Aus der

Poliklinik für Rheumatologie

der Universität zu Lübeck

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

Interleukin-32
im endonasalen Gewebe der
Granulomatose mit Polyangiitis

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Sektion-

Vorgelegt von

Sebastian Torben Jendrek

Lübeck 2014

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Konrad Sommer

- Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2014
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 07.10.2014

  - Promotionskommission der Sektion Medizin -

*Wegener F: Über eine eigenartige **rhinogene Granulomatose** mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren. Beit path Anat allg Path 102, 36, 1939*

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1. Die Granulomatose mit Polyangiitis – eine histopathologische Betrachtung 01

2. Interleukin-32 11

2.1 Struktur und Vorkommen 11

2.2 IL-32 und chronische Inflammation 11

2.3 Interaktion von IL-32 mit PR3 13

2.4 IL-32 und Knochendestruktion 13

3. Interleukin-10 und Interleukin-17 – Regulatoren der Inflammation 14

Zielsetzungen 16

Patienten, Material und Methoden

1. Patienten und Kontrollen 17

2. Reagenzien und Hilfsmittel 19

2.1 Geräte 19

2.2 Verbrauchsmaterial 20

2.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen 20

2.4 Immunhistochemie-Kits-Materialien 21

2.5 Antikörper für Immunhistochemie 22

2.6 Antikörper für Immunfluoreszenz 23

2.7 RNA-Trizol-Materialien 24

2.8 Enzymatische Spaltung genomischer DNA in RNA-Proben 24

2.9 Superscript 3-Reverse-Transkriptase-Materialien 24

2.10 PCR-Ansätze 24

3. Methodik 25

3.1 Immunhistochemische (Doppel)färbungen

3.1.1 IL-32 Peroxidase-Einzelfärbung 25

3.1.2 IL-32 Alkalische Phosphatase-(AP)Einzelfärbung 26

3.1.3 Doppelfärbung für CD68 und IL-32 26

3.1.4 Doppelfärbung für Vimentin und IL-32 27

3.1.5 Doppelfärbung für CD4 und IL32 28

3.1.6 CD68-Einzelfärbungen 28

3.1.7 Vimentin- Einzelfärbung 29

3.1.8 IL-10 Einzelfärbung 29
3.1.9 IL-17 Einzelfärbung 30

3.2 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen 31
3.3 Kolokalisationsanalysen anhand von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen 31
3.3.1 Arbeitsprinzip des Konfokalen Mikroskops 31
3.3.2 Doppelfärbung für PR3 und IL-32α 33
3.3.3 Doppelfärbung für CD66b und IL-32α 34
3.3.4 Semi-nested PCR zur Analyse des mRNA-Expressionsmusters von IL-32 im Nasenschleimhautgewebe bei GPA 34

Ergebnisse 36

1. IL-32α und IL-32β, γ, δ mRNA Expression in Nasenschleimhautgewebe bei GPA 37
2. Phänotypisierung und semi-quantitative Auswertung von IL-32$^+$ Zellen 38
2.1 IL-32 Proteinexpression in Nasenschleimhautgewebe bei GPA im Vergleich zur CRS 38
2.2 CD4$^+$ T-Lymphozyten stellen eine Minorität der IL-32$^+$ Zellen in der granulomatösen Entzündung dar 42
2.3 Erhöhte Anzahl IL-32$^+$ Makrophagen in der granulomatösen Entzündung 44
2.4 Erhöhte Anzahl von IL-32$^+$ Fibroblasten-ähnlichen Zellen in der granulomatösen Entzündung 51
2.5 IL-32-Expression von Epithelzellen 57
3. Korrelationsanalysen
3.1 Keine Korrelationen zwischen verschiedenen IL-32$^+$ Zelltypen 59
3.2 Kein Zusammenhang zwischen der Expression von IL-10 und IL-32 in der granulomatösen Entzündung 59
3.3 Expression von IL-32 und IL-17A in der granulomatösen Entzündung bei GPA 61
4. IL-32α Expression im Nasenschleimhautgewebe bei GPA im Vergleich zu CRS
4.1 IL-32α$^+$CD66b$^+$ Zellen in Nasenschleimhautgewebe 63
4.2 Kolokalisation von IL-32α mit PR3 in Nasenschleimhautgewebe 67

Diskussion 71

Zusammenfassung 78

Literaturverzeichnis 80

Abkürzungsverzeichnis 89

Anhang

Die Granulomatose mit Polyangiitis 91

Die Proteinase 3 97

Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen 101

Danksagung 106

Eigene Veröffentlichungen und Vorträge Publikationen 107

Lebenslauf 108

Einleitung

1. Die Granulomatose mit Polyangiitis – eine histopathologische Betrachtung

Die Umbenennung der Wegener´schen Granulomatose in Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) wurde im Vorwege des 15. Internationalen Vaskulitis- und ANCA-Workshops in Chapel Hill, NC, USA im Mai 2011 von Repräsentanten führender Arbeitsgruppen auf dem Gebiet der Vaskulitisforschung beschlossen [Falk RJ et al., 2011]. Die Granulomatose mit Polyangiitis wird als primär systemische Vaskulitis durch die revidierte Krankheitsdefinition der Chapel Hill Consensus Conference von 2013 (siehe Anhang Abb. 48: CHCC-2013-Definitionen) und die vom American College for Rheumatology 1990 erstellten Klassifikationskriterien (siehe Anhang Abb. 49: ACR-1990-Klassifikation) beschrieben. Das Krankheitsbild wird im Anhang beschrieben.

Vor Einführung der heute üblichen immunsuppressiven Therapien wurde eine mittlere Überlebensdauer der GPA von 5 Monaten angegeben. Eine Studie aus den 1990-er Jahren gab nach Einführung der Cyclophosphamidtherapie zur Remissionsinduktion und -erhaltung Überlebensraten von über 80% für im Median 6 – 8 Jahre an [Hoffman et al., 1992]. Aktuelle Daten zeigen eine Angleichung der Überlebensrate von GPA-Patienten an die Normalbevölkerung als Folge der heute möglichen früheren Diagnosestellung und Diversifizierung der Therapiestrategien [Holle et al., 2011]. Es fehlt allerdings weiterhin an kausalen und nebenwirkungsärmeren Therapieansätzen**.**

Die Histopathologie von Patientengewebe mit GPA zeigt viele Charakteristika, welche für sich isoliert gesehen nicht beweisend für das Vorliegen einer GPA sind. In den Biopsaten liegen zumeist nicht alle Charakteristika auf einmal vor. Außerdem gibt es einige Überschneidungen zu anderen Kleingefäßvaskulitiden wie z.B. der mikroskopischen Polyarteriitis (MPA) [Holl-Ulrich, 2009]. Folglich gilt es, die Histopathologie immer im Zusammenhang mit den klinischen Manifestationen zu werten. Die neutrophilenreiche granulomatöse Entzündung im oberen und unteren Respirationstrakt ist für die GPA jedoch kennzeichnend und unterscheidet sie von den beiden anderen Anti-Neutrophilen zytoplasmatische Autoantikörper (ANCA)-assoziierten Kleingefäßvaskulitiden (MPA und eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis, EGPA). Richtungsweisend für das Vorliegen einer GPA ist die histomorphologische Trias aus einer granulomatösen extravaskulären Entzündung mit landkartenartigen Nekrosen und einer nekrotisierenden Kleingefäßvaskulitis [Devaney et al., 1990].

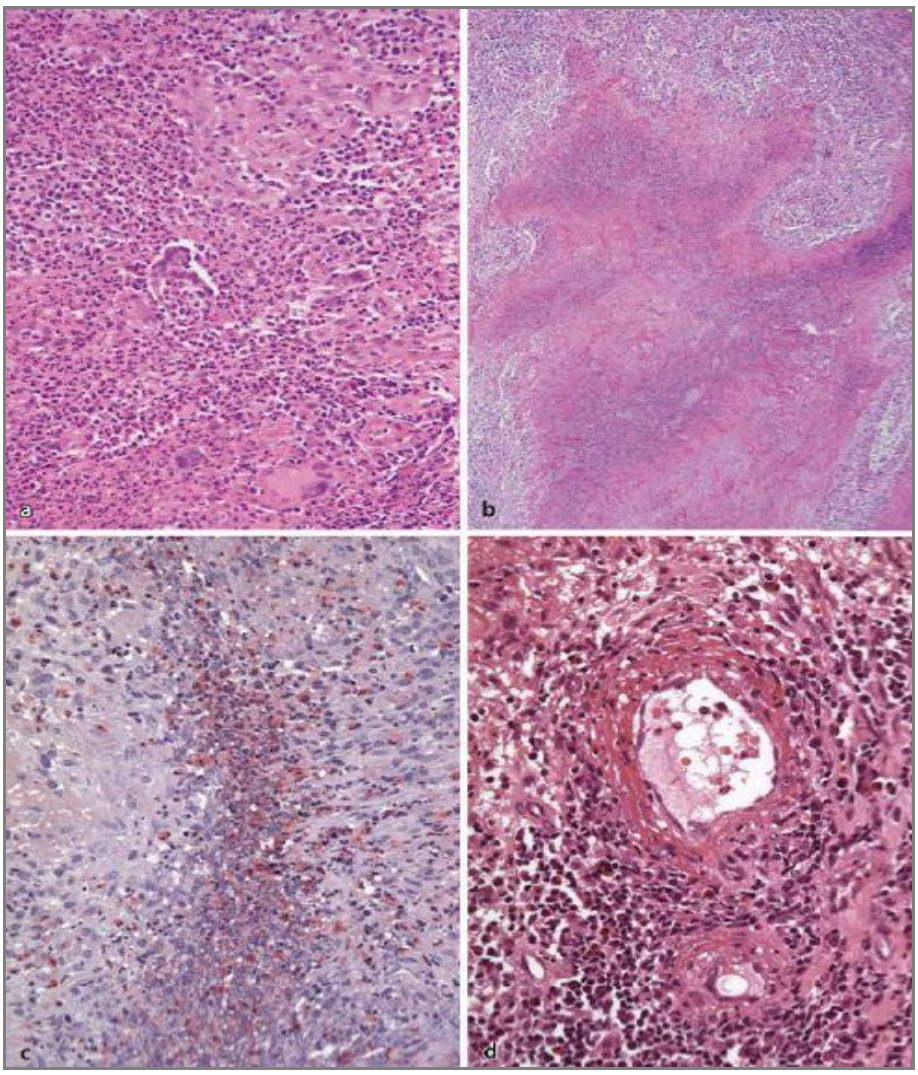


Abb. 1: histomorphologische Charakteristika der GPA im Respirationstrakt. (HE-Färbung, Vergr. 200:1). Aus: [Holl-Ulrich K, Histopathologie systemischer Vaskulitiden, Pathologe, 2009, DOI 10.1007/s00292-009-1156-x].
Hierbei zeigt Ausschnitt (a) ein unscharf begrenztes epitheloidzelliges Granulom mit begleitenden Mikroabszessen, in Ausschnitt (b) kommt eine landkartenartige Nekrose zur Darstellung, Ausschnitt (c) fokussiert einen Mikroabszess mit begrenzenden Epitheloidzellen und Ausschnitt (d) zeigt die nekrotisierende Kleingefäßvaskulitis.

Die frühe Phase der Entzündung im Gewebe der GPA ist vor allem durch ein purulentes Bild geprägt. Insbesondere die akute und unbehandelte Gewebsläsion der GPA erscheint somit oft eher als Abszess auf Grund der Durchsetzung des Gewebes mit zahlreichen neutrophilen Granulozyten (siehe Abb. 2). [Jennette et al., 2013].

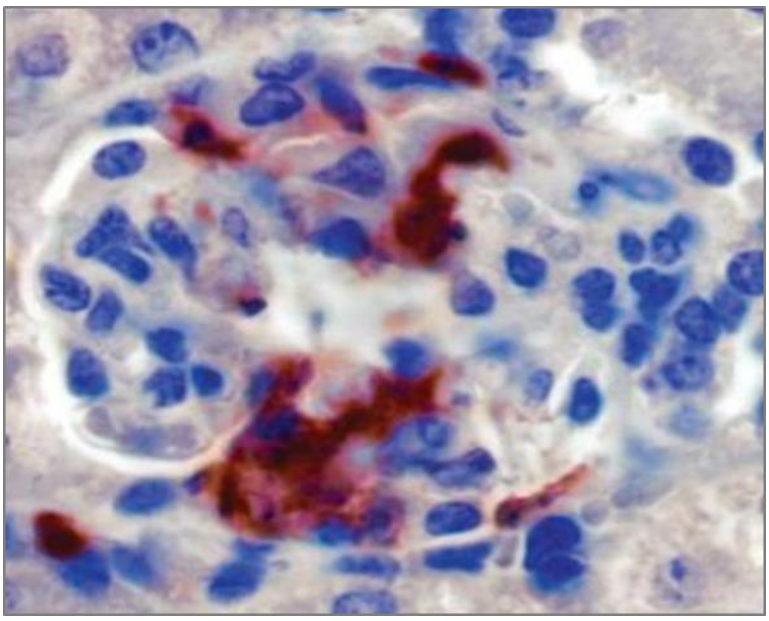


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung von neutrophilen Granulozyten im Respirationstrakt, welche eine segmentale Nekrose-assoziierte Akkumulation zeigen. [aus: Jennette J.C, Falk R, Peiqi H, Hong X, Pathogenesis of Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody–Associated Small-Vessel Vasculitis Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2013. 8:139–60].

Die Frühphase des entzündlichen Bildes im Gewebe der GPA ist durch den starken Einstrom neutrophiler Granulozyten geprägt. Im Rahmen ihrer Aktivierung mit Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und „respiratory burst“ kommt es zur Freisetzung der in den azurophilen Granula gespeicherten Enzyme. Durch den Zerfall der neutrophilen Granulozyten kommt es zur Ausbildung fokaler Mikroabszesse. Mark und Kollegen (1988) vermuteten, dass die sich in Folge entwickelnden Nekrosezonen einen Anreiz zur Ausbildung von multinukleären Riesenzellen darstellen. An den Rändern der Nekrosen bilden sich Zonen mit den die granulomatöse Entzündung aufbauenden mehrkernigen Riesenzellen.
In der Peripherie der Granulomatose befinden sich um einen Kern von zellulärem Debris vor allem pallisadenartig angeordnete, länglich ausgezogene Makrophagen, welche sich histomorphologisch teilweise zu mehrkernigen Riesenzellen rechnen lassen (Abb. 3).

Die im Gewebe der GPA beobachteten Granulome besitzen hierbei keine oder nur sehr wenig Ähnlichkeiten zu jenen der Sarkoidose oder Tuberkulose.

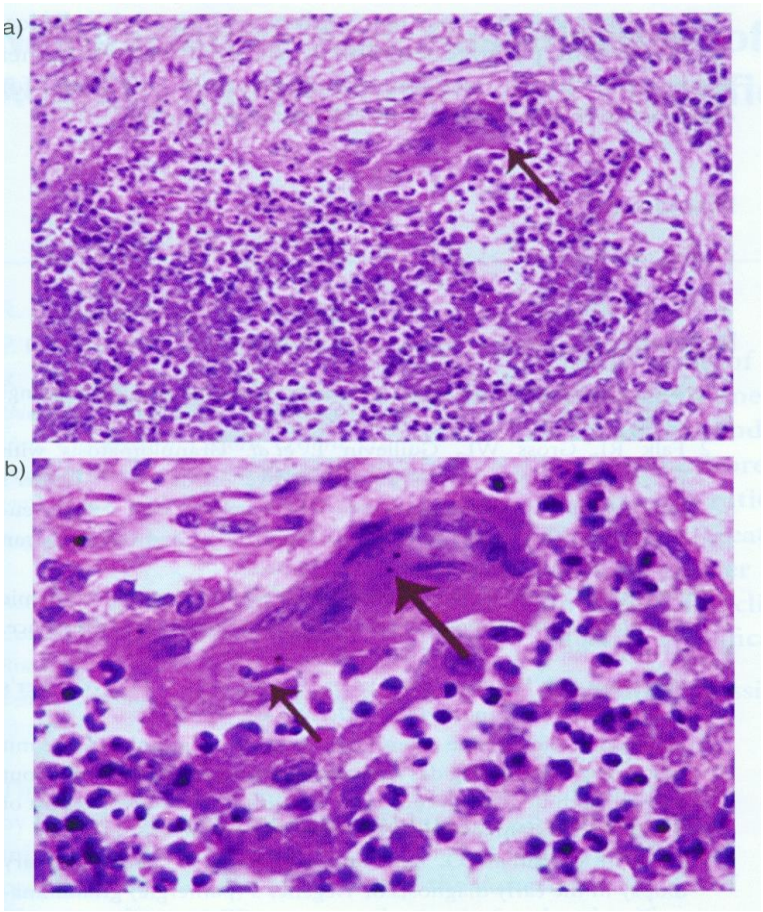


Abb. 3: Lungengewebe eines Patienten mit GPA (Hämatoxylin/Eosin). [aus: Jennette J.C. Nomenclature and classification of vasculitis: lessons learned from granulomatosis with Polyangiitis (Wegener´s granulomatosis), Clin Exp Immunol, 2011, 164: 7-10]
Der Ausschnitt **(a)** zeigt eine zentrale Nekrosezone mit der Ausbildung eines Mikroabszesses. Hier kommt es zu intensivem Einstrom von neutrophilen Granulozyten. Am oberen Pol der Nekrose kommt eine assoziierte multinukleäre Riesenzelle zur Darstellung (Pfeil). Die darunter abgebildete Detailaufnahme **(b)** zeigt die multinukleären Riesenzelle mit phagozytiertem apoptotischen Zelldebris (dicker Pfeil) und einem phagozytiertem neutrophilen Granulozyten (dünner Pfeil) [aus Jennette et al., 2011].

2. Interleukin-32

2.1 Struktur und Vorkommen

Interleukin-32 (IL-32γ) wurde ursprünglich Anfang der 1990-er Jahre als ein Transskript in einer cDNA-Bibliothek identifiziert, welche von Interleukin-2 aktivierten NK-Zellen abgeleitet wurde [Dahl et al., 1992].

Es konnten 6 Splice-Varianten (α, β, γ, δ, ε, ζ) identifiziert werden, von denen allerdings nur α-δ im Gewebe und dort hauptsächlich intrazellulär beobachtet werden können [Kim et al., 2005]. IL-32α wurde hierbei als die in humanen NK-Zellen dominierende Isoform identifiziert. Ergänzend zeigten Choi et al. (2008), dass IL-32γ die Isoform mit der größten biologischen Aktivität ist. Die biologische Aktivität wurde in diesem Fall definiert als induzierbare TNF-α-Produktion von humanen PBMC´s nach Inkubation mit den verschiedenen Isoformen. Die IL-32ε- und ζ- Isoformen konnten bisher nur in aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen werden [Goda et al., 2006].

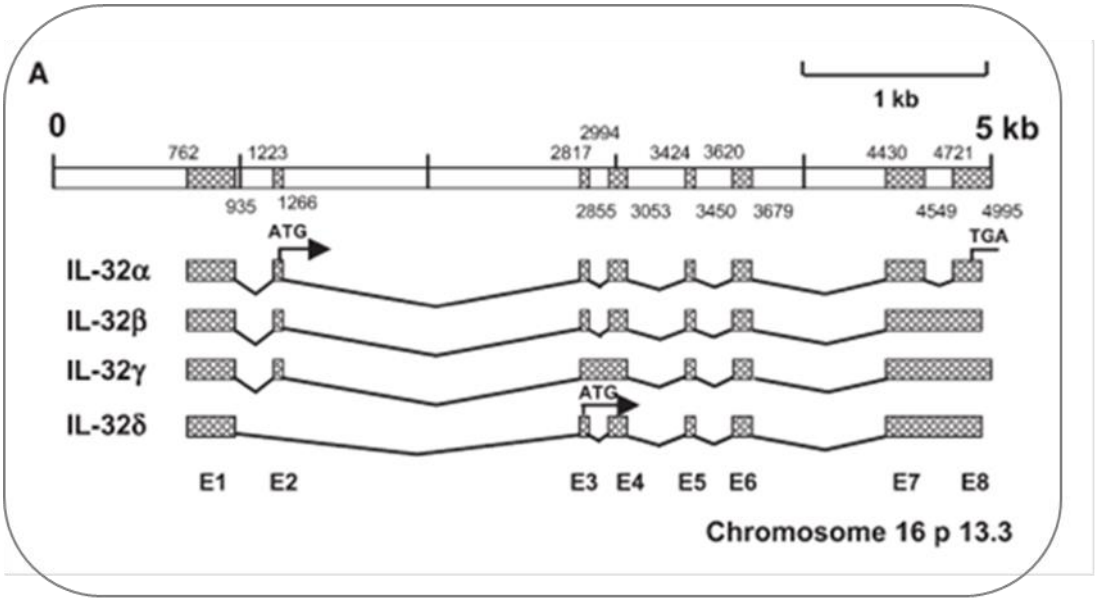


Abb. 4: IL-32 wird auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 (16p13.3.) kodiert.

Den vier bisher am besten charakterisierten Splice-Varianten (α-δ) fehlt das hydrophobe Signal-Peptid am N-Terminus. [Abb. aus Kim S-H, Han S-Y, Azam T, Interleukin-32: A Cytokine and Inducer of TNF-α, Immunity, 2005, 22, 131-142].

2.2 IL-32 und chronische Inflammation

Viele Aspekte der Funktionen und Signaltransduktionswege dieses proinflammatorisch wirksamen Zytokins müssen noch geklärt und nachvollzogen werden. Obwohl IL-32 keine Sequenzhomologien zu den bekannten übrigen Zytokinfamilien zeigt, wird es doch als Zytokin eingeordnet, da IL-32 die klassischen Zytokin-Signaltransduktionswege wie NF-κB und die p38 MAP-Kinase aktiviert und auf diese Weise weitere proinflammatorische

Zytokine wie TNF-α, IL-8 und MIP-2 induziert [Kim et al., 2005]. Bei diesen Zytokininduktionen handelt es sich allerdings nicht um einen unidirektionalen Weg, denn pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1β und IFN-γ induzieren wiederum die Expression von IL-32 in unterschiedlichen Zellen wie Epithelien, Monozyten und Makrophagen [Kim et al., 2005, Heinhuis et al., 2010]. Eine Überexpression von IL-32 wurde insbesondere bei Erkrankungen nachgewiesen, die durch eine chronische Entzündung gekennzeichnet. Einen Überblick liefert Tabelle 1.

Erkrankung	IL-32-exprimierende Zellen	exprimierte IL-32 Isoformen	Referenz
Rheumatoide Arthritis	Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten	IL-32 β,γ,δ	Joosten et al., 2006/ Dinarello et al., 2006/ Heinhuis et al., 2011
COPD	Makrophagen, Alveolarzellen, Flimmerepithel, $CD8^+$ T-Lymphozyten	IL-32 α,β,γ,δ	Calabrese et al., 2008
Atopische Dermatitis	Keratinozyten	IL-32 α,β,γ^{++},δ	Meyer et al., 2010
CED (M. Crohn/ C. ulcerosa)	Mukosa (Epithelzellen)	IL-32 α	Shioya et al., 2007
Chronisch-polypöse Rhinosinusitis	Epithelzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten	IL-32 α,β^{++},γ^{++},δ^{++}	Jeong et al., 2011/ Keswani et al., 2011
Allergische Rhinitis	Eosinophile Granulozyten, Mastzellen	IL-32 α^+,β,γ^{++},δ	Keswani et al., 2011
Myasthenia gravis	Serum	IL-32 α	Na et al., 2011
Chronische Pankreatitis	Duktales Epithel	IL-32 α,β,γ,δ	Nishida et al., 2009
Pankreaskarzinom	Zelllinien PANC-1, MIA PaCa-2, BxPC-3	IL-32 α,β,γ,δ	Nishida et al., 2009

Tab. 1: IL-32-exprimierende Zellen bei verschiedenen Erkrankungen

Kürzlich wurden bei der GPA eine erhöhte IL-32 mRNA-Konzentration in peripheren Blutleukozyten sowie erhöhte IL-32 Serum-konzentrationen im Vergleich zu normalen Kontrollen gemessen (Bae et al., 2012).

2.3 Interaktionen von IL-32 mit PR3

Novick et al. konnten 2006 zeigen, dass das Autoantigen der GPA, die in azurophilen Granula von Neutrophilen und in Monzyten exprimierte Proteinase 3 (PR3) (siehe Anhang), ein löslicher Rezeptor für IL-32α *in vitro* ist. PR3 spaltet IL-32α. Die bei diesem Prozess entstehenden IL-32α-Fragmente besitzen eine größere proinflammatorische Wirkung im Vergleich zum Ausgangssubstrat IL-32α. Weitergehende funktionelle Untersuchungen zeigten, dass die aus der Spaltung von IL-32α durch PR3 entstehenden Spaltpeptide mit 16 und 13 kDa Masse *in vitro* in menschlichen Monozyten eine vermehrte proinflammatorische MIP-2 und IL-8 Expression induzieren (Novick et al., 2005). Da die PR3 durch vermehrte Proteolyse IL-32 auch inaktivieren kann, kommt einer Spaltung von membran-gebundenen und somit auf zellulärer Ebene nur teilweise zugänglichem IL-32 mit Blick auf die proinflammatorische Wirkung eine besondere Bedeutung zu.

Weitere bekannte Bindungspartner der PR3 mit einer potentiell proinflammatorischen Funktion sind das β2-Integrin CD11b/CD18 [David et al., 2003], der in Neutrophilen häufig vorhandene Fc-Rezeptor FcγRIIIb (CD16) [David et al., 2005] sowie das NB1 Glykoprotein CD177 [Kantari et al., 2007]. Diese Rezeptoren konnten als GPI-verankerte Proteine auf PR3-positiven neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Untersuchungen mit konfokaler Immunfluoreszenz und Ko-Immunopräzipitationen dieser Proteine mit der PR3 legen ihre Beteiligung in der Aktivierung der Neutrophilen nahe. Ein weiterer Interaktionspartner der PR3 stellt der Protease-aktivierte-Rezeptor 2 (PAR-2) dar. Es konnte gezeigt werden, dass die PR3 durch Spaltung von PAR-2 eine Reifung dendritischer Zellen induziert [Csernok et al., 2006].

Ein spezifischer IL-32 Rezeptor ist noch nicht identifiziert worden.

2.4 IL-32 und Knochendestruktion

Eine die Patienten sehr beeinträchtigende Manifestation der GPA ist die Knochen-und Knorpeldestruktion des oberen Respirationstraktes mit über die Ausbildung einer Septumperforation und Sattelnasebildung weit hinausreichenden, komplizierenden Folgen. Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) wurde kürzlich gezeigt, dass IL-32 zusammen mit IL-17 an einem Receptor Activator of NF-κB Ligand (RANKL)-unabhängigen Mechanismus des Knochenabbaus beteiligt ist [Moon et al., 2012].

In dieser Studie waren im Gewebe eines Mausmodells (type-II collagen-induced arthritis (CIA)) Osteoklastenmarker wie Calcitonin, Cathepsin K und Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) nach Inkubation mit IL-32 und IL-17 gegenüber Stimulation mit RANKL hochreguliert. Darüber hinaus wurde eine Induktion der IL-17-Produktion in humanen $CD4^+$-T-Lymphozyten durch IL-32 sowie eine Induktion der IL-32-Expression in humanen Fibroblasten-ähnlichen Synovialzellen von Patienten mit RA durch Inkubation

mit IL-17 nachgewiesen. Die Autoren folgerten daraus, dass beide Zytokine einem reziproken Einfluss untereinander unterliegen und über Fibroblasten-ähnliche Synoviozyten einen RANKL-unabhängigen Knochenabbau bei der RA induzieren. Außerdem ist IL-32 *in vitro* ein potenter Induktor der Osteoklastendifferenzierung aus $CD14^+$ Monozyten in Gegenwart von RANKL [Kim et al., 2010]. Die Rolle von IL-32 bei der nasalen Knochendestruktion bei der GPA wurde bisher nicht untersucht.

3. Interleukin-10 und Interleukin-17 – Regulatoren der Inflammation

IL-10 ist ein 37 kDa Protein, welches aus zwei 18.5 kDa Homodimeren aufgebaut wird. [Fiorentino et al., 1991]. In weiteren Arbeiten wurde IL-10 als Modulator der Th1- und Th2-Antwort beschrieben, wobei IL-10 die Th2-Antwort verstärkt. Dem IL-10 kommt dabei ein auf proinflammatorische Prozesse supprimierend wirkender Effekt zu. So konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Makrophagenaktivierung durch Inhibition der Produktion von Interferon-γ, IL-2, IL-12, IL-18 und TNF-α supprimiert [Moore et al., 2001]. Ebenso zeigten Moore et al., dass IL-10 die Inflammation reduziert, indem es autokrin auf Antigen-präsentierende Zellen (APC) wirkt und die APC-vermittelte T-Zellaktivierung vermindert. Als zelluläre Quelle des IL-10 konnten vor allem Makrophagen und Monozyten, dendritische Zellen, $CD4^+$-Lymphozyten und regulatorische T-Zellen identifiziert werden. Der lokalen Induktion von regulatorischen T-Zellen durch IL-10 kommt insbesondere bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Bedeutung zu. So entwickeln IL-10-defiziente Mäuse u.a. eine schwere Colitis [Kuhn et al., 1993]. Eine Dysbalance von IL-10 scheint auch in der Darmmukosa bei M. Crohn zu bestehen. Hierbei besteht eine negative Korrelation des proinflammatorischen IL-17 mit dem antiinflammatorischen IL-10 [Wilke et al., 2011]. Auch in Zusammenhang mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden scheint ein Mangel oder eine gestörte Funktion des IL-10 eine Proinflammation zu begünstigen. So wird eine erniedrigte IL-10-Produktion während der Remissionsphase als Prädiktor für einen „Relaps“ der GPA angesehen [Hruskova et al., 2009]. Cao et al. (2012) konnten zeigen, dass in Leukozyten von GPA-Patienten mit einem *gain-of-function*-Polymorphismus des *Protein-Tyrosin-Phosphatase-non-Rezeptors 22 (PTPN22)* Gens die IL-10 mRNA-Expression herunterreguliert ist. Dieser *PTPN22 620W* Polymorphismus ist ein genetischer Risikofaktor für die GPA [Jagiello et al., 2005]. Zusammenhänge zwischen der IL-10- und IL-32-Expression bei der GPA wurden bisher nicht untersucht.

Die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-17, dessen IL-17-Rezeptor nahezu ubiquitär exprimiert ist [Yao et al., 1997], ist auf einer Vielzahl von Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden und bei der rheumatoiden Arthritis (RA) nachgewiesen [Hueber et al., 2010]. So sind vor allem $CD4^+$ T-Lymphozyten, Mastzellen, neutrophile Granulozyten, und Makrophagen als $IL\text{-}17^+$ Zellen beschrieben.

Es konnte auch gezeigt werden, dass ANCA unmittelbar *in vitro* die Expression von IL-17 in aktivierten neutrophilen Granulozyten induzieren [Hoshino et al., 2008]. Ebenso wie IL-32 induziert IL-17 die Sekretion von TNF-α und IL-1. Dabei hat IL-17 additive und synergistische Effekte auf TNF-α. So verstärkt IL-17 die TNF-α induzierte Expression von IL-1, IL-6 und IL-8 in Fibroblasten der Synovia bei RA und führt dort zu gesteigerter Gewebszerstörung [Katz et al., 2001]. Insbesondere fördert IL-17 hier auch den Knochenabbau über die Induktion von Matrix-Metalloproteasen [Kotake et al., 1999, Lubberts et al., 2003]. Eine Korrelation der IL-17-Expression im Gewebe der GPA mit der IL-32-Expression erscheint insbesondere auch deshalb von Interesse, da ein Teil der IL-17 Signaltransduktion TNF-α unabhängig ist [Koenders et al., 2006]. Studien, welche bei RA Fibroblasten-ähnliche Synovialzellen, $CD4^+$-T-Lymphozyten oder dendritische Zellen verwendeten, wiesen eine ausgeprägte gegenseitige Induktion von IL-32 und TNF-α nach, so dass der Begriff einer autoinflammatorischen TNF-α/IL-32/TNF-α-Schleife geprägt wurde [Heinhuis et al., 2011]. Außerdem wurden Überschneidungen bei den Signaltransduktionswege der beiden bei der Entzündung der ANCA-assoziierten Vaskulitiden beschriebenen Zytokine IL-17 und IL-32, wie z. B. der Transkriptions-koaktivator p300 (EP300) und eine Proteinkinase (death-associated protein kinase-1), identifiziert [Turner-Brannen et al., 2011].

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der mRNA- und Proteinexpression des pro-inflammatorischen und pro-apoptotischen Interleukins IL-32 in Nasenschleimhautgewebe bei der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA). Insbesondere soll mittels Ko-Expressionsanalysen zwischen verschiedenen IL-32-exprimierenden Zelltypen differenziert werden. Außerdem soll die Ko-Expression von IL-32 mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-17 und dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 untersucht werden, um den Einfluss entzündungsamplifizierender und –regulierender Mechanismen in der nasalen Mukosa bei der GPA darzustellen. Als geschlechts- und altersadaptierte Kontrollen werden Nasenschleimhautgewebe von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis (CRS) verwendet. Diese Krankheitskontrolle repräsentiert einen permanent-entzündlichen Zustand der nasalen Mukosa, ohne die histomorphologischen Charakteristika der GPA, wodurch eine Beurteilung des Einflusses histomorphologischer Merkmale möglich wird. Spezielles Interesse gilt außerdem der Kolokalisation von IL-32α mit dem IL32α-spaltenden und die Entzündungsreaktion durch die Generierung von IL-32α-Spaltprodukte verstärkenden Autoantigen der GPA, Proteinase 3 (PR3). Im Einzelnen werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

• Nachweis von IL-32 mRNA (α- und nicht-α Isoformen) im Nasenschleimhautgewebe der GPA mittels RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR.

• Analyse der IL-32–Expression in der nasalen Mukosa bei GPA im Hinblick auf den Typ der IL-32-produzierenden Zellen (T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten) einschließlich der Charakterisierung des histomorphologischen Verteilungsmusters mittels Immunhistochemie und semi-quantitativer Auswertung.

• Analyse der IL-10- und der IL-17A-Expression in Nasenschleimhautgewebe bei GPA, einschließlich der Frage nach einem Zusammenhang mit der IL-32-Expression mittels Immunhistochemie und semi-quantitativer Auswertung.

• Nachweis der α-Isoform von IL-32 mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie, um herauszufinden, ob die Voraussetzung einer Kolokalisation für die von Novick et al. (2006) postulierte Interaktion zwischen IL-32α und dem Autoantigen der GPA, PR3, in der granulomatösen Entzündung gegeben ist

Außerdem soll diese Untersuchung die Frage beantworten helfen, ob und welchen Beitrag (z.B. in Analogie zur rheumatoiden Arthritis) IL-32 für die Entstehung und/oder Aufrechterhaltung der granulomatösen Entzündung inklusive einer möglichen Beteiligung an der Knochendestruktion bei der GPA leistet.

Patienten, Material und Methoden

1. Patienten und Kontrollen

Für Immunhistochemie/Immunfluoreszenz:

GPA-Patienten (n=10) davon 3 im generalisierten Stadium und 7 im lokalisierten Stadium entsprechend der EUVAS-Kriterien (nach Hellmich et al., 2007), alle befundet durch das Referenzzentrum für Vaskulitis-Diagnostik am Institut für Pathologie Universitätsklinikum Schleswig Holstein (UKSH).

CRS (n=10), alle durch das Institut für Pathologie des UKSH Campus Lübeck pathologisch-anatomisch begutachtet, alle sind gering bis hochgradig chronische, polypöse Sinusitiden, Altersmedian = 45 (Spannweite von 12 bis 80 Jahren), Geschlechterverhältnis Männer : Frauen = 1:1. (Vergleiche Tab. 2, S 18)

Für PCR-Analysen:

Nasales Gewebe (gefriergetrocknet) von 3 Patienten mit CRS. Diagnose und Probeentnahme erfolgte in der HNO-Abteilung, UKSH Campus Kiel.

Gewebe (gefriergetrocknet) von 3 Patienten mit GPA. Diagnose und Probeentnahme erfolgte in der HNO-Abteilung, UKSH Campus Kiel.

Tab. 2: Patientencharakteristika, deren Gewebe für die Untersuchungen genutzt wurde.

E = Beteiligung des oberen respiratorischen Traktes, L = Lungenbeteiligung, B = B-Symptomatik, A = rheumatische Beschwerden, Ey = Augenbeteiligung, C = Beteiligung des zentralen Nervensystems, K = Nierenbeteiligung, n.b.: nicht bekannt. Cyc = Cyclophosphamid, GC = Glucokortikoide, BVAS = Birmingham Vasculitis Activity Score (siehe Anhang Tab. 14), DEI = Disease Extent Index (siehe Anhang Tab.13).

