

Aus dem Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie
(Direktor Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen)

**Intravitale Beurteilung des Verhaltens von neutrophilen
Granulozyten innerhalb des murinen Nierenglomerulus im
Rahmen der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis unter
besonderer Berücksichtigung der pathophysiologischen Rolle
des Komplementsystems**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Sven Heiko Loosen

aus Düsseldorf

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen
 Universitätsprofessor Dr. med. Tom Lüdde

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	ANCA-assoziierte Glomerulonephritis	1
1.1.1	Einleitung und Klassifikation	1
1.1.2	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper	3
1.1.3	Epidemiologie.....	4
1.1.4	Pathogenese.....	5
1.1.5	Klinische Präsentation	10
1.1.6	Therapie und Prognose	12
1.2	Komplementsystem	15
1.3	ANCA-assoziierte GN und das Komplementsystem	17
1.4	Konfokale Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie.....	22
1.4.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	22
1.4.2	Multiphotonenmikroskopie	23
1.4.3	Konfokale Mikroskopie.....	27
1.5	Zielsetzung.....	29
2	Material und Methoden.....	30
2.1	Materialliste	30
2.2	Versuchstiere.....	32
2.3	Herstellung von anti-MPO-Antikörpern	32
2.3.1	Synthese von MPO-in 32Dcl3-Zellen	33
2.3.2	Immunisierung von <i>Mpo</i> ^{-/-} Mäusen.....	35
2.3.3	Blutgewinnung und Aufreinigung von anti-MPO-AK aus Mausserum	36
2.3.4	Herstellung von anti-MPO-AK unter Verwendung des p52 MPO-Peptids.....	37
2.4	Unilaterale Ureterligation (UUO)	41
2.4.1	Operatives Vorgehen der UUO.....	41
2.5	Katheterisierung der Halsvene	44
2.6	Präparation der Niere.....	45
2.7	Vorbereitung zur intravitalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie	48
2.8	Kardiale Punktion	50
2.9	Digitale Auswertung des Bildmaterials	50
2.10	Komplementfaktor C3-ELISA	54
2.11	Statistische Auswertung der Messwerte	55

3	Ergebnisse	56
3.1	Adhäsion und Migration neutrophiler Granulozyten in unbeschädigten glomerulären Kapillaren	56
3.2	Anti-MPO-Antikörper führen in C57BL6/J Mäusen zu einer gesteigerten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus.....	59
3.3	Anti-MPO-Antikörper führen in LysM-EGFP-Mäusen zu einer gesteigerten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus.....	63
3.4	Die Depletion des Komplementsystems mittels CVF führt im anti-MPO-GN-Model zu einer Reduktion der durch anti-MPO-AK gesteigerten Verweildauer.....	67
3.5	Die anti-MPO-induzierte Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im murinen Nierenglomerulus ist C5aR abhängig.....	72
3.6	Anti-MPO-Antikörper führen zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten	76
3.7	Der anti-MPO-induzierte Anstieg der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten nimmt mit fortschreitender Zeit zu.....	80
4	Diskussion.....	82
4.1	Neutrophile Granulozyten adhären und migrieren auch im physiologischen Nierenglomerulus	82
4.2	Anti-MPO-Antikörper führen im Rahmen der ANCA-assoziierten GN zu einer erhöhten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten	84
4.3	Die anti-MPO-induzierte Steigerung der Verweildauer von Neutrophilen ist vom Komplementsystem abhängig.....	87
4.4	Anti-MPO-Antikörper führen im Rahmen der ANCA-assoziierten GN zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten.....	91
4.5	Ausblick	92
4.5.1	Auswirkung der Komplementinhibition auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies.....	92
4.5.2	Selektive Blockierung von Adhäsionsmolekülen.....	92
4.5.3	<i>Neutrophil extracellular traps</i> (NET).....	93
5	Zusammenfassung	94
6	Literatur.....	96
	Abbildungsverzeichnis	111
	Danksagung	113
	Erklärung zur Datenaufbewahrung (§5 Abs.1)	114
	Erklärung über den Eigenanteil	115
	Curriculum vitae	116

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
aa	<i>Amino acid</i>
AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitis
AG	Antigen
AK	Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C5aR	C5a-Rezeptor
CaCl ₂	Calciumchlorid
c-ANCA	Cytoplasmatische ANCA
CRP	C-reaktives Protein
CSS	Churg-Strauss-Syndrom
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cw	<i>Continuous wave</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DHE	Dihydroethidium (Hydroethidin)
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ESRD	<i>End stage renal disease</i>
FCA	<i>Freund's complete adjuvans</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FIA	<i>Freund's incomplete adjuvans</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i>
GBM	<i>Glomerula basement membrane</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (engl. für Meerrettichperoxidase)
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IL-3	Interleukin-3
IMDB	<i>Iscoe's modified dulbecco's medium</i>

KG	Körpergewicht
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen</i> (auch: CD11b, CR3)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MnCl ₂	Manganchlorid
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MPM	Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie
MPO	Myeloperoxidase
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NCGN	<i>Necrotising crescentic glomerulonephritis</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
OVA	Ovalbumin
p-ANCA	Perinukleäre ANCA
PAS	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PI*Z	Proteinase Inhibitor Z-Allel
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	<i>Polymorphonuclear neutrophil</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPGN	<i>Rapidly progressive glomerulonephritis</i>
S. aureus	Staphylokokkus aureus
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SVV	<i>Small vessel vasculitis</i> (engl. für Kleingefäßvaskulitiden)
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TPO	Thyreoperoxidase
WG	Wegener Granulomatose

1 Einleitung

1.1 ANCA-assoziierte Glomerulonephritis

1.1.1 Einleitung und Klassifikation

Die ANCA-assoziierte Glomerulonephritis, die ich im Rahmen meiner Dissertation untersuchte, stellt kein eigenständiges, klar von anderen Erkrankungen abgrenzbares Krankheitsbild dar. Vielmehr handelt es sich um eine Form der Glomerulonephritis, die im Zusammenhang mit verschiedenen systemischen Vaskulitiden, jedoch auch davon unabhängig, auftreten kann. Histopathologisch führt die ANCA-assoziierte GN zu einer rapid-progressiven Glomerulonephritis (engl. *rapidly progressive glomerulonephritis*, RPGN), die in der englischen Literatur aufgrund der histologischen Veränderungen im renalen Glomerulus auch häufig als *crescentic glomerulonephritis* (engl. bogenförmig, halbmondförmig) oder auch als *necrotizing crescentic glomerulonephritis* (NCGN) bezeichnet wird.

Rapid-progressive Glomerulonephritis (RPGN)

Die RPGN ist die Beschreibung einer schweren morphologischen Schädigung des Glomerulus, die im Zuge vieler verschiedener Krankheiten auftreten kann. Ursächlich steht die Ruptur einer glomerulären Kapillare im Vordergrund. Diese führt zur Ausschüttung von humoralen und zellulären Entzündungsmediatoren in die Bowman-kapsel, was wiederum in einer Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten sowie einer Invasion von Monozyten und Makrophagen resultiert und somit zu der Bildung des histologisch sichtbaren Halbmondes (engl.: *crescent*) führt (Couser, 1988; Jennette and Falk, 1998).

Abbildung 1 zeigt das typische Erscheinungsbild eines betroffenen Glomerulus verglichen mit einer physiologischen Aufnahme.

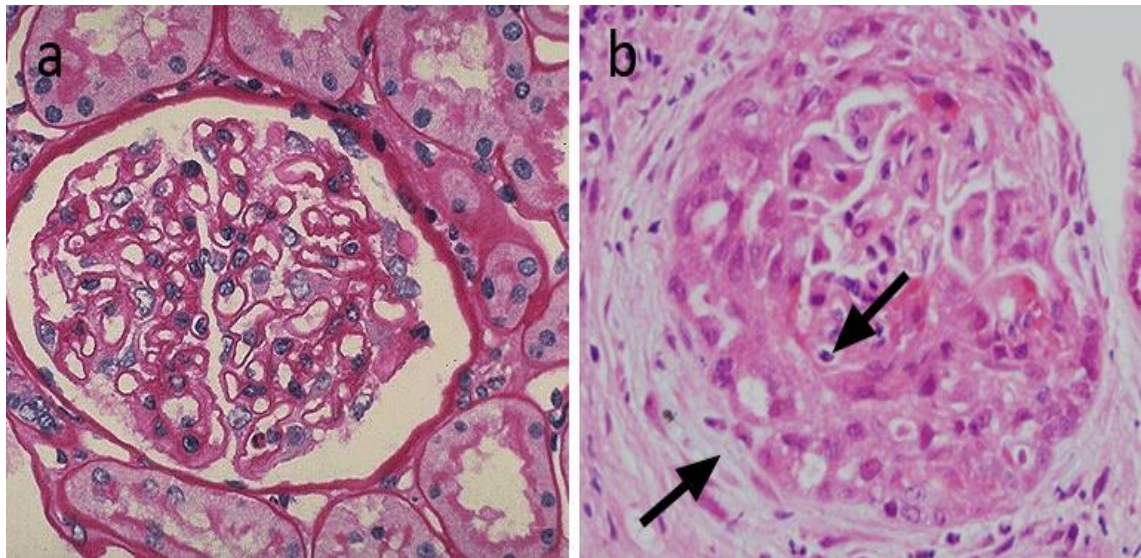


Abb. 1: Histologischer Vergleich eines physiologischen Glomerulus (**a**, PAS-Färbung) und eines bogenförmig veränderten (*crescentic*) Glomerulus (**b**, HE-Färbung) im Rahmen einer RPGN (die beiden schwarzen Pfeile grenzen den halbmondförmigen *crescent* ein; Quelle: **a** Fig.1 aus (Ramidi et al., 2011), **b** Fig. 2 aus (Lote et al., 2013)).

Anhand von immunpathologischen Befunden lässt sich die rapid-progressive Glomerulonephritis in drei verschiedene Untergruppen einteilen. Man unterscheidet zwischen einer anti-GBM-Antikörper Glomerulonephritis (GN), einer Immunkomplex GN und der pauci-Immunkomplex GN. Letztere ist in der Mehrzahl der Fälle mit zirkulierenden Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) assoziiert und wird daher oft als **ANCA-assozierte Glomerulonephritis** bezeichnet (Couser, 1988; Jennette and Thomas, 2001).

Die ANCA-assozierte Glomerulonephritis, die im Mittelpunkt dieser Dissertation steht, tritt in den meisten Fällen, in Kombination mit anderen organspezifischen Begleiterscheinungen, im Rahmen von systemischen Kleingefäßvaskulitiden (engl.: *small vessel vasculitis*, SVV) auf. In manchen Fällen präsentiert sie sich jedoch auch als isolierte renale Erkrankung und wird dann als idiopatische ANCA Glomerulonephritis (engl.: *renal limited disease*) bezeichnet (Jennette and Falk, 1998; Jennette and Thomas, 2001; Jennette et al., 1994).

Die drei systemischen SVV, die mit einer ANCA-assozierten GN einhergehen, wurden 1994 in der so genannten Chapel Hill Nomenklatur (Jennette et al., 1994) klassifiziert.

Man unterscheidet die Wegener Granulomatose¹ (WG), die Mikroskopische Polyangiitis (MPA) sowie das Churg Strauss-Syndrom (CSS) (Falk and Jennette, 2010; Jennette et al., 1994). Bei der Mikroskopischen Polyangiitis liegt eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen Gefäße (Kapillaren, Venolen, Arteriolen) vor, die sich ohne das Auftreten von Asthma oder der Bildung von Granulomen und mit keiner bzw. einer minimalen Ablagerung von Immunkomplexen präsentiert. Sehr häufig kommt es zu der beschriebenen nekrotisierenden Glomerulonephritis. Zudem lässt sich oftmals eine nekrotisierende Arteriitis der mittelgroßen Arterien sowie eine pulmonale Kapillaritis finden (Falk and Jennette, 2010; Jennette et al., 1994). Die Wegener Granulomatose ist von einer nekrotisierenden granulomatösen Entzündung mit Beteiligung des Atemtraktes und MPA-ähnlichen Läsionen geprägt. Es liegen weder Asthma noch eine Bluteosinophilie vor. Das Churg Strauss-Syndrom gleicht in seinem Ausprägungsmuster sehr der Wegener Granulomatose, präsentiert sich jedoch mit Asthma und einer Eosinophilie des Blutes (Falk and Jennette, 2010).

1.1.2 Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper

Die Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörper, die in Patienten mit ANCA-assoziiierter GN nachzuweisen sind, weisen eine Spezifität gegen die Myeloperoxidase (MPO) oder die Proteinase 3 (PR3) auf, die sich in den primären, oder auch azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten sowie Peroxidase-positiven Lysosomen von Monozyten befinden (Jennette and Falk, 1998). Die Myeloperoxidase ist ein 140 kDa schweres Enzym, welches die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chloridionen zu Wasser und Hypochloridionen katalysiert. Die entstehende hypochlorige Säure ist ein hochpotenter antimikrobieller Wirkstoff (Radice and Sinico, 2005). Zudem wird vermutet, dass die Myeloperoxidase an der oxidativen Modifikation von LDL beteiligt ist und somit eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Artherosklerose spielt

¹ Aufgrund der kürzlich bekannt gewordenen nationalsozialistischen Vergangenheit des Namensgeber Dr. F. Wegener, der im Jahre 1936 die Krankheit erstmalig beschrieb, wird zunehmend von dem Namen Wegener Granulomatose Abstand genommen (Feder, 2008). Die Fachgesellschaften *American College of Rheumatology* und *American Society of Nephrology* empfehlen die Verwendung der Bezeichnung Granulomatose mit Polyangiitis (engl. *granulomatosis with polyangiitis*) (Falk et al., 2011). Aus Gründen der Verständlichkeit und einer besseren Übereinstimmung mit der relevanten Literatur wird die Erkrankung in dieser Dissertation jedoch weiterhin als Wegener Granulomose beschrieben.

(Klebanoff, 2005). Die Proteinase 3 ist eine 29-30 kDa schwere Serin-Protease, die in einem inflammatorischen Milieu primär von neutrophilen Granulozyten sekretiert wird und in der Lage ist Kollagen, Proteoglykane und anderes Bindegewebe zu degradieren (Wieslander and Wiik, 1994). Des Weiteren besitzt die PR 3 ebenfalls eine nicht proteolytische antimikrobielle Funktion gegen Bakterien und Pilze (Gabay et al., 1989).

Die zuvor beschriebenen systemischen Kleingefäßvaskulitiden (SSV) sind jeweils durch ein recht spezifisches ANCA-Profil charakterisiert. Während die Wegener Granulomatose primär durch das Auftreten von PR3-ANCA gekennzeichnet ist, finden sich im Rahmen der mikroskopischen Polyangiitis vorwiegend MPO-ANCAs. Der jeweils andere Antikörpertyp ist in einem geringen Umfang nachweisbar. Das Churg-Strauss-Syndrom und die idiopathische *crecentic* Glomerulonephritis weisen ebenfalls überwiegend MPO-ANCAs auf (Falk and Jennette, 2010; Kallenberg, 2011).

ANCAs können aufgrund der zellulären Lokalisation ihres Antigens weiterhin in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Mithilfe des indirekten Immunfluoreszenztests von ethanolfixierten Neutrophilen lässt sich ein cytoplasmatisches Färbungsmuster (c-ANCA) von einem perinuklearen Färbungsmuster (p-ANCA) unterscheiden (Radice and Sinico, 2005). Das cytoplasmatische Färbungsmuster ist stark mit Antikörpern gegen die PR3 assoziiert (Jennette et al., 1990). Das perinukleare Färbungsmuster lässt sich hingegen hauptsächlich mit den Antikörpern, die gegen die Myeloperoxidase gerichtet sind, in Verbindung bringen (Falk and Jennette, 1988).

1.1.3 Epidemiologie

Die Datenlage bezüglich des epidemiologischen Auftretens der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis ist sehr dürftig und bedarf weiterer Studien. Braun et al. fanden in ihrer fünfjährigen Arbeit im Zeitraum von 2003 bis 2008 in Norddeutschland eine Inzidenz von 5,4 Fällen pro 1 Million Einwohner pro Jahr (Braun et al., 2011). In Großbritannien lag die Inzidenz von 1986-1996 bei durchschnittlich 3,9 Patienten pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr (Hedger et al., 2000). Dabei war ein stetiger Anstieg der Inzidenz mit zunehmendem Alter zu verzeichnen. Covic et al. beobachteten eine Auftretenswahrscheinlichkeit von 3,3 Fällen pro eine Million Einwohner pro Jahr (Covic et

al., 2006). Die Krankheitsinzidenz ist zwischen den Geschlechtern weitestgehend ausgeglichen. Einige Autoren berichten von einer minimal höheren Auftretenswahrscheinlichkeit bei Männern (Harper and Savage, 2005; Pettersson et al., 1995).

1.1.4 Pathogenese

Die Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis sowie die Pathogenese anderer ANCA-assoziiierter Vaskulitiden (AAV) spiegeln ein multimodales Entstehungskonzept wider, welches sich aus mehreren, zum Teil noch nicht ausreichend erforschten, Komponenten zusammensetzt.

Die eigentliche Ursache für das Auftreten der Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörper ist noch nicht vollkommen verstanden. Da es sich sowohl bei der Myeloperoxidase als auch der Proteinase 3 um endogene, körpereigene Proteine handelt, erklärt sich die Bildung von Autoantikörpern über den Verlust der Selbsttoleranz. In den letzten Jahren ist die Theorie der Autoantigenkomplementarität entstanden (Pendergraft et al., 2004). Die These der Autoantigenkomplementarität postuliert, dass ein Protein, welches komplementär (*antisense*) zu dem eigentlich Autoantigen (*sense*) ist, zu einer Immunreaktion führt und es zu einer Kreuzreaktion der entstehenden anti-*antisense* Antikörper mit dem Autoantigen kommt (Pendergraft et al., 2004). Die Herkunft des komplementären Antigens könnte entweder in Form einer abweichenden komplementären Transkription endogener Natur sein oder als ein komplementäres Antisenseprotein, das gegen die antimikrobielle Eigenschaften von MPO und PR3 gerichtet ist, durch ein Pathogen in den Organismus eingebacht worden sein (Falk and Jennette, 2010). Weiterhin scheinen dendritische Zellen (DC), die über die Aufnahme von nekrotischen und apoptotischen Neutrophilen mit dem MPO-Antigen in Kontakt kommen, durch einen inflammatorischen Stimulus zur Ausreifung angeregt zu werden. Die reifen DC sind anschließend besser in der Lage B-Zellen zur AK Produktion zu stimulieren und es kommt zu einem Versagen der peripheren Toleranz (Clayton et al., 2003).

Pathogene Rolle Anti-Neutrophiler cytoplasmatischer Antikörper

Die Assoziation von Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern mit der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis und den systemischen Vaskulitiden ist ausgiebig beschrieben worden (Falk and Jennette, 1988; Jennette and Falk, 1997; van der Woude et al., 1985). Es stellt sich allerdings die Frage, ob ANCAs wirklich eine pathogene Rolle spielen und direkt an der Krankheitsentstehung beteiligt sind, oder ob sie vielmehr als eine im Rahmen der Krankheit auftretende Begleiterscheinung anzusehen sind.

Viele klinische Beobachtungen stellen eine wichtige Rolle von ANCAs in der Pathophysiologie der ANCA-assoziierten Vaskulitiden als sehr wahrscheinlich dar. Ein Fallbericht aus dem Jahr 2004 beschreibt die diaplazentare Übertragung von anti-MPO-Antikörpern, die bei dem Neugeborenen sekundär zu einer Mikroskopischen Polyangiitis mit pulmonalen Hämorrhagien und einer renalen Schädigung führten (Bansal and Tobin, 2004). Das Kind präsentierte sich am zweiten Lebenstag mit erhöhten anti-MPO-Titern und konnte durch Glucocortikoide und eine Plasmapheresetherapie vollständig geheilt werden.

Eine weitere klinische Beobachtung, die für die Pathogenität von ANCAs spricht, ist die positive Korrelation von ANCA-Titern im Serum und der Rückfallrate von Patienten. Zwei Studien konnten in Patienten mit Wegener Granulomatose zeigen, dass ein Rückfall nach primärer Krankheitsremission mit einem signifikanten Anstieg der ANCA-Titer im Serum einhergeht (Boomsma et al., 2000; Tervaert et al., 1989). Der Serumtiter von c-ANCAs und anti-PR3 Antikörpern in Bezug auf die Therapie der aktiven SVV korreliert zudem positiv mit dem generellen Risiko eines Rückfalls im weiteren Krankheitsverlauf (Sanders et al., 2006).

Auch der neuartige erfolgreiche Therapieansatz mit Rituximab in der Behandlung von ANCA-assoziierten Vaskulitiden legt eine Beteiligung von Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern in der Pathogenese nahe. Rituximab ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper, der gegen das Oberflächenprotein CD20, welches primär auf B-Zellen exprimiert wird, gerichtet ist. B-Zellen werden somit zerstört und die Bildung von Antikörpern (u.a. ANCAs) wird unterbrochen (Reff et al., 1994). Zwei Arbeitsgruppen offenbarten kürzlich die Wirksamkeit von Rituximab in Patienten mit

schwerer SVV und untermauerten damit die Pathogenität von ANCA (Jones et al., 2010; Stone et al., 2010).

Es gibt jedoch auch gegenteilige klinische Studien, die diesen Beobachtungen widersprechen. Finkielman et al. untersuchten 156 Patienten mit Wegener Granulomatose im Hinblick auf die anti-PR3-Titer und die Krankheitsaktivität. Sie konnten keine Assoziation von erhöhten ANCA-Titern und einem Rückfall feststellen. Auch eine kürzere Remissionsdauer korrelierte nicht mit einem niedrigen Titer an ANCA (Finkielman et al., 2007).

Neben klinischen Studien trugen auch eine Vielzahl von experimentellen Untersuchungen in vitro und in vivo zum Verständnis der pathophysiologischen Bedeutung von ANCA bei. Bereits in den 1990-Jahren fanden Falk et al. in einem in vitro Experiment heraus, dass ANCA in der Lage sind humane Granulozyten zum oxidativen Burst und zur Degranulation zu aktivieren (Falk et al., 1990b). Xiao et. al etablierten ein in vivo Mausmodell, in dem der passive Transfer von anti-MPO-Antikörpern in immunkompetente Wildtypmäuse zur Induktion einer Glomerulonephritis führte. Auch die Administration von Splenozyten aus *Mpo*^{-/-} Mäusen, die zuvor mit MPO-immunisiert wurden, führten in *Rag2*^{-/-} Mäusen zur Ausbildung einer schweren NCGN, die dem humanen Krankheitsbild ausgesprochen ähnlich ist (Huugen et al., 2005; Xiao et al., 2002, 2005). Ein vergleichbares Tiermodell in Ratten, bei dem humane anti-MPO-Antikörper durch eine Kreuzreaktion mit dem murinen MPO-reagieren und zu einer Krankheitsinduktion führen, unterstützt die pathogene Wirkung der anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörper (Little et al., 2005).

Die aufgeführten klinischen und experimentellen Beobachtungen legen eine Beteiligung von ANCA in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitiden nahe. Aufgrund von gegenteiligen Feststellungen, in denen ANCA eher als eine Begleiterscheinung ohne pathophysiologischen Hintergrund angesehen werden, sind weitere Untersuchungen notwendig um die Pathogenität eindeutig zu belegen.

Genetische und umweltbedingte Faktoren

Auch genetische Komponenten sind im Rahmen der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis beschrieben worden. Wenngleich eine klassische monogenetische Kompo-

nente als äußerst unwahrscheinlich anzusehen ist, und familiäre Häufungen von ANCA-assoziierten Vaskulitiden sehr selten sind (Hay et al., 1991; Hull et al., 2000; Stoney et al., 1991), so lässt sich die Erkrankung jedoch mit verschiedenen Genpolymorphismen assoziieren (Lionaki et al., 2007). Neben Genen wie PTPN22 (Jagiello et al., 2005), die im Allgemeinen mit einer vermehrten Neigung zu Autoimmunkrankheiten korrelieren, findet sich in AAV Patienten häufig eine Heterogenie für das PI*Z Allel des α_1 -Antitrypsin-Gens (Elzouki et al., 1994; Esnault et al., 1993).

Neben genetischen Faktoren scheinen auch Umweltfaktoren in der Pathogenese der ANCA GN von Bedeutung zu sein. In epidemiologischen Studien konnte eine Exposition von Silikaten als begünstigender Faktor für die Ausprägung einer ANCA-SVV bestätigt werden (Hogan et al., 2001). Dauer und Grad der maximalen Silikateexposition können in Patienten mit einer ANCA Glomerulonephritis als primärer Risikofaktor angesehen werden (Hogan et al., 2007). Zudem stehen Medikamente wie das in der antithyroidalen Therapie eingesetzte Propylthiouracil im Verdacht eine ANCA-SVV auszulösen. Meistens handelt es sich dabei um anti-MPO-Antikörper geprägte SVV, was aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten der Myeloperoxidase und der TPO nachvollziehbar ist (ten Holder et al., 2002).

In letzter Zeit häufen sich zudem Beobachtungen, die eine mikrobiell-infektiöse Komponente in der Entstehung von AAV nahe legen. Für diese These spricht zum einen, dass die Mehrzahl von Patienten vor Manifestation der AAV von einer grippeähnlichen Symptomatik berichten (Jennette and Falk, 1998). Des Weiteren weisen chronische, nasale Träger von *Staphylococcus aureus* eine erhöhte Rückfallrate nach erstmaliger Remission der AAV auf (Stegeman et al., 1994). Die präventive antimikrobielle Therapie reduziert zudem das Risiko eines Krankheitsrückfalles (Kallenberg et al., 1996; Stegeman et al., 1996). Der genaue Mechanismus wie *S. aureus* die Pathogenese ANCA-assoziiierter Vaskulitiden beeinflusst ist noch nicht hinreichend erforscht. Es wird vermutet, dass das Bakterium im Körper zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine führt, die wiederum in der Lage sind neutrophile Granulozyten für die Aktivierung durch ANCAs zu sensibilisieren (Popa et al., 2002).

Die heute geltende Vorstellung der eigentlichen Schädigung und Zerstörung von glomerulären Strukturen im Rahmen der ANCA-assoziierten GN ist zusammenfassend in Abbildung 2 dargestellt.

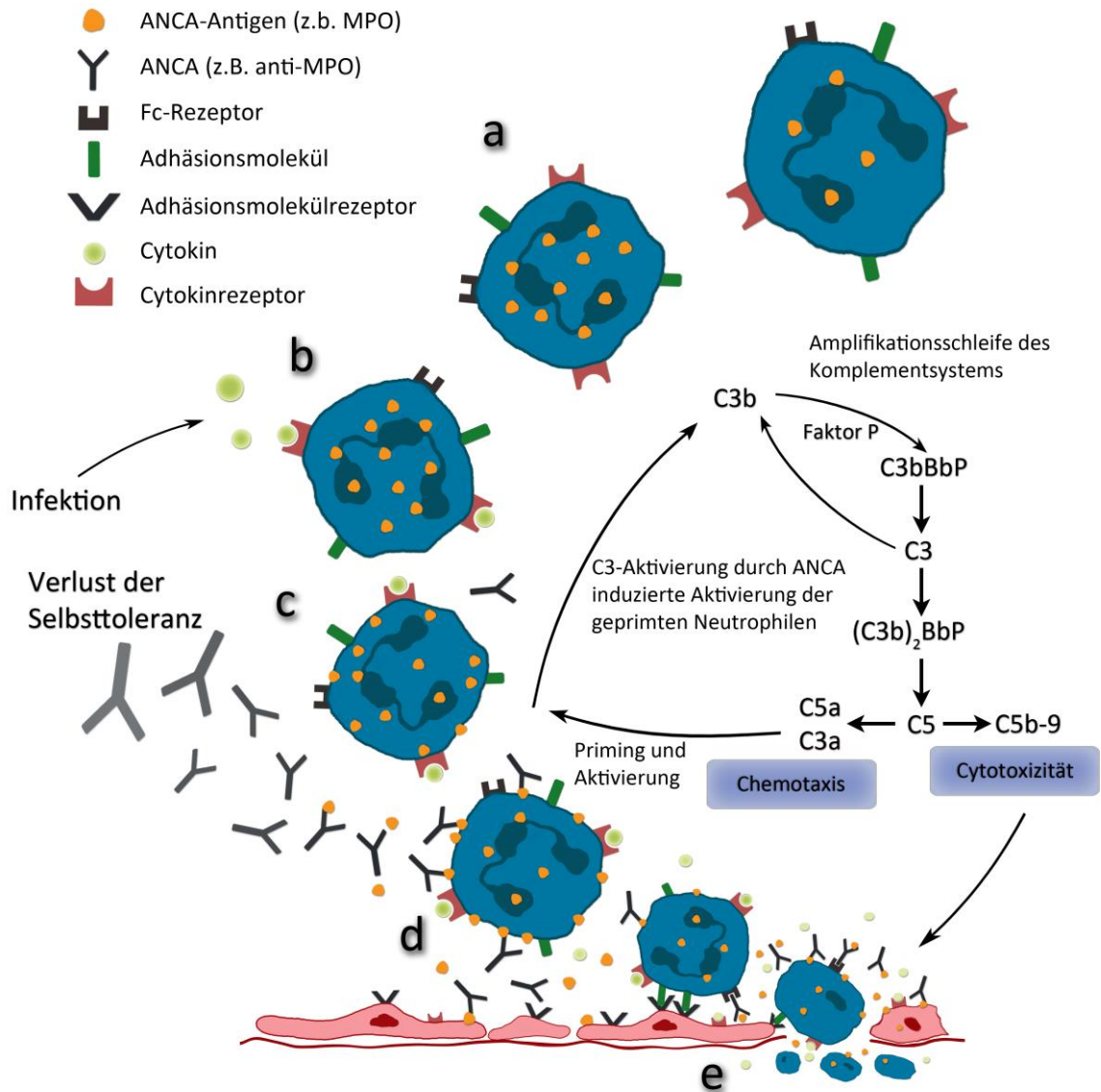


Abb. 2: Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis **a** Eine abweichend epigenetisch kontrollierte verstärkte Expression von MPO und PR3 führt zu einer gesteigerten Antigenkonzentration in neutrophilen Granulozyten **b** Beispielsweise durch eine Infektion verursacht, kommt es zu vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen (TNF- α , LPS, C5a) die an Cytokinrezeptoren der neutrophilen Granulozyten binden können **c** Die Bindung der Cytokine führt zum *priming* der Neutrophilen und es kommt zur Externalisierung des Antigens (MPO und PR3) an die Zelloberfläche **d** ANCAs können nun über Fab'- und Fc-Rezeptoren an die neutrophilen Granulozyten binden und diese aktivieren. Die aktivierten Neutrophilen sind in der Lage die Amplifikationsschleife des alternativen Komplementsystemwegs zu initiieren und sorgen somit für eine weitere chemotaktische Rekrutierung sowie für eine zusätzliche Aktivierung von neutrophilen Granulozyten **e** Destruktive Faktoren, die von aktivierten Neutrophilen ausgeschüttet und durch das Komplementsystem generiert wurden, führen zu einer inflammatorischen Zerstörung des glomerulären Endothels (Quelle: Eigene Kreation mit Adobe Photoshop 5.1, verändert nach (Falk and Jennette, 2010; Xiao et al., 2007)).

1.1.5 Klinische Präsentation

Die klinische Präsentation von Patienten, die an einer ANCA-assoziierten Glomerulonephritis leiden, ist je nach Stärke der Erkrankung sehr unterschiedlich ausgeprägt. Sie kann von einer schmerzlosen Hämaturie bis hin zu einer rapid progressiven Glomerulonephritis (RPGN) reichen (Lionaki et al., 2007). Beim Krankheitsbild der rapid progressiven GN kommt es zu einem raschen Verlust der renalen Funktion bei sonographisch normal großen Nieren (Renz-Polster and Krautzig, 2008). Die Patienten weisen oft ein blasses Hautkolorit, eine schwere Hypertonie sowie eine ausgeprägte Proteinurie auf. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und das CRP im Blutserum sind oftmals erhöht (Herold, 2011).

Die häufigsten Laborbefunde sind ein erhöhtes Serumkreatinin, ein Urinsediment mit dysmorpher Erythrozyturie und eine Proteinurie (Lionaki et al., 2007). Neben den nierenspezifischen Symptomen kommt es bei vielen Patienten weiterhin zu allgemeinen Krankheitszeichen wie subfebrilen Temperaturen, Myalgien, Müdigkeit, Gewichtsreduktion und Athralgien (Falk et al., 1990a; Jennette and Falk, 1997). Häufig wird von einer prodromalen grippeartigen Symptomatik vor der eigentlichen vaskulär renalen Manifestation berichtet, die verstärkt im Winter auftritt (Falk et al., 1990a; Savage et al., 1985).

In den meisten Fällen präsentiert sich die ANCA-assoziierte Glomerulonephritis neben den renalen Manifestationen und der Allgemeinsymptomatik mit systemischen Anzeichen einer Kleingefäßvaskulitis (SVV). Woodworth et al. bestätigten, dass ca. 75 % aller Patienten mit einer ANCA-assoziierten GN zusätzliche systemische Manifestationen einer SVV bei Vorstellung oder im klinischen Verlauf aufwiesen (Woodworth et al., 1987). Die drei Hauptvertreter der SSVs, bei denen eine renale Beteiligung und weitere systemische Manifestationen auftreten, sind, wie bereits erwähnt, die Wegener Granulomatose (WG), die mikroskopische Polyangiitis (MPA) und das Churg-Strauss-Syndrom (CSS). Bei einer Studienkollektiv von 350 Patienten mit einer ANCA positiven pauci-immun crescentic Glomerulonephritis wiesen 56 % eine MPA, 17 % ein WG und 25 % eine idiopathische GN auf (Hogan et al., 2005).

Die mikroskopische Polyangiitis äußert sich neben der renalen Manifestation vor allem durch muskuloskelettale Erscheinungen wie Athralgien und Myalgien, Hautveränderungen und einer pulmonalen Vaskulitis mit diffusen alveolären Hämorrhagien (Herold, 2011; Savage et al., 1985). Bei den Hautveränderungen stehen subkutane Knötchen und eine palpable Purpura vorwiegend der unteren Extremitäten im Vordergrund. Die renale Symptomatik findet sich in ca. 90 % der Krankheitsfälle (Lionaki et al., 2007)

Bei der Wegener Granulomatose steht klinisch zunächst der obere Respirationstrakt im Mittelpunkt. Primär kommt es zu einer chronischen Rhino- und Sinusitis, Ulzerationen im Oropharynx und Lungenrundherde mit eventuellen Einschmelzungen (Herold, 2011; Renz-Polster and Krautzig, 2008). Die Beteiligung des oberen Respirationstraktes findet sich bei ca. 90 % der Patienten (Fauci et al., 1983). Häufig geht diese Phase der Erkrankung mit knorpelartigen Deformitäten und der Ausbildung einer Sattelnase einher (Lionaki et al., 2007; Renz-Polster and Krautzig, 2008). Im weiteren Verlauf kommt es zu einem vaskulitischen Generalisationsstadium, das mit alveolären Hämorrhagien und Hämoptoen sowie der rapid-progressiven Glomerulonephritis einhergehen kann (Herold, 2011). Eine renale Beteiligung im Rahmen der Wegener Granulomatose tritt in ca. 70-80 % auf (Lionaki et al., 2007; Renz-Polster and Krautzig, 2008)

Patienten mit einem Churg-Strauss-Syndrom präsentieren sich häufig mit allergischem Asthma, flüchtigen Lungeninfiltraten sowie mit einer kardialen Beteiligung (Abril, 2011; Herold, 2011). Außerdem findet sich eine Eosinophilie im Blut und in den von der Krankheit befallenen Organen. Die renale Beteiligung beim CSS steht primär nicht im Vordergrund. Zeichen einer renalen Abnormalität sind in ca. 27 % der Patienten zu finden. Eine RPGN findet sich nur bei 14 % (Sinico et al., 2006).

1.1.6 Therapie und Prognose

Das primäre Ziel in der Therapie der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis ist eine Remission des Krankheitszustandes mit Stabilisierung oder Verbesserung der Nierenfunktion. Diese kann anhand von verschiedenen Parametern wie dem Serumkreatinin, einer Verbesserung der Hämaturie oder einer Reduktion extrarenaler Manifestationen der systemischen Vaskulitis beurteilt werden (Nachman and Hogan, 1996). Der bisherige Goldstandard der ANCA-assoziierten Glomerulonephritistherapie ist eine Kombination von Corticosteroiden und Cyclophosphamid (Belmont, 2006; Falk et al., 1990a; Fauci et al., 1983).

Die Therapie beginnt mit der initialen Gabe von 7 mg/kg KG Methylprednisolon i.v. an drei aufeinanderfolgenden Tagen gefolgt von einer oralen Gabe von 1 mg/kg KG Prednison für weitere vier Wochen und einer sich anschließenden Reduktion des Prednisons über drei bis fünf Monate (Lionaki et al., 2007). Cyclophosphamid wird entweder monatlich mit einer Dosis von 0.5 g/m² (gefolgt von einer Steigerung auf bis zu 1 g/m²) intravenös oder täglich mit einer Dosis von initial 2 mg/kg KG oral über einen Zeitraum von sechs bis zwölf Monaten verabreicht. Die Therapiedosis wird kontinuierlich an die Leukozytenzahl des Patienten angeglichen (Falk et al., 1990a). Im Hinblick auf das Erreichen einer Remission besteht kein Unterschied zwischen der intravenösen und oralen Cyclophosphamidgabe. Die kumulative Medikamentendosis ist in der intravenösen Therapieform jedoch geringer und somit weniger toxisch (Falk et al., 1990a; Groot and Harper, 2009).

Bei besonders schweren Verlaufsformen der ANCA-assoziierten GN kann zusätzlich zur beschriebenen Therapie auf eine Plasmapherese zurückgegriffen werden. Hierbei handelt es sich um ein therapeutisches Verfahren, bei dem die pathogenen Antikörper aus dem Blutplasma herausgefiltert werden und der Patient somit vor schweren Organschädigungen bewahrt wird. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Patienten, die sich initial mit einem Serumkreatininwert von > 500 µmol/L (entspricht einem Wert von > 5,66 mg/dL) präsentieren, von einer zusätzlichen Plasmapheresetherapie profitieren (de Lind van Wijngaarden et al., 2006; Pusey et al., 1991). Auch bei Patienten, die im Rahmen ihrer Vaskulitis eine pulmonale Hämorrhagie aufweisen, verbessert die Therapieerweiterung mittels Plasmapherese die Prognose signifikant

(Klemmer et al., 2003). Somit lassen sich eine schwere renale Schädigung mit einem Serumkreatinin von $> 500 \mu\text{mol/L}$ sowie eine pulmonale Hämorrhagie als Indikation für eine zusätzliche Plasmapheresetherapie zusammenfassen.

In persistenten Fällen der ANCA-assoziierten GN, die nicht auf eine der Standardtherapien ansprechen, können weitere medikamentöse Optionen zur Behandlung in Erwägung gezogen werden. Eine Pilotstudie zeigte, dass die Therapie mit Mycophenolat-Mofetil eine angemessene Therapiealternative in nicht lebensbedrohlichen Fällen von resistenten Vaskulitiden darstellt (Joy et al., 2005). Eine weitere Option bietet der Einsatz von Rituximab, einem monoklonalen Antikörper, der gegen CD20 gerichtet ist. Erste Studien konnten in ANCA-assoziierten SVV eine Ansprechrate von über 90 % nachweisen (Flossmann et al., 2006). Zwei prospektiv randomisierte Studien zeigten kürzlich, dass eine anti-CD20 Therapie mit Rituximab im Hinblick auf die Krankheitsremission zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Kombination von Corticosteroiden und Cyclophosphamid führt (Jones et al., 2010; Stone et al., 2010). Das Nebenwirkungsprofil der Rituximabtherapie wies im Vergleich zur Standardtherapie sogar weniger Komplikationen auf. Da jedoch das Bedürfnis der individuellen Anpassung der Therapie aufgrund von Rückfällen und Infektionen noch sehr groß ist, ist diese Therapieoption noch als kritisch zu betrachten (Niles, 2011).

Eine exakte Vorhersage der Prognose und des Krankheitsverlaufs von Patienten mit einer ANCA-assoziierten Glomerulonephritis ist ausgesprochen schwierig. Die Standardtherapie mit Glucocorticoiden und Cyclophosphamid führt bei ca. 85 % der Patienten zu einer erfolgreichen Remission (Groot and Harper, 2009; Hogan et al., 2005). In 11 % bis 57 % der Fälle kommt es im Krankheitsverlauf nach Remission zu einem Rückfall, der wiederum einer immunsuppressiven Therapie bedarf (Hogan et al., 2005). Aufgrund der hohen Nebenwirkungsrate einer immunsuppressiven Therapie ist stets individuell abzuwägen, ob eine medikamentöse Erhaltungstherapie zur Prävention eines Rückfalls indiziert ist. Jayne et al. fanden heraus, dass der Austausch von Cyclophosphamid durch Azathioprin nach Remission zu keinem Anstieg der Rückfallraten führt und als eine schonungsvollere Therapieoption zu sehen ist (Jayne et al., 2003).

Es gibt verschiedene prognostische Marker, die mit einer höheren Mortalität bzw. einer erhöhten Rückfallrate assoziiert sind. Hogan et al. bewiesen, dass Patienten, die mit einer pulmonalen Hämorrhagie vorstellig wurden, ein fast neunfach erhöhtes relatives Sterberisiko aufwiesen (Hogan et al., 1996). Das Vorliegen von cytoplasmatischen ANCAs (c-ANCA) ist im Vergleich zu perinuklearen ANCAs (p-ANCA) mit einem knapp vierfach erhöhten Sterberisiko assoziiert (Hogan et al., 1996). Das weibliche Geschlecht, schwarze Hautfarbe und eine ausgeprägte Form der Nierenerkrankung sind assoziiert mit der Resistenz gegen einen initialen Versuch der Remissionseinleitung (Hogan et al., 2005).

Trotz der effektiven Therapiebemühungen im Rahmen einer ANCA-assoziierten GN führt die Krankheit bei ca. einem Fünftel der Patienten zum terminalen Nierenversagen (ESRD) (Allen et al., 1998; Nachman and Hogan, 1996; Weidanz et al., 2007). Zudem greift die immunsuppressive Therapie nicht mit einem kausalen Ansatz an der Pathogenese der ANCA-assoziierten GN an, sondern versucht vielmehr durch eine Unterdrückung des Immunsystems die entstehenden Symptome zu mildern. Weiterhin weist die Therapie mit Corticosteroiden und Cyclophosphamid, vor allem bei längerfristiger Applikation, eine hohe Toxizität mit einem ausgeprägten Nebenwirkungsprofil auf.

Diese Beobachtungen verdeutlichen den Bedarf weiterer Optionen in der Therapie der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis. Auch wenn neuere Ansätze, wie beispielsweise die Depletion von B-Zellen mit Rituxumab, bereits spezifischere Angriffspunkte in der Pathogenese aufweisen, so bleibt die Notwendigkeit neuartiger Therapieoptionen weiterhin bestehen. In meiner Dissertation lege ich daher einen der Schwerpunkte auf die Rolle des Komplementsystems in der Pathogenese der ANCA Glomerulonephritis, um die Beteiligung dieses Systems besser verstehen zu können und mögliche neue Therapieoptionen in diesem Bereich voranzutreiben.

1.2 Komplementsystem

Das aus verschiedenen Plasmaproteinen bestehende Komplementsystem stellt einen wichtigen Teil der angeborenen Immunabwehr im Hinblick auf die Abwehr diverser Pathogene dar. Bei vielen dieser Plasmaproteine handelt es sich um so genannte Zymogene. Zymogene sind Proteasen, die zu ihrer eigenen Aktivierung selbst einer proteolytischen Spaltung durch eine andere Protease bedürfen. Die Hauptaufgabe des Komplementsystems ist in drei verschiedene Komponenten zu unterteilen. Zum einen dient es der Rekrutierung von inflammatorischen und immunkompetenten Zellen. Des Weiteren sorgt es dafür, dass Pathogene opsonisiert werden und dadurch für die Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten zugänglich gemacht werden. Die dritte Aufgabe besteht darin, Pathogene auf direktem Wege abzutöten und somit unschädlich zu machen (Murphy et al., 2008).

Es gibt drei verschiedene Wege, die zu einer Aktivierung des Komplementsystems führen. Den klassischen Aktivierungsweg, den Lectinweg und den alternativen Weg. Im klassischen Weg wird die Komplementkaskade durch die Bindung des Faktors C1q an das akute Phase Protein CRP, an Antigen-Antikörper-Komplexe oder durch die direkte Bindung von Oberflächenproteinen mancher Bakterien aktiviert. Zur Aktivierung des Lectinwegs bedarf es der Bindung eines Kohlenhydrat-bindenden Proteins (z.b. Mannose-bindendes Lectin, MBL) an einen der Kohlenhydratreste von Pathogenen. Im alternativen Aktivierungsweg bindet der, spontan im Blutplasma aktivierte, Komplementfaktor C3 direkt an die Oberfläche des Pathogens und aktiviert somit die Komplementkaskade.

Alle drei Aktivierungswege resultieren letzten Endes in einer aktiven C3-Konvertase, die in der Lage ist den Komplementfaktor C3 proteolytisch in C3a und C3b zu spalten. Bindet ein C3b-Fragment an eine C3-Konvertase, so entsteht eine C5-Konvertase, die nun den Komplementfaktor C5 in seine aktiven Komponenten C5a und C5b spaltet. Als gemeinsame Endstrecke aller drei Aktivierungswege bildet sich auf Grundlage des entstandenen C5b Moleküls nun der Membranangriffskomplex (MAC, engl. *membrane attack complex*) auf der Zielzelle. Dies geschieht durch die nachfolgende Anlagerung der Komplementfaktoren C6, C7 und C8 an das C5b Fragment. Abschließend lagern sich 10-15 C9 Moleküle an den bestehenden Komplex an und bilden eine zylindrische

Pore durch die Membran der Zelle. Es resultiert eine osmotische Imbalance, die zur Lyse der Zielzelle führen kann (Ehrnthaller et al., 2010).

Das Komplementsystem ist nicht nur in der Bekämpfung von exogenen Krankheitserregern als Teil der angeborenen Immunabwehr von klinischer Relevanz, sondern spielt auch in der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder eine entscheidende Rolle. Bei der Entstehung einer systemischen Sepsis kommt es beispielsweise zu einer Aktivierung des Komplementsystems (Riedemann et al., 2003). Insbesondere die exzessive Bildung des Faktors C5a führt während einer Sepsis zur Paralyse des Immunsystems, zum Multiorganversagen und zur Apoptose von Thymozyten (Guo et al., 2000; Riedemann et al., 2002). Auch bei ischämischen oder traumatischen cerebralen Schädigungen findet sich im Tiermodell eine ausgeprägte Hochregulierung des Komplementsystems (Pasinetti et al., 1992; Schäfer et al., 2000). Schlaganfallpatienten weisen häufig eine systemische Komplementaktivierung auf (Pedersen et al., 2004). Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen ist eine Beteiligung des Komplementsystems nachweisbar (Langlois and Gawryl, 1988). Die präventive Depletion des Komplementsystems resultiert im Tiermodell in einer erheblichen Reduktion der Infarktgröße nach myokardialer Ischämie (Väkevä et al., 1994). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten kürzlich, dass es auch in der posttraumatischen Entzündungsreaktion zu einer gravierenden Aktivierung des Komplementsystems kommt (Flierl et al., 2008; Ganter et al., 2007). Des Weiteren sind in der Literatur Aktivierungen des Komplementsystems in Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis (Mizuno, 2006), dem SLE (Bao and Quigg, 2007), Asthma (Köhl and Wills-Karp, 2007), der Multiplen Sklerose (Rus et al., 2006) sowie neurodegenerativen Erkrankungen (Bonifati and Kishore, 2007) beschrieben worden.

1.3 ANCA-assoziierte GN und das Komplementsystem

Eine Beteiligung des Komplementsystems in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis wurde lange Zeit als sehr unwahrscheinlich angesehen. Gründe dafür lagen in den sehr marginalen Immunglobulin- und Komplementablagerungen, die in Gefäßen von AAV Patienten im Vergleich zu Patienten mit anti-GBM Nephritis oder Immunkomplexnephritis aufzufinden waren (Van Timmeren et al., 2009). Zudem ist bei Patienten, die an einer ANCA-assoziierten Vaskulitis leiden, keine Hypokomplementämie zu beobachten.

Es erfolgte jedoch insofern ein Umdenken, als dass der vaskuläre Entzündungsmediator nicht notwendigerweise in hoher Konzentration in der Gefäßwand vorliegen muss und auch komplementassoziierte Erkrankungen wie beispielsweise die Purpura Henoch-Schönlein oder die anti-GBM Nephritis keine Hypokomplementämie aufweisen (Van Timmeren et al., 2009).

In den 1970er Jahren wurden zum ersten Mal neutrophile Granulozyten, die in der Pathogenese der ANCA-assoziierten GN von entscheidender Bedeutung sind, mit der Aktivierung des Komplementsystems in Verbindung gebracht. Zwei Arbeitsgruppen konnten die Spaltung der Komplementfaktoren C3 und C5 durch Proteasen aus aktivierten humanen PMNs beweisen (Johnson et al., 1976; Venge and Olsson, 1975).

In den 1990-Jahren zeigte Shingu et. al, dass Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikale, die durch aktivierte neutrophile Granulozyten produziert wurden, in der Lage sind das Komplementsystem zu aktivieren (Shingu et al., 1992). Vogt et al. postulierten die Aktivierung des Komplementfaktors C5 durch Produkte der Myeloperoxidase (MPO), die von aktivierten humanen PMN sezerniert worden waren (Vogt, 1996) .

Xiao et al. brachten 2007 erstmalig in einem Tiermodell das Komplementsystem in Verbindung mit der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis (Xiao et al., 2007). In C57BL6/J Mäusen wurde durch die Administration von 50 µg/g KG anti-MPO-Antikörpern eine *necrotizing crescentic glomerulonephritis* (NCGN) induziert. Nach sechs Tagen erfolgte die Beurteilung der Krankheitsentwicklung anhand von Urinuntersuchungen und der histologischen Beurteilung des Nierengewebes. Die Depletion des Komplementsystems mittels intraperitonealer Injektion von 30 µg Cobra Venom Factor

(CVF) vier Stunden vor Administration der anti-MPO-Antikörper hatte einen protektiven Effekt auf die Ausbildung einer NCGN. Die Depletion des Komplementsystems verhinderte den Anstieg der Albuminkonzentration im Urin sowie die Leukozyturie und Hämaturie, die in undepletierten Mäusen zu beobachten war. Die histologische Beurteilung der Niere zeigte, dass keine der, mit CVF vorbehandelten Mäuse, eine glomeruläre Nekrose oder eine *crecent* Formation aufwies.

Weiterhin untersuchte die Arbeitsgruppe die Auswirkungen eines C5-Knockouts im Hinblick auf die Entstehung der anti-MPO-induzierten NCGN. In Abwesenheit des Komplementfaktors C5 war die Induktion der NCGN ebenfalls deutlich abgeschwächt (Xiao et al., 2007). Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Huugen et al., die im anti-MPO-Mausmodell zeigen konnten, dass durch die Blockierung des Faktors C5 mittels eines inhibierenden monoklonalen C5-Antikörpers (BB5.1) die Krankheitsinduktion, im Hinblick auf pathologische Urinveränderungen und histologische Analysen der Glomeruli, ebenfalls auf ein basales Level reduziert wird (Huugen et al., 2007).

Um die relative Rolle der drei Aktivierungswege des Komplementsystems zu beleuchten, verglichen Xiao et al. die Induktion einer NCGN mittels des oben beschriebenen anti-MPO-Modells in C4- und Faktor B (fB) knockout Mäusen. Der Komplementfaktor C4 ist für die Aktivierung des klassischen Aktivierungswegs und des Lectinweges notwendig, wohingegen der Faktor B eine wichtige Rolle in der Initiierung des alternativen Aktivierungswegs spielt. Interessanterweise waren $fB^{-/-}$ Mäuse, nicht aber $C4^{-/-}$ Mäuse vor der Entstehung einer NCGN geschützt (Xiao et al., 2007). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass primär der alternative Aktivierungsweg des Komplementsystems in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis von Bedeutung ist.

Schreiber et al. untersuchten die Rolle des Anaphylatoxins C5a und seines C5a-Rezeptors (C5aR, CD88) in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis (Schreiber et al., 2009).

C5a entsteht durch die proteolytische Spaltung des Komplementfaktors C5 durch eine C5-Konvertase. Es stellt einen hochpotenten Peptid-Entzündungsmediator dar, der

unter anderem für eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, eine Aktivierung von Mastzellen und der Stimulation von Phagozyten verantwortlich ist. Der C5a-Rezeptor (CD88) ist ein heptahelikaler G-Protein gekoppelter Rezeptor, der neben Endothelzellen und Mastzellen auch im hohen Maße auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Gerard and Gerard, 1994).

Um die Rolle des C5aR in der Krankheitsentstehung zu untersuchen verwendete die Arbeitsgruppe ein leicht abgewandeltes Model der ANCA-assoziierten GN. *Mpo*^{-/-} Mäuse mit einem C57BL/6J Hintergrund wurden mit MPO-immunisiert und nach 40 Tagen zur Knochenmarkdepression bestrahlt. Anschließend erfolgte die intravenöse und retroorbitale Injektion von Knochenmarkzellen, die entweder aus Wildtypmäusen oder *C5ar*^{-/-} Mäusen gewonnen wurden. Acht Wochen nach Transplantation erfolgte die Beurteilung der Krankheitsinduktion anhand von Urin- und histologischen Untersuchungen. Alle Mäuse, die Knochenmarkzellen von Wildtypmäusen erhalten hatten, jedoch keine der Mäuse die KM-Zellen von *C5ar*^{-/-} Mäusen bekamen, wiesen nach acht Wochen eine Hämaturie und Proteinurie auf (Schreiber et al., 2009). Zudem rief die Injektion von Wildtyp-KM-Zellen in allen Fällen eine histologisch zu sichernde NCGN auf, wohingegen Mäuse in der *C5ar*^{-/-} Gruppe nur minimale glomeruläre Abnormalitäten zeigten. (Schreiber et al., 2009). Diese Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Rolle des Komplementsystems in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis und heben die Wichtigkeit der C5a-C5aR-Interaktion hervor.

Das Komplementsystem ist auch im Hinblick auf die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten von großer Bedeutung. Schreiber et al. fanden heraus, dass C3a und C5a konditioniertes Medium humane neutrophile Granulozyten für den anti-MPO-induzierten oxidativen Burst primt (Schreiber et al., 2009; Xiao et al., 2007). In nachfolgenden Experimenten belegte die Arbeitsgruppe die erneut entscheidende Rolle von insbesondere C5a und seinem Rezeptor CD88 im Hinblick auf das Primen von neutrophilen Granulozyten (Schreiber et al., 2009).

Neutrophile Granulozyten sind zudem eigenständig in der Lage das Komplementsystem über den alternativen Initiierungsweg zu aktivieren. Humane Neutrophile, die mit ANCA stimuliert werden, führen zu einer Generierung von C3a und C5a (Schreiber et

al., 2009; Xiao et al., 2007). Die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit TNF- α /fMLP oder PMA resultierte in einer gesteigerten C3 und C3d Ablagerung auf der Zelloberfläche (Camous et al., 2011). Dieser Effekt ist in C2-, nicht aber in Faktor B-depletiertem Medium zu beobachten. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Neutrophile nach oben beschriebener Stimulation den Faktor P (Properdin) sezernieren, der in der Lage ist den C3bBb-Komplex (C3-Konvertase des alternativen Aktivierungswegs) auf der Zelloberfläche zu stabilisieren und somit die Aktivierung des Komplementsystems zu verstärken (Camous et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich in diesen Ergebnissen eine Amplifikationsschleife erkennen. Neutrophile Granulozyten aktivieren nach Stimulation das Komplementsystem über den alternativen Weg, was letzten Endes in der Generierung von C5a resultiert. C5a ist wiederum in der Lage Neutrophile zu aktivieren und beispielsweise für den oxidativen Burst zu primen (siehe auch Abbildung 2).

Neben den beschriebenen experimentellen Laboruntersuchungen legten auch Untersuchungen an Patienten mit einer ANCA-assoziierten Vaskulitis (AAV) die Bedeutung des Komplementsystems und insbesondere des Entzündungsmediators C5a dar. Yuan et al. konnten zeigen, dass die C5a Plasma- und Urinkonzentrationen in Patienten mit einer aktiven AAV signifikant höher sind als bei Patienten, die sich aktuell in einer Krankheitsremission befinden (Yuan et al., 2012). Die histologische Betrachtung der Nierenbiopsien von NCGN-Patienten im Rahmen einer AAV ergab zudem Hinweise auf eine Beteiligung des alternativen Aktivierungswegs. NCGN-Patienten wiesen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine erhöhte Präsenz von C3d, Faktor P, Faktor B sowie des Membran-Angriff-Komplexes (MAC) auf (Xing et al., 2009). Das Mannose-bindende Lektin (MBL), welches für die Aktivierung des Lektinwegs verantwortlich ist, sowie der Komplementfaktor C4d, der in der Aktivierung des klassischen und des Lektinweges von Bedeutung ist, konnten nicht in erhöhtem Maße nachgewiesen werden (Xing et al., 2009). Chen et al. fanden heraus, dass die Menge an C3c-Ablagerungen, einem Abbauprodukt von C3b, in histologischen Nierenbiopsien mit der Stärke der histologischen Nierenläsion, gemessen an der Anzahl von *crescent* Formationen und interstitieller Infiltrationen, korreliert (Chen et al., 2009). Patienten mit ausgeprägten C3c-Ablagerungen wiesen im Vergleich zu gesunden Patienten

zudem eine erhöhte Proteinkonzentration im Urin sowie eine schlechtere renale Funktion auf (Chen et al., 2009).

Auch in der Pathogenese anderer Autoimmunkrankheiten wurde eine Beteiligung des Komplementsystems postuliert. Die Blockade des Komplementsystems mittels eines monoklonalen C5-Antikörpers verhinderte die Krankheitsinduktion und führte zur Verbesserung einer bestehenden Erkrankung im kollageninduzierten Arthritis-Mausmodell (Wang et al., 1995). Das inflammatorische Arthritismodell ist ebenfalls stark vom alternativen Aktivierungsweg und vom Faktor C5a abhängig (Ji et al., 2002). Ähnliche Beobachtungen wurden im NZB/WF1-Mausmodell des Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) gemacht. Durch die Administration des monoklonalen C5-Antikörpers konnte die Krankheitsinduktion protektiv beeinflusst und eine bereits bestehende Erkrankung in ihrem Verlauf verbessert werden (Wang et al., 1996).

Zusammenfassend lässt sich aus den oben genannten Experimenten und Untersuchungen schließen, dass eine Beteiligung des Komplementsystems in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis sehr wahrscheinlich ist. Insbesondere der alternative Aktivierungsweg und der Komplementfaktor C5a scheinen pathophysiologisch von Bedeutung zu sein.

1.4 Konfokale Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung des Verhaltens neutrophiler Granulozyten im murinen Nierenglomerulus verwendete ich ein konfokales Multiphotonenfluoreszenzmikroskop. Im nachfolgenden Abschnitt werden zunächst die technischen Hintergründe dieses bildgebenden Verfahrens erläutert.

1.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Das Phänomen der Fluoreszenz wurde erstmalig in der Mitte des 19. Jahrhunderts von Sir George G. Stokes beschrieben. Unter Fluoreszenz versteht man die spontane Emission von Licht, die beim Übergang eines zuvor angeregten elektronischen Systems auf ein niedrigeres Energielevel auftritt. Dabei ist die Wellenlänge des anregenden Lichtes stets kleiner als die Wellenlänge des emittierten Lichts (Stokes Shift). Technische Anwendung dieses Phänomens fand die Fluoreszenz in den Anfängen des 20. Jahrhunderts durch die Entwicklung des ersten Fluoreszenzmikroskops durch Köhler, Reichert und Lehmann (Liedke and Popp, 2006). Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie ist es, das zu untersuchende Präparat mit einer gewünschten Wellenlänge zu bestrahlen und anschließend das vielfach schwächere emittierte Licht von dem anregenden Licht zu trennen (Spring, 2003). Dadurch ist es möglich, nur das emittierte Fluoreszenzsignal mit sehr hohen Kontrastverhältnissen auf einem dunklen Hintergrund darzustellen. Die Auftrennung des Anregungs- und Emissionslichts im Strahlengang des Mikroskops erfolgt mithilfe eines dichroitischen Spiegels, der nur Licht einer bestimmten Wellenlänge reflektiert und den restlichen Anteil transmittiert. Um das Präparat ausschließlich mit Licht einer vorgegebenen Wellenlänge anzuregen, verwendet man einen Anregungsfilter, der das restliche Spektrum des sichtbaren Lichtes nicht transmittiert. Das Funktionsprinzip eines Fluoreszenzmikroskops ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

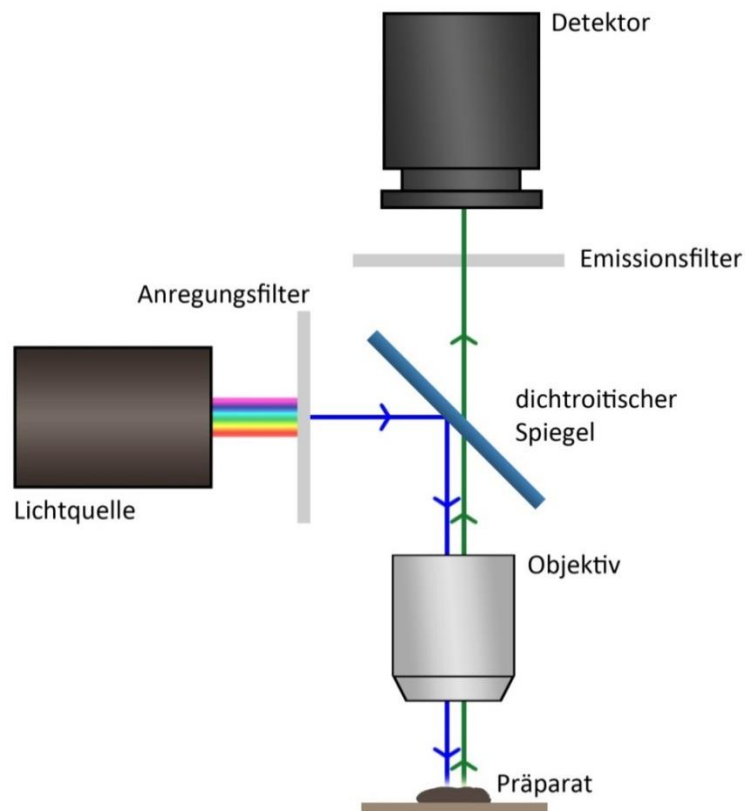


Abb. 3: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops. Durch den Anregungsfilter gelangt nur Licht einer bestimmten Wellenlänge (hier blau), welches am dichroitischen Spiegel reflektiert wird und nachfolgend das Präparat zur Fluoreszenz anregt. Das emittierte Licht (hier grün) wird am dichroitischen Spiegel transmittiert und gelangt über den Emissionsfilter zu einem Detektor, der das Fluoreszenzsignal aufzeichnet (Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1, verändert nach (Conchello and Lichtman, 2005)).

1.4.2 Multiphotonenmikroskopie

Das Konzept der Multiphotonenmikroskopie (MPM) hat seinen Ursprung in den 1930-Jahren. Maria Göppert-Mayer sagte in ihrer Dissertation voraus, dass die Anregung eines Elementarteilchens zum Quantensprung auch durch zwei Photonen möglich ist (Goeppert-Mayer, 1931). Aufgrund der technischen Gegebenheiten der damaligen Zeit war es allerdings erst 30 Jahre später möglich Göppert-Mayers Idee zu verwirklichen. Kaiser und Garret beobachteten 1961 die blaue Fluoreszenz von $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ Kristallen, die mit einem roten, 0,5 ms gepulsten Rubinlaser (Wellenlänge: 694 nm) angeregt wurden (Kaiser and Garrett, 1961). Die sehr hohen Energieniveaus der damals verwendeten Laser machten eine Anwendung bei biologischen Proben jedoch zunächst unmöglich. Der routinemäßige Einsatz der Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie im Bereich der biologischen Materialien erfolgte erst ab den 1990-Jahren durch die Entwicklung von ultrakurz gepulsten Lasersystemen (Denk et al., 1990).

Prinzip der Elektronenanregung durch mehrere Photonen

Das Phänomen der Elektronenanregung durch zwei oder mehrere Photonen tritt auf, wenn beispielsweise zwei Photonen zum gleichen Zeitpunkt auf ein Elektron treffen und es somit zu einer simultanen Absorption beider Photonen im Rahmen eines einzigen Quanteneffekts kommt. Die Energie der beiden absorbierten Photonen wird dabei addiert. Da sich Wellenlänge und Energie eines Photons umgekehrt proportional zueinander verhalten, müssen bei einer Elektronenanregung durch zwei Photonen diese jeweils eine doppelt so große Wellenlänge, im Vergleich zu einem einzelnen anregenden Photon, aufweisen, um das Elektron des Fluorophors gleichstark anzuregen. Geht man zum Beispiel davon aus, dass ein Fluorophor normalerweise durch ein einziges Photon mit einer Wellenlänge von 400 nm zur Fluoreszenz angeregt wird, so lässt sich der gleiche Effekt mit zwei simultan absorbierten Photonen mit einer Wellenlänge von 800 nm erzielen. Die Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzphotons ist dabei in beiden Fällen gleich. Abbildung 4 verdeutlicht das Prinzip der Multiphotonenanregung im Jablonski-Energiediagramm.

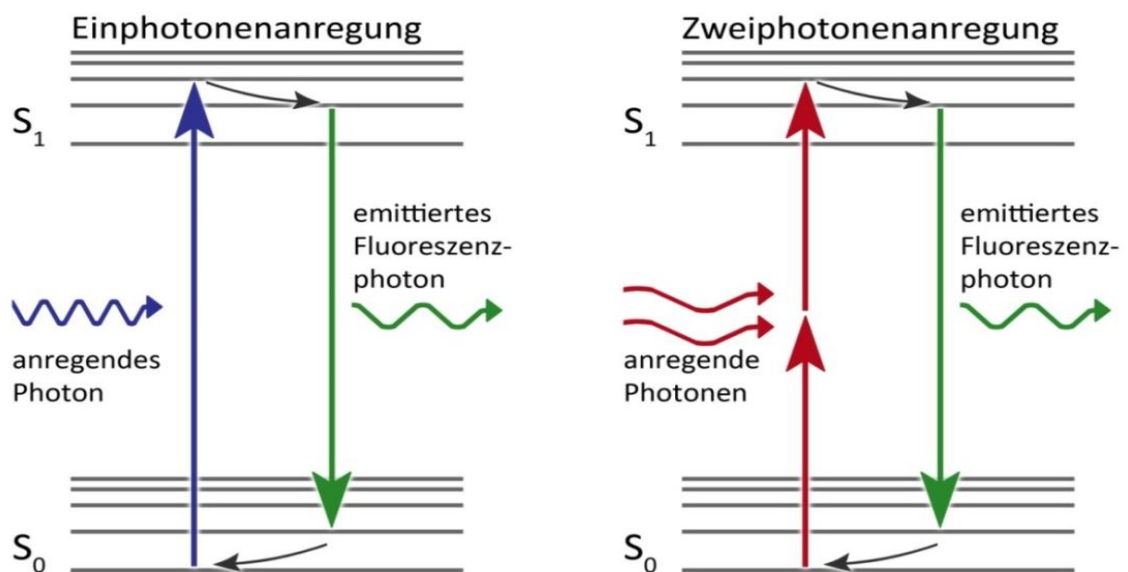


Abb. 4: Ein- und Zweiphotonenanregung dargestellt im Jablonski-Diagramm. Bei der Einphotonenanregung regt ein Photon einer bestimmten Wellenlänge das Elektron zum Quantensprung an. Bei der Zweiphotonenanregung treffen zwei Photonen einer höheren Wellenlänge im exakt gleichen Moment auf das Elektron und regen dieses simultan an. Der Quantensprung des Elektron und damit die Wellenlänge des emittierten Photons ist in beiden Fällen gleich (Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1, verändert nach (Dunn and Young, 2006a)).

Um den beschriebenen Effekt der simultanen Photonenabsorption zu erzielen müssen beide Photonen innerhalb einer Attosekunde (10^{-18} s) auf den Fluorophor treffen (McCain, 1970). Um dieses Phänomen in einem ausreichenden Maße herbeiführen zu können müsste ein cw-Laser (*continuous wave*) eine ausgesprochen hohe Photonen- und somit auch Energiedichte aufweisen. Eine Anwendung im Bereich von biologischen Proben wäre aufgrund der hohen Rate an Lichtschäden des Präparats undenkbar.

Aus diesem Grunde verwendet man in der Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie ultrakurz gepulste Laser. Diese Laser emittieren Licht in kurzen, intensiven Pulsen mit einer Länge von circa 100-2000 Femtosekunden (10^{-15} s) bei einer Frequenz von ungefähr 80 MHz. Da der Tastgrad (Verhältnis von Impulsdauer zu Impulsperiodendauer) dieser Laser bei ungefähr gerade einmal 0.001 % liegt, kann die erforderliche hohe Flussrate an Photonen ohne eine nennenswerte Schädigung des biologischen Präparats oder des Fluorophors erreicht werden (Dunn and Young, 2006b).

Das Prinzip der Zweiphotonenanregung bringt aus physikalischen Gründen einen wichtigen Vorteil mit sich. Der Lichtstrahl des gepulsten Lasers wird wie bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie durch die Optik des Mikroskops auf einen einzigen Punkt des Präparats fokussiert. Je näher man diesem Fokus kommt, desto höher ist nun die vorliegende Photonendichte, da der Lichtstrahl des Lasers zunehmend gebündelt wird. Die Wahrscheinlichkeit der simultanen Elektronenanregung durch zwei Photonen steigt an und ist im Bereich der Fokusebene so hoch, dass eine ausreichende Exzitation des Fluorophors erreicht wird. Da jedoch der Photonenfluss mit zunehmender Entfernung zum Fokus in der vierten Potenz abnimmt (Dunn and Young, 2006b), liegt die suffiziente Exzitation nur in unmittelbarer Nähe zum Fokus vor.

Auf diese Weise wird sichergestellt, dass nur ein minimaler Teil des Präparats angeregt wird, Fotoschäden des Präparats sowie Hintergrundrauschen in der eigentlichen Bildgebung werden weitestgehend vermieden. Abbildung 5 veranschaulicht die Unterschiede zwischen der Ein- und Zweiphotonenmikroskopie im Hinblick auf die Exzitation des Fluorophors.

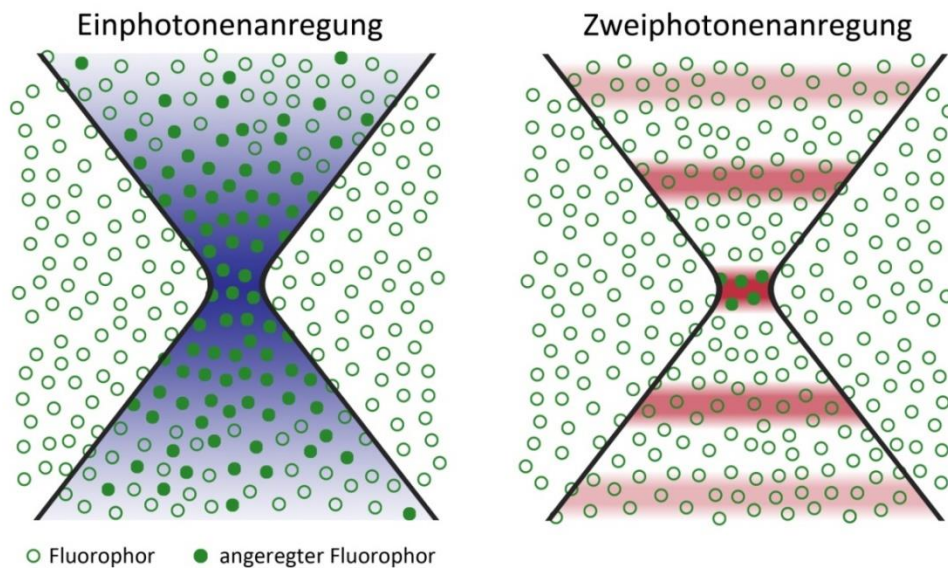


Abb. 5: Anregungsparadigma der Fluorophore durch Ein- und Zweiphotonenanregung. In der Einphotonenmikroskopie regt ein cw-Laser die Fluorophore fast im gesamten Volumen an. Der gepulste Laser der Multiphotonenmikroskopie regt hingegen nur Fluorophore in unmittelbarer Nähe zur Fokusebene an (Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1, verändert nach (Dunn and Young, 2006b)).

Den wohl größten Vorteil der Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie stellt jedoch die Möglichkeit dar, das zu untersuchende Gewebe in größerem Maße penetrieren zu können und somit auch eine gute Bildgebung von tieferen Gewebsschichten zu erhalten. Der begrenzende Faktor der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie ist die zunehmende Streuung des Lichtstrahls in der Tiefe der Gewebeprobe. Die Lichtstreuung ist jedoch von der Wellenlänge des Lichtstrahls abhängig. Ein Lichtstrahl mit einer hohen Wellenlänge (wie er im Bereich der MPM verwendet wird) erfährt im Vergleich zu Licht einer kürzeren Wellenlänge deutlich weniger Streuung (Centonze and White, 1998). Aufgrund der reduzierten Streuung resultiert eine erhöhte Eindringtiefe des Lichtstrahls und es ist somit möglich tiefer liegende Ebenen optisch anzuregen (Potter et al., 1996). Der zweite Faktor, der zu einer größeren Eindringtiefe führt, ist die praktisch nicht vorhandene Anregung von Fluorophoren oberhalb der Fokusebene. Wie bereits erwähnt verhält sich die Exzitationsrate proportional zum Quadrat der lokalen Strahlenintensität (Kaiser and Garrett, 1961). Somit kommt es oberhalb der Fokusebene nicht zu einer Zweiphotonenanregung, die die Exzitation der Fluorophore in der Fokusebene blockieren würde. Auch eine einfache Anregung von Fluorophoren oberhalb der Fokusebene tritt aufgrund der verwendeten, hohen Wellenlängen nur in einem sehr geringen Ausmaß auf. Zudem unterliegt auch das vom Fluorophor emittierte Licht der Lichtstreuung im Gewebe. In der herkömmlichen

Fluoreszenzmikroskopie führt dies dazu, dass emittierte Photonen, die durch die Anregung von Fluorophoren außerhalb der Fokusebene entstanden sind, durch die Lichtstreuung zum Hintergrundrauschen des eigentlichen Bildes führen (Centonze and White, 1998). Da es im Bereich der MPM jedoch nicht zur Anregung von Fluorophoren außerhalb der Fokusebene kommt, wird dieses Problem auf ein Minimum reduziert. Ein hochauflösendes Bild ist somit auch in tieferen Schnitten des Präparates zu erzielen. Zusammenfassend führen diese Vorteile der Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie zu einer möglichen Penetrationstiefe von bis zu 600 μm (Helmchen et al., 1999; Kleinfeld et al., 1998).

1.4.3 Konfokale Mikroskopie

Die Entwicklung der konfokalen Mikroskopie geht auf Marvin Minsky zurück, der im Jahr 1955 das erste konfokale Mikroskop konstruierte (Minsky, 1961) und später in seinen Memoiren ausführlich darüber berichtete (Minsky, 1988).

Der Hauptunterschied der Konfokalmikroskopie liegt darin, dass im Gegensatz zur herkömmlichen Weitfeldmikroskopie immer nur ein Punkt des Präparats zur gleichen Zeit beleuchtet wird. Das Mikroskop fährt somit das zu untersuchende Objekt Punkt für Punkt ab und konstruiert daraus ein zusammenhängendes Bild (Abb. 6). Diese rasterartige Abtastung der xy-Ebene erfolgt durch die Ablenkung des Lichtstrahls mittels zweier rotierender Spiegel. Hierdurch wird ein Großteil des Streulichtes, das bei der Beleuchtung des gesamten Präparates zum gleichen Zeitpunkt entsteht, vermieden.

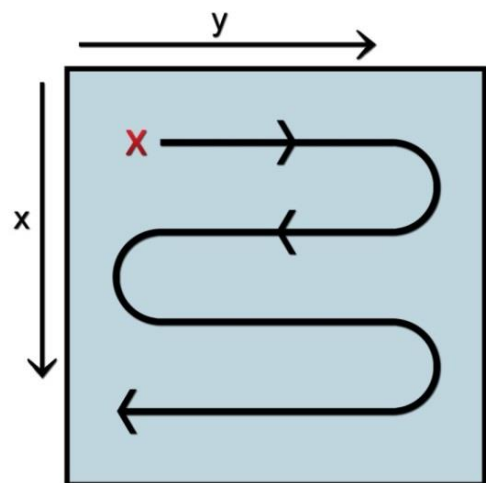


Abb. 6: Rasterartige Abtastung der xy-Ebene in der konfokalen Mikroskopie (Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1).

Zudem sorgt eine vor dem Detektor angebrachte Lochblende dafür, dass nur emittierte Lichtstrahlen, die unmittelbar in der Fokusebene liegen, vom Detektor erfasst werden. Lichtstrahlen, die von einem Fluorophor ober- oder unterhalb der Fokusebene stammen oder aber seitlich des Fokus liegen, werden an der Lochblende blockiert und tragen nicht zur Entstehung des Bildes bei (Abb. 7). So lässt sich gezielt eine einzige optische Schnittebene des Präparats abbilden. Durch die digitale Kombination mehrerer optischer Ebenen entlang der z-Achse ist es anschließend möglich ein dreidimensionales Bild des Präparats zu erschaffen. Abbildung 7 stellt das Konzept der Lochblende in der konfokalen Mikroskopie anhand einer Schemazeichnung dar.

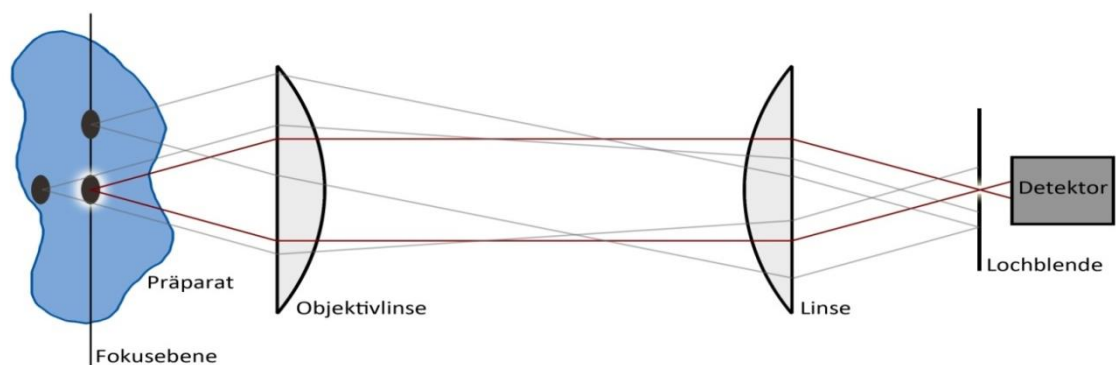


Abb. 7: Funktionsprinzip der konfokalen Mikroskopie mittels Lochblende. Durch den Einsatz einer kurz vor den Detektor positionierten Lochblende werden nur die emittierten Signale von Bereichen innerhalb der Fokalebene detektiert. Auch das Signal von horizontal versetzten Bereichen wird von der Lochblende abgeschirmt (Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1, verändert nach (Conchello and Lichtman, 2005)).

Für die Experimente im Rahmen meiner Dissertation verwendete ich ein Leica SP5 konfokales Multiphotonenfluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), das mit einem 20X 1.0 NA WI Objektiv ausgestattet war. Die Anregung der Fluorophore erfolgte über einen SpectraPhysics MaiTai gepulsten Ti: Sapphire Laser (*pulse width*: <100 fs, *tuning range*: 690 - 1040 nm, *average power*: >2,5 W, *repetition rate*: 80 MHz \pm 1 MHz; SpectraPhysics, Stahnsdorf, Germany) bei einer Wellenlänge von 810 nm. Experimente, an denen GFP-exprimierende Mäuse beteiligt waren, wurden mit einer Wellenlänge von 900 nm durchgeführt. Bilddaten wurden alle 30 Sekunden über einen Zeitraum von 60 Minuten erzeugt. Die durchschnittliche Bildstärke in der Z-Ebene (nachfolgend als z-Stack bezeichnet) betrug ca. 150 μ m und wurde in z-Stack-Schritten von ca. 6 μ m generiert. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit *non-descanned detection* (NDD) Detektoren mit Emissionsfiltern von 432-482 nm, 500- 550 nm, 575-605 nm und 625-675 nm detektiert.

1.5 Zielsetzung

Die ANCA-assoziierte Glomerulonephritis stellt mit einer jährlichen Inzidenz von 3-5 Fällen pro 1.000.000 Einwohner eine oftmals unterschätzte, jedoch ausgesprochen ernst zu nehmende Gesundheitsbelastung dar. Durch die schnell voran schreitende renale Funktionseinschränkung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nur bei 78 % (Booth et al., 2003). Weiterhin sind 30 % der Patienten in diesem Zeitraum dialysepflichtig und somit mit einer gravierenden Einschränkung ihrer Lebensqualität konfrontiert. Die bisherige Therapie der ANCA-assoziierten GN ist ausgesprochen unspezifisch und hoch toxisch (Belmont, 2006; Lionaki et al., 2007). Auch wenn sich das Verständnis der Pathogenese in den letzten zehn Jahren deutlich besserte und Ideen zu möglichen Behandlungsoptionen der Krankheit entwickelt wurden, sind viele krankheitsassoziierte Faktoren noch unerforscht.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, durch den Einsatz der intravitralen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit Experimenten im anti-MPO-Mausmodell weitere Erkenntnisse im Hinblick auf die Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis zu gewinnen, um zukünftig Patienten potenziell durch spezifischere und weniger toxische Therapieansätze effizient helfen und die krankheitsbegleitenden Einschränkungen der Lebensqualität auf ein Minimum reduzieren zu können. Zunächst sollte dazu ein mithilfe der intravitralen MPM nachweisbares Korrelat für die beschriebene krankheitsinduzierende Rolle der anti-MPO-AK gefunden werden. Da neutrophile Granulozyten primär mit der renalen Schädigung im Rahmen der ANCA-GN in Verbindung gebracht wurden, konzentrierte ich mich auf die Analyse des Verhaltens dieser Zellpopulation im murinen Nierenglomerulus.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit das Komplementsystem, und insbesondere die C5a-C5aR-Achse, an der Pathogenese der ANCA-GN beteiligt ist und ob eine künstliche Inaktivierung dieser Systeme mit einer protektiven Funktion bezüglich der Krankheitsentstehung verbunden ist. Zudem untersuchte ich, ob die Administration von anti-MPO-Antikörpern in meinem intravitralen Modell der ANCA-assoziierten GN direkt zu einer sichtbaren Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies führte.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

Medikamente

Ketamin

Xylazin

Sevofluran

NaCl-Lösung (0,9 %)

Morphin (Buprenorphin)

Carprofen (Rimadyl)

Chlorhexidingluconat-Lösung (0,5 %)

Hersteller

Hospira (Melbourne, Vic, Australia)

Ellar Laboratories (Vic, Australia), Troy

Laboratories (NSW, Australia)

Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA)

Baxter (Deerfield, IL, USA)

Reckitt Benckiser (Auckland, NZ)

Ellar Laboratories (Vic, Australia), Pfizer

(NSW, Australia)

3M (NSW, Australia)

Instrumente

Mikropinzette, gerade

Mikropinzette, gebogen

chirurgische Schere (spitz/spitz)

feine anatomische Pinzette, gebogen

negative Pinzette (selbstschließend,
gerade)

Fine Science Tools (Vancouver, BC, Canada)

Fine Science Tools (Vancouver, BC, Canada)

Fine Science Tools (Vancouver, BC, Canada)

Fine Science Tools (Vancouver, BC, Canada)

Fine Science Tools (Vancouver, BC, Canada)

Rasiergerät für Kleintiere

40 Surgical Blade Cut 3/128

WAHL (Shelton, CT, USA)

Nahtmaterial

Dysilk non-absorband USP 5-0

Dysilk non-absorband USP 4-0 + needle

Dysilk non-absorband USP 3-0

Dytek Pty Ltd. (Hendon, SA, Australia)

Dytek Pty Ltd. (Hendon, SA, Australia)

Dytek Pty Ltd. (Hendon, SA, Australia)

Spritzen, Nadeln und Katheter

25G Needle

26G Needle (x ½")

30G Needle (x ½")

Tuberculin Syringe (1ml)

Katheter (PE Tubing), 0,61x0,28mm
(PE 6128)

Livingstone

BD (Franklin Lakes, NJ, USA)

BD (Franklin Lakes, NJ, USA)

BD (Franklin Lakes, NJ, USA)

Microtube Extrusion (North Rocks, NSW,
Australia)

**Mikroskope, Lichtquellen,
Wärmeplatten**

Modular Stereo Microscope Leica M60	Leica Microsystems (Wetzlar, Germany)
SP5 confocal multiphoton microscope	Leica Microsystems (Heidelberg, Germany)
KL 1500 LCD (Kaltlichtquelle)	Carl Zeiss AG (Jena, Germany)
Process Heater Mat (7,5 W, 100x75 mm, 12 V)	RS Components Pty Ltd (Smithfield, NSW, Australia)
Process Heater Mat (7,5 W, 50x50 mm, 12 V)	RS Components Pty Ltd (Smithfield, NSW, Australia)

Antikörper und Reagenzien

AlexaFluor 488 - anti mouse Ly-6G (Gr-1)	eBioscience (San Diego, CA, USA)
anti-mouse Ly-6G (Gr-1) - PE	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Pac-Blue-Dextran (Pacific Blue succinimidyl ester, dextran: 70 kDa MW)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Non-Functionalized eFluor 650NC (eBeads)	eBioscience (San Diego, CA, USA)
DHE (104,7 mg/ml)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti-C5aR (mAB, 20/70)	Hyocult Biotech (Uden, Niederlande)
CVF	Venom Supplies (Tanunda, SA, Australia)
TiterMax Gold Adjuvans	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Freund's Adjuvans, complete and incomplete	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Mouse-C3-ELISA-Kit	Innovative Research (Novi, MI, USA)

Computersoftware

<i>Imaris</i> 6.1 (Bitplane Scientific Software)	Bitplane AG (Zürich, Switzerland)
LAS AF	Leica Microsystems (Heidelberg, Germany)
<i>GraphPad Prism</i> 5 und 6	GraphPad Software Inc. (La Jolla, CA, USA)

2.2 Versuchstiere

Für die Experimente im Rahmen meiner Dissertation wurden männliche Wildtyp-Mäuse der Linie C57BL6/J sowie männliche Mäuse einer LysM-EGFP-Mauslinie (ebenfalls mit C57BL6/J Hintergrund) verwendet. Bei LysM-EGFP-Mäusen handelt es sich um Tiere, deren neutrophile Granulozyten aufgrund eines gentechnischen Knock-ins das Protein EGFP exprimieren und diese Zellen somit klar in der Fluoreszenzmikroskopie erkennbar sind (Kreisel et al., 2010). Das durchschnittliche Gewicht der Mäuse betrug zum Zeitpunkt der Experimente 28-32 g. Die unilaterale Ligation des Ureters (siehe 2.3) erfolgte in einem Alter von 4-5 Wochen; die intravitale Mikroskopie des Nierengewebes in einem Alter von 16-17 Wochen. Die Unterbringung und artgerechte Haltung der Mäuse wurde durch die Mitarbeiter der *Monash Animal Research Platform* am *Monash Medical Center* der *Monash University* (Clayton, Melbourne, Australien) gewährleistet. Mäuse wurden in Gruppen von bis zu fünf Tieren in Käfigen der vorgeschriebenen Größe, die mit Holzgranulat und Gegenständen zum *environmental enrichment* ausgestattet waren, gehalten. Die durchschnittliche Raumtemperatur lag bei 19-21°C; die Luftfeuchtigkeit bei 50-60 %. Der zirkadiane Rhythmus der Tiere wurde durch einen künstlichen, 12 stündigen Tag/Nacht-Zyklus simuliert. Alle Mäuse hatten kontinuierlichen, freien Zugang zu Zuchtfutter und keimarmem Wasser.

2.3 Herstellung von anti-MPO-Antikörpern

Die Herstellung von polyklonalen anti-MPO-Antikörpern, die in unserem Modell der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis zur Krankheitsinduktion führten, erfolgte nach dem in der Literatur üblichen Vorgehen (Huugen et al., 2005; Jennette et al., 2011). *Mpo*^{-/-} Mäuse wurden dazu mehrfach mit dem MPO-Protein immunisiert. Da MPO-knockout Mäuse nicht in der Lage sind MPO zu exprimieren, erkennen sie das immunisierte MPO-als Fremdartigen. Es folgt eine T-Zell vermittelte Produktion polyklonaler Antikörper, die gegen das MPO-Peptid gerichtet sind.

Der detaillierte Ablauf der Antikörperherstellung ist im Folgenden beschrieben.

2.3.1 Synthese von MPO-in 32Dcl3-Zellen

Das später zur Injektion in *Mpo*^{-/-} Mäusen verwendete MPO wurde zunächst in einer Zellkultur hergestellt. Ich verwendeten die IL-3 abhängige Zelllinie 32Dcl3. Hierbei handelt es sich um eine murine myeloblastische Zelllinie, die sich in Anwesenheit von IL-3 gut expandieren lässt (Valtieri et al., 1987). Durch den Entzug von IL-3 und die gleichzeitige Stimulierung durch G-CSF proliferieren die Zellen zunächst für vier bis fünf Tage und differenzieren sich nach ca. 12 Tagen zu phenotypischen neutrophilen Granulozyten (Guchhait et al., 2003).

Im Einzelnen wurden undifferenzierte IL-3-abhängige 32Dcl3 Zellen in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDB; Sigma) expandiert. Dem IMDB-Medium (500 ml) wurden folgenden Zusätze hinzugefügt: 50 ml hitzeinaktiviertes FCS, 5 ml L-Glutamin (200 nM), 10 ml Penicillin-Streptomycin, 5 ml gefilterter WEHI-3 Überstand (als IL-3 Quelle).

Die Differenzierung der expandierten 32D Zellen zu MPO-enhaltenden Zellen erfolgte nach Transfer der Zellen in G-CSF (50 ng/ml) enthaltendes IMDB-Medium, welches kein WEHI-3 Überstand mehr enthielt. Dabei war es wichtig, dass die Zellen vor dem Transfer in das endgültige Medium zweimal mit WEHI-3-Überstand freiem IMDB Medium gewaschen wurden, da bereits die kleinste Menge an IL-3 die Differenzierung von 32D Zellen zu MPO-enhaltenden Zellen inhibiert. Die initiale Konzentration der 32D Zellen sollte bei 1×10^6 Zellen/ml liegen. Die Zellen wuchsen anschließend für 8-10 Tage im G-CSF enthaltendem Medium.

Nach erfolgreicher Differenzierung der Zellen wurden diese vom Nährflaschenboden gelöst und die gesamte Zellsuspension zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einmalig in PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in einem 1 %-igen Cetyltrimethylammoniumbromid-Puffer (Puffer A) bei einer Konzentration von 1 ml Puffer A / 2×10^7 differenzierte Zellen resuspendiert. CTAB ist eine quartäre Ammoniumverbindung, die das MPO-in den differenzierten Zellen löst. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur für 2-4 Stunden auf einem Wippschüttler durchmischt. Das entstandene Lysat konnte anschließend bei -20 °C gelagert werden.

Als Nächstes folgte die Aufreinigung des MPO-Proteins. Dazu wurden am ersten Tag 150-200 ml des zuvor erzeugten Lysats aufgetaut und bei Raumtemperatur für 30 min bei 20.000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde ausgiebig mit Puffer B bei 4°C über Nacht dialysiert.

Am zweiten Tag wurden zu dem dialysierten Lysat Calciumchlorid (CaCl_2), Magnesiumchlorid (MgCl_2) und Manganchlorid (MnCl_2) bis zu einer Konzentration von je 1 mM hinzugegeben. Das Lysat wurde nach der Zugabe von Concanavalin A-Sepharose (7ml) bei 4°C auf einem Rollenmischer über Nacht durchmischt. Die Con A-Sepharose sollte vor der Verwendung einmalig mit Puffer B, welcher CaCl_2 , MgCl_2 und MnCl_2 enthält (Puffer B⁺), gewaschen werden.

Am dritten Tag erfolgte die Auftrennung der Proteine in einer Chromatographiesäule (Econo-Column, BioRad). Die Säule wurde zunächst mit Puffer B⁺ gewaschen und anschließend das Lysat/Con A-Sepharose Gemisch vorsichtig in die Säule gegeben. Eine Blasenbildung sollte vermieden werden. Um die MPO-Bindung zu erhöhen sollte die ungebundene Fraktion dreimal durch die Säule laufen. Die Säule wurde nun mehrmals mit Puffer B⁺ (in 5ml Schüben) gewaschen um ungebundene Proteine zu entfernen. Die Extinktion der gesammelten Fraktion wurde bei 280 nm bestimmt und die Fraktion solange gewaschen bis $A_{280} = 0$ war. Die Extinktion bei 280 nm gibt dabei Auskunft über die Gesamtproteinmenge in der gesammelten Fraktion. Um das gebundenen MPO-von der Concanavalin A-Sepharose zu eluieren, erfolgt die Zugabe von 750 mM Methyl α -D-Mannopyranosid in Puffer B in 3-4 ml Schüben. Alle Fraktionen, die eine Extinktion von $A_{280} > 0$ aufwiesen, wurden zusammengefügt und die Extinktion bei 430 nm (spezifisch für MPO) bestimmt. Die gepoolten, MPO enthaltenden, Fraktionen wurden erneut bei 4°C über Nacht gegen Puffer B⁺ dialysiert. Die Konzentration von MPO in mg/ml lässt sich mit der nachfolgender Formel errechnen: Konzentration von MPO = $A_{430} \times 1,282$

Puffer A (1000 ml)	
Natriumphosphat (6,7 mM, pH = 6)	0,9511 g dibasisches Na ₂ HPO ₄ 0,8039 g monobasisches NaH ₂ PO ₄
Magnesiumchlorid (1 mM)	0,0962 g
Natriumchlorid (3 mM)	0,1753 g
1 % CTAB	10 g pro Liter

Puffer B (1000 ml)	
Natriumacetat (100 mM, pH = 6,3)	8,2040 g
Natriumchlorid (100 mM)	5,8440 g
Puffer B⁺	
+ Calciumchlorid (1 mM)	1 ml von 100 mM (1,1099 g CaCl ₂ in 100 ml dH ₂ O)
+ Magnesiumchlorid (1 mM)	1 ml von 100 mM (0,9523 g MgCl ₂ in 100 ml dH ₂ O)
+ Manganchlorid (1 mM)	1 ml von 100 mM (1,979 g MnCl ₂ in 100 ml dH ₂ O)
Puffer B⁺ (Methyl D-Mannopyranosid)	
+ Methyl α-D-Mannopyranosid (750 mM)	14,5650 g

2.3.2 Immunisierung von *Mpo*^{-/-} Mäusen

Mpo^{-/-} Mäuse mit einem C57BL6/J-Hintergrund (Prof. A.J. Lusic, UCLA) wurden anschließend mit dem zuvor hergestellten MPO-Protein immunisiert. Die Immunisierung der Mäuse erfolgte an den Tagen 0, 7 und 14. Am Tag 28 wurde das Blut zur Antikörperherstellung gewonnen. Die MPO-Dosis jeder Injektion lag bei 20 µg MPO/Maus. Zur initialen Immunisierung am Tag 0 wurde das MPO-Protein in komplettem Freund-Adjuvans (FCA) emulgiert und nachfolgend subkutan verabreicht. Die beiden Boosterapplikationen an den Tagen 7 und 14 erfolgten ebenfalls subkutan,

jedoch in Form einer Emulsion mit inkompletten Freund-Adjuvans (FIA). Um eine optimale Immunantwort zu erhalten wurden die Mäuse an verschiedenen anatomischen Lymphknotenstationen (Schwanzwurzel, Nacken, axillare und inguinale Regionen) immunisiert.

Freund-Adjuvans (FCA/FIA)

Das komplette Freund-Adjuvans setzt sich aus einem nicht metabolisierbaren Mineralöl, dem Surfactant Mannitmonooleat sowie hitzeabgetöteten Mykobakterien (*M. tuberculosis* bzw. *M. butyricum*) zusammen (Freund, 1951). Das inkomplette Freund-Adjuvans verzichtet auf die Zugabe der Mykobakterienbestandteile. Das im Jahr 1951 von Jules Freund beschriebene Adjuvans verstärkt sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunabwehr des Zielorganismus, der daraufhin Antikörper gegen Epitope des denaturierten Antigenproteins bildet. Nachteil des Adjuvans ist die Gefahr der Granulombildung und Entzündungsreaktion nahe der Injektionsstelle (Jennings, 1995). Aus diesem Grund wird das toxischere komplette Freund-Adjuvans nur für die initiale Injektion verwendet. Auffrischinjektionen werden mit inkomplettem Freund-Adjuvans durchgeführt.

Die Wasser-in-Öl Emulsion des Freund-Adjuvans sorgt dafür, dass das Antigen über einen längeren Zeitraum von bis zu 6 Monaten gespeichert und langsam freigegeben wird, um möglichst hohe Antikörpertiter zu erhalten (Jennings, 1995). Neben dieser Depot-Funktion führt insbesondere das komplette Freund-Adjuvans durch die Rekrutierung von Makrophagen und anderen Immunzellen zu einer Verteilung des Antigens in die lokalen Lymphknoten, was wiederum die Immunantwort verstärkt (Waksman, 1979).

2.3.3 Blutgewinnung und Aufreinigung von anti-MPO-AK aus Mausserum

28 Tage nach initialer Immunisierung wurde den *Mpo*^{-/-} Mäusen das Antikörper enthaltende Blut über die Vena cava inferior entnommen. Dazu anästhesierte ich die Mäuse mit Xylazin und Ketamin und führten eine circa zwei Zentimeter lange, leicht rechts mediolaterale Inzision durch Haut und Muskelschichten der Bauchwand durch. Die Eingeweide wurden nach lateral mobilisiert um einen freien Blick auf die V. cava inf. zu

erhalten. Das Blut wurde anschließend über eine 25G Nadel möglichst vollständig entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die narkotisierten Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation schonend getötet.

Das entnommene Blut lagerte über Nacht bei 4°C um eine vollständige Gerinnung zu gewährleisten. Am darauffolgenden Tag wurden die Seren aller Mäuse nach Zentrifugation (5 min bei 2000 G) isoliert und vermengt. Um die Bindungseffizienz während der Aufreinigungsprozedur zu maximieren, dialysierte ich das Serum zunächst über Nacht bei 4°C gegen Natriumphosphat Bindungspuffer (0,02 mol/L, pH 7). Die Aufreinigung der IgG-Fraktion erfolgte in einer Protein G Chromatographiesäule (GE Healthcare) unter Verwendung des *Biologic DuoFlow chromatography system* (Bio-Rad Australia). Dazu ließ ich das Serum mehrfach durch die Chromatographiesäule laufen und eluierte die IgG Fraktion anschließend mit Glycinhydrochloridpuffer (0,1 mol/l, pH 2,7). Das eluierte IgG wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt und mit Tris-HCl-Puffer (1 mol/L, pH 9) neutralisiert. Die einzelnen Antikörperfraktionen wurden miteinander vermengt und für 48 h gegen PBS dialysiert. Die IgG Konzentration ließ sich mittels UV/Vis Spektralphotometer (Beckman Coulter) bei 280 nm bestimmen. Die von mir verwendeten anti-MPO-Antikörper hatten eine Konzentration von 2,5 mg/ml.

Anti-OVA-Antikörper, die in meiner Dissertation als Kontrollantikörper dienen, wurden nach gleichem Schema hergestellt. Als Antigen verwendete ich Ovalbumin (Sigma-Aldrich).

2.3.4 Herstellung von anti-MPO-AK unter Verwendung des p52 MPO-Peptids

Da der von mir in der intravitalen MPM beobachtete, krankheitsinduzierende Effekt der anti-MPO-Antikörper im Vergleich zum anti-GBM GN Modell (Devi et al., 2012) geringer ausgeprägt war, versuchte ich mit einer leicht abgewandelten Methodik höher potente anti-MPO-Antikörper herzustellen. Hierzu immunisierte ich die *Mpo*^{-/-} Mäuse nicht, wie zuvor beschrieben, mit dem kompletten MPO-Protein, sondern lediglich mit einem 33 Aminosäuren langen immunogenen MPO-Peptid (Ooi et al., 2012). Um die immunogene Wirkung des Peptids zusätzlich zu verstärken, wurde das MPO-Peptid mit *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) verknüpft. Das *keyhole limpet*

hemocyanin ist ein hochmolekularer Kupfer-Proteinkomplex, der aus der Hämolymphe der großen kalifornischen Schlüssellochschnecke (*Megathura crenulata*) stammt (Campell et al., 1964). Verschiedene Arbeitsgruppen belegten die immunstimulatorischen Effekte des KLH in Tieren und Menschen (Curtis et al., 1970; Herscowitz et al., 1972; Weigle, 1964). Aus diesem Grund wird KLH häufig als Trägerprotein (*carrier*) von niedermolekularen Peptiden in der Immunisierung von Tieren eingesetzt.

Neben der Verwendung des Freund-Adjuvans immunisierte ich zudem eine Gruppe von *Mpo*^{-/-} Mäusen mit einer MPO-Peptid/TiterMax Emulsion. Das TiterMax Gold Adjuvans besteht aus einem Blockcopolymer (CRL-8300), dem metabolisierbaren Öl Squalen sowie einem speziellen Mikropartikelstabilisator aus Siliziumdioxid (Sigma-Aldrich, 2012). Ähnlich dem Freund-Adjuvans bildet es eine stabile Wasser-in-Öl Emulsion. Die Anreicherung des Antigens auf der Oberfläche des Copolymers resultiert in einer Aktivierung des Komplementsystems, welches die Speicherung des Antigens im lymphatischen Gewebe und die Aktivierung von immunreaktiven Zellen verstärkt (Hunter and Bennett, 1984). Zudem steigern Blockcopolymere die Oberflächenexpression von MHC-II-Molekülen aus Makrophagen, was zu einer gesteigerten T-Zell Antigenpräsentation führt (Howerton et al., 1990). Da Squalen ein metabolisierbares Öl ist und das TiterMax Adjuvans keine Mykobakterienbestandteile enthält, sind die Nebenwirkungen im Vergleich zum Freund-Adjuvans deutlich geringer.

Ich immunisierte je 2 Gruppen von 11-12 *Mpo*^{-/-} Mäusen mit Freund-Adjuvans bzw. TiterMax-Adjuvans. Die erste Gruppe erhielt das 33aa MPO-Peptid mit dem jeweiligen Adjuvans. Die zweite Gruppe erhielt das an KLH gekoppelte MPO-Peptid mit dem jeweiligen Adjuvans. Die beiden TiterMax-Gruppen wurden einmalig mit 100 µg MPO-Peptid/Maus immunisiert und das Blut nach 6 Wochen entnommen. In den Freund-Adjuvans-Gruppen erfolgte die initiale Immunisierung von 100 µg MPO-Peptid/Maus mit FCA und die Boosterimmunisierung am Tag 14 ebenfalls mit 100 µg Peptid im FIA. Die Mäuse wurden am Tag 28 zur Blutentnahme getötet. Das sonstige Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen Protokoll.

Vor der finalen Aufreinigung der anti-MPO-Antikörper aus den gewonnenen Mausseren wurde die Anzahl der gebildeten AK in einem MPO-ELISA kontrolliert. Dazu wurde eine ELISA-Platte mit murinem MPO aus einer neutrophilen Zelllinie beschichtet

und mit den gewonnenen Seren inkubiert. Es kam zu einer AG-AK-Reaktion, bei der die anti-MPO-AK an das murine MPO binden. Nach mehreren Waschzyklen wurde ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der mit Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert war. Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe eines Farbsubstrates (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB), welches nun von der HRP umgesetzt wurde. Der Grad der Umsetzung des TMB korrelierte somit mit der Konzentration an anti-MPO-AK und ließ sich anschließend durch Messung der Extinktion am Fotometer bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmen.

Das genauere Funktionsprinzip des ELISAs ist in Kapitel 2.9 ausführlich beschrieben. Die Ergebnisse des anti-MPO-ELISAs sind in Abbildung 8 dargestellt.

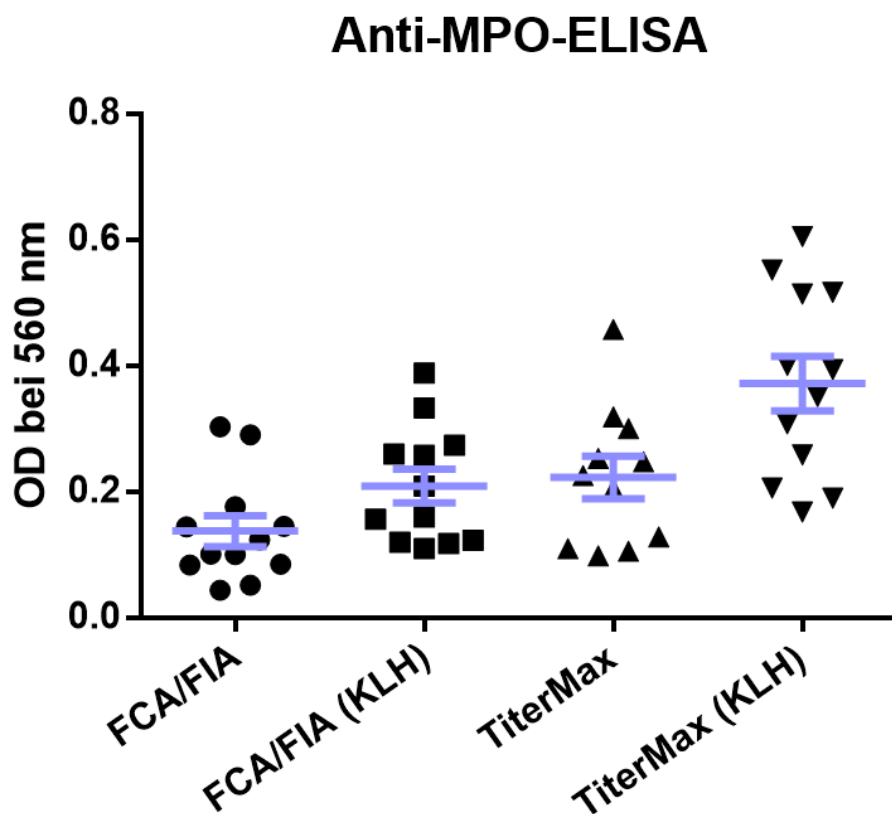


Abb. 8: Anti-MPO-ELISA der gewonnenen Mausseren. Mäuse, die mit dem KLH-Konjugat immunisiert wurden, wiesen in beiden Adjuvansgruppen eine höhere anti-MPO-Konzentration auf. Der Vergleich beider Adjuvantien zeigt, dass die Immunisierung mit FCA/FIA im Gegensatz zur Immunisierung mit TiterMax zu einer reduzierten Antikörperkonzentration führt (OD = optische Dichte, FCS = *Freund's complete adjuvans*, FIA = *Freund's incomplete adjuvans*, KLH = *Keyhole limpet hemocyanin*).

Es ist deutlich zu sehen, dass die Verknüpfung des MPO-Peptids mit dem KLH in beiden Adjuvansgruppen zu einer Steigerung der Antikörperbildung führt. Weiterhin scheint das TiterMax Impfadjuvans dem Freundschens Adjuvans (FCI/FIA) überlegen zu sein. Sowohl in Mäusen, die das native MPO-Peptid erhielten, als auch in Mäusen, die mit der MPO-Peptid/KLH Kombination immunisiert wurden, führte das TiterMax Adjuvans zu einer potenteren Immunantwort. Verglichen mit den MPO-ELISAs der zuvor durchgeführten Immunisierungsversuche mit dem kompletten MPO-Protein war die Konzentration von anti-MPO-AK jedoch in allen vier Gruppen nicht signifikant erhöht (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurde der Ansatz des 33aa-MPO-Peptids nicht weiter verfolgt; die weiteren Experimente wurden mit den ursprünglich verwendeten anti-MPO-Antikörpern aus Mäusen, die mit dem kompletten MPO-Peptid immunisiert wurden, durchgeführt.

2.4 Unilaterale Ureterligation (UUO)

Die Bildgebung glomerulärer Strukturen in einer nativen, soliden Mausniere ist auch bei Verwendung eines konfokalen Multiphotonenmikroskops ausgesprochen kompliziert, da das Nierenparenchym, welches die einzelnen Glomeruli umgibt, eine sehr hohe Gewebsdichte aufweist. Um dennoch eine aussagekräftige Bildgebung zu erreichen und die intravitalen Vorgänge innerhalb der Nierenglomeruli ausreichend beurteilen zu können verwendete ich das *unilateral ureteral obstruction* (UUO) Modell.

Die UUO in Mäusen ist eigentlich ein gut beschriebenes Modell der intestinalen Nierenfibrose und der obstruktiven Nephropathien (Chevalier et al., 2009; Klahr and Morrissey, 2002). Die irreversible Okklusion des Ureters führt in diesem Modell innerhalb von einigen Tagen zur Hydronephrose, zur Einwanderung von Entzündungszellen (primär Makrophagen) und zum Zelltod tubulärer Epithelzellen (Chevalier et al., 2009). Da die kortikalen Nierenstrukturen inklusive der Glomeruli jedoch weitestgehend unverändert bleiben, verwendete ich das UUO-Modell um eine hydronephrotische Niere zu erzeugen, welche deutliche Vorteile in der konfokalen Bildgebung mit sich bringt (Steinhausen et al., 1983). Befürchtungen, dass die parenchymalen Umbauprozesse der Niere im Anschluss an die UUO auch die Vorgänge in glomerulären Nierenstrukturen beeinflussen, konnten ausgeräumt werden. Arbeitsgruppen in unserem Labor zeigten im direkten Vergleich von soliden und hydronephrotischen Nieren, dass das Verhalten von Leukozyten im Glomerulus durch die UUO-Prozedur nicht beeinflusst wird (Devi et al., 2010a; Kuligowski et al., 2006b, 2009).

2.4.1 Operatives Vorgehen der UUO

Ziel der Ureterligation ist die Unterbrechung des Urinabfluss aus dem Nierenbecken in die Harnblase. Der Rückstau des Urins führt zu einer hydronephrotischen Morphologie der Niere und ermöglicht somit eine optimale Bildgebung glomerulärer Strukturen.

Die Maus wurde dazu zunächst in einer Sevofluran-Gaskammer inhalativ narkotisiert. Um die Narkose während der gesamten Operationsdauer aufrecht zu erhalten, wurde die Maus nach Fixierung auf dem Operationsboard mit einer speziellen Inhalationsvorrichtung stetig mit einer ausreichenden Menge an Sevofluran versorgt.

Es folgte die gründliche Rasur des abdominalen Fells mit anschließender Hautreinigung und -desinfektion mittels Chlorhexidingluconat-Lösung.

Die Operation begann mit einer circa einen Zentimeter langen, minimal links-lateralen Hautinzision etwa 0,5 cm oberhalb des Genitals. Nach sorgfältiger Entfernung des subkutanen Bindegewebes folgte eine ebenfalls einen Zentimeter lange Inzision der abdominalen Muskelschichten. Anschließend wurden Haut- und Muskelgewebe durch zwei Retraktoren nach lateral aufgespannt um einen optimalen Blick auf die nun geöffnete Bauchhöhle zu erlangen.

Der Ureter wurde zusammen mit den uretralen Blutgefäßen mit Hilfe zweier Pinzetten aufgesucht und vorsichtig aus der Bauchhöhle angehoben. Nachdem der korrekte Ursprung des Ureters aus dem Nierenbecken überprüft worden war, folgte die zweifache Ligation mittels mehrfach verknoteter nicht resorbierbarer USP 5-0 Nylonfäden im Abstand von ca. 2 mm (Abb. 9, a). Der Ureter wurde zwischen beiden Ligationen mechanisch durchtrennt und die überstehenden Fäden getrimmt. Die Durchtrennung des Ureters mit anschließender narbiger Umbildung der Schnittenden gewährleistete eine optimale Obstruktion des Harnleiters, auch wenn sich die Fäden im postoperativen Verlauf lösen sollten. Um eine angemessene lokale Schmerzkontrolle zu erlangen wurden zwei bis drei Tropfen Morphin auf den operierten Ureter geträufelt.

Die abdominalen Muskelschichten wurden mithilfe einer invertierten C-Naht (USP 4-0, nicht resorbierbar) verschlossen. Die Haut wurde durch eine fortlaufende kutane Naht (USP 4-0, nicht resorbierbar) mit drei bis vier Stichen vernäht (Abb. 9, b).

Im Anschluss an die Operation wurde die Maus mit einer intraperitonealen Dosis von 100 µl Carprofen (1 mg/ml) zur zusätzlichen Schmerz- und antiphlogistischen Kontrolle versorgt. Dieser Schritt wurde nach 24 Stunden wiederholt.

Nach Abschluss der Operation wurden die Mäuse zunächst täglich auf Anzeichen von Schmerzen und unzureichender Wundheilung untersucht. Gegebenenfalls mussten die Hautnähte erneuert werden.

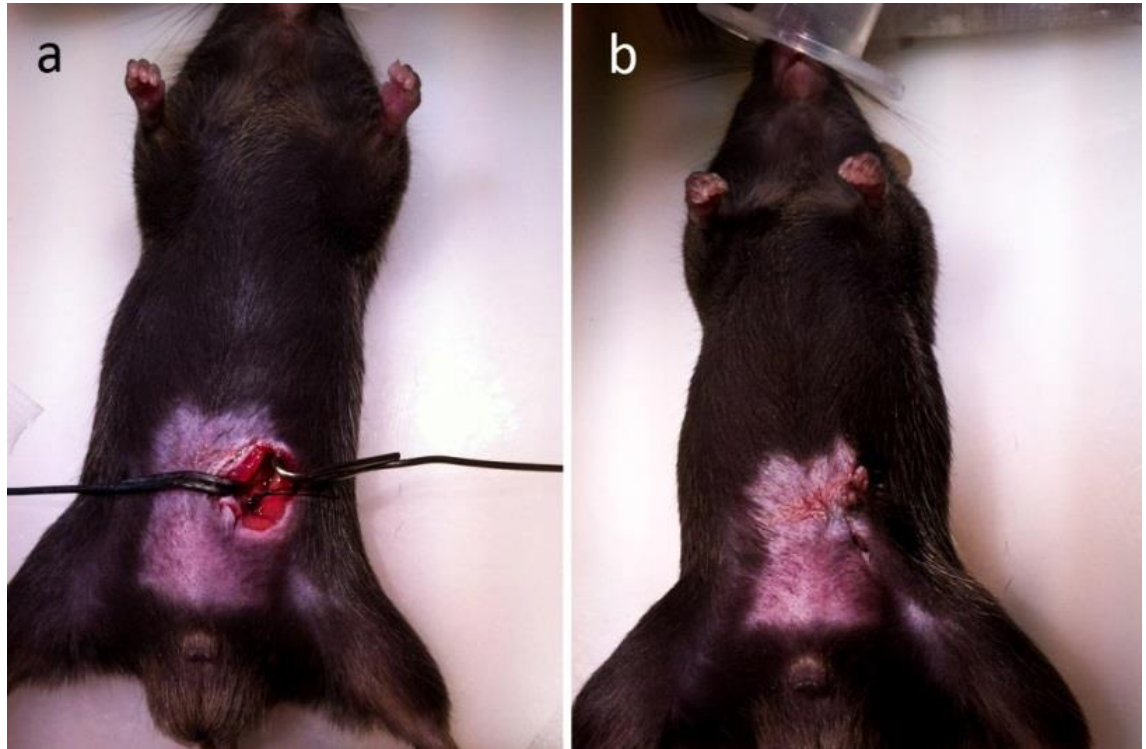


Abb. 9: UUO-Prozedur. **a** Operationssitus nach erster Ligation des Ureters mittels Nylonfaden **b** Operationswunde mit fortlaufender Naht.

Die bildgebende Untersuchung der hydronephrotischen Mausniere wurde im Rahmen unserer Untersuchungen jeweils 12 Wochen nach der UUO-Prozedur durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt war die Niere auf ein durchschnittliches Maß von ca. 15 x 10 mm angeschwollen und die Glomeruli sowie Gefäßstrukturen befanden sich oberflächlich in einer dünnen Schicht von Nierenparenchym (Abb. 10).

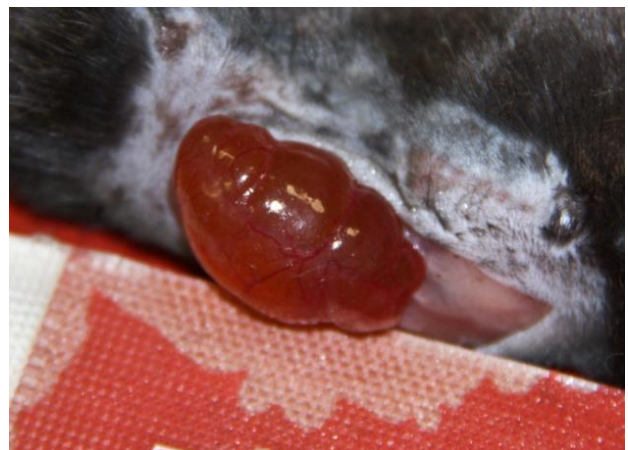


Abb. 10: Hydronephrotische Niere zwölf Wochen nach UUO-Prozedur (C57BL6/J Maus, Niere nach lateral externalisiert).

2.5 Katheterisierung der Halsvene

Um während des Experimentes eine ausreichende Versorgung der Maus mit Anästhetika und Reagenzien sicherzustellen, wurde vor Beginn des Experimentes die Halsvene der Maus katheterisiert. Da die nachfolgende Externalisierung der hydro-nephrotischen Niere auf der linken Seite erfolgte, wurde der Katheter in die rechte Halsvene eingeführt.

Hierzu wurde die Maus zunächst vor Beginn des Experimentes durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von 150 mg/kg KG Ketamin und 10 mg/kg KG Xylazin narkotisiert. Nach kurzer Einwirkzeit wurde die Narkose mittels Beurteilung der Schnurrhaarbewegung, der Atemfrequenz sowie des *pinch-toe test* beurteilt, anschließend wurde mit der eigentlichen Prozedur begonnen. Die Operation wurde unter einem Sektionsmikroskop mit 3-facher Vergrößerung durchgeführt, um eine optimale Sicht während der Katheteranlage zu gewährleisten.

Das Fell der rechten Halsregion wurde entfernt und die Maus rücklings auf einer Arbeitsplatte fixiert (Abb. 11, a). Es folgte eine ca. 1 cm lange Hautinzision entlang des anatomischen Verlaufs der Halsvene. Nach seitlicher Retraktion beider Wundränder wurde die Halsvene mit zwei gebogenen Pinzetten aus dem umliegenden Fett- und Muskelgewebe freipräpariert und zwei Nylonfäden (USP 3-0, nicht resorbierbar) unter der Halsvene hergeführt (b).

Der kraniale Faden wurde fest um die Vene verknotet und an der Arbeitsplatte fixiert. Dadurch spannte sich die Halsvene auf und bot einen optimalen Zugang für die Punktion dar. Der zweite Nylonfaden wurde kaudal des ersten lose um die Venen verknotet, um später den Katheter zu fixieren (c). Die Halsvene wurde nun vorsichtig mittels einer 30G Nadelspitze punktiert und der spitz zugeschnittene Katheter (PE10) vorsichtig unterhalb der eingeführten Nadel in das Gefäßlumen vorgeschoben.

Das andere Ende des Katheter war zu diesem Zeitpunkt über eine 30G Nadel mit einer NaCl gefüllten 1 ml Spritze verbunden. Die korrekte Lage des Katheters wurde durch die vorsichtige Injektion von NaCl sowie leichter Blutaspiration überprüft. Es wurde darauf geachtet, keine Luft in das Gefäßsystem der Maus gelangen zu lassen, da dies

meist zu einer letalen Luftembolie der Lunge führt. Der korrekt liegende Katheter wurde abschließend mit beiden Nylonfäden an der Halsvene fixiert (d).

