

Aus der Poliklinik für Rheumatologie
der Universität zu Lübeck

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. J. Steinhoff



Zur Rolle von High-Mobility Group Box 1 Protein in der Granulomatose mit Polyangiitis

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Naturwissenschaften -

vorgelegt von
Anja Kerstein
aus Siegen

Lübeck, 2014

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Peter Lamprecht

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 27.03.2015

Meinen Eltern

Inhalt

1. Zusammenfassung	7
1.1. Abstract	9
2. Einleitung.....	11
2.1. Granulomatose mit Polyangiitis.....	11
2.2. Erweiterte Theorien zur (Auto)Immunantwort.....	15
2.3. Endogene Gefahrensignale.....	18
2.4. HMGB1.....	18
2.4.1. Struktur	18
2.4.2. Freisetzung.....	20
2.4.3. Posttranslationale Modifikationen.....	22
2.4.4. Rezeptoren und Bindungspartner	23
2.4.5. Funktion.....	25
2.4.6. Rolle bei Erkrankungen.....	27
2.5. Fragestellung	30
3. Material und Methoden.....	31
3.1. Geräte.....	31
3.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterial	31
3.3. Puffer, Lösungen und Medien	33
3.4. Kits	34
3.5. Antikörper und Negativkontrollen.....	35
3.6. Zellkultur	36
3.6.1. Embryonale Mäusefibroblasten.....	36
3.6.2. THP-1 Zellen.....	36
3.7. Isolation humaner Zellen	36
3.8. Proteinanalyse	37
3.8.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford	37
3.8.2. Proteinaufbereitung.....	38

3.8.3.	Isoelektrische Fokussierung	39
3.8.4.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	40
3.8.5.	Semi-Dry Westernblot	41
3.8.6.	Koimmunpräzipitation.....	42
3.9.	Immunhistochemie.....	44
3.9.1.	Gewebeschnitte	44
3.9.2.	Immunhistologische Färbung	44
3.9.3.	Immunfluoreszenzfärbung	45
3.10.	sRAGE-ELISA.....	46
3.11.	Genanalyse.....	47
3.11.1.	Isolierung von RNA	47
3.11.2.	Reverse Transkription.....	48
3.11.3.	Primerdesign	49
3.11.4.	qPCR	49
3.11.5.	SNP-Analyse	51
3.12.	Zytokin-Induktion in THP-1 Zellen	52
3.13.	PMN Apoptoseassay	53
3.14.	Patientenmaterial.....	55
4.	Ergebnisse	56
4.1.	Lokalisation von HMGB1 im Nasenschleimhautgewebe.....	56
4.2.	CD68-Expression im Nasenschleimhautgewebe	59
4.3.	Posttranslationale Modifikationen von HMGB1 im Blutplasma.....	61
4.4.	Expression von RAGE im Nasenschleimhautgewebe.....	62
4.5.	sRAGE im Serum	64
4.6.	<i>rage</i> und <i>adam10</i> mRNA in PBMC	66
4.7.	Einfluss von nekrotisch freigesetztem HMGB1 auf THP-1 Zellen.....	67
4.8.	Bindung von HMGB1 und PR3 in PMN-Lysaten	68
4.9.	Expressionen von HMGB1 und PR3 im Nasenschleimhautgewebe	70
4.10.	Expression von HMGB1 und PR3 in apoptotischen PMN	71

4.11.	Assoziation von HMGB1 SNPs mit klinischen Parametern	72
5.	Diskussion.....	74
5.1.	Alarmin-Funktion von HMGB1 bei der GPA.....	74
5.2.	HMGB1 und Makrophagen in der granulomatösen Entzündung.....	74
5.3.	HMGB1-abhängige IL-1 β -Freisetzung in differenzierten THP-1 Zellen <i>in vitro</i>	76
5.4.	RAGE-Expression in der granulomatösen Entzündung.....	77
5.5.	Serum-Konzentration des Abfangrezeptors sRAGE.....	78
5.6.	mRNA Expression von <i>adam10</i> in PBMC	79
5.7.	HMGB1 interagiert mit dem Autoantigen PR3 in/auf PMN.....	79
5.8.	HMGB1/PR3 im Gewebe und auf PMN <i>in vitro</i>	80
5.9.	Zusammenhang von HMGB1 Polymorphismen mit GPA Krankheitsparametern	82
6.	Schlussfolgerung und Ausblick	83
7.	Literaturverzeichnis.....	86
8.	Anhang.....	94
8.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	94
8.2.	Abbildungsverzeichnis.....	96
8.3.	Tabellenverzeichnis	97
9.	Danksagung	98

1. Zusammenfassung

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ist eine seltene, chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die zur Gruppe der Anti-Neutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden (AAV) zählt. Die GPA ist durch eine nekrotisierende, granulomatöse Entzündung des Respirationstraktes und eine systemische autoimmune Kleingefäßvaskulitis charakterisiert. Die Pathogenese der extravaskulären Granulomatose und der Vaskulitis ist bis heute nur zum Teil verstanden. Unterschiede zwischen murinen und humanen Neutrophilen, besonders im Hinblick auf die Proteinase 3 (PR3), dem Hauptautoantigen bei der GPA, haben die Entwicklung von GPA-Tiermodellen erschwert. Daher ist es notwendig, dass relevante pathogenetische Mechanismen vor allem bei Patienten und damit im humanen System weiter erforscht werden. Interessanterweise wurde gezeigt, dass zirkulierendes HMGB1 (engl. *high-mobility group box 1*), ein ubiquitär exprimiertes DNA-bindendes Molekül, mit der Krankheitsaktivität und dem Ausmaß der pulmonalen granulomatösen Entzündung bei der GPA korreliert. Wird HMGB1 durch passive oder aktive Mechanismen in den extrazellulären Raum freigesetzt, kann es dort als prototypisches Alarmin zu einer verstärkten inflammatorischen und autoreaktiven Immunantwort beitragen. In dieser Arbeit wurde HMGB1 auf genetischer und zellulärer Ebene bei der GPA, insbesondere in der bisher wenig verstandenen granulomatösen Entzündung, im Hinblick sowohl auf eine mögliche proinflammatorische Rolle und als auch als potentielles endogenes Adjuvans für PR3, dem Hauptautoantigen, untersucht. Die Lokalisation von HMGB1 in Assoziation mit Makrophagen und die Expression des Rezeptors RAGE (engl. *receptor for advanced glycation endproducts*) wurden in Nasenschleimhautbiopsien bei der GPA im Vergleich zu chronischer Rhinosinusitis (CRS) mittels Immunhistochemie untersucht. Die Konzentration des endogenen RAGE-Inhibitors sRAGE (engl. *soluble RAGE*) wurde im Serum von GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und Diabetes mellitus Typ I-Patienten (T1D) mittels ELISA gemessen. Die Genexpression von *rage* und der RAGE-Protease *adam10* wurde in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden mit Hilfe quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) bestimmt. Der Einfluss von nekrotisch freigesetztem HMGB1 auf die proinflammatorische Zytokinantwort (hier IL-1 β) wurde *in vitro* an einer Makrophagenzelllinie getestet. Mögliche Unterschiede in posttranslationalen Modifikationen von HMGB1 im Plasma bei GPA-Patienten und gesunden Probanden wurden anhand des Expressionsmusters in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) und nachfolgendem Westernblot analysiert. Weiterhin wurde überprüft, ob vier bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNP) im *hmgb1*-Gen mit klinischen Parametern bei der GPA assoziiert sind. Die Expression des Hauptautoantigens PR3 mit

HMGB1 in Nasenschleimhautbiopsien bei GPA-Patienten wurde im Vergleich zu CRS mittels Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Ob eine direkte Interaktion von PR3 mit HMGB1 möglich ist, wurde in Lysaten von polymorphkernigen Granulozyten (engl. *polymorphonuclear granulocytes*, PMN) mittels Koimmunpräzipitation und Westernblot analysiert. Weiterhin wurde das Expressionsmuster von PR3 und HMGB1 *in vitro* auf PMN von GPA-Patienten und gesunden Probanden nach Apoptoseinduktion im Vergleich zu vitalen Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von HMGB1 im entzündeten Nasenschleimhautgewebe bei der GPA im Vergleich zur mehr kernständigen Lokalisation bei CRS. Zellen um nekrotische Bereiche in der granulomatösen Entzündung wurden als CD68⁺ Makrophagen identifiziert, die zusätzlich zu einer zytoplasmatischen Lokalisation von HMGB1 auch den Rezeptor RAGE exprimierten. Im Blut ergab sich jedoch kein Unterschied zwischen sRAGE-Spiegeln von GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu waren sRAGE-Spiegel bei T1D als Krankheitskontrolle erhöht. Nekrotisch freigesetztes HMGB1 vermittelte eine IL-1 β Ausschüttung in einer Makrophagenzelllinie *in vitro*. Interessanterweise ergab sich ein unterschiedliches Expressionsmuster von HMGB1 im Plasma von GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden in der 2D-PAGE. Dies deutet auf verschiedene posttranslationale Modifikationen wie z.B. Acetylierung und damit auf aktive Sekretionsprozesse hin, die modifiziertes HMGB1 (im Gegensatz zur Gesamtkonzentration allein) als diagnostischen Marker vor allem für die granulomatöse Entzündung interessant machen. Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass aktive Sekretion und passive Freisetzung von HMGB1 zu einem sich selbst-amplifizierenden Kreislauf über RAGE und IL-1 β in der granulomatösen Entzündung bei der GPA beitragen. Genetische Varianten des *hmgb1* Gens standen hingegen in keinem Zusammenhang mit klinischen Parametern bei der GPA. Demgegenüber wurde erstmals eine Bindung von HMGB1 an das Autoantigen PR3 in PMN nachgewiesen. Außerdem war HMGB1 zusammen mit PR3 *in vitro* auf der Oberfläche von apoptotischen PMN exprimiert, nicht jedoch auf vitalen PMN. Zusätzlich konnte eine Kolo-kalisation von HMGB1 und PR3 in der granulomatösen Entzündung beobachtet werden. Dieser Teil der Ergebnisse legt nahe, dass eine persistierende Freisetzung des Gefahrensignals HMGB1 zusammen mit der erhöhten Verfügbarkeit des Autoantigens PR3 und einer gestörten Efferozytose in der granulomatösen Entzündung wesentlich zur Toleranzdurchbrechung beitragen könnte. Zusammengefasst unterstützen die Daten die Annahmen, dass HMGB1 sowohl zur Unterhaltung der granulomatösen Entzündung beiträgt als auch als endogenes Adjuvans für die PR3 agiert, was letztlich die Entstehung der Autoimmunreaktion bei der GPA begünstigen könnte.

1.1. Abstract

Granulomatosis with polyangiitis (GPA) is a rare chronic inflammatory and autoimmune disease that belongs to the group of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides (AAV). GPA is characterized by necrotizing granulomatous inflammation of the respiratory tract and systemic autoimmune small-vessel vasculitis. The pathogenesis of the necrotizing extravascular granulomatosis and the vasculitis is thus far only partly understood. Differences between murine and human neutrophils, especially regarding proteinase 3 (PR3), the main GPA autoantigen, have hampered the development of GPA animal models. Therefore, it remains necessary to study relevant pathogenetic mechanisms in the human system, *i.e.* GPA patients. Interestingly, it has been shown that the endogenous danger molecule high-mobility group box 1 (HMGB1), which is a ubiquitously expressed DNA-binding protein, correlates with disease activity and the pulmonary granulomatous burden in GPA. HMGB1 released into the extracellular space by both passive and active mechanisms acts as a prototypic alarmin and thereby contributes to inflammatory and autoreactive immune responses. Herein, HMGB1 was examined at genetic and cellular levels in GPA, focusing on the less understood granulomatous inflammation and the assumed function of HMGB1 as an inflammatory mediator and adjuvant for PR3. Localization of HMGB1 and the expression of the receptor RAGE (receptor for advanced glycation end products) were analyzed in tissue sections of endonasal biopsies in GPA compared to chronic rhinosinusitis (CRS) by immunohistochemistry. The concentration of the endogenous RAGE-Inhibitor sRAGE (soluble RAGE) in sera of GPA in comparison to healthy controls (HC) and type 1 diabetes (T1D) patients was measured by ELISA. Gene expressions of *rage* and the RAGE-protease *adam10* in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in GPA in comparison to HC were determined by quantitative real-time PCR (qPCR). The effect of HMGB1 derived from necrotic cells on a pro-inflammatory cytokine response (here IL-1 β) of a macrophage-like cell line was tested *in vitro*. Potential differences with respect to posttranslational modifications of HMGB1 were analyzed by comparing the protein expression patterns in plasma between GPA and HC using two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) and western blotting. The expression of the main GPA autoantigen PR3 and HMGB1 in nasal tissue sections of GPA in comparison to CRS was determined by immunofluorescence staining. To find out if there is an interaction between PR3 and HMGB1, lysates of polymorphonuclear granulocytes (PMN) were evaluated by co-immunoprecipitation followed by western blotting. Furthermore, the expression patterns of both proteins in vital and apoptotic PMN were studied *in vitro* by immunofluorescence staining. Finally, four known single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *hmgb1* gen were tested for correlations with clinical parameters. The results showed a predominant cytoplasmic

localization of HMGB1 in granulomatous inflammation in GPA in contrast to more nuclear localization in CRS. Cells around necrotic areas in the granulomatous inflammation were identified as CD68⁺ macrophages, which not only shifted HMGB1 to the cytoplasm but also displayed a substantial RAGE expression. However, there was no difference in serum sRAGE concentrations between GPA and HC. In contrast, sRAGE was elevated in T1D as disease control. HMGB1 derived from necrotic cells mediated the release of IL-1 β from a macrophage-like cell line *in vitro*. Interestingly, differences were observed in the expression pattern of HMGB1 in plasma samples of GPA in comparison to HC in 2D-PAGE. This indicates various posttranslational modifications such as acetylation which point to active secretion processes. Thus, modified HMGB1, in contrast to total amounts, could be an interesting marker for diagnostic purposes of the granulomatous manifestation in GPA. Altogether, we speculate that active secretion and passive release of HMGB1 in the granulomatous inflammation could contribute to a self-amplificatory loop via RAGE and IL-1 β production. Genetic variations of the *hmgb1* gene were not associated with clinical parameters in GPA. Moreover, we demonstrated for the first time that HMGB1 interacts with and binds to the autoantigen PR3 in PMN. Further, HMGB1 was expressed together with PR3 on the surface of apoptotic PMN, but not on viable PMN *in vitro*. In addition, colocalization of HMGB1 and PR3 was observed in the granulomatous inflammation. These data support the hypothesis that the persistently released danger signal HMGB1 in the granulomatous inflammation together with the overexpressed autoantigen PR3 and an impaired efferocytosis could trigger a break of tolerance. In conclusion, we assume that HMGB1 both contributes to the maintenance of the granulomatous inflammation and acts as endogenous adjuvant for PR3 which eventually promotes the autoimmune reaction in GPA.

2. Einleitung

2.1. Granulomatose mit Polyangiitis

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) gehört zusammen mit der Mikroskopischen Polyangiitis (MPA) und der Eosinophilen Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA) zur Gruppe der Anti-Neutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörper (ANCA)-assoziierten Vaskulitiden (AAV). Mit einer jährlichen Inzidenz von 9-12 Fällen/Mio. Einwohner in Deutschland gilt die GPA als seltene Erkrankung (Reinhold-Keller et al., 2005). Definiert wird die GPA nach der internationalen Chapel Hill Consensus Konferenz als nekrotisierende, granulomatöse Entzündung des oberen und unteren Respirationstraktes und systemische nekrotisierende Vaskulitis der kleinen und mittleren Blutgefäße (Jennette et al., 2013). Das Auftreten von Autoantikörpern gegen Proteinase 3 (PR3-ANCA), eine antimikrobielle Serinprotease aus azurophilen Granula von Neutrophilen und Monozyten, ist ein charakteristisches Merkmal der GPA. Die Erkrankung verläuft meist in zwei Phasen, indem sie als lokale, granulomatöse Initialphase im Respirationstrakt beginnt (< 50% ANCA-positiv), die häufig mit starker Gewebs- und Knochenzerstörung assoziiert ist (Mueller et al., 2013). Im weiteren Verlauf geht sie in der Regel in eine systemische generalisierte Phase (> 95% ANCA-positiv) mit multipler Organmanifestation über (Lamprecht et al., 2009). Die Untergruppen der GPA sind durch die EULAR (engl. *European League Against Rheumatism*) definiert worden (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Definition von Untergruppen der GPA (Hellmich et al., 2007)

Phase	Vaskulitis außerhalb HNO/Lunge	Bedrohung für Organfunktion	ANCA
Lokalisiert	nein	nein	negativ
Frühsystemisch	ja	nein	negativ/positiv
Generalisiert	ja	ja	positiv
Schwer	ja	ja (Organversagen)	positiv
Refraktär	ja	ja	positiv

Bleibt die Krankheit unbehandelt, würde sie innerhalb eines Jahres zum Tode führen. Heute kann die Krankheit aufgrund der Erkenntnisse aus verschiedenen Studien schnell kontrolliert und eine Remission eingeleitet bzw. aufrechterhalten werden, wobei die Nebenwirkungen einiger Therapien z.T. zu schweren Komplikationen führen können. Die Therapie richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung (Schönermarck et al., 2014). Die aktuellen Behandlungsstrategien für die Einleitung und Erhaltung einer Remission bei Minimierung schwerer Nebenwirkungen ist in Abb. 1 dargestellt.

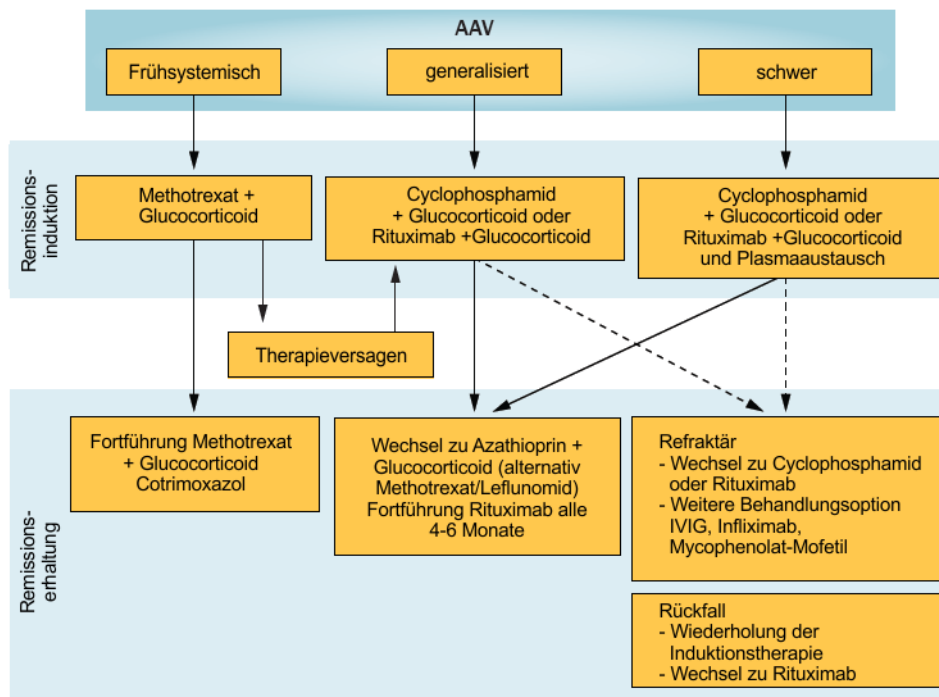


Abb. 1 Therapiestrategien zur Einleitung und Erhaltung einer Remission bei AAV

(übersetzt nach Schönemarck *et al.*, 2014)

Das heutige Verständnis zur Pathogenese der GPA basiert auf Erkenntnissen aus klinischen und experimentellen Daten. Die beiden Hauptmerkmale der GPA, Vaskulitis und extravaskuläre Granulomatose, werden dabei häufig getrennt betrachtet und sind unterschiedlich gut verstanden. Einen Überblick über mögliche Theorien und Mechanismen zur Pathogenese und Entstehung der Autoimmunreaktion ist nachfolgend dargestellt (nach Jennette and Falk, 2014).

Pathogenese der ANCA-vermittelten Vaskulitis

Zirkulierende, durch Zytokine oder alternative Komplementfaktoren geprimte Neutrophile exprimieren die PR3 auf ihrer Oberfläche und setzen sie in die Umgebung frei. ANCA binden an die PR3 auf Neutrophilen und führen zur deren Aktivierung. Aktivierte Neutrophile setzen Faktoren frei, die das alternative Komplementsystem aktivieren. Dies aktiviert zusammen mit ANCA weitere Neutrophile über einen inflammatorischen, sich selbst amplifizierenden Kreislauf. Aktivierte Neutrophile dringen in die Gefäßwände ein, erzeugen einen oxidativen Burst, degranulieren oder werden nekrotisch, apoptotisch oder NETotisch (ein Prozess, bei dem Neutrophile ihre DNA-Fasern (engl. *neutrophil extracellular traps*, NETs) freisetzen, um extrazelluläre Pathogene zu eliminieren). Die im frühen Stadium der Entzündung durch Neuro-

phile vermittelte Schädigung der Gefäße mit fibrinoider Nekrose geht im Weiteren über in eine Leukozyten-vermittelte chronische Entzündung mit starker, fibrotischer Vernarbung. Dieser Prozess ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.

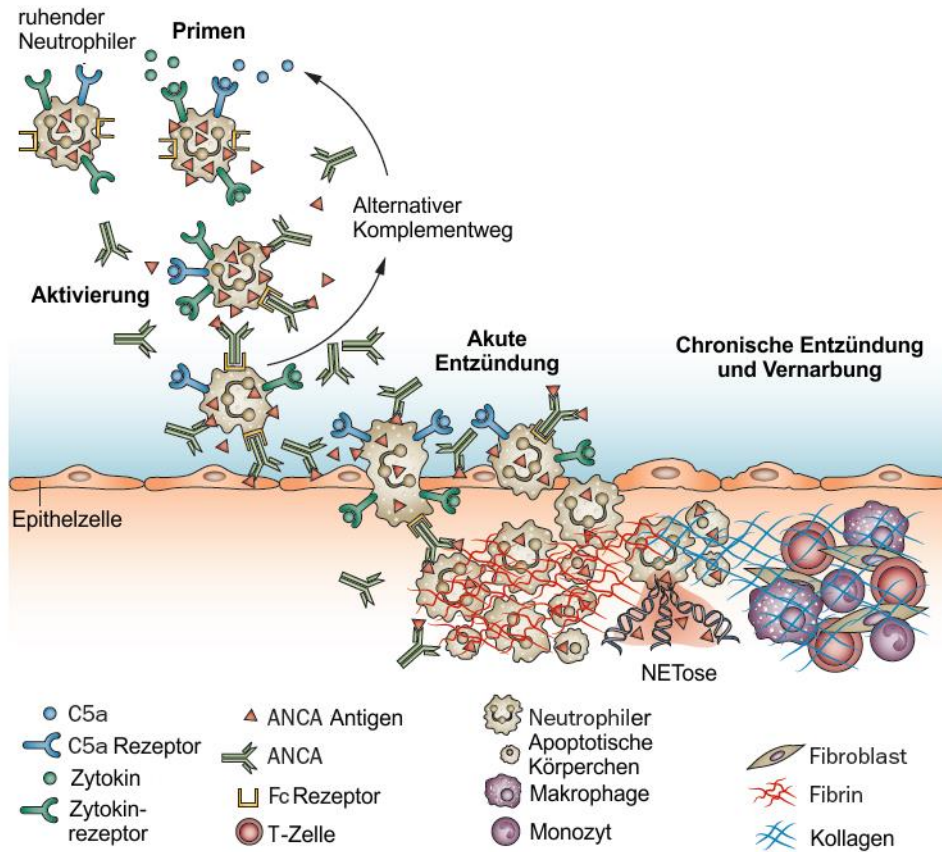


Abb. 2 Mögliche pathogenetische Prozesse der ANCA-vermittelten Vaskulitis (übersetzt nach (Jennette and Falk, 2014)). Erläuterung siehe Text.

Pathogenese der Granulomatose

Dieser Aspekt der Erkrankung ist weniger gut aufgeklärt. Vermutlich befindet sich aufgrund vorausgehender Ereignisse (Infektion o.Ä.) eine erhöhte Anzahl an geprimten Neutrophilen im Gewebe. ANCA aktivieren geprimte Neutrophile, welche einen inflammatorischen, sich selbst amplifizierenden Kreislauf auslösen und weitere Neutrophile anlocken und aktivieren. Es entsteht ein nekrotisierender Mikroabszess, in dem sich Neutrophile in verschiedenen Stadien der Apoptose oder Nekrose befinden, mit einem Rand aus Monozyten und Makrophagen. Im weiteren Verlauf wird durch die akute, nekrotisierende Entzündung eine Immunantwort ausgelöst, die zur Abgrenzung des nekrotischen Bereichs durch einen epitheloidartigen Rand aus Makrophagen führt. Das Einwandern weiterer Immunzellen wie dendritische Zellen, Makrophagen, Riesenzellen, T- und B-Zellen führt zur Entstehung des charakteristischen, unscharf begrenzten Granuloms. Im späten Stadium entwickeln sich daraus lymphoide folliculäre Strukturen, die zur Chronifizierung der Granulomatose führen und möglicherweise

eine bislang unbekannte Quelle für die ANCA Entstehung darstellen (Voswinkel et al., 2005). Der Prozess zur Entstehung der Granulomatose ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

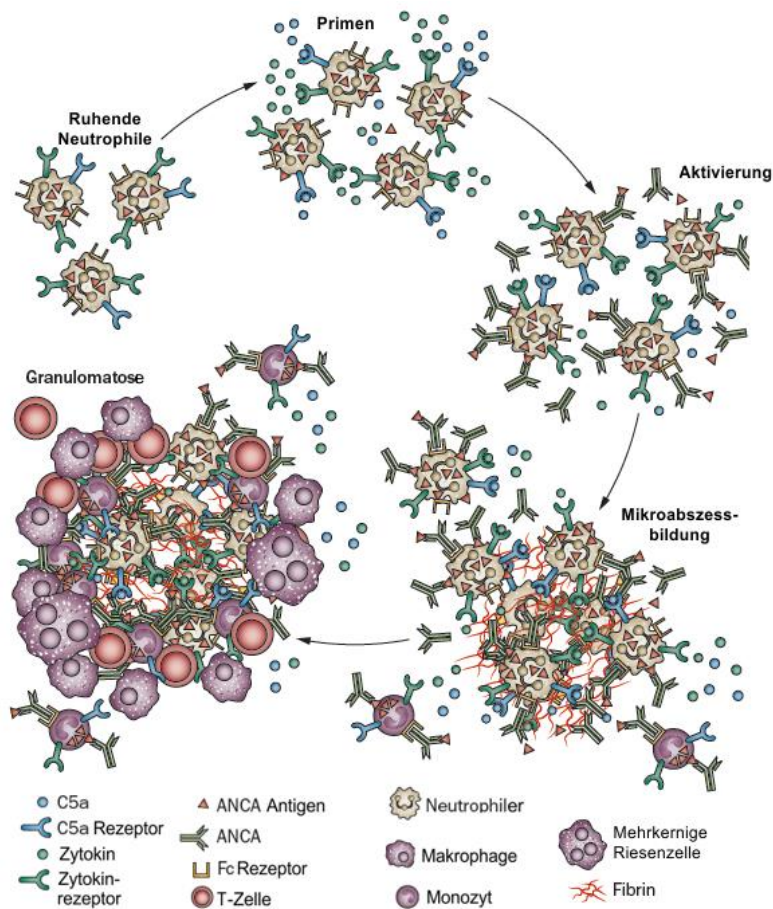


Abb. 3 Mögliche pathogenetische Prozesse der ANCA-vermittelten nekrotisierenden Granulomatose [übersetzt nach (Jennette and Falk, 2014)]. Erläuterung im Text.

Autoimmunreaktion bei der GPA

Die Ursache bzw. der Trigger für die Entstehung der Autoimmunreaktion bei der GPA ist bisher ungeklärt. Es spricht vieles für eine multifaktorielle Kombination aus genetischem Hintergrund, gestörter Immunregulation und Umwelteinflüssen.

Genetische Studien haben gezeigt, dass *HLA DPB1*0401* (ein Locus des Haupthistokompatibilitätskomplexes), *SERPINA1* (kodiert für α 1-Antitrypsin, ein natürlicher Inhibitor von PR3) und *PRTN3* (kodiert für Proteinase 3) mit PR3-ANCA⁺ GPA assoziiert sind (Lyons et al., 2012). Auch eine erhöhte Membranexpression von PR3 auf Neutrophilen ist genetisch determiniert (Schreiber et al., 2003).

Zusätzlich zur genetischen Prädisposition, sind möglicherweise Fehlregulationen auf zellulärer Ebene bei der Entstehung der Autoimmunreaktion bei der GPA beteiligt. In Tabelle 2 sind die möglichen Defekte der Immunregulation aufgelistet, die für GPA diskutiert werden.

Tabelle 2 Hypothesen und mögliche Mechanismen zur gestörten Immunregulation bei der GPA

Hypothese	möglicher Mechanismus in GPA
fehlende Suppression im T- und B-Zell-Repertoire	<ul style="list-style-type: none"> • verminderte Suppressorfunktion regulatorischer T-Zellen • verstärkte B-Zellstimulation durch ANCA-aktivierte Neutrophile (BAFF-Freisetzung → Proliferation, Apoptose-Inhibierung)
Generierung von Neoautoantigenen	<ul style="list-style-type: none"> • alternatives Splicen • Produktion von komplementärer PR3 durch Transkription des antisense-Strangs
Epitopverschiebung von natürlichen/nicht-pathogenen Autoantikörpern	<ul style="list-style-type: none"> • Generierung pathogener Antikörper aus natürlichen Antikörpern durch Einfluss endogener und exogener Stimuli
komplementäre Antigene und anti-idiotypische Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • Antikörperbildung gegen komplementäre PR3 (cPR3-AK) • Anti-Idiotypen Antwort gegen cPR3-AK induziert den PR3-ANCA
Molekulare Mimikry	<ul style="list-style-type: none"> • Sequenzähnlichkeiten von Pathogen-assoziierten Peptiden zu PR3 oder komplementärer PR3 führen zur Generierung von PR3-ANCA
Abnorme, immunstimulatorische Präsentation des Autoantigens	<ul style="list-style-type: none"> • verminderte Beseitigung apoptotischer Neutrophiler, die PR3 auf der Oberfläche präsentieren • Präsentation von PR3 auf NET

In der nekrotisierenden, granulomatösen Entzündung bei der GPA befinden sich Neutrophilen-assoziierte Autoantigene (durch nekrotische, apoptotische oder NETotische Neutrophile präsentiert) in enger räumlicher Nähe zu antigenpräsentierenden Zellen (APC), T-Zellen und B-Zellen. Zusammenfassend wird in dieser Arbeit die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die neutrophilenreiche Entzündung in Kombination mit möglichen Defekten in der Immunregulation einen Ort der Toleranzdurchbrechung darstellen und damit zur Autoimmunreaktion gegen PR3 führen könnte.

2.2. Erweiterte Theorien zur (Auto)Immunantwort

Die Begründung der modernen, zellulären Immunologie geht über 60 Jahre zurück, nachdem Peter Medawar und Thomas Gibson die Beteiligung von Immunzellen bei der Abstoßung von Transplantaten zeigten und damit die bis dato gültige Ansicht ablösten, Immunantworten seien nur auf die Beteiligung von Antikörpern zurückzuführen. Im Jahre 1959 beschrieb Frank Macfarlane Burnet die Selbst-Nichtselbst-Theorie (engl. *self-nonself theory*, SNS), die besagte, dass Abwehrzellen (später B-Zellen) eine Immunantwort auslösen, wenn sie fremde Strukturen erkennen, nicht jedoch bei körpereigenen Strukturen (Burnet, 1959). 1970 wurde dieses Modell von Peter Bretscher und Melvin Cohn erweitert, weil sie erkannten, dass B-Zellen ein zweites Signal von einer weiteren Zelle (später T-Helferzelle) erhalten müssen, um

eine Immunantwort auszulösen (Bretscher and Cohn, 1970). 1975 hatten Kevin Lafferty und Alastair Cunningham einen weiteren Zelltypen in das bestehende Modell eingefügt, denn sie fanden heraus, dass auch die T-Helferzelle ein zweites Signal oder Kostimulation durch einen weiteren Zelltyp (später Antigenpräsentierende Zelle, APC) benötigen (Lafferty and Cunningham, 1975). Charles Janeway revolutionierte 1989 die bis dahin bestehenden Modelle, indem er die Mustererkennungstheorie (engl. *pattern recognition theory*) aufstellte. Diese besagte, dass dem adaptiven Immunsystem aus B- und T-Zellen mit zufällig generierten Rezeptoren ein evolutionär konserviertes, angeborenes System vorausgehen muss. Er war der Überzeugung, dass APC mit genetisch determinierten Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) gegen konservierte Mikrobenstrukturen (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) ausgestattet sind und dass deren Aktivierung notwendig ist, damit T- und B-Zellen eine Immunantwort auslösen. Das Immunsystem würde demnach nicht zwischen Selbst und Nichtselbst, sondern zwischen nichtinfektiösem Selbst und infektiösem Nichtselbst (engl. *infectious non-self*, INS) unterscheiden (Janeway, 1989). Nach der Auffassung von Polly Matzinger lassen sich jedoch mit den SNS/INS Theorien selbst nach weiteren Modifizierungen bestimmte immunologische Probleme immer noch nicht erklären (z.B. Abstoßung von Transplantaten, Autoimmunität, Wirkung von Adjuvantien nicht-bakteriellen Ursprungs). Daher postulierte sie 1994 das „Danger“-Modell (zu Deutsch Gefahren-Modell), das besagte, dass APC durch endogene Gefahren- oder Alarmsignale von gestressten oder zerstörten Zellen aktiviert werden, das Immunsystem also zwischen gefährlich und ungefährlich unterscheidet (Matzinger, 1994). Matzinger schließt also nicht aus, dass APC sowohl durch endogene als auch durch exogene Signale aktiviert werden können. Denn viele PRR, wie Toll-like-Rezeptoren, können sowohl Moleküle bakteriellen Ursprungs (z.B. LPS) als auch körpereigene Proteine (z.B. Hitzeschockproteine) binden. Die Einteilung aller möglichen Antigene nach Matzinger ist in Abb. 4 dargestellt. Die Immunantwort in Abhängigkeit der Antigen-Herkunft bei der Gefahr-Theorie unterscheidet sich z.T. von den anderen beiden Theorien (siehe Tabelle 3).

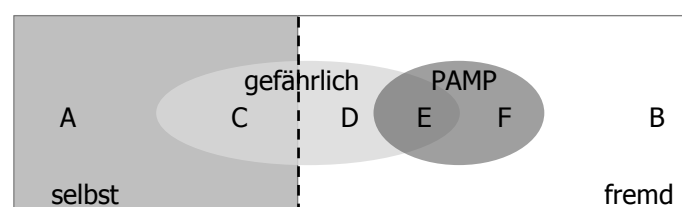


Abb. 4 Unterteilung der Antigene und Immunantworten nach den drei immunologischen Modellen SNS, INS und Gefahr-Theorie.

(Abk.: PAMP – pathogen-associated molecular patterns)

Tabelle 3 Vorhersage der Immunantworten (ja/nein) für die drei immunologischen Modelle SNS, INS und Gefahr-Theorie in Abhängigkeit des Antigens nach Matzinger, 2002

Beschreibung des Antigens				Theorien		
Herkunft des Ag	Gefahrenpotential	PAMP	Code*	SNS	INS	Gefahr
selbst	gefährlich		C	nein	nein	ja
	harmlos		A	nein	nein	nein
fremd	gefährlich	+	E	ja	ja	ja
		-	D	ja	nein	ja
	harmlos	+	F	ja	ja	nein
		-	B	ja	nein	nein

Abk.: Ag – Antigen; * bezieht sich auf Abb. 4

Nach Matzingers Auffassung ist die Entscheidung, ob die Immunantwort erfolgt oder nicht, stark abhängig von den Vorgängen im Gewebe. Die gewebsständigen Zellen beeinflussen je nach Art und Stärke der Signale (pro- oder anti-inflammatorisch) die lokale Immunantwort. Letztendlich ist keines der Modelle in der Lage, alle Immunphänomene zu erklären. Dennoch scheint Matzingers Gefahr-Modell bestimmte Interpretationen bezüglich der Pathogenese von Autoimmunität und die damit verbundene Toleranz bzw. deren Durchbrechung zuzulassen, die auch die Autorin dieser Arbeit favorisiert.

Unter Einbeziehung der Gefahr-Theorie gibt Tveita vier mögliche Erklärungen für die Entstehung einer Autoimmunreaktion (Tveita, 2010):

- 1) Defekte in der Beseitigung apoptotischer Zellen: nicht vollständig beseitigte, tote Zellen stellen eine Hauptquelle von Selbst-Antigenen dar, die bei persistierender Freisetzung von Gefahrensignalen APC aktivieren und zur Autoimmunreaktion führen kann.
- 2) Fehlerhafter Abbau von Antigenen durch APC: phagozytierte (Auto)Antigene werden nicht vollständig degradiert und können im endozytotischen Kompartiment über Toll-Like-Rezeptor 7 und 9 zur Autoimmunantwort führen.
- 3) Verändertes Selbst: Antigene sind z.B. durch Demaskierung (Mechanismus unbekannt) ungewöhnlich verändert und können selbst zum Gefahrensignal werden.
- 4) Neo-Autoantigenbildung durch Komplexierung: nicht-immunogene Antigene können in Komplex mit einer immunogenen Struktur (z.B. Adjuvans) eine Immunantwort auslösen.

2.3. Endogene Gefahrensignale

Neben exogenen PAMPs sind auch endogene Gefahrensignale (wie von Matzinger postuliert), die durch Gewebeerstörung und Zelluntergang freigesetzt werden, in der Lage, PRR und damit die angeborene Immunantwort zu aktivieren. 2006 wurde von Joost Oppenheim der Begriff „Alarmin“ für diese Gruppe endogener Moleküle eingeführt, die für Gewebs- und Zellzerstörung stehen. Marco Bianchi definiert darauf basierend folgende vier Eigenschaften, die ein „Alarmin“ charakterisiert (Bianchi, 2007):

1. Passive Freisetzung durch Nekrose, aber nicht durch Apoptose
2. Aktive Sekretion durch vitale Immunzellen
3. Rekrutierung und Aktivierung von Rezeptor-exprimierender Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. dendritische Zellen)
4. Beteiligung an der Wiederherstellung der physiologischen Gewebshomöostase

Die Liste der identifizierten Alarmine wächst stetig. Die bisher am besten charakterisierten, klinisch relevanten sind HMGB1 (engl. *high-mobility group box 1*), S100 Proteine S100A8/A9/A12, Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70, β -Defensine und das Cathelicidin LL-37 (Chan and Roth, 2012).

2.4. HMGB1

Vor rund 15 Jahren wurde HMGB1 als später Mediator in der Sepsis identifiziert (Wang et al., 1999). Es gilt als prototypisches Alarmin und ist ein zentrales Molekül der angeborenen Immunantwort, das an Gewebeerstörung, Entzündung, Stammzellrekrutierung und Geweberegeneration beteiligt ist. Es ist ein ubiquitär exprimiertes Kernprotein und in allen Säugern zu > 99% identisch (Bianchi and Manfredi, 2007). HMGB1 Knockout-Mäuse sterben innerhalb von 24 h nach der Geburt, woraus man eine essentielle Funktion des Proteins ableiten kann (Calogero et al., 1999).

2.4.1. Struktur

Hmgb1 liegt beim Menschen auf dem Chromosom 13q12-13 und besteht aus fünf Exons, die ein 215 Aminosäuren langes Polypeptid kodieren, aus welchem ein 25 kD Protein entsteht. HMGB1 ist strukturell aus zwei homologen DNA-Bindedomänen (Box A und B mit je ~ 80

Aminosäuren), welche eine charakteristische L-Form mit drei α -Helices aufweist, und einem negativ geladenen sauren C-Terminus (~ 30 aufeinanderfolgende Glutamine und Aspartate) aufgebaut (Hardman et al., 1995). Box A besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften und bindet vorwiegend geschädigte DNA (Yang et al., 2004). Im Gegensatz dazu wirkt die Box B pro-inflammatorisch, da diese Domäne Rezeptorbindestellen (TLR und RAGE, siehe dazu 2.4.4 Rezeptoren und Bindungspartner) enthält und darüber die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine in Makrophagen induziert (Li et al., 2003). Die Proteinstrukturen der Domänen A und B sind mittels NMR bereits aufgeklärt (siehe Abb. 5).

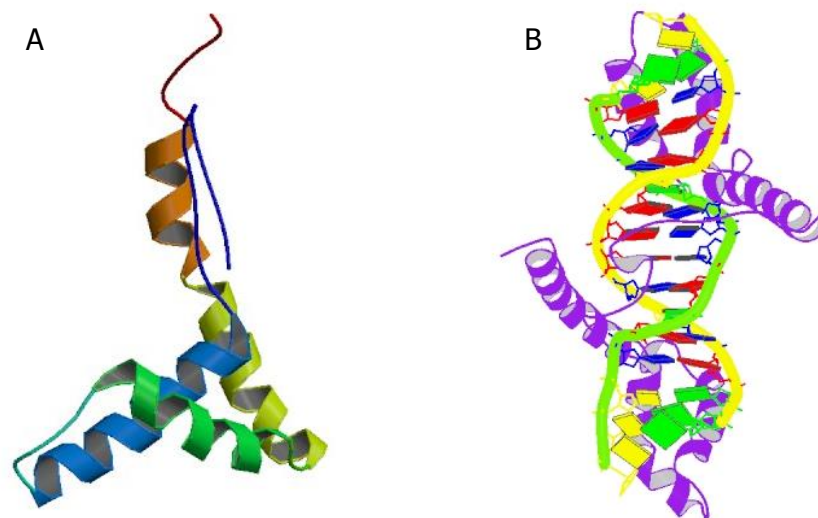


Abb. 5 NMR Strukturen von HMGB1

A) Box A des oxidierten HMGB1 (Wang et al., 2013); B) Box B an DNA gebunden (Stott et al., 2006)

Der C-Terminus ist u.a. an DNA-Reparatur, Replikation und Umbau der Chromatinstruktur beteiligt (Stros, 2010). HMGB1 weist zwei Kernlokalisierungssequenzen (engl. *nuclear localization signals*, NLS) und zwei Kernexportsequenzen (engl. *nuclear export signals*, NES) auf, wobei ersteres den Import in den Kern und letzteres den Export aus dem Kern bewirkt (Bonaldi et al., 2003). HMGB1 kann an verschiedenen Aminosäuren posttranslational modifiziert werden (Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Oxidierung), wodurch die zelluläre Lokalisation und biologische Aktivität von HMGB1 entscheidend beeinflusst wird (siehe 2.4.2 Freisetzung und 2.4.3 Posttranslationale Modifikationen). Eine Übersicht über Primärstruktur und Funktion der einzelnen Domänen ist in Abb. 6 dargestellt.

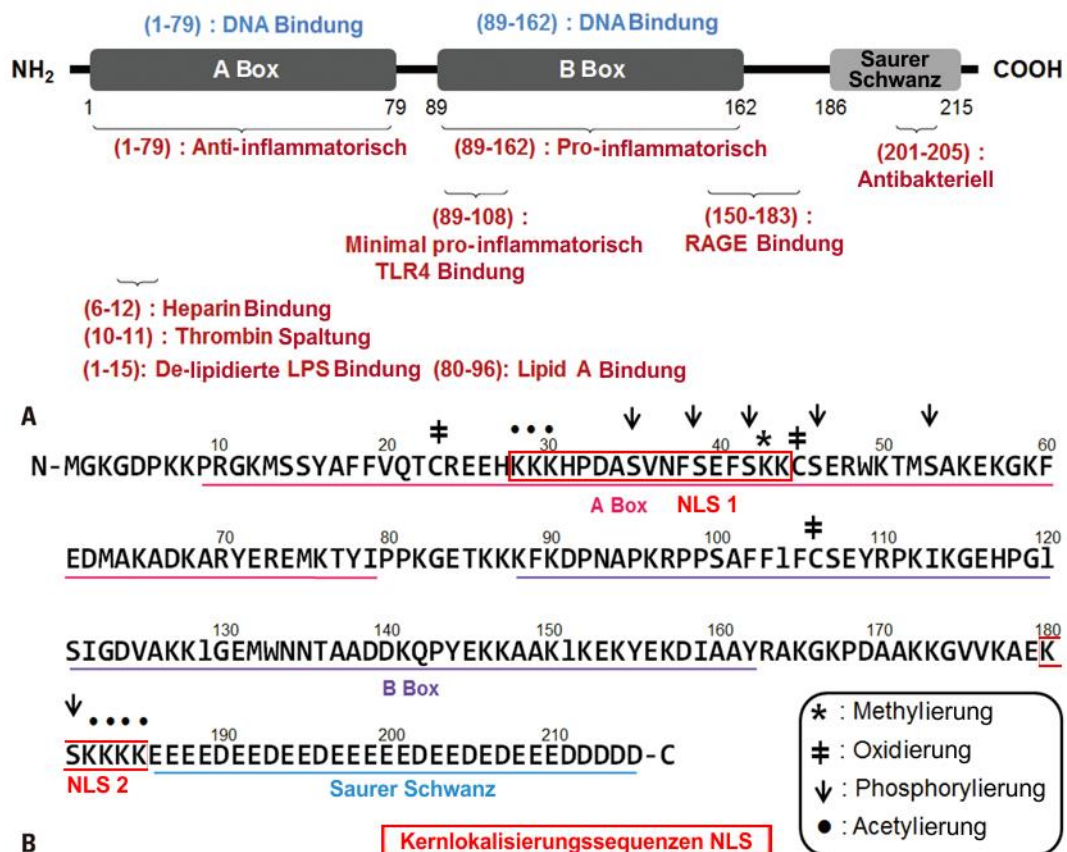


Abb. 6 Primärstruktur, Funktionen und Modifikationen von HMGB1
(modifiziert und übersetzt nach Lee *et al.*, 2014)

2.4.2. Freisetzung

Passive Freisetzung

Wie in Abb. 7 dargestellt, kann HMGB1 den Kern prinzipiell auf zwei Wegen verlassen. Zum einen passiv durch nekrotische oder beschädigte Zellen und zum anderen aktiv durch Sekretion aktivierter Immunzellen. Nekrotische Zellen setzen HMGB1 frei und induzieren die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α in Monozyten. Apoptotische Zellen weisen hypoacetyliertes Chromatin auf, an welches HMGB1 stabil gebunden bleibt. (Scaffidi *et al.*, 2002).

Aktive Sekretion

Nach Stimulation durch PAMPs (z.B. LPS) oder andere inflammatorische Moleküle wird HMGB1 von Monozyten und Makrophagen aktiv sekretiert. Die Sekretion in Monozyten erfolgt über drei Schritte:

1. HMGB1 verlässt den Kern und tritt in das Zytoplasma ein. Dieser Prozess ist stark abhängig von dem Acetylierungsstatus des Chromatins. Unter physiologischen Bedingungen wird HMGB1 passiv oder über das Exportin CRM1 (engl. *chromosome region maintenance 1*), einem Kernexport-Protein, ins Zytoplasma transportiert. Gleichzeitig wird HMGB1 über Kernimporter in die entgegengesetzte Richtung zurück in den Kern befördert. In diesem Zustand pendelt HMGB1 zwischen Kern und Zytoplasma, wobei der Kernimport überwiegt und HMGB1 größtenteils im Kern vorliegt. Die Stimulation eines Monozyten durch inflammatorische Moleküle führt über den NF- κ B-Signalweg zur Aktivierung von Histonacetylasen und gleichzeitig zur Inhibierung von Histondeacetylasen. Dies führt wiederum zu einer Acetylierung von HMGB1 und seiner Kernlokalisierungssequenzen (NLS). Die daraus resultierende Neutralisierung der Ladung der NLS verhindert den Reimport von HMGB1 in den Kern und zu einer Akkumulation im Zytosol. (Bonaldi et al., 2003).
2. HMGB1 transloziert vom Zytosol in zytoplasmatische Organellen. Diese Organellen sind als spezielle sekretorische Lysosomen identifiziert worden, die über einen nicht-klassischen Sekretionsweg zur Plasmamembran transportiert werden. Die molekulare Grundlage hierfür ist jedoch unklar (Gardella et al., 2002).
3. Organellen werden exozytiert. Die Exozytose von HMGB1-enthaltenden sekretorischen Vesikeln wird durch Lysophosphatidylcholin (LPC) getriggert. LPC ist ein bioaktives Lipid, das erst spät in inflammatorischen Prozessen akkumuliert und eine Rolle in der Exozytose spielt (Gardella et al., 2002).

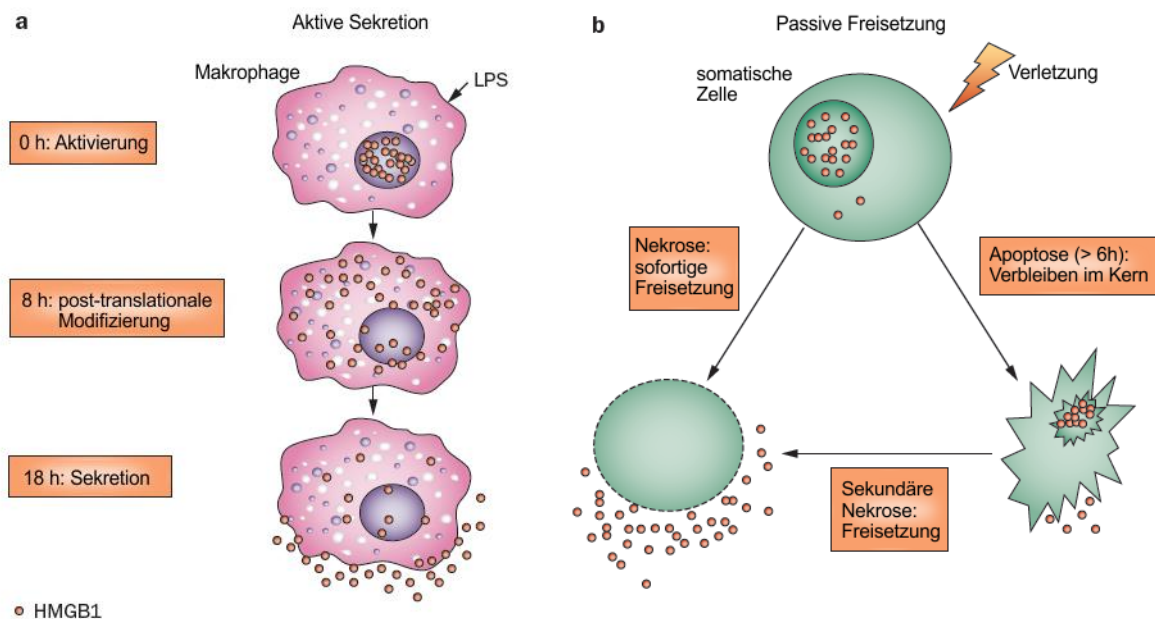


Abb. 7 Extrazelluläre Freisetzung von HMGB1

a) Aktive Sekretion durch stimulierten Makrophagen, in denen HMGB1 erst posttranslational modifiziert und nach einer bestimmten Zeit sekretiert wird. b) Eine passive Freisetzung von HMGB1 durch Nekrose erfolgt schnell. Während der Apoptose verbleibt HMGB1 im Kern, kann aber durch sekundäre Nekrose ebenfalls passiv freigesetzt werden. (Übersetzt nach Harris *et al.*, 2012)

2.4.3. Posttranslationale Modifikationen

Neben der bereits beschriebenen Acetylierung (siehe 2.4.2 Freisetzung) spielen weitere posttranslationale Modifikationen eine entscheidende Rolle für die Lokalisation und die biologische Aktivität von HMGB1.

Phosphorylierung, verursacht u.a. durch TNF- α , beeinflusst ebenfalls den Kerntransportprozess von HMGB1 z.B. in Makrophagen. Werden beide Kernlokalisierungssequenzen (NLS) phosphoryliert, ist der Karyopherin- α 1 (KAP- α 1)-abhängige Kernimport von HMGB1 inhibiert und HMGB1 akkumuliert im Zytoplasma (Youn and Shin, 2006).

Für Neutrophile ist bekannt, dass Mono-Methylierung an einem Lysinrest zu einer Konformationsänderung der Box A und damit einhergehender Abschwächung der DNA-Bindung führt. HMGB1 diffundiert dann passiv ins Zytoplasma, im Gegensatz zu Monozyten/Makrophagen, bei denen HMGB1 überwiegend kernständig lokalisiert ist (Ito et al., 2007).

HMGB1 ist außerdem sensitiv für Redox-Vorgänge in der Zelle. Der Redox-Status dreier Cysteine (C23, C45, C106) beeinflusst die pro-inflammatorische Aktivität von HMGB1 (Venereau et al., 2012). An einem *in vivo* Mausmodell für Muskelverletzung demonstrierte die Gruppe das zeitliche Auftreten verschiedener HMGB1-Redox-Formen während einer Entzündung. Zu Beginn entzündlicher Vorgänge befinden sich alle drei Cysteine von extrazellulärem HMGB1 in der reduzierten Thiol-Form. Diese Form wirkt über den Chemokinrezeptor CXCR4 chemotaktisch (Campana et al., 2009) und rekrutiert weitere Leukozyten an den Ort der Entzündung. Im weiteren Verlauf der Entzündung tritt vermehrt HMGB1 mit einer Disulfid-Brücke zwischen C23 und C45 auf, während C106 in reduzierter Thiol-Form vorliegt. Diese Disulfid-Form von HMGB1 wird von rekrutierten Leukozyten direkt oder indirekt durch partielle Oxidation unter Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) produziert. Die Disulfid-Form löst über die Bindung an TLR4 eine Zytokin-Antwort bei Leukozyten aus (Yang et al., 2011) und kann als Marker für Gewebeschädigung betrachtet werden. Durch anhaltende ROS Produktion kommt es zur vollständigen Oxidierung der Schlüsselcysteine und zur Inaktivierung von HMGB1. Alle drei Redox-Formen sind in Abb. 8 schematisch dargestellt.

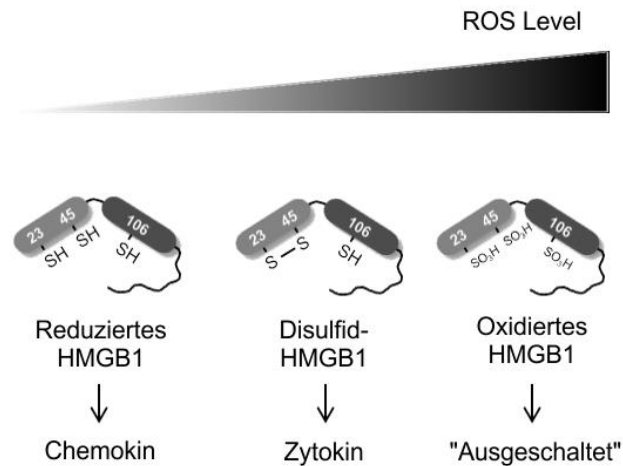


Abb. 8 Biologische Aktivität von freigesetztem HMGB1

Funktion von HMGB1 in Abhängigkeit des Redox-Status, wie sie in einer Entzündung mit zunehmender Konzentration an Reaktiver-Sauerstoffspezies (ROS) auftreten. Die beteiligten Cysteine 23, 45 und 106 werden dabei stufenweise oxidiert (Venereau et al., 2012)

2.4.4. Rezeptoren und Bindungspartner

Für HMGB1 sind verschiedene Rezeptoren bekannt, die überwiegend zur Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren (PRR) der angeborenen Immunantwort zählen. HMGB1 vermittelt meist im Komplex mit anderen pro-inflammatorischen Molekülen (Bianchi, 2009) immunologisch relevante Prozesse wie Zytokinproduktion, Zellproliferation, Chemotaxis oder Zelldifferenzierung. Eine Übersicht über die wichtigsten Rezeptoren, ihre Zellexpression und Funktion ist in Tabelle 4 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4 HMGB1 Bindungspartner und Rezeptoren

Rezeptor	Bindungs-partner	Zell-expression	Funktion	Referenz
RAGE	-	Monozyten DC Lymphozyten	Chemotaxis Proliferation Differenzierung Zytokinfreisetzung	(Yang et al., 2007) (Schmidt et al., 2001)
TLR2	Nukleosomen	Makrophagen DC	Zytokinfreisetzung Reifung Antikörperproduktion	(Urbonaviciute et al., 2008) (Wen et al., 2013)
TLR4	LPS	Monozyten Makrophagen DC	Zytokinfreisetzung	(Youn et al., 2011)
TLR9	ssDNA CpG-DNA	DC	Zytokinfreisetzung	(Tian et al., 2007)
IL-1R	IL-1 β	Makrophagen Neutrophile	Zytokinfreisetzung	(Sha et al., 2008)
CXCR4	CXCL12	Makrophagen DC	Chemotaxis Migration Proliferation	(Campana et al., 2009)

Abk.: DC – dendritische Zellen

Die Interaktion von HMGB1 mit den Rezeptoren TLR2, TLR4, TLR9 und RAGE (engl. *receptor for advanced glycation endproducts*) aktiviert über verschiedene Signalwege den zentralen inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B, was eine schnelle zelluläre Antwort wie Zytokin- oder Chemokin-Ausschüttung zur Folge hat (siehe Abb. 9)

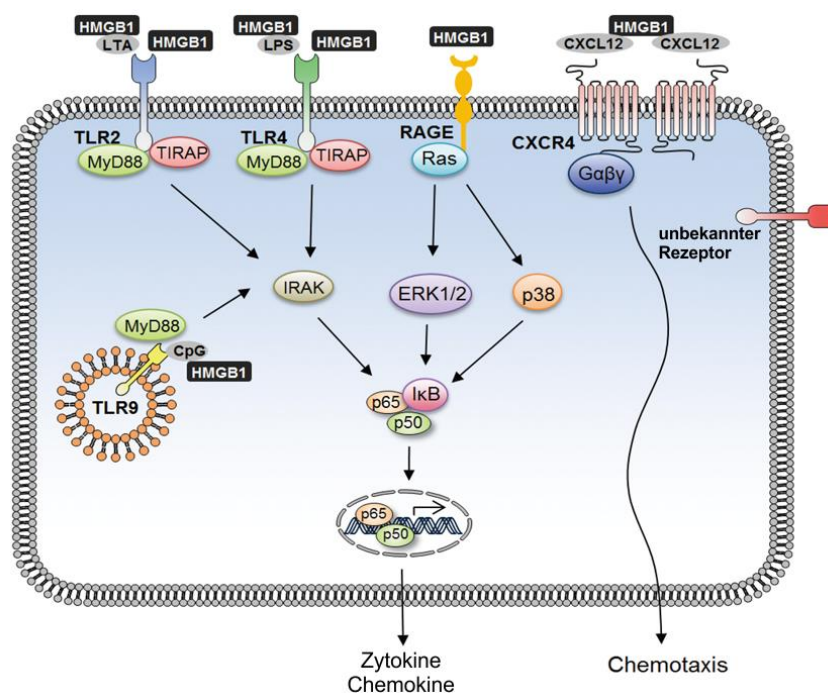


Abb. 9 HMGB1 Rezeptoren und Signalkaskaden
(übersetzt nach Lee *et al.*, 2014)

Studien zeigten eine Beteiligung von RAGE in inflammatorischen Prozessen sowie damit einhergehende Gewebeerstörung in verschiedenen (chronisch) entzündlichen Erkrankungen (Ramasamy et al., 2009). RAGE ist ein Transmembranprotein, das zur Immunglobulin-Superfamilie zählt. Dieser Rezeptor erkennt ein breites Spektrum an Liganden. Ursprünglich als Rezeptor für nicht-enzymatisch glykolysierte und oxidierte Makromoleküle (engl. *advanced glycation endproducts*, AGE) identifiziert, ist RAGE heute auch als Rezeptor für endogene Gefahrenmoleküle wie HMGB1 oder S100A12 bekannt (Liu et al., 2009). Unter physiologischen Bedingungen mit Ausnahme der Lunge wird RAGE niedrig exprimiert. Durch Akkumulation der Liganden wird die Expression des Rezeptors über einen sich selbst amplifizierenden Prozess jedoch aktiviert (Schmidt et al., 2001). Eine verkürzte, lösliche Variante von RAGE ist sRAGE (engl. *soluble RAGE*). sRAGE wird durch alternatives Splicen oder durch enzymatische Abspaltung u.a. durch ADAM10 (engl. *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) von der Membranoberfläche generiert und besitzt die gleiche Spezifität für Liganden des membrangebundenen Rezeptors (Zhang et al., 2008). Daher wird sRAGE auch als Abfangrezeptor für RAGE-Liganden bezeichnet, da er die Rezeptor/Liganden-Bindung negativ reguliert (Maillard-Lefebvre et al., 2009). Es ist bekannt, dass sowohl erniedrigte als auch erhöhte Serum Spiegel von sRAGE in einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen eine Rolle spielen können, weshalb sRAGE als Biomarker kontrovers diskutiert wird (Prasad, 2014).

2.4.5. Funktion

Die intrazellulären und extrazellulären Funktionen von HMGB1 sind in zahlreichen Arbeiten beschrieben worden.

Intrazellulär

Als Kernprotein erfüllt HMGB1 wichtige Funktionen in der Regulation von Transkription und Reparatur. Durch nicht-spezifische Bindung in der kleinen Furche der DNA führt HMGB1 zur Krümmung der DNA und macht diese zugänglich für weitere DNA-regulierende Proteine. HMGB1 interagiert neben Transkriptionsfaktoren auch mit Nukleosomen. HMGB1 ist dadurch an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie z.B. Chromatin-Umstrukturierung, Transkriptionsregulation, V(D)J Rekombination oder DNA-Reparatur (Churchill et al., 2011).

Im Zytoplasma spielt HMGB1 eine entscheidende Rolle bei der Autophagie, einem programmierten Überlebensmechanismus gestresster Zellen. Die durch den Einfluss von ROS generierte Disulfid-Form von HMGB1 bindet Beclin-1, einen zentralen Regulator von Autophagie,

wodurch Autophagie und damit ein wichtiger Überlebensmechanismus angeschaltet wird (Tang et al., 2010).

Eine weitere intrazelluläre Funktion von HMGB1 ist die negative Regulation von Efferozytose, d.h. dem Beseitigen von apoptotischen Neutrophilen durch Makrophagen ohne Aktivierung des Immunsystems. Intrazelluläres HMGB1 verhindert Src-Kinase-abhängig den Umbau des Zytoskeletts und damit der Fähigkeit des Makrophagen zur Phagozytose apoptotischer Neutrophiler. Ineffiziente Efferozytose kann zur permanenten Freisetzung inflammatorischer Moleküle und damit zur Entstehung entzündlicher Prozesse beitragen (Banerjee et al., 2011)

Extrazellulär

Passiv oder aktiv freigesetztes, extrazelluläres HMGB1 ist in der Lage, je nach Kontext über verschiedene Rezeptoren (siehe 2.4.4 Rezeptoren und Bindungspartner) Einfluss auf immunologische Prozesse zu nehmen. Seine Rolle als endogenes Gefahrensignal ist dabei von zentraler Bedeutung, denn HMGB1 ist auch in Prozesse involviert, in denen das Immunsystem nicht durch Infektionen aktiviert wird (d.h. bei sterilen inflammatorischen Ereignissen in Abwesenheit von Pathogenen, wie z.B. Trauma, Ischämie, nekrotischer Zelltunergang oder Autoimmunerkrankungen). HMGB1 erfüllt alle vier von Bianchi definierten Eigenschaften eines prototypischen Alarmins (siehe 2.3 Endogene Gefahrensignale) und passt damit in das Konzept von Matzingers Gefahren-Theorie. Tabelle 5 fasst die wichtigsten HMGB1-vermittelten Effekte auf Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems zusammen.

Tabelle 5 Effekt von extrazellulärem HMGB1 auf verschiedene Zelltypen des Immunsystems

(zusammengefasst aus Andersson and Tracey, 2011; Li et al., 2013)

angeborenes Immunsystem		adaptives Immunsystem	
Zelltyp	Effekt	Zelltyp	Effekt
Neutrophile	Aktivierung, Chemotaxis	T-Zellen	Proliferation, Th1-Polarisierung, Inhibition der Suppressorfunktion von Tregs
Makrophagen/ Monozyten	Produktion von Zytokinen, Chemokin und Metalloproteinasen, transendotheliale Migration	B-Zellen	Einfluss auf V(D)J Rekombination, Aktivierung, Proliferation
DC	Reifung und Migration zu Lymphknoten, Verstärkung der Immunogenität von aufgenommenen Antigenen, Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine		
NK Zellen	Aktivierung, Ausschüttung von IFN γ		

Abk.: DC – dendritische Zellen, NK – Natürliche Killer

Neben seiner Rolle als pro-inflammatorischer Faktor ist HMGB1 auch als endogenes Adjuvans beschrieben, das die Immunogenität von normalerweise nicht-immunogenen Antigenen erhöhen kann. HMGB1 lockt z.B. DC an, stimuliert ihre Reifung und erhöht ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation (Yang et al., 2007). HMGB1 erhöht die Immunogenität von löslichen Antigenen wie Ovalbumin (OVA), demonstriert durch HMGB1-vermittelte Bildung OVA-spezifischen Antikörper *in vivo* bei Mäusen (Rovere-Querini et al., 2004). Des Weiteren können auch HMGB1-Nukleosomen-Komplexe aus sekundär nekrotischen Zellen DC zur Reifung anregen und induzieren eine DNA- und Histon-spezifische Antikörperbildung. Da sich zirkulierende HMGB1-Nukleosomen-Komplexe im Blut von SLE-Patienten finden und DNA-spezifische Autoantikörper ein Charakteristikum der Krankheit sind, spekulieren die Autoren darüber, dass HMGB1 das endogene Adjuvans für die Autoimmunreaktion gegen dsDNA beim SLE darstellt (Urbonaviciute et al., 2008). Dies zeigt, dass HMGB1 ein potentes Adjuvans ist, das an der Durchbrechung der peripheren Toleranz gegen lösliche oder Zell-assoziierte Autoantigene beteiligt sein kann.

2.4.6. Rolle bei Erkrankungen

Ursprünglich als später Mediator der Sepsis entdeckt (Wang et al., 2004), weiß man heute von einer Vielzahl chronisch-entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen, an deren Pathogenese HMGB1 beteiligt ist. Einige Beispiele hierfür sind nachstehend aufgeführt.

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) ist aufgrund von Zellsterben und Hypoxie erhöhtes extrazelluläres HMGB1 in Blut, Synovialflüssigkeit und –gewebe mit verstärkter pro-inflammatorischer Zytokinfreisetzung assoziiert. Die Wirksamkeit von HMGB1-Antagonisten konnte gezeigt werden, die insbesondere protektiv gegen Knorpel- und Knochendestruktion wirkten (Harris et al., 2012).

Bei der Myositis zeigen Muskel-infiltrierende Monozyten vermehrt zytoplasmatisches und extrazelluläres HMGB1, die zu Entzündung und Muskelschwäche führen (Ulfgren et al., 2004).

Beim Systemischen Lupus Erythemathodes (SLE) kann erhöhtes extrazelluläres HMGB1 in Blut und Haut aufgrund von vermehrtem Zellsterben und defekter Beseitigung apoptotischer Zellen zur lokalen und systemischen Entzündung führen. HMGB1 in Komplex mit DNA/Nukleosomen verstärkt durch Stimulation von APC und autoreaktiven B-Zellen die Immunantwort und ist an der Autoantikörper-induzierten Zerstörung der Niere beteiligt (Urbonaviciute and Voll, 2011).

Beim Typ I Diabetes (T1D) stimuliert HMGB1 aus sekundär nekrotischen β -Zellen autoreaktive DC und verstärkt die Immunantwort gegen β -Zell-Antigene in Mäusen (Zhang et al., 2009).

Beim Sjögren-Syndrom ist erhöhtes extrazelluläres HMGB1 in Speicheldrüsen mit verstärkter Zytokinfreisetzung assoziiert (Ek et al., 2006).

HMGB1 als therapeutisches Ziel

HMGB1-spezifische Inhibitoren sind in klinischen Studien bisher wenig untersucht worden. In verschiedenen vorklinischen Tiermodellen u.a. für Arthritis, Endotoxämie oder Atherosklerose konnte eine Wirksamkeit der spezifischen Blockierung von HMGB1 belegt werden (Schaper et al., 2013). Die möglichen Ansätze zur Inhibierung von HMGB1, die in Abb. 10 verdeutlicht sind, umfassen die Blockierung der HMGB1-Freisetzung, die Neutralisierung von HMGB1 selbst oder die Blockierung der HMGB1-Rezeptor-Interaktion.

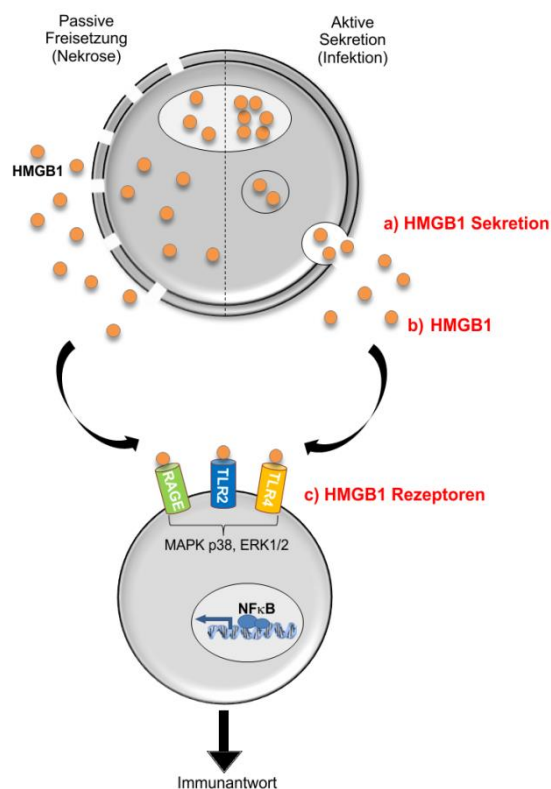


Abb. 10 Therapeutische Ansätze zur Inhibierung von HMGB1-abhängigen Mechanismen

a) die Blockierung der HMGB1-Sekretion, b) die Neutralisierung von HMGB1 selbst und c) die Blockierung der HMGB1-Rezeptorinteraktion.

Wie in Tabelle 6 dargestellt, wurden in experimentellen Modellen zahlreiche Substanzen erfolgreich getestet. Die Schwierigkeit für HMGB1-Therapien beim Menschen bestehen jedoch darin, die Nebenwirkungen dieser Substanzen zu minimieren. Neben den potentiell schädlichen Effekten dürfen die essentiellen Funktionen von HMGB1 nicht unterdrückt werden.

Tabelle 6 Einsatz von HMGB1-Inhibitoren in experimentellen Modellen

(zusammengefasst aus Musumeci *et al.*, 2014)

Zielmechanismus	Substanzklasse (Beispiel)
HMGB1 Sekretion	
- Inhibition des Kernexports	• kleine, synthetische Substanzen (Ethylpyruvat)
- Inhibition der Exozytose	• kleine, natürliche Substanzen (Epigallocatechingallat)
HMGB1 Neutralisation	• HMGB1-Antikörper (monoklonale und polyklonale α HMGB1-AK)
	• kleine, natürliche Substanzen (Glycyrrhizin)
	• kleine, synthetische Substanzen (Nafamostat Mesylate)
	• Peptidinhibitoren (Vasoaktives intestinales Peptid)
	• Proteininhibitoren (rekombinantes Thrombomodulin)
	• Oligonukleotid-basierte Inhibitoren (knotenförmige Haarnadel-DNA)
HMGB1 Rezeptoren	• HMGB1-Peptid (rekombinante Box A)

2.5. Fragestellung

Die Pathogenese der extravaskulären, nekrotisierenden Granulomatose bei der GPA ist bis heute unverstanden (Jennette and Falk, 2014). Die Korrelationen der Serumkonzentration des Alarmins HMGB1 mit der Krankheitsaktivität und dem Ausmaß der granulomatösen Entzündung in der Lunge bei der GPA deuten auf eine mögliche Relevanz und Funktion von HMGB1 bei der GPA hin (Henes et al., 2011; Wibisono et al., 2010). Obwohl zirkulierendes HMGB1 keinen Biomarker für die Gruppe der AAV darzustellen scheint, wurde dennoch ein Zusammenhang mit granulomatösen Manifestationen und der chronischen Entzündung bei der GPA postuliert (de Souza et al., 2013).

In dieser Arbeit sollten folgende zwei Arbeitshypothesen überprüft werden:

1. Das endogene Gefahrenmolekül HMGB1 wird in der granulomatösen Entzündung freigesetzt und trägt in Anlehnung an Matzingers Gefahren-Modell zur chronischen Entzündung bei der GPA bei.
2. HMGB1 agiert als endogenes Adjuvans, das an der Toleranzdurchbrechung gegen PR3 in der granulomatösen Entzündung bei der GPA beteiligt ist.

Dabei waren insbesondere die Untersuchung der zellulären Lokalisation von HMGB1, die Assoziation mit Makrophagen, die Expression des Rezeptors RAGE in Nasenschleimhautgewebe bei GPA-Patienten im Vergleich zu Kontrollen sowie der Einfluss von Genvariationen auf Ausprägungen der Krankheit von Interesse. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob und wo HMGB1 als potentielles endogenes Adjuvans mit dem Autoantigen PR3 in Zellen oder in Nasenschleimhautgewebe assoziiert ist.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte

Bezeichnung	Firma
Biophotometer	Eppendorf
CFX Connect™ Real-Time PCR System	Bio-Rad
Criterion™ Cell (Vertikale Midi-Format Elektrophoresekammer)	Bio-Rad
ChemiDoc™ XRS System (Gel Imaging System)	Bio-Rad
ELISA Reader	Tecan
Gel Doc™ EZ System	Bio-Rad
Mini Sub Cell GT (RNA-Gelkammer)	Bio-Rad
Objekträgerscanner Mirax Midi	Zeiss
Power-Supplies:	
• Power Pack 25	Biometra
• Microcomputer Electrophoresis Power Supply	Consort
Power Pack 25 Power-Supply	Biometra
PROTEAN® i12™ IEF System (Isoelektrische Fokussierung)	Bio-Rad
Fluoreszenzmikroskop	Keyence
Konfokalmikroskop IX81	Olympus
Zentrifugen	
• Universal 320R	Hettich
• Centrifuge 5804R	Eppendorf

3.2. Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Firma
Verbrauchsmaterial	
Deckgläschen	Th. Geyer
Kanülen (20G)	BD
UV-Küvetten	Sarstedt
Mikrotiterplatten	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Einmalpipetten	Sarstedt
Reaktionsgefäße (verschiedene Fassungsolumina)	Sarstedt
Reagenzien	
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Agarose	Biozym
Amersham ECL Plex Fluorescent Rainbow Marker	GE Healthcare

Amersham Hybond LFP 0.2 PVDF	GE Healthcare
Antibody Diluent	Dako
ATP	InvivoGen
Biocoll	Biochrom
Chloroform	Sigma-Aldrich
DAPI	Life Technologies
DePeX Eindeckmedium	Serva
DMEM	Biochrom
Equilibration Buffer (enthalten im Buffer Kit for 2D HPE™ Gels)	Serva
Ethanol	Th. Geyer
FCS	Biochrom
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10,000 x)	Biotium
Glycin	Sigma-Aldrich
Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific
HMGB1, rekombinant	HMGbiotech
Human Universal Reference Total RNA	BD Biosciences
Immun-Blot PVDF Membrane	Bio-Rad
IPG ReadyStrip™, pH 3-6, 11 cm	Bio-Rad
Isopropanol	Roth
KCl	Merck
LPS-EK	InvivoGen
Methanol	J.T. Baker
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	J.T. Baker
PBS	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
PMA	Applichem
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Polyvenylalkohol	Merck
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad
ProLong® Gold Antifade Reagent	Life Technologies
Proteinase 3, human	Athens Research & Technologies
Protein Block Serum-Free	Dako
RPMI	Biochrom
SDS	Sigma-Aldrich
Streptolysin-O (0,78 mg; 49000 U)	Sigma
TGX Stain-Free Gele	Bio-Rad
<ul style="list-style-type: none"> • 4–15% Criterion™ TGX Stain-Free™ Gel, 12+2 well, 45 µl • 4–20% Criterion™ TGX Stain-Free™ Gel, 11 cm IPG/prep+1 well, 550 µl 	

Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Pack	Bio-Rad
Thiourea	Sigma-Aldrich
Tris	Serva
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %)	Biochrom
Tween-20	Sigma-Aldrich
Urea	Merck
Xylol	Applichem

3.3. Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Äquilibrationpuffer I	5 ml Equilibration Buffer 1,8 g Harnstoff 50 mg DTT
Äquilibrationpuffer II	5 ml Equilibration Buffer 1,8 g Harnstoff 125 mg Iodacetamid
2D-Probenpuffer	30 mM Tris 7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % (w/v) CHAPS Wasser pH 8,5 einstellen
2D-Rehydrierungspuffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 2 % (w/v) CHAPS 2 % Pharmalyte kleine Spatelspitze Bromphenolblau Wasser
Blockpuffer: f. Chemilumineszenzdetektion (1D-PAGE)	TBS-T 5 % BSA
f. Fluoreszenzdetektion (2D-PAGE)	TBS-T 5 % Amersham ECL Prime Blocking Reagent
Citratpuffer	10 mM Citronensäure-Monohydrat, pH 6.0 mit NaOH einstellen
Laemmli-Puffer (2 x)	0,175 M Tris-HCl, pH 6.8 20 % Glycerol 4 % SDS 0,125 % Bromphenolblau 5 % β -Mercaptoethanol
Nukleinsäure Ladepuffer (6 x)	0,25 % Bromphenolblau 40 % (w/v) Sucrose Wasser
Polyvenylalkohol	1 % Polyvenylalkohol NaCl Lösung
Protein-Lysepuffer	50 mM Tris HCl pH 8

	150 mM NaCl 10% Glycerol 0,5% Triton-X-100 1 mM PMSF 1 x Protease Inhibitor Cocktail
Permeabilisierungspuffer	50 mM HEPES 100 mM KCl 20 mM NaCl 1 mM EGTA 0.1% Dextrose
SDS-PAGE Laufpuffer (10 x)	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1% SDS
Standard-Zellmedium	RPMI 10% FCS 1 % Penicillin 1 % Streptomycin
Streptolysin-O Stammlösung (0,5 mg/ml; 31410 U)	0,78 mg 1,56 ml Wasser
TBE (5 x)	450 mM Tris-borate 10 mM EDTA
TBS (10 x)	0,5 M Tris, pH 7.5 1,5 M NaCl pH mit HCl einstellen
TBS-T	TBS 1x 0,05% Tween 20
THP-1 Zellmedium	RPMI 1640 10% FCS 50 µM β-Mercaptoethanol 1 % Penicillin/Streptomycin
Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20 % Methanol 0,0375 % SDS
Zellmedium für embryonale Mäusefibroblasten	DMEM komplett 10% FCS 0,5 mM β-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 1 % Penicillin/Streptomycin

3.4. Kits

Bezeichnung	Firma
Aurum™ Affi-Gel® Blue Mini Kit	Bio-Rad
Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit	PromoKine
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
EnVision™ G 2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red)	Dako

iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
NucleoSpin® RNA II Kit	MACHEREY-NAGEL
Pierce® Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit	Thermo Scientific
ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit	Bio-Rad
SsoAdvanced™ SYBR®Green Supermix	Bio-Rad
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat	Thermo Fisher Scientific
T-Rex Protein Labeling Kit	NH DyeAgnostics

3.5. Antikörper und Negativkontrollen

Name	Verwendung	Konz.	Firma
Primärantikörper			
monoklonale anti-HMGB1 Maus IgG2B Klon # 115603	Co-IP 2D-PAGE	25 µg 0,5 µg/ml	R & D Systems
polyklonale anti-HMGB1 Kaninchen IgG	IF	1 µg/ml	Abcam
polyklonale anti-PR3 Schaf IgG	Co-IP IHC	25 µg 1 µg/ml	R & D Systems
monoklonale anti-PR3 Maus IgG1 Klon CLB-12.8 (ANCA)	IF	1 µg/ml	Sanquin
polyklonale anti Il-1β Kaninchen IgG	WB	1:1000	Cell Signaling
polyklonale anti-RAGE Kaninchen IgG	IHC	1 µg/ml	Abcam
monoklonale anti-CD68 Maus IgG (Klon PGM-1)	IHC	1:100	DAKO
monoklonale anti-β-Actin Maus IgG HRPO	WB	1:1000	Cell Signaling
Negativ-Kontrollen			
Universal negativ Maus Ig	IHC IF		Dako
Universal negativ Kaninchen Ig	IHC IF		Dako
Schaf IgG	IHC IF		R & D Systems
Sekundärantikörper			
Ziege anti-Maus IgG (H+L)-HRPO	WB	1:40000	Dianova
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO	WB	1:40000	Dianova
Esel anti-Schaf IgG HRPO	WB	1:1000	R&D Systems
Esel anti-Maus DyLight 488	IF	1 µg/ml	Dianova
Esel anti-Kaninchen AlexaFluor594	IF	1 µg/ml	Dianova
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Cy3®	2D-PAGE	0,2 µg/ml	Abcam
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Cy2®	2D-PAGE	0,2 µg/ml	Abcam

Abk.: Co-IP – Koimmunpräzipitation; IF – Immunfluoreszenz; IHC – Immunhistochemie; WB - Westernblot ; HRPO – Meerrettichperoxidase

3.6. Zellkultur

3.6.1. Embryonale Mäusefibroblasten

Hmgb1^{+/+} und Hmgb1^{-/-} embryonale Mäusefibroblasten (MEF) wurden vom Hersteller (HMGBiotech S.r.l., Mailand, Italien) aus Geschwisterembryos von Kreuzungen aus HMGB1 Heterozygoten mit reinem BALB/c Hintergrund (> 10 Rückkreuzungen) gewonnen und nach dem 3T3-Protokoll kultiviert. Dieses Protokoll besagt, dass die Zellen alle 3 Tage im Verhältnis 1:3 für 3 Monate aufgeteilt und kultiviert wurden. Das Medium, indem die Zellen kultiviert wurden, ist komplettes DMEM (10% FCS, 1mM Natriumpyrovat, 0,5 mM β -Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin). Die adhärent wachsenden Zellen wurden bei ca. 80 % Konfluenz mittels Trypsinierung abgelöst und im Verhältnis 1:3 (Hmgb1^{+/+}) bzw. 1:5 (Hmgb1^{-/-}) aufgeteilt.

3.6.2. THP-1 Zellen

THP-1 Zellen wurden 1978 von einem einjährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie isoliert (DSMZ, ACC 16). Sie weisen zytochemische und immunologische Eigenschaften von Monozyten auf, wie z.B. Phagozytosefähigkeit, Lysozymproduktion und lassen sich durch PMA-Stimulation zu Makrophagen-ähnliche Zellen differenzieren (Tsuchiya et al., 1980, 1982). Die nicht-adhärent wachsenden Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS, 50 μ M β -Mercaptoethanol, jeweils 1% Penicillin und Streptomycin kultiviert und alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:3 aufgeteilt.

3.7. Isolation humaner Zellen

Für die Gewinnung von Zellen aus Blut wurde eine Dichtegradientenzentrifugation angewendet. Patientenvollblut aus EDTA-Röhrchen wurde zu gleichen Teilen mit PBS gemischt. In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurde Biocoll, eine gebrauchsfertige Polymerlösung auf Polysucrosebasis, vorlegt und mit dem gleichen Volumen des Blut-PBS-Gemisches langsam überschichtet. Nach einer Zentrifugation für 25 min bei 1000 x g ohne Bremse bildeten sich vier Schichten. Die erste Schicht aus Thrombozyten und Plasma wurde verworfen. Für die Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurde die zweite Schicht aus Leukozyten in ein neues Zentrifugen-

röhrchen überführt, mit PBS gewaschen (d.h. mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen) und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die gewünschte Zellzahl wurde in entsprechende Puffer für die Weiterverwendung (RNA- oder Proteinisolation) aufgenommen und ggf. bei -20° eingefroren. Für die Gewinnung von polymorphkernigen Granulozyten (engl. *polymorphonuclear granulocytes*, PMN) wurde die dritte Schicht abgesaugt. Zu der verbleibenden vierten Schicht wurde die doppelte Menge an 1%igem Polyvinylalkohol zugegeben, gemischt und für 20 min zum Sedimentieren ruhen gelassen. Der Überstand wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 300 x g und 4°C wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Nach der Erythrozytenlyse durch Zugabe von 2 ml 4°C sterilem, kaltem Wasser für 30 s wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen (d.h. mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert), auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die gewünschte Zellzahl wurde in entsprechende Lysepuffer (s.u.) für die Weiterverwendung (RNA- oder Proteinisolation, Koimmunpräzipitation) aufgenommen und ggf. bei -20° eingefroren. Für Proteinanalyse wurde die Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl für 5 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem Protein-Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte für 10 min auf Eis. Das Lysat wurde für 10 min bei 13.000 x g und 4°C zentrifugiert und der zellfreie Überstand bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Für RNA-Isolation oder Koimmunpräzipitation wurden die Lysepuffer der entsprechenden Kits verwendet.

3.8. Proteinanalyse

3.8.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde der Bio-Rad Protein Assay verwendet. Zunächst wurde eine BSA-Standardreihe mit den Konzentrationen 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml und 0 µg/ml vorbereitet, wobei der Leerwert nur aus Probenpuffer (PBS) bestand. Die zu analysierende Proteinprobe wurde in der Regel 1:400 mit PBS gemischt, indem 798 µl PBS vorgelegt und 2 µl Proteinlösung hinzugegeben wurden. Von jeder Standard- und Proteinlösung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, wobei je 800 µl Probe/Standard vorgelegt, 200 µl 5fach Bradford Reagenz hinzugegeben und mittels Vortexmischer gemischt wurden. Nach 15 min Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm in

einem Fotometer gemessen. Die Mittelwerte der Duplikate wurden zur Konzentrationsberechnung herangezogen. Aus den Werten der BSA-Standardreihe wurde eine Geradengleichung erstellt, mit deren Hilfe die Ausgangskonzentration der Proteinproben errechnet werden konnte.

3.8.2. Proteinaufbereitung

Albumindepletion

Für die Analyse von niedrigkonzentrierten Proteinen mittels 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) aus Serum- oder Plasmaproben war es nötig, höher konzentrierte Proteine wie z.B. Albumin zu entfernen. Hierzu wurde das Aurum™ Affi-Gel® Blue Mini Kit verwendet. Es handelt sich dabei um eine Affinitätschromatographie, bei der der Reaktivfarbstoff Cibacronblau F3G-A kovalent an Agarosekügelchen gebunden ist. Dieser Farbstoff bindet u.a. Albumin, aber auch Koagulationsfaktoren und andere Enzyme. Die mit den Agarosekügelchen gefüllte Aurum Affi-Gel Blue Säule wurde in ein Teströhrchen gesteckt und mindestens fünf min gewartet, damit sich die Säulenmatrix absetzt. Dann wurden Deckel und Verschluss am Boden der Säule entfernt. Nach einer zweiminütigen Wartezeit floss der überschüssige Puffer aus der Säule. Die Säule wurde zweimal mit je 1 ml 20mM Tris pH 8.3 gewaschen und erneut gewartet, bis der Puffer vollständig abgelaufen war. Die Säule wurde für 20 s bei 10.000 x g zentrifugiert, um das Säulenmaterial zu trocknen. 125 µl der aufzuräumenden Serum- oder Plasmaprobe wurde mit 375 µl 20mM Tris pH 8.3 gemischt von dieser Mischung 400 µl auf die Säule gegeben. Nachdem die Probe durch das Säulenmaterial geflossen war, wurde die Säule erneut für 20 s bei 10.000 x g zentrifugiert, um die verbleibende Probe von der Säule zu eluieren. Weitere 200 µl des 20mM Tris pH 8.3 Puffers wurde auf die Säule gegeben und in das gleiche Eppendorf-Reaktionsgefäß wie vorher zentrifugiert. Das Eluat enthielt nun die aufbereitete Serum/Plasmaprobe, die zur Konzentrierung weiter bearbeitet werden konnte.

Aufbereiten für 2D-PAGE

Zur Konzentrierung und Optimierung der Proben für die 2D-PAGE wurde das ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit verwendet. Hierfür wurden bis zu 300 µg Proteine mit einem Gesamtvolumen von 100 µl in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden 300 µl Fällungsmittel 1 zugegeben, mittels Vortexmischer gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 300 µl Fällungsmittel 2 hinzugegeben, mittels Vortexmischer gemischt und bei 15.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach erneuter Zentrifugation für 30 s wurde

die restliche Flüssigkeit über dem Pellet abgenommen. Es wurden 40 µl Waschpuffer 1 auf das Pellet gegeben, bei 15.000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 25 µl ultrareines Wasser auf das Pellet gegeben und für 20 s mittels Vortexmischer gemischt.

Nach Zugabe von 1 ml -20°C kaltem Waschpuffer 2 und 5 µl Waschpufferzusatz wurde die Probe für 1 min mittels Vortexmischer gemischt. Die Probe wurde für 30 min bei -20°C inkubiert und dabei alle 10 min für 30 s mittels Vortexmischer gemischt. Die Probe wurde dann bei 15.000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 30 s wurde die restliche Flüssigkeit über dem jetzt weißen, festen Pellet abgenommen. Nach einem Trocknungsschritt für wenige Minuten wurde das Pellet in 15 µl 2D-Rehydrierungspuffer resuspendiert und bei 15.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur isoelektrischen Fokussierung bei -80°C ausbewahrt.

3.8.3. Isoelektrische Fokussierung

Bei der Analyse von Proteinen mittels zweidimensionaler Elektrophorese wird in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt. Die IEF ist ein Verfahren, bei dem Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt werden. Der pI entspricht dabei dem pH-Wert, bei dem das Protein eine Nettoladung von 0 aufweist. Die Proteine werden einem pH-Gradienten ausgesetzt und wandern bei Anlegen eines elektrischen Feldes zu der Elektrode mit der entgegengesetzten Ladung. Bei dem pH, der dem pI des Proteins entspricht, stoppt die Wanderung und die Nettoladung des Proteins ist 0.

Aus den zu untersuchenden Plasmaproben wurden zunächst, wie unter 3.8.2 Proteinaufbereitung beschrieben, Serumalbumin entfernt. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt (siehe 3.8.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford) und auf eine Konzentration von 3 µg/µl mit PBS eingestellt. Für die Proteinaufbereitung wurden je 300 µg Protein verwendet (siehe 3.8.2 Proteinaufbereitung) und mit 15 µl 2D-Probenpuffer resuspendiert, so dass eine Konzentration (bei Annahme einer 100%igen Rückgewinnung nach der Aufreinigung) von ~ 20 µg/µl resultierte. Die Proben wurden 1:4 mit 2D-Probenpuffer auf 5 µg/µl verdünnt. Für eine spätere Detektion der Proteine wurden die Proben mit dem rot-fluoreszierenden Farbstoff T-Rex markiert. Dafür wurde das T-Rex Protein Labeling Kit verwendet. Für jede Probe wurde ein Farbstoffaliquot mit 2 µl T-Rex Solvent gelöst und gemischt. Pro Markierungsansatz wurden 50 µg Protein (10 µl der zuvor verdünnten Proben) zum gelösten Farbstoff gegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis konnten die Proben

für die Auftrennung in der IEF vorbereitet werden. In dieser Arbeit wurde das Protean® i12™ IEF System verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 11 cm langem gebrauchsfertigen Gelstreifen (ReadyStrip IPG Strips pH 3-6) mit einem immobilisierten pH-Gradienten. Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden mit 2D-Rehydrierungspuffer auf 200 µl aufgefüllt und in die Bahnen des Fokussierungseinsatzes pipettiert. Die Gelstreifen wurden mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf die Proteinlösung aufgebracht und mit Mineralöl bedeckt. Der aktive Rehydrierungsschritt erfolgte für 12 h vor der IEF bei niedriger Voltzahl. Das IEF Protokoll wurde wie folgt eingestellt:

Schritt	Volt [v]	Gradient	Current [µa]	Zeit	VoltHours
1	50	Rapid	50	6:00	
2	60	Rapid	50	6:00	
3	250	Rapid	50	0:20	
4	8000	Gradual	50	1:00	
5	8000	Rapid	50	20000	Volt hr
6	750	hold	50		

Danach wurden die Proteine in 2. Dimension, d.h. ihrer Größe nach, mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt.

