

Aus der
Poliklinik für Rheumatologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. W.L. Gross

**Das Immunglobulin-Schwerkettenrepertoire
in granulomatösen Geweben
bei der
Wegenerschen Granulomatose**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Jan Andreas Krämer
aus Brühl

Lübeck 2007

1. Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Angela Gause

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Hasib Djonlagic

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2008

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den 28.05.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Wegenersche Granulomatose	1
1.2 Anti-Neutrophilen cytoplasmatische Antikörper (ANCA)	5
1.3 Die Immunglobulinvielfalt	8
2 Fragestellung	13
3 Material	14
3.1 Geräte	14
3.2 Verbrauchsmaterialien	14
3.3 Reagenzien, Lösungen, Enzyme, Primer	15
3.4 Materialien in den Kits	16
4 Methoden	17
4.1 Immunhistochemische Färbung für CD20	17
4.2 Entparaffinierung und Proteinase K-Verdau	18
4.3 DNA-Aufreinigung	19
4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	19
4.5 PCR	19
4.5.1 VH-spezifische seminested PCR	19
4.5.2 Reaktionsansätze	20
4.5.3 Verwendete Primer	21
4.5.4 Standard PCR-Bedingungen	21
4.6 Agarose-Gelelektrophorese	22
4.7 Reinigung der PCR-Produkte	23
4.8 DNA-Klonierung	23
4.8.1 Ligation	24
4.8.2 Transformation	24
4.8.3 Replikation in <i>E. coli</i>	24
4.8.4 Plasmidisolierung	24
4.9 Restriktionsenzym-Verdau	25
4.10 Sequenzierung	25
4.11 Auswertung und Statistik	26
5 Patienten	27
5.1 Übersicht	27
5.2 Patient 1 (gWG1)	28

5.3 Patient 2 (gWG2)	28
5.4 Patient 3 (IWG3)	29
5.5 Patient 4 (IWG4)	29
6 Ergebnisse	30
6.1 Immunhistochemische Färbung für CD20	30
6.2 Konzentrationsbestimmung von DNA	32
6.3 VH-spezifische PCR	32
6.4 DNA-Klonierung	35
6.5 VH-Gen Charakterisierung	36
6.6 VH-Gen Charakterisierung von Patient 1 (gWG1)	38
6.7 VH-Gen Charakterisierung von Patient 2 (gWG2)	40
6.8 VH-Gen Charakterisierung von Patient 3 (IWG3)	42
6.9 VH-Gen Charakterisierung von Patient 4 (IWG4)	43
7 Diskussion	45
8 Zusammenfassung	55
9 Literaturverzeichnis	56
10 Anhang	66
11 Verzeichnis eigener Veröffentlichungen	78
12 Danksagung	80
13 Lebenslauf	81

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
a.d.	destilliertes Wasser
AK	Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophilen cytoplasmatische Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region
DEI	Disease Extent Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-Segment	diversity segment
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
ELK	E=Ear, Nose and Throat, L=Lung, K=Kidney
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
Fc	fragment crystallizable
fm	femtomolar
FR	Rahmenregion
HCl	Salzsäure
H-Kette	schwere Kette
HNO	Hals, Nasen, Ohren
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. v.	intravenös
J-Segment	joining segment

kb	kilo Basen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
L-Kette	leichte Kette
M	molar
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTX	Methotrexat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNH	Nasennebenhöhle
N-Nukleotid	nontemplate Nukleotid
PCR	polymerase chain reaction
pH	-logarithmus [H ₃ O ⁺]
PNS	peripheres Nervensystem
P-Nukleotid	palindrome Nukleotid
PR3	Proteinase 3
RA	Rheumatoide Arthritis
R:S	replacement : silent
sec.	Sekunde
SED	staphylococcal enterotoxin D
sog.	so genannt
SpA	staphylococcal protein A

Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TdT	Desoxynucleotidyltransferase
Temp.	Temperatur
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VH	variable heavychain
WG (gWG, IWG)	Wegenersche Granulomatose (generalisiert, lokalisiert)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter
μ g	Mikrogramm

1 Einleitung

1.1 Die Wegenersche Granulomatose

Die Wegenersche Granulomatose (WG) gehört zu den primären systemischen Vaskulitiden. Sie wurde erstmals 1936 von dem Lübecker Pathologen Friedrich Wegener beschrieben (Wegener, 1936, 1939). Kennzeichnend für die WG sind eine nekrotisierende, granulomatöse Entzündung des Respirationstraktes und eine nekrotisierende Vaskulitis vor allem der kleinen Gefäße (Jennette et al., 1994). Typischer Weise ist die WG eine biphasische Erkrankung und beginnt mit einer granulomatösen Entzündung des Respirationstraktes (lokalisierte WG, lWG), ehe sie nach einer variablen Zeitspanne in eine mit Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) assoziierte systemische Vaskulitis mit potentiell organschädigenden und vitalbedrohlichen Manifestationen konvertiert (generalisierte WG, gWG). In einigen Fällen bleibt die Generalisierung aus und die Erkrankung bleibt als granulomatöse Entzündung auf den Respirationstrakt beschränkt.

Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz der WG variiert regional. Sie beträgt in Deutschland ca. 10 pro 1 Million Einwohner, in England 19.8 pro 1 Million Einwohner und in den USA 8.5 pro 1 Million Einwohner (Gross, 2000; Reinhold-Keller et al., 2005). Auch die Prävalenz der WG variiert und liegt in Deutschland bei 50 pro 1 Million Einwohner und in den USA bei 30 pro 1 Million Einwohner. Die WG kann in jedem Alter auftreten, ist bei Jugendlichen jedoch sehr selten. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 40 und 50 Jahren, wobei Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen sind (Hoffman et al., 1992; Reinhold-Keller et al., 2000).

Klinik

Wie oben schon erwähnt unterscheidet man im Verlauf der Erkrankung zwei Stadien. Am Anfang steht das lokalisierte Stadium, das durch eine granulomatöse Entzündung im Respirationstrakt gekennzeichnet ist. Die typischen Symptome in diesem Stadium sind chronische, borkig-blutige Rhinitis mit Epistaxis, Nasenschleimhautulzerationen, Septumperforation, Sattelnasenbildung, Sinusitis und bei Lungenbeteiligung Hämoptysen, Dyspnoe und Pleuritis (Hoffman et al., 1992; Übersicht: Schmitt et al., 1997; Reinhold-Keller et al., 2000).

Nach einer variablen Zeitspanne folgt typischer Weise das generalisierte Stadium, das durch eine systemische Vaskulitis mit potentiell organschädigenden und vital-

bedrohlichen Manifestationen geprägt wird. Hier kann nahezu jedes Organsystem befallen werden. Besonders häufig findet man eine Nierenbeteiligung (ca. 60% der Fälle), des weiteren Episkleritis, Arthralgien, periphere Polyneuropathien und ZNS-Granulome (Hoffman et al., 1992; Reinhold-Keller et al., 2000). Das pulmorenale Syndrom beinhaltet eine rapid progressive Glomerulonephritis und Lungenblutungen und ist besonders gefürchtet. Zudem liegt häufig eine sog. B-Symptomatik vor, die mit Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust einhergeht. Auch Fälle von zentralem Diabetes insipidus wurden beschrieben (Czarnecki et al., 1995; Garovic et al., 2001); (zu weiteren Manifestationen siehe Tab. 19 im Anhang).

Diagnostik

Die Diagnostik der WG stützt sich hauptsächlich auf drei Pfeiler: die klinischen Symptome, die Biopsie und den serologischen Nachweis von ANCA. Die klinische Zuordnung verlangt dabei eine gezielte Anamnese und eine ausführliche körperliche Untersuchung insbesondere auch des HNO-Traktes. Eine histologische Sicherung sollte immer angestrebt werden, wobei Biopsien aus erkennbar pathologisch verändertem Material entnommen werden sollten (Übersicht: Gross, 1999). Auf die ANCA-Diagnostik wird in Kapitel 1.2 ausführlich eingegangen. Neben den drei Hauptpfeilern kommen weitere Laboruntersuchungen wie Akutphaseproteine und Harnuntersuchungen sowie bildgebende Verfahren wie konventionelles Röntgen und MRT zum Einsatz.

Bei der Sicherung der Diagnose können die Klassifikationskriterien des „American College of Rheumatism“ von 1990 (Tab. 17 im Anhang) helfen, sie sind jedoch nicht als einzige Diagnosekriterien zu betrachten, da sie nur die typischen Fälle erfassen (Übersicht: Gross, 1999). Eine Hilfe zur Erfassung von Stadium und Krankheitsaktivität bietet der Disease Extent Index (DEI), der auf der erweiterten „ELK-Klassifikation“ (E=Ear, Nose and Throat, L=Lung, K=Kidney) basiert (de Groot et al., 2001; siehe Tab. 19 im Anhang). Ferner existieren der BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score), der klinische Aspekte und Laborparameter berücksichtigt (Luqmani, 2002) und eine neue Klassifikation für ANCA-assoziierte Vaskulitiden für epidemiologische Studien (Watts et al., 2007).

Histopathologie

Unter einem Granulom versteht man eine chronisch persistierende, fokale Proliferation und Aggregation von Histiozyten und anderen an entzündlichen Prozessen beteiligten Leukozyten-Populationen (Chapel und Haeney, 1993). Es tritt als Gewebereaktion auf allergisch-infektiöse oder chronisch-entzündliche Prozesse auf und hat für bestimmte

Erkrankungen einen relativ charakteristischen histologischen Aufbau (James et al., 2000; Sneller et al., 2002).

Das Wegener-Granulom besteht im Wesentlichen aus einer Ansammlung von Makrophagen, den von diesen abstammenden Epitheloid- und Riesenzellen sowie aus einem umgebenden Wall aus aktivierten T-Lymphozyten und einigen B-Lymphozyten und Plasmazellen. Im lokalisierten Stadium können bei der WG die Granulome im Bindegewebe auch unabhängig von Gefäßen entstehen (Fienberg, 1981). Im generalisierten Stadium sind sie hingegen meist gefäßgebunden. Weiterhin typisch sind zentrale, landkartenartige Nekrosen und sog. Mikroabszesse (Travis et al., 1991; Bühling et al., 1995). Im Weiteren bilden sich um die Mikroabszesse palisadenartig angeordnete Histiocytenwälle, die für die WG pathognomonisch sind. Charakteristisch für die vaskulitischen Herde ist ferner, dass sich histopathologisch *in situ* keine oder nur sehr wenige Immunkomplexe in der Gefäßwand nachweisen lassen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von „pauci-immuner“ Vaskulitis.

Therapie

Die Therapie der WG erfolgt aktivitäts- und stadienadaptiert. So kann im lokalisierten Initialstadium mit einer peroralen Therapie mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol (Cotrimoxazol) bei ca. 60% der Patienten eine längerfristige Remission erzielt werden (Reinhold-Keller et al., 1996; Stegemann et al., 1996).

Im generalisierten Stadium wird immunsuppressiv behandelt. Dabei unterscheidet man die Induktionstherapie, die (Remissions-) Erhaltungstherapie und die Eskalationstherapie zur Behandlung therapieresistenter oder -refraktärer Fälle. Die Standardtherapie zur Remissionsinduktion bildet das sog. FAUCI-Schema (=NIH-Standard (National Institute of Health)), eine Kombinationstherapie aus peroralem Cyclophosphamid mit Glukokortikoiden (Fauci et al., 1983; Hoffman et al., 1992; Langford und Sneller, 2001; Übersicht: Gause et al., 2002). Hierdurch kann bei über 90% der Patienten eine Remission erreicht werden. Die Nebenwirkungen sind jedoch beträchtlich. Bei weniger aggressiven Verläufen ohne Nierenbeteiligung kann Methotrexat (MTX) eingesetzt werden (Reinhold-Keller et al., 2000). Nach erreichter Remission haben sich für die Erhaltungstherapie mehrere Medikamente bewährt. Neben MTX werden auch Azathioprin, Leflunomid und Mycophenolatmofetil eingesetzt (Übersicht: Gause et al., 2002). Die Gabe von hochdosierten Immunglobulinen i. v. wird bei refraktären Verläufen angewendet (Jayne et al., 2000). Weitere, zum Teil experimentelle, immunsuppressive Therapieverfahren sind die B-Zell-Depletion mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD20 (Specks et al.,

2001; Keogh et al., 2005), die anti-TNF- α -Therapie (Lamprecht et al., 2002a), die Therapie mittels Antithymozytenglobulin (Schmitt et al., 2004) und die Plasmaseparation (Iwatani et al., 2004; Nguyen et al., 2005).

Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie und Pathogenese der WG sind nach wie vor unklar. Es gab und gibt mehrere Erklärungsansätze. So wird unter anderem über genetische Risikofaktoren (Cotch et al., 1995; Huang et al., 2000), Silikonstaub-Exposition (Hogan et al., 2001; Beaudreuil et al., 2005) und Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (Elzouki et al., 1994) als Auslöser der WG diskutiert. Keine der Thesen konnte bisher jedoch bewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass eine Besiedelung der Nasenschleimhaut mit *Staphylokokkus aureus* bei WG-Patienten mit einer erhöhten Rezidivrate verbunden ist (Popa et al., 2002, 2003). Eine infektiöse Genese könnte also eine Rolle spielen.

Die tragende Rolle in der Pathogenese spielt das Immunsystem. So sind Anti-Neutrophilen cytoplasmatische Antikörper gegen das „Wegenersche Autoantigen“ Proteinase 3 (PR3), die sog. PR3-ANCA, für die generalisierte WG hochspezifisch (Nölle et al., 1989; Luedemann et al., 1990). Bei der WG wurden ferner sowohl ein Übergewicht an zytotoxischen T-Zellen vom TH1-Typ (Müller et al., 2000; Lamprecht et al., 2001; Müller et al., 2003), als auch eine Vermehrung der für die TH1-Reaktion wichtigen Zytokine wie z. B. TNF α beobachtet (Lamprecht et al., 2002b; Übersicht: Lamprecht, 2006). Auf diesen Ergebnissen fußt die These, dass es bei der WG initial im Rahmen einer Entzündungsreaktion unbekannter Genese in der Nasenschleimhaut, geprägt durch TH1-Zellen, Makrophagen und TNF α , zur Granulombildung kommt.

Der Entstehungsort der ANCA ist bis jetzt unbekannt. Ein wichtiger Schritt zum Verständnis der WG besteht in der Beantwortung der Frage, wo und weshalb die Selektion und Reifung von PR3-ANCA-produzierenden B-Zellen initiiert wird. In endonasalen Granulomen von Wegener-Patienten finden sich Konglomerate von Lymphozyten mit 30-50% B-Zell-Anteil und Plasmazellen sowie an Zelloberflächen exprimierte PR3 (Müller et al., 2000; Voswinkel et al., 2006). Das Granulom zeigt somit einige Charakteristika eines tertiären lymphatischen Organs. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob das Wegener-Granulom als Entstehungsort der PR3-ANCA in Frage kommt.

1.2 Anti-Neutrophilen cytoplasmatische Antikörper (ANCA)

Anti-Neutrophilen cytoplasmatische Antikörper (ANCA) sind Autoantikörper, die gegen zytoplasmatische Bestandteile polymorphkerniger Leukozyten und Monozyten gerichtet sind. Sie werden anhand ihres unterschiedlichen Fluoreszenzmusters im Immunfluoreszenztest in cANCA, pANCA und atypische ANCA unterteilt (Schultz et al., 1995).

Atypische ANCA finden sich bei einer Reihe von Erkrankungen, wie z. B. der Autoimmun-Hepatitis, bei systemischen Vaskulitiden werden sie nicht beobachtet. pANCA und cANCA lassen sich nicht nur anhand ihrer Fluoreszenzmuster, sondern auch anhand der verschiedenen Zielantigene in Subtypen unterteilen. pANCA haben ein perinukleäres (p) Fluoreszenzmuster. Ihr Zielantigen ist meist die Myeloperoxidase (MPO-ANCA). MPO-ANCA sind stark mit der mikroskopischen Polyangiitis assoziiert. Beim Churg-Strauss-Syndrom, einer weiteren ANCA-assoziierten Vaskulitis, finden sich sowohl pANCA, als auch cANCA (Seo et al., 2004). Das Fluoreszenzmuster der cANCA (classical ANCA) breitet sich diffus im Zytoplasma aus. Als Zielantigen der cANCA wurde vor 17 Jahren die Proteinase 3 (PR3) charakterisiert (Luedemann et al., 1990). PR3-ANCA sind für die WG hochspezifisch (Nölle et al., 1989; Luedemann et al., 1990). MPO-ANCA werden bei der WG nur sehr selten gefunden. PR3-ANCA wurden interessanterweise auch bei Patienten mit subakuter bakterieller Endokarditis gefunden (Choi et al., 2000).

Die Proteinase 3 (PR3)

Die PR3, ein Protein mit 29 kDa, ist eine Serinprotease, die in azurophilen Primärgranula humaner neutrophiler Granulozyten lokalisiert ist (van der Geld et al., 2001). Sie besitzt proteolytische Aktivität gegen Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Elastin, Laminin, Hämoglobin und Kollagen Typ IV und erlaubt so die Neutrophilen-Migration (Pezzato et al., 2003). Ferner kann sie Vorläuferformen von Zytokinen (TNF α , IL8) in eine aktive Form überführen (Robache-Gallea et al., 1995; Campbell et al., 2000). Die Funktion der PR3 wird durch den Serinprotease-Inhibitor Alpha-1-Antitrypsin reguliert (Dolman et al., 1992).

Bindung zwischen PR3 und ANCA

Mehrere Studien zeigten, dass die anti-PR3-Antikörperaffinität aus unterschiedlichen Proben gegen eine begrenzte Anzahl an linearen Epitopen gerichtet ist, die sich allesamt auf einem relativ kleinen Areal der PR3-Oberfläche befinden und in enger Nachbarschaft zum katalytischen Zentrum des Enzyms stehen (Williams et al., 1994; van der Geld et al.,

1999; Griffith et al., 2001). Die ANCA-Affinität zur PR3 wird dabei von Aminosäuren determiniert, die die PR3 von Serinproteasen ähnlicher Aminosäuresequenz (humane Leukozytenelastase, Cathepsin G) unterscheiden (Williams et al., 1994). Charakteristisch für die Antigenbindungsstellen der PR3 sind positiv geladene (basische) Aminosäuren an der Proteinoberfläche, die zu einer Erhöhung des isoelektrischen Punkts von dem aus der Aminosäuresequenz zu erwartenden Wert von 7.9 auf 9.5 in der Realität führen (Schultz et al., 1995). Es wird angenommen, dass negativ geladene (saure) Aminosäuren in den Antigenbindungsstellen der ANCA die Affinität zur positiv geladenen PR3 erhöhen können (Peen und Williams, 2000). Im sauren Milieu verliert die PR3 ihre antigene Wirkung, da diese an intakte Disulfidbrücken gebunden ist (Specks, 2000).

ANCA-Diagnostik

Der Nachweis von ANCA hat in der Diagnostik der WG einen großen Stellenwert. PR3-ANCA sind allerdings nur bei ca. 50% der Patienten mit lokalisierter Erkrankung nachweisbar, wohingegen ca. 95% der Patienten im generalisierten Stadium PR3-ANCA positiv sind (Nölle et al., 1989; Hagen et al., 1998). Als Screeningverfahren wird in der Diagnostik der Immunfluoreszenztest eingesetzt. ELISA haben sich zur Identifizierung der ANCA-Subtypen durchgesetzt. Hier werden biochemisch hochgereinigte Antigenpräparationen der ANCA-Zielantigene (z. B. PR3, MPO) eingesetzt (Übersicht: Gross, 1999). Diese Verfahren werden nicht nur für die Diagnosestellung, sondern auch zur Aktivitätsbestimmung und zur Therapiekontrolle eingesetzt. So sind hohe oder steigende ANCA-Titer häufig mit Rezidiven assoziiert (Boomsma et al., 2000; Han et al., 2003). Ferner sind ANCA im Stadium der kompletten Remission häufig nicht mehr nachzuweisen. Die ANCA-Diagnostik muss allerdings immer kritisch hinterfragt werden, da z. B. ein negativer ANCA-Test eine Immun-Vaskulitis nicht ausschließt und Patienten auch in Remission im Einzelfall hohe ANCA-Titer behalten können.

Pathogenetische Bedeutung

Die Korrelation zwischen ANCA-Titer und Krankheitsaktivität und Rezidivrate legt eine Beteiligung der ANCA am Pathomechanismus der WG nahe. Dennoch ist die pathogenetische Bedeutung der PR3-ANCA bei der WG noch nicht abschließend geklärt. In zahlreichen *in vitro* Studien wurden die Wirkungen von ANCA untersucht. So konnte gezeigt werden, dass durch Zytokine vorstimulierte neutrophile Granulozyten PR3 an ihrer Zelloberfläche exprimieren und durch ANCA aktiviert werden können. Dies führt zur vorzeitigen Degranulation der Neutrophilen und zur Freisetzung von endothelschädigenden Sauerstoffradikalen (Falk et al., 1990; Savage et al., 1992; Csernok

et al., 1994). Dabei korreliert eine hohe PR3-Membran-Expression mit Krankheitsaktivität und Rezidivrate (Muller Kobold et al., 1998; Schreiber et al., 2004). Zusätzlich stimulieren ANCA Neutrophile und Monozyten zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Muller Kobold et al., 1999) und unterstützen die Adhäsion und Migration von Neutrophilen am Endothel (Radford et al., 2001).

Auch *in vivo* konnten Hinweise auf die Pathogenität der ANCA gewonnen werden. MPO-ANCA induzieren im Tiermodell eine nekrotisierende Kleingefäßvaskulitis und Glomerulonephritis (Xiao et al., 2002). PR3-ANCA verstärken *in vivo* eine TNF α -induzierte Pannikulitis (Pfister et al., 2004). Die Pannikulitis ist allerdings kein Symptom der WG, so dass weitere Studien benötigt werden.

Indirekte Hinweise auf die Pathogenität der ANCA ergeben sich dadurch, dass bei Patienten, die auf die Standardbehandlung nicht ansprachen, durch die Entfernung der zirkulierenden PR3-ANCA mittels Plasmaseparation oder B-Zell-Depletion mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD20 Remissionen erreicht werden konnten (Iwatani et al., 2004; Keogh et al., 2005).

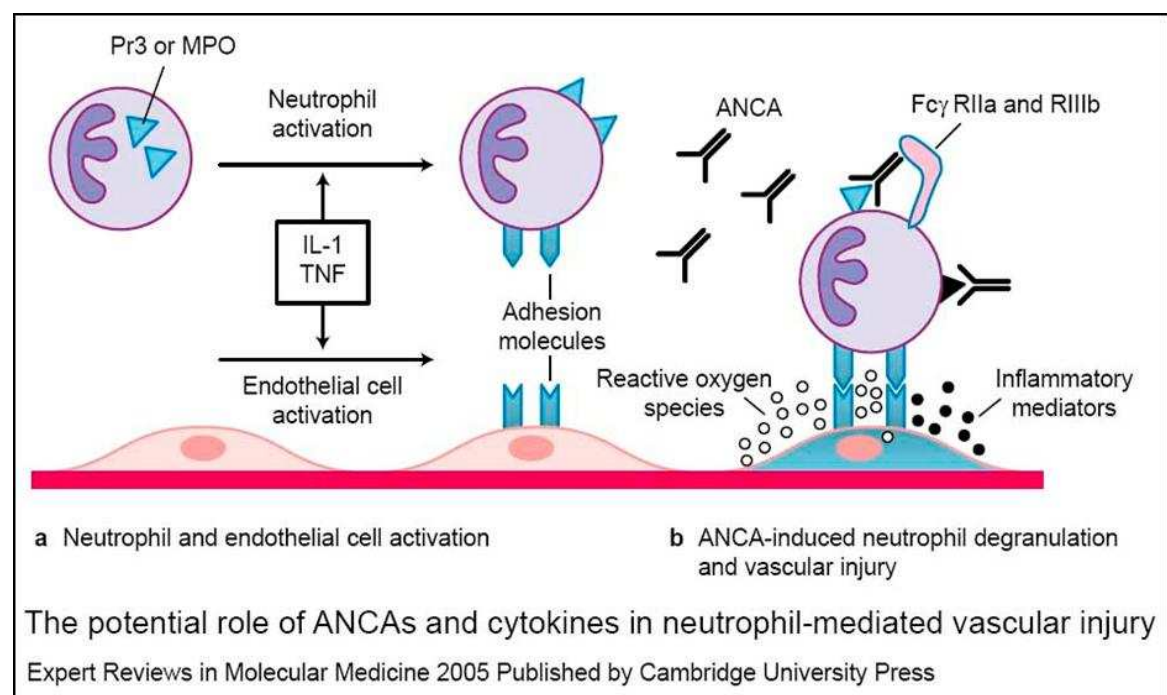


Abb. 1: Modell der ANCA-Zytokin-Sequenztheorie.

Darstellung der potentiellen Rolle der ANCA bei der Pathogenese der systemischen Vaskulitis (aus Sarraf und Sneller, 2005).

Die bisherigen Studienergebnisse wurden im folgenden hypothetischen Modell (ANCA-Zytokin-Sequenztheorie) zusammengeführt (siehe Abb. 1): *In vivo* ist das Zielantigen (da

intrazellulär) für zirkulierende Autoantikörper unter Normalbedingungen nicht zugänglich. Durch Apoptose oder Neutrophilen-Priming (Membranexpression und Freisetzung von PR3 bei Anwesenheit von Zytokinen (TNF α , IL1, IL8)) wird das Zielantigen zugänglich. Es folgt die Neutrophilen-Aktivierung über die Bindung der ANCA erstens an die PR3 und zweitens an den Fc-Rezeptor der Neutrophilen. Die Aktivierung führt zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen mit konsekutiver Gewebsschädigung. Gleichzeitig können Interferenzen zwischen ANCA und PR3 die Inaktivierung von PR3 durch Alpha-1-Antitrypsin blockieren. Lösliche PR3 wirkt proinflammatorisch durch Aktivierung der Vorläuferformen von Zytokinen (TNF α , IL8). Zusätzlich sezernieren PR3-exprimierende Monozyten in Anwesenheit von ANCA vermehrt IL8, welches als potenter chemotaktischer Faktor Neutrophile und T-Lymphozyten anlockt. Somit wird eine Kaskade entzündungsverstärkender Faktoren in Gang gesetzt, die sich eigenständig fortsetzt. Dieses Modell geht jedoch nicht darauf ein, wo und warum es zur Bildung hochaffiner, zirkulierender ANCA kommt.

1.3 Die Immunglobulinvielfalt

Immunglobuline (Ig) sind Glykoproteine. Sie werden von B-Zellen gebildet und fungieren als B-Zell-Rezeptor oder werden als Antikörper von B-Zellen bzw. Plasmazellen sezerniert. Sie spielen mit ihrer Fähigkeit, spezifisch Antigene zu binden, eine entscheidende Rolle in der adaptiven, humoralen Immunantwort. Die Immunglobulin-Monomere haben eine Y-förmige Struktur und sind aus vier Polypeptidketten aufgebaut, die durch Disulfidbrücken symmetrisch verbunden sind (siehe Abb. 2). Man unterscheidet zwei identische schwere oder H-Ketten (heavy chains) und zwei identische leichte oder L-Ketten (light chains). Jede Kette hat am aminoterminalen Ende seiner Aminosäuresequenz eine variable V-Region. Sie ist für die Antigenbindung verantwortlich. Dabei bilden jeweils die V-Regionen einer H-Kette und einer L-Kette eine Bindungsstelle, so dass zwei identische Bindungsstellen an einem Monomer entstehen. Der carboxyterminale Teil hat eine relativ konstante Struktur (C-Region). Anhand der C-Regionen der H-Ketten (Fc-Fragment) lassen sich Immunglobuline in Klassen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) unterteilen, die die funktionellen Eigenschaften bestimmen (Janeway et al., 2002).

Da Immunglobuline Antigene spezifisch binden, muss bei der großen Zahl von Antigenen eine Vielzahl unterschiedlicher Immunglobuline zur Verfügung stehen. Diese Immunglobulinvielfalt beruht auf vier Hauptmechanismen: erstens der kombinatorischen

Diversität, zweitens der junktionalen Vielfalt, drittens der unterschiedlichen Kombination von H- und L-Ketten und viertens der somatischen Hypermutation.

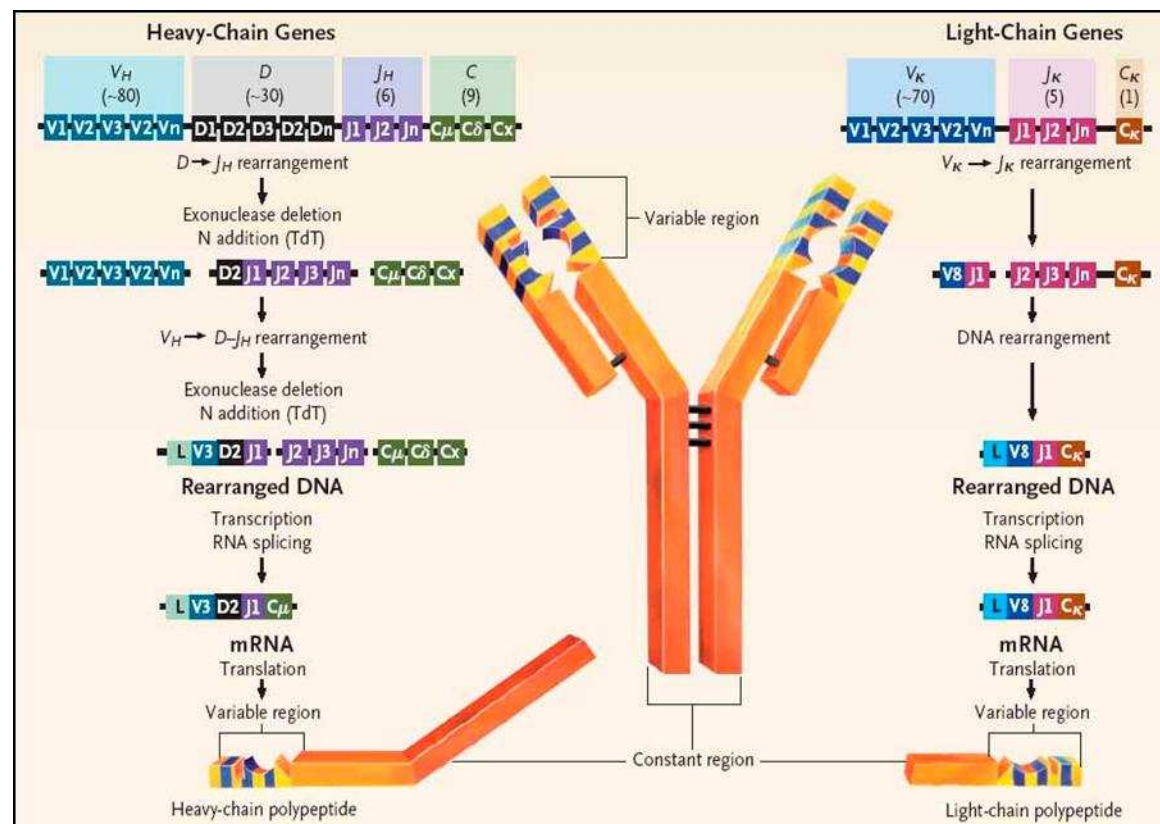


Abb. 2: Entstehung der Immunglobulinvielfalt.

Darstellung des Aufbaus von Immunglobulinen und des Rearrangements der Schwer- und Leichtketten (aus Schwartz, 2003).

Kombinatorische Diversität

Die kombinatorische Diversität beruht darauf, dass die variablen Regionen der Immunglobulinketten von mehreren in der Keimbahn nicht zusammenhängenden Gensegmenten kodiert werden. So wird die variable Region einer H-Kette von einem V_H -Segment (V steht für variable), einem oder mehreren D-Segmenten (D steht für diversity) und einem J_H -Segment (J steht für joining) kodiert, die der L-Kette von jeweils einem V_L - und V_J -Segment. Für jeden dieser Segmenttypen existieren in der Keimbahn mehrere unterschiedliche Gensegmente. Während der B-Zell-Reifung werden Segmente mittels des Enzyms V(D)J-Rekombinase zufällig zusammengelagert (rearrangiert). Dabei werden die zwischen den Segmenten liegenden DNA-Abschnitte unwiderruflich ausgeschnitten. Dieser Vorgang wird als somatische Rekombination bezeichnet (siehe Abb. 2 und 3). Es

entsteht ein zusammenhängendes Exon von ca. 350 bp für die variable Region. Die entstandenen Gensegmente sind durch ihre Länge mittels PCR zu analysieren.

Für die Schwerketten liegen die meisten Gensegmente auf Chromosom 14. Es existieren 30 unterschiedliche D-Segmente und sechs unterschiedliche JH-Segmente. Daneben sind ca. 120 VH-Gensegmente bekannt. Unter letzteren gibt es jedoch eine große Anzahl nichtfunktioneller Gensegmente, sog. Pseudogene, so dass ca. 80 funktionelle VH-Gensegmente zur Rekombination zur Verfügung stehen. Aufgrund des genetischen Polymorphismus zwischen Individuen werden immer noch neue VH-Gensegmente charakterisiert, so dass die Anzahl bekannter VH-Gene einem gewissen Wandel unterliegt (Matsuda et al., 1998; Schwartz, 2003). Die VH-Gene lassen sich aufgrund ihrer Homologien (mindestens 80%) zueinander sieben Hauptfamilien zuordnen, die wiederum in Klanen weiter unterteilt sind (Chothia et al., 1992, Cook und Tomlinson, 1995). Die meisten Gensegmente gehören zur VH3-Familie, danach folgen VH1, VH4, VH2, VH5, VH6 und VH7. Lange Zeit ging man davon aus, dass eine erfolgte Rekombination ein weiteres Genrearrangement ausschliesse. Es besteht jedoch im sog. VH-Gene replacement die Möglichkeit eines erneuten Rearrangements, mit dem das VH-Segment gewechselt werden kann, wenn es sich z. B. um ein Pseudogen handelt. Das gilt natürlich nur für Gene, die bei der ersten Rekombination nicht deletiert wurden (Zhang et al., 2003).

Junktionale Vielfalt

Die junktionale Vielfalt entsteht während des Rekombinationsvorgangs, indem an den Verknüpfungsstellen zwischen verschiedenen Gensegmenten Nukleotide hinzugefügt oder entfernt werden. Bei den zugefügten Nukleotiden handelt es sich entweder um P-Nukleotide (P steht für palindrome) oder um N-Nukleotide (N steht für nontemplate). N-Nukleotide werden von dem Enzym Desoxynucleotidyltransferase (TdT) angefügt. Da auch dieser Mechanismus auf dem Zufall beruht, wächst die Immunglobulinvielfalt nochmals enorm. Es kommt jedoch auch häufig zu Leserasterverschiebungen und unproduktiven Umordnungen.

Das durch die Rekombination und die junktionale Vielfalt entstandene Exon für die variable Region der Schwerkette einer B-Zelle und ihrer Nachkommen unterscheidet sich von denen aller anderen B-Zellen. Im Exon lassen sich verschiedene, funktionell wichtige Bereiche unterscheiden (siehe Abb. 3). Die Sequenzvariabilität ist nämlich nicht gleichmäßig über die V-Region verteilt, sondern konzentriert sich in bestimmten Abschnitten. Es existieren vier Regionen mit geringerer Variabilität, die Rahmenregionen (FR, framework region). Sie sind für die strukturelle Basis der Domäne verantwortlich.

Die FR1-3 werden von dem VH-Segment kodiert, die FR4 von dem JH-Segment. Die drei hypervariablen Regionen, die für die tatsächliche Antigenbindung verantwortlich sind, werden komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR, complementarity determining region) genannt. Die CDR1 und 2 werden durch das VH-Segment kodiert, die CDR3 wird durch die Fusionsstellen kodiert, die das D-Segment, Teile des JH-Segments und eventuell P- und N-Nukleotide enthält (siehe Abb. 3). Die CDR3 eignet sich dadurch zur Detektion von B-Zell-Klonen, da nur klonal verwandte B-Zellen die gleiche CDR3 haben können.

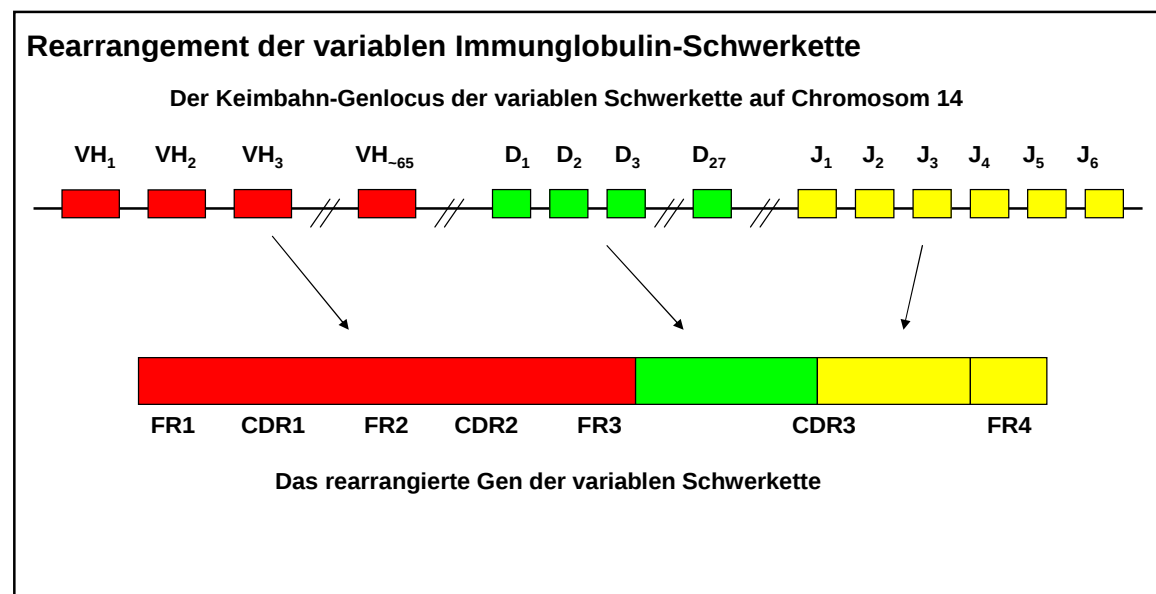


Abb. 3: Rearrangement der variablen Immunglobulin-Schwerkette.

Kombination von H-Kette und L-Kette

Da die Antigenbindung vom Zusammenspiel der H- und der L-Ketten abhängt, erhöht ihre unterschiedliche Kombination auch die Immunglobulinviefalt. Es gibt zwei unterschiedliche Arten von L-Ketten (κ und λ), die ähnlich den H-Ketten rearrangiert werden. D-Segmente gibt es nicht. Es existieren insgesamt ca. neun JL-Segmente und 70 JV-Segmente (siehe Abb. 2).

Somatische Hypermutation

Die drei oben genannten Mechanismen finden alle während der ersten Entwicklungsphase der B-Zellen in den zentralen lymphatischen Organen statt. Die somatische Hypermutation hingegen beginnt erst nach Antigenkontakt in den peripheren lymphatischen Organen und setzt die Erzeugung von funktionsfähigen Immunglobulinen durch die B-Zellen voraus. Dabei kommt es zu Punktmutationen in den umgeordneten

Genen der variablen Region. Einige der mutierten Immunglobulinmoleküle binden besser an das Antigen als der ursprüngliche B-Zell-Rezeptor. Die B-Zellen, die diese Immunglobuline exprimieren, werden positiv selektioniert und reifen zu antikörpersezernierenden Zellen aus. Dieses Phänomen nennt man Affinitätsreifung. Dabei werden Austauschmutationen, die die Rahmenregionen betreffen, negativ selektioniert, da sie die grundlegende Antikörperstruktur verändern. Austauschmutationen in den CDRs verändern die Antigenbindung und werden daher bevorzugt.

Die Kenntnisse über den Aufbau der variablen Regionen der Immunglobuline und dessen Zustandekommen sind wichtig für die Analyse des VH-Repertoires. So kann die VH-Familien- und Segment-Verteilung im Repertoire untersucht werden. Anhand der Mutationsanalysen im Vergleich mit der Keimbahn kann nach Merkmalen einer Affinitätsreifung gesucht werden und klonal verwandte Gene können detektiert werden. (Tab. 7 im Anhang zeigt beispielhaft die Gegenüberstellung eines WG-VH-Gens mit seinem zugehörigen Keimbahngen samt Mutationsanalyse).

2 Fragestellung

Die Wegenersche Granulomatose (WG) lässt sich in zwei Stadien einteilen, ein lokalisiertes mit einer granulomatösen Entzündung im Respirationstrakt und ein generalisiertes mit Vaskulitis. Die Ätiopathogenese dieser Erkrankung ist noch nicht geklärt und nach wie vor fehlt das Verbindungsglied dieser beiden Stadien. PR3-ANCA sind hochspezifisch für die WG, und sie scheinen an ihrer Pathogenese entscheidend beteiligt zu sein. Zum Verständnis dieser Autoimmunerkrankung ist es also wichtig die Frage zu beantworten, wo die ANCA-Bildung initiiert wird.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob das WG-Granulom als Entstehungsort der ANCA in Frage kommt. Dazu wurden Gewebeproben aus WG-Granulomen auf das Vorliegen von B-Lymphozyten-Infiltraten untersucht. Anschließend wurde aus den Granulomgeweben DNA isoliert und diese einer Immunglobulin-Schwerketten (VH)-spezifischen PCR zugeführt. Die PCR-Produkte wurden bakteriell subkloniert und sequenziert, um das VH-Gen-Repertoire der B-Lymphozyten im Granulom zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals paraffineingebettete Gewebeschnitte dieser Methode zugänglich gemacht und es wurde erstmals das VH-Gen-Repertoire aus einem Lungengranulom untersucht.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Sind im Granulom die Voraussetzungen für eine Affinitätsreifung von B-Lymphozyten gegeben?
2. Findet im Granulom eine Affinitätsreifung statt?
3. Wird im WG-Granulom die Bildung von ANCA-produzierenden B-Lymphozyten initiiert?

3 Material

3.1 Geräte

Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
Vortexer Heidolph Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge 2K15	Sigma, Steinheim
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus, Osterode
Zentrifuge EBA 12R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Research 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank -80°C	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Stuttgart
Kühlschrank 4°C	Bosch, Stuttgart
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen
Gelkammer	Bio-Rad, München
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Electrophoresis Documentation System 120	Kodak, Stuttgart
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Schüttelwasserbad	Köttermann, Uetze
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau

3.2 Verbrauchsmaterialien

Objektträger (Superfrost Plus)	Menzel-Glaser, Braunschweig
Färbeküvette	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Photometerküvetten, Uvette	Eppendorf, Hamburg
Agarplattenschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.3 Reagenzien, Lösungen, Enzyme, Primer

Xylol	Merck, Darmstadt
Ethanol 100%, 70%	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
BSA	Roche, Mannheim
Tris (Hydroxymethylaminomethan)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Anti-CD20 mAb (L26)	Dako, Hamburg
Dako EnVision TM	Dako, Hamburg
Levamisole	Merck, Darmstadt
Naphthol-AS-Bi-Phosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Sigma, Steinheim
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, Steinheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Ammoniumacetat	Sigma, Steinheim
Primer (VH1-6, JH Intron1+2, JH1-6)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Nukleotide (dNTP-Mix)	Invitrogen, Karlsruhe
10x PCR-Puffer (Expand High Fidelity PCR System)	Roche Mannheim
MgCl ₂ Stammlösung (25 mM, aus Expand High Fidelity PCR System)	Roche Mannheim
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Bio-Rad, München
100 bp DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Glucose	Sigma, Steinheim
Bitek Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Yeast Extract	Sigma, Steinheim

Tryptone Peptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsendonuklease EcoR1 (high conc)	Roche, Mannheim
SuRE/Cut Puffer H für Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim
Primer M13 uni (-21) und M13 rev (-29)	MWG, Ebersberg

3.4 Materialien in den Kits

NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
<i>Enthält:</i> Puffer (NT, NT3, NE); Aufreinigungssäulen; Tubes (2 ml)	
TOPO-TA Cloning TOP10 Kit	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Enthält:</i> pCR [®] 2.1-TOPO [®] (10 ng/μl plasmid DNA in: 50% Glycerol, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100 μg/ml BSA, Phenol Rot); 10x Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 25 mM MgCl ₂ , 0.01% Gelatine); Salzlösung (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂); Kontroll-Template; Kontroll-PCR-Primer; M13 uni Primer; M13 rev Primer; dNTP Mix; SOC Medium (2% Trypton, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose); <i>E. coli</i> Zellen (TOP10); pUC19 Kontroll-DNA	
NucleoSpin Plasmid Quick-Pure Kit	Macherey-Nagel, Düren
<i>Enthält:</i> Puffer (A1, A2, A3, AQ, AE); RNase; Aufreinigungssäulen; Tubes (2 ml)	
SequiTherm EXCEL [™] II DNA Sequencing Kit-LC	Biozym, Oldendorf
<i>Enthält:</i> SequiTherm EXCEL [™] II DNA Polymerase (5 U/μl); 3.5x SequiTherm EXCEL [™] II Sequencing Puffer; SequiTherm EXCEL [™] II-LC Termination Mix (G, A, T, C); Kontroll Template (pSAD2, 100 fmoles/μl); Stop-Lade Puffer (95% Formamid, 10 mM EDTA, 0.1% Basic Fuchsin, 0.01% Bromphenol Blau)	

4 Methoden

4.1 Immunhistochemische Färbung für CD20

Die Gewebeproben wurden zur Darstellung von B-Lymphozyten mit anti-CD20 mAb mittels der APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) gefärbt.

Arbeitsschritte

Entparaffinierung:

1. Gewebeschnitte (ca. 4 µm) auf silanisierten Objektträgern aufziehen.
2. Nach dem Schneiden über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubieren.
3. 2 x 10 min. in Xylol stellen.
4. 2 x 5 min. in 100% Ethanol stellen, 2 x 5 min. in 96% Ethanol stellen, 1 x 5 min. in 80% Ethanol stellen, 1 x 5 min. in 70% Ethanol stellen und gut in a.d. spülen.

Antigendemaskierung:

5. In 0.01 M Citronensäuremonohydratpuffer (2.1 g Citronensäure-Monohydrat ad 1 l a.d., pH mit NaOH auf 6.0 einstellen) 45 min. bei 95°C im Wasserbad erhitzen.
6. Die Schnitte 20 min. im Puffer abkühlen lassen und gut spülen in a.d.

Färbung:

7. 30 min. in feuchter Kammer mit TBS/BSA 5% (0.5 g BSA ad 10 ml 1xTBS (10xTBS Stammlösung: 12.1 g Tris, 87.8 g NaCl auf 1 l mit a.d.)) inkubieren.
8. 30 min. in feuchter Kammer mit dem Primärantikörper (monoklonaler Maus-anti-human-AK (IgG2a, kappa, Clone L26) gegen CD20cy; 705 µg/ml) inkubieren.
9. Nach der Inkubation die Objektträger dreimal in einer Küvette mit 1xTBS spülen.
10. Objektträger mit einem Tuch um die Schnitte herum vorsichtig abtrocknen und 1 - 2 Tropfen Konjugat (Dako EnVision™, Ziege-anti-Maus/Kaninchen, Alkalische Phosphatase, Code K4017, gebrauchsfertig) auftragen und 30 min. in feuchter Kammer inkubieren.
11. Objektträger dreimal mit 1xTBS spülen und in 1xTBS stehen lassen.

Entwicklung (Neufuchsin-Reaktion):

12. Neufuchsin-Ansatz für 1 Küvette: Lösung A: 20 mg Levamisole einwiegen und in 12,5 ml AP-Puffer (5.85 g NaCl 0.1 M, 12.1 g Tris 0.1 M auf 1 l mit a.d.) und 35 ml Entwicklungspuffer (1.21 g Tris 0.01 M, 5.85 g NaCl 0.1 M auf 1 l mit a.d.) lösen. Lösung B: 25 mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat einwiegen und in 300 µl Dimethylformamid lösen. Lösung C: 20 mg Natriumnitrit einwiegen und in 250 µl

- a.d. und 100 µl Neufuchsinammlösung (5 g Neufuchsin ad 100 ml mit 2N HCl (20 ml HCl 32%, 81.78 ml a.d.)) lösen.
13. Die Lösungen in der Reihenfolge A + C + B zusammenführen, jeweils durchmischen und mit dem Magnetrührer gut durchrühren lassen.
 14. 1 min. stehen lassen und mit 1M HCl pH 8.8 einstellen, danach filtrieren.
 15. Schnitte 20min. in Neufuchsinlösung entwickeln lassen, einmal mit TBS waschen.
 16. Zur Gegenfärbung Schnitte in Küvette mit filtriertem Hämalaun stellen, 2 min. inkubieren.
 17. Schnitte mit 1xTBS abspülen und dann zum Bläuen mindestens 10 min. in 1xTBS stehen lassen, dann unter passendem Deckgläschen mit Glycerringelatine eindecken.

4.2 Entparaffinierung und Proteinase K-Verdau

Die Entparaffinierung und der Proteinase K-Verdau dienen der DNA-Gewinnung aus in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten.

Arbeitsschritte

1. Im Reagiergefäß auf die Probe 1000 µl Xylol geben und vortexen.
2. Bei Raumtemperatur 10 min. inkubieren.
3. Mit 13000 U/min für 3 min. zentrifugieren (2K15) und Überstand verwerfen.
4. Schritte 1 bis 3 zweimal wiederholen.
5. 1000 µl Ethanol 100% auf die Probe geben und vortexen.
6. Mit 13000 U/min für 3 min. zentrifugieren (2K15) und Überstand verwerfen.
7. Schritte 5 bis 6 einmal wiederholen.
8. Proben im Thermomixer ca. 15 min. bei 56°C trocknen.
9. Probenpellet in 150 µl PK-Puffer (100 mM Tris (pH8), 50 mM EDTA (pH8), 500 mM NaCl) aufnehmen.
10. 8 µl Proteinase K (15.6 mg/ml) zugeben und einige Tropfen Mineralöl auf den Ansatz geben.
11. Über Nacht im Thermomixer bei 56°C verdauen.

4.3 DNA-Aufreinigung

Die DNA-Aufreinigung diente dazu, die Reinheit der durch den Verdau erhaltenen DNA-Probe zu erhöhen.

Arbeitsschritte

1. Im Reagiergefäß 150 µl DNA-Probe mit 50 µl Ammoniumacetat (10 M) mischen.
2. 300 µl Ethanol 100% dazugeben und für 1 Std. bei -80°C inkubieren.
3. Mit 13000 U/min bei 4°C 5 min. zentrifugieren (2K15) und Überstand verwerfen.
4. 750 µl kaltes Ethanol (70%, -20°C) hinzufügen.
5. Mit 13000 U/min bei 4°C 5 min. zentrifugieren (2K15) und Überstand verwerfen.
6. Pellet bei Raumtemperatur an der Luft trocknen lassen.
7. Getrocknetes Pellet in 50 µl a.d. aufnehmen und lösen lassen.

4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt. Nach entsprechender Verdünnung der DNA in a.d. wurde die Lichtabsorption in einer Küvette bei der Wellenlänge 260 nm gemessen (BioPhotometer). Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml. Die Reinheit der Nukleinsäure lässt sich am Quotienten A260/A280 abschätzen (reine DNA: 1.8-1.9).

4.5 PCR

4.5.1 VH-spezifische seminested PCR

Die polymerase chain reaction (PCR) wurde eingesetzt, um einen genau definierten Teil, hier die variable Region der Immunglobulin-Schwerkette (VH, variable heavy chain), eines DNA-Stranges zu vervielfältigen. Die seminested PCR ist eine Methode, um die Spezifität der PCR zu erhöhen. Hierbei wurde nach erfolgreicher erster Amplifikation das PCR-Produkt als Template für eine zweite PCR-Runde verwendet. Dabei lag einer der beiden Primer (3'Primer) weiter innen (Abb. 4). So wurden nur noch die spezifischen DNA-Abschnitte der ersten Runde amplifiziert, wodurch sich Empfindlichkeit und Effizienz erhöhen.