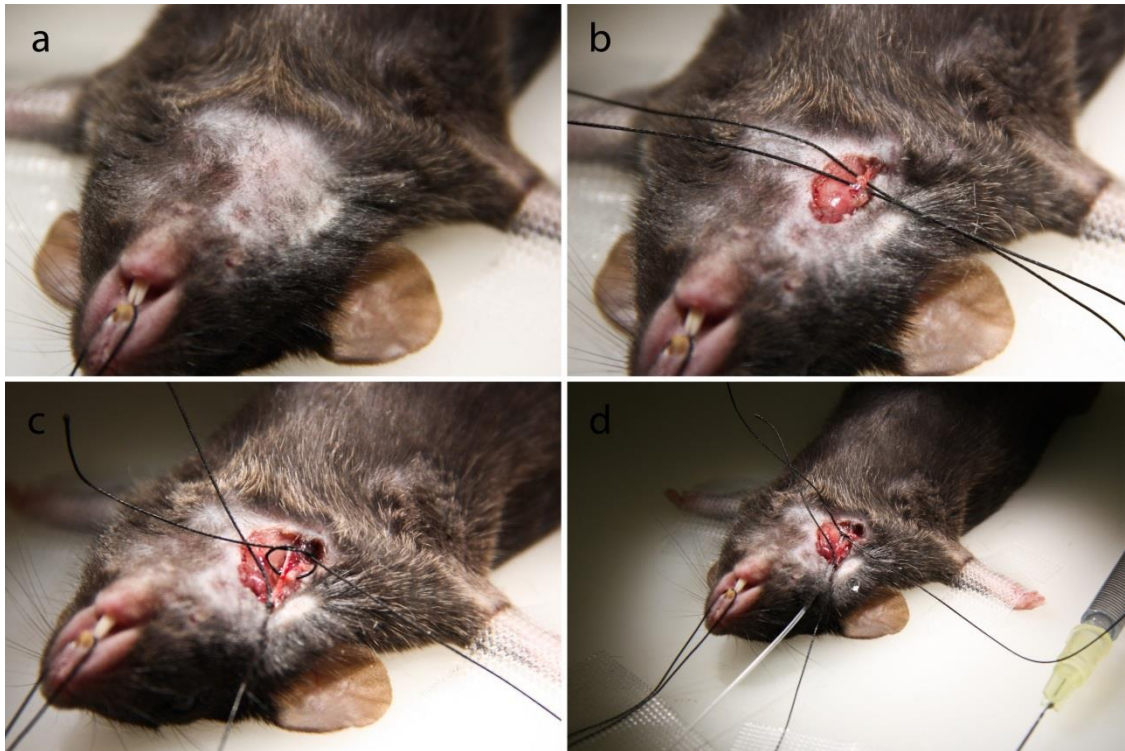


Abb. 11: Katheterisierung der Halsvene. **a** Rasur der rechten Halsregion, **b** Freipräparierte Halsvene mit Nylonfäden, **c** Aufspannen der Halsvene mithilfe des kranial verknöteten Fadens, **d** Fertig eingebrachter und fixierter Halsvenenkatheter.

2.6 Präparation der Niere

Zur optimalen intravitalen Untersuchung des Nierengewebes mittels konfokaler MPM musste die Niere zunächst für die Mikroskopie zugänglich gemacht werden. Die linke Flanke der Maus wurde dazu großzügig enthaart (Abb. 12, a) und über eine 2 bis 3 cm lange Hautinzision entlang der anatomischen Lage der Niere eröffnet (b). Die abdominalen Muskelschichten der Bauchwand wurden mithilfe eines Elektrokauters durchtrennt. Dabei wurde stets auf eine ausreichende Kühlung des Gewebes geachtet um mögliche Hitzeschäden des Nierengewebes zu vermeiden. Die Inzision des Muskelgewebes sollte eine Länge von ca. 1 bis 1,5 cm nicht überschreiten (c). Somit konnte gewährleistet werden, dass die Niere nach Externalisierung zusätzlich durch das Muskelgewebe am Nierenstil fixiert wird.

Die Maus wurde nun auf eine spezielle Wärmeplatte überführt und die hydronephrotische Niere auf eine weitere kleine Wärmeplatte externalisiert (d). Der Urin wurde über eine am oberen Pol der Niere eingeführte 30G Nadel vorsichtig entfernt (e). Die Menge an Resturin, der in der Niere verblieb, ist von der Größe der hydronephrotischen Niere abhängig. Es sollte versucht werden nicht zu viel Urin abzuführen, da ansonsten die Niere vollständig kollabiert. Auch eine zu große Menge an Resturin ist problematisch, da beim Aufbringen des Objektträgers ansonsten zu viel Druck auf das Nierenparenchym ausgeübt wird und die Perfusion der Niere negativ beeinträchtigt wird.

Die externalisierte Niere wurde anschließend auf der Wärmeplatte fixiert um sie für die intravitale Mikroskopie gut zugänglich zu machen. Dies erfolgte mit Hilfe dreier Nylonfäden, die entlang der Nierenkapsel am Parenchym und Fettgewebe befestigt wurden (f) und nachfolgend zum Aufspannen der Niere dienten (g). Während der Fixierung sollte auf die ausreichende Befeuchtung der Niere geachtet werden um mögliche Parenchymschäden durch Austrocknen zu vermeiden.

Um die Niere für die intravitale Mikroskopie vorzubereiten wurde sie mit NaCl-Lösung umspült und mit einem Deckglas vorsichtig von oben fixiert (h). Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Niere und Deckglas befanden, da diese die Bildgebung behindert hätte. Das Deckglas wurde mit Schmierfett abgedichtet, so dass die Niere zu jeder Zeit mit NaCl-Lösung umspült war und während des Experiments nicht austrocknete. Ein Ring aus Schmierfett auf der Oberseite des Deckglases diente später der NaCl-Immersion des Objektes zur Optimierung der Bildgebung.

Die Narkose der Maus musste während der gesamten Präparation kontinuierlich, wie zuvor beschrieben, überprüft und gegebenenfalls durch erneute Anästhetikagabe aufgefrischt werden.

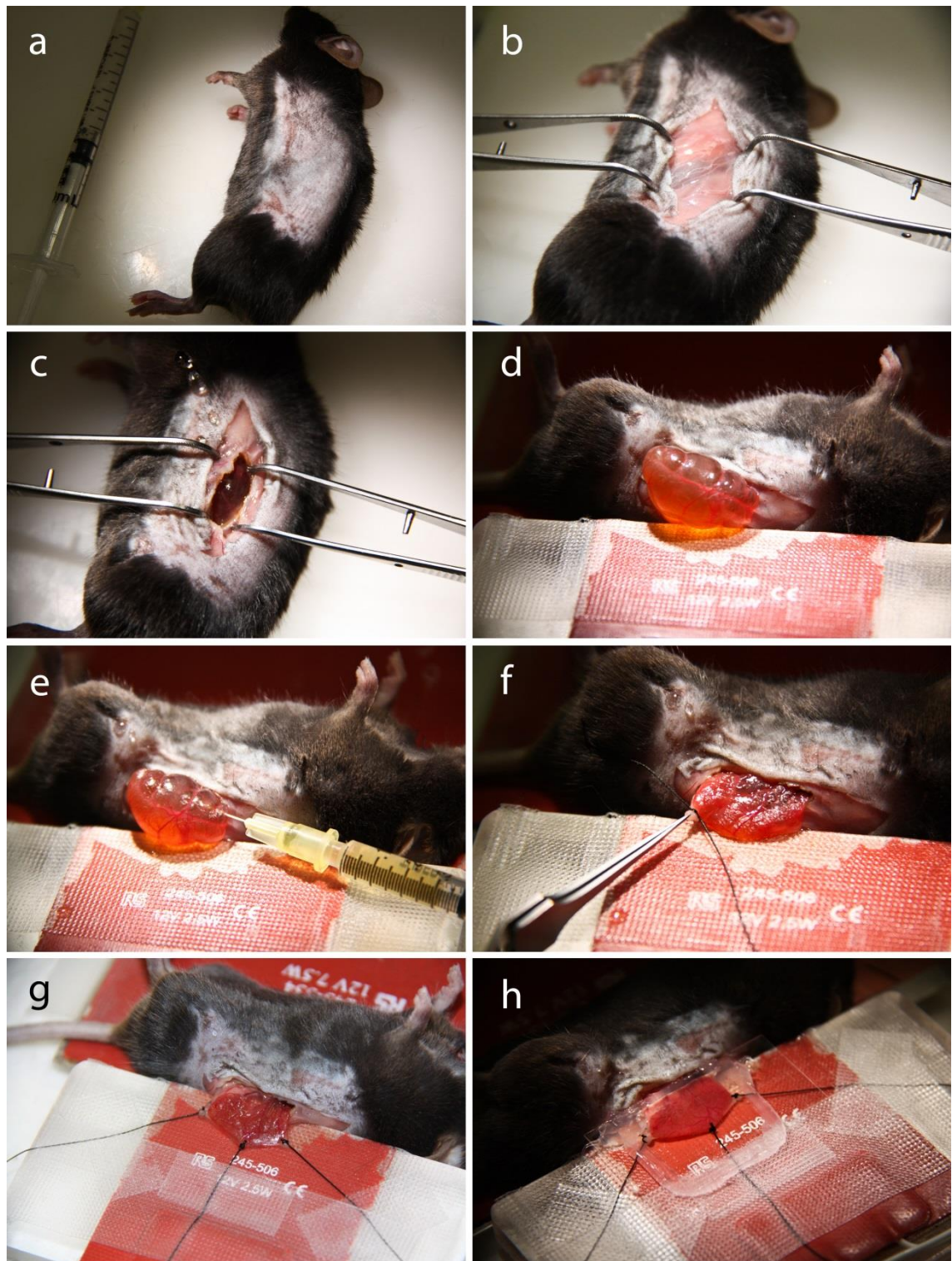


Abb. 12: Präparation der Niere. **a** Rasur der rechten Flanke, **b** Hautinzision, **c** Inzision der abdominalen Muskelschichten, **d** Externalisierung der hydronephrotischen Niere auf die Wärmeplatte, **e** Entnahme des Urins, **f** Befestigung der Fixierungsfäden, **g** Aufspannen der Niere, **h** Aufbringen des Deckglases.

2.7 Vorbereitung zur intravitalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie

Nach der Nierenpräparation für die intravitale Mikroskopie wurden die Mäuse zusammen mit der Wärmeplatte auf dem Objekttisch des Mikroskops positioniert (Abb. 13). Ich verwendete ein Leica SP5 konfokales Multiphotonenfluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), welches mit einem 20X 1.0 NA WI Objektiv (Leica) ausgestattet war. Der theoretische Hintergrund der konfokalen MPM wurde bereits an anderer Stelle erläutert.



Abb. 13: Präparierte Maus auf dem Objekttisch des SP5 Mikroskops.

Vor Beginn der Aufzeichnung musste zunächst eine zur intravitalen Mikroskopie geeignete Stelle im Nierengewebe gefunden werden. Hierzu wurde das Nierenpräparat vorerst mit einem blauen Laser (420 nm) angeregt. Durch die Autofluoreszenz des Gewebes ließ sich ein geeignetes Gesichtsfeld auffinden. Dabei war es wichtig, dass die einzelnen Glomeruli im Gesichtsfeld eine bestmögliche Blutperfusion aufwiesen und die Menge an periglomerulärem Bindegewebe möglichst gering war. Um im Anschluss an den Versuch eine optimale Analyse des aufgezeichneten Bildmaterials gewährleisten zu können, wurde das SP5 Mikroskop zunächst auf die versuchsspezifischen Modalitäten eingestellt. Das SP5-System arbeitet mit der Software LAS AF (*Leica Application Suite Advanced Fluorescence*, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), mit der sich verschiedenste Parameter einstellen ließen. Abbildung 14 zeigt die Benutzeroberfläche der Software.

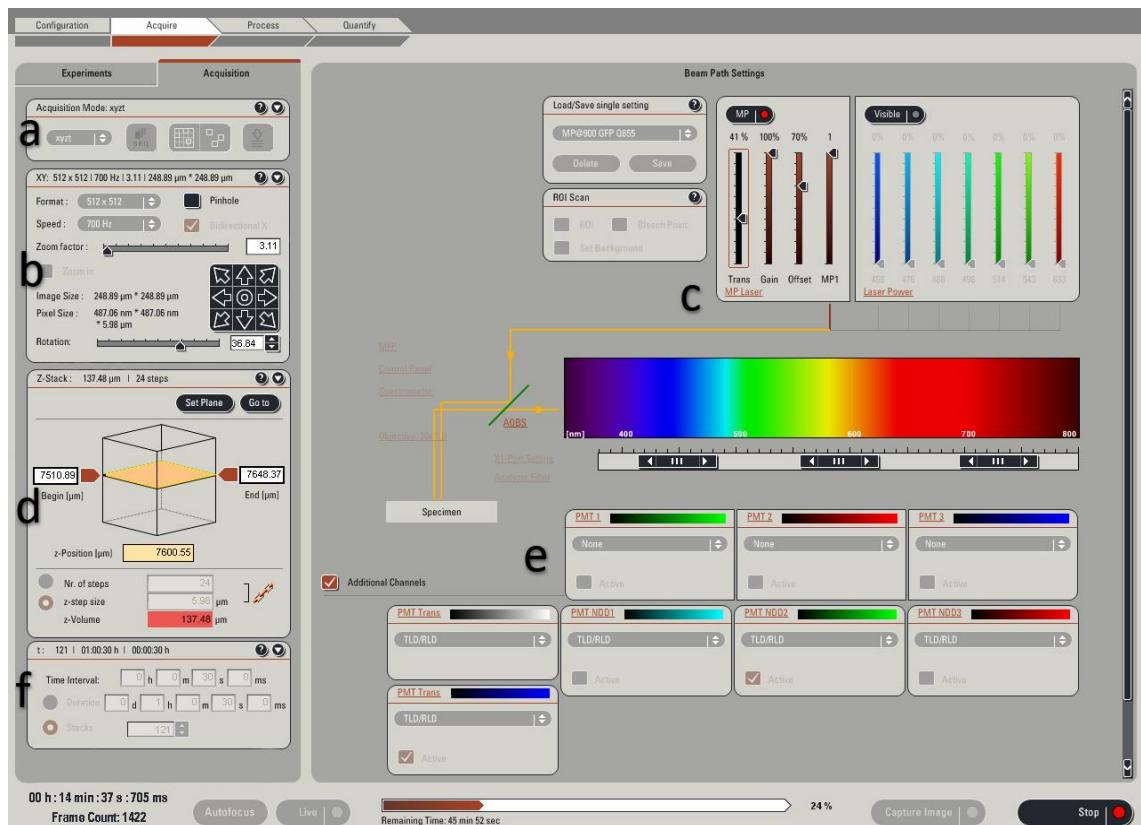


Abb. 14: Benutzeroberfläche von LAS AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence) **a** Wahl der Aufzeichnungsmethode (z.B. xyzt) **b** Feinjustierung der Horizontalebene **c** Einstellung der Laserparameter **d** Definition des Z-Stacks **e** Auswahl der Detektoren **f** Einstellung des Versuchszeitraums und der Abbildungshäufigkeit (Quelle: Eigener Screenshot des Programms LAS AF).

Zunächst erfolgte die Einstellung der Laserparameter (c). Den prozentualen Anteil der maximalen Laserpower (*transmission*) wählte ich je nach Transparenz des Nierenpräparates zwischen 20 und 45 %. Die Wellenlänge lag in Abhängigkeit des Versuches bei 810 oder 900 nm. Die Werte für *gain* und *offset* lagen bei allen Experimenten bei 100 bzw. 70 %. Als Aufzeichnungsmethode verwendete ich den Modus „xyzt“ der die dreidimensionale Aufnahme eines Quaders über einen bestimmten Zeitraum ermöglichte (a). Über das Bedienfeld „XY“ (b) ließen sich die gewählten Glomeruli durch Rotation, Zoom und Verschiebung in XY-Richtung in der Mitte des Gesichtsfelds zentrieren. Um später für die jeweilige Maus ausreichend repräsentative Daten zu erhalten, zeichnete ich drei bis vier Glomeruli gleichzeitig auf. Die Größe des Z-Stacks (d) stellte ich je nach Größe der Glomeruli auf einen Wert zwischen 120 und 150 µm mit einem Rasterabstand von ca. 6 µm ein. Da die Atembewegung der Maus während des Experiments zu Bewegungen des Präparats entlang der Z-Achse führen kann, ist es wichtig den Z-Stack so groß zu wählen, dass kleine Bewegungen des Gewebes toleriert werden können. Das emittierte Fluoreszenzsignal zeichnete ich je nach Versuch mit

den Detektoren NDD 1-4 auf (e). Ich wählte eine Gesamtaufnahmezeit von 1 Stunde mit Aufzeichnungsintervallen von 30 Sekunden (f).

Nachdem alle Parameter korrekt eingestellt und die versuchsspezifischen Antikörper zeitgerecht verabreicht worden waren, startete ich die einstündige Aufzeichnung. Die Narkose der Maus sollte alle 5 Minuten anhand der Schnurrhaarbewegung und des *pitch-toe-tests* überprüft werden. In Abständen von 20 Minuten erfolgte die Narkoseauffrischung mit jeweils 30 µl des Ketamin/Xylazin-Gemisches.

2.8 Kardiale Punktion

Bei einigen Experimenten war es zur Analyse verschiedener Parameter notwendig, der untersuchten Maus im Anschluss an das Experiment Blut zu entnehmen. Ich verwendete das gut beschriebene Modell der kardialen Punktion (Hoff, 2000). Mittels kardialer Punktion lässt sich bei einer final anästhetisierten Maus je nach Größe und Gewicht der Maus ein Blutvolumen von bis zu 1 ml gewinnen. Dazu wird zunächst eine 1 ml-Spritze mit ca. 50 µl einer Heparinlösung gefüllt und mit einer 26G Nadel bestückt. Anschließend legt man die Maus möglichst gerade auf eine feste Unterfläche und führt die Nadel linkslateral ca. 0,5 cm unterhalb der Achselhöhle mit einem Anstellwinkel von ca. 30° nach kranial waagrecht durch den Brustkorb ein. Sobald der Ventrikel des Herzens punktiert ist, erscheint eine leicht pulsierende Blutsäule in der Spritze. Durch vorsichtiges Aufziehen der Spritze wird verhindert, dass der Ventrikel kollabiert. Vor Durchführung der kardialen Punktion ist auf eine ausreichend tiefe Narkose der Maus zu achten. Im Anschluss wird die Maus durch zervikale Dislokation schonend getötet.

2.9 Digitale Auswertung des Bildmaterials

Das mit dem SP5 Multiphotonenmikroskop aufgenommene Bildmaterial der einzelnen Experimente wurde im Anschluss zur Analyse des Verhaltens der neutrophilen Granulozyten digital ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels der Software *Imaris* (Bitplane, Scientific Solutions). *Imaris* ist ein Programm, das die Visualisierung, Segmentierung und Interpretation von dreidimensionalen Mikroskopaufnahmen er-

möglichst. In diesem Abschnitt gehe ich kurz auf die unterschiedlichen Möglichkeiten der dreidimensionalen Bildanalyse mit *Imaris* ein.

Zunächst ließen sich Helligkeit, Kontrast und Intensität der verschiedenen Farbkanäle einstellen. Mit diesen Einstellungen sollte versucht werden eine optimale Bilddarstellung des Präparates zu erhalten. Es ist darauf zu achten, dass sich die angefärbten Zellen zu jedem Zeitpunkt klar von dem verwendeten vaskulären Marker abgrenzen lassen und auch schwächer angefärbte Zellen noch gut sichtbar sind. Je nach Kombination von zellulärem und vaskulärem Marker ist es auch möglich einen bestimmten Farbton, der vom Detektor des Mikroskops aufgenommen wurde, vollständig zu ändern um die Kontrasteigenschaften zwischen den glomerulären Gefäßstrukturen und der passierenden Zellen zu verbessern.

Für die eigentliche Analyse des Bildmaterials stehen in *Imaris* vier verschiedene Darstellungsvarianten zur Verfügung:

a. Dreidimensionale Ansicht

In der dreidimensionalen Ansicht wird der gesamte Z-Stack in Form eines Würfels dargestellt, der sich frei in allen Ebenen rotierend lässt. Hierdurch wird eine optimale räumliche Darstellung des Glomerulus und der Zellen gewährleistet. Nachteil dieser Projektionsart ist die oftmals nicht vermeidbare Anfärbung von Bindegewebsstrukturen, die eine klare Sicht auf den Glomerulus behindern kann. Ein weiterer Nachteil ist das vergleichbar geringe Auflösungsvermögen der dreidimensionalen Ansicht. Insbesondere bei kleinen Glomeruli und Zellen kann eine optimale Beurteilung dadurch eingeschränkt sein.

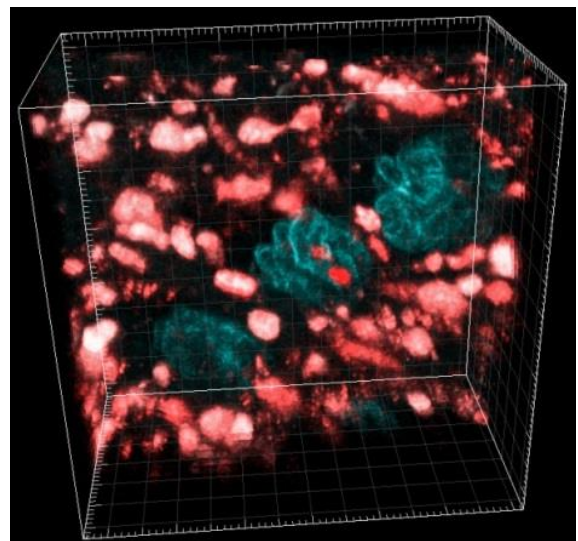


Abb. 15: Dreidimensionale Darstellungsweise der murinen Nierenglomeruli (türkis) und der neutrophilen Granulozyten (leuchtend rot, innerhalb der Glomeruli; Quelle: Eigene Aufnahme mit *Imaris*).

b. Ebenenansicht

In der Ebenenansicht wird immer nur eine Ebene des Z-Stacks gleichzeitig dargestellt. Dadurch kann man jede Ebene in voller Bildgröße analysieren und anschließend zwischen verschiedenen Ebenen wechseln. Nachteil dieser Darstellung ist der hohe zeitliche Aufwand, der für die separate Analyse der einzelnen Ebenen benötigt wird.

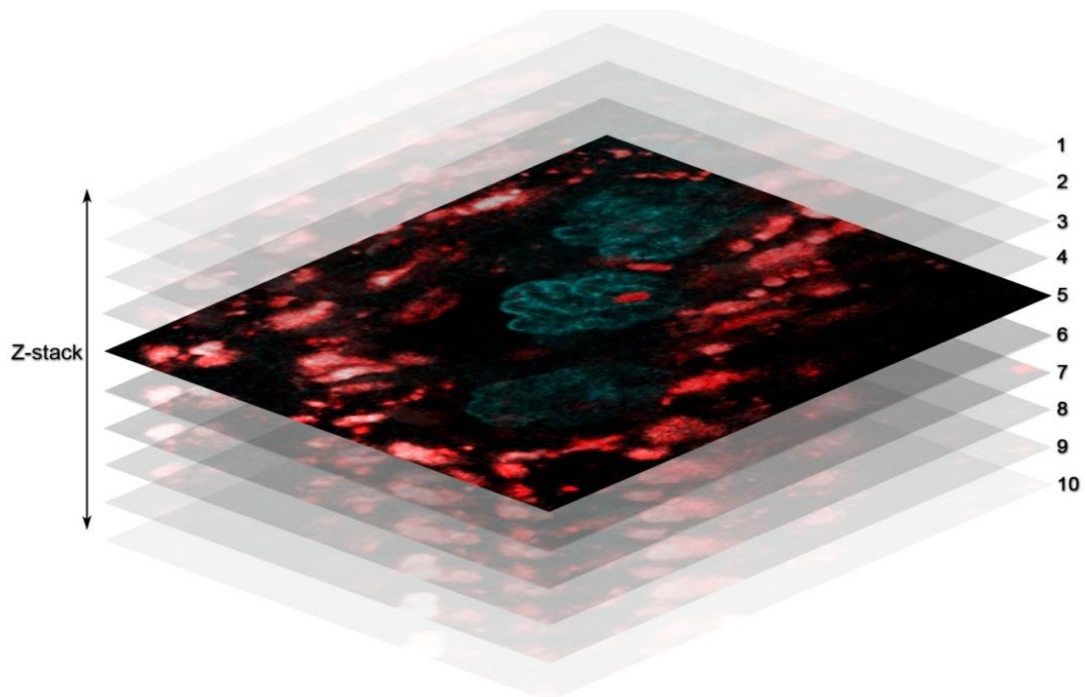


Abb. 16: Funktionsschema der Ebenenansicht (Nierenglomeruli (türkis) und neutrophile Granulozyten (leuchtend rot, innerhalb der Glomeruli; Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1 unter Verwendung eigener Aufnahmen mit *Imaris*).

c. Maximalprojektion

In der Maximalprojektion werden alle Ebenen des aufgenommenen Z-Stacks übereinander projiziert und somit ein einziges zweidimensionales Bild erzeugt. Eine Zelle, die sich im dreidimensionalen Raum des Glomerulus bewegt, wird somit als rundlicher Punkt dargestellt, der sich nur in der XY-Ebene bewegt. Aufgrund der überlagernden Projektionen aller Ebenen sind auch schwächer angefärbte Zellen gut erkennbar. Der Nachteil dieser Ansicht liegt in der Abgrenzung verschiedener Zellen, die sich in einer räumlichen Nähe zueinander befinden und aufgrund von Bewegungen in der Z-Ebene nur durch andere Darstellungen zu unterscheiden sind.

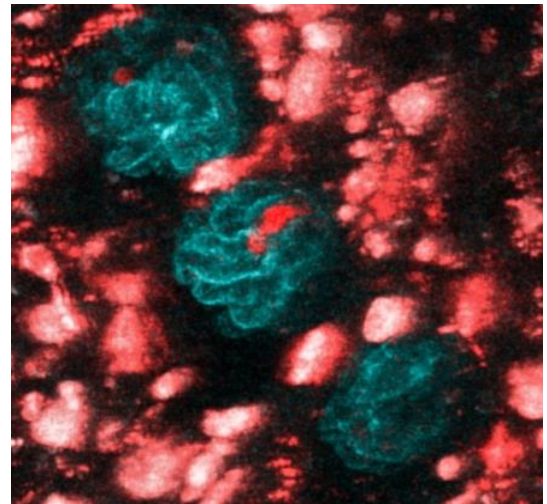


Abb. 17: Maximalprojektion der murinen Nierenglomeruli (türkis) und der neutrophilen Granulozyten (leuchtend rot, innerhalb der Glomeruli; Quelle: Eigene Aufnahme mit *Imaris*).

d. Galerieansicht

Die Galerieansicht stellt alle aufgenommenen Ebenen gleichzeitig in örtlicher Abfolge dar. Auf diese Weise lässt sich die Bewegung der Zellen im Glomerulus optimal in allen räumlichen Ebenen verfolgen. Auch die Abtrennung von nahe beieinander liegenden Zellen ist in dieser Ansicht deutlich einfacher. Von Nachteil ist die reduzierte Größe der einzelnen Schnittbilder.

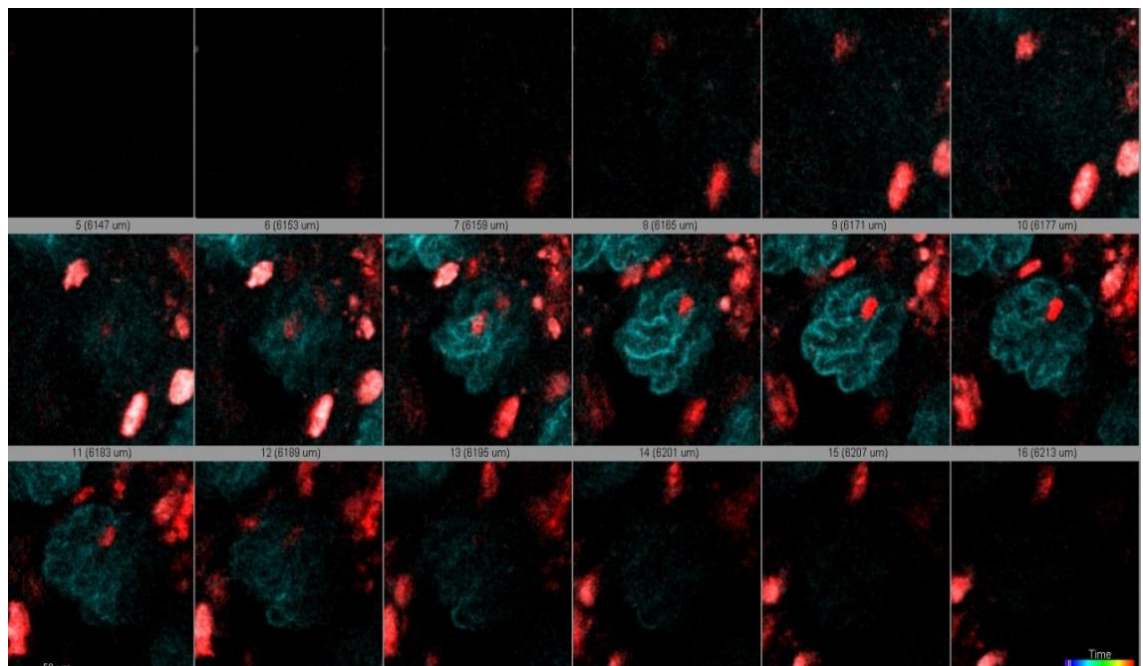


Abb. 18: Galerieansicht der murinen Nierenglomeruli (türkis) und der neutrophilen Granulozyten (leuchtend rot, innerhalb der Glomeruli; Quelle: Eigene Aufnahme mit *Imaris*).

Da alle vier Darstellungsvarianten Vor- und Nachteile mit sich bringen, wechselte ich für die optimale Analyse meiner experimentellen Daten zwischen den unterschiedlichen Ansichtsmodi.

2.10 Komplementfaktor C3-ELISA

Der murine C3-ELISA stellt ein Verfahren zur Bestimmung der C3-Komplementfaktor-konzentration in Mausseren dar. ELISA steht hierbei für *enzyme-linked immuno sorbent assay* (engl. für enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest) und beschreibt ein biochemisches Nachweisverfahren, das mithilfe einer enzymatischen Farbreaktion die Konzentrationsbestimmung eines Antigens ermöglicht. Bei dem von mir verwendeten C3-ELISA handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Hierbei wird das zu untersuchende Antigen mittels eines ersten *capture*-Antikörpers, der zuvor auf einer 96-well-Mikrotiter-Platte aufgebracht wurde, aus dem Mausserum gebunden und immobilisiert. Innerhalb eines bestimmten Referenzbereiches verhält sich die Menge an gebundenem Antigen dabei proportional zu der Konzentration des Antigens im Serum. Es folgt die Applikation eines zweiten *detection*-Antikörpers, der ebenfalls, an einer anderen Bindungsstelle, am Antigen bindet. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, die anschließend in der Lage ist eine Substratlösung umzusetzen. Der dabei zu beobachtende Farbumschlag korreliert mit der Antigenkonzentration und lässt sich mit einem Fotometer quantifizieren. Eine Bestimmung der absoluten C3-Konzentration ist durch die Auftragung einer C3-Standardreihe möglich.

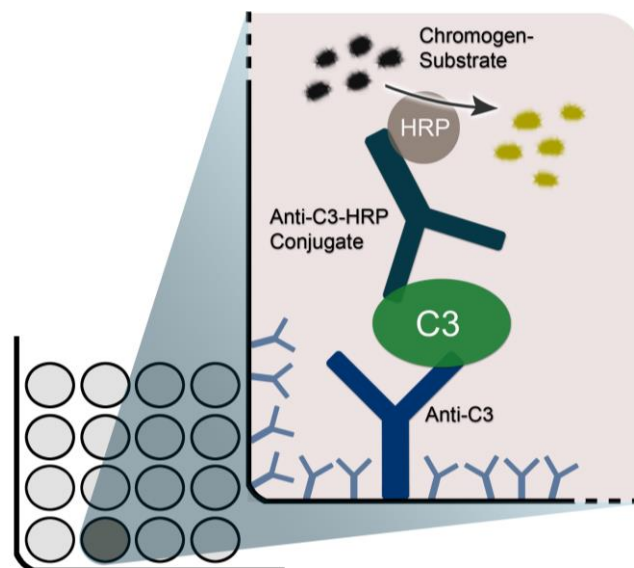


Abb. 19: Schema zum Funktionsprinzip des murinen C3-ELISAs. Ein anti-C3-Primärantikörper ist auf der 96-well-Mikrotiterplatte immobilisiert und bindet den Komplementfaktor C3 aus dem Mausserum. Ein Sekundärantikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert ist, bindet ebenfalls das C3-Antigen. Die Meerrettichperoxidase katalysiert anschließend die Umsetzung der Substratlösung. Der zu beobachtende Farbumschlag lässt sich mithilfe eines Fotometers quantifizieren (Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1).

Im Einzelnen wurden die zu untersuchenden Mausseren mit Verdünnungslösung auf eine Konzentration von 1/50.000 vorverdünnt. Der Primärantikörper (anti-C3) ist bereits zuvor maschinell auf die Mikrotiterplatte aufgetragen worden. Um später die absolute C3-Konzentration bestimmen zu können erfolgte die Aufbringung einer C3-Standardreihe. Hierzu werden je 100 µl einer standardisierten C3-Lösung in sich halbierenden Konzentrationsschritten von 200 ng/ml bis 3,125 ng/ml sowie der Leerwert auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Jeweils 100 µl der verdünnten Mausseren werden ebenfalls auf die Platte pipettiert. Es folgt eine 20 minütige horizontale Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wird der Inhalt der *wells* aspiriert und viermalig mit Waschpuffer gespült. Dabei ist auf eine vollständige Entfernung des Waschpuffers zu achten. Je 100 µl des Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpers werden aufgetragen und die Platte bei Raumtemperatur horizontal im Dunkeln für weitere 20 Minuten inkubiert. Der Waschschrift wird wiederholt. Als Substrat für die Meerrettichperoxidase wird 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. In jedes *well* werden 100 µl TMB pipettiert und die Platte erneut horizontal bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach ca. 10 Minuten wird die Substratreaktion mit einer Stopplösung beendet und die Extinktion der einzelnen *wells* bei 450 nm mittels Photometer bestimmt.

2.11 Statistische Auswertung der Messwerte

Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgte mithilfe der Software *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, La Jolla, USA). Es wurden die Mittelwerte und die dazugehörigen SEM ermittelt. Zur Signifikanzbestimmung diente der *two-tailed unpaired student's t-test*. P-Werte wurden für ein 95 %-Konfidenzintervall berechnet. Ab einem P-Wert von $p \leq 0,05$ wurden die Unterschiede zwischen zwei Größen als signifikant angesehen und in Diagrammen mit einem Stern (*) dargestellt. Ab einem P-Wert von $p \leq 0,01$ wurde der Grad der Signifikanz mit zwei Sternen (**), ab einem P-Wert von $p \leq 0,001$ mit drei Sternen (***) angegeben.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil meiner Dissertation gliedert sich in verschiedene Experimentengruppen mit unterschiedlichem Aufbau und Zielsetzungen. Alle dargestellten Daten wurden mit der bereits beschriebenen Methodik der intravitalen konfokalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie des Nierenglomerulus erhoben. Experimentspezifische Gegebenheiten werden kurz vor der Darstellung der Daten erläutert. Alle Abbildungen im Ergebnisteil meiner Dissertation wurden, unter Verwendung eigener Aufnahmen aus *Imaris* und *GraphPad Prism*, eigenständig mit *Adobe PS 5.1* erstellt.

3.1 Adhäsion und Migration neutrophiler Granulozyten in unbeschädigten glomerulären Kapillaren

In den vergangenen zehn Jahren gewann die Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie im Bereich der intravitalen Untersuchung verschiedener Organsysteme zunehmend an Bedeutung und etablierte sich als leistungsstarke Methodik zur Beurteilung von immunologischen Vorgängen in *in-vivo imaging* Laboratorien (Garside and Brewer, 2008; Mazo et al., 2005; Miller et al., 2002; Nava et al., 2010; Peti-Peterdi et al., 2012). Insbesondere in der intravitalen Darstellung des Nierengewebes stießen konventionelle Mikroskopieverfahren aufgrund der geringen Tiefendarstellung und einer sehr hohen Fototoxizität schnell an ihre Grenzen. Die Entwicklung des konfokalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskops überwand diese Einschränkungen und ermöglichte unserer Arbeitsgruppe nun eine mehrkanalige, dreidimensionale Tiefengewebsdarstellung des Nierenglomerulus über einen verlängerten Zeitraum, die mit einer vergleichbar geringen Fototoxizität einhergeht (Devi et al., 2012).

Zunächst beobachtete ich das Verhalten neutrophiler Granulozyten in physiologischen, nicht entzündlich veränderten Nierenglomeruli. Die Zellen und die renalen Gefäßstrukturen wurden durch die intravenöse Gabe von 10 µl anti-Gr1-PE bzw. 7 µl Pac-Blue-Dextran angefärbt und mit der beschriebenen Methodik in Intervallen von 30 Sekunden über einen Zeitraum von 60 Minuten abgebildet. Das emittierte Fluoreszenzsignal wurde mit den Detektoren NDD 1 und NDD 3 aufgezeichnet.

Unerwarteterweise zeigte sich, dass neutrophile Granulozyten auch in Abwesenheit eines inflammatorischen Stimulus Phasen der Migration und Adhäsion in den glomerulären Kapillaren durchlaufen, bevor sie den Glomerulus mit dem Blutstrom wieder verlassen. Der üblichen Klassifikation für Leukozyten in der intravitalen Mikroskopie entsprechend wurden Neutrophile, die für mehr als 30 Sekunden im Glomerulus verweilten, als adhärente Zellen definiert. Während der einstündigen Aufzeichnungsperiode entsprachen durchschnittlich 20,83 Zellen ($N=6$, $SEM=2,53$) diesem Kriterium. Die Zeit vom Eintreffen einer Zelle bis zum Zeitpunkt des Ablösens von der Gefäßwand und des Verlassens des Glomerulus wurde als Verweildauer (*dwell time*) definiert. Die Verweildauer, oder auch Aufenthaltszeit, der neutrophilen Granulozyten lag in unbehandelten, nicht entzündlich veränderten Glomeruli bei durchschnittlich 2,8 Minuten ($N=6$, $SEM=0,521$).

Bei der genaueren Betrachtung der Zellen im Glomerulus ließen sich weiterhin zwei unterschiedliche Verhaltensphänotypen beschreiben. Zum einen waren neutrophile Granulozyten zu beobachten, die während ihres gesamten Aufenthalts weitestgehend an einem Ort der glomerulären Gefäßstruktur verweilten. Diese Zellen wurden als statische Neutrophile (*static neutrophils*) bezeichnet. Auf der anderen Seite fanden sich Zellen, die entlang der vaskulären Struktur migrierten und dabei ihre morphologische Struktur änderten. Diese Zellen wurden als migrierende Neutrophile (*crawling neutrophils*) definiert. In den Abbildungen 20 und 21 ist der Unterschied zwischen statischen und migrierenden Neutrophilen dargestellt.

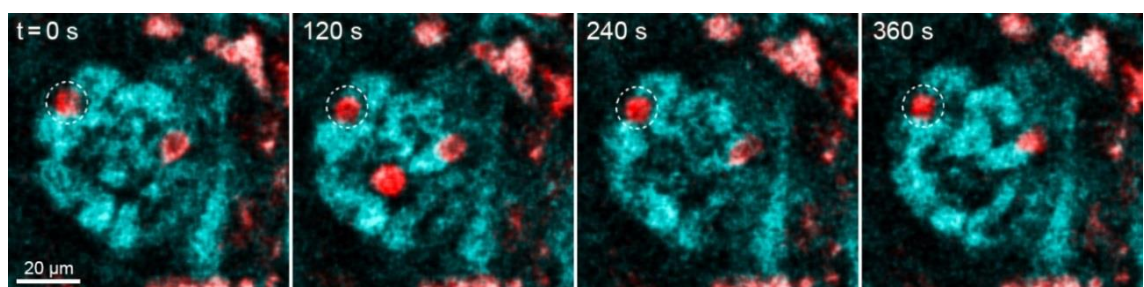


Abb. 20: Neutrophiler Granulozyt vom statischen Phänotyp (*static neutrophil*, rote Struktur innerhalb des weiß gepunkteten Kreises, gefärbt mit anti-Gr1-PE) im murinen Nierenglomerulus (türkis, gefärbt mit Pac-Blue-Dextran). Aufnahme mit SP5 Multiphotonenmikroskop, Auswertung mit *Imaris* (ausführliche Beschreibung der Methodik unter Kapitel 2.6 und 2.8; Quelle: Eigene Aufnahmen mit *Imaris*, modifiziert mit Adobe PS 5.1).

