Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie

(Prof. Dr. med. G. A. Müller)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Expression von Lymphotaktin (XCL1) bei der Wegener'schen Granulomatose

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Philip Brandt

aus

Verden/Aller

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I.	Berichterstatterin:	Prof. Dr. med. S. Blaschke
II.	Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
III.	Berichterstatter:	Prof. D. med., Dr. rer. nat. T. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 18. April 2012

Inhalt

1 Einleitung ... 1
1.1 Wegener'sche Granulomatose ... 1
1.1.1 Überblick ... 1
1.1.2 Klink und Verlauf ... 2
1.1.3 Therapie ... 3
1.1.4 Pathogenese ... 5
1.2 Rapid Progressive Glomerulonephritis (RPGN) ... 8
1.2.1 Überblick ... 8
1.2.2 Glomerulonephritis bei Wegener'scher Granulomatose ... 9
1.3 Bedeutung von T-Lymphozyten bei Wegener`scher Granulomatose ... 10
1.3.1 T-Zellen bei rapid progressiver Glomerulonephritis ... 10
1.3.2 CD28 ... 11
1.3.3 T-Zell-Aktivierungsmarker ... 12
1.4 Chemokine ... 14
1.4.1 Klassifikation/Struktur ... 14
1.4.2 Funktion ... 14
1.4.3 Genlokus ... 15
1.4.4 Lymphotaktin (XCL1) ... 15
1.4.5 Interleukin 8 (IL-8, CXCL-8) ... 18
1.5 Fragestellung ... 20
2 Materialien und Methoden ... 22
2.1 Material ... 22
2.1.1 Patienten und Probematerialien ... 22
2.1.2 ELISA ... 25
2.1.3 Durchflusszytometrie ... 27
2.1.4 Immunhistochemie ... 29
2.1.5 Stimulation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten mit rekombinantem XCL1 ... 32
2.2 Methoden ... 33
2.2.1 ELISA ... 33
2.2.2 Durchflusszytometrie ... 35
2.2.3 Immunhistochemie ... 38
2.2.4 Stimulation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PNG) mit rekombinantem XCL1 ... 42

2.2.5 Statistische Analyse 43
3 Ergebnisse 44
3.1 Analyse der Serum-XCL1-Spiegel von WG-Patienten und gesunden Kontrollen 44
3.2 Immunphänotypisierung von $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Lymphozyten in WG- Patienten und Kontrollen 46
3.3 Vergleich der Expression von XCL1 in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes von WG-Patienten und gesunden Kontrollen 47
3.4 Expression von XCL1 in Biopsien des Nierengewebes von WG-Patienten 50
3.5 Vermehrte Expression von IL-8 in XCL1-stimulierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNG) 54
4 Diskussion 56
4.1 Analyse der XCL1-Serumkonzentrationen 56
4.2 Durchflusszytometrische Analyse der PBMC 56
4.3 Analyse der Expression von XCL1 in Nierenbiopsien 57
4.4 Analyse der funktionellen Bedeutung von XCL1 bei WG 59
5 Zusammenfassung 61
6 Literaturverzeichnis 63

Verzeichnis der Abkürzungen

AAT	α-1-Antitrypsin
AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitiden
ACR	Amerikanische Gesellschaft für Rheumatologie
Ak	Antikörper
ANCA	Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
ATAC	activation-induced, T-cell-derived, and chemokine related molecule, entspricht XCL1
AZA	Azathioprin
cANCA	zytoplasmatische Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
BVAS	Birmingham-Vaskulitis-Aktivitäts-Score
CD	Cluster of Differentiation
CHC	Chapel Hill Consensus Conference
CRP	C-reaktives Protein
CXCL8	Interleukin-8
CXCR1	Interleukin-8 Rezeptor 1
CXCR2	Interleukin-8 Rezeptor 2
CYC	Cyclophosphamid
DAPI	4',6‘-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMARD	disease modifying antirheumatic drug, Basistherapeutikum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assey
EUVAS	European Vasculitis study group
FK-506	Tacrolimus
FSC	Forward Angle Light Scatter, Vorwärtslichtstreuung

GBM	glomeruläre Basalmembran
GC	Glucocorticoide
GN	Glomerulonephritis
HLA	humanes Leukozytenantigen
HNO	Hals Nase Ohren
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IL-8	Interleukin-8
IL-8R	Interleukin-8 Rezeptor
IL-12	Interleukin-12
IMDM	Isocove's modifiziertes Dulbecco's Medium
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
LPTN	Lymphotaktin, entspricht XCL1
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MDNCF	monocyte-derived neutrophile chemotactic factor, entspricht IL-8
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibiltätskomplex
MONAP	monocyte-derived neutrophil activating peptide, entspricht IL-8
MTX	Methotrexat
NAF	neutrophil activating factor, entspricht IL-8
NIH	National Institutes of Health
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTS	nephrotoxisches Serum

OPD	ortho-Phenylendiamin
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMA	Phorbol-12-acetat-13-myristat
PNG	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PR-3	Proteinase-3
RA	Rheumatoide Arthritis
RANTES	Regulated On Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RPGN	rapid progressive Glomerulonephritis
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion
SSC	Side Angle Light Scatter, Seitlichtstreuung
SCM-1	single-C-motif-1, entspricht XCL1
TBS	TRIS buffered saline, TRIS-gepufferte Salzlösung
T_H1	T-Helferzellen Typ 1
T_H2	T-Helferzellen Typ 2
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TCR	T-Cell Receptor, T-Zell-Rezeptor
WG	Wegener’sche Granulomatose
WKY	Wistar-Kyoto
XCL1	Lymphotaktin
XCR	Lymphotaktinrezeptor

1 Einleitung

1.1 Wegener'sche Granulomatose

1.1.1 Überblick

Die Wegener'sche Granulomatose (WG) ist eine seltene Autoimmunerkrankung mit einer geschlechtsindifferenten Inzidenz von 2-12/1000000/Jahr und einer Prävalenz von 24-157/1000000/Jahr (Pagnoux und Teixeira 2007). Die Patienten befinden sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Prädilektionsalter) meist im Alter zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr.

Nach der Klassifikation der Chapel-Hill-Konsensuskonferenz (CHC) gehört sie zu den ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) der kleinen Gefäße (Jennette und Falk 1994).

Tabelle 1: Klassifikation der primär systemischen Vaskulitiden laut CHC

Vaskulitis der großen Gefäße	Vaskulitis der mittleren Gefäße	Vaskulitis der kleinen Gefäße (Kapillaren, Venolen, Arteriolen)
•Riesenzellarteriitis •Takayasu-Arteriitis	•Polyarteriitis nodosa •Morbus Kawasaki	•ANCA-assoziiert: - **Wegener'sche Granulomatose** - CSS - MPA •Purpura Henoch-Schönlein •Kutane leukozytoklastische Angiitis •Essentielle kryoglobulinämische Vaskulitis

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung vorwiegend im HNO-Bereich (z.B. Otitis media, eitrige/blutige Nasensekretion, Nasenseptumperforation und -destruktion mit resultierender Sattelnase), im Bereich der Lungen (pulmonale Infiltrate, Dyspnoe, Hämoptysen) und besonders der Nieren im Sinne einer Glomerulonephritis, z.T. mit rapid-progressivem Verlauf. Dabei ist die renale Beteiligung unbehandelt häufig eine direkte oder indirekte Ursache der erhöhten Mortalität der Erkrankung.

ACR-Kriterien für die Klassifikation der Wegener 'schen Granulomatose (1990)			
histologisch:	klinisch:	radiologisch:	laborchemisch:
• granulomatöse Entzündung (intramural, peri- oder extravaskulär) aus geeignetem Biopsat	• Entzündung in Nase oder Mund (ulzerierend, hämorrhagisch oder purulent)	• Infiltration der Lunge in der Thorax Röntgenaufnahme (Rundherde, Kavernen, "fixe"Infiltrationen)	• nephritisches Urinsediment (Mikrohämaturie >5 Erythrozyten/Gesichtsfeld, Erythrozytenzylinder)

Tabelle 2: ACR-Kriterien für die WG: bei Erfüllung von zwei Kriterien beträgt die Sensitivität 88%, die Spezifität 92% (nach Manger 2005, S. 269)

Die Diagnose erfolgt klinisch-pathologisch nach den in Tabelle 2 aufgeführten Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) (Leavitt et al. 1990). Ergänzend werden bestimmte für WG typische Autoantikörper, sog. **c**ytoplasmatische **A**nti-**N**eutrophile **c**ytoplasmatische **A**ntikörper (cANCA), die gegen das in den azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten enthaltene körpereigene Enzym Proteinase 3 (PR-3) gerichtet sind, mittels ELISA und Immunfluoreszenz bestimmt. Dieser Parameter ist bei ca. 50% der Patienten mit der lokalisierten Form und bei >90% der Patienten mit generalisierter WG erhöht. Es wurde weiterhin gezeigt, dass im Rahmen von regelmäßigen Messungen festgestellte, steigende cANCA-Spiegel (positiver prädiktiver Wert: 57% (cANCA), 71% (PR-3)) frühzeitig auf ein bevorstehendes Rezidiv hinweisen können (Boomsma et al. 2000). Eine medikamentöse Therapie allein aufgrund steigender Titer einzuleiten, ist allerdings aufgrund der den Therapeutika eigenen Toxizität nicht indiziert.

1.1.2 Klink und Verlauf

Unbehandelt verläuft die WG in der Regel letal. Ein biphasischer Verlauf, bestehend aus einem Initial- und einem Generalisationsstadium, ist typisch. Die beiden Stadien sind jedoch in nur etwa einem Drittel aller Fälle scharf voneinander zu trennen. Fließende Übergänge und eine starke interindividuelle Symptomvarianz sind häufig. Die sog. „Wegener-Trias“ beschreibt die charakteristische Befundkonstellation aus Granulomatose, Vaskulitis der kleinen Gefäße und segmentaler Glomerulonephritis.

Das *Initialstadium (= lokalisiertes Stadium)* ist durch das Auftreten von Symptomen im HNO-Bereich, wie z.B. chronische (auch hämorrhagische) Rhinitis, Sinusitis und/oder Otitis gekennzeichnet. Seltener treten Ulzera in der Mundhöhle, Tränenwegs- oder Trachealstenosen sowie Lungeninfiltrate auf. Etwa 70% der

Patienten weisen bei Krankheitsbeginn eines oder mehrere dieser Symptome auf. Dieses Stadium kann Monate bis Jahre bestehen.

Das *Generalisationsstadium* geht mit zum Teil schwerer Allgemeinsymptomatik (Fieber, Gewichtsverlust) einher. Eine Beteiligung der Lungen (bis zu 85%; pulmonale Infiltrationen oder Rundherde, Hämoptysen) sowie der Nieren (bis zu 77%; Glomerulonephritis, siehe 1.2.2, **S.9**), der Gelenke (bis zu 67% Arthralgien, Arthritiden, nicht selten Destruktionen), der Augen (Konjunktivitis, Uveitis, Episkleritis, Skleritis, retroorbitales Granulom) und der Haut (bis zu 46%; Effloreszenzen wie Granulome, Ulzerationen, Papeln, Bläschen) kommen vor (Hoffman, Kerr et al. 1992). Auch Hypertonie, Perikarditis, Kardiomyopathie und eine ZNS-Beteiligung wurden beobachtet (Manger 2005).

1.1.3 Therapie

Das Standardtherapie-Regime für die Behandlung der WG lässt sich in zwei Phasen unterteilen.

Remissionsinduktion

Zunächst wird mittels Cyclophosphamid (CYC; 1-2mg/kgKG/Tag p.o, oder 750mg/qm Körperoberfläche i.v. als Stoßtherapie alle 4 Wochen), einem Zytostatikum mit immunsuppressiver Wirkung, und Kortikosteroiden (meist Prednison, 1mg/kgKG/Tag p.o.) die *Remission* der aktiven Erkrankung induziert (Fauci et al. 1983). Die Mindest-Therapiedauer beträgt 6-12 Monate. Bei foudroyanten Verläufen kann die Verabreichung der Steroiddosis als intravenöse Pulstherapie (3x1000mg) sowie erhöhte CYC-Dosen (3-4mg/kgKG/Tag) notwendig sein. In schweren Fällen mit rapid progressiver Glomerulonephritis kommt CYC in Kombination mit Plasmapherese zum Einsatz (de Groot und Reinhold-Keller 2009). Im Vergleich von adjunktiver intravenöser Gabe von Methylprednisolon und adjunktiver Plasmapherese bei AAV-Patienten mit schwerer Nierenbeteiligung wurde im Rahmen der MEPEX (*methyl prednisolone or plasma exchange for severe renal vasculitis*)-Studie der EUVAS (European Vasculitis Study group) die Überlegenheit der Plasmapherese in Bezug auf die Verbesserung der Nierenfunktion bewiesen (Jayne et al. 2007).

Refraktäre Verläufe wurden erfolgreich mit Rituximab, einem B-Zell-spezifischen CD20-Antikörper, behandelt. Für die Dauer der Abwesenheit von B-Zellen wurde eine Remission erreicht, Rückfälle konnten erfolgreich erneut mit Rituximab

behandelt werden (Specks et al. 2001; Ferraro et al. 2005; Keogh et al. 2005; Keogh et al. 2006). Diese Funde und die Möglichkeit der Wiederherstellung der B-Zell-Toleranz gegenüber ANCA-Antigenen werden momentan in einer großen randomisierten Studie (RAVE, *rituximab for ANCA-associated vasculitis*, www.immunetolerance.org/RAVE) der *National Institutes of Health* (NIH) untersucht.

Erhaltungstherapie

Ist die Remission erreicht, stehen zu ihrer *Erhaltung* Basistherapeutika wie Methotrexat, Azathioprin, Ciclosporin A und Leflunomid zur Verfügung. Die Wirksamkeit von Mycophenolat Mofetil in der Remissionserhaltung wird nach widersprüchlichen Ergebnissen kleinerer Studien im Rahmen der IMPROVE-Studie (*International Mycophenolate mofetil to Reduce Outbreaks of Vasculitides*) noch weiter untersucht.

Die additive Gabe von Co-trimoxazol (Trimethoprim plus Sulfamethoxazol) kann eine weitere Reduktion der Rezidivraten bewirken. Dies wird auf eine Verminderung der mit WG-Rezidiven assoziierten Infektionen der oberen Atemwege zurückgeführt (Belmont 2006). Auch Patienten in Remission bedürfen (lebenslang) regelmäßiger Kontrolluntersuchungen, um Rezidive frühzeitig zu erkennen und adäquat zu behandeln.

Nebenwirkungen

Die Immunsuppression mit Cyclophosphamid und Kortikosteroiden ist mit Remissionsraten von 70% bis 93% sehr effektiv, kann aber leider zu einer Reihe schwerwiegender Nebenwirkungen bzw. Komplikationen führen (Belmont 2006). Insbesondere die Behandlung mit Cyclophosphamid kann dabei zu einer hämorrhagischen Cystitis (15-45% der Patienten) und einer erhöhten Infektanfälligkeit auf dem Boden einer CYC-induzierten Leukozytopenie mit resultierenden opportunistischen Infektionen (46%) führen. Darüber hinaus erhöht die Behandlung mit CYC das Risiko für das Auftreten von Blasenkarzinomen (Hoffman et al. 1992; Westman et al. 1998).

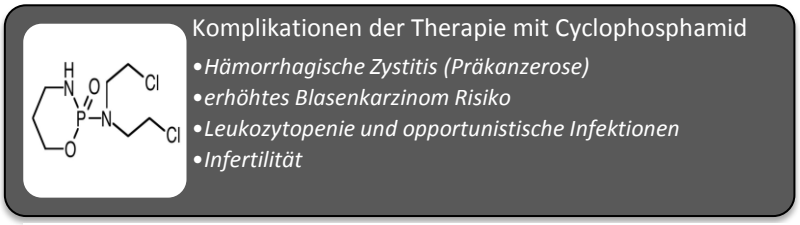


Abbildung 1: Komplikationen der Therapie mit Cyclophosphamid

1.1.4 Pathogenese

Die Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) einschließlich der WG ist bisher ungeklärt. Am wahrscheinlichsten liegt eine multifaktorielle Genese zu Grunde (de Lind van Wijngaarden et al. 2008). Verschiedene Hypothesen wurden postuliert:

1.1.4.1 Autoimmunität/Autoantikörper

ANCA (Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper)

Wie oben bereits beschrieben geht die WG häufig mit dem Auftreten von sogenannten cANCA-Autoantikörpern einher. Für die pathogenetische Bedeutung dieser Autoantikörper sprechen eine Reihe verschiedener Forschungsergebnisse:

ANCA-Autoantikörper sind in der Lage neutrophile Granulozyten durch Bindung an ihren Fc-gamma-Rezeptor zu aktivieren (Porges et al. 1994). Die Granulozyten setzen in der Folge reaktive Sauerstoffspezies und lytische Enzyme wie Elastase und PR3 frei (Falk et al. 1990) und können die Gefäßwand auf diese Weise destruieren. Darüber hinaus legen einige *in-vitro*-Experimente die Vermutung nahe, dass ANCA auch direkt die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel fördern. Dort greifen diese nach Aktivierung die Gefäßwand an und könnten so zu einer nekrotisierenden Vaskulitis führen (Savage et al. 1992).
Eine Arbeitsgruppe um Radford konnte zeigen, dass ANCA die Migration von neutrophilen Granulozyten durch das Endothel fördern (Radford et al. 2001).
ANCA gegen PR-3 scheinen darüber hinaus die Synthese von Interleukin-8 in Endothelzellen zu induzieren (Mayet W et al. 1999), was wiederum zu einer Anhäufung von Neutrophilen via Chemotaxis führt.

Proteinase 3 (PR-3)

Das Zielantigen der cANCA ist die Proteinase-3 (PR-3), ein Enzym, welches in den azurophilen Granula der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten vorkommt. Als Serinprotease ist PR-3 unter anderem dazu in der Lage, Elastin und einige Kollagene (Typ I, III, IV) zu zerstören. Ihr physiologischer Inhibitor ist das α-1-Antitrypsin. Experimentell konnte durch tracheale Insufflation von PR-3 die Entstehung von Emphysemen bei Hamstern ausgelöst werden (Kao et al. 1988).

Im Rahmen von WG, ANCA-assoziierter Vaskulitis und Infektionen konnte eine vermehrte Expression von membrangebundener PR-3 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten gezeigt werden (Csernok et al. 1993). Die vermehrte Expression von PR3 auf ruhenden Neutrophilen scheint mit einer erhöhten WG-Rezidivrate und -inzidenz (Rarok et al. 2002) und die verstärkte Expression von PR-3-mRNA in zirkulierenden Leukozyten mit ANCA-assoziierter GN assoziiert zu sein (Alcorta et al. 2002).

Mayet et al. konnten in ihren Experimenten zeigen, dass IFN-γ und TNF-α eine vermehrte PR-3-Expression im Zytoplasma auf der Zellmembran auslösen können (Mayet WJ et al. 1993).

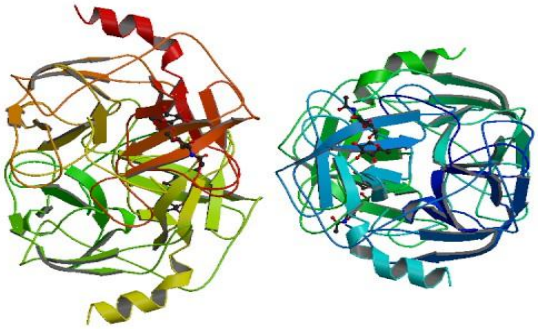


Abbildung 2: Kristall-Struktur der Proteinase 3 nach http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1FUJ siehe auch Fujinaga et al. 1996

1.1.4.2 Umweltfaktoren:

Umweltfaktoren wie Ackerbau, Lösungsmittelexposition und Schwermetalle wurden in früheren Studien als potentielle Auslöser von AAV beschrieben (Lane et al. 2003; Albert et al. 2004). Der am häufigsten beschriebene Umweltfaktor ist die Exposition gegenüber Silicium-haltigen Stäuben (SiO_4, SiO_2) (Nuyts et al. 1995; Duna et al. 1998; Hogan et al. 2007).

Bezüglich der *geographischen Verteilung* der WG-Inzidenz in Europa zeigt sich ein Nord-Süd-Gefälle (höher in Skandinavien, geringer im Mittelmeerraum). Dies lässt zusätzlich eine Beteiligung des Klimas vermuten.

Zigarettenraucher scheinen im Vergleich zur Gesamtbevölkerung eine signifikant geringere Prävalenz von AAV der kleinen Gefäße aufzuweisen (Haubitz et al. 2005).

1.1.4.3 Genetik

Ein Polymorphismus (Allel PiZ) des Gens für α-1-Antitrypsin (AAT), einem wichtigen Inhibitor der PR-3-Aktivität, führt zu reduzierter AAT-Aktivität. Heterozygonität ist mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für WG (Elzouki et al. 1994), einem erhöhten Risiko für disseminierten Befall und erhöhter Letalität assoziiert (Segelmark et al. 1995).

Darüber hinaus scheint die Expression von PR-3 auf der Zellmembran eine Rolle bei der Entwicklung der WG zu spielen: So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit starker Expression der membrangebundenen Form von PR-3 auf neutrophilen Granulozyten ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung bzw. deren Rezidiv haben (Witko-Sarsat et al. 1999; Rarok et al. 2002; van Rossum et al. 2003).

1.1.4.4 Infektiöse Agenzien

Infektiöse Agenzien, v.a. Staphylococcus aureus (Popa and Tervaert 2003), aber auch Parvovirus B19 (Finkel et al. 1994), werden ebenfalls als mögliche auslösende Faktoren diskutiert.

1.2 Rapid Progressive Glomerulonephritis (RPGN)

1.2.1 Überblick

Bei der rapid progressiven Glomerulonephritis handelt es sich um eine schubweise auftretende bilaterale Entzündung der Niere mit Beteiligung der Glomeruli, die unbehandelt mit einem raschen Verlust der Nierenfunktion einhergeht. Typisches pathologisches Korrelat der rapid progressiven Glomerulonephritis ist die Ausbildung von sogenannten glomerulären Halbmonden. Hierbei handelt es sich um Läsionen im Bowman'schen Raum, die aus proliferierenden parietalen Epithelzellen und infiltrierenden Monozyten bestehen. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie lässt sich die RPGN in drei Untergruppen unterteilen.

Bei der *Anti-Basalmembran*-GN liegen *lineare* Immunkomplex-Ablagerungen entlang der glomerulären Basalmembran vor (Abb.3A). Serologisch sind Antikörper gegen die Basalmembran (Anti-GBM-IgG) nachweisbar. Typische Beispiele sind die Anti-GBM-Erkrankung und das Goodpasture Syndrom.

Die *Immunkomplex*-Glomerulonephritiden hingegen zeichnen sich durch ein *granuläres* Ablagerungsmuster von Immunkomplexen (Immunglobuline und Komplementfaktor C3) an der glomerulären Basalmembran (GBM) aus (Abb.3B). Vertreter dieser Form sind beispielsweise die Poststreptokokken-GN und die Lupusnephritis.

Die letzte und häufigste Form der RPGN ist die *pauci-immune* GN, welche in einer Vielzahl der Fälle mit einer ANCA-assoziierten Systemerkrankung einhergeht. Typisch ist hier der Mangel (*engl. paucity*) an nachweisbaren Immunkomplex- und Komplementablagerungen entlang der Basalmembran (Abb.3C). Erkrankungen, bei denen diese Art der RPGN vorkommt, sind v.a. die Wegener'sche Granulomatose und die mikroskopische Polyangiitis (Dietel et al. 2002).

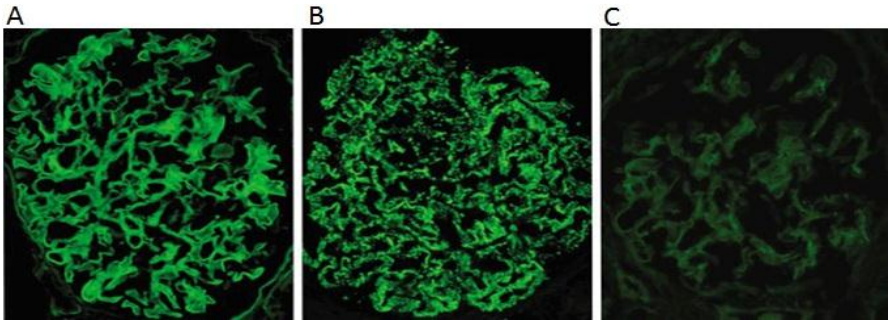


Abbildung 3: Immunfluoreszenzmuster der RPGN (Jennette und Nickeleit 2006, S.615): lineare Immunfluoreszenz entlang der Basalmembran im Rahmen einer Anti-GBM-Glomerulonephritis (A). Granuläre Immunfluoreszenz im Rahmen einer Immunkomplex-Glomerulonephritis (B). Spärliche, manchmal ganz fehlende glomeruläre Immunfluoreszenz im Rahmen einer pauci-immun-Glomerulonephritis (C).

1.2.2 Glomerulonephritis bei Wegener'scher Granulomatose

Bei ca. 80% der Patienten mit Wegener'scher Granulomatose kommt es zu einem Befall der Nieren. Das typische histopathologische Korrelat der Nierenschädigung ist die fokal-segmental nekrotisierende GN, die oft mit der Bildung von Halbmonden einhergeht und häufig mit einem akuten Nierenversagen assoziiert ist. Die Immunfluoreszenz und die Elektronenmikroskopie zeigen eine sog. pauci-immun-GN, welche sich durch das Fehlen von Immunglobulin-, Komplement- oder Immunablagerungen auszeichnet. Das Ausmaß der Nierenbeteiligung ist einer der wichtigsten prognostischen Faktoren bei WG (Dietel et al. 2002).

1.3 Bedeutung von T-Lymphozyten bei Wegener`scher Granulomatose

T-Lymphozyten spielen in der Pathogenese der WG eine wesentliche Rolle. Sie sind intraläsional insbesondere im Bereich der granulomatösen Entzündungsreaktion nachweisbar. Das Zytokinmuster der T-Zellen (verstärkte Expression von IFN-γ) im peripheren Blut, in der bronchoalveolären Lavage und in Biopsien aus der Nase von Patienten mit WG weist auf eine sogenannte T_H1-gesteuerte zelluläre Immunantwort hin (Ludviksson et al. 1998; Csernok et al. 1999). Auch bei der Entstehung anderer granulomatöser Entzündungen, wie etwa der Tuberkulose, sind die T-Lymphozyten (und Makrophagen) von wesentlicher Bedeutung (Kaufmann 2002).

Typischerweise besteht das Granulom bei WG aus T-Zellen (überwiegend $CD4^+$), von Monozyten abgeleiteten Gewebemakrophagen, Riesenzellen und neutrophilen Granulozyten, die um ein nekrotisches Areal gelegen sind. Gelegentlich sind die Makrophagen palisadenartig angeordnet.

1.3.1 T-Zellen bei rapid progressiver Glomerulonephritis

Die T-Zell-gesteuerte adaptive Immunität spielt bei vielen Formen der Glomerulonephritis und besonders der RPGN mit Halbmondbildung eine wichtige Rolle. Dabei wird die Nephritis-auslösende Immunreaktion offenbar von $CD4^+$-Zellen gesteuert (Tipping und Holdsworth 2006). In experimentellen Modellen der Glomerulonephritis konnte gezeigt werden, dass eine Immunreaktion, welche von $CD4^+$-T-Helfer-Zellen der Subpopulation 1 (T_H1), dominiert und gesteuert wird (T_H1-Reaktion), die Entstehung der für die RPGN typischen Halbmonde fördern kann. Die T_H1-Zellen zeichnen sich durch die Produktion eines für sie charakteristischen Zytokinmusters aus.

Das für eine T_H1-Reaktion typische Zytokinmuster umfasst insbesondere IFN-γ, TNF-α und Interleukin-12. So konnte in Mausmodellen für Glomerulonephritis gezeigt werden, dass IFN-γ die Entstehung von Halbmonden und die Schädigung des Gewebes als Folge einer Zell-vermittelten Immunreaktion vermittelt (Kitching et al. 1999a) und die Gabe von IL-12 eine T_H1-Immunreaktion und Halbmondbildung induziert (Kitching et al. 1999b).

Die Rolle der $CD8^+$-T-Zellen ist demgegenüber weniger gut erforscht. Bei der histologischen Untersuchung von WG-Nierenbiopsien zeigt sich eine prominente $CD8^+$-T-Zell- und Makrophageninfiltration (Aasarod et al. 2001). T-Zell-vermittelte Zytotoxizität trägt zur Gewebeschädigung in den Läsionen der WG bei. Es konnte

gezeigt werden, dass eine Depletion der $CD8^+$-T-Zellen mittels monoklonaler Antikörper in experimentellen Tiermodellen mit Ratten die Entstehung einer RPGN verhindern kann, ohne die Höhe der Titer zirkulierender nephritogener Antikörper wesentlich zu beeinflussen. Darüber hinaus war in diesen Experimenten die erhöhte glomeruläre Konzentration von Granzym B (Serinprotease: Apoptoseinduktion, Beteiligung an Destruktion der extrazellulären Matrix) reduziert (Reynolds et al. 2002).

1.3.2 CD28

Das costimulatorische Oberflächenantigen CD28 ist für die Proliferation und IL-2-Produktion von T-Lymphozyten sowie für die Entwicklung von T_H2-Helferzellen essentiell.

Bei Patienten mit WG wurde in der Vergangenheit eine auffällige Expansion CD28-negativer $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zell-Subpopulationen beobachtet (Schlesier et al. 1995; Lamprecht et al. 2001). Es zeigte sich, dass der Anteil an $CD28^+$-T-Zellen negativ mit dem Ausmaß der klinischen Manifestation korreliert. Patienten mit einem höheren Anteil an $CD28^-$-T-Zellen haben folglich ein erhöhtes Risiko für einen schwereren Krankheitsverlauf (Moosig et al. 1998). Signifikante Anreicherungen von $CD28^-$-T-Lymphozyten konnten sowohl in granulomatösen Läsionen der Nase als auch in der bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit erhöhter Krankheitsaktivität nachgewiesen werden. Eine weitere Studie kam zu dem Schluss, dass $CD4^+CD28^-$-T-Lymphozyten, die aus peripherem Blut und aus Granulomen isoliert wurden, IFN-γ und TNF-α produzieren und somit die Granulomentstehung fördern können (Komocsi et al. 2002). Die Untersuchungen einer weiteren Forschungsgruppe konnten zeigen, dass das C-Klasse-Chemokin Lymphotaktin (XCL1, Chemoattraktans für T-Zellen, siehe 1.4.4 Lymphotaktin (XCL1), S.15) bei Rheumatoider Arthritis hauptsächlich in CD28-negativen $CD4^+$- und $CD8^+$-Lymphozyten exprimiert wird (Blaschke et al. 2003).

$CD8^+CD28^+$-Zellen von Patienten mit aktiver WG, welche zusätzlich den Marker CD11b exprimieren, produzieren IFN-γ. Bei Gesunden und Patienten in Remission oder unter immunsuppressiver Therapie fand sich CD11b ausschließlich auf $CD8^+CD28^-$-Zellen. Eine Expansion dieser $CD8^+CD28^-$- und $CD11b^+$-T-Zell-Subpopulation fand sich insbesondere bei Patienten mit besonders langem oder schwerem Krankheitsverlauf. Die IFN-γ produzierenden Zellen stimulierten *in vitro* die

Expression von MHC-II-Molekülen in PNG und damit die Entstehung des für die aktive ANCA-assoziierten Vaskulitiden typischen PNG-Phänotyps (HLA-DR$^+$-CD4$^+$- und HLA-DR$^+$-CD8$^+$-Zellen) (Iking-Konert et al. 2008).

1.3.3 T-Zell-Aktivierungsmarker

Die Expression des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) und CD69 auf der Zelloberfläche zeigt eine Immunstimulation in der Frühphase an. Dagegen ist die HLA-DR-Expression erst in der Spätphase einer Immunstimulation nachweisbar.
Patienten mit aktiver WG weisen einen größeren Anteil HLA-DR- und CD25-positiver T-Lymphozyten auf als gesunde Probanden (Schlesier et al. 1995).

1.3.3.1 HLA-DR

HLA-DR ist ein MHC(*major histocompatibility complex*)-Molekül der Klasse II und wird durch den HLA (humanes Leukozytenantigen)-Komplex auf Chromosom 6 kodiert.
MHC-II-Molekülen wie HLA-DR kommt eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunität zu. Als Oberflächenrezeptor auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, dendritischen Zellen, B-, T-, NK- Zellen stellt HLA-DR mit seinen Liganden eine Bindungsstelle für den T-Zell-Rezeptor (TCR) dar. Die MHC-II-Moleküle werden intrazellulär mit phagozytierten (prozessierten) Fremdproteinen beladen und dann an die Zelloberfläche der APC verlagert, wo sie das Antigen dem T-Zell-Rezeptor der T-Zellen präsentieren. Trifft nun ein T-Lymphozyt auf sein spezifisches Antigen, wird er aktiviert und zur Expression von IL-2 und seinem Rezeptor (CD25) angeregt. Dies führt zur klonalen Expansion. Die weitere Differenzierung in CD8$^+$-zytotoxische T-Lymphozyten oder CD4$^+$-T-Helfer-Zellen (T_H1 oder T_H2) schließt sich an. Im Rahmen der WG konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Krankheitsaktivität eine erhöhte Anzahl CD4$^+$-T-Zellen HLA-DR exprimieren. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen dem Anstieg der HLA-DR-Expression und dem Ausmaß der Organmanifestation festgestellt werden (Schlesier et al. 1995).
Die Expression verschiedener HLA-DR-Moleküle ist auch mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von anderen Autoimmunerkrankungen (z.B. RA und juvenile RA (Stastny et al. 1991), Psoriasis (Henseler 1997), Sjögren-Syndrom (Reveille et al. 1984), Multiple Sklerose (Kalman und Lublin 1999), Myastenia gravis (Carlsson et al.

1990), Goodpasture Syndrom (Ooi et al. 2008) und Zöliakie (Godkin und Jewell 1998) assoziiert.

1.4 Chemokine

1.4.1 Klassifikation/Struktur

Chemokine sind Proteine mit kleinem Molekulargewicht (ca. 8-14 kDa), welche eine entscheidende Rolle bei der transendothelialen Migration von Lymphozyten entlang chemotaktischer Gradienten und ihrer Aktivierung bei inflammatorischen Prozessen einnehmen (Baggiolini et al. 1994).

Die Klassifikation der Chemokin-Familie erfolgt anhand ihrer N-terminalen Cystein-Konfiguration (Rollins 1997): Bei den Chemokinen vom Typ CC folgen die beiden Cysteine direkt aufeinander, während bei den Cysteinen vom CXC- und CX_3C (CXXXC)-Typ eine bzw. drei Aminosäuren zwischen den beiden Cysteingruppen liegen. Die C-Subfamilie besitzt nur ein Cystein am N-terminalen Ende.

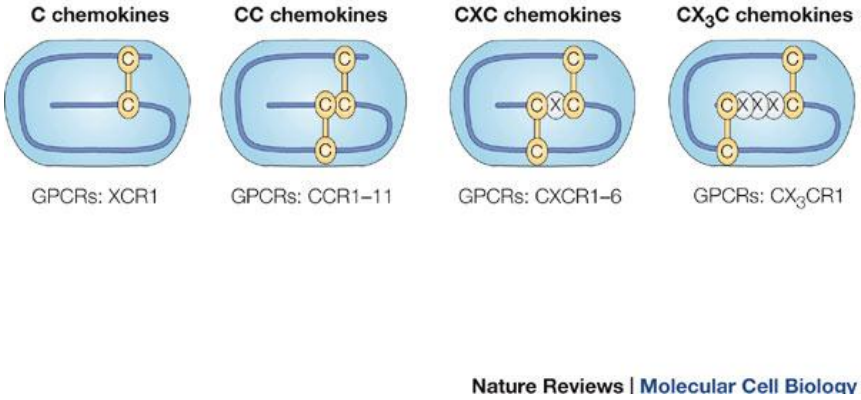


Abbildung 4: Klassifikation der Chemokine anhand ihrer n-terminalen Cystein-Konfiguration (Sodhi et al. 2004, S.1001)

1.4.2 Funktion

Chemokine entfalten ihre biologische Aktivität über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Jede der vier Chemokingruppen besitzt ein Kollektiv von unterschiedlichen Effektorzelltypen. C-C-Chemokine wirken beispielsweise auf Monozyten, eosinophile und basophile Granulozyten und T-Lymphozyten, C-X-C-Chemokine (z.B. Interleukin-8) hauptsächlich auf neutrophile Granulozyten und T-Zellen. Das einzig bekannte Mitglied der CX_3C-Familie, Fractalkin/Neurotaktin, beeinflusst bevorzugt NK-Zellen und T-Lymphozyten, C-Chemokine (z.B. XCL1) hingegen beeinflussen vor allem T-Zellen, dendritische Zellen und „Natural Killer“ (NK) Zellen. Folglich spielen diese kleinen Proteine besonders in der Lymphozytenmigration und -aktivierung an Orten der Entzündung eine dominante Rolle.

1.4.3 Genlokus

Die genetische Information für die vier Chemokinsubfamilien befindet sich auf verschiedenen Chromosomen.

Die Gene für die CC-Familie liegen auf Chromosom 17 (Naruse et al. 1996), die der CXC-Familie auf Chromosom 4 (Modi und Chen 1998), die der CX_3C-Familie auf Chromosom 16 (Nomiyama et al. 1998) und die der C-Chemokine auf Chromosom 1 (Kennedy et al. 1995; Muller et al. 1995).

1.4.4 Lymphotaktin (XCL1)

1.4.4.1 Überblick

Die Entdeckung des Lymphotaktins wurde in kurzem Abstand in drei voneinander unabhängigen Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen berichtet. Je nach Veröffentlichung wurde das gleiche Protein als Lymphotaktin (Kelner et al. 1994) bzw. Single C-Motif-1 (SCM-1) (Yoshida et al. 1995) oder „activation-induced, T-cell derived, and chemokine related molecule“ (ATAC) (Muller et al. 1995) bezeichnet.

1.4.4.2 Struktur

Lymphotaktin (XCL1) ist das (bisher) einzige Mitglied der C-Chemokin-Klasse. Es ist zwar strukturell mit der C-C-Chemokin-Subfamilie verwandt, ihm fehlen jedoch im Vergleich die Cysteinmoleküle an den Positionen 1 und 3 (Kelner et al. 1994), während sie an Position 2 und 4 vorhanden sind. XCL1 besitzt ein erweitertes Carboxylende, welches für die chemotaktische Wirkung wichtig ist. Lymphotaktin kann, je nach Umgebungsbedingungen (entscheidend sind v.a. Salzgehalt und Temperatur) in verschiedenen dreidimensionalen Formen vorkommen (Kuloglu et al. 2002). Die funktionelle Bedeutung des Strukturumbaus ist bisher ungeklärt.

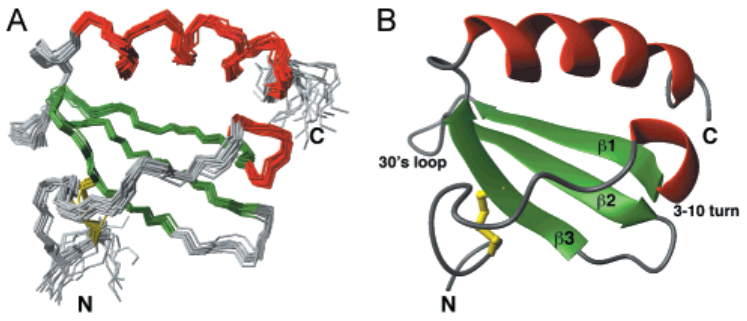


Abbildung 5: NMR-Struktur menschlichen Lymphotaktins (Kuloglu et al. 2001, S. 12493)

1.4.4.3 Funktion

Wie die übrigen Chemokine entfaltet Lymphotaktin seine Wirkung über einen Rezeptor (XCR-1), welcher aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen stammt (Yoshida et al. 1998). Eine XCL1-Expression findet sich in aktivierten $CD8^+$-T-Zellen, einem geringen Anteil aktivierter $CD4^+$-T-Zellen (Muller et al. 1995), αβ-Typ Thymozyten (Kelner et al. 1994), intraepithelialen T-Zellen vom γδ-Typ (Boismenu et al. 1996), Mastzellen (Rumsaeng et al. 1997) und NK-Zellen (Hedrick et al. 1997).

Der Lymphotaktinrezeptor XCR1 wurde auf $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen (Kennedy et al. 1995; Dorner et al. 1997), NK- (Giancarlo et al. 1996) Zellen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und B-Zellen (Huang et al. 2001) nachgewiesen. Resultat des Kontaktes dieser Zelltypen mit XCL1 ist eine Chemotaxis-induzierte Migration entlang des Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Konzentration. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass XCL1 die normale Aktivierung von $CD4^+$-T-Zellen zu inhibieren/verhindern vermag (Ordway et al. 2007), während es die Aktivierung von $CD8^+$-T-Zellen fördert (Cerdan et al. 2000).

1.4.4.4 Klinische Relevanz

Die Expression von XCL1 ist bereits in mehreren klinischen und experimentellen Modellen entzündlicher Erkrankungen einschließlich chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (verstärkte XCL1mRNA Expression) (Middel et al. 2001), Enzephalomyelitis (Tran et al. 2000) und Rheumatoider Arthritis (verstärkte lokale Expression von XCL1 und XCR1) (Blaschke et al. 2003; Wang CR et al. 2004) sowie pulmonaler Sarkoidose (erhöhte XCL1-mRNA Levels in BAL)(Petrek et al. 2002) untersucht worden.

Bezüglich der XCL1-Expression bei Erkrankungen der Niere liegen Studien über XCL1 bei akuter Transplantatabstoßungsreaktion (Wang JD et al. 1998) und experimenteller Glomerulonephritis mit Halbmondbildung (Natori et al. 1998) vor. Die Ergebnisse dieser Studien unterstützen die Hypothese, dass XCL1 bei T_H1-vermittelten inflammatorischen Prozessen eine pathogenetische Bedeutung besitzt.

Tabelle 3: Eigenschaften von XCL1

Lymphotaktin (XCL1)	
Subfamilie	C
Genlokus	Chromosom 1
Rezeptor	XCR1, G-Protein-gekoppelt mit sieben Transmembrandomänen
Synthese	Aktivierte $CD8^+$-T-Lymphozyten, wenige aktivierte $CD4^+$- T-Lymphozyten, αβ-Thymozyten, intraepitheliale γδ-Typ-T-Zellen, Mastzellen, NK-Zellen
Zielzellen	$CD4^+$- und $CD8^+$-T-Lymphozyten, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten, B-Lymphozyten

1.4.5 Interleukin 8 (IL-8, CXCL-8)

1.4.5.1 Überblick

Ursprünglich wurde IL-8 von verschieden Gruppen als MDNCF (monocyte-derived neutrophile chemotactic factor) (Yoshimura et al. 1987), MONAP (monocyte-derived neutrophil activating peptide)(Schroder et al. 1987) bzw. NAF (neutrophil activating factor)(Walz et al. 1987) beschrieben. IL-8 gehört zur Familie der CXC-Chemokine, seine genetische Information befindet sich auf Chromosom 4 (4q12-q21).

Als IL-8-produzierende Zellen wurden bisher Monozyten (Yoshimura et al. 1987), dermale Fibroblasten (Strieter et al. 1989b), Endothelzellen (Strieter et al. 1989a), Keratinozyten (Larsen et al. 1989), PBMC, Alveolarmakrophagen (Larsson et al. 1999) und T-Lymphozyten (Schroder et al. 1988) identifiziert.
Die beiden Rezeptoren für Interleukin-8 werden nach der International Union of Pharmacology (Murphy et al. 2000) mit CXCR1 (Thomas et al. 1990) und CXCR2 (Murphy und Tiffany 1991) bezeichnet.

1.4.5.2 Struktur

Interleukin-8 entsteht aus einem 99 Aminosäuren messenden Vorläufermolekül. Die häufigste aktive Form ist ein aus 72 Aminosäuren bestehendes Molekül (Matsushima et al. 1988), andere Proteinlängen kommen seltener vor (Yoshimura et al. 1989).

Interleukin-8 enthält eine Struktur aus 14 Aminosäuren, welche wesentlich für die Grundeigenschaften des Moleküls verantwortlich sind.

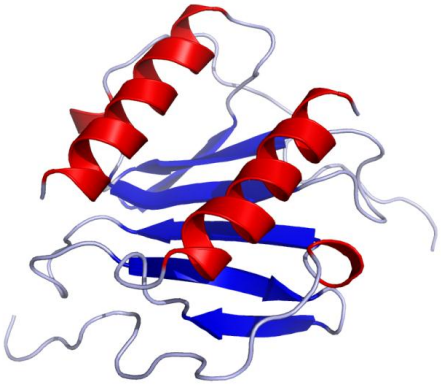


Abbildung 6: 3D-Struktur von Interleukin 8 nach Clore, Appella et al. 1990

1.4.5.3 Funktion

IL-8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und vermittelt so eine Migration dieser Zellen aus der Blutbahn in das umgebende Gewebe. Sie bewegen sich dabei auf die Quelle der IL-8-Freisetzung zu, welche dem Ort der höchsten Konzentration entspricht. Seine Wirkung übt IL-8 über die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 aus.

IL-8 stimuliert darüber hinaus (im Zusammenspiel mit TNF-alpha) die Freisetzung aggressiver Substanzen wie reaktiven Sauerstoffspezies („respiratory burst“) und lysosomaler Enzyme aus neutrophilen Granulozyten (Schroder et al. 1987; Peveri et al. 1988). Diese Substanzen haben im Rahmen der Immunabwehr die Aufgabe schädliche Fremdorganismen anzugreifen und zu zerstören. Gegen körpereigene Zellen gerichtet können sie zur Schädigung des umliegenden Gewebes führen.

Die Induktion der Enzymfreisetzung konnte mit rekombinantem IL-8 für Myeloperoxidase und β-Glucuronidase durch Neutrophile bestätigt werden. Hierbei war die für eine Freisetzung von 50% der maximalen Enzymmenge benötigte Konzentration im Experiment 10mal höher als jene für die Induktion der Chemotaxis (Matsushima und Oppenheim 1989).

IL-8 werden darüber hinaus eine angiogenetische Potenz (Waugh und Wilson 2008; Singh et al. 2009) und eine gewisse chemotaktische und histaminfreisetzende Wirkung auf basophile Granulozyten (Dahinden et al. 1989) zugeschrieben.

1.4.5.4 Klinische Relevanz

IL-8 spielt bei der Entstehung der akuten Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle, da es die Infiltration von Neutrophilen zum Ort der Entzündung fördert. Daher ist IL-8 bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Psoriasis (Schulz et al. 1993) oder Rheumatoider Arthritis (Kraan et al. 2001) von Bedeutung. An malignen Prozessen ist Interleukin-8 unter anderem wegen seiner angiogenetischen Potenz beteiligt (Inoue et al. 2000).

1.5 Fragestellung

Die Wegener'sche Granulomatose ist eine seltene Autoimmunerkrankung aus dem Formenkreis der systemischen Vaskulitiden. Histopathologisch zeichnet sie sich durch eine nekrotisierende Entzündung der kleinen Gefäße in Verbindung mit einer Granulombildung aus. Im Bereich der Niere sind die Läsionen durch Infiltration mit T-Lymphozyten, Gewebsmakrophagen, Riesenzellen und neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet. Die Rolle der T-Lymphozyten in der Pathogenese ist noch nicht eindeutig bekannt. Bei der Wegener'schen Granulomatose sind T-Zellen intraläsional insbesondere im Bereich der granulomatösen Entzündungsreaktion und im Interstitium nachweisbar.

Das Zytokinexpressionsprofil der $CD4^+$-T-Zellen ist dabei insbesondere durch die verstärkte Expression von Interferon-γ gekennzeichnet: Dies weist auf eine zugrundeliegende sog. T_H1-gesteuerte Immunreaktion hin. Diese T-Zell-Subpopulation spielt insbesondere bei der rapid progredienten Glomerulonephritis mit Halbmondbildung eine wichtige Rolle. So konnte in experimentellen Tiermodellen gezeigt werden, dass IFN-γ produzierende $CD4^+$-T-Zellen wesentlich an der Entstehung der für die RPGN typischen Halbmonde und der inflammatorischen Gewebsschädigung beteiligt sind.

Neben $CD4^+$-T-Zellen findet sich bei der Wegener'schen Granulomatose intraläsional auch eine prominente Infiltration mit $CD8^+$-T-Zellen. Zytotoxische $CD8^+$-T-Zellen tragen dabei offenbar wesentlich zur lokalen Gewebsschädigung bei. So konnte in Tiermodellen belegt werden, dass die Entstehung der RPGN durch die Depletion dieser Zellen mit monoklonalen Antikörpern verhindert werden kann.

Lymphotaktin ist ein Chemokin der C-Klasse, welches funktionell insbesondere durch ein chemotaktisches Potential für T-Zellen und polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PNG) charakterisiert ist. Darüber hinaus konnten bei anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Morbus Crohn oder Rheumatoider Arthritis erhöhte Konzentrationen von Lymphotaktin nachgewiesen und eine funktionelle insbesondere proinflammatorische Bedeutung für dieses Chemokin experimentell belegt werden. Die Expression und funktionelle Bedeutung von XCL1 bei Wegener'scher Granulomatose wurde bisher nicht untersucht. Auf der Grundlage dieser Vorarbeiten wurde die Hypothese aufgestellt, dass Lymphotaktin ebenfalls bei der Wegener`schen Granulomatose eine pathogenetische Rolle spielen könnte.

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die Serum-Konzentrationen von XCL1 bei Patienten mit Wegener'scher Granulomatose im Vergleich zu einem gesunden Probandenkollektiv untersucht. Darüber hinaus wurde die Expression von Lymphotaktin in peripheren mononukleären Zellen durchflusszytometrisch analysiert und mittels Immunphänotypisierung charakterisiert. Immunhistochemisch wurde nachfolgend in Nierenbiopsien bei Patienten mit neu diagnostizierter WG die lokale Lymphotaktin-Produktion untersucht. Aufgrund der Ergebnisse wurde im Anschluss an diese experimentellen Untersuchungen die mögliche funktionelle Bedeutung von Lymphotaktin bei der WG durch *in-vitro*-Stimulationsexperimente analysiert.

2 Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten und Probematerialien

Aus heparinisierten Blutproben von 16 WG-Patienten und 16 gesunden Blutspendern als Kontrollgruppe wurden mononukleäre Zellen isoliert (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Alle WG-Patienten erfüllten die vom *American College of Rheumatology* (ACR) festgelegten Kriterien für Wegener'sche Granulomatose (Leavitt et al. 1990). Die Erkrankungsdauer betrug im Mittel 5,6 Jahre (Min-Max: 1-12 Jahre). Die Mehrzahl der Patienten erhielt die üblichen Basistherapeutika (DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs) wie Azathioprin (AZA), Methotrexat (MTX) oder Cyclophosphamid (CYC) und eine niedrige Dosis Prednisolon (< 10mg/Tag). Der Krankheitsaktivitätsscore der ausgewählten Patienten betrug zum Zeitpunkt der Erstmanifestation im Durchschnitt 22,1 (Min-Max: 12-34), bestimmt nach den Kriterien des Birmingham-Vaskulitis-Aktivitäts-Score (BVAS). Die klinischen Charakteristika des untersuchten Patientenkollektivs sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bei Beginn der Studie zeigten sechs der 16 WG-Patienten klinische Aktivität, zehn befanden sich in klinischer Remission. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen geprüft und zugelassen und die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten gemäß der Deklaration von Helsinki eingeholt.

Die PBMCs wurden mit Hilfe von Ficoll Hypaque® Dichtegradienten-Zentrifugation (Biotech, Berlin) aus peripherem Blut gewonnen. Nachfolgend wurde durchflusszytometrisch die Expression der Oberflächenantigene CD4, CD8, CD25, CD69 und HLA-DR untersucht.

Serumproben (10ml) wurden von 16 WG-Patienten und 16 gesunden Blutspendern für die Messung der Lymphotaktin(XCL1)-Serumspiegel gesammelt.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Nierenbiopsien von Patienten eingesetzt, bei denen zur weiteren diagnostischen Abklärung einer bestehenden Niereninsuffizienz unklarer Genese eine Nierenbiopsie vorgenommen wurde. Den fünf Patienten mit WG standen vier Patienten mit benigner Nephrosklerose, zwei Patienten mit IgA-Nephritis sowie zwei Patienten mit

Lupusnephritis (WHO Klasse IV) als Kontrollen gegenüber. Ein Teil dieser Gewebeproben wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und nachfolgend in Paraffin eingebettet.

Eine Zusammenfassung der klinischen Charakteristika dieser Patienten und ihrer renalen histopathologischen Veränderungen findet sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: Klinische Charakteristika der WG-Patienten

Anzahl der Patienten	16
Geschlecht m:w	12 : 4
BVAS Mittel (Min.-Max.)	22.1 (12-34)
cANCA positiv (%)	100
PR-3 Mittel (Min.-Max.) U/ml	13.1 (0-98)
CRP Mittel (Min.-Max.) mg/l	6.23 (3.0-16.5)
Mittlere Erkrankungsdauer (Min.-Max.) in Jahren	5.6 (1-12)
Therapie	
Kortikosteroide	16
Azathioprin	7
Methotrexat	6
Cyclophosphamid	3

Tabelle 5: Nierenbiopsien von Patienten mit WG

Patient	Alter	Erst-diagnose	Klinische Manifestation			BVAS	Laborwerte			Histopathologischer Befund	Therapie
			HNO	Lunge	Niere		cANCA	PR-3 U/ml	CRP mg/l		
1	34	2003	+	+	+	24	1 :640	279	320	Diffuse nekrotisierende extrakapillär proliferierende Glomerulonephritis mit moderater interstitieller Nephritis	CYC GC
2	45	2002	+	–	+	21	1 :160	33	18	Fokal segmental nekrotisierende extrakapillär proliferierende Glomerulo-nephritis mit milder interstitieller Nephritis	CYC GC
3	54	2002	+	–	+	34	1 :160	11	42	Fokal segmental nekrotisierende Glomerulonephritis	CYC GC
4	49	2002	–	+	+	20	1 :160	7	59	Fokal segmental nekrotisierende Glomerulonephritis mit milder interstitieller Nephