Aus der Poliklinik für Rheumatologie

der Universität Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. W.L. Gross

Phänotypische und funktionelle Veränderungen von regulatorischen T-Zellen bei der Wegenerschen Granulomatose

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Sebastian Klapa

aus Magdeburg

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Lamprecht

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Ludwig

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.12.2011

Für Rigo, Ulrike und Isabel

„Es handelt sich um ein 4-7 Monate dauerndes Krankheitsbild, beginnend mit Schnupfen… (das) unter unklaren septischen Erscheinungen unter dem Bilde zunehmender Nierenstörungen tödlich endet.“ *Aus: F. Wegener. Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren. Beitr Pathol Anat Allg Pathol 102:36-68 (1939)*

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 6

TABELLENVERZEICHNIS 9

ABBILDUNGSVERZEICHNIS 9

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG 11

1.1 Toleranz im Immunsystem 11

1.2 Natürliche regulatorische T-Zellen (Treg) 12

1.3 Die Wegenersche Granulomatose (WG) und regulatorische T-Zellen..... 15

1.4 Fragestellung 19

2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN 20

2.1 Patienten 20

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterial 22

2.3 Chemikalien 23

2.4 Antikörper 25

2.5 Durchflusszytometrie 26

2.6 Zellkultur 28

2.7 Immunhistologie 31

2.8 Statistische Analyse 31

3. ERGEBNISSE 33

3.1 Kohortenanalyse, *ex vivo* Untersuchungen 33

3.2 Proliferationsuntersuchungen, *in vitro* Ergebnisse 43

3.3 Immunhistologische Untersuchungsergebnisse 50

4. DISKUSSION 51

5. ZUSAMMENFASSUNG 59

6. ANHANG: ABBILDUNGEN UND TABELLEN 61

7. LITERATURVERZEICHNIS 69

8. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN UND VORTRÄGE 78

9. DANKSAGUNG 80

10. CURRICULUM VITAE 81

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
ACR	*American College of Rheumatology*
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	*Antigen presenting cells*
APC	Allophycocyanin
ANCA	antineutrophiler zytoplasmatischer Autoantikörper
Aq. dest.	*aqua destillata*
BCR	B-Zellrezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
BVAS	Birmingham Vasculitis Activity Score
°C	Grad Celsius
C-	Carboxyl-Gruppen-tragend
ca.	circa
C-ANCA	ANCA mit zytoplasmatischen Fluoreszenzmuster
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	*Cluster of Differentiation*
CFDA-SE	5-Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester
CFSE	5-Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester, Syn. CFDA-SE
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	*cytotoxic T-lymphocyte antigen*
C	Cyclophosphamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
ELISA	*enzyme linked immunosorbent assay*
et al.	*et alii*
FACS	*fluorescence activated cell scanner*
FCS	*fetal calf serum*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	*forward scatter*
g	Gramm
GITR	Glukokortikoid-induzierter TNF-Rezeptor
HC	*healthy controls*; gesunde Probanden/Kontrollen
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen

HNO	Hals, Nasen, Ohren
IE	internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
l	Liter
M	molar
MFI	*mean fluorescence intensity*
MHC	*major histocompatibility complex*
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MPO	Myeloperoxidase
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
MTX	Methotrexat
N-	Amino-Gruppen-tragend
ng	Nanogramm
nM	nmol/l
P-ANCA	ANCA mit perinukleärem Fluoreszenzmuster
PBMC	*peripheral blood mononuclear cell*
PBS	*phosphate buffered saline*
PD-1	*programmed death 1*
PE	Phycoerythrin
PerCP	*Peridinin-chlorophyll-protein complex*
pH	-logarhithmus [H_3O^+]
PMN	polymorphonukleäre Zellen
PR3	Proteinase 3
sec.	Sekunde
sog.	so genannt
std.	Stunde
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TARC	*thymus and activation regulated chemokine*
TCR	T-Zellrezeptor
Temp.	Temperatur

TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
Teff	Effektor T-Zellen
Treg	regulatorische T-Zellen
U	*Units*
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	*Units* pro Milliliter
WG (gWG, lWG)	Wegenersche Granulomatose (generalisiert, lokalisiert)
gWG A	aktive generalisierte Wegenersche Granulomatose
gWG R	generalisierte Wegenersche Granulomatose in Remission
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1:	ACR Kriterien zu Klassifikation einer WG.	16
Tabelle 2:	Patienten Charakteristika, deren Blut für die Untersuchung genutzt wurde.	20-21
Tabelle 3:	Patienten Charakteristika, deren nasale Biopsien für die Untersuchungen genutzt wurde.	22
Tabelle 4:	Übersicht der genutzten Antikörper für die Durchflusszytometrie und der Suppressionsuntersuchung.	25
Tabelle 5:	Anzahl und Verhältnis von $CD4^+$/$CD8^+$ T-Zellen.	33
Tabelle 6:	BVAS 2003 (Birmingham Vasculitis Activity Score).	61-62
Tabelle 7:	ELK-Klassifikation nach der DEI (Disease Extent Index).	62-63
Tabelle 8:	Vergleich des relativen Anteils von $CTLA4^+$ Treg, $CD103^+$ Treg, $PD\text{-}1^+$ Treg sowie $CD154^+$ Treg.	68

Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1:	Differenzierung von Treg mittels Durchflusszytometrie.	13
Abbildung 2:	Mechanismen der Treg vermittelten Suppression von Effektor T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APC).	14
Abbildung 3:	Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) in der Population der $CD4^+$ T-Zellen.	35
Abbildung 4:	Korrelation zwischen dem C-ANCA-Titer und dem prozentualen Anteil von Treg bei Patienten mit einer gWG.	35
Abbildung 5:	Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen) in der Population der $CD4^+$ T-Zellen.	36
Abbildung 6:	Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) in der Population der $CD4^+$ T-Zellen.	37
Abbildung 7:	Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ T-Zellen (Treg) in der Population der $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg).	38
Abbildung 8:	Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{neg}FoxP3^+$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) in der Population der $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen).	39

Abbildung 9: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{high}CCR4^+$ T-Zellen (Treg). 40

Abbildung 10: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{neg}CCR4^+$ T-Zellen (Effektor T-Zellen). 41

Abbildung 11: Korrelation zwischen dem Anteil von $CD4^+CD25^{neg}CCR4^+$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) und dem Aktivitätsscore BVAS. 41

Abbildung 12: Darstellung des prozentualen Anteils von IFNR1 positiven Zellen in den $CD4^+$T-Zellen, $CD4^+CD25^{high}$ Treg und $CD8^+$T-Zellen. 42

Abbildung 13: *In vitro* Proliferation- und Suppressionsuntersuchung. 44

Abbildung 14: *In vitro* Proliferationuntersuchung von *ex vivo* proliferierten Treg. 46

Abbildung 15: *In vitro* Expressionsuntersuchung von *ex vivo* proliferierten Treg. 48

Abbildung 16: Konzentration von TNFα im Überstand von PBMC nach 24h und 9 Tagen Stimulation. 49

Abbildung 17: Akkumulation von $FoxP3^+$ T-Zellen in granulomatösen Läsionen bei WG. 50

Abbildung 18: Das optische System eines Durchflusszytometer. 63

Abbildung 19: Die Parameter FSC und SSC. 64

Abbildung 20: Darstellung eines Fluoreszenssignals in Form eines Histogramms. 64

Abbildung 21: Darstellung zweier Fluoreszenssignale in Form eines Dot-Plots. 65

Abbildung 22: Darstellung von SSC und FSC in Form eines Dot-Plots. 65

Abbildung 23: Darstellung der Verteilung des Lebensalters der in dieser Studie untersuchten Probanden. 66

Abbildung 24: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CCR4^+$ T-Zellen in der Population der $CD4^+$ T-Zellen. 66

Abbildung 25: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{med}CCR4^+$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen) in der Population der $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen). 67

Abbildung 26: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen bei gWG ohne Immunsuppression. 67

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Toleranz im Immunsystem

Das menschliche Immunsystems unterteilt sich wesentlich in ein angeborenes und ein adaptives Abwehrsystem, zwischen denen zahlreiche Wechselwirkungen bestehen. Beide untergliedern sich jeweils in eine zelluläre und eine humorale Komponente. Die Interaktionen zwischen den Abwehrzellen werden durch Zytokine und andere Mediatoren geregelt. Die phänotypische Charakterisierung der einzelnen Gruppen von Immunzellen erfolgt anhand ihrer Expression von Oberflächenmolekülen, sog. CD-Molekülen (=„cluster of differentiation“).

Das System der adaptiven Immunität ermöglicht dem Organismus individuell auf fast jedes Antigen zu reagieren. Diese Eigenschaft basiert zum größten Teil auf B- und T-Lymphozyten und wird in einem Zusammenspiel mit den Zellen des angeborenen Immunsystems vermittelt. T-Zellen erkennen Antigene, die zusammen mit körpereigenen Proteinstrukturen (MHC) auf den Zellen präsentiert werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit der Entstehung von Rezeptoren mit autoreaktiver Spezifität mittels zufälliger Rekombination von Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptorgenen und somit die Bildung autoreaktiver T- und B-Lymphozyten (Böcker et al. 2004).

Die Kontrolle und Vermeidung von autoreaktiven T- und B-Lymphozyten obliegt der immunologischen Selbst-Toleranz. Diese wird in eine zentrale sowie in eine periphere Toleranz unterteilt. Die zentrale Toleranz bezeichnet die Kontrolle der Rezeptorspezifitäten bei der Lymphozytenreifung. Bei T-Zellen findet dies im Thymus jeweils über eine initiale positive Selektion (Funktionalität des T-Zellrezeptors (TCR)) und spätere negative Selektion (Elimination bei Erkennung einer hohen Avidität gegenüber Selbst-Peptid-MHC) statt. Hierbei werden im optimalen Falle funktionstüchtige Lymphozyten in die Peripherie entlassen, welche keine Autoantigene erkennen. Dies ist jedoch nicht immer der Fall, insbesondere potentiell autoreaktive T-Zellen sind in der Blut-Zirkulation nachweisbar (Böcker et al. 2004, Oo et al., 2010).

In der Peripherie wiederum wirken hauptsächlich drei weitere Mechanismen, welche der peripheren Toleranz zugeordnet werden.

Jede T-Zelle benötigt zu einer Aktivierung neben der TCR-Komplex MHC-Peptid-Bindung ein weiteres kostimulatorisches Signal, welches von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) geliefert wird. Diese werden wiederum im Rahmen einer Entzündung induziert, zum Beispiel durch proinflammatorische Zytokine. Nichtaktivierte APC exprimieren nur eine geringe Dichte von kostimulatorischen Molekülen, wie etwa CD80 und CD86, und induzieren bei Kontakt mit T-Zellen Anergie. Diese anergischen T-Zellen können unter normalen Bedingungen nicht mehr aktiviert werden. Ein weiterer Mechanismus stellt der aktivierungsinduzierte-Zelltod (AiCd) dar, welcher bei wiederholter und andauernder Stimulation mit einem Selbst-Antigen

induziert wird und zur Elimination der autoreaktiven T-Zelle führt. Neben diesen Mechanismen kommt eine weitere Kontrolle autoreaktiver T-Zellen, durch die sogenannten regulatorischen T-Zellen zum Tragen.

1.2 Natürliche regulatorische T-Zellen (Treg)

Regulatorische- oder Suppressorzellen können aktiv andere Zellen regulieren, z.B. T-Zellen, B-Zellen oder auch dendritische Zellen. Eine besondere Rolle spielen $CD4^+$ Suppressor T-Zellen. Mit der Beschreibung des CD25 Rezeptors (entspricht der α-Kette des Interleukin 2 Rezeptors) als konstitutivem Marker für $CD4^+$ regulatorische T-Zellen war es möglich geworden diese Suppressorzellen näher zu untersuchen (Sakaguchi et al., 1995). Diese Zellen werden aufgrund ihrer Genese im Thymus als natürliche $CD25^{high}$ regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet. Hierbei ist die Dichte der Expression des CD25 Rezeptor entscheidend, da CD25 auch in geringer Dichte auf T-Lymphozyten exprimiert wird. Durchflusszytometrisch ist es möglich, regulatorische T-Zellen als $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen von aktivierten T-Zellen als $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen zu unterscheiden und mittels *in vitro* Untersuchung deren Suppressionseigenschaften zu analysieren (Baecher-Allan et al., 2001; Miyara et al., 2006; Wang et al. 2007; Corthay et al. 2009).

Die Auftrennung zwischen $CD25^{med}$ und $CD25^{high}$ T-Zellen ist häufig schwierig, da es technisch aufwendig ist die Trennschärfe bei jeder Probe zu bestimmen. In den letzten Jahren wurde daher nach Markern/Molekülen gesucht, die eine Spezifität für Tregs aufweisen. Das Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) schien diesen Anforderungen gerecht zu werden. FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, gehört zur *winged helix* Familie und erlaubt als intrazellulärer Marker die Trennung zwischen $CD25^{med}$ und $CD25^{high}$ Treg (Fontenot et al. 2003; Sakaguchi et al. 2008). Die Zellen werden als Treg bezeichnet, welche zum einen eine hohe Dichte an CD25 aufweisen und in der der höchste Anteil FoxP3 positiver Zellen nachweisbar ist (Abb.1; Wang et al. 2007; Tang und Bluestone 2008). Ferner zeigen Untersuchungen, dass FoxP3 ebenfalls als transienter Aktivitätsmarker bei $CD4^+$ Nicht-Suppressor T-Zellen nachweisbar ist (Tran et al. 2007; Wang et al. 2007; Bonelli et al. 2008), hierbei jedoch vor allem in der Fraktion $CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen). Zusätzlich existieren zwei Splice-Varianten von FoxP3 in humanen Treg, diese Treg sind jedoch funktionell nicht beeinträchtigt (Smith et al. 2006).

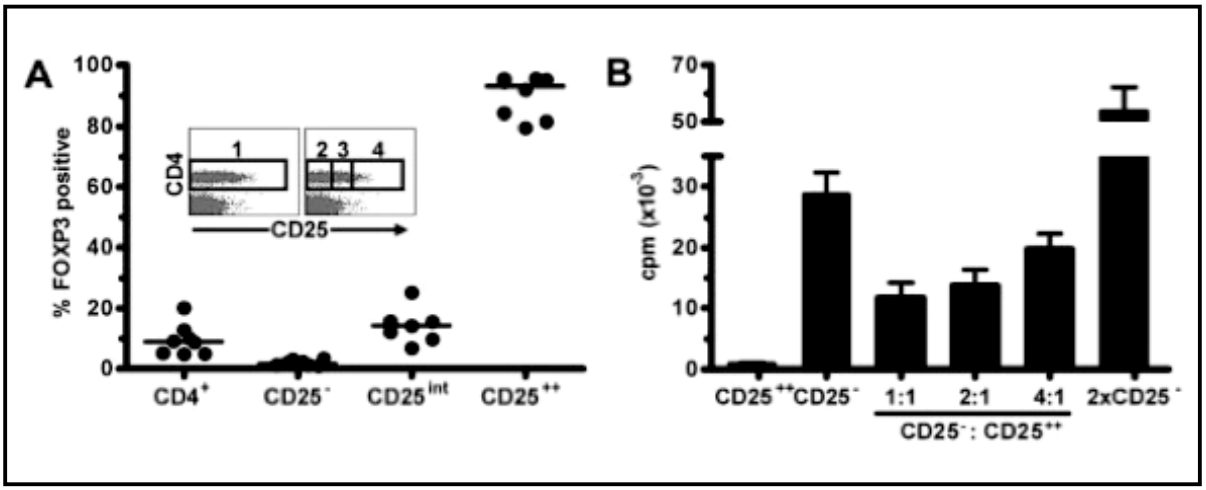


Abb.1: Differenzierung von Treg mittels Durchflusszytometrie A: Links Darstellung der einzelnen T-Zell Subpopulation mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Expression von CD25 (1 entspricht $CD4^+$ T-Zellen; 2 entspricht $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen ((Effektor T-Zellen)); 3 entspricht der $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen ((aktivierten T-Zellen)); 4 entspricht $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen ((Treg))). Darunter Darstellung der intrazellulären Expression von FoxP3. Die Fraktion der $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) zeigt den höchsten Anteil von FoxP3 positiven Zellen. **B:** *in vitro* Suppressionsuntersuchung mittels Proliferationstestung von $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) in verschiedenen Mischverhältnissen mit $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg). In Abhängigkeit des Anteils von $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) zeigt sich eine Suppression der Proliferation von $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen). *Abbildung aus Wang et al. 2007*

Die Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression sind bisher nicht gänzlich erforscht und lassen noch Fragen offen. Drei mögliche direkte Mechanismen werden diskutiert (Abb.2; Scheffold et al. 2007; Vignali et al. 2008; Buckner 2010; Sakaguchi 2011):

1. Zellkontakt-vermittelte Aktivierung von membrangebundenen zytotoxischen oder suppressiven Molekülen bei Effektor T-Zellen und/oder Antigen-präsentierenden Zellen (APC)
2. Sekretion von suppressiv-wirksamen Molekülen durch die Treg, wie *transformig growth factor-β* (TGF-β) oder *Interleukin-10* (IL-10)
3. Konkurrenz per Konsumption von Wachstums- und/oder Überlebensfaktoren wie Interleukin 2 (IL-2)

Neben diesen direkten Mechanismen wird ferner die Induktion von Treg aus Effektor T-Zellen diskutiert, welche wiederum suppressorisch aktiv sind durch die Sekretion von IL-10 und/oder TGF-β. Hierbei werden diese induzierten Suppressorzellen als T_R1- und T_H3-Zellen bezeichnet (Abb.2; Lafaille and Lafaille 2009; Vukmanovic et al. 2006).

Neben CD25 und FoxP3 exprimieren Treg noch weitere Rezeptoren, welche jedoch auch auf anderen T-Zellgruppen gefunden werden. Zu diesen gehört der Chemokin Rezeptor CCR4 (CD194) welcher auf Treg im hohen Maße exprimiert wird. In verschiedenen Studien wurde von einem Anteil von 80% $CCR4^+$Treg berichtet (Iellem et al. 2001; Hirahara et al. 2006).

CCR4 gehört zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und ist essentiell für die

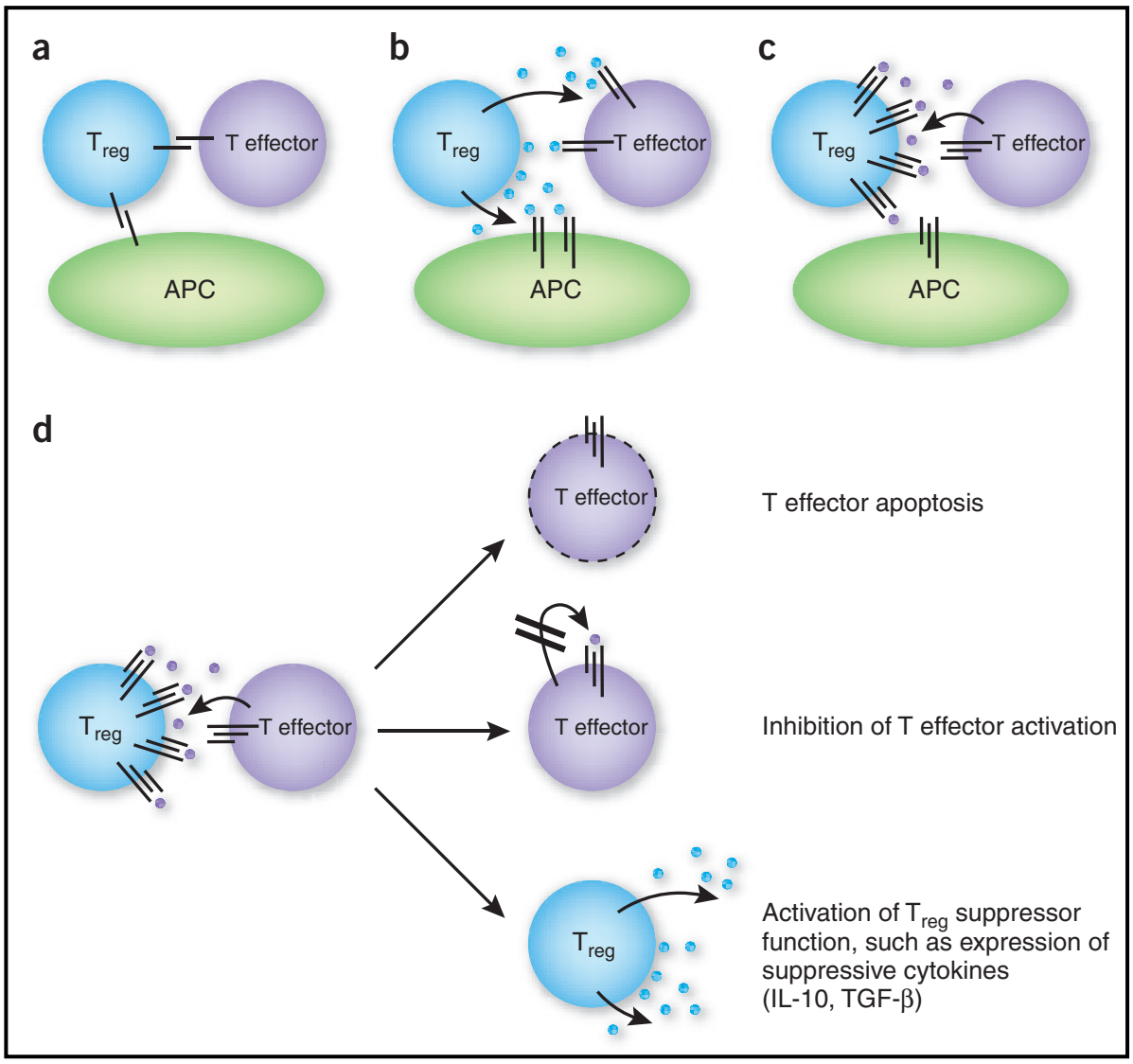


Abb. 2: Mechanismen der Treg vermittelten Suppression von Effektor T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APC). a-c: Darstellung dreier möglicher Mechanismen der Treg-Zell-vermittelten Suppression von Effektor T-Zellen/APC. **a:** Zellkontakt-vermittelte Aktivierung von suppressorischen oder zytotoxischen Molekülen. **b:** Sekretion von suppressiv-wirksamen Substanzen (IL-10, TGFβ). **c:** Konkurrenz (via Konsumption) von Wachstums-und/oder Überlebensfaktoren wie IL2. **d:** Darstellung der Konsequenz der Treg vermittelten Suppression von Effektor T-Zellen. Diese reicht hierbei von der Induktion der Apoptose der Effektor T-Zelle, über die fehlende Aktivierung bis hin zur Konversion der Effektor T-Zelle in eine Tr1- oder Th3-Zelle mit immunsuppressiven Eigenschaften durch die Sekretion von IL-10 bzw. TGF-β. *Abbildung aus Scheffold et al. 2007*

Migration von Zellen in das Gewebe. Hierbei erfolgt die zielgerichtete Chemotaxis anhand der Konzentration der Liganden von CCR4. Zu diesen zählen CCL17 (TARC; *thymus and activation regulated chemokine*) und CCL22 (Macrophage-derived chemokine) sowie CCL2 (MCP-1; *monocyte chemotactic protein-1*). Die Produktion sowie Freisetzung dieser Liganden erfolgt hierbei vor allem durch gewebständige Makrophagen im Rahmen einer Entzündungsreaktion und führt über die Aktivierung von CCR4 zur Migration in das entzündliche Gewebe.

1.3. Die Wegenersche Granulomatose (WG) und regulatorische T-Zellen

1.3.1 Die Wegenersche Granulomatose

Die Wegenersche Granulomatose ist eine primär systemische Kleingefäßvaskulitis, die mit dem Nachweis von Anti-Neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern gegen die Proteinase 3 (C-ANCA/PR3) assoziiert ist. Klinisch stellt sich typischerweise ein biphasischer Verlauf dar, beginnend mit einer granulomatösen Entzündung des Respirationstraktes (lokalisierte WG, lWG), zeigt sich nach einer variablen Zeitspanne eine C-ANCA/PR3 assoziierte systemische Vaskulitis mit potentiell organschädigenden und vitalbedrohlichen Manifestationen (generalisierte WG, gWG). Die Diagnostik zur Festlegung von Krankheitsausdehnung sowie der Krankheitsaktivität erfolgt interdisziplinär. Die Therapie richtet sich nach dem Stadium sowie der Aktivität der Erkrankung. Eine Remissionsinduktion bei der „Early-systemic-WG“ erfolgt mittels Methotrexat. Bei schweren generalisierten Verläufen ist Cyclophosphamid indiziert.

Die Erstbeschreibung der später als Wegenersche Granulomatose benannten Erkrankung erfolgte bereits 1931 durch H. Klinger, wobei diese als “Grenzform der Periarteriitis nodosa” beschrieben wurde (Klinger 1931). Erst der später in Lübeck tätige Pathologe Friedrich Wegener erkannte die Eigenständigkeit dieser Erkrankung und berichtete 1936 bei drei Obduktionsfällen über eine “merkwürdige granulomatöse Erkrankung mit Beteiligung der Blutgefäße“ (Wegener 1936 und 1939). Etwa elf Jahre später bestätigten Ringerts sowie Johnson, 1954 Godmann und Jacob Churg diese ersten Beobachtungen und etablierten den Begriff „Wegenersche Granulomatose“. Im Zuge eine Vaskulitis-Nomenklatur frei von Eponymen zu schaffen, wurde ein Alternativbenennung der Wegenerschen Granulomatose eingeführt, die Granulomatose mit Polyangiitis (Falk et al. 2011)

Die Wegenersche Granulomatose gehört zum Formenkreis der primär systemischen Vaskulitiden, nach den Definitionen und der Nomenklatur der „Chapel Hill Consensus Conference“ von 1992 (Jennette et al. 1994) zu den ANCA-assoziierten Vaskulitiden mit überwiegendem Befall kleiner Blutgefäße, bei der WG kombiniert mit granulomatösen Veränderungen überwiegend im oberen sowie unteren Respirationstrakt. Histologisch findet man Zeichen einer nekrotisierenden Vaskulitis, mit fehlender oder nur minimalen *in-situ* Ablagerungen von Immundeposits. Serologisch-immunologisch besteht bei der WG eine hohe Assoziation mit dem C-ANCA, Subspezifität Proteinase 3 (Jennette et al. 2011). Die Klassifikationskriterien gemäß des American College of Rheumatology (ACR; Leavitt et al. 1990) für die WG sind in der Tab. 1 zusammengestellt. Epidemiologisch handelt es sich bei der Wegenerschen Granulomatose um eine seltene Erkrankung, mit einer Inzidenz von etwa 8 Neuerkrankungen pro Jahr und 1 Mio. Einwohner und einer Prävalenz zwischen 160 auf 1 Mio. Einwohner in Nordeuropa (Mohammad et al. 2007), sowie 58 auf 1 Mio. Einwohner in

Deutschland (Reinhold-Keller et al. 2005).

ACR-Kriterien zur Klassifikation der Wegenerschen Granulomatose
- Nasale/orale Entzündung (blutig-krustiger Schnupfen / orale Ulzera) - Pathologisches Röntgen-Thorax mit Rundherden und/oder Infiltraten - Pathologisches/nephritisches Urinsediment - Histologisch granulomatöse Veränderung innerhalb oder in der Umgebung von Gefäßwänden

Tab.1: ACR Kriterien zu Klassifikation einer WG. Eine Vaskulitis kann als Wegenersche Granulomatose klassifiziert werden, wenn 2 der 4 oben genannten Kriterien erfüllt sind, mit einer Sensitivität von 88,2% und einer Spezifität von 92% (Leavitt et al. 1990). ACR= American College of Rheumatology

Die klinische Manifestation der WG ist individuell variabel und abhängig vom jeweiligen Organbefall und des Krankheitsstadium. Man unterscheidet hierbei eine lokalisierte Phase oder Initialphase (iWG), von einem generalisierten Stadium (gWG). In der Initialphase zeigen sich typischerweise granulomatöse Veränderungen im Bereich des oberen und unteren Respirationstraktes, welche klinisch als blutig-borkige Rhinitis, Mastoiditis oder Sinusitis imponieren. Daneben entwickelt sich häufig, auf dem Boden der chronischen Entzündung, eine Sattelnase, eine subglottische Stenose oder isolierte pulmonale Granulome ohne manifeste Vaskulitis. In der Regel schreitet die WG innerhalb von Wochen bis Monaten vom Initialstadium zum Generalisationsstadium fort. Nur in seltenen Fällen verbleibt die WG im lokalisierten Stadium, ohne dass eine Generalisation folgt Im Generalisationsstadium präsentiert sich klinisch das Vollbild einer Kleingefäßvaskulitis mit Multiorganbefall. In Abhängigkeit von der jeweiligen Organmanifestation zeigen sich hierbei Hb-relevante Hämoptysen, Paresen, Arthralgien, eine palpable Purpura, Hautnekrosen, Psychosen sowie eine rapid progressiven Glomerulonephritis.

Das therapeutische Ziel ist die Induktion einer Vollremission und die anschließende remissionserhaltende Therapie. Hierfür werden nach Schwere und Stadium der Erkrankung neben Glukokortikoiden Immunsupressiva wie Methotrexat (MTX), Cyclophosphamid oder Azathioprin eingesetzt (Reinhold-Keller et al. 2000). Einen besonderen Stellenwert in der Therapie hat in den letzten Jahren Rituximab eingenommen, welche aktuell nicht nur bei refraktären Verläufen sondern auch zur Remissionsinduktion empfohlen wird (Stone et al. 2010).

1.3.2 Regulatorische T-Zellen bei der Wegenerschen Granulomatose

Es existieren verschiedene Hypothesen und Modelle, die die Entstehung der granulomatösen Strukturen und die Induktion der ANCA-Produktion beinhalten. Es wird davon ausgegangen, dass T- und B-Zellen hierbei eine zentrale Rolle spielen (Jennette et al. 2011). Bei der WG sind erhöhte Werte von gelöstem CD25 sowie eine erhöhte Fraktion von peripheren $CD4^+CD25^+$ T-Zellen also aktivierten T-Zellen beschrieben (Schmitt et al. 1992; Schlesier et al. 1995; Popa et al. 1999, Marinaki et al. 2005). Es wird angenommen, das Treg in Analogie zu anderen Autoimmunerkrankungen eine Rolle in der Pathogenese spielen. Bisherige Untersuchungen zeigten unter anderem eine erhöhte Anzahl von Treg bei Patienten mit WG in klinischer Remission. Dieser Befund wurde zusammen mit einem funktionellen Defizit, im Sinne einer verminderten Suppression der Proliferation von Effektor T-Zellen (Abdulahad et al. 2007) nach 6-tägiger polyklonaler Stimulation, beschrieben. Aufgrund der Nutzung eines ^{3}H-Thymidine-basierenden Untersuchungsansatzes war es nicht möglich, die proliferierten Zellen näher zu klassifizieren. Des Weiteren wurden Patienten mit einer aktiven WG nicht in die Untersuchung miteinbezogen. Ein CFDA-SE basierender Untersuchungsansatz zur Klärung der Funktion der Treg bei WG, konnte in einer anderen Studie deren funktionelle Dysfunktion zeigen, im Sinne einer verminderten Suppression der Proliferation von Effektor T-Zellen nach 11-tägiger polyklonaler Stimulation (Morgan et al. 2010). Eine weitere Untersuchung der proliferierten Zellen erfolgte hierbei nicht. Zudem erfolgte keine weitere Unterteilung der Patienten anhand der klinischen Aktivität. Eine weitere Studie zeigte ferner eine erniedrigte Anzahl von Treg bei Patienten mit ANCA-Assoziierten Erkrankungen (Rimbert et al. 2011), mit einer verminderter Suppression von Effektor T-Zellen unter 4-tägiger polyklonaler Stimulation. Hierbei wurden neben Patienten mit einer Mikroskopischen Polyangiitis (MPO), auch Patienten mit einer aktiven WG sowie WG in Remission einbezogen. Aufgrund der Nutzung eines ^{3}H-Thymidine-basierenden Untersuchungsansatzes war hierbei ebenfalls eine weitere Klassifizierung der proliferierten Zellen nicht möglich. Des weiteren wurden die Ergebnisse nicht weiter krankheitsspezifisch (WG im Vergleich zur MPA und HC) unterteilt, so dass keine Aussage über WG spezifische Ergebnisse möglich war.

1.3.3 Interferon alpha bei der Wegenerschen Granulomatose

Eine klinische Beobachtung aus dem Rheumaklinikum Bad Bramstedt lenkte das Interesse auf die Frage nach einer Bedeutung von Interferon-alpha (IFNα) bei der WG. Eine Patientin mit einer IWG in klinischer Remission erhielt aufgrund einer akuten Hepatitis C eine Therapie mit Peginterferon alpha 2a. Hierunter kam es zeitgleich zu einer Aktivierung der WG mit deutlich ausgeprägter Symptomatik (Reinhold-Keller et al. 2001). Bisher liegen nur wenige Daten über IFNα oder deren Rezeptoren (unter anderem IFNR1) bei WG vor. Erhöhte

Serum-Konzentrationen wurde bei WG und anderen systemischen Vaskulitiden gezeigt (Grau et al. 1989).

In einem Maus-Modell konnte ferner gezeigt werden, das unter dem Einfluss von IFNα die zelluläre Autoreaktivität in das Vollbild eines Autoimmun-Diabetes konvertiert (Lang et al. 2005). Des Weiteren zeigten Untersuchungen bei einer anderen Autoimmunerkrankung, dem systemischen Lupus Erythematodes, das IFNα die autoimmune Aktivität des Immunsystems initiieren (Rönnblom et al. 2006), sowie Treg in deren suppressorischer Aktivität hindern kann (Yan et al. 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IFNα die Expression des Wegenerschen Autoantigens, der Proteinase 3, auf zirkulierenden Leukozyten induziert (Burchert et al. 2003).

1.4 Fragestellung

Es liegen nur wenige Daten über phänotypische Veränderungen der Treg *ex vivo* sowie nach *in vitro* Stimulation vor. In bisherigen Arbeiten (Abdulahad et al. 2007; Morgan et al. 2010) wurden hauptsächlich Patienten in klinischer Remission untersucht, über Treg bei Patienten im aktiven Stadium der Erkrankung sowie mit einer lokalisierten Form der WG ist wenig bekannt. Unsere Hypothese ist, dass die Treg, in Analogie zu anderen Autoimmunerkrankungen, durch Veränderung in Quantität und Qualität im Vergleich zu gesunden Kontrollen bei der WG zu einer Fehlregulation der T-Zellantwort beitragen. Folgende Fragen sollen zur Untersuchung der Hypothese beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Anzahl von Treg bei WG im Vergleich zu gesunden Kontrollen?
2. Zeigen sich Unterschiede in der Expression von FoxP3 sowie anderen Rezeptoren wie z.B. CCR4 oder IFNR1 in bzw. auf Treg bei der WG?
3. Finden sich Korrelationen zwischen der Anzahl der Treg bei WG in Abhängigkeit vom Stadium und der Krankheitsaktivität?
4. Zeigen Treg bei WG eine reduzierte suppressorische Aktivität von Effektor T-Zellen unter polyklonaler Stimulation, u.a. mit dem Autoantigen PR3 und/oder IFNα?
5. Gibt es quantitative und qualitative Veränderungen der proliferierten Zellen nach *in vitro* Stimulation?
6. Sind Treg in den granulomatösen Läsionen der WG nachweisbar?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Blutproben

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Blutproben entstammen Patienten der Poliklinik für Rheumatologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck sowie Patienten der Rheumaklinik Bad Bramstedt. Die Diagnosesicherung wurde durch die behandelnden Ärzte gemäß der ACR Kriterien (Tab. 1, Einleitung) durchgeführt. Die Blutproben wurden den Patienten nach ausführlicher Aufklärung und Einverständnis entnommen und mit EDTA versetzt. Eine positive Zustimmung der Ethikkomission lag vor (AZ 07-054). Auf Grund des Datenschutzes wurden Proben der Patienten mit fortlaufenden Initialen verschlüsselt.

Initialen	Geschlecht	Alter	Aktivität	C-ANCA Titer	CRP mg/dl	BVAS aktuell	DEI	ELK aktuell	ELK kumulativ	Therapie
Patienten mit einer lokalisierten Form der Wegenerschen Granulomatose										
lWG1	weiblich	68	A	0	0,5	3	2	E	E	GC
lWG2	weiblich	33	A	0	4,9	1	2	E	E	GC
lWG3	männlich	54	A	0	1,1	6	2	E	E	---
Patienten mit einer generalisierten Form der Wegenerschen Granulomatose										
gWG1	weiblich	38	A	1024	11,5	15	8	E,A,B,L	E,A,B,L	MTX,GC
gWG2	weiblich	44	A	512	1,74	6	6	E,K,A	E,K,A,S,Ey,B	C,GC
gWG3	männlich	41	A	32	0,3	0	2	E	E,A,B	C,GC
gWG4	weiblich	76	R	512	0,3	0	0		E,L,K,Ey,C,B	---
gWG5	männlich	70	A	1024	0,63	1	2	A	K,A,B,S	MTX,GC
gWG6	männlich	51	A	64	0,89	0	2	K	E,K,H,A,B	C,GC
gWG7	weiblich	75	R	256	1,3	0	0	---	E,I,K,B	AZA,GC
gWG8	weiblich	35	A	1024	0,3	8	4	A,K	E,L,K,A,B,Gi	MMF,GC
gWG9	weiblich	65	R	512	0,3	0	0	---	E,L,K,Ey,B,H?	MTX,LEF,GC
gWG10	weiblich	51	R	2048	0,3	0	0	---	E,Ey,A,B,Gi,P?	MTX,GC
gWG11	weiblich	35	A	0	0,3	1	2	B	E,A,B	LEF,GC
gWG12	männlich	58	A	1024	0,3	6	2	L	E,L,A,B	C,GC
gWG13	männlich	39	A	32	0,3	2	2	E	E,L,(K),S,C?,B,A	AZA,GC
gWG14	männlich	68	A	2048	0,6	1	2	A	E,L,(K),Ey,A	AZA,GC
gWG15	männlich	58	R	32	0,3	0	0	---	E,A,B,P	---
gWG16	männlich	51	A	128	0,87	8	8	E,C,Ey,L	E,L,Ey,C	C,GC
gWG17	weiblich	80	A	0	2,74	1	2	A	E,Ey,L,K,C,A,B	---
gWG18	weiblich	80	R	256	0,3	0	0	---	L,E,K,P,S?,B,Ey	AZA,GC
gWG19	weiblich	69	R	256	0,64	0	0	---	A,P,B,S,E,	MTX,GC

									Ey,K	
gWG20	männlich	42	A	512	2,7	10	4	E,L	E,L,(K),A,B	C,GC
gWG21	weiblich	39	A	1024	11,8	10	8	E,L,K,Ey	E,L,K,Ey,B	---
gWG22	männlich	64	R	0	0,4	0	0	---	E,L,Ey	LEF,GC
gWG23	männlich	37	A	20	0,3	9	4	E,C	E,L?,K,C,S,H?,P,A,B	C,GC
gWG24	weiblich	61	A	2560	6,8	11	12	E,L,(K),Ey,A,B	E,L,(K),Ey,A,B	MTX,GC
gWG25	weiblich	38	A	40	0,7	2	4	E,B	E,A,B	MTX,GC
gWG26	weiblich	67	A	5120	4,6	19	8	E,L,K,B	E,L,K,A,B,P	---
gWG27	weiblich	62	A	0	1,9	6	12	E,L,K,A,B,P	E,L,K,A	MTX,GC
gWG28	weiblich	44	A	1280	5,8	17	16	E,Ey,C,K,L,A,B	E,L,K,Ey,C,A,B	AZA,GC
gWG29	männlich	39	A	160	3,2	6	4	L,E	E,L,(K),S,C,A,B	AZA,GC
gWG30	männlich	60	A	80	0,4	6	4	E,Ey	E,L,P,A,B,Ey	MTX,LEF,GC
gWG31	männlich	59	A	2560	0,9	18	10	E,L,(K),B,A,S	E,L,(K),B,A,S	C,GC
gWG32	männlich	26	R	0	0,7	0	4	Ey,E	E,Ey.L,K,C,B,A,S	LEF,GC
gWG33	männlich	44	A	2560	0	18	6	E,K,A	E,L,K,A	AZA,GC
gWG34	weiblich	54	A	160	0,2	6	2	E	E,L,C,A,B	AZA,GC
gWG35	männlich	37	A	80	1,4	0	4	E,L	E,L,B,Gi	MTX,GC
gWG36	weiblich	55	A	1280	0,4	6	4	L,E	E,L,K?,Ey,S,A,B,P	AZA,GC
gWG37	weiblich	62	R	0	0,8	0	0	---	E,L,K,P,B,Ey	LEF,GC
gWG38	weiblich	45	A	1024	0,4	6	10	E,L,Ey, A,P	E,A	MTX,GC
gWG39	weiblich	45	A	640	0,4	27	10	E,L,K,B,A	E,L,K,B,A	C,GC
gWG40	weiblich	39	A	40	0,2	4	2	C	E, Ey, C	C,GC
gWG41	weiblich	20	A	1280	10,4	28	10	E,(K),A,Ey,S	E,(K),A,Ey,S	GC
gWG42	männlich	87	A	2560	4,7	28	12	E,L,K,A,B,P	E,L,K,A,B,P	C,GC
gWG43	männlich	54	A	0	4	9	2	L	E,A,B	C,GC
gWG44	männlich	83	A	0	0,1	12	4	K,B	K,B	C,GC
gWG45	weiblich	30	A	2560	0,2	12	2	K	E,L,K,Ey,A,B	GC
gWG46	männlich	26	A	320	15,9	5	4	E,L	E,L,(K),A,S,B	GC

Tab. 2: Patienten Charakteristika, deren Blut für die Untersuchungen genutzt wurden. A = aktive Erkrankung; R = Erkrankung in Vollremission; BVAS Berechnung siehe Tabelle 6, Anhang; DEI Berechnung siehe Tabelle 7, Anhang; ELK-Klassifikation siehe Tabelle 7, Anhang; GC = Glukokortikoide, MTX = Methotrexat, AZA = Azathioprin, C = Cyclophosphamid; LEF = Leflunomid, MMF = Mycophenolat Mofetil

Das Blut von 30 gesunden Probanden wurde nach ausführlicher Aufklärung und Einverständnis ebenfalls mit EDTA versetzt und als gesunde Kontrollkohorte in die Studie eingepflegt.

2.1.2 Gewebeproben

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Gewebeproben wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. Alfred C. Feller) zur Verfügung gestellt. Die Diagnosesicherung wurde von Mitarbeitern des Instituts durchgeführt. Auf Grund des Datenschutzes wurden sowohl die asservierten Proben der Patienten als auch die der Kontrollen mit fortlaufenden Nummern verschlüsselt.

Initialen	Geschlecht	Alter	Aktivität	C-ANCA Titer	CRP mg/dl	BVAS aktuell	DEI	Therapie
WG 1	männlich	43	A	1280	13,5	6	5	C, GC
WG 2	weiblich	75	A	64	0,3	4	2	keine
WG 3	weiblich	28	A	0	0,3	4	2	keine
WG 4	männlich	62	A	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
WG 5	männlich	78	A	256	0,3	4	4	C,GC
WG 6	weiblich	65	A	256	17,8	4	6	GC
WG 7	weiblich	52	A	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
WG 8	männlich	21	A	512	11,4	9	6	MTX,GC
WG 9	männlich	85	A	0	0	13	4	C,GC
WG 10	männlich	78	A	0	25,7	4	4	C,GC

Tab. 3: Patienten Charakteristika, deren nasale Biopsien für die Untersuchungen genutzt wurden. n.b. = nicht bekannt bzw. nicht bestimmt; A = aktive Erkrankung; R = Erkrankung in Vollremission; BVAS Berechnung siehe Tabelle 6, Anhang; DEI Berechnung siehe Tabelle 7, Anhang; GC = Glukokortikoide, MTX = Methotrexat, C = Cyclophosphamid

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Webeco, Bad Schwartau
Brutschrank	Nuaire, Plymouth, MN/USA
Drehschüttler	Hassa, Lübeck
Durchflusszytometer, *FACSCalibur*™	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer, *FACSCanto II*™	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefrierschrank, -20 °C	Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank, -80 °C	Nuaire, Plymouth, MN/USA
Kühlschränke, 4 °C	Bosch, Stuttgart
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipetten 25-200 µl	Brand, Wertheim
Mini-MACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikropipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-250 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

Mikroskope:	
Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Zeiss 470918	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
MS Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg
Neubauerzählkammer (0,0025mm²/0,1mm)	Zeiss, Jena
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim
Rüttler Vortex	Heidolph, Kelheim
Sterilbank	Nuaire, Plymouth, MN/USA
Stickstofftank	Arpege
Zentrifugen: Kühlzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Megafuge® 1.0R	Heraeus, Hanau

Verbrauchsmaterial	**Hersteller, Firmensitz**
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
Einweg-Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Einwegpipetten, steril (2,5,10,25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
FACS-Röhrchen, Falcon	Becton Dickinson, Heidelberg
Multiwell™ Gewebekulturplatte (48 well)	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm® M	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, gestopft (10, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturplatte (96-well)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen TPP (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien

2.3.1 Verbrauchschemikalie	**Hersteller, Firmensitz**
7-aminoactinomycin D (7-AAD)	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Antigendemaskierende Pufferlösung	Dako, Hamburg
Aquatex®	Merck, Darmstadt
Biocoll®	Biochrom, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Diaminobenzidin	Dako, Hamburg

Double stain blocking reagent	Dako, Hamburg
Ethylendiamin-N,N,N´,N´-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
FACS® Clean	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
FACS® Flow	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
FACS® Rinse	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Fixation/Permeabilization Buffer	eBioscience, San Diego/USA
Flow Cytometry Staining Buffer	eBioscience, San Diego/USA
Formaldehyd (Methanal)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Hematoxylin	Merck, Darmstadt
Humanserum	PAA, Pasching/Österreich
Interferon alpha (IFNα)	PBL, Piscataway, NJ/USA
Isopropanol	VWR, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Permeabilization Buffer	eBioscience, San Diego/USA
Peroxidase Blocking Buffer	Dako, Hamburg
Proteinase 3	Athens Research and Technology, Athens/USA
RPMI 1640 (Hydrogencarbonat-Puffersystem)	Biochrom, Berlin
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Berlin
TBS (trisgepufferte Salzlösung, pH7,6)	Merck, Darmstadt
Trypanblau 0,4 %	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Xylene	Merck, Darmstadt

2.3.2 Puffer und Nährmedien

Die Herstellung der folgenden aufgeführten Lösungen erfolgte unter aseptischen Bedingungen.

Puffer/Nährmedium	**Zusammensetzung**
Blockingpuffer	5% Humanserum, 0,1% BSA in PBS
Fixierungspuffer	1% Formaldehyd in PBS
Kulturmedium	10% Humanserum, L-Glutamin, 200 IE/l Penicillin 0,1mg/ml Streptomycin in RPMI 1640

Probenpuffer	0,1% BSA in PBS
MACS-Puffer	0,5% BSA und 2mM EDTA in PBS mit einem pH von 7,2

2.4 Antikörper

Die Bestimmung der optimalen Konzentration, der in der unten aufgeführten Tabelle verwendeten Antikörper, erfolgte mittels Titrationsversuchen.

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugation	Optimale Konzentration (µl/400µl)	Firma/ Herkunft	Einsatz
Maus IgG_1	MOPC-21	----	APC	2,5µl	BD	FACS
Maus IgG_{2a}	G155-178	----	APC	2,5µl	BD	FACS
Maus IgG_1	MOPC-21	----	FITC	2,0µl	BD	FACS
Maus IgG_1	MOPC-21	----	PE	2,0µl	BD	FACS
Maus IgG_{2a}	MOPC-173	----	PE	2,0µl	BD	FACS
Ratte IgG_{2a}	----	----	PE	2,5µl	eBioscience	FACS
Maus IgG_1	MOPC-31C	----	PE-Cy5®	2,0µl	BD	FACS
Maus IgG_1	X40	----	PE-Cy7®	2,0µl	BD	FACS
CD3	----	----	----	----	HISS	Stimulation
CD4	RPA-T4	Maus IgG_1	APC	1,5µl	BD	FACS
CD4	RPA-T4	Maus IgG_1	PacificBlue®*	1,5µl	BD	FACS
CD8	SK1	Maus IgG_1	PerCP	1,5µl	BD	FACS
CD25	M-A251	Maus IgG_1	FITC	2,5µl	BD	FACS
CD25	M-A251	Maus IgG_1	PE-Cy7®	2,5µl	BD	FACS
CD25	----	----	MicroBeads*[1]	----	Miltenyi	Seperation
CD27	M-T271	Maus IgG_1	FITC	2,5µl	BD	FACS
CD28	CD28.2	Maus IgG_1	PE-Cy7®	2,5µl	BD	FACS
CD103	Ber-ACT8	Maus IgG_1	PE	2,5µl	BD	FACS
CD103	Ber-ACT8	Maus IgG_1	FITC	2,5µl	BD	FACS
CD152/ CTLA4	BNI3	Maus IgG_{2a}	PE	2,5µl	BD	FACS
CD154/ CD40L	5C8	Maus IgG_{2a}	APC	2,5µl	Miltenyi	FACS
CD279/ PD1	MIH4	Maus IgG_1	APC	2,5µl	eBioscience	FACS
CCR4	1G1	Maus IgG_1	PE	2,0µl	BD	FACS
FoxP3	PCH101	Ratte IgG_{2a}	PE	2,5µl	eBioscience	FACS
IFN-α/β R1	85228	Maus IgG_1	PE	2,5µl	RnD Systems	FACS

Tab. 4: Übersicht der genutzten Antikörper für die Durchflusszytometrie und der Suppressionsuntersuchung. APC: Allophycocyanin; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; PE: Phycoerythin; PerCP: Peridinin-chlorophyll-protein complex

[1]Antikörper sind an kleine Eisen-Kügelchen gebunden (beads) und somit ferromagnetisch.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Allgemeines zur Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine fluoreszenzaktivierte Zellanalyse, welche auch als FACS-Scan (fluoresence activated cell separation) bezeichnet wird. Sie ist ein quantitatives Verfahren, welches auf Einzellzellebene sowohl morphologische Eigenschaften von Zellen, als auch Fluoreszenz erfassen kann. Extrazelluläre Strukturen, insbesondere Rezeptoren, aber auch intrazelluläre Strukturen, wie der Transkriptionsfaktor FoxP3, können durch spezifische monoklonale Antikörper detektiert werden, die diese als Antigen erkennen. Nach Konjugation dieser Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen ist das Durchflusszytometer in der Lage über die Fluoreszensintensität die Antigenmenge pro Zelle zu quantifizieren. Technisch wird hierbei die Eigenschaft dieser Fluoreszenzfarbstoffe ausgenutzt, nach vorheriger Aktivierung durch einen Laser, z.B. Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm, in einer bestimmten Wellenlänge Licht zu emittieren. Dieses Licht kann durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt werden. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff erhält man somit ein spezifisches Signal (Abb. 18, Anhang). Außerdem lässt sich, unabhängig von den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen, eine Aussage über die Größe der Zelle und deren Granularität treffen, dieses ist gewährleistet durch die Messung von Vorwärtsstreulicht (engl. Forwardscatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (engl. Sidescatter, SSC). Das Vorwärtstreulicht resultiert aus der Reflektion von Licht durch die einzelne Zelle, welches im geringen Winkel (2-20°) reflektiert wird, es korreliert mit der Zellgröße und dem Brechungsindex. Hingegen korreliert das im rechten Winkel gestreute Seitwärtsstreulicht mit der Granularität der einzelnen Zelle (Abb. 19, Anhang). Entscheidendes Merkmal dieser Meßmethode ist, dass innerhalb kürzester Zeit tausende Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet und charakterisiert werden können.

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt mit der jeweiligen gerätespezifischen Software, in dieser Arbeit CellQuest® sowie FACSDiva® der Firma Becton Dickinson. Prinzipiell werden die jeweiligen Ergebnisse als Ereignisse dargestellt, dass bedeutet bei der Darstellung eines bestimmten Fluoreszenzfarbstoffes gekoppelt an ein spezifisches Antigen wird die Stärke der Fluoreszenz pro Zelle wiedergegeben. Je nach Intensität der Signale kann eine lineare oder eine logarithmische Darstellung gewählt werden. Die Art der Darstellung ist abhängig von der Fragestellung der Untersuchung. Ein Histogramm-Plot stellt die Stärke eines Fluoreszenssignales, also die Dichte des gekoppelten Antikörpers, in Korrelation zur Häufigkeit dar (Abb. 20, Anhang). Eine weitere Darstellung ist der zweidimensionale Dot-Plot. Hierbei werden zwei Fluoreszenssignale gegeneinander aufgetragen, so ist es möglich die Beziehung zweier Fluoreszenzen, also zweier Antikörpergebundener Antigene, auf eine Zelle darzustellen (Abb. 21, Anhang). Stellt man in einem Dot-Plot das Vorwärts- und das

Seitwärtsstreulicht gegeneinander in Beziehung so erhält man die Möglichkeit morphologisch die Zellen mit Hilfe ihrer Größe und Granularität voneinander zu unterscheiden. Dadurch ist es möglich Lymphozyten von Granulozyten oder Monozyten zu unterscheiden (Abb. 22, Anhnag). Die gerätespezifische Software ist in der Lage Gruppen von phänotypisch gleichen Zellen weiter zu untersuchen. Dies bedeutet, dass mit Hilfe des Histogramm-Plots oder eines Dot-Plots Zellen näher definiert werden, die in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines weiteren Fluorochroms näher beschrieben werden. So kann man, je nach Vielfalt der genutzten Antikörper, eine spezifische Untergruppe von Zellen darstellen und ihre Häufigkeit in einer Population bestimmen, z.B. den Anteil an $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Lymphozyten bei Patienten mit einer generalisierten Wegenerschen Granulomatose (siehe Ergebnissteil). Ferner ist es möglich die Dichte des gebundenen Fluorochroms und somit die Dichte des Antigens auf bzw. in den Zielzellen zu bestimmen, dieser Wert wird als MFI (Mean Fluorescence Intensity) angegeben. In dieser Arbeit wurden Lymphozyten, speziell T-Lymphozyten, näher untersucht, welche durch die Marker CD4 sowie CD8 in $CD4^+$T-Helfer-Zellen bzw. $CD8^+$zytotoxische T-Zellen unterschieden wurden.

2.5.2 Färbung der Oberflächenantigenen

Die folgenden Arbeitschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank. Zunächst erfolgt die Isolierung der PBMC aus den gewonnenen Blutproben. Hierfür werden 30ml des in EDTA versetzten Blutes der Probanden mit der gleichen Menge RPMI bei 4°C gemischt. Anschließend erfolgt die langsame Überschichtung der Mischung auf Biocoll im Verhältnis 2 zu 1 in 50 ml Röhrchen. Die Proben werden nun für 35min zentrifugiert ohne Bremsung und unter langsamer Beschleunigung bei 20°C und 1400 U/min. Innerhalb dieser Zeit erfolgt die Separation der zellulären Bestandteile gemäß der jeweiligen Dichte. Nach der Zentrifugation stellen sich die PBMC als weißlicher Ring oberhalb der Ficollschicht dar. Kleinere korpuskuläre Bestandteile, insbesondere Erythrozyten, stellen sich als Pellet am Boden des Röhrchens dar. Die PBMC werden nun vorsichtig entnommen und bei 4°C mit kaltem PBS zweifach gewaschen, hierbei erfolgt zweimalig die Zentrifugation für 10 min bei 1000 U/min. Im Anschluss erfolgt die Zellzählung, hierbei werden 10 µl der PBMC/PBS Mischung mit 190 µl Trypanblau 0,4% versetzt und anschließend in die Neubauerzählkammer überführt und ausgezählt. Es erfolgt nun die Einstellung der Zellsuspension auf 1 Mio Zellen pro ml. Hierfür wird die PBMC/PBS Mischung zentrifugiert und anschließend mit der jeweiligen Menge Blockingpuffer versetzt. Die Suspension inkubiert nun in einer Konzentration von 1 Mio Zellen / ml für 15 min bei 4°C, während dieser Zeit erfolgt die Blockade von unspezifischen, gegen humane Immunglobuline gerichteten Bindungen mittels des im Blockingpuffer enthaltenen Humanserum. Anschließend erfolgt die Färbung der Zellen gemäß des zu untersuchenden Rezeptorprofils bei 4°C für 30 min in

Dunkelheit, in unterschiedlicher Antikörperkonzentration (siehe Tab. 3). Nach der Färbung erfolgt eine zweifache Waschung mit kaltem PBS und abschließend die Überführung der Proben in spezifische FACS-Röhrchen. Zur längeren Lagerung werden die Proben nach der zweiten Waschung mit Fixierungspuffer versetzt. Es erfolgt nun die Messung im Durchflusszytometer.

2.5.3 Färbung von intrazellulären FoxP3

Zur Färbung des intrazellulären FoxP3 werden zunächst die Arbeitschritte zur Anfärbung extrazellulärer Antigene vollzogen. Nach der extrazellulären Färbung der Zellen werden diese nicht mit PBS sondern mit Flow Cytometry Staining Buffer in einer Konzentration von 0,5 Mio Zellen / ml gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit Fixation/Permeabilization Buffer in einer Konzentration von 1 Mio Zellen / ml für 45 min bei 4°C in Dunkelheit, während dieser Zeit erfolgt die Bildung von Kanälen innerhalb der Zellmembran. Nach der Inkubation wird die Suspension zweimalig mit Permeabilization Buffer gewaschen. Es erfolgt nun die intrazelluläre Blockade von unspezifischen Bindungen gegen Immunglobuline. Da der FoxP3 Antikörper Bestandteile von Immunglobulinen gewonnen aus Rattenseren enthält, erfolgt die Blockade mit 200 µl Rattenserum pro 1 Mio Zellen für 15 min. Nach Inkubation werden die Zellen zweifach mittels Permeabilization Buffer gewaschen. Anschließend erfolgt die intrazelluläre Färbung der Zellen mit dem FoxP3 Antikörper für 30 min bei 4°C in Dunkelheit. Abschließend erfolgt die Fixierung der Zellen in 400 µl Flow Cytometry Staining Buffer nach einer zweifachen Waschung der Zellen mittels Permeabilization Buffer. Es erfolgt nun die Messung im Durchflusszytometer.

2.6. Zellkultur

2.6.1 positive Selektion von $CD25^+$ T-Zellen mittels magnetischer Isolation

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen stammen von 3 Patienten (gWG 41, 45 und 46), welche unter geringer immunsuppressiver Therapie (low-dose Cortisontherapie) zum Zeitpunkt der Blutentnahme standen, aufgrund der bekannten Inhibition der *in vitro* Aktivität von Treg unter Medikation mit Cyclophosphamid (Lutsiak et al. 2005), sowie 3 alters- und geschlechtgleichen gesunden Kontrollen.

Die folgenden Arbeitschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen unter der Werkbank. Zunächst erfolgt die Isolierung der PBMC aus den gewonnenen Blutproben, wie unter Kapitel 2.5.2 erläutert. Die Zellzahl wird nach Zählung auf 10^7 Zellen eingestellt. Nach Zentrifugation mit 1000 U/min für 5 min werden die Zellen in 90 µl MACS-Puffer aufgenommen. Nun erfolgt die Inkubation mit CD25-Antikörper-Mikromagnetpartikel für 10 min bei 4-8°C im Drehschüttler. Nach zweifacher Waschung der Zellen mit MACS-Puffer durch Hinzufügen

des 10fachen Volumen und anschließender Zentrifugation bei 1000 U/min, erfolgt nach Aufnahme der Zellen in 500 µl MACS Puffer die magnetische Isolation.
Nach Platzierung der MS Säule in den Mini-MACS-Separator, erfolgt die Ankopplung in das magnetischen Feld der MACS MultiStand Vorichtung. Nach einer Spülung der MS Säule mittels MACS-Puffer, erfolgt die Überführung der Zell-Antikörper-Suspension über die MS Säule. Durch das vorhandene Magnetfeld werden die ferromagnetischen Anti-CD25-Antikörper fixiert, und somit ebenfalls die gebunden $CD25^+$ Zellen. Die ungebundenen Zellen stellen die $CD25^-$ Zellen dar. Die MS-Säule wird nun anschließend 3-fach mit MACS-Puffer gespült und anschließend aus dem Magnetfeld entfernt. Die nun folgende Spülung löst die $CD25^+$ Zellen. Nach erneuter Zählung wird der Erfolg der Selektion mittels durchflusszytometrischer Messung des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^+$ Zellen bestimmt (Methoden siehe Kap. 2.5.2).
In der vorliegenden Arbeit wurde hierbei eine Reinheit von >95% $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen in der $CD25^+$ Zellfraktion und <1% $CD4^+CD25^{high}$ in der $CD25^-$ Zellfraktion sichergestellt.

2.6.2 CFDA-SE / CFSE Färbung

Die Grundlagen der CFDA-SE bzw. CFSE basierenden Proliferationsuntersuchung von Treg wurden bereits durch frühere Arbeiten evaluiert (Venken et al. 2007). Es zeigte sich ferner, dass Treg zu Suppression von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) keine weiteren Zelltypen benötigen (Oberg et al. 2006), sodass in diesem Experiment keine weiteren sog. „Responder-Zellen“ hinzugefügt wurden
Vor der Inkubation werden die Zellfraktionen nun in die einzelnen Mischungsverhältnisse gebracht. Zur *in vitro* Stimulation werden neben unbehandelten PBMC und den ungemischten $CD25^+$ sowie $CD25^-$ Fraktionen, je ein 1 zu 1 Mischverhältnis (50% je $CD25^+$ bzw. $CD25^-$ Zellfaktion) sowie ein 1 zu 2 Mischverhältnis (33 % $CD25^+$ sowie 66% $CD25^-$ Zellfraktion) angelegt. Diese Fraktionen werden nun nach Zentrifugation mit 1300 U/min für 5 min in steriles PBS und CFDA-SE resuspendiert. Bei einer Konzentration von 0,5 µM CFDA-SE werden die Zellfraktionen bei 37°C im Dunkeln für 10 min inkubiert. Nach einer zweifachen Waschung mit kaltem PBS wird die erfolgreiche Färbung mittels der durchflusszytometrischen Messung der intrazellulären Konzentration von CFDE-SE überprüft, hierbei enthalten alle Zellen den gleichen Anteil an CFDA-SE. Proliferiert eine gefärbte Zelle so verringert sich der Anteil von CFDA-SE im Zytoplasma. Stark proliferierte Zellen sind durchflusszytometrisch als CFDA-SE bzw. $CFSE^{low}$ Zellen differenzierbar (Venken et al. 2007). Durchflusszytometrisch wird dabei die laserinduzierte Fluoreszenz von CFDA-SE ausgenutzt, welche über den Detektor FL-1 registriert wird.

2.6.3 Suppressionsexperiment

Die unter Kapitel 2.6.2 angelegten und mit CFDA-SE gefärbten Zellen werden nun in einer 48-well Platte mit dem Kulturmedium versetzt. Die Zellzahl variiert hierbei aufgrund der geringen Verfügbarkeit der Treg. Die Zellzahl der PBMC beträgt $1x10^6$ /ml, hingegen die Zellzahl der separierten Zellen und der Mischfraktionen $1x10^5$ /ml beträgt. Die verschiedenen Zellfraktionen werden nun mit unterschiedlichen Stimulantien versetzt. Neben einer Negativkontrolle (reines Kulturmedium) erfolgt eine Stimulation mit löslichen anti-CD3 Antikörper in verschiedener Konzentration (0.5µg/ml; 1.0µg/ml), Interferon alpha (IFNα, 500U/ml), naive Proteinase 3 (PR3; 5µg/ml), PR3 + IFNα sowie hitze-inaktivierter PR3 (iPR3) plus IFNα für 9 Tage bei 37°C und 5%CO2 im Brutschrank. Die Länge der Inkubation wurde zuvor durch weitere Experimente mit 9 Tagen als optimale Zeit detektiert.

Nach 9 Tagen werden die Zellen resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht. Tote Zellen werden durch die Färbung mit 7-AAD (7-aminoactinomycin D) detektiert, die proliferierten Zellen werden als CFDA-SE^{low} Zellen dargestellt (nach Venken et al. 2007). Durch die Möglichkeit der Nutzung des Mehrfachlasersystem ist nun durch gleichzeitige Färbung mehrerer Rezeptoren eine weitere Untersuchung der proliferierten Zellen möglich. Hierbei ist auch die Untersuchung induzierter Treg ($CFSE^{low}CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ T-Zellen) möglich. Die prozentuale Suppression der Proliferation von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) durch Treg erfolgt mittels evaluierter Formel (Abdulahad et al. 2007; Venken et al. 2007; Chen et al. 2007):

% Suppression= 100 - (100 x [% der Proliferation der Mischkulturen [[1:1 oder 1 :2]] /
% der Proliferation der $CD4^+CD25^-$ T-Zellen allein])

2.6.4 Zytokin - Bestimmung

Je 100 µl Überstand aus der unveränderten PBMC Zellsuspension unter den verschiedenen Stimulantien wurden 24h sowie 9 Tage nach Stimulation entnommen und auf die Konzentration von Tumornekrosefaktor alpha (TNFα), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 17 (IL-17) und Interferon gamma (INFγ) untersucht. Hierbei erfolgte die Untersuchung durch eine beauftragte Firma (Microbionix, München, Deutschland) per Multiplex-Zytokine-Bestimmung.

2.7. Immunhistologie

Zwecks Nachweis FoxP3$^+$ T-Zellen erfolgte eine Doppelfärbung von CD3 und FoxP3.
Gewebe aus granulomatösen Läsionen von Patienten mit einer histologische gesicherten Wegenerschen Granulomatose (Tab.3) bzw. Kontrollgewebe aus Probeexisionen von Patienten mit chronischer Sinusitis wurden initial in Paraffin eingebettet und anschließend auf eine Größe von 2-3 µm zugeschnitten und auf Superfrost-Objektträger aufgebracht.
Zum Zeitpunkt der Färbung werden die Gewebeschnitte entwachst, durch Waschen mit Xylol, und rehydriert. Zwecks späterer Antikörper-Bindung erfolgt im nächsten Schritt die Demaskierung des Antigens mit demaskierender Pufferlösung bei pH 9.0 im Mikrowellenherd. Nach Abkühlung werden die Proben mit TBS gewaschen. Anschließend wird endogene Peroxidase 5 min mittels Inkubation mit Peroxidase Blocking Buffer unterdrückt. Nach einer weiteren Waschung mit TBS werden die Proben nun für 60 min mit dem FoxP3 Antikörper inkubiert (Maus Anti-Mensch Antikörper; Clone: 236A/E7; eBioscience, San Diego/ USA). Nach der ersten Inkubation werden die Proben gewaschen und nun mit dem zweiten Antikörper, welcher wiederum gegen den primären Antikörper gerichtet ist, für 30 min inkubiert (Anti-Maus Antikörper; Dako, Hamburg). Hierbei erfolgt zusätzlich eine Reaktionsverstärkung durch Zuführung von Diaminobenzidine als farbstoffbildenes Substrat. Anschließend erfolgt eine Waschung mit destilliertem Wasser. Als nächstes erfolgt die Färbung des zweiten Antigens dem Rezeptor CD3. Zunächst erfolgt eine Blockade der endogenen alkalischen Phosphatase mittels Blockingpuffer (double stain blocking regent; Dako), hiernach erfolgt die 30 min Inkubation mit dem CD3 Antikörper (Kaninchen Anti-Mensch Antikörper, Dako, Hamburg). Anschließend erfolgt nach einer Waschung die weitere Inkubation mit dem Anti-Kaninchen Antikörper (Dako, Hamburg) für 30 min. Hierbei erfolgt ebenfalls zusätzlich eine Reaktionsverstärkung durch Zuführung von Fast-red® (Dako, Hamburg) für 5 min. Abschließend erfolgt eine Kernfärbung mit Hematoxylin und Versieglung mit Aquatex® (Merck, Darmstadt). Die mikroskopische Auswertung erfolgt im Anschluss.

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Dabei wurden für intervallskalierte und normalverteilte Variablen die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson, für nicht normalverteilte Variablen der Chi-Quadrat-Test und für ordinalskalierte oder nicht normalverteilte Variablen die Rangkorrelation nach Spearman verwendet. Der gepaarte Student T-Test wurde zum Vergleich der voneinander abhängigen Gruppen und der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der nicht

normalverteilten Mittelwerte zweier abhängiger Gruppen eingesetzt. Die Ergebnisse waren signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p unter 0.05 lag und hochsignifikant, wenn p kleiner als 0.01 war.

3. Ergebnisse

3.1 Kohortenanalyse, *ex vivo* Untersuchungen

3.1.1 Klinische Charakterisierung

Die Daten beziehen sich auf die *ex vivo* Phänotypisierung der T-Lymphozyten der Patienten mit WG im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Es wurden 49 Patienten mit einer WG untersucht. Diese untergliederten sich in 46 Patienten mit einer generalisierten Form der WG (gWG; Alter: 52.24±2.43 Jahren) sowie 3 Patienten mit eine lokalisierte Form der WG (lWG; Alter: 51.67±10.17 Jahren). Die Patienten mit einer generalisierten Form der WG wurden im weiteren Verlauf jeweils in zwei Kohorten unterteilt. Zum einen in das Patientenkollektiv, welches sich in klinischer Remission der WG (gWG R) befand (n=10) mit einem mittleren Lebensalter von 62.60±4.92 Jahren, zum anderen das Patientenkollektiv mit klinischer Aktivität der WG (gWG A; n=36), mit einem mittleren Lebensalter von 49.36±2.62 Jahren (siehe Abb. 23, Anhang). Die Krankheitsaktivität zeigte sich bei den Patienten mit lWG durch einen DEI von 2.00±0.00 und einen BVAS von 3.33±1.45. Die Gruppe der Patienten mit gWG wies eine Krankheitsaktivität mit einem DEI von 4.17±0.57 und einem BVAS von 5.36±1.00 auf. Innerhalb dieser Kohorte zeigten die Patienten in Remission einen DEI und einen BVAS von 0, hingegen die Patienten mit einer aktiven klinischen Symptomatik einen DEI von 5.33±0.60 und einen BVAS von 6.89±1.142 aufwiesen. Zum Vergleich dienten 30 gesunde Probanden mit einem mittleren Lebensalter von 41.47± 2.02 Jahren.

3.1.2 Keine Unterschiede in der Anzahl der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie in deren Verhältnis zueinander

Durchflusszytometrisch wurden 100.000 Lymphozyten hinsichtlich ihres Phänotypes untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Kohorten hinsichtlich der Gesamtzahl der $CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen und im Verhältnis $CD4^+$ T-Zellen / $CD8^+$ T-Zellen (Tab.5).

Kohorte	Gesamtzahl $CD4^+$ T-Zellen	Gesamtzahl $CD8^+$ T-Zellen	Verhältnis $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen
HC	41030±2019	24320±1507	1.98±0.16
WG	36830±1919	22060±1676	2.13±0.18
lWG	42330±2375	21270±5361	2.33±0.71
gWG	36860±2040	22120±1765	2.11±0.19
gWG R	47620±3868	19220±2190	2.54±0.39
gWG A	33690±2118	22970±2185	2.00±0.21

Tab. 5: Anzahl und Verhältnis von $CD4^+/CD8^+$ T-Zellen. Die absolute Gesamtzahl bezieht sich auf 100.000 Lymphozyten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.1.3 Die Anzahl von natürlichen regulatorischen $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) war bei der generalisierter WG erhöht und korrelierte positiv mit dem C-ANCA Titer

Die Expression von CD25 erlaubt die Differenzierung zwischen Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen), aktivierten T-Zellen ($CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen) sowie natürlichen regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen). Unter Effektor T-Zellen versteht man im Allgemeinen T-Zellen, die nach Antigenerkennung aus naiven T-Zellen differenzieren (Lanzavecchia und Sallusto, 2000). Dies impliziert, dass Effektor T-Zellen auch aktivierte T-Zellen $CD25^{med}$ T-Zellen sind. Der üblichen internationalen Gepflogenheit in Studien zu Treg folgend, werden die Effektor T-Zellen in dieser Arbeit rein als $CD25^{neg}$ T-Zellen beschrieben, die aktivierten T-Zellen als $CD25^{med}$ T-Zellen (Baecher-Allan et al., 2001). Die Differenzierung zwischen einer hohen und mittleren Expression von CD25, also die Darstellung von Treg, erfolgt zusammen mit der intrazellulären Expression von FoxP3. Im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen, exprimiert die Fraktion der Treg einen deutlich höheren Anteil an $FoxP3^+$ Zellen (siehe Kapitel 1.2 sowie 3.1.5).

Die Anzahl von Treg zeigt sich bei Patienten mit einer generalisierten WG unabhängig von der klinischen Aktivität deutlich erhöht. Bei gesunden Kontrollen stellte sich ein relativer Anteil von 0.95±0.06% Tregs innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen dar (Abb. 3), ähnlich der relative Anteil bei Patienten mit einer lWG mit 1.33±0.56%. Hingegen zeigte sich im Vergleich der Anteil an Treg bei Patienten mit einer gWG von 2.56±0.39% signifikant erhöht. Diese Erhöhung war unabhängig von der klinischen Manifestation, denn auch Patienten in Remission zeigten eine deutliche Erhöhung mit 2.08±0.48%. Patienten mit einer aktiven gWG hatten den höchsten relativen Anteil an Treg mit einem Wert von 2.72±0.40% innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen.

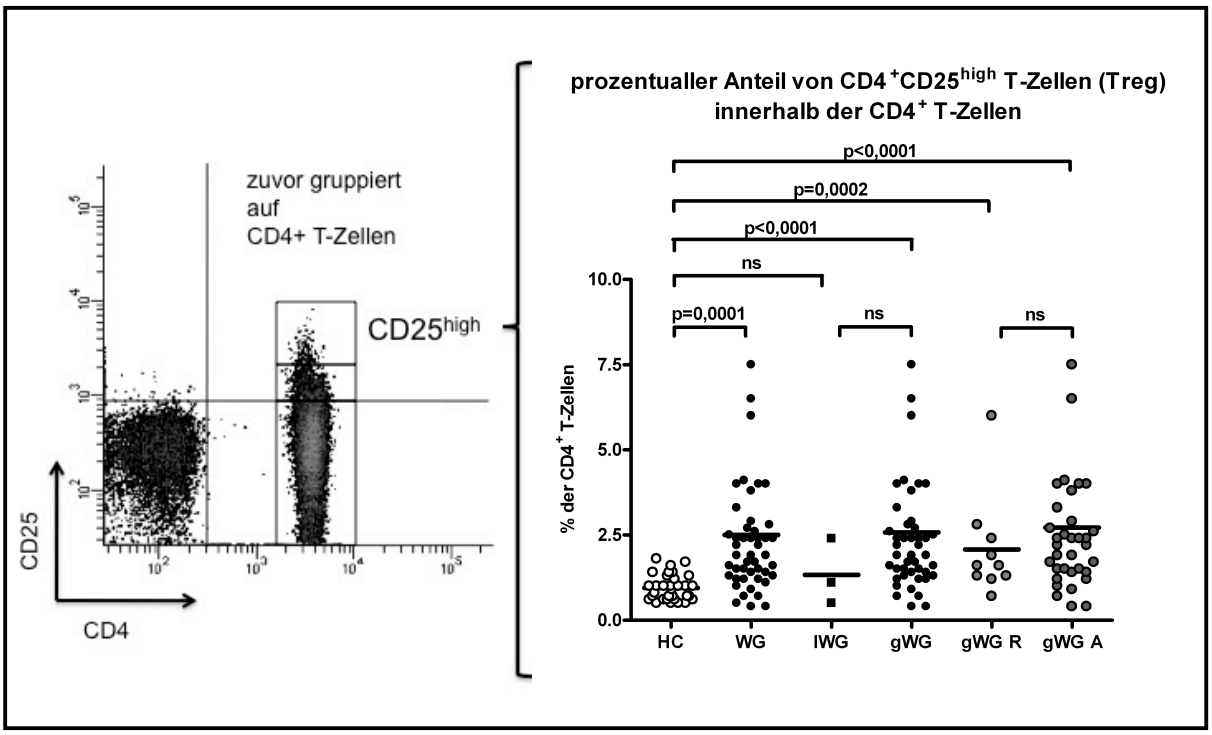


Abb. 3: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) in der Population der $CD4^+$ T-Zellen. Links ein exemplarischer DotPlot mit der Darstellung von $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) zuvor gruppiert aus $CD4^+CD8^-$ T-Zellen. Im rechten Bereich Darstellung des relativen Anteils von Treg an $CD4^+$ T-Zellen. Patienten mit einer generalisierten WG präsentierten sowohl in der aktiven Form als auch in klinischer Remission eine deutliche Erhöhung an $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg).

Vergleicht man den prozentualen Anteil der Treg bei Patienten mit einer aktiven gWG mit den Aktivitäts-Scores BVAS bzw. DEI, so zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. Korreliert man jedoch den prozentualen Anteil der Treg mit dem C-ANCA-Titer bei Patienten mit gWG, so zeigte sich eine positive Korrelation (r^2=0.408; p=0.0001; Abb. 4).

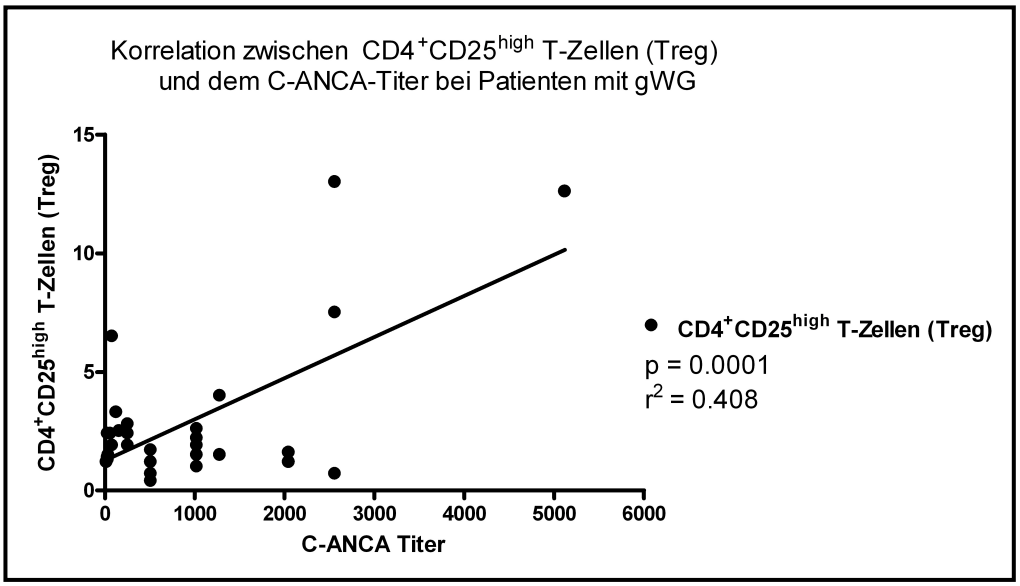


Abb. 4: Korrelation zwischen dem C-ANCA-Titer und dem prozentualen Anteil von Treg bei Patienten mit einer generalisierten WG. Der Anteil von Treg korreliert signifikant positiv mit dem serologischen C-ANCA-Titer.

3.1.4 Bei der generalisierten WG zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierten T-Zellen) und eine Erniedrigung der $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen)

Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigte sich bei Patienten mit einer generalisierten WG eine signifikante Zunahme der $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen. Im Vergleich zu Patienten mit einer lokalisierten Form der WG war dies nicht nachweisbar. Mit 14.57±1.02% $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen präsentierten Patienten mit einer aktiven gWG eine erhöhte Anzahl als gesunde Kontrollen mit 6.63±0.47%. Hierbei zeigte sich auch bei Patienten mit einer klinischen Remission eine signifikante Vermehrung von $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen mit 12.45±2.29%, verglichen mit Patienten mit einer aktiven klinischen Manifestation mit 15.18±1.14% ohne Unterschied. Patienten mit einer lWG präsentierten hingegen einen Anteil von 7.80±1.62% $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (Abb. 5).

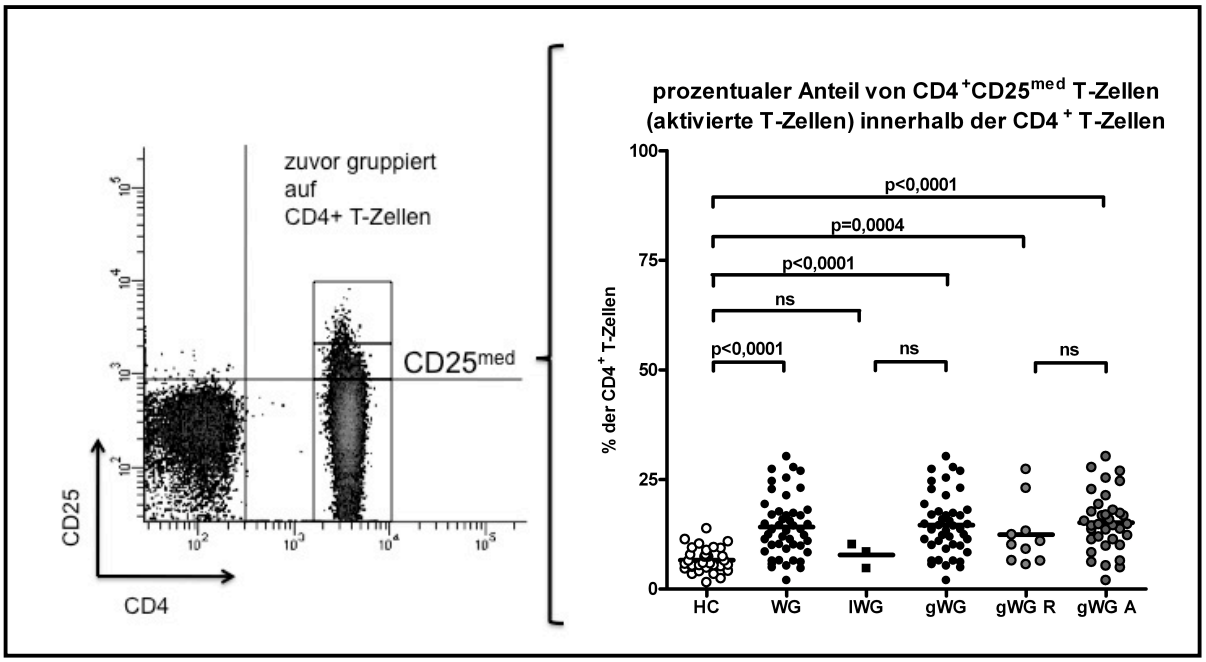


Abb. 5: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen) in der Population der $CD4^+$ T-Zellen. Links ein exemplarisches DotPlot mit der Darstellung $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierten T-Zellen) zuvor gruppiert aus $CD4^+CD8^-$ T-Zellen. Im rechten Bereich Darstellung des relativen Anteils von $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen an $CD4^+$ T-Zellen. Patienten mit einer generalisierten WG präsentierten sowohl in der aktiven Form als auch in klinischer Remission eine deutliche Erhöhung an $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierten T-Zellen).

Spiegelbildlich zeigte sich mit der prozentualen Erhöhung der aktivierten T-Zellen eine signifikante Erniedrigung des prozentualen Anteils an Effektor T-Zellen, also $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen, innerhalb der $CD4^+$ T-Zellpopulation bei Patienten mit einer generalisierten WG im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abb. 6). Hierbei zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen mit einem prozentualen Anteil von 92.42±0.48% im Vergleich zu Patienten der Gruppe lWG mit einem prozentualen Anteil von 90.87±1.67%. Hingegen präsentieren Patienten mit einer gWG einen signifikant niedrigeren

prozentualen Anteil von 82.85±1.24%, unabhängig von der klinischen Aktivität (gWG R: 85.47±2.63%; gWG A 82.10±1.39%).

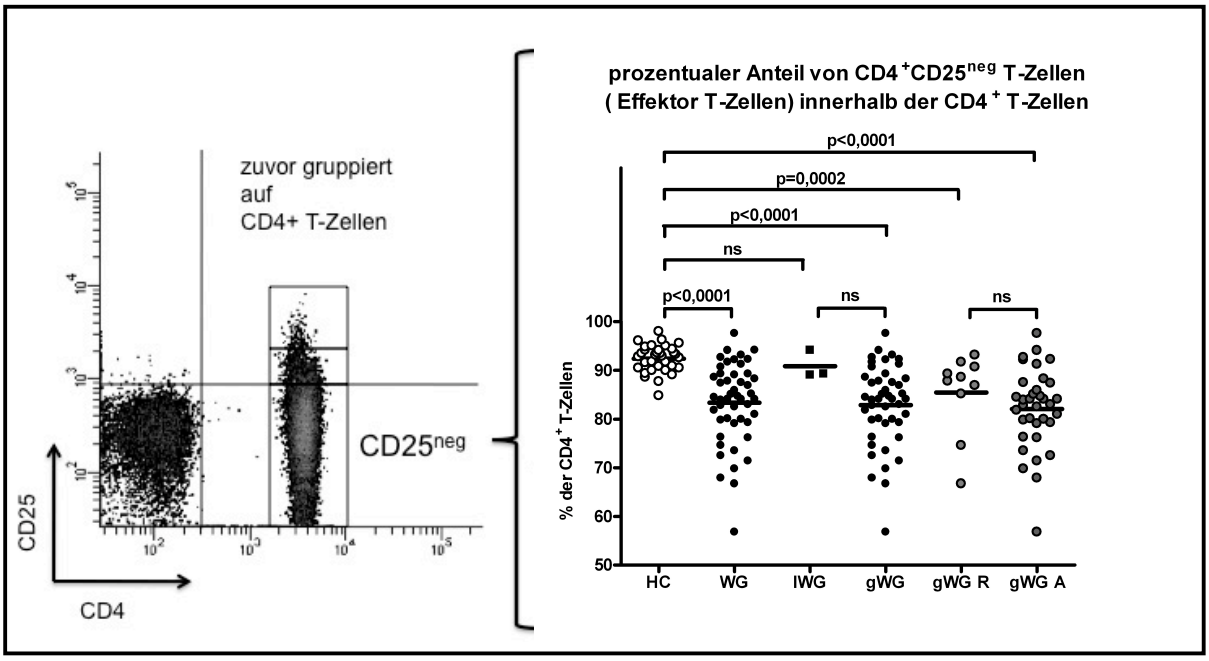


Abb. 6: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) in der Population der $CD4^+$ T-Zellen. Links ein exemplarisches DotPlot mit der Darstellung $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) zuvor gruppiert aus $CD4^+CD8^-$ T-Zellen. Im rechten Bereich Darstellung des relativen Anteils von $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen an $CD4^+$T-Zellen. Patienten mit einer generalisierten WG präsentierten sowohl in der aktiven Form als auch in klinischer Remission eine deutliche Erniedrigung an $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen).

3.1.5 Erniedrigter prozentualer Anteil von $FoxP3^+$ Treg sowie erhöhter Anteil $FoxP3^+$ Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen) bei WG

Während die $CD4^+$- sowie $CD8^+$ T-Zellfraktionen keine Unterschiede in der Anzahl von $FoxP3^+CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen verglichen mit gesunden Kontrollen aufwiesen, zeigte sich bei Patienten mit einer aktiven gWG ein signifikanter Verlust von $FoxP3^+$Treg. Bei gesunden Probanden (n=11) stellte sich ein prozentualer Anteil von 49.75±4.75% $FoxP3^+$Treg dar, hingegen war bei aktiver gWG (n=18) nur ein prozentualer Anteil von 31.49±3.89% FoxP3 zu ermitteln (Abb. 7). Verglichen mit anderen Publikationen zeigte sich ein geringerer Anteil von FoxP3 in den Treg bei HC. Ursächlich hierfür ist eine andere Methodik der Messung, so wurden zum einen in anderen Arbeiten durchflusszytometrisch sortierte Treg analysiert zum anderen der Anteil von FoxP3 per PCR ermittelt (Valencia et al. 2007; Miyara et al. 2006), wohingegen in dieser Arbeit der Anteil direkt durchflusszytometrisch ermittelt wurde.

Patienten mit einer IWG sowie Patienten mit einer gWG in Remission wurden in diese Untersuchung nicht miteinbezogen.

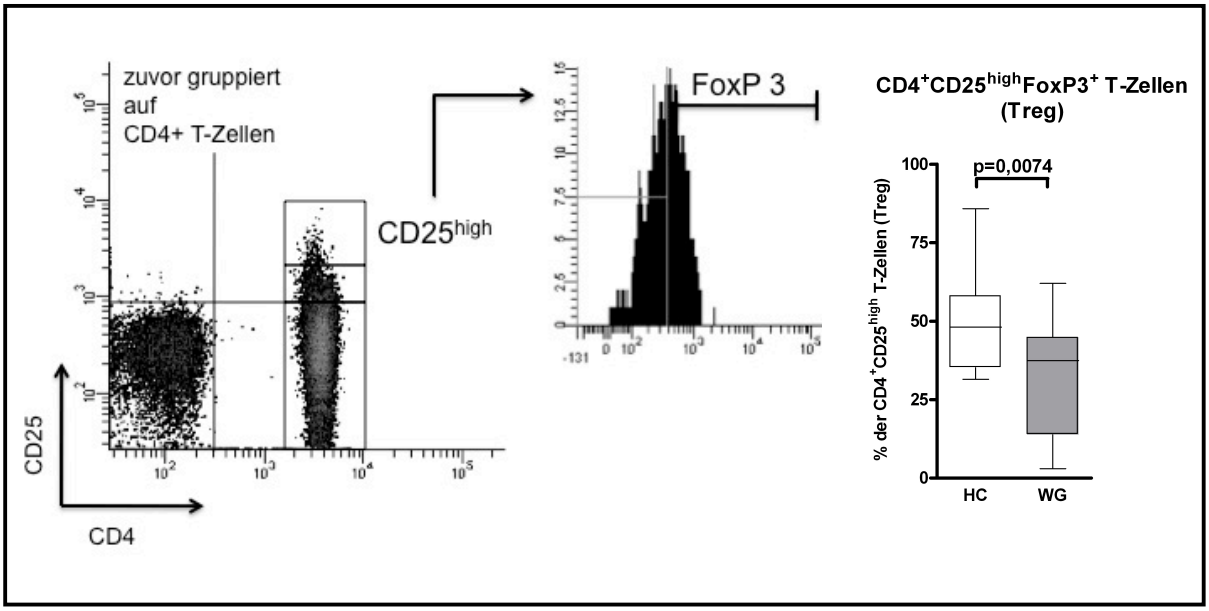


Abb. 7: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ T-Zellen (Treg) in der Population der $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg). Links ein exemplarisches DotPlot mit der Darstellung $CD4^+CD25^{high}$ Treg zuvor gruppiert aus $CD4^+CD8^-$ T-Zellen. Im mittleren Bereich exemplarisches Histogramm der intrazellulären Expression von FoxP3 zuvor gruppiert auf die Fraktion $CD4^+CD25^{high}$ Treg. Im rechten Bereich Darstellung des relativen Anteils von $FoxP3^+$ Treg in der Gesamtpopulation der Treg. Patienten mit einer generalisierten WG präsentierten in der aktiven Form eine deutliche Erniedrigung an $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ Treg.

Betrachtet man die Fraktion der aktivierten T-Zellen, so zeigten sich ebenfalls auch in dieser $FoxP3^+$ T-Zellen. Diese $CD4^+CD25^{med}FoxP3^+$ aktivierten T-Zellen gab es sowohl bei aktiver gWG als auch bei gesunden Kontrollen. Hierbei gab es keinen Unterschied im prozentualen Anteil (HC: 14.35±2.02%; gWG A 9.98±1.89%).

Betrachtet man die Fraktion der $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen, also der Effektor T-Zellen, so fanden sich dort ebenfalls $FoxP3^+$ Effektor T-Zellen. Hierbei zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils dieser Zellen innerhalb der Fraktion der Effektor T-Zellen. Während gesunde Probanden einen prozentualen Anteil von 0.75±0.15% $CD4^+CD25^{neg}FoxP3^+$ T-Zellen aufwiesen, war diese Fraktion mit 2.14±0.46% bei gWG A fast um das Dreifache erhöht (Abb. 8). Die Expression von FoxP3 wir transient auch in Zellen beobachtet, die nicht den Treg zugeordnet werden können, wie z.B. $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen Effektor T-Zellen. Die Funktion dieser Zellen ist bisher nicht gänzlich geklärt (siehe Kapitel 4.1.2).

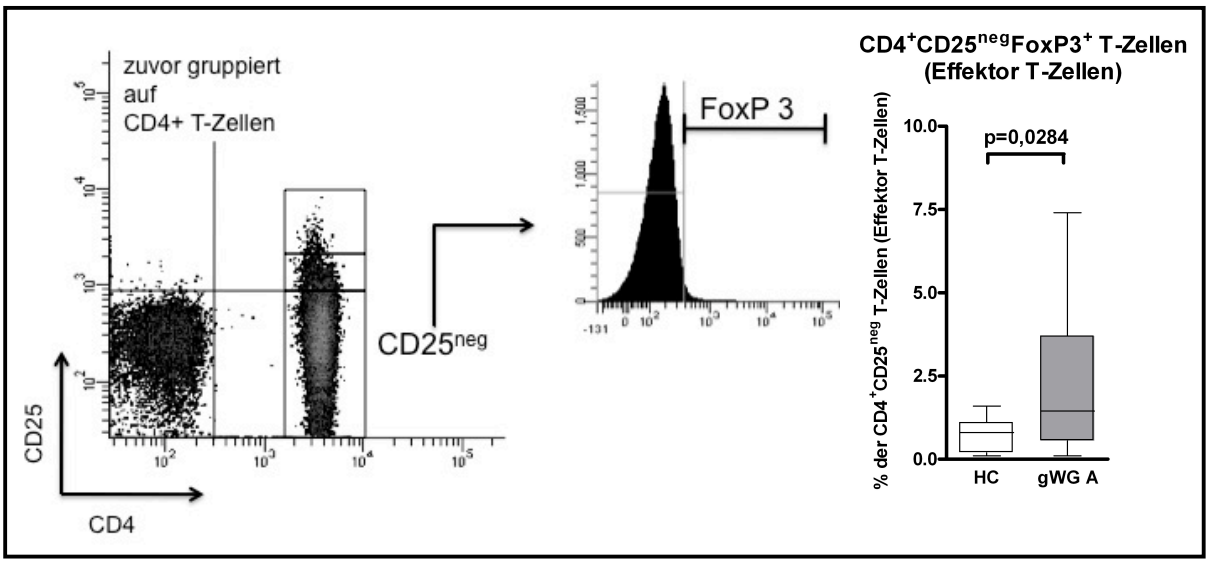


Abb. 8: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{neg}FoxP3^+$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) in der Population der $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen). Links ein exemplarisches DotPlot mit der Darstellung $CD4^+CD25^{neg}$ Effektor T-Zellen zuvor gruppiert aus $CD4^+CD8^-$ T-Zellen. Im mittleren Bereich exemplarisches Histogramm der intrazellulären Expression von FoxP3 zuvor gruppiert auf die Fraktion $CD4^+CD25^{neg}$ Effektor T-Zellen. Im rechten Bereich Darstellung des relativen Anteils von $FoxP3^+$ Effektor T-Zellen in der Gesamtpopulation der Effektor T-Zellen. Patienten mit einer generalisierten WG präsentierten in der aktiven Form eine deutliche Erhöhung an $CD4^+CD25^{neg}FoxP3^+$ Effektor T-Zellen.

3.1.6 Erniedrigter prozentualer Anteil von $CCR4^+$ Treg sowie erhöhter Anteil $CCR4^+$ Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen) bei der generalisierten WG

Betrachtet man die Expression von CCR4 auf $CD4^+$ T-Zellen, so zeigte sich bei allen Gruppen der WG eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils von $CD4^+CCR4^+$ T-Zellen. Gesunde Kontrollen hatten einen signifikant geringeren prozentualen Anteil von $CD4^+CCR4^+$ T-Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen mit 20.82±1.11% im Vergleich zur lWG 27.96±1.88%, gWG 40.73±17.77%, gWG in Remission 30.90±3.43% oder aktiven gWG 26.94±2.24% (Abb. 24, Anhang).

Untersucht man nun die einzelnen T-Zell-Fraktionen so zeigte sich, dass innerhalb der Fraktion der Treg der prozentuale Anteil an $CCR4^+$ Treg bei der gWG, im Gegensatz zu gesunden Kontrollen und lokalisierten WG, signifikant erniedrigt war. Bei gesunden Kontrollen (n=24) exprimierten 86.18± 2.23% der Treg CCR4. Patienten mit einer lWG (n=3) wiesen einen Wert von 94.07±2.83% auf. Hingegen sich bei der gWG (n=34) eine deutlich verminderte Anzahl von $CCR4^+$ Tregs mit 68.10±2.85% darstellte, unabhängig von der klinischen Aktivität (gWG R: 75.38±2.80%; gWG A: 65.87±3.54%; Abb. 9)

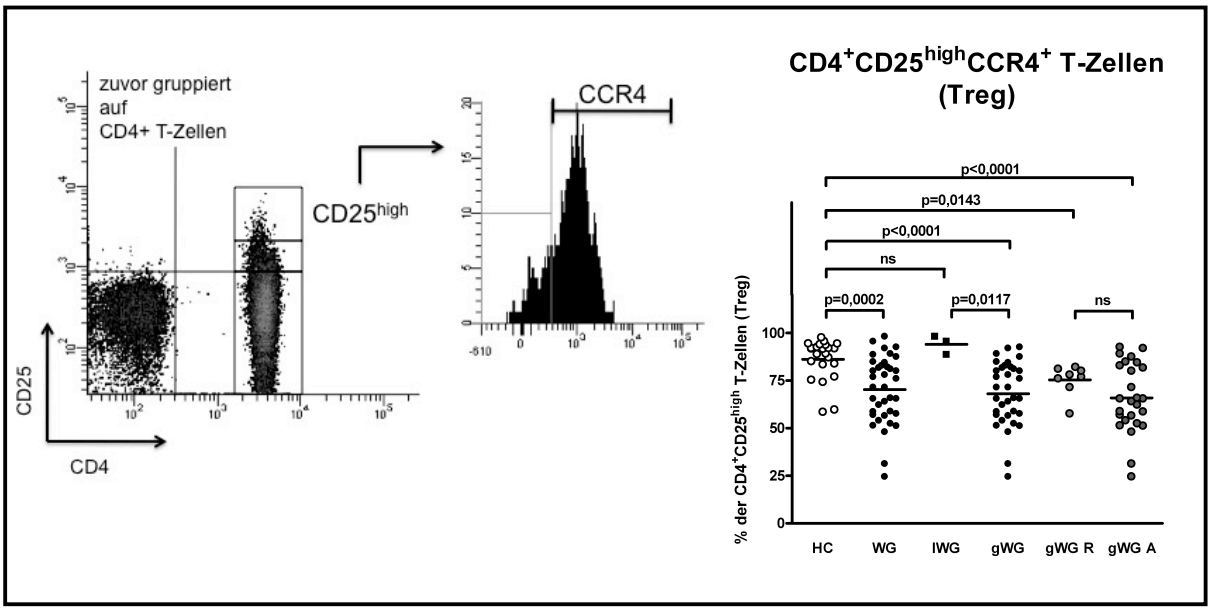


Abb. 9: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{high}CCR4^+$ Treg. Links ein exemplarisches DotPlot mit der Darstellung $CD4^+CD25^{high}$ Treg zuvor gruppiert aus $CD4^+CD8^-$ T-Zellen. Im mittleren Bereich exemplarisches Histogramm der Expression von CCR4 zuvor gruppiert auf die Fraktion $CD4^+CD25^{high}$ Treg. Im rechten Bereich Darstellung des prozentualen Anteils von $CCR4^+$ Treg innerhalb der Fraktion der Treg. Patienten mit einer generalisierten WG präsentierten in der generalisierten Form (gWG R+A) eine deutliche Erniedrigung an $CD4^+CD25^{high}CCR4^+$ Tregs.

Im Gegensatz dazu zeigte sich für die aktivierten T-Zellen, also die $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen, kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Anteils $CCR4^+$ Zellen in den jeweiligen Kohorten (HC:48.07±2.25%; IWG: 55.87±5.96%; gWG: 45.85±2.64%; gWG R: 53.78±3.06%; gWG A: 42.88±3.28%; Abb. 25, Anhang)

Die Erhöhung der $CD4^+CCR4^+$ T-Zellen bei Patienten mit einer WG spiegelte sich auch in der $CD25^{neg}$ T-Zell-Fraktion wieder. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollen mit einem Anteil von 18.91±0.95% zeigten die Effektor T-Zellen bei Patienten mit einer IWG 34.40±12.46% sowie bei Patienten mit einer gWG 24.15±1.86% einen deutlich höherer Anteil an $CCR4^+$ Effektor T-Zellen. Interessanterweise unterschieden sich die Patienten der gWG hinsichtlich der klinischen Manifestation in der Expression verglichen mit gesunden Kontrollen. Patienten in einer Remission zeigten einen signifikant höheren Anteil an $CCR4^+$ Effektor T-Zellen mit 27.22±3.34%, hingegen Patienten mit einer aktiven gWG keinen signifikanten Unterschied aufwiesen mit 22.95±2.22% verglichen mit gesunden Kontrollen ebenso verglichen mit gWG R (Abb. 10).

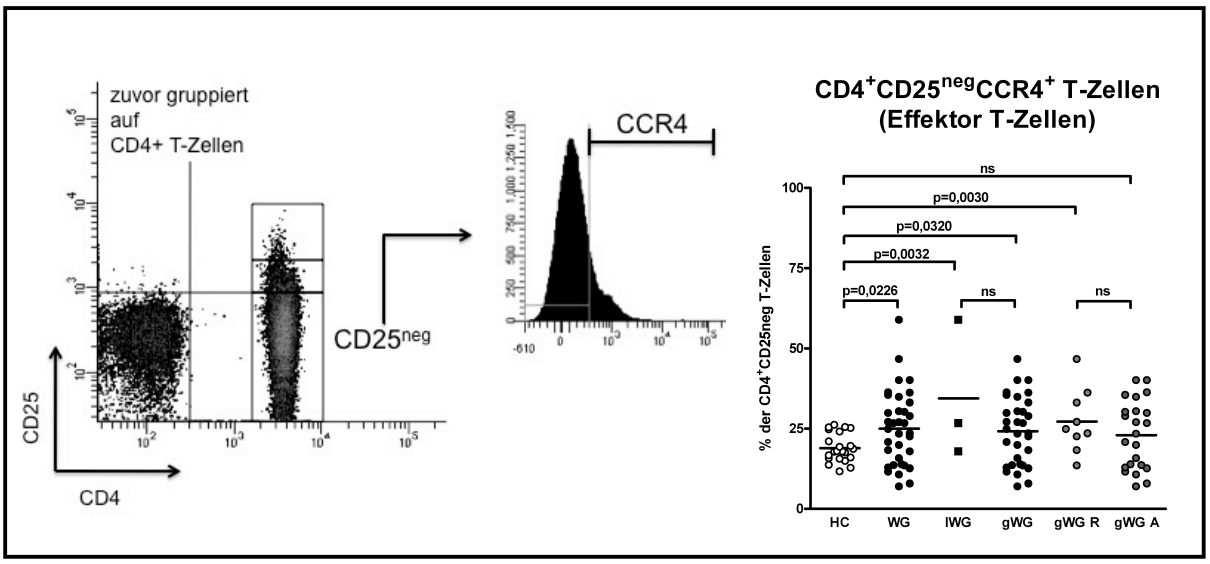


Abb. 10: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{neg}CCR4^+$ Effektor T-Zellen. Links ein exemplarisches DotPlot mit der Darstellung $CD4^+CD25^{neg}$ Effektor T-Zellen zuvor gruppiert aus $CD4^+CD8^-$ T-Zellen. Im mittleren Bereich exemplarisches Histogramm der Expression von CCR4 zuvor gruppiert auf die Fraktion $CD4^+CD25^{neg}$ Effektor T-Zellen. Im rechten Bereich Darstellung des prozentualen Anteils von $CCR4^+$ Effektor T-Zellen. Patienten mit einer generalisierten WG in Remission und lokalisierten WG präsentierten eine deutliche Erhöhung an $CD4^+CD25^{neg}CCR4^+$ Effektor T-Zellen.

Diese Unterschiede ließen eine Abhängigkeit vom Anteil $CCR4^+$ Effektor T-Zellen bei WG mit der klinischen Aktivität vermuten. Es zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil $CD4^+CD25^{neg}CCR4^+$ Effektor T-Zellen in der Gesamtpopulation der Effektor T-Zellen und dem BVAS (r^2: -0.5782; p=0.0002; Abb. 11). Eine signifikante Korrelation mit dem DEI wurde nicht beobachtet.

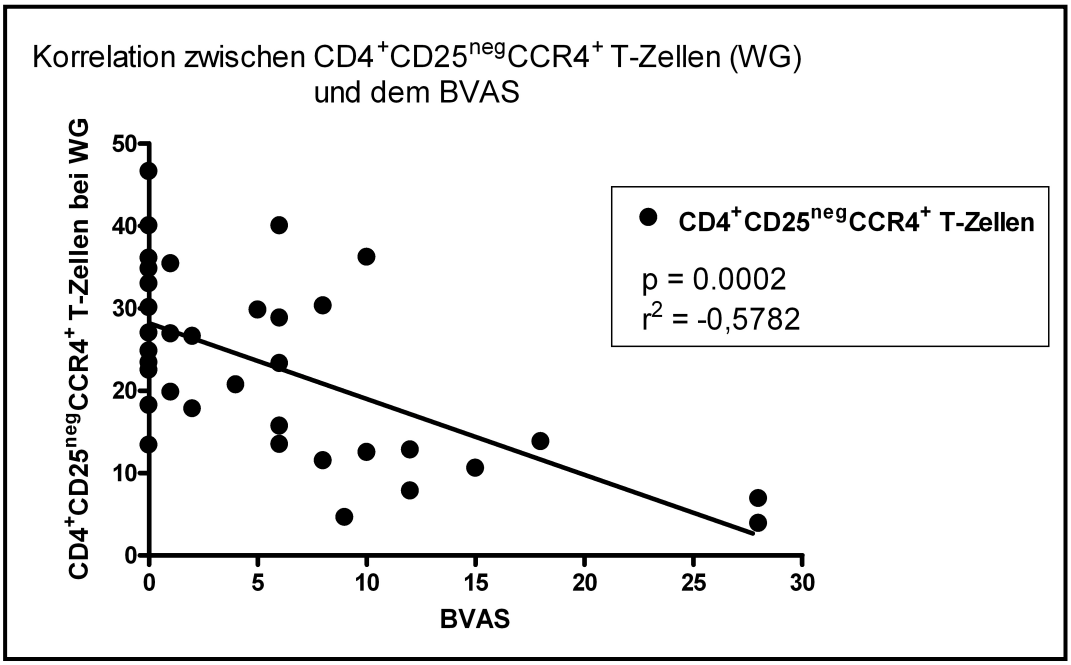


Abb. 11:Korrelation zwischen dem Anteil von $CD4^+CD25^{neg}CCR4^+$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) und dem Aktivitätsscore BVAS. Der prozentuale Anteil von $CD4^+CD25^{neg}CCR4^+$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) bei Patienten mit einer WG korreliert negativ mit dem Aktivitätsscore BVAS.

3.1.7 Die Anzahl von IFNR1$^+$CD4$^+$CD25^{high} Treg ist bei der aktiven generalisierten WG erhöht

Die Messungen hinsichtlich der Expression von IFNR1 wurden an den Kohorten der gesunden Kontrollen sowie der Patienten mit einer aktiven gWG durchgeführt.

Während die CD4$^+$ T-Zellen im Vergleich mit gesunden Kontrollen keinen Unterschied im prozentualen Anteil von CD4$^+$IFNR1$^+$ T-Zellen zeigten (HC:0.26±0.06% n=15; gWG A:0.39±0.08% n=18), war der prozentuale Anteil von CD4$^+$CD25^{high}IFNR1$^+$ Treg bei Patienten mit einer aktiven gWG mit 1.80±0.46% um mehr als das dreifache im Vergleich zu gesunden Kontrollen mit 0.57±0.27% erhöht (Abb. 12). Eine Expression von IFNR1 auf CD4$^+$CD25^{med} T-Zellen (aktivierte T-Zellen) sowie auf CD4$^+$CD25^{neg} T-Zellen (Effektor T-Zellen) war nicht nachweisbar.

Interessanterweise war IFNR1 auch auf CD8$^+$ T-Zellen nachweisbar, hierbei zeigte sich eine signifikante Erhöhung von CD8$^+$IFNR1$^+$ T-Zellen bei Patienten mit einer gWG A (HC:0.15±0.04% n=15; gWG A:0.42±0.09% n=18; p=0.0251) im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

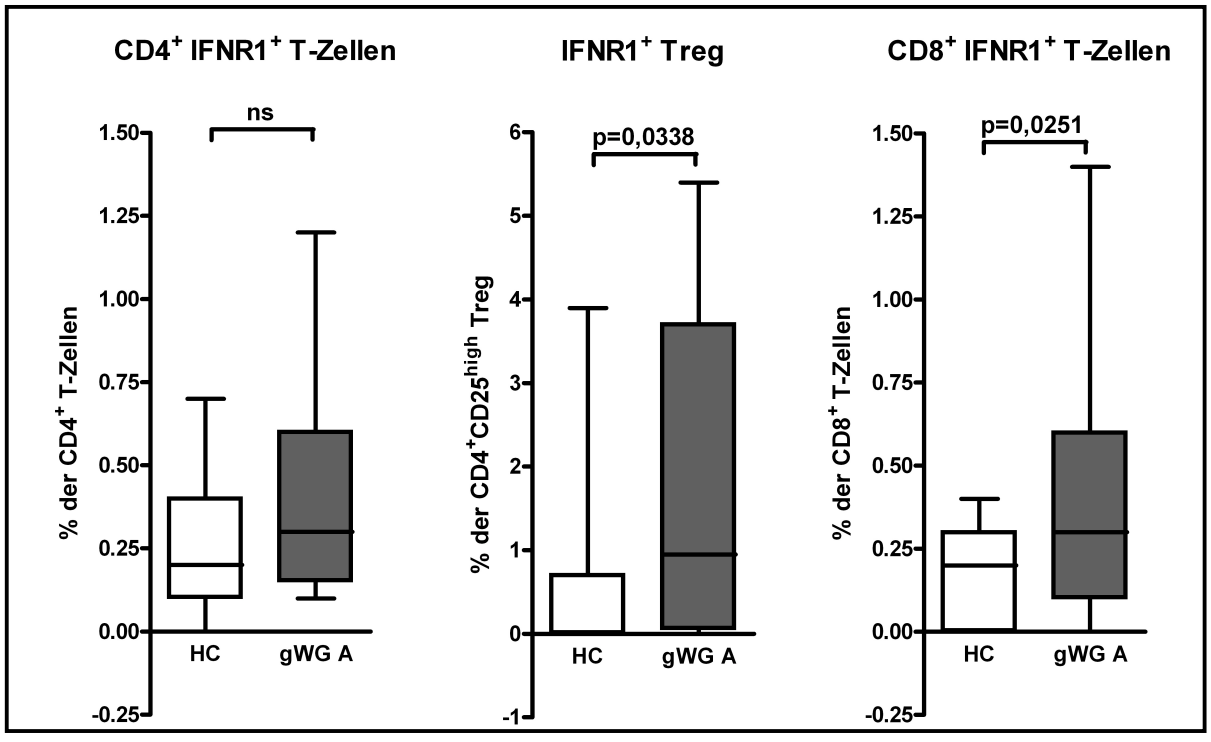


Abb. 12: Darstellung des prozentualen Anteils von IFNR1 positiven Zellen in den CD4$^+$T-Zellen, CD4$^+$CD25^{high} Treg und der CD8$^+$T-Zellen. Links der Vergleich zwischen HC und gWG A hinsichtlich des Anteils von IFNR1$^+$CD4$^+$ T-Zellen, es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. In der Mitte Darstellung der IFNR1$^+$ Treg, im Gegensatz zu HC zeigte sich eine signifikante Erhöhung bei gWG A. Rechts der Vergleich zwischen HC uns gWG A hinsichtlich des Anteils IFNR1$^+$CD8$^+$ T-Zellen, es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Anteils IFNR1$^+$CD8$^+$ T-Zellen bei gWG A.

3.1.8 Keine Unterschiede in der Anzahl von PD-1$^+$ Treg, CTLA 4$^+$ Treg, CD103$^+$ Treg oder CD154$^+$ Treg bei der WG

Der prozentuale Anteil von CTLA 4$^+$ Treg, CD103$^+$ Treg, PD1$^+$ Treg oder CD154$^+$ Treg zeigte keine signifikanten Veränderungen bei der WG im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Tab. 8, Anhang). Der prozentuale Anteil PD-1$^+$CD4$^+$ T-Zellen zeigte sich bei Patienten mit einer aktiven gWG mit 0.98±0.24% gegenüber gesunden Kontrollen mit 0.34±0.10% leicht signifikant (p=0.0379) erhöht.

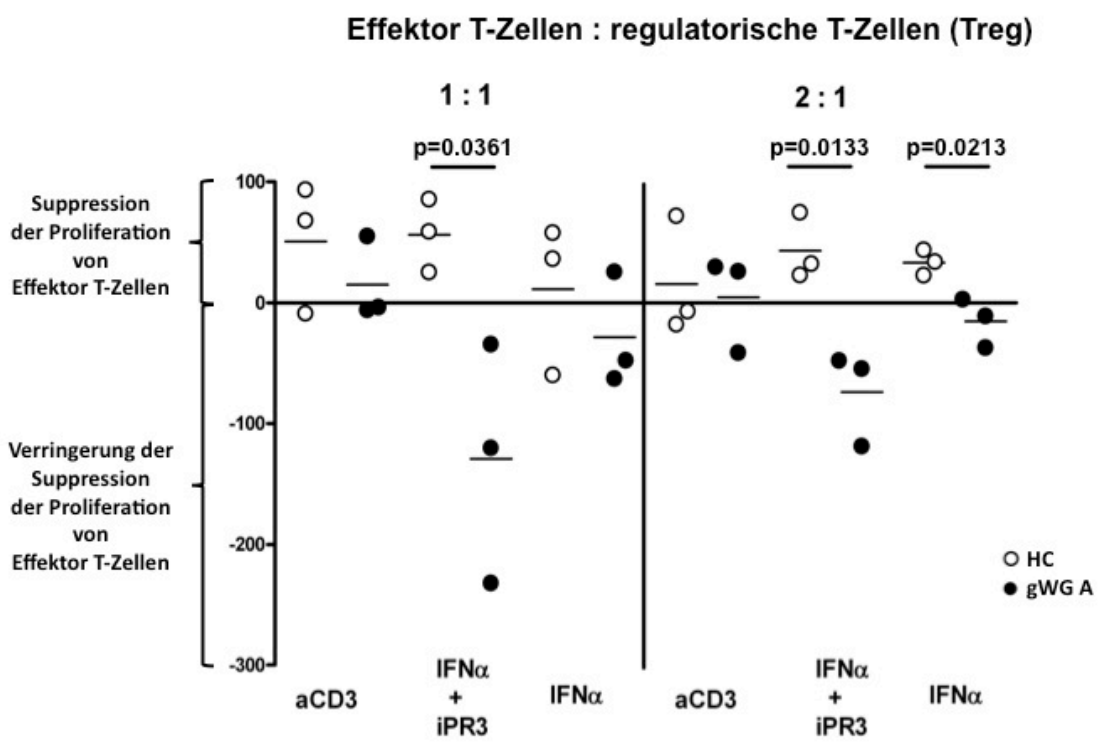
3.2 Proliferationsuntersuchungen, *in vitro* Ergebnisse

3.2.1 regulatorische T-Zellen (Treg) von Patienten mit einer aktiven generalisierten Wegenerschen Granulomatose zeigten eine verminderte suppressorische Aktivität unter *in vitro* Stimulation mit Interferon alpha (IFNα) und Hitze-inaktivierter Proteinase 3 (iPR3)

Für diese Versuche wurden 3 Patienten mit einer aktiven gWG ohne Vor- oder Dauermedikation ausgewählt. Als gesunde Kontrollen dienten 3 Personen, welche bezogen auf die Patienten jeweils das gleiche Alter und das gleiche Geschlecht besaßen. Zur Berechnung der suppressorischen Aktivität wurde die im Abschnitt Methoden aufgeführte Formel (siehe Kapitel 2.6) verwendet, hierbei diente als Ausgangswert jeweils der prozentuale Anteil der proliferierten Effektor T-Zellen ohne Treg, sowie der prozentuale Anteil der proliferierten Effektor T-Zellen in einer Ko-Kultur mit Treg in verschiedenen Mischungsverhältnissen (1:1 entspricht 50% zu 50%; 2:1 entspricht 66.6 % Effektor T-Zellen zu 33.3% Treg) nach 9-tägiger Stimulation mit anti-CD3 (0.5 µg/ml; 1.0 µg/ml), naiver Proteinase 3 (PR3), Interferon alpha (IFNα), Interferon alpha plus naiver Proteinase 3 (IFNα+PR3) und Interferon alpha plus Hitze-inaktiver Proteinase 3 (IFNα+iPR3). Lebende proliferierte Zellen stellten sich durchflusszytometrisch als 7AAD$^-$CFSE^{low} Zellen dar. Die weitere Differenzierung der Zellen erfolgte gemäß der Oberflächenrezeptoren.

Unter der Stimulation mit Interferon alpha und inaktivierter Proteinase 3 bei beiden Mischverhältnissen sowie Interferon alpha bei einem Mischverhältnis von 2:1, zeigten Treg von Patienten mit einer aktiven gWG eine reduzierte suppressorische Aktivität im Vergleich zu gesunden Kontrolle (IFNα+iPR3 Verhältnis 1:1: HC:56.39±17.45% gWG A:-129.1±57.20% p=0.0361; IFNα+iPR3 Verhältnis 2:1: HC:43.03±15.91% gWG A:-73.98±22.56% p=0.0133; IFNα Verhältnis 2:1: HC:33.15±6.03% gWG A:-15.39±11.74% p=0.0213; Abb. 13)

Bezüglich der Stimulation mit naiver Proteinase 3 und naiver Proteinase 3 plus Interferon alpha sowie der unspezifischen Stimulation mit anti CD3 (0.5µg/ml; 1.0µg/ml) im Vergleich zeigten sich keine signifikanten Auffälligkeiten.



	Verhältnis Effektor T-Zellen : regulatorische T-Zellen					
	1 : 1			2 : 1		
Stimulation	HC	gWG A	p	HC	gWG A	p
anti CD3 (0.5µg/ml)	20.43±42.13%	0.99±20.79%	0.7003	50.63±30.74%	14,89±19.99%	0.3849
anti CD3 (1.0µg/ml)	-11.24±45.24%	-3.50±28.52%	0.8919	15.37±28.25%	4.49±23.07%	0.7804
PR3	19.02±49.71%	-34.27±23.10%	0.3861	46.18±30.61%	-43.93±15.38%	0.0582
PR3 + IFNα	11.08±39.89%	-9.01±35.53%	0.7259	23.58±25.96%	-22.39±25.00%	0.2711
iPR3 + IFNα	56.39±17.45%	-129.1±57.20%	0.0361	43.03±15.91%	-73.98±22.56%	0.0133
IFNα	11.21±36.23%	-28.60±27.24%	0.4294	33.15±6.03%	-15.39±11.74%	0.0213

Abb. 13: *In vitro* Proliferation- und Suppressionsuntersuchung. Die Suppression (in %) der Proliferation, nach 9-tägiger Stimulation, der Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen) durch Treg in einer Ratio von 1:1 und 2:1. Treg von Patienten mit einer gWG A zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine reduzierte suppressorische Aktivität unter der Stimulation mit Interferon alpha ± inaktivierter Proteinase 3. Unter unspezifischer Stimulation mit anti-CD3 (aCD3) zeigten sich keine Unterschiede.

3.2.2 Der prozentuale Anteil von *ex vivo* proliferierte regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^{high}CFSE^{low}$ T-Zellen) ist bei Patienten mit einer gWG A nach 9-tägiger *in vitro* Stimulation mit inaktivierter Proteinase 3 ± Interferon alpha im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt.

Neben den Untersuchungen mit zuvor isolierten $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) und $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) einzeln und zusammen, wurden auch die PBMC für 9 Tage stimuliert nach vorheriger Färbung mit CSFE. Die Stimulation erfolgte dabei ebenfalls mit anti-CD3 (0.5 µg/ml sowie 1.0 µg/ml), naive Proteinase 3, naive Proteinase 3

plus Interferon alpha, inaktivierte Proteinase 3 plus Interferon alpha sowie nur mit Interferon alpha. Nach 9-tägiger Stimulation wurden die Zellen gefärbt und der Phänotyp durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei erfolgte die Bestimmung lebender Zellen mittels Färbung mit 7AAD-Kernfärbung, lebende Zellen mit intakter Zellmembran stellten sich hierbei $7AAD^-$ dar. Die Proliferation wurde anhand der intrazellulären Konzentration von CFSE bestimmt (nähere Informationen Kapitel 2.6.2), proliferierte Zellen zeigten eine verringerte Konzentration an CFSE. Die so gegliederten Zellen wurden mittels Bestimmung der Oberflächenrezeptoren weiter unterteilt.

Zunächst zeigte der prozentuale Anteil der $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) unabhängig von der Proliferation ($CD4^+CD25^{high}CFSE^{high}$ T-Zellen und $CD4^+CD25^{high}CFSE^{low}$ T-Zellen) im Bezug auf die Gesamtpopulation an lebenden $CD4^+$ T-Zellen keine Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und aktiver WG. Betrachtet man nun die Fraktion der *ex vivo* proliferierten Treg, ($CD4^+CD25^{high}CFSE^{low}$Treg), zeigte sich unter spezifischer Stimulation eine Reduzierung des relativen Anteils der *ex vivo* proliferierten Treg an der Gesamtpopulation der $CD4^+$ T-Zellen. Während sich unter Stimulation mit anti-CD3 in aufsteigender Konzentration keine Unterschiede zu gesunden Kontrollen ergaben (0.5 µg/ml: HC:10.10±3.36%, gWG A:12.77±4.17%, p=0.6443; 1.0µg/ml: HC:12.83±4.20%, gWG A:20.20±4.51, p=0.2979), zeigte sich unter spezifischer Stimulation mit naiver Proteinase 3 eine signifikante Reduktion des relativen Anteils der *ex vivo* proliferierten Treg an der Gesamtpopulation $CD4^+$ T-Zellen (HC:5.20±1.38%, gWG A:0.97±0.52%, p=0.0461). Ebenfalls konnte dies auch im Trend unter der Stimulation mit naiver Proteinase plus Interferon alpha (HC:4.90±2.82%, gWG A: 1.10±0.59%, p=0.2587), unter Stimulation mit inaktivierter Proteinase 3 plus Interferon alpha (HC:14.03±9.48%, gWG A:2.17±0.28%, p=0.2792) und unter Stimulation mit Interferon alpha (HC:7.87±3.05%, gWG A:2.10±0.61%, p=0.1422) nachgewiesen werden, die Unterschiede stellten sich jedoch nicht als signifikant dar (Abb. 14)

Die prozentualen Anteile der $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierten T-Zellen) und der $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) an der Gesamtpopulation der lebenden CD4+ T-Zellen, waren sowohl bezogen auf den Anteil der proliferierten sowie unabhängig von der Proliferation, im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht verändert.

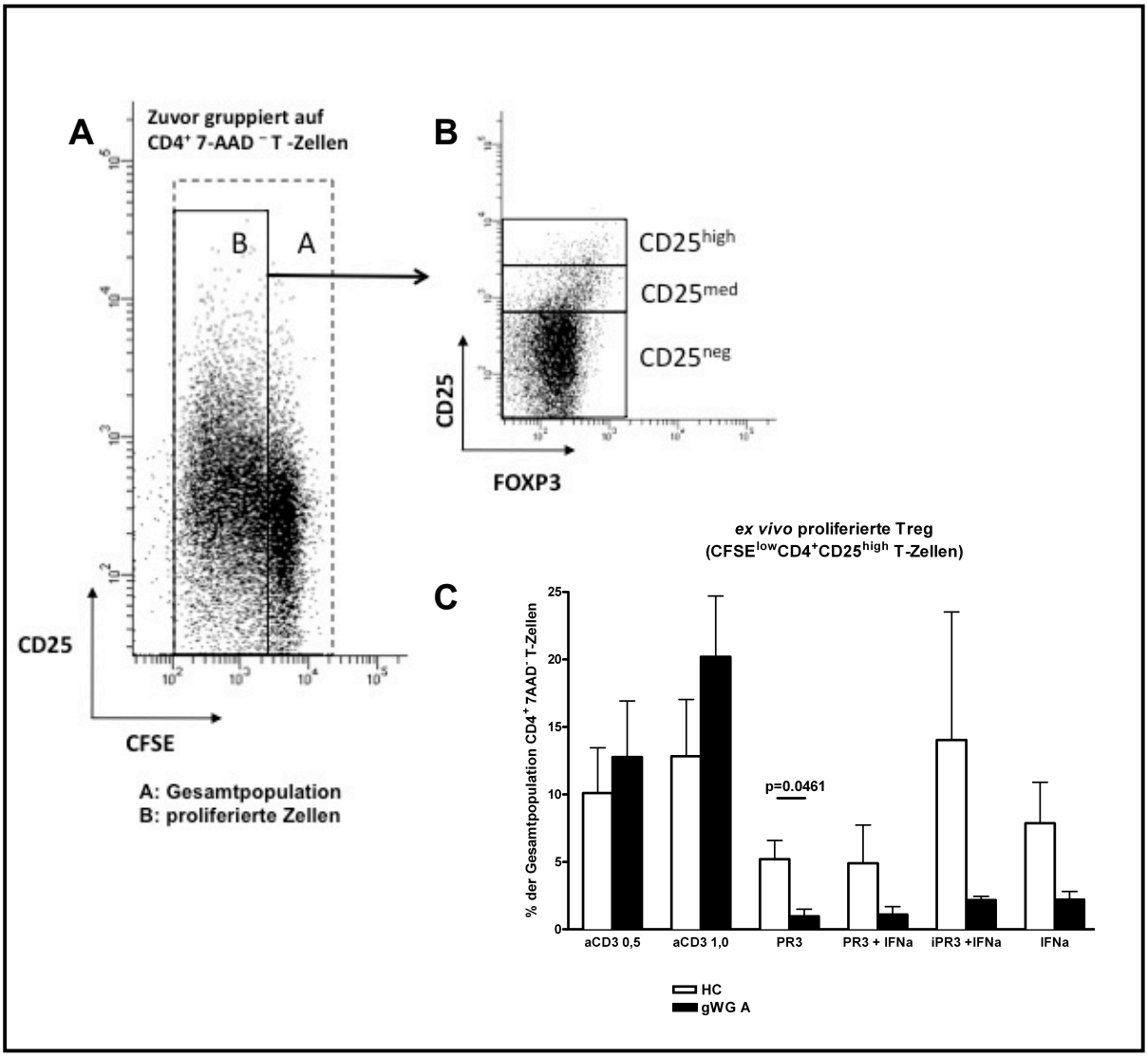


Abb. 14: ***In vitro*** **Proliferationuntersuchung von** ***ex vivo*** **proliferierten Treg. A:** repräsentativer DotPlot der lebenden $CD4^+7AAD^-$ T-Zellen, dargestellt anhand der Expression von CD25 und der intrazellulären Konzentration von CFSE. Mit A wurde die Gesamtpopulation dargestellt, B zeigt die proliferierten $CFSE^{low}$ T-Zellen. **B:** Darstellung der gruppierten proliferierten $CD4^+CFSE^{low}$ T-Zellen (B) und weitere Differenzierung mittels FoxP3 und CD25. Auch nach 9tägiger Stimulation ist die Differenzierung gem. der Expression von CD25 möglich. C: Unter Stimulation mit PR3, PR3+INFα, iPR3+INFα und INFα zeigt sich ein reduzierter prozentualer Anteil von *ex vivo* proliferierten Treg bei Patienten mit einer gWG a im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HC)

3.2.3 Der prozentuale Anteil von $FoxP3^+$ *ex vivo* proliferierten Treg und $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierten Treg ist nach 9tägiger *in vitro* Stimulation mit inaktivierter Proteinase 3 plus Interferon alpha und unter Stimulation mit Interferon alpha im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt.

Neben der Anzahl der *ex vivo* proliferierten Treg, wurden auch die einzelnen Untergruppen untersucht, gemäß des Vorhandensein des Transkriptionsfaktors FoxP3 und der extrazellulären Expression von CCR4. Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigt sich der prozentuale Anteil von $FoxP3^+$ *ex vivo* proliferierten Treg und $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierten

Treg bei einer aktiven generalisierten WG (gWG A) nach 9tägiger Stimulation mit PR3, PR3+ INFα, iPR3 und iPR3 + INFα erniedrigt.

Während sich nach Stimulation mit anti-CD3 in aufsteigender Konzentration keine Unterschiede im prozentualen Anteil von $FoxP3^+$ *ex vivo* proliferierten Treg und $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierten Treg an der *ex vivo* proliferierten Treg Gesamtpopulation zeigten ($FoxP3^+$ *ex vivo* proliferierten Treg: aCD3 0.5µg/ml: HC:21.43±6.01%, gWG A:5.87±3.04%, p=0.0818; aCD3 1.0µg/ml: HC:16.20±5.12%, gWG A:9.80±4.96%, p=0.4200; $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierten Treg: aCD3 0.5µg/ml: HC:37.53±2.54%, gWG A:28.70±16.62%, p=0.6271; aCD3 1.0µg/ml: HC:38.20±3.88%, gWG A: 35.73±13.07%, p=0.8653), präsentierte sich eine deutliche Verringerung des Anteils bei Stimulation mit PR3 und IFNα (Abb. 15). Unter der Stimulation mit PR3, PR3 + INFα, sowie unter Stimulation mit INFα konnten keine $FoxP3^+$ *ex vivo* proliferierten Treg oder $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierten Treg bei einer gWG A im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil von $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierten Treg unter der Stimulation mit iPR3 + INFα war bei Patienten mit gWG A im Vergleich mit gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt (HC:41.80±6.23%, gWG A:6.77±6.77%, p=0.0190).

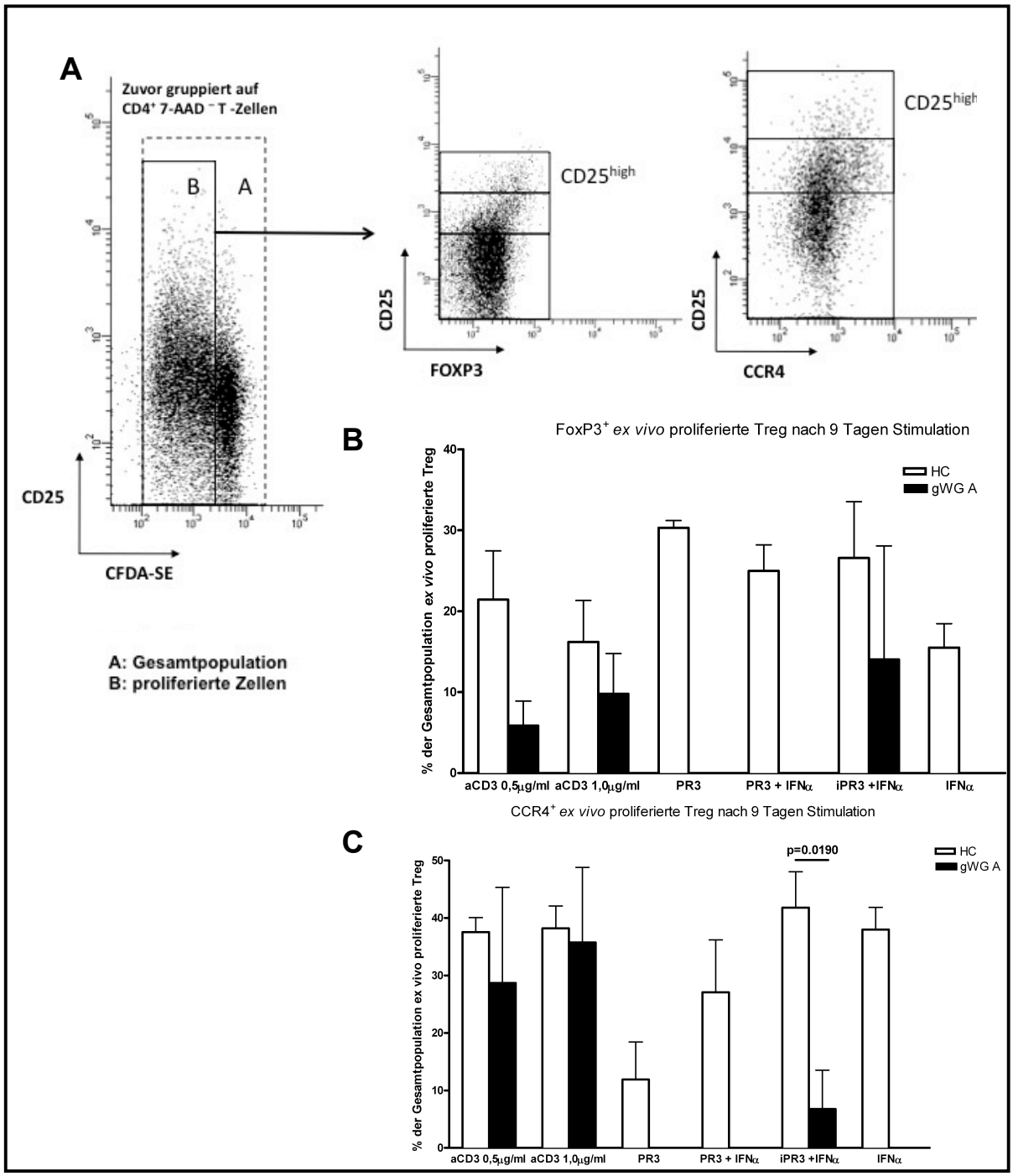


Abb. 15: *In vitro* Expressionsuntersuchung von *ex vivo* proliferierten Treg. A: repräsentatives DotPlot (links) der lebenden $CD4^{+}7AAD^{-}$ T-Zellen, dargestellt anhand der Expression von CD25 und der intrazellulären Konzentration von CFSE. Mit A wurde die Gesamtpopulation dargestellt, B zeigt die proliferierten $CFSE^{low}$ T-Zellen. Diese wurden im weiteren hinsichtlich der Expression von FoxP3 und CCR4 weitergehend untersucht (Mitte sowie rechts), gruppiert in $FoxP3^{+}$- sowie CCR4+ *ex vivo* proliferierten Treg **B:** unter der Stimulation mit PR3±INFα sowie INFα zeigte sich ein deutlicher Verlust an $FoxP3^{+}$ *ex vivo* proliferierten Treg bei WG innerhalb der *ex vivo* proliferierten Treg Population **C:** unter Stimulation mit PR3±INFα, iPR3+INFα sowie INFα zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Verlust an $CCR4^{+}$ *ex vivo* proliferierten Treg bei WG innerhalb der *ex vivo* proliferierten Treg Population im Vergleich zu gesunden Kontrollen

3.2.4 Unter *in vitro* Stimulation mit anti-CD3 (0,5 µg/ml) zeigte sich bei aktiver gWG eine erhöhte Konzentration von Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα) im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Neben der direkten Bestimmung der Inhibition der Proliferation von Effektor T-Zellen durch Treg mittels Proliferationsuntersuchungen (siehe 3.2.1) stellt sich die Frage nach einem möglichen weiteren funktionellen Defizit der Treg, in Form einer verminderten Sekretion von inhibitorischen Zytokinen (IL-10) bzw. verminderte Inhibiton der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen.(TNFα, IL-17, INFγ) durch Effektor T-Zellen.

Je 100 µl Überstand aus der unveränderten PBMC Zellsuspension unter den verschiedenen Stimulantien wurden 24h sowie 9 Tage nach Stimulation entnommen und auf die Konzentration von Tumornekrosefaktor alpha (TNFα), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 17 (IL-17) und Interferon gamma (INFγ) untersucht. Unter der Stimulation mit PR3±INFα, iPR3+INFα sowie INFα waren IL-10, IL-17 sowie IFNγ nicht nachweisbar. Die Konzentration von TNFα unter Stimulation mit PR3±INFα, iPR3+INFα sowie INFα stellte sich gering dar und ohne signifikanten Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und aktiver WG. Betrachtet man jedoch die Zytokinkonzentration unter Stimulation mit anti-CD3 0.5 µg/ml so zeigte sich ein Nachweis von allen untersuchten Zytokinen, welche jedoch im Vergleich zwischen HC und gWG A bis auf TNFα keine signifikanten Unterschiede präsentierten. Die Konzentration von TNFα nach 24 h Inkubation war bei Patienten mit einer gWG A um mehr als das Doppelte erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HC: 849.0±180.6pg/ml, gWG A:1820±75.06pg/ml, p=0.0077, Abb. 16). Dieser Unterschied war nach 9 Tagen Stimulation jedoch nicht mehr nachweisbar.

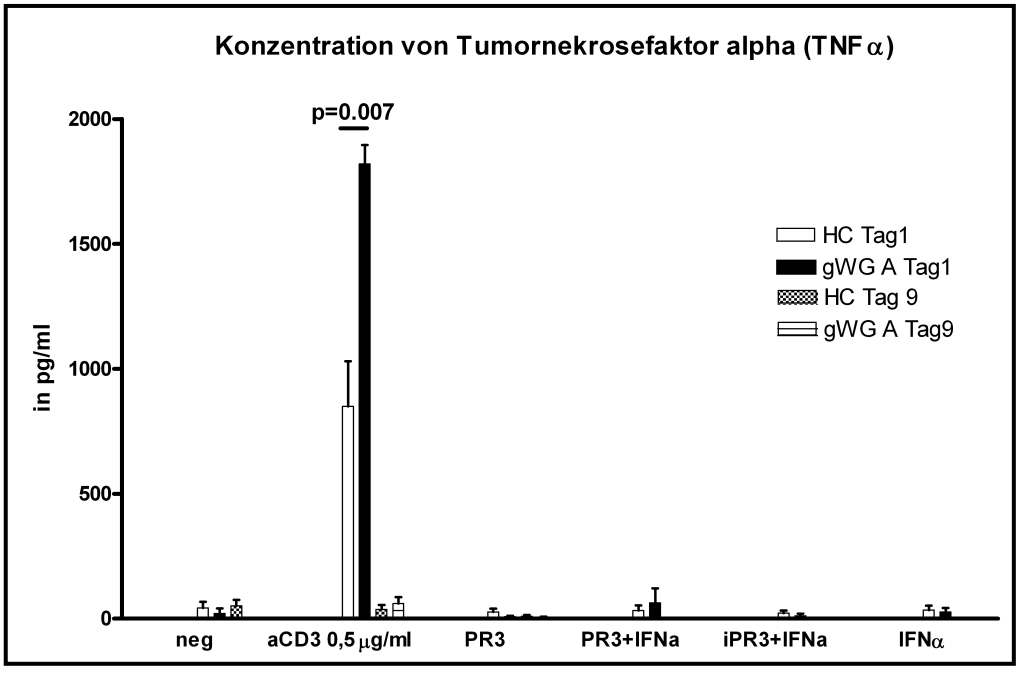


Abb. 16: Konzentration von TNFα im Überstand von PBMC nach 24h und 9 Tagen Stimulation. Unter der Stimulation mit anti-CD3 0,5 µg/ml zeigte sich ein signifikante Erhöhung von TNFα bei gWG A im Vergleich zu HC.

3.3 Immunhistologische Untersuchungsergebnisse

3.3.1 $CD3^+FoxP3^+$ T-Zellen sind in den granulomatösen Läsionen der WG nachweisbar und im Vergleich zur chronischer Sinusitis bezogen auf die Gesamtpopulation der $CD3^+$ T-Zellen erhöht.

Neben der phänotypischen Untersuchung peripherer Treg, wurden nasale Biopsien von Patienten mit WG (n=5) hinsichtlich $FoxP3^+$ T-Zellen untersucht. Die klinische Charakteristik dieser Patienten ist im Kapitel 2.1 aufgeführt. Als Vergleich diente histologisches Material von Patienten mit einer chronischen Sinusitis (n=5). Mittels Doppelfärbung (CD3 sowie FoxP3) konnten erstmals $FoxP3^+$ T-Zellen in den granulomatösen Läsionen bei WG nachgewiesen werden. Durch Auszählung von 100 $CD3^+$ T-Zellen wurde der Anteil von $FoxP3^+$ T-Zellen an dieser Kohorte ausgezählt. Im Vergleich zu den Präparaten von Patienten mit einer chronischen Sinusitis, zeigte sich innerhalb der granulomatösen Läsionen bei der WG eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils von $FoxP3^+$ T-Zellen innerhalb der T-Zellen (chron. Sinusitis: 2.8±1.36%, WG: 9.7±1.1%, p=0.005, Abb. 17). Die Verteilung der $FoxP3^+$ T-Zellen folgte keiner bestimmten Struktur und verteilte sich diffus durch das Gewebe.

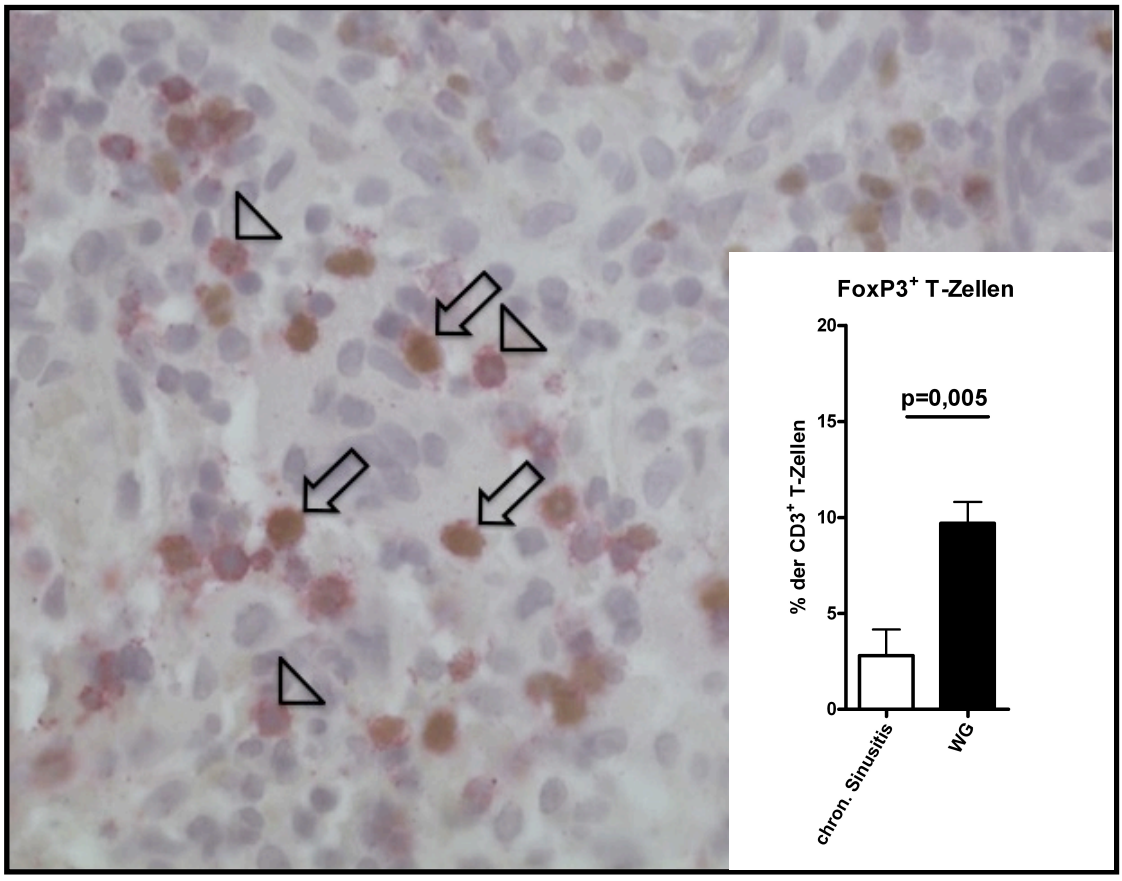


Abb. 17: Akkumulation von $FoxP3^+$ T-Zellen in granulomatösen Läsionen bei WG. $FoxP3^+$ Zellen (braune Kernfärbung) sowie $CD3^+$ T-Zellen (rote Membranfärbung, Dreieck). $FoxP3^+$ T-Zellen (braune Kernfärbung + rote Membranfärbung, Pfeil) sind bei der WG und bei der chron. Sinusitis nachweisbar. Im Vergleich zur chron. Sinusitis zeigte sich bei WG eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils von $FoxP3^+$T-Zellen innerhalb der T-Zellen (unten rechts). (400 fache Vergrößerung)

4. Diskussion

Natürliche regulatorische T-Zellen (Treg) spielen eine zentrale Rolle für die Homöostase von Immunreaktionen. Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der Suppression der Aktivität (z.B. Proliferation) von T-Zellen und dendritischen Zellen (Sakaguchi et al. 2008, Sakaguchi 2011). Numerische und funktionelle Aberrationen der Treg sind mit der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus Erythematodes (SLE, Lee et al. 2008) oder der Sarkoidose (Taflin et al. 2009) assoziiert.

Die Wegenersche Granulomatose (WG) ist eine ungewöhnliche, chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, welche durch gegen die Proteinase 3 (PR3) gerichtete Autoantikörper (PR3-ANCA) charakterisiert ist (Jennette et al. 2011). Die WG kann sich hierbei als lokalisierte oder systemische Erkrankung manifestieren, wobei in der lokalisierten Form die granulomatöse Entzündung des Respirationstrakt führend ist (Holle et al. 2010), während bei der systemischen WG die Vaskulitis vorherrscht. Die lokalisierte WG (lWG) liegt selten vor, da die Erkrankung bereits nach wenigen Wochen oder Monaten in die generalisierte Form (gWG) fortschreitet (Holle et al. 2010). Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zur Rolle von Treg in der Pathogenese der WG zeigten eine erhöhte Anzahl im peripheren Blut bei Patienten in Remission (Abdulahad et al. 2006), sowie *in vitro* eine verminderte Suppression der Proliferation von Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen) nach polyklonaler Stimulation (Abdulahad et al. 2007; Rimbert et al. 2011) und nach Stimulation mit dem hitze-inaktivierten Autoantigen PR3 (Morgan et al. 2010).

4.1 Kohortenanalyse, *ex vivo* Untersuchungen

4.1.1 Veränderte Zahlen von $CD4^+CD25^{high}$ T Zellen (Treg), $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen) und $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) bei der Wegenerschen Granulomatose

Die vorliegende Arbeit konnte, im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HC), eine deutlich erhöhte Anzahl von Treg aus dem peripheren Blut bei generalisierter WG (gWG) nachweisen, und zwar unabhängig von der Krankheitsaktivität (bemessen am BVAS und DEI; Tab. 6 bzw. 7 im Anhang). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die numerische Aberration bei lWG nicht nachweisbar war.

Es ist möglich, dass die Erhöhung der Anzahl der Treg durch die Therapie beeinflusst wird. So war bei rheumatoider Arthritis sowie SLE unter Glukokortikoid- und anti-TNF-α-Therapie eine Erhöhung der Treg detektierbar (Ehrenstein et al. 2004, Zhang et al. 2008; Stary et al. 2011). Ein Vergleich der 5 unbehandelten Patienten mit gWG (3 gWG A; 2 gWG R) mit alters- und geschlechtsgleichen gesunden Kontrollen bestätigte jedoch den numerischen Unterschied mit einem erhöhten Anteil von Treg bei der gWG (HC:0.82±0.10%,

gWG:2.18±0.50%, p=0.0289: Abb. 26 im Anhang). Unsere Daten lassen daher vermuten, dass die Therapie für die erhöhte Anzahl der Treg bei WG eher eine geringe Rolle spielt.

In Übereinstimmung mit vorhergehenden Veröffentlichungen (Schlesier et al. 1995, Popa et al. 1999, Marinaki et al. 2005) waren die $CD25^{med}$ T-Zellen bei gWG im Vergleich zu HC gleichfalls unabhängig von der Krankheitsaktivität erhöht, wohingegen dies bei lWG nicht nachweisbar war. Die $CD25^{neg}$ T-Zellen waren hingegen erniedrigt bei gWG im Vergleich zu HC, gleichfalls unabhängig von der Krankheitsaktivität. Dieses Ergebnis stimmt auch mit anderen Untersuchungen überein (Abdulahad et al. 2007). Die erniedrigte Anzahl der $CD25^{neg}$ T-Zellen war bei lWG ebenfalls nicht nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit werden die $CD4^{+}CD25^{neg}$ T-Zellen als Effektor T-Zellen betitelt. Unter Effektor T-Zellen versteht man im Allgemeinen T-Zellen, die nach Antigenerkennung aus naiven T-Zellen differenzieren (Lanzavecchia und Sallusto, 2000). Dies impliziert, dass Effektor T-Zellen auch aktivierte T-Zellen $CD25^{med}$ T-Zellen sind. Der üblichen internationalen Gepflogenheit in Studien zu Treg folgend, werden die Effektor T-Zellen in dieser Arbeit rein als $CD25^{neg}$ T-Zellen beschrieben, die aktivierten T-Zellen als $CD25^{med}$ T-Zellen (Baecher-Allan et al., 2001).

Die lokalisierte Form der WG präsentiert im Hinblick auf die Zahl der Treg, der aktivierten T-Zellen und der Effektor T-Zellen im Vergleich zu HC keine Unterschiede. Dies könnte ein Hinweis auf eine zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung begrenzte Autoimmunantwort sein, in der zunächst eine lokale Entzündung im oberen Respirationstrakt vorherrscht, ohne systemische Vaskulitis. Die erhöhte Anzahl der Treg bei gWG könnte als reaktiver Mechanismus auf eine erhöhte Proliferation von aktivierten T-Zellen verstanden werden. Dazu passt die positive Korrelation der Zahl der Treg mit dem C-ANCA-Titer (r^2=0.408; p=0.0001).

4.1.2 Die Expression von FoxP3 in $CD4^{+}CD25^{high}$ T Zellen (Treg), $CD4^{+}CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen) und $CD4^{+}CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) aus dem peripheren Blut bei der Wegenerschen Granulomatose

In diesen Untersuchungen beschränkten wir uns auf Patienten mit einer aktiven generalisierten WG (gWG A), so dass weder Aussagen über Patienten mit einer Remission noch über Patienten mit einer lWG getroffen werden. Bezüglich der intrazellulären Expression von FoxP3 ist zu berücksichtigen, dass diese nicht zwangsläufig Treg beschreibt. FoxP3 wird in T-Zellen gefunden, welche nicht zu den $CD4^{+}CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) gehören (Wang et al. 2007; Bonelli et al. 2008). Im Vergleich zu HC konnte erstmals gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil von $FoxP3^{+}$ Treg ($CD4^{+}CD25^{high}$ T-Zellen) bei gWG A reduziert war, während in der Anzahl von $CD4^{+}FoxP3^{+}$ T-Zellen keine Unterschiede nachweisbar waren. Verglichen mit anderen Publikationen zeigte sich ein geringerer Anteil von FoxP3 in

den Treg bei HC. Ursächlich hierfür ist eine andere Methodik der Messung, so wurden zum einen in anderen Arbeiten durchflusszytometrisch sortierte Treg analysiert zum anderen der Anteil von FoxP3 per PCR ermittelt (Valencia et al. 2007; Miyara et al. 2006), wohingegen in dieser Arbeit der Anteil direkt durchflusszytometrisch ermittelt wurde.

Ein erniedrigter Anteil von $FoxP3^+$ Treg mit einem möglichen funktionellen Defizit der Treg ist bereits bei einer anderen Autoimmunerkrankung beschrieben, dem SLE (Zhang et al. 2008, Lee et al. 2008). Für die WG existieren bisher kontroverse Ergebnisse. Mittels PCR zeigten sich in einer Arbeit keine Unterschiede in der FoxP3 mRNA Expression der $CD4^+$ T-Zellen (Marinaki et al. 2005), hierbei wurden jedoch die $CD4^+$ T-Zellen hinsichtlich der Expression von CD25 nicht weiter differenziert. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in einer jüngeren Arbeit, die den Anteil (MFI) von FoxP3 in Treg untersuchte (Rimbert et al. 2011) und ebenfalls keine Unterschiede feststellte. Bei beiden Arbeiten wurden jedoch Patienten aus einem heterogenen Kollektiv von ANCA-assoziierten Vaskulitiden (sowohl WG als auch Mikroskopische Polyangiitis) untersucht, so dass keine Aussagen über WG-spezifische Veränderungen erhoben wurden. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls keine Unterschiede in der FoxP3 Expression von $CD4^+$ T-Zellen nachweisen, eine Differenzierung anhand von CD25 bestätigte diese Ergebnisse, hierbei erfolgte jedoch keine weitere statistische Auswertung des Anteils $FoxP3^-$ Treg (Abdulahad et al. 2006, Abdulahad et al. 2007). Eine weitere Arbeit konnte indes eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils von $CD4^+FoxP3^+$ T-Zellen bei Patienten mit einer WG im Vergleich zu HC nachweisen (Morgan et al. 2010), hierbei erfolgte jedoch keine Differenzierung der Patienten anhand der Krankheitsaktivität (Remission vs. aktive Erkrankung). Ferner zeigte sich in dieser Arbeit ein im Trend ($p=0.053$) erniedrigter prozentualer Anteil $FoxP3^+$ Treg bei Patienten mit einer WG.

Es stellt sich die Frage nach einem möglichen Auslöser des verminderten Anteils $FoxP3^+$ Treg. Es ist bekannt, dass eine immunsuppresive Therapie auch zu einer Veränderung der Anzahl der Treg und zu einem Funktionsverlust der Treg führen kann (Ehrenstein et al. 2004, Zhang et al. 2008; Stary et al. 2011; Lutsiak et al. 2005). Bezüglich der Expression von FoxP3 gibt es jedoch bisher keine Daten. In der vorliegenden Arbeit standen alle untersuchten Patienten unter immunsuppressiver Therapie, so dass daher ein möglicher Einfluss der Therapie nicht auszuschließen ist. Weiterführende Untersuchungen, möglichst mit unbehandelten Patienten, könnten diese Frage klären.

Hinsichtlich der Expression von FoxP3 in $CD25^{med}$ T-Zellen gab es bisher keine statistischen Untersuchungen des Anteils dieser Zellen bei WG. Lediglich das Vorhandensein von $FoxP3^+CD25^{med}$ T-Zellen wurde beschrieben (Abdulahad et al. 2007). Diese Arbeit bestätigt das Vorhandensein aktivierter $FoxP3^+$ T-Zellen. Im Vergleich zu HC bestand jedoch kein Unterschied in der Anzahl.

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils von FoxP3^{+}CD25^{neg} (Effektor T-Zellen) bei gWG im Vergleich zu HC. Frühere Arbeiten bestätigten die Existenz dieser Zellen bei WG (Abdulahad et al. 2007). Der prozentuale Anteil von 1.74% ist vergleichbar mit dem in der vorliegenden Arbeit ermittelten Anteil von 2.14%. Die Funktion dieser Zellen ist bisher nicht geklärt. Eine ähnliche Erhöhung dieser Zellen findet sich ebenfalls beim SLE (Bonelli et al. 2009). Bonelli und Kollegen postulieren anhand von *in vitro* Untersuchungen, dass es sich hierbei ebenfalls um eine Art Treg handelt, welche jedoch funktionelle Defekte aufweisen, im Sinne einer verminderten Suppression von IFNγ-produzierenden T-Zellen (Bonelli et al. 2009). Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle dieser Zellen bei WG zu untersuchen.
Zusammenfassend deuten sowohl die in dieser Arbeit gezeigte Erhöhung der CD4^{+}CD25^{high} T-Zellen (Treg) als auch der Verlust an FoxP3^{+} Treg auf der einen Seite und die Erhöhung der CD4^{+}CD25^{med} T-Zellen (aktivierte T-Zellen) sowie die Erhöhung von FoxP3^{+} CD4^{+}CD25^{neg} T-Zellen (FoxP3^{+} Effektor T-Zellen) auf der anderen Seite auf eine gestörte Balance von suppressorischen und aktivierten T-Zellen bei WG. Eine gestörte Balance zwischen anderen T-Zell Populationen wurde durch uns und andere Arbeitsgruppe bei WG bereits früher beschrieben (Capraru et al. 2008, Wilde et al. 2009, Berden et al. 2009). Es stellt sich letztlich die Frage, ob diese Dysbalancen Ursache oder Folge der systemischen Entzündungsreaktion sind.

4.1.3 Die Expression von CCR4 auf CD4^{+}CD25^{high} T Zellen (Treg), CD4^{+}CD25^{med} T-Zellen (aktivierte T-Zellen) und CD4^{+}CD25^{neg} T-Zellen (Effektor T-Zellen) aus dem peripheren Blut bei der Wegenerschen Granulomatose

Der Chemokinrezeptor CCR4 ist kein Identifikationsmarker für Treg, wird jedoch sowohl auf Treg als auch auf der Mehrzahl von CD4^{+} T-Zellen in im peripheren Blut exprimiert (Lim et al. 2008, Hirahara et al. 2006). Von Relevanz ist hierbei, dass CCR4 sowohl konstitutiv als auch nach Aktivierung exprimiert wird (Andrew et al. 2001).
Im Vergleich zu HC zeigte die gesamte CD4^{+}T-Zellfraktion bei gWG eine deutliche Erhöhung des Anteils von CCR4^{+} T-Zellen. Überraschenderweise zeigten Treg von Patienten mit gWG eine deutliche Reduktion der CCR4^{+} Treg Fraktion im Vergleich zu HC und Patienten mit lWG. Diese Erniedrigung war unabhängig von der Krankheitsaktivität und sowohl bei aktiver gWG als auch in Remission nachweisbar. Als Ursache für die diese Erniedrigung ist zum einen eine mögliche Migration von CCR4^{+} Treg in das entzündete Gewebe denkbar, zum anderen eine IFNα vermittelte Reduktion der Expression von CCR4 auf Treg zu vermuten (siehe 4.2.2). Bei einer anderen Autoimmunerkrankung, dem SLE, zeigte sich neben einem reduzierten Anteil von CCR4^{+} Treg eine erniedrigte *in vitro* Migration nach Stimulation mit einem CCR4 Liganden (CCL22/MDC = Macrophage-Derived Chemokine; Lee et al. 2008).

Die Autoren nehmen an, dass die Verringerung des prozentualen Anteils von $CCR4^+$ Treg zu einer verringerten Migrationskapazität der Treg in entzündliches Gewebe führt.
Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Relevanz dieser Ergebnisse in der Pathogenese der WG zu verstehen, z.B. der histologische Nachweis $CCR4^+$ Tregs im granulomatösen Gewebe.
Bezogen auf die $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen) zeigte sich keine Erhöhung des Anteils von $CCR4^+CD25^{med}$ T-Zellen bei WG. Im Vergleich zu HC stellte sich weder bei gWG noch bei aktiver gWG oder gWG in Remission eine Erhöhung dar. Im Gegensatz dazu zeigte sich für $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen (Effektor T-Zellen) ein erhöhter Anteil von $CCR4^+$ Effektor T-Zellen bei Patienten mit WG im Vergleich zu HC. Hierbei ergab sich sowohl ein erhöhter Anteil bei gWG als auch bei lWG. Ein Unterschied zwischen Patienten in Remission sowie aktiver WG war nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe (Abdulahad et al. 2006) insofern, das bei der WG ein Ungleichgewicht zwischen Effektor T-Zellen und naiven T-Zellen zu Gunsten der Effektor T-Zellen besteht. Die Autoren vermuten hierbei, dass die Effektor T-Zellen bei der Krankheitsaktivität eine entscheidende Rolle spielen könnten.
Betrachtet man nun in der vorliegenden Arbeit die Anzahl Effektor T-Zellen mit der Krankheitsaktivität, so zeigt sich eine negative Korrelation (r^2=-0.5782, p=0.0002) zwischen dem prozentualen Anteil $CCR4^+$ Effektor T-Zellen und dem BVAS. Man kann daher vermuten, dass eine erniedrigte Anzahl der $CCR4^+$ Effektor T-Zellen als Ausdruck der erhöhten Migration von $CCR4^+$ Effektor T-Zellen in das entzündete Gewebe zu werten ist. Hierbei ist wichtig, dass die klinische Symptomatik mit dem BVAS ermittelt wurde (siehe Anhang, Tab. 7). Dieser Score stellt u.a. eine Summation der organspezifischen Entzündungsreaktionen dar und ist somit ein Ausdruck der Organinfiltration von Entzündungszellen. Es ist daher postulierbar, dass die $CCR4^+$ Effektor T-Zellen vermehrt in das Gewebe einwandern und somit die Entzündungsreaktion verstärken. Ferner kann man annehmen, dass dieser Effekt durch den Verlust von $CCR4^+$ Treg noch verstärkt wird, da diese in der Migration gehemmt sind und somit nicht am Ort der Entzündung suppressorisch auf die Effektor T-Zellen einwirken können.
Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass die Effektor T-Zellen eine wichtige Rolle in der Krankheitsaktivität bzw. im Unterhalt der gewebespezifischen Entzündungsreaktion spielen, während auf der anderen Seite die Treg einen scheinbaren Verlust der Migrationsfähigkeit aufzeigen.

4.1.4 Die Expression von IFNR1 auf $CD4^+CD25^{high}$ T Zellen (Treg) aus dem peripheren Blut bei der Wegenerschen Granulomatose

In dieser Untersuchungen beschränkten wir uns auf Patienten mit einer aktiven gWG (gWG A), so dass weder Aussagen über Patienten in Remission noch über Patienten mit lWG getroffen werden.

Im Vergleich zu HC stellte sich eine erhöhte Anzahl von $IFNR1^+$ Treg bei gWG A dar. Während es in der Gesamtpopulation der $CD4^+$ T-Zellen keine Unterschiede zu HC gab, konnten weder in der Population der aktivierten T-Zellen ($CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen) noch der Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen) $IFNR1^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von IFNR1 scheint somit, wenn auch nur gering ausgeprägt (HC:0.39 %; gWG A: 1.80%), spezifisch für Treg.

Die Expression von IFNR1 auf Treg wurde bisher noch nicht untersucht und lenkt den Fokus der Untersuchungen auf den Liganden INFα. Der erhöhte Anteil $IFNR1^+$Treg könnte zu einer stärkeren IFNα vermittelten Modifikation von Treg, z.B. der Suppressorfunktion beitragen (siehe Diskussion 4.2.1 und 4.2.2)

4.2 Proliferationsuntersuchungen, *in vitro* Untersuchungen

In diesen Untersuchungen beschränkten wir uns auf Patienten mit einer aktiven gWG (gWG A), so dass weder Aussagen über Patienten in Remission noch über Patienten mit lWG getroffen werden.

4.2.1 Suppressorische Aktivität von $CD4^+CD25^{high}$ T Zellen (Treg)

Treg bei gWG A zeigten im Gegensatz zu HC unter Stimulation mit INFα sowie INFα + iPR3 (inaktivierte PR3) eine eingeschränkte Suppression der Proliferation von Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen). Dieser Effekt trat nach Stimulation mit anti-CD3 nicht auf. Bisherige Analysen hinsichtlich der Funktion von Treg zeigten bei WG eine verminderte Suppression von Effektor T-Zellen unter Stimulation mit anti-CD3 + anti-CD28 (Abdulahad et al. 2007; Rimbert et al. 2011) sowie nach Stimulation mit inaktivierter PR3 (Morgan et al. 2010). Ein Grund für die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte im Fehlen der zusätzlichen Stimulation mit anti-CD28 liegen.

Die Rolle von IFNα bei der WG ist bisher noch nicht untersucht wurden, obgleich erhöhte Serum-Level von IFNα bei WG und anderen systemischen Vaskulitiden bekannt sind (Grau et al. 1989). Der hier gefundene inhibitorische Effekt von IFNα auf die Treg bei WG ist vergleichbar mit Ergebnissen beim SLE. Es wurde beschrieben, dass Treg von Patienten mit SLE sowohl auf exogenes IFNα als auch auf endogenes INFα durch IFNα-produzierende APC mit einer verminderten Suppression reagierten (Yan et al. 2008). Des weiteren zeigt

sich dieser inibitorische Effekt jeweils in Kombination mit Hitze-inaktivierter PR3 (iPR3), jedoch nicht mit naiver PR3 oder PR3 allein. Der Grund hierfür könnte in der starken enzymatischen Aktiviät der naiven PR3 liegen. Wir hier gezeigt, resultiert aus der Kombination von INFα und inaktivierter PR3 der stärkste inhibitorischen Effekt auf Treg.

4.2.2 Anzahl und Phänotyp der *ex vivo* proliferierten Treg ($CFSE^{low}CD4^{+}CD25^{high}$ T-Zellen)

Anhand der CFSE-Konzentration (siehe Kapitel 2.6) war es möglich, Treg von *ex vivo* proliferierten Treg zu unterscheiden. Die hier gezeigte verminderte Suppression der Effektor T-Zellen ($CD4^{+}CD25^{-}$ T-Zellen) durch Treg ($CD4^{+}CD25^{high}$ T-Zellen) bei gWG A nach Stimulation mit IFNα sowie IFNα + iPR3 führt zu der Frage, ob die *ex vivo* proliferierten Treg phänotypisch verändert sind. Nach Stimulation mit PR3, IFNα sowie IFNα+iPR3 war zum einen die Anzahl der *ex vivo* proliferierten Treg bei der gWG A im Vergleich zu HC erniedrigt, als auch der Anteil von $FoxP3^{+}$ sowie $CCR4^{+}$ *ex vivo* proliferierten Treg. Interessanterweise zeigte sich somit ein mit dem *ex vivo* Phänotyp der Treg aus dem peripheren Blut vergleichbares Bild. Wir vermuten, dass diese Reaktion auf IFNα±(i)PR3 ein WG-spezifischer Befund darstellen könnte. Es bleibt aber zu beantworten, ob INFα allein oder in Kombination mit PR3 *in vivo* auch zu einer Herunterregulation von FoxP3 und CCR4 bei Treg führt.

4.2.3 Zytokinprofil von PBMC nach Stimulation

Zur Einschätzung der inhibitorischen Funktion von Treg auf Effektor T-Zellen, ist neben der Bestimmung der Proliferation von Effektor T-Zellen in Mischkulturen unter Stimulation, auch die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen aufschlußreich. Hierbei liegt der Fokus zum einen auf die von Treg produzierten inhibitorischen Zytokine (IL-10), als auch auf die von Effektor T-Zellen produzierten proinflammatorischen Zytokine (TNFα, IFNγ, IL-17). Hierbei besteht die Funktion der Treg in der Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Zytokine durch autoreaktiven Effektor T-Zellen. Die Untersuchungen wurden an unveränderten PBMC durchgeführt, ohne Separation von z.B. Antigen präsentierenden Zellen um ein möglichst genaue Aussage *ex vivo* zu erhallten

Im Zellkulturüberstand bei gWG A an Tag 1 nach Stimulation mit anti-CD3 zeigte sich eine Erhöhung von TNFα im Vergleich zu HC. Weitere Unterschiede zu HC in der Sekretion von IL-10, IL-17 und IFNγ durch verschiedene Stimulantien (aCD3, PR3, iPR3, iPR3+IFNα, IFNα) zeigten sich bei gWG A nicht. Eine erhöhte Sekretion von TNFα im Überstand von PBMC wurde bei Patienten mit $ANCA^{+}$ WG nachgewiesen (n=10, Morgan et al. 2010) nach Stimulation mit iPR3. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auch anhand von Patienten mit aktiver $ANCA^{+}$ WG (gWG A) bei jedoch geringer Anzahl (n=3) durchgeführt,

welche die nicht signifikanten Unterschiede von TNFα nach Stimulation mit iPR3 erklären könnten. Eine Relevanz der Sekretion von TNFα auf die Funktion der Treg wurde in einer Studie der rheumatoiden Arthritis (RA) belegt (Valencia et al. 2006). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Treg bei RA durch TNFα in der Suppression von Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^-$ T-Zellen) gehemmt werden, via dem Rezeptor TNFRII auf Treg. Ferner konnte dieser Effekt durch Anti-TNFRII Antikörper rückgängig gemacht werden.