Da neutrophile Granulozyten vom statischen Phänotyp teilweise minimale Bewegungen erkennen ließen, war es notwendig eine klar definierte Grenze festzulegen. So wurden erst die Neutrophilen, die eine längere Strecke als ihren eigenen gemittelten Durchmesser zurückgelegt hatten, als migrierende Zellen (*crawling neutrophils*) klassifiziert. Zellen, die eine geringere Strecke zurücklegten wurden als statische Neutrophile (*static neutrophils*) angesehen.

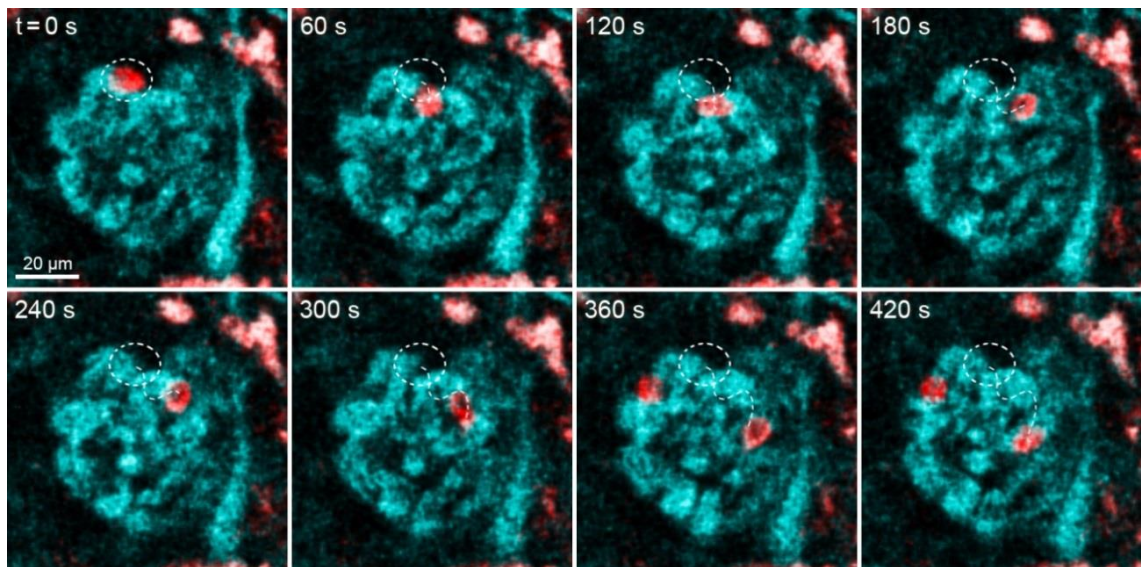


Abb. 21: Neutrophiler Granulozyt vom migrierenden Phänotyp (*crawling neutrophil*, rote Struktur zunächst innerhalb des weiß gepunkteten Kreises, dann entlang der weiß gestrichelten Linie durch den Glomerulus migrierend, gefärbt mit anti-Gr1-PE) im murinen Nierenglomerulus (türkis, gefärbt mit Pac-Blue-Dextran). Aufnahme mit SP5 Multiphotonenmikroskop, Auswertung mit *Imaris* (Quelle: Eigene Aufnahmen mit *Imaris*, modifiziert mit Adobe PS 5.1).

3.2 Anti-MPO-Antikörper führen in C57BL6/J Mäusen zu einer gesteigerten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus

Nachdem ich das Verhalten von neutrophilen Granulozyten im physiologischen, nicht entzündlich veränderten Glomerulus untersucht hatte, wollte ich den möglichen Auswirkungen von GN induzierenden anti-MPO-Antikörpern auf das Verhalten der Granulozyten nachgehen.

Wie bereits im Einleitungsteil meiner Dissertation ausführlich beschrieben, ist eine pathogene Rolle der anti-MPO-Antikörper in der Entstehung der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis als sehr wahrscheinlich anzunehmen (Bansal and Tobin, 2004; Little et al., 2005; Sanders et al., 2006; Xiao et al., 2002). Des Weiteren werden neutrophile Granulozyten auf dem heutigen Stand der Forschung als Hauptverursacher des glomerulären Schadens angesehen (Jennette et al., 2006; Kallenberg, 2011; Lionaki et al., 2007). Aus diesen Gründen schien die genauere Untersuchung der Effekte von anti-MPO-AK auf das Verhalten der Neutrophilen von Bedeutung zu sein.

Zunächst war es wichtig ein optimales Modell mit einer bestmöglichen Dosierung der Antikörper zu entwickeln. Kuligowski et al., die das Verhalten von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus mittels herkömmlicher intravitaler Mikroskopie beurteilt hatten, postulierten zwei unterschiedliche Vorgehensweisen. Zum einen beschrieben sie ein Modell, in dem die einmalige Administration von 200 µg/Maus anti-MPO-AK zu einer gesteigerten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten führt (Kuligowski et al., 2009). Zusätzlich beobachtete die Arbeitsgruppe vergleichbare Ergebnisse durch eine geringe Dosis von anti-MPO-AK (50 µg/Maus) bei gleichzeitiger Vorbehandlung der Mäuse mit Lipopolysaccharid (LPS). Die Administration von LPS führt in den Mäusen zu einem unmittelbaren Anstieg der TNF- α Serumkonzentration (Huugen et al., 2005). Dieser proinflammatorische Stimulus resultiert wiederum in einer Sensibilisierung der neutrophilen Granulozyten im Hinblick auf die Aktivierung durch ANCAs und verstärkt somit die krankheitsinduzierende Wirkung der anti-MPO-Antikörper (Falk et al., 1990b; Rarok et al., 2003; Reumaux et al., 1995). Da Huugen et al. (Huugen et al., 2005) in ihrem Modell, verglichen mit der LPS-Dosis von 0,1 µg/Maus, die Kuligowski et al. (Kuligowski et al., 2009) verabreichten, für höhere LPS-Dosen noch stärkere Effekte

zeigen konnten, wählte ich zunächst eine Dosis von 1 µg LPS/Maus, welche den Mäusen vier Stunden vor Administration der anti-MPO-Antikörper intraperitoneal verabreicht wurde. Die Auswertung des aufgezeichneten Bildmaterials zeigte jedoch eine zu starke Adhäsionsantwort der neutrophilen Granulozyten, die die Wirkung der anti-MPO-Antikörper überschattete. Zudem zeigte sich in den renalen Blutgefäßen außerhalb der Glomeruli eine ausgeprägte, durch das verabreichte LPS bedingte, Adhäsion neutrophiler Granulozyten, die den eigentlich glomerulär stattfindenden Effekt zu beeinflussen schien (Daten sind nicht gezeigt). Aus diesen Gründen führte ich meine Experimente mit der ursprünglichen Dosis von Kuligowski et al. mit 0,1 µg LPS und 50 µg anti-MPO-(bzw. anti-OVA) durch.

Um sicherzustellen, dass die Administration von LPS nicht die Gesamtzahl der Leukozyten im Blutsystem der Maus beeinflusst, bestimmte ich nach Abschluss jedes Experimentes die Gesamtzahl an Leukozyten aus einer Blutprobe der Maus. Dazu wurde der Maus mittels kardialer Punktion Blut entnommen. Es folgte die gezielte Lyse von Erythrozyten mit 3 %iger Essigsäure. Die Leukozyten wurden anschließend mit Hilfe von Kristallviolett (1 %) angefärbt und ihre Gesamtzahl pro Milliliter in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Gesamtzahl an Leukozyten unterschied sich in Experimenten, in denen die Mäuse mit LPS vorbehandelt wurden, nicht von der Anzahl der Zellen in unbehandelten Mäusen (Daten sind nicht gezeigt).

Circa drei Stunden nach intraperitonealer Injektion von 0.1 µg LPS wurden die Mäuse mit der beschriebenen Methodik zur intravitalen Mikroskopie präpariert. Anschließend erfolgte die Anfärbung der glomerulären Gefäßstrukturen mit 7 µl Pacific-Blue-Dextra. Die zu untersuchenden neutrophilen Granulozyten wurden mit 10 µl (2 µg) anti-Gr1-PE angefärbt. Beide Marker wurden ca. 5 Minuten vor Beginn der digitalen Aufzeichnung über den jugularen Katheter verabreicht. Die Administration von anti-MPO-Antikörpern (50 µg/Maus), die letztendlich zur Induktion der ANCA-assoziierten GN führen sollte, erfolgte wenige Sekunden vor Aufzeichnungsbeginn. Anschließend wurde das Nierengewebe für einen Zeitraum von einer Stunde aufgezeichnet (Abb. 22).



Abb. 22: Injektionsschema des Versuchs 3.2 (LPS = Lipopolysaccharid, anti-MPO/OVA = anti-Myeloperoxidase/Ovalbumin-Antikörper; Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1).

Die Analyse des aufgezeichneten Bildmaterials führte zu einer interessanten Beobachtung: Durch die Administration der anti-MPO-Antikörper zeigte sich im Vergleich zur anti-OVA-Gruppe eine signifikante Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten (Abb. 23, a). In der anti-MPO-Gruppe blieben die Zellen für einen Zeitraum von 6,3 Minuten ($6,332 \pm 0,2793$; $N=6$) in den glomerulären Gefäßstrukturen adhären, wohingegen in der anti-OVA-Gruppe die Neutrophilen den Glomerulus nach durchschnittlich 4 Minuten ($4,062 \pm 0,5296$; $N=6$) wieder verließen. Im Vergleich zu der beobachteten Verweildauer der Neutrophilen im physiologischen Glomerulus (2,8 Minuten, siehe Experiment 4.1) scheint es auch in Mäusen, die mit dem anti-OVA-Kontrollantikörper behandelt wurden, zu einer Verweilzeitsteigerung gekommen zu sein. Diese Tatsache lässt sich jedoch über das in meinem Modell verabreichte LPS erklären, welches als pro-inflammatorischer Mediator ebenfalls zu einer verstärkten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel führt.

Interessanter Weise führte der inflammatorische Stimulus der anti-MPO-AK aber nicht zu einer Zunahme der Gesamtzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten (Abb. 23, b). Diese lag in der anti-OVA-Gruppe bei 23,6 Zellen/Stunde ($23,61 \pm 2,554$; $N=6$) und in der anti-MPO-Gruppe bei 22,6 Zellen/Stunde ($22,58 \pm 3,257$; $N=6$).

Vergleicht man die Populationen von statischen Neutrophilen und migrierenden Neutrophilen miteinander, so fällt auf, dass nur im Bereich der migrierenden Neutrophilen eine signifikante Zunahme der Verweildauer von 4,9 Minuten ($4,896 \pm 0,6418$; $N=6$) auf 8,5 Minuten ($8,460 \pm 0,4994$; $N=6$) auftritt (Abb. 23, d). Die minimale Verweilzeitsteigerung in der Untergruppe der statischen neutrophilen Granulozyten ist hingegen nicht signifikant (Abb. 23, c).

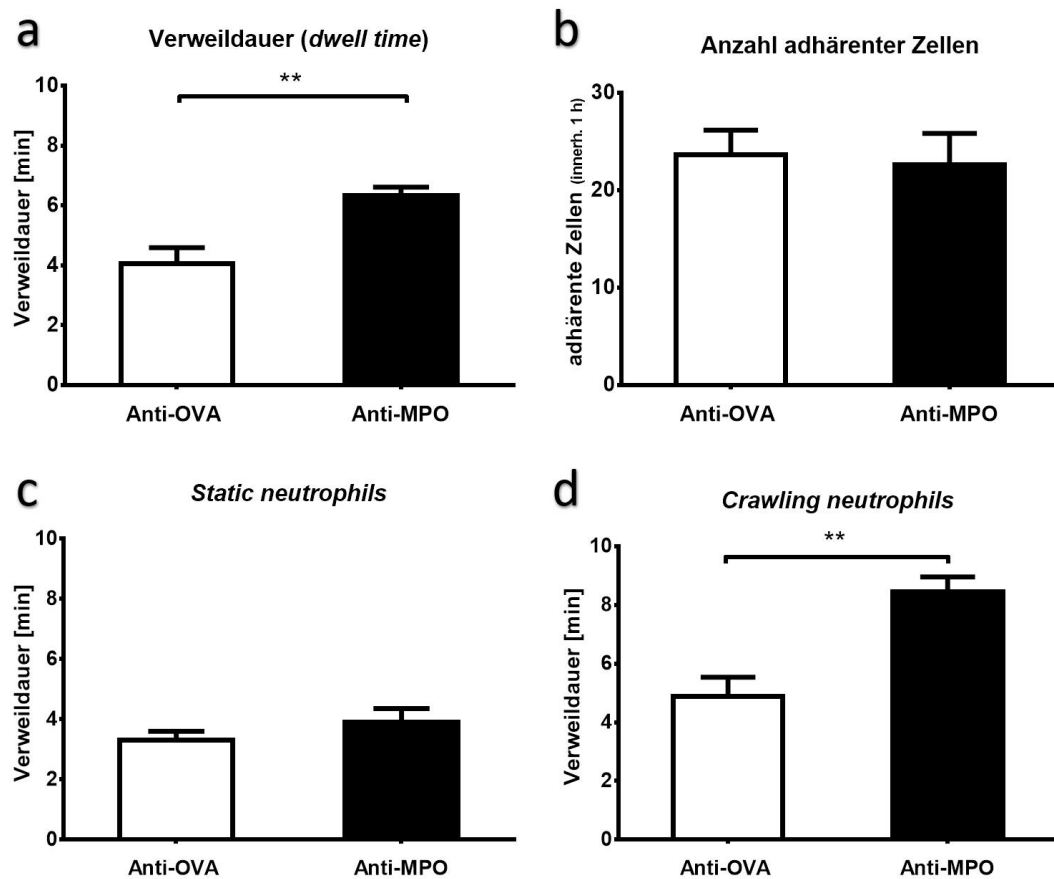


Abb. 23: Anti-MPO-Antikörper führen in C57BL6/J Mäusen zu einer gesteigerten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus. **a** Die Administration von 50 µg anti-MPO-Antikörper führt zu einer signifikanten Steigerung der Verweildauer ($p = 0,0035$). **b** Die Gesamtzahl adhärenter Zellen während der einstündigen Aufzeichnung wird durch die anti-MPO-AK nicht beeinflusst. **c** und **d** Die Zunahme der Verweildauer spiegelt sich insbesondere in der Untergruppe der *crawling neutrophils* ($d, p = 0,0014$). Die marginale Verweilzeitsteigerung im Bereich der *static neutrophils* ist nicht signifikant ($c, p = 0,3095$, Anti-OVA/MPO = Anti-Ovalbumin/Myeloperoxidase-Antikörper).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ergebnisse dieses Versuches die These einer pathogenen Beteiligung der anti-MPO-AK im Krankheitsgeschehen der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis weiter untermauern. Die Schädigung der glomerulären Strukturen durch neutrophile Granulozyten wird dabei jedoch nicht über eine zahlenmäßige Zunahme an Neutrophilen erreicht, sondern spiegelt sich vielmehr in einer Steigerung ihrer Verweildauer im Nierenglomerulus wider.

3.3 Anti-MPO-Antikörper führen in LysM-EGFP-Mäusen zu einer gesteigerten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus

In dem vorangegangenen Experiment wurde zur Darstellung der neutrophilen Granulozyten ein PE-gekoppelter anti-Ly-6G (Gr-1) Antikörper verwendet. In der Analyse des aufgezeichneten Bildmaterials bemerkte ich, dass vereinzelte Granulozyten ein schwächeres Färbungsmuster aufwiesen. Insbesondere bei Mäusen, die mit den krankheitsinduzierenden anti-MPO-Antikörpern behandelt wurden, stellte sich die Analyse teilweise als kompliziert heraus. Kuligowski et al. beschrieben bei der Verwendung gleicher Antikörperkombinationen ähnliche Beobachtungen (Kuligowski et al., 2009). Um sicherzustellen, dass der von mir beschriebene Effekt von anti-MPO-auf die Verweildauer von neutrophilen Granulozyten nicht eine artifizielle Erscheinung aufgrund von färbungsbedingten Analysefehlern war, testete ich mein intravitales MPO-Modell in einer speziellen LysM-EGFP-Mauslinie. Hierbei handelt es sich um Mäuse, bei denen das EGFP Gen in den Genlocus des Lysosoms M integriert wurde (Faust et al., 2000). Durch diesen *knock-in* exprimieren die neutrophile Granulozyten dieser Mäuse in hohem Maße das grün fluoreszierende Protein und sind somit zuverlässig in der Fluoreszenzmikroskopie zu erkennen (Kreisel et al., 2010). Durch Verwendung der LysM-EGFP-Mäuse ließ sich ein möglicher artifizieller Effekt der anti-Gr1-PE Färbung sicher ausschließen.

Die Mäuse wurden nach üblichem Schema zur intravitalen Mikroskopie vorbereitet. Die glomerulären Gefäßstrukturen wurden mit 0,4 µl nicht-funktionalisiertem eFluor 650NC (10 µM, eBioscience, San Diego, USA) angefärbt. Um ein optimales Fluoreszenzsignal der GFP gekoppelten neutrophilen Granulozyten zu erhalten, erfolgte die Anregung des Präparates bei einer Wellenlänge von 900 nm. Das emittierte Signal der Granulozyten wurde mit dem Detektor NDD 2, das Signal des vaskulären Markers mittels des NDD 4 für eine Stunde aufgezeichnet. Die anti-MPO-bzw. anti-OVA-Antikörper (jeweils 50 µg) verabreichte ich wiederum vier Stunden nach Injektion des LPS (0,1 µg), diesmal jedoch eine Stunde vor Beginn der Aufzeichnung. Durch die zeitlich vorgezogene Administration wollte ich die zeitliche Komponente der anti-MPO-induzierten Steigerung der Verweildauer von Neutrophilen untersuchen.

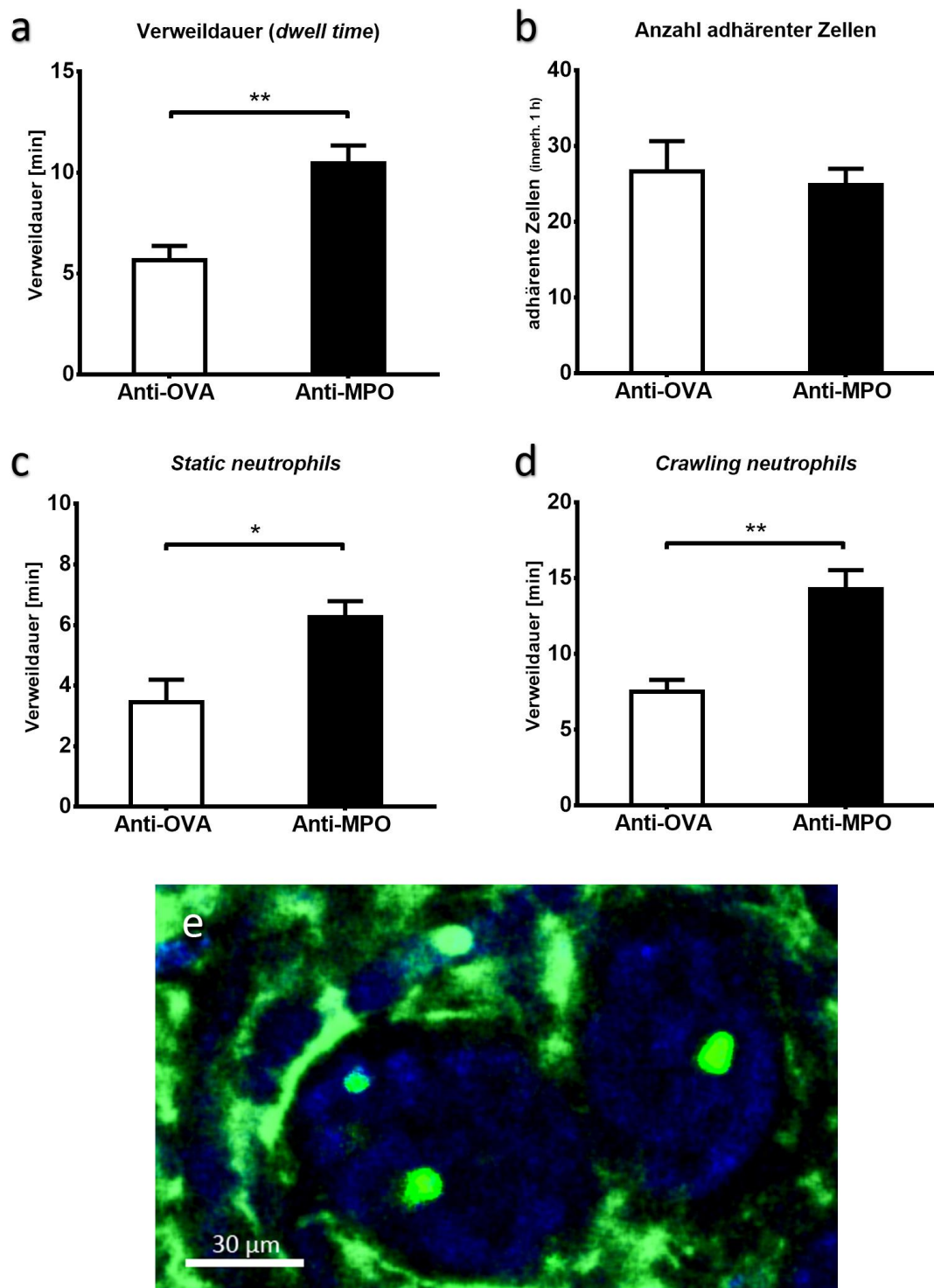


Abb. 24: Anti-MPO-Antikörper führen in LysM-EGFP-Mäusen zu einer gesteigerten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus. **a** Die Administration von 50 μ g anti-MPO-führte zu einem signifikanten Anstieg der Verweildauer ($p = 0,002$). **b** Die Gesamtanzahl von adhärenenten Neutrophilen während der einstündigen Aufzeichnungsperiode wies keine nennenswerten Veränderungen auf. **c** und **d** Der Anstieg der Verweildauer zeigt sich sowohl in der Gruppe der *static neutrophils* als auch bei den *crawling neutrophils* ($p = 0,0122$ bzw. $p = 0,0011$). **e** Neutrophile Granulozyten sind durch die Expression von EGFP (grüne Zellen) klar erkennbar. Die Gefäßstruktur wurde mit nicht-funktionalisiertem eFluor 650NC bläulich angefärbt (Anti-OVA/MPO = Anti-Ovalbumin/Myeloperoxidase-Antikörper).

Die Analyse des aufgezeichneten Bildmaterials führte im Hinblick auf Verweildauer und Gesamtzahl von adhärenenten neutrophilen Granulozyten zu einem mit dem vorherigen Experiment vergleichbaren Ergebnis. Auch in LysM-EGFP-Mäusen führte die Administration von 50 µg anti-MPO-Antikörpern zu einer signifikant erhöhten Verweildauer der Neutrophilen (Abb. 24, a). Die gemittelte Verweildauer steigerte sich von 5,7 Minuten ($5,660 \pm 0,7171$; N=6) in der anti-OVA-Kontrollgruppe auf einen Wert von 10,5 Minuten ($10,45 \pm 0,9050$; N=6) in der anti-MPO-Gruppe.

Trennt man die Gesamtzahl der adhärenenten Neutrophilen wiederum in die beiden Untergruppen der statischen und migrierenden Zellen auf, so zeigt sich in LysM-EGFP-Mäusen eine signifikante Steigerung in beiden Subpopulationen (Abb. 24, c und d). In der Gruppe der *static neutrophils* ließ sich ein Anstieg von 3,4 Minuten ($3,443 \pm 0,7524$; N=6) in der Kontrollgruppe auf 6,3 Minuten ($6,254 \pm 0,5305$; N=6) in der anti-MPO-Gruppe verzeichnen. Bei den *crawling neutrophils* war der beobachtete Anstieg wiederum noch deutlicher zu sehen. Hier führte die Injektion der anti-MPO-Antikörper zu einem Anstieg der Verweildauer von 7,5 Minuten ($7,528 \pm 0,7694$; N=6) auf 14,3 Minuten ($14,27 \pm 1,268$; N=6).

Auch im Hinblick auf die Gesamtanzahl adhärenenter Granulozyten ließ sich das Ergebnis mit dem zuvor Beobachteten vergleichen. Die krankheitsinduzierenden anti-MPO-Antikörper führten auch in LysM-EGFP-Mäusen nicht zu einem Anstieg der Neutrophilenanzahl (Abb. 24, b). Es fanden sich während der einstündigen Aufzeichnungsperiode 26,7 Zellen ($26,68 \pm 3,982$; N=6) in der Kontrollgruppe und 24,8 Zellen ($24,83 \pm 2,199$; N=6) in der anti-MPO-Gruppe.

Einer der Gründe für die Durchführung des anti-MPO-Versuches in LysM-EGFP-Mäusen stellte die mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch eine mangelnde Anfärbung der neutrophilen Granulozyten durch den zuvor verwendeten anti-Gr1-PE-Antikörper dar. Vergleicht man allerdings die Gesamtzahl der analysierten adhärenenten Zellen in beiden Gruppen, so zeigt sich weder in der anti-OVA-Kontrollgruppe noch in der anti-MPO-Gruppe eine nennenswerte Abweichung der Zellanzahl (Abb. 25).

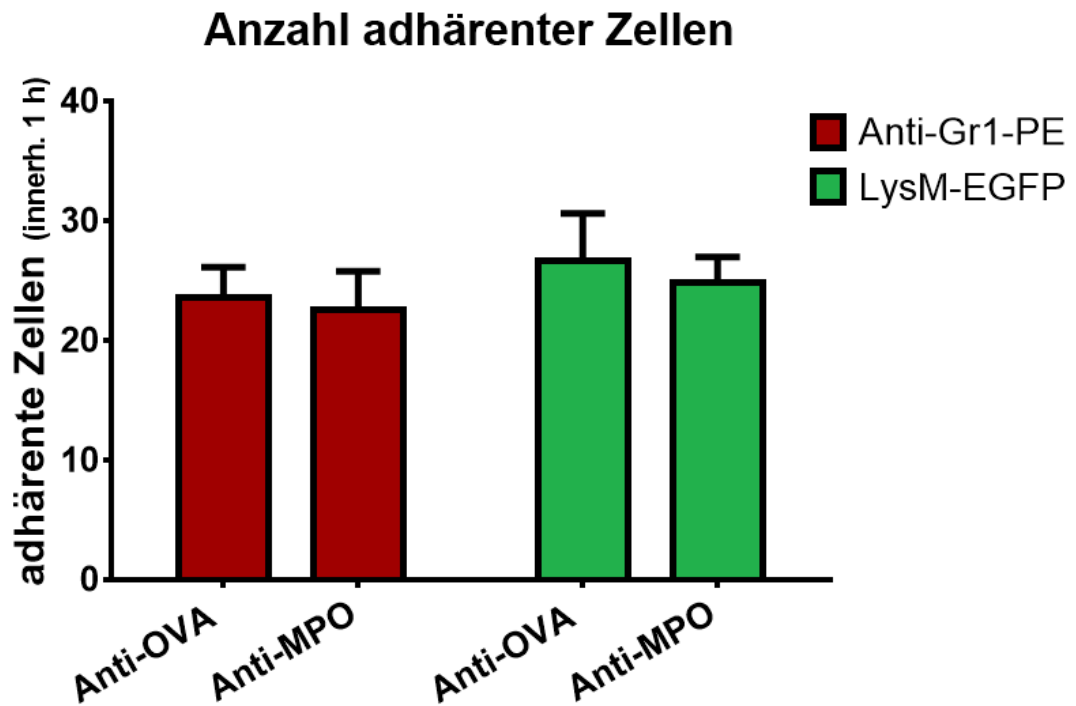


Abb. 25: Vergleich der Gesamtanzahl analysierter neutrophiler Granulozyten. Es lässt sich zwischen der Verwendung des anti-Gr1-PE-Antikörpers und LysM-EGFP-Mäusen kein Unterschied in der Anzahl der analysierten Zellen feststellen (Anti-OVA/MPO = Anti-Ovalbumin/Myeloperoxidase-Antikörper, Anti-Gr1-PE = Mausgruppe, in denen die Neutrophilen mit anti-Gr1-PE-Antikörper angefärbt wurden, LysM-EGFP = Mausgruppe, die das grün fluoreszierende Protein (EGFP) auf der Neutrophilenoberfläche exprimieren).

Die geäußerten Bedenken, dass die Verwendung des anti-Gr1-PE-Antikörpers in Mäusen, die mit anti-MPO-Antikörper behandelt wurden, zu einer unzureichenden Anfärbung der neutrophilen Granulozyten führt (Kuligowski et al., 2009) und somit die Daten verfälscht werden könnten, scheinen in meinem Modell keine nennenswerte Rolle zu spielen. Die Anfärbung der Neutrophilen mittels des anti-Gr1-PE-Antikörpers führt zu gleichen Ergebnissen wie die Verwendung von LysM-EGFP-Mäusen.

Da sich die Präparation der Niere für die intravitale MPM in LysM-EGFP-Mäusen aufgrund von vermehrtem Fett- und Bindegewebe und einem suboptimalen Ansprechen der Mäuse auf die UUO-Prozedur oftmals als sehr schwierig herausstellte, wurden für die nachfolgenden Experimente wieder C57BL6/J Mäuse in Kombination mit dem anti-Gr1-PE-Antikörper verwendet.

3.4 Die Depletion des Komplementsystems mittels CVF führt im anti-MPO-GN-Model zu einer Reduktion der durch anti-MPO-AK gesteigerten Verweildauer

Nachdem die verweildauersteigernde Wirkung von anti-MPO-Antikörper im Rahmen des intravitalen Modells der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis sowohl in einer C57BL6/J-Mauslinie als auch in LysM-EGFP-Mäusen belegt werden konnte, untersuchte ich nun die Rolle des Komplementsystems in der Pathogenese der ANCA GN. Wie bereits zuvor erwähnt, konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass das Komplementsystem bei der Induktion der ANCA-assoziierten GN von entscheidender Bedeutung ist, und Mäuse, in denen das Komplementsystem durch den Cobra Venom Faktor (CVF) depletiert wurde, vor einer Krankheitsausbildung geschützt sind (Schreiber et al., 2009; Xiao et al., 2007). Es stellte sich nun die Frage, ob der von mir beobachtete Anstieg der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im intravitalen Mausmodell auch mit dem Komplementsystem in Verbindung steht. Da der Cobra Venom Faktor seit langer Zeit zur Depletion des Komplementsystems in Tiermodellen angewendet wird und die experimentelle Handhabung des Faktors als sehr einfach einzustufen ist (Cochrane et al., 1970), entschied ich mich ebenfalls für den CVF.

Cobra Venom Faktor

Beim Cobra Venom Faktor, der gelegentlich auch als C3b_(Cobra) bezeichnet wird, handelt es sich um den nichttoxischen Bestandteil des Schlangengiftes der Brillenschlange *Naja naja*, welcher in der Lage ist, das Komplementsystem zu aktivieren (Fritzing et al., 1994; Vogel et al., 1996). Strukturell und funktionell stellt der ca. 150 kDa schwere CVF ein Analogon des Komplementfaktors C3 dar. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit bildet CVF (ähnlich wie C3b im alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems) in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen einen Komplex mit Faktor B, der nachfolgend vom Faktor D gespalten wird (Hensley et al., 1986; Vogel and Müller-Eberhard, 1982; Vogt et al., 1974). Durch die Spaltung entsteht ein CVF,Bb-Komplex, der als C3/C5-Konvertase in der Lage ist die Faktoren C3 und C5 zu spalten und somit das Komplementsystem zu aktivieren (Vogel and Müller-Eberhard, 1982; von Zabern et al., 1980). Die entstandene Konvertase gleicht der üblichen C3bBb-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges, bringt jedoch einige entscheidende Unterschiede mit

sich. So übersteigt die Halbwertszeit der C3/C5-Konvertase, die durch CVF gebildet wird, mit sieben Stunden (Vogel and Müller-Eberhard, 1982) die Halbwertszeit der konventionellen Konvertase mit 1,5 Minuten (Medicus et al., 1976) deutlich. Zudem ist die „CVF-Konvertase“ resistent gegen die negativ regulierenden Faktoren H und I (Alper and Balavitch, 1976; Lachmann and Halbwachs, 1975) und ist des Weiteren in der Lage den Faktor C5 in der flüssigen Phase ohne vorherige Bindung an den Faktor C3 zu spalten und somit zu aktivieren (von Zabern et al., 1980).

Es resultiert im Vergleich zur gewöhnlichen C3/C5-Konvertase des alternativen Wegs eine deutlich gesteigerte enzymatische Bioaktivität der durch CVF gebildeten Konvertase, das Komplementsystem wird durch die weitestgehend ungebremste Aktivierung fast vollständig depletiert. Mit diesen Eigenschaften stellt der Cobra Venom Faktor ein optimales Reagenz im Bezug auf die Untersuchung der Rolle des Komplementsystems in der Pathogenese von Krankheiten dar.

Der CVF wurde in einer Dosis von 25 µg/Maus einmalig 24h vor Experimentbeginn intraperitoneal verabreicht (Abb. 26). Xiao et al zeigten, dass die einmalige i.p. Gabe von CVF das Komplementsystem innerhalb von 24h fast vollständig depletiert und dieser Effekt für sechs Tage anhält (Xiao et al., 2007). Anschließend wurden die Mäuse nach der beschriebenen Methodik zeitgerecht zur intravitralen MPM vorbereitet. Die i.p. Injektion von 0,1 µg LPS erfolgte wiederum 4 Stunden vor Injektion der anti-MPO-Antikörper (50 µg) und dem damit verbundenen Beginn des Experiments. Zur Anfärbung von neutrophilen Granulozyten und der glomerulären Gefäßstruktur wurden die gleichen Fluorophore in identischer Konzentration wie in Versuch 4.1 verwendet. Das emittierte Fluoreszenzsignals wurde wiederum mittels der Detektoren NDD 1 und NDD 3 aufgezeichnet.



Abb. 26: Injektionsschema Versuch 3.4 (CVF = Cobra Venom Faktor, LPS = Lipopolysaccharid, anti-MPO/OVA = anti-Myeloperoxidase/Ovalbumin-Antikörper; Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1).

Die Depletion des Komplementsystems durch Injektion von 25 µg CVF 24 Stunden vor Gabe der krankheitsinduzierenden anti-MPO-Antikörper verhinderte in allen untersuchten Mäusen den zuvor beobachteten Anstieg der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus. Die durchschnittliche Verweildauer der Neutrophilen in der mit CVF vorbehandelten Gruppe lag bei 4,4 Minuten ($4,347 \pm 0,6999$; N=4) und war somit fast auf die basalen Werte der anti-OVA-Kontrollgruppe des ursprünglichen Versuches ($4,062 \pm 0,5296$; N=6) reduziert (Abb. 27, a). Im direkten Vergleich mit der anti-MPO-Gruppe ($6,332 \pm 0,2793$; N=6) führte die Injektion des CVF zu einer signifikanten Reduktion der Verweildauer ($p = 0,0162$).

Im Hinblick auf die Gesamtanzahl von adhärenenten neutrophilen Granulozyten, also von Zellen, die über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden im Glomerulus verweilten, zeigte sich kein signifikanter Unterschied (b). Die durchschnittliche Anzahl an Zellen, die dieses Kriterium erfüllten, lag in der einstündigen Aufzeichnungsperiode bei ca. 30 Zellen ($29,58 \pm 6,862$; N=4).

Insbesondere in der phänotypischen Subpopulation der migrierenden neutrophilen Granulozyten (*crawling neutrophils*) stellte sich die reduzierte Verweildauer als signifikant heraus (d). Hier lag der gemittelte Wert für alle mit CVF vorbehandelten Mäuse bei ca. 5,5 Minuten ($5,551 \pm 0,8577$; N=4). Im Vergleich dazu zeigten Neutrophile in der anti-MPO-Gruppe ohne CVF Injektion eine mittlere Verweildauer von 8,5 Minuten ($8,460 \pm 0,4994$; N=6). Der tendenzielle Abfall in der Subgruppe der statischen Neutrophilen (*static neutrophils*) war nicht signifikant ($p = 0,2141$, c). Dieses Ergebnis ist wenig überraschend, da sich der zuvor beobachtete Anstieg der Verweildauer durch die Administration der anti-MPO-Antikörper in der Gruppe der *static neutrophils* ebenfalls als nicht signifikant heraus gestellt hatte.

Fasst man die Ergebnisse des Versuches zusammen, so lässt sich eine deutlich erkennbare Abhängigkeit der Verweilzeitsteigerung neutrophiler Granulozyten von einem intakten Komplementsystem beschreiben. Mäuse, in denen das Komplementsystem durch die prä-experimentelle Administration von CVF depletiert wurde, sind vor der beobachteten Steigerung der Verweildauer durch die Injektion von anti-MPO-Antikörpern weitestgehend geschützt. Geht man davon aus, dass eine längere Verweildauer der neutrophilen Granulozyten mit einem größeren glomerulären

Schaden des Nierengewebes einhergeht, so korrelieren die Beobachtungen dieses Experiments ausgezeichnet mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Xiao et al., 2007). Durch den Versuch lässt sich die beschriebene nierenprotektive Rolle einer Komplementsystemdepletion im Hinblick auf eine glomeruläre Schädigung im Rahmen einer ANCA-assoziierten GN erstmalig in einem intravitralen Modell nachvollziehen. Eine geringere Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus führt hierbei zu einer Reduktion der durch Neutrophile hervorgerufenen Schädigung von glomerulären Gefäßstrukturen und angrenzendem Gewebe.

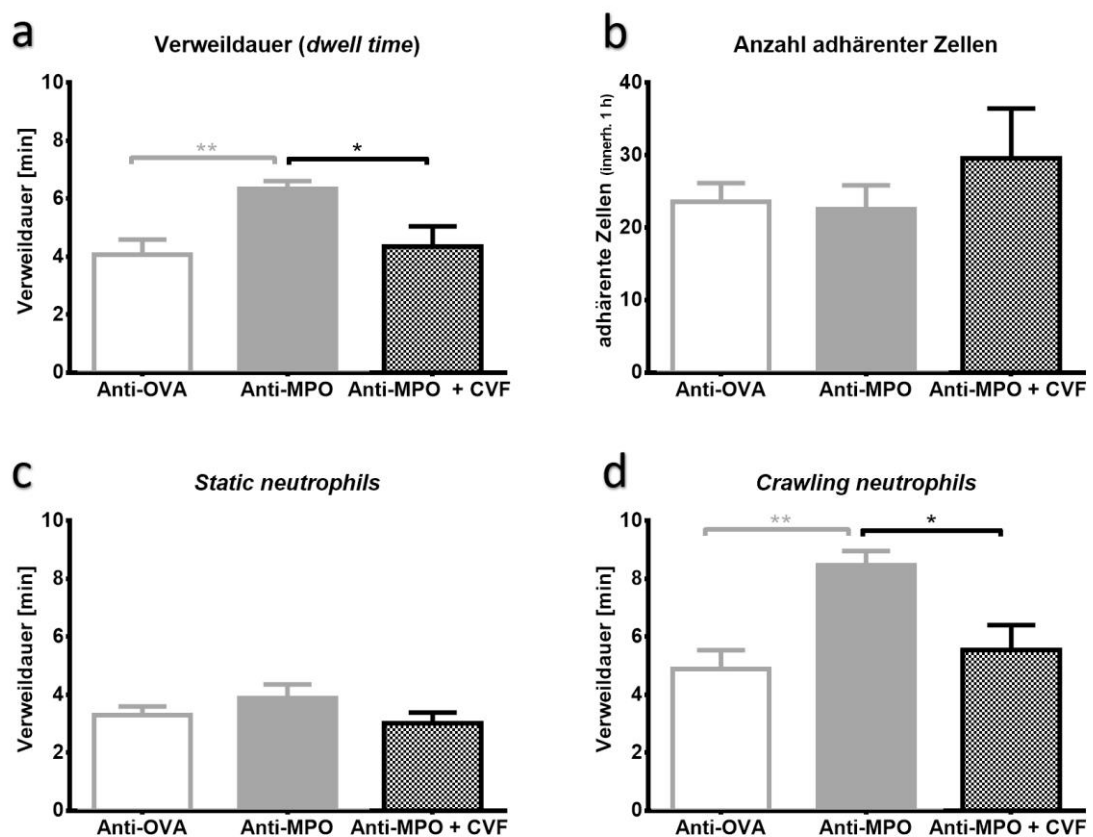


Abb. 27: Die Depletion des Komplementsystems mittels CVF führt im anti-MPO-GN Modell zu einer Reduktion der durch anti-MPO-AK hervorgerufenen, gesteigerten Verweildauer. **a** Die i.p. Injektion von 25 µg CVF 24 h vor Injektion der anti-MPO-AK reduziert den Anstieg der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten signifikant ($p = 0,0162$). **b** Die Gesamtanzahl von adhärenenten Neutrophilen während der einstündigen Aufzeichnungsperiode ändert sich nicht. **c** und **d** Die beobachtete Reduktion der Verweildauer ist insbesondere für die *crawling neutrophils* signifikant ($p = 0,0135$). Die Tendenz in der Gruppe der *static neutrophils* ist nicht signifikant ($p = 0,2141$, Anti-OVA/MPO = Anti-Ovalbumin/Myeloperoxidase-Antikörper, CVF = Cobra Venom Faktor).