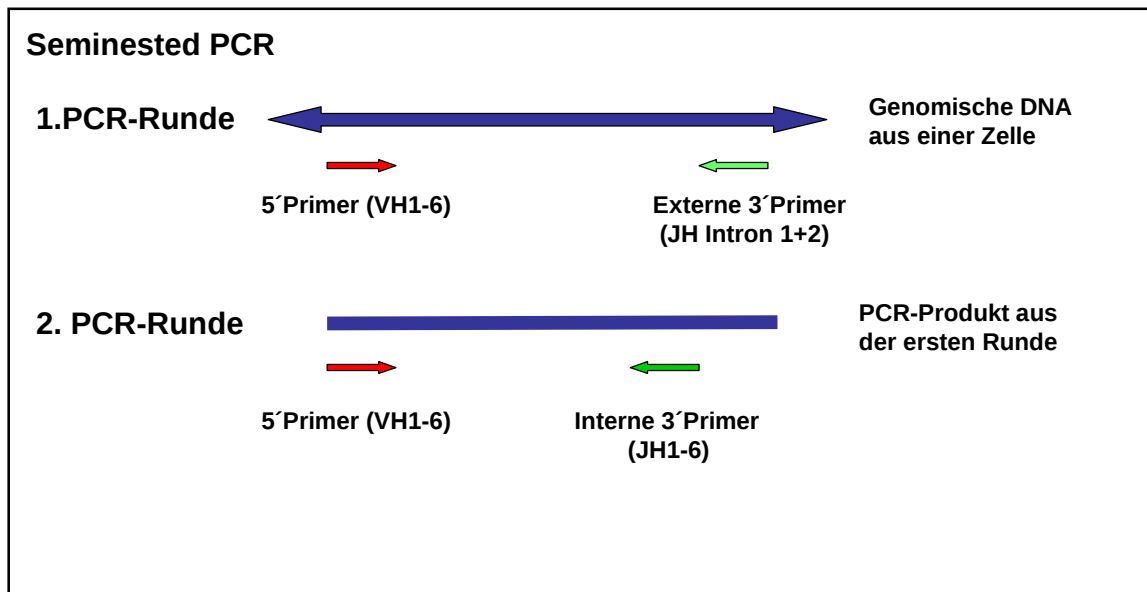


Abb. 4: Darstellung des Prinzips einer VH-spezifischen seminested PCR.

4.5.2 Reaktionsansätze

In beiden PCR-Runden gab es für jeden Patienten und die Gesamtnegativkontrolle (Patientin mit conchaler Hyperplasie) jeweils einen Reaktionsansatz für jede der VH-Familien 1-6 und einen Reaktionsansatz ohne DNA als Negativkontrolle für jeden Versuch. In der ersten PCR-Runde wurden in jeden Reaktionsansatz folgende Materialien in ein Reagiergefäß eingesetzt:

350 ng DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl $MgCl_2$ (50 mM), 1 µl Nukleotide (dNTP-Mix: dGTP, dATP, dTTP, dCTP; 10 mM), 5 µl 5' Primer (VH1, 2, 3, 4, 5 oder 6; 100 mM), 5 µl 3' Primer-Mix (JH Intron 1 und 2; 100 mM) und 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) auf 50 µl mit a.d.

In der zweiten Runde wurden in jedem Reaktionsansatz folgende Materialien in ein Reagiergefäß eingesetzt:

1 µl PCR-Produkt aus Runde 1, 5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl $MgCl_2$ (50 mM), 1 µl Nukleotide (dNTP-Mix: dGTP, dATP, dTTP, dCTP; 10 mM), 5 µl 5' Primer (VH1, 2, 3, 4, 5 oder 6; 100 mM), 5 µl 3' Primer-Mix (JH 1, 2, 3, 4, 5 und 6; 100 mM) und 0,2 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) auf 50 µl mit a.d.

Die Reaktionsansätze wurden kurz anzentrifugiert (Biofuge A) und danach sofort im Thermocycler T3 weiterverarbeitet.

4.5.3 Verwendete Primer

Als 5' Primer dienten in beiden PCR-Runden VH1-6 spezifische Oligonukleotide. Als 3' Primer dienten in der ersten Runde JH-Konsensus Primer, in der zweiten Runde interne JH-Primer. Im Einzelnen wurden folgende Primer verwendet:

5'Primer

VH1	5'CTACGTCGAC CCTCAGTGAA GGTTCCTGC AAGGC	(16-24)
VH2	5'GCACGTCGAC GTCCTGCGCT GGTGAAASCC ACACA	(16-24)
VH3	5'GTACGTCGAC GGGGTCCCTG AGCTCTCCTG TGCAG	(15-24)
VH4	5'CGTCGTCGAC CCTGTCCCTC ACCTGCRCTG TC	(16-24)
VH5	5'CGACGTCGAC AAAAAGCCCG GGGAGTCTCT GARGA	(12-20)
VH6	5'CGTCGTCGAC CTGTGCCATC TCCGGGGACA GTG	(21-29)

Externe 3'Primer

JH Intron1 (1,2,4,5)	5'GACTCACCTG AGGAGACGGT GACC
JH Intron2 (3,6)	5'TCTTGCCTGA GGAGACGGTG ACCRT

Interne 3'Primer

JH1	5'CGTCGTCGAC CAGGGTGCCC TGGCCCCAGT GC	(101-109)
JH2	5'CGTCGTCGAC CAGGGTGCCC TGGCCCCAGT GC	(101-109)
JH3	5'CGTCGTCGAC ATTGTCCCTT GGCCCCAGAC ATCA	(100-108)
JH4	5'CGTCGTCAAC CACGGTTCCT TGGCCCCAGT AG	(101-109)
JH5	5'CGTCGTCGAC GTGACCAGGG TTCCTTGGCC CCAGG	(102-110)
JH6	5'CGTCGTCGAC GTGGTCCCTT GCCCCCAGAC GTCC	(100-108)

Der Primer für VH1 bindet auch VH7. In Klammern sind die korrespondierenden Aminosäuren angegeben.

4.5.4 Standard PCR-Bedingungen

Die seminested VH-PCR wurde in zwei PCR-Runden mit jeweils 35 Zyklen im Thermocycler T3 unter folgenden Standardbedingungen durchgeführt:

Erste PCR-Runde:

Schritt	Temp.	Zeit	Arbeitsschritt
1	95°C	2 min.	Denaturierung
2	63°C (68°C bei VH3+4)	90 sec.	Annealing
3	72°C	90 sec.	DNA-Synthese

4	95°C	80 sec.	Denaturierung
5	63°C (68°C bei VH3+4)	30 sec.	Annealing
6	72°C	90 sec.	Synthese; Schritte 4-6 wurden 34mal wiederholt.
7	72°C	5 min.	abschließender Syntheseschritt

Zweite PCR-Runde:

<i>Schritt</i>	<i>Temp.</i>	<i>Zeit</i>	<i>Arbeitsschritt</i>
1	95°C	2 min.	Denaturierung
2	58°C (63°C bei VH3+4)	90 sec.	Annealing
3	72°C	90 sec.	DNA-Synthese
4	95°C	80 sec.	Denaturierung
5	58°C (63°C bei VH3+4)	30 sec.	Annealing
6	72°C	90 sec.	Synthese. Schritte 4-6 wurden 34mal wiederholt.
7	72°C	5 min.	abschließender Syntheseschritt

Im Annealing werden die Primer angelagert. Nach abschließender Synthese Lagerung der PCR-Produkte bei 4°C.

4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten, wie sie in der PCR oder nach Behandlung mit Restriktionsenzymen entstehen. Ziel der Auftrennung war die Identifikation der Fragmente. Im Vergleich zu einem DNA-Längenmarker wurden durch Einlagerung von Ethidiumbromid die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Die gesuchten Fragmente hatten eine Länge von ca. 350 bp.

0.75 g Agarose wurden mit 50 ml 0.5x TBE-Puffer (Stammlösung für 5x TBE-Puffer: 54 g Tris-Base, 27.5 g Borsäure, 20 ml 0.5 M EDTA, auf 1 l mit a.d.) gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf 65°C wurden Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 0.5 mg/ml zugegeben und das Gel in den Gelträger mit Kamm gegossen. Nach 20 min. Aushärtung wurde das Gel nach Entfernung des Kamms in die mit 0.5x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die Proben wurden mit einer entsprechenden Menge Ladepuffer (Bromphenolblau 0.25%, Glucose 40%, in entsprechend a.d.) versetzt und aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 50 Volt (Power-Pack

P25) für 1-2 Std. Neben den Proben wurde ein DNA-Längenstandard (100 bp DNA-Ladder) mitgeführt. Das Gel wurde unter UV-Licht (254 nm) fotografiert (Electrophoresis Documentation System 120).

4.7 Reinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das NucleoSpin Extract II Kit nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Zentrifugiert wurde mit der Zentrifuge 2K15.

4.8 DNA-Klonierung

Die Klonierung ist eine Methode, um *in vitro* manipulierte DNA in einer geeigneten Wirtszelle zu vermehren, so dass identische Kopien dieser DNA entstehen. Hier diente sie dazu, einzelne in der PCR gewonnene DNA-Fragmente zu separieren und so zu vervielfältigen, dass sie einer Sequenzierung zugänglich wurden. Dabei wurden die PCR-Produkte in eine Vektor-DNA integriert. Das entstandene Plasmid wurde in *E. coli* Bakterien eingebracht. Die Bakterien wurden kultiviert und das Plasmid anschließend wieder entfernt (Abb. 5). Zur Klonierung wurde das TOPO-TA Cloning TOP10-Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

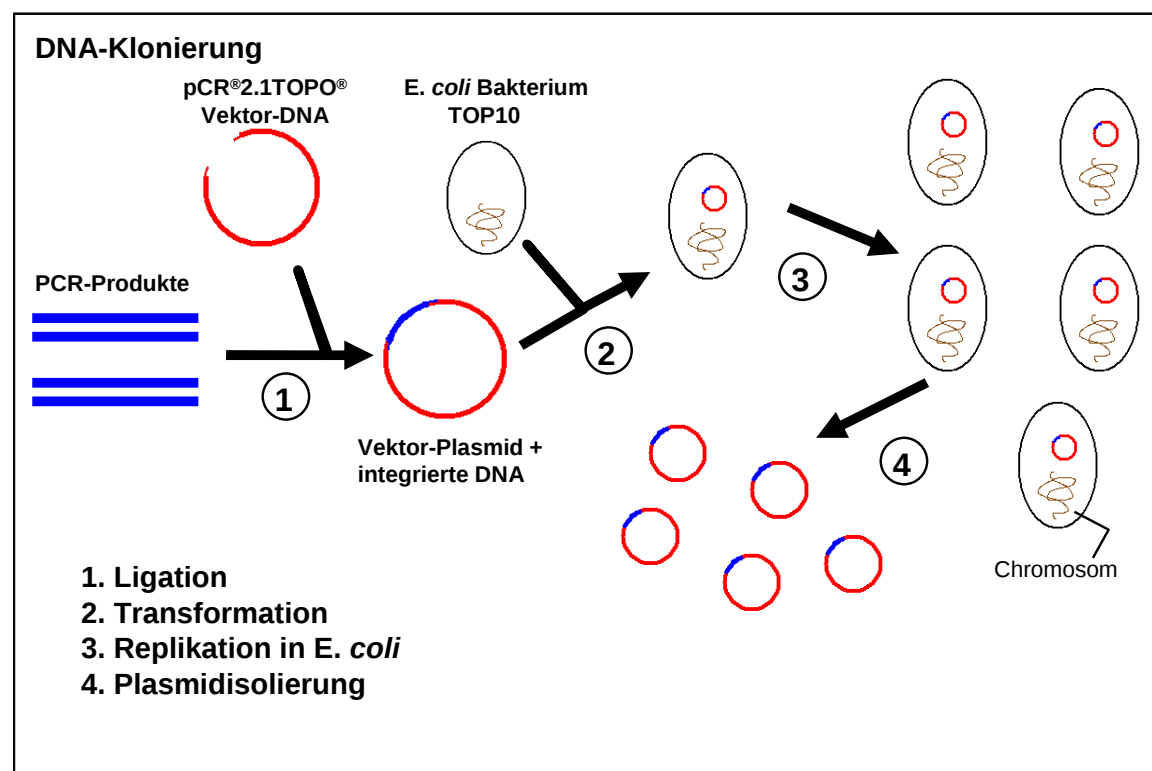


Abb. 5: Das Prinzip der DNA-Klonierung mit TOPO-TA Cloning TOP10-Kit.

4.8.1 Ligation

Bei der Ligation wurden die PCR-Produkte in die Vektor-DNA (pCR[®]2.1TOPO[®]) legiert, so dass ein Vektor-Plasmid entsteht (Abb. 5). pCR[®]2.1TOPO[®] (3.9 kb) enthält neben Schnittstellen für EcoR1 (siehe unten) auch Sequenzen für die Sequenzierungs-Primer (M13 rev, M13 uni) und Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin. (Arbeitsprotokoll und weitere Angaben siehe Hersteller).

4.8.2 Transformation

In der Transformation wurden die Plasmide zur Klonierung in Bakterien eingeschleust (Abb. 5). Das hier verwendete *E. coli* TOP10 Bakterium zeichnet sich durch eine hohe Transformierbarkeit aus. (Arbeitsprotokoll und weitere Angaben zum Genotyp von *E. coli* TOP10 siehe Hersteller).

4.8.3 Replikation in *E. coli*

Die transformierten *E. coli* Bakterien wurden sofort weiterverarbeitet. Die Kultivierung erfolgte auf LB-Agarplatten für ca. 15 Std. bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die entstandenen Bakterienkolonien einzeln mit einer Pipettenspitze aufgepickt und in flüssiges LB-Medium überführt. Darin wurden sie für ca. 15 Std. bei 37°C im Wasserschüttelbad inkubiert. Die so entstandenen Zellsuspensionen wurden anschließend der Plasmidisolierung zugeführt.

Herstellung von LB-Agar und Medium:

Für die Agarplatten wurden 10 g Tryptone, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl und 15 g Bitek-Agar mit a.d. auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde mit NaOH ein pH 7.0 eingestellt. Danach wurde für 20 min. bei 120°C autoklaviert. Die Lösung wurde auf ca. 55°C abkühlen gelassen und es wurden 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Das LB-Medium wurde nach demselben Rezept hergestellt, jedoch ohne den Bitek-Agar. Durch den Zusatz von Ampicillin können sich nur Bakterien vermehren, die ein Plasmid aufgenommen haben. Vor dem Auftragen der Bakterien auf die Platten wurden diese auf 37°C vorgewärmt, mit 40 mg/ml X-Gal-Lösung (400 mg X-Gal, 10 ml Dimethylformamid) bedeckt und trocknen gelassen.

4.8.4 Plasmidisolierung

In der Plasmidisolierung (Mini-Präparation) wurden die Plasmide aus den Bakterien isoliert. Zur Isolierung der Plasmide wurde das NucleoSpin Plasmid Quick-Pure Kit nach

den Anweisungen des Herstellers verwendet. Zentrifugiert wurde mit der Zentrifuge EBA 12R.

4.9 Restriktionsenzym-Verdau

Der Restriktionsenzym-Verdau diente dazu, Plasmide zu detektieren die ein Insert aufgenommen hatten. Dazu wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoR1, einem Enzym, das doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen schneidet, das Insert aus dem Plasmid herausgeschnitten. Anschließend wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese nach DNA-Fragmenten mit einer Länge von ca. 350 bp gesucht.

Zum Restriktionsenzym-Verdau wurden folgende Materialien in ein Reagiergefäß eingesetzt:

2 µl Plasmidfiltrat aus der Mini-Präparation, 1.25 µl EcoR1 (5 U/µl), 1.25 µl 10x Puffer (SuRE), 5.5 µl a.d.

Danach wurde die Probe für 3 Std. bei 37°C im Thermocycler T3 inkubiert. Dann folgte die Agarose-Gelelektrophorese (siehe oben).

Bei allen Proben, bei denen ein Insert detektiert wurde, wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe oben).

4.10 Sequenzierung

Alle Proben, bei denen ein Insert detektiert wurde, wurden mittels automatischem Sequenzierer sequenziert. Dabei wurden in vier separaten PCR-Reaktionen dem Nukleotidgemisch jeweils eine Art (A, T, C oder G) fluoreszenzmarkierte didesoxy-Nukleotide (dd-Nukleotide) zugesetzt. Die Polymerase generiert einen Komplementärstrang zur Probe, der bei Einbau eines dd-Nukleotids abbricht. Bei Wiederholung entstehen somit Kettenabbrüche an jeder Position des jeweiligen Nukleotids im DNA-Strang. Die Fragmente werden in einem Acrylamidgel aufgetrennt. An der Basis der Apparatur befindet sich ein Laser, der das Durchlaufen der markierten Nukleotide registriert und an einen Rechner weiterleitet.

Für die PCR-Reaktionen (Thermocycler T1) wurde das SequiTherm EXCELTM II DNA Sequencing Kit-LC nach dem Cycle Sequencing Protokoll mit den Primern M13 uni (-21) (Modifikation 5' IRD 800) und M13 rev (-29) (Modifikation 5' IRD 700) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurden die Proben im Institut für Biologie der Universität zu Lübeck mit dem LI-COR[®] 4000L Sequenzierungsautomaten

(LI-COR Inc., Lincoln, USA) mit einem Rapid XL Gel (6%, 41cm) nach den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet.

4.11 Auswertung und Statistik

Alle Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm DNASIS (Hitachi, Berlin) und der Internet-Datenbank IMGT/V-Quest (www.imgt.cines.fr) ausgewertet. Dabei wurden die Sequenzen untereinander und mit ihren zugehörigen Keimbahngenomenen verglichen. Alle Mutationen im Vergleich zur Keimbahn wurden analysiert. Dabei wurde die Mutationsfrequenz berechnet und die Mutationen wurden getrennt nach Austauschmutationen und stillen Mutationen für die komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR) und die Rahmenregionen (FR) ausgezählt. Dabei wurde auf Mutationen hin zu sauren und basischen Aminosäuren geachtet. Weiterhin wurden die Länge und der Aufbau der CDR3 ermittelt. Gesondert betrachtet wurden nicht-funktionelle Gene. Als gesunde Kontrolle dienten 84 VH-Gene von B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders. Die Daten entstammten einer Arbeit von Brezinschek (Brezinschek et al., 1995) und wurden nach denselben Gesichtspunkten ausgewertet. Statistisch ausgewertet wurden nur funktionelle VH-Gene, also Gene, die dem Leseraster entsprachen und potentiell funktionelle Schwerketten kodierten. Es wurde die Statistiksoftware SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) mit den nicht-parametrischen Tests Mann-Whitney U und Fisher's exact verwendet. Jeder Patient wurde mit der gesunden Kontrolle verglichen bezüglich der Mutationsfrequenz (Mann-Whitney U) und der Anzahl von Mutationen hin zu sauren Aminosäuren in der CDR1 und 2 (Mann-Whitney U). Ferner wurden die R:S-Werte, die das Verhältnis von Mutationen angeben, die die Aminosäure verändern (R: replacement) zu Mutationen, die keinen Aminosäurenaustausch bewirken (S: silent), der Patienten und der gesunden Kontrolle getrennt für die CDR und die FR verglichen (Fisher's exact test). p-Werte <0.05 galten als statistisch signifikant.

5 Patienten

5.1 Übersicht

Untersucht wurden vier Patienten mit der klinisch und histopathologisch gesicherten Diagnose einer Wegenerschen Granulomatose (WG). Die Diagnosen wurden mit Hilfe der Klassifikationskriterien für die Wegenersche Granulomatose des „American College of Rheumatism“ von 1990 (Leavitt et al., 1990; Übersicht: Gross, 1999) (siehe Tab. 17 im Anhang) gestellt. Die histologische Untersuchung erfolgte im Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck. Tab. 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Patientendaten.

Als Negativkontrolle diente eine Biopsie einer ansonsten gesunden Patientin mit conchaler Hyperplasie. Sie wurde mittels CD20-APAAP auf B-Lymphozyten gefärbt und einer VH-spezifischen seminested PCR zugeführt.

Als Vergleichskontrolle dienten 84 VH-Gene von B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut eines Gesunden. Die Daten stammen aus einer Arbeit von Brezinschek (Brezinschek et al., 1995).

Patient; Alter (Jahre); Biopsie	Manifestation	Krankheits- aktivität	Erkrankungs- dauer	cANCA (anti- PR3)	Bisherige Behandlung
gWG1 (48) Lunge	generalisiert (E, L, Ey, C)	aktiv	3 Monate	1:128 (36 U/ml)	Cyclophosphamid Steroide Cotrimoxazol
gWG2 (64) NNH	generalisiert (E, P, C)	schleichend	1 Jahr	1:512 (80 U/ml)	Keine
IWG3 (82) Nase	lokalisiert (E)	schleichend	3 Monate	negativ	Keine
IWG4 (72) NNH	lokalisiert (E)	aktiv	4 Jahre	1:4 (grenz- wertig)	Cotrimoxazol Steroide

Tab. 1: Patientendaten.

Manifestationen nach ELK-Klassifikation (siehe Tab. 19 im Anhang). cANCA-Titer bestimmt durch Immunfluoreszenztest; anti-PR3 in Units pro ml bestimmt durch ELISA. NNH: Nasennebenhöhlen. Alle Angaben beziehen sich auf den Zeitpunkt der Biopsie.

5.2 Patient 1 (gWG1)

Bei Patient 1 handelte es sich um einen 48 Jahre alten Patienten mit einem akuten und aggressiven Verlauf einer generalisierten WG (gWG). Etwa drei Monate vor dem Zeitpunkt der Biopsie begannen die Beschwerden mit Luftnot, rezidivierenden Kopfschmerzen und einer therapierefraktären Konjunktivitis. Stationär wurden eine chronisch aktive ulzeröse Konjunktivitis (histologisch gesichert), eine chronisch aktive ulzeröse Rhinitis (histologisch gesichert) und einzelne, zum Teil einschmelzende, intrapulmonale Rundherde mit Seropneumothorax (Computer-tomographische Darstellung), sowie im Labor ein ANCA-Titer von 1:128 (Anti-PR3 36 U/ml) festgestellt. Ferner zeigte sich ein Diabetes insipidus bei hypophysärer Raumforderung (Magnet-Resonanz-tomographische Darstellung, nicht histologisch gesichert, aber gut vereinbar mit einem WG-Granulom). Noch vor der pulmonalen Biopsie wurde mit einer Induktionstherapie nach Fauci (initial hochdosiertes Kortison und Cyclophosphamid) begonnen. In der durch Resektion gewonnenen Biopsie des linken Unterlappen bestätigte sich die Diagnose WG. Hier fanden sich landkartenartige Nekrosen mit histiozytärem Randwall, einzelne mehrkernige Riesenzellen, granulozytenreiche Mikroabszesse und Anschnitte von kleinen Arterien mit transmuralen lymphoplasmazellulären und monozytären Entzündungszellinfiltraten.

5.3 Patient 2 (gWG2)

Bei Patient 2 handelte es sich um eine 64 jährige Patientin mit einem schleichenden Verlauf einer generalisierten WG (gWG). Zum Zeitpunkt der Biopsie bestand bereits seit einem Jahr eine blutig borkige Rhinitis und seit einem halben Jahr eine Polyneuropathie mit brennenden Dysästhesien an den Unterschenkeln beidseits und eine Hypakusis beidseits. Ferner hatte die Patientin seit drei Wochen eine diskrete Hemisymptomatik links. Im Labor fanden sich ein ANCA-Titer von 1:512 (Anti-PR3 80U/ml). Im Nasenabstrich fand sich ein positiver Befund für *Staphylokokkus aureus*. In der Biopsie der Nasennebenhöhlen links und rechts fanden sich landkartenartige Nekrosen, entzündliche Infiltrate aus Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten, sowie

palisadenartig angeordnete Epitheloidzellen und einzelne Riesenzellen. Eine Therapie wurde erst nach der Biopsie eingeleitet.

5.4 Patient 3 (IWG3)

Bei Patient 3 handelte es sich um eine 82 jährige Patientin mit einem gutartigen Verlauf einer lokalisierten WG (IWG) im Initialstadium. Zum Zeitpunkt der Biopsie bestanden seit drei Monaten Schmerzen im Bereich der Nase, Epistaxis und Krustenbildung. Anzeichen für eine systemische Beteiligung konnten nicht gefunden werden. Im Labor war der ANCA negativ. Im Nasenabstrich konnte man *Staphylokokkus aureus* nachweisen. In der Biopsie der Nasen-Schleimhaut fanden sich dichte Ansammlungen von Entzündungszellen aller Art, multiple epitheloidzellige Granulome mit Riesenzellen, sowie Entzündungen kleiner regionären Arterienäste. Eine Therapie wurde zum Biopsiezeitpunkt nicht durchgeführt.

5.5 Patient 4 (IWG4)

Bei Patient 4 handelte es sich um eine 72 Jahre alte Patientin mit einem langdauernden, aggressiven Verlauf einer lokalisierten WG (IWG). Bereits vier Jahre vor der Biopsie bestanden eine erschwerte Nasenatmung, Borkenbildung und Epistaxis. Im Verlauf kam es bei hoher endonasaler Aktivität zu massiver Borkenbildung, ausgeprägter Destruktion der Nasenhaupthöhlen mit Septumperforation und Sattelnasenbildung, sowie Einbeziehung der Nasennebenhöhlen mit Schwellung und nekrotisierender Entzündung. Im Labor fand sich ein ANCA-Titer von 1:4 (grenzwertig). In der durch eine Pansinusitis-Operation gewonnenen Gewebebiopsie der Kieferhöhlenschleimhaut fanden sich landkartenartige Nekrosen mit einem histiozytären Randwall und teilweise epitheloidzellig transformierte Zellen. Es fanden sich Riesenzellen und gemischte Entzündungszellinfiltrate aus Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten. Weiterhin fanden sich kleine Arterien mit faserreichen Intimafibrosen. Die Patientin wurde bis zum Zeitpunkt der Biopsie mit Cotrimoxazol und niedrig dosierten Steroiden behandelt.

6 Ergebnisse

6.1 Immunhistochemische Färbung für CD20

Gewebeproben von allen vier Patienten wurden mittels anti-CD20 mAb gefärbt (Abb. 6-9). CD20 ist ein B-Lymphozyten-spezifisches Oberflächenantigen, das ab dem Entwicklungsstadium der prä-B-Zelle bis hin zur Gedächtniszelle exprimiert wird, und somit ein zuverlässiger Marker für reife B-Lymphozyten ist.

In allen vier Gewebeproben wurden Infiltrate von mononukleären Zellen gefunden. In diesen follikelähnlichen Strukturen sind ca. 30-50% CD20⁺ B-Lymphozyten.

Als Patienten-Negativkontrolle diente die Biopsie einer Patientin mit conchaler Hyperplasie. Hier konnte keine signifikante Anzahl an B-Lymphozyten dargestellt werden.

Abb. 6-9: CD20 Expression in WG-Granulomen.

Lymphozyten mit anti-CD20 (APAAP-Methode) gefärbt (rot) und mit Hämalaun (blau) gegengefärbt. Erkennbar sind follikelähnliche B-Lymphozyten-Infiltrate im direkten Umfeld der Granulome.

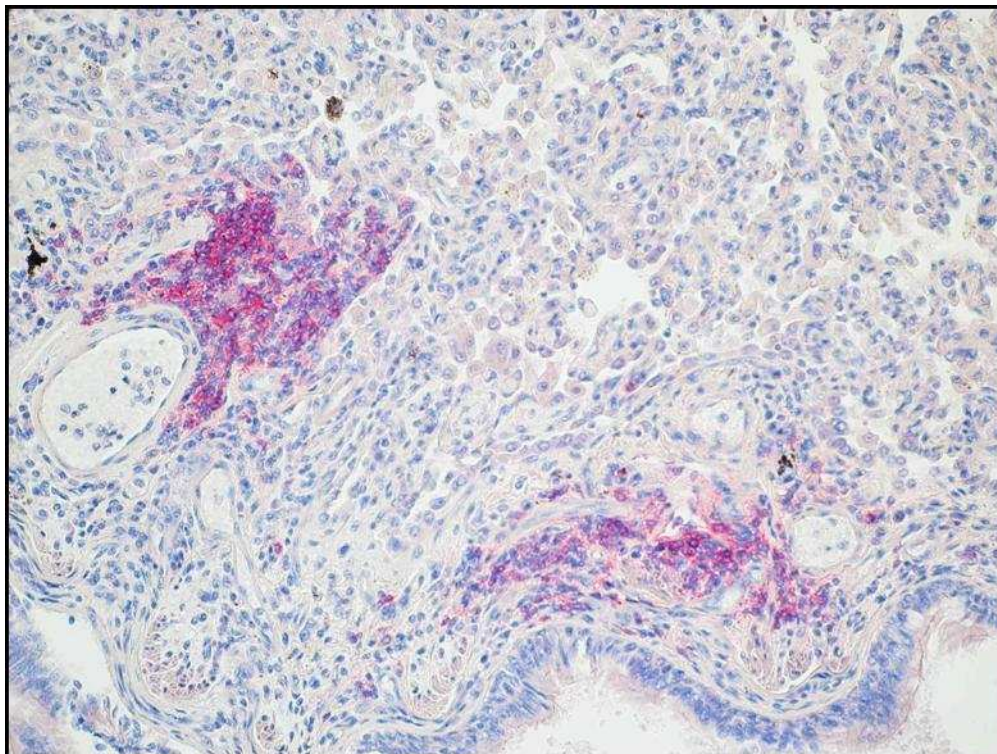


Abb. 6: Patient 1 (gWG1), entparaffinierter Schnitt (4 µm) aus einer Lungenbiopsie. Original Vergrößerung 200fach.

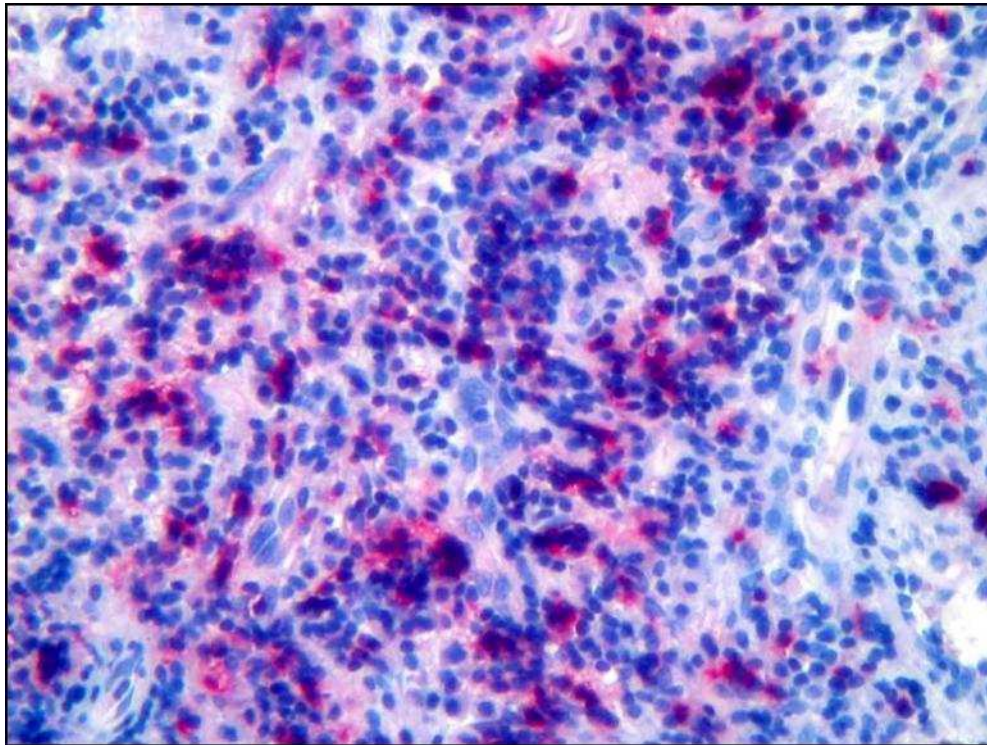


Abb. 7: Patient 2 (gWG2), entparaffinierter Schnitt (4 μ m) aus einer Biopsie der Nasennebenhöhle. Original Vergrößerung 200fach.

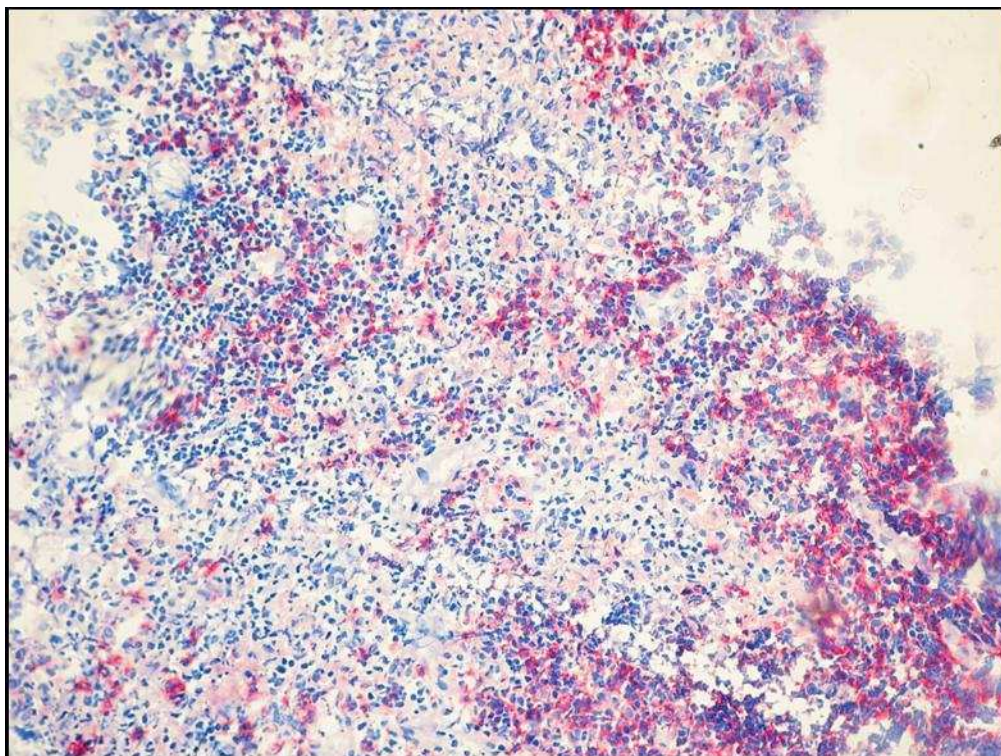


Abb. 8: Patient 3 (IWG3), entparaffinierter Schnitt (4 μ m) aus einer endonasalen Biopsie. Original Vergrößerung 200fach.

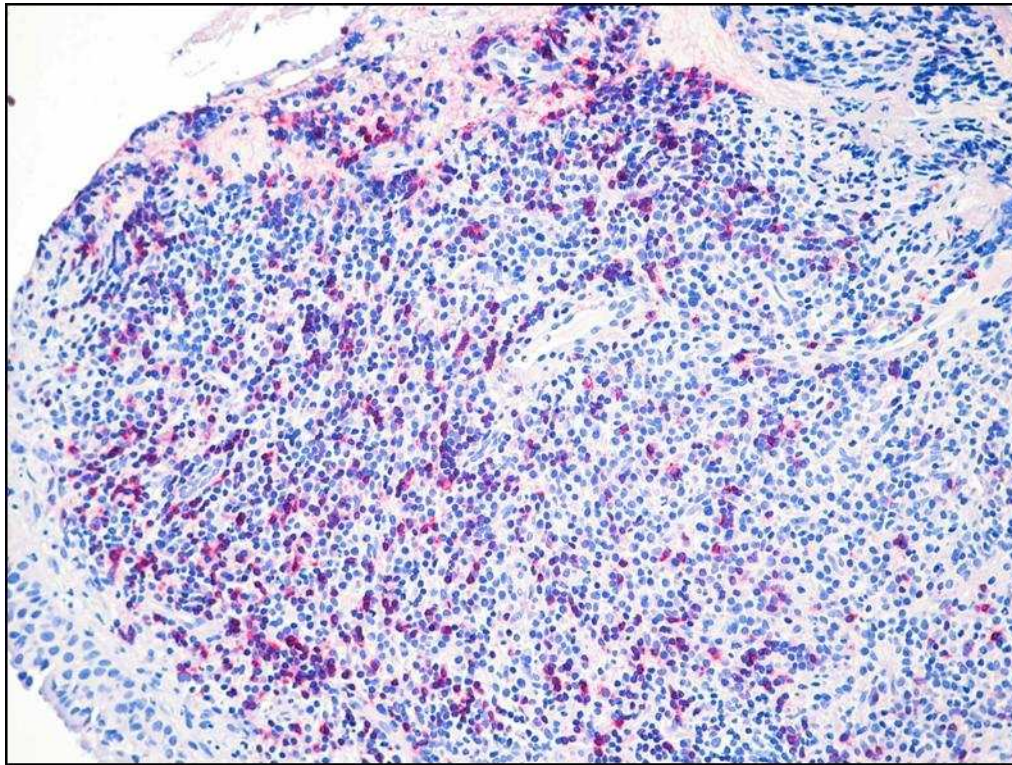


Abb. 9: Patient 4 (IWG4), entparaffinierter Schnitt (4 μm) aus einer Biopsie der Kieferhöhlenschleimhaut. Original Vergrößerung 200fach.

6.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden entparaffiniert. Von den verdauten und aufgereinigten Gewebeproben wurden photometrisch die Konzentration der DNA, sowie deren Reinheit bestimmt (die Reinheit der Nukleinsäure lässt sich am Quotienten A260/A280 abschätzen, reine DNA: 1.8-1.9).

Patient 1 (gWG1): Konzentration: 299 ng/ μl ; A260/A280: 1,58

Patient 2 (gWG2): Konzentration: 320 ng/ μl ; A260/A280: 1,61

Patient 3 (IWG3): Konzentration: 137 ng/ μl ; A260/A280: 1,17

Patient 4 (IWG4): Konzentration: 107 ng/ μl ; A260/A280: 1,57

6.3 VH-spezifische PCR

Jeweils 350 ng DNA wurden in eine seminested VH-spezifische PCR mit Primern für die VH-Familien 1-6 (VH1 ist ebenfalls für VH7 spezifisch) eingesetzt. Als Amplifikationsprodukt erhält man dabei rearrangierte Ig-Gene, deren VH-Segment der durch den jeweiligen Primer repräsentierten VH-Familie entspricht. Die Länge dieser Produkte beträgt ca. 350 bp. Eine ausreichende Menge an Produkten stellt sich im Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel nach Elektrophorese als Bande dar.

Produktbanden konnten im Vergleich zu einem parallel laufenden Marker der Höhe von 350 bp zugeordnet werden. Bei Patient 1 wurden PCR-Produkte für die Familien VH1, VH3, VH4 und VH5 detektiert. Bei Patient 2 wurden PCR-Produkte für die Familien VH1, VH2, VH3, VH4 und VH5 detektiert. Bei Patient 3 wurden PCR-Produkte für die Familien VH1, VH2, VH3, VH4 und VH5 detektiert. Bei Patient 4 wurden PCR-Produkte für die Familien VH1, VH2, VH3, VH4 und VH6 detektiert. Bei allen Patienten waren die Negativkontrollen (Reaktionsgemisch ohne Template), die parallel zu jedem PCR-Ansatz durchgeführt wurden, negativ. Die Gelelektrophoresen der Patienten 1-4 sind in den Abbildungen 10-13 dargestellt. Als Patienten-Negativkontrolle diente DNA einer Patientin mit conchaler Hyperplasie. Hier konnten nach zwei PCR-Runden mit denselben Bedingungen keine PCR-Produkte detektiert werden.

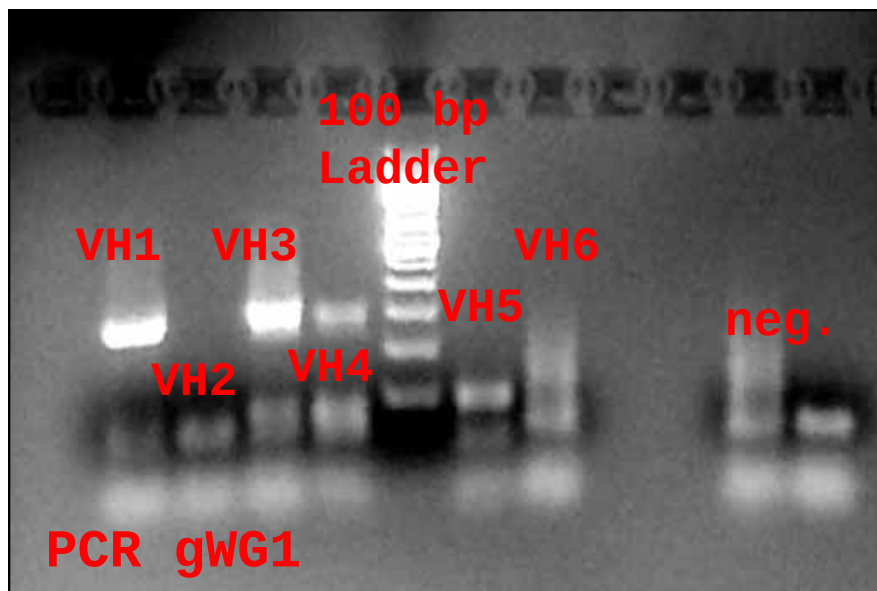


Abb. 10: PCR-Gelelektrophorese von gWG1.

Positiv sind die Banden in einer Höhe von ca. 350 bp bei VH1, VH3 und VH4. Die positive Bande für VH5 wurde in einer anderen PCR detektiert und ist hier nicht dargestellt.

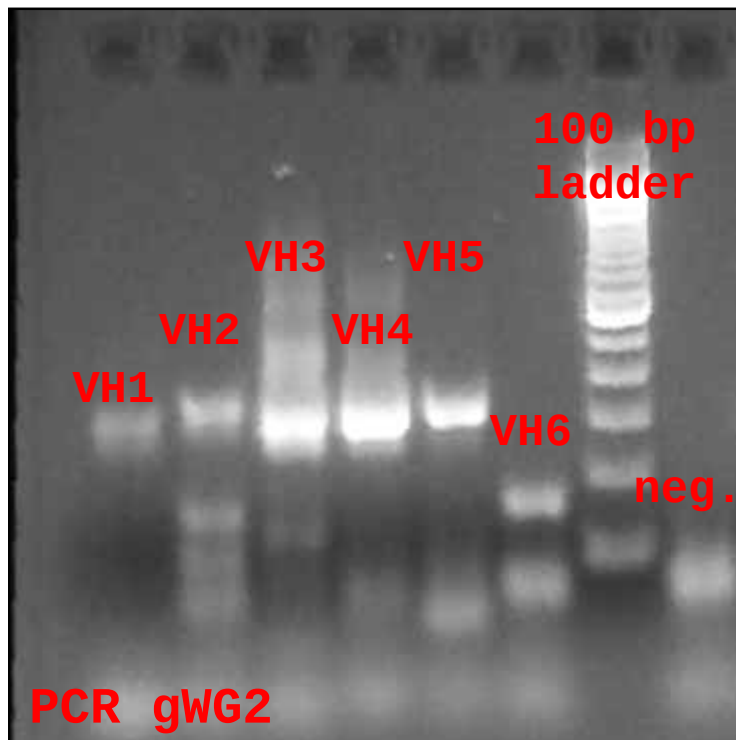


Abb. 11: PCR-Gelelektrophorese von gWG2.

Positiv sind die Banden in einer Höhe von ca. 350 bp bei VH1, VH2, VH3, VH4 und VH5.

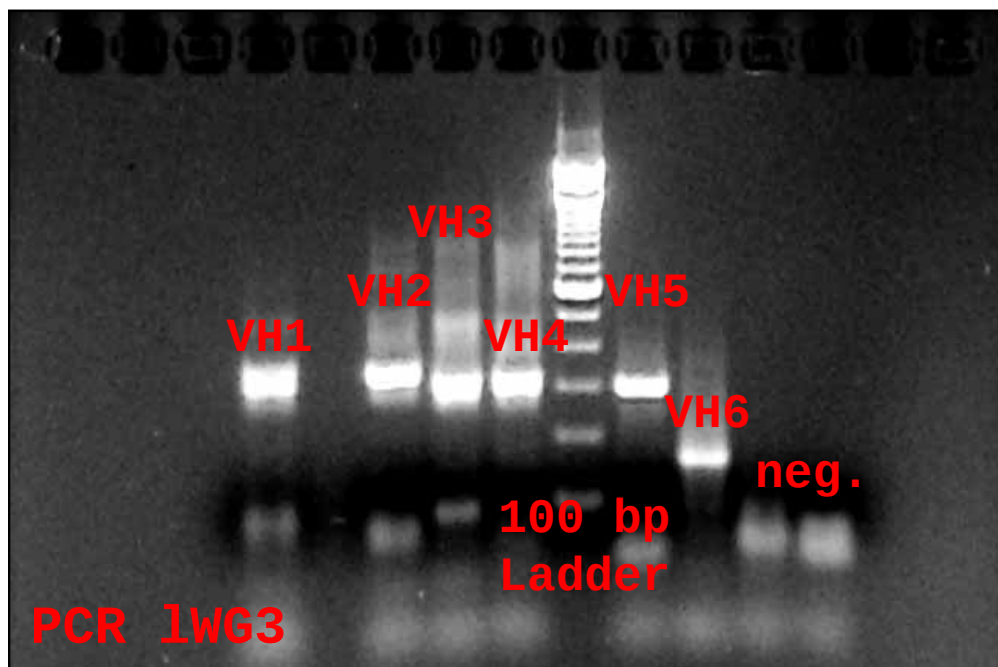


Abb. 12: PCR-Gelelektrophorese von lWG3.

Positiv sind die Banden in einer Höhe von ca. 350 bp bei VH1, VH2, VH3, VH4 und VH5.

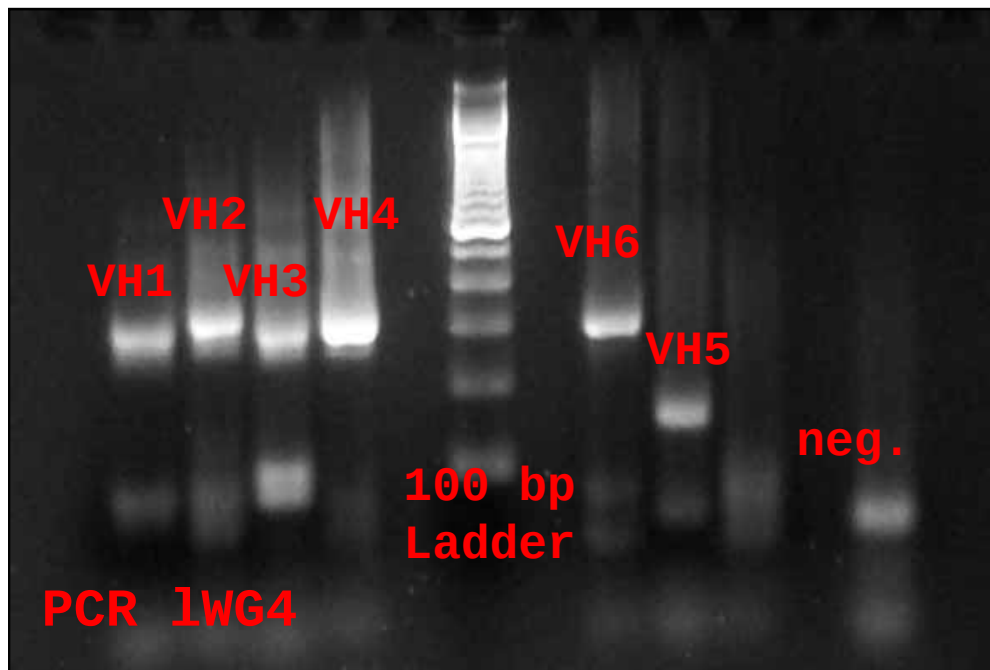


Abb. 13: PCR-Gelelektrophorese von VWG4.

Positiv sind die Banden in einer Höhe von ca. 350 bp bei VH1, VH2, VH3, VH4 und VH6.

6.4 DNA-Klonierung

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt. Anschließend wurden sie mit Hilfe des TOPO-TA Cloning Kit kloniert. Hierbei werden die PCR-Produkte in Plasmide legiert. Diese Plasmide enthalten zusätzlich ein Antibiotikaresistenz-Gen und werden in der Transformation in *E. coli* Bakterien eingeschleust. Die transformierten Bakterien werden auf antibiotikahaltigen Agarplatten und anschließend in flüssigen Nährmedien kultiviert. Von den entstandenen Bakterienkolonien wurden insgesamt bei allen vier Patienten 882 Kolonien der Mini-Präparation, bei der die Plasmide wieder isoliert werden, zugeführt. Mit einem Restriktionsenzym-Verdau mittels EcoR1, einem Enzym welches das Insert wieder aus dem Plasmid ausschneidet, und anschließender Gelelektrophorese wurden bei 647 der 882 Plasmide Inserts detektiert (ein Beispiel einer solchen Gelelektrophorese zeigt Abb. 14). Diese Proben wurden mittels automatischem Sequenzierer sequenziert.

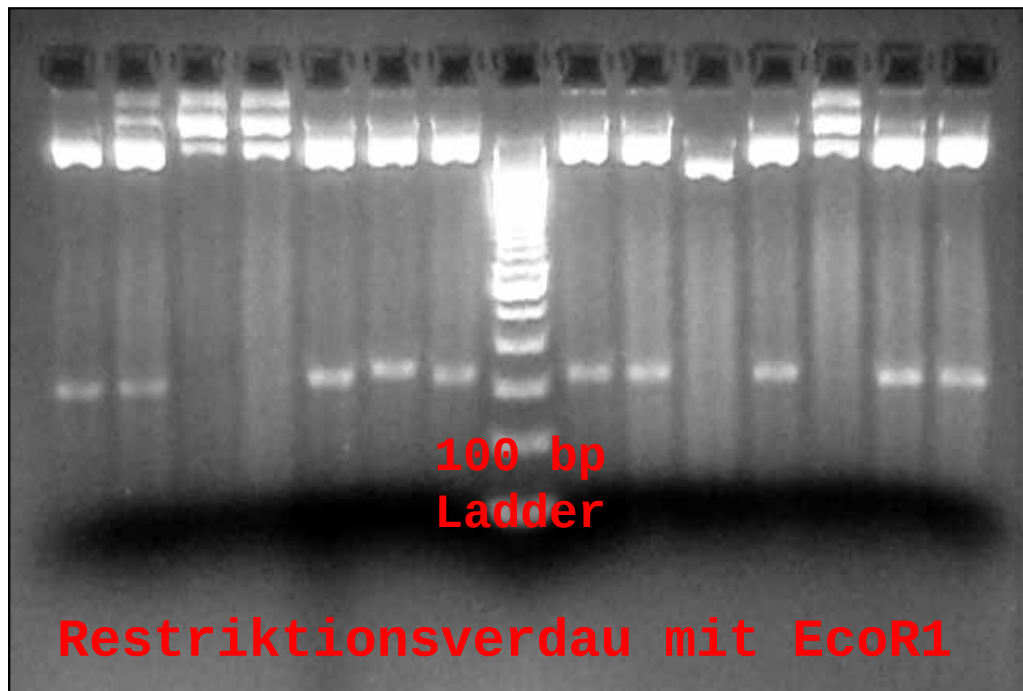


Abb. 14: Beispiel einer Gelelektrophorese nach Restriktionsenzym-Verdau mit EcoR1. Inserts werden durch Banden in einer Höhe von ca. 350 bp angezeigt.

6.5 VH-Gen Charakterisierung

Die Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm DNASIS (Hitachi, Berlin) und der Internetdatenbank IMGT/V-Quest (www.imgt.cines.fr) ausgewertet. Da die meisten Sequenzen mehrfach auftraten, fanden sich in den 647 Inserts 115 individuelle VH-Gene. Alle Sequenzen sind in der Internetdatenbank EMBL Nucleotide Sequence Database (www.ebi.ac.uk/embl) unter den accession numbers AM050894 bis AM051008 veröffentlicht (auch bei PubMed (www.ncbi.nlm.gov) einsehbar). Die VH-Gene wurden untereinander verglichen und mittels IMGT/V-Quest ihrem Keimbahngen zugeordnet. Alle Mutationen in Bezug auf die Keimbahn wurden erfasst, wobei differenziert wurde, ob die Mutationen in den Rahmenregionen (FR) oder in den Antigenbindungsstellen (CDR) lagen und ob sie zu einem Austausch in der Aminosäuresequenz führten oder nicht. Aus den Mutationszahlen berechneten wir die R:S-Werte getrennt für die CDR1 und 2 sowie für die FR. Die mittleren R:S-Werte geben das Verhältnis an von Mutationen, die die Aminosäure verändern (R: replacement) zu Mutationen, die keinen Aminosäurenaustausch bewirken (S: silent). Gesondert betrachtet wurden Austauschmutationen in den CDR1 und 2, die zu einer sauren Aminosäure (Aspartat (D) oder Glutamat (E)) oder zu einer basischen Aminosäure (Arginin (R), Histidin (H) oder Lysin (K)) führten. Weiterhin wurden die Länge und der Aufbau der CDR3 ermittelt und die CDR3 der einzelnen Sequenzen verglichen, um Sequenzen klonalen Ursprungs zu

ermitteln. Gesondert betrachtet wurden nicht-funktionelle Gene, die nicht dem Leseraster entsprachen oder Stop-Codons enthielten. Sie gingen nicht mit in die statistischen Berechnungen ein. Als gesunde Kontrolle dienten 84 VH-Gene von B-Lymphozyten aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders, die das gesunde VH-Gen-Repertoire darstellten. Die Daten entstammten einer Arbeit von Brezinschek (Brezinschek et al., 1995) und wurden nach denselben Gesichtspunkten ausgewertet. Die Tab. 8-12 im Anhang zeigen die Charakteristika der einzelnen VH-Gene, Tab. 13-16 im Anhang zeigen die Charakteristika der einzelnen CDR3, Tab. 2 fasst die Daten und die statistischen Berechnungen für alle vier Patienten und die gesunde Kontrolle zusammen.

	gWG1	gWG2	IWG3	IWG4	Gesunde Kontrolle
Individuelle Gene	20	29	28	38	84
Funktionell rearrangiert	17 (85%)	25 (86%)	27 (96%)	34 (89%)	71 (84%)
Mittlere Mutationsfrequenz	7% (p<0.001)	6% (p<0.001)	6% (p<0.001)	5% (p<0.001)	3%
Mittlere R:S- Werte, CDR	4.9 (n.s.)	2.6 (p=0.09)	3.3 (n.s.)	6.4 (p=0.04)	3.3
Mittlere R:S- Werte, FR	1.7 (n.s.)	1.5 (n.s.)	1.7 (n.s.)	1.4 (p=0.07)	1.9
Mutationen zu E/D, CDR 1+2	5 (29%) (n.s.)	6 (24%) (n.s.)	8 (30%) (p=0.08)	18 (53%) (p=0.00003)	10 (14%)
Mittlere CDR3- Länge	15	16	14	15	12

Tab. 2: VH-Gen Charakterisierung.

Vergleich zwischen VH-Genen aus WG-Granulomen und VH-Genen aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden (Brezinschek et al., 1995). Funktionell rearrangiert sind Gene, die einen potentiell funktionellen Antikörper codieren. R:S-Werte geben das Verhältnis von Mutationen an, die die Aminosäure verändern (R: replacement) zu Mutationen, die keinen Aminosäureaustausch bewirken (S: silent). Mutationen hin zu sauren Aminosäuren (Aspartat (D), Glutamat (E)) verglichen mit der gesunden Kontrolle. CDR, komplementaritätsbestimmende Region; FR, Rahmenregion. Mittlere CDR3-Länge

in Aminosäuren. Alle statistischen Vergleiche beziehen sich nur auf funktionelle Gene. Es wurden die nicht-parametrischen Tests Mann-Whitney U (Mutationsfrequenz und Mutationen hin zu E und D) und Fisher's exact (R:S-Werte CDR und FR) verwendet. p-Werte <0.05 galten als statistisch signifikant, p-Werte in Klammern. n.s., nicht signifikant

Bei den vier Patienten wurden insgesamt 115 individuelle Gene gefunden. Von diesen 115 Genen waren 103 funktionell. 94% dieser Gene waren im Vergleich zu ihrem Keimbahngen mutiert. Im gesunden Repertoire (Brezinschek et al., 1995) waren von den 84 untersuchten Genen 71 Gene funktionell, von diesen waren 66% mutiert. Auch die mittleren Mutationsfrequenzen, die die Anzahl der Mutationen in den Genen widerspiegeln, waren bei allen vier Patienten im Vergleich mit dem Gesunden signifikant erhöht (Tab. 2).

Es fanden sich bei allen Patienten jeweils Gene mit derselben CDR3, die also gleich rearrangiert, aber unterschiedlich mutiert waren. Dabei handelt es sich um verschiedene Mutationsstufen eines Klons, wie sie bei einer antigengesteuerten Affinitätsreifung entstehen. Viele dieser Paare enthielten Mutationen hin zu sauren Aminosäuren (Aspartat (D) oder Glutamat (E)) (Tab. 3-6).

Bei den beiden Patienten mit schleichenden Krankheitsverläufen (gWG2 und IWG3) fanden sich keine Unterschiede zum Gesunden bezüglich der Verteilung der VH-Gensegmente, der R:S-Werte oder der Mutationen hin zu sauren Aminosäuren. Bei den beiden Patienten mit aktiven Krankheitsverläufen (gWG1 und IWG4) waren im Allgemeinen die VH4-Gensegmente und im Einzelnen die VH-Gensegmente VH3-23, VH4-59 und VH4-34 überrepräsentiert. Bei IWG4 waren ferner der R:S-Wert für die CDR und die Anzahl der Mutationen hin zu sauren Aminosäuren signifikant erhöht.

6.6 VH-Gen Charakterisierung von Patient 1 (gWG1)

Bei Patient 1 wurden 162 Kolonien der Mini-Präparation zugeführt, davon enthielten 100 ein Insert. Unter den Inserts wurden nach Sequenzierung und Analyse 20 individuelle VH-Gene gefunden. Von diesen 20 VH-Genen waren 17 (85%) funktionell rearrangiert, das heißt, sie entsprachen dem Leseraster und enthielten keine Stop-Codons.

Die mittlere Mutationsfrequenz war bei den 17 funktionellen VH-Genen mit 7% signifikant höher als bei der gesunden Kontrolle (3%; $p < 0.001$).

Unter den 20 VH-Genen fanden sich 3 VH1-Gene, 8 VH3-Gene, 8 VH4-Gene und 1 VH5-Gene. VH-Gensegmente, die besonders häufig verwendet wurden, waren VH3-23

(4), VH4-59 (4) und VH4-34 (3). Insgesamt wurden zwölf unterschiedliche VH-Gensegmente verwendet. Die nicht-funktionellen Gene verwendeten die Gensegmente VH3-23, VH3-11 und VH3-66.

Bei den R:S-Werten, die sich nur auf funktionelle Gene beziehen, fand sich für die CDR ein Wert von 4.9, für die FR ein Wert von 1.7. Im Vergleich zu der gesunden Kontrolle bestand hier kein signifikanter Unterschied.

Von den 17 funktionellen Genen hatten 5 (29%) in der CDR1 oder 2 Mutationen, die zu sauren Aminosäuren (Aspartat (D) oder Glutamat (E)) führten. Hier bestand kein signifikanter Unterschied zur gesunden Kontrolle, bei der 10 (14%) der 71 funktionellen Gene solche Mutationen trugen. Sieben (41%) Gene bei Patient 1 trugen Mutationen in der CDR1 oder 2, die zu basischen Aminosäuren (Arginin (R), Histidin (H) oder Lysin (K)) führten, bei der Kontrolle waren es 14 (20%).

Die CDR3 bestand im Mittel aus 15 Aminosäuren. Die kürzeste CDR3 von den funktionell rearrangierten VH-Genen hatten St03 und St16 mit 11 Aminosäuren, die längste hatte St120 mit 20 Aminosäuren. 15 der funktionell rearrangierten VH-Gene trugen in der CDR3 D- und J-Segmente, die homolog zu bereits bekannten D- und J-Segmenten waren. Die häufigste Verwendung fanden D3-10, JH4, JH5 und JH6. Bei St03 und St16 konnten keine bekannten Segmente der CDR3 zugeordnet werden. Ferner fanden sich bei zwei Genen ein N-Nukleotid, bei elf Genen fanden sich zwei N-Nukleotide jeweils zwischen VH-Gensegment und D-Segment oder zwischen D-Segment und J-Segment. Bis auf zwei Gene hatten alle ein bis fünf saure Aminosäuren in der CDR3.

Wir fanden bei Patient 1 unter den 20 VH-Genen drei Paare von Genen, die jeweils dieselbe CDR3 hatten, also gleich rearrangiert waren und somit von einem gemeinsamen Klon abstammen. Da sie im Hinblick auf das Keimbahngen unterschiedlich mutiert waren, handelt es sich um verschiedene Mutationsstufen eines Klones. In Abb. 3 sind die drei Paare dargestellt.

	--CDR1--	--CDR2--	----CDR3--
VH3-23:	GFTFSSYA	ISGSGGST	
St 16 :	-----T	-TD--D--	PIPPVLLRFGL
St 03 :	--N-- DDA	-TD--D--	-----
	--CDR1--	-CDR2--	-----CDR3-----
VH4-59:	GGSVSSYY	IYYSGST	
St 37 :	---F-P--	-F-----	ARSGTGNYEGWLD
St 43 :	---FGP--	-F-----	-----
	--CDR1--	-CDR2--	-FR3- -----CDR3-----
VH4-59:	GGSISSYY	IYYSGST	SKNQF
St112 :	----GT-F	-R-N-N-	-R--- ARHGGFGDYVGLAY
St115 :	----GT-F	-R-N-N-	-RD-- -----

Tab. 3: Kurzdarstellung der intraklonalen Diversifizierung bei gWG1.

Beispiele für unterschiedliche Mutationsstufen von B-Zell-Klonen. Aufgeführt sind die Antigenbindungsstellen (CDR1, 2, 3) und Teile der Rahmenregionen (FR). Oben steht das jeweilige Keimbahngen in der Aminosäuresequenz (gemäß gängiger Einbuchstabenabkürzung), darunter die Mutationsstufen mit ihren Austauschmutationen. Gleiche Aminosäuren sind durch Striche gekennzeichnet. Fettgedruckt sind Austauschmutationen hin zu sauren Aminosäuren. Die klonale Verwandtschaft sieht man an der identischen CDR3.

Von den 20 Genen bei Patient 1 waren insgesamt drei nicht-funktionell rearrangiert. Dabei war bei St21 und St22 das Leseraster verschoben, St126 enthielt eine Mutation hin zu einem Stop-Codon in der FR3. Alle drei Gene gingen nicht in die statistischen Analysen ein.

6.7 VH-Gen Charakterisierung von Patient 2 (gWG2)

Bei Patient 2 wurden 324 Kolonien der Mini-Präparation zugeführt, hier enthielten 204 ein Insert. Nach Sequenzierung und Analyse wurden 29 individuelle VH-Gene gefunden. 25 (86%) der VH-Gene waren funktionell.

Auch bei Patient 2 war die mittlere Mutationsfrequenz mit 6% signifikant höher im Vergleich zu der gesunden Kontrolle ($p < 0.001$).

Die VH-Gene waren wie folgt auf die VH-Familien verteilt: fünf VH-Gene gehörten zur VH1-Familie, zwei zur VH2-Familie, 15 zur VH3-Familie, sechs zur VH4-Familie und schließlich gehörte ein VH-Gen zur VH5-Familie. Insgesamt wurden 17 verschiedene

VH-Gensegmente verwendet, dabei wurde das VH-Segment VH3-23 viermal, und damit am häufigsten gefunden. Die nicht-funktionellen Gene verwendeten die Gensegmente VH1-69, VH3-23, VH3-30 und VH4-34.

Bei Patient 2 fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der R:S-Werte im Vergleich zu der gesunden Kontrolle. Für die CDR ergab sich ein Wert von 2.6, für die FR ein Wert von 1.5.

Sechs VH-Gene (24%) trugen in der CDR1 oder 2 Mutationen hin zu sauren Aminosäuren, auch hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zur gesunden Kontrolle. Demgegenüber trugen acht VH-Gene (32%) Mutationen hin zu basischen Aminosäuren in der CDR1 oder 2.

Die CDR3 hatte im Mittel eine Länge von 16 Aminosäuren. Die Längsten waren 26 Aminosäuren lang (Ro101 und Ro151), die Kürzeste war 10 Aminosäuren lang (Ro45). Bei allen funktionellen Genen konnten der CDR3 bekannte D- und J-Segmente zugeordnet werden. Die häufigste Verwendung fanden D3-10 (8) und JH4 (9). Bis auf Ro45 trugen alle Sequenzen ein oder zwei N-Nukleotide zwischen den Segmenten. Bei allen Genen fanden sich zwischen ein und vier saure Aminosäuren in der CDR3.

Unter den 29 VH-Genen befanden sich vier Paare mit jeweils identischer CDR3 und unterschiedlichen Mutationen in der CDR1 und 2 oder der FR, die somit gemeinsamen klonalen Ursprungs waren. Abb. 4 stellt diese vier Paare dar.

VH1-46:	--CDR1-- GYTFTSY	--CDR2-- INPSGGST	-----CDR3----- ARVAGLAGHDNYMDV
Ro85 :	-----H-	---R--RP	
Ro89 :	----I-HD	---R--RP	-----
VH1-8 :	--CDR1-- GYTFTSYD	--CDR2-- MNPNSGNT	-----CDR3----- ARDGKAISLTRGFHLSVEADYPGLDV
Ro101 :	----I-H-	ID---K-	
Ro151 :	--S-ITH-	-D-S--K-	-----
VH3-23:	--CDR1-- GFTFSSYA	FR2->--CDR2-- EWVSAISGSGGST	-----CDR3----- AKFQYYYGSRTPSNWFDP -----
Ro113 :	-----	----D-----	
Ro112 :	--S--TFG	----D-----	-----
VH4-39:	---CDR1--- GGSISSSY	-CDR2-- IYYSGST	----CDR3----- ASSPFVVRGPFDY -----
Ro132 :	-----	-----	
Ro131 :	-----	--T--T-	-----

Tab. 4: Kurzdarstellung der intraklonalen Diversifizierung bei gWG2.

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 3.

Vier Gene waren nicht-funktionell rearrangiert. Drei Gene trugen Stop-codons in der FR3 oder der CDR3 (Ro99, Ro118 und Ro66). Bei einem Gen war das Leseraster verschoben (Ro108).

6.8 VH-Gen Charakterisierung von Patient 3 (IWG3)

Von 182 Kolonien, die bei Patient 3 untersucht wurden, enthielten alle ein Insert. Bei der Analyse fanden wir 28 individuelle VH-Gene, von denen 27 (96%) funktionell waren.

Mit 6% war auch hier die mittlere Mutationsfrequenz signifikant höher als bei der Kontrolle ($p < 0.001$).

Folgende VH-Familien waren vertreten: Acht Gene der VH1-Familie, drei Gene der VH2-Familie, elf Gene der VH3-Familie, vier Gene der VH4-Familie und zwei Gene der VH5-Familie. Es wurden insgesamt 16 verschiedene VH-Gensegmente verwendet, darunter fünfmal das Gensegment VH1-8 und dreimal das Gensegment VH3-21. Das nicht-funktionelle Gen verwendete das Gensegment VH2-70.

Weder der R:S-Wert der CDR (3.3) noch der der FR (1.7) zeigten einen signifikanten Unterschied zur gesunden Kontrolle.

Acht (30%) der 27 funktionellen Gene trugen Mutationen hin zu einer sauren Aminosäure in der CDR1 oder 2. Hier war mit einem $p = 0.08$ kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit dem gesunden Repertoire festzustellen. Zwölf VH-Gene (44%) trugen Mutationen hin zu basischen Aminosäuren in der CDR1 oder 2.

Die mittlere Länge der CDR3 betrug 14 Aminosäuren, dabei war die längste CDR3 23 Aminosäuren lang (Ko207), die kürzeste hatte eine Länge von acht Aminosäuren (Ko137). Bei allen funktionellen Genen konnte der CDR3 jeweils ein bekanntes D-Segment und ein bekanntes J-Segment zugeordnet werden. Bei 20 Genen kamen ein oder zwei N-Nukleotide in der CDR3 vor. Bis auf zwei Gene trugen alle Gene ein bis vier saure Aminosäuren in der CDR3.

Auch bei Patient 3 fanden sich drei Paare von Genen mit jeweils gleichem klonalen Ursprung, die unterschiedlich mutiert waren. Abb. 5 stellt die drei Paare dar.

	--CDR1--	--CDR2--	----CDR3----
VH1-8 :	GYTFTSYD	MNPNSGNT	
Ko76 :	-----	---T--HS	ARPVDTVATNVDY
Ko81 :	-G--ST-A	---T--HS	-----
	--CDR1--	--CDR2--	-----CDR3-----
VH1-8 :	GYTFTSYD	MNPNSGNT	
Ko158 :	-----N-	---K----	ARSGGGPGAAARYLWSDP
Ko198 :	----I-N-	---K----	-----
	---CDR1---	FR2->-CDR2--	----CDR3----
VH4-30:	GGSISSGGYS	EWIGYIYHSGST	
Ko152 :	-----L--	-----	ARGEKGSYDFDS
Ko155 :	-----L--	----E-N-----	-----

Tab. 5: Kurzdarstellung der intraklonalen Diversifizierung bei IWG3.

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 3.

Ein Gen (Ko118) entsprach nicht dem Leseraster und war damit nicht-funktionell.

6.9 VH-Gen Charakterisierung von Patient 4 (IWG4)

Von den 139 untersuchten Bakterienkolonien bei Patient 4 enthielten 127 Plasmide ein Insert. Unter diesen 127 waren 39 individuelle Gene, von denen 34 (89%) funktionell waren.

Die mittlere Mutationsfrequenz war, im Vergleich mit der gesunden Kontrolle, mit 5% signifikant erhöht ($p < 0.001$).

Sechs VH-Gene gehörten zur VH1-Familie, ein Gen zur VH2-Familie, 15 Gene zur VH3-Familie, 14 Gene zur VH4-Familie und zwei Gene gehörten zur VH6-Familie. Besonders häufige Verwendung fanden die VH-Gensegmente VH4-59 (6), VH4-34 (4) und VH3-23 (3). Insgesamt wurden 18 verschiedene VH-Gensegmente verwendet. Die nicht-funktionellen Gene verwendeten die Segmente VH1-46, VH3-33, VH3-49 und VH4-4.

Der R:S-Wert der CDR war bei Patient 4 mit 6.4 signifikant höher als bei der Kontrolle ($p = 0.04$). Dagegen bestand bezüglich des R:S-Wertes der FR (1.4) kein signifikanter Unterschied.

Von den 34 funktionellen Genen trugen 18 (53%) in Bezug auf ihr Keimbahngen Mutationen hin zu sauren Aminosäuren in der CDR1 oder 2. Das bedeutete eine signifikante Erhöhung ($p = 0.00003$) gegenüber der Kontrolle. Zehn Gene (29%) trugen Mutationen hin zu basischen Aminosäuren in der CDR1 oder 2.

Die CDR3-Länge betrug im Mittel 15 Aminosäuren, dabei war die Kürzeste 6 Aminosäuren lang (Scy54), die Längste war 25 Aminosäuren lang (Scy169). Außer zwei Genen (Scy17, Scy132) konnten allen funktionellen Genen bekannte D- und J-Segmente zugeordnet werden. Häufige Verwendung fanden D2-2 (8), D3-10 (4) und D3-3 (4) sowie JH4 (9) und JH6 (11). Unter den Genen, denen bekannte Segmente zugeordnet werden konnten, fand sich in drei Fällen keine Verwendung eines N-Nukleotides. Der Rest verwendete ein oder zwei N-Nukleotide zwischen den Segmenten. Abgesehen von drei Genen fanden sich bei allen ein bis drei saure Aminosäuren in der CDR3.

Auch bei Patient 4 fanden sich unterschiedlich mutierte Gene eines Klonen. So haben Scy37, Scy66 und Scy83 dieselbe CDR3. Bei dem Paar Scy07 und Scy64 ist die CDR3 ebenfalls gleich, allerdings ist Scy64 so stark mutiert in Bezug auf das Keimbahngen VH3-23, dass ihm von der Datenbank IMGT das Keimbahngen VH3-74 zugeordnet wurde. Abb. 6 zeigt die jeweiligen CDR1, 2 und 3.

	--CDR1--	-CDR2--	-----CDR3-----
VH4-59:	GGSISSYY	IYYSGST	
Scy66 :	-----	--N--T-	ARASVIVPVDWFDP
Scy37 :	---F-A--	V--T---	-----
Scy83 :	---LAY--	V--T---	-----
	--CDR1--	--CDR2--	-----CDR3-----
VH3-23:	GFTFSSYA	ISGSGGST	
Scy07 :	-L---T--	-R---DR-	AKGTHSGSFSELD
Scy64 :	-----D-W	-NKD-SV-	-----

Tab. 6: Kurzdarstellung der intraklonalen Diversifizierung bei IWG4.

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 3.

Vier Gene waren nicht-funktionell. Bei Scy142 war das Leseraster verschoben, Scy12, Scy50 und Scy129 hatten jeweils ein Stop-Codon.

7 Diskussion

Die Ätiopathogenese der Wegenerschen Granulomatose (WG) ist bis heute ungeklärt. Anti-Neutrophilen cytoplasmatische Antikörper (ANCA) sind hochspezifisch für die WG und scheinen an ihrer Pathogenese entscheidend beteiligt zu sein. Für das Verständnis der WG und ihrer Pathogenese ist es daher wichtig zu wissen, wo die Reifung von ANCA-produzierenden B-Lymphozyten initiiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das WG-Granulom als Entstehungsort ANCA-produzierender B-Lymphozyten in Frage kommt. Dazu wurden im granulomatösen Gewebe B-Lymphozyten dargestellt und ihr Immunglobulin-Schwerkettenrepertoire untersucht. 115 VH-Gene aus WG-Granulomen von vier Patienten wurden analysiert und mit 84 VH-Genen aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden verglichen. Die Ergebnisse sollen nun Bezug nehmend auf die Fragestellung anhand folgender Einzelfragen diskutiert werden:

1. Sind im Granulom die Voraussetzungen für eine Affinitätsreifung von B-Lymphozyten gegeben?
2. Findet im Granulom eine Affinitätsreifung statt?
3. Wird im WG-Granulom die Bildung von ANCA-produzierenden B-Lymphozyten initiiert?

Sind im Granulom die Voraussetzungen für eine Affinitätsreifung von B-Lymphozyten gegeben?

Die Affinitätsreifung von B-Lymphozyten findet in den Keimzentren der peripheren lymphatischen Organe statt. Obwohl sich die unterschiedlichen peripheren lymphatischen Organe, wie z. B. Lymphknoten oder Milz, deutlich in ihrem Erscheinungsbild unterscheiden, zeigen sie dennoch alle denselben Grundaufbau. Jedes der Gewebe funktioniert nach demselben Prinzip: Antigene werden festgehalten und wandernden kleinen B-Lymphozyten präsentiert, was zur Auslösung der adaptiven Immunantwort führt. Keimzentren sind dabei anatomisch definierte Strukturen, in denen vorwiegend proliferierende B-Lymphozyten von einer Mantelzone mit phänotypisch unterschiedlichen kleinen ruhenden B-Lymphozyten umgeben sind (Liu et al., 1989; MacLennan, 1991). Sie entstehen durch Proliferation und klonale Expansion von aktivierten B-Zentroblasten. Weitere zelluläre Bestandteile des Keimzentrums sind T-Helfer-Zellen, follikulär dendritische Zellen (FDC) und Makrophagen.

Im WG-Granulom finden sich im Wesentlichen Makrophagen, die davon abstammenden Epitheloid- und Riesenzellen sowie aktivierte T-Lymphozyten. Diese Zellpopulationen wurden auch bei der histologischen Begutachtung der vier Gewebeproben der Patienten gefunden. Zusätzlich konnte mittels der CD20-Färbungen bei allen WG-Granulomen (lokalisierten und generalisierten) eine große Anzahl (30-50%) von B-Lymphozyten dargestellt werden. Da CD20 als B-Lymphozyten-spezifisches Oberflächenantigen ab dem Entwicklungsstadium der prä-B-Zelle bis zur Gedächtniszelle exprimiert wird, ist es ein zuverlässiger Marker für reife B-Zellen. Es erlaubt jedoch keine Unterscheidung der einzelnen B-Zell-Populationen oder Aktivierungsgrade. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe fanden sich in zahlreichen endonasalen Granulomen verschiedener WG-Patienten Cluster von B-Zellen, zum Teil in keimzentrumsähnlichen Formationen. Mittels des Oberflächenantigens CD38 konnten Plasmazellen im Granulom dargestellt werden und mit anti-PR3 (WGM2) konnte gezeigt werden, dass sich PR3-exprimierende Zellen im Granulom befinden (Müller et al., 2000; Voswinkel et al., 2006).

Das WG-Granulom beherbergt also in unmittelbarer Nachbarschaft Makrophagen, T-Helferzellen, B-Lymphozyten, Plasmazellen und Zellen, die das „Wegenerische Autoantigen“ PR3 exprimieren. Folglich besteht die Möglichkeit, dass B-Lymphozyten im Granulom an der PR3 als Zielantigen reifen und zu PR3-ANCA-produzierenden Zellen differenzieren. Dies trifft auf Lungengranulome und auf endonasale Granulome sowohl im lokalisierten als auch im generalisierten Stadium zu. Außerhalb der vorformierten sekundären lymphatischen Organe könnte im Granulom der WG somit eine Affinitätsreifung von B-Lymphozyten stattfinden im Sinne eines neuformierten ektopen bzw. tertiären lymphatischen Organes.

Ähnliche Mechanismen sind von anderen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis bekannt. Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) konnte gezeigt werden, dass im entzündlichen Gewebe der arthritischen Gelenke B-Zell-reiche follikuläre Infiltrate mit keimzentrumsähnlicher Struktur auftreten, in denen eine antigengesteuerte B-Lymphozytenreifung mit Expansion und Rezirkulation selektionierter Klone stattfindet (Gause et al., 1995, 1997; Voswinkel et al., 1996, 1999). Auch bei der Spondylitis ankylosans konnte ähnliches beobachtet werden (Voswinkel et al., 2001). Bei den Autoimmunerkrankungen Sjögren Syndrom, Hashimoto Thyroiditis und der Multiplen Sklerose finden sich B-Zell-Infiltrate im Sinne von tertiären lymphatischen Organen außerhalb der präformierten lymphatischen Organe (Mebius, 2003; Drayton et al., 2006).

Findet im Granulom eine Affinitätsreifung statt?

Methodik

Bevor diese Frage anhand der Ergebnisse der Untersuchung diskutiert wird, soll die Methodik, mit der die Ergebnisse erzielt wurden, kritisch beleuchtet werden. Die PCR ist eine elegante und gut etablierte Methode, um genetische Informationen von Zellen zu untersuchen (Küppers et al., 1993, 1994). Bei der Untersuchung des Immunglobulin-Schwerkettenrepertoires erhält man durch die PCR mit den spezifischen Primern fast die gesamte Sequenz zwischen FR1 und FR4 der variablen Schwerkettenregion. Vergleiche mit den bekannten Gensegmenten erlauben dabei sowohl Mutationsanalysen als auch die Analyse des Genrearrangements. Angehörige eines B-Zell-Klons können so an ihrem Rearrangement identifiziert werden, da nur klonal verwandte B-Zellen denselben V-D-J-Übergang haben (Küppers et al., 1993, 1994). Die hier durchgeführte Untersuchung von genomischer DNA hat gegenüber mRNA-Analysen den Vorteil, dass auch die nicht-funktionell rearrangierten Gene erfasst werden. Ferner ermöglicht sie, B-Zell-Infiltrate bezüglich Klonalität und Mutationen unbeeinflusst vom Aktivierungszustand der Zelle zu charakterisieren, während bei mRNA-Analysen zwangsläufig aktivierte B-Zellen und vor allem Plasmazellen bevorzugt werden.