4.3 $FoxP3^+CD3^+$ T-Zellen im Wegenerschen Granulom

Erstmals wurden $FoxP3^+$ T-Zellen in der granulomatösen Läsion der WG nachgewiesen. Im Vergleich zur chronischen Sinusitis fand sich eine Erhöhung des Anteils von $CD3^+FoxP3^+$ T-Zellen. In Analogie zu anderen Studien (Korn et al. 2007, Miyara et al. 2006, Taflin et al. 2009) kann man aufgrund der methodisch bedingten geringen Sensitivität des immunhistochemischen Nachweises von FoxP3 davon ausgehen, das es sich bei den $CD3^+FoxP3^+$ T-Zellen um Treg handelt.

Bei einer anderen Autoimmunerkrankung, der Sarkoidose, welche ebenfalls granulomatöse Läsionen aufweist, wurde in Ähnlichkeit zu unseren Ergebnissen eine Erhöhung von Treg in diesen Strukturen festgestellt (Miyara et al. 2006, Taflin et al. 2009). Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Sarkoidose (Miyara et al. 2006), in dem sich Treg peripher um das Sarkoidose-Granulom angeordnet fanden, ist die Lokalisation der Treg in den granulomatösen Strukturen bei der WG ungeordnet und keiner spezifischen Struktur folgend. Des weiteren wurde bei der Sarkoidose gezeigt, dass diese Treg zwar im Gewebe akkumulieren, im Vergleich zu Treg von HC, die Granulombildung *in vitro* jedoch nicht unterbinden können (Taflin et al. 2009). In einem Tiermodel für die multiplen Sklerose, welche ebenfalls eine Akkumulation von Treg im entzündeten Gewebe zeigte, konnte ferner demonstriert werden, dass diese gewebsstämmigen Treg funktionell in der Suppression von autoreaktive T-Zellen geschädigt waren (Korn et al. 2007).

5. Zusammenfassung

Regulatorische T Zellen (Treg) werden für die Homöostase einer Vielzahl von Immunreaktionen als essentiell betrachtet. Quantitative Aberrationen sowie Dysfunktionen von regulatorischen T Zellen sind für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus Erythematodes oder multiple Sklerose, beschrieben und als pathogenetisch relevant bezeichnet worden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Anzahl, dem Phänotyp und der Funktion von $CD4^+CD25^{high}$ Treg bei einer chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankung, der Wegenerschen Granulomatose (WG), welche u.a. durch gegen Proteinase 3 (PR3) gerichtete Autoantikörper (C/PR3-ANCA) charakterisiert ist. Bisher veröffentlichte Daten belegten eine erhöhte Anzahl von zirkulierenden Treg bei WG in Remission sowie *in vitro* eine verringerte Suppression von Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen) nach polyklonaler Stimulation (anti-CD3 + anti-CD28, 6 Tage). Diese Arbeit legt folgende neue Hinweise für die pathogenetische Relevanz von Treg bei WG dar:

1. Die Anzahl der zirkulierenden $CD4^+CD25^{high}$ Treg bei generalisierter WG (gWG; n=49) ist unabhängig von der Krankheitsaktivität (BVAS 2003, DEI) und im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HC; n=30) erhöht (p=0.0001). Die Anzahl der zirkulierenden $CD4^+CD25^{high}$ Treg korreliert positiv mit dem C-ANCA-Titer (r^2=0.408; p=0.0001).
2. Die Anzahl der zirkulierenden $FoxP3^+$ Treg und $CCR4^+$ Treg bei gWG ist im Vergleich zu HC vermindert (p≤0.001), während sich in den zirkulierenden Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen) eine erhöhte Anzahl von $FoxP3^+$ bzw. $CCR4^+$ Zellen findet (p≤0.05). Die Anzahl an $CCR4^+$ Effektor T-Zellen verringert sich mit steigender Krankheitsaktivität (BVAS 2003; r^2=-0.578; p<0.001).
3. Die Anzahl der zirkulierenden $INFR1^+$ Treg ist bei aktiver gWG im Vergleich zu HC erhöht (p<0.05).
4. $CD4^+CD25^{high}$ Treg von aktiver gWG (n=3) zeigen im Vergleich zu HC (n=3) *in vitro* nach Stimulation sowohl mit Interferon-α (IFNα) als auch mit IFNα + Hitze-inaktivierter PR3 (9 Tage) eine verminderte Suppression von Effektor T-Zellen ($CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen; p≤0.05).
5. $CFSE^{low}CD4^+CD25^{high}$ *ex vivo* proliferierte Treg von aktiver gWG, welche *in vitro* nach Stimulation mit IFNα (9 Tage) durch Proliferation entstanden sind, zeigen im Vergleich zu HC einen geringeren Anteil an $FoxP3^+$ sowie $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierten Treg (p<0.05 für $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierte Treg).
6. Die Anzahl der $CD3^+FoxP3^+$ T-Zellen ist in den granulomatösen Läsionen der WG (n=10) im Vergleich zu chronischer Sinusitis (n=5) erhöht (p<0.05).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse erstmals eine von der Krankheitsaktivität unabhängige Erhöhung von Treg bei der WG, welche weiterhin mit einer Veränderung des Phänotyps der Treg vergesellschaftet ist, nämlich mit einem Verlust von $FoxP3^+$ und $CCR4^+$ Treg, bei gleichzeitiger Vermehrung von $IFNR1^+$ Treg. Dieses *ex vivo* ermittelte Muster konnte unter Stimulation mit IFNα ± PR3 bei *ex vivo* proliferierten Treg experimentell induziert werden, im Sinne eines Verlustes an $FoxP3^+$ sowie $CCR4^+$ *ex vivo* proliferierten Treg. Ferner konnte demonstriert werden das die selbe Stimulation gleichzeitig auch zu einer verminderten Suppressoraktivität der Treg führt. Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass sich in den granulomatösen Läsionen der WG diffus $CD3^+FoxP3^+$ T-Zellen (Treg) finden. Analog zu Tiermodellen bei der multiplen Sklerose lassen diese *in vitro* Daten vermuten, dass gewebsstämmige Treg bei der WG in ihrer Funktion eingeschränkt sind und auf diese Weise der chronischen Entzündung und Autoimmunität Vorschub geleistet wird. Diese Arbeit zeigt, dass unter den Zytokinen offenbar IFNα eine bisher bei der WG nicht bekannte Bedeutung bei der Funktionsminderung der Treg zukommt.

Diese Ergebnisse bilden eine Grundlage für weitere Untersuchungen, wie z.B. der Suche nach $CCR4^+/FoxP3^+$ Treg im Gewebe, sowie der Gewinnung von Treg aus den granulomatösen Läsionen bei der WG und der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung dieser einschließlich der Wechselwirkung mit IFNα ± PR3 .

6. Anhang: Abbildungen und Tabellen

6.1. Scores und Abbildungen der Einleitung sowie Methoden

6.1.1 BVAS 2003 (Birmingham Vasculitis Activity Score)

Manifestation	**nähere Beschreibung**		**BVAS persistierend**	**BVAS aktuell**
1. Allgemeinsymptomatik		**Maximum:**	**2**	**3**
Myalgien			1	1
Arthralgien oder Arthritis			1	1
Fieber ≥38.0°C			2	2
Gewichtsverlust	≥ 2 kg in 4 Wochen		2	2
2. Kutane Manifestationen		**Maximum:**	**3**	**6**
Hautnekrosen			1	2
Purpura			1	2
Ulzerationen			1	4
Gangrän			2	6
andere	z.B. Erythema nodosum		1	2
3. Schleimhäute sowie Augenbeteiligung		**Maximum:**	**3**	**6**
Ulzerationen der Mundschleimhaut			1	2
genitale Ulzerationen			1	1
Entzündungen der Adnexen			2	4
signifikante Proptosis			2	4
(Epi)skleritis			1	2
Konjunktivitis			1	1
Blepharitis			1	1
Keratitis			1	3
Einschränkung des Gesichtfeldes			2	3
akuter Sehverlust				6
Uveitis			2	6
reinale Vaskulitis			2	6
retinale Venenthrombose			2	6
retinale Exudate			2	6
retinale Hämorrhagie			2	6
4. oberer Respirationstrakt		**Maximum:**	**3**	**6**
Rhinitis, nasale Ulzerationen			3	6
paranasale Sinusbeteiligung			1	2
subglottische Stenose			3	6
Mittelohrbeteiligung			1	3
Innenohrbeteiligung			2	6
5. unterer Respirationstrakt		**Maximum:**	**3**	**6**
Stridor			1	2
Kavernen				3
Pleurabeteiligung			2	4
Infiltrate			2	4
endobronchiale Beteiligung			2	4
massive Hämoptysis / alveoläre Hämorrhagie			4	6
respiratorische Insuffizienz			4	6
6. kardiovaskuläre Beteiligung		**Maximum:**	**3**	**6**
arterieller Verschluss			1	4

Endokarditis	2	4
Perikarditis	1	3
Angina pectoralis	2	4
Kardiomyopathie z.B. Wandbewegungsstörung	3	6
Herzinsuffizienz	3	6
7. Beteiligung des GI-Traktes Maximum:	**4**	**9**
Peritonismus	3	9
blutige Diarrhöen	3	9
Angina abdominalis	2	6
8. renale Beteiligung Maximum:	**6**	**12**
Hypertension	1	4
Proteinurie	2	4
Hämaturie	3	6
Kreatininanstieg 125-249µmol/l	2	4
Kreatininanstieg 250-499µmol/l	3	6
Kreatininanstieg ≥500µmol/l	4	8
Erhöhung des Kreatinins >30%, Abfall GFR >25%		6
9. nervale Beteiligung Maximum:	**6**	**9**
Cephalgien	1	1
Menigitis	1	3
organische Funktionseinschränkung	1	3
Krämpfe	3	9
Apoplex	3	9
transverse Myelitis	3	9
Hirnstamm Lähmung	3	6
sensorische periphere Neuropathie	3	6
motorische periphere Neuropathie	3	9

Tab. 6: BVAS 2003 (Birmingham Vasculitis Activity Score). übersetzt nach Mukhtyar et al., 2009; BVAS persistierend bezieht sich auf eine klinische Symptomatik, welche mindestens seit 6 Monaten besteht.

6.1.2 ELK-Klassifikation und dem DEI (Disease Extent Index)

Organmanifestation (ELK)		Punkte (DEI)	Manifestation
E	oberer Respirationstrakt	2	Rhinitis, Epistaxis, subglottische Stenose
L	Lunge	2	Bronchialstenose, Lungengranulome, alveoläre Hämorrhagie, Pleuritis
Ey	Auge	2	Proptosis, Episkleritis, Skleritis, Zentralvenenthrombose
K	Niere	2	Fokal-segmental-nekrotisierende extra-kapiläre Glomerulonephritis, Nierengranulom
H	Herz	2	Koronaritis, Vavulitis, Perikarditis, Pankarditis
Gi	Gastrointestinal	2	Colitis

S	Haut	2	Leukozytoklastische Vaskulitis, Hautulcera, Pyoderma gangränosum, orale und genitale Aphten, akrale Nekrosen
P	periphere Nerven	2	Polyneuritis, Mononeuritis
C	Zentralnervensystem	2	ZNS-Granulome, Gefäßverschlüsse
A	Muskeln, Gelenke	2	Myalgien, wandernde Arthralgien, nicht-erosive Arthritis
B	B-Symptomatik	2	Nachtschweiß, Abgeschlagenheit, Fieber, Gewichtsverlust
---	Vollremission	0	keine klinische Symptomatik für die Dauer ≥ 6 Monate

Tab. 7: ELK-Klassifikation und der DEI (Disease Extent Index). nach de Groot et al., 2001

6.1.3 Abbildungen zur Erläuterung des FACS

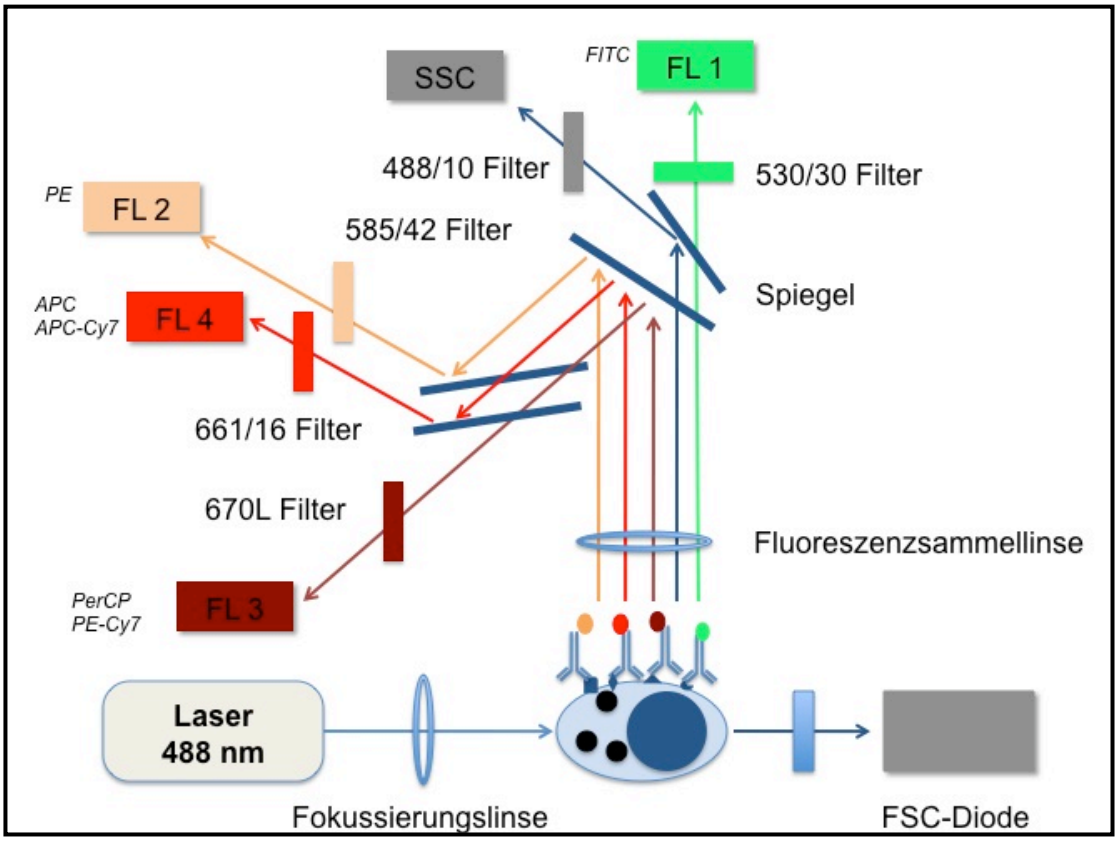


Abb. 18: Das optische System eines Durchflusszytometer. Ein Laser sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses wird fokussiert und trifft auf eine Messküvette. Das Licht wird gestreut und reflektiert. Fluoreszenzfarbstoffe emittieren Licht in verschiedenen Wellenlängen. Spiegel und Filter trennen diese auf. Detektoren (FL1-FL3) registrieren den jeweiligen Anteil. Mit dem hier dargestellten Setup können die Größe der Partikel (FSC-Diode), deren Granularität (SSC) sowie verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (FL 1: FITC; FL 2: PE; FL 4: APC, APC-Cy7; FL 3: PerCP, PE-Cy7) bestimmt werden. 488/10, 530/30, 585/42, 661/16: Bandpassfilter; 670L: Longpassfilter.

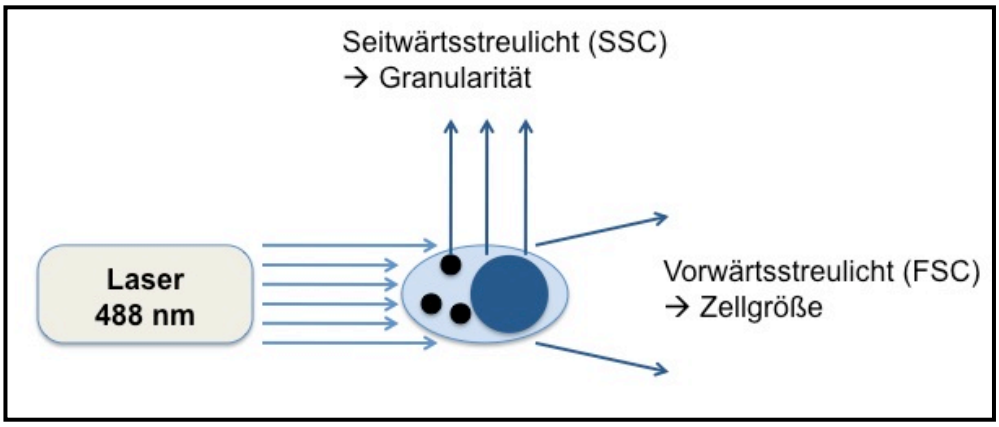


Abb. 19: Die Parameter FSC und SSC. Das von einem Laser ausgesandte Licht trifft auf eine Zelle. Durch die Streuung der Lichtstrahlen in Verlängerung der Richtung des Laserstrahls kann die Zellgröße bestimmt werden (Vorwärtssteulicht oder FSC). Das an Strukturen innerhalb der Zelle in einem 90°-Winkel reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht oder SSC bezeichnet und stellt ein Maß für die Zellgranularität dar.

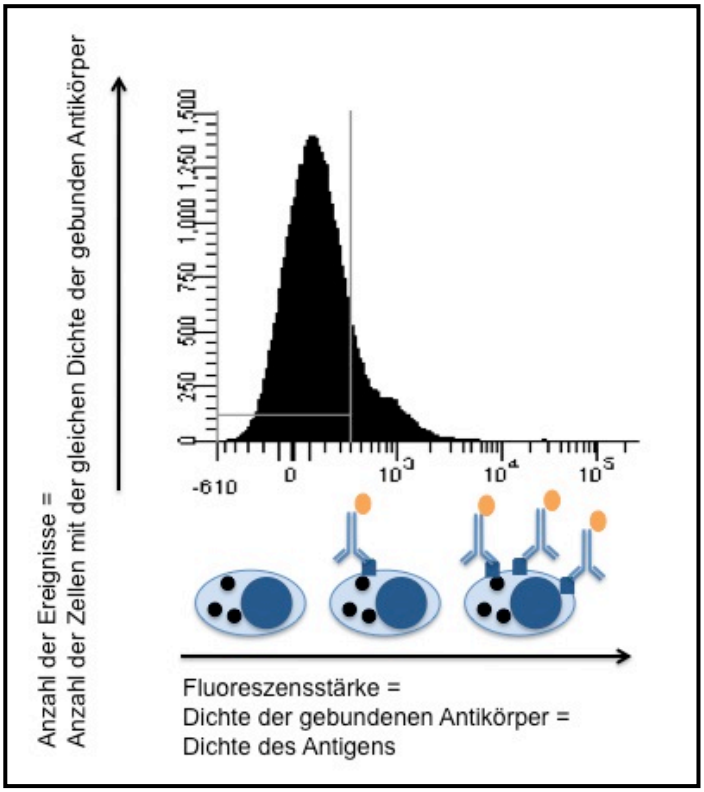


Abb. 20: Die Darstellung eines Fluoreszenssignals in Form eines Histogramms.

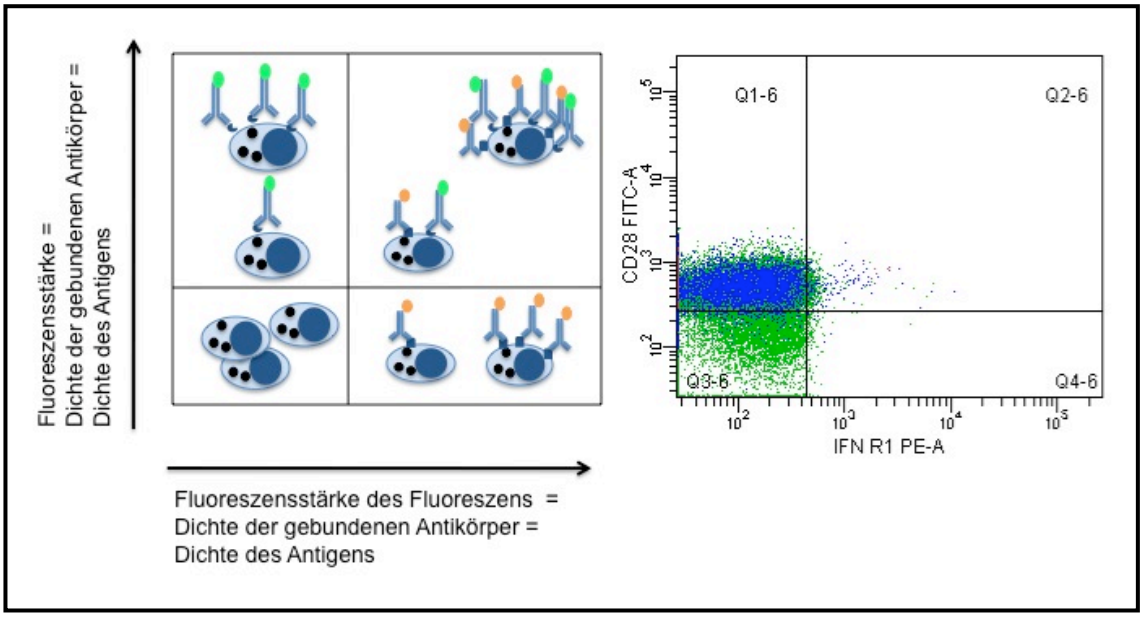


Abb. 21: Darstellung zweier Fluoreszenssignale in Form eines Dot-Plots. Die linke Hälfte des Bildes zeigt anschaulich die Verteilung der jeweiligen Zellen anhand der Dichte der gemessenen Fluoreszensstärke des gebundenen Antikörpers in die jeweiligen vier Quadrate (doppelt negativ, positiv gemäß der Dichte des gebundenen Antikörpers allein für eine Fluoreszens, doppelt positiv gemäß der Dichte der gebundenen Antikörper beider Fluoreszensen. Die rechte Hälfte des Bildes verdeutlicht dies anhand eines Dot-Plots der zwei Fluorochrome FITC und PE, jeweils konjugiert mit den Antikörpern gegen CD28 bzw. INF R1 (Interferon-Rezeptor 1).

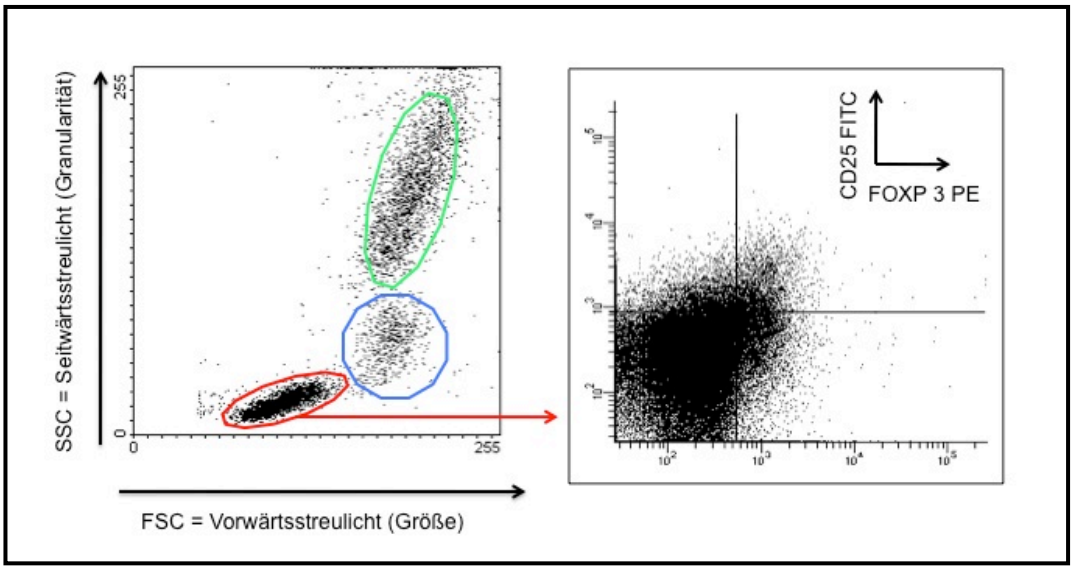


Abb. 22: Darstellung von SSC und FSC in Form eines Dot-Plots. Die linke Hälfte des Bildes zeigt anschaulich die Verteilung der jeweiligen Zellen anhand der Granularität (SSC) und Größe (FSC). Die rot umrandeten Zellen stellen Lymphozyten dar. Die blau umrandeten Zellen stellen Monozyten dar. Die grün umrandeten Zellen stellen Granulozyten dar. In der rechten Hälfte des Bildes ist anschaulich ein Dot-Plot der Fuorochrome FITC und PE, jeweils konjugiert mit den Antikörpern gegen CD25 bzw. FoxP 3, welches auf die Lymphozyten-Population eingestellt ist.

6.2 Ergebnisse

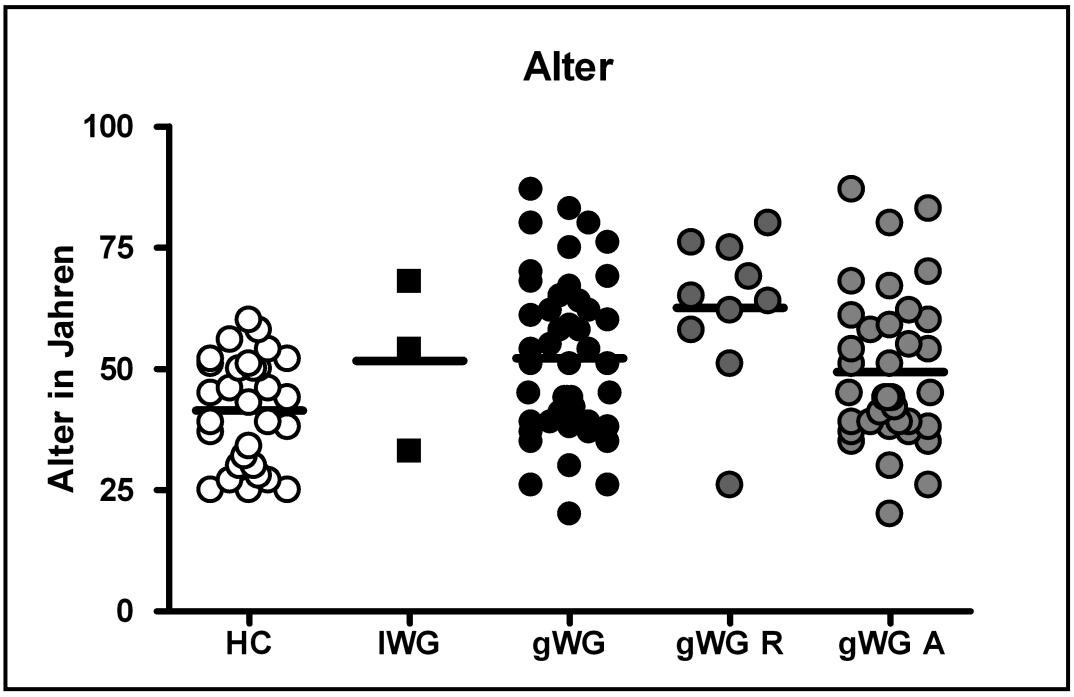


Abb. 23: Darstellung der Verteilung des Lebensalters der in dieser Studie untersuchten Probanden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Mittelwert des Lebensalters.