3.8.4. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Um Proteine aus Zelllysaten, Serum oder anderen Proben zu untersuchen, wurden die zu analysierenden Proteinlösungen mittels ihrer Größe nach in einem gebrauchsfertigen SDS-Polyacrylamidgel (TGX Stain-Free™-Gel) aufgetrennt. Diese Gele hatten gegenüber selbst hergestellte Gelen neben der besseren Reproduzierbarkeit den Vorteil, dass die Proteine nach der Auftrennung im Gel Doc™ EZ mittels UV-Belichtung sichtbar gemacht werden konnten, so dass ein klassischer Färbeschritt z.B. mit Coomassie überflüssig war.

1D-PAGE

Die Proteinproben für die klassische eindimensionale SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese) wurden zunächst mit 2x Laemmli-Puffer verdünnt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Zur Auftrennung der Proteinproben wurden die Criterion™ Gelelektrophorese Kammer und SDS-PAGE Laufpuffer verwendet. Als Proteingrößenmarker wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard verwendet. Nach dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben im elektrischen Feld bei 200 V und 120 mA der Größe nach aufgetrennt.

2D-PAGE

Für die Durchführung der SDS-PAGE als 2. Dimension im Rahmen der isoelektrischen Fokussierung wurden die Strips nach der IEF zunächst in zwei unterschiedlichen Äquilibrationpuffer inkubiert. Ein Strip wurden mit der Gelseite nach oben in einem verschließbaren Glasröhrchen mit 4 ml Äquilibrationpuffer I bedeckt und unter Schwenken auf einem Schüttler 15 min inkubiert. Der überschüssige Puffer wurde abgegossen, durch 4 ml Äquilibrationpuffer II ersetzt und wie zuvor beschrieben für 15 min inkubiert. Der überschüssige Puffer wurde abgegossen und die Strips mit SDS-PAGE Laufpuffer gespült. Die Strips wurden in die Vertiefung der Criterion™ TGX Stain-Free™ Gele für 11 cm IPG-Strips platziert und mit 0,5% handwarmer, flüssiger Agarose bedeckt. Als Proteingrößenmarker wurde der Amersham ECL Plex Fluorescent Rainbow Marker verwendet. Die Proteine wurden im elektrischen Feld für 10 min bei 100 V und für ca. 20 min bei 200 V der Größe nach aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Transferierung der Proteine auf eine PVDF-Membran, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

3.8.5. Semi-Dry Westernblot

Um Proteine in den verschiedenen Proben zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen, wurden die Proteine nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierzu wurde das Gel zunächst für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran (Chemilumineszenzdetektion 1D-PAGE: Immun-Blot PVDF Membrane; Fluoreszenzdetektion bei 2D-PAGE: Amersham Hybond LFP 0.2 PVDF) wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten und für 20 s in 100 % Methanol getaucht. Die Membran wurde danach erst für 2 min in destilliertem Wasser, dann für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Proteintransfer vom Gel auf die Membran wurde ein Semi-Dry Blotverfahren angewendet.

1D-PAGE

Es wurden zunächst drei Blotpapiere in Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei auf die Anodenplatte des Semi-Dry Blotters aufgelegt. Darauf wurde erst die Membran, dann das Gel bündig zur Membran aufgebracht. Weitere drei, in Transferpuffer getränkte Blotpapiere wurden aufgebracht. Eventuelle Luftblasen wurden mittels eines Röhrchens durch Rollbewegungen entfernt und überschüssiger Puffer von der Anode abgewischt. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und der Transfer für 1 h bei 120 mA auf Eis durchgeführt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran kurz mit TBS gewaschen und anschließend 1 h in Blockpuffer auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindung der Antikörper zu verringern. Die

Primärantikörper wurden in Blockpuffer gemäß Datenblatt des Herstellers oder vorheriger Titration verdünnt (siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen). Die Membran wurde in einer Schlauchfolie platziert und an drei Seiten zugeschweißt. 7 – 10 ml des verdünnten Primärantikörpers wurde in die verbleibende Öffnung der „Tasche“ pipettiert und die Tasche luftblasenfrei zugeschweißt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Konzentrationen siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Nach der Inkubation wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran für 30 min mit TBS-T auf einem Schüttler gewaschen, wobei der Waschpuffer mehrere Male erneuert wurde. Der Sekundärantikörper wurde in 30 ml Blockpuffer verdünnt (Konzentrationen siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) und 1 h auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde erneut wie oben mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde in einer Entwicklungsfolie platziert und mit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat benetzt. Die Chemilumineszenzentwicklung wurde mittels ChemiDoc™ XRS detektiert. Zur Quantifizierung der Signale wurde die Software Image Lab™ verwendet. Als Ladekontrolle dienten β -Aktin und GAPDH.

2D-PAGE

Für den Semi-Dry Blot bei der 2D-PAGE wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System verwendet. Der Aufbau erfolgte analog zur 1D-PAGE unter Verwendung von Blotpapieren aus dem Trans-Blot® Turbo™ Midi PVDF Transfer Pack und der Amersham Hybond LFP 0.2 PVDF Membran mit verringerter Autofluoreszenz. Der Transfer erfolgte im Blotter nach Herstellerprotokoll für 30 min bei 25 V. Blocken und Antikörperinkubationen erfolgte analog zur 1D-PAGE, jedoch unter Verwendung des Amersham ECL Blocking Agent und Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper (siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen). Die Membran wurde nach dem Waschen mit TBS-T noch dreimal mit TBS gewaschen und für 1 h bei 37°C im Dunklen getrocknet. Die Detektion der Fluoreszenzsignale (rot: T-Rex markiertes Gesamtprotein; grün: Cy3-markiertes, zu analysierendes Protein) erfolgte nach Herstellerangaben im Laserscanner Typhoon FLA 9000 und der Software ImageQuant TL.

3.8.6. Koimmunpräzipitation

Um die Interaktion von PR3 und HMGB1 zu untersuchen, wurde eine das Pierce® Co-Immunoprecipitation (Co-IP) Kit verwendet (Parameter und Einstellungen siehe Protokoll des Herstellers). PMN wurden zunächst aus GPA-Blut isoliert (siehe 3.7 Isolation humaner Zellen) und mit eiskaltem IP-Lysepuffer (+ Protease Inhibitor Cocktail) für 10 min auf Eis auf einem

Schüttler inkubiert. Unlöslicher Zellschrott wurde durch 10 min zentrifugieren bei 13000 x g vom löslichen Proteinüberstand getrennt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde mittels Bradford-Test (siehe 3.8.1 Konzentrationsbestimmung nach Bradford) bestimmt. Als „Waschen“ wird nachfolgend das beladen der Säule mit Puffer und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 1000 x g bezeichnet. Um unspezifische Bindungen der Zielproteine an das Säulenmaterial zu verringern, wurde für jede Probe 80 µl Kontrollagarosematrix pro mg Protein in eine Säule gegeben, mit 100 µl Kopplungspuffer gewaschen und mit 1 mg Proteinlösung für 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Die Säulen wurden zentrifugiert und der geklärte Durchfluss für die IP weiterverwendet. Dazu wurden zunächst jeweils 25 µg Antikörper gegen HMGB1 oder PR3 (siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) wie nachfolgend beschrieben an die Säulenmatrix gekoppelt. Es wurden jeweils 50 µl der flüssigen AminoLink Plus Agarosematrix in eine Säule gegeben und zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit Kopplungspuffer gewaschen und die Säulen dann mit einem Stopfen am Boden verschlossen. Die Antikörperlösungen wurden mit Kopplungspuffer auf 200 µl aufgefüllt, auf die Säulenmatrix gegeben und unter dem Abzug mit 3 µl Natriumcyanoborhydrid versetzt. Die Säulen wurden mit einem Schraubdeckel verschlossen und für 2 h auf einem Rotator inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säulen zentrifugiert und der Durchfluss zur Kontrolle der erfolgreichen Antikörperbindung aufbewahrt. Die Säulen wurden zweimal mit Kopplungspuffer und einmal mit Quencherpuffer gewaschen. Dann wurden die Säulen erneut mit dem Stopfen am Boden verschlossen, und mit je 200 µl Quencherpuffer und 3 µl Natriumcyanoborhydrid unter dem Abzug befüllt. Die Säulen wurden mit dem Schraubdeckel verschlossen und für 15 min unter Schwenken inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säulen zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säulen wurden zweimal mit Kopplungspuffer und sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Säule war nun mit immobilisiertem Antikörper beladen und für die Co-IP vorbereitet. Alle weiteren Schritte der Co-IP wurden bei 4°C durchgeführt. 1 mg der geklärten Proteinprobe wurde mit Kopplungspuffer auf 500 µl aufgefüllt und auf die mit immobilisiertem Antikörper präparierte Säule gegeben und über Nacht auf einem Rotator inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säule zentrifugiert und der Durchfluss (enthielt alle ungebundenen Proteine) aufbewahrt. Die Säule wurde fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und die Waschfraktionen für spätere Kontrollen aufbewahrt. Es wurden 10 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben und in zu 5 µl 1 M Tris pH 9,5 zentrifugiert. Es wurden weitere 45 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die Säule wurde erneut zentrifugiert und der Durchfluss im selben Gefäß wie zuvor aufgefangen. Das Eluat enthielt nun die spezifisch gebundenen Proteine und deren Bindungspartner. Die Kontrollen und Proben wurden mittels Westernblot (siehe 3.8.5 Semi-Dry Westernblot) auf das Vorhandensein der potentiellen Bindungspartner des an die Säule gebunden Proteine analysiert.

3.9. Immunhistochemie

3.9.1. Gewebeschnitte

Tabelle 7 Übersicht der verwendeten Nasenschleimhautgewebe von GPA-Patienten.

Alle Gewebe lagen als Formalin-fixiertes Paraffingewebe vor und zeigten histomorphologisch gesicherte, GPA-charakteristische Eigenschaften (Mueller et al., 2014).

#	geo-graphische Nekrose	unscharf begrenztes Granulom	Riesenzellen	Vaskulitis	Mikroabszesse	Knochen-destruktion
I	+	+	+	+	+	-
II	+	+	+	+	(+)	+
III	+	+	+	+	+	-
IV	+	+	-	-	-	-
V	+	+	+	-	+	-
VI	+	+	(+)	+	+	+
VII	+	+	+	-	+	-
VIII	+	+	+	-	+	-
IX	+	+	+	-	+	+
X	+	+	-	+	+	-

Als Krankheitskontrolle wurden aus den von Mueller et al., 2014 verwendeten, diagnostisch charakterisierten Nasengeweben von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis (CRS) 10 Gewebe zufällig ausgewählt.

3.9.2. Immunhistologische Färbung

Für die immunhistologische Analyse von Nasenschleimhautgewebe von GPA-Patienten und chronischer Rhinosinusitis (CRS) wurde das EnVision™ G|2 Doublestain System nach Herstellerangaben verwendet. Alle Lösungen und Substanzen wurden nach Herstellerprotokoll angesetzt. Zur Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffin-Schnitte (Tabelle 7) wurde eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte erst für 2 x 10 min in Xylol (100 %), dann nacheinander für je 5 min in 100 %, 95 %, 80 % und 70 % Alkohol gestellt. Danach wurden die Schnitte zweimal mit destilliertem Wasser gespült und zur Antigendemaskierung in Citratpuffer für 15 min in einer Mikrowelle gekocht. Die Schnitte wurden auf Raumtemperatur abgekühlt, dreimal mit destilliertem Wasser gespült und in einer Feuchtkammer platziert, in der alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten. Zur Blockierung der im Gewebe vorhandenen endogenen alkalischen Phosphatasen und Peroxidasen wurden die Schnitte mit Dual Endogenous Enzyme Block benetzt, für 5 min inkubiert und anschließend dreimal mit TBS gewaschen. Um unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe zu blockieren wurden die Schnitte mit Protein Block benetzt und 10 min inkubiert. Nach Entfernung des

Protein Blocks wurde der in Antibody Diluent verdünnte Primärantikörper auf die Schnitte gegeben (verwendete Antikörper und Konzentrationen siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) und für 1 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Mischung aus Immunglobulinen (siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) desselben Organismus verwendet, aus dem der Primärantikörper stammt. Primärantikörper bzw. Immunglobulinmischung wurden entfernt und die Schnitte dreimal mit TBS gewaschen. Für ein rotes Färbeergebnis wurden die Schnitte mit je 150 µl Polymer/AP (mit alkalischer Phosphatase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugierte Dextranpolymere) für 10 min inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit TBS gewaschen und mit je 200 µl frisch angesetzter Permanent Red Arbeitslösung bedeckt. Nach 15 min Inkubation wurde die Schnitte in entionisiertem Wasser gewaschen und für 5 min in entionisiertem Wasser inkubiert.

Alternativ wurden die Schnitte für ein braunes Färbeergebnis mit je 150 µl mit Polymer/HRP (mit Meerrettichperoxidase und affinitätsisolierten Immunglobulinen konjugierte Dextranpolymere) für 10 min inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit TBS gewaschen und mit je 200 µl DAB+-Arbeitslösung bedeckt. Nach 5 min Inkubation wurden die Schnitte einmal in entionisiertem Wasser und einmal in TBS gewaschen. Die so braun bzw. rot gefärbten Schnitte wurden für eine Kernfärbung für 2-5 min in gefiltertes Hämatoxylin gestellt, dann einmal mit TBS gewaschen und anschließend zum Bläuen für 10 min in TBS gestellt. Anschließend wurde zum Entwässern eine aufsteigende Alkoholreihe (in umgekehrter Reihenfolge wie die oben beschrieben absteigende Alkoholreihe) durchgeführt und nach dem letzten Xylol-Bad für wenige min getrocknet. Auf die Schnitte wurde ein Tropfen Eindeckmedium gegeben und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Nach vollständiger Trocknung wurden die Schnitte mit dem Objektträger-Scanner Mirax Midi eingescannt und mit der Software Panoramic Viewer und ImageJ ausgewertet.

3.9.3. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Fluoreszenzfärbung wurden die Gewebsschnitte, wie unter „3.9.2 Immunhistologische Färbung“ beschrieben, entparaffiniert, demaskiert und blockiert. Zusätzlich wurden die Schnitte mit Serum (5% in PBS) des Ursprungsorganismus der verwendeten Sekundärantikörper (Esel oder Kaninchen) für 20 min inkubiert. Nach Entfernung des Serums wurde der in Antibody Diluent verdünnte Primärantikörper gegen HMGB1 auf die Schnitte gegeben (verwendete Antikörper und Konzentrationen siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) und für 1,5 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Mischung aus Immunglobulinen (siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) desselben Organismus verwendet, aus dem der

Primärantikörper stammte. Primärantikörper bzw. Immunglobulinmischung wurden entfernt und die Schnitte dreimal mit TBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit den entsprechenden in Antibody Diluent verdünnten Sekundärantikörpern (siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Bei einer Einzelfärbung wurde der Sekundärantikörperlösung mit 300nM DAPI versetzt, um eine Kernfärbung zu erzielen. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls im Dunkeln. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in TBS gewaschen. Bei der Durchführung einer Doppelfärbung wurden die Schnitte erneut mit Protein Block benetzt und 10 min inkubiert. Überschüssiger Protein Block wurde entfernt und wie oben beschreiben mit einem weiteren Primärantikörper inkubiert. Die Sekundärantikörperlösung wurde wie oben beschrieben zur Kernfärbung mit 300nM DAPI versetzt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Schnitte mit PFA (3% in PBS) benetzt und für 10 min unter einem Abzug inkubiert. Die Schnitte wurden fünfmal mit TBS gewaschen und mit einem Tropfen ProLong[®] Gold bedeckt. Deckgläser wurden luftblasenfrei auf die Schnitte gelegt und für 24 h getrocknet. Die Schnitte wurden bis zur Analyse mittels Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskop bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

3.10. sRAGE-ELISA

Zur Messung von löslichem RAGE in Serum von GPA-Patienten im Vergleich zu Kontrollen wurde der humane sRAGE ELISA nach Herstellervorgaben verwendet. Alle Puffer und Substanzen wurden nach Protokoll angesetzt. Zunächst wurde eine sRAGE Standardreihe durch schrittweise Verdünnung des sRAGE Master Standards (3200 pg/ml) mit Verdünnungspuffer hergestellt, wobei die Konzentrationen 1600, 800, 400, 200, 100 und 50 pg/ml hergestellt wurden. Je 100 µl Serum von 10 GPA-Patienten (bei jeweils inaktiver Erkrankung während Remission und aktiver Erkrankung bei Rezidiv), fünf Diabetes mellitus Typ 1-Patienten (T1D) und sechs gesunden Kontrollen wurden mit 200 µl Verdünnungspuffer gemischt. Je 100 µl verdünntes Serum, sRAGE Standards, Qualitätskontrollen und Verdünnungspuffer als Leerwert wurden eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert, wobei alle Proben in Doppelbestimmung gemessen wurden. Die Mikrotiterplatte war bereits vom Hersteller mit polyklonalen Antikörpern gegen humanes sRAGE beschichtet. Während der Inkubationszeit von 2 h unter gleichmäßigem Schütteln auf einem Schüttler bei 300 rpm konnte zirkulierendes sRAGE des Serums an den Antikörper binden. Die Wells wurden fünfmal mit je 350 µl Waschpuffer gewaschen und der überschüssige Puffer durch Abklopfen auf Papiertüchern entfernt. Pro Well wurden 100 µl Biotin-konjugierter Antikörper gegen sRAGE hinzugegeben und für 1 h wie oben beschrieben auf einem Schüttler inkubiert. Die Wells wurden wie oben beschrieben

gewaschen und der restliche Puffer entfernt. Pro Well wurden 100 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat hinzugegeben und für 30 min wie oben beschrieben auf einem Schüttler inkubiert. Das Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat konnte dabei hochaffin an Biotin-markiertes sRAGE binden. Die Wells wurden wie oben beschrieben gewaschen und der restliche Puffer entfernt. In jedes Well wurden 100 µl Substratlösung pipettiert und für 10 – 20 min im Dunkeln inkubiert, bis eine blaue Farbe sichtbar ist. Die TMB (Tetramethylbenzidin)-haltige Lösung wird durch die Peroxidase in ein blaues Produkt umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopplösung pro Well gestoppt. Die in der Stopplösung enthaltene Säure führte einen Farbumschlag ins Gelbe herbei. Die Absorption wurde sofort in einem ELISA-Lesegerät bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Software Magellan™. Dabei wurde zunächst der Leerwert von allen Probenwerten abgezogen und der Mittelwert aus der Doppelbestimmung gebildet. Die Konzentrationen der Standards wurden auf der x-Achse gegen die Absorption auf der y-Achse aufgetragen und aus den Werten eine sigmoide Standardkurve mittels 4-Parameter-Algorithmus berechnet, mit deren Hilfe die Konzentrationen der Proben bestimmt wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und multiplen Paarvergleich nach Bonferroni-Methode. Es wurde die Nullhypothese H_0 , dass kein Unterschied zwischen den Medianen der Gruppen besteht, getestet.

3.11. Genanalyse

3.11.1. Isolierung von RNA

Für die Analyse der Genexpression in bestimmten Zelltypen (siehe 3.7 Isolation humaner Zellen) wurde die Gesamt-RNA mittels NucleoSpin® RNA II Kit extrahiert. Bis zu 5×10^6 Zellen wurden mit 350 µl Lysepuffer RA1 und 3,5 µl β -Mercaptoethanol versetzt und auf einem Vortexmischer gemischt. Um die Viskosität der Proben zu reduzieren und die DNA zu scheitern, wurde die Lysate 15-mal durch eine Spritze mit aufgesetzter 20G Kanüle gezogen. Die Proben wurden dann für 1 min bei 11.000 x g durch NucleoSpin® Filter zentrifugiert. Die gefilterten Proben wurden mit 350 µl 70%igem Ethanol gemischt, auf NucleoSpin® RNA II Säulen pipettiert und für 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert. Die nun auf der Säulenmembran gebundene RNA wurde durch Zugabe von 350 µl Entsalzungspuffer MDB entsalzt und durch Zentrifugieren für 1 min bei 11.000 x g getrocknet. Die auf der Säulenmembran verbliebene DNA wurde durch Zugabe von rDNAse während einer 15 minütigen Inkubation verdaut. Zum Inaktivieren des DNA-Verdau und Waschen der Membran wurden 200 µl Waschpuffer RA2

auf die Säule pipettiert und 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert. Ein weiterer Waschschrift erfolgte mit 600 µl Waschpuffer RA3 für 30 s bei 11.000 x g und erneut mit 250 µl für 2 min bei 11.000 x g, um die Membran vollständig zu trocknen. Die RNA wurde durch Zugabe von 40-60 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation für 1 min bei 11.000 x g von der Säulenmembran eluiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde im Photometer bei Wellenlängen von 260 nm und 230 nm in einer Quarzküvette gemessen. Die optische Dichte (OD) bei 260 nm von 1 entspricht einer Konzentration von 40 ng/µl RNA. Kontaminationen durch Proteine usw. kann an dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} abgelesen werden. Dieser Quotient lag bei der RNA-Isolierung mit dem hier verwendeten Kit durchweg bei $> 2,0$, was einen hohen Reinheitsgrad der RNA widerspiegelt. Um die Integrität der isolierten RNA zu überprüfen, wurden die Proben auf einem 1%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurde 1% w/v Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, mit dem Nukleinsäurefarbstoff GelRed™ versetzt und zum Aushärten in eine Gelkammer gegossen. Die RNA-Proben wurden mit 6fach konzentriertem Nukleinsäure-Ladepuffer versetzt und im elektrischen Feld bei 70 V aufgetrennt. Die Nukleinsäure wurde in einem Gel Doc™ EZ System im UV Licht sichtbar gemacht. Intakte RNA zeigte zwei Banden im Verhältnis 2:1, die der 28S- und der 18S ribosomalen RNA entsprechen. Es wurden nur Proben verwendet, deren Integrität im Agarosegel bestätigt wurde.

3.11.2. Reverse Transkription

Um aus isolierter RNA komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*; cDNA) für Genexpressionsanalysen herzustellen, wurde das iScript cDNA Synthesis Kit verwendet. In der Regel wurden 200 ng RNA pro Reaktionsansatz eingesetzt, die durch eine optimierte Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde. Pro Reaktionsansatz wurden 4 µl 5 x iScript Reaktionsmix, 1 µl iScript Reverse Transkriptase und 200 ng RNA-Matrize zusammen pipettiert und mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

5 min bei 25°C
30 min bei 42°C
5 min bei 85°C
halten bei 4°C

Die cDNA wurde für nachfolgende Analysen bei -20°C aufbewahrt.

3.11.3. Primerdesign

Für das Design spezifischer Primer für die Genexpressionsanalyse wurde das Online-Programm PrimerBlast des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) verwendet. Als Matrize wurde die NCBI Referenzsequenz der zu analysierenden Gene in das Programm eingegeben und die gewünschten Parameter eingestellt. Die Primer wurden so gewählt, dass die theoretische Anlagerungstemperatur von Vorwärts- und Rückwärtsprimer bei ca. 60°C lag und die Produktlänge < 200 Basenpaare beträgt. Die Primer wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg hergestellt.

Tabelle 8 Primer für qPCR

Gen	Orientierung	5' > 3' Sequenz	Produktlänge	Tm¹
<i>rage</i>	vorwärts	AATGGAAACTGAACACAGGCCG	170 bp	60°C
	rückwärts	TCCATTCCTGTTTCATTGCCTGG		
<i>adam10</i>	vorwärts	GCCCAGCATCTGACCCTAAA	82 bp	60°C
	rückwärts	GAACCTGCACATTGCCATT		
<i>18sRNA</i>	vorwärts	GTAACCCGTTGAACCCATT	151 bp	60°C
	rückwärts	CCATCCAATCGGTAGTAGCG		

¹ experimentell mittels Temperaturgradienten-PCR bestimmt, siehe 3.11.4 qPCR

3.11.4. qPCR

Die Genexpression wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) analysiert. Dafür wurde der SsoAdvanced™ SYBR®Green Supermix verwendet, einem gebrauchsfertigen 2fach Konzentrat mit allen benötigten Reagenzien wie Polymerase, SYBR®Green, Nukleotide, MgCl₂, Verstärker und Stabilisierer. Bei der PCR Reaktion lagern sich die spezifischen Primer an die komplementäre Sequenz in der cDNA Matrize an. Die Polymerase verlängert vom Primer aus den neuen DNA-Strang. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green bindet an die nun doppelsträngige DNA. Der Anstieg der Fluoreszenz wird während der Amplifizierung der DNA-Fragmente in Echtzeit gemessen, wobei das Fluoreszenzsignal proportional zur DNA Menge ansteigt. Für jede Probe wird der Zyklus ermittelt, bei dem ein bestimmter Wert für die Fluoreszenzintensität, die im exponentiellen Bereich und über der Hintergrundfluoreszenz liegen muss, überschritten wird. Dies ist der Cp-Wert (engl. *crossing point*) und wird für die relative Quantifizierung im Bezug zur Expression von Haushaltsgenen herangezogen. Für jede Probe

wurden ein 20 µl Ansatz mit folgender Zusammensetzung in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert, wobei alle Proben in Doppelbestimmung gemessen wurden:

10 µl 2 x SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix
 1 µl Vorwärtsprimer (10 pmol)
 1 µl Rückwärtsprimer (10 pmol)
 7 µl Nuklease-freies Wasser
 1 µl cDNA (10 ng)

Das qPCR Programm für das CFX Connect™ Real-Time PCR System wurde in der Software Bio-Rad CFX Manager 3.1 wie folgt eingestellt:

Initiale Denaturierung	95°C für 3 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C für 10 s	
Anlagerung	60°C für 10 s	
Strangverlängerung	72°C für 30 s	
Finale Denaturierung	95°C für 10 s	
Schmelzkurve	65°C bis 95°C in 0,5°C Schritten à 5 s	

Die Schmelzkurve diente der Qualitätskontrolle der Primer, um zu überprüfen, ob nur spezifische Amplifikate generiert wurden. Für die Berechnung der relativen Genexpression wurde die ΔC_p Methode nach Pfaffl verwendet (Pfaffl et al., 2004). Für jeden Primer wurde zusätzlich die Effizienz überprüft und bei großen Abweichungen von 100% die Primer ggf. neu designt.

Um die optimale Anlagerungstemperatur der Primer zu ermitteln, wurde vor der Verwendung in der qPCR für jedes Primerpaar ein Temperaturgradient erstellt. Dafür wurde als PCR-Matrize eine aus universaler RNA (Mischung aus verschiedenen adulten humanen Geweben) generierte cDNA verwendet. Für jede waagerechte Reihe einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde die Reaktion mit einer anderen Anlagerungstemperatur durchgeführt, wobei jede Probe in Doppelbestimmung gemessen wurde.

Das Temperaturgradienten Programm für das CFX Connect™ Real-Time PCR System wurde wie folgt eingestellt:

Initiale Denaturierung	95°C für 3 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C für 10 s	
Anlagerung	x °C für 10 s	
Strangverlängerung	72°C für 30 s	
Finale Denaturierung	95°C für 10 s	
Schmelzkurve	65°C bis 95°C in 0,5°C Schritten à 5 s	

Die Anlagerungstemperatur x wurde von 58°C bis 63°C in 8 von der Software vorgegeben Abstufungen variiert. Die Auswertung erfolgte durch Auftragen der Temperatur gegen die Cp-Werte. Die Temperatur mit dem niedrigsten Cp-Wert bei optimaler Schmelzkurve wurde als Anlagerungstemperatur für die Primer gewählt.

3.11.5. SNP-Analyse

Im Rahmen genetischer Untersuchungen an einer Kohorte von 285 GPA-Patienten (Charakterisierung siehe Tabelle 9) durch Jörg Epplen und Stefan Wieczorek vom Institut für Human-genetik an der Ruhr-Universität Bochum wurde DNA aus Patientenvollblut isoliert und vier bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNP) von HMGB1 mittels Genotypisierung durch Restriktionsenzym-Verdau nach PCR oder Taqman SNP Genotypisierungs-Assay (Applied Biosystems) untersucht (Tabelle 10). Die bisher unpublizierten Daten wurden für die Auswertung im Rahmen dieser Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 9 Charakterisierung der GPA-Patienten

	GPA n=285
Alter (Median, Min, Max)	61 (25, 90)
Geschlecht	148 w, 137 m
Subgruppen nach EULAR Klassifikation	20 lokalisiert 265 andere (generalisiert/systemisch)
Subgruppen nach ANCA	246 C-ANCA pos. 39 C-ANCA neg.

Tabelle 10 Untersuchte Einzelnukleotid-Polymorphismen von HMGB1

SNP	Allel 1	Allel 2	Position	Referenz	Untersuchte Erkrankung
rs1360485	A	G	hinter 3' Ende		
rs1045411	G	A	3' UTR	(Kornblit et al., 2008)	SIRS
rs3742305	G	C	Intron	(Kornblit et al., 2008)	SIRS
rs1412125	C	T	5' UTR Promoter	(Wang et al., 2014)	Ansprechen der Chemotherapie bei Lungenkrebs

Abk.: SIRS - Systemisches Inflammatorisches Response Syndrom

Die Genotypen der vier analysierten SNPs des *hmgb1* Gens wurden zunächst auf das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in der GPA-Population und einer Referenzpopulation untersucht. Als Referenzpopulation wurde das Kollektiv mit nord- und westeuropäischer Abstammung (CEU) aus der Phase 3 des HapMap-Projekts gewählt (www.hapmap.org). Die beobachteten Genotypenfrequenzen wurden mit den zu erwarteten Genotypenfrequenzen verglichen. Die Nullhypothese H_0 , dass die beobachteten Genotypenfrequenzen nur zufällig von den erwarteten Genotypenfrequenzen abweichen, wurde mittels Chi-Quadrat-Test auf mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ überprüft. Bei einem kritischen Wert von $\chi^2 < 5,99$ (Wert der Chi-Quadrat-Verteilung bei einem Freiheitsgrad $df = 2$ und 5% Signifikanzniveau) wird die Null-Hypothese nicht verworfen, d.h. ein Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wird angenommen. Des Weiteren wurde mittels Chi-Quadrat-Test auf mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ überprüft, ob bei C-ANCA positiven und C-ANCA negativen Patienten bzw. bei Patienten mit lokalisierter GPA und generalisierter/systemischer GPA Unterschiede in der Genotypenfrequenz der einzelnen Polymorphismen vorlagen.