Problematisch ist die eingeschränkte Genauigkeit, mit der die Taq-Polymerase den zweiten Strang synthetisiert. Die PCR erzeugt damit eine bestimmte Anzahl „falscher“ Mutationen (Arnheim und Erlich, 1992). Die Häufigkeit der Fehler ist dabei abhängig von der Anzahl der Zyklen, der Templatemenge und der Konzentration von dNTPs und Magnesium. Die Taq-Fehlerrate (ca. 0.07% bei 35 Zyklen) muss bei jeder Mutationsanalyse berücksichtigt werden und erhöht sich in einer seminested PCR noch durch die zweite Runde.

Durch die PCR kann es bei gemischten Zellpopulationen zu artifizieller Selektion kommen, z. B. wenn kürzere Gene effizienter amplifiziert werden als lange (Arnheim und Erlich, 1992). Stark mutierte Gene können möglicherweise weniger oder gar nicht mehr amplifiziert werden (Küppers et al., 1994; Aubin et al., 1995), auch wenn die Primer an den konservierteren Rahmenregionen binden.

Zudem ist die PCR durch ihre hohe Sensitivität anfällig für Kontaminationen. Ein Vorteil bei der Analyse von rearrangierten Immunglobulingenen ist dabei, dass an den V-D-J-Übergängen Kontaminationen erkannt werden können (Küppers et al., 1994). Bei unseren Experimenten trat eine solche Kontamination auf. Im PCR-Ansatz für VH4 bei Patient 2 fand sich fast ausschließlich ein PCR-Produkt, das identisch mit einem PCR-Produkt von

Patient 1 war. Die gesamte PCR wurde wiederholt und es wurde noch strenger darauf geachtet, die Durchführung der PCR von anderen Arbeiten mit DNA, insbesondere mit Plasmiden, räumlich zu trennen. Es wurden unterschiedliche Pipetten und Zentrifugen verwendet. Danach traten keine Kontaminationen mehr auf.

Auch die Klonierung und die Sequenzierung sind gut etablierte Methoden, die heutzutage standardisiert durchgeführt werden. Da hier DNA kopiert und amplifiziert wird kann es zu artifiziellen Mutationen kommen. Bei der Sequenzierung wurde die Gefahr vermindert, indem mit den Primern M13 uni und M13 rev von beiden Seiten sequenziert wurde und sich somit die Sequenz aus zwei separaten Sequenzreaktionen vergleichen ließ.

Diese Probleme müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, auch wenn die Methoden etabliert sind und zuverlässige Ergebnisse liefern.

Affinitätsreifung

Die Affinitätsreifung beruht auf den Mechanismen somatische Hypermutation, Selektion und klonale Expansion. Durch den Prozess der somatischen Hypermutation kann sich die Affinität der Antikörper zum immunisierenden Antigen um das 10-100fache erhöhen. B-Lymphozyten, die diese Antikörper bilden, werden selektioniert und expandieren klonal (Allen et al., 1987; Kocks und Rajewsky, 1989; Berek und Ziegner, 1993). Typischerweise werden Punktmutationen mit einer Rate von 1×10^{-3} pro Base und Zellgeneration in die variablen Regionen der Antikörper eingefügt. Diese Mutationen führen entweder zu einem Austausch der Aminosäure (replacement mutation (R)) oder bleiben ohne Konsequenz (silent mutation (S)). Die Punktmutationen gelten als Folge molekularer, antigenunabhängiger Prozesse (Dörner et al., 1997). Als alternativer Mechanismus der somatischen Mutation ist die Insertion beziehungsweise Deletion ganzer Aminosäure-kodierender Basentriplets bekannt (Wilson et al., 1998).

Die Reifung der B-Zellen verläuft abwechselnd in Phasen von Expansion ohne Mutation und Mutation mit Selektion (Kepler und Perelson, 1993). B-Zellen durchlaufen diese Zyklen mehrfach, bis sie je nach Affinität ihrer Antikörper zu Plasma- oder Gedächtniszellen reifen oder erneut weitere Zyklen durchlaufen (Oprea und Perelson, 1997). Anhand der Zwischenstufen im Mutationsprozess lässt sich eine zeitliche Abfolge der Mutationsschritte und somit ein Stammbaum der klonalen Entwicklung erstellen (Kocks und Rajewsky, 1989).

Auch wenn keine antigengesteuerte Affinitätsreifung stattfindet, findet man Mutationen im VH-Repertoire. Dabei werden konservierte Gensequenzen durch Selektion favorisiert und B-Zellen mit zahlreichen R-Mutationen werden negativ selektioniert. Das Modell der

negativen Selektion von Austauschmutationen könnte den Organismus vor autoaffinen Antikörpern schützen (Boerretzen et al., 1994). Bei der antigengesteuerten Affinitätsreifung werden Austauschmutationen in den hypervariablen Regionen (CDR) dagegen positiv selektioniert, da sie die Antigenbindung erhöhen können. Typischerweise hat das ein höheres R:S-Verhältnis in der CDR ($R:S > 3$) zur Folge als es durch Zufallsmutationen zu erklären ist (Chang et al., 1994). Zahlreiche R-Mutationen in den Rahmenregionen werden dagegen negativ selektioniert, da sie zur Instabilität führen (Dörner et al., 1997).

Eine Affinitätsreifung lässt sich im VH-Repertoire also an folgenden Merkmalen erkennen: erhöhte Mutationsfrequenz, hohe R:S-Werte in den CDR, niedrige R:S-Werte in den FR und klonale Expansion. Ferner erwartet man ein durch Selektion und klonale Expansion entstandenes oligoklonales VH-Repertoire.

Affinitätsreifung im WG-Granulom

In den WG-Granulomen fand sich ein selektioniertes polyklonales VH-Repertoire. Polyklonal bedeutet, dass sich viele verschiedene VH-Gensegmente und unterschiedliche Rearrangements in den Proben fanden. Im Repertoire fanden sich alle anderen Merkmale einer Affinitätsreifung.

Die mittleren Mutationsfrequenzen der Patienten lagen zwischen 5% und 7% und waren allesamt im Vergleich zur gesunden Kontrolle (3%) signifikant erhöht ($p < 0.001$). Somit handelte es sich in den Granulomen um hochmutierte VH-Gene.

Bezüglich der R:S-Werte zeigte sich ein differenzierteres Bild. Die R:S-Werte für die FR waren bei allen Patienten klein und lagen zwischen 1.4 und 1.7. Die gesunde Kontrolle hatte einen R:S-Wert von 1.9 für die FR, es bestand kein statistischer Unterschied. Die R:S-Werte für die CDR1 und 2 waren bei den beiden Patienten mit aggressiven Krankheitsverläufen mit 4.9 (gWG1) und 6.4 (IWG4) erhöht, wogegen sie bei den Patienten mit schleichenden Krankheitsverläufen niedriger waren und bei 2.6 (gWG2) und 3.3 (IWG3) lagen. Dies legt einen Zusammenhang zwischen Aktivitätsgrad und Affinitätsreifung nahe. Ein signifikanter Unterschied zur gesunden Kontrolle ließ sich nur für IWG4 ($p = 0.04$) feststellen. Auch bei Vorarbeiten an kryokonservierten Nasenbiopsien fanden sich ähnliche R:S-Verteilungen (Voswinkel et al., 2006).

Die klonale Expansion konnte bei allen vier Patienten an Beispielen belegt werden. Hierbei handelte es sich um VH-Gene, die jeweils die gleiche CDR3 aufwiesen, jedoch unterschiedlich im Vergleich zur Keimbahn mutiert waren. Dabei unterschieden sich die beiden Paare St37/St43 und St112/115 nur in jeweils einer R-Mutation, so dass hier eine

artifizielle Mutation durch die Taq-Fehlerrate nicht auszuschließen war. Bei allen anderen Beispielen waren die Unterschiede zu groß, so dass artifizielle Mutationen ausgeschlossen werden konnten. Bei dem klonal verwandten Paar Scy07/Scy64 fanden sich so viele Mutationen, dass eine sichere Zuordnung zu einem Keimbahnen nicht möglich war. Da es sich bei allen Beispielen außer den VH-Genen Scy37/Scy66/Scy83 um Paare von zwei verwandten VH-Genen handelte, konnten keine klonalen Stammbäume erstellt werden.

Auch in Synovialmembranen von Patienten mit RA wurden klonal expandierende und zwischen verschiedenen Gelenken rezirkulierende Klone gefunden. Dies zeigt ebenfalls eine lokalisierte B-Zell-Reifung im Gewebe mit Übergang in eine systemische Autoimmunreaktion (Voswinkel et al., 1996, 1999).

Zusammenfassend trägt das VH-Repertoire aus WG-Granulomen Merkmale einer antigengesteuerten Affinitätsreifung, die offenbar mit der Aktivität der Krankheit korrelieren.

Wird im WG-Granulom die Bildung von ANCA-produzierenden B-Lymphozyten initiiert?

Generell gibt es keine Merkmale, die es erlauben, allein durch die Sequenzanalyse der variablen Schwereketten eine Affinität zu bestimmten Zielantigenen zu beweisen. Es können jedoch Hinweise gesammelt werden, die auf eine solche Affinität hindeuten.

VH-Gensegmente

Aus der Anzahl und Verteilung der verwendeten VH-Gensegmente lassen sich Hinweise auf einen potentiellen Krankheitswert des Repertoires gewinnen (Brezinschek et al., 1995).

Hier zeigte sich bei den VH-Segmenten aus den WG-Granulomen wie schon bei vorherigen Diskussionspunkten ein Unterschied nicht zwischen lokalisierten und generalisierten Krankheitsverläufen, sondern zwischen aggressiven und schleichenden. So zeigte sich bei den schleichenden Krankheitsverläufen (gWG2 und IWG3) ein ausgeglichenes Repertoire mit einem Übergewicht an VH3-Segmenten gefolgt von VH4 und VH1 wie im Gesunden. Keine einzelnen VH-Segmente wurden überproportional häufig verwendet.

Anders im Repertoire der beiden Patienten im aktiven Stadium. Bei beiden Patienten wurden die VH-Segmente VH3-23, VH4-59 und VH4-34 besonders häufig verwendet. Und sowohl für VH3-23, als auch für VH4-59 konnte bei beiden Patienten eine klonale Expansion gezeigt werden. VH3-23 ist eines der meist verwendeten VH-Segmente

überhaupt auch im gesunden Repertoire (Brezinschek et al., 1995). Allerdings wurde es in ähnlich hoch mutierter Form in ANCA-produzierenden B-Zellen nachgewiesen (Sibilia et al., 1997). Es ist ferner bekannt, dass VH3-23 Bestandteile eines Anti-DNA-Antikörpers beim systemischen Lupus erythematoses kodiert (Mahmoudi et al., 1997). VH4-59 ist mit autoaffinen Antikörpern assoziiert und wurde gleichfalls in ANCA-produzierenden B-Zellen nachgewiesen (Sibilia et al., 1997). VH4-34 (vormals VH4.21) ist ebenfalls mit Autoantikörpern assoziiert und eine Überrepräsentation dieses VH-Segments im Autoimmunrepertoire ist vorbeschrieben (Pascual und Capra, 1992a, 1995). VH4-34 kodiert auch in unmutiertem Zustand als einziges VH-Gen Kälteagglutinine (Pascual et al., 1992b).

Für das VH-Repertoire in Autoimmunerkrankungen wurde generell eine Überrepräsentation der VH4-Familie postuliert (Pascual und Capra, 1992a, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass der VH4-Anteil an funktionellen Rearrangements im gesunden Repertoire etwa dem VH4-Anteil auf Chromosom 14 (ca. 22%) entspricht, an nicht-funktionellen Rearrangements hingegen mit bis zu 44% stark erhöht ist. Daraus wurde gefolgert, dass hier eine negative Selektion beim Gesunden stattfindet, die vor Autoimmunität schützen soll (Brezinschek et al., 1997). Auch bei der Rheumatoiden Arthritis findet sich eine Überrepräsentation an VH4-Genen (Voswinkel et al., 1996).

Bei unseren Untersuchungen fanden wir für die beiden schleichenden Krankheitsverläufe und die gesunde Kontrolle einen VH4-Anteil an funktionellen Genen, der in etwa dem zu erwartenden Wert entsprach (gWG2 20%, IWG3 15%, Kontrolle 20%). Bei den Patienten im aktiven Stadium fanden sich dagegen stark vermehrt VH4-Gene (gWG1 47%, IWG4 38%) als Hinweis auf das Vorliegen eines Autoimmunrepertoires.

Bei Patient 4 fanden sich zusätzlich zwei VH-Gene der VH6-Familie, die als einzige Familie nur durch ein einziges VH-Segment (VH6-1) repräsentiert wird. VH6-Gene kodieren Anti-DNA-Antikörper und finden sich in B-Zellpopulationen bestimmter chronisch-lymphatischer Leukämien (Berman et al., 1991).

Das Repertoire der Immunglobuline aus Granulomen bei WG-Patienten mit aktiven und aggressiven Krankheitsverläufen trägt also Kennzeichen eines affinitätsgereiften Repertoires und beinhaltet überproportional viele VH-Segmente, die an ANCA-produzierenden B-Zellen beschrieben wurden.

Initiierung der ANCA-Bildung durch Staphylokokkus aureus B-Zell-Superantigene

Da die Besiedlung der Nasenschleimhaut mit *Staphylokokkus aureus* bei Patienten mit WG mit einer erhöhten Rezidivrate verbunden ist und Trimethoprim-Sulfamethoxazol

(Cotrimoxazol) erfolgreich in der Therapie eingesetzt wird (Reinhold-Keller et al., 1996; Stegemann et al., 1996), wird darüber diskutiert, ob *Staphylokokkus aureus* als initialer Stimulus der ANCA-Reifung in Frage kommt (Popa et al., 2002, 2003). Dabei wird vor allem die Rolle verschiedener *Staphylokokkus aureus* B-Zell-Superantigene wie SED (staphylococcal enterotoxin D) und SpA (staphylococcal protein A) diskutiert. Diese Superantigene zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht an den Antigenbindungsstellen der Immunglobuline, sondern an den konservierten Rahmenregionen binden und so die B-Zellen stimulieren. Interessanterweise besitzen die bei aktiver WG im Granulom überproportional vertretenen VH-Segmente VH4-34 und VH4-59 Bindungsstellen für SED (Domati-Saad et al., 1996). B-Zellen, die VH3-Gene verwenden, werden von SpA stimuliert (Hakoda et al., 1996). Vor dem Hintergrund der klinischen Assoziation von *Staphylokokkus aureus* Besiedlung der Nase und WG-Rezidiven (Popa et al., 2002, 2003) können *Staphylokokkus aureus* B-Zell-Superantigene somit als initialer Stimulus autoreaktiver B-Zellen im Granulom dienen.

Mutationen hin zu sauren Aminosäuren

Neben räumlicher Struktur, Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräften und hydrophoben Kräften sind elektrostatische Kräfte an der Antigen-Antikörper-Bindung beteiligt (Janeway et al., 2002). Elektrostatische Kräfte entstehen dabei durch die Anziehung zwischen entgegengesetzten Ladungen. Charakteristisch für die Antigenbindungsstelle der PR3 sind basische (positiv geladene) Aminosäuren an der Proteinoberfläche (Schultz et al., 1995). Vier verschiedene PR3-ANCA produzierende B-Zell-Linien aus peripherem WG-Patientenblut wurden bezüglich der Immunglobuline mittels EBV-Transformation von Sibilia und Mitarbeitern analysiert. Auffällig war, dass alle anti-PR3-mAbs in Antigenbindenden Regionen (CDR3) jeweils eine oder mehrere saure (negative geladene) Aminosäuren aufwiesen (Sibilia et al., 1997). Hierdurch könnte sich die Affinität zur basischen PR3 erhöhen (Peen und Williams, 2000).

Aufgrund dieser Annahme untersuchten wir die Mutationen hin zu sauren Aminosäuren (Aspartat (D) oder Glutamat (E)) in der CDR1 und 2 sowie die Anzahl saurer Aminosäuren in der CDR3 bei den VH-Genen aus den WG-Granulomen. Für die CDR3 ergab sich folgendes Bild: Von den insgesamt 103 funktionellen Genen befand sich nur bei sieben keinerlei saure Aminosäuren innerhalb der CDR3, bei den anderen fanden sich ein bis fünf saure Aminosäuren in der CDR3. Allerdings unterschied sich das WG-Repertoire hier nicht von der gesunden Kontrolle. Auch hier fanden sich unter den funktionellen Genen (71) nur sieben ohne saure Aminosäuren in der CDR3 und beim Rest

fanden sich ein bis vier. Auch sonst fanden sich bezüglich der CDR3 keine Unterschiede zwischen dem Gesunden und dem WG-Repertoire. Bei den Untersuchungen sowohl der mittleren CDR3-Länge als auch der Verwendung von JH-Segmenten, D-Segmenten und N-Nukleotiden ergaben sich keine Auffälligkeiten.

Bezüglich der CDR1 und 2 hatten 14% der Gene beim Gesunden Mutationen hin zu sauren Aminosäuren. Höhere Prozentzahlen fanden sich bei gWG1 (29%), gWG2 (24%) und IWG3 (30%). Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zum Gesunden. Ferner wurden auch die Mutationen hin zu basischen Aminosäuren untersucht. Bei allen drei Patienten trugen mehr Gene Mutationen zu basischen als zu sauren Aminosäuren. Bei gWG1 und den beiden Patienten mit den schleichenden Krankheitsverläufen lässt sich also keine Tendenz zu sauren Ladungen in den Antigenbindungsstellen feststellen.

Bei IWG4 wiesen hingegen 53% aller funktionellen Gene solche Mutationen auf, es ergab sich somit ein signifikanter Unterschied ($p=0.00003$). Auch fanden sich nur bei 29% der Gene Mutationen zu basischen Aminosäuren. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe an kryokonservierten Geweben konnte für zwei weitere Patienten im aktiven Krankheitsstadium eine signifikante Favorisierung von sauren Aminosäuren in der CDR1 und 2 nachgewiesen werden, wobei bei einem weiteren Patienten im schleichenden Stadium keine Tendenz zu erkennen war (Voswinkel et al., 2006). Es besteht also im aktiven Stadium eine Tendenz zu Mutationen hin zu sauren Aminosäuren, was bedeuten könnte, dass im Granulom ein Selektionsdruck besteht, der saure Aminosäuren begünstigt und so die Bindungsstärke zur PR3 erhöht. Dieser Selektionsdruck scheint mit der Krankheitsaktivität korreliert.

Bei gWG1 zeigt sich diese Tendenz jedoch nicht. Hierbei handelt es sich um das Lungengranulom eines Patienten im aktiven Stadium. Patient 1 stand zum Zeitpunkt der Biopsie unter stark immunsuppressiver Therapie, was die Ergebnisse beeinflusst haben könnte. Möglicherweise spiegelt dieser Unterschied in den Mutationsmustern im Vergleich zu den anderen aktiven Patienten aber auch ein Charakteristikum von Lungengranulomen im Unterschied zu Nasenschleimhaut-Granulomen wieder. Bei der untersuchten Biopsie handelte es sich um ein repräsentatives Resektionspräparat. Dennoch war die Ausbeute an VH-Genen bei dieser Lungenbiopsie schlechter als bei den Nasenbiopsien.

Zusammenfassend tragen die VH-Gene aus Granulomen von WG-Patienten im aktiven Krankheitsstadium Merkmale eines affinitätsgereiften Repertoires. Sowohl die Verteilung der VH-Gene, als auch die Art der Mutationen tragen Merkmale, die an ANCA-

produzierenden B-Zellen dargestellt wurden. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass die Bildung von ANCA-produzierenden B-Lymphozyten im Granulom initiiert wird. Ein Beweis dafür lässt sich mit der verwendeten Methodik jedoch nicht erbringen.

Übersicht und Ausblick

Die vorliegende Arbeit machte erstmals paraffinkonservierte WG-Biopsien der Immunglobulin-Gen-Analyse zugänglich. Da paraffinkonservierte Proben erheblich häufiger zur Verfügung stehen als Kryokonservate kann nunmehr eine erheblich breitere Basis an Geweben untersucht werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung des Immunglobulin-Schwerkettenrepertoires aus WG-Granulomen unterstützen die These, dass das WG-Granulom im Sinne eines tertiären lymphatischen Organs der Ort ist, an dem ANCA-produzierende B-Lymphozyten reifen. In der Untersuchung konnte anhand von Mutationsanalysen und der Darstellung einer intraklonalen Diversifizierung gezeigt werden, dass in WG-Granulomen eine antigengesteuerte Affinitätsreifung stattfindet. Die Merkmale einer Affinitätsreifung waren bei den Patienten im aktiven Krankheitsstadium ausgeprägter als bei Patienten mit schleichenden Krankheitsverläufen. Es konnten sowohl bei der Art der Mutationen, als auch bei der Verteilung der VH-Gene Kennzeichen dargestellt werden, die an PR3-ANCA-produzierenden B-Zellen beschrieben wurden. Es fanden sich darüber hinaus im aktiven Krankheitsstadium Hinweise auf eine Affinitätsreifung am Zielantigen PR3.

Durch eine breite Charakterisierung der B-Zell-Reifung in der WG sollen potentiell krankheitsassoziierte Genmotive detektiert werden, die eine frühere Aussage über den Aktivitätsgrad und eine drohende Generalisierung der Erkrankung ermöglichen.

Um die vorliegenden Strukturuntersuchungen mit der Funktion zu korrelieren ist geplant, mittels Mikrodissektion und Einzelzell-PCR einzelne B-Zellen aus Granulomen zu untersuchen. So erhält man sowohl Schwer- als auch Leichtkettengene. Mit diesen wäre es möglich, einen kompletten Antikörper nachzubauen und dessen Bindung zum Zielantigen PR3 zu analysieren, um so die Bildung hochaffiner Antikörper im Granulom nachzuweisen.

8 Zusammenfassung

Die Wegenersche Granulomatose (WG) beginnt in ihrem typischen Verlauf mit einer granulomatösen Entzündung des Respirationstraktes, ehe sie nach einer variablen Zeitspanne in eine mit Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) assoziierte systemische Vaskulitis mit potentiell organschädigenden und vital-bedrohlichen Manifestationen übergeht. Der Entstehungsort dieser für die WG hochspezifischen Autoantikörper, die gegen das „Wegenersche Autoantigen“ Proteinase 3 (PR3) gerichtet sind, ist bis jetzt unbekannt.

In Wegener-Granulomen des Respirationstraktes fanden sich follikelähnliche B-Lymphozyteninfiltrate, PR3-exprimierende Zellen und Plasmazellen in unmittelbarer Nachbarschaft. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig aus paraffineingebetteten Gewebebiopsien von vier WG-Patienten das Immunglobulin-Schwerketten-(VH)-Repertoire aus Lungen- und Nasenschleimhaut-Granulomen untersucht. 115 individuelle VH-Gene wurden charakterisiert und mit 84 VH-Genen aus dem peripheren Blut eines gesunden Probanden verglichen. Im Vergleich zum Gesunden fanden sich im WG-Repertoire höhere Mutationsfrequenzen. Bei Patienten mit aktiven Krankheitsverläufen fand sich eine größere Anzahl an Austauschmutationen in den antigenbindenden Regionen (CDR) 1 und 2. Darunter waren viele Austauschmutationen hin zu sauren Aminosäuren, die in den Bindungsregionen die Affinität zur basisch geladenen PR3 erhöhen können. Außerdem beobachteten wir mehrfach unterschiedliche Mutationsstufen jeweils eines B-Zell-Klons als Ausdruck klonaler Expansion und intraklonaler Diversifikation wie bei einer antigengesteuerten Affinitätsreifung. Bei Patienten im aktiven Stadium fand sich eine Überrepräsentation der VH4-Familie als Kennzeichen eines autoreaktiven Repertoires. Ferner zeigte sich bei diesen Patienten die überproportionale Verwendung von VH-Genen, die in ähnlich hoch mutierter Form in ANCA-produzierenden B-Zellen charakterisiert wurden. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe an kryokonservierten Geweben.

Bei der WG, vor allem im aktiven Stadium, finden sich somit follikelähnliche B-Zell-Cluster mit einem selektionierten VH-Repertoire sowohl in Granulomen des unteren als auch des oberen Respirationstraktes. Diese Ergebnisse stützen die These, dass das WG-Granulom als neuformiertes ektopes beziehungsweise tertiäres lymphatisches Organ Ort der Autoantigen-Präsentation und Bildung hochaffiner PR3-ANCA sein kann.

9 Literaturverzeichnis

1. Allen D, Cumano A, Dildrop R, Kocks C, Rajewsky K, Rajewsky N, Roes J, Sablitzky F, Siekevitz M: **Timing, genetic requirements and functional consequences of somatic hypermutation during B-cell development.** *Immunol Rev* 96: 5-22 (1987).
2. Arnheim N, Erlich H: **Polymerase chain reaction strategy.** *Annu Rev Biochem* 61: 131-156 (1992).
3. Aubin J, Davi F, Nguyen-Salomon F, Leboeuf D, Debert C, Taher M, Valensi F, Canioni D, Brousse N, Varet B: **Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies.** *Leukemia* 9: 471-479 (1995).
4. Beaudreuil S, Lasfargues G, Laueriere L, El Ghoul Z, Fourquet F, Longuet C, Halimi JM, Nivet H, Buchler M: **Occupational exposure in ANCA-positive patients: a case-control study.** *Kidney Int* 67: 1961-1966 (2005).
5. Berek C, Ziegner M: **The maturation of the immune response.** *Immunol Today* 14: 400-404 (1993).
6. Berman JE, Nickerson KG, Pollock RR, Barth JE, Schuurman RK, Knowles DM, Chess L, Alt FW: **VH gene usage in humans: biased usage of the VH6 gene in immature B lymphoid cells.** *Eur J Immunol* 21: 1311-1314 (1991).
7. Boerretzen M, Randen I, Zdarsky E, Forre O, Natvig JB, Thompson KM: **Control of autoantibody affinity by selection against amino acid replacements in the complementarity-determining regions.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12917-12921 (1994).
8. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, Oost W, Hermans J, Kallenberg CG, Limburg PC, Tervaert JW: **Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study.** *Arthritis Rheum* 43: 2025-2033 (2000).
9. Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE: **Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction.** *J Immunol* 155: 190-202 (1995).
10. Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dorner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE: **Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells.** *J Clin Invest* 99: 2488-2501 (1997).