Komplementfaktor C3-ELISA zur Kontrolle der Depletion des Komplementsystems

Um eine erfolgreiche Depletion des Komplementsystems durch den verabreichten CVF zu verifizieren und somit die beobachteten Ergebnisse eindeutig auf eine Beteiligung des Komplementsystems zurückführen zu können, bestimmte ich im Anschluss an den Versuch die Serumkonzentration des Komplementfaktors C3. Dazu wurde den Mäusen nach Beendigung der intravitralen Aufzeichnung mittels kardialer Punktion ca. 1 ml Blut entnommen und das Serum aufgereinigt. Die Bestimmung der absoluten C3-Konzentration erfolgte mithilfe eines speziellen *Mouse C3-ELISA Kits* (Innovative Research, Novi, USA). Das ausführliche Vorgehen bei der Durchführung des C3-ELISAs ist im Methodikabschnitt beschrieben.

Die Auswertung des C3-ELISAs zeigt deutlich, dass die Depletion des Komplementsystems durch Gabe von CVF in allen vier untersuchten Mäusen erfolgreich war (Abb. 28, a). Die durchschnittliche C3-Konzentration in CVF behandelten Mäusen lag bei 0,95 ng/ml ($0,9545 \pm 0,1089$; N=4, Abb. 28, b). Die Kontrollgruppe wies eine Konzentration von durchschnittlich 9,7 ng/ml ($9,697 \pm 0,9697$; N=2, Abb. 28, b) auf.

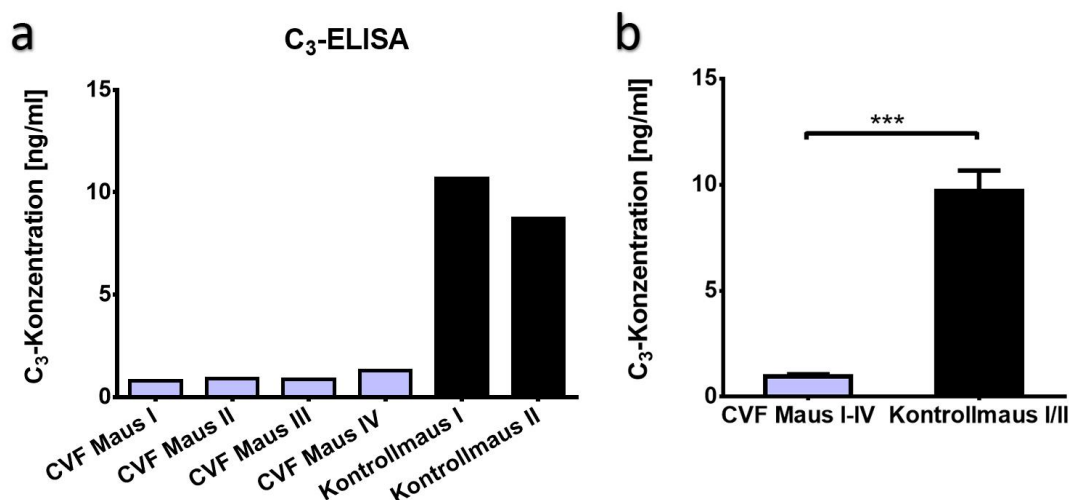


Abb. 28: Auswertung C3-ELISA **a** Die Gabe von 25 µg CVF 24 h vor Experimentbeginn führte in allen vier Mäusen zu einer Depletion des Komplementsystems. **b** Die gemittelte absolute C3-Konzentration in CVF behandelten Mäusen ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p = 0,0001$) reduziert (C3 = Komplementfaktor 3, CVF = Cobra Venom Faktor).

Betrachtet man die Ergebnisse des C3-ELISAs, so kann man davon ausgehen, dass für die beobachtete signifikante Reduktion der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten die Depletion des Komplementsystems verantwortlich ist.

3.5 Die anti-MPO-induzierte Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im murinen Nierenglomerulus ist C5aR abhängig

Nachdem ich durch die Administration von CVF belegen konnte, dass der anti-MPO-induzierte Anstieg der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus stark von einem funktionsfähigem Komplementsystem abhängt (siehe 3.4), untersuchte ich die spezifische Rolle dieses Systems in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis genauer. In der Literatur werden vor allem der alternative Aktivierungsweg des Komplementsystems und der proinflammatorische Entzündungsmediator C5a mit der ANCA GN in Verbindung gebracht (Huugen et al., 2007; Van Timmeren et al., 2009; Xiao et al., 2007). Insbesondere die direkte Wirkung von C5a auf seinen Rezeptor (C5aR) scheint in der Pathogenese der AAV von großer Bedeutung zu sein (Schreiber et al., 2009; Yuan et al., 2012). Die Auswirkungen der C5a-C5aR-Achse auf die Verweildauer von neutrophilen Granulozyten in meinem intravitalen Mausmodell untersuchte ich mittels eines anti-C5aR-Antikörpers (Hycult Biotech, Niederlande). Der monoklonale Antikörper 20/70 erkennt den murinen C5a-Rezeptor (CD88) und verhindert durch seine Bindung zuverlässig die Signalwechselwirkungen zwischen C5a und einer C5aR exprimierenden Zielzelle (Godau et al., 2004; Shushakova et al., 2002).

Die Mäuse wurden nach üblicher Methodik zur intravitalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Die verwendeten Fluorophore, versuchsspezifische Einstellungen des Mikroskops sowie das LPS/anti-MPO-Schema zur Krankheitsinduktion waren identisch zu den CVF Versuchen (siehe 3.4). Der anti-C5aR-Antikörper wurde 15 Minuten vor Injektion der anti-MPO-Antikörper in einer Dosis von 100 µg/Maus über den Jugularkatheter injiziert (Abb. 29). Es wurde wiederum die erste Stunde aufgezeichnet. Als Kontrolle verwendete ich einen *rat anti-mouse* IgG_{2b}-Antikörper, der ebenfalls in einer Dosis von 100 µg/Maus verabreicht wurde.

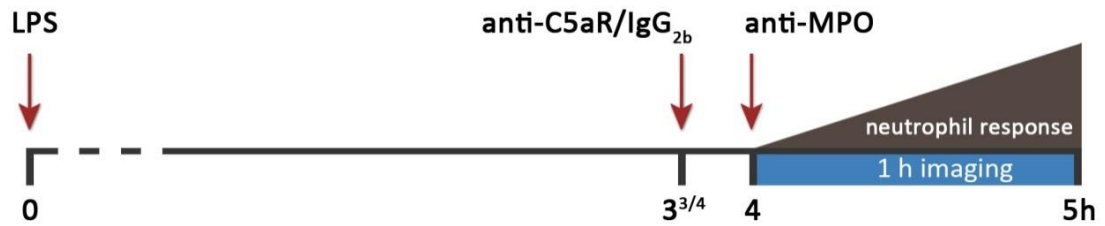


Abb. 29: Injektionsschema Versuch 3.5 (LPS = Lipopolysaccharid, anti-C5aR/IgG_{2b} = anti-C5a-Rezeptor/IgG_{2b}-Antikörper, anti-MPO = anti-Myeloperoxidaseantikörper; Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1).

Durch die Injektion der anti-C5aR-Antikörper reduzierte sich der in Versuch 3.2 beobachtete Anstieg in der Verweildauer signifikant von durchschnittlich 6,3 Minuten ($6,332 \pm 0,2793$; N=6) auf 4,8 Minuten ($4,789 \pm 0,2173$; N=4, Abb. 30, a). Der als direkte Kontrollgruppe verabreichte anti-IgG_{2b}-Antikörper wirkte sich nicht auf die Aufenthaltszeit von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus aus. Die gemittelte Verweildauer lag bei 6,3 Minuten ($6,265 \pm 0,4408$; N=5).

Teilt man die Gesamtzahl der Granulozyten in ihre beiden Verhaltensphänotypen auf, so lässt sich feststellen, dass die Reduktion im Bereich der Verweildauer insbesondere den *crawling neutrophils* zuzuschreiben ist. In dieser Gruppe führte der anti-C5aR-Antikörper zu einer signifikanten Abnahme der *dwel time* von 8,5 Minuten ($8,460 \pm 0,4994$; N=6) in der anti-MPO-Gruppe auf 5,9 Minuten ($5,884 \pm 0,1815$; N=4, Abb. 30, d). Die Kontrollgruppe (anti-IgG_{2b}) wies eine durchschnittliche Verweildauer von 9,5 Minuten ($9,574 \pm 0,7241$; N=5) auf. Für die Subpopulation der *static neutrophils* zeigte sich, im Vergleich zur anti-MPO-Gruppe, durch die Gabe der anti-C5aR-Antikörper nur ein Abfall von 3,9 Minuten ($3,894 \pm 0,4650$; N=6) auf 3,3 Minuten ($3,345 \pm 0,2583$; N=4, Abb. 30, c). Diese Tendenz wies jedoch keinen Signifikanzgrad auf ($p = 0,399$). Die mittlere Verweildauer der *static neutrophils* in der anti-IgG_{2b}-Gruppe lag bei 4,4 Minuten ($4,372 \pm 0,4867$; N=5). Interessanterweise ließ sich bei der Gesamtzahl der adhärenen neutrophilen Granulozyten während der einstündigen Aufzeichnungsperiode in der anti-C5aR-Gruppe eine Reduktion von 22,6 Zellen/h (anti-MPO: $22,58 \pm 3,257$; N=6) auf 16,5 Zellen/h ($16,54 \pm 2,254$; N=4) verzeichnen ($p = 0,211$, Abb. 30, b). Da jedoch in der anti-C5aR-Gruppe das aufgezeichnete anti-Ly-6G-PE Signal bei gleicher Menge an verabreichten Antikörpern deutlich schwächer ausgeprägt war (Abbildung 30, e und f), lässt sich nicht ausschließen, dass vereinzelte Neutrophile ein

zu schwaches PE-Signal aufwiesen und somit bei der Analyse nicht erfasst wurden. Höchstwahrscheinlich werden durch die funktionsblockierende Bindung des anti-C5aR Antikörper an den oberflächlich exprimierten C5a-Rezeptor die Bindungsstellen des anti-Ly-6G-PE-Färbeantikörpers beeinflusst oder blockiert, und es kommt somit teilweise nur zu einer unzureichenden Anfärbung der neutrophilen Granulozyten. Da für Ly-6G (Gr-1) jedoch keine Funktion in der Adhäsion beschrieben wurde, sollte die Verweildauer der Zellen weiterhin beurteilbar sein.

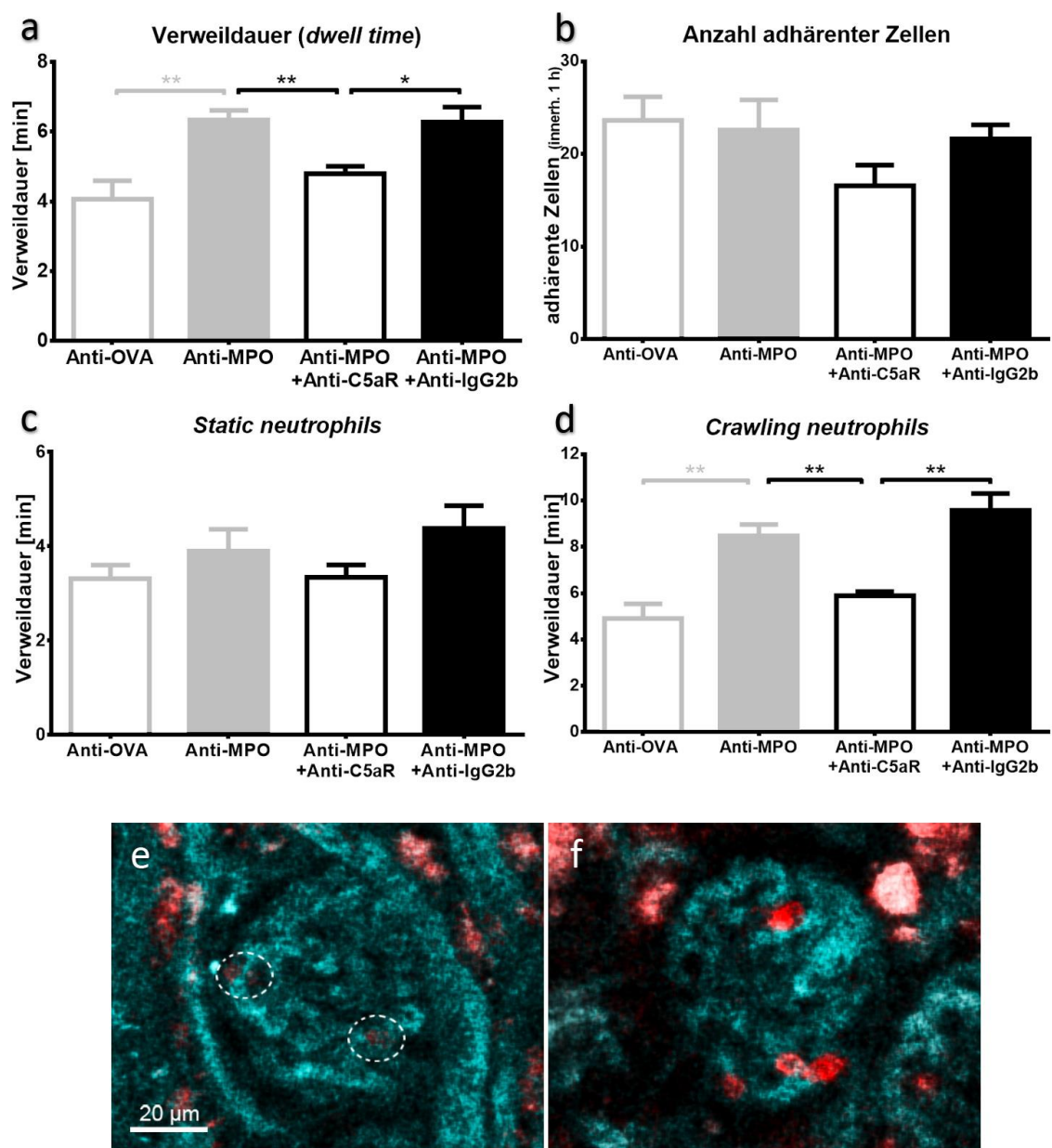


Abb. 30: Die anti-MPO-induzierte Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im murinen Nierenglomerulus ist C5aR abhängig. **a** Die Administration von 100 µg eines funktionsblockierenden anti-C5aR-Antiköpers reduziert den durch anti-MPO-hervorgerufenen Anstieg der Verweildauer auf fast basale Werte ($p = 0,0041$, $N = 6$ bzw. 4); auch im Vergleich zur direkten anti-IgG_{2b}-Kontrollgruppe ist die Verweildauer signifikant reduziert ($p = 0,0282$, $N = 4$ bzw. 5).

b Obwohl die Anzahl der adhärenen neutrophilen Granulozyten während der einstündigen Aufzeichnungsperiode in der anti-C5aR-Gruppe tendenziell niedriger ist, lässt sich keine Signifikanz beschreiben. **c,d** Eine signifikante Verminderung der Verweildauer durch den anti-C5aR-Antikörper ist insbesondere für die kriechenden Neutrophilen (crawling neutrophils) gegeben (vgl. mit anti-MPO: $p = 0,0038$, $N = 6$ bzw. 4; vgl. mit anti-IgG_{2b}: $p = 0,0031$, $N = 4$ bzw. 5); für die statischen Neutrophilen ist zwar eine ähnliche Tendenz erkennbar, signifikante Werte zeigen sich jedoch nicht. **e** Anti-C5aR-Gruppe: Das rote Fluoreszenzsignal des anti-Ly-6G-PE-Antikörpers ist vermindert (siehe weiß gepunktete Kreise) **f** Anti-IgG_{2b}-Gruppe: Neutrophile Granulozyten zeigen ein starkes anti-Ly-6G-PE-Signal (Anti-OVA/MPO = Anti-Ovalbumin/Myeloperoxidase-Antikörper, anti-C5aR-/IgG_{2b} = anti-C5a-Rezeptor/IgG_{2b}-Antikörper).

Das durchgeführte Experiment belegt eindrucksvoll, dass der Anstieg der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten, den ich in meinem intravitalen Modell der ANCA-assoziierten GN durch die Administration von anti-MPO-erzielt habe, von der C5a-C5aR-Achse abhängig ist. Auch wenn die Reduktion der *dwel time* den basalen Wert der anti-OVA-Gruppe nicht ganz erreicht, so lässt sich doch mit Sicherheit sagen, dass der proinflammatorische Entzündungsmediator C5a und die Wechselwirkung mit seinem Rezeptor (C5aR) für die Pathogenese der ANCA-assoziierten GN von entscheidender Bedeutung sind.

3.6 Anti-MPO-Antikörper führen zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten

Die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten bietet eine effektive Möglichkeit, pathogene Erreger, aber auch Eigengewebe zu schädigen und so Entzündungsreaktionen zu modulieren und zu potenzieren (Ciz et al., 2012). Dieser Effekt wird als respiratorischer oder oxidativer Burst bezeichnet. Dabei kommt es zu einer Redoxreaktion, bei der, durch die NADPH-Oxidase katalysiert, O_2 -Moleküle unter Verbrauch von NADPH zu $O_2^{\bullet-}$ -Radikalen (Superoxidanionen) reduziert werden (Chanock et al., 1994).



Da die ANCA-assoziierte Glomerulonephritis primär durch neutrophile Granulozyten getriggert wird, liegt eine Beteiligung des oxidativen Bursts an der Pathogenese nahe. In verschiedenen in vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von humanen Neutrophilen mit ANCA IgG zu einer Generierung von radikalen Sauerstoffspezies und zur Degranulation von neutrophilen Granulozyten führt (Charles et al., 1991; Falk et al., 1990b). Eine direkte Beteiligung der radikalen Sauerstoffspezies an der glomerulären Endothelschädigung ist daher als sehr wahrscheinlich anzunehmen (Kallenberg, 2011).

Um die beschriebenen in vitro Experimente zu verifizieren und die Rolle des oxidativen Bursts in der Pathogenese der ANCA-assoziierten GN weiter zu beleuchten, untersuchte ich in dem von mir verwendeten Modell die Generierung von radikalen Sauerstoffspezies im murinen Glomerulus.

Zur Darstellung von radikalen Sauerstoffspezies in der intravitalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie eignet sich das Oxidantien sensitive Fluorophor Dihydroethidium (DHE) (Rothe and Valet, 1990; Zhao et al., 2005). Dihydroethidium, oder Hydroethidin, kann die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten frei passieren und wird durch radikale Sauerstoffspezies (insbesondere durch $O_2^{\bullet-}$ -Radikale) intrazellulär zu dem rot fluoreszierenden Ethidium und 2-Hydroxyethidium oxidiert (Elbim and Lizard, 2009; Jackman et al., 2009; Zhao et al., 2005). Das oxidierte Ethidium verbleibt durch

Interkalation in die DNA im Zellkern und ermöglicht somit den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des oxidativen Bursts.

C57BL6/J-Mäuse wurden nach beschriebener Methodik zur intravitralen MPM vorbereitet. Die glomerulären Gefäßstrukturen wurden mit 7 μ l Pacific-Blue-Dextran, neutrophile Granulozyten mit 6 μ l (3 μ g) Alexa Fluor 488, anti-Ly-6G (Gr1) angefärbt. Die GN induzierenden anti-MPO-Antikörper (50 μ g/Maus) bzw. die als Kontrolle verwendeten anti-OVA-Antikörper wurden eine Stunde vor Aufzeichnungsbeginn und vier Stunden nach LPS Injektion (0.1 μ g) ebenfalls über den Jugularkatheter injiziert. Die Administration von Dihydroethidium (20 mg/kg KG) erfolgte 20 Minuten vor Beginn der Aufzeichnung. Die Fluorophore wurden mit einer Wellenlänge von 810 nm angeregt. Das Signal des Pacific-Blue Dextran wurde mittels des NDD 1, das Signal des Alexa Fluor 488 mittels des NDD 2 und das Signal des DHE mittels des NDD 3 aufgezeichnet.

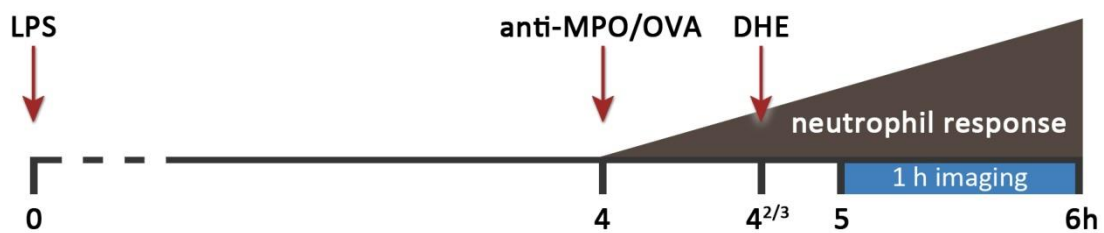


Abb. 31: Injektionsschema Versuch 3.6 (LPS = Lipopolysaccharid, anti-MPO/OVA = anti-Myeloperoxidase/Ovalbumin-Antikörper, DHE = Dihydroethidium; Quelle: Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1).

Die Analyse des aufgezeichneten Bildmaterials zeigte, dass in Mäusen, die zuvor den Glomerulonephritis induzierenden anti-MPO-Antikörper erhalten hatten, mehrere neutrophile Granulozyten ein deutlich positives DHE Signal zeigten (Abb. 32, a und b).

In der Kontrollgruppe (anti-OVA) wies nur eine minimale Anzahl von Zellen ein DHE positives Signal auf (c). Im Durchschnitt führte die Injektion der anti-MPO-Antikörper in 22,4 Prozent ($22,38 \pm 3,270$; N=6) der neutrophilen Granulozyten zu einem roten Fluoreszenzsignal und somit zur Induktion des respiratorischen Bursts (d). In der Kontrollgruppe lag die durchschnittliche Anzahl an DHE⁺ Zellen bei 5,2 Prozent ($5,20 \pm 0,8489$; N=6).

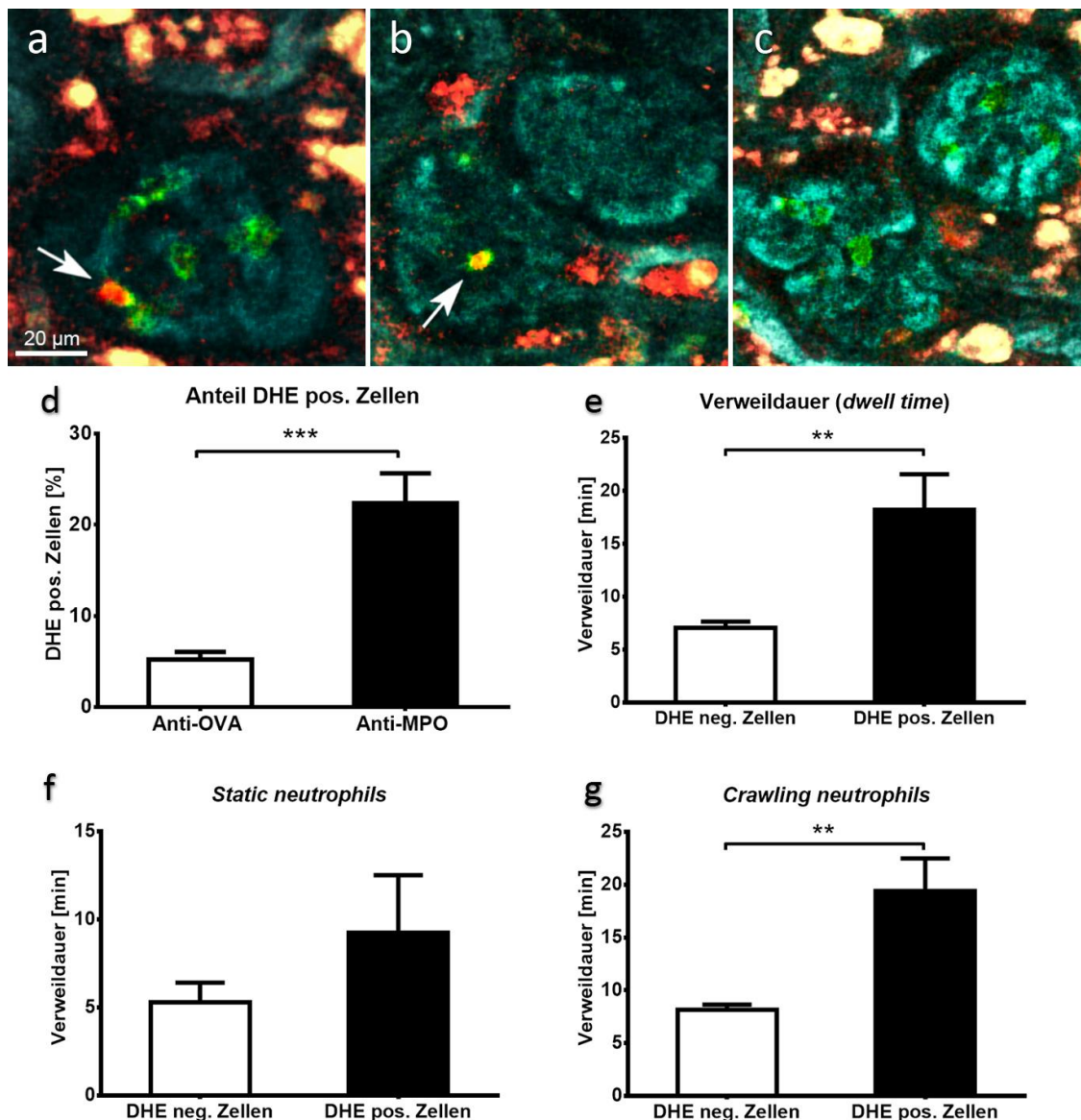


Abb. 32: Anti-MPO-Antikörper führen zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten. **a,b** Anti-MPO-Gruppe: Die mit weißem Pfeil gekennzeichneten neutrophilen Granulozyten weisen ein stark positives DHE Signal auf (rote Fluoreszenz). **c** Anti-OVA-Gruppe: Die Mehrzahl der Zellen ist DHE negativ. **d** Die Injektion von 50 μ g anti-MPO-führt zu einem signifikanten Anstieg von DHE⁺ Zellen ($p = 0,0005$, $N = 6$). **e** Die durchschnittliche Verweildauer (*dwell time*) ist bei DHE⁺ Zellen im Vergleich zu DHE⁻ Zellen signifikant erhöht ($p = 0,0082$, $N = 6$). **f,g** Insbesondere die *crawling neutrophils* weisen eine deutlich gesteigerte Verweildauer auf ($p = 0,0048$, $N = 6$), der Unterschied bei *static neutrophils* ist nicht signifikant ($p = 0,246$, $N = 6$; anti-MPO/OVA = anti-Myeloperoxidase/Ovalbumin-Antikörper, DHE = Dihydroethidium, pos. = positiv, neg. = negativ).

Die genauere Analyse der Verweildauer von DHE⁺ und DHE⁻ Zellen führte zu einer weiteren entscheidenden Erkenntnis. Überraschenderweise wiesen DHE⁺ Zellen mit einer durchschnittlichen Aufenthaltszeit von ungefähr 18 Minuten ($18,22 \pm 3,342$; $N=6$), im Vergleich zu DHE⁻ Zellen mit ca. sieben Minuten ($7,075 \pm 0,5851$; $N=6$), eine signifikant erhöhte Verweildauer im Glomerulus auf (e). Insbesondere die

migrierenden neutrophilen Granulozyten (*crawling neutrophils*) blieben deutlich länger an den glomerulären Gefäßstrukturen adhären (g). Der Unterschied im Bereich der statischen Neutrophilen (*static neutrophils*) war dabei nicht signifikant (f).

Interessanterweise beobachtete ich während der einstündigen Aufzeichnungsperiode in der anti-MPO-Gruppe sowohl Zellen, die bereits als DHE⁺ Zellen im Glomerulus erschienen und dort in der Gefäßstruktur adhärten, als auch Zellen, die während ihres Aufenthaltes im Glomerulus zunächst DHE⁻ waren und anschließend ein stetig zunehmendes DHE Signal aufwiesen (Abb. 33). Weiterhin ließ sich beobachten, dass das positive DHE Signal nicht die gesamte Zelle ausfüllt, sondern vielmehr im Bereich des Zellkerns zu finden ist. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass sich das Ethidiumbromid, das im Rahmen des oxidativen Bursts innerhalb der Zelle gebildet wird, an die DNA im Nukleus der Zelle anlagert und sich somit in diesem Bereich aufkonzentriert.

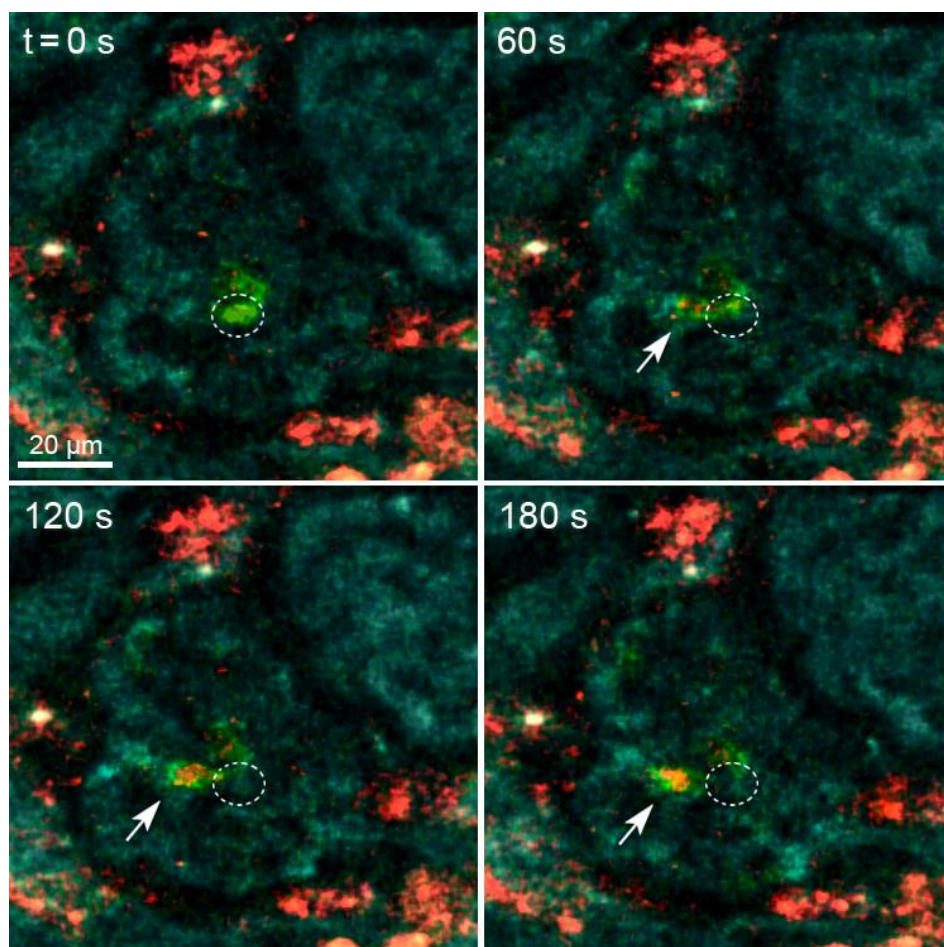


Abb. 33: Übergang eines DHE⁻ *crawling neutrophils* (hellgrün) zu einer DHE⁺ Zelle (weißer Pfeil) mit stetiger Zunahme des DHE Signals (rot, innerhalb des Granulozyts) über einen Zeitraum von 180 Sekunden. Der weiß gepunktete Kreis markiert den Startpunkt des migrierenden Neutrophilen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen krankheitsinduzierenden anti-MPO-Antikörpern und dem oxidativen Burst von neutrophilen Granulozyten. Mäuse, die die anti-MPO-Antikörper erhielten, wiesen im Vergleich zur anti-OVA-Kontrollgruppe eine deutlich höhere Anzahl von DHE⁺ Zellen auf. Zunächst erscheint das Auftreten von DHE⁺ Zellen in der Kontrollgruppe merkwürdig, da in einem physiologischen Glomerulus keine gewebsschädigende Produktion von radikalen Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten zu finden sein sollte. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass in meinem intravitalen Mausmodell der ANCA-assoziierten GN die Mäuse mit proinflammatorischem LPS vorbehandelt wurden. Die Induktion des oxidativen Bursts durch LPS, der somit auch in der Kontrollgruppe stattfindet, ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen. Die Tatsache, dass sich Neutrophile, die durch die anti-MPO-Antikörper zur Sauerstoffradikalproduktion angeregt wurden, im Vergleich zu DHE⁻ Zellen mehr als doppelt so lange im Glomerulus aufhielten, bestärkt die These, dass anti-MPO-Antikörper eine direkte Rolle in der Pathogenese der ANCA GN und vor allem der renalen Schädigung spielen. Zudem wird diese Annahme durch die lokale Zunahme des DHE Signals sowie die Progression von DHE⁻ zu DHE⁺ Zellen innerhalb des Nierenglomerulus und die damit verbundene lokale, organspezifische Schädigung des Nierengewebes untermauert.

3.7 Der anti-MPO-induzierte Anstieg der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten nimmt mit fortschreitender Zeit zu

Um einen Eindruck über die zeitliche Komponente des Anstiegs der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten zu erhalten, verglich ich die aufgezeichneten Daten von Mäusen, welche die krankheitsinduzierenden anti-MPO-AK unmittelbar (siehe 3.2) bzw. 60 Minuten (siehe 3.6) vor Beginn der Aufzeichnung erhalten hatten. Da beide Experimente mit der gleichen C57BL6/J-Mauslinie durchgeführt wurden und die identische Dosis von anti-MPO/OVA-AK injiziert wurde, war es möglich die Ergebnisse direkt zu vergleichen. Abbildung 34 zeigt, dass die Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Zeitraum von 60-120 Minuten gegenüber der Verweildauer während der ersten Stunde nach Injektion der anti-MPO-Antikörper signifikant erhöht ist.

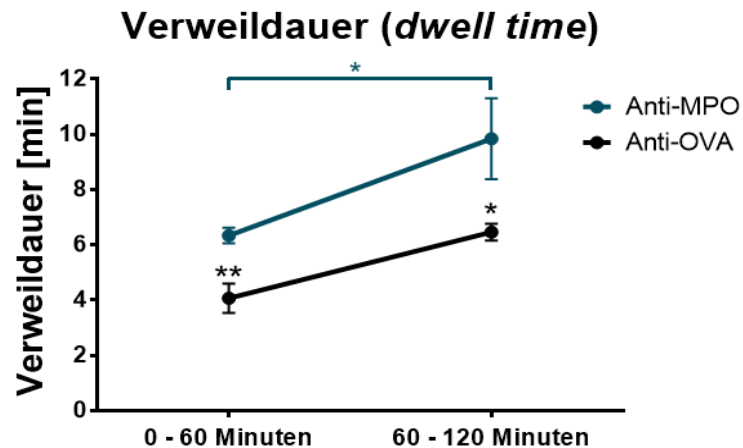


Abb. 34: Vergleich der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten während der ersten bzw. zweiten Stunde nach Injektion der anti-MPO-AK. Die gemessene Verweildauer in der zweiten Stunde liegt deutlich über den Werten der ersten Stunde (anti-MPO/OVA = anti-Myeloperoxidase/Ovalbumin-Antikörper).

Auch die Ergebnisse des Versuchs 3.3 (LysM-EGFP-Mauslinie) zeigen, dass die Verweildauer von Neutrophilen innerhalb der zweiten Stunde deutlich über den gemessenen Werten für die erste Stunde liegt. Diese Daten lassen sich jedoch nur schwer vergleichen, da der Versuch 3.3 in einer abweichenden Mauslinie durchgeführt wurde.

Der beobachtete Anstieg der Aufenthaltszeit ist kritisch zu hinterfragen. Aus der Abbildung 34 ist ersichtlich, dass es in der zweiten Stunde nach Injektion der Antikörper auch in der anti-OVA-Kontrollgruppe zu einer Steigerung der Verweildauer kommt. Demnach ist es fraglich, ob der beobachtete Effekt wirklich durch die anti-MPO-Antikörper induziert ist oder vielmehr eine experimentell bedingte Begleiterscheinung darstellt. Bei den Experimenten der zweiten Stunde werden die Mäuse bereits eine Stunde vor Beginn des Experimentes narkotisiert (siehe 3.3 und 3.6) um die Antikörper über die Jugularvene verabreichen zu können. Dadurch könnte es im Laufe der Zeit durch das Narkotikum oder eine zunehmende Abkühlung des renalen Gewebes trotz der eingesetzten Heizplatte zu einer Reduktion der Nierenperfusion kommen. Aus diesem Grunde sind weitere Experimente notwendig, um die zeitliche Komponente der AK Administration in unserem Modell der ANCA-assoziierten GN genauer zu untersuchen. Dazu ist es erforderlich ein Modell zu entwickeln, bei dem die Antikörper nicht über einen Jugularvenenkatherter verabreicht werden, da es bei dieser Methode einer vollständigen Sedierung der Maus bedarf. In einem Modell, in dem die Antikörper beispielsweise über die Schwanzvene verabreicht werden, wäre es möglich die zeitlichen Effekte über einen deutlich längeren Zeitraum zu beobachten.

4 Diskussion

Die Multiphotonenmikroskopie hat in den vergangenen Jahren durch intravitale Untersuchungen von Gewebsstrukturen einen großen Beitrag zum Verständnis des Verhaltens von Leukozyten im Rahmen von inflammatorischen Prozessen geleistet (Kreisel et al., 2010; McDonald et al., 2010; Mempel et al., 2004). Dennoch spielte diese Technik bis dato in der Beurteilung der Rekrutierung von Leukozyten im renalen Glomerulus eine sehr untergeordnete Rolle.

Durch den Einsatz der konfokalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie zur Beurteilung des Leukozytenverhaltens in einem intravitalen Mausmodell war es unserer Arbeitsgruppe möglich ein neues Paradigma des Verhaltens von neutrophilen Granulozyten im murinen Glomerulus zu erarbeiten.

4.1 Neutrophile Granulozyten adhärieren und migrieren auch im physiologischen Nierenglomerulus

Die initiale Analyse von neutrophilen Granulozyten in physiologischen, nicht entzündlich veränderten Nierenglomeruli führte zu einer unerwarteten Beobachtung. Auch in Abwesenheit eines inflammatorischen Stimulus kam es bei einigen neutrophilen Granulozyten zu einer Retention der Zellen aus dem Blutstrom mit anschließender Adhäsion an den glomerulären Gefäßstrukturen, die teilweise mehr als zwei Minuten andauerte. Dabei ließ sich ein statischer Phänotyp von einem migrierenden Phänotyp unterscheiden. Zellen vom statischen Phänotyp verweilten während ihres gesamten Aufenthalts im Glomerulus weitestgehend an derselben Stelle. Neutrophile Granulozyten des migrierenden Phänotyps migrierten hingegen intraluminal entlang der glomerulären Gefäßstrukturen, bevor sie sich von diesen ablösten und wieder dem Blutstrom folgten.