3.12. Zytokin-Induktion in THP-1 Zellen

THP-1 Zellen sind eine humane monozytäre Leukämiezelllinie, die als Modell für Monozyten- und Makrophagen-Studien verwendet werden. Sie dienen u.a. der Untersuchung von Zytokinproduktion wie IL-1 β -Freisetzung (Auwerx, 1991). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von nekrotisch freigesetztem HMGB1 auf die IL-1 β Freisetzung in THP-1 untersucht. Dazu wurden 5×10^5 THP-1 Zellen (siehe 3.6.2 THP-1 Zellen) in 500 μ l Medium in Wells einer 24-Loch-Mikrotiterplatte gesät. Durch Zugabe von 0,5 μ M PMA und Inkubation für 3 h bei 37°C wurden die als Einzelzell-Suspension wachsenden THP-1 Zellen in adhären wachsende Makrophagen-ähnliche Zellen differenziert (Tsuchiya et al., 1982). Die Zellen wurden zweimal mit

PBS gewaschen und zur vollständigen Anheftung in 500 μ l THP-1 Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das THP-1 Medium durch 500 μ l Serum-freies RPMI-Medium ersetzt. Die Zellen wurden mit 200 ng/ml LPS für 2 h geprimt. Die geprimten Zellen wurden mit Zellüberstand von jeweils 5×10^5 nekrotischen HMGB1^{-/-} oder HMGB1^{+/+} Mäusefibroblasten (siehe 3.6.1 Embryonale Mäusefibroblasten) stimuliert. Dazu wurden 5×10^5 Fibroblasten in 500 μ l Serum-freiem RPMI-Medium dreimal bei -80°C eingefroren und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Der unlösliche Zellschrott wurde für 10 min bei 300 x g in einer Zentrifuge pelletiert und der Überstand zu den Makrophagen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 18 h bei 37°C (in Anlehnung an Scaffidi et al., 2002). Als Positivkontrolle wurden differenzierte THP-1 Zellen für 1 h mit 5 mM ATP stimuliert (Grahames et al., 1999), um eine starke IL-1 β Freisetzung zu induzieren. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Nach den oben genannten Inkubationszeiten wurden die Überstände gesammelt und restliche Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 300 x g entfernt. Für eine Analyse der sekretierten Proteine wurde eine Methanol-Chloroform-Fällung durchgeführt. Dafür wurde zu je 500 μ l Überstand jeweils 500 μ l Methanol und 125 μ l Chloroform gegeben und mittels Vortexmischer gemischt. Durch Zentrifugieren für 3 min bei 13.000 rpm und 4°C bildeten sich drei Phasen. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig entfernt. Durch Zugabe von weiteren 500 μ l Methanol und gründlichem Mischen fielen die Proteine der mittleren Phase aus. Durch Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm und 4°C wurden die Proteine pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet für wenige Minuten getrocknet. Das Pellet wurde in 50 μ l 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 85°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE (siehe 3.8.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese) und Westernblot (3.8.5 Semi-Dry Westernblot) mit einem Primärantikörper gegen IL-1 β und einem HRPO-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper inkubiert (siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen). Die Expression wurde gegen β -Aktin relativiert.

3.13. PMN Apoptoseassay

PMN wurden aus Blut von GPA-Patienten und Gesunden isoliert (siehe 3.7 Isolation humaner Zellen) und auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in Standard-Zellmedium eingestellt. Eine Hälfte der noch vitalen Zellen wurde sofort für die Fluoreszenz-Doppelfärbung von HMGB1 und PR3 verwendet. Die andere Hälfte der Zellen wurde für die Induktion von Apoptose in einem Reaktionsgefäß für 18 h bei 37°C in einen Inkubator platziert und am folgenden Tag mittels Immunfluoreszenzfärbung nach dem abgeänderten Protokoll von Pederzoli et al., 2005 analysiert. Es wurden zunächst runde Deckgläser mit Poly-L-Lysin (33%ig in PBS) für

30 min beschichtet. Auf die beschichteten Deckgläser wurden jeweils 2×10^5 PMN ausgesät. Das Anheften der Zellen erfolgte für 45 min bei 37°C in einem Inkubator. Die überschüssigen Zellen wurden durch Spülen der Deckgläser mit PBS entfernt. Zur Fixierung der Zellen wurden die Deckgläser mit 150 µl Paraformaldehyd (3% in PBS) für 15 min bedeckt und anschließend dreimal mit PBS gespült. Für die Permeabilisierung wurde je 200 µl Streptolysin-O (0,05 U/ml in Permeabilisierungspuffer) auf die Zellen gegeben und für 5 min bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurden die Deckgläser mit 150 µl Permeabilisierungspuffer für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gespült. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Benetzen mit Protein Block für 10 min gesättigt. Überschüssiger Protein Block wurde entfernt und der Primärantikörper gegen HMGB1 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper, siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) für 45 min auf die Deckgläser gegeben. Der Antikörper wurde entfernt, die Deckgläser mehrmals mit PBS gespült und die einem fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörper (Esel anti-Kaninchen, siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Ab hier erfolgten alle weiteren Schritte im Dunkeln. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurde ein Primärantikörper gegen PR3 (monoklonaler Maus-Antikörper, siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) auf die Deckgläser gegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Der Antikörper wurde entfernt, die Deckgläser mehrmals mit PBS gespült und mit einem fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörper (Esel anti-Maus, siehe 3.5 Antikörper und Negativkontrollen) für 30 min inkubiert. Der Antikörper wurde entfernt, die Deckgläser mehrmals mit PBS gespült und zur Kernfärbung mit 300nM DAPI für 5 min inkubiert. Überschüssiges DAPI wurde entfernt und die Deckgläser mehrmals mit PBS gespült. Überschüssige Flüssigkeit wurde von den Deckgläsern entfernt und diese mit den Zellen nach unten auf einem Tropfen ProLong[®] Gold auf Objektträgern platziert. Nach 24 h Trocknen im Dunkeln wurden die Expression von HMGB1 und PR3 in vitalen und apoptotischen PMN mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Um die Apoptose der isolierten PMN zu überprüfen, wurde die Zellen nach der 18 h Inkubation im Inkubator und Aussäen auf beschichtete Deckgläser (s.o.) mit dem Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit nach Herstellervorgaben untersucht. Dafür wurden die Deckgläser zweimal mit Bindungspuffer gewaschen. In einem Reaktionsgefäß wurden pro Deckglas 5 µl FITC-Annexin V, 5 µl Ethidium Homodimer III und 5 µl Hoechst 33342 zu 100 µl Bindungspuffer hinzugegeben, gemischt und auf die Deckgläser pipettiert. Die Deckgläser wurden für 15 min im Dunkeln inkubiert anschließend zweimal mit Bindungspuffer gewaschen. Die Deckgläser wurden wie oben beschrieben auf mit ProLong[®] Gold präparierten Objektträgern platziert und mit FITC/TexasRed/DAPI-Filtern mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Dabei färbt das membrandurchlässige Hoechst alle Zellkerne blau. Der membran-

undurchlässige Fluoreszenzfarbstoff Ethidium Homodimer III färbt hingegen nekrotische Zellen rot, da diese im Gegensatz zu vitalen oder apoptotischen Zellen eine zerstörte Zellmembran aufweisen. Apoptotische Zellen haben eine intakte Zellmembran und exponieren Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche. Das FITC-konjugierte Annexin V bindet an Phosphatidylserin und lässt apoptotische Zellen grün fluoreszieren. Spät-apoptotische Zellen, deren Membranintegrität mit der Zeit ebenfalls abnimmt, erscheinen rot und grün.

3.14. Patientenmaterial

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Proben wurden im Rahmen der DFG-geförderten klinischen Forschergruppe 170 gewonnen und sind von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt worden (07-058; 07-059). Die schriftlichen Einverständniserklärungen der Studienteilnehmer wurden gemäß der Deklaration von Helsinki eingeholt.

4. Ergebnisse

4.1. Lokalisation von HMGB1 im Nasenschleimhautgewebe

Wie bereits beschrieben (siehe 2.4.2 Freisetzung), kann das normalerweise kernständige HMGB1 durch verschiedene Prozesse, wie z.B. Freisetzung durch aktivierte Immunzellen oder Nekrose, den Zellkern verlassen und in den extrazellulären Raum gelangen, wo es als Alarmin wirkt. Um die zelluläre Lokalisation und die damit womöglich einhergehende Funktion von HMGB1 bei der GPA zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von Nasenschleimhautgewebe im Vergleich zur CRS mittels immunhistologischer Färbung (siehe 3.9.2 Immunhistologische Färbung) und Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.9.3 Immunfluoreszenzfärbung) untersucht. Für die Quantifizierung wurden jeweils fünf Schnitte von GPA-Patienten und Patienten mit CRS mittels immunhistologischer Färbung analysiert. Von jedem Schnitt wurden jeweils fünf repräsentative Bereiche mit einer Zellzahl von durchschnittlich 1000 Zellen/pro Feld mit der Software ImageJ ausgezählt. Der Anteil der Zellen mit zytoplasmatischem HMGB1 im Verhältnis zur Gesamtzellzahl bei GPA im Vergleich zur CRS wurde mittels Mann-Whitney-U verglichen. Dabei wurde die Nullhypothese H_0 , dass die Mediane der beiden Gruppen gleich sind, auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ getestet. Während sich HMGB1 in der Nasenschleimhaut bei CRS meist im Zellkern befand (Abb. 11 A' und B'), zeigten die Zellen von GPA-Patienten eine erhöhte zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 11 A und B), die statistisch signifikant war ($p < 0,01$, Abb. 11 C). Im Gewebe von GPA-Patienten mit granulomatöser Entzündung zeigten insbesondere Zellen am Rand von Mikroabszessen und nekrotischen Bereichen eine vermehrt zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 12 A). Auch bei der CRS waren vereinzelt Zellen mit zytoplasmatischem HMGB1 zu beobachten, z.B. in der Nähe zu ektopen lymphatischen Strukturen, wie sie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen auftreten (Abb. 12 B).

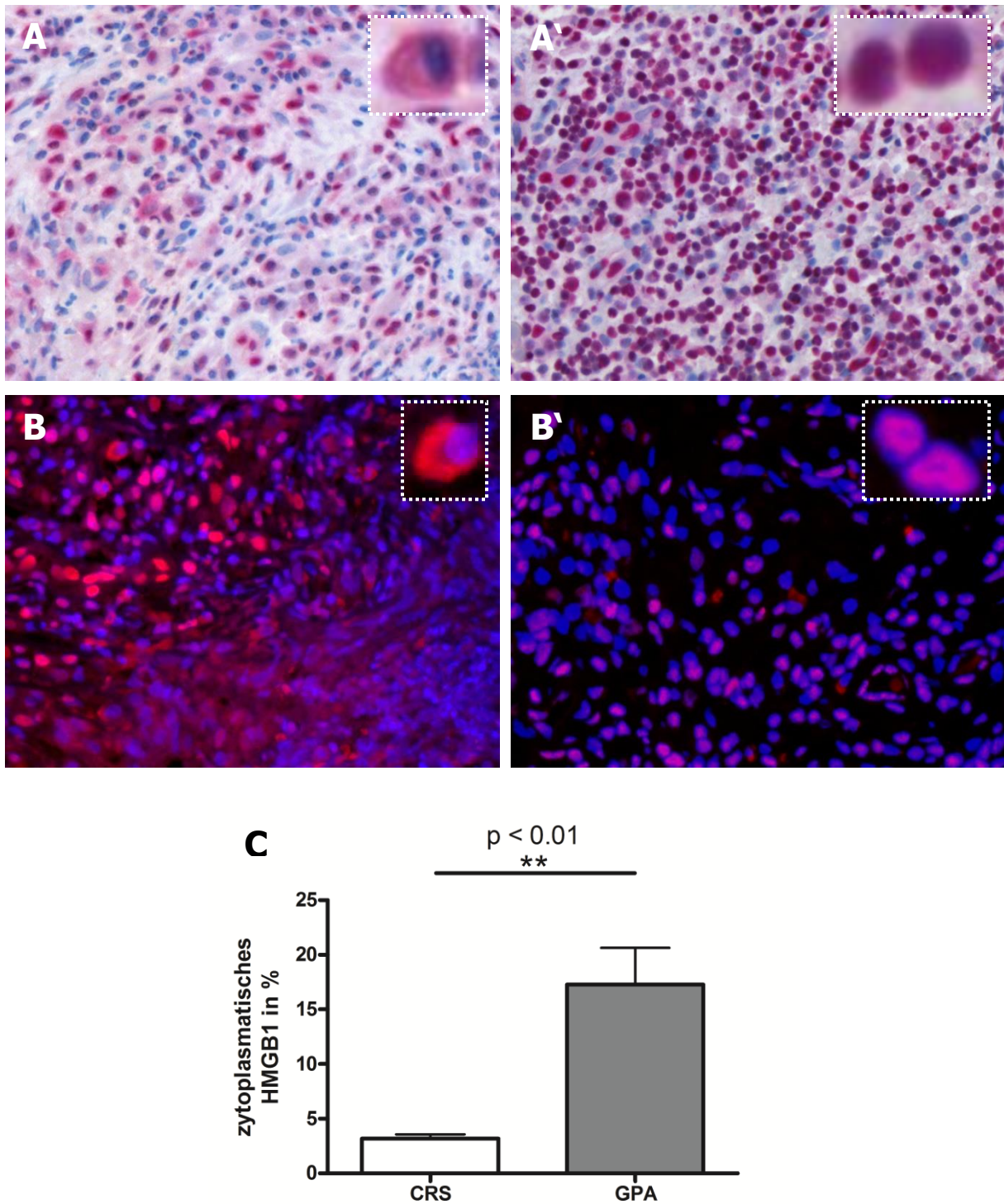


Abb. 11 Lokalisation von HMGB1 in Zellen des Nasenschleimhautgewebes

Exemplarische Darstellung der HMGB1-Expression in Nasenschleimhautgewebe bei der GPA (**A**) im Vergleich zur CRS (**A'**) mittels immunhistologischer Färbung von HMGB1 (rot) und Zellkernen (blau); exemplarische Darstellung der HMGB1-Expression bei der GPA (**B**) im Vergleich zu CRS (**B'**) mittels Immunfluoreszenzfärbung von HMGB1 (rot) und Zellkernen (blau); (**C**) Erhöhter Anteil von zytoplasmatisch lokalisiertem HMGB1 im Verhältnis zur Gesamtzellzahl bei der GPA im Vergleich zur CRS (n= 5; p < 0,01).

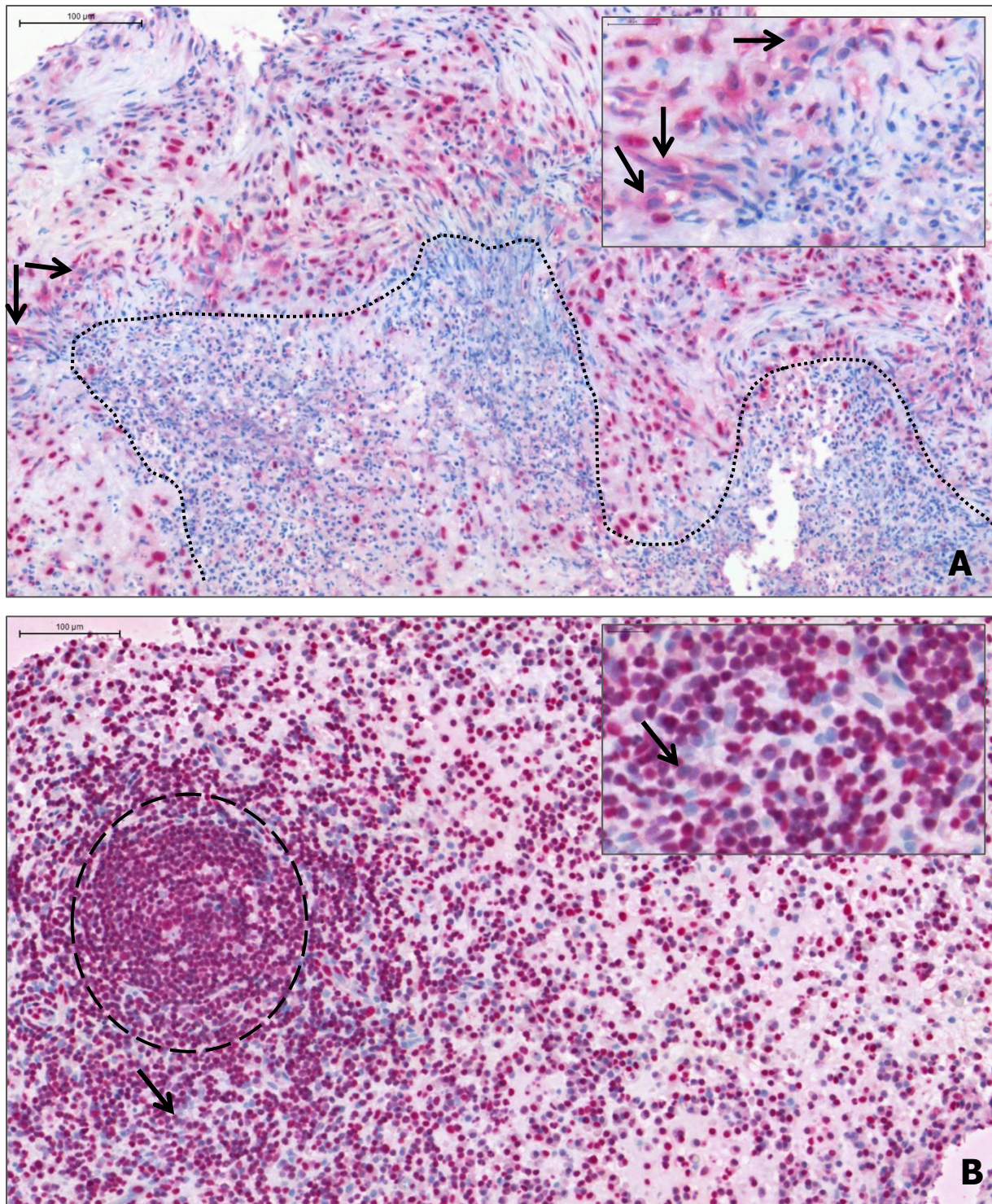


Abb. 12 Verteilung der HMGB1-Expression im Nasenschleimhautgewebe

Exemplarische Darstellung der HMGB1-Expression in Nasenschleimhaut bei der GPA (A) und CRS (B) mittels Immunhistologischer Färbung von HMGB1 (rot) und Zellkernen (blau), jeweils $n = 10$. gepunkteter Rand: neutrophilenreiche Mikroabszesse und nekrotische Läsionen mit einem Rand aus Zellen mit zytoplasmatischem HMGB1; gestrichelter Kreis: Follikel; Pfeile: zytoplasmatisches HMGB1.

4.2. CD68-Expression im Nasenschleimhautgewebe

Um Zellen zu identifizieren, die HMGB1 freisetzen, wurden serielle FFPE Schnitte von GPA-Nasenschleimhautgewebe (n = 10, siehe Tabelle 7) mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. Da bereits bekannt ist, dass häufig palisadenartige Makrophagen um nekrotische Bereiche bei der GPA zu finden sind, wurde die Expression des Makrophagenmarkers CD68 analysiert. Bei den palisadenartig lokalisierten Zellen, die um nekrotische Bereiche in der Nasenschleimhaut bei der GPA vorkommen, handelt es sich vorwiegend um Makrophagen (Abb. 13 A). Im Gegensatz zu der starken Akkumulation von CD68⁺ Zellen in der granulomatösen Entzündung bei der GPA wurden bei der CRS überwiegend diffus verteilte CD68⁺ Zellen beobachtet (Abb. 13 B).

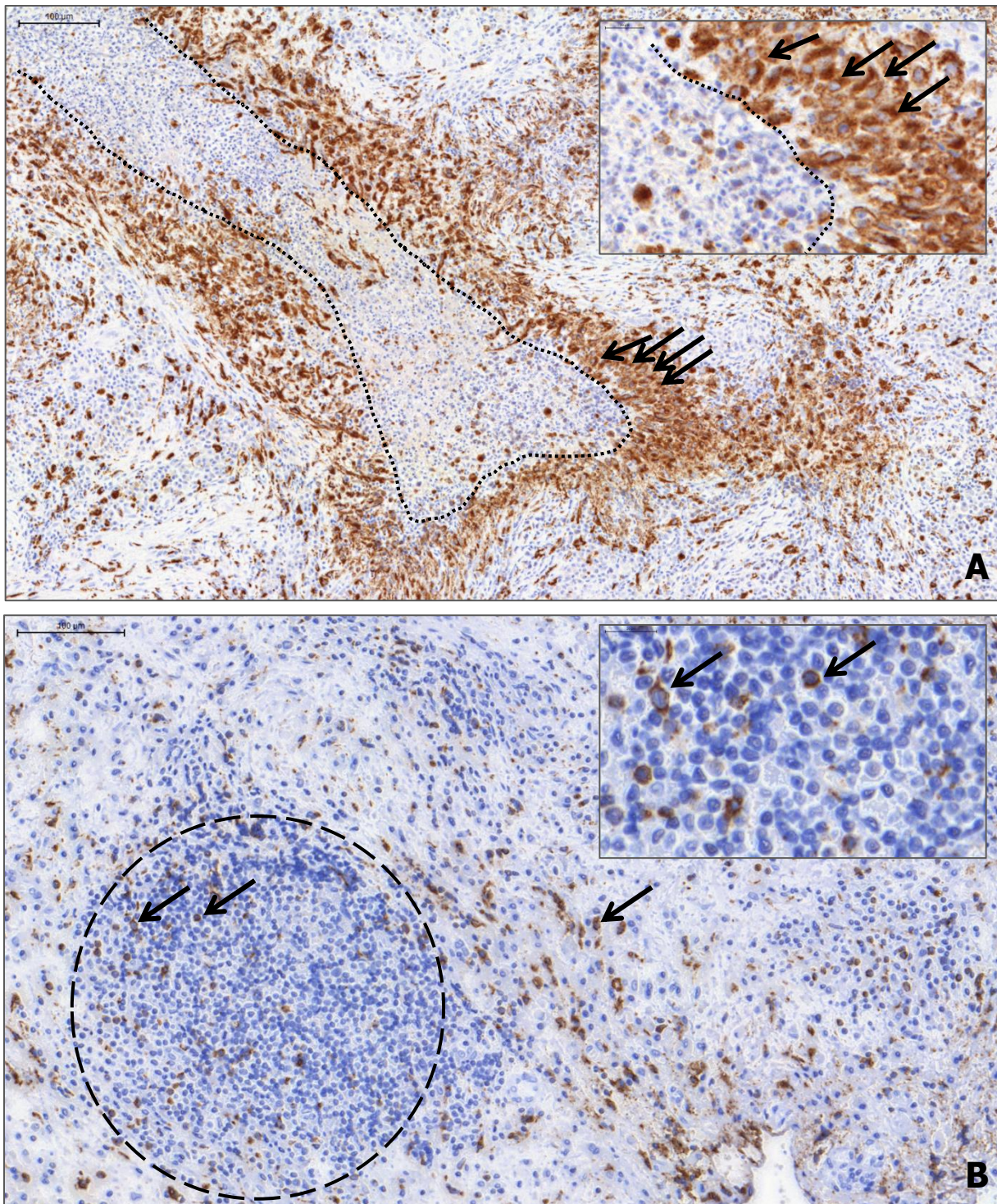


Abb. 13 Verteilung der CD68-Expression im Nasenschleimhautgewebe

Exemplarische Darstellung der CD68-Expression in Nasenschleimhaut bei der GPA (A) und CRS (B) mittels immunhistologischer Färbung von CD68 (braun) und Zellkernen (blau), jeweils n = 10. gepunkteter Rand: neutrophilenreiche Mikroabszesse mit einem Rand aus CD68⁺ Zellen; gestrichelter Kreis: Follikel; Pfeile: CD68⁺ Zellen.

4.3. Posttranslationale Modifikationen von HMGB1 im Blutplasma

Da posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung von HMGB1 eine Verschiebung im isoelektrischen Punkt (pI) bewirken, wurde Plasma von GPA-Patienten und gesunden Kontrollen mittels 2D-PAGE analysiert (siehe 3.8 Proteinanalyse). Die Auftrennung nach pI und Größe von Plasmaproteinen bei den Kontrollen und der GPA mittels 2D-PAGE zeigte ein unterschiedliches Expressionsmuster von HMGB1. Signale einer charakteristischen Bande sind bei der GPA in Richtung eines niedrigeren pH-Wertes verschoben (siehe Abb. 14, Pfeile). Des Weiteren zeigten sich neben den eigentlichen HMGB1-Signalen bei 28 kD weitere Signale bei ~ 60 kD und ~ 90 kD, die bei der GPA ebenfalls zum niedrigeren pH verschoben war (Abb. 14 Sternchen und Raute).

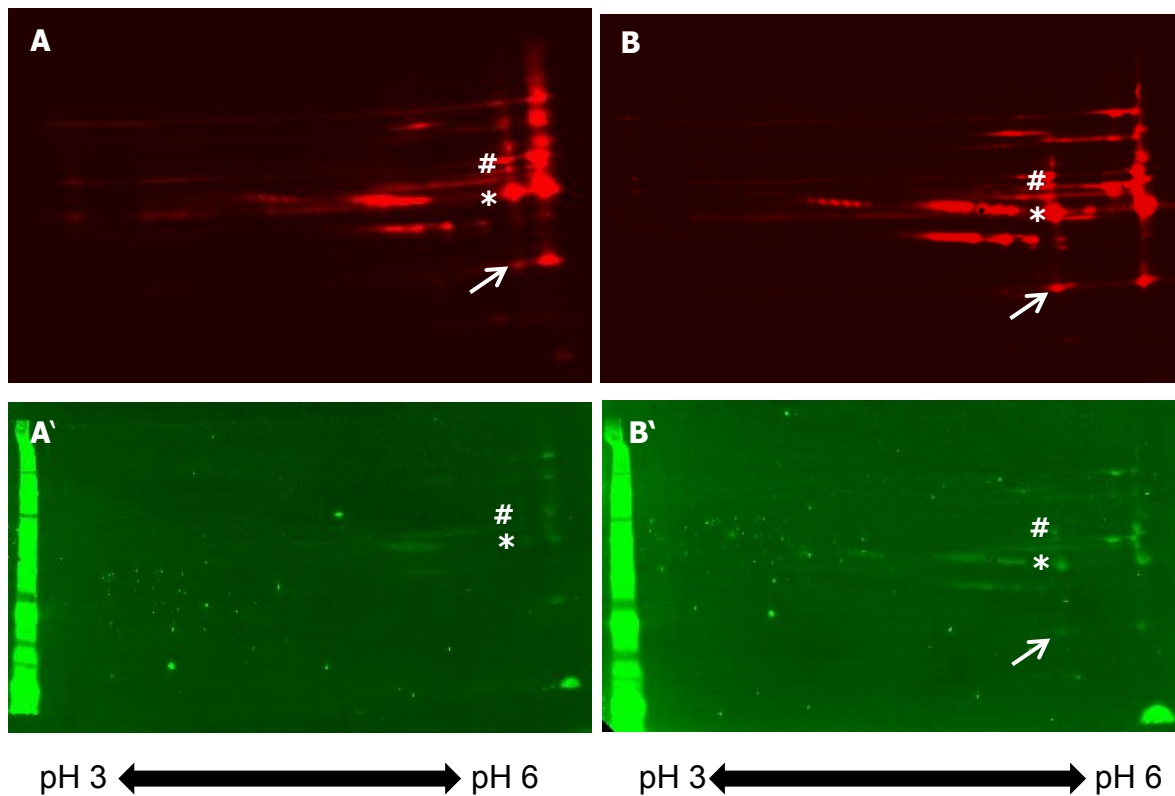


Abb. 14 Expressionsmuster von HMGB1 in der 2D-PAGE

Exemplarische Expression von Gesamtprotein (rot) und HMGB1 (grün) aus Plasma einer gesunden Kontrolle (A) und eines GPA-Patienten (B) nach Auftrennung mittels 2D-PAGE. Pfeil: HMGB1 Monomer bei 28 kD; *: ~ 60 kD Signal; #: ~ 90 kD Signal.

4.4. Expression von RAGE im Nasenschleimhautgewebe

Ein wichtiger Rezeptor von HMGB1 ist RAGE, der mit chronischen Entzündungen und Gewebeerstörung assoziiert ist (siehe 2.4.4 Rezeptoren und Bindungspartner). Um zu untersuchen, ob RAGE in der granulomatösen Entzündung bei der GPA eine Rolle spielt, wurde die RAGE-Expression bei seriellen Schnitten von Nasenschleimhautgewebe bei der GPA (n = 10, siehe Tabelle 7) und CRS mittels immunhistologischer Färbungen (siehe 3.9.2 Immunhistologische Färbung) analysiert. Im Vergleich zur CRS ist die RAGE-Expression im Gewebe bei der GPA deutlich erhöht. Einer starken Akkumulation von RAGE⁺ Zellen konnten insbesondere in der Nähe der granulomatösen Entzündung und am Rand von Mikroabszessen und Nekrosen beobachtet werden (Abb. 15 A). Wie unter 4.2 beschrieben, handelt es sich bei diesen Zellen überwiegend um Makrophagen. Im Gegensatz dazu wurde bei der CRS eine eher schwache und diffus verteilte oder mit Endothel-assoziierte Expression von RAGE beobachtet (Abb. 15 B).

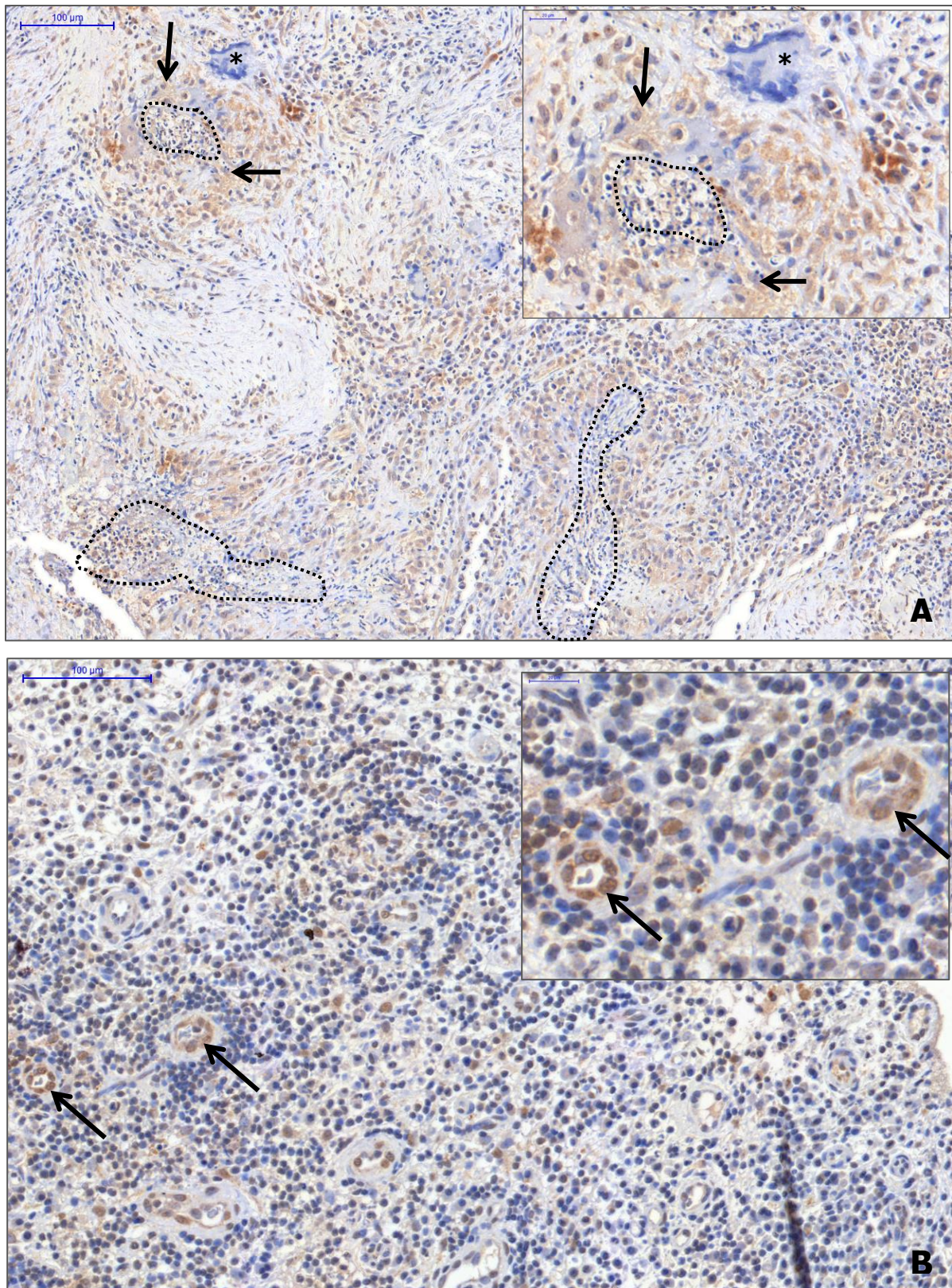


Abb. 15 Verteilung der RAGE-Expression im Nasenschleimhautgewebe

Exemplarische Darstellung der RAGE-Expression in Nasenschleimhaut bei der GPA (A) und CRS (B) mittels immunhistologischer Färbung von RAGE (braun) und Zellkernen (blau), jeweils n = 10. gepunkteter Rand: neutrophilenreiche Mikroabszesse mit einem Rand an RAGE⁺ Zellen, Sternchen: Riesenzelle; Pfeile: RAGE⁺ Zellen.

4.5. sRAGE im Serum

sRAGE ist die lösliche Form von RAGE, die durch proteolytische Spaltung mittels Disintegrine und Matrix-Metalloproteasen gebildet wird und Liganden wie HMGB1 abfangen und neutralisieren kann (siehe 2.4.4 Rezeptoren und Bindungspartner). Ob sRAGE bei der GPA eine Rolle spielt, wurde in Seren von 10 GPA-Patienten (bei jeweils inaktiver Erkrankung während Remission und aktiver Erkrankung bei Rezidiv), fünf Diabetes mellitus Typ 1-Patienten (T1D) und sechs gesunden Kontrollen mittels ELISA untersucht (siehe 3.10 sRAGE-ELISA). Der sRAGE-Spiegel wurde zunächst bei inaktiven und aktiven GPA-Patienten verglichen. Dabei wurde die Nullhypothese H_0 , dass es keinen Unterschied in der Differenz der Mediane beider Gruppen gibt, mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ überprüft. Der sRAGE-Spiegel der 10 GPA-Patienten in Remission (inaktive GPA) und im Rezidiv (aktive GPA) war nicht signifikant unterschiedlich, die Nullhypothese konnte nicht verworfen werden (Abb. 16).

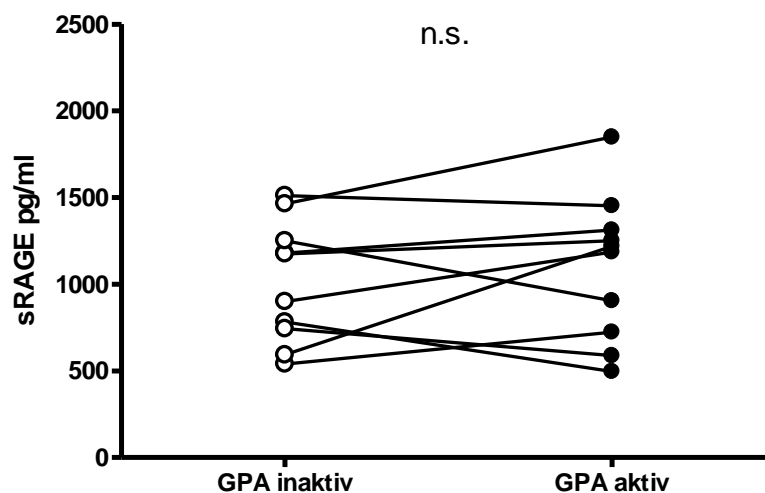


Abb. 16 sRAGE im Serum von inaktiven und aktiven GPA-Patienten

Kein signifikanter Unterschied des sRAGE-Spiegels im Serum von Patienten mit inaktiver (Remission) und aktiver (Rezidiv) GPA mittels ELISA. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Weiterhin wurde der sRAGE-Spiegel bei der GPA im Vergleich zu Gesunden und T1D-Patienten verglichen. Dabei wurde die Nullhypothese H_0 , dass die Mediane der Gruppen gleich sind, mittels Kruskal-Wallis-Test mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ überprüft. Die Mediane der Gruppen GPA, Gesund und T1D waren signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$), so dass die Nullhypothese verworfen wurde. Ein anschließender multipler Paarvergleich nach der Bonferroni-Methode ergab keinen signifikanten Unterschied von gesunden

Kontrollen zu GPA-Patienten, jedoch einen signifikanten Unterschied zu T1D-Patienten ($p < 0,05$; Abb. 17).

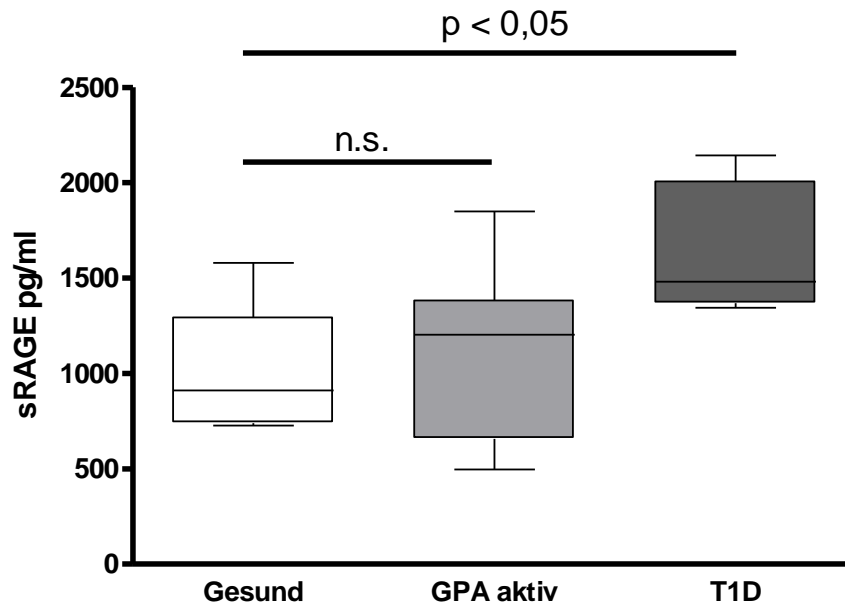


Abb. 17 sRAGE-Spiegel im Serum von aktiven GPA-Patienten im Vergleich zu Gesunden Kontrollen und Typ 1 Diabetes mellitus (T1D) als Krankheitskontrolle

Kein signifikanter Unterschied des sRAGE-Spiegels im Serum von Patienten mit GPA im Vergleich zu Gesunden. Signifikanter Unterschied zwischen T1D-Patienten und Gesunden ($p < 0,05$). Statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test und multiplem Paarvergleich nach Bonferroni.

Innerhalb der aktiven GPA-Patienten wurde untersucht, ob eine Korrelation des sRAGE-Spiegels mit dem BVAS (engl. *Birmingham Vasculitis Activity Score*) vorlag. Dabei wurde die Nullhypothese H_0 , dass die Korrelation nur aufgrund eines Stichprobenzufalls beobachtet wurde, mittels Spearmans Rangkorrelationskoeffizient mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ überprüft. Bei der Untersuchung der sRAGE-Spiegel von aktiven GPA-Patienten in Abhängigkeit des BVAS wurde eine signifikante Korrelation gefunden ($r = 0,79$; $p < 0,01$; Abb. 18), so dass die Nullhypothese verworfen wurde.

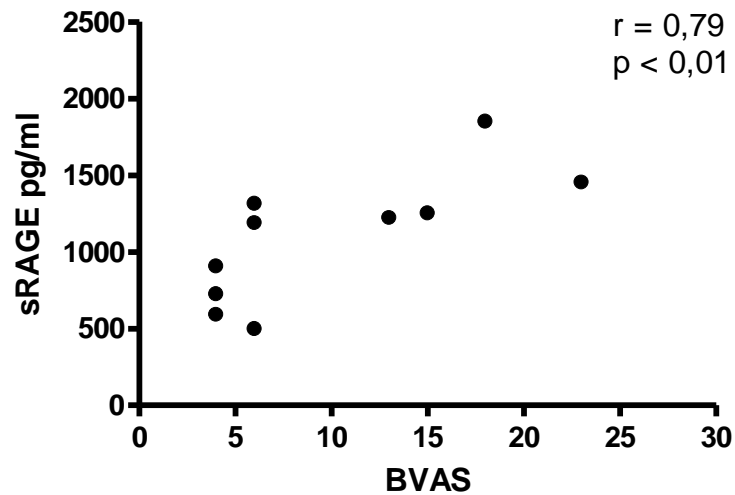


Abb. 18 sRAGE-Spiegel im Serum von aktiven GPA-Patienten in Korrelation mit dem BVAS
 Statistische Auswertung mittels Spearmans Rangkorrelationskoeffizient.

4.6. *rage* und *adam10* mRNA in PBMC

Da ADAM10 für die Generierung von sRAGE durch proteolytische Abspaltung von der Membranoberfläche verantwortlich ist, wurde die Genexpression von *rage* und *adam10* in PBMC von je sechs gesunden Probanden und sechs GPA-Patienten mittels qPCR verglichen. Die Expression wurde gegen das Haushaltsgen 18S rRNA relativiert. Dabei wurde die Nullhypothese H_0 , dass die Mediane der beiden Gruppen gleich sind, auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ getestet.

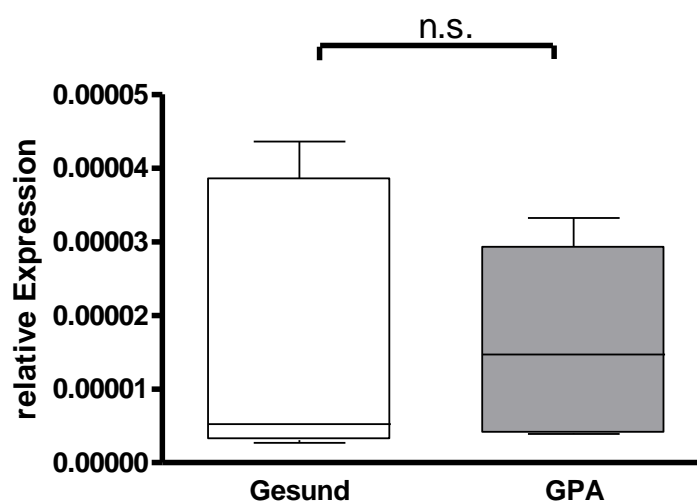


Abb. 19 *rage* mRNA in PBMC

Die mRNA Expression von *rage* in PBMC von GPA-Patienten zeigte im Vergleich zu Gesunden keinen signifikanten Unterschied (jeweils $n = 6$). Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test.

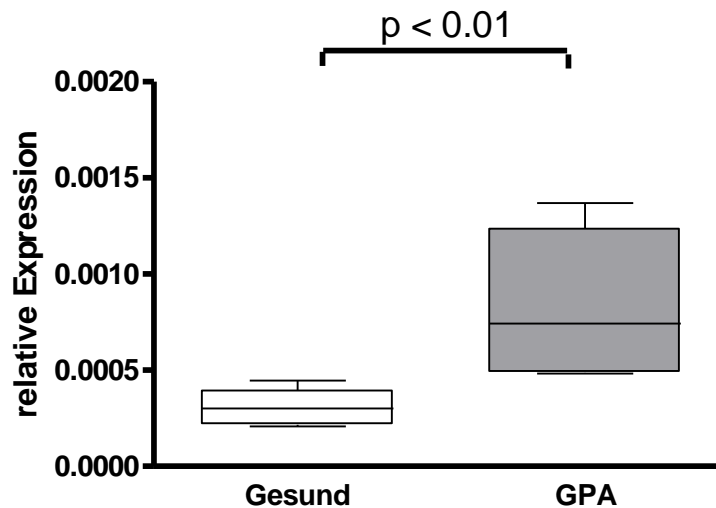


Abb. 20 *adam10* mRNA in PBMC

Die mRNA Expression von *adam10* in PMBC von GPA-Patienten war im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht (jeweils n = 6). Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test.

Es wurde kein Unterschied zwischen GPA-Patienten und Gesunden in der Genexpression von *rage* in PBMC festgestellt (Abb. 19), während die Genexpression von *adam10* erhöht war (p < 0,01; Abb. 20).

4.7. Einfluss von nekrotisch freigesetztem HMGB1 auf THP-1 Zellen

Die Auswirkung von nekrotisch freigesetztem HMGB1 auf Makrophagen wurde *in vitro* imitiert. Dazu wurde nekrotischer Überstand aus HMGB1^{-/-} und HMGB1^{+/+} embryonalen Mäusefibroblasten (MEF) durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen generiert. Die zu Makrophagen differenzierte monozytäre Leukämiezelllinie THP-1 wurde mit dem nekrotischen Überstand der MEF stimuliert. Die IL-1 β -Freisetzung wurde im Überstand mittels Westernblot gemessen (3.12 Zytokin-Induktion in THP-1 Zellen).

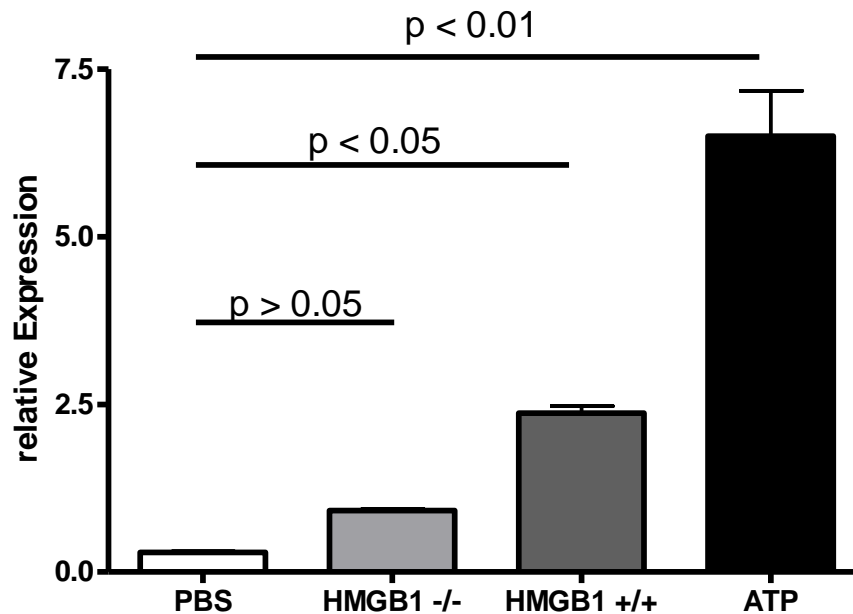


Abb. 21 HMGB1-abhängige IL-1 β -Freisetzung in differenzierten THP-1 Zellen

Der Einfluss von nekrotisch freigesetztem HMGB1 wurde durch Stimulation von differenzierten THP-1 Zellen mit nekrotischem Überstand aus HMGB1^{+/+} und HMGB1^{-/-} embryonalen Mäusefibroblasten (MEF) anhand der IL-1 β Ausschüttung mittels Westernblot analysiert. ATP diente als Positivkontrolle. Statistische Auswertung mittels ein-faktorieller ANOVA und multiplem Paarvergleich nach Dunnett (n = 3).

Dabei wurde die Nullhypothese H_0 , dass die Mittelwerte der Gruppen gleich sind, mittels ein-faktorieller ANOVA auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ getestet. Die Mittelwerte der Gruppen waren signifikant unterschiedlich ($p < 0.0001$), so dass die Nullhypothese verworfen wurde. Ein anschließender multipler Paarvergleich nach der Dunnett-Methode ergab, dass die Stimulation von THP-1 Zellen mit nekrotischem Überstand von HMGB1^{+/+} MEF zu einer signifikant erhöhten IL-1 β -Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (PBS) führte ($p < 0.05$), nekrotischer Überstand von HMGB1^{-/-} MEF jedoch nicht ($p > 0.05$) führte (Abb. 21).

4.8. Bindung von HMGB1 und PR3 in PMN-Lysaten

Die potentielle Interaktion zwischen PR3 und HMGB1 in PMN wurde in PMN-Lysaten mittels Koimmunpräzipitation und Westernblot analysiert (siehe 3.8.6 Koimmunpräzipitation). Dazu wurden an Säulen entweder α HMGB1-Antikörper oder α PR3-Antikörper immobilisiert und mit PMN-Lysaten von GPA-Patienten oder Gesunden inkubiert. Die Präzipitation der Bindungspartner von HMGB1 bzw. PR3 wurde im Westernblot mit den identischen Antikörpern wie in der Säulenpräparation überprüft.

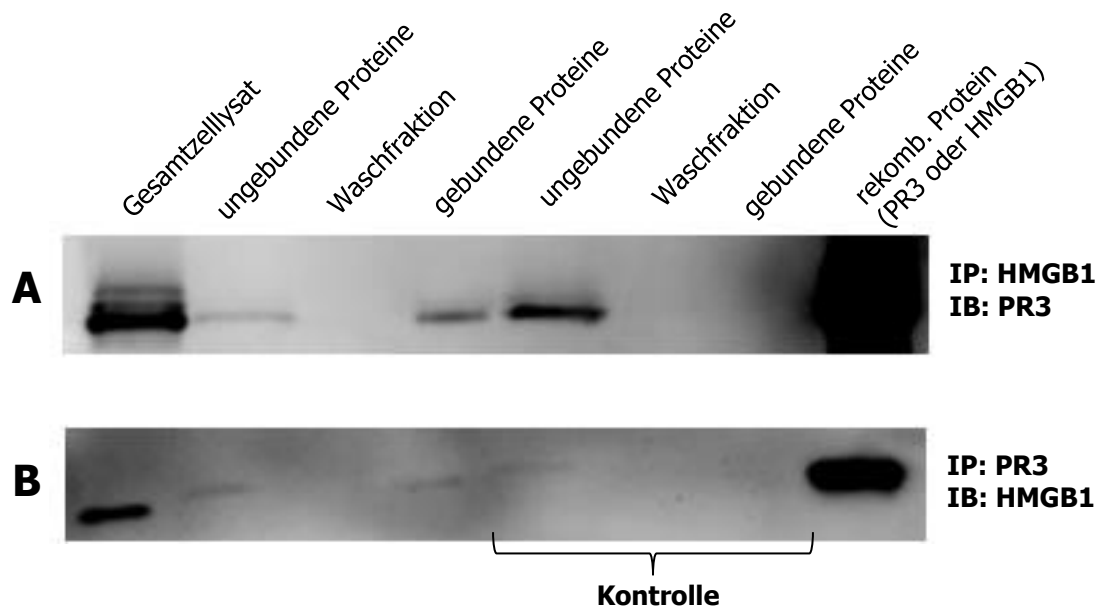


Abb. 22 Interaktion von HMGB1 und PR3 in PMN-Lysaten

Es wurden HMGB1 mit potentiellen Bindungspartnern (A) bzw. PR3 mit potentiellen Bindungspartnern (B) mittels Koimmunpräzipitation aus PMN-Lysaten eluiert und mittels Westernblot nachgewiesen. Repräsentatives Beispiel von insgesamt 6 unabhängigen Versuchen.

Bei den Säulen mit immobilisierten α HMGB1-Antikörpern bzw. α PR3-Antikörpern erfolgte die Präzipitation von PR3 gebunden an HMGB1 (Abb. 22 A) bzw. von HMGB1 gebunden an PR3 (Abb. 22 B). Es erfolgte keine unspezifische Bindung an das Säulenmaterial (Abb. 22 Kontrolle).

4.9. Expressionen von HMGB1 und PR3 im Nasenschleimhautgewebe

Die Expressionen von PR3 und HMGB1 in Nasenschleimhautbiopsien bei der GPA (n = 10, siehe Tabelle 7) wurden im Vergleich zur CRS mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbung (siehe 3.9.3 Immunfluoreszenzfärbung) und konfokaler Mikroskopie untersucht.

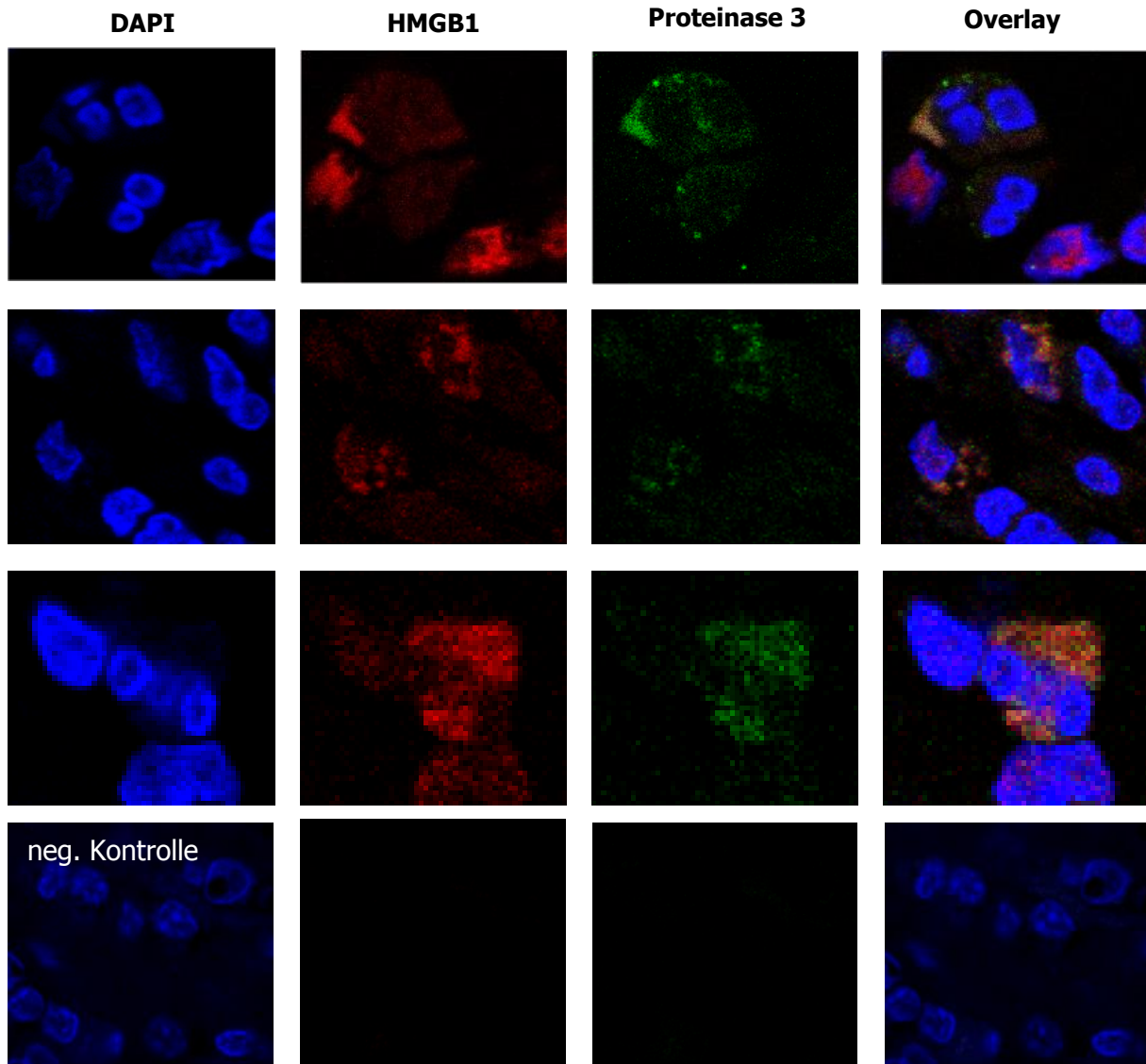


Abb. 23 Kolokalisation von HMGB1 und PR3 in Nasenschleimhautgewebe

Exemplarische Darstellung der HMGB1- und PR3-Expression im Nasenschleimhautgewebe eines GPA-Patienten mittels Immunfluoreszenzfärbung von HMGB1 (rot), PR3 (grün) und Zellkernen (blau), n = 10. Es sind drei repräsentative Beispiele von Kolokalisation gezeigt.

Im Nasenschleimhautgewebe bei GPA-Patienten wurde eine Kolokalisation von HMGB1 und PR3 auf der Oberfläche (und im Zytoplasma) von Zellen beobachtet. Es fiel auf, dass HMGB1⁺/PR3⁺ Zellen häufig einen gelappten Zellkern, wie es für PMN typisch ist, aufwiesen (Abb. 23).

4.10. Expression von HMGB1 und PR3 in apoptotischen PMN

Da bei den Gewebefärbungen mit HMGB1 und PR3 eine Kolo­kalisierung auf Zellen mit gelappten/segmentierten Zellkernen beobachtet wurde, sollte die Expression von HMGB1 und PR3 auf isolierten PMN aus Blut genauer überprüft werden. Dabei sollte insbesondere getestet werden, wie sich die Apoptoseinduktion auf die Lokalisation von HMGB1 und PR3 bei PMN von GPA-Patienten im Vergleich zu Gesunden auswirkt. PMN wurden dafür aus Blut isoliert (siehe 3.7 Isolation humaner Zellen) und auf beschichtete Glasplättchen gesät. Entweder im vitalen Zustand oder nach Apoptoseinduktion (18h Inkubation bei 37°C) wurden die PMN mittels Immunfluoreszenzfärbung auf die Expression von HMGB1 und PR3 analysiert. Apoptose wurde mittels Annexin V-Markierung überprüft (siehe 3.13 PMN Apoptoseassay).

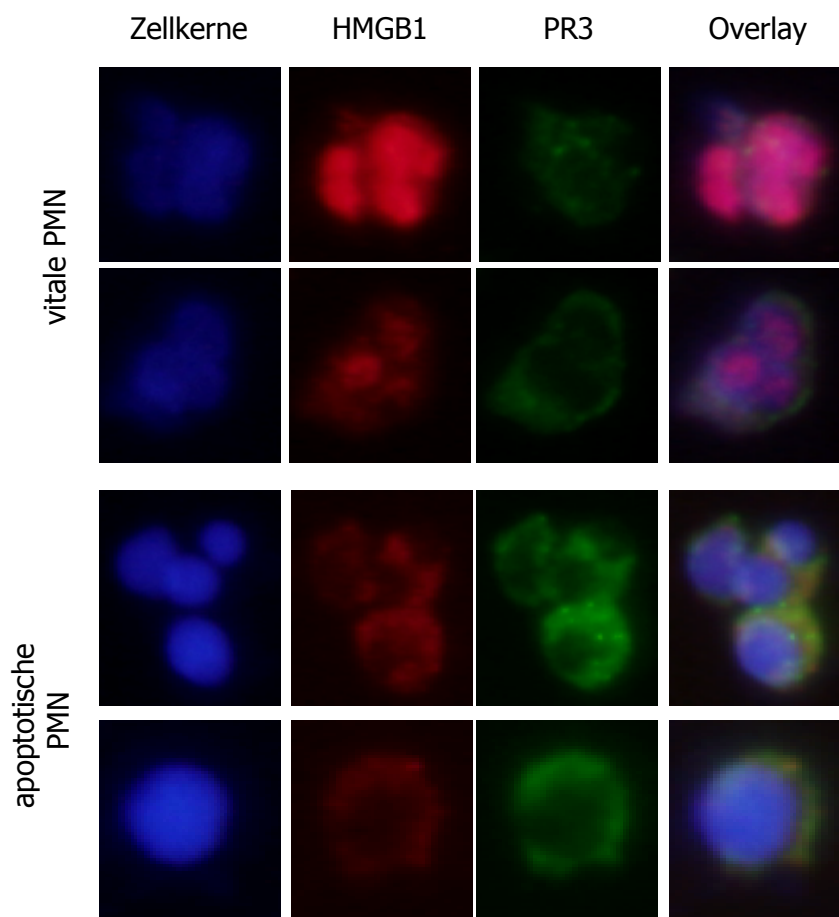


Abb. 24 Expression von HMGB1 und PR3 in apoptotischen PMN

Exemplarische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung von HMGB1 (rot), PR3 (grün) und Zellkernen (blau) in vitalen und apoptotischen PMN (n = 6).

In vitalen PMN sowohl von gesunden Probanden (n = 3) als auch GPA-Patienten (n = 3) war HMGB1 im Kern lokalisiert. Bezüglich der PR3-Expression zeigte sich bei der GPA eine ver-

mehrte Membranexpression. Nach Induktion von Apoptose wurde eine Verschiebung von HMGB1 auf die PMN-Oberfläche beobachtet, wo PR3 und HMGB1 koexprimiert erscheinen (Abb. 24).