11. Bühling KJ, Lepenies J, Witt K: **Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie.** Urban & Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 1. Auflage: 57-59 (1995).
12. Campbell EJ, Campbell MA, Owen CA: **Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity and susceptibility to inhibition.** *J Immunol* 165: 3366-3374 (2000).
13. Chang B, Casali P: **The CDR1 sequences of a major proportion of human germline Ig VH genes are inherently susceptible to amino acid replacement.** *Immunol Today* 15: 367-373 (1994).
14. Chapel H, Haeney M: **Essentials of clinical immunology.** Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Paris, Berlin, Wien 3: 210-215 (1993).
15. Choi HK, Lamprecht P, Niles JL, Gross WL, Merkel PA: **Subacute bacterial endocarditis with positive cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-PR3 antibodies.** *Arthritis Rheum* 43: 226-231 (2000).
16. Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G: **Structural repertoire of the human VH segments.** *J Mol Biol* 227: 799-817 (1992).
17. Cook GP, Tomlinson IM: **The human immunoglobulin VH repertoire.** *Immunol Today* 16: 237-242 (1995).
18. Cotch MF, Fauci AS, Hoffman GS: **HLA typing in patients with Wegener's granulomatosis.** *Ann Intern Med* 122: 635 (1995).
19. Csernok E, Ernst M, Schmitt W, Bainton DF, Gross WL: **Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane *in vitro* and *in vivo*.** *Clin Exp Immunol* 95: 244-250 (1994).
20. Czarniecki EJ, Spickler EM: **MR demonstration of Wegener granulomatosis of the infundibulum, a cause of diabetes insipidus.** *AJNR Am J Neuroradiol* 16: 968-970 (1995).
21. De Groot K, Gross WL, Herlyn K, Reinhold-Keller E: **Development and validation of a disease extent index for Wegener's granulomatosis.** *Clin Nephrol* 55: 31-38 (2001).
22. Dörner T, Brezinschek HP, Brezinschek RI, Foster SJ, Domiati-Saad R, Lipsky PE: **Analysis of the frequency and pattern of somatic mutations within**

- nonproductively rearranged human variable heavy chain genes.** *J Immunol* 158: 2779-2789 (1997).
23. Dolman KM, van de Wiel BA, Kam CM, Abbink JJ, Hack CE, Sonnenberg A, Powers JC, von dem Borne AE, Goldschmeding R: **Determination of proteinase 3 - alpha 1-antitrypsin complexes in inflammatory fluids.** *FEBS Lett* 314: 117-121 (1992).
 24. Domiati-Saad R, Attrep JF, Brezinschek HP, Cherrie AH, Karp DR, Lipsky PE: **Staphylococcal enterotoxin D functions as a human B cell superantigen by rescuing VH4-expressing B cells from apoptosis.** *J Immunol* 156: 3608-3620 (1996).
 25. Drayton D, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH: **Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis.** *Nature Immunol* 7: 344-353 (2006).
 26. Elzouki AN, Segelmark M, Wieslander J, Eriksson S: **Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis.** *J Intern Med* 236: 543-548 (1994).
 27. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC: **Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4115-4119 (1990).
 28. Fauci AS, Haynes BF, Katz P, Wolff SM: **Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years.** *Ann Intern Med* 98: 76-85 (1983).
 29. Fienberg R: **The protracted superficial phenomenon in pathergic (Wegener's) granulomatosis.** *Hum Pathol* 12: 458-467 (1981).
 30. Garovic VD, Clarke BL, Chilson TS, Specks U: **Diabetes insipidus and anterior pituitary insufficiency as presenting features of Wegener's granulomatosis.** *Am J Kidney Dis* 37: E5 (2001).
 31. Gause A, Gundlach K, Zdichavsky M, Jacobs G, Koch B, Hopf T, Pfreundschuh M: **The B lymphocyte in rheumatoid arthritis: analysis of rearranged V kappa genes from B cells infiltrating the synovial membrane.** *Eur J Immunol* 25: 2775-2782 (1995).
 32. Gause A, Gundlach K, Carbon G, Daus H, Trumper L, Pfreundschuh M: **Analysis of VH gene rearrangements from synovial B cells of patients with rheumatoid arthritis reveals infiltration of the synovial membrane by memory B cells.** *Rheumatol Int* 17: 145-150 (1997).

33. Gause A, de Groot K, Gross WL: **Wegener'sche Granulomatose – Therapie heute und morgen.** *Kliniker* 31: 142-147 (2002).
34. Griffith ME, Coulthart A, Pemberton S, George AJ, Pusey CD: **Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) from patients with systemic vasculitis recognize restricted epitopes of proteinase 3 involving the catalytic site.** *Clin Exp Immunol* 123: 170-177 (2001).
35. Gross WL: **Primär systemische Vaskulitiden.** *Der Internist* 40: 779-794 / 951-968 / 1194-1215 (1999).
36. Gross WL: **Therapie der Immunvaskulitiden.** 1.Aufl., 1. Kap. S. 13-24, Uni-med, Bremen (2000).
37. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G, Lesavre P, Ludemann J, Rasmussen N, Sinico RA, Wiik A, van der Woude FJ: **Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis.** *Kidney Int* 53: 743-753 (1998).
38. Hakoda M, Kamatani N, Hayashimoto-Kurumada S, Silverman GJ, Yamanaka H, Terai C, Kashiwazaki S: **Differential binding avidities of human IgM for staphylococcal protein A derive from specific germ-line VH3 gene usage.** *J Immunol* 157: 2976-2981 (1996).
39. Han WK, Choi HK, Roth RM, McCluskey RT, Niles JL: **Serial ANCA titers: useful tool for prevention of relapses in ANCA-associated vasculitis.** *Kidney Int* 63: 1079-1085 (2003).
40. Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD, Rottem M, Fauci AS: **Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients.** *Ann Intern Med* 116: 488-498 (1992).
41. Hogan SL, Satterly KK, Dooley MA, Nachman PH, Jennette JC, Falk RJ: **Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol* 12: 134-142 (2001).
42. Huang D, Giscombe R, Zhou Y, Lefvert AK: **Polymorphisms in CTLA-4 but not tumor necrosis factor-alpha or interleukin 1 beta genes are associated with Wegener's granulomatosis.** *J Rheumatol* 27: 397-401 (2000).
43. Iwatani H, Uzu T, Kakihara M, Nakayama Y, Kanasaki K, Yamato M, Hirai Y, Uemimoto K, Yamauchi A: **A case of Wegener's granulomatosis with pulmonary bleeding successfully treated with double filtration plasmapheresis (DFPP).** *Clin Exp Nephrol* 8: 369-374 (2004).

44. James DG: **A clinicopathological classification of granulomatous disorders.** *Postgrad Med J* 76: 457-465 (2000).
45. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: **Immunologie.** *Spektrum Akademischer Verlag* Heidelberg Berlin, 5. Auflage: 101-111, 132-146, 369-387 (2002).
46. Jayne D: **Evidence-based treatment of systemic vasculitis.** *Rheumatology (Oxford)* 39: 585-595 (2000).
47. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CG, McCluskey RT, Sinico RA, Rees AJ, Van Es LA, Waldherr R, Wiik A: **Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference.** *Arthritis Rheum* 37: 187-192 (1994).
48. Keogh KA, Wylam ME, Stone JH, Specks U: **Induction of remission by B lymphocyte depletion in eleven patients with refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis.** *Arthritis Rheum* 52: 262-268 (2005).
49. Kepler TB, Perelson AS: **Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation.** *Immunol Today* 14: 412-415 (1993).
50. Kocks C, Rajewsky K: **Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways.** *Annu Rev Immunol* 7: 537-559 (1989).
51. Küppers R, Zhao M, Rajewsky K, Hansmann ML: **Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction.** *Am J Pathol* 143: 230-239 (1993).
52. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML: **Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10962-10966 (1994).
53. Lamprecht P, Moosig F, Csernok E, Seitzer U, Schnabel A, Mueller A, Gross WL: **CD28 negative T cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis.** *Thorax* 56: 751-757 (2001).
54. Lamprecht P, Voswinkel J, Lilienthal T, Nolle B, Heller M, Gross WL, Gause A: **Effectiveness of TNF-alpha blockade with infliximab in refractory Wegener's granulomatosis.** *Rheumatology (Oxford)* 41: 1303-1307 (2002a).

55. Lamprecht P, Kumanovics G, Mueller A, Csernok E, Komocsi A, Trabandt A, Gross WL, Schnabel A: **Elevated monocytic IL-12 and TNF-alpha production in Wegener's granulomatosis is normalized by cyclophosphamide and corticosteroid therapy.** *Clin Exp Immunol* 128: 181-186 (2002b)
56. Lamprecht P: **Molekulare Pathogenese primärer systemischer Vaskulitiden.** *Akt Rheumatol* 31: 33-40 (2006).
57. Langford CA, Sneller MC: **Update on the diagnosis and treatment of Wegener's granulomatosis.** *Adv Intern Med* 46: 177-206 (2001).
58. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, Calabrese LH, Fries JF, Lie JT, Lightfoot RW, Masi AT, McShane DJ, Mills JA, Stevens MB, Wallace SL, Zvaifler NJ: **The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis.** *Arthritis Rheum* 33: 1101-1107 (1990).
59. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC: **Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres.** *Nature* 342: 929-931 (1989).
60. Lüdemann J, Utecht B, Gross WL: **Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme.** *J Exp Med* 171: 357-362 (1990).
61. Luqmani RA: **Assessing disease in the systemic vasculitides.** *Curr Opin Rheumatol* 14: 23-28 (2002).
62. MacLennan I: **Immunology. The centre of hypermutation.** *Nature* 354: 352-353 (1991).
63. Mahmoudi M, Edwards JY, Bell DA, Cairns E: **V region gene analysis of human IgM hybridoma monoclonal anti-Sm antibodies.** *Lupus* 6: 578-589 (1997).
64. Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma K, Hayashida H, Miyata T, Honjo T: **The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus.** *J Exp Med* 11: 2151-2162 (1998).
65. Mebius RE: **Organogenesis of lymphoid tissues.** *Nat Rev Immunol* 3: 292-303 (2003).
66. Müller A, Trabandt A, Gloeckner-Hofmann K, Seitzer U, Csernok E, Schonermarck U, Feller AC, Gross WL: **Localized Wegener's granulomatosis: predominance of CD26 and IFN-gamma expression.** *J Pathol* 192: 113-120 (2000).

67. Müller A, Holl-Ulrich K, Feller AC, Gross WL, Lamprecht P: **Immune phenomena in localized and generalized Wegener's granulomatosis.** *Clin Exp Rheumatol* 21: S49-54 (2003).
68. Muller Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW: **Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis.** *Br J Rheumatol* 37: 901-907 (1998).
69. Muller Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW: **Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis.** *Ann Rheum Dis* 58: 237-245 (1999).
70. Nguyen T, Martin MK, Indrikovs AJ: **Plasmapheresis for diffuse alveolar hemorrhage in a patient with Wegener's granulomatosis: case report and review of the literature.** *J Clin Apher* 20: 230-234 (2005).
71. Nölle B, Specks U, Lüdemann J, Rohrbach MS, DeRemee RA, Gross WL: **Anticytoplasmic Autoantibodies: their immunodiagnostic value in Wegener granulomatosis.** *Ann Intern Med* 111: 28-40 (1989).
72. Oprea M, Perelson AS: **Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts.** *J Immunol* 158: 5155-5162 (1997).
73. Pascual V, Capra JD: **VH4.21, a human VH gene segment overrepresented in the autoimmune repertoire.** *Arthritis Rheum* 35: 11-18 (1992a).
74. Pascual V, Victor K, Spellerberg M, Hamblin TJ, Stevenson FK, Capra JD: **VH restriction among human cold agglutinins. The VH4.21 gene segment is required to encode anti-I and anti-i specificities.** *J Immunol* 149: 2337-2344 (1992b).
75. Pascual V, Capra JD: **Immunoglobulin heavy chain variable region gene usage in human autoimmune diseases.** *Adv Exp Med Biol* 386: 133-139 (1995).
76. Peen E, Williams RC: **What you should know about PR3-ANCA. Structural aspects of antibodies to proteinase 3.** *Arthritis Res* 2: 255-259 (2000).
77. Pezzato E, Dona M, Sartor L, Dell'Aica I, Benelli R, Albini A, Garbisa S: **Proteinase 3 directly activates MMP-2 and degrades gelatin and Matrigel; differential inhibition by (-)epigallocatechin-3-gallate.** *J Leukoc Biol* 74: 88-94 (2003).
78. Pfister H, Ollert M, Frohlich LF, Quintanilla-Martinez L, Colby TV, Specks U, Jenne DE: **Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic *in vivo*.** *Blood* 104: 1411-1418 (2004).

79. Popa ER, Stegeman CA, Kallenberg CG, Tervaert JW: ***Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis.** *Arthritis Res* 4: 77-79 (2002).
80. Popa ER, Tervaert JW: **The relation between *Staphylococcus aureus* and Wegener's granulomatosis: current knowledge and future directions.** *Intern Med* 42: 771-780 (2003).
81. Radford DJ, Luu NT, Hewins P, Nash GB, Savage CO: **Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells.** *Arthritis Rheum* 44: 2851-2861 (2001).
82. Reinhold-Keller E, de Groot K, Rudert H, Nölle B, Heller M, Gross WL: **Response to trimethoprim/sulfamethoxazole in Wegener's granulomatosis depends on the phase of disease.** *Q J Med* 89: 15-23 (1996).
83. Reinhold-Keller E, Beuge N, Latza U, de Groot K, Rudert H, Nölle B, Heller M, Gross WL: **An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis: long-term outcome in 155 patients.** *Arthritis Rheum* 43: 1021-1032 (2000).
84. Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer R, Gross WL: **Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from the German vasculitis register.** *Arthritis Rheum* 53: 93-99 (2005).
85. Robache-Gallea S, Morand V, Bruneau JM, Schoot B, Tagat E, Realo E, Chouaib S, Roman-Roman S: **In vitro processing of human tumor necrosis factor-alpha.** *J Biol Chem* 270: 23688-23692 (1995).
86. Sarraf P, Sneller MC: **Pathogenesis of Wegener's granulomatosis: current concepts.** *Expert Rev Mol Med* 7: 1-19 (2005).
87. Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD: **Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity towards cultured endothelial cells.** *Am J Pathol* 141: 335-342 (1992).
88. Schmitt WH, Paulsen J, Rudert H, Gross WL: **ANCA-assozierte Vaskulitiden (AAV).** *HNO* 45: 477-491 (1997).
89. Schmitt WH, Hagen EC, Neumann I, Nowack R, Flores-Suarez LF, van der Woude FJ: **Treatment of refractory Wegener's granulomatosis with antithymocyte globulin (ATG): an open study in 15 patients.** *Kidney Int* 65: 1440-1448 (2002).
90. Schreiber A, Luft FC, Kettritz R: **Membrane proteinase3 expression and ANCA-induced neutrophil activation.** *Kidney Int* 65: 2172-2183 (2004).

91. Schultz DR, Tozman EC: **Antineutrophil cytoplasmic antibodies: major autoantigens, pathophysiology and disease associations.** *Semin Arthritis Rheum* 25: 143-159 (1995).
92. Schwartz RS: **Shattuck lecture: diversity of the immune repertoire and immunoregulation.** *N Engl J Med* 348: 1017-1026 (2003).
93. Seo P, Stone JH: **The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides.** *Am J Med* 117: 39-50 (2004).
94. Sibilia J, Benlagha K, Vanhille P, Ronco P, Brouet JC, Mariette X: **Structural analysis of human antibodies to proteinase 3 from patients with Wegener granulomatosis.** *J Immunol* 159: 712-719 (1997).
95. Sneller MC: **Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis.** *Cleve Clin J Med* 69 Suppl 2: SII 40-43 (2002).
96. Specks U: **What you should know about PR3-ANCA. Conformational requirements of proteinase 3 (PR3) for enzymatic activity and recognition by PR3-ANCA.** *Arthritis Res* 2: 263-267 (2000).
97. Specks U, Fervenza FC, McDonald TJ, Hogan MC: **Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy.** *Arthritis Rheum* 44: 2836-2840 (2001).
98. Stegeman CA, Tervaert JW, De Jong PE, Kallenberg CG: **Trimethoprim-sulfamethoxazole (Co-Trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis.** *N Engl J Med* 335: 16-20 (1996).
99. Travis WD, Hoffman GS, Leavitt RY, Pass HI, Fauci AS: **Surgical pathology of the lung in Wegener's granulomatosis. Review of 87 open lung biopsies from 67 patients.** *Am J Surg Pathol* 15: 315-333 (1991).
100. Van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG: **Characterization of monoclonal antibodies to proteinase 3 (PR3) as candidate tools for epitope mapping of human anti-PR3 autoantibodies.** *Clin Exp Immunol* 118: 487-496 (1999).
101. Van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG: **Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen.** *J Leukoc Biol* 69: 177-190 (2001).
102. Voswinkel J, Trümper L, Carbon G, Hopf T, Pfreundschuh M, Gause A: **Evidence for a selected humoral immune response encoded by VH4 family genes in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis (RA).** *Clin Exp Immunol* 106: 5-12 (1996).

103. Voswinkel J, Weisgerber K, Pfreundschuh M, Gause A: **The B lymphocyte in rheumatoid arthritis: recirculation of B lymphocytes between different joints and blood.** *Autoimmunity* 31: 25-34 (1999).
104. Voswinkel J, Weisgerber K, Pfreundschuh M, Gause A: **B lymphocyte involvement in ankylosing spondylitis: the heavy chain variable segment gene repertoire of B lymphocytes from germinal center-like foci in the synovial membrane indicates antigen selection.** *Arthritis Res* 3: 189-195 (2001).
105. Voswinkel J, Mueller A, Kraemer JA, Lamprecht P, Herlyn K, Holl-Ulrich K, Feller AC, Pitann S, Gause A, Gross WL: **B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions.** *Ann Rheum Dis* 65: 859-864 (2006).
106. Watts R, Lane S, Hanslik T, Hauser T, Hellmich B, Koldingsnes W, Mahr A, Segelmark M, Cohen-Tervaert JW, Scott D: **Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies.** *Ann Rheum Dis* 66: 222-227 (2007).
107. Wegener F: **Über generalisierte, septische Gefäßerkrankungen.** *Verh Dtsch Pathol Ges* 29: 202-210 (1936).
108. Wegener F: **Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Niere.** *Beitr Pathol Anat allg Pathol* 102: 36-68 (1939).
109. Williams RC Jr, Staud R, Malone CC, Payabyab J, Byres L, Underwood D: **Epitopes on proteinase-3 recognized by antibodies from patients with Wegener's granulomatosis.** *J Immunol* 152: 4722-4737 (1994).
110. Wilson PC, De Bouteiller O, Liu YJ, Potter K, Banchereau J, Capra JD, Pascual V: **Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes.** *J Exp Med* 187: 59-70 (1998).
111. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC: **Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice.** *J Clin Invest* 110: 955-963 (2002).
112. Zhang Z, Zemlin M, Wang YH, Munfus D, Huye LE, Findley HW, Bridges SL Jr, Roth DB, Burrows PD, Cooper MD: **Contribution of VH gene replacement to the primary B cell repertoire.** *Immunity* 19: 21-31 (2003).

10 Anhang

Alle durchgeführten Untersuchungen sind von der Ethikkommission der Universität Lübeck unter dem Aktenzeichen Az. 01-091 genehmigt.

Tab. 7: Sequenzvergleich und Mutationsanalyse zwischen einem WG-VH-Gen und dem zugehörigen Keimbahngen am Beispiel von Ko166 und seinen zugehörigen Keimbahngen VH1-69, D3-22 und JH4 (aus der Internetdatenbank IMGT/V-Quest). Dargestellt ist die gesamte Sequenz zwischen FR1 und FR4. In der ersten Reihe findet sich die Aminosäuresequenz (aa) von Ko166 gemäß der gängigen Einbuchstabenabkürzung. Darunter die Nukleinsäuresequenz gemäß der gängigen Abkürzung in Basentriplets. In den Reihen drei und vier finden sich die entsprechenden Sequenzen der Keimbahngene. Gleiche Basen sind durch Striche dargestellt. Eingefügte N-Nukleotide sind gekennzeichnet. Mutationen sind fettgedruckt.

aa
Ko 166:
aa
VH1-69:

	<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
aa	S V K V S C K A
Ko 166:	CC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT
aa	K P G S S
VH1-69:	AAG CCT GGG T-- -- G --- --- --- --- --- --- ---

	FR1<	x	CDR1	xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx	CDR1	x	<FR2<<<<<<					
aa	S	G	G	T	F	N	D	Y	I	I	S	W
Ko 166:	TCT	GGA	GGC	ACC	TTC	AAC	GAC	TAT	ATT	ATC	AGC	TGG
aa						S	S		T			
VH1-69:	---	---	---	---	---	-G-	AG-	---	-C-	---	---	---

```
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
aa      V   R   Q   A   P   G   Q   G   L   E   W   M
Ko 166: GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAG GGG CTT GAG TGG ATG
aa             Q
VH1-69: --- --- --- --- --- --A--- --- ---
```


Tab. 8-12: Charakteristika der einzelnen VH-Gene.

Die Homologie gibt in Prozent an, wie viele Nukleinsäuren mit dem angegebenen Keimbahngen identisch sind. In absoluten Zahlen sind angegeben die Austauschmutationen (R) und die stillen Mutationen (S), getrennt für komplementaritätsbestimmende Region (CDR1 und 2) und Rahmenregion (FR), sowie Mutationen hin zu sauren Aminosäuren (E, D) und basischen Aminosäuren (R, H, K) in CDR1 und 2. Die sauren Aminosäuren in der CDR3 sind getrennt aufgeführt. Die CDR3-Länge ist in Aminosäuren angegeben. Anmerkungen beziehen sich auf klonale Verwandtschaft oder Funktionalität. Nicht-funktionelle VH-Gene sind kursiv gekennzeichnet. Fehlende Daten konnten nicht erhoben werden.

Tab. 8: Charakteristika der VH-Gene von Patient 1 (gWG1).

VH Gen	Keimbahn-gen	Homo-logie	C D R				F R		C D R3	CDR3-Länge	Anmerkung
		(% zur Keimbahn)	R	E/D	R/H/K	S	R	S	E/D	(Aminosäuren)	
St59	1-69	92	4	0	0	2	8	6	2	15	
St81	1-2	94	3	1	1	2	8	2	2	12	
St96	1-18	95	2	0	1	0	6	4	5	17	
St01	3-23	98	0	0	0	2	3	0	1	13	
St16	3-23	94	4	2	0	2	7	3	0	11	verwandt mit St03
St03	3-23	90	6	4	0	2	8	4	0	11	verwandt mit St16
St22	3-23										nicht funktionell
St21	3-11										nicht funktionell
St13	3-30	100	0	0	0	0	1	0	2	17	
St11	3-9	99	0	0	0	0	2	0	1	16	
St126	3-66	91	4	0	1	2	11	3	0	7	nicht funktionell
St35	4-4	92	6	0	2	2	5	5	2	15	
St37	4-59	91	3	0	0	0	8	8	2	14	verwandt mit St43
St43	4-59	90	4	0	0	0	8	8	2	14	verwandt mit St37
St44	4-34	90	7	1	2	1	6	7	2	20	
St112	4-59	90	6	0	1	0	8	7	1	14	verwandt mit St115
St115	4-59	90	6	0	1	0	9	7	1	14	verwandt mit St112
St120	4-34	90	8	2	0	1	10	3	1	20	
St127	4-34	92	5	0	2	0	9	4	1	16	
St57	5-51	95	4	0	0	0	9	0	1	12	

Tab. 9: Charakteristika der VH-Gene von Patient 2 (gWG2).

VH Gen	Keimbahn-gen	Homologie	C D R				F R		C D R3	CDR3-Länge	Anmerkung
		(% zur Keimbahn)	R	E/D	R/H/K	S	R	S	E/D	(Aminosäuren)	
Ro85	1-46	94	4	0	3	1	5	4	2	16	verwandt mit Ro89
Ro89	1-46	92	6	1	3	2	6	5	2	16	verwandt mit Ro85
Ro99	1-69	88	3	2	0	2	15	0	2	20	nicht funktionell
Ro101	1-8	91	5	1	2	1	10	4	4	26	verwandt mit Ro151
Ro151	1-8	89	7	1	2	0	13	7	4	26	verwandt mit Ro101
Ro92	2-5	95	5	0	0	0	2	4	2	15	
Ro119	2-5	90	3	0	0	0	10	9	1	19	
Ro39	3-30	90	4	1	0	2	11	5	1	13	
Ro22	3-9	93	2	0	0	2	11	2	1	13	
Ro45	3-53	100	0	0	0	0	0	0	2	10	
Ro34	3-53	91	3	0	0	2	6	6	2	20	
Ro38	3-21	93	5	0	1	2	5	4	1	13	
Ro24	3-48	88	6	1	3	3	12	2	2	13	
Ro47	3-9	88	2	0	0	4	16	7	2	13	
Ro108	3-30										nicht funktionell
Ro109	3-30	96	4	0	1	0	3	3	1	18	
Ro113	3-23	99	0	0	0	1	1	0	1	18	verwandt mit Ro112
Ro112	3-23	95	4	0	0	3	3	1	1	18	verwandt mit Ro113
Ro114	3-11	93	3	0	2	1	3	9	2	13	
Ro115	3-23	96	2	0	0	1	2	5	3	22	
Ro118	3-23	91	6	1	3	1	11	3	2	16	nicht funktionell
Ro179	3-33	95	2	0	0	2	3	5	1	18	
Ro75	4-4	96	1	0	0	0	4	4	1	12	
Ro66	4-34	98	1	0	0	0	1	4	3	21	nicht funktionell
Ro132	4-39	100	0	0	0	0	1	0	1	13	verwandt mit Ro131
Ro131	4-39	97	2	0	0	1	3	1	1	13	verwandt mit Ro132
Ro133	4-39	89	5	0	0	2	12	7	2	18	
Ro230	4-61	93	5	1	0	1	6	5	2	15	
Ro13	5-a03	96	2	0	0	1	4	2	1	19	

Tab. 10: Charakteristika der VH-Gene von Patient 3 (IWG3).