Patient	Alter/ Geschlecht	Organ-Manifestation [DEI]	Krankheits-Dauer (Monate)	cANCA-Titer	Behandlung	Histologie: Granulomatose/ Nekrose/ Vaskulitis	BVAS V3.0
GPA1	35/m	E,L,B,Leber [8]	132	1:128	Cyc	**+/+/+**	**n.b.**
GPA2	43/m	E,A,B [6]	1	1:280	keine	**+/+/+**	**8**
GPA3	19/w	E,B [4]	72	negativ	keine	**+/+/-**	**2**
GPA4	69/w	E,B [4]	7	negativ	keine	**+/+/-**	**6**
GPA5	53/m	E,Ey [4]	240	negativ	keine	**+/+/-**	**6**
GPA6	39/w	E,Ey,C [6]	n.b.	1:80	keine	**+/+/+**	**n.b.**
GPA7	24/w	E [2]	24	1:80	GC	**+/+/-**	**2**
GPA8	66/m	n.b. [n.b.]	n.b.	n.b.	n.b.	**+/+/+**	**n.b.**
GPA9	49/m	E,A,B [6]	1	n.b.	keine	**+/+/-**	**6**
GPA10	51/w	E,Ey,K [6]	0	1:1280	keine	**+/+/+**	**n.b.**

Bei der Gewebeauswahl wurde darauf geachtet, dass die histomorphologischen GPA-Merkmale der Granulom- und Nekroseformation in allen Schnitten vorliegen. Die Mehrzahl der Patienten war zum Zeitpunkt der Biopsie nicht therapiert. Sämtliche Patienten stimmten der Gewebeverwendung zu Forschungszwecken zu. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck bewilligt (Aktenzeichen 07-058).

Tab. 3: Mittleres Alter, Organbeteiligung und durchschnittliche Krankheitsaktivität nach BVAS ½ und DEI der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie

	GPA-Patienten (n = 10)
Mittleres Alter	44,8±5,2
Geschlechterverhältnis (Männer:Frauen)	1:1
E (oberer Respirationstrakt)	10
Ey (Augenbeteiligung)	3
B (B-Symptomatik)	5
A (Rheumatische Symptome)	2
K (Nierenbeteiligung)	1
L (Lungenbeteiligung)	1
C (ZNS-Beteiligung)	1
Krankheitsaktivität (Median BVAS V3.0)	6 (Spannweite: 0-8)
Krankheitsausdehnung (Median DEI)	5 (Spannweite: 2-8)

2. Reagenzien und Hilfsmittel

2.1 Geräte

Analysenwaage, Sartorius, Göttingen
CFX-Connect Real-Time System, BioRad, CA, USA
Drehschüttler, R-01, Hassa, Lübeck
Eppendorf Thermomixer 5436, Hamburg
Feuchte Dunkelkammer, Zytomed, Berlin
Gefrierschrank (-20°C), Bosch, Stuttgart
Gefrierschrank (-80°C), Nuaire, Plymouth, MN/USA
Kühlschrank (4°C), Bosch, Stuttgart
Kühlzentrifuge, Hettich, Tuttlingen
Mikropipetten (0,5-10 µl, 10-100 ml, 20-250 µl, 100-1000 ml), Eppendorf, Hamburg

Mikroskope:
Konfokales Laserscanning-Mikroskop LSM 510 META, Zeiss, Jena
Olympus CK2, Olympus, Hamburg
Mikrowelle, Panasonic, Hamburg
pH-Meter, WTW, Weilheim
Pipettierhilfe, accu-jet pro, Brand, Wertheim
Rüttler Vortex, Vortexer REAX 2000, Heidolph, Kelheim
Sterile Werkbank Nuaire Class 2 Type A/B3, Plymouth, USA
Slide Scanner Mirax Midi, Zeiss, Jena
Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge R 1.0R, Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterial

Bechergläser, Schott, Mainz
Einmalhandschuhe, Ansell, Belgien
Einweg-Pasteurpipetten, Brand, Wertheim
Einwegstabpipetten, steril (10 ml, 25 ml), Sarstedt, Nümbrecht
Einwegpipettenspitzen (10, 100, 1000 µl) Sarstedt, Nürnbrecht
Erlenmeyerkolben, Schott, Mainz
Objektträger, Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm ^{R} M, Brandt, Wertheim
Steriles Einmalskalpell, Megro, Wesel

2.3 Chemikalien, Reagenzien, Lösungen

AEC: 3-Amino-9-Ethylcarbazol, Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose ultrapureR, Invitrogen, Darmstadt
Aceton, Merck, Darmstadt
AquatexR-Eindeckmedium, Merck, Darmstadt
Borsäure, Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat [C6H8O7 * H20] Sigma-Aldrich, Steinheim
DAKO Antibody diluent, DAKO, Hamburg
DePexR Eindeckmedium, Biophoretics, Serva
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Sigma-Aldrich, Steinheim
Fast EnzymeR-Antigendemaskierungslösung, Zytomed, Berlin
FaramountR-Eindeckmedium, DAKO, Hamburg
GelRedR10000x, Biotium, Hayward, CA, USA
Hämatoxylin, Merck, Darmstadt

Humanserum, PAA, Pasching/Österreich
100 bp, DNA-Leiter, BioLabs, Ipswich, MA, USA
Image-iT FXR Signalverstärker, Invitrogen, Darmstadt
MOPS (3-N-Morpholino-propansulfonsäure), Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd 3%, Sigma-Aldrich, Steinheim
Peroxidaseblocklösung, DAKO, Hamburg
PBS (Phosphat-gepufferte Saline), Biochrom, Berlin
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat [$C_6H_5Na_3O_7 * H_2O$], Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchloridlösung (NaCl), Merck, Darmstadt
TBS (trisgepufferte Salzlösung, pH 7,6), selbst angesetzt:
10xTBS (pH 7,5): 12,1 g Tris + 87,8 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest. mit HCl auf pH 7,5 eingestellt.
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan), Merck, Darmstadt
VECTASHIELDR Eindeckmedium, 1,5 µg/ml, Vector Laboratories, Birlngame, USA
Zitratpuffer (pH 6,0):
0,1 M/L Citronensäure-Monohydrat mit 0,1 M/L Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad Aqua dest.

2.4 Immunhistochemie-Kits-Materialien

EnVisionTM G2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) K5361, DAKO, Glostrup, Dänemark:

- Endogene Enzymblockierungslösung
- Polymer/HRP (horse radish peroxidase)
- DAB+ (3,3´Diaminobenzidin) Substratpuffer
- DAB+ Chromogen
- “Doublestain Block” Blockierungslösung
- „Rabbit/Mouse (Link)“ Sekundäre Antikörper gegen Kaninchen- und Mausimmunglobuline
- „Polymer/AP“ Alkalische Phosphatase und mit affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugiertes Dextranpolymer
- Permanent Red Substratpuffer
- Permanent Red Chromogen-Lösung

2.4 (Primär-)Antikörper für Immunhistochemie

Tab. 4

Antikörper	Isotyp	Klon	Epitop	Konzentration	Quelle
IL-32 (α,β,γ,δ)	Kaninchen IgG	polyklonal	16 Aminosäuren im Zentrum von IL-32	5 µg/ml	Novus Biologicals
IL-32 (α,β,γ)	Ziege IgG	polyklonal	unbekannt	8 µg/ml	R&D Systems
IL-32 (β,γ,δ)	Kaninchen IgG	polyklonal	15 Aminosäuren am Carboxy-Terminus von IL-32	10 µg/ml	Novus Biologicals
IL-32 (α,β,γ,δ)	Maus IgG	KU32-52	Rekombinantes humanes IL32	18 µg/ml	Biolegend
IL-32 (α,β,δ)	Maus IgG	KU32-56	Rekombinantes humanes IL32	18 µg/ml	Biolegend
IL-32 (α,β,γ,δ)	Maus IgG	KU32-09	Rekombinantes humanes IL32	5 µg/ml	Biolegend
CD 68	Maus IgG	PGM1	Rekombinantes humanes CD68	0,8 µg/ml	DAKO
Vimentin	Maus IgG	Vim 3B4	Rekombinantes humanes Vimentin	5 µg/ml	DAKO
CD 4	Maus IgG	4B12	Rekombinantes humanes CD4	unverdünnt	Biogenex
IL-10	Ratte IgG	JES3-9D7	Rekombinantes humanes IL-10	5 µg/ml	BD Pharmingen

2.5 (Sekundär-)Antikörper für Immunhistochemie

Tab. 5

Produkt-Nr.	Isotyp	Konjugation	Dilution	Quelle
115-035-062	Ziege-anti-Maus IgG	POX	1:500	Dianova
305-035-045	Kaninchen-anti-Ziege IgG	POX	1:500	Dianova

2.6 Antikörper für Immunfluoreszenz

Polyklonale Primärantikörper:

Tab. 6

	Istotyp	Konzentration	Quelle	Reaktivität
IL-32 (β,γ,δ)	Kaninchen IgG	10 µg/ml	Novus Biolog.	unspezififsch

Monoklonale Primärantikörper:

Tab. 7

Monoklonal anti-human	Quelle	Isotyp	Klon	Konzentration
IL-32α	R&D	Ratte	373812	10µg/ml
CD66b	Biolegend	Maus IgMkappa	G10F5	2,5µg/ml
CD4	Biogenex	Maus	4B12	*unverdünnt*
PR3	E. Csernok (Bad Bramstedt)	Maus IgG	WGM2	10 µg/ml

Sekundärantikörper:

Tab. 8

Antikörper	Quelle	Exzitation	Emission	Konzentration
Goat Anti-Mouse IgG, DyLight 488	Thermo Scintific	493+/-4nm	518+/-4nm	1µg/ml
Donkey Anti-Mouse NL493	R&D	493nm	514nm	5µg/ml
Donkey Anti-Rabbit DyLight 594	Dianova	591nm	616nm	2,5µg/ml
Chicken-Anti-Goat AF488	Invitrogen	495nm	519nm	5µg/ml
Donkey-Anti-Mouse NL557	R&D	557nm	574nm	5mg/ml
Mouse IgG-FITC	BD Pharmingen	493nm	514nm	1,25µg/ml
Goat-Anti-Rat AF546	Invitrogen	556nm	573nm	5µg/ml
Kaninchen-Anti-Rat-Texas Red	Dianova	596nm	620nm	5mg/ml

2.7 RNA-Isolierung – Trizol-Chloroform-Methode: Materialien

- Trizol-Reagenz (Phenol, Guanidin-Isothiocyanat), Fa. Invitrogen, Kalifornien, USA
- Chloroform, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Isopropanol, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- 75% Ethanol, Fa. ChemSolute,
- „RNAlater“ RNA Stabilisierungsreagenz zur Lagerung in -80 C° Gerfriertruhe, Fa. Quiagen, Kalifornien, USA

2.8 Enzymatische Spaltung genomischer DNA in RNA-Proben

- DNase 1 – Kit, Fa. Roche, Grenzach-Wylhen, Deutschland
- EDTA 0,2 M/L: 5,84 g EDTA in 100 ml nukleasefreiem Aqua dest., Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Nukleasefreies Aqua dest.

2.9 SuperScript^{TM} 3-Reverse-Transkriptase-Materialien – cDNA-Erststrangsynthese

- SuperScript 3 Reverse Transkriptase (200U/µl), Fa. Invitrogen, Kalifornien, USA
- 5x Erst-Strang-Puffer (250mM Tris-HCL, pH=8,3, 375mM KCL, 15mM $MgCl_2$), Fa. Invitrogen, Kalifornien, USA
- 0,1 M Dithiotreitol (DTT), Fa. Invitrogen, Kalifornien, USA
- RNaseOut Recombinant 40 U/µl, Fa. Invitrogen, Kalifornien, USA
- 10 mM dNTP Mix, Fa. Invitrogen, Kalifornien, USA
- Random Primers 1:10 Verdünnung, Fa. Invitrogen, Kalifornien, USA
- Wasser (RNasefrei), Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland

2.10 PCR-Ansätze

<u>Interleukin-32 Primer, (Fa. Life Technologies, Karlsruhe, BRD):</u>

- IL-32 outer sense: 5´-GTC CCG GAT GTT GAG GAT CCC GCA A-3´ (nt 476-500)
- IL-32 outer antisense: 5´-CGC GGT GAC GGG GAG GGC AA-3´ (nt 644-625)
- IL-32 inner sense: 5´-AGC CTG GGG AGA GCT TTT GTG ACA AG-3´ (nt 507-532)
- IL-32 inner antisense : 5´-TGA GGA TTG GGG TTC AGA GCA CTT CT-3´ (nt 601-576)

<u>GAPDH Primer, (Fa. Life Technologies, Karlsruhe, BRD):</u>

- GAPDH sense: 5´-TCT GCC CCC TCT GCT GAT GCC CCC-3´
- GAPDH antisense: 5´-CCA TCA CGC CAC AGT TTC CCG GAG-3´

- 10x PCR-Puffer (200mM Tris-HCl, pH=8,4, 500mM KCl)
- $MgCl_2$
- 10mM dNTP Mix
- Taq DNA Polymerase (5U/µl)
- cDNA aus der Erstrang-Reaktion
- Autoklaviertes, destilliertes Wasser

3. Methodik

3.1 Immunhistochemie

Es erfolgte zur Vorbereitung der IL-32-Doppelfärbungen die Testung mehrerer mono- und polyklonaler IL-32-Antikörper. Es wurden zunächst die unter „Immunhistochemieantikörper“ genannten kommerziell erwerblichen IL-32-Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen, Inkubationszeiten und mit unterschiedlichen Antigendemaskierungen getestet. Hierbei zeigte der polyklonale Kaninchen-anti-human IL-32-Antikörper der Firma Novus Biologicals, welcher 16 Aminosäuren im Zentrum von IL-32 erkennt, die besten Ergebnisse im Sinne spezifischer Anfärbung, so dass er in allen weiteren IL-32-Doppelfärbungen Verwendung findet. Ein weiterer IL-32-Antikörper (ebenfalls Kaninchen-anti-human-IL32 der Fa. Novus Biologicals), welcher 15 Aminosäuren am Carboxy-Terminus von IL-32 erkennt, wurde noch während der Testungsphase vom Hersteller auf Grund unspezifischer Bindungen vom Markt genommen. Eine Unterscheidung der einzelnen IL-32-Isoformen gelingt mit den derzeit zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht.

3.1.1 IL-32(Peroxidase)einzelfärbungen

Nach Entparaffinierung in Xylol und in einer absteigenden Konzentrationsreihe von Aceton erfolgt die Antigendemaskierung mittels 45-minütigem Kochen in Zitratpuffer (pH 6,0). Die Blockung endogener Peroxidasen/Phosphatasen geschieht in 5-minütiger Inkubation mit 3%-igem Wasserstoffperoxid in Methanol (75 µ + 125 µml Ziegenserum + 2,3 ml 1 X TBS. Nach Waschen in TBS-Puffer erfolgt die Inkubation für 90 Minuten mit dem ersten Primärantikörper (anti-IL-32, Maus-anti-human, Biolegend) bzw. Maus-Universal-Negativkontrolle in einer feuchten Kammer. Die Schnitte werden im Anschluss in TBS-Puffer gewaschen und 5 Minuten darin stehen gelassen. Nun erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-IgG, Peroxidase-konjugiert, Dianova, 1:500)und Antibody Diluent für 30 Minuten. Anschließend nach erneutem Waschen in TBS-Puffer wird zur Entwicklung 10 Minuten AEC (DAKO, K 3469) hinzugefügt. Nach Spülen in Aqua dest. erfolgt die 2-minütige Inkubation in Hämalaun und

das Nachbläuen in TBS-Puffer. Abschließend erfolgen die Versiegelung mit Faramount (DAKO, Hamburg) und die mikroskopische Auswertung.

3.1.2 IL-32-Alkalische Phosphatase (AP-) Einzelfärbung

Das in Paraffin eingebettete Gewebe der genannten GPA-Patienten bzw. Kontrollgewebe von Patienten mit chronischer Sinusitis wurde auf Schnitte mit einer Dicke von 2-3 µm zugeschnitten und anschließend auf Superfrost-Objektträger aufgebracht.
Im ersten Schritt erfolgt die Entparaffinierung mittels Xylol und einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol. Zur Antigendemaskierung mit dem Ziel einer besseren Antikörperbindung zeigt sich das Kochen der Gewebeschnitte in der Mikrowelle für 15 Minuten bei 700 Watt in Zitratpuffer (pH 6,0) als gut geeignet. Anschließend gründliches Waschen der Schnitte mit TBS-Puffer. Die Blockierung potentiell vorhandener endogener Aktivität von alkalischer Phosphatase, Peroxidase und Pseudoperoxidase geschieht fünf Minuten mit dem „Dual Endogenous Enzyme Block“ (EnVisionTM G2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) K5361, DAKO, Glostrup, Dänemark). Erneut vorsichtiges Waschen und fünf Minuten ruhen lassen in TBS-Puffer. Anschließend Inkubation für 45 Minuten mit dem polyklonalen Kaninchen-anti-human-Antikörper gegen IL-32 (1000 µg/ml, 1:200 verdünnt, Fa. Novus Biologicals) bzw. mit der Kaninchen universal Negativkontrolle. Nach Waschen mit TBS-Puffer erfolgt das 10-minütige Inkubieren mit dem Kaninchen/Maus-Link (EnVision^{TM} G2 Doublestain System). Anschließend inkubieren nach erneutem TBS-Waschen für 15 Minuten mit dem Polymer/Alkalische Phosphatase-Konjugat und Visualisierung der Bindung mittels 10-minütiger Inkubation mit Permanent Red Substrat (100 Teile Permanent Red Substratpuffer + 1 Teil Permanent Red Chromogen, EnVision^{TM} G2 Doublestain System). Abschließend erfolgt die Kernfärbung mit frisch filtriertem Hämatoxylin (Merck, Darmstadt) und Eindecken der Schnitte mit Aquatex (Merck, Darmstadt).

Die hier beschriebene IL-32-Färbung erfolgt ebenso in den Doppelfärbungen, so dass im Folgenden lediglich auf die Färbung der Zellmarker CD68, Vimentin und CD4 in der IL-32-Doppelfärbung eingegangen wird.

3.1.3 Doppelfärbung für CD68 und IL-32

Die Doppelfärbungen werden mit dem EnVision^{TM} G2 Doublestain System der Fa. DAKO durchgeführt. Einem Verfahren zur sequentiellen Doppelfärbung von zwei Antigenen, welches das erste Antigen mit HRP(horse radish peroxidase)/DAB+(Diaminobenzidin) und das zweite Antigen mit AP(Alkalischer Phosphatase)/Permanent Red sichtbar macht.

Nach Entparaffinierung in Xylol und in einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol erfolgt die Antigendemaskierung mittels 15-minütigem Kochen in Zitratpuffer

(pH 6,0). Die Blockung endogener Peroxidasen/Phosphatasen geschieht in 5-minütiger Inkubation mit dem Dual Endogenous Block^{R} (DAKO). Nach Waschen in TBS-Puffer erfolgt die Inkubation für 45 Minuten mit dem ersten Primärantikörper (anti-CD 68, Maus-anti-human, Klon: PGM1, DAKO) bzw. Maus-Universal-Negativkontrolle in einer feuchten Kammer. Die Schnitte werden im Anschluss in TBS-Puffer gewaschen und 5 Minuten darin stehen gelassen. Nun erfolgt die Inkubation mit Meerrettichperoxidase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugiertem Dextranpolymer (Polymer/HRP, Fa. DAKO) für 15 Minuten. Anschließend nach erneutem Waschen in TBS-Puffer wird als Farbstoff bildendes Substrat Diamonibenzidin für 10 Minuten hinzugefügt. Hiermit schließt die erste Antigenfärbung in der DAB+-Reaktion mit einer braunen Färbung des CD 68 ab. Zur weiteren Doppelfärbung wird die Rest-Enzymaktivität mit gebrauchsfertiger Blockierungslösung (Doublestain-Block, Fa. DAKO) mittels 3-minütiger Inkubation geblockt. Nachdem in TBS-Puffer gewaschen wurde, wird der Antikörper gegen IL-32 (polyklonaler anti-IL32, Kaninchen-anti-human, Novus Biologicals) bzw. die Kaninchen-Universal-Negativkontrolle auf die Gewebe pipettiert und für 45 Minuten inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte vom Inkubieren mit dem Kaninchen-Maus-Link, dem Binden des 2. Konjugats (Polymer/AP) bis zur Entwicklung der Permanent Red-Reaktion und Hematoxylinkernfärbung werden wie bei der IL-32-Einzelfärbung vollzogen. Abschließend erfolgen die Versiegelung mit Aquatex (Merck, Darmstadt) und die mikroskopische Auswertung.

3.1.4 Doppelfärbung für Vimentin und IL-32

Nach Entparaffinierung in Xylol und in einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol erfolgt die Antigendemaskierung mittels 15-minütigem Kochen in Zitratpuffer (pH 6,0). Die Blockung endogener Peroxidasen/Phosphatasen geschieht in 5-minütiger Inkubation mit dem Dual Endogenous BlockR (DAKO). Nach Waschen in TBS-Puffer erfolgt die Inkubation für 30 Minuten mit dem ersten Primärantikörper (anti-Vimentin, Maus-anti-human, Klon: Vim 3B4, DAKO) bzw. Maus-Universal-Negativkontrolle in einer feuchten Kammer. Die Schnitte werden im Anschluss in TBS-Puffer gewaschen und 5 Minuten darin stehen gelassen. Nun erfolgt die Inkubation mit Meerrettichperoxidase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugiertem Dextranpolymer (Polymer/HRP, Fa. DAKO) für 15 Minuten. Anschließend nach erneutem Waschen in TBS-Puffer wird als Farbstoff bildendes Substrat Diamonibenzidin für 10 Minuten hinzugefügt. Hiermit schließt die erste Antigenfärbung in der DAB+-Reaktion mit einer braunen Färbung des Vimentin ab. Zur weiteren Doppelfärbung wird die Rest-Enzymaktivität mit gebrauchsfertiger Blockierungslösung (Doublestain-Block, Fa. DAKO) mittels 3-minütiger Inkubation geblockt. Nachdem in TBS-Puffer gewaschen wurde, wird der Antikörper gegen IL-32 (polyklonaler anti-IL32, Kaninchen-anti-human, Novus Biologicals) bzw. die Kaninchen-

Universal-Negativkontrolle auf die Gewebe pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte vom Inkubieren mit dem Kaninchen-Maus-Link, dem Binden des 2. Konjugats (Polymer/AP) bis zur Entwicklung der Permanent Red-Reaktion und Hematoxylinkernfärbung werden wie bei der IL-32-Einzelfärbung vollzogen. Abschließend erfolgen die Versiegelung mit Aquatex (Merck, Darmstadt) und die mikroskopische Auswertung.

3.1.5 Doppelfärbung für CD4 und IL-32

Nach Entparaffinierung in Xylol und in einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol erfolgt die Antigendemaskierung mittels 15-minütigem Kochen in Zitratpuffer (pH 6,0). Die Blockung endogener Peroxidasen/Phosphatasen geschieht in 5-minütiger Inkubation mit dem Dual Endogenous Block^{R} (DAKO). Nach Waschen in TBS-Puffer erfolgt die Inkubation für 45 Minuten mit dem ersten Primärantikörper (anti-CD4, Maus-anti-human, Klon: 4B12, Biogenex) bzw. Maus-Universal-Negativkontrolle in einer feuchten Kammer. Die Schnitte werden im Anschluss in TBS-Puffer gewaschen und 5 Minuten darin stehen gelassen. Nun erfolgt die Inkubation mit Meerrettichperoxidase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugiertem Dextranpolymer (Polymer/HRP, Fa. DAKO) für 15 Minuten. Anschließend nach erneutem Waschen in TBS-Puffer wird als Farbstoff bildendes Substrat Diaminobenzidin für 10 Minuten hinzugefügt. Hiermit schließt die erste Antigenfärbung in der DAB^{+}-Reaktion mit einer braunen Färbung des CD4 ab. Zur weiteren Doppelfärbung wird die Rest-Enzymaktivität mit gebrauchsfertiger Blockierungslösung (Doublestain-Block, Fa. DAKO) mittels 3-minütiger Inkubation geblockt. Nachdem in TBS-Puffer gewaschen wurde, wird der Antikörper gegen IL-32 (polyklonaler anti-IL32, Kaninchen-anti-human, Novus Biologicals) bzw. die Kaninchen-Universal-Negativkontrolle auf die Gewebe pipettiert und für 45 Minuten inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte vom Inkubieren mit dem Kaninchen-Maus-Link, dem Binden des 2. Konjugats (Polymer/AP) bis zur Entwicklung der Permanent Red-Reaktion und Hematoxylinkernfärbung werden wie bei der IL-32-Einzelfärbung vollzogen. Abschließend erfolgen die Versiegelung mit Aquatex (Merck, Darmstadt) und die mikroskopische Auswertung.

3.1.6 CD68 Einzelfärbung

Mit dem Ziel eines semiquantitativen Vergleichs der CD68-Expression zwischen GPA- und CRS-Geweben werden CD68-Einzelfärbungen durchgeführt. Es wird eine Peroxidasefärbung auf Paraffinschnitten verwendet. Im ersten Schritt erfolgt die Entparaffinierung mittels Xylol und in einer absteigenden Konzentrationsreihe von Aceton.

Die Antigendemaskierung geschieht durch 15-minütiges Kochen in Zitronensäuremonohydrat-Puffer (pH=6.0). Nach Waschen in TBS-Puffer, Blockierung der endogenen Peroxidase mit Peroxidaseblocklösung der Fa. DAKO für 10 Minuten und Inkubation mit dem Proteinblock (DAKO) wird für 60 Minuten mit dem anti-CD 68 Primärantikörper (Klon: PGM 1, DAKO) in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss an erneutes Waschen in TBS-Puffer wird mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-IgG, POX-konjugiert, DIANOVA) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird mit TBS gewaschen und mit AEC (DAKO) 10 Minuten die braune Farbreaktion entwickelt. Die Kernfärbung geschieht mit Hematoxylin. Die abschließende Versiegelung der Schnitte wird durch Eindecken mit Faramount-Eindeckmedium (DAKO) vollzogen.

3.1.7 Vimentin-Einzelfärbung

Zur semiquantitativen Evaluation einer signifikant unterschiedlichen Fibroblastenzahl in GPA- und CRS-Gewebe wird eine Vimentineinzelfärbung mittels Peroxidasefärbung auf Paraffingewebe vorgenommen. Nach Entparaffinierung mittels Xylol und in einer absteigenden Konzentrationsreihe von Aceton erfolgt die Antigendemaskierung durch 15-minütiges Kochen in Zitronensäuremonohydrat-Puffer (pH = 6,0). Im Anschluss wird in TBS-Puffer gewaschen, die endogenen Peroxidasen mit Peroxidasblocklösung der Fa. DAKO blockiert (10 Minuten) und mit Proteinblock (DAKO) 10 Minuten inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-Vimentin, Klon Vim 3b4, DAKO) bzw. der Maus-Universalnegativkontrolle geschieht für 90 Minuten in der feuchten Kammer. Nach erneutem Waschen mit TBS-Puffer wird mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-IgG, POX-konjugiert, DIANOVA) für 30 Minuten und weitere 30 Minuten mit einem POX-konjugiertem Kaninchen-anti-Ziege Tertiärantikörper (DIANOVA) zwecks Reaktionsverstärkung inkubiert. Die Entwicklung der Farbreaktion erfolgt mit AEC (DAKO). Abschließend werden die Zellkerne mit Hematoxylin gegengefärbt und das Gewebe mit Faramount-Eindeckmedium versiegelt.

3.1.8 IL-10 Einzelfärbung

Die in Paraffin eingebetteten GPA- und CRS-Gewebe werden für IL-10 mit der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion gefärbt. Verwendet wird hierbei das EnVision^{TM} G2 Doublestain System (K 5361) der Fa. DAKO. Zunächst erfolgt die Entparaffinierung in Xylol und einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol. Die hitzeinduzierte Antigendemaskierung wird durch 20-minütiges Kochen in Zitratpuffer (pH = 6,0) erreicht. Im Anschluss wird in Aqua dest. gespült. Die endogene alkalische Phosphatase wird mit dem Dual Endogenous Block^{R} (DAKO) (8 Minuten) blockiert. Zur Hintergrundreduktion

wird 20 Minuten mit dem Proteinblock der Fa. DAKO inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-IL10 (Klon: JES3-9D7, BDPharmingen) bzw. der Maus-Universalnegativkontrolle erfolgt für 60 Minuten in der feuchten Kammer. Anschließend wird für 15 Minuten der Maus-Kaninchen-Link hinzugegeben und in Folge für 15 Minuten mit alkalischer Phosphatase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugiertem Dextranpolymer inkubiert. (Sekundärantikörperkonjugat, Polymer/AP, DAKO). In Zwischenschritten wird mit TBS-Puffer gewaschen. Die Visualisierung der Bindung erfolgt mittels 10-minütiger Inkubation mit Permanent Red Substrat (100 Teile Permanent Red Substratpuffer + 1 Teil Permanent Red Chromogen, EnVision™ G2 Doublestain System). Abschließend erfolgt die Kerngegenfärbung mit frisch filtriertem Hematoxylin. Nach Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol, 100%-igem Propanol und Xylol wird mit DePex®-Eindeckmedium (BioPhoretics, Serva) versiegelt.

3.1.9 IL-17 Einzelfärbung

Die in Paraffin eingebetteten GPA- und CRS-Gewebe werden für IL-17 mit der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion gefärbt. Verwendet wird hierbei das EnVision™ G2 Doublestain System (K 5361) der Fa. DAKO. Zunächst erfolgt die Entparaffinierung in Xylol, 100%-igem Propanol und einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol. Die hitzeinduzierte Antigendemaskierung wird durch 15-minütiges Kochen in Zitratpuffer (pH = 6,0) erreicht. Im Anschluss wird in Aqua dest. gespült. Die endogene alkalische Phosphatase wird mit dem Dual Endogenous Block® (DAKO) (8 Minuten) blockiert. Zur Hintergrundreduktion wird 30 Minuten mit dem Proteinblock der Fa. DAKO inkubiert. Die Inkubation mit dem polyklonalem Primärantikörper goat-anti-human-IL17 (200 µg/ml, 1:20) (R&D Systems) bzw. der Ziege-Isotypenkontrolle (normal goat IgG) erfolgt über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Anschließend wird für 30 Minuten der Kaninchen-anti-Ziege-IgG hinzugegeben und in Folge für 12 Minuten mit dem Kaninchen-Maus-Link inkubiert. Anschließend wir gründlich in TBS gewaschen. Es erfolgt die Inkubation mit alkalischer Phosphatase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugiertem Dextranpolymer (Sekundärantikörperkonjugat, Polymer/AP, DAKO). In Zwischenschritten wird mit TBS-Puffer gewaschen. Die Visualisierung der Bindung erfolgt mittels 5-minütiger Inkubation mit Permanent Red Substrat (100 Teile Permanent Red Substratpuffer + 1 Teil Permanent Red Chromogen, EnVision™ G2 Doublestain System). Abschließend erfolgt die Kerngegenfärbung mit frisch filtriertem Hematoxylin. Nach Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol, 100%-igem Propanol und Xylol wird mit DePex®-Eindeckmedium (BioPhoretics, Serva)

3.2 Semi-quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Mit der Intention, aus den immunhistochemischen Einzel- und Doppelfärbungen neben einem qualitativen Informationsgewinn auch eine semiquantitative Analyse der IL-32-Expression zu erreichen, wurden die gefärbten Gewebsschnitte mikroskopisch eingescannt und mit Hilfe der Mirax Scan Software (Zeiss) als digitaler Datensatz ausgewertet. Hierfür wurde in freundlicher Kooperation durch das Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Eppendorf das notwendige Mikroskop Mirax Midi (Zeiss) zur Verfügung gestellt. Die aktuelle Version der Software zur Visualisierung/Bearbeitung der Datensätze (Pannoramic Viewer, 3DHisTec) ist frei über das Internet zu beziehen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Version Pannoramic Viewer 1.14.50 verwendet. Es wurde mit Hilfe der Messwerkzeuge auf den Gewebsschnitten ein Areal von 2.400.000 μm^2 definiert und die darin gefärbten Zellen ausgezählt. Zuvor erfolgte eine Kalibrierung des jeweils verwendeten Bildschirms im Mirax Viewer über das „slide display scale setup“. Schließlich wurden die durch 2 Personen unabhängig voneinander gezählten Zellen gemittelt. Dabei wurde darauf Wert gelegt, dass bei der Auszählung der einzelnen Zellmarker annähernd das gleiche Areal der seriellen Schnitte ausgewertet wurde. Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde der U-Test von Mann und Whitney für zwei unverbundene Stichproben ohne Annahme von Symmetrie oder gar Normalverteilung angewendet. Die Ergebnisse waren signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p< 0.05$ lag und hochsignifikant, wenn $p<0.01$ lag. Das Vorliegen eines Zusammenhanges zwischen erhöhter bzw. erniedrigter Expression der IL-32-exprimierenden Zellen im Gewebe der GPA bzw. CRS wurde mittels der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman untersucht. Die durchschnittliche Krankheitsaktivität der GPA-Patienten nach BVAS/DEI wird im Folgenden als Median angegeben.

3.3 Kolokalisationsanalysen anhand von Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

3.3.1 Arbeitsprinzip des Konfokalen Mikroskops

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops LSM 510 META (Zeiss, Jena) analysiert, welches in freundlicher Kooperation durch das Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt wurde. Im Folgenden soll kurz das Arbeitsprinzip eines konfokalen Mikroskops dargestellt werden. Ebenso sollen einige Unterschiede zur konventionellen Mikroskopie aufgezeigt werden, welche die besondere Eignung für den Einsatz in Kolokalisationsanalysen erklären.

Die Generierung eines Bildes durch den Scanprozess eines konfokalen Mikroskops unterscheidet sich grundsätzlich von der konventionellen Lichtmikroskopie, indem eine zu

untersuchende Probe nur punktweise (seriell) bestrahlt und beobachtet wird und diese Informationen dann digitalisiert und mit weiteren Beobachtungspunkten zu einem Bild zusammengesetzt werden. In der konventionellen Lichtmikroskopie erfolgt hingegen die Informationstransformation für alle Objektpunkte gleichzeitig und parallel. Der in der konfokalen Mikroskopie vornehmlich zu nennende technische Unterschied ist hierbei der Einsatz einer konfokalen Blende (Pinhole). Intention dieser im Durchmesser variablen Blende ist eine möglichst punktförmige Beleuchtung und Beobachtung eines Objektes, woraus sich auch der ideale Anspruch an einen unendlich kleinen Durchmesser ableitet. Der Durchmesser des Pinholes wird in „airy units“ (AE) angegeben. Dabei betragen typische Einstellungen zwischen 0,25 und 1 AE, da die punktförmige Beleuchtung eines Objektes durch einen Licht-(Laser)strahl z.B. auch beugungsbegrenzt ist. Der konfokale Strahlengang bezeichnet die Abbildung von Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander in einer konjugierten Ebene. Der Durchmesser der konfokalen Blende vermag somit festzulegen, in wie weit Licht außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird. Die konfokale Mikroskopie ist hierdurch tiefendiskriminierend und eignet sich besonders gut, Zellen in ihrem Gewebsverbund zu betrachten. Darüber hinaus wird durch die Streulicht unterdrückende Wirkung des Pinholes ein Kontrast steigernder Effekt erzielt. Im Anwendungsbereich Immunfluoreszenzfärbung bedeutet dies, dass eine simultane Aufnahme der einzelnen Kanäle bei dennoch guter Kanaltrennung gelingt.

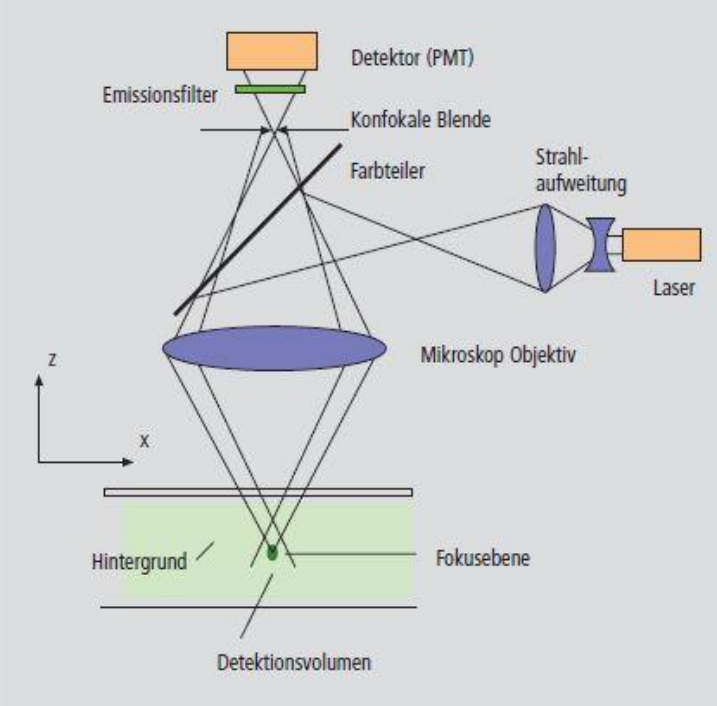


Abb. 5: Schema des Strahlenganges in einem konfokalen Mikroskop: Ein Laserstrahl wird über das Mikroskopobjektiv auf das Gewebe gelenkt. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung gelangt über das Objektiv zu einem Farbteiler, in dem die interessierende Wellenlänge selektiert und das Licht des anregenden Lasers geblockt wird. Das Licht gelangt über die konfokale Blende zu einem Sekundärelektronenvervielfacher, in welchem eine pixelweise Detektion der vom Probenort emittierten Fluoreszenzstrahlung und Digitalisierung der optischen Information erfolgt. [Aus: Wilhelm S, Gröbler B, Gluch M, Heinz H, Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Carl Zeiss Jena GmbH, 2003, 45-0029d/09.03]

3.3.2 Doppelfärbung für PR3 und IL-32α

Die Immunfluoreszenzfärbungen werden auf in Paraffin eingebetteten Geweben von Patienten, deren Gewebe bereits in den immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden, durchgeführt. Nach Entparaffinierung in Xylol und einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol erfolgt die Antigendemaskierung durch Inkubation mit Fast Enzyme (Fa. Zytomed) bei 41°C. Eine Antigendemaskierung mittels Kochen oder anderweitiger Hitzebehandlung ist auf Grund des konformationellen Epitops, welches der anti-PR3 Antikörper (Klon: WGM2) erkennt, in diesem Fall nicht möglich. Nach Spülen in Aqua dest. werden die Gewebe mit dem Ziel der Reduktion unspezifischer Hintergrundfluoreszenz für 30 Minuten mit der gebrauchsfertigen Lösung Image-iT FX Signalverstärker (Fa. Invitrogen) inkubiert. Nun wird für 15 Minuten mit dem Proteinblock (Fa DAKO) und anschließend für 45 Minuten mit dem ersten Primärantikörper gegen PR 3 (Klon: WGM2) bzw. PBS/25% humanes Serum als Negativkontrolle inkubiert. Die weiteren Schritte werden zur Vermeidung eines Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe

weitestgehend im Dunkeln durchgeführt. Die Inkubation mit dem ersten konjugierten Sekundärantikörper DyLight488 (Ziege-anti-Maus-IgG, Fa Thermo Scientific) erfolgt für 20 Minuten. Nachfolgend wird mit dem zweiten primären Antikörper gegen IL-32α bzw. PBS/25% humanes Serum als Negativkontrolle für 45 Minuten inkubiert. Der zweite konjugierte Sekundärantikörper TexasRed (Kaninchen-anti-Ratte IgG, Fa. Dianova) wird für 20 Minuten aufgetragen. Zur Fixierung der Färbung wird für die Dauer von 10 Minuten 3-%iges Paraformaldehyd aufgetragen. Nun erfolgt nach Spülen der Schnitte in PBS die parallele Versiegelung und Kernfärbung mittels Eindecken mit VectaShield^{R} + DAPI Fluoreszenzeindeckmedium (Fa. Vector). Die mikroskopische Auswertung erfolgt im Anschluss.

3.3.3 Doppelfärbung für CD66b und IL-32α

Nach Entparaffinierung in Xylol und einer absteigenden Konzentrationsreihe von Ethanol erfolgt die Antigendemaskierung durch 15-minütiges Kochen in Zitratpufferlösung. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundfluoreszenz wird für 30 Minuten mit der gebrauchsfertigen Lösung Image-iT FX Signalverstärker (Fa. Invitrogen) inkubiert. Nun wird für 15 Minuten mit dem Proteinblock (Fa DAKO) und anschließend für 45 Minuten mit dem ersten Primärantikörper anti-CD 66b (Klon: G10F5) bzw. PBS/25% humanes Serum als Negativkontrolle inkubiert. Die weiteren Schritte werden zur Vermeidung eines Ausbleichens der Fluoreszenzfarbstoffe weitestgehend im Dunkeln durchgeführt. Die Inkubation mit dem ersten konjugierten Sekundärantikörper NorthernLights493 (Esel-anti-Maus-IgG, Fa R&D Systems) erfolgt für 20 Minuten. Nachfolgend wird mit dem zweiten primären Antikörper gegen IL-32α bzw. PBS/25% humanes Serum als Negativkontrolle für 45 Minuten inkubiert. Der zweite konjugierte Sekundärantikörper AlexaFluor546 (Ziege-anti-Ratte IgG, Fa. Invitrogen) wird für die Dauer von 20 Minuten aufgetragen. Zur Fixierung der Färbung wird für 10 Minuten 3-%iges Paraformaldehyd aufgetragen. Nun erfolgt nach Spülen der Schnitte in PBS die parallele Versiegelung und Kernfärbung mittels Eindecken mit VectaShield^{R} + DAPI Fluoreszenzeindeckmedium (Fa Vector). Die mikroskopische Auswertung erfolgt im Anschluss.

3.4 Semi-nested PCR zur Analyse des mRNA-Expressionsmusters von IL-32 im Nasenschleimhautgewebe bei GPA

Zunächst erfolgt die RNA-Isolation aus den Probegeweben nach der Trizol-Chloroform-Methode. Es werden Gewebeproben (ca. 40 mg) von Patienten mit GPA und CRS mit einem sterilen Einmalskalpell zerkleinert und im Homogenisator für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit Trizol homogenisiert. Nun erfolgt die Zugabe von 80 µl Chloroform und nach gründlichem Schütteln und 3-minütiger Inkubation die Zentrifugation für 15 Minuten und bei 4°C mit 12000 g. Nach Überführen der oberen wässrigen Phase mit der

enthaltenden RNA in ein neues Tube und Zugabe von 200 µl 2-Propanol wird wieder kräftig geschüttelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird erneut 10 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Die RNA sedimentiert als gelartiges Pellet am Boden. Der Überstand wird abdekantiert und es werden 400 µl Ethanol 75% hinzugegeben. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 7500 g wird dieser Schritt einmal wiederholt. Schließlich wird das RNA-Pellet in 10 µl RNAse-freiem Wasser gelöst und kurz zentrifugiert sowie bei 60°C für 10 Minuten inkubiert. Die RNA-Reinheit wird durch Absorptionsmessung im TE-Puffer gemessen. Die Ratio von 260/280 nm liegt bei 1,8-2,0, andernfalls erfolgt eine Aufreinigung. Die enzymatische Spaltung der genomischer DNA in RNA-Proben erfolgt mit Hilfe des DNAse-I-Kits der Fa. Roche nach Herstellerinformation.

Die folgende cDNA-Erststrangsynthese wird mit Superscript III reverser Transkriptase (Fa. Invitrogen) durchgeführt. Die zuvor isolierte RNA wird so verdünnt, dass zwischen 1 und 5 µg RNA pro Reaktionsansatz zum Einsatz kommen. Zu 11 µl der vorverdünnten RNA werden dann je 1 µl des dNTP Mix und 1 µl der Random Primer pipettiert und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wird sofort auf Eis heruntergekühlt und kurz zentrifugiert. Parallel wird der Reaktionsmix für die reverse Transkription angesetzt. Hierfür werden zu je 6 µl des vorherigen Ansatzes 4 µl des 5x First Strand Buffers, 1 µl 0,1 M Dithiotreitol, 1 µl RNaseOut und je 1 µl SuperScript III bzw. je 1 µl H_2O zur Kontrolle pipettiert. Durch Auf- und Abpipettieren wird gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird im PCR-Cycler für 60 Minuten bei 50°C, für 15 Minuten bei 70°C inkubiert und auf 4°C heruntergekühlt. Abschließend erfolgt kurzes Zentrifugieren und Lagerung der cDNA bei -20°C.

Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgt das Pipettieren des MasterMix zur (Semi-nested) PCR für humanes IL-32. Für 50 µl Ansatz werden 36.75 µl dH_2O + 5 µl 10x Puffer + 2 µl $MgCl_2$ + 1.25 µl DMSO + 1 µl dNTP´s + 1 µl sense primer1 (äußeres Paar) + 1 µl antisense primer1 (äußeres Paar) + 1 µl Taq-Polymerase + 1 µl cDNA pipettiert. Es erfolgen bei 59°C Annealing-Temperature 40 Zyklen im PCR-Cycler. Nach Ende der ersten Runde mit den äußeren Primern werden 10 µl Produkt aus der ersten Runde 1:100 verdünnt mit 1 µl cDNA und 39 µl MasterMIX (26.75 µl dH_2O +5 µl 10x Puffer + 2 µl $MgCl_2$ + 1.25 µl DMSO +1 µl dNTP´s +1 µl sense primer2 (inneres Paar) +1 µl antisense primer2 (inneres Paar) +1 µl Taq-Polymerase) pipettiert und bei erneut 59°C Annealing-Temperature für 40 Zyklen im PCR-Cycler inkubiert. Die Produkte werden auf 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (IL-32α = 95 bp, IL-32β, γ, δ = 265 bp, GAPDH 233 bp).

Ergebnisse

Die Immunhistochemie/-fluoreszenz-Untersuchungen der hier präsentierten Daten erfolgten auf Formaldehyd-fixierten und in Paraffin eingebetteten Nasenschleimhautbiopsien von zehn Patienten mit klinisch diagnostizierter und durch das Konsultations- und Referenzzentrum für Vaskulitis-Diagnostik (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) histopathomorphologisch bestätigter GPA und zehn Patienten mit chronischer Rhinosinusitis (CRS, n=10).

Das mittlere Alter der GPA-Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie betrug 44,8±5,2 Jahre (Spannweite 19 bis 69 Jahre) und einem Geschlechterverhältnis von 1:1 (m:w).

Gemäß der EUVAS-Kriterien befanden sich drei der GPA-Patienten im generalisierten und sieben im auf den Respirationstrakt beschränkten lokalisierten Stadium. Alle Individuen hatten eine Beteiligung des oberen Respirationstraktes, welche in allen zehn Biopsien bestätigt wurde (weitere Einzelheiten zur Organbeteiligung in Abschnitt 2.2 „Patienten und Kontrollen“).

Die Krankheitsaktivität (BVAS V3.0) war 6 (Spannweite: 0-8), die Krankheitsausdehnung (DEI) war 5 (Spannweite: 2-8). Die Hälfte der Patienten hatte zum Zeitpunkt der Biopsie einen positiven C-ANCA-Titer und die Mehrheit war unbehandelt. Lediglich ein Patient hatte bereits Prednisolon und ein Patient Cyclophosphamid erhalten.

Alle Patienten mit GPA wiesen eine granulomatöse Entzündung auf (vgl. Tab. 2, S. 19). Die Auswertung der Gewebsareale von 2.400.000 μm^2 in den immunhistochemischen Doppelfärbungen erfolgte in einem zufällig festgelegten Areal.

Als (Krankheits-)Kontrollen dienen die Formaldehyd-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe von zehn Patienten mit unspezifischer CRS. Das mittlere Alter jener Patienten betrug zum Zeitpunkt der Biopsie 46±8,4 Jahre (Spannweite 12 bis 80 Jahre) und einem Geschlechterverhältnis von 1:1 (m:w). Die CRS ist als Krankheitskontrolle für den Vergleich zur GPA etabliert [Laudien et al., 2011].

1. Expression von IL-32α und IL-32 nicht-α (β, γ, δ) mRNA Isoformen in Nasenschleimhautgewebe bei GPA

Es wurde exemplarisch das IL-32-Isoformenexpressionsmuster in Nasenschleimhautgewebe bei der GPA untersucht. Alle drei Proben zeigten eine Expression der IL-32-Isoformen β, γ, δ (Abb. 6). Eine Probe wies nur eine schwache Expression der nichtα-Isoformen auf, zeigte allerdings eine starke Expression von IL-32α mRNA (Patient 3, Abb. 6). Denkbar ist hierbei, dass es sich um eine Nasenschleimhautbiopsie mit einem hohen Anteil an Epithel handelte.

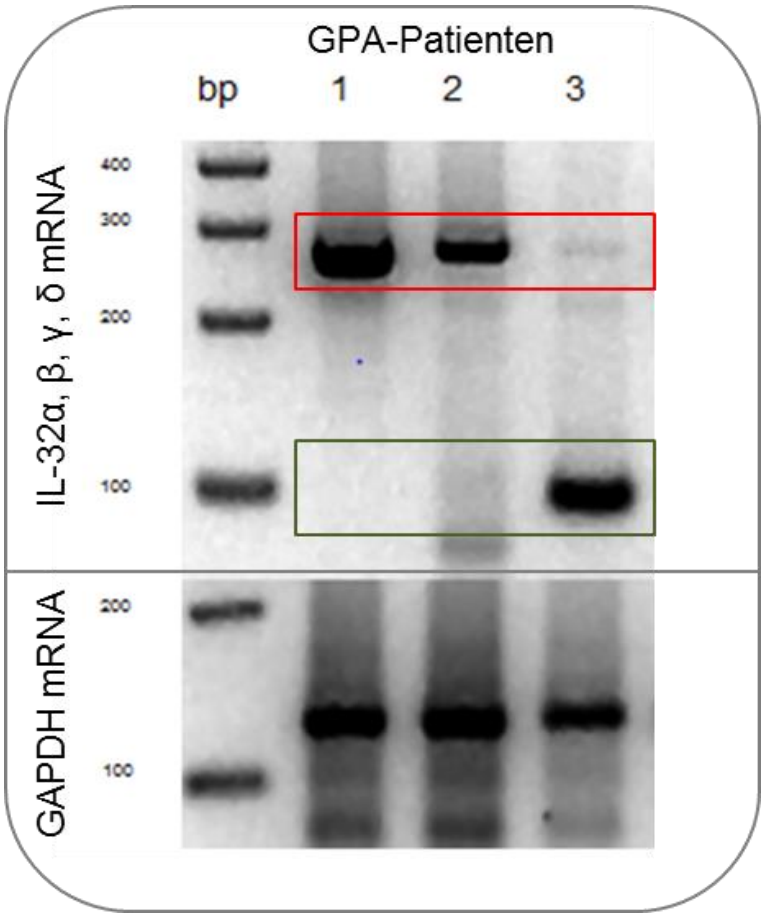


Abb. 6: IL-32α und IL-32β, γ, δ mRNA findet sich in Nasenschleimhaut bei GPA (n=3). Semi-nested PCR der IL-32 Isoformen α (95 bp, grüner Kasten) sowie nicht-α (β, γ, δ: 265 bp, roter Kasten) in der Nasenschleimhaut bei GPA. Das house-keeping Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GAPDH, 233 bp) findet sich in allen Proben. Links: 100 Basenpaarleiter (bp).

2. Phänotypisierung und semi-quantitative Auswertung von IL-32$^+$Zellen

2.1 IL-32 Proteinexpression in Nasenschleimhautgewebe bei GPA im Vergleich zur CRS

Die Analyse von IL-32 in nasaler Schleimhaut bei Patienten mit GPA und CRS erfolgte zunächst anhand von Einzelfärbungen. Ein polyklonaler IL-32-Antikörper (Kaninchen-anti-human-IL-32α,β,γ,δ; Fa. Novus Biologicals) wurde mit einem monoklonalen IL-32-Antikörper (Maus-anti-human-IL-32α,β,γ,δ; Klon: KU 32-09, Fa. Biolegend) verglichen, jeweils für GPA (n=5) und CRS (n=5). Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl von IL-32$^+$ -Zellen wurde nicht beobachtet (Abb. 7, Tab. 9). Die etwas höheren Werte für den polyklonalen IL-32-Antikörper waren vermutlich auf die Klonalität zurückzuführen. Unabhängig von der Verwendung unterschiedlicher anti-IL-32 Antikörper findet sich sowohl bei GPA als auch bei CRS eine vorwiegend intrazytoplasmatische Lokalisation des IL-32 (Abb. 8).

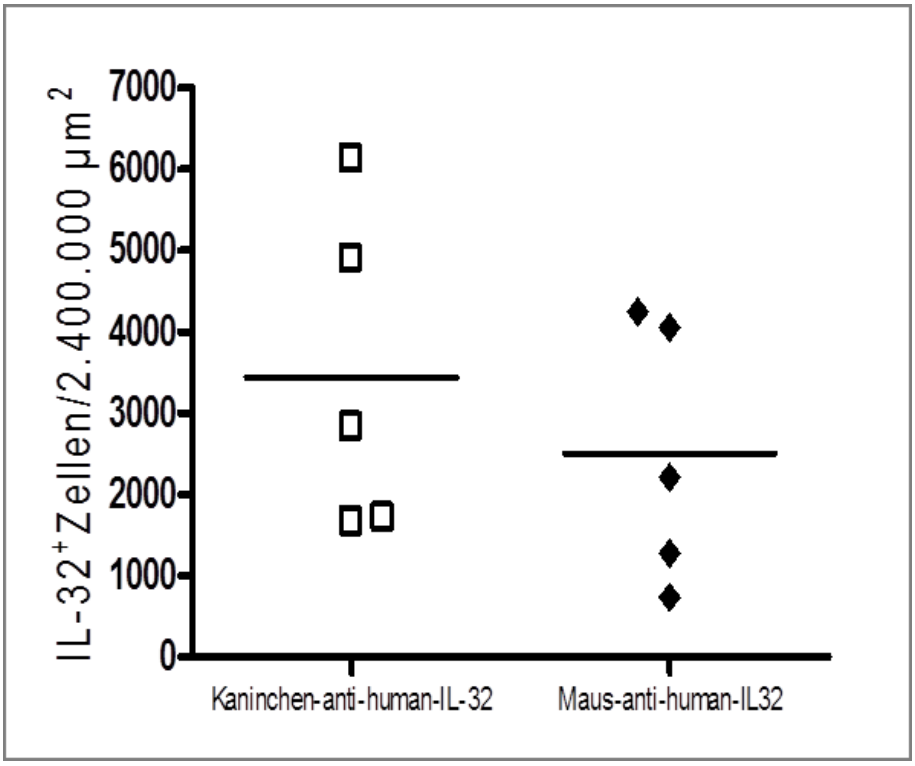


Abb. 7: Kein Unterschied in der Anzahl von IL-32$^+$ Zellen zwischen verschiedenen Antikörpern (polyklonaler Kaninchen-anti-human-IL-32 versus monoklonaler Maus-anti-human-IL-32; p>0.05).

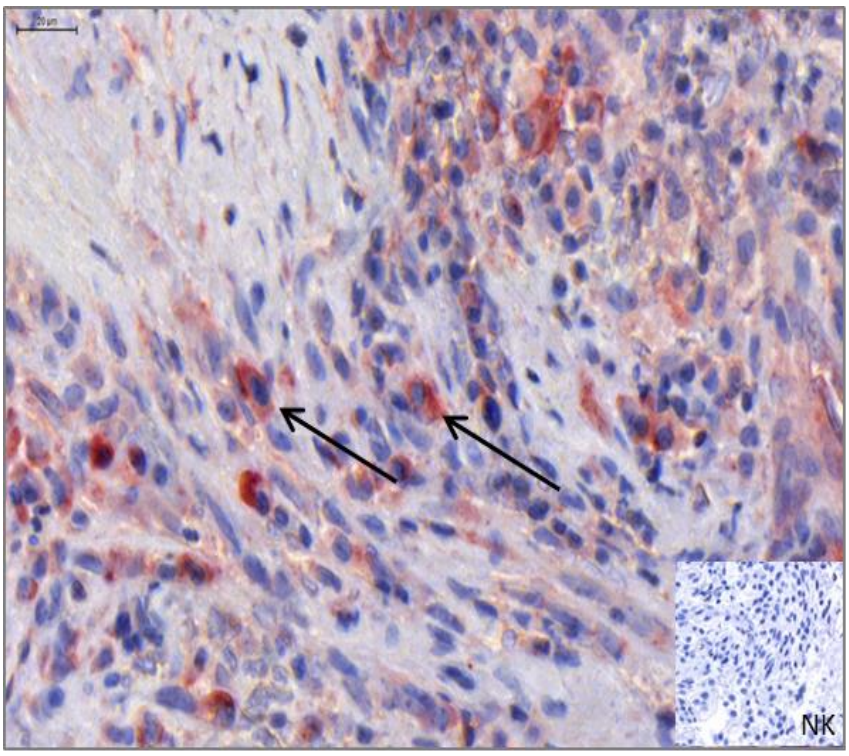


Abb. 8: IL-32 (rot, schwarze Pfeile) wurde vorwiegend intrazytoplasmatisch exprimiert (GPA, Nasenschleimhautgewebe); Kernfärbung mit Hämalaun (blau). NK = Isotypkontrolle.

	Kaninchen-anti-human-IL-32α,β,γ,δ IL-32$^+$ Zellen / 2.400.000 µm^2	**Maus-anti-human-IL-32α,β,γ,δ IL-32$^+$ Zellen / 2.400.000 µm^2**
GPA 2	2821	2207
GPA 3	1657	1273
GPA 4	4892	4050
GPA 5	6120	4241
GPA 6	1708	733

Tab. 9: Vergleich von zwei verschiedenen anti-IL-32-Antikörpern (Kaninchen-anti-human-IL-32 vs Maus-anti-human-IL-32) **bzgl. der Anzahl von IL-32$^+$ Zellen in Nasenschleimhautgewebe bei GPA.**

Der Vergleich zwischen GPA und CRS deutete die Tendenz einer vermehrten Anzahl von IL-32$^+$ Zellen bei GPA an (Abb. 9-11).

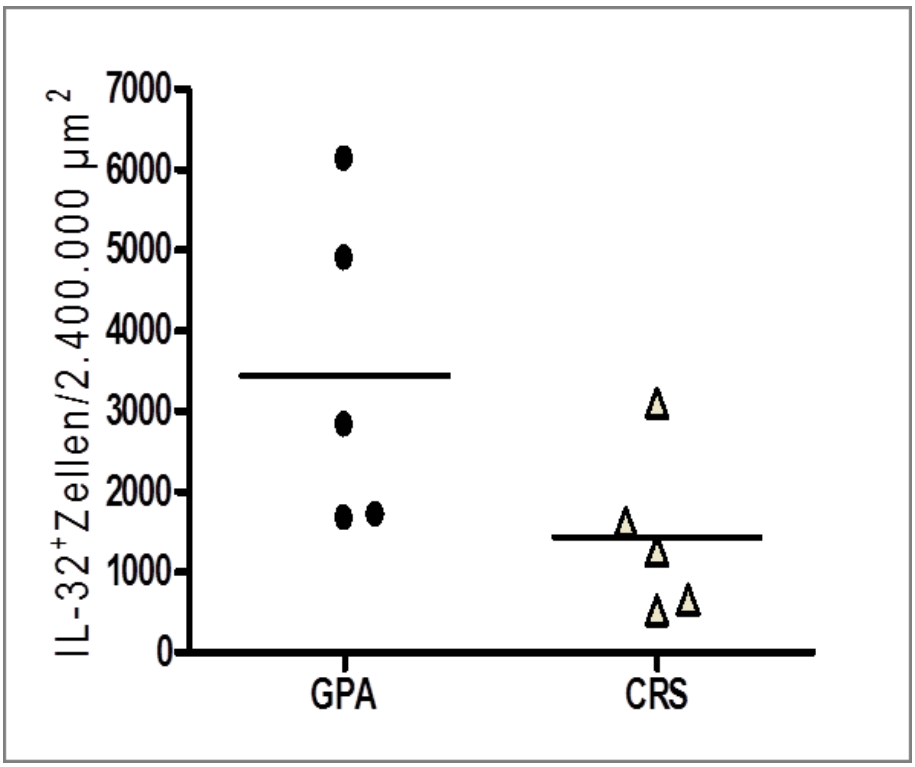


Abb. 9: **Vermehrte Anzahl von IL-32$^+$ Zellen in Nasenschleimhautgewebe bei GPA (n=5) im Vergleich mit CRS (n=5).** polyklonaler Kaninchen-anti-human IL-32 Antikörper; p=0.0556.

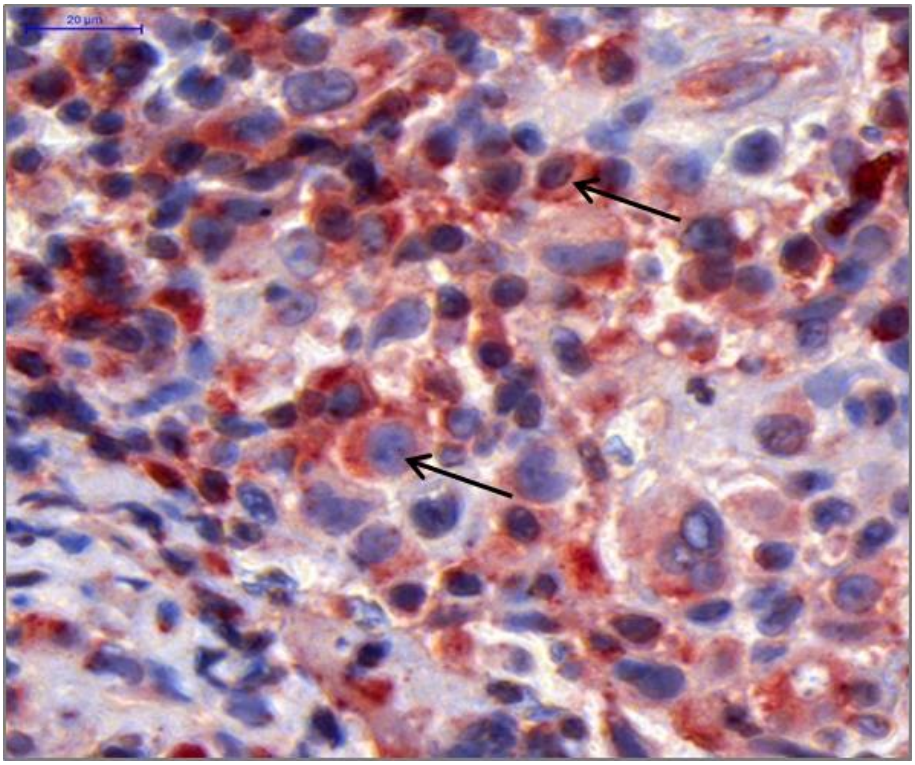


Abb. 10: Zahlreiche IL-32$^+$ Zellen (rot, schwarze Pfeile) in Nasenschleimhautgewebe bei GPA. Kernfärbung mit Hämalaun (blau).

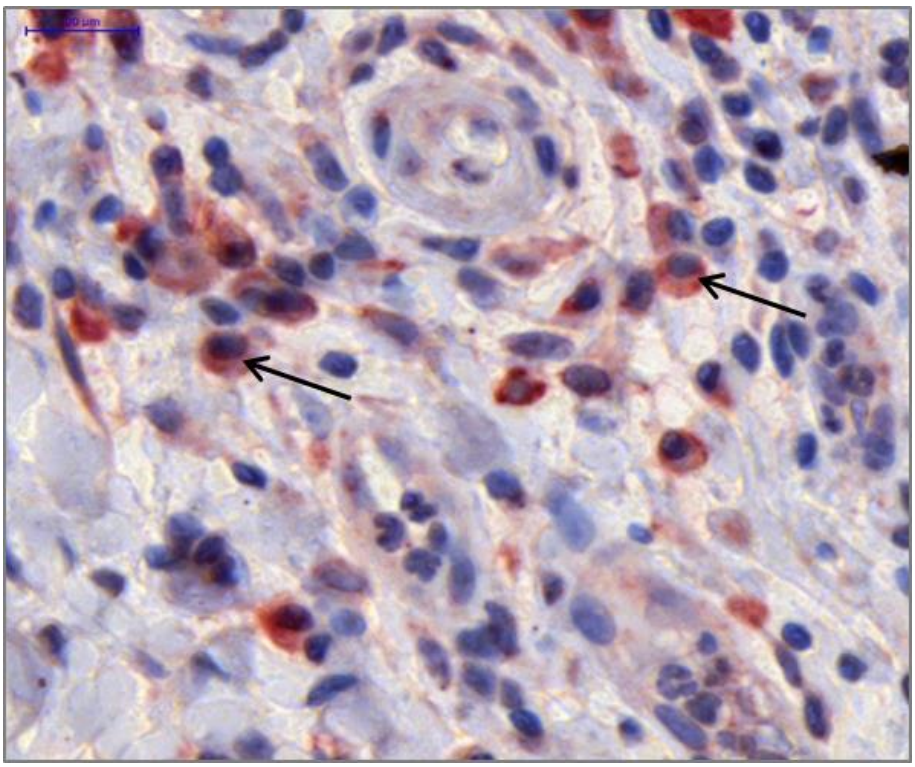


Abb. 11: IL-32^{+} Zellen (rot, schwarze Pfeile) in Nasenschleimhautgewebe bei CRS. Kernfärbung mit Hämalaun (blau).

2.2 $CD4^+$ T-Lymphozyten stellen eine Minorität von $IL\text{-}32^+$ Zellen in der granulomatösen Entzündung dar

Das Oberflächenmolekül CD4 ist vorwiegend auf T-Helfer-Zellen zu finden. In der Nasenschleimhaut und insbesondere in lymphoplasmazellulären Infiltraten bei GPA und CRS waren zahlreiche $CD4^+IL\text{-}32^+$ T-Lymphozyten zu finden. Allerdings ergab sich zwischen GPA und CRS kein statistisch signifikanter Unterschied (Abb. 12). Die auffällige Rotfärbung vieler Zellen in der Nasenschleimhaut bei GPA wies neben den $CD4^+$ T-Zellen auf weitere IL-32-exprimierende Zelltypen hin (Abb. 13). Interessanterweise fanden sich in einigen Nasenschleimhautgeweben bei CRS zum Teil mehr $CD4^+IL\text{-}32^+$ T-Zellen als bei GPA (Abb. 14/15).

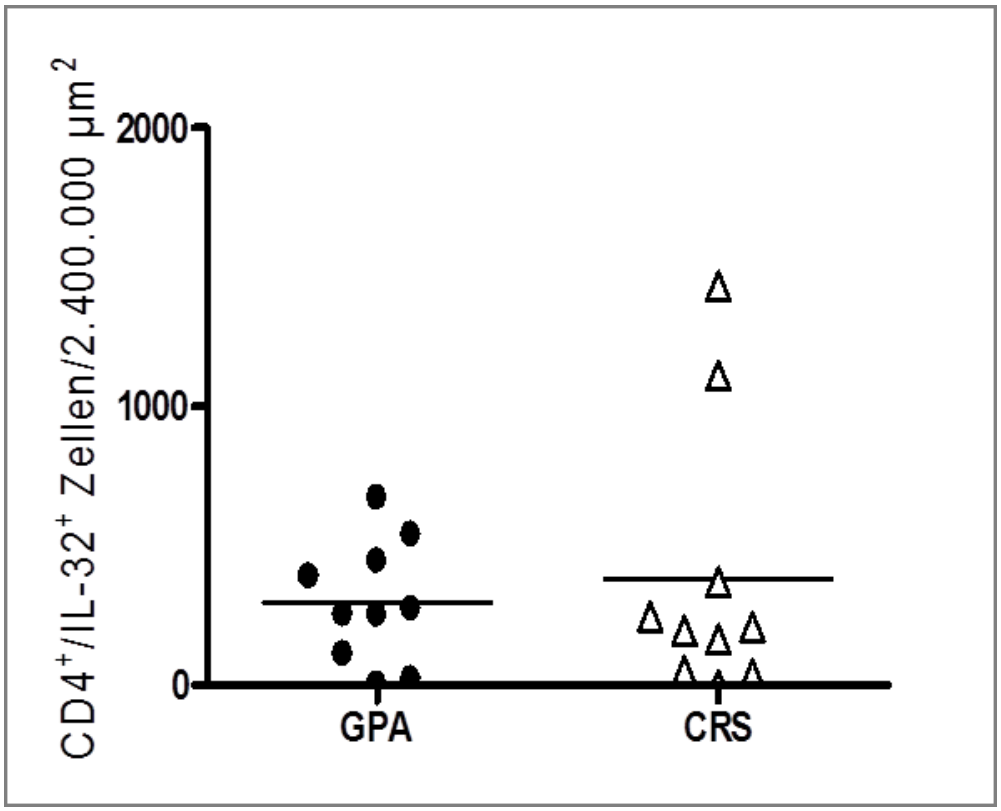


Abb. 12: Kein Unterschied zwischen GPA und CRS in der Anzahl von $CD4^+IL\text{-}32^+$ Zellen in Nasenschleimhautgewebe ($p>0.05$).

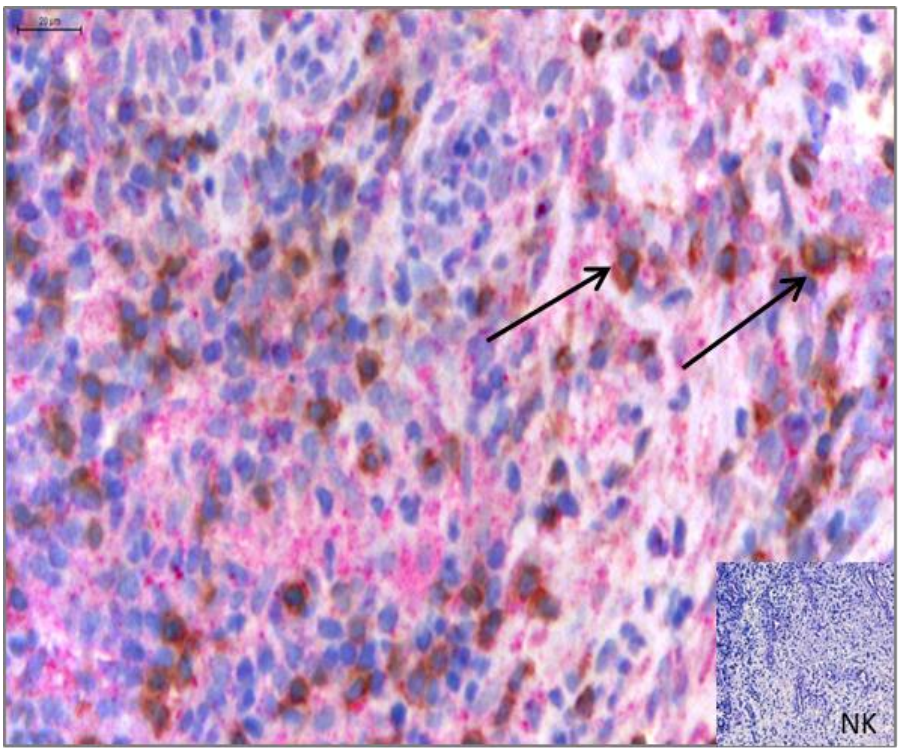


Abb. 13: CD4$^+$IL-32$^+$ T-lymphozyten (schwarze Pfeile) in der Nasenschleimhaut bei GPA. IL-32 (rot), CD4$^+$ T-Lymphozyten (braun). Kerne nach Hämalaun (blau) NK = Isotypkontrolle.

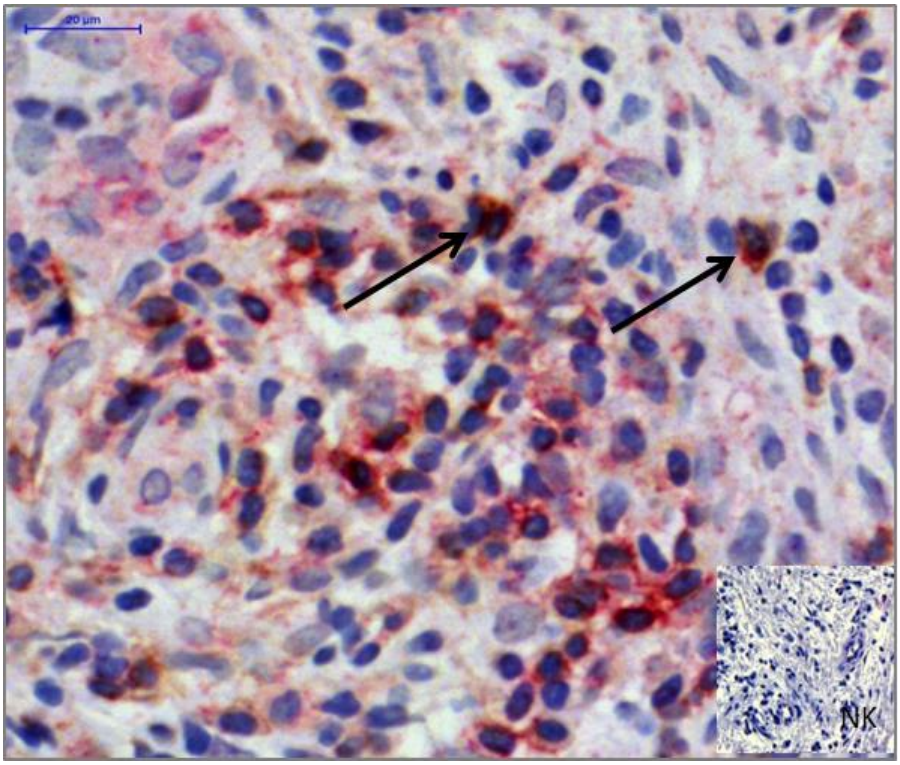


Abb. 14: CD4$^+$IL-32$^+$ T-Lymphozyten (schwarze Pfeile) in der Nasenschleimhaut bei CRS. IL-32 (rot), CD4$^+$ T-Lymphozyten (braun), Kerne nach Hämalaun (blau). NK = Isotypkontrolle.