4.11. Assoziation von HMGB1 SNPs mit klinischen Parametern

Die Genotypen der vier analysierten SNPs des *hmgb1* Gens wurden auf das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in der GPA-Population und der Referenzpopulation überprüft. In allen untersuchten Gruppen war das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt (HWE $\chi^2 < 5,99$ bei 2 Freiheitsgraden). Weiterhin wurde der Unterschied zwischen den Genotypenfrequenzen zwischen der GPA- und der Referenzpopulation mittels Chi-Quadrat Test überprüft. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$), eine Assoziation aller vier SNP mit der Erkrankung wurde daher nicht angenommen.

Tabelle 11 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) und Unterschied der Genotypenfrequenz zwischen der GPA- und der Referenzpopulation (p)

SNP	Genotyp	GPA		HWE	Referenz		HWE	p
		beobachtet	erwartet		beobachtet	erwartet		
rs1412125	CC	110	103	2,64	51	47	2,50	0,66
	CT	117	130		44	52		
	TT	47	41		18	14		
rs1045411	GG	137	138	0,16	52	21	0,14	0,45
	GA	114	111		48	50		
	AA	21	22		13	12		
rs3742305	GG	138	139	0,20	30	28	0,74	0,17
	GC	107	104		26	29		
	CC	18	19		9	7		
rs1360485	AA	62	56	2,67	29	32	1,43	0,14
	AG	81	92		62	58		
	GG	43	37		21	24		

Ob bei Patienten mit lokalisierter und generalisierter/systemischer GPA bzw. Patienten mit C-ANCA und ohne C-ANCA Unterschiede in der Genotypenfrequenz der Polymorphismen vorlagen, wurde mittels Chi-Quadrat-Test überprüft (Tabelle 12)

Tabelle 12 Genotypenverteilung der Vergleichsgruppen GPA mit C-ANCA und ohne C-ANCA bzw. lokalisierter und generalisierter/systemischer GPA (χ^2 -Test)

SNP	Genotyp	c-ANCA	kein C-ANCA	p	lokalisiert	generalisiert/systemisch	p
rs1412125	CC	98	12	0,49	6	102	0,66
	CT	99	18		10	106	
	TT	39	8		3	44	
rs1045411	GG	119	18	0,76	11	123	0,83
	GA	98	17		8	106	
	AA	17	4		1	20	
rs3742305	GG	120	18	0,16	10	125	0,84
	GC	95	12		6	101	
	CC	13	5		1	17	
rs1360485	AA	54	8	0,59	3	58	0,35
	AG	71	10		7	74	
	GG	40	3		1	41	

Es ergab sich weder bei GPA mit C-ANCA und ohne C-ANCA bzw. lokalisierter und generalisierter/systemischer GPA ein signifikanter Unterschied in der Genotypenfrequenz ($p > 0,05$).

5. Diskussion

5.1. Alarmin-Funktion von HMGB1 bei der GPA

HMGB1 ist ein prototypisches Alarmin, das in Analogie zur Gefahr-Theorie sowohl durch exogene (Infektionen) als auch durch endogene Einflüsse (sterile Zell- und Gewebeerstörung) freigesetzt wird und somit eine Immunantwort auslösen kann (siehe 2.4.5 Funktion). Da die granulomatöse Entzündung bei der GPA mit einer Gewebeerstörung und Nekrose einhergeht, wurde eine Beteiligung von HMGB1 vermutet. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentration von HMGB1 bei der GPA im Vergleich zu Gesunden erhöht ist und mit der Krankheitsaktivität korreliert, bei der MPA jedoch nicht (Wibisono et al., 2010). Dies könnte darin begründet sein, dass sich die MPA vor allem durch das Fehlen einer extravaskulären granulomatösen Entzündung von der GPA unterscheidet. Die Hypothese, dass die granulomatöse Entzündung eine mögliche Quelle von HMGB1 darstellen, konnte weiter untermauert werden, indem eine positive Korrelation der Serumkonzentration von HMGB1 mit dem Ausmaß der granulomatösen Entzündung in der Lunge bei der GPA gezeigt wurde (Henes et al., 2011). Um weitere Hinweise auf eine mögliche Rolle von HMGB1 in der granulomatösen Entzündung zu erhalten, wurde die Expression und zelluläre Lokalisation von HMGB1 im Gewebe der GPA im Vergleich zu CRS untersucht. In Zellen der Nasenschleimhaut von GPA-Patienten lag HMGB1 überwiegend außerhalb des Zellkerns vor, in Gegensatz zur meist kernständigen Expression bei der CRS ($p < 0.01$). Besonders Zellen, die sich am Rand nekrotischer Bereiche befanden, zeigten eine zytoplasmatische Expression von HMGB1. Innerhalb der nekrotischen Zonen schien HMGB1 diffus zwischen nekrotischen Zellfragmenten im extrazellulären Raum vorzuliegen. Diese Daten deuten darauf hin, dass HMGB1 in Mikroabszessen und nekrotischer Läsionen bei der GPA freigesetzt wird. Die angrenzenden Zellen könnten durch das endogene Gefahrensignal stimuliert werden.

5.2. HMGB1 und Makrophagen in der granulomatösen Entzündung

Da die Zellen um nekrotische Bereiche in Lungenbiopsien bei der GPA als palisadenartig angeordnete Makrophagen charakterisiert wurden (Fienberg, 1989), wurde die Expression des Makrophagenmarkers CD68 in Nasenschleimhautgewebe untersucht. Bei den palisadenartig angeordneten Zellen um nekrotische Bereiche in der Nasenschleimhaut bei der GPA handelte es sich hauptsächlich um Makrophagen, die meist eine zytoplasmatische Lokalisation von HMGB1 zeigten. Dies deutet darauf hin, dass sowohl passive als auch aktive Freisetzung-

prozesse von HMGB1 in der granulomatösen Entzündung bei der GPA eine Rolle spielen. Einerseits könnte nekrotisch freigesetztes HMGB1 direkt auf Makrophagen (z.B. phänotypisch) wirken. Andererseits können Makrophagen selbst über aktive Freisetzung von HMGB1 zur lokalen Entzündungsreaktion bei der GPA beitragen.

Die zytoplasmatische Expression von HMGB1 in Makrophagen kann durch posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung oder Phosphorylierung beeinflusst werden (siehe dazu 2.4.2 Freisetzung und 2.4.3 Posttranslationale Modifikationen). Experimentell konnten einige modifizierte HMGB1 Isoformen nachgewiesen werden. Beispielsweise ist gezeigt worden, dass der isoelektrische Punkt (pI) von acetyliertem HMGB1 aus aktivierten Monozyten in einen niedrigeren pH-Bereich verschoben ist (Bonaldi et al., 2003). Redox-abhängige Isoformen von HMGB1, die durch den Redox-Status der Cysteine 23, 45 und 106 definiert sind und unterschiedliche biologische Aktivität (Chemokin, Zytokin, inaktiv) besitzen, zeigten im Western-blot unterschiedliche Laufverhalten. Am Beispiel eines *in vivo* Mausmodells konnte dabei demonstriert werden, dass das zeitliche Auftreten der Redox-abhängigen Isoformen den Verlauf einer Entzündung sehr gut widerspiegeln (Venereau et al., 2012). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass mehrere Moleküle von Disulfid-HMGB1 über das freie, reduzierte Cystein 106 unter oxidierenden Bedingungen ebenfalls Disulfid-Bindungen ausbilden können. Dies führt zu einer Oligomerisierung und verstärkt die Bindung an TLR4 und damit die Entzündungsreaktion (Lee et al., 2014). Posttranslationale Modifikationen von HMGB1 können daher Aufschluss über die zelluläre Quelle (passiv bei Nekrose, aktiv durch Immunzellen) und die biologische Aktivität (Chemokin, Zytokin) geben.

Bei der GPA könnte dieser Aspekt von besonderer Bedeutung sein. Obwohl in den bereits erwähnten Arbeiten von Wibisono et al. und Henes et al. eine positive Korrelation mit Krankheitsparametern der GPA gefunden wurde, wird Serum-HMGB1 als Biomarker für Krankheitsaktivität bei den AAV kontrovers diskutiert. Eine longitudinale Studie mit AAV-Patienten zeigte keine Assoziation der HMGB1-Konzentration im Bezug auf den AAV-Typ oder einem Rückfallrisiko, jedoch eine negative Korrelation von AAV mit Nierenbeteiligung (de Souza et al., 2013). Allerdings finden die Autoren, in Übereinstimmung mit Henes et al., erhöhte Serum-Spiegel von HMGB1 bei lokalisierter GPA und AAV-Patienten mit granulomatösen Läsionen in der Lunge. Dies deutet darauf hin, dass erhöhtes Serum-HMGB1 zwar kein allgemeiner Biomarker für die Krankheitsaktivität bei AAV, jedoch ein Kennzeichen für das Auftreten von Granulomen bei der GPA darstellen könnte. Eine weitere Ursache für die Diskrepanz liegt möglicherweise in den verwendeten Analysemethoden von Serum-HMGB1. Der überwiegend verwendete ELISA kann lediglich die Konzentration an Gesamt-HMGB1 messen, berücksichtigt jedoch nicht Unterschiede in der posttranslationalen Modifizierung. Außerdem kann HMGB1 durch verschiedene Immunglobuline maskiert sein, so dass

gebundenes HMGB1 ebenfalls nicht detektiert und die ELISA-Messung verfälscht wird (Urbonaviciute et al., 2007). Die Analyse der posttranslationalen Modifizierungen von HMGB1 im Blut mittels geeigneterer Methoden, wie 2D-PAGE, könnte daher detailliertere Informationen wie Quelle und Aktivität von freigesetztem HMGB1 bei der GPA liefern, welche besser mit Krankheitsparametern korrelieren könnten.

Da acetyliertes HMGB1 wie oben beschrieben eine Veränderung des pI zeigt, wurde Plasma von GPA-Patienten und gesunden Kontrollen mittels 2D-PAGE aufgetrennt. Die Auftrennung von Plasma bei Gesunden und GPA-Patienten mittels 2D-PAGE zeigte ein unterschiedliches Expressionsmuster von HMGB1. Signale einer charakteristischen Bande sind bei der GPA in Richtung eines niedrigeren pH-Wertes verschoben. Des Weiteren zeigten sich neben den eigentlichen HMGB1-Signalen bei 28 kD weitere Signale bei ~ 60 kD und ~ 90 kD, die möglicherweise HMGB1-Dimeren oder Trimeren entsprechen. Es kann daher spekuliert werden, dass die Verschiebung der HMGB1-Signale in Richtung niedrigerem pH von freigesetztem, acetyliertem HMGB1 aus aktivierten Monozyten/Makrophagen stammen könnte. Darüber hinaus könnten die Signale mit höherem Molekulargewicht (60 kD und 90 kD) von HMGB1-Oligomeren stammen, wie sie von Lee *et al.*, 2014 beschrieben wurden. Diese Daten deuten eine unterschiedliche Modifikation von HMGB1 im Plasma von GPA-Patienten und Gesunden an. Möglicherweise handelt es sich hier um acetyliertes HMGB1 und/oder oligomerisiertes Disulfid-HMGB1. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen im Gewebe überein, bei dem Makrophagen bei der granulomatösen Entzündung vermehrt zytoplasmatisches HMGB1 aufweisen und möglicherweise sezernieren. Eine massenspektrometrische Analyse der Banden könnte genaueren Aufschluss über die HMGB1-Formen geben. Posttranslationale Modifikationen von HMGB1 im Blut würde somit möglicherweise geeignete Kandidaten als Marker bei der GPA und anderen Erkrankungen im Vergleich mit der Gesamtkonzentration darstellen.

5.3. HMGB1-abhängige IL-1 β -Freisetzung in differenzierten THP-1 Zellen *in vitro*

Um den Einfluss von nekrotisch freigesetztem HMGB1 auf Makrophagen in einem *in vitro* Modell nachzuvollziehen, wurde eine zu Makrophagen differenzierte, monozytäre Zelllinie (THP-1) mit nekrotischem Überstand aus WT und HMGB1-ko Zellen stimuliert und die proinflammatorische Zytokinantwort analysiert. Frühere Studien zeigten, dass eine Stimulation mit rekombinantem HMGB1 bei gesunden Monozyten zu IL-1 β -Freisetzung führt (Andersson et al., 2000). Außerdem wurde eine IL-1 β -Freisetzung *in situ* aus aktivierten Monozyten bei AAV demonstriert (Noronha et al., 1993). Daher sollte nun der Einfluss von nekrotisch freigesetztem HMGB1 in diesem Prozess *in vitro* überprüft werden. Nekrotisch freigesetztes

HMGB1 führte zu einer erhöhten IL-1 β -Freisetzung in differenzierten Makrophagen. IL-1 β wurde als einer der Bindungspartner von HMGB1 identifiziert, dessen pro-inflammatorische Eigenschaft durch HMGB1-Bindung verstärkt wird (Sha et al., 2008). Daher könnte HMGB1 zusammen mit IL-1 β über einen sich-selbst amplifizierenden inflammatorischen Kreislauf zur granulomatösen Entzündung bei der GPA beitragen.

5.4. RAGE-Expression in der granulomatösen Entzündung

RAGE-Expression ist bekannt als ein Marker für Gewebeerstörung. Da RAGE viele Liganden, darunter auch Alarmine erkennt, kann man ihn zu den PRR zählen (Sims et al., 2010). RAGE spielt eine wichtige Rolle in vielen pathologischen Situationen, wie sterile Entzündungen und chronisch-entzündliche und Autoimmunerkrankungen (Sims et al., 2010). RAGE wird im normalen Gewebe, außer der Lunge, wenig exprimiert. Erst die Akkumulation seiner Liganden führt über einen Rezeptor-abhängigen, inflammatorischen Kreislauf zu vermehrter RAGE-Expression, (Schmidt et al., 2001). RAGE ist essentiell für die Wanderung von DC zu Lymphknoten (Manfredi et al., 2008). Die Bindung von RAGE an seine Liganden induziert eine Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen über NF κ B. Von DC freigesetztes HMGB1 führt RAGE-abhängig zur CD4⁺ T-Zell Proliferation und Th1 Polarisierung, was Einfluss auf die Initiierung und Aufrechterhaltung von Autoimmunreaktionen hat (Dumitriu et al., 2005b).

Um zu untersuchen, ob RAGE in der granulomatösen Entzündung bei der GPA eine Rolle spielt, wurde die RAGE-Expression im Gewebe bei der GPA im Vergleich zu CRS analysiert. Im Vergleich zur CRS ist die RAGE-Expression im Gewebe bei der GPA erhöht. Insbesondere in der Nähe von Granulomen kommt es zu einer starken Akkumulation von RAGE⁺ Zellen. Vor allem die Zellen um nekrotische Bereiche, welche meist Makrophagen darstellen, zeigen eine hohe RAGE-Expression. Dies deutet auf einen möglichen HMGB1/IL-1 β /RAGE-vermittelten inflammatorischen Kreislauf in der granulomatösen Entzündung bei der GPA hin.

Darüber hinaus wird RAGE von pDC exprimiert. pDC setzen durch CpG-Motive (ein DNA-Motiv aus Bakterien oder Viren) über TLR9 große Mengen IFN α frei, welches antivirale Eigenschaften besitzt. Sowohl HMGB1 als auch RAGE spielen dabei eine Rolle, denn die IFN α -Freisetzung kann durch Blocken von HMGB1 oder RAGE inhibiert werden. HMGB1 und RAGE bilden einen autokrinen Kreislauf zur Regulation der Reifung pDC (Dumitriu et al., 2005a). HMGB1 bindet CpG-ODN und verstärkt die inflammatorische Zytokinantwort über TLR9 in Makrophagen. HMGB1 bindet an TLR9 in speziellen Vesikeln und ist beteiligt an der Translokation in frühe Endosomen. HMGB1/CpG-ODN beeinflussen sich gegenseitig über einen au-

tokrinen und parakrinen Kreislauf (Ivanov et al., 2007). CpG-ODN stimulieren die ANCA-Produktion in Monozyten von GPA-Patienten *in vitro*. Die Autoren spekulieren, dass eine mögliche endogene CpG Quelle NETs sein könnten (Hurtado et al., 2008). Wir konnten eine Kolo-kalisation von Neutrophilen und pDC in der granulomatösen Entzündung bei der GPA bereits in einem anderen Zusammenhang beobachten (Millet *et al.*, 2014, in Revision). Denkbar ist daher, dass CpG-Motive auf NETs zusammen mit HMGB1 pDC bei der GPA aktivieren. Dies könnte u.a. eine Th1 Polarisierung und B-Zell Reifung zu Plasmazellen induzieren (Colonna et al., 2004), so dass die hier gezeigte erhöhte RAGE und HMGB1-Expression neben einer pro-inflammatorischen Rolle möglicherweise auch zur Aufrechterhaltung der Autoimmunreaktion bei der GPA beiträgt.

5.5. Serum-Konzentration des Abfangrezeptors sRAGE

sRAGE, eine lösliche Variante von RAGE, wird durch proteolytische Spaltung mittels Disintegrinen und Matrix-Metalloproteasen (z.B. ADAM10) gebildet. Die Akkumulation von RAGE-Liganden führt zu einer erhöhten RAGE-Expression, aber auch zur erhöhten sRAGE-Produktion, welche einen negativen Rückkopplungsmechanismus darstellt. sRAGE wirkt als Abfangrezeptor für RAGE-Liganden und inhibiert so deren RAGE-vermittelte Prozesse (siehe dazu 2.4.4 Rezeptoren und Bindungspartner). Ein Anstieg der sRAGE Konzentration kann somit zur Abschwächung einer Entzündung beitragen. Tatsächlich wurde eine erniedrigte Konzentration an sRAGE im Serum bei Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit gefunden. Im Gegensatz dazu wurden erhöhte Seren-Spiegel von sRAGE bei Diabetes Typ 1 und 2 und bei Nierenerkrankungen gemessen. Eine erhöhte sRAGE-Konzentration bei Diabetes ist mit verstärkter RAGE-Spaltung durch MMP9 assoziiert (Prasad, 2014).

sRAGE Spiegel wurden in dieser Arbeit in Seren von 10 GPA-Patienten (jeweils bei aktiver und inaktiver Erkrankung), sechs Gesundkontrollen und fünf T1D analysiert. Wie oben beschrieben, ist sRAGE im Serum bei Diabetes erhöht. Daher wurden die hier untersuchten T1D Proben als positive Kontrolle mitgeführt. Es konnte eine Erhöhung von sRAGE im Vergleich zu Gesunden gemessen werden ($p < 0,05$). Die Unterschiede zwischen GPA und gesunden Kontrollen und ebenso zwischen aktiver und inaktiver GPA waren nicht signifikant. Jedoch wurde eine positive Korrelation bei der aktiven GPA mit dem BVAS gefunden ($p < 0,01$). Eine Akkumulation von RAGE-Liganden führt wie zuvor bereits erwähnt, zu einer Erhöhung der sRAGE-Konzentration. In dieser Untersuchung konnte jedoch trotz erhöhter Gewebskonzentration an HMGB1 (nekrotisch oder aktiv freigesetzt) und erhöhter RAGE-Expression kein erhöhter sRAGE-Spiegel im Serum bei der GPA festgestellt werden. Dies könnte auf ein mögli-

ches Fehlen des negativen Rückkopplungsmechanismus der HMGB1/RAGE-Interaktion hindeuten.

5.6. mRNA Expression von *adam10* in PBMC

Wie oben beschrieben, wird sRAGE durch proteolytische Abspaltung vor allem mittels ADAM10 generiert (Raucci et al., 2008). Da keine erhöhten sRAGE-Spiegel im Serum von GPA-Patienten gefunden wurden, sollte ein möglicher Unterschied in der Genexpression von *adam10* in PBMC von Gesunden und GPA untersucht werden. Die Genexpression von *adam10* ist in PBMC von GPA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht. Der unveränderte sRAGE-Spiegel bei der GPA kann somit nicht auf eine erniedrigte Genexpression von ADAM10 zurückgeführt werden. Für ADAM10 sind noch weitere Substrate beschrieben, die eine Rolle bei Autoimmunreaktionen und Entzündungen (z.B. CD23 in allergischen und rheumatischen Erkrankungen) spielen (Gibb et al., 2011). Ob ADAM10 bei der GPA an ähnlichen Prozessen beteiligt sein könnte, wurde bislang noch nicht untersucht.

5.7. HMGB1 interagiert mit dem Autoantigen PR3 in/auf PMN

HMGB1 bindet eine Vielzahl verschiedener Moleküle, wie LPS, DNA, Zytokine, Chemokine oder Nukleosomen (siehe 2.4.4. Rezeptoren und Bindungspartner). Darüber hinaus wirkt HMGB1 als Adjuvans in Kombination mit löslichen und zell-assoziierten Proteinen (Rovere-Querini et al., 2004). Bei SLE ist HMGB1 als endogenes Adjuvans für zirkulierende Nukleosomen an der Entstehung der Autoimmunreaktion gegen Nukleosomen-assoziierte Antigene wie dsDNA beteiligt (Urbonaviciute et al., 2008). Daher in dieser Arbeit überprüft, ob HMGB1 mit dem GPA-Autoantigen PR3 interagieren kann. PMN stellen einen zentralen Faktor in der Pathogenese der GPA und eine Quelle von sowohl HMGB1 als auch PR3 dar. Es wurde gezeigt, dass neben der erhöhten Membranexpression der PR3 (Schreiber et al., 2003) in PMN bei der GPA auch ein krankheitsspezifischer Unterschied im Proteinprofil der PMN bei der GPA im Vergleich zur MPA besteht (Uchida et al., 2013). Ob HMGB1 und PR3 möglicherweise in der GPA interagieren können, wurde daher in PMN-Lysaten untersucht. In Koimmunpräzipitationsversuchen wurden a) HMGB1-Antikörper oder b) PR3-Antikörper immobilisiert und mit PMN-Lysaten inkubiert. Anschließend präzipitierte im Fall a) HMGB1 und im Fall b) PR3 in Komplex mit Bindungspartnern. Bei beiden Varianten wurden PR3 bzw. HMGB1 an das jeweils andere Protein präzipitiert. Dies deutet darauf hin, dass HMGB1 und PR3 prinzipiell mit-

einander interagieren können. Ob eine Assoziation von HMGB1 und PR3 möglicherweise auch im Gewebe bei der GPA eine Rolle spielt, wurde durch die Analyse der Gewebsexpression überprüft werden. Neben HMGB1⁺ und PR3⁺ Zellen konnte auch eine Kolokalisation von HMGB1 und PR3 auf der Oberfläche (und im Zytoplasma) einiger Zellen bei der GPA im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden. HMGB1⁺/PR3⁺ Zellen zeigten häufig einen gelappten Zellkern, so dass es sich hier möglicherweise um PMN handelte. Dies deutet darauf, dass das endogene Adjuvans HMGB1 zusammen mit dem Autoantigen PR3 im Gewebe der GPA in räumlicher Nähe auftreten könnte.

5.8. HMGB1/PR3 im Gewebe und auf PMN *in vitro*

Es ist gezeigt worden, dass HMGB1 durch Bindung an klassische „Iss-mich“-Signale wie Phosphatidylserin auf apoptotischen PMN und Bindung an RAGE auf Makrophagen die Efferozytose inhibieren kann (Banerjee et al., 2010). Zusätzlich ist auch für die PR3 eine Membranexpression u.a. auf apoptotischen PMN beschrieben, welche durch Maskierung von „Iss-mich“-Signalen inhibitorisch auf Efferozytose wirkt (Gabillet et al., 2012). Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, wie sich die Apoptoseinduktion auf die Lokalisation von HMGB1 und PR3 bei PMN von GPA-Patienten und Gesunden auswirkt. In vitalen PMN sowohl von gesunden Probanden als auch GPA-Patienten war HMGB1 im Kern lokalisiert. Bezüglich der PR3-Expression zeigten sich bei der GPA eine vermehrte Membranexpression, was sich mit den Ergebnissen früherer Studien deckt (Schreiber et al., 2003). Nach Induktion einer Apoptose wurde eine Verschiebung von HMGB1 auf die PMN-Oberfläche beobachtet. Es ist denkbar, dass diese Kolokalisation auf (möglicherweise apoptotischen) PMN zu einer gestörten Efferozytose beiträgt. Nicht beseitigte PMN könnten über sekundäre Nekrose durch Freisetzung des intrazellulären Inhalts zur persistierenden Entzündung beitragen. Die Bindung des endogenen Adjuvans HMGB1 an ein Autoantigen wie PR3 könnte in einer hochentzündlichen Umgebung wie der Granulomatose zur erhöhten Immunogenität und möglicherweise zur Durchbrechung der peripheren Toleranz gegen PR3 beitragen.

Um diese Hypothese zu validieren, wäre der Nachweis einer HMGB1-vermittelten Autoantikörperantwort gegen PR3 *in vivo* erforderlich. Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, dass derzeit kein zuverlässiges GPA-Tiermodell verfügbar ist. Das große Hindernis bei der Entwicklung eines PR3-ANCA bzw. GPA-Tiermodells liegt in den Unterschieden von humaner und muriner PR3. Erstens besteht zwischen muriner und humaner PR3 nur 68% Homologie in der Aminosäuresequenz. Zweitens wird die murine PR3 nicht auf der Oberfläche von unstimulierten Neutrophilen exprimiert. Drittens erkennt der humane ANCA die murine PR3 nicht (Little

et al., 2012). Verschiedene Strategien wurden angewendet, um diese Probleme zu umgehen. Die resultierenden Tiermodelle imitieren die Vaskulitispathologie der GPA, nicht jedoch die extravaskuläre Granulomatose im Respirationstrakt. Eine Übersicht über bisher publizierte Tiermodelle zeigt Tabelle 13.

Tabelle 13 Tiermodelle zur PR3-induzierten Vaskulitis

Tiermodell	PR3	Immunantwort	Referenz
PR3/NE Knockout-Mäuse und WT Mäuse	rekombinante murine PR3	Induktion von murinem PR3-ANCA in K.O.-Mäusen; passiver Transfer von murinem PR3-ANCA in WT Mäuse induziert keine klinischen Symptome	(Pfister et al., 2004)
WKY Ratten und C57BL/6J Mäuse	rekombinante chimäre Human/Maus-PR3	Induktion von PR3-spezifischen Antikörpern induziert keine klinische Symptome	(van der Geld et al., 2007)
C57BL/6 oder NOD Mäuse	rekombinante murine PR3 in Insektenzellen + Baculovirus System	Induktion von hohen PR3-ANCA Titern in NOD Mäusen ohne klinische Symptome; passiver Transfer in NOD-SCID Mäuse induziert tödliche Vaskulitis und nekrotisierende Glomerulonephritis	(Primo et al., 2010)
NOD-SCID-IL2R $\gamma^{-/-}$ mit humanisiertem Immunsystem		Humanes anti-PR3 IgG induziert Vaskulitis	(Little et al., 2012)
PR3 humanisierte transgene FVB/N Mäuse (unter Kontrolle eines nieren-spezifischen humanen Promoters)		Injektion von humanen PR3 Antikörpern 6A6 und 4A5 induzieren keine Nierenpathologie	(Relle et al., 2013)

Durch Verwendung z.B. von chimären Maus/Human-PR3 Antigenen für Immunisierungen oder Mäusen mit humanisiertem Immunsystem ist es teilweise gelungen, Symptome einer Vaskulitis in den Mäusen zu erzeugen. Dennoch bestehen noch einige Hürden, z.B. sind die Immunantworten in chimären Modellen mit humanen hämatopoetischen Stammzellen z.T. schwer zu interpretieren und die Experimente sind technisch anspruchsvoll und sehr teuer. Eine andere Gruppe übertrug humane Nasenschleimhautbiopsate mit granulomatöser Entzündung in ein Xenotransplantat-Modell und konnte die Knorpel- und Knochendestruktion nachahmen (Kesel et al., 2012). In keinem der bisherigen Modelle wurde jedoch eine Vaskulitis und eine nekrotisierende granulomatöse Entzündung, also beide charakteristischen Merkmale der GPA, vereint. Dies verdeutlicht, dass die Mechanismen zu den unterschiedlichen klinischen Manifestationen, v.a. der Granulomatose, nach wie vor unverstanden sind. Um ein funktionierendes Tiermodell für die granulomatöse Entzündung zu etablieren, müssen

daher vor allem relevante pathogene Mechanismen im Patienten/humanen System weiter aufgeklärt werden.

5.9. Zusammenhang von HMGB1 Polymorphismen mit GPA Krankheitsparametern

Die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen sind in verschiedenen andern Studien untersucht worden. Dabei wurde jedoch nur eine Assoziation von rs1412125 mit dem Ansprechen der Chemotherapie bei Lungenkrebs gefunden (Wang et al., 2014). Keinem der in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen konnte ein Einfluss auf die klinischen Ausprägungen lokalisierte und generalisierte/systemische GPA bzw. C-ANCA und kein C-ANCA nachgewiesen werden (siehe 3.11.5 SNP-Analyse). Die in dieser Arbeit beobachteten HMGB1-vermittelten Effekte sind vermutlich weniger auf genetische Variationen im *hmgb1* Gen zurückzuführen, als vielmehr auf Beeinflussung von HMGB1 durch zelluläre Ereignisse wie Zelltod oder post-translationale Modifizierungen durch Signale im Gewebe.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Alarmin HMGB1 ein relevanter Faktor in der Granulompathogenese bei der GPA ist. Es wurden dabei HMGB1-abhängige, zelluläre Vorgänge aufgedeckt, obgleich genetische Variationen im *hmgb1*-Gen in keinem Zusammenhang mit klinischen Parametern standen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erweitern das Verständnis zur Pathogenese der GPA, indem sie HMGB1 im Hinblick auf unterschiedliche Modifikationen als diagnostisches und durch seine zellulär vermittelten Prozesse als therapeutisches Ziel in den Fokus rücken.