VH Gen	Keimbahn-gen	Homo-logie	C D R				F R		C D R3	CDR3-Länge	Anmerkung
		(% zur Keimbahn)	R	E/D	R/H/K	S	R	S	E/D	(Aminosäuren)	
Ko76	1-8	93	3	0	1	1	9	4	2	12	verwandt mit Ko81
Ko81	1-8	89	7	0	1	2	11	5	2	12	verwandt mit Ko76
Ko77	1-69	93	4	0	0	2	6	6	1	16	
Ko158	1-8	98	2	0	1	0	0	4	1	18	verwandt mit Ko198
Ko198	1-8	97	3	0	1	0	1	3	1	18	verwandt mit Ko158
Ko166	1-69	95	6	2	0	0	4	3	3	15	
Ko169	1-18	93	5	2	0	3	7	2	4	19	
Ko197	1-8	97	2	0	1	0	2	4	1	10	
Ko116	2-5	97	2	1	0	1	3	3	2	13	
Ko118	2-70										nicht funktionell
Ko170	2-5	95	3	0	0	1	6	3	1	13	
Ko01	3-30	89	8	0	1	0	8	4	3	14	
Ko10	3-21	93	5	1	1	3	6	2	1	18	
Ko22	3-9	96	0	0	0	0	4	4	1	10	
Ko135	3-30	91	3	0	0	2	7	5	2	13	
Ko137	3-7	92	6	0	3	2	6	5	1	8	
Ko202	3-11	94	5	1	2	2	3	3	2	19	
Ko203	3-21	90	6	1	1	1	10	5	2	14	
Ko204	3-21	94	6	1	1	1	5	1	3	14	
Ko205	3-23	93	4	1	0	1	7	2	0	10	
Ko207	3-49	99	0	0	0	0	2	0	1	23	
Ko208	3-7	97	3	0	0	1	2	0	0	11	
Ko47	4-61	93	5	0	1	0	7	5	4	22	
Ko150	4-34	93	4	0	0	1	7	1	1	17	
Ko152	4-30	96	1	0	0	1	4	3	3	12	verwandt mit Ko155
Ko155	4-30	95	2	0	0	1	6	3	3	12	verwandt mit Ko152
Ko123	5-51	100	0	0	0	0	1	0	1	9	
Ko176	5-51	95	2	0	0	3	6	2	2	18	

Tab. 11: Charakteristika der VH-Gene von Patient 4 (IWG4).

VH Gen	Keimbahn-gen	Homo-logie	C D R				F R		C D R3	CDR3-Länge	Anmerkung
		(% zur Keimbahn)	R	E/D	R/H/K	S	R	S	E/D	(Aminosäuren)	
Scy133	1-2	95	3	1	1	0	5	4	2	21	
Scy139	1-69	95	3	1	0	0	5	5	3	17	
Scy141	1-3	96	5	0	2	0	3	1	2	20	
Scy142	1-46										nicht funktionell
Scy147	1-2	93	3	1	1	0	9	1	3	11	
Scy132	1-3	93	4	1	1	1	8	5	3	11	
Scy163	2-70	100	0	0	0	0	0	0	1	19	
Scy60	3-48	95	4	1	0	0	6	1	1	20	
Scy07	3-23	92	5	1	2	3	6	5	2	14	verwandt mit Scy64
Scy54	3-23	95	6	0	0	0	2	3	0	6	
Scy49	3-23	96	1	0	0	3	5	1	1	12	
Scy03	3-74	92	6	0	1	2	3	4	2	10	
Scy53	3-11	94	3	1	0	1	5	6	3	11	
Scy01	3-11	100	0	0	0	0	0	1	3	12	
Scy08	3-11	98	0	0	0	0	2	3	1	13	
Scy17	3-43	91	4	2	0	2	9	4	3	11	
Scy50	3-33	98	1	1	0	1	2	1	1	11	nicht funktionell
Scy61	3-33	96	5	0	1	0	3	3	3	16	
Scy12	3-49	97	0	0	0	2	6	0	3	20	nicht funktionell
Scy59	3-49	93	5	1	0	0	3	6	0	14	
Scy64	3-74	90	3	1	1	0	8	9	2	14	verwandt mit Scy07
Scy65	3-64	98	1	0	0	0	4	1	0	8	
Scy25	4-34	98	1	1	0	0	2	2	1	12	
Scy37	4-59	95	4	0	0	1	4	4	2	14	verwandt mit Scy66,83
Scy66	4-59	97	2	0	0	0	6	0	2	14	verwandt mit Scy37,83
Scy83	4-59	93	5	0	0	0	4	6	2	14	verwandt mit Scy37,66
Scy69	4-39	95	5	0	0	0	6	2	2	21	
Scy73	4-39	99	1	0	0	0	1	0	1	17	
Scy74	4-59	97	3	1	0	0	3	1	3	18	
Scy75	4-34	91	3	1	0	1	10	4	2	19	
Scy78	4-34	97	1	1	0	0	2	6	1	14	
Scy86	4-59	97	3	1	0	1	1	3	3	17	
Scy109	4-39	96	4	1	0	0	4	1	1	12	
Scy111	4-59	95	5	2	0	0	6	3	3	22	
Scy128	4-34	98	0	0	0	0	2	1	3	18	
Scy129	4-4	95	2	0	0	1	6	2	1	11	nicht funktionell
Scy169	6-1	99	1	0	1	0	0	1	2	25	
Scy175	6-1	95	4	1	1	1	6	2	2	12	

Tab. 12: Charakteristika der VH-Gene der gesunden Kontrolle (Brezinschek et al., 1995).

VH Gen	Keimbahn- gen	Homo- logie	C D R				F R		C D R3	CDR3- Länge	Anmerkung
		(% zur Keimbahn)	R	E/ D	R/ H/ K	S	R	S	E/ D	(Amino- säuren)	
B7-g1A11	1-46/DP-7	100	0	0	0	0	0	0	2	12	
B7-g1A03	1-2/DP-75	99	2	0	0	0	0	0	1	10	
B7-g1B07	1-8/DP-15	98	0	0	0	0	3	0	1	2	
B8-g1C04	1 -2/DP-75	100	1	0	0	0	0	0	1	25	
B8-g1 E04	1-69/DP- 10/hv1263	100	0	0	0	0	0	0	3	9	
B8-g1F03	1 -24/DP-5	100	0	0	0	0	0	0	2	14	
B8-g1G04	1-8/DP-15	100	0	0	0	0	0	0	2	16	
B8-g1G09	1-18/DP-14	100	0	0	0	0	0	0	3	7	
B8-g1H02	1-8/DP-15	93	5	0	1	0	10	4	2	21	
B7-g2B01	2-5/DP-76	90	3	0	0	5	10	7	0	09	
B8-g2F09	2-5/DP-76	98	2	0	0	0	1	1	1	15	
B8-g2G08	2-26/DP-26	99	1	1	0	0	1	0	2	18	
B7-g3A01	3-53/DP-42	98	0	0	0	0	2	1	1	17	
B7-g3A05	3-23/DP-47	100	0	0	0	0	0	0	0	13	
B7-g3A10	3-30.3/DP- 46	100	0	0	0	1	0	0	2	12	
B7- g3A11np	3-23/DP-47	99	3			0	0	0		19	nicht funktionell
B7-g3B02	3-15/DP-38	97	2	0	1	0	5	2	3	15	
B7-g3B03	3-23/DP-47	100	0	0	0	0	0	0	1	14	
B7-g3B05	3-53/DP-42	98	1	0	0	0	3	1	3	19	
B7-g3B06	3-15/DP-38	99	0	0	0	0	1	1	3	19	
B7-g3C03	3-7/DP-54	100	0	0	0	0	0	1	2	18	
B7- g3C05np	3-74/DP-53	86	10			1	14	4		24	nicht funktionell
B7-g3C12	3-30.3/DP- 46	98	3	0	0	0	2	0	2	21	
B7-g3D07	3-30/DP-49	89	8	0	2	0	12	1	0	13	
B7-g3D12	3-49RB	99	0			0	2	0		16	
B7-g3E01	3-49RB	99	0	0	0	0	2	0	1	11	
B7-g3E03	3-7/DP-54	98	2	0	1	0	1	1	1	7	
B7-g3E11	3-49RB	99	0	0	0	0	2	1	0	7	
B7-g3F02	3-23/DP-47	94	4	1	0	1	7	3	2	17	
B7-g3F10	3-23/DP-47	99	1	0	0	0	1	1	4	17	
B7-g3G02	3-7/DP-54	92	3	0	2	2	8	4	1	10	
B7-g3G04	3-48/DP-51	100	1	0	0	0	0	0	3	17	
B8-g3B01	3-23/DP-47	97	1	0	0	0	5	2	1	6	
B8-g3B07	3-30/DP-49	96	2	0	1	1	4	3	3	13	
B8-g3B08	3-21/DP-77	90	7	1	0	3	8	5	2	10	
B8-g3C07	3-23/DP-47	89	8	4	1	1	9	5	1	15	
B8-g3C08	3-23/DP-47	93	5	0	0	2	3	7	3	12	
B8-g3C09	3-23/DP-47	99	1	1	0	1	0	0	1	7	
B8-g3C11	3-30/DP-49	99	1	0	0	0	0	1	2	9	
B8-g3C12	3-23/DP-47	92	9	0	1	0	7	3	1	13	
B8- g3D01np	3-7/DP-54	98	2			0	1	1		16	nicht funktionell
B8-g3D03	3-53/DP-42	98	0	0	0	0	2	1	1	19	

B8-g3D04	3-53/DP-42	91	5	0	1	3	6	4	2	10	
B8-g3D07	3-49RB	98	1	0	0	1	3	1	1	15	
B8-g3D08	3-53/DP-42	100	0	0	0	0	0	0	2	17	
B8-g3E02	3-74/DP-53	93	5	0	1	2	4	3	2	20	
B8-g3E03	3-9/DP-31	100	0	0	0	0	0	1	1	14	
B8-g3F03	3-30/DP-49	94	4	1	2	0	5	4	1	11	
B8-g3F03np	3-53/DP-42	92	7			0	10	3		15	nicht funktionell
B8-g3F04np	3-23/DP-47	94	6			1	7	0		18	nicht funktionell
B8-g3F05	3-33/DP-50	90	6	0	0	1	10	4	2	9	
B8-g3F12	3-23/DP-47	98	2	0	0	0	3	0	3	12	
B8-g3G01	3-23/DP-47	97	3	1	0	0	3	2	1	12	
B8-g3G03	3-30/DP-49	99	0	0	0	1	1	1	3	11	
B8-g3G05	3-23/DP-47	98	2	0	1	1	1	1	2	12	
B8-g3G07np	3-11/DP-35	100	0			0	0	0		8	nicht funktionell
B8-g3G08np	3-30/DP-49	99	1			0	1	0		16	nicht funktionell
B8-g3G10	3-33/DP-50	100	0	0	0	0	0	1	4	14	
B8-g3H01	3-30/DP-49	94	6	1	1	4	5	5	3	19	
B8-g3H08np	3-11/DP-35	100	0			0	0	1		14	nicht funktionell
B7-g4A07	4-39/DP-79	100	0	0	0	0	0	0	1	11	
B7-g4A08	4-4b/DP-70	100	0	0	0	0	1	0	0	17	
B7-g4A08np	4-34/DP-63	100	1			0	1	0		22	nicht funktionell
B7-g4C05	4-4b/DP-70	95	4	0	0	2	4	3	2	17	
B7-g4D09	4-31/DP-65	99	0	0	0	0	1	0	2	16	
B7-g4E01np	4-59/DP-71	99	0			0	2	1		31	nicht funktionell
B7-g4F08	DP-78	100	0	0	0	0	1	0	4	18	
B7-g4G07	4-4	100	0	0	0	0	0	0	2	16	
B8-g4B07np	4-31/DP-65	89	8			2	13	2		17	nicht funktionell
B8-g4C02	4-34/DP-63	100	0	0	0	0	0	0	1	17	
B8-g4E01	DP-71RB	95	4	1	0	1	5	1	2	13	
B8-g4E05	4-4	100	0	0	0	0	0	0	2	11	
B8-g4E10	4-4b/DP-70	97	2	0	1	2	3	1	1	9	
B8-g4F06np	4-4b/DP-70	100	0			0	1	0		10	nicht funktionell
B8-g4F11	DP-71RB	99	1	0	0	0	2	0	1	17	
B8-g4G01np	4-59/DP-71	95	3			0	5	3		12	nicht funktionell
B8-g4G11	DP-71RB	97	3	1	0	1	2	0	2	12	
B8-g4H09	4-39/DP-79	99	0	0	0	0	3	0	0	11	
B8-g4H10	4-34/DP-63	100	0	0	0	0	1	0	2	20	
B7-g5G03	5-51/DP-73	100	0	0	0	0	0	0	2	18	
B8-g5B10	5-51/DP-73	99	1	0	0	1	0	0	3	6	
B8-g5D10	5-51/DP-73	100	0	0	0	0	0	0	1	19	
B8-g5H08	5-51/DP-73	100	0	0	0	0	0	0	0	13	
B8-g6D12	6-1/DP-74	96	2	0	0	1	4	2	1	8	

Tab. 13-16: CDR3-Charakteristika der einzelnen VH-Gene.

Aufgeführt sind das verwendete D-Segment, das verwendete JH-Segment, die Anzahl der N-Nukleotide sowie die CDR3-Länge in Aminosäuren. Nicht-funktionelle Gene sind kursiv gekennzeichnet. Fehlende Daten konnten nicht erhoben werden.

Tab. 13: CDR3-Charakteristika von Patient 1 (gWG1).

VH-Gen	D	JH	N	CDR3-Länge		VH-Gen	D	JH	N	CDR3-Länge
St59	6-6	6	2	15		<i>St126</i>		5		7
St81	3-10	4	2	12		St35	6-6	5	2	15
St96	1-1	3	2	17		St37	1-26	5	2	14
St01	5-12	5	2	13		St43	1-26	5	2	14
St16				11		St44	3-3	6	1	20
St03				11		St112	4-17	5	2	14
St22						St115	4-17	5	2	14
<i>St21</i>						St120	3-10	4	2	20
St13	1-14	6	1	17		St127	3-10	5	2	16
St11	2-2	4	0	16		St57	3-10	4	0	12

Tab. 14: CDR3-Charakteristika von Patient 2 (gWG2).

VH-Gen	D	JH	N	CDR3-Länge		VH-Gen	D	JH	N	CDR3-Länge
Ro85	3-3	6	1	16		Ro109	5-5	6	1	18
Ro89	3-3	6	1	16		Ro113	3-10	5	2	18
<i>Ro99</i>				20		Ro112	3-10	5	2	18
Ro101	3-10	6	2	26		Ro114	2-2	4	1	13
Ro151	3-10	3	2	26		Ro115	3-3	6	2	22
Ro92	3-10	5	2	15		<i>Ro118</i>				16
Ro119	3-16	5	2	19		Ro179	3-10	5	2	18
Ro39	2-8	4	2	13		Ro75	4-4	4	2	12
Ro22	3-22	4	2	13		<i>Ro66</i>				21
Ro45	5-24	3	0	10		Ro132	3-10	4	2	13
Ro34	6-19	2	2	20		Ro131	3-10	4	2	13
Ro38	2-8	4	2	13		Ro133	3-22	4	2	18
Ro24	6-13	1	1	13		Ro230	1-26	2	2	15
Ro47	3-22	4	2	13		Ro13	6-19	6	2	19
<i>Ro108</i>										

Tab. 15: CDR3-Charakteristika von Patient 3 (IWG3).

VH-Gen	D	JH	N	CDR3-Länge		VH-Gen	D	JH	N	CDR3-Länge
Ko76	5-24	4	0	12		Ko135	2-21	4	1	13
Ko81	5-24	4	0	12		Ko137	2-8	5	1	8
Ko77	3-3	6	2	16		Ko202	3-16	6	2	19
Ko158	2-15	5	2	18		Ko203	4-23	5	2	14
Ko198	2-15	5	2	18		Ko204	2-15	6	1	14
Ko166	3-22	4	2	15		Ko205	2-8	5	1	10
Ko169	3-10	6	2	19		Ko207	2-15	5	2	23
Ko197	3-10	5	0	10		Ko208	4-23	1	1	11
Ko116	6-13	4	0	13		Ko47	1-7	6	1	22
Ko118						Ko150	2-2	4	2	17
Ko170	1-1	5	2	13		Ko152	1-26	4	0	12
Ko01	6-13	6	1	14		Ko155	1-26	4	0	12
Ko10	2-15	6	2	18		Ko123	3-22	6	0	9
Ko22	3-10	5	1	10		Ko176	2-15	6	1	18

Tab. 16: CDR3-Charakteristika von Patient 4 (IWG4).

VH-Gen	D	JH	N	CDR3-Länge		VH-Gen	D	JH	N	CDR3-Länge
Scy133	6-6	6	2	21		Scy59	3-9	3	2	14
Scy139	5-12	6	2	17		Scy64	3-10	4	2	14
Scy141	6-6	6	1	20		Scy65	2-21	1	1	8
Scy142						Scy25	5-24	6	1	12
Scy147	3-10	3	0	11		Scy37	2-2	5	1	14
Scy132				11		Scy66	2-2	5	1	14
Scy163	5-12	6	0	19		Scy83	2-2	5	1	14
Scy60	2-2	6	2	20		Scy69	3-3	5	2	21
Scy07	3-10	4	2	14		Scy73	6-19	1	2	17
Scy54	3-9	5	1	6		Scy74	3-3	4	2	18
Scy49	3-3	4	2	12		Scy75	2-2	4	2	19
Scy03	3-10	4	1	10		Scy78	1-14	5	2	14
Scy53	1-26	6	1	11		Scy86	3-3	4	0	17
Scy01	4-17	4	2	12		Scy109	2-15	5	2	12
Scy08	6-13	4	1	13		Scy111	2-2	6	1	22
Scy17				11		Scy128	2-15	2	2	18
Scy50				11		Scy129				11
Scy61	1-26	6	2	16		Scy169	2-2	6	2	25
Scy12				20		Scy175	2-2	6	1	12

Tab. 17: Klassifikationskriterien der Wegenerschen Granulomatose.

„American College of Rheumatism“ (1990)-Klassifikationskriterien für die Wegenersche Granulomatose (Leavitt et al., 1990; Übersicht: Gross, 1999).

- Entzündung in Nase oder Mund (ulzerierend/hämorrhagisch/purulent)
- Infiltration der Lunge im Röntgen-Thorax (Rundherde, Kavernen, „fixe“ Infiltrationen)
- Nephritisches Urinsediment (Erythrozyturie (>5 Erys/Gesichtsfeld), Ery-Zylinder)
- Histologisch granulomatöse Entzündung (in der Gefäßwand, peri-und extravaskulär)

Zur Klassifikation einer Wegenerschen Granulomatose müssen mindestens zwei der vier Kriterien erfüllt werden (Spezifität 92%, Sensitivität 88%).

Tab. 18: Krankheitsdefinition der Wegenerschen Granulomatose.

„Chapel Hill Consensus Conference“ (1992) - Krankheitsdefinition für die Wegenersche Granulomatose (Jennette et al., 1994):

- granulomatöse Entzündung, die unter anderem den Respirationstrakt betrifft
- eine vornehmlich kleine und mittelgroße Gefäße befallende nekrotisierende Vaskulitis

Tab. 19: ELK-Klassifikation und Disease-Extent-Index (DEI): Maß der Krankheitsausdehnung bei der Wegenerschen Granulomatose.

Organbeteiligung (ELK)		Punkte (DEI)	Manifestation / Klinik
E	oberer Resp.Trakt (Nase, Nebenhöhlen, Trachea, Bronchien)	2	Borkige blutige Rhinitis, Epistaxis, Sinusitis, Sattelnase, Subglottisstenose
L	Lunge	2	Bronchialstenosen, Lungengranulome, alveoläre Hämorrhagie, Pleuritis
Ey	Auge	2	Proptosis, Dakryozystitis, Sicca-Syndrom, Episkleritis, Skleritis, (Skleromalazie), Randkeratitis, Zentralvenenthrombose
K	Niere	2	Fokal-segmental-nekrotisierende extrakapilläre Glomerulonephritis, granulomatöse Periglomerulitis, Nierengranulome
H	Herz	2	Koronariitis, Valvulitis, Perikarditis, Pankarditis
GI	Gastrointestinaltrakt	2	Colitis
S	Haut	2	Leukozytoklastische Vaskulitis, Hautulcera, Pyoderma gangränosum, Gingivahyperplasie, orale und genitale Ulcera, akrale Nekrosen, Livedo retikularis
P	Periphere Nerven	2	Polyneuritis, Mononeuritis
C	Zentralnervensystem	2	ZNS-Granulome, Gefäßverschlüsse, Subarachnoidalblutung
A	Muskeln, Gelenke	2	Myalgien, wandernde Arthralgien, nicht-erosive Arthritis
B	B-Symptome	1	Nachtschweiß, Abgeschlagenheit, Fieber, Gewichtsverlust
Höchstwert DEI 21			

11 Verzeichnis eigener Veröffentlichungen

A. Originalarbeiten

Voswinkel J*, Mueller A*, Kraemer JA, Lamprecht P, Herlyn K, Holl-Ulrich K, Feller AC, Pitann S, Gause A, Gross WL: **B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions.** *Ann Rheum Dis* 65: 859-864 (2006).

* = shared 1st authorship

Krämer JA, Müller A, Herlyn K, Pitann S, Lamprecht P, Holl-Ulrich K, Feller AC, Gross WL, Gause A, Voswinkel J: **B-Lymphozyten-Differenzierung in granulomatösen Geweben der Lunge und der Nasenschleimhäute beim Morbus Wegener: Ursprungsort der ANCA-Bildung?** *Z Rheumatol* 66: 421-429 (2007).

B. Abstracts / Poster / Kongressbeiträge

Krämer JA, Voswinkel J, Müller A, Lamprecht P, Pitann S, Gross WL, Gause A: **The immunoglobulin VH repertoire from different granulomatous tissues in Wegener's granulomatosis (WG). The granuloma as origin of ANCA formation?** Forum Experimentelle Rheumatologie vom 09.09 – 11.09.2004 in Düsseldorf. (Vortrag)

Voswinkel J, Krämer JA, Müller A, Lamprecht P, Pitann S, Gause A, Gross WL: **Is ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? B lymphocyte clusters display affinity maturation in local contact to Proteinase 3.** 4th International Congress on Autoimmunity vom 03.11. – 05.11.2004 in Budapest. (Vortrag)

Krämer JA, Voswinkel J, Müller A, Lamprecht P, Holl-Ulrich K, Pitann S, Gross WL, Gause A: **The immunoglobulin VH repertoire from different granulomatous tissues in Wegener's granulomatosis. The granuloma as origin of ANCA formation?** *Med Klin* 100: Abstract-Band S88 (2005). 111. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin vom 02.04 – 06.04.2005 in Wiesbaden. (Poster, ausgezeichnet mit dem Posterpreis im Schwerpunkt Rheumatologie)

Krämer JA, Voswinkel J, Müller A, Lamprecht P, Holl-Ulrich K, Pitann S, Gross WL, Gause A: **Das Immunglobulin-Schwerkettenrepertoire aus granulomatösen Geweben beim Morbus Wegener. Das Granulom als Ursprungsort für die ANCA-Bildung?** *Dtsch Med Wochenschr* 130: 1716 (2005). (Kurzdarstellung zum Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin)

Voswinkel J, Krämer JA, Müller A, Lamprecht P, Gause A, Holl-Ulrich K, Gross WL: **Wegener's granulomatous tissues display B lymphocyte clusters with a selected VH repertoire – affinity maturation in granulomatous lesions.** *Immunobiol* 210: S380 (2005). Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology vom 21.09 – 24.09.2005 in Kiel. (Poster)

C. Auszeichnungen

Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin im Jahr 2005 für den Schwerpunkt Rheumatologie, zuerkannt für die Arbeit:

The immunoglobulin VH repertoire from different granulomatous tissues in Wegener's granulomatosis. The granuloma as origin of ANCA formation?

12 Danksagung

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. A. Gause, Rheumatologin am Rheumazentrum Elmshorn und ehemalige Oberärztin an der Poliklinik für Rheumatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und der Abteilung für Innere Medizin-Rheumatologie-Klinische Immunologie der Rheumaklinik Bad Bramstedt und Herrn Dr. med. J. Voswinkel, Oberarzt an der Klinik für Innere Medizin 1 des Universitätsklinikums des Saarlandes, ehemaliger Assistenzarzt an der Poliklinik für Rheumatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck danke ich sehr für das interessante und spannende Thema, die konstruktive Zusammenarbeit, die kompetente und tolle Hilfestellung und die Gelegenheit, meine Arbeit auf Kongressen vorzustellen und als Erstautor zu veröffentlichen.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Forschungslabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und die fachliche Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. L. Gross, Direktor der Poliklinik für Rheumatologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und der Abteilung für Innere Medizin-Rheumatologie-Klinische Immunologie der Rheumaklinik Bad Bramstedt.

Frau Dr. Ing. A. Müller, Leiterin des Forschungslabor in Lübeck, möchte ich für die freundliche Atmosphäre die fachliche Hilfe, die logistische Unterstützung und die wertvollen Hilfestellungen bei der Veröffentlichung der Ergebnisse auf Kongressen und in Fachjournalen danken.

Weiterhin möchte ich allen medizinisch-technischen Assistentinnen des Forschungslabors Lübeck für ihre kompetente und freundliche Hilfe herzlich danken. Besonders Frau S. Pitann war mir eine sehr große Hilfe und stand mir immer geduldig und hilfsbereit zur Seite. Auch Frau P. Zander danke ich für ihre liebevolle Hilfe und Mühe.

Herrn Prof. Dr. med. A. C. Feller und Frau Dr. med. K. Holl-Ulrich vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck danke ich für die Begutachtung der Gewebeschnitte. Herrn Dr. K. Kalies und Frau H. Riechers vom Institut für Biologie der Universität zu Lübeck danke ich für die Durchführung der Sequenzierungen.

Meinen Eltern, Hans Krämer und Renate Krämer-Köttgen gilt mein herzlicher Dank für die Ermöglichung eines sorgenfreien Studiums und die mentale Unterstützung. Für ihre intensive Anteilnahme danke ich des Weiteren meiner Schwester Anja Krämer-Jambor, ihrem Mann Torsten Jambor und meinem gesamten Freundeskreis.

13 Lebenslauf

Name: Jan Andreas Krämer
Geburtsdatum: 11.10.1974
Geburtsort: Brühl im Rheinland
Anschrift: Friedrich-Wilhelmstr. 23, 51545 Waldbröl, Deutschland
Familienstand: ledig
Konfession: evangelisch

1981-1985: Besuch der St. Franziskus-Grundschule Brühl
1985-1994: Besuch des Max-Ernst-Gymnasium Brühl
1994: Abitur

1994-1995: Zivildienst in der Seniorenresidenz Brühl

SS 1996: Studium der Skandinavistik, allgemeinen Sprachwissenschaften und Philosophie an der Universität zu Köln

1996-1999: Ausbildung zum Krankenpfleger an der Krankenpflegeschule des Universitätsklinikums Freiburg im Breisgau
1999: Erwerb der Erlaubnis zur Führung der Berufsbezeichnung Krankenpfleger

1999-2006: Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2001: Ärztliche Vorprüfung
2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003: Beginn der experimentellen Arbeit im immunologischen Labor der Rheumatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck
2005: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006: Approbation als Arzt
2007: Assistenzarzt an der medizinischen Klinik des Kreiskrankenhauses Waldbröl