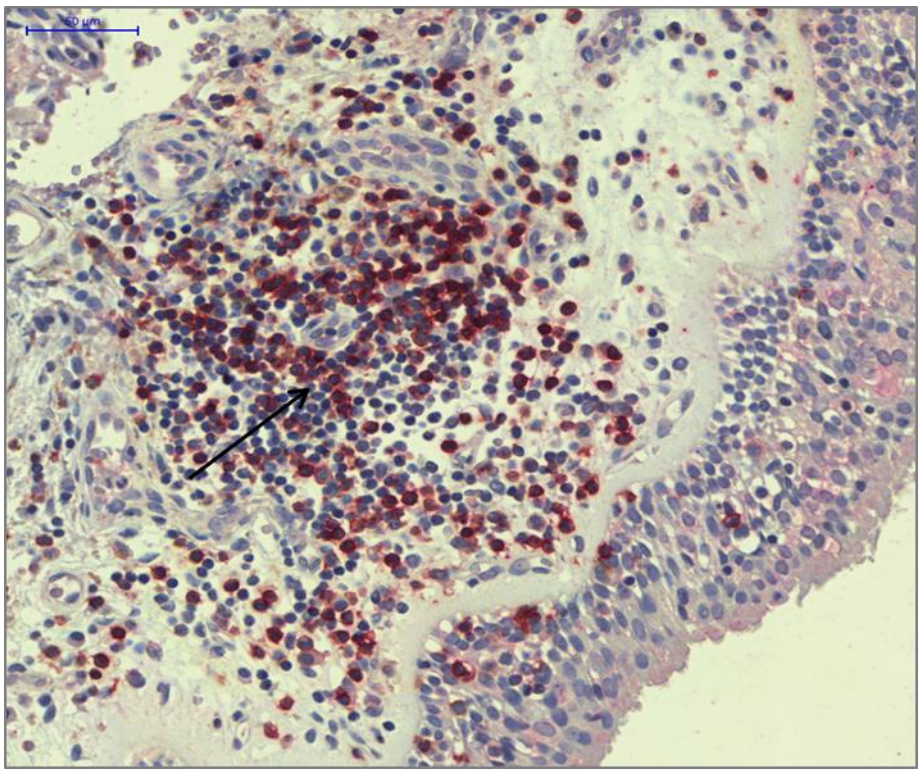


Abb. 15: Zahlreiche $CD4^+IL\text{-}32^+$ T-Zellen (schwarzer Pfeil) in einem subepithelial gelegenem lymphoplasmazellulären Infiltrat in Nasenschleimhautgewebe bei CRS. IL-32 (rot), $CD4^+$ T-Lymphozyten (braun), Kerne nach Hämalaun (blau).

2.3 Erhöhte Anzahl von $IL\text{-}32^+$ Makrophagen in der granulomatösen Entzündung

Makrophagen wurde mittels CD68-Färbung identifiziert. Die Auszählung der CD68/IL-32 Doppelfärbung ergab eine gesteigerte Anzahl von $IL\text{-}32^+$ Makrophagen in der granulomatösen Entzündung (Abb. 16/17). Einen Teil der $IL\text{-}32^+$ Makrophagen war Bestandteil des epitheloiden Randwalls um nekrotische Areale herum (Abb. 18). In der Nähe fanden sich des weiteren $IL\text{-}32^+$ multinukleäre Riesenzellen (Abb. 19/20). In der Nasenschleimhaut bei CRS fanden sich ebenso $CD68^+IL\text{-}32^+$ Makrophagen (Abb. 21), jedoch in geringerer Anzahl und im Vergleich zur GPA diffus verteilt. Bei der CRS wiesen viele Makrophagen keine IL-32-Expression auf (Abb. 22). Um auszuschließen, dass der signifikante Unterschied in der Anzahl der $IL\text{-}32^+$ Makrophagen lediglich auf einer ausgeprägteren Entzündung mit Nekrose, Apoptose und konsekutiv verstärkter Phagozytose von Zelldetritus beruht, wurde die Anzahl der Makrophagen in Nasenschleimhautgewebe bei GPA und CRS in CD68-Einzelfärbungen miteinander verglichen (Abb. 23-25). In den Nasenschleimhautgeweben zeigte sich eine im Mittel leicht erhöhte Anzahl von $CD68^+$ Zellen bei der GPA. Dieser Unterschied war jedoch im Vergleich zur CRS nicht signifikant.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hauptsächlich aus Makrophagen und multinukleären Riesenzellen bestehende granulomatöse Entzündung eine wichtige Quelle von IL-32 darstellte und im Vergleich zur CRS deutlich mehr Makrophagen IL-32 exprimierten.

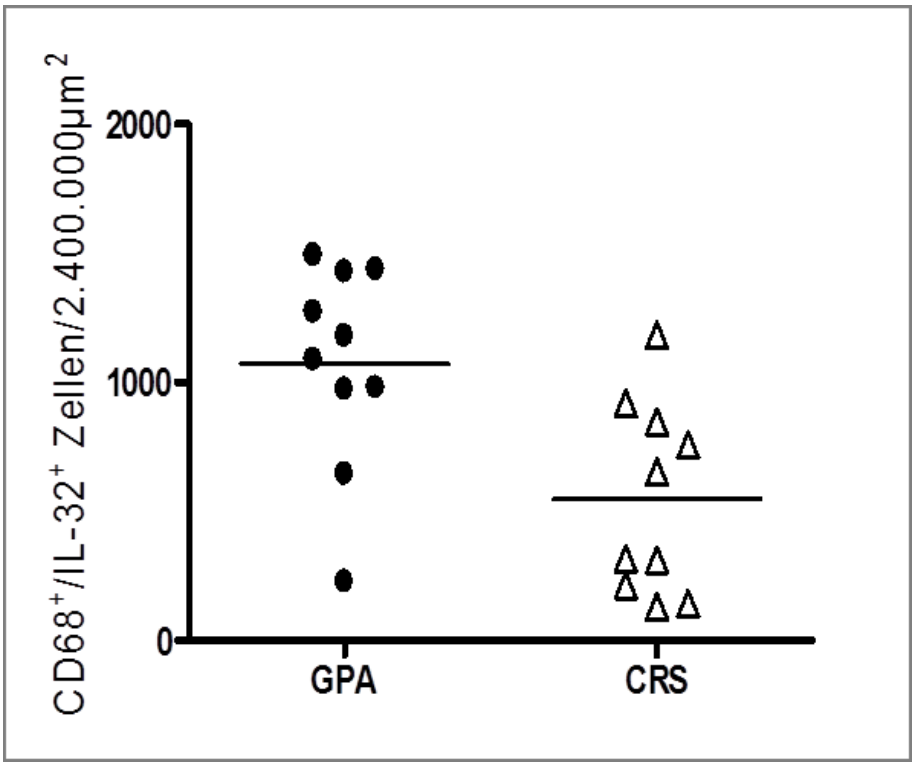


Abb. 16: Erhöhte Anzahl von $CD68^+/IL\text{-}32^+$ Zellen in Nasenschleimhautgewebe bei GPA im Vergleich mit CRS (p=0.0089).

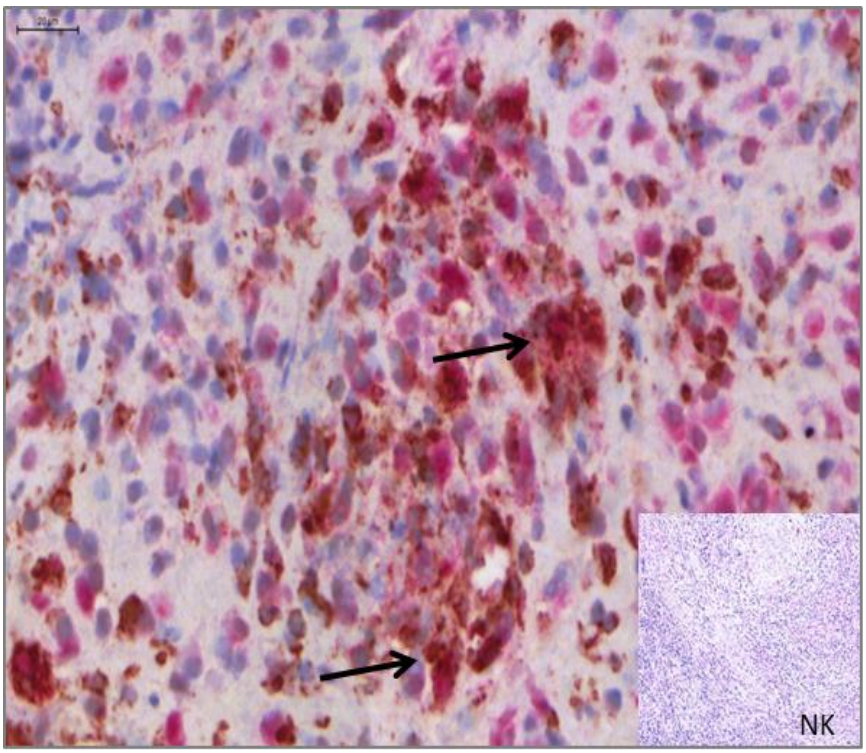


Abb. 17: CD68^{+} Makrophagen (braun) exprimierten IL-32 (rot) in der Nasenschleimhaut bei GPA. Kernfärbung mit Hämalaun (blau). Areale mit zahlreichen CD68^{+}/IL-32^{+} Makrophagen (schwarze Pfeile) liegen im Bindegewebe. NK = Isotypkontrolle.

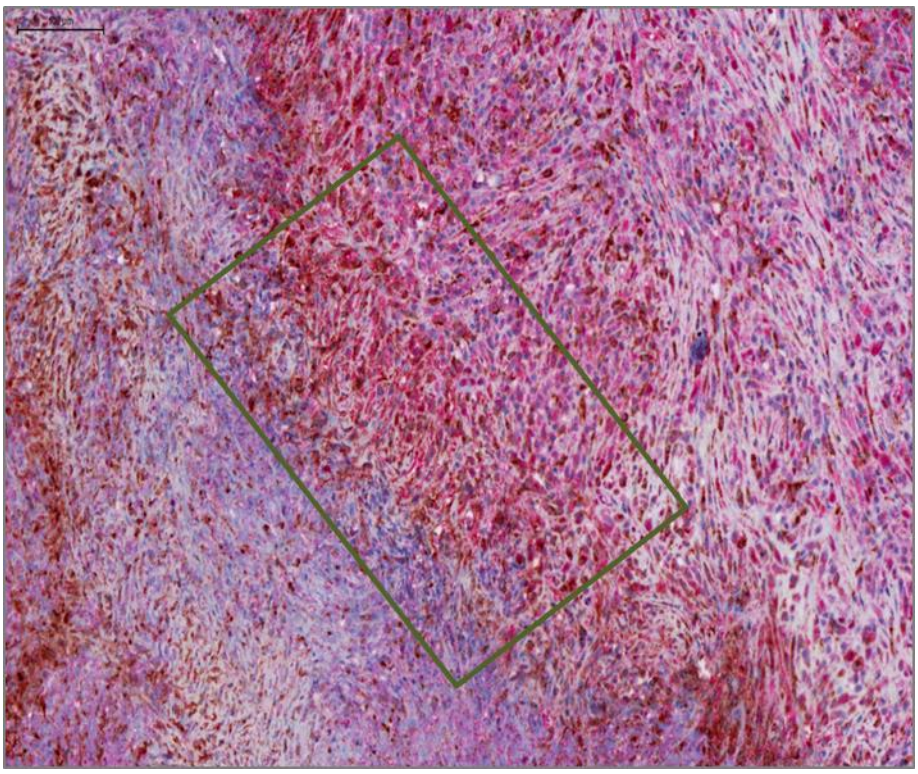


Abb. 18: Viele IL-32^{+}CD68^{+} Makrophagen waren Bestandteil eines epitheloidzellartigen Randwalls (grüner Kasten) um eine Nekrose in der granulomatösen Entzündung.

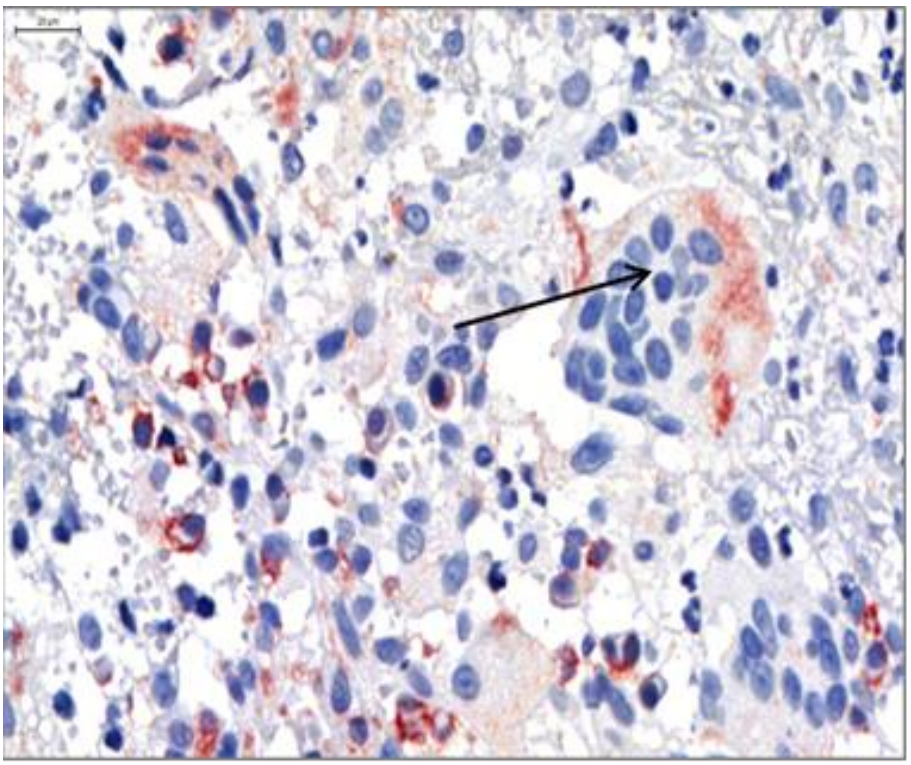


Abb. 19: IL-32^{+} mehrkernige Riesenzelle (rot, schwarzer Pfeil) in Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau).

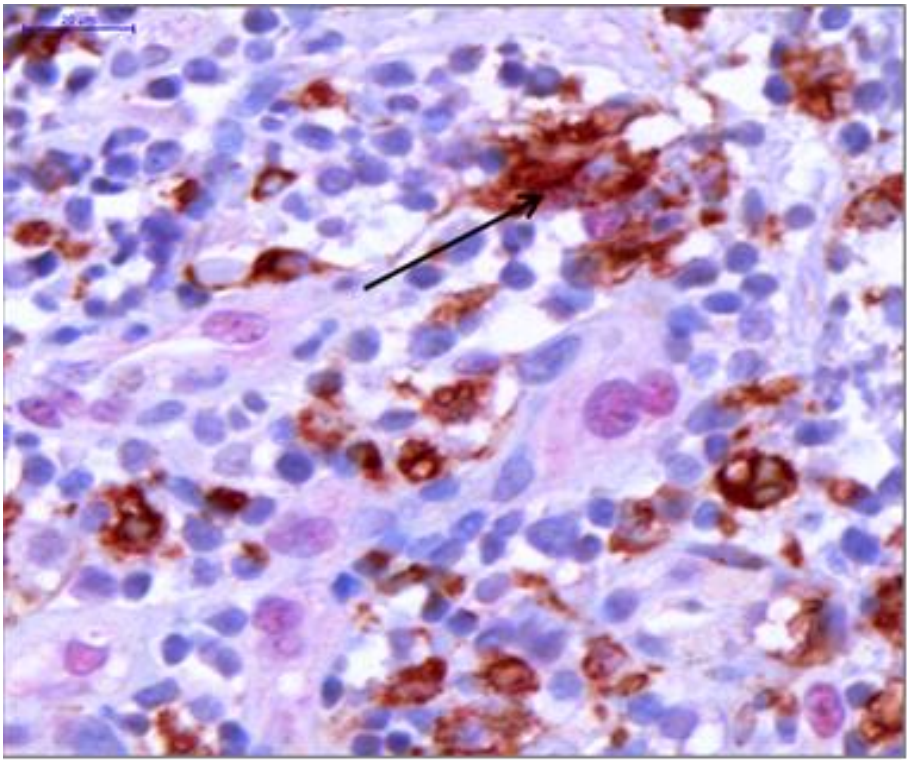


Abb. 20: IL-32$^+$ mehrkernige CD68$^+$ Riesenzelle (schwarzer Pfeil) in Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau), IL-32 (rot), CD68 (braun). (serielle Darstellung zu Abb. 19).

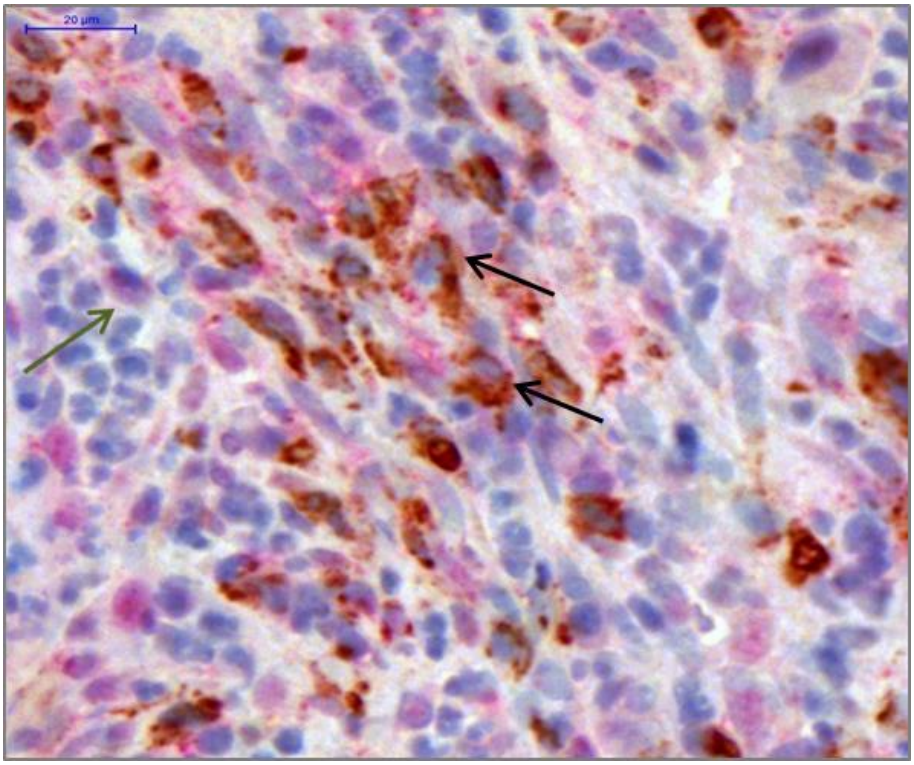


Abb. 21: CD68$^+$ Makrophagen exprimierten IL-32 in der Nasenschleimhaut bei CRS. Kerne nach Hämalaun (blau), IL-32 (rot), CD68 (braun). CD68$^-$IL-32$^+$ Zelle (grüner Pfeil).

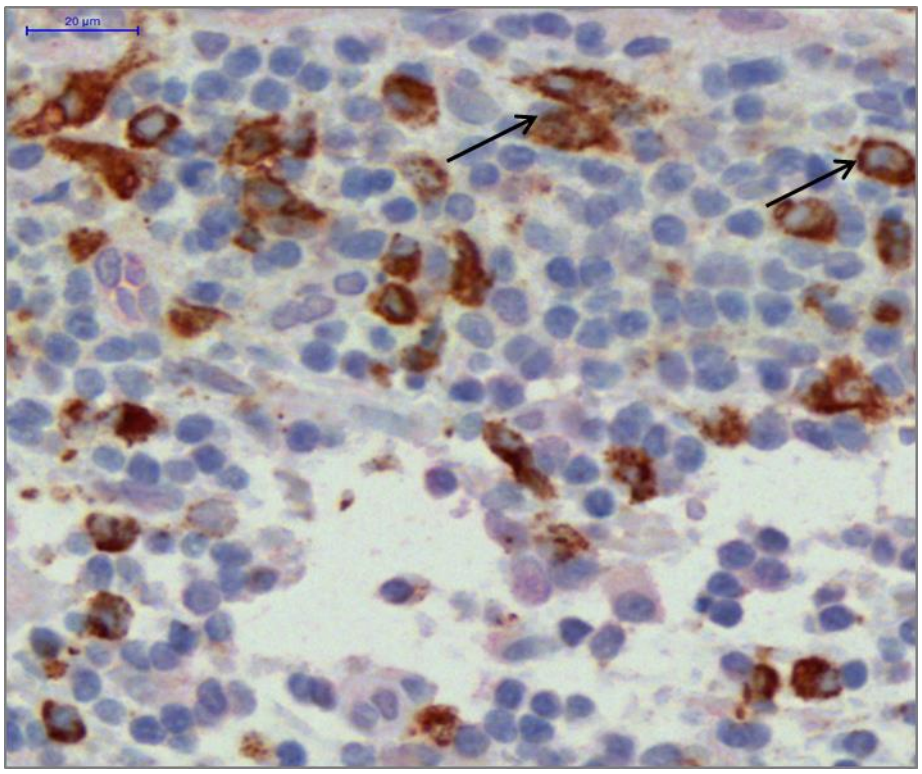


Abb. 22: Mehrere CD68$^+$ Makrophagen (schwarze Pfeile) exprimierten kein IL-32 in der Nasenschleimhaut bei CRS. Kerne nach Hämalaun (blau), CD68 (braun), IL32 (rot).

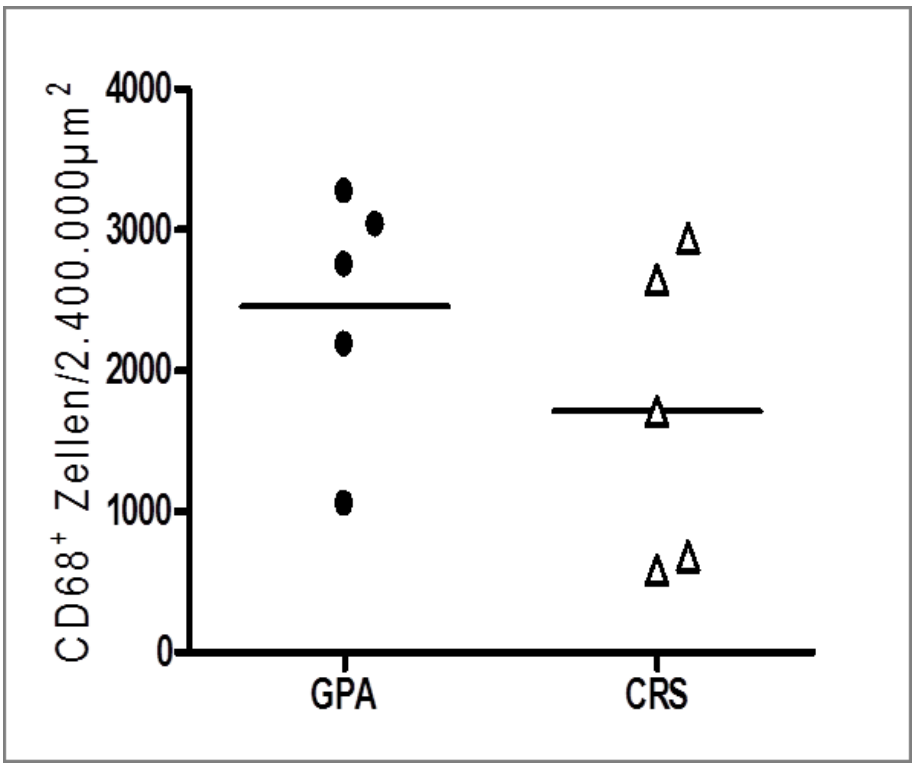


Abb. 23: Kein Unterschied in der Anzahl der CD68$^+$ Zellen in Nasenschleimhautgewebe zwischen GPA und CRS (p>0.05).

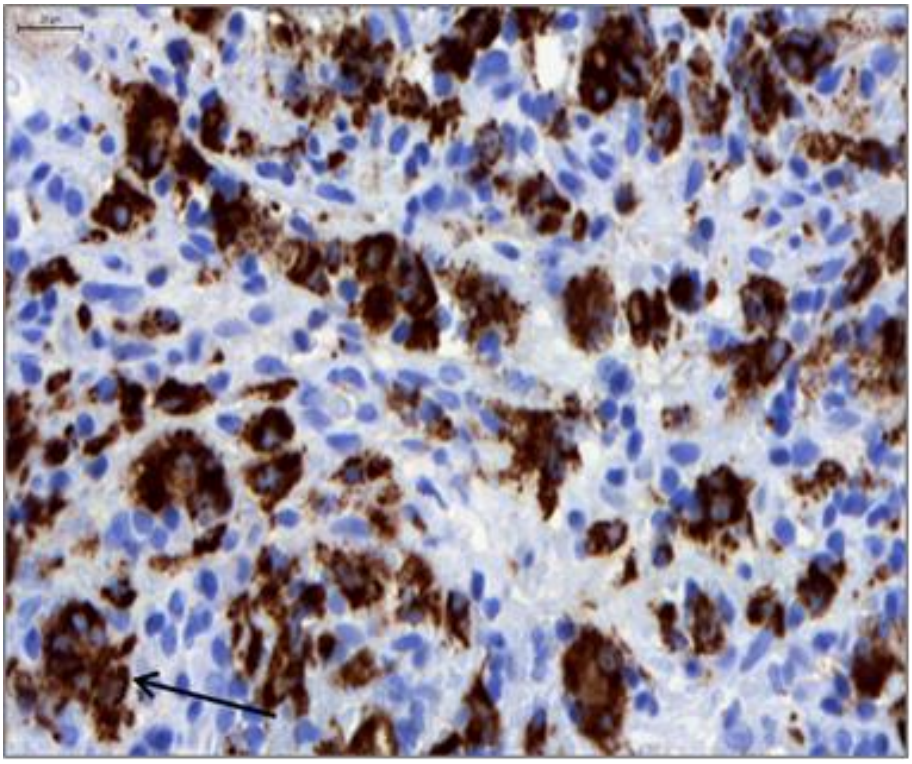


Abb. 24: CD68^{+} Zellen (braun) in der Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau). Der Pfeil markiert eine perivaskulär liegende mehrkernige Riesenzelle.

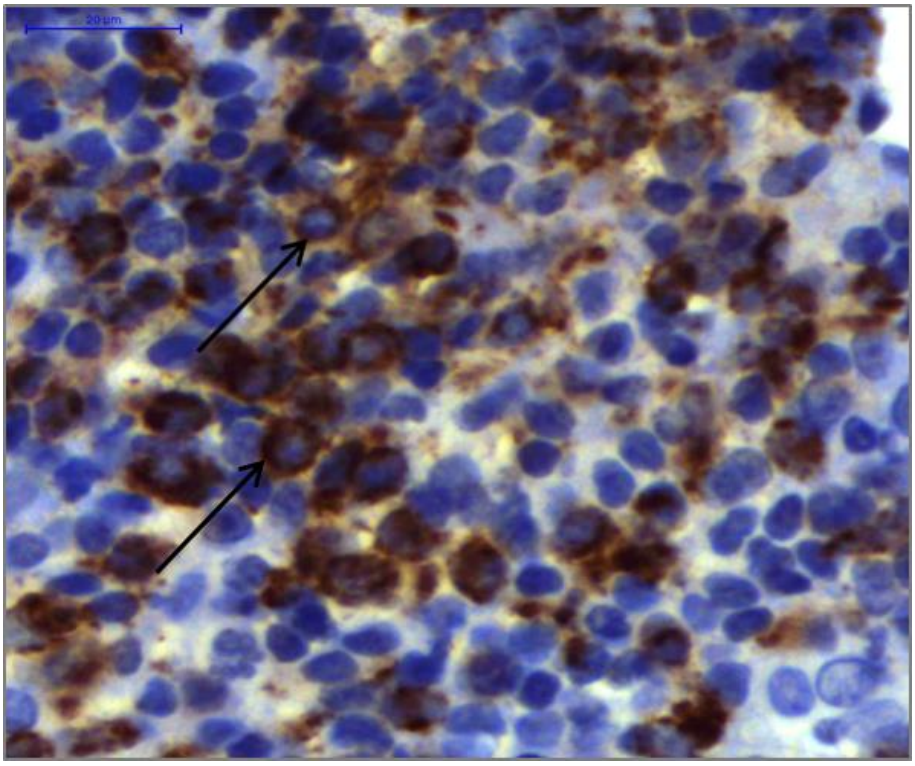


Abb. 25: CD68^{+} Zellen (braun, schwarze Pfeile) in der Nasenschleimhaut bei CRS. Kerne nach Hämalaun (blau).

2.4 Erhöhte Anzahl von IL-32$^+$ Fibroblasten-ähnlichen Zellen in der granulomatösen Entzündung

Abgesehen von T-Zellen, Makrophagen und multinukleären Riesenzellen ließen die Färbungen weitere IL-32$^+$ Zellen in der Nasenschleimhaut vermuten. Die Histomorphologie deutete auf fibroblasten-ähnliche Stromazellen des Bindegewebes hin. Daher wurde eine Doppelfärbung für Vimentin als von Fibroblasten stark exprimiertem Molekül und IL-32 durchgeführt. Insgesamt zeigte sich eine erhöhte Anzahl der Vimentin$^+$IL-32$^+$ Zellen bei GPA im Vergleich mit CRS ($p<0.01$, Abb. 26). Viele Fibroblasten in Nasenschleimhautgewebe bei GPA exprimierten IL-32 (Abb. 27/28). In Randwällen um nekrotische Areale konnten neben CD68$^+$IL-32$^+$ Zellen auch Vimentin$^+$IL-32$^+$ Zellen beobachtet werden. IL-32$^+$ Fibroblasten konnten bei der CRS ebenfalls nachgewiesen werden, allerdings in geringerer Anzahl im Vergleich zur GPA (Abb. 29/30). Dieser Unterschied ließ sich *a priori* nicht durch eine größere Anzahl Vimentin$^+$ Zellen bei der GPA erklären, wie die Auszählung der Vimentin-Einzelfärbungen ergab (Abb. 31-33).

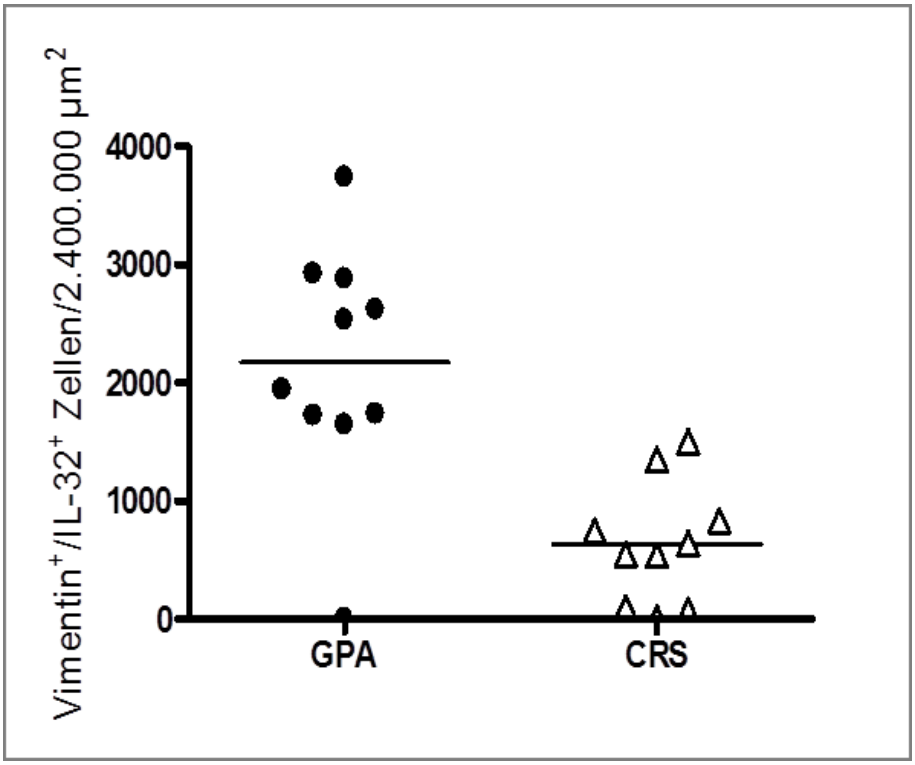


Abb. 26: Erhöhte Anzahl von Vimentin$^+$IL-32$^+$ Zellen in Nasenschleimhaut bei GPA im Vergleich mit CRS (p=0.0015).

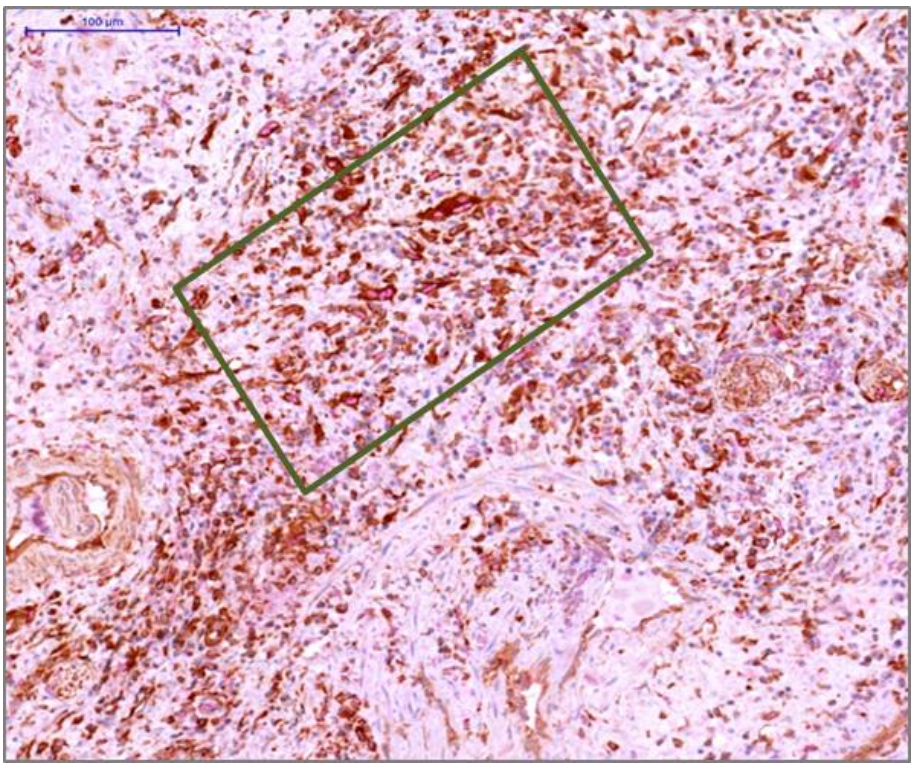


Abb. 27: Übersichtsdarstellung von Vimentin$^+$IL-32$^+$Zellen (Kasten) in Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau), IL-32 (rot), Vimentin (braun).

.

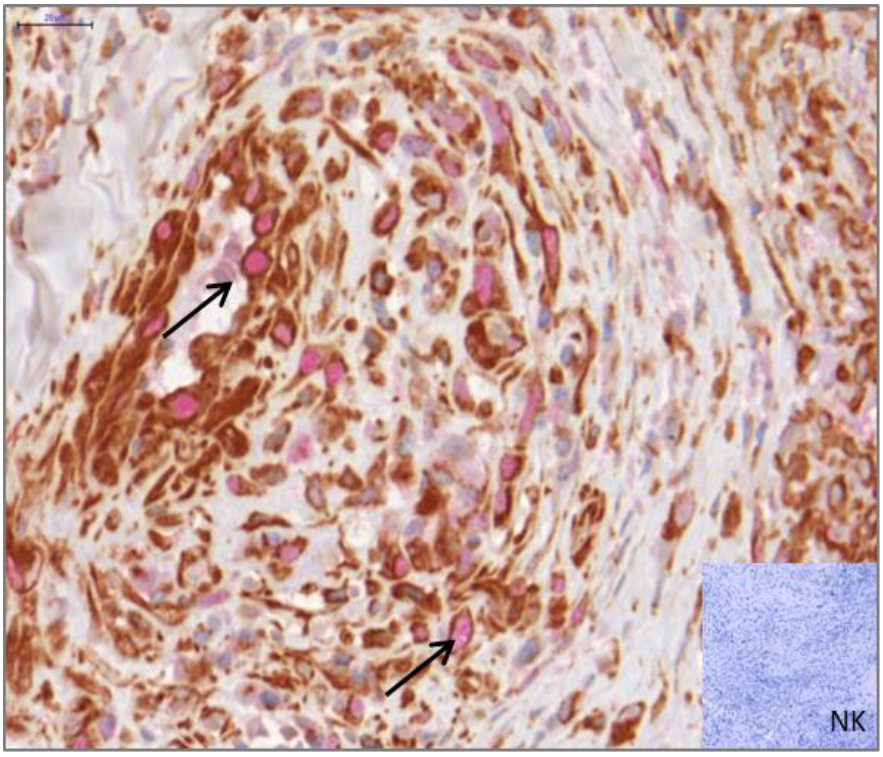


Abb. 28: Zahlreiche Vimentin$^+$IL-32$^+$ Fibroblasten (schwarze Pfeile) in Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau), IL-32 (rot), Vimentin (braun). NK = Isotypkontrolle

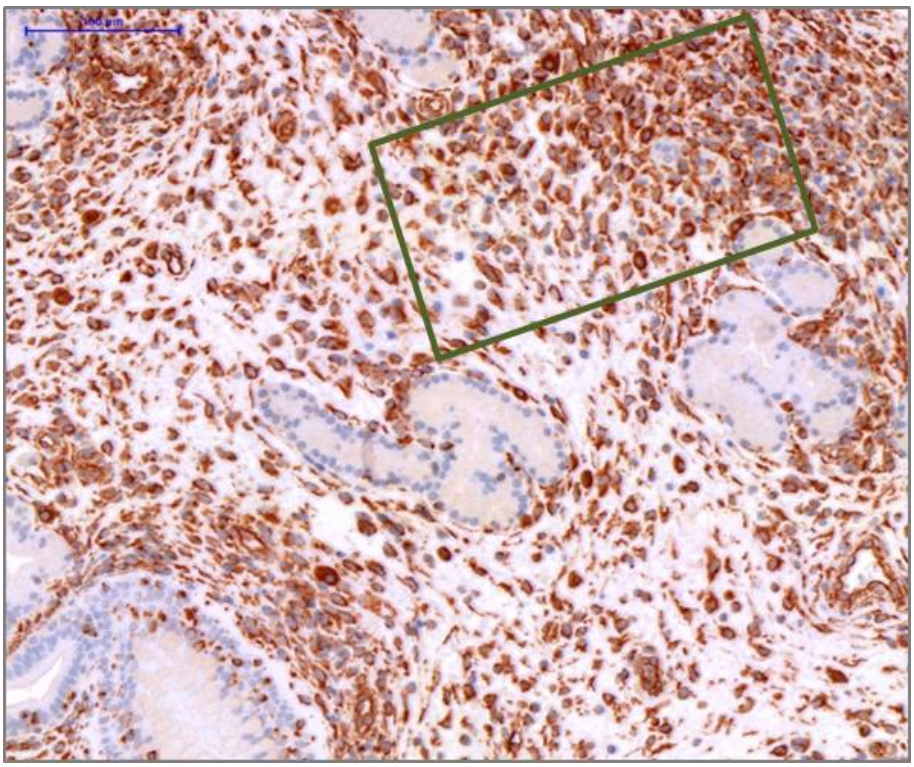


Abb. 29: Übersichtsdarstellung von wenigen Vimentin^{+}IL-32^{+} Zellen (grüner Kasten) **in Nasenschleimhaut bei CRS.** Kerne nach Hämalaun (blau), IL-32 (rot), Vimentin (braun).

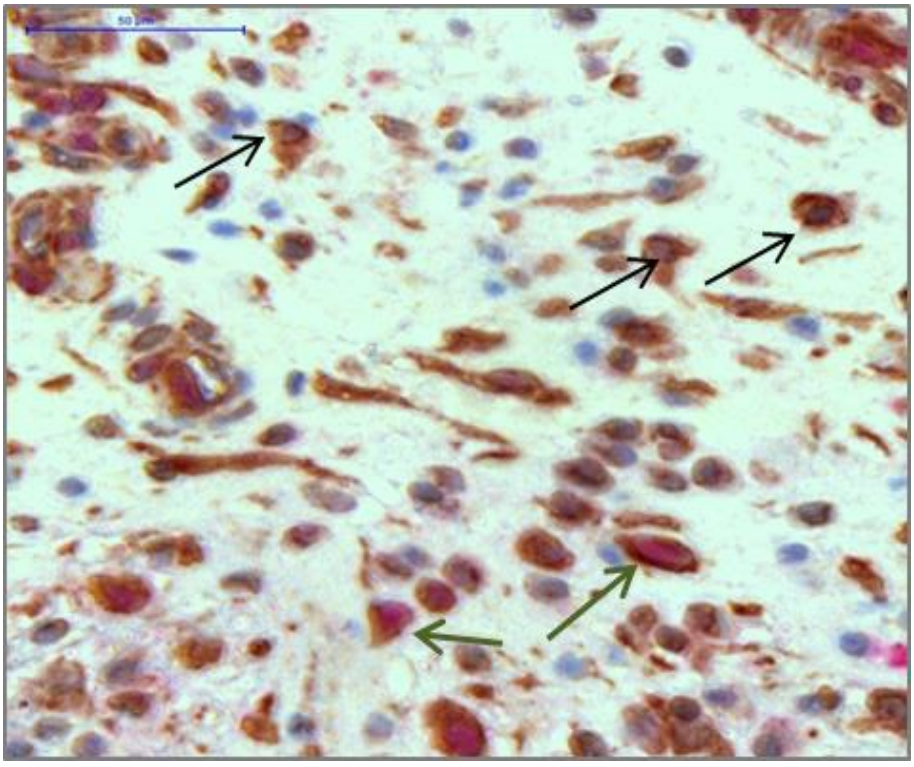


Abb. 30: IL-32^{-} Fibroblasten (schwarze Pfeile) in Nasenschleimhaut bei CRS. Kerne nach Hämalaun (blau), IL-32 (rot), Vimentin (braun). IL-32^{+}Vimentin^{+} Fibroblasten (grüne Pfeile)

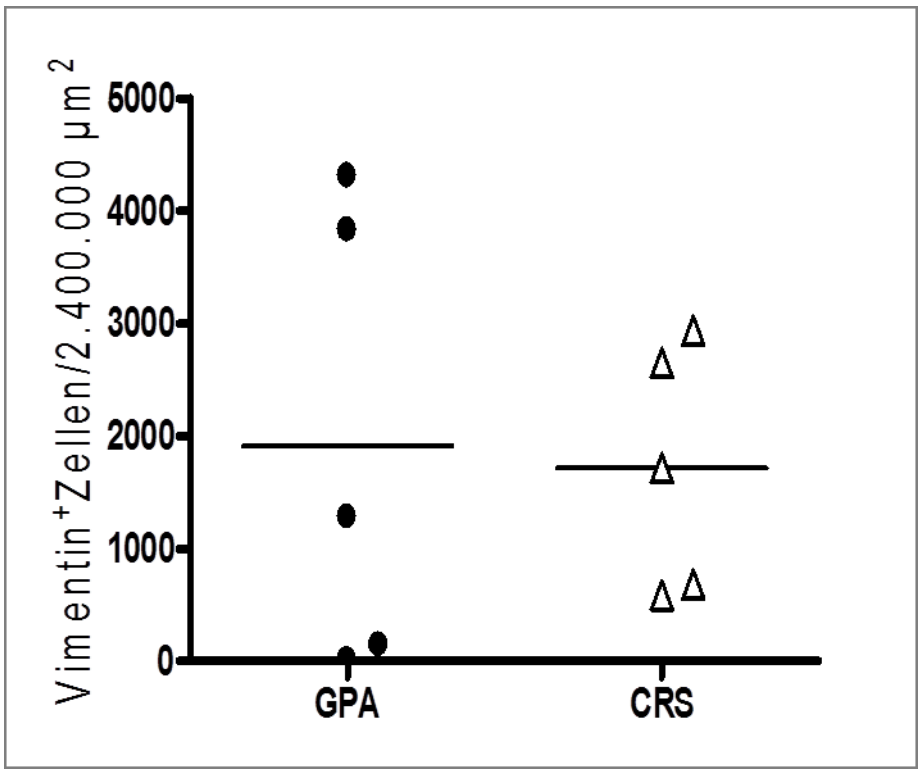


Abb. 31: Kein Unterschied in der Anzahl der Vimentin$^+$ Zellen zwischen GPA und CRS (p>0.05).

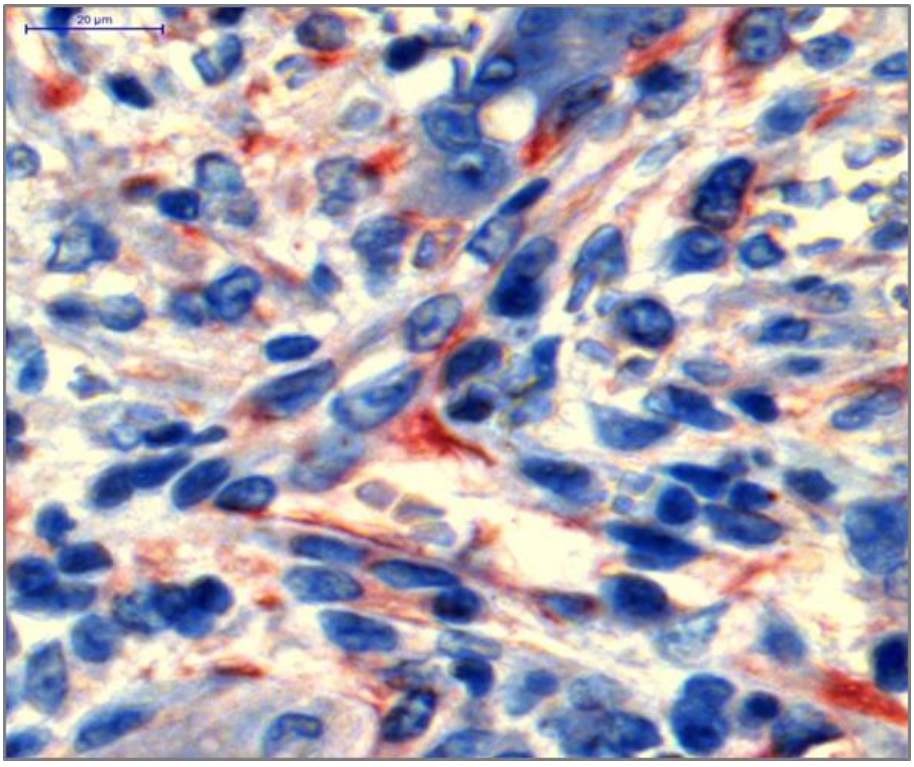


Abb. 32: Vimentin$^+$ Zellen (rot) **in Nasenschleimhaut bei GPA.** Kerne nach Hämalaun (blau).

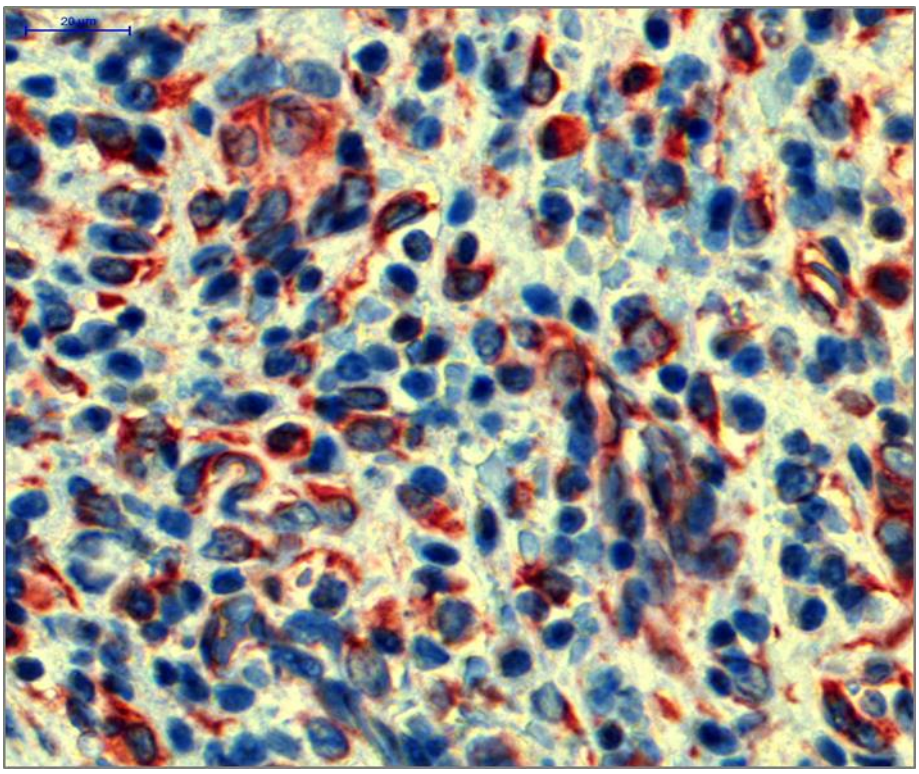


Abb. 33: Vimentin$^+$ Zellen (rot) **in Nasenschleimhaut bei CRS.** Kerne nach Hämalaun (blau).

Interessanterweise fanden sich Vimentin$^+$IL-32$^+$ Fibroblasten in Arealen mit Knochenarrosion in der Nasenschleimhaut bei der GPA. Im Detail wiesen einige direkt am Knochen befindliche Vimentin$^+$ Zellen eine IL-32-Expression auf (Abb. 34-36). Eine knorpeldestruierende Eigenschaft der Fibroblasten aus der Nasenschleimhaut von GPA-Patienten ist aus einem Tiermodell bekannt [Kesel et al., 2012]. Eine ossäre Destruktion ist bei der CRS hingegen nicht zu finden.

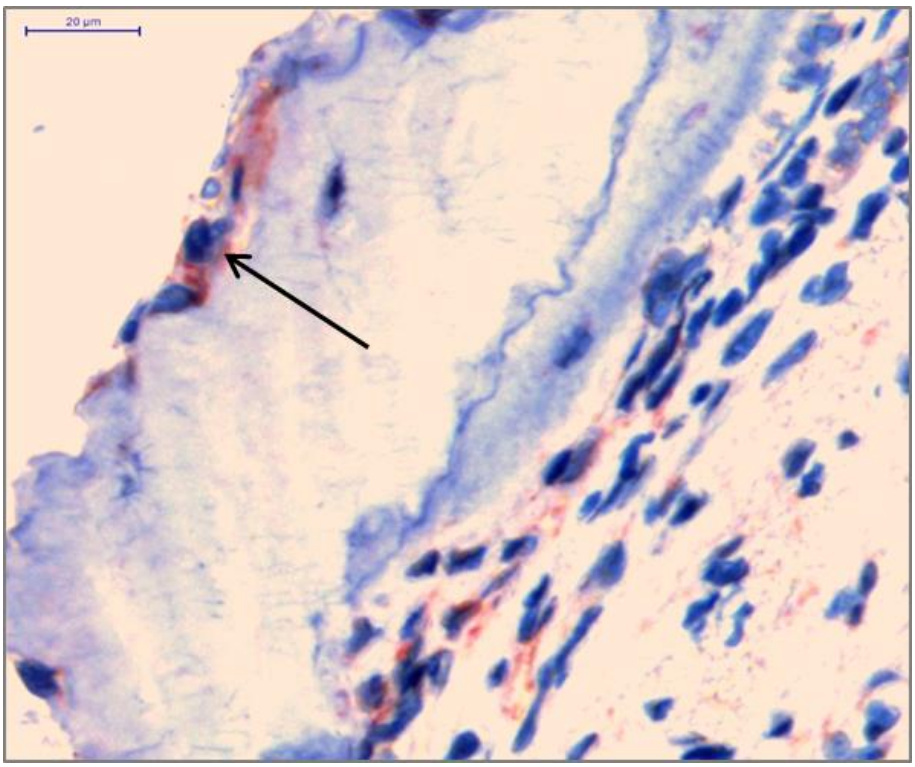


Abb. 34: Vimentin^{+}-Zellen (rot, schwarzer Pfeil) finden sich am Knochen in Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau).

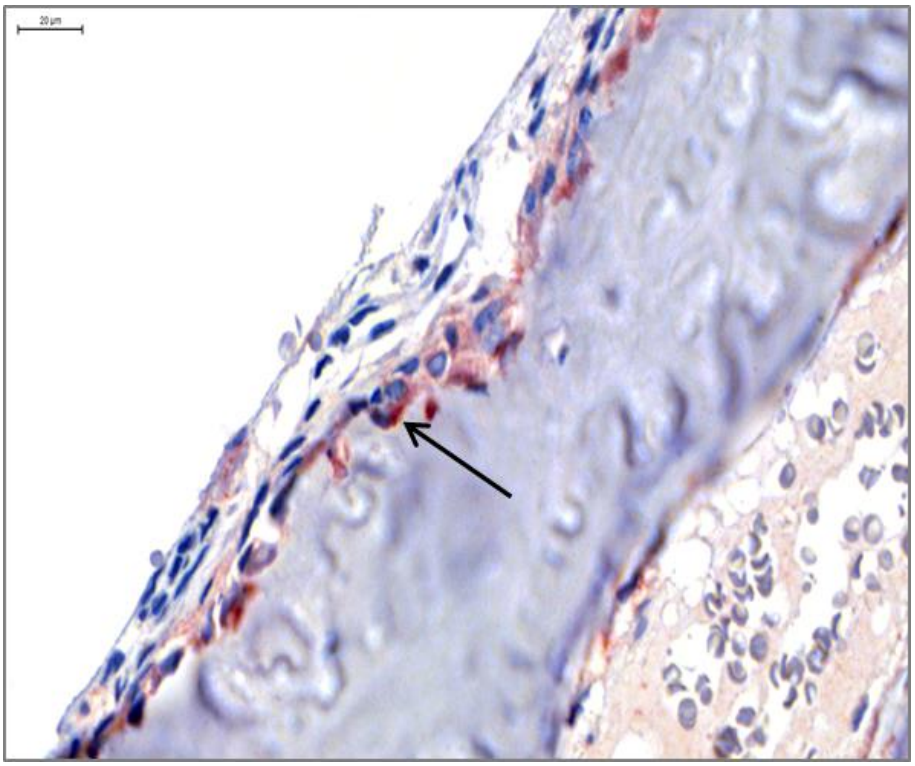


Abb. 35: IL32^{+}-Zellen (rot, schwarzer Pfeil) finden sich am Knochen in Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau). (serielle Darstellung zu Abb. 34).

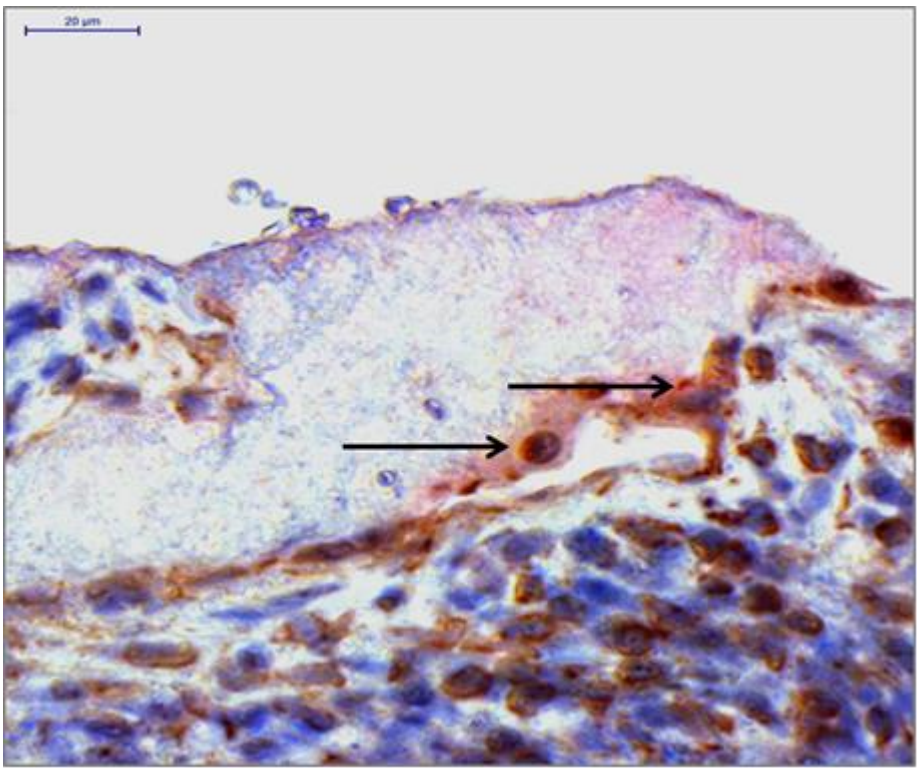


Abb. 36: Vimentin^{+}IL-32^{+}-Zellen (schwarze Pfeile) finden sich am Knochen in Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau).

2.5 IL-32 Expression von Epithelzellen

Nahezu alle Epithelzellen der nasalen Schleimhaut bei GPA und CRS exprimierten IL-32 (Abb. 37/38). Deutliche Unterschiede zwischen GPA und CRS ließen sich zumindest nach grober lichtmikroskopischer Durchsicht nicht erkennen. Daher wurde auf eine genauere semi-quantitative Auswertung an dieser Stelle verzichtet.

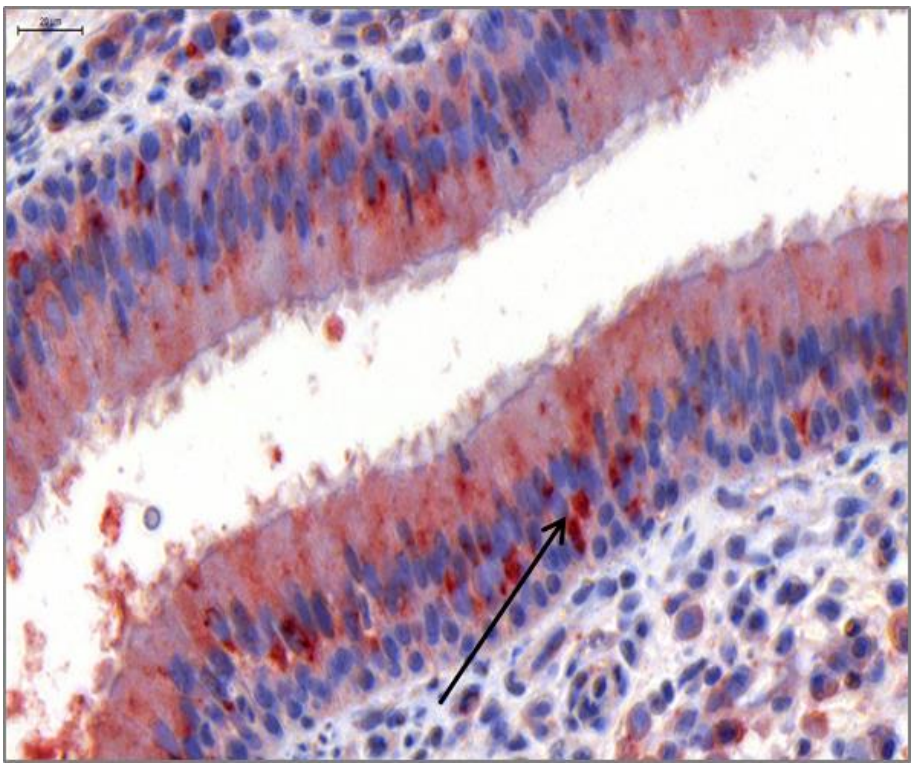


Abb. 37: IL-32^{+} Epithelzellen (rot, schwarzer Pfeil) in Nasenschleimhaut bei GPA. Kerne nach Hämalaun (blau).

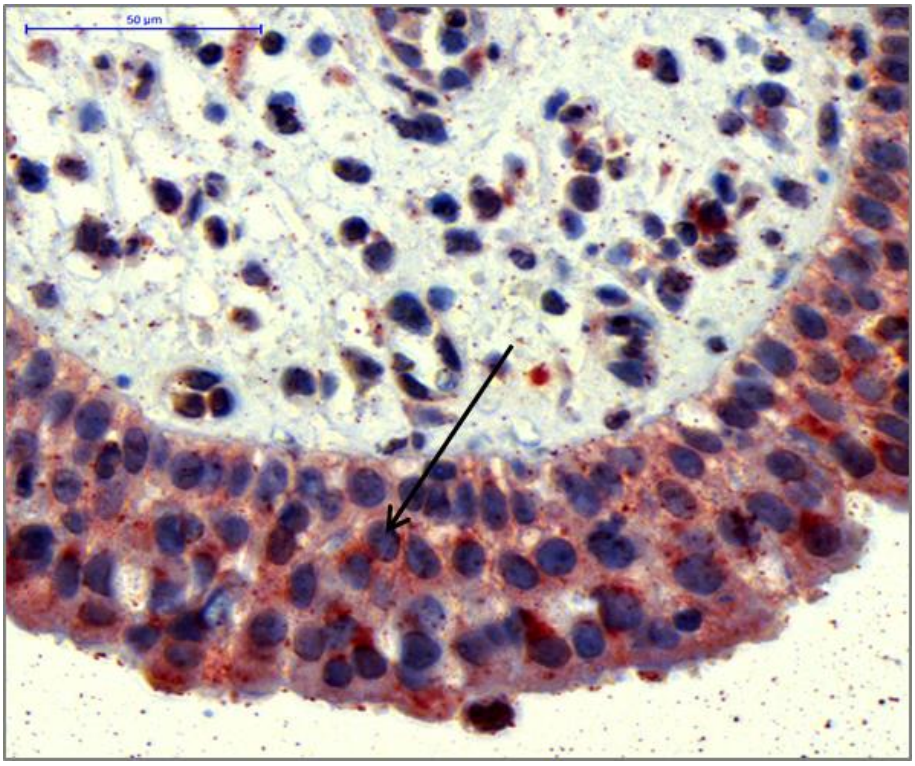


Abb. 38: IL-32^{+} Epithelzellen (rot, schwarzer Pfeil) in Nasenschleimhaut bei CRS. Kerne nach Hämalaun (blau).

3. Korrelationsanalysen

3.1 Keine Korrelationen zwischen verschiedenen IL-32$^+$ Zelltypen

Mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman wurde untersucht, ob sich Hinweise auf Zusammenhänge zwischen den verschiedenen IL-32-exprimierenden Zelltypen in Nasenschleimhautgewebe bei GPA und CRS finden. Es zeigt sich sowohl bei der GPA ($r=-0.200$; $p>0.05$) als auch bei der CRS ($r=0.152$; $p>0.05$) keine Korrelation zwischen den CD68$^+$IL-32$^+$ Zellen und den Vimentin$^+$IL-32$^+$ Zellen. Desgleichen fand sich keine Korrelation zwischen den CD68$^+$IL-32$^+$ Zellen und den CD4$^+$IL-32$^+$ Zellen. Dies galt sowohl für die GPA ($r=-0.164$; $p>0.05$) als auch die CRS ($r=0.127$; $p>0.05$). Ähnlich verhielt es sich mit den Vimentin$^+$IL-32$^+$ Zellen und den CD4$^+$IL-32$^+$ Zellen, wiederum sowohl bei der GPA ($r=0.103$; $p>0.05$) als auch bei der CRS ($r= -0.018$; $p>0.05$).

3.2 Kein Zusammenhang zwischen der Expression von IL-10 und IL-32 in der granulomatösen Entzündung

In der granulomatösen Entzündung fanden sich einige IL-10$^+$ Zellen (Abb. 39). Insgesamt ist die Anzahl der IL-10$^+$ Zellen in Nasenschleimhautgewebe bei der GPA allerdings deutlich geringer als die Anzahl der IL-32$^+$ Zellen (Tab. 10). Im Hinblick auf eine Korrelation von IL-32 und IL-10 wurde seriell (d.h. in den gleichen Arealen einer Größe von 2.400.000 µm^2 für jeweils n=5) die Anzahl der IL-10$^+$ Zellen und die Anzahl der IL-32$^+$ Zellen ermittelt. Es ergab sich keine Korrelation zwischen der IL-10- und der IL-32-Expression ($r=-0.2$; $p>0.05$).

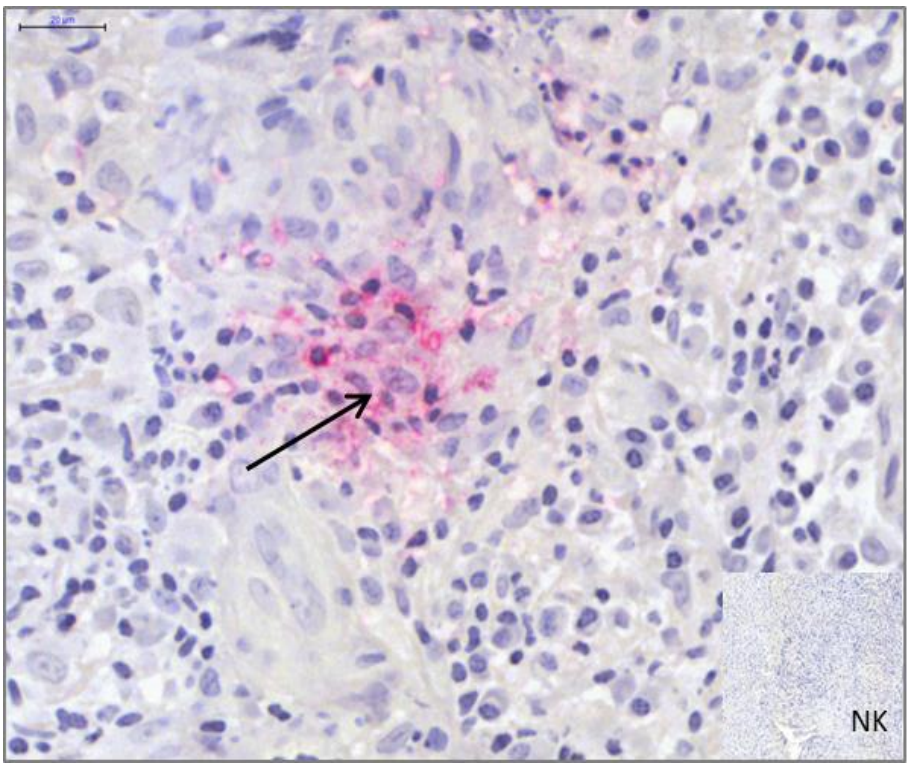


Abb. 39: IL-10$^+$ Zellen (rot, schwarzer Pfeil) waren in der Nasenschleimhaut bei GPA nachweisbar. Kerne nach Hämalaun (blau). NK = Isotypkontrolle.

GPA	IL-10$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2	IL-32$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2
GPA2	598	2821
GPA3	592	1657
GPA4	419	4892
GPA 5	123	6120
GPA 6	88	1708

Tab. 10: Vergleich der Anzahl der IL-10$^+$ und der IL-32$^+$ Zellen in Nasenschleimhaut bei GPA. Es gibt keine Korrelation zwischen den IL-10$^+$ Zellen und den IL-32$^+$ Zellen in der granulomatösen Entzündung.

3.2 Expression von IL-32 und IL-17A in der granulomatösen Entzündung bei GPA.

In der granulomatösen Entzündung fanden sich IL-17A$^+$ Zellen (Abb. 40). Wegen des für die rheumatoide Arthritis beschriebenen wechselseitigen Induktionsvermögens beider Zytokine [Moon et al., 2012] mit konsekutiv gesteigerter Osteoklastenaktivität stellte sich die Frage nach einer Korrelation der IL-17A- mit der IL-32-Expression in der granulomatösen Entzündung der GPA. Im Hinblick auf eine Korrelation von IL-32 und IL-17A wurde seriell (d.h. in den gleichen Arealen einer Größe von 2.400.000 µm^2 für jeweils n=5) die Anzahl der IL-17A$^+$ Zellen und die Anzahl der IL-32$^+$ Zellen ermittelt. Angesichts eines p-Wertes von 0.0833 und einem r-Wert von 0.9 waren zwar die statistischen Voraussetzungen für eine Korrelation nicht erfüllt, aber im Vergleich mit den o.g. Korrelationsanalysen (und unter Berücksichtigung der niedrigen n-Zahl) könnten diese Werte tendenziell auf einen Zusammenhang zwischen der IL-17A und der IL-32-Expression hindeuten (Abb. 41).

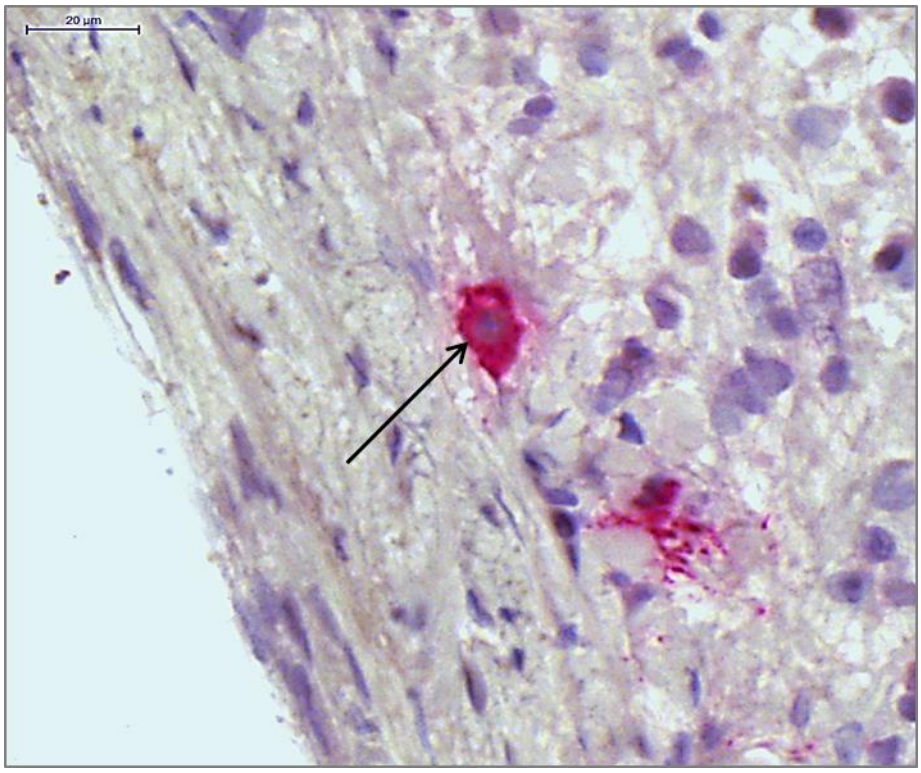


Abb. 40: IL-17A$^+$ Zellen (rot, schwarzer Pfeil) in Nasenschleimhaut bei GPA.

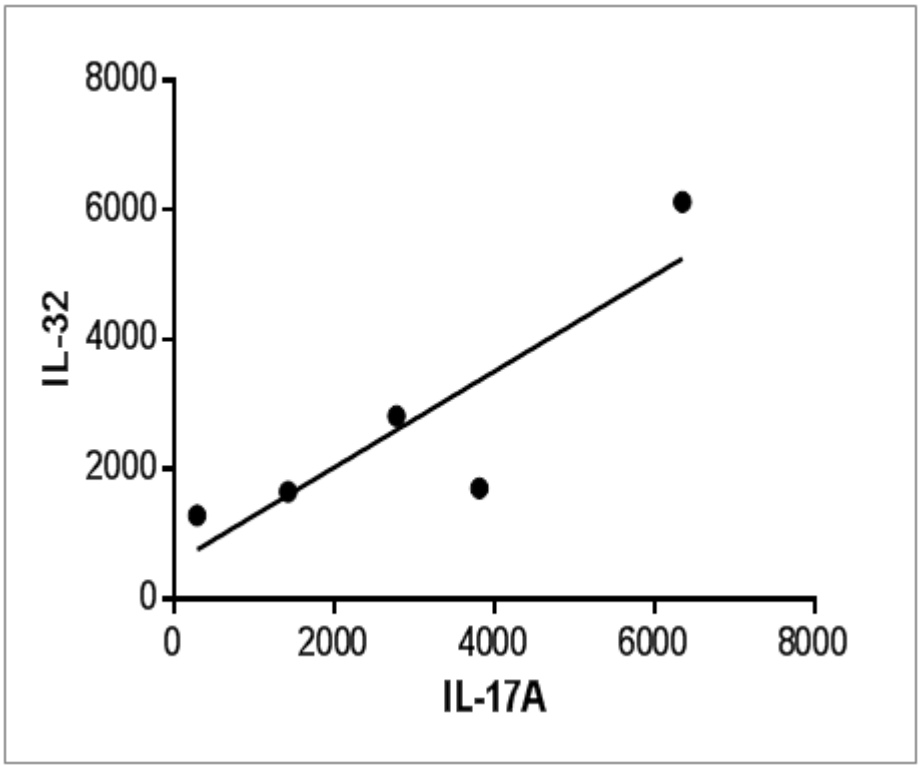


Abb. 41: Anzahl der IL-17A$^+$ und der IL-32$^+$ Zellen in Nasenschleimhaut bei GPA. Es besteht die Tendenz einer positiven Korrelation (r=0.9; p=0.0833) zwischen der IL-17A- und der IL-32-Expression in der granulomatösen Entzündung.

4. IL-32α Expression im Nasenschleimhautgewebe bei GPA im Vergleich mit CRS

4.1 Kolokalisation von IL-32α mit CD66b in Nasenschleimhautgewebe

Die bisherigen Resultate zeigten, dass Makrophagen und Fibroblasten einen Großteil der IL-32$^+$ Zellen im Nasenschleimhautgewebe bei GPA und CRS darstellen. Des Weiteren stellte sich die Frage nach einer IL-32α Expression durch neutrophile Granulozyten bei GPA im Vergleich zur CRS. Als Marker für neutrophile Granulozyten wurden CD66b und PR3 verwendet. Hierfür wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit anschließender konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Bei der Auszählung wurde darauf geachtet, in den seriellen Schnitten 10 HPF (high power fields, x400) mit vergleichbarer Lokalisation auszuwerten. Unterschiede zwischen GPA und CRS in der Anzahl der IL-32α$^+$CD66b$^+$ Zellen wurden nicht beobachtet, wie die semi-quantitative Auswertung von je zehn HPF pro Biopsat zeigt (Abb. 42). Im Einzelnen findet fanden sich IL-32α$^+$CD66b$^+$ neutrophile Granulozyten sowohl in Nasenschleimhautgewebe bei der GPA als auch bei der CRS (Abb. 43, 44). Im gezeigtem Biopsat bei GPA (Abb. 43) fand sich ein fokal akzentuiertes Färbemuster von IL-32α$^+$CD66b$^+$ Neutrophilen, welches auf die Präsenz von Mikroabszessen deutet (Tab. 11, GPA9), wohingegen die CRS ein diffus verteiltes Färbemuster präsentiert. Interessanterweise fanden sich auch Zellen, welche IL-32α zu exprimieren scheinen, aber nicht CD66b.

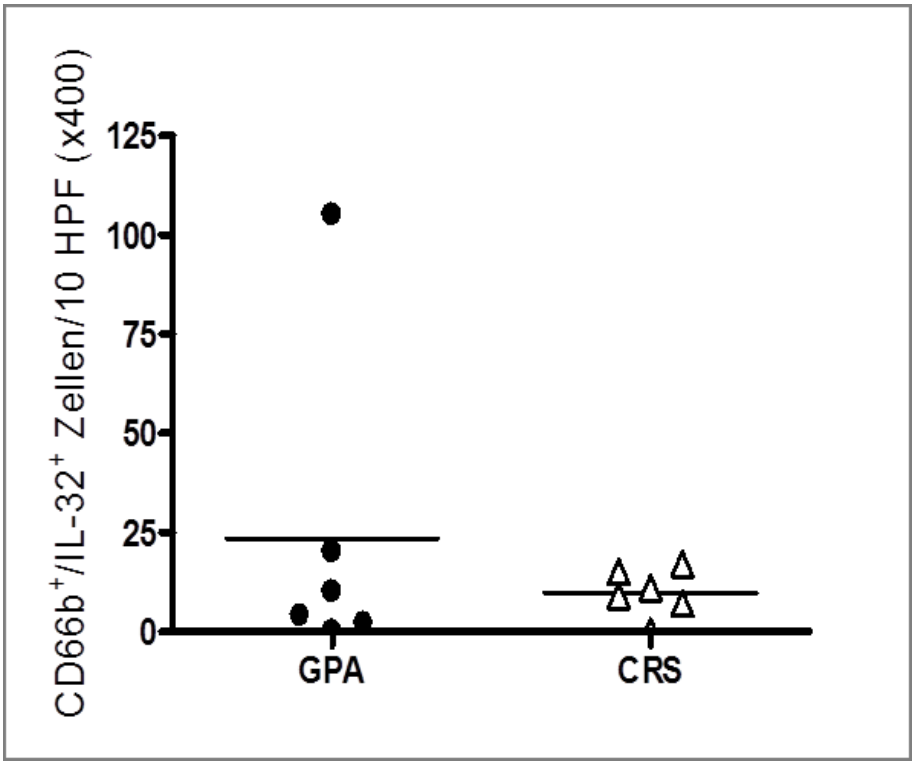


Abb. 42: Kein Unterschied zwischen GPA und CRS in der Anzahl der IL-32$^+$αCD66b$^+$ Zellen in Nasenschleimhaut (p>0.05).

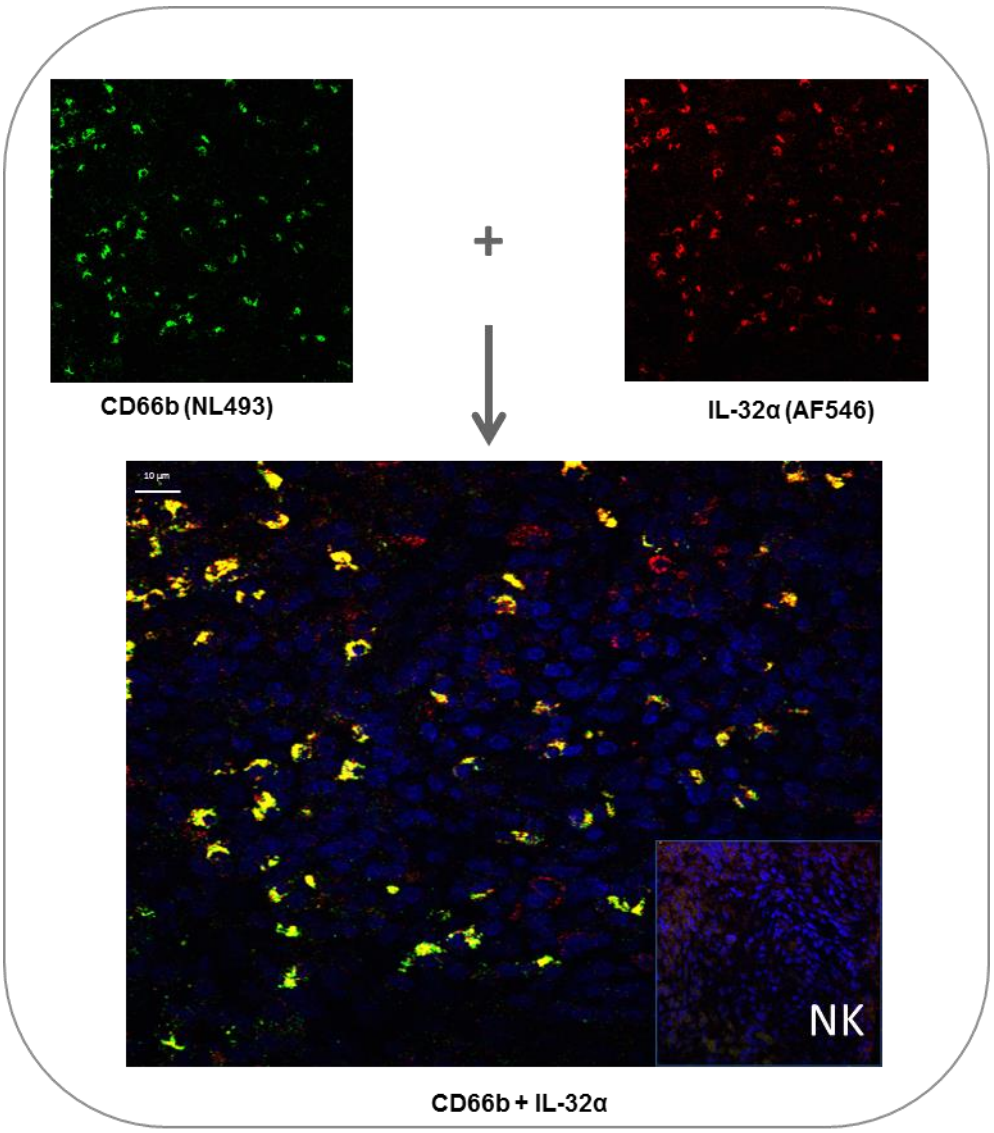


Abb. 43: IL-32α$^+$ (rot) und CD66b$^+$ (grün) neutrophile Granulozyten in Nasenschleimhautgewebe bei GPA, dargestellt mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die gelb markierten Zellen stellen IL-32α$^+$ neutrophile Granulozyten dar. Teilweise sind auch gelappte Kerne zu erkennen. (NK = Negativkontrolle, x400).

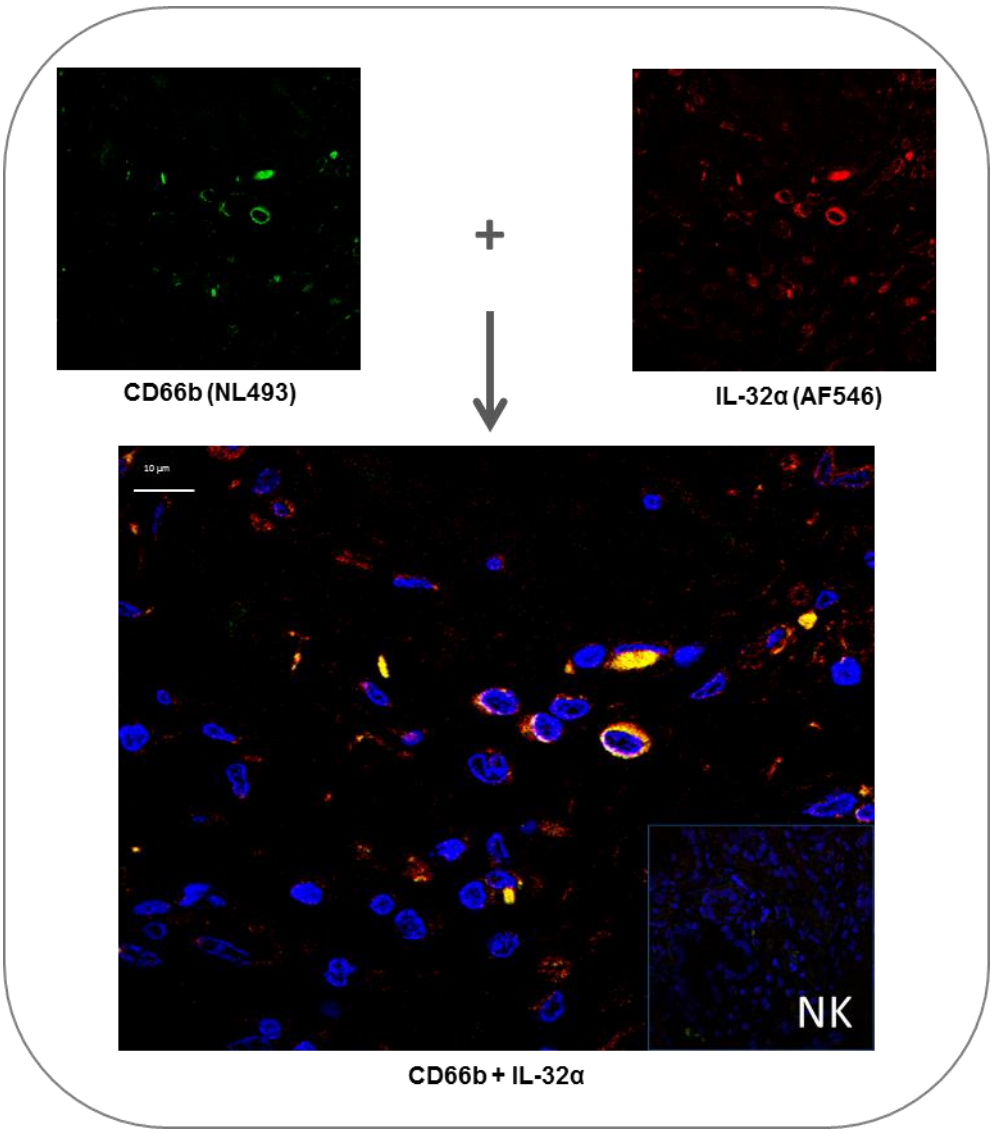


Abb. 44: IL-32α$^+$ (rot) und CD66b$^+$ (grün) Immunfluoreszenzdoppelfärbung in Nasenschleimhautgewebe bei CRS, dargestellt mittels konfokaler Mikroskopie. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die Abbildung zeigt, dass im Nasenschleimhautgewebe bei CRS IL32α mit CD66b auf neutrophilen Granulozyten kolokalisiert ist (IL-32α$^+$CD66b$^+$ Zellen: gelb; NK = Negativkontrolle, x630).

GPA	IL32-α$^+$CD66b$^+$ 10 HPF (x400)	CRS	IL32-α$^+$CD66b$^+$ 10 HPF (x400)
GPA 2	20	**CRS 4**	0
GPA 3	4	**CRS 5**	9
GPA 4	2	**CRS 6**	7
GPA 5	10	**CRS 7**	17
GPA 9	105	**CRS 9**	15
GPA 10	0	**CRS 10**	11

Tab. 11: Semi-quantitative Auswertung von IL-32α$^+$CD66b$^+$ Zellen anhand von je 10 Gesichtsfeldern mit 400-facher Vergrößerung (HPF, high power fields). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der IL-32α$^+$CD66b$^+$ Zellen zwischen GPA und CRS.

4.2. Kolokalisation von IL-32α mit PR3 in Nasenschleimhautgewebe

Nachdem IL-32α$^+$CD66b$^+$ neutrophile Granulozyten in der Nasenschleimhaut beobachtet wurden, stellte sich die Frage nach einer Kolokalisation von IL-32α mit PR3. Insgesamt wurde kein Unterschied in der Anzahl der IL-32α$^+$PR3$^+$ Zellen zwischen GPA und CRS festgestellt (Abb. 45). Es wurde sowohl auf einigen neutrophilen Granulozyten in der Nasenschleimhaut bei GPA als auch CRS eine Kolokalisation von IL-32α mit PR3 gefunden (Abb. 46/47). In Analogie zur IL-32α/CD66b-Färbung wurde im Nasenschleimhautgewebe eines GPA-Patienten eine deutlich erhöhte Anzahl von IL-32α$^+$PR3$^+$ Zellen gefunden (Tab. 12, GPA 9). Es handelte sich um ein Gewebe mit Mikroabszessen in einer frühen Manifestationsform der granulomatösen Entzündung. Obwohl IL-32α$^+$PR3$^+$ neutrophile Granulozyten in den übrigen Geweben bei GPA in vergleichsweise geringer Zahl detektiert wurden, war nicht auszuschließen, dass es in Geweben mit vielen Mikroabszessen eine sich auf die Entzündung substantiell auswirkende Interaktion zwischen IL-32α und PR3 gibt.

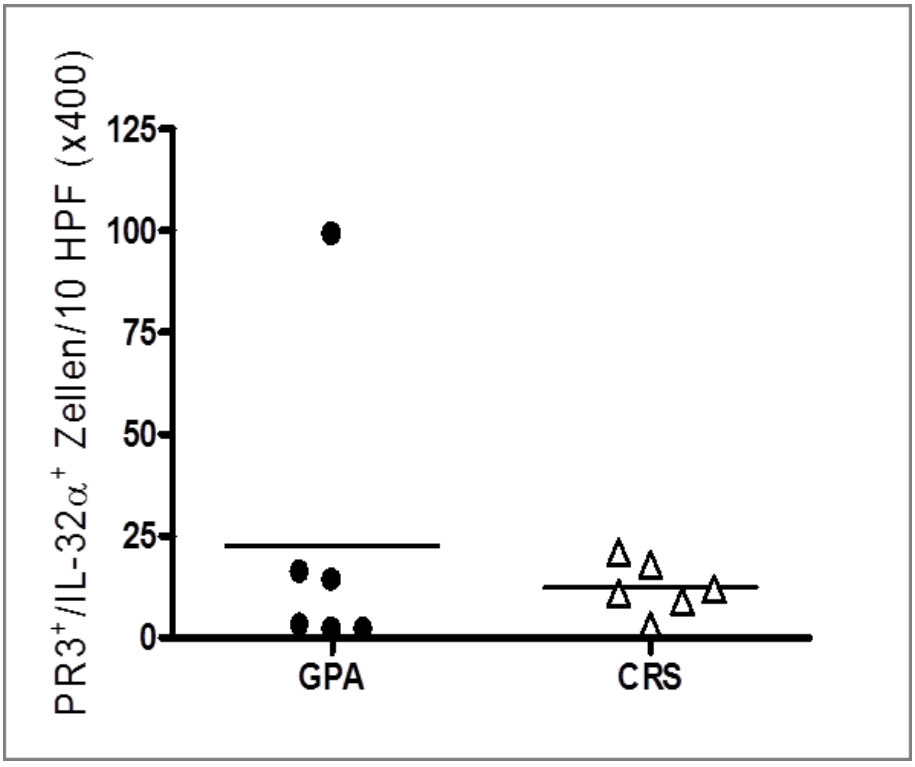


Abb. 45: Kein Unterschied zwischen GPA und CRS in der Anzahl der IL-32α$^+$PR3$^+$ Zellen in Nasenschleimhaut (p>0.05).

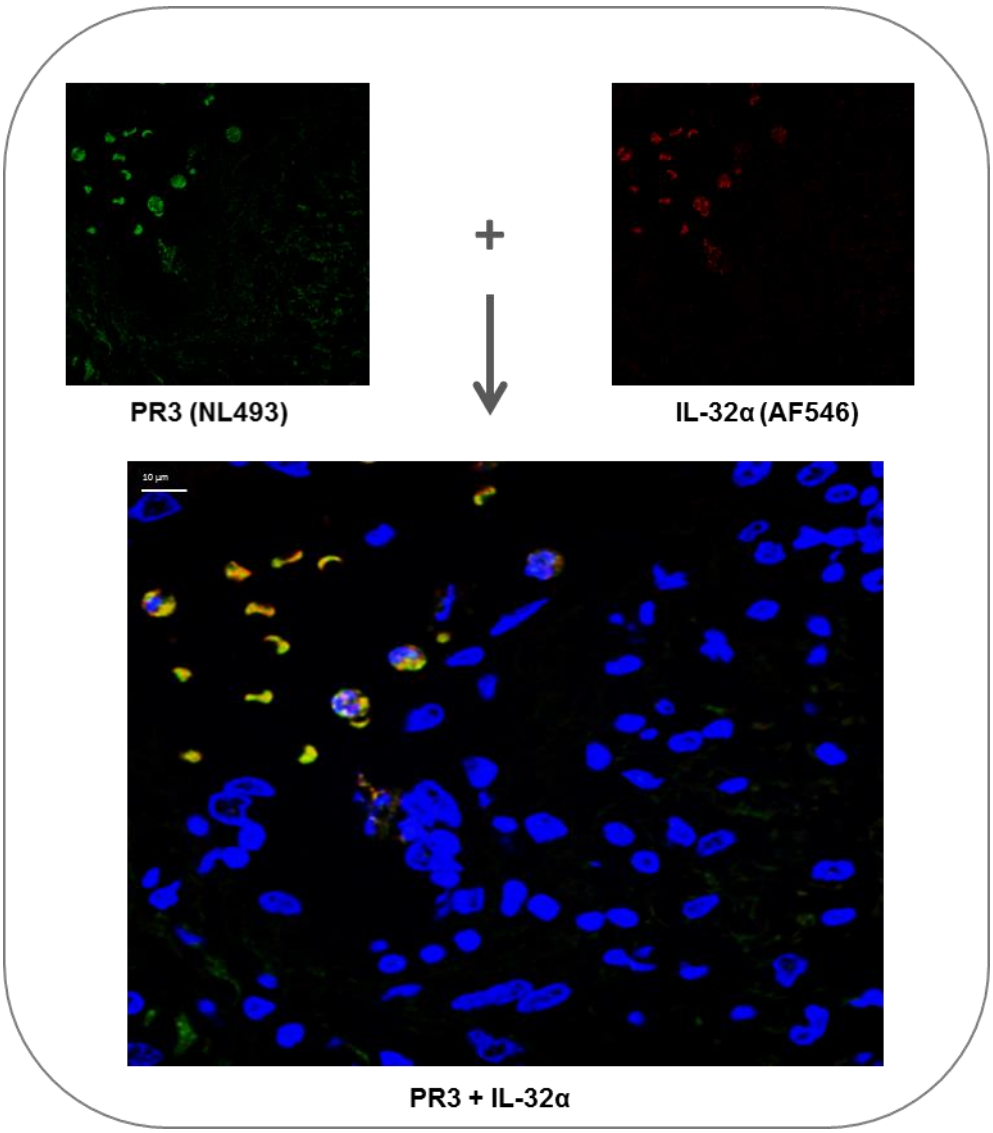


Abb. 46: IL-32α$^+$ (rot) und PR3$^+$ (grün) Immunfluoreszenzdoppelfärbung in Nasenschleimhautgewebe bei GPA, dargestellt mittels konfokaler Mikroskopie. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Der gelbe Farbeindruck zeigt eine Kolokalisation von IL-32α und PR3. Teilweise sind gelappte Kerne der neutrophilen Granulozyten zu erkennen (x400).

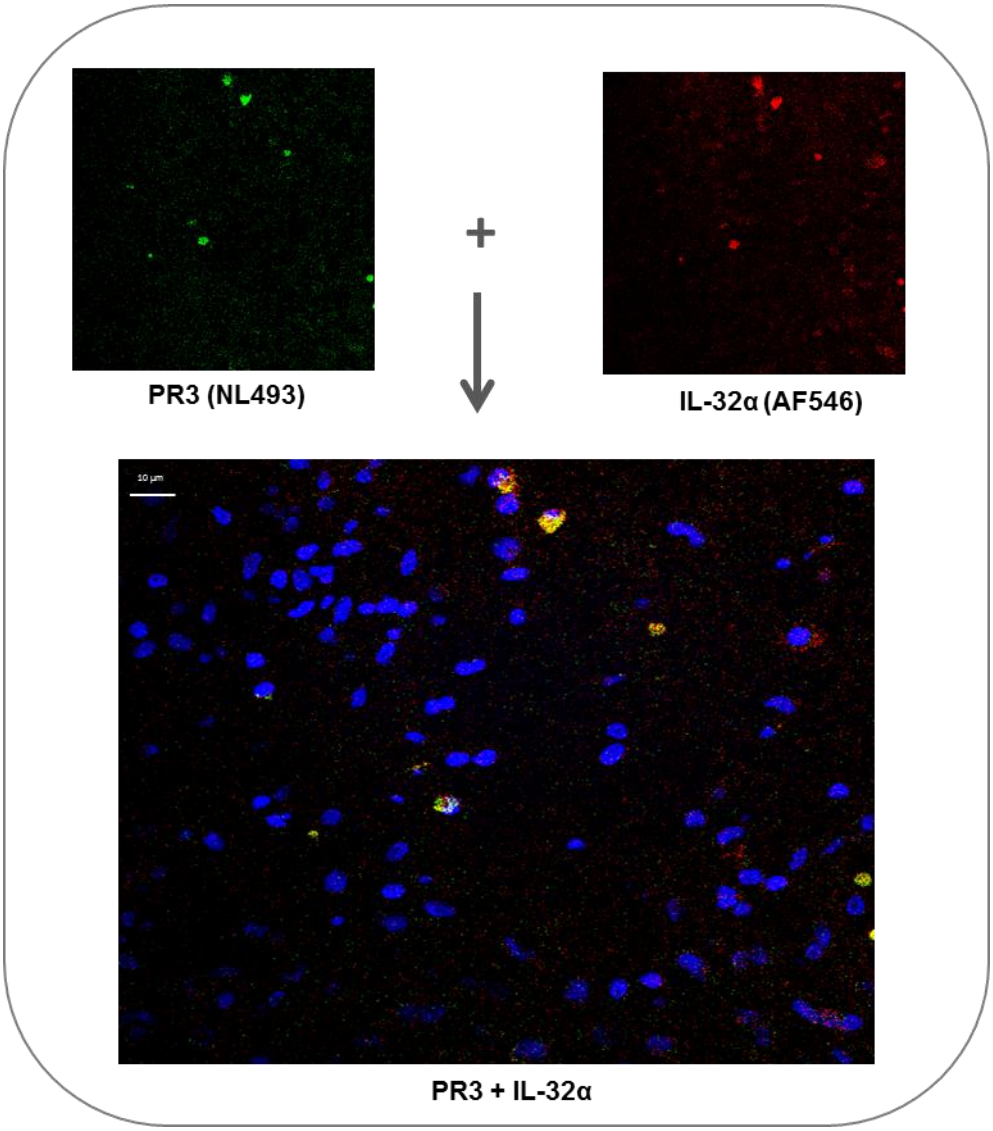


Abb. 47: IL-32α$^+$ (rot) und PR3$^+$ (grün) Immunfluoreszenzdoppelfärbung in Nasenschleimhautgewebe bei CRS, dargestellt mittels konfokaler Mikroskopie. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Der gelbe Farbeindruck zeigt die Kolokalisation von IL-32α und PR3. Teilweise sind gelappte Kerne der neutrophilen Granulozyten zu erkennen. (x400).

GPA	IL32α^{+}PR3^{+} 10 HPF (x400)	CRS	IL32α^{+}PR3^{+} 10 HPF (x400)
GPA 2	16	**CRS 4**	3
GPA 3	3	**CRS 5**	11
GPA 4	2	**CRS 6**	9
GPA 5	14	**CRS 7**	21
GPA 9	99	**CRS 9**	12
GPA 10	2	**CRS 10**	18

Tab. 12: Semi-quantitative Auswertung von IL-32α^{+}PR3^{+} Zellen anhand von je 10 Gesichtsfeldern mit 400-facher Vergrößerung (HPF, high power fields). Zwischen GPA und CRS zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der IL-32α^{+}PR3^{+} Zellen.

Diskussion

Die Pathogenese der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist bisher nur zum Teil verstanden. Sowohl i*n-vivo* und i*n-vitro* Experimente als auch klinische Beobachtungsstudien unterstützen die Hypothese einer pathogenetischen Relevanz von Autoantikörpern, den sogenannten Anti-Neutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörpern (ANCA) in der GPA [Jennette et al., 2013]. ANCA binden dabei bei der GPA an das Autoantigen PR3, welches in den primären Granula der neutrophilen Granulozyten und Peroxidase-positiven Lysosomen von Monozyten lokalisiert ist [Falk & Jennette, 2010]. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) haben genetische Risikofaktoren in Form von Polymorphismen für ein MHC-Klasse-II-Gen (*HLA-DPB*0401*), das Autoantigen PR3, Alpha-1-Antitrypsin sowie die Signaltransduktion von T- und B-Lymphozyten regulierende Proteine (PTPN 22) identifiziert [Lyons et al., 2012, Holle & Gross, 2013]. Ebenso wie die Spezifität der ANCA (PR3-spezifische ANCA bei der GPA, Myeloperoxidase-(MPO)-ANCA bei der mikroskopischen Polyangiitis, MPA) zur Differenzierung der ANCA-assoziierten Vaskulitiden genutzt werden kann, grenzt die neutrophilenreiche granulomatöse Entzündung im oberen und/oder unteren Respirationstrakt die GPA von der MPA ab [Müller et al., 2013]. Neben den PR3-ANCA zeigen aktuelle Forschungsergebnisse, dass weitere Faktoren wie bakterielle Infektionen, epigenetische Dysregulationen, aberante T-Zell-Antworten, proinflammatorische Zytokine und eine Aktivierung des Komplementsystems an der Ausbildung der Kleingefäßvaskulitis und der granulomatösen Entzündung bei der GPA beteiligt sind [Lamprecht et al., 2009]. Epigenetische Dysregulationen scheinen z.B. für eine erhöhte PR3-Expression in den neutrophilen Granulozyten bei GPA verantwortlich zu sein [Ciavatta et al., 2010]. Eine besondere Form des bei der GPA zu beobachtenden Zelltodes neutrophiler Granulozyten stellt die Formation von „neutrophil extracellular traps“ (NET´s) dar. NETs bestehen aus einem extrazellulärem Geflecht aus Chromatin und anderen Bestandteilen, u.a. auch der PR3. NETs können so dem Immunsystem PR3 präsentieren und bei der GPA so möglicherweise zur Pathogenese beitragen [Kessenbrock et al., 2009]. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Pathogenese der GPA das Zusammenspiel von Umweltfaktoren sowie endogenen Faktoren beinhaltet.
Im Hinblick auf das postulierte Zusammenspiel mehrerer exogener und endogener Faktoren, welches u.a. unter Beteiligung verschiedener Immunzellen abläuft, ist die Analyse des in der GPA vorliegenden Zytokinprofils wichtig. Hierbei muss vor allem dem Expressionsmuster der Zytokine im Gewebe des oberen und unteren Respirationstraktes Aufmerksamkeit geschenkt werden, da es sich um den primären Manifestationsort der granulomatösen Entzündung und zugleich, z.B. in Bezug auf das nasale Epithel, die erste Verteidigungsbarriere gegen exogene Einflussfaktoren handelt.

In dieser Arbeit steht folglich die Expression des hauptsächlich mit pro-inflammatorischen Wirkungen assoziierten Zytokins IL-32 in der Nasenschleimhaut bei GPA im Fokus. Zahlreiche chronisch-entzündliche Erkrankungen sind durch eine Überexpression von IL-32 charakterisiert [Heinhuis et al., 2012]. Humanes IL-32 kommt in sechs Splicevarianten (α, β, γ, δ, ε und ζ) vor, wobei IL-32γ die längste Isoform darstellt [Kim et al., 2005, Dinarello & Kim, 2006]. IL-32γ weist eine hohe biologische Aktivität auf, gemessen am Ausmaß der Induktion von IL-6 und TNFα [Choi et al., 2008]. Zudem wurde gezeigt, dass IL-32γ *in vitro* die Reifung und Aktivierung (Produktion von IL-12 und IL-6) von murinen dendritischen Zellen induziert [Jung et al. 2011] und zur Bildung von Osteoklasten beiträgt [Kim et al., 2010]. Netea et al. (2005) zeigten, dass IL-32γ über Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition-Rezeptoren, PRR) eine Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und IL-6 aus humanen mononukleären Leukozyten bewirkt. Goda et al. (2006) zeigten, dass in *in vitro* aktivierten T-Lymphozyten die IL-32β Isoform die am stärksten exprimierte Isoform ist. Die Isoform IL-32α wird wesentlich von Epithelzellen exprimiert, z.B. in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und der COPD [Shioya et al., 2007, Ko et al., 2011], aber auch von (Myo)Fibroblasten [Nishida et al., 2008]. Interessanterweise wurde zudem berichtet, dass die IL-32α-Isoform mit membrangebundener PR3 interagiert [Novick et al., 2006]. Während im Gewebe gesunder Individuen nahezu keine IL-32 Expression nachweisbar ist, wird IL-32 in chronisch entzündeten Geweben bei der rheumatoiden Arthritis (RA), chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Riesenzellarteritis und ankylosierenden Spondylitis exprimiert [Joosten et al., 2006, Shioya et al., 2007, Ciccia et al., 2011, Ciccia et al., 2012].

Bisher liegt eine Studie zur Expression von IL-32 bei der GPA vor. Diese Arbeit zeigte u.a. bei 4 von 5 Patienten erhöhte IL-32γ mRNA-Werte im peripheren Blut im Vergleich zu 2 gesunden Kontrollen [Bae et al., 2012]. In meiner hier vorgelegten Doktorarbeit konzentrierte ich mich hingegen auf die Analyse der Expression von IL-32 an einem definierten Ort der chronischen Entzündung, *d.h.* der Nasenschleimhaut bei GPA. In dieser Arbeit wurde zunächst anhand von Primern die Expression der IL-32α mRNA Isoform und der nicht-α mRNA Isoformen (β, γ und δ) untersucht. mRNA für die nicht-α Isoformen war in Nasenschleimhautgewebe bei GPA nachweisbar. Eine Probe wies eine schwache Expression der nicht-α Isoformen auf, zeigte aber eine starke Expression von IL-32α mRNA (siehe Abb. 6). Denkbar ist hierbei, dass es sich in Analogie zu anderen Erkrankungen mit erhöhten Mengen von epithelialer IL-32α mRNA um ein Nasenschleimhautgewebe mit einem hohen Anteil von Epithel handelte, [Shioya et al., 2007, Ko et al., 2011]. Für die Beantwortung der Frage, ob die IL-32 Expression eine spezifische pathogenetische Rolle bei GPA spielt, ist die Analyse einer entsprechenden Krankheitskontrolle wichtig. Diese erfolgte, indem die IL-32 Proteinexpression in

Nasenschleimhautgewebe bei GPA im Vergleich mit chronischer Rhinosinusitis (CRS) untersucht wurde. Diese Kontrolle wurde aufgrund der vergleichbaren Gewebestruktur gewählt und ist bereits in anderen Studien zur GPA-Pathogenese verwendet worden [Laudien et al., 2011]. Für die CRS wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Mengen an (epithelialer) IL-32 mRNA nachgewiesen [Soyka et al., 2012]. Daher wurde auf eine eigene mRNA-Analyse bei CRS verzichtet. Für die Untersuchungen der IL-32 Proteinexpression wurden kommerziell erwerbliche Antikörper ausgewählt, welche die vier hauptsächlich exprimierten Isoformen (α,β,γ,δ) erkennen. In den immunhistochemischen Analysen wurden zwischen dem monoklonalen und dem polyklonalen IL-32-Antikörper in der Anzahl der IL-32$^+$ Zellen kein Unterschied festgestellt, allerdings wurden durch den polyklonalen Antikörper (siehe Tab. 4) absolut mehr Zellen angefärbt. Dies kann im Kontext mit der (Poly)Klonalität bzw. der Bindung an mehrere IL-32-Epitope gesehen werden. Vergleicht man die Anzahl der IL-32$^+$ Zellen zwischen GPA und CRS, lässt sich angesichts des P-Wertes von p=0.0556 von einer im Trend leicht erhöhten Anzahl der IL-32$^+$ Zellen bei der GPA sprechen. Dass lediglich ein Trend besteht, könnte daran liegen, dass der Vergleich mit der CRS erfolgt, für die bereits eine erhöhte IL-32 Expression beschrieben ist [Keswani et al., 2013]. Vermutlich stellt auch die Anzahl (n=5) eine Limitation in der Auswertung der Einzelfärbungen dar. In der Nasenschleimhaut sowohl bei der GPA als auch der CRS war das IL-32-Protein nahezu immer intrazytoplasmatisch lokalisiert. In den nekrotischen Arealen der granulomatösen Entzündung, welche als fehlgeschlagener geordneter Zelltod aufgefasst werden könnte [Nikoletopoulou et al., 2013] fand sich auch extrazellulär lokalisiertes IL-32. Insgesamt scheint jedoch die IL-32-Proteinexpression durch intakte Zellen dominierend. Das Untersuchungsergebnis stand damit in Übereinstimmung mit der Literatur, in der IL-32 als hauptsächlich intrazellulär exprimiert beschrieben wird und eine extrazelluläre Freisetzung nur als Resultat von Zelltod (z.B. Aktivierungs-induzierter Zelltod) vorzukommen scheint [Goda et al., 2006, Heinhuis et al., 2012].
In nasalen Polypen bei der CRS wurden u.a. CD3$^+$ T Zellen als ebenfalls IL-32-exprimierende Zellen gezeigt [Keswani et al., 2011]. IL-32$^+$CD8$^+$ T Zellen wurden in der Lunge bei der COPD beschrieben [Calabrese et al., 2008]. In der vorliegenden Arbeit fand sich hinsichtlich der Anzahl von CD4$^+$IL-32$^+$ T-Lymphozyten kein Unterschied zwischen der GPA und der CRS. Vielleicht deuten die teilweise höheren Zahlen von CD4$^+$IL-32$^+$ Zellen bei der CRS auf eine größere Rolle von IL-32$^+$ T-Zellen im Vergleich zur GPA hin (siehe Abb. 12).
In Analogie zur RA und COPD [Joosten et al., 2006, Calabrese et al., 2008] konnte ich in der vorgelegten Arbeit eine erhöhte Anzahl von CD68$^+$IL-32$^+$ Makrophagen in der granulomatösen Entzündung bei der GPA nachweisen (siehe Abb. 16). Da dies *a priori* nicht auf eine erhöhte Anzahl an Makrophagen in der granulomatösen Läsion bei der GPA

gegenüber der entzündlichen Läsion bei der CRS zurückzuführen war, war die vermehrte Anzahl von $CD68^{+}IL\text{-}32^{+}$ Makrophagen als charakteristischer Unterschied zwischen der GPA und der CRS aufzufassen. Bei der GPA differenzieren sich die aus den Monozyten entwickelnden Makrophagen mit zunehmender Veränderung der initialen Gewebsläsion, *d.h.* im Verlauf der Granulombildung zum Teil zu mehrkernigen Riesenzellen [Mark et al., 1988]. Diese mehrkernigen Riesenzellen exprimieren ebenso $IL\text{-}32^{+}$ wie jene Makrophagen, welche pallisadenartig um die Nekrosen angeordnet sind (siehe Abb. 18), so dass man von einer substantiellen IL-32 Expression in der granulomatösen Entzündung sprechen kann. Die Ergebnisse sind kongruent mit Untersuchungen bei der Riesenzellarteriitis. Hierbei fanden Ciccia et al. (2011) ebenfalls $IL\text{-}32^{+}$ Riesenzellen in der entzündeten Arterienwand und stellten eine Hochregulierung von IL-32 mRNA und IL-32 Protein fest, die sich in einer entsprechenden Korrelation widerspiegelte.