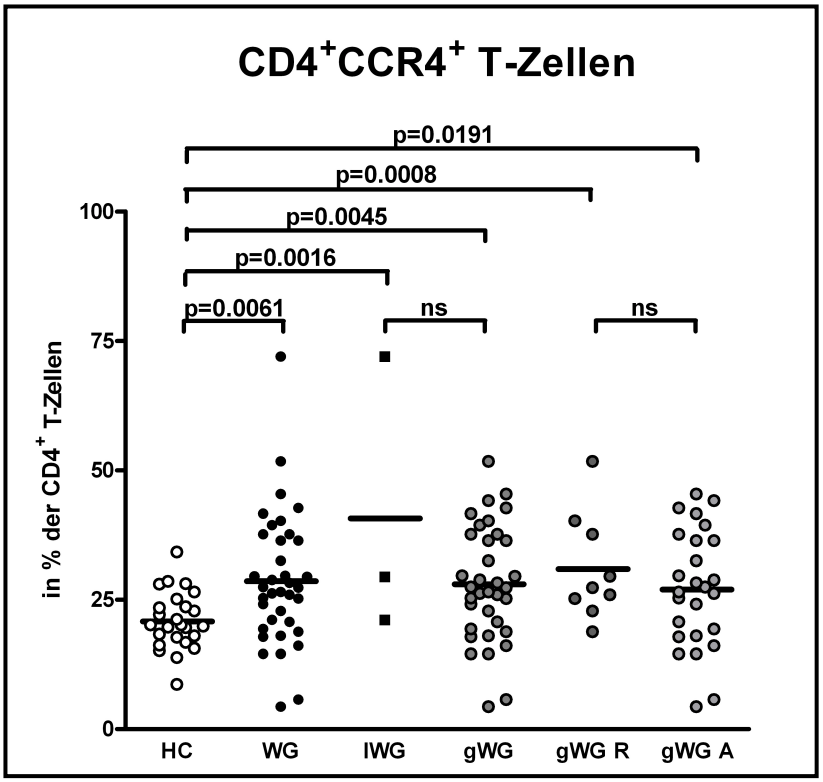


Abb. 24: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CCR4^+$ T-Zellen in der Population der $CD4^+$ T-Zellen. Patienten mit einer WG präsentieren sowohl in der lokalisierten und generalisierten Form eine deutliche Erhöhung an $CD4^+CCR4^+$ T-Zellen, unabhängig von der klinischen Aktivität.

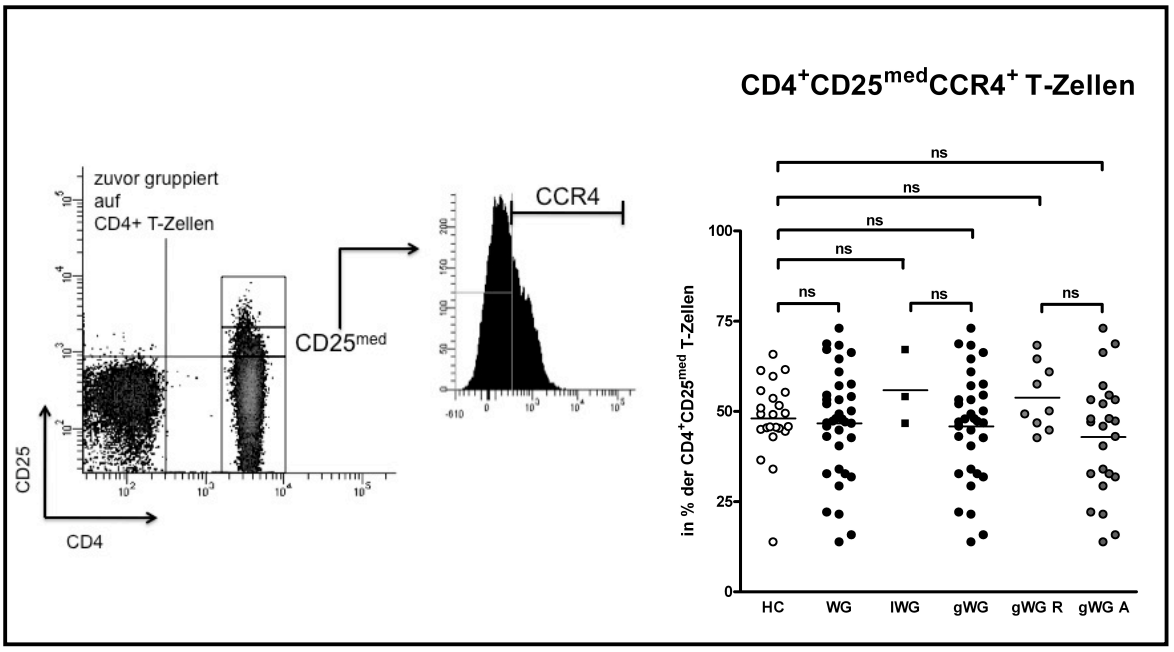


Abb. 25: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{med}CCR4^+$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen) in der Population der $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen (aktivierte T-Zellen). Links ein exemplarisches DotPlot mit der Darstellung $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen zuvor gruppiert aus $CD4^+CD8^-$ T-Zellen. Im mittleren Bereich exemplarisches Histogramm der Expression von CCR4 zuvor gruppiert auf die Fraktion $CD4^+CD25^{med}$ T-Zellen. Im rechten Bereich Darstellung des relativen Anteils von $CD4^+CD25^{med}CCR4^+$ T-Zellen innerhalb der $CD4^+CD25^{med}$ T-Zell-Fraktion. Es zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Gruppen.

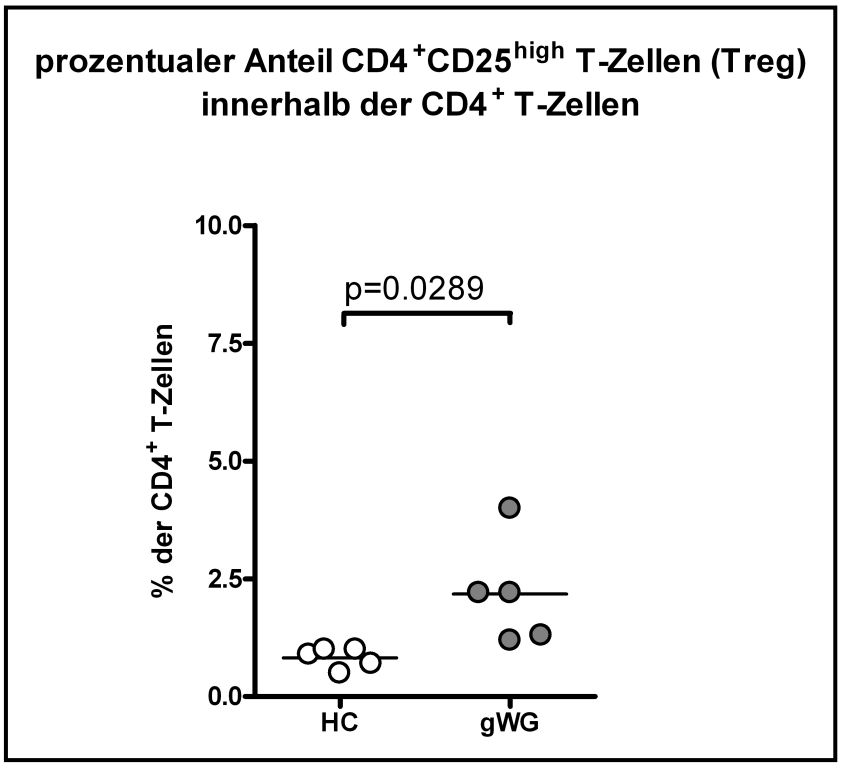


Abb. 26: Vergleich des prozentualen Anteils von $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen bei gWG ohne Immunsuppression. Patienten mit einer gWG ohne immunsuppressiver Therapie präsentieren in der generalisierten Form der WG eine Erhöhung $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen (Treg) im Vergleich zu alters- und geschlechtgleichen gesunden Kontrollen.

Population	HC	IWG	p	gWG	p	gWG A	p	gWG R	p
CTLA4$^+$ Treg	0,52±0,16 (p=18)	1,95±1,45 (n=2)	0,0316	1,01±0,30 (p=21)	0,1723	0,94±0,41 (n=14)	0,3062	1,09±0,39 (n=7)	0,1197
CD103$^+$ Treg	1,14±0,37 (n=29)	1,77±0,94 (n=3)	0,6023	1,04±0,61 (n=30)	0,8994	1,34±0,82 (n=22)	0,8052	0,23±0,13 (n=8)	0,2137
PD1$^+$ Treg	0,51±0,20 (n=10)	0,7 (n=1)	n.m.	1,58±0,20 (n=22)	0,2572	1,73±0,66 (n=20)	0,2128	0,05±0,05 (n=2)	0,3427
CD154$^+$ Treg	0,01±0,01 (n=9)	0,0 (n=1)	n.m.	0,71±0,30 (n=18)	0,1128	0,75±0,31 (n=17)	0,1007	0,0 (n=1)	n.m.

Tab. 8: Vergleich des relativen Anteils von CTLA4$^+$ Treg, CD103$^+$ Treg, PD-1$^+$ Treg sowie CD154$^+$ Treg. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HC) zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen des Anteils der einzelnen Subpopulation in der Population der CD4$^+$CD25^{high} T-Zellen (Treg) bei Patienten mit einer Wegenerschen Granulomatose in den einzelnen Kohorten (IWG, gWG, gWG A sowie gWG R). n.m. = nicht möglich

7. Literaturverzeichnis

Abdulahad WH, Stegeman CA, van der Geld YM, Doornbos- van der Meer B, Limburg PC, Kallenberg CGM: **Functional defect of circulating regulatory $CD4^+$ T cells in patients with Wegener's granulomatosis in remission.**
Arthritis Rheum 56:2080-91 (2007)

Abdulahad WH, van der Geld YM, Stegeman CA, Kallenberg CGM: **Persistent expansion of $CD4^+$ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis.**
Kidney Int 70:938-47 (2006)

Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, Murphy K, Campbell JJ, Butcher EC, Wu L: **C-C Chemokine Receptor 4 expression defines a major Subset of Circulating nonintestinal memory t cells of both Th1 and TH2 Potential.**
J Immunol 166:103-111 (2001)

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA: **$CD4^+CD25^{high}$ regulatory T cells in human peripheral blood.**
J Immunol 167:1245-53 (2001)

Berden AE, Kallenberg CGM, Savage CO, Yard BA, Abdulahad WH, de Heer E, Bruijn JA, Bajema IM: **Cellular Immunity in Wegener's Granulomatosis. Characterizing T Lymphocytes.**
Arthritis Rheum 60:1578-87 (2009)

Böcker W, Denk H, Heitz PhU: **Pathologie**.
3.Aufl., 4.Kap.S.112-145 (2004)

Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, Smolen JS, Scheinecker C: **FoxP3 expression in $CD4^+$ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis.**
Ann Rheum Dis 67:664-71 (2008)

Bonelli M, Savitskaya A, Steiner CW, Rath E, Smolen JS, Scheinecker C: **Phenotypic and functional analysis of $CD4^+CD25^-FoxP3^+$ T cells in patients with systemic lupus erythmatosus.**
J Immunol 182:1689-95 (2009)

Buckner JH: **Mechanisms of impaired regulation by $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatory T cells in human autoimmune disease.**
Nature Rev Immunol 10 849-59 (2010)

Burchert A, Wölfl S, Schmidt M , Brendel C, Denecke B, Cai D, Odyvanova L, Lagaye T, Müller MC, Berg T, Gschaidmeier H, Wittig B, Hehlmann R, Hochhaus A, Neubauer A: **Interferon-α, but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia.**
Blood 101:259-64 (2003)

Capraru D, Müller A, Csernok E, Gross WL, Holl-Ulrich K, Northfield J, Klenerman P, Herlyn K, Holle J, Gottschlich S, Voswinkel J, Spies T, Fagin U, Jabs WJ, Lamprecht P: **Expansion of circulating $NKG2D^+$ effector memory T-cells and expression of NKG2D-ligand MIC in granulomatous lesions in Wegener's granulomatosis.**
Clin Immunol 127:144-50 (2008)

Chen X, Bäumel L, Männel DN, Howard OMZ, Oppenheim JJ: **Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function od mouse CD4+CD25+ T regulatory cells.**
J Immunol 179:154-61 (2007)

Corthay A: **How do regulatory T cells work?**
Scand J Immunol 70:326-36 (2009)

De Groot K, Gross WL, Herlyn K, Reinhold-Keller E: **Development and validation of a disease extent index für Wegener's granulomatosis.**
Clin Nephrol 55 (1) :31-8 (2001)

Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg D, Mauri C: **Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFα therapy.**
J Exp Med 200:277-85 (2004)

Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman G, Jayne DRW, Jennette JC, Kallenberg CGM, Luqmani R, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Specks U, Watts R:
Granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): An alternative name for Wegener's granulomatosis.
Ann Rheum Dis 70:704 (2011)

Grau GE, Roux-Lombard P, Gysler C, Lambert C, Lambert PH, Dayer JM, Guillevin L: **Serum cytokine changes in systemic vasculitis.**
Immunology 68:196-8 (1989)

Herlyn K, Hellmich B, Gross WL, Reinhold-Keller E: **Stable incidence of systemic vasculitides in Schleswig-Holstein, Germany.**
Dtsch Arztebl Int 105:355–61 (2008)

Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS: **The majority of human peripheral blood $CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}$regulatory T cells bear functional skin homing receptors.**
J Immunol 177:2288-94 (2006)

Holle JU, Gross WL, Holl-Ulrich K, Ambrosch P, Noelle B, Both M, Csernok E, Moosig F, Schinke S, Reinhold-Keller E: **Prospective long-term follow-up of patients with localised Wegener's granulomatosis: does it occur as persistent disease stage?**
Ann Rheum Dis 69(11):1934-9 (2010)

Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D: .
Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cells
J Exp Med 194:847-53 (2001)

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(2):187-92 (1994)

Jennette JC, Falk RJ, Gasim AH**: Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitis.**
Curr Opin Nephrol Hypertens 20(3):263-70 (2011)

Klinger H: **Grenzformen der Periarteritis nodosa**.
Frankfurt Ztschr Pathol 1 42:455 (1931)

Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, Conrad C, Ittner LM, Bauer S, Luther SA, Uematsu S, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM
Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease.
Nat Med 11:138-45 (2005)

Lanzavecchia A, Sallusto F: **Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors and memory cells.**
Science 290(5489):92-7 (2000)

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:
The american college of rheumatology 1990 criteria fort he classification of wegener's granulomatosis
Arthritis Rheum 33:1101-7 (1990)

Lafaille MAC, Lafaille JJ: **Natural and Adaptive FoxP3$^+$ Regulatory T cells: More of the Same or a Division of Labor?**
Immunity 30:626-35 (2009)

Lee HY, Hong YK, Yun HJ, Kim YM, Kim JR, Yoo WH: **Altered frequency and migration capacity of CD4$^+$CD25$^+$regulatory T cells in systemic lupus erythmatosus.**
Rheumatology 47:789-94 (2008)

Lim HW, Lee J, Hillsamer P, Kim CH: **Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells an FoxP3$^+$ regulatory T cells**.
J Immunol 180:122-9 (2008)

Lutsiak MEC, Semnani RT, de Pascalis R, Kashmiri SVS, Schlom J, Sabzevari H: **Inhibition of CD4$^+$CD25$^+$ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide**
Blood 105:2862-68 (2005)

Marinaki S, Neumann I, Kälsch AI, Grimminger P, Breedijk A, Birck R, Schmitt W, Waldherr R, Yard BA, van der Woude FJ: **Abnormalities of CD4$^+$ T cell subpopulations in ANCA-associated vasculitis.**
Clin Exp Immunol 140:181-91 (2005)

Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Kambouchner M, Valeyre D, Chapelon-Abric C, Debré P, Piette JC, Gorochow G: **The immune paradox of sarcoidosis an regulatory T cells.**
J Exp Med 203:359-70 (2006)

Mohammad AJ, Jacobsson LTH, Mahr AD, Sturfelt G, Segelmark M: **Prevalence of Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiits, polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome within a defined population in southern Sweden.**
Rheumatology 46:1329-37 (2007)

Morgan MD, Day CJ, Piper KP, Khan N, Harper L, Moss PA, Savage CO: **Patients with Wegener's granulomatosis demonstrate a relative deficiency and functional impairment of T-regulatory cells.**
Immunology 130 (1): 64-73 (2010)

Mukhtyar C, Lee R, Brown D, Carruthers D, Dasgupta B, Dubey S, Flossmann O, Hall C, Hollywood J, Jayne D, Jones R, Lanyon P, Muir A, Scott D, Young L, Luqmani R: **Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (Version 3).**
Ann Rheum Dis 68 (12):1827-32 (2009)

Oberg HH, Wesch D, Lenke J, Kabelitz D: **An optimized method for the functional analysis of human regulatory T cells.**
J Immunol Methods 64:353-60 (2006)

Oo YH, Hubscher SG, Adams DH: **Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis and managment**.
Hepatol Int 4:475-93 (2010)

Popa ER, Stegeman CA, Bos NA, Kallenberg CG, Tervaert JW: **Differntial B-and T-cell activation in Wegener's granulomatosis.**
J Allergy Clin Immunol 103:885-94 (1999)

Reinhold-Keller E, Beuge N, Latza U, de Groot K, Rudert H, Nolle B, Heller M, Gross WL: **An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's Granulomatosis: long-term outcame in 155 patients.**
Arthritis Rheum 43:1021-32 (2000)

Reinhold-Keller E, Lamprecht P, Feller AC, Gross WL: **Polyarthritis following interferon alpha treatment in a patient with localized Wegener`s granulomatosis.**
Clin Exp Rheumatol 19:227-228 (2001)

Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer, Gross WL: **Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from the german vasculitis register.**
Arthritis Rheum 53:93-99 (2005)

Rimbert M, Hamidou M, Braudeau C, Puéchal X, Teixeira L, Caillon H, Néel A, Audrain M, Guillevin L, Josien R: **Decreased numbers of blood dendritic cells and defective function of regulatory t cells in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis**.
PLos One 8;6(4):e18734 (2011)

Rönnblom L, Eloranta ML, Alm GV: **The type I interferon system in systemic lupus erythematosus.**
Arthritis Rheum 54:408-20 (2006)

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α-chains (CD25).**
J Immunol 155:1151-64 (1995)

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M: **Regulatory T cells and immune tolerance.**
Cell 133:775-87 (2008)

Sakaguchi S: **Regulatory T cells: history and perspective.**
Methods Mol Biol 707:3-17 (2011)

Scheffold A, Murphy KM, Höfer T: **Competition for cytokines: Treg cells take all**
Nature Immunol 12:1285-87 (2007)

Schlesier M, Kaspar T, Gutfleisch J, Wolff-Vorbeck G, Peter HH: **Activated CD4+ and CD8+ T cell subsets in Wegener's granulomatosis.**
Rheumatol Int 14:213-9 (1995)

Schmitt WH, Heesen C, Csernok E, Rautmann A, Gross WL: **Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptor in patients with Wegener's granulomatosis. Association with disease activity.**
Arthritis Rheum 35:1088-96 (1992)

Shevach EM: **Mechanismus of FoxP3$^+$ T regulatory cell-mediated suppression.**
Immunity 30:636-45 (2009)

Smith EL, Finney HM, Nesbitt AM, Ramsdell F, Robinson MK: **Splice variants of human FoxP3 are functionel inhibitors of human CD4$^+$ T-cell activation.**
Immunology 119:203-211 (2006)

Stary G, Klain I, Bauer W, Koszik F, Reininger B, Kohlhofer S, Gruber K, Skvara H, Jung T, Stingl G: **Glucocorticosteroids modify Langerhans cells to produce TGF-β expand regulatory T cells.**
J Immunol 186(1):103-12 (2010)

Stone JH, Merkel PA, Spiera R, Seo P, Langford CA, Hofman GS, Kallenberg CGM, Clair EW, Turkiewicz A, Tchao NK, Webber L, Ding L, Sejismundo LP, Mieras K, Weitzenkamp D, Ikle D, Seyfert-Margolis V, Mueller m, Brunetta P, Allen NB, Fervenza FC, Geetha D, Keogh KA, Kisin EY, Monach PA, Peikert T, Stegeman C, Yttenberg SR, Specks U: **Rituximab versus Cyclophosphamide for ANCA-Associated Vasculitis.**
N Engl J Med 363:221-232 (2010)

Taflin C, Miyara M, Nochy D, Valeyre D, Naccache JM, Altare F, Salek-Peyron P, Badoual C, Bruneval P, Haroche J, Mathian A, Amoura Z, Hill G, Gorochov G:
FoxP3$^+$ regulatory T cells supress early stage of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions.
Am J Pathol 174:497-508 (2009)

Tang Q, Bluestone JA: **The FoxP3^{+} regulatory T-cell: a jack of all trades, master od regulation.**
Nat Immunol 3:239-44 (2008)

Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM: **Induction of FoxP3 expression in naive human CD4+FoxP3- T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-β-dependent but does not confer a regulatory phenotype.**
Blood 110:2983-2990 (2007)

Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE: **TNF downmodulates the function of human CD4^{+}CD25^{high} T-regulatory cells.**
Blood 108:253-61 (2006)

Venken K, Thewissen M, Hellings N, Somers V, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P**: CFSE based assay for measuring CD4+CD25+ regulatory T cell mediated supression of auto-antigen specific and polyclonal T cell responses**
J Immunol Methods 322:1-11 (2007)

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ: **How regulatory T cells work**
Nature Immunol 8:523-532 (2008)

Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, Rustin MHA, Taams LS, Beverley PCL, Macallan DC, Akbar AN: **Human CD4+Cd25hiFoxPr regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo.**
JCI 116:2423-33 (2006)

Wallace SL, Zvaifler NJ: **The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis.**
Arthritis Rheum 33:1101–1107 (1990)

Wang J, Ioan-Facsinay A, Van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM: **Transient expression of FoxP3 in human activated nonregulatory CD4^{+} T cells.**
Eur J Immunol 37:129-38 (2007)

Wegener F: **Über generalisierte, septische Gefäßerkrankungen.**
Verh Dtsch Pathol Ges 29: 202-210 (1936).

Wegener F: **Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Niere.**
Beitr Pathol Anat allg Pathol 102: 36-68 (1939)

Wilde B, Dolff S, Cai X, Specker C, Becker J, Tötsch M, Costabel U, Düring J, Kribben A, Cohen Tervaert JW, Schmid KW, Witzke O: **$CD4^+CD25^+$ T-cell populations expressing CD132 and GITR are associated with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis.**
Nephrol Dial Transplant 24:161-71 (2009)

Yan B, Ye S, Chen G, Kuang M, Shen N, Chen S: **Dysfunctional $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-α-producing antigen-presenting cells.**
Arthritis Rheum 58:801-12 (2008)

Zhang B, Zhang X, Tang F, Zhu L, Liu Y: **Reduction of forkhead box P3 levels in $CD4^+CD25^{high}$ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematodes.**
Clin Exp Immunol 153:182-7 (2008)

8. Eigene Veröffentlichungen und Vorträge

8.1 Originalarbeiten

Klapa S, Müller A, Csernok E, Fagin U, Klenerman P, Holl-Ulrich K, Gross WL, Lamprecht P: **Lower numbers of FoxP3 and CCR4 co-expressing cells in an elevated subpopulation of $CD4^{+}CD25^{high}$ regulatory T cells from Wegener's granulomatosis.**
Clin Exp Rheumatol 28:72-80 (2010)

Sudeck H, **Klapa S**: **Einschmelzende kavernöse Pneumonie bei einem immunkompetenten Patienten mit positiven QuantiFERON-Test nach ISAF-Einsatz.**
Wehrmedizin und Wehrpharmazie 3:42-43 (2010)

8.2 Anerkennungen und Preise

Ludolph-Brauer-Posterpreis 2007 der Nordwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin für den Beitrag:
Klapa S, Müller A, Capraru D, Gross WL, Lamprecht P:
Charakterisierung von $NKG2D^{+}$ Effektor Gedächtnis-T-Zellen bei der Wegenerschen Granulomatose. (Postervorstellung auf der 133. Tagung der Nordwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin vom 02. Februar bis zum 03. Februar 2007 in Hamburg)

Reisestipendium der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Universität zu Lübeck für die Teilnahme am 13. Internationalen Vaskulitis und ANCA Workshop 26. April bis 29. April 2007 in Cancun Mexiko

8.3 Abstracts, Vorträge und Poster

Klapa S, Brown S, Humphreys I, Barnes E, Klenerman P: **Analysis von $CD4^{+}$ T cell responses in HCV^{+} patients using a MIG (Monokine induced by gamma) detection assay.** (Postervorstellung auf der Schwerpunkt – Konferenz „klinische Immunologie bei viralen Hepatitiden" der *European Association for the Study of the Liver* (EASL) 07. Oktober bis 08. Oktober 2006 in London)

Klapa S, Müller A, Csernok E, Klenerman P, Begemann A, Gross WL, Lamprecht P: **Regulatorische T-Zellen bei der Wegenerschen Granulomatose**. *Z. Rheumatol* 66:63-64 (Vortrag auf der 34. Tagung des Arbeitskreises Klinische Immunologie 03. November bis 04. November 2006 in Frankfurt)

Klapa S, Capraru D, Müller A, Csernok E, Begemann A, Gross WL, Lamprecht P:
Expansion of NKG2D$^+$ effector memory T-cells in Wegener´s granulomatosis.
Clin Exp Rheumatol S-84, O-III-20 (2007) (Vortrag und Postervorstellung auf dem 13. Internationalen Vaskulitis und ANCA Workshop 26. April bis 29. April 2007 in Cancun Mexiko)

Begemann A, Holle J, Schwarz N, Müller A, Csernok E, **Klapa S**, Gross WL, Lamprecht P: **Upregulated CD162 (PSGL-1) and CD18 (β2-integrin) expression on an anomalous higher spontaneus rolling of activated T-cells in Wegener´s granulomatosis**
Clin Exp Rheumatol S-85, PD-III-25 (2007)

Klapa S, Müller A, Csernok E, Fagin U, Gross WL, Lamprecht P: **Regulatorische T-Zellen bei der Wegenerschen Granulomatose.** FOCUS MUL 24:125 (Postervorstellung auf dem ersten Lübecker Doktorandentag *Public Understanding of Science* 06.06.2007 in Lübeck)

9. Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter Lamprecht, Oberarzt der Poliklinik für Rheumatologie des UKSH Campus Lübeck und der Abteilung für Innere Medizin / Rheumatologie der Rheumaklinik Bad Bramstedt danken für diesen interessanten Forschungsauftrag, für die fortwährende Betreuung, für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Kooperation mit dem Labor von Prof. P. Klenerman in Oxford / UK sowie für die Unterstützung meine Arbeit auf Kongressen vorzustellen und als Erstautor veröffentlichen zu können. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Forschungslabor am UKSH Campus Lübeck und an der Rheumaklinik Bad Bramstedt sowie für die konstruktive Kritik möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W.L. Gross, Direktor der Poliklinik für Rheumatologie des UKSH Campus Lübeck und der Abteilung für Innere Medizin / Rheumatologie der Rheumaklinik Bad Bramstedt, danken.

Ich danke im besonderem Maße Frau Dr. Ing. Antje Müller, Leiterin des Forschungslabors am UKSH Campus Lübeck, für die hervorragende Betreuung bei allen Phasen dieser Arbeit, für die lebhafte konstruktive Diskussion der Methodiken und der Versuchsergebnisse sowie für die ständige Hilfsbereitschaft bei allen Fragen des wissenschaftlichen Lebens.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Elena Csernok, Leiterin des Labors in der Rheumaklinik Bad Bramstedt, für die fortwährende Unterstützung und Motivation. Frau Monika Backes, Frau Silke Pitann und Frau Petra Zander danke ich für die engagierte Einarbeitung in die Laborabläufe und die exzellente technische Assistenz. Ferner danke ich Prof. Paul Klenerman für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Peter Medawar Building for Pathogen Research an der University of Oxford sowie für die Unterstützung in der Optimierung der Versuchsmethodik.

Frau Dr. med. K. Holl-Ullrich vom Institut für Pathologie des UKSH Campus Lübeck danke ich für die Begutachtung der Gewebeschnitte.

Mein Dank gilt außerdem allen Patienten sowie gesunden Spendern deren Hilfsbereitschaft diese Studie erst ermöglicht hat.

Meiner Familie danke ich für die großartige Unterstützung in allen Phasen meines Studiums und im besonderem Maße für die stets willkommene Motivation.

10. Curriculum vitae

entfernt für die online Veröffentlichung