Diese Beobachtung schien zunächst im Widerspruch mit vorausgegangenen Untersuchungen zu stehen, da sich in der histologischen Analyse von unbeschädigten, physiologischen Nierenglomeruli üblicherweise nur eine minimale Anzahl von neutrophilen Granulozyten nachweisen lässt (Tang et al., 1997; Tipping et al., 1994). Bedenkt

man jedoch, dass die histologische Schnittuntersuchung nur eine zeitliche Momentaufnahme darstellt und die gewöhnliche histologische Schnittdicke von ca. 5 μm nur einen Bruchteil des gesamten Glomerulusdurchmessers von ca. 100 μm abdeckt, so lassen sich meine Befunde gut mit der Literatur in Einklang bringen.

Auch die Befürchtung, dass die beobachtete Retention von neutrophilen Granulozyten in nicht entzündeten Nierenglomeruli nur durch die Verwendung des UUO-Modells bedingt war, konnte durch vorangegangene Experimente unserer Arbeitsgruppe ausgeräumt werden. Die Untersuchung von soliden, nicht durch die UUO-Prozedur hydronephrotisch veränderten Nieren zeigte ein vergleichbares Verhalten der Leukozyten (Devi et al., 2010b; Kuligowski et al., 2006a, 2009).

Eine interessante Beobachtung, deren Hintergrund nicht vollständig geklärt werden konnte, stellt die Tatsache dar, dass neutrophile Granulozyten zwei unterschiedliche Phänotypen aufzuweisen schienen. Das Phänomen könnte beispielsweise durch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Externalisierung und Präsentation des MPO-Antigens an der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten oder durch eine abweichende Aktivierung der Zellen durch das verabreichte LPS bedingt sein. Ob Zellen vom migrierenden Phänotyp ein anderes Expressionsmuster an Adhäsionsmolekülen aufweisen als Zellen vom statischen Phänotyp, ließ sich im Rahmen meiner Dissertation nicht klären und bedarf weiterer Untersuchungen.

Obwohl bereits zuvor verschiedene Studien intravaskuläre Migrationsvorgänge von neutrophilen Granulozyten in entzündlich veränderten Mikrogefäßstrukturen beschrieben (McDonald et al., 2010; Phillipson et al., 2006), so scheint der verlängerte, teilweise von Migration geprägte Aufenthalt von neutrophilen Granulozyten in unbeschädigten physiologischen Gefäßen des murinen Glomerulus eine nierenspezifische Besonderheit darzustellen. Diese neuen Ergebnisse, die in ähnlicher Weise von anderen Arbeitsgruppen unseres Labors gemacht wurden (Devi et al., 2012), stellen eine bisher unbekannte Beobachtung dar, und lassen vermuten, dass die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im murinen Glomerulus deutlich umfangreicher und komplizierter ist als bisher angenommen.

4.2 Anti-MPO-Antikörper führen im Rahmen der ANCA-assoziierten GN zu einer erhöhten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten

Wie bereits zuvor ausführlich beschrieben wurde, ist eine entscheidende Rolle der Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörper in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis als immer wahrscheinlicher anzusehen. Diverse klinische Beobachtungen (Bansal and Tobin, 2004; Stone et al., 2010) sowie experimentelle Studien in vitro (Falk et al., 1990b) und in vivo (Little et al., 2005; Xiao et al., 2002) legen nahe, dass es sich bei den ANCA um weit mehr als eine mit der Krankheit assoziierte Begleiterscheinung handelt. Dennoch bleiben nach wie vor weite Teile der Pathogenese ungeklärt. Neutrophile Granulozyten werden als Hauptverursacher des glomerulären Schadens, der im Rahmen einer ANCA-assoziierten GN zu finden ist, angesehen (Jennette et al., 2006; Kallenberg, 2011; Lionaki et al., 2007).

Im Jahre 2009 postulierten Kuligowski et al., die das Verhalten von neutrophilen Granulozyten mittels konventioneller intravitaler Epifluoreszenzmikroskopie beurteilten, dass die Administration von anti-MPO-Antikörpern zu einer vermehrten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in murinen Glomeruli führte (Kuligowski et al., 2006a, 2009). Auch histologische Untersuchungen renaler Biopsien von Patienten mit ANCA-assoziiierter Glomerulonephritis zeigten eine ausgeprägte Infiltration des Nierenparenchyms mit neutrophilen Granulozyten und sprechen somit für eine verstärkte Rekrutierung der Zellen im Rahmen des aktiven Krankheitsgeschehens (Hauer et al., 2002).

Diese Beobachtung scheint zunächst nur schwierig mit den Ergebnissen meiner Experimente vereinbar zu sein. Die Untersuchung des Neutrophilenverhaltens mittels konfokaler MPM über einen Zeitraum von einer Stunde führte zu der Erkenntnis, dass sich der pro-inflammatorische Stimulus der anti-MPO-AK vielmehr in einer Steigerung der Verweildauer der Neutrophilen ausdrückte. Beim Vergleich der absoluten Anzahl adhärenter Neutrophiler, die sich während der einstündigen Aufzeichnungsperiode beobachten ließen, zeigte sich zwischen der anti-MPO-Gruppe und der anti-OVA-Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied.

Berücksichtigt man jedoch die genaue experimentelle Herangehensweise von Kuligowski et al., so lässt sich dieser Widerspruch schnell ausräumen. Bei der Verwendung der herkömmlichen Epifluoreszenzmikroskopie weisen die Aufzeich-

nungsperioden eine durchschnittliche Länge von ca. einer Minute auf und stellen somit nur einen zeitlichen Ausschnitt eines kontinuierlichen Geschehens dar. Der Einsatz der konfokalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie ermöglichte uns jedoch eine fortlaufende Analyse der Zellen über einen Zeitraum von einer Stunde. Die beobachtete Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten nach Administration der anti-MPO-AK geht, bei Anwendung der herkömmlichen Epifluoreszenzmikroskopie, logischerweise mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einher, zu einem bestimmten Zeitpunkt während der einstündigen Aufzeichnungsperiode mehrere adhärente neutrophile Granulozyten im Glomerulus vorzufinden. Meine Beobachtungen stehen somit nicht im Widerspruch mit der bis dato vorliegenden Literatur.

Vielmehr war es mir möglich, mithilfe der konfokalen MPM ein neues Paradigma der glomerulären Schädigung durch neutrophile Granulozyten aufzustellen. Demnach scheint die Schädigung glomerulärer Strukturen im Rahmen der ANCA-assoziierten GN nicht primär durch eine gesteigerte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bedingt zu sein, sondern ist hingegen Ausdruck einer gesteigerten Verweildauer der Zellen innerhalb der glomerulären Gefäßstrukturen.

Wiederum stellt sich die Frage warum der beobachtete Effekt vor allem bei Granulozyten des migrierenden Phänotyps zu beobachten ist. Greift man den Gedankengang auf, dass der entstehende Phänotyp der neutrophilen Granulozyten durch eine unterschiedlich starke Externalisierung des MPO-Antigens bedingt ist, so ließe sich schlussfolgern, dass insbesondere das Externalisierungsmuster von migrierenden Granulozyten bei Administration von anti-MPO-Antikörpern eine ausgeprägte Adhäsionsantwort hervorruft. Durch den Einsatz spezieller Antikörper zur gezielten Blockade verschiedener Adhäsionsmoleküle wäre es möglich, die genauen Umstände, die für einen Phänotyp spezifisch sind und insbesondere in neutrophilen Granulozyten vom migrierenden Phänotyp zu einer anti-MPO-induzierten Steigerung der Verweildauer führen, zu untersuchen.

Die Kontrolle des intravitalen Mausmodells der ANCA-assoziierten GN in einer weiteren Mauslinie (LysM-EGFP) führte zu vergleichbaren Ergebnissen und unterstützt somit unser Paradigma des Leukozytenverhaltens im Glomerulus.

Die Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus als reaktive Antwort auf eine inflammatorische Stimulation der Versuchstiere mit anti-MPO-Antikörpern lässt sich weiterhin gut mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen unseres Labors vergleichen. Devi et al. machten in einem vergleichbaren intravitalen Modell, bei dem der inflammatorische Impuls durch anti-GBM-Antikörper erfolgte, ähnliche Beobachtungen für neutrophile Granulozyten und Monozyten (Devi et al., 2012).

Interessant ist vor diesem Hintergrund auch die Beobachtung, dass die Schädigung glomerulärer Strukturen durch neutrophile Granulozyten geschieht, während sich die Zellen innerhalb des Lumens der glomerulären Gefäßstrukturen befinden. Nach heutigem Kenntnisstand geht man eigentlich davon aus, dass neutrophile Granulozyten gewöhnlicherweise im Anschluss an einen komplizierten Adhäsionsvorgang am Gefäßendothel durch die Gefäßwand migrieren und durch chemotaktische Liganden zur Lokalisation der Entzündungsreaktion gelangen (Ley et al., 2007; Muller, 2003).

Weiterhin offen bleibt die Frage, ob die Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten durch eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen bedingt ist oder ob es sich um das Resultat eines passiven Retentionsvorgangs, der beispielsweise durch NETs bedingt sein könnte, handelt. Hinweise auf die aktive Beteiligung von Adhäsionsmolekülen liefert die Studien von Kuligowski et al., die bei der glomerulären Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten α_4 -Integrine als eine notwendige Komponente beschrieben (Kuligowski et al., 2009). Auch Devi et al. beobachteten in ihrem intravitalen anti-GBM Modell, dass die Inhibition von Mac-1 in einer signifikanten Reduktion der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten auf nahezu basale Werte resultiert. Weitere Experimente sind notwendig um die kausalen Hintergründe einer gesteigerten Verweildauer von Neutrophilen als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus durch anti-MPO-Antikörper vollkommen zu klären.

4.3 Die anti-MPO-induzierte Steigerung der Verweildauer von Neutrophilen ist vom Komplementsystem abhängig

Der Zusammenhang zwischen dem Komplementsystem und der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis wurde bereits in früheren Abschnitten meiner Dissertation ausführlich beschrieben (Huugen et al., 2007; Schreiber et al., 2009; Xiao et al., 2007). Hauptintention der Depletionsversuche mit CVF und die Anwendung eines C5aR-Antikörpers war es, die genauen Einflüsse des Komplementsystems auf die Krankheitsentwicklung in unserem intravitalem Modell der ANCA-assoziierten GN weiter zu erforschen und somit zusätzlich unser neuartiges Paradigma der Schädigung glomerulärer Strukturen durch eine gesteigerte Verweildauer von neutrophilen Granulozyten zu untermauern.

Interessanterweise führte die Administration von 25 µg CVF und die damit verbundene vollständige Depletion des Komplementsystems tatsächlich zu einem Ausbleiben des, nach Verabreichung der krankheitsinduzierenden anti-MPO-AK zuvor beobachteten, Anstiegs der Verweildauer. Bezogen auf unser neuartiges Paradigma des Leukozytenverhaltens im Glomerulus, spricht eine, mit nicht stimulierten Mäusen vergleichbare, geringe Verweildauer der neutrophilen Granulozyten für eine Reduktion des glomerulären Schadens. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit den Untersuchungen von Xiao et al. vergleichen, die im Hinblick auf die Krankheitsinduktion durch anti-MPO-AK von einer protektiven Rolle der CVF Depletion berichteten (Xiao et al., 2007).

Da in den vergangenen Jahren zunehmend Hinweise darauf gefunden wurden, dass die Rolle des Komplementsystems sich primär über die C5a/C5aR-Achse abzuspielen scheint, untersuchte ich weiterhin die Auswirkungen einer C5aR Blockierung mittels monoklonalem Antikörper auf die Verweildauer der Neutrophilen im Anschluss an die Administration der anti-MPO-AK. Die funktionelle Blockade der C5a/C5aR-Achse resultierte ebenfalls in einer geringeren Verweildauer der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch wenn die Verweildauer, verglichen mit der Zeit in nicht stimulierten Versuchstieren, noch leicht gesteigert war und die Effekte der Rezeptorblockade nicht ganz so wirkungsvoll waren wie in den Depletionsversuchen mit CVF, so scheint die Bindung von C5a an seinen Rezeptor im Hinblick auf die Pathogenese der ANCA-assoziierten GN von Bedeutung zu sein. Die Differenz der

Verweildauer in der CVF-Gruppe und der anti-C5aR-Antikörper-Gruppe deutet allerdings darauf hin, dass die komplementvermittelten Effekte nicht ausschließlich über den C5aR vermittelt werden, sondern auch andere Signalkaskaden eine Rolle spielen.

Auch in diesem Fall lassen sich meine Beobachtungen gut mit der bestehenden Literatur in Einklang bringen. Schreiber et al. konnten anhand von histologischen Untersuchungen und Urinalanalysen zeigen, dass in ihrem Mausmodell der ANCA-assoziierten GN die Blockierung des C5aR sich ebenfalls in einer präventiven Hinsicht auf die Krankheitsinduktion auswirkt (Schreiber et al., 2009). Auch Xiao et al. und Huugen et al. bewiesen, dass eine funktionelle Blockade des Komplementfaktors C5 zu einer weniger stark ausgeprägten Glomerulonephritis führt (Huugen et al., 2007; Xiao et al., 2007).

Interessant wäre zudem die intraexperimentelle Blockierung des C5L2-Rezeptors. Der Ligand C5a verfügt neben dem bereits beschriebenen C5aR (CD88) über einen weiteren Rezeptor, den C5L2-Rezeptor (Cain and Monk, 2002; Ohno et al., 2000). Die genauen Eigenschaften und Funktionsweisen des C5a/C5L2-Signalwegs konnten bislang jedoch noch nicht abschließend geklärt werden. Die Arbeitsgruppe um Chen et al. schreiben dem Signalweg pro-inflammatorische Eigenschaften zu (Chen et al., 2007). Somit könnte die Signalweiterleitung über den C5L2-Rezeptor auch im Rahmen der ANCA-assoziierten GN zu einer Amplifikation des pro-inflammatorischen Signals führen. Andere Arbeitsgruppen beschreiben den C5L2-Rezeptor hingegen als „*default*“ oder „*scavenger receptor*“, der sich kompetitiv zum C5aR verhalte ohne dabei jedoch ein pro-inflammatorische Signalkaskade zu initiieren und somit eher als anti-inflammatorisch angesehen werden muss (Manthey et al., 2009; Okinaga et al., 2003). Auch in Bezug auf die ANCA-assoziierten Glomerulonephritis gibt es Beobachtungen, die eine Rolle des C5L2-Rezeptors in der Pathogenese vermuten lassen. Yuan et al. konnten zeigen, dass die glomeruläre Expression von C5L2 in Patienten mit ANCA-assoziiierter GN deutlich gesteigert ist (Yuan et al., 2012). Ein spezifischer pro- oder anti-inflammatorischer Effekt der C5a/C5L2-Rezeptorsignalkaskade konnte jedoch nicht gezeigt werden und somit bedarf es weiterer Forschung um die genaue Rolle des C5L2-Rezeptors im Rahmen der ANCA-assoziierten GN weiter zu klären. Die gezielte

intraexperimentelle Blockade des C5L2-Rezepts und eine mögliche Auswirkung auf die Verweildauer der neutrophilen Granulozyten oder die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in meinem Modell der ANCA-assoziierten GN könnten somit dazu beitragen, die genaue Funktion der C5a/C5L2-Rezeptorsignalkaskade in der Krankheitsentstehung zu verstehen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die These einer Beteiligung des Komplementsystems in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis durch meine Experimente weiter bekräftigt wurde. Sowohl eine vollständige Depletion des Komplementsystems mittels des Cobra Venom Factors als auch die selektive Blockade der C5a/C5aR-Achse resultierten trotz Administration der anti-MPO-Antikörper in einer normalen Verweildauer der neutrophilen Granulozyten. Zudem stellt die Reduktion der Verweildauer bei Inhibition des Komplementsystems eine logische Konsequenz in Bezug auf unser neues Paradigma des Neutrophilenverhaltens dar und untermauert dessen Gültigkeit.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse und zuvor publizierter Studien lässt sich über einen Einsatz von Komplementinhibitoren in der Therapie der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis beim Menschen diskutieren. Bedenkt man, dass das Komplementsystem bereits seit mehreren Jahrzehnten ausgiebig erforscht wird und seine Faktoren und Regulatoren seit längerer Zeit sequenziert sind, so erscheint es verwunderlich, dass bis dato nur wenige Komplementinhibitoren klinisch eingesetzt werden. Neben dem Einsatz des C1-Inhibitors *Serping1* (Epstein and Bernstein, 2008) bei Patienten mit hereditärem Angioödem, den intravenösen Immunglobulinen (IVIG) bei Patienten mit Kawasaki Syndrom oder der idiopathischen thrombozytopenen Purpura sowie der Verwendung des anti-C5-Antikörpers Eculizumab im Rahmen der primären nächtlichen Hämaturie finden sich aktuell keine weiteren zugelassenen Medikamente (Wagner and Frank, 2010).

Für die Behandlung der ANCA-assoziierten GN würden sich insbesondere Medikamente eignen, die spezifisch in die C5a/C5aR-Achse eingreifen, da dieser Signalweg in der Pathogenese von besonderer Bedeutung zu sein scheint. Neben dem bereits erwähnten monoklonalen anti-C5-Antikörper Eculizumab (Parker, 2009), der die Generierung von C5a effektiv unterdrückt (Rother et al., 2007), werden zurzeit auch

Antikörper wie der AK TNX-558 erforscht, die direkt die Bindung von C5a an seinen Rezeptor (C5aR, CD88) verhindern und somit das intrazelluläre Signalling unterbinden (Sprong et al., 2003). Auch direkte Rezeptorantagonisten gegen den C5aR sind in der Entwicklung. Das zyklische Hexapeptid PMX-53 (Köhl, 2006) zeigt eine starke inhibitorische Aktivität gegen den C5aR und hat in der Anwendung bei rheumatoider Arthritis und Psoriasis bereits die Phase II der klinischen Zulassung überstanden. Der gegen den Faktor D gerichtete humanisierte Antikörper TNX-234 (Hollmer, 2007) inhibiert den für die Pathogenese der ANCA-assoziierten GN entscheidenden, alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems und befindet sich zurzeit in Phase I des Zulassungsverfahrens bei Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration.

Neben den recht spezifischen Angriffspunkten der monoklonalen Antikörper und Peptide wäre auch eine komplette Depletion des Komplementsystems, wie sie bei Verwendung des CVF auftritt, als humanes Therapeutikum in sehr schweren Fällen denkbar. Obwohl der Cobra Venom Factor in vielen Tiermodellen angewandt wird, ist er aufgrund der möglichen Induktion von systemischen inflammatorischen Reaktionen, die zur pulmonalen Hämorrhagie und zum Kreislaufversagen führen können, nicht zur Anwendung beim Menschen geeignet (Younger et al., 2001). Trotz dieser Tatsache wurde ein CVF/C3-Hybridmolekül entwickelt (Fritzing et al., 2009), welches in der Lage ist, das Komplementsystem zu depletieren und dabei keine negativen immunogenen Eigenschaften aufweist (Wagner and Frank, 2010). Die weitere Entwicklung hinsichtlich eines humanen Einsatzes dieses Hybriden bleibt abzuwarten.

Obwohl es in den letzten Jahren vermehrt Bemühungen gab spezifische Komplementinhibitoren zu entwickeln, steht der Einsatz dieser Medikamente in der Therapie der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis noch am Anfang. Weitere krankheitsspezifische Studien und Experimente sind notwendig um die mögliche Verwendung von Substanzen wie Eculizumab, PMX-53 oder TNX-234 in der Therapie der ANCA-assoziierten GN hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und ihres Nebenwirkungsprofil zu evaluieren. Da sich die heutige Therapie der ANCA-assoziierten GN jedoch als ausgesprochen unspezifisch und sehr toxisch präsentiert, lassen sich von der spezifischen Inhibition des Komplementsystems neue, weniger toxischen Medikamente mit hoher Wirksamkeit erhoffen.

4.4 Anti-MPO-Antikörper führen im Rahmen der ANCA-assoziierten GN zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten

Die Eigenschaft neutrophiler Granulozyten, im Rahmen des oxidativen Bursts reaktive Sauerstoffspezies zu generieren, ist bereits seit längerer Zeit bekannt (Babior et al., 1973; Baldridge and Gerard, 1933; Iyer et al., 1961). Auch die Fähigkeit von Anti-Neutrophilen Antikörpern, neutrophile Granulozyten in vitro zum oxidativen Burst anzuregen, wurde bereits beschrieben (Charles et al., 1991; Falk et al., 1990b). Bis dato war es allerdings nicht möglich in einem in vivo Modell der ANCA-assoziierten GN den oxidativen Burst von Neutrophilen als Ursache der glomerulären Schädigung nachzuweisen.

In diesem Zusammenhang gelang es mir im intravitalen Mausmodell der ANCA GN neutrophile Granulozyten nachzuweisen, die reaktive Sauerstoffspezies produzierten und somit direkt zu einer Schädigung glomerulärer Gewebsstrukturen beitrugen. Die Anzahl an Zellen, die respiratorischen Burst betrieben (DHE⁺ Zellen), war in der mit anti-MPO-AK behandelten Gruppe im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe um mehr als das Vierfache erhöht. Dieser Befund und die Tatsache, dass einige Neutrophile erst nach Retention aus dem renalen Blutstrom im lokalen Milieu des Glomerulus mit der Generierung von ROS begannen, bekräftigen den direkten Zusammenhang zwischen der Administration von anti-MPO-AK und der lokalen glomerulären Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies und verdeutlichen den Stellenwert der ROS in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis.

Interessanterweise machte ich die Beobachtung, dass sowohl Neutrophile vom statischen als auch Zellen vom migratorischen Phänotyp in der Lage waren, reaktive Sauerstoffspezies zu generieren. Während die statischen Neutrophile wahrscheinlich nur eine Schädigung der Endothelstrukturen verursachen, an denen sie gerade adhärent sind, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass durch die Generierung von ROS in Zellen des migratorischen Phänotyps auch eine ausgeprägte Schädigung glomerulärer Strukturen über einen langen Abschnitt des Gefäßkonvoluts möglich ist.

Weiterhin interessant erscheint die Tatsache, dass DHE⁺ Zellen eine deutlich gesteigerte Verweildauer im Glomerulus aufwiesen. Im Durchschnitt waren die neutrophilen

Granulozyten, die im Glomerulus reaktive Sauerstoffspezies generierten, für mehr als die 2,5 fache Zeit adhären. Auch wenn die genaueren Umstände dieses Befundes weiterer Nachforschungen bedürfen, so scheint es, dass neutrophile Granulozyten, die ROS generieren und somit einen „schädigenden Phänotyp“ aufweisen, Vorgängen unterliegen, die für eine längere Aufenthaltszeit der Zellen im Glomerulus verantwortlich sind und somit die Schädigung des Glomerulus maximieren.

4.5 Ausblick

Die Untersuchung neutrophiler Granulozyten im Rahmen der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis mittels konfokaler Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie führte zu neuartigen Erkenntnissen hinsichtlich des Verhaltensparadigmas von Neutrophilen in unbeschädigten und inflammatorisch veränderten Nierenglomeruli und bekräftigte verschiedene Thesen zur Pathogenese der ANCA-assoziierten GN. Die angewendete Methodik stellte sich als hervorragende Möglichkeit heraus, intravitale Vorgänge im murinen Glomerulus untersuchen und verstehen zu können. Aus diesem Grund sind weitere Experimente, die zum zusätzlichen Verständnis der ANCA-assoziierten GN beitragen könnten, angezeigt.

4.5.1 Auswirkung der Komplementinhibition auf die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies

Nachdem ich zeigen konnte, dass eine Inhibition des Komplementsystems zu einer Reduktion der Neutrophilenverweildauer führt, wäre es interessant zu sehen, ob das Komplementsystem auch für die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies, die, laut meinen Ergebnissen, im Rahmen der ANCA GN zu finden sind, notwendig ist. Dazu wäre es vorstellbar, die DHE Versuche mit der CVF-vermittelten Depletion des Komplementsystems oder der Anwendung des anti-C5aR-Antikörpers zu kombinieren.

4.5.2 Selektive Blockierung von Adhäsionsmolekülen

Um eine kausale Ursache für die gesteigerte Verweildauer der neutrophilen Granulozyten bei inflammatorischer Stimulation durch anti-MPO-AK finden zu können, ist es sinnvoll, verschiedene Adhäsionsmoleküle der Neutrophilen selektiv durch Antikörper

zu blockieren und die Auswirkungen auf die Steigerung der Verweildauer zu analysieren.

4.5.3 *Neutrophil extracellular traps (NET)*

Eine weitere, höchst interessante Komponente, die in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis von Bedeutung sein könnte und mit dem von mir verwendeten Modell der intravitalen MPM experimentell gut zu untersuchen wäre, ist das Auftreten von NETs (*neutrophil extracellular traps*). Bei NETs handelt es sich um extrazelluläre netzartige Strukturen, die durch die Sekretion von Chromatin durch neutrophile Granulozyten entstehen und in der angeborenen Immunantwort von großer Bedeutung sind (Brinkmann et al., 2004). Die Formation von NETs scheint von der Produktion von ROS abhängig zu sein und kann beispielsweise durch den Komplementfaktor C5a initiiert werden (Yousefi et al., 2009). NETs wurden zudem in Nierenbiopsien von Patienten mit einer aktiven ANCA-assoziierten Vaskulitis nachgewiesen (Bosch, 2009; Kessenbrock et al., 2009). Durch die neuesten Entwicklungen im Bereich des *in vivo imaging* ist es nun möglich geworden, die Formation von NETs durch fluoreszierende Farbstoffe wie dem *Sytox Green DNA dye* optisch darzustellen (McDonald et al., 2012; Yipp et al., 2012). Die Anwendung dieses Darstellungsverfahrens in unserem intravitalen Mausmodell würde zur Aufklärung einer möglichen Beteiligung von NETs an der Pathogenese der ANCA-assoziierten GN beitragen.

5 Zusammenfassung

Die ANCA-assoziierte Form der rapid progressiven Glomerulonephritis (RPGN) repräsentiert ein oftmals unterschätztes, jedoch sehr ernst zu nehmendes Krankheitsbild, welches mit einer hohen gesundheitlichen und wirtschaftlichen Belastung einhergeht. Mit einer 5-Jahres Überlebensrate von weniger als 80 % und einer Dialyseabhängigkeit der überlebenden Patienten von 30 % stellt die Erkrankung weiterhin einen gravierenden Einschnitt in die Lebensqualität der betroffenen Patienten dar (Booth et al., 2003). Auch wenn die intensive Forschung der vergangenen Jahre einen großen Beitrag zum Verständnis der Krankheit und ihrer Ursachen geleistet hat, so bleiben große Teile der Pathogenese weiterhin ungeklärt. Die zurzeit verfügbaren Therapieansätze der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis weisen bei einem primären Einsatz von Glucocortikoiden und Immunsuppressiva ein ausgesprochen unspezifisches und sehr toxisches Wirkungsprofil auf. Das Ziel meiner Dissertation war es, zu einem besseren Verständnis der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis und ihrer Pathogenese beizutragen und im Hinblick auf die Entwicklung neuer therapeutischer Schwerpunkte insbesondere die pathophysiologische Rolle der neutrophilen Granulozyten und des Komplementsystems besser nachvollziehen zu können.

Durch den Einsatz der konfokalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie in unserem intravitalen Mausmodell der ANCA-assoziierten GN war es möglich, den unmittelbaren Verhaltenshabitus von neutrophile Granulozyten im murinen Glomerulus zu untersuchen und ein neuartiges Paradigma des Neutrophilenverhaltens in der Gefäßstruktur des Glomerulus aufzustellen. Ich konnte zeigen, dass neutrophile Granulozyten auch in Abwesenheit eines inflammatorischen Stimulus gelegentlich eine Retention aus dem renalen Blutstrom erfahren, die letztendlich in eine statische oder migratorische Adhäsionsphase übergeht. Eine inflammatorische Stimulation des Glomerulus, die in meinem Falle durch anti-MPO-Antikörper hervorgerufen wurde, resultiert jedoch nicht, wie bisher angenommen, in der Rekrutierung zusätzlicher neutrophiler Granulozyten, sondern äußert sich vielmehr in einer Steigerung der Verweildauer der Zellen in den glomerulären Gefäßstrukturen. Konkret war es mir möglich, eine Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten bei konstanter absoluter Zellanzahl

innerhalb der einstündigen Aufzeichnungsperiode in zwei unterschiedlichen Mauslinien (C57BL6/J und LysM-EGFP) nachzuweisen.

Weiterhin gelang es mir, durch die Verwendung des Oxidantien sensitiven Fluorophors Dihydroethidium (DHE) die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten nachzuweisen und die damit verbundene Schädigung der glomerulären Strukturen mit den krankheitsinduzierenden anti-MPO-Antikörpern in Verbindung zu bringen. Diese zuvor noch nicht beschriebene Beobachtung verdeutlicht den unmittelbaren Zusammenhang zwischen den anti-MPO-AK und einer glomerulären Schädigung und untermauert die Rolle der Antikörper in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis.

Bezogen auf das Komplementsystem führten meine Experimente zu der Erkenntnis, dass die von mir beschriebene gesteigerte Verweildauer von neutrophilen Granulozyten nach Administration der anti-MPO-AK durch die Gabe von CVF und, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, auch durch die Gabe eines anti-C5aR-Antikörpers signifikant reduziert werden kann. Hierdurch wird die These einer entscheidenden Beteiligung des Komplementsystems und insbesondere der C5a/C5aR-Achse in der Pathogenese der ANCA-assoziierten GN gestützt. Therapeutische Ansätze, wie der neuartige Antikörper TNX-558 (Sprong et al., 2003) oder das zyklische Hexapeptid PMX-53 (Köhl, 2006), die beide explizit an der beschriebenen Achse angreifen, stellen somit eine vielversprechende, spezifischere und weniger toxische Alternative in der Behandlung von Patienten mit ANCA-assoziiierter GN dar.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Methodik der konfokalen Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie eine hervorragende Möglichkeit darstellt, um intravitale Vorgänge im murinen Nierenglomerulus zu untersuchen. In Bezug auf das Verhalten von neutrophilen Granulozyten innerhalb des Glomerulus im Rahmen der ANCA-assoziierten GN konnten neue Erkenntnisse gewonnen und bestehende Thesen ergänzt werden. Auch wenn es, insbesondere im Hinblick auf die humane Therapie, noch weiterer Studien und Experimente bedarf, so leistet die vorliegende Dissertation einen wichtigen Beitrag in der Erforschung der Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis.

6 Literatur

Abril, A. (2011). Churg-strauss syndrome: an update. *Curr. Rheumatol. Rep.* 13, 489–495.

Allen, A., Pusey, C., and Gaskin, G. (1998). Outcome of renal replacement therapy in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 1258–1263.

Alper, C.A., and Balavitch, D. (1976). Cobra venom factor: evidence for its being altered cobra C3 (the third component of complement). *Science* 191, 1275–1276.

Babior, B.M., Kipnes, R.S., and Curnutte, J.T. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52, 741–744.

Baldrige, C., and Gerard, R. (1933). The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* 235–236.

Bansal, P.J., and Tobin, M.C. (2004). Neonatal microscopic polyangiitis secondary to transfer of maternal myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody resulting in neonatal pulmonary hemorrhage and renal involvement. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 93, 398–401.

Bao, L., and Quigg, R.J. (2007). Complement in lupus nephritis: the good, the bad, and the unknown. *Semin. Nephrol.* 27, 69–80.

Belmont, H.M. (2006). Treatment of ANCA-associated systemic vasculitis. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* 64, 60–66.

Bonifati, D.M., and Kishore, U. (2007). Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol. Immunol.* 44, 999–1010.

Boomsma, M.M., Stegeman, C.A., van der Leij, M.J., Oost, W., Hermans, J., Kallenberg, C.G., Limburg, P.C., and Tervaert, J.W. (2000). Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum.* 43, 2025–2033.

Booth, A.D., Almond, M.K., Burns, A., Ellis, P., Gaskin, G., Neild, G.H., Plaisance, M., Pusey, C.D., and Jayne, D.R.. (2003). Outcome of ANCA-associated renal vasculitis: a 5-year retrospective study. *Am. J. Kidney Dis.* 41, 776–784.

Bosch, X. (2009). LAMPs and NETs in the pathogenesis of ANCA vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1654–1656.

Braun, N., Schweisfurth, A., Lohöfener, C., Lange, C., Gründemann, C., Kundt, G., and Gröne, H.-J. (2011). Epidemiology of glomerulonephritis in Northern Germany. *Int. Urol. Nephrol.* 43, 1117–1126.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.

- Cain, S.A., and Monk, P.N. (2002). The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J. Biol. Chem.* 277, 7165–7169.
- Camous, L., Roumenina, L., Bigot, S., Brachemi, S., Frémeaux-Bacchi, V., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2011). Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. *Blood* 117, 1340–1349.
- Campell, D., Garvey, J., Cremer, N., and Sussdorf, D. (1964). *Methods in Immunology* (New York: Benjamin).
- Centonze, V.E., and White, J.G. (1998). Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys. J.* 75, 2015–2024.
- Chanock, S.J., el Benna, J., Smith, R.M., and Babior, B.M. (1994). The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 24519–24522.
- Charles, L.A., Caldas, M.L., Falk, R.J., Terrell, R.S., and Jennette, J.C. (1991). Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 50, 539–546.
- Chen, M., Xing, G.-Q., Yu, F., Liu, G., and Zhao, M.-H. (2009). Complement deposition in renal histopathology of patients with ANCA-associated pauci-immune glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant* 24, 1247–1252.
- Chen, N.-J., Mirtsos, C., Suh, D., Lu, Y.-C., Lin, W.-J., McKerlie, C., Lee, T., Baribault, H., Tian, H., and Yeh, W.-C. (2007). C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature* 446, 203–207.
- Chevalier, R.L., Forbes, M.S., and Thornhill, B.A. (2009). Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 75, 1145–1152.
- Ciz, M., Denev, P., Kratchanova, M., Vasicek, O., Ambrozova, G., and Lojek, A. (2012). Flavonoids inhibit the respiratory burst of neutrophils in mammals. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 181295.
- Clayton, A.R., Prue, R.L., Harper, L., Drayson, M.T., and Savage, C.O.S. (2003). Dendritic cell uptake of human apoptotic and necrotic neutrophils inhibits CD40, CD80, and CD86 expression and reduces allogeneic T cell responses: relevance to systemic vasculitis. *Arthritis Rheum.* 48, 2362–2374.
- Cochrane, C.G., Müller-Eberhard, H.J., and Aikin, B.S. (1970). Depletion of plasma complement in vivo by a protein of cobra venom: its effect on various immunologic reactions. *J. Immunol.* 105, 55–69.
- Conchello, J.-A., and Lichtman, J.W. (2005). Optical sectioning microscopy. *Nat. Methods* 2, 920–931.
- Couser, W.G. (1988). Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenetic mechanisms, and therapy. *Am. J. Kidney Dis.* 11, 449–464.
- Covic, A., Schiller, A., Volovat, C., Gluhovschi, G., Gusbeth-Tatomir, P., Petrica, L., Caruntu, I.-D., Bozdog, G., Velciov, S., Trandafirescu, V., et al. (2006). Epidemiology of renal disease in

Romania: a 10 year review of two regional renal biopsy databases. *Nephrol. Dial. Transplant* 21, 419–424.

Curtis, J.E., Hersh, E.M., Harris, J.E., McBride, C., and Freireich, E.J. (1970). The human primary immune response to keyhole limpet haemocyanin: interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response and in vitro blast transformation. *Clin. Exp. Immunol.* 6, 473–491.

Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73–76.

Devi, S., Kuligowski, M.P., Kwan, R.Y.Q., Westein, E., Jackson, S.P., Kitching, A.R., and Hickey, M.J. (2010a). Platelet Recruitment to the Inflamed Glomerulus Occurs via an α IIb β 3 / GPVI-Dependent Pathway. *Am. J. Pathol.* 177, 1131–1142.

Devi, S., Kuligowski, M.P., Kwan, R.Y.Q., Westein, E., Jackson, S.P., Kitching, a R., and Hickey, M.J. (2010b). Platelet recruitment to the inflamed glomerulus occurs via an α IIb β 3/GPVI-dependent pathway. *Am. J. Pathol.* 177, 1131–1142.

Devi, S., Li, A., Westhorpe, C.L. V, Lo, C.Y., Abeynaïke, L.D., Snelgrove, S.L., Hall, P., Ooi, J.D., Sobey, C.G., Kitching, A.R., et al. (2012). Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus. *Nat. Med.*

Dunn, K.W., and Young, P.A. (2006a). Principles of multiphoton microscopy. *Nephron. Exp. Nephrol.* 103, e33–40.

Dunn, K.W., and Young, P.A. (2006b). Principles of multiphoton microscopy. *Nephron. Exp. Nephrol.* 103, e33–40.

Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F., and Huber-Lang, M. (2010). New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol. Med.* 17, 317–329.

Elbim, C., and Lizard, G. (2009). Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry. A* 75, 475–481.

Elzouki, A.N., Segelmark, M., Wieslander, J., and Eriksson, S. (1994). Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *J. Intern. Med.* 236, 543–548.

Epstein, T.G., and Bernstein, J.A. (2008). Current and emerging management options for hereditary angioedema in the US. *Drugs* 68, 2561–2573.

Esnault, V.L., Testa, A., Audrain, M., Rogé, C., Hamidou, M., Barrier, J.H., Sesboüé, R., Martin, J.P., and Lesavre, P. (1993). Alpha 1-antitrypsin genetic polymorphism in ANCA-positive systemic vasculitis. *Kidney Int.* 43, 1329–1332.

Falk, R., and Jennette, J. (1988). 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. *NEJM* 318, 1651–1657.

Falk, R.J., and Jennette, J.C. (2010). ANCA disease: where is this field heading? *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 745–752.

- Falk, R., Hogan, S., Carey, T., and Jennette, J. (1990a). Clinical course of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and systemic vasculitis. The Glomerular Disease Collaborative Network. *Ann. Intern. Med.*
- Falk, R.J., Terrell, R.S., Charles, L. a, and Jennette, J.C. (1990b). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4115–4119.
- Falk, R.J., Gross, W.L., Guillevin, L., Hoffman, G., Jayne, D.R.W., Jennette, J.C., Kallenberg, C.G.M., Luqmani, R., Mahr, A.D., Matteson, E.L., et al. (2011). Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): an alternative name for Wegener's granulomatosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 587–588.
- Fauci, A.S., Haynes, B.F., Katz, P., and Wolff, S.M. (1983). Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. *Ann. Intern. Med.* 98, 76–85.
- Faust, N., Varas, F., Kelly, L.M., Heck, S., and Graf, T. (2000). Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 96, 719–726.
- Feder, B. (2008). A Nazi Past Cast a Pall on Name of Disease. *New York Times* online presence.
- Finkelstein, J.D., Merkel, P.A., Schroeder, D., Hoffman, G.S., Spiera, R., St Clair, E.W., Davis, J.C., McCune, W.J., Lears, A.K., Ytterberg, S.R., et al. (2007). Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* 147, 611–619.
- Flierl, M.A., Perl, M., Rittirsch, D., Bartl, C., Schreiber, H., Fleig, V., Schlaf, G., Liener, U., Brueckner, U.B., Gebhard, F., et al. (2008). The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma. *Shock* 29, 25–31.
- Flossmann, O., Jones, R.B., Jayne, D.R.W., and Luqmani, R.A. (2006). Should rituximab be used to treat antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis? *Ann. Rheum. Dis.* 65, 841–844.
- Freund, J. (1951). The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review. *Am. J. Clin. Pathol.* 21, 645–656.
- Fritzinger, D.C., Bredehorst, R., and Vogel, C.W. (1994). Molecular cloning and derived primary structure of cobra venom factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12775–12779.
- Fritzinger, D.C., Hew, B.E., Thorne, M., Pangburn, M.K., Janssen, B.J.C., Gros, P., and Vogel, C.-W. (2009). Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 105–116.
- Gabay, J.E., Scott, R.W., Campanelli, D., Griffith, J., Wilde, C., Marra, M.N., Seeger, M., and Nathan, C.F. (1989). Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5610–5614.

- Ganter, M.T., Brohi, K., Cohen, M.J., Shaffer, L.A., Walsh, M.C., Stahl, G.L., and Pittet, J.-F. (2007). Role of the alternative pathway in the early complement activation following major trauma. *Shock* 28, 29–34.
- Garside, P., and Brewer, J.M. (2008). Real-time imaging of the cellular interactions underlying tolerance, priming, and responses to infection. *Immunol. Rev.* 221, 130–146.
- Gerard, C., and Gerard, N.P. (1994). C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 775–808.
- Godau, J., Heller, T., Hawlisch, H., Trappe, M., Howells, E., Best, J., Zwirner, J., Verbeek, J.S., Hogarth, P.M., Gerard, C., et al. (2004). C5a initiates the inflammatory cascade in immune complex peritonitis. *J. Immunol.* 173, 3437–3445.
- Goeppert-Mayer, M. (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprünge. Göttinger Dissertation. *Ann Phys* 9, 273–294.
- Groot, M.K. de, and Harper, L. (2009). Pulse Versus Daily Oral Cyclophosphamide for Induction of Remission in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody–Associated Vasculitis. *Ann Intern ...*
- Guchhait, P., Tosi, M.F., Smith, C.W., and Chakaraborty, A. (2003). The murine myeloid cell line 32Dcl3 as a model system for studying neutrophil functions. *J. Immunol. Methods* 283, 195–204.
- Guo, R.F., Huber-Lang, M., Wang, X., Sarma, V., Padgaonkar, V.A., Craig, R.A., Riedemann, N.C., McClintock, S.D., Hlaing, T., Shi, M.M., et al. (2000). Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis. *J. Clin. Invest.* 106, 1271–1280.
- Harper, L., and Savage, C.O. (2005). ANCA-associated renal vasculitis at the end of the twentieth century--a disease of older patients. *Rheumatology (Oxford)*. 44, 495–501.
- Hauer, H.A., Bajema, I.M., van Houwelingen, H.C., Ferrario, F., Noël, L.-H., Waldherr, R., Jayne, D.R.W., Rasmussen, N., Bruijn, J.A., and Hagen, E.C. (2002). Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups. *Kidney Int.* 61, 80–89.
- Hay, E.M., Beaman, M., Ralston, A.J., Ackrill, P., Bernstein, R.M., and Holt, P.J. (1991). Wegener's granulomatosis occurring in siblings. *Br. J. Rheumatol.* 30, 144–145.
- Hedger, N., Stevens, J., Drey, N., Walker, S., and Roderick, P. (2000). Incidence and outcome of pauci-immune rapidly progressive glomerulonephritis in Wessex, UK: a 10-year retrospective study. 1593–1599.
- Helmchen, F., Svoboda, K., Denk, W., and Tank, D.W. (1999). In vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 2, 989–996.
- Hensley, P., O'Keefe, M.C., Spangler, C.J., Osborne, J.C., and Vogel, C.W. (1986). The effects of metal ions and temperature on the interaction of cobra venom factor and human complement factor B. *J. Biol. Chem.* 261, 11038–11044.
- Herold, G. (2011). Innere Medizin.

- Herscowitz, H.B., Harold, W.W., and Stavitsky, A.B. (1972). Immunochemical and immunogenic properties of a purified keyhole limpet haemocyanin. *Immunology* 22, 51–61.
- Hoff, J. (2000). Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Anim. (NY)*. 29, 47–53.
- Hogan, S., Nachman, P., Wilkman, A., Jennette, J., and Falk, R. (1996). Prognostic markers in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 23–32.
- Hogan, S.L., Satterly, K.K., Dooley, M.A., Nachman, P.H., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2001). Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 134–142.
- Hogan, S.L., Falk, R.J., Chin, H., Cai, J., Jennette, C.E., Jennette, J.C., and Nachman, P.H. (2005). Predictors of relapse and treatment resistance in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-vessel vasculitis. *Ann. Intern. Med.* 143, 621–631.
- Hogan, S.L., Cooper, G.S., Savitz, D.A., Nylander-French, L.A., Parks, C.G., Chin, H., Jennette, C.E., Lionaki, S., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2007). Association of silica exposure with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody small-vessel vasculitis: a population-based, case-control study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2, 290–299.
- Ten Holder, S.M., Joy, M.S., and Falk, R.J. (2002). Cutaneous and systemic manifestations of drug-induced vasculitis. *Ann. Pharmacother.* 36, 130–147.
- Hollmer, M. (2007). Genentech makes its first-ever acquisition. *Nat. Biotechnol.* 25, 4–5.
- Howerton, D.A., Hunter, R.L., Ziegler, H.K., and Check, I.J. (1990). Induction of macrophage Ia expression in vivo by a synthetic block copolymer, L81. *J. Immunol.* 144, 1578–1584.
- Hull, C.M., Couser, W.G., and Knostman, J.D. (2000). A familial case of P-ANCA glomerulonephritis presenting in a father and daughter. *Am. J. Kidney Dis.* 35, E23.
- Hunter, R.L., and Bennett, B. (1984). The adjuvant activity of nonionic block polymer surfactants. II. Antibody formation and inflammation related to the structure of triblock and octablock copolymers. *J. Immunol.* 133, 3167–3175.
- Huugen, D., Xiao, H., van Esch, A., Falk, R.J., Peutz-Kootstra, C.J., Buurman, W. a, Tervaert, J.W.C., Jennette, J.C., and Heeringa, P. (2005). Aggravation of anti-myeloperoxidase antibody-induced glomerulonephritis by bacterial lipopolysaccharide: role of tumor necrosis factor- α . *Am. J. Pathol.* 167, 47–58.
- Huugen, D., van Esch, a, Xiao, H., Peutz-Kootstra, C.J., Buurman, W. a, Tervaert, J.W.C., Jennette, J.C., and Heeringa, P. (2007). Inhibition of complement factor C5 protects against anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis in mice. *Kidney Int.* 71, 646–654.
- Iyer, G., Islam, M., and Quastel, J. (1961). Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature* 192, 535–541.
- Jackman, K.A., Miller, A.A., De Silva, T.M., Crack, P.J., Drummond, G.R., and Sobey, C.G. (2009). Reduction of cerebral infarct volume by apocynin requires pretreatment and is absent in Nox2-deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* 156, 680–688.

- Jagiello, P., Aries, P., Arning, L., Wagenleiter, S.E.N., Csernok, E., Hellmich, B., Gross, W.L., and Epplen, J.T. (2005). The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 52, 4039–4043.
- Jayne, D., Rasmussen, N., Andrassy, K., Bacon, P., Tervaert, J.W.C., Dadoniené, J., Ekstrand, A., Gaskin, G., Gregorini, G., de Groot, K., et al. (2003). A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N. Engl. J. Med.* 349, 36–44.
- Jennette, J., and Falk, R. (1998). Pathogenesis of the vascular and glomerular damage in ANCA-positive vasculitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16–20.
- Jennette, J.C., and Falk, R.J. (1997). Small-vessel vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 337, 1512–1523.
- Jennette, J.C., and Thomas, D.B. (2001). Crescentic glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant* 16 *Suppl* 6, 80–82.
- Jennette, J., Hoidal, J., and Falk, R.J. (1990). Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3. *Blood* 75, 2263–2264.
- Jennette, J.C., Falk, R.J., Andrassy, K., Bacon, P. a, Churg, J., Gross, W.L., Hagen, E.C., Hoffman, G.S., Hunder, G.G., and Kallenberg, C.G. (1994). Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* 37, 187–192.
- Jennette, J.C., Xiao, H., and Falk, R.J. (2006). Pathogenesis of vascular inflammation by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1235–1242.
- Jennette, J.C., Xiao, H., Falk, R., and Gasim, A.M.H. (2011). Experimental models of vasculitis and glomerulonephritis induced by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Contrib. Nephrol.* 169, 211–220.
- Jennings, V.M. (1995). Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *ILAR J.* 37, 119–125.
- Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D.M., Hofhuis, F.M.A., Boackle, S.A., Takahashi, K., Holers, V.M., Walport, M., Gerard, C., et al. (2002). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 16, 157–168.
- Johnson, U., Ohlsson, K., and Olsson, I. (1976). Effects of granulocyte neutral proteases on complement components. *Scand. J. Immunol.* 5, 421–426.
- Jones, R.B., Cohen Tervaert, J.W., Hauser, T., Luqmani, R., Morgan, M.D., Peh, C.A., Savage, C.O., Segelmark, M., Tesar, V., Van Paassen, P., et al. (2010). Rituximab versus Cyclophosphamide in ANCA-Associated Renal Vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 363, 211–220.
- Joy, M.S., Hogan, S.L., Jennette, J.C., Falk, R.J., and Nachman, P.H. (2005). A pilot study using mycophenolate mofetil in relapsing or resistant ANCA small vessel vasculitis. *Nephrol. Dial. Transplant* 20, 2725–2732.
- Kaiser, W., and Garrett, C. (1961). Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.* 7, 229–231.

- Kallenberg, C.G.M. (2011a). Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Ann. Rheum. Dis.* 70 *Suppl 1*, i59–63.
- Kallenberg, C.G.M. (2011b). Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Ann. Rheum. Dis.* 70 *Suppl 1*, i59–63.
- Kallenberg, C.G., Stegeman, C.A., and Tervaert, J.W. (1996). Staphylococcus aureus, trimethoprim-sulfamethoxazole, and Wegener's granulomatosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* 13, 253–255.
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemarker, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Gröne, H.-J., Brinkmann, V., and Jenne, D.E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15, 623–625.
- Klahr, S., and Morrissey, J. (2002). Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, F861–75.
- Klebanoff, S.J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 77, 598–625.
- Kleinfeld, D., Mitra, P.P., Helmchen, F., and Denk, W. (1998). Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15741–15746.
- Klemmer, P.J., Chalermkulrat, W., Reif, M.S., Hogan, S.L., Henke, D.C., and Falk, R.J. (2003). Plasmapheresis therapy for diffuse alveolar hemorrhage in patients with small-vessel vasculitis. *Am. J. Kidney Dis.* 42, 1149–1153.
- Köhl, J. (2006). Drug evaluation: the C5a receptor antagonist PMX-53. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 529–538.
- Köhl, J., and Wills-Karp, M. (2007). A dual role for complement in allergic asthma. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 283–289.
- Kreisel, D., Nava, R.G., Li, W., Zinselmeyer, B.H., Wang, B., Lai, J., Pless, R., Gelman, A.E., Krupnick, A.S., and Miller, M.J. (2010). In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18073–18078.
- Kuligowski, M., Kitching, R.A., and Hickey, M.J. (2006a). Leukocyte recruitment to the inflamed glomerulus: a critical role for platelet-derived P-selectin in the absence of rolling. *J. Immunol.* 176, 6991–6999.
- Kuligowski, M.P., Kitching, R., and Hickey, M.J. (2006b). Leukocyte recruitment to the inflamed glomerulus: a critical role for platelet-derived P-selectin in the absence of rolling. *J. Immunol.* 176, 6991–6999.
- Kuligowski, M.P., Kwan, R.Y.Q., Lo, C., Wong, C., James, W.G., Bourges, D., Ooi, J.D., Abeynaïke, L.D., Hall, P., Kitching, R., et al. (2009). Antimyeloperoxidase antibodies rapidly induce alpha-4-integrin-dependent glomerular neutrophil adhesion. *Blood* 113, 6485–6494.
- Lachmann, P.J., and Halbwachs, L. (1975). The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin. Exp. Immunol.* 21, 109–114.

- Langlois, P.F., and Gawryl, M.S. (1988). Detection of the terminal complement complex in patient plasma following acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 70, 95–105.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.
- Liedke, S., and Popp, J. (2006). *Laser, Licht und Leben - Techniken in der Medizin* (Weinheim: WILEY-VCH Verlag).
- De Lind van Wijngaarden, R.A.F., Hauer, H.A., Wolterbeek, R., Jayne, D.R.W., Gaskin, G., Rasmussen, N., Noël, L.-H., Ferrario, F., Waldherr, R., Hagen, E.C., et al. (2006). Clinical and histologic determinants of renal outcome in ANCA-associated vasculitis: A prospective analysis of 100 patients with severe renal involvement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 2264–2274.
- Lionaki, S., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2007). Anti-neutrophil cytoplasmic (ANCA) and anti-glomerular basement membrane (GBM) autoantibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *Semin. Immunopathol.* 29, 459–474.
- Little, M. a, Smyth, C.L., Yadav, R., Ambrose, L., Cook, H.T., Nourshargh, S., and Pusey, C.D. (2005). Antineutrophil cytoplasm antibodies directed against myeloperoxidase augment leukocyte-microvascular interactions in vivo. *Blood* 106, 2050–2058.
- Lote, H., Mannion, E., Cook, T., Cairns, T., and Savage, P. (2013). Adenocarcinoma of the seminal vesicles complicated by antineutrophil cytoplasmic antibody vasculitis: a case report and review of the literature. *J. Med. Case Rep.* 7, 59.
- Manthey, H.D., Woodruff, T.M., Taylor, S.M., and Monk, P.N. (2009). Complement component 5a (C5a). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2114–2117.
- Mazo, I.B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R.P., Koni, P.A., et al. (2005). Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity* 22, 259–270.
- McCain, W. (1970). Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids. *J Chem Phys* 55, 2789– 2796.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C.M., Beck, P.L., Muruve, D.A., and Kubes, P. (2010). Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 330, 362–366.
- McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2012). Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Capture Bacteria from the Bloodstream during Sepsis. *Cell Host Microbe* 12, 324–333.
- Medicus, R.G., Götze, O., and Müller-Eberhard, H.J. (1976). Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J. Exp. Med.* 144, 1076–1093.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154–159.

- Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2002). Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296, 1869–1873.
- Minsky, M. (1961). US Patent 3013467.
- Minsky, M. (1988). Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning* 10, 128–138.
- Mizuno, M. (2006). A review of current knowledge of the complement system and the therapeutic opportunities in inflammatory arthritis. *Curr. Med. Chem.* 13, 1707–1717.
- Muller, W.A. (2003). Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24, 326–333.
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). *Janeway’s Immunobiology* (Garland Science).
- Nachman, P., and Hogan, S. (1996). Treatment response and relapse in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis. *J. Am. ...* 7, 33–39.
- Nava, R.G., Li, W., Gelman, A.E., Krupnick, A.S., Miller, M.J., and Kreisel, D. (2010). Two-photon microscopy in pulmonary research. *Semin. Immunopathol.* 32, 297–304.
- Niles, J. (2011). Rituximab in induction therapy for anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 164 Suppl , 27–30.
- Ohno, M., Hirata, T., Enomoto, M., Araki, T., Ishimaru, H., and Takahashi, T.A. (2000). A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol. Immunol.* 37, 407–412.
- Okinaga, S., Slattery, D., Humbles, A., Zsengeller, Z., Morteau, O., Kinrade, M.B., Brodbeck, R.M., Krause, J.E., Choe, H.-R., Gerard, N.P., et al. (2003). C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry* 42, 9406–9415.
- Ooi, J.D., Chang, J., Hickey, M.J., Borza, D.-B., Fugger, L., Holdsworth, S.R., and Kitching, A.R. (2012). The immunodominant myeloperoxidase T-cell epitope induces local cell-mediated injury in antimyeloperoxidase glomerulonephritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2615–24.
- Parker, C. (2009). Eculizumab for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 373, 759–767.
- Pasinetti, G.M., Johnson, S.A., Rozovsky, I., Lampert-Etchells, M., Morgan, D.G., Gordon, M.N., Morgan, T.E., Willoughby, D., and Finch, C.E. (1992). Complement C1qB and C4 mRNAs responses to lesioning in rat brain. *Exp. Neurol.* 118, 117–125.
- Pedersen, E.D., Waje-Andreassen, U., Vedeler, C.A., Aamodt, G., and Mollnes, T.E. (2004). Systemic complement activation following human acute ischaemic stroke. *Clin. Exp. Immunol.* 137, 117–122.
- Pendergraft, W.F., Preston, G.A., Shah, R.R., Tropsha, A., Carter, C.W., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2004). Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat. Med.* 10, 72–79.

- Peti-Peterdi, J., Burford, J.L., and Hackl, M.J. (2012). The first decade of using multiphoton microscopy for high-power kidney imaging. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **302**, F227–33.
- Pettersson, E.E., Sundelin, B., and Heigl, Z. (1995). Incidence and outcome of pauci-immune necrotizing and crescentic glomerulonephritis in adults. *Clin. Nephrol.* **43**, 141–149.
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., and Kubes, P. (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* **203**, 2569–2575.
- Popa, E.R., Stegeman, C.A., Kallenberg, C.G.M., and Tervaert, J.W.C. (2002). *Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res.* **4**, 77–79.
- Potter, S.M., Wang, C.M., Garrity, P.A., and Fraser, S.E. (1996). Intravital imaging of green fluorescent protein using two-photon laser-scanning microscopy. *Gene* **173**, 25–31.
- Pusey, C.D., Rees, A.J., Evans, D.J., Peters, D.K., and Lockwood, C.M. (1991). Plasma exchange in focal necrotizing glomerulonephritis without anti-GBM antibodies. *Kidney Int.* **40**, 757–763.
- Radice, A., and Sinico, R. (2005). Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity* **38**, 93–103.
- Ramidi, G.B., Kurukumbi, M.K., and Sealy, P.L. (2011). Collapsing glomerulopathy in sickle cell disease: a case report. *J. Med. Case Rep.* **5**, 71.
- Rarok, A.A., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (2003). Neutrophil-activating potential of antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 3–15.
- Reff, M., Carner, K., Chambers, K., Chinn, P., Leonard, J., Raab, R., Newman, R., Hanna, N., and Anderson, D. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**, 435–445.
- Renz-Polster, H., and Krautzig, S. (2008). *Basislehrbuch Innere Medizin*.
- Reumaux, D., Vossebeld, P.J., Roos, D., and Verhoeven, a J. (1995). Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* **86**, 3189–3195.
- Riedemann, N.C., Guo, R.-F., Laudes, I.J., Keller, K., Sarma, V.J., Padgaonkar, V., Zetoune, F.S., and Ward, P.A. (2002). C5a receptor and thymocyte apoptosis in sepsis. *FASEB J.* **16**, 887–888.
- Riedemann, N.C., Guo, R.-F., and Ward, P.A. (2003). Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* **9**, 517–524.
- Rothe, G., and Valet, G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leukoc. Biol.* **47**, 440–448.
- Rother, R.P., Rollins, S.A., Mojcik, C.F., Brodsky, R.A., and Bell, L. (2007). Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1256–1264.

- Rus, H., Cudrici, C., David, S., and Niculescu, F. (2006). The complement system in central nervous system diseases. *Autoimmunity* 39, 395–402.
- Sanders, J.-S.F., Huitma, M.G., Kallenberg, C.G.M., and Stegeman, C. a (2006). Prediction of relapses in PR3-ANCA-associated vasculitis by assessing responses of ANCA titres to treatment. *Rheumatology (Oxford)*. 45, 724–729.
- Savage, C.O., Winearls, C.G., Evans, D.J., Rees, A.J., and Lockwood, C.M. (1985). Microscopic polyarteritis: presentation, pathology and prognosis. *Q. J. Med.* 56, 467–483.
- Schäfer, M.K., Schwaeble, W.J., Post, C., Salvati, P., Calabresi, M., Sim, R.B., Petry, F., Loos, M., and Weihe, E. (2000). Complement C1q is dramatically up-regulated in brain microglia in response to transient global cerebral ischemia. *J. Immunol.* 164, 5446–5452.
- Schreiber, A., Xiao, H., Jennette, J.C., Schneider, W., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2009). C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 289–298.
- Shingu, M., Nonaka, S., Nishimukai, H., Nobunaga, M., Kitamura, H., and Tomo-Oka, K. (1992). Activation of complement in normal serum by hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-related oxygen radicals produced by activated neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.* 90, 72–78.
- Shushakova, N., Skokowa, J., Schulman, J., Baumann, U., Zwirner, J., Schmidt, R.E., and Gessner, J.E. (2002). C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR in immune complex-induced lung disease. *J. Clin. Invest.* 110, 1823–1830.
- Sigma-Aldrich (2012). TiterMax Gold Adjuvans data sheet.
- Sinico, R.A., Toma, L. Di, Maggiore, U., Tosoni, C., Bottero, P., Sabadini, E., Giammarresi, G., Tumati, B., Gregorini, G., Pesci, A., et al. (2006). Renal Involvement in Churg-Strauss Syndrome. *Am. J. Kidney Dis.* 47, 770–779.
- Spring, K.R. (2003). Fluorescence Microscopy. In *Encyclopedia of Optical Engineering*, (New York: Marcel Dekker), pp. 548–555.
- Sprong, T., Brandtzaeg, P., Fung, M., Pharo, A.M., Høiby, E.A., Michaelsen, T.E., Aase, A., van der Meer, J.W.M., van Deuren, M., and Mollnes, T.E. (2003). Inhibition of C5a-induced inflammation with preserved C5b-9-mediated bactericidal activity in a human whole blood model of meningococcal sepsis. *Blood* 102, 3702–3710.
- Stegeman, C.A., Tervaert, J.W., Sluiter, W.J., Manson, W.L., de Jong, P.E., and Kallenberg, C.G. (1994). Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* 120, 12–17.
- Stegeman, C.A., Tervaert, J.W., de Jong, P.E., and Kallenberg, C.G. (1996). Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group. *N. Engl. J. Med.* 335, 16–20.
- Steinhausen, M., Snoei, H., Parekh, N., Baker, R., and Johnson, P.C. (1983). Hydronephrosis: a new method to visualize vas afferens, efferens, and glomerular network. *Kidney Int.* 23, 794–806.

- Stone, J.H., Merkel, P. a, Spiera, R., Seo, P., Langford, C. a, Hoffman, G.S., Kallenberg, C.G.M., St Clair, E.W., Turkiewicz, A., Tchao, N.K., et al. (2010). Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N. Engl. J. Med.* *363*, 221–232.
- Stoney, P.J., Davies, W., Ho, S.F., Paterson, I.C., and Griffith, I.P. (1991). Wegener's granulomatosis in two siblings: a family study. *J. Laryngol. Otol.* *105*, 123–124.
- Tang, T., Rosenkranz, A., Assmann, K.J., Goodman, M.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Carroll, M.C., Cotran, R.S., and Mayadas, T.N. (1997). A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fcγ receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* *186*, 1853–1863.
- Tervaert, J.W.C., Woude, F.J. Van Der, Fauci, A.S., Ambrus, J.L., Velosa, J., Keane, W.F., and Meijer, S. (1989). Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch. Intern.*
- Van Timmeren, M.M., Chen, M., and Heeringa, P. (2009). Review article: Pathogenic role of complement activation in anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibody-associated vasculitis. *Nephrology (Carlton)*. *14*, 16–25.
- Tipping, P.G., Huang, X.R., Berndt, M.C., and Holdsworth, S.R. (1994). A role for P selectin in complement-independent neutrophil-mediated glomerular injury. *Kidney Int.* *46*, 79–88.
- Väkevä, A., Morgan, B.P., Tikkanen, I., Helin, K., Laurila, P., and Meri, S. (1994). Time course of complement activation and inhibitor expression after ischemic injury of rat myocardium. *Am. J. Pathol.* *144*, 1357–1368.
- Valtieri, M., Tweardy, D.J., Caracciolo, D., Johnson, K., Mavilio, F., Altmann, S., Santoli, D., and Rovera, G. (1987). Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J. Immunol.* *138*, 3829–3835.
- Venge, P., and Olsson, I. (1975). Cationic proteins of human granulocytes. VI. Effects on the complement system and mediation of chemotactic activity. *J. Immunol.* *115*, 1505–1508.
- Vogel, C.W., and Müller-Eberhard, H.J. (1982). The cobra venom factor-dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. *J. Biol. Chem.* *257*, 8292–8299.
- Vogel, C.W., Bredehorst, R., Fritzinger, D.C., Grunwald, T., Ziegelmüller, P., and Kock, M.A. (1996). Structure and function of cobra venom factor, the complement-activating protein in cobra venom. *Adv. Exp. Med. Biol.* *391*, 97–114.
- Vogt, W. (1996). Complement activation by myeloperoxidase products released from stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Immunobiology* *195*, 334–346.
- Vogt, W., Dieminger, L., Lynen, R., and Schmidt, G. (1974). Alternative pathway for the activation of complement in human serum. Formation and composition of the complex with cobra venom factor that cleaves the third component of complement. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* *355*, 171–183.

- Wagner, E., and Frank, M.M. (2010). Therapeutic potential of complement modulation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 43–56.
- Waksman, B. (1979). Adjuvants and immune regulation by lymphoid cells. *Springer Semin. Immunopathol.* 2, 5–33.
- Wang, Y., Rollins, S. a, Madri, J. a, and Matis, L. a (1995). Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8955–8959.
- Wang, Y., Hu, Q., Madri, J.A., Rollins, S.A., Chodera, A., and Matis, L.A. (1996). Amelioration of lupus-like autoimmune disease in NZB/WF1 mice after treatment with a blocking monoclonal antibody specific for complement component C5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8563–8568.
- Weidanz, F., Day, C.J., Hewins, P., Savage, C.O., and Harper, L. (2007). Recurrences and infections during continuous immunosuppressive therapy after beginning dialysis in ANCA-associated vasculitis. *Am. J. Kidney Dis.* 50, 36–46.
- Weigle, W. (1964). IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES OF HEMOCYANIN. *Immunochemistry* 1, 295–302.
- Wieslander, J., and Wiik, A. (1994). ANCA antigens: Proteinase 3. In *Manual of Biological Markers of Disease.*, W. Van Venrooy, and R. Maine, eds. (Dordrecht: Kluwer Academy), pp. 1–9.
- Woodworth, T.G., Abuelo, J.G., Austin, H.A., and Esparza, A. (1987). Severe glomerulonephritis with late emergence of classic Wegener's granulomatosis. Report of 4 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 66, 181–191.
- Van der Woude, F.J., Rasmussen, N., Lobatto, S., Wiik, A., Permin, H., van Es, L.A., van der Giessen, M., van der Hem, G.K., and The, T.H. (1985). Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1, 425–429.
- Xiao, H., Heeringa, P., Hu, P., and Liu, Z. (2002). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J. Clin. ...* 110, 955–963.
- Xiao, H., Heeringa, P., Liu, Z., Huugen, D., Hu, P., Maeda, N., Falk, R.J., and Jennette, J.C. (2005). The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am. J. Pathol.* 167, 39–45.
- Xiao, H., Schreiber, A., Heeringa, P., Falk, R.J., and Jennette, J.C. (2007). Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am. J. Pathol.* 170, 52–64.
- Xing, G., Chen, M., Liu, G., Heeringa, P., Zhang, J., Zheng, X., E, J., Kallenberg, C.G.M., and Zhao, M. (2009). Complement activation is involved in renal damage in human antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated pauci-immune vasculitis. *J. Clin. Immunol.* 29, 282–291.

- Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N. V, Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* *18*, 1386–1393.
- Younger, J.G., Sasaki, N., Delgado, J., Ko, A.C., Nghiem, T.X., Waite, M.D., Till, G.O., and Ward, P.A. (2001). Systemic and lung physiological changes in rats after intravascular activation of complement. *J. Appl. Physiol.* *90*, 2289–2295.
- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., and Simon, H.U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* *16*, 1438–1444.
- Yuan, J., Gou, S.-J., Huang, J., Hao, J., Chen, M., and Zhao, M.-H. (2012). C5a and its receptors in human anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R140.
- Von Zabern, I., Hinsch, B., Przyklenk, H., Schmidt, G., and Vogt, W. (1980). Comparison of *Naja n. naja* and *Naja h. haje* cobra-venom factors: correlation between binding affinity for the fifth component of complement and mediation of its cleavage. *Immunobiology* *157*, 499–514.
- Zhao, H., Joseph, J., Fales, H.M., Sokoloski, E.A., Levine, R.L., Vasquez-Vivar, J., and Kalyanaraman, B. (2005). Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 5727–5732.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Histologischer Vergleich eines physiologischen Glomerulus und eines bogenförmig veränderten Glomerulus im Rahmen einer RPGN modifiziert nach: Linke Abbildung (a): Fig. 1 aus (Ramidi et al., 2011), Rechte Abbildung (b): Fig. 2 aus (Lote et al., 2013)	Seite 2
Abb. 2:	Pathogenese der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis eigene Kreation mit Adobe Photoshop 5.1, verändert nach (Falk and Jennette, 2010; Xiao et al., 2007)	9
Abb. 3:	Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1, verändert nach (Conchello and Lichtman, 2005)	23
Abb. 4:	Ein- und Zweiphotonenanregung dargestellt im Jabolski Diagramm Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1, verändert nach (Dunn and Young, 2006a)).	24
Abb. 5:	Anregungsparadigma der Fluorophore durch Ein- und Zweiphotonenanregung Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1, verändert nach (Dunn and Young, 2006b)	26
Abb. 6:	Rasterartige Abtastung der xy-Ebene in der konfokalen Mikroskopie Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1	27
Abb. 7:	Funktionprinzip der konfokalen Mikroskopie mittels Lochblende Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1, verändert nach (Conchello and Lichtman, 2005)	28
Abb. 8:	Anti-MPO-ELISA der gewonnenen Mausseren Eigene Kreation mit GraphPad Prism 6 auf Grundlage eigenständig erhobener Daten	39
Abb. 9:	UUO-Prozedur Eigene Aufnahmen	43
Abb. 10:	Hydronephrotische Niere zwölf Wochen nach UUO-Prozedur Eigene Aufnahmen	43
Abb. 11:	Katheterisierung der Halsvene Eigene Aufnahmen	45
Abb. 12:	Präparation der Niere Eigene Aufnahmen	47
Abb. 13:	Präparierte Maus auf dem Objektisch des SP5 Mikroskops Eigene Aufnahmen	48
Abb. 14:	Benutzeroberfläche von LAS AF Eigener Screenshot der Benutzeroberfläche von LAS AF	49
Abb. 15-18:	Verschieden Analyseansichten in Imaris Eigene Screenshots der Software <i>Imaris</i> , tlw. eigenständig modifiziert mit Adobe PS 5	51-53
Abb. 19:	Funktionsprinzip des murinen C3-ELISA Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1	54
Abb. 20:	Neutrophiler Granulozyt vom statischen Phänotyp Eigene Aufnahmen mit <i>Imaris</i> , modifiziert mit Adobe PS 5.1	57

Abb. 21:	Neutrophiler Granulozyt vom migrierenden Phänotyp Eigene Aufnahmen mit <i>Imaris</i> , modifiziert mit Adobe PS 5.1	Seite 58
Abb. 22:	Injektionsschema Versuch 3.2 Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1	61
Abb. 23:	Anti-MPO-Antikörper führen in C57BL6/J Mäusen zu einer gesteigerten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus Eigene Kreation mit <i>Prism 6</i> auf Grundlage eigener Daten, zusammengestellt mit Adobe PS 5.1	62
Abb. 24:	Anti-MPO-Antikörper führen in LysM-EGFP-Mäusen zu einer gesteigerten Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im Glomerulus Eigene Kreation mit <i>Prism 6</i> auf Grundlage eigener Daten (a-d), eigene Aufnahmen mit <i>Imaris</i> (e), zusammengestellt mit Adobe PS 5.1	64
Abb. 25:	Vergleich der Gesamtanzahl analysierter neutrophiler Granulozyten Eigene Kreation mit <i>Prism 6</i> auf Grundlage eigener Daten	66
Abb. 26:	Injektionsschema Versuch 3.4 Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1	68
Abb. 27:	Die Depletion des Komplementsystems mittels CVF führt im anti-MPO-GN Model zu einer Reduktion der, durch anti-MPO-AK hervorgerufenen, gesteigerten Verweildauer Eigene Kreation mit <i>Prism 6</i> auf Grundlage eigener Daten, zusammengestellt mit Adobe PS 5.1	70
Abb. 28:	Auswertung C3-ELISA Eigene Kreation mit <i>Prism 6</i> auf Grundlage eigener Daten, zusammengestellt mit Adobe PS 5.1	71
Abb. 29:	Injektionsschema Versuch 3.5 Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1	73
Abb. 30:	Die anti-MPO-induzierte Steigerung der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten im murinen Nierenglomerulus ist C5aR abhängig Eigene Kreation mit <i>Prism 6</i> auf Grundlage eigener Daten (a-d), eigene Aufnahmen mit <i>Imaris</i> (e und f), zusammengestellt mit Adobe PS 5.1	74
Abb. 31:	Injektionsschema Versuch 3.6 Eigene Kreation mit Adobe PS 5.1	77
Abb. 32:	Anti-MPO-Antikörper führen zu Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten Eigene Kreation mit <i>Prism 6</i> auf Grundlage eigener Daten (d-g), eigene Aufnahmen mit <i>Imaris</i> (a-c), zusammengestellt mit Adobe PS 5.1	78
Abb. 33:	Übergang eines DHE⁻ <i>crawling neutrophil</i> zu einer DHE⁺ Zelle mit stetiger Zunahme des DHE Signals eines über einen Zeitraum von 180 Sekunden Eigene Aufnahmen mit <i>Imaris</i> , modifiziert mit Adobe PS 5.1	79
Abb. 34:	Vergleich der Verweildauer von neutrophilen Granulozyten während der ersten bzw. zweiten Stunde nach Injektion der anti-MPO-AK Eigene Kreation mit <i>Prism 6</i> auf Grundlage eigener Daten	81

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen, Direktor des Instituts für Biochemie und Molekulare Zellbiologie für die hervorragende Betreuung meiner Dissertation. In seiner Funktion als mein Doktorvater ermöglichte er mir die Durchführung eines großen Teils meiner Dissertation am Center For Inflammatory Diseases des Monash Medical Center in Melbourne (Australien) und unterstütze mich stets mit Anregungen und Hilfe bei aufkommenden Fragen.

Des Weiteren spreche ich A/Prof. Michael Hickey für die exzellente Integrierung in seine Arbeitsgruppe in Melbourne sowie für die immerwährende Unterstützung bei der Planung und Durchführung meiner Experimente einen besonderen Dank aus.

Weiterhin bedanke ich mich beim Team der AG Hickey und dem gesamten Team des Center For Inflammatory Diseases in Melbourne für die überaus freundliche Hilfestellung bei jedweder Problematik. Namentlich zu erwähnen sind an dieser Stelle Clare Westhorpe, Pam Hall, Anqi Li, Zachary Chow, Latasha Abeynaike, Colin Cheng und Camden Lo.

Mein Dank gilt darüber hinaus dem gesamten Team des Instituts für Biochemie und Molekulare Zellbiologie sowie der AG Peter Boor der Medizinischen Klinik II für Ihre Unterstützungen und Hilfestellungen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen beiden Brüdern für ihre Hilfe und Geduld in der zurückliegenden Zeit von Herzen.

Erklärung zur Datenaufbewahrung (§5 Abs.1)

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, Sven Loosen, Am Taubenschlag 31, 41352 Korschenbroich, hinterlegt sind.

Erklärung über den Eigenanteil

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Herr Sven Loosen** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Intravitale Beurteilung des Verhaltens von neutrophilen Granulozyten innerhalb des murinen Nierenglomerulus im Rahmen der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis unter besonderer Berücksichtigung der pathophysiologischen Rolle des Komplementsystems“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Durchführung sämtlicher dargestellter Experimente, sowie deren statistische Auswertung. Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

- A. A/Prof. Michael Hickey: Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente
- B. Clare Westhorpe: Einarbeitung in die Methodik der intravitale Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie von murinen Nierenglomeruli
- C. Pam Hall: Einarbeitung in die Methodik der intravitale Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie von murinen Nierenglomeruli und der UUO-Prozedur, Blutentnahme im Rahmen der Generierung von anti-MPO-Antikörper
- D. Laborteam Australien: Unterstützung bei der Generierung von anti-MPO-Antikörper; insbesondere bei der Herstellung und Aufreinigung des MPO-Peptids und der Aufreinigung der anti-MPO AK
- E. Camden Lo: Technische Unterstützung des SP5 Multiphotonenmikroskops
- F. Prof. Dr. Jürgen Bernhagen: Betreuung, Koordination und Korrektur der Dissertation

Sven Loosen

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Herrn Sven Loosen

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Sven Loosen
Anschrift: Am Taubenschlag 31,
41352 Korschenbroich
Telefon: +49 - 178 - 412 513 9
E-Mail: Sven.Loosen@googlemail.com
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum und -ort: 18. Mai 1988, Düsseldorf

Familienstand: ledig
Eltern: Dr. Klaus Loosen
Dr. Karin Loosen, geb. Streit

Universitärer und schulischer Werdegang

1994 - 1998 Katholische Grundschule Pesch, Korschenbroich
1998 - 2007 Gymnasium Korschenbroich
Juni 2007 Abitur (Note: 1,3)
2008 - 2014 Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
(1. ÄP: sehr gut, 2. ÄP: sehr gut)
Seit Januar 2012 Promotion am Institut für Zellbiologie und Molekulare
Zellbiologie der Uniklinik RWTH Aachen bei
Univ.-Prof. Dr. Jürgen Bernhagen

Stipendien und Auszeichnungen

Seit Februar 2009 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes
Okt 2010 – Sep 2012 Stipendiat der Gertraude-Holste-Stiftung
August 2013 Auslandsstipendium von *medizinernachwuchs.de*
April – Juli 2014 PJ-Stipendium der KV Nordrhein
April 2013, 2014 Kongressstipendien der DGIM und DGCH
Seit WS 2009 Mitglied der *Dean's List* der Medizinischen Fakultät zur
besonderen Förderung der 3% Jahrgangsbesten
2014 Zertifikat „Molekulare Medizin“ der RWTH Aachen

Publikationen

- 2013 *Loosen S, Preuss S, Zelle BA, Pape HC, Tarkin: Multimorbid patients with poor soft tissue conditions: Treatment of distal tibia fractures with retrograde intramedullary nailing; Unfallchirurg. 2013*

Fachbezogene Tätigkeiten und Auslandsaufenthalte

- Aug 2007 – Jun 2008 Zivildienst im Pflegebereich der Medizinischen Klinik II – Gastroenterologie der Städtischen Kliniken Neuss
- August 2009 Sommerakademie der SDV, Thema: Diabetes mellitus
- September 2010 Famulatur im Bereich der Kardiologie des AKH Wiens, Wien, Österreich (Univ.-Prof. Dr. Gerald Maurer)
- Feb – Apr 2011 Famulatur im Bereich der Orthopädie/Unfallchirurgie des *University of Pittsburgh Medical Centers*, Pittsburgh, USA (Freddie H. Fu, M.D.)
- Apr – Okt 2012 Forschungsaufenthalt am *Centre for inflammatory diseases* der *Monash University*, Melbourne, Victoria, Australien (Prof. Stephen Holdsworth)
- Seit Oktober 2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Forschungsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Tom Lüdde in der Medizinischen Klinik III des UKA (Univ.-Prof. Dr. med. Christian Trautwein)
- April 2013 FELASA B - Kurs am Institut für Versuchstierkunde, RWTH Aachen
- Aug 2013 - Jul 2014 Praktisches Jahr mit Aufhalten am *The Heart Hospital* (University College of London, UK), dem Luzerner Kantonsspital (Schweiz) und der Uniklinik RWTH Aachen

Sonstige Erfahrungen

Musikalische Ausbildung:


- 1994 – 2008 Einzelunterricht Violine, Orchester, Streicherensemble
- 2004 – 2006 Einzelunterricht Schlagzeug
- Seit 2008 Mitglied im Hochschulorchester der RWTH Aachen

Sportliche Aktivität:

2002 – 2008	Leichtathletiktraining (Zehnkampf und Stabhochsprung)
2005 – 2007	Trainer verschiedener Leichtathletik-Nachwuchsgruppen (A-Trainer)
Seit 2007	Ehrenamtliche Jugendarbeit im Korschenbroicher LC
Seit 2009	Volleyballtraining (Hochschulsport RWTH Aachen); Lauftraining
Seit 2012	Mitglied im Uniklinik RWTH Aachen Laufteam

Schülerwettbewerbe:

2002 – 2005	Jugend Forscht, fünfmalige Teilnahme am Landeswettbewerb, Bundeswettbewerbsteilnahme 2005
2006 – 2007	Mathematik- und Biologieolympiade
1997 – 2006	Messdiener und Messdienerausbildung in der Pfarrgemeinde Korschenbroich-Pesch


Aachen, den 04.12.2014