Des Weiteren kann die erhöhte Anzahl von $IL\text{-}32^{+}$ Makrophagen in der granulomatösen Entzündung im Zusammenhang mit der ossären Destruktion bei GPA gesehen werden. Eine Stimulation mit löslichem RANKL und M-CSF führte zu einer vermehrten Anzahl von Tartrat-resistant acid phosphatase $(TRAP)^{+}$ Osteoklasten-ähnlichen Zellen bei der GPA [Park et al., 2012]. *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass Monozyten unter dem Einfluss von IL-32 nicht nur zu Makrophagen differenzieren [Netea et al., 2008], sondern auch zu Osteoklasten-ähnlichen $TRAP^{+}$ Zellen [Kim et al., 2010, Moon et al., 2012]. Im Hinblick auf die Bildung von Osteoklasten wurde neben einer synergistischen Wirkung von IL-32 und IL-17 *in vitro* gezeigt, dass IL-17 *in situ*, d.h. in Synovialflüssigkeit zur Osteoklastenbildung bei der RA beiträgt [Kotake et al., 1999 Moon et al., 2012]. Ergänzend wurde deshalb in dieser Arbeit die Expression von IL-17A im nasalen Gewebe bei der GPA untersucht. Es ergab sich eine Tendenz für eine positive Korrelation von IL-32 mit IL-17A ($r=0.9$; $p=0.0833$; siehe Abb. 41).

Ein in diesem Kontext wichtiges Ergebnis war der Nachweis einer erhöhte Anzahl von $Vimentin^{+}IL\text{-}32^{+}$ Zellen in der granulomatösen Entzündung bei der GPA im Vergleich zur CRS (siehe Abb. 26). Dieser Unterschied ist nicht *a priori* auf eine unterschiedliche Anzahl an $Vimentin^{+}$ Zellen bei der GPA und der CRS zurückzuführen (siehe Abb. 31). Obwohl Vimentin als definierter Marker für Fibroblasten verwendet wird [Karouzakis et al., 2009, Barone et al., 2013], muss man berücksichtigen, dass Vimentin auch von anderen Zellen als Fibroblasten, z.B. Fibrozyten – einer alternativen Differenzierungsform von Monozyten – oder Endothelzellen exprimiert werden kann [Reilkoff et al., 2011, Barone et al., 2013]. Um Fehler zu minimieren, wurde daher bei der Auswertung der Vimentin-Gewebsfärbungen zusätzlich auf die Morphologie von Fibroblasten, d.h. große spindelförmige Zellen, geachtet.

Im Hinblick auf die Rolle von gewebsständigen Fibroblasten befassen sich viele Studien mit den Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten (FLS) in der RA, weil den FLS eine

Schlüsselrolle in der Pannusformation und inflammatorischen Gelenkdestruktion zugeschrieben wird [Bottini et al., 2013]. Während eine Stimulation von RA-FLS mit IFNγ oder TNFα hauptsächlich die IL-32 mRNA Isoformen β,γ,δ induzierte, fand sich eine intrazelluläre Proteinexpression von IL-32α nur nach Stimulation mit TNFα [Alsaleh et al., 2010]. Damit einhergehend beschrieb eine weitere Studie, dass die Stimulation mit TNFα zu einer substantiellen Expression von IL-32γ mRNA in FLS von Arthritis-Patienten führt. Weil andererseits IL-32 zu einer verlängerten TNFα Produktion beiträgt, postulierte diese Studie die Induktion einer autoinflammatorischen Schleife von IL-32 und TNFα in der synovialen Entzündung bei RA [Heinhuis et al., 2011]. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Bestimmung der IL-32 mRNA Expression von GPA-Fibroblasten durchgeführt, da diese bereits gezeigt worden ist [Kesel et al., 2012]. In der vorliegenden Arbeit interessierte ich mich dafür, ob eine Produktion von IL-32 auf Proteinebene in nasalen Fibroblasten bei der GPA stattfindet. In der granulomatösen Entzündung wird IFNγ und TNFα exprimiert [Müller et al., 2000, Komocsi et al., 2002], so dass in Analogie zur RA eine IFNγ- und TNFα-vermittelte IL-32 Expression in der granulomatösen Läsion induziert werden könnte. In der o.g. Studie [Kesel et al., 2012] wurde anhand eines Mausmodelles demonstriert, dass nasale Fibroblasten bei der GPA knorpeldestruierend wirken. Angesichts der Ko-lokalisation von IL-32$^+$ und den Vimentin$^+$ fibroblastenähnlichen Zellen an Stellen mit Knochenarrosion im nasalen Gewebe bei der GPA (siehe Abb. 34/35) kann eine IL-32-vermittelte Aktivierung von knorpel- und knochenarrodierenden Fibroblasten vermutet werden.

Die Expression der Isoform IL-32β ist mit einer Heraufregulierung der IL-10 Produktion assoziiert [Kang et al., 2009]. Zudem wurde berichtet, dass das Spleißen der natürlich vorkommenden Isoform IL-32γ in IL-32β als Kontrollmechanismus dient und so die chronische Entzündung reduziert werden kann [Heinhuis et al., 2011b, Heinhuis et al., 2012]. Des Weiteren wurde bei der ankylosierenden Spondylitis eine zeitabhängige IL-32γ-induzierte Produktion von IL-10 in Epithelzellen demonstriert und folglich eine protektive Rolle für IL-32 in der Spätphase der Entzündung postuliert [Ciccia et al., 2012]. Deshalb untersuchte ich auch die Expression von IL-10 in der granulomatösen Entzündung. Es fanden sich IL-10$^+$ Zellen in der granulomatösen Entzündung, allerdings in einer geringeren Anzahl als die IL-32$^+$ Zellen. Es gab keine Korrelation zwischen den IL-10$^+$ Zellen und den IL-32$^+$ Zellen. Diese Ergebnisse könnten auf einen Mangel an Regulation, z.B. durch die Isoform IL-32β hindeuten, und somit eine Aufrechterhaltung der Entzündung implizieren. Eine niedrige Anzahl an IL-10$^+$ Zellen könnte aber auch mit der verminderten Anzahl von regulatorischen B-Zellen bei den ANCA-assoziierten Vaskulitiden zusammenhängen, die kürzlich berichtet wurde [Wilde et al., 2013]. Interessanterweise ist eine erniedrigte IL-10 Produktion in der Remissionsphase mit einer höheren Rezidivrate bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden verknüpft [Hruskova et al., 2009].

Ein weiterer Zelltypus, für welchen eine Überexpression von IL-32 mRNA und Protein beschrieben ist, stellen Darmepithelzellen beim Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa sowie nasale Epithelien bei der CRS dar [Shioya et al., 2007, Keswani et al., 2011, Soyka et al., 2012]. In den hier beschriebenen Untersuchungen fand sich sowohl bei der GPA als auch bei der CRS eine vergleichbare, *d.h.* immunhistochemisch nicht unterscheidbare Anzahl von IL-32$^+$ Epithelien in der Nasenschleimhaut. Hauptsächlich wegen dieses fehlenden Unterschiedes wurde auf eine genauere Analyse der epithelialen IL-32 Expression in der granulomatösen Entzündung verzichtet.

Aufgrund der Ergebnisse der o.g. Studie von Novick et al. (2006) stellte sich die Frage nach einer Kolokalisation von IL-32α mit PR3 in der Nasenschleimhaut bei der GPA. Die Kolokalisation von IL-32α mit dem Autoantigen der GPA wäre eine räumliche Voraussetzung für den von Novick und Kollegen (2006) postulierten Mechanismus einer limitierten Spaltung von IL-32α durch membranständige PR3, mit der Folge einer erhöhten pro-inflammatorischen Wirkung des Spaltproduktes. Die Frühphase der entzündlichen Alteration in Nasenschleimhautgewebe bei GPA ist u.a. durch die Ausbildung von Mikroabszessen, welche hauptsächlich aus neutrophilen Granulozyten bestehen, geprägt [Holl-Ulrich, 2009]. In der vorliegenden Arbeit waren in der chronisch granulomatös entzündeten Nasenschleimhaut, *d.h. in situ*, IL-32α$^+$CD66b$^+$ Neutrophile bzw. eine Kolokalisation von IL-32α mit der PR3 auf neutrophilen Granulozyten nachweisbar (siehe Abb. 43/46). Interessanterweise berichten Bae et al. (2012) über eine Koexpression von IL-32γ und PR3 in zirkulierenden polymorphkernigen Leukozyten bei der GPA. Insgesamt ergaben sich keine Unterschiede zwischen der GPA und der CRS, bis auf ein Nasenschleimhautgewebe eines GPA-Patienten, in welchem die erhöhte Anzahl und Lokalisation von IL-32α$^+$ Neutrophilen auf die Präsenz eines Mikroabszesses hindeuten könnte. In Geweben mit zahlreichen Mikroabszessen könnte die Prozessierung von IL-32α durch PR3 zur Verstärkung der pro-inflammatorischen Reaktion bei GPA beitragen.

Zusammenfassend weisen die Resultate dieser Arbeit darauf hin, dass sich die IL-32 Expression in der granulomatösen Entzündung bei der GPA von der chronischen Entzündung bei der CRS unterscheidet. Hierfür ist bei der GPA hauptsächlich die IL-32 Expression durch Fibroblasten und Makrophagen einschließlich multinukleärer Riesenzellen, ausschlaggebend. In Ergänzung zu Befunden aus dem peripheren Blut [Bae et al., 2012] und in Analogie zu anderen rheumatischen Erkrankungen findet sich bei der GPA eine verstärkte Expression von IL-32 in der chronisch entzündeten Nasenschleimhaut. Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass insbesondere die charakteristische histomorphologische Struktur der granulomatösen Entzündung bei der GPA eine substantielle IL-32-Quelle darstellt. Funktionelle Studien müssen Aufschluss geben, ob die Überexpression von IL-32 in der granulomatösen Entzündung und hier speziell durch

die Fibroblasten die Korpel- und Knochendestruktion bei der GPA begünstigt. Weiterhin sollte die Bedeutung von IL-32 im Zusammenhang mit der Überlebensdauer und Mechanismen des Zelltodes von Zellen des Immunsystems in der granulomatösen Entzündung betrachtet werden. Hierbei wären besonders weitere funktionelle Fragestellungen nach unterschiedlichen Signaltransduktionswegen und auch IL-32-Rezeptoren zwischen der GPA und der CRS von Interesse.

Zusammenfassung

Interleukin(IL)-32 ist ein hauptsächlich als pro-inflammatorisch wirksam beschriebenes Zytokin, von dem sechs Isoformen (α-ζ) beschrieben sind. Bei einer Vielzahl von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wurde eine vermehrte IL-32 Expression nachgewiesen. Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA; Wegener) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung ungeklärter Ätiologie. Charakterisiert ist die GPA zum einen durch eine granulomatöse Entzündung im oberen und/oderunteren Respirationstrakt, die u.a. in eine Gewebs- und Knochendestruktion münden kann, zum anderen durch eine systemische Kleingefäßvaskulitis. Die GPA ist mit Proteinase 3-spezifischen Anti-Neutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörpern (PR3-ANCA) assoziiert. Kürzlich wurden bei der GPA erhöhte IL-32γ mRNA-Mengen in peripheren Blutleukozyten sowie gesteigerte IL-32 Serumwerte im Vergleich mit normalen Kontrollen gezeigt. In der hier vorgelegten Arbeit wurde nunmehr die mRNA- und Proteinexpression von IL-32 lokal, *d.h.* in der chronisch entzündeten Nasenschleimhaut, bei der GPA im Vergleich zur unspezifischen chronischen Rhinosinusitis (CRS) mit Hilfe molekularer und immunhistochemischer/Immunfluoreszenz-Untersuchungen analysiert. Hierfür wurde nasales Gewebe (tiefe diagnostische Biopsien) von Patienten mit GPA mittels PCR auf die mRNA-Expression von IL-32 untersucht. IL-32-exprimierende Zelltypen wurden mittels immunhistochemischer Doppelfärbungen und Immunfluoreszenz-Kolokalisationsanalysen dargestellt.

Folgende neue Erkenntnisse wurden gewonnen:

1. Die mRNA von IL-32α und nicht-α (β-δ) Isoformen kann in Nasenschleimhaut bei der GPA nachgewiesen werden. Die Expression der nicht-α Isoformen überwiegt die Expression von IL-32α mRNA. Die Expression von IL-32α mRNA deutet auf einen epithelialen Anteil der Biopsie hin.
2. In der Nasenschleimhaut bei der GPA und der CRS ist die Isoform IL-32α mit CD66b, einem Oberflächenmarkermolekül von neutrophilen Granulozyten, als Hinweis auf eine mögliche *in situ* Prozessierung von IL-32α durch PR3 ko-lokalisiert.
3. In der chronisch granulomatös entzündeten Nasenschleimhaut bei der GPA stellen Vimentin$^+$ fibroblastenähnliche Zellen sowie Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen im Gegensatz zur CRS eine bedeutende Quelle von intrazellulärem IL-32 dar (jeweils $p<0.01$). Der Unterschied zur CRS beruht dabei a priori nicht auf einer höheren Anzahl an Vimentin$^+$ fibroblastenähnlichen Zellen oder CD68$^+$ Zellen in der granulomatösen Entzündung ($p>0.05$).

4. Bei der GPA sind IL-32$^+$ fibroblastenähnliche Zellen mit einer Knochenarrosion lokalisiert.
5. CD4$^+$ T-Lymphozyten stellen in der granulomatösen Entzündung eine Minorität der IL-32$^+$ Zellen dar und unterscheiden sich in der Anzahl nicht von der CRS ($p>0.05$).
6. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-17A wird von Zellen in der granulomatösen Entzündung bei der GPA und der CRS exprimiert. Bei der Korrelationsanalyse ist ein Trend zwischen der IL-17A- und der IL-32-Expression in der GPA erkennbar.
7. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wird nur von wenigen Zellen in der granulomatösen Entzündung bei der GPA und bei der CRS exprimiert. Eine Korrelation mit IL-32$^+$ Zellen in der GPA wurde nicht festgestellt.

Die vorgelegte Doktorarbeit zeigt, dass ein spezifisches histomorphologisches Merkmal der GPA, *d.h.* die granulomatöse Entzündung, einen Ort der IL-32 Überexpression darstellt und stützt somit die Annahme einer pathogenetisch relevanten pro-inflammatorischen Rolle von IL-32 bei der GPA. Neben der erhöhten Anzahl weist zudem die Lokalisation einiger IL-32$^+$ Fibroblasten auf eine Beteiligung dieser Zellpopulation an der bei GPA vorkommenden Knochen- und Knorpeldestruktion hin. Die IL-32 Überexpression von CD68$^+$ Zellen in der granulomatösen Entzündung muss bezüglich ihrer funktionellen Konsequenzen in weiteren Experimenten validiert werden.

Literaturliste

Alsaleh G, Sparsa L, Chatelus E, Ehlinger M, Gottenberg JE, Wachsmann D, Sibilia J: Innate immunity triggers IL-32 expression by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Research & Therapy 12(4), R135 (2010)

Bae S, Kim YG, Choi J, Hong J, Lee S, Kang T, Jeon H, Hong K, Kim E, Kwak A, Lee CK, Yoo B, Park YB, Song EY, Kim S: Elevated interleukin-32 expression in granulomatosis with Polyangiitis. Rheumatology (Oxford) 11, 1979-88 (2012)

Barone F, Nayar S, Buckley CD: The role of non-hematopoietic stromal cells in the persistence of inflammation. Front Immunol. 3:416 (2013)

Bottini N, Firestein G: Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. Nat Rev Rheumatol. 1, 24-33 (2013)

Braun M, Csernok E, Gross WL, Müller-Hermelink H: Proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. Immunolocalization in normal and pathologic tissues. Am J Pathol. 139, 831-838 (1991)

Brockmann H, Schwarting A, Kriegsmann J, Petrow P, Gaumann A, Müller K, Galle P, Mayet W: Proteinase 3 as the major autoantigen of c-ANCA is strongly expressed in lung tissue of patients with Wegener´s granulomatosis. Arthritis Res. 4, 220-225 (2002)

Bucala R, Ritchlin C, Winchester R, Cerami A: Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. J Exp Med 173, 569-574 (1991)

Calabrese F, Baraldo S, Bazzan E, Lunardi F, Rea F, Maestrelli P, Turat G, Lokar-Oliani K, Papi A, Zuin R, Sfriso P, Balestro E, Dinarello CA, Saetta M: IL-32, a novel proinflammatory cytokine in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Resp Crit Care Med 178, 894-901 (2008)

Cao Y, Yang J, Colby K, Hogan SL, Hu Y, Jennette C, Berg E, Zhang Y, Jennette JC, Falk RJ, Preston GA: High basal activity of the PTPN22 gain-of-function variant blunts leukocyte responsiveness negatively affecting IL-10 production in ANCA vasculitis. PLoS One 7(8):e42783 (2012)

Choi J, Bae S, Hong J, Ryoo S, Jhun H, Hong K, Yoon D, Lee S, Her E, Choi W, Kim J, Azam T, Dinarello CA, Kim S: Paradoxical effects of constitutive human IL-32{gamma} in transgenic mice during experimental colitis. Proc Natl Acad Sci USA 107, 21082-21086 (2010)

Choi JD, Bae SY, Hong JW, Azam T, Dinarello CA, Her E, Choi WS, Kim BK, Lee CK, Yoon DY, Kim SJ, Kim SH: Identification of the most active interleukin-32 isoform. Immunology 126, 535-42 (2009)

Ciavatta DJ, Yang JJ, Preston G, Badhwar A, Xiao H, Hewins P, Nester C, Pendergraft III W, Magnuson T, Jennette JC, Falk RJ: Epigenetic basis for aberrant upregulation of autoantigen genes in humans with ANCA vasculitis. J Clin Invest. 120, 3209–3219 (2010)

Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, Principe S, Raiata F, Cavazza A, Guggino G, Accardo-Palumbo A, Boiardi L, Ferrante A, Principato A, Giardina A, De Leo G, Salvarani C, Triolo G: Expression of Interleukin-32 in the inflamed Arteries of Patients with Giant Cell Arteritis. Arthritis & Rheumatism 63, 2097-2104 (2011)

Ciccia F, Rizzo A, Accardo-Palumbo A, Giardina A, Bombardieri M, Guggino G, Taverna S, Leo GD, Alessandro R, Triolo G: Increased expression of interleukin-32 in the inflamed ileum of ankylosing spondylitis patients. Rheumatology (Oxford) 51, 1966-72 (2012)

Csernok E, Ai M, Gross WL, Wicklein D, Petersen A, Lindner B, Lamprecht P, Holle JU, Hellmich B: Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated-receptor-2 pathway. Blood 107, 4440-4448 (2006)

Csernok E, Lüdemann J, Gross WL, Bainton DF: Ultrastructural Localization of Proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmatic antibodies circulating in Wegener´s granulomatosis. Am J Pathol. 137, 1113-1119 (1990)

Dahl CA, Schall RP, He HL, Cairns JS: Identification of a novel gene expressed in activated natural killer cells and T cells. J Immunol 148, 597-603 (1992)

David A, Kacher Y, Specks U, Aviram I: Interaction of proteinase 3 with CD11b/CD18 (beta2 integrin) on the cell membrane of human neutrophils. J Leukoc Biol 308, 156-165 (2003)

David A, Fridlich R, Aviram I: The presence of membrane proteinase 3 in neutrophil lipid rafts and its colocalization with FCgammaRIIIb and cytochrome b 558. Exp Cell Res 308, 156-165 (2005)

Devaney KO, Travis WD, Hoffman G, Leavitt R, Lebovics R, Fauci AS: Interpretation of head and neck biopsies in Wegener's granulomatosis. A pathologic study of 126 biopsies in 70 patients. Am J Surg Pathol 14, 555-564 (1990)

Dinarello CA, Kim SH: IL-32, a novel cytokine with a possible role in disease. Ann Rheum Dis. 65(Suppl 3), iii61-4 (2006)

Falk RJ, Gross WL, Guillevin L, Hoffman GS, Jayne DR, Jennette JC, Kallenberg CG, Luqmani R, Mahr AD, Matteson EL, Merkel PA, Specks U, Watts RA: Granulomatosis with Polyangiitis (Wegener´s): an alternative name for Wegener´s granulomatosis. Arthritis Rheum. 63, 863-4 (2011)

Falk RJ, Jennette JC: ANCA disease: Where is this field going? J. Am. Soc. Nephrol. 21, 745–52 (2010)

Falk RJ, Jennette JC: Rituximab in ANCA-associated disease. N Engl J Med 363, 285–286 (2010)

Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 87, 4115–4119 (1990)

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol. 147, 3815-22 (1991)

Goda C, Kanaji T, Kanaji S, Tanaka G, Arima K, Ohno S, Izuhara K: Involvement of IL-32 in activation-induced cell death in T cells. International Immunology 18, 233-240 (2005)

Gross WL: Wegenersche Granulomatose. In: Gross WL: Therapie der Immunvaskulitiden. 1. Auflage, 82-93, UNI-MED, Bremen, 2000

Hasegawa H, Thomas HJ, Schooley K, Born TL: Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein. Cytokine 53, 74-83 (2010)

Heinhuis B, Koenders M, Van Riel P, van de Loo FA, Dinarello CA, Netea MG, van den Berg WB, Joosten LA: Tumor necrosis factor alpha-driven IL-32 expression in rheumatoid arthritis synovial tissue amplifies an inflammatory cascade. Ann Rheum Dis 70, 660-667 (2011)

Heinhuis B, Koenders M, Van de Loo F, Netea MG, van den Berg WB, Joosten LA: Inflammation-dependent secretion and splicing of IL-32γ in rheumatoid arthritis. PNAS 108, 4962-4967 (2011)

Heinhuis B, Koenders M, Van de Loo F, van Lent PL, Kim SH, Dinarello CA, Joosten LA, van den Berg WB: IL-32γ an Streptococcus pyogenes cell wall fragments synergise for IL-1-dependent destructive arthritis via upregulation of TLR-2 and NOD2. Ann Rheum Dis, 69, 1866-1872 (2010)

Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD, Rottem M, Fauci AS: Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. Ann Intern Med 116, 488-498 (1992)

Holle J, 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 localized Wegener´s granulomatosis: does it occur as a persistent disease stage? Ann Rheum Dis 69, 1934-1939 (2010)

Holle JU, Gross WL: Genetic risk factors for vasculitis. Internist (Berl). 55, 128-134 (2013)

Holl-Ulrich: Histopathologie systemischer Vaskulitiden. Pathologe DOI 10.1007/s00292-009-1156-x (2009)

Hoshino A, Nagao T, Nagi-Miura N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Nakayama T, Suzuki K: MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner. J Autoimmun. 31, 79-89 (2008)

Hruskova Z, Rihova Z, Mareckova H, Jancova E, Rysava R, Zavada J, Merta M, Löster T, Tesar V: Intracellular cytokine production in ANCA-associated vasculitis: low levels of interleukin-10 in remission are associated with a higher relapse rate in the long-term follow-up. Arch Med Res. 40, 276-284 (2009)

Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, Melendez AJ, McInnes IB: Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. J Immunol. 184, 3336-3340 (2010)

Jagiello P, Aries P, Arning L, Wagenleiter SE, Csernok E, Hellmich B, Gross WL, Epplen JT: The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum. 52, 4039-4043 (2005)

Jennette JC: Nomenclature and classification of vasculitis: lessons learned from granulomatosis with Polyangiitis (Wegener´s granulomatosis). Clin Exp Immunol 164, 7-10 (2011)

Jennette JC, Falk R, Peiqi H, Hong X: Pathogenesis of Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody–Associated Small-Vessel Vasculitis. Annu Rev Pathol Mech Dis 8,139–160 (2013)

Jeong H-J, Shin S-Y, Oh H-A, Kim MH, Cho JS, Kim HM: IL-32 up-regulation is associated with inflammatory cytokine production in allergic rhinitis. J Pathol 224, 553-563 (2011)

Joosten L, Netea M, Kim SH, Yoon DY, Oppers-Walgreen B, Radstake TR, Barrera P, van de Loo FA, Dinarello CA, van den Berg WB: IL-32, a proinflammatory cytokine in rheumatoid arthritis. PNAS 103, 3298-3303 (2006)

Joosten LA, Heinhuis B, Netea MG, Dinarello CA: Novel insights into the biology of interleukin-32. Cell Mol Life Sci. 70, 3883-3892. (2013)

Jung MY, Son MH, Kim SH, Cho D, Kim TS: IL-32gamma induces the maturation of dendritic cells with Th1- and Th17-polarizing ability through enhanced IL-12 and IL-6 production. J Immunol 186, 6848-6859 (2011)

Kain R, Exner M, Brandes R, Ziebermayr R, Cunningham D, Alderson CA, Davidovits A, Raab I, Jahn R, Ashour O, Spitzauer S, Sunder-Plassmann G, Fukuda M, Klemm P, Rees AJ, Kerjaschki D: Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. Nat Med 14, 1088–1096 (2008)

Kang J-W, Choi S-C, Cho MC Kim HJ, Kim JH, Lim JS, Kim SH, Han JY, Yoon DY: A proinflammatory cytokine interleukin-32β promotes the production of an anti-inflammatory cytokine interleukin-10. Immunology 128, e532-e540 (2008)

Kantari C, Pederzoli-Ribeil M, Amir-Moazami O: Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis. Blood 110, 4086-4095 (2007)

Katz Y, Nadiv O, Beer Y: Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. Arthritis Rheum. 44, 2176-2184 (2001)

Keswani A, Chustz RT, Suh L, Carter R, Peters AT, Tan BK, Chandra R, Kim SH, Azam T, Dinarello CA, Kern RC, Schleimer RP, Kato A: Differential expression of interleukin-32 in chronic Rhinosinusitis with and without nasal polyps. Allergy 67, 25-32 (2011)

Keswani A, Kern RC, Schleimer RP, Kato A: Role of interleukin-32 in chronic Rhinosinusitis. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 13, 13-18 (2013)

Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M: DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 60, 3613-3622 (2009)

Kesel N, Köhler D, Herich L, Laudien M, Holl-Ulrich K, Jüngel A, Neidhart M, Gay S, Gay RE, Csernok E, Lamprecht P, Gross WL, Schumacher U, Ullrich S: Cartilage destruction in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's granulomatosis) is mediated by human fibroblasts after transplantation into immunodeficient mice. Am J Pathol. 180, 2144-2155. (2012)

Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne H-J, Brinkmann V, Jenne D: Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat Med 15, 623–625 (2009)

Kim Y-G, Lee C-K, Oh JS, Kim SH, Kim KA, Yoo B: Effect of Interleukin-32γ on Differentiation of Osteoclasts from CD 14+ Monocytes. Arthritis & Rheumatism 62, 515-523 (2010)

Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA: Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFα. Immunity 22, 131-142 (2005)

Kim K-H, Shim J-H, Seo EH, Cho MC, Kang JW, Kim SH, Yu DY, Song EY, Lee HG, Sohn JH, Kim J, Dinarello CA, Yoon DY: Interleukin-32 monoclonal antibodies for immunohistochemistry, Western blotting and ELISA. Journal of Immunological Methods 333, 38-50 (2008)

Kim S, Lee S, Her E, Bae S, Choi J, Hong J, Jaekal J, Yoon D, Azam T, Dinarello CA, Kim S: Proteinase 3-processed form of the recombinant IL-32 separate domain. BMB reports 41, 814-819 (2008)

Ko NY, Mun SH, Lee SH, Kim JW, Kim do K, Kim HS, Her E, Kim SH, Won HS, Shin HS, Kim HS, Kim YM, Choi WS: Interleukin-32α production is regulated by MyD88-dependent and independent pathways in IL-1β-stimulated human alveolar epithelial cells. Immunobiology 216, 32-40 (2010)

Ko NY, Chang SH, Lee JH, Kim NW, Kim YM, Choi WS, Choi JD, Bae SY, Hong JW, Jaekal J, Azam T, Her E, Kim SH: Unique expression of a small IL-32 protein in the Jurkat leukemic T cell line. Cytokine 42, 121-127 (2008)

Koenders MI, Lubberts E, van de Loo FA, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Kolls JK, Di Padova FE, Joosten LA, van den Berg WB: Interleukin-17 acts independently of TNF-alpha under arthritic conditions. J Immunol. 176, 6262-6269 (2006)

Komocsi A, Lamprecht P, Csernok E, Mueller A, Holl-Ulrich K, Seitzer U, Moosig F, Schnabel A, Gross WL: Peripheral Blood and Granuloma $CD4^+$ CD28 T Cells Are a Major Source of Interferon and Tumor Necrosis Factor-alpha in Wegener's Granulomatosis. Am J Pathol. 160, 1717–1724 (2002)

Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T: IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J Clin Invest 103, 1345-1352 (1999)

Laudien M, Häsler R, Wohlers J, Böck J, Lipinski S, Bremer L, Podschun R, Ambrosch P, Lamprecht P, Rosenstiel P, Till A: Molecular signatures of a disturbed nasal barrier function in the primary tissue of Wegener's granulomatosis. Mucosal Immunol. 4, 564-573 (2011)

Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell. 75, 263-274 (1993)

Lu X, Garfield A, Rainger GE, Savage CO, Nash GB: Mediation of endothelial cell damage by serine proteases, but not superoxide released from antineutrophil cytoplasmic antibody-stimulated neutrophils. Arthritis Rheum 54, 1619–1628 (2006)

Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA, van den Berg WB: IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. J Immunol 170, 2655-2662 (2003)

Mabilleau G, Sabokbar A: Interleukin-32 promotes Osteoclast Differentiation but not Osteoclast Activation. PloS ONE 4: e4173 (2009)

Mark EJ, Matsubara O, Tan-Liu NS, Fienberg R: The pulmonary biopsy in the early diagnosis of Wegener´s (pathergic) granulomatosis: a study based on 35 open lung biopsies. Hum Pathol 19, 1065-1071 (1988)

Mayel WJ, Csernok E, Szymkowiak C, Gross W.L, Meyer zum Buschenfelde, KH: Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmatic antibodies in Wegener´s granulomatosis. Blood 82, 1221-1229 (1993)

Meyer N, Zimmermann M, Bürgler S, Bassin C, Woehrl S, Moritz K, Rhyner C, Indermitte P, Schmid-Grendelmeier P, Akdis M, Menz G, Akdis CA: IL-32 is expressed by human primary keratinocytes and modulates keratinocyte apoptosis in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 125, 858-865 (2010)

Moon YM, Yoon BY, Her YM, Oh HJ, Lee JS, Kim KW, Lee SY, Woo YJ, Park KS, Park SH, Kim HY, Cho ML: IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 14(6):R246 (2012)

Mueller A, Holl-Ulrich K, Gross WL: Granuloma in ANCA-Associated Vasculitides: Another Reason to Distinguish Between Syndromes. Curr Rheumatol Rep 15, 376 (2013)

Muller Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW: Leukocyte membrane expression of proteinase correlates with disease activity in patients with Wegener´s granulomatosis. Br J Rheumatol 37, 901-907 (1998)

Mun SH, Kim JW, Nah SS, Ko NY, Lee JH, Kim JD, Kim do K, Kim HS, Choi JD, Kim SH, Lee CK, Park SH, Kim BK, Kim HS, Kim YM, Choi WS: Tumor Necrosis Factor α-Induced Interleukin-32 is positively regulated via the Syk/Protein Kinase Cδ/JNK pathway in Rheumatoid Synovial Fibroblasts. Arthritis & Rheumatism 60, 678-685 (2009)

Na SJ, So SH, Lee KO, Choi YC: Elevated serum level of interleukin-32α in the patients with myasthenia gravis. J Neurol. 258, 1865-1870 (2011)

Netea MG, Lewis EC, Azam T, Joosten LA, Jaekal J, Bae SY, Dinarello CA, Kim SH: Interleukin-32 induces the differentiation of monocytes into macrophage-like cells. PNAS, 9, 3515-3520 (2008)

Netea MG, Azam T, Ferwerda G, Girardin SE, Walsh M, Park JS, Abraham E, Kim JM, Yoon DY, Dinarello CA, Kim SH: IL-32 synergizes with nucleotide oligomerization domain (NOD) 1 and NOD2 ligands for IL-1β and IL-6 production through a caspase 1-dependent mechanism. PNAS 45, 16309-16314 (2005)

Netea MG, Azam T, Lewis EC, Joosten LA, Wang M, Langenberg D, Meng X, Chan ED, Yoon DY, Ottenhoff T, Kim SH, Dinarello CA: Mycobacterium tuberculosis induces Interleukin-32 Production through a Caspase 1/ IL-18/ Interferon-γ-dependent Mechanism. PloS Med 3:e277 (2006)

Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N: Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochim Biophys Acta 1833, 3448-3459 (2013)

Nishida A, Andoh A, Inatomi O, Fujiyama Y: Interleukin-32 Expression in the Pancreas. Journal of Biological Chemistry 26, 17868-17876 (2009)

Nishida A, Andoh A, Shioya M, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Fujiyama Y: Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling mediates interleukin-32alpha induction in human pancreatic periacinar myofibroblasts. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 294, G831-8 (2008)

Nold-Petry CA, Nold MF, Zepp JA, Kim SH, Voelkel NF, Dinarello CA: IL-32-dependent effects of IL-1β on endothelial cell functions. Immunology 106, 3883-3888 (2009)

Nold MF, Nold-Petry CA, Pott GB, Zepp JA, Saavedra MT, Kim SH, Dinarello CA: Endogenous IL-32 Controls Cytokine and HIV-1 Production. The J Immunol 181, 557-565 (2008)

Novick D, Rubinstein M, Azam T, Rabinkov A, Dinarello CA, Kim SH: Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. Immunology 103, 3316-3321 (2006)

Park JK, Askin F, Giles J, Halushka M, Rosen A, Levine S: Increased Generation of TRAP Expressing Multinucleated Giant Cells in Patients with Granulomatosis with Polyangiitis. PLoS ONE 7(8):e42659 (2012)

Pendergraft WF, Alcorta DA, Segelmark M, Yang JJ, Tuttle R, Jennette JC, Falk RJ, Preston GA: ANCA antigens, Proteinase 3 and myeloperoxidase, are not expressed in endothelial cells. Kidney Int. 57, 1981-1990 (2000)

Pendergraft WF, Rudolph EH, Falk RJ, Jahn JE, Grimmler M, Hengst L, Jennette JC, Preston GA: Proteinase 3 sidesteps caspases and cleaves p21(Waf1/Cip1/Sdi1) to induce endothelial cell apoptosis. Kidney Int. 65, 75-84 (2004)

Radom-Aizik S, Zaldivar F Jr, Leu SY, Galassetti P, Cooper DM: Effects of 30 min of aerobic exercise on gene expression in human neutrophils. J Appl Physiol 104, 236-243 (2008)

Rasmussen N, Jayne DR, Abramowicz D: European therapeutic trials in ANCA-associated systemic vasculitis: disease scoring, consensus regimens and proposed clinical trials. Clin Exp Immunol 101, 29-43 (1995)

Reinhold-Keller E, Beuge N, Latza U, de Groot K, Rudert H, Nölle B, Heller M, Gross WL: An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener´s granulomatosis: long term outcome in 155 patients. Arthritis Rheum. 43, 1021-1032 (2000)

Reinhold-Keller E, Herlyn K, Wagner-Bastmeyer R, Gutfleisch J, Peter HH, Raspe HH, Gross WL: No difference in the incidences of vasculitides between north and south Germany: first results of the german vasculitis register. Rheumatology 41: 540-549 (2002)

Reilkoff R, Bucala R, Herzog E: Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. Immunology 11, 427-435 (2011)

Ross A, Xu W, Castellano G: Mini-review: a pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. Eur J Immunol 34, 921-929 (2004)