In Übereinstimmung mit der Gefahren-Theorie von Matzinger (siehe 2.2 Erweiterte Theorien zur (Auto)Immunantwort) lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ein Modell zur möglichen Rolle von HMGB1 bei der GPA aufstellen (siehe Abb. 25). Makrophagen um Mikroabszesse und nekrotische Bereiche in der granulomatösen Entzündung exprimieren zytoplasmatisch HMGB1 und seinen Rezeptor RAGE. Nekrotisch freigesetztes HMGB1 könnte als potentes Alarmin zu einer Rezeptor-abhängigen (RAGE), sich selbst amplifizierenden Entzündungsreaktion bei der GPA beitragen (Abb. 25, A). Zusätzlich könnte die vermehrte HMGB1-Freisetzung in der granulomatösen Entzündung zur Aktivierung von DC führen (Yang et al., 2007). Darüber hinaus zeigten die Daten erstmals eine Bindung und Kollokalisierung des Autoantigens PR3 mit HMGB1 in bzw. auf PMN. So könnten apoptotische PMN mit PR3/HMGB1 auf der Oberfläche aufgrund beeinträchtigter Efferozytose (Gabillet et al., 2012; Liu et al., 2008) akkumulieren. Nicht beseitigte apoptotische PMN könnten über sekundären nekrotischen Zelltod Selbstantigene (hier PR3) verfügbar machen und/oder über Aufnahme durch APC (z.B. DC) die Entstehung einer Autoimmunreaktion unterstützen. Wir postulieren, dass HMGB1 in Assoziation mit dem Autoantigen PR3 als endogenes Adjuvans zur Toleranzdurchbrechung in der granulomatösen Entzündung beiträgt (Abb. 25, B).

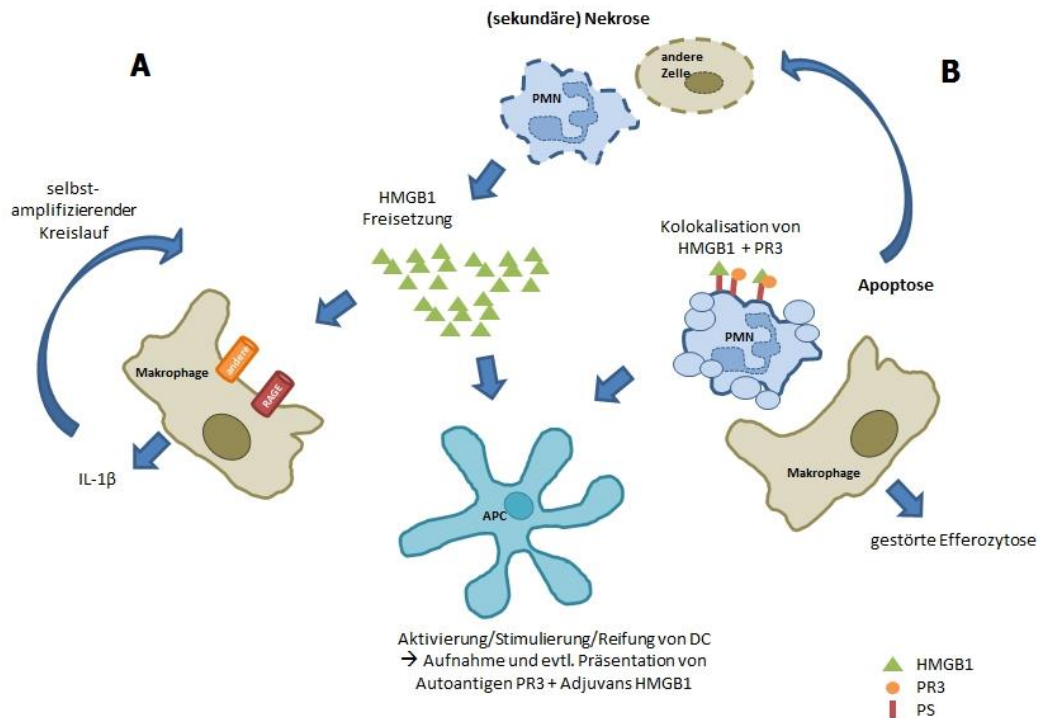


Abb. 25 Hypothese zur Rolle von HMGB1 in der granulomatösen Entzündung bei der GPA

HMGB1 wirkt als pro-inflammatorischer Mediator (A) und als Adjuvans (B) in der GPA. Makrophagen um Mikroabszesse und nekrotische Bereiche in der granulomatösen Entzündung exprimieren zytoplasmatisch HMGB1 und den Rezeptor RAGE. Nekrotisch freigesetztes HMGB1 könnte als potentes Alarmin zu einer Rezeptor-abhängigen (RAGE und andere), sich selbst amplifizierenden Entzündungsreaktion bei der GPA beitragen (A). In neutrophilenreichen Mikroabszessen exprimieren apoptotische PMN PR3 und HMGB1 auf der Oberfläche und können aufgrund beeinträchtigter Efferozytose akkumulieren. Nicht beseitigte apoptotische PMN könnten über sekundären nekrotischen Zelltod Selbstantigene (hier PR3) verfügbar machen. Die vermehrte HMGB1-Freisetzung in der granulomatösen Entzündung kann APC wie z.B. DC aktivieren. Die Aufnahme des Adjuvans HMGB1 in Assoziation mit PR3 durch APC bildet die Voraussetzungen für eine Autoimmunreaktion, bei der es womöglich zur Toleranzdurchbrechung gegen PR3 kommen könnte.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit können die aufgestellten Arbeitshypothesen (siehe 2.5 Fragestellung) in folgendem Umfang beantwortet werden:

1. Ja, das endogene Gefahrenmolekül HMGB1 wird in der granulomatösen Entzündung freigesetzt und trägt in Anlehnung an Matzingers Gefahren-Modell zur chronischen Entzündung bei der GPA bei.
2. Ja, HMGB1 kann als endogenes Adjuvans für PR3 agieren und somit zur Toleranzdurchbrechung in der granulomatösen Entzündung bei der GPA beitragen.

Um die aufgestellten Hypothesen zu validieren, könnte in einem Mausmodell wie z.B. dem zur Gewebeerstörung von Kesel et al., 2012 die Wirksamkeit von HMGB1-Inhibitoren getestet werden. Des Weiteren könnte in Anlehnung an Csernok et al., 2006 der Einfluss von HMGB1 zusammen mit PR3/apoptotischen PMN auf die Reifung von DC als Aktivierung einer (Auto)Immunantwort untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Andersson, U., and Tracey, K.J. (2011). HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 139–162.
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.-C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., et al. (2000). High Mobility Group 1 Protein (Hmg-1) Stimulates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes. *J. Exp. Med.* *192*, 565–570.
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* *47*, 22–31.
- Banerjee, S., Friggeri, A., Liu, G., and Abraham, E. (2010). The C-terminal acidic tail is responsible for the inhibitory effects of HMGB1 on efferocytosis. *J. Leukoc. Biol.* *88*, 973–979.
- Banerjee, S., de Freitas, A., Friggeri, A., Zmijewski, J.W., Liu, G., and Abraham, E. (2011). Intracellular HMGB1 negatively regulates efferocytosis. *J. Immunol.* *187*, 4686–4694.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 1–5.
- Bianchi, M.E. (2009). HMGB1 loves company. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 573–576.
- Bianchi, M.E., and Manfredi, A. a (2007). High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* *220*, 35–46.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* *22*, 5551–5560.
- Bretscher, P., and Cohn, M. (1970). A theory of self-nonself discrimination. *Science* *169*, 1042–1049.
- Burnet, M. (1959). *The clonal selection theory of acquired immunity*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Calogero, S., Grassi, F., Aguzzi, A., Voigtländer, T., Ferrier, P., Ferrari, S., and Bianchi, M.E. (1999). The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat. Genet.* *22*, 276–280.
- Campana, L., Bosurgi, L., Bianchi, M.E., Manfredi, A. a, and Rovere-Querini, P. (2009). Requirement of HMGB1 for stromal cell-derived factor-1/CXCL12-dependent migration of macrophages and dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 609–615.
- Chan, J., and Roth, J. (2012). Alarmins: awaiting a clinical response. *J. Clin. Invest.* *122*, 2711–2719.
- Churchill, M.E.A., Klass, J., and Zoetewey, D.L. (2011). Structural Analysis of HMGB1-DNA Complexes Reveal Influence of Intercalation on Sequence Selectivity and DNA Bending. *J. Mol. Biol.* *403*, 88–102.

- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* *5*, 1219–1226.
- Csernok, E., Ai, M., Gross, W.L., Wicklein, D., Petersen, A., Lindner, B., Lamprecht, P., Holle, J.U., and Hellmich, B. (2006). Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* *107*, 4440–4448.
- Dumitriu, I.E., Baruah, P., Bianchi, M.E., Manfredi, A. a, and Rovere-Querini, P. (2005a). Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *35*, 2184–2190.
- Dumitriu, I.E.I.E., Baruah, P., Valentinis, B., Voll, R.E.R.E., Herrmann, M., Nawroth, P.P.P., Bianchi, M.E.M.E., Manfredi, A.A.A., Arnold, B., and Rovere-Querini, P. (2005b). Release of High Mobility Group Box 1 by Dendritic Cells Controls T Cell Activation via the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J. Immunol.* *174*, 7506.
- Ek, M., Popovic, K., Harris, H.E., Nauc ler, C.S., and Wahren-Herlenius, M. (2006). Increased extracellular levels of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in minor salivary glands of patients with Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum.* *54*, 2289–2294.
- Fienberg, R. (1989). A morphologic and immunohistologic study of the evolution of the necrotizing palisading granuloma of pathergic (Wegener’s) granulomatosis. *Semin Respir Med* *10*, 126–132.
- Gabillet, J., Millet, A., Pederzoli-Ribeil, M., Tacnet-Delorme, P., Guillevin, L., Mouthon, L., Frchet, P., and Witko-Sarsat, V. (2012). Proteinase 3, the Autoantigen in Granulomatosis with Polyangiitis, Associates with Calreticulin on Apoptotic Neutrophils, Impairs Macrophage Phagocytosis, and Promotes Inflammation. *J. Immunol.*
- Gardella, S., Andrei, C., Ferrera, D., and Lotti, L. (2002). The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* *3*, 995–1001.
- Van der Geld, Y.M., Hellmark, T., Selga, D., Heeringa, P., Huitema, M.G., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (2007). Rats and mice immunised with chimeric human/mouse proteinase 3 produce autoantibodies to mouse Pr3 and rat granulocytes. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 1679–1682.
- Gibb, D.R., Saleem, S.J., Chaimowitz, N.S., Mathews, J., and Conrad, D.H. (2011). The emergence of ADAM10 as a regulator of lymphocyte development and autoimmunity. *Mol. Immunol.* *48*, 1319–1327.
- Grahames, C.B., Michel, A.D., Chessell, I.P., and Humphrey, P.P. (1999). Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1beta release in human monocytes. *Br. J. Pharmacol.* *127*, 1915–1921.
- Hardman, C.H., Broadhurst, R.W., Raine, A.R., Grasser, K.D., Thomas, J.O., and Laue, E.D. (1995). Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* *34*, 16596–16607.

- Harris, H.E., Andersson, U., and Pisetsky, D.S. (2012). HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* *8*, 195–202.
- Hellmich, B., Flossmann, O., Gross, W.L., Bacon, P., Cohen-Tervaert, J.W., Guillevin, L., Jayne, D., Mahr, A., Merkel, P. a, Raspe, H., et al. (2007). EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* *66*, 605–617.
- Henes, F.O., Chen, Y., Bley, T. a, Fabel, M., Both, M., Herrmann, K., Csernok, E., Gross, W.L., and Moosig, F. (2011). Correlation of serum level of high mobility group box 1 with the burden of granulomatous inflammation in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 1926–1929.
- Hurtado, P.R., Jeffs, L., Nitschke, J., Patel, M., Sarvestani, G., Cassidy, J., Hissaria, P., Gillis, D., and Peh, C.A. (2008). CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis. *BMC Immunol.* *9*, 34.
- Ito, I., Fukazawa, J., and Yoshida, M. (2007). Post-translational Methylation of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Causes Its Cytoplasmic Localization in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* *282*, 16336–16344.
- Ivanov, S., Dragoi, A.-M., Wang, X., Dallacosta, C., Louten, J., Musco, G., Sitia, G., Yap, G.S., Wan, Y., Biron, C.A., et al. (2007). A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* *110*, 1970–1981.
- Janeway, C.A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54 Pt 1*, 1–13.
- Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2014). Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 463–473.
- Jennette, J.C., Falk, R.J., Bacon, P. a, Basu, N., Cid, M.C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L.F., Gross, W.L., Guillevin, L., Hagen, E.C., et al. (2013). 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* *65*, 1–11.
- Kesel, N., Köhler, D., Herich, L., Laudien, M., Holl-Ulrich, K., Jüngel, A., Neidhart, M., Gay, S., Gay, R.E., Csernok, E., et al. (2012). 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.
- Kornblit, B., Munthe-Fog, L., Madsen, H.O., Strøm, J., Vindeløv, L., and Garred, P. (2008). Association of HMGB1 polymorphisms with outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care* *12*, R83.
- Lafferty, K.J., and Cunningham, A.J. (1975). A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* *53*, 27–42.
- Lamprecht, P., Holle, J., and Gross, W.L. (2009). Update on clinical, pathophysiological and therapeutic aspects in ANCA-associated vasculitides. *Curr. Drug Discov. Technol.* *6*, 241–251.
- Lee, S.A., Kwak, M.S., Kim, S., and Shin, J.S. (2014). The role of high mobility group box 1 in innate immunity. *Yonsei Med. J.* *55*, 1165–1176.

- Li, G., Liang, X., and Lotze, M.T. (2013). HMGB1: The Central Cytokine for All Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* *4*, 68.
- Li, J., Kokkola, R., Tabibzadeh, S., Yang, R., Ochani, M., Qiang, X., Harris, H.E., Czura, C.J., Wang, H., Ulloa, L., et al. (2003). Structural Basis for the Proinflammatory Cytokine Activity of High Mobility Group Box 1. *Mol. Med.* *9*, 37–45.
- Little, M.A., Al-Ani, B., Ren, S., Al-Nuaimi, H., Leite, M., Alpers, C.E., Savage, C.O., and Duffield, J.S. (2012). Anti-proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies recapitulate systemic vasculitis in mice with a humanized immune system. *PLoS One* *7*, e28626.
- Liu, G., Wang, J., Park, Y., Tsuruta, Y., Lorne, E.F., Zhao, X., and Abraham, E. (2008). High Mobility Group Protein-1 Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils through Binding to Phosphatidylserine. *J. Immunol.* *181*, 4240–4246.
- Liu, R., Mori, S., Wake, H., Zhang, J., Liu, K., Izushi, Y., Takahashi, H.K., Peng, B., and Nishibori, M. (2009). Establishment of in vitro binding assay of high mobility group box-1 and S100A12 to receptor for advanced glycation endproducts: heparin's effect on binding. *Acta Med. Okayama* *63*, 203–211.
- Lyons, P. a, Rayner, T.F., Trivedi, S., Holle, J.U., Watts, R. a, Jayne, D.R.W., Baslund, B., Brenchley, P., Bruchfeld, A., Chaudhry, A.N., et al. (2012). Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N. Engl. J. Med.* *367*, 214–223.
- Maillard-Lefebvre, H., Boulanger, E., Daroux, M., Gaxatte, C., Hudson, B.I., and Lambert, M. (2009). Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. *48*, 1190–1196.
- Manfredi, A.A., Capobianco, A., Esposito, A., Cobelli, F. De, Canu, T., Monno, A., Raucci, A., Sanvito, F., Doglioni, C., Peter, P., et al. (2008). Maturing Dendritic Cells Depend on RAGE for In Vivo Homing to Lymph Nodes. *J. Immunol.* *180*, 2270–2275.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991–1045.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301–305.
- Mueller, A., Holl-Ulrich, K., and Gross, W.L. (2013). Granuloma in ANCA-Associated Vasculitides: Another Reason to Distinguish Between Syndromes? *Curr. Rheumatol. Rep.* *15*, 376.
- Musumeci, D., Roviello, G.N., and Montesarchio, D. (2014). An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies. *Pharmacol. Ther.* *141*, 347–357.
- Noronha, I.L., Krüger, C., Andrassy, K., Ritz, E., and Waldherr, R. (1993). In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. *Kidney Int.* *43*, 682–692.
- Pederzoli, M., Kantari, C., Gausson-Dorey, V., Moriceau, S., and Witko-Sarsat, V. (2005). Proteinase-3 induces procaspase-3 activation in the absence of apoptosis: potential role of this compartmentalized activation of membrane-associated procaspase-3. *J. Immunol.* 6381–6390.

- Pfaffl, M.W., Physiologie, L., and Weihenstephan, W. (2004). Real-time RT-PCR : Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* *1/04*, 92–95.
- Pfister, H., Ollert, M., Fröhlich, L.F., Quintanilla-Martinez, L., Colby, T. V, Specks, U., and Jenne, D.E. (2004). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* *104*, 1411–1418.
- Prasad, K. (2014). Low Levels of Serum Soluble Receptors for Advanced Glycation End Products, Biomarkers for Disease State: Myth or Reality. *Int. J. Angiol.* *23*, 11–16.
- Primo, V.C., Marusic, S., Franklin, C.C., Goldmann, W.H., Achaval, C.G., Smith, R.N., Arnaout, M. a, and Nikolic, B. (2010). Anti-PR3 immune responses induce segmental and necrotizing glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* *159*, 327–337.
- Ramasamy, R., Yan, S.F., and Schmidt, A.M. (2009). RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response--the evidence mounts. *J. Leukoc. Biol.* *86*, 505–512.
- Rauci, A., Cugusi, S., Antonelli, A., Barabino, S.M., Monti, L., Bierhaus, A., Reiss, K., Saftig, P., and Bianchi, M.E. (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* *22*, 3716–3727.
- Reinhold-Keller, E., Herlyn, K., Wagner-Bastmeyer, R., and Gross, W.L. (2005). Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from the German vasculitis register. *Arthritis Rheum.* *53*, 93–99.
- Relle, M., Cash, H., Schommers, N., Reifenberg, K., Galle, P.R., and Schwarting, A. (2013). PR3 antibodies do not induce renal pathology in a novel PR3-humanized mouse model for Wegener's granulomatosis. *Rheumatol. Int.* *33*, 613–622.
- Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentini, B., Catalanotti, F., Giazson, M., Dumitriu, I.E., Müller, S., Iannaccone, M., Traversari, C., et al. (2004). HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* *5*, 825–830.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* *418*, 191–195.
- Schaper, F., Heeringa, P., Bijl, M., and Westra, J. (2013). Inhibition of high-mobility group box 1 as therapeutic option in autoimmune disease: lessons from animal models. *Curr. Opin. Rheumatol.* *25*, 254–259.
- Schmidt, A.M., Yan, S.D., Yan, S.F., and Stern, D.M. (2001). The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* *108*, 949–955.
- Schönermarck, U., Gross, W.L., and de Groot, K. (2014). Treatment of ANCA-associated vasculitis. *Nat. Rev. Nephrol.* *10*, 25–36.
- Schreiber, A., Busjahn, A., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2003). Membrane Expression of Proteinase 3 Is Genetically Determined. *J. Am. Soc. Nephrol.* *14*, 68–75.
- Sha, Y., Zmijewski, J., Xu, Z., and Abraham, E. (2008). HMGB1 Develops Enhanced Proinflammatory Activity by Binding to Cytokines. *J. Immunol.* *180*, 2531–2537.

- Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R., and Coyle, A.J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 367–388.
- De Souza, A., Westra, J., Bijzet, J., Limburg, P.C., Stegeman, C.A., Bijl, M., and Kallenberg, C.G.M. (2013). Is serum HMGB1 a biomarker in ANCA-associated vasculitis? *Arthritis Res. Ther.* *15*, R104.
- Stott, K., Tang, G.S.F., Lee, K.-B., and Thomas, J.O. (2006). Structure of a complex of tandem HMG boxes and DNA. *J. Mol. Biol.* *360*, 90–104.
- Stros, M. (2010). HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* *1799*, 101–113.
- Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Cheh, C.-W., Farkas, A., Loughran, P., Hoppe, G., Bianchi, M.E., Tracey, K.J., Zeh, H.J., et al. (2010). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.* *190*, 881–892.
- Tian, J., Avalos, A.M., Mao, S.-Y., Chen, B., Senthil, K., Wu, H., Parroche, P., Drabic, S., Golenbock, D., Sirois, C., et al. (2007). Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.* *8*, 487–496.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* *26*, 171–176.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T., and Tada, K. (1982). Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* *42*, 1530–1536.
- Tveita, A. a (2010). The danger model in deciphering autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)*. *49*, 632–639.
- Uchida, T., Nagai, K., Sato, T., Iizuka, N., Arito, M., Takakuwa, Y., Nakano, H., Ooka, S., Kurokawa, M.S., Suematsu, N., et al. (2013). Comparative proteomic analysis of neutrophils from patients with microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis. *J. Proteomics* *91*, 259–269.
- Ulfgren, A.-K., Grundtman, C., Borg, K., Alexanderson, H., Andersson, U., Harris, H.E., and Lundberg, I.E. (2004). Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids. *Arthritis Rheum.* *50*, 1586–1594.
- Urbonaviciute, V., and Voll, R.E. (2011). High-mobility group box 1 represents a potential marker of disease activity and novel therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *J. Intern. Med.* *270*, 309–318.
- Urbonaviciute, V., Fürnrohr, B.G., Weber, C., Haslbeck, M., Wilhelm, S., Herrmann, M., and Voll, R.E. (2007). Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 67–74.
- Urbonaviciute, V., Fürnrohr, B.G., Meister, S., Munoz, L., Heyder, P., De Marchis, F., Bianchi, M.E., Kirschning, C., Wagner, H., Manfredi, A. a, et al. (2008). Induction of inflammatory and

immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J. Exp. Med.* *205*, 3007–3018.

Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D.J., Cattaneo, A., De Marchis, F., Liu, J., Antonelli, A., Preti, A., Raeli, L., et al. (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J. Exp. Med.* *209*, 1519–1528.

Voswinkel, J., Müller, A., and Lamprecht, P. (2005). Is PR3-ANCA formation initiated in Wegener's granulomatosis lesions? Granulomas as potential lymphoid tissue maintaining autoantibody production. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1051*, 12–19.

Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., et al. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* *285*, 248–251.

Wang, H., Yang, H., and Tracey, K.J. (2004). Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J. Intern. Med.* *255*, 320–331.

Wang, J., Tochio, N., Takeuchi, A., Uewaki, J.-I., Kobayashi, N., and Tate, S.-I. (2013). Redox-sensitive structural change in the A-domain of HMGB1 and its implication for the binding to cisplatin modified DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *441*, 701–706.

Wang, Y., Li, X.-P., Yin, J.-Y., Zhang, Y., He, H., Qian, C.-Y., Chen, J., Zheng, Y., Smieszkol, K., Fu, Y.-L., et al. (2014). Association of HMGB1 and HMGB2 genetic polymorphisms with lung cancer chemotherapy response. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *41*, 408–415.

Wen, Z., Xu, L., Chen, X., Xu, W., Yin, Z., Gao, X., and Xiong, S. (2013). Autoantibody induction by DNA-containing immune complexes requires HMGB1 with the TLR2/microRNA-155 pathway. *J. Immunol.* *190*, 5411–5422.

Wibisono, D., Csernok, E., Lamprecht, P., Holle, J.U., Gross, W.L., and Moosig, F. (2010). Serum HMGB1 levels are increased in active Wegener's granulomatosis and differentiate between active forms of ANCA-associated vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 1888–1889.

Yang, D., Chen, Q., Yang, H., Tracey, K.J., Bustin, M., and Oppenheim, J.J. (2007). High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 59–66.

Yang, H., Ochani, M., and Li, J. (2004). Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 296–301.

Yang, H., Lundbäck, P., Ottosson, L., Erlandsson-Harris, H., Venereau, E., Bianchi, M.E., Al-Abed, Y., Andersson, U., Tracey, K.J., and Antoine, D.J. (2011). Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of HMGB1. *Mol. Med. Cambridge Mass* *18*, 250–259.

Youn, J.H., and Shin, J.-S. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J. Immunol.* *177*, 7889–7897.

Youn, J.H., Kwak, M.S., Wu, J., Kim, E.S., Ji, Y., Min, H.J., Yoo, J.-H., Choi, J.E., Cho, H.-S., and Shin, J.-S. (2011). Identification of lipopolysaccharide-binding peptide regions within HMGB1 and their effects on subclinical endotoxemia in a mouse model. *Eur. J. Immunol.* *41*, 2753–2762.

Zhang, L., Bukulin, M., Kojro, E., Roth, A., Metz, V. V, Fahrenholz, F., Nawroth, P.P., Bierhaus, A., and Postina, R. (2008). Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* *283*, 35507–35516.

Zhang, S., Zhong, J., Yang, P., Gong, F., and Wang, C.-Y. (2009). HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *3*, 24–38.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitiden
ADAM10	engl. a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ANCA	Anti-Neutrophile zytoplasmatische Autoantikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zellen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderalbumin (engl. bovine serum albumin)
CD	engl. cluster of differentiation
cDNA	engl. complementary DNA
Cp	engl. crossing point
CpG-ODN	CpG-Oligonukleotide
CRS	Chronische Rhinosinusitis
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAMP	engl. damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
df	engl. degree of freedom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGPA	Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
EULAR	European League Against Rheumatism
FCS	Fötale Kälberserum
FFPE	engl. formalin-fixed paraffin-embedded
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
h	Stunde
HMGB1	engl. high-mobility group box 1
HRPO	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
l	Liter
kD	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MEF	embryonale Mäusefibroblasten
min	Minute
ml	Milliliter
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
mRNA	Boten-RNA
NET	engl. Neutrophil Extracellular Traps
NLS	Kernlokalisierungssequenzen
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	engl. pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatpuffer (engl. phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Picogramm
pI	Isoelektrischer Punkt
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
pmol	Picomol
PR3	Proteinase 3
PRR	engl. pattern recognition receptors
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
RAGE	engl. receptor of advanced glycation end products
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SLE	Systemischer Lupus Erythemathodes
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
sRAGE	engl. soluble RAGE
T1D	Typ-1 Diabetes mellitus
TBE	Tris-Borat EDTA
TBS	Trispuffer (engl. Tris buffered saline)
TLR	Toll-Like Rezeptoren
x g	x-fache Erdbeschleunigung

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Therapiestrategien zur Einleitung und Erhaltung einer Remission bei AAV	12
Abb. 2 Mögliche pathogenetische Prozesse der ANCA-vermittelten Vaskulitis	13
Abb. 3 Mögliche pathogenetische Prozesse der ANCA-vermittelten nekrotisierenden Granulomatose	14
Abb. 4 Unterteilung der Antigene und Immunantworten nach den drei immunologischen Modellen SNS, INS und Gefahr-Theorie.	16
Abb. 5 NMR Strukturen von HMGB1	19
Abb. 6 Primärstruktur, Funktionen und Modifikationen von HMGB1	20
Abb. 7 Extrazelluläre Freisetzung von HMGB1	21
Abb. 8 Biologische Aktivität von freigesetztem HMGB1	23
Abb. 9 HMGB1 Rezeptoren und Signalkaskaden	24
Abb. 10 Therapeutische Ansätze zur Inhibierung von HMGB1-abhängigen Mechanismen	28
Abb. 11 Lokalisation von HMGB1 in Zellen des Nasenschleimhautgewebes	57
Abb. 12 Verteilung der HMGB1-Expression im Nasenschleimhautgewebe.....	58
Abb. 13 Verteilung der CD68-Expression im Nasenschleimhautgewebe.....	60
Abb. 14 Expressionsmuster von HMGB1 in der 2D-PAGE	61
Abb. 15 Verteilung der RAGE-Expression im Nasenschleimhautgewebe	63
Abb. 16 sRAGE im Serum von inaktiven und aktiven GPA-Patienten	64
Abb. 17 sRAGE-Spiegel im Serum von aktiven GPA-Patienten im Vergleich zu Gesunden Kontrollen und Typ 1 Diabetes mellitus (T1D) als Krankheitskontrolle	65
Abb. 18 sRAGE-Spiegel im Serum von aktiven GPA-Patienten in Korrelation mit dem BVAS .	66
Abb. 19 <i>rage</i> mRNA in PBMC	66
Abb. 20 <i>adam10</i> mRNA in PBMC.....	67
Abb. 21 HMGB1-abhängige IL-1 β -Freisetzung in differenzierten THP-1 Zellen	68
Abb. 22 Interaktion von HMGB1 und PR3 in PMN-Lysaten	69
Abb. 23 Kolokalisation von HMGB1 und PR3 in Nasenschleimhautgewebe.....	70
Abb. 24 Expression von HMGB1 und PR3 in apoptotischen PMN	71
Abb. 25 Hypothese zur Rolle von HMGB1 in der granulomatösen Entzündung bei der GPA..	84

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Definition von Untergruppen der GPA (Hellmich et al., 2007)	11
Tabelle 2 Hypothesen und mögliche Mechanismen zur gestörten Immunregulation bei der GPA	15
Tabelle 3 Vorhersage der Immunantworten (ja/nein) für die drei immunologischen Modellen SNS, INS und Gefahr-Theorie in Abhängigkeit des Antigens nach Matzinger, 2002	17
Tabelle 4 HMGB1 Bindungspartner und Rezeptoren	24
Tabelle 5 Effekt von extrazellulärem HMGB1 auf verschiedene Zelltypen des Immunsystems	26
Tabelle 6 Einsatz von HMGB1-Inhibitoren in experimentellen Modellen.....	29
Tabelle 7 Übersicht der verwendeten Nasenschleimhautgewebe von GPA-Patienten.....	44
Tabelle 8 Primer für qPCR	49
Tabelle 9 Charakterisierung der GPA-Patienten	51
Tabelle 10 Untersuchte Einzelnukleotid-Polymorphismen von HMGB1.....	52
Tabelle 11 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) und Unterschied der Genotypenfrequenz zwischen der GPA- und der Referenzpopulation (p).....	72
Tabelle 12 Genotypenverteilung der Vergleichsgruppen GPA mit C-ANCA und ohne C-ANCA bzw. lokalisierter und generalisierter/systemischer GPA (χ^2 -Test)	73
Tabelle 13 Tiermodelle zur PR3-induzierten Vaskulitis.....	81

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei all denen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Lamprecht für das Überlassen des Dissertationsthemas, für das mir entgegengebrachte Vertrauen und Unterstützung in den letzten dreieinhalb Jahren und natürlich für die Möglichkeit, das Thema in Zukunft weiter zu bearbeiten.

Ein besonders herzlicher Dank gilt der Laborleiterin Dr. Antje Müller, die mich während der Zeit im Labor durch eine sehr enge, persönliche Betreuung begleitet hat und auch über das Berufliche hinaus immer ein offenes Ohr hatte, was ich sehr zu schätzen wusste.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Kooperationspartnern Dr. Konstanze Holl-Ulrich, Dr. Timo Gemoll, Dr. Véronique Witko-Sarsat und Arnaud Millet für die gute Zusammenarbeit und interessanten Diskussionen.

Ich bedanke mich außerdem bei allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1727, insbesondere Prof. Dr. Ralf Ludwig für die Unterstützung.

Und natürlich bedanke ich mich bei meinem Verlobten, meiner Familie und meinen Freunden, die immer großes Vertrauen in mich hatten und mir in allen Lebenslagen zur Seite standen und ohne die ich nie so weit gekommen wäre.