Schreiber A, Luft FC, Kettritz R: Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. Kidney Int 65, 2172–2183 (2004)

Schwarting A, Hagen D, Odenthal M, Brockmann H, Dienes HP, Wandel E, Rumpelt HJ, Zum Büschenfelde KH, Galle PR, Mayet W: Proteinase 3 mRNA expressed by glomerular epithelial cells correlates with crescent formation in Wegener´s granulomatosis. Kidney Int 57, 2412-2422 (2000)

Shioya M, Nishida A, Yagi Y, Ogawa A, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y, Andoh A: Epithelial overexpression of interleukin-32α in inflammatory bowel disease. Clinical and Experimental 149, 480-486 (2007)

Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K: Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. Arthritis Research & Therapy 8:R166 (2006)

Silva F, Cisternas M, Specks U: TNF-α blocker therapy and solid malignancy risk in ANCA-associated vasculitis. Curr Rheumatol Rep 14, 501-508 (2012)

Soyka MB, Treis A, Eiwegger T, Menz G, Zhang S, Holzmann D, Akdis CA, Meyer N: Regulation and expression of IL-32 in chronic rhinosinusitis. Allergy 67, 790–798 (2012)

Suppiah R, Mukhtyar C, Flossmann O, Alberici F, Baslund B, Batra R, Brown D, Holle J, Hruskova Z, Jayne D, Judge A, Little M, Palmisano A, Stegeman C, Tesar V, Vaglio A, Westman K, Luqmani R: A cross-sectional study of the Birmingham Vasculitis Activity Score version 3 in systemic vasculitis. Rheumatology (Oxford) 50, 899-905 (2011)

Szpirt WM, Heaf JG, Petersen J: Plasma exchange for induction and cyclosporine A for maintenance of remission in Wegener's granulomatosis: a clinical randomized controlled trial. Nephrol Dial Transplant 26, 206–213 (2011)

Turner-Brannen E, Choi KY, Arsenault R, El-Gabalawy H, Napper S, Mookherjee N: Inflammatory Cytokines IL-32 and IL-17 have common signaling Intermediates despite differential Dependence on TNF-Receptor. Journal of Immunology 186, 7127-7135 (2011)

Van der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG: Proteinase 3 Wegener´s autoantigen: from gene to antigen. J Leukoc Biol 69, 177-190 (2001)

Watts RA, Scott DG: ANCA vasculitis: to lump or split? Why we should study MPA and GPA separately. Rheumatology 51, 2115–2117 (2012)

Wilhelm S, Gröbler B, Gluch M, Heinz H, Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie, Carl Zeiss Jena GmbH 45-0029d/09.03 (2003)

Wilke CM, Wang L, Wei S, Kryczek I, Huang E, Kao J, Lin Y, Fang J, Zou W: Endogenous interleukin-10 constrains Th17 cells in patients with inflammatory bowel disease. J Transl Med. 16(9), 217 (2011)

Witko-Sarsat V, Reuter N, Mouthon L: Interaction of proteinase 3 with its associated partners: implications in the pathogenesis of Wegener´s granulomatosis. Curr Opin Rheumatol 22, 1-7 (2009)

Witko-Sarsat V, Cramer EM, Hieblot C: Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. Blood 94, 2487-2496 (1999)

Yang JJ, Pendergraft WF, Alcorta DA, Nachman PH, Hogan SL, Thomas RP, Sullivan P, Jennette JC, Falk RJ, Preston GA: Circumvention of normal constraints on granule protein gene expression in peripheral blood neutrophils and monocytes of patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibodyassociated glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 15, 2103–2114 (2004)

Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, Zappone JD, Painter SL, Armitage RJ: Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. Cytokine 9, 794-800 (1997)

Abkürzungsverzeichnis

AE	Airy units
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ACR	American College of Rheumatology
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANCA	antineutrophiler zytoplasmatischer Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aq. dest.	Aqua destillata
BVAS	Birmingham Vasculitis Activity Score
C-	Carboxyl-Gruppen-tragend
°C	Grad Celsius
ca	circa
C-ANCA	ANCA mit zytoplasmatischen Fluoreszenzmuster
CD	Cluster of Differentiation
CHC	Chapel Hill Consensus Conference
COPD	chronic obstructive pulomary disease
CRP	C-reaktives Protein
CRS	chronische Rhinosinusitis
CSS	Churg-Strauss-Syndrom
Cyc	Cyclophosphamid
DAB	3,3´Diaminobenzidin
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glucokortikoid
GPA	Granulomatose mit Polyarteriitis
EGPA	Eosinophile granulomatöse Polyangiitis
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNO	Hals, Nasen, Ohren
HPF	High-Power-Field
HRP	horse radish peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

kDa	kilo Dalton
MPA	mikroskopische Polyarteriits
mg	Miligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
ml	Mililiter
MPO	Myeloperoxidase
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NK	Negativ-/Isotypkontrolle
N-	Amino-Gruppen-tragend
p38 MAP-Kinase	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythin
pH	-logaritjmus $[H_3O^+]$
PMN	polymorphonukleäre Zellen
PR3	Proteinase 3
PTPN22	Protein-Tyrosin-Phosphatase-non-Rezeptor 22
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	message-Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
Tab.	Tabelle
TBS	trisgepufferte Salzlösung
Th	T-Helferzellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase=
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

Anhang

Granulomatose mit Polyangiitis

Epidemiologie

Obgleich die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) in Deutschland die häufigste der drei ANCA-assoziierten Vaskulitiden (GPA, MPA, EGPA) ist, stellt sie doch eine seltene Erkrankung dar, welche in Deutschland mit einer Inzidenz von ca. 10/1.000.000/Jahr beschrieben ist [Reinhold-Keller et al., 2002]. Der überwiegende Anteil der Patienten erkrankt zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, wobei keine Geschlechtsprädisposition festgestellt werden kann [Lamprecht et al., 2009].

Klinik

Die GPA ist durch eine granulomatöse Entzündung des oberen und/oder unteren Respirationstraktes und durch eine nekrotisierende Vaskulitis überwiegend der kleinen Gefäßen charakterisiert. Klinisch führend sind die Manifestationen im HNO-Trakt sowie die pulmonale und renale Beteiligung.

Die Mehrzahl der Patienten zeigt bei Erkrankungsbeginn ein lokal auf den oberen und/oder unteren Respirationstrakt begrenztes Initialstadium von unterschiedlicher Dauer. Dieses kann gekennzeichnet sein durch eine chronische blutig-borkige Rhinosinusitis, eine chronische Otitis mit eventuell begleitender Mastoiditis und Lungenrundherden. Komplizierend kann das Auftreten von knöchernen nasalen Destruktionen, oropharyngealen Ulzerationen und subglottischer Larynx- oder Bronchialstenosen sein.

Nach einer variablen Zeitspanne entwickelt sich das Generalisationsstadium der GPA. Bei 80-90% der Patienten ist dieses durch ein potentiell lebensbedrohliches pulmorenales Syndrom mit alveolärer Hämorrhagie und rapid-progressiver Glomerulonephritis gekennzeichnet. Das jeweilige klinische Bild lässt sich mit der erweiterten ELK-Klassifikation (siehe Tab.13) beschreiben. Unter den vielfältigen Symptomen finden sich Arthralgien, Myalgien, Hämoptysen, ZNS-Symptome wie Hirnnervenlähmungen, gastrointestinale Symptome wie blutige Durchfälle, kardiovaskuläre Symptome wie pektanginöse Beschwerden und Vaskulitismanifestationen an der Haut in Form von palpablen Purpura. Ausdruck der Nierenbeteiligung können Ödeme und das häufig auftretende nephritische Sediment sein.

Adynamie, Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust können weiter hinzutretende Allgemeinsymptome darstellen [Lamprecht et al., 2009]. Bei etwa 10% der GPA-Patienten entwickelt sich die Erkrankung nicht über das lokalisierte Initialstadium hinaus [Holle et al., 2010].

Histopathologie

Die Histopathologie zeigt bei der GPA viele Charakteristika, welche für sich isoliert gesehen nicht beweisend für das Vorliegen einer GPA sind [Holl-Ulrich, 2009].
Folglich gilt es, die Histopathologie immer im Zusammenhang mit den klinischen Manifestationen zu werten.
Richtungsweisend für das Vorliegen einer GPA ist die histomorphologische Trias aus einer granulomatösen extravaskulären Entzündung mit landkartenartigen Nekrosen und einer nekrotisierenden Kleingefäßvaskulitis [Devaney et al., 1990].
Die granulomatöse Entzündung ist initial im Bindegewebe durch eine kleine Nekrose gekennzeichnet, um die herum neutrophile Granulozyten akkumulieren und zerfallen. Die Diapedese der Granulozyten aus den Gefäßen führt zu Mikroabszessen. Schließlich sammeln sich im Weiteren Histiozyten pallisadenartig um diese Mikroabszesse [Jennnette et al., 2013]. Histiozytenwälle und randständige Riesenzellen stellen eine histomorphologische Differenzierungsmöglichkeit zu anderen granulomatösen Erkrankungen dar.
In der granulomatösen Entzündung der GPA werden überwiegend T-Lymphozyten und Plasmazellen, Monozyten, Granulozyten, Epitheloidzellen sowie Riesenzellen vom Fremdkörpertyp gefunden. Die nekrotisierende Vaskulitis wird aufgrund des Fehlens bzw. nur sehr spärlichen Vorkommens von Immunkomplexablagerungen in den Gefäßwänden auch „pauci-immune“ Vaskulitis bezeichnet [Holl-Ullrich, 2009, Jennette et al., 2013].

Abb. 48: Krankheitsdefinition (GPA) gemäß der Chapel Hill Consensus Conference 2013

Granulomatöse Entzündung des Respirationstraktes und nekrotisierende Vaskulitis kleiner bis mittelgroßer Gefäße, z.B. der Kapillaren, Venolen, Arteriolen und Arterien; meist nekrotisierende Glomerulonephritis

Abb. 49: ACR-Klassifikationskriterien (1990) der Granulomatose mit Polyangiitis

- Entzündung in Nase oder Mund mit Ulzera und purulenter nasaler Sekretion
- Knoten, Infiltrationen oder Kavernennachweis im Röntgen-Thorax
- Pathologisches Urinsediment mit Mikrohämaturie oder Erythrozytenzylindern
- Bioptisch nachgewiesene granulomatöse Entzündung in arteriellen Gefäßwänden oder perivaskulär

Zur Klassifikation müssen mindestens 2 von 4 Kriterien vorliegen

Tab. 13: Erweiterte ELK Klassifikation (nach deRemee 1976, erweitert nach de Groot und Reinhold-Keller 1996) und DEI (Disease Extent Index)

Organbeteiligung	**Punkte (DEI)**	**Anamnese**	**Klinische Befunde**
E Oberer Respirationstrakt	2	Blutig-borkiger Schnupfen, chron. Sinusitis, Nasenatmungsbehinderung, Mittelohrentzündungen, Heiserkeit, etc.	Nasenhaupthöhle: sanguinolente Rhinitis Nasennebenhöhle: chron. sanguinolente Entzündung Mittelohr: seröse/eitrige Otitis media Subglottische Stenose
L Lunge	2	Bluthusten, Luftnot	
EY Auge	2	Schmerzhafte Rötung, Tränengangsstenose, Visusverlust	Skleritis, Episkleritis, retrobulbäres Granulom, Dakroadenitis, Konjunktivits, Korneosklerale Ulzerationen, Uveitis, Amotio, Tränenwegsstenose
H Herz	2	Infarkte, pektanginöse Beschwerden, Rhythmusstörungen	
K Niere	2	Hämaturie, Ödeme, schaumiger Urin	
GI Gastrointestinaltrakt	2	Krämpfe, blutige Durchfälle	
S Haut	2	Erhabene flohstichartige Effloreszenzen (palpable Purpura), Ulzera	Palpable Purpura der Extremitäten, Ulzerationen, Pyoderma gangraenosum, Urtikaria-Vaskulitis, Gingiva-Hyperplasie der Mundhöhle
P Peripheres Nervensystem	2	Taubheitsgefühl, Missempfindungen, Fußheberschwäche	Periphere Neuropathie (Mononeuritis multiplex, distale symmetrische Polyneuropathie)
C Zentrales Nervensystem	2	Kopfschmerzen, Sehstörungen, Lähmungen, Hirnnervenlähmungen	Kraniale Neuropathie (v.a. Hirnnerven 2,5,6,7), externe Ophthalmoparese durch Pseudotumor der Orbita, seltener: zerebrovask. Komplikationen
A Rheumatische	2		(Poly) –myalgie, -arthralgie, -myositis, -

Beschwerden			arthritis
B B-Symptomatik	2	Adynamie, Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust	

Tab. 14: BVAS V3.0 (Birmingham Vasculitis Activity Score) nach Suppiah et al., 2011

Manifestation		**BVAS neu**	**BVAS aggraviert**
1. Allgemeinsymptomatik	**Maximum:**	**3**	**3**
Abgeschlagenheit		1	1
Kopfschmerz		1	1
Myalgien		1	1
Arthralgie oder Arthritis		1	1
Fieber > 38,5°C		2	2
Fieber < 38,5°C		1	1
Gewichtsverlust (>2kg in 4 Wochen)		2	2
2. Kutane Manifestation	**Maximum:**	**6**	**6**
Hautnekrose		2	2
Purpura		1	2
Ulzerationen		4	4
Gangrän		6	6
Andere (Livedo reticularis, Erythema nodosum)		2	2
Multiple digitale Gangrän		6	6
3. Schleimhäute sowie Augenbeteiligung	**Maximum:**	**6**	**6**
Ulzerationen der Mundschleimhaut		1	1
Genitale Ulzerationen		1	1
Entzündungen der Adnexen		2	4
Signifikante Proptosis		4	4
(Epi)skleritis		2	2
Konjunktivitis		1	1
Blepharitis		1	1
Keratitis		1	3
Einschränkung des Gesichtsfeldes		3	3
Akuter Sehverlust		6	6
Uveitis		6	6
Renale Vaskulitis		2	6
Retinale Venenthrombose		2	6
Retinale Exsudate		6	6
Retinale Hämorrhagie		6	6
4. Oberer Respirationstrakt	**Maximum:**	**6**	**6**
Nasale Obstruktion		2	2
Hämorrhagische Rhinitis		4	4
Nasale Krusten		4	4
Granulomatöse Sinusitis/Rhinitis		4	4
Paranasale Sinusbeteiligung		2	2
Subglottische Entzündung/Stenose		6	6
Hörverlust		3	3
Mittelohrbeteiligung		3	3
Innenohrbeteiligung		6	6
5. Unterer Respirationstrakt	**Maximum:**	**6**	**6**
Persistierender Husten > 2 Wochen		2	2
Dyspnoe		2	2
Stridor		1	2
Kavernen		3	3
Pleurabeteiligung		2	4
Infiltrate		2	4
Endobronchiale Beteiligung		2	4
Radiologische Lungenrundherde/Kavernen		3	3
Pleuraerguss/Pleuritis		4	4
Hämoptysen		4	4
Massive Hämoptysis/Alveoläre Hämorrhagie		6	6
Respiratorische Insuffizienz/Versagen		6	6
6. Kardiovaskuläre Beteiligung	**Maximum:**	**3**	**6**
Herzgeräusche		2	2
Periphere Pulsabschwächung		2	2
Arterieller Verschluss/Extremitätenischämie		4	4
Aortenklappeninsuffizienz		4	4
Endokarditis		2	4
Perikarditis		3	3
Angina pectoris		4	4
Kardiomyopathie		6	6
Myokardinfarkt		6	6
Herzinsuffizienz		3	6
7. Beteiligung des GI-Traktes	**Maximum:**	**9**	**9**
Peritonismus		3	3

Blutige Diarrhoen	3	3
Angina abdominalis/abd. Ischämie	9	9
Akute Pankreatitis	9	9
8. Renale Beteiligung Maximum:	**12**	**12**
Hypertonus	4	4
Proteinurie	4	4
Hämaturie	6	6
Kreatininanstieg 125-249 µmol/l	4	4
Kreatininanstieg 250-499 µmol/l	6	6
Kreatininanstieg >500 µmol/l	8	8
Erhöhung des Kreatinins >30%, Abfall GFR>25%	6	6
9. Nervale Beteiligung Maximum:	**9**	**9**
Cephalgie	1	1
Meningitis	1	3
Organische Funktionseinschränkung/Verwirrtheit	3	3
Krampfanfälle (tonisch/klonisch)	9	9
Apoplex	9	9
Transverse Myelitis	9	9
Hirnstamm Lähmung	6	6
Sensorische periphere Neuropathie	6	6
Motorische periphere Neuropathie	9	9

[Maximaler Score = 63].

Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der GPA ist nach wie vor noch nicht ergründet. Neben der o.g. genetischen Prädisposition dürften eine epigenetisch determinierte abnorme Autoantigenexpression von PR3 in neutrophilen Granulozyten, exogene Faktoren wie respiratorische Infektionen, eine hieraus resultierende überschießende neutrophilenreiche granulomatöse Entzündung im Respirationstrakt und T-Zellregulationsdefekte eine Rolle in der Pathogenese der GPA spielen [Jennette et al., 2013].

Die Proteinase 3 - Allgemeines zu Aufbau und Funktion

Die Proteinase 3 (PR3) ist eine kationische Chymotrypsin ähnliche Serinprotease von 29 kD Größe [Niles et al., 1989] und konnte als Autoantigen der GPA identifiziert werden [Csernok et al., 1990].

Neben der PR3 gehören zur Familie der strukturell verwandten Serinproteasen die neutrophile Elastase und Kathepsin G.

Die PR3 stellt ein multifunktionelles Enzym dar. Sie kann als Serinprotease sowohl antibiotische Wirkung entfalten, als auch durch Spaltung von Zytokinen immunregulierende Wirkungen ausüben [van der Geld et al., 2001]. Die Fähigkeit des Abbaus extrazellulärer Matrixproteine gehört ebenso zu ihrer Wirkung im Rahmen von Immunantworten.

Untersuchungen mit in Hybridoma-Technik hergestellten monoklonalen Antikörpern haben polymorphkernige Leukozyten (PMN/neutrophile Granulozyten) und zu einem geringeren Anteil auch Monozyten als die hauptsächlich PR3 exprimierenden Zellen identifizieren können [Csernok et al., 1990].

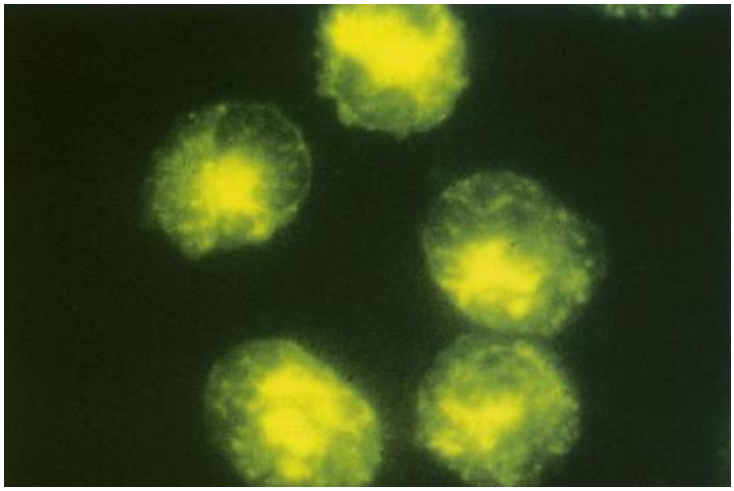


Abb. 50: Typisches Färbemuster einer indirekten Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern (WGM2) gegen PR3: Neutrophile Granulozyten eines Patienten mit GPA. (x700). (Aus: Csernok E, Lüdemann J, Gross W.L, Bainton D.F, Ultrastructural Localization of Proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmatic antibodies circulating in Wegener´s granulomatosis, Am. J. Pathol., 1990, 137(5):1113-1119.

In den neutrophilen Granulozyten ist die PR3 vor allem in den azurophilen Granula lokalisiert. Die PR3 wird nach Aktivierung der Granulozyten sezerniert, z.T. aber auch in membrangebundener Form präsentiert [Witko-Sarsat et al., 1999]. Allerdings fehlt ihr die hierfür notwendige Transmembranregion, so dass PR3 zunächst mit Lipiden oder Proteinen eine Bindung eingehen muss, um eine stabile Zellmembranverankerung zu erreichen. Das katalytische Zentrum bleibt auch beim membrangebundenen Enzym intakt. Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen ist die Beeinflussung der PR3-Aktivität durch ihre möglichen Bindungspartner. Kommt es zur Fusion der azurophilen Granula mit der Zellmembran bleiben die meisten Serinproteasen stabil an die Membran gebunden und entziehen sich zudem teilweise der endogenen Inhibition [Owen et al., 1995, Campbell et al., 2000]. Hierdurch werden sie in die Lage versetzt als spezifische Modulatoren der Immunantwort zu agieren.

Tab. 15: faßt die wichtigsten Charakteristika der PR3 zusammen:

Merkmal	**Proteinase 3**
Genlokus und -struktur	19p13.3, 5 Exons und 4 Introns
Endogener Aktivator	Dipeptidyl-Peptidase 1
Molekularmasse	29-32 kDa
Glykolisierungsstellen	2
pH-Aktivitätsoptimum	8
Exprimierende Zellen/Strukturen	Neutrophile Granulozyten (Braun et al 1991) NET´s (neutrophil extracellular traps) Monozyten (Braun et al. 1991)
Endogene Inhibitoren	α2-Makoglobulin Elafin/prä-Elafin α1-PI/MNEI
Biologische Funktionen	Bakterizide Wirkungen Apoptoseinduktion (Endothelzellen) Negativer Feedback auf Granulopoese Spaltung inflammatorischer Mediatoren Rezeptorenspaltung

Die Proteinase 3 ist ein stark gefaltetes Molekül, dessen Funktion von einer intakten Tertiärstruktur abhängig ist. Diese ist in der unten stehenden Abbildung dargestellt.

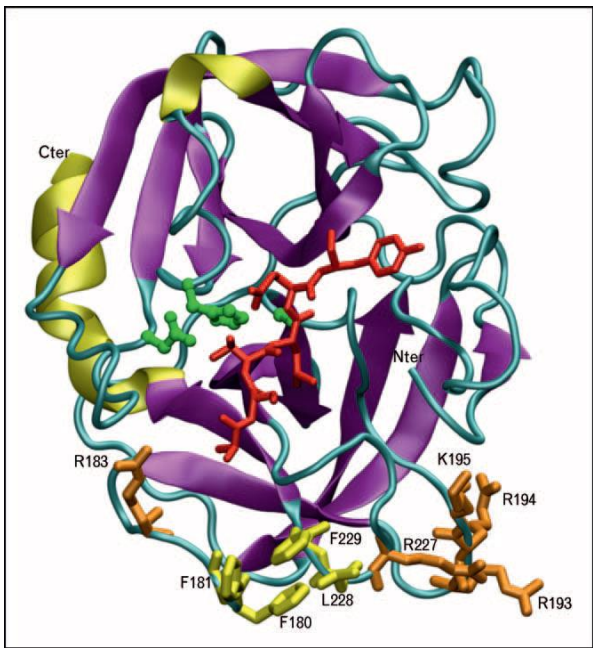


Abb. 51: Tertiärstruktur der Proteinase 3. Das katalytische Zentrum liegt zwischen den jeweils 6 antiparallelen β-Faltblättern (violett) und besteht aus 3 Aminosäuren (grün): his71, asp118 und scr203. Eine C-terminale α-Helix ist gelb dargestellt.
Fünf basische Aminosäuren (orange) dienen der Orientierung der PR 3 innerhalb der Zellmembran, so dass die hydrophoben Aminosäuren F180, F181, F229 und L228 in die Membran inseriert werden können. [Aus: Witko-Sarsat V, Reuter N, Mouthon L. Interaction of proteinase 3 with its associated partners: implications in the pathogenesis of Wegener´s granulomatosis. Curr Opin Rheumatol, 2009, 21:000-000].

Die notwendige Assoziation der PR3 mit Bindungspartnern zum Erreichen einer stabilen Membranexpression, die Beeinflussung ihrer Aktivität abhängig vom Zeitpunkt ihrer Expression während des inflammatorischen Prozesses und ihr Vorkommen im prädominanten Zelltypus der frühen GPA-Läsion, werfen viele Fragen zur Rolle der PR3 in der Pathogenese der GPA auf.

2.1 Die Proteinase 3 als Hauptautoantigen der Granulomatose mit Polyangiitis

Neben den bereits oben beschriebenen histopathologischen Charakteristika ist die GPA als systemische Autoimmunerkrankung auch durch das Auftreten antineutrophiler zytoplasmatischer Antikörper charakterisiert. Als Zielantigen des ANCA wurde bei der GPA die PR3 identifiziert werden, welche eine erhöhte Membranexpression auf Neutrophilen von Vaskulitispatienten zeigt und positiv mit der Krankheitsaktivität korreliert [Muller Kobold et al., 1998]. Binden die ANCA an die PR3 auf der Zelloberfläche der neutrophilen Granulozyten, so kommt es zu deren Aktivierung mit Auslösung eines respiratory burst und Zytokinproduktion. Die ANCA-vermittelte intravaskuläre endothelnahe Degranulierung der neutrophilen Granulozyten induziert die nekrotisierende Kleingefäßvaskulitis bei der GPA [Lamprecht et al., 2009].

Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

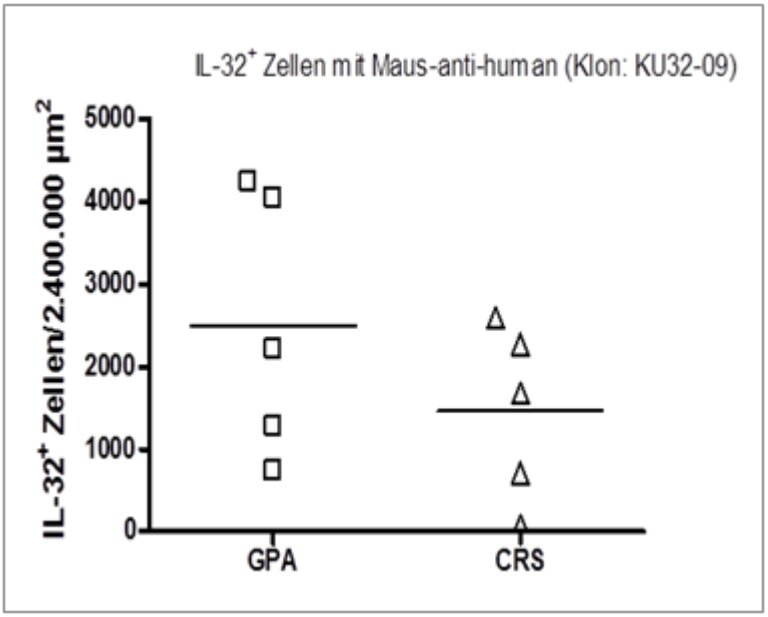
Tab. 16: Anzahl der für IL-32 (α, β, γ, δ)$^+$ Zellen in einem zufällig festgelegten Areal von 2.400.000 µm^2 im Gewebe der GPA und CRS (Kaninchen-anti-human-IL-32 α, β, γ, δ, Fa. Novus Biologicals).

GPA	**IL-32$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2**	**CRS**	**IL-32$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm2**
GPA2	2821	**CRS 2**	654
GPA3	1657	**CRS 3**	3100
GPA4	4892	**CRS 8**	1614
GPA 5	6120	**CRS 9**	1261
GPA 6	1708	**CRS 10**	522

Tab. 17: Anzahl der für IL-32 (α, β, γ, δ)$^+$ Zellen in einem zufällig festgelegten Areal von 2.400.000 µm^2 im Gewebe der GPA und CRS (Maus-anti-human-IL-32 α, β, γ, δ, Klon: KU32-09, Fa. Biolegend).

GPA	**IL-32$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2**	**CRS**	**IL-32$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2**
GPA2	2207	**CRS 2**	1674
GPA3	1273	**CRS 3**	2599
GPA4	4050	**CRS 8**	2267
GPA 5	4241	**CRS 9**	712
GPA 6	733	**CRS 10**	68

Abb. 52: Anzahl IL-32$^+$Zellen pro 2.400.000 µm^2 im Gewebe der GPA und CRS (Maus-anti-human-IL-32 α, β, γ, δ, Klon KU32-09, Fa. Biolegend). U-Test nach Mann und Whitney (5 vs 5): p = 0,4206.



Tab. 18: Anzahl der für IL-32 (α, β, γ, δ) und CD68 doppelt$^+$ Zellen in einem zufällig festgelegten Areal von 2.400.000 µm^2. Die Biopsien (n=10) wurden mit einer Verschlüsselung versehen, um die Patientenidentität zu wahren.

GPA	IL-32$^+$CD68$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2	CRS	IL-32$^+$CD68$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2
GPA1	1435	**CRS1**	1182
GPA2	1272	**CRS2**	654
GPA3	644	**CRS3**	848
GPA4	1490	**CRS4**	919
GPA5	1427	**CRS5**	757
GPA6	1178	**CRS6**	318
GPA7	977	**CRS7**	132
GPA8	972	**CRS8**	143
GPA9	1088	**CRS9**	214
GPA10	227	**CRS10**	312

Tab. 19: Anzahl der CD68$^+$ Zellen in einem zufällig festgelegten Areal von 2.400.000 µm^2

GPA	CD 68$^+$ Zellen / 2.400.000 µm^2	CRS	CD 68$^+$ Zellen / 2.400.000 µm^2
GPA 1	2183	**CRS 4**	2647
GPA 5	3032	**CRS 5**	1713
GPA 6	3269	**CRS 7**	683
GPA 7	1052	**CRS 9**	584
GPA 8	2747	**CRS 10**	2937

.

Tab. 20: Anzahl der für IL-32 (α, β, γ, δ) und Vimentin doppelt$^+$ Zellen in einem zufällig festgelegten Areal von 2.400.000 µm^2.

GPA	IL-32$^+$Vimentin$^+$ Zellen/2.400.000 µm^2	CRS	IL-32$^+$Vimentin$^+$ Zellen/2.400.000 µm^2
GPA 1	3739	**CRS 1**	643
GPA 2	1645	**CRS 2**	832
GPA 3	2532	**CRS 3**	1352
GPA 4	1940	**CRS 4**	549
GPA 5	1736	**CRS 5**	540
GPA 6	0	**CRS 6**	98
GPA 7	2922	**CRS 7**	72
GPA 8	2878	**CRS 8**	1500
GPA 9	1721	**CRS 9**	744
GPA 10	2618	**CRS 10**	11

Tab. 21: Anzahl der Vimentin$^+$ Zellen in einem zufällig festgelegten Areal von 2.400.000 µm^2.

GPA	Vimentin$^+$ Zellen / 2.400.000 µm^2	CRS	Vimentin$^+$ Zellen / 2.400.000 µm^2
GPA 1	3825	**CRS 4**	2647
GPA 6	140	**CRS 5**	1713
GPA 7	4308	**CRS 7**	683
GPA 8	1277	**CRS 9**	584
GPA 9	7	**CRS 10**	2937

Tab. 22: Anzahl der für CD4 und IL-32 (α, β, γ, δ) doppelt$^+$ Zellen in einem zufällig festgelegten Areal von 2.400.000 µm^2.

GPA	IL-32$^+$CD4$^+$ Zellen/2.400.000 µm^2	CRS	IL-32$^+$CD4$^+$ Zellen/2.400.000 µm^2
GPA 1	272	**CRS 1**	51
GPA 2	253	**CRS 2**	195
GPA 3	111	**CRS 3**	1432
GPA 4	2	**CRS 4**	1110
GPA 5	671	**CRS 5**	0
GPA 6	20	**CRS 6**	371
GPA 7	250	**CRS 7**	245
GPA 8	444	**CRS 8**	39
GPA 9	539	**CRS 9**	209
GPA 10	389	**CRS 10**	165

Tab. 23: Anzahl der IL-17A$^+$ und der IL-32$^+$ Zellen in Nasenschleimhaut bei GPA. Es besteht die Tendenz einer positiven Korrelation (r=0.9; p=0.0833) zwischen der IL-17A- und der IL-32-Expression in der granulomatösen Entzündung.

GPA	IL-17A$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2	IL-32$^+$ Zellen/ 2.400.000 µm^2
GPA2	2776	2821
GPA3	1421	1657
GPA5	6350	6120
GPA 6	3810	1708
GPA 8	281	1289

Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter Lamprecht, Oberarzt der Poliklinik für Rheumatologie des UKSH Campus Lübeck und der Abteilung für Innere Medizin/Rheumatologie des Klinikums Bad Bramstedt, für die Betreuung während dieses sehr interessanten Forschungsauftrages.

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Dr. ing. Antje Müller, Leiterin des rheumatologischen Forschungslabors am UKSH Campus Lübeck, aussprechen für die außerordentlich hervorragende Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit, die konstruktiven Diskussionen der Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Einführung in das wissenschaftliche Leben mit der aktiven Teilnahme an Kongressen und mögliche Erstautorenschaften. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem Team des rheumatologischen Forschungslabors am UKSH Campus Lübeck Herrn Christoph Brieske, Frau Silke Pitann und Frau Kristina Krause für die engagierte Einarbeitung in die Laborabläufe, das tolle zwischenmenschliche Miteinander und die exzellente technische Assistenz.

Meinen Eltern und meiner Lebenspartnerin danke ich für die allzeit liebevolle und großartige Unterstützung sowie das Verständnis für die beruflichen Anforderungen.

Eigene Veröffentlichungen und Vorträge Publikationen

- Jendrek ST, Krause K, Schüler S, Schinke S, Csernok E, Ullrich S, Holl-Ulrich K, Gross WL, Müller A: IL-32 as a driver of chronic inflammation in Wegener´s granuloma? 15. Internationaler Vaskulitis & ANCA Workshop, Chapel Hill, NC, USA, Abstract und Poster (Reisestipendium im Rahmen Lübecker Promotionsstipendium „Exzellenzmedizin“).

- Jendrek ST, Krause K, Csernok E, Schüler S, Brieske C, Laudien M, Butherus K, Gross WL, Holl-Ulrich K, Müller A: Vermehrte Expression von IL-32 im Wegenerschen Granulom. 38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Hamburg, (Posterpreis (500 €) für Vortrag und Poster).

- Jendrek ST, Müller A, Csernok E, Schüler S, Gross WL: Proteinase 3: Bedrohliche Seiten eines „Maltesers“. Lübecker Doktorandentag 2009.

Curriculum Vitae

Sebastian Torben Jendrek

geboren am 25.06.1985 in Bad Oldesloe

Beruf

04/14 – lfd.	**Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck** Assistenzarzt interdisziplinäre Notaufnahme
12/12 – 04/14	**Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck** Assistenzarzt Stat. 41b (Gastroenterologie)
07/12 – 12/12	**Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck** Assistenzarzt Stat. 43b (Diabetologie/Endokrinologie)

Studium

10/05 –05/12	**Universität zu Lübeck** Medizin
04/12	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note „sehr gut“) Wahlfach: Notfallmedizin und Notarztwagenpraktikum
02/11 - 01/12	**Universitätsklinikum Lübeck** Praktisches Jahr Tertial Innere Medizin und Wahlfach Anästhesie Tertial Chirurgie in der Asklepiosklinik Bad Oldesloe Wahlfach: Notfallmedizin und Notarztwagenpraktikum.
2008 – 2010	Famulaturen in den Bereichen • Innere Medizin • Rheumatologie, • Anästhesie und Intensivmedizin • Radiologie • Allgemeinmedizin (Landarztpraxis).
2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note „gut“) Wahlfach: Molekularbiologie und Therapie endokriner Erkrankungen

Promotion

06/08 – 11/13	**Universität zu Lübeck Rheumatologie**, Doktorvater: Prof. Dr. Lamprecht Thema der Dissertation:„Interleukin-32 im endonasalen Gewebe der Granulomatose mit Polyangiitis

Stipendium/Kongresse/Auszeichnungen

2011	15. Internationaler Vaskulitis & ANCA Workshop, Chapel Hill, NC, USA, Abstract und Poster
2010	38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, Hamburg, Posterpreis für Vortrag und Poster
10/09 – 11/10	Stipendiat des Lübecker Promotionsstipendiums „Exzellenzmedizin“

Wehrdienst

03/05 – 07/05	Freiwillige Wehrdienstverlängerung um 3 Monate im Schifffahrtmedizinischen Institut der Marine Kiel Teilbereiche Druckkammermedizin, Tropenmedizin und Allgemeinmedizin
07/04 – 03/05	Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel

Schulbildung

06/04 Kreisgymnasium Bargteheide (Abitur: 1,1)

Ehrenamtliches Engagement

01/2006 – lfd. **Malteser Hilfsdienst Ahrensburg**
Ausbilder für Erste Hilfe und lebensrettende Sofortmaßnahmen

2003 – 2004 Lehrgang für Rettungssanitäter

Lübeck, 01.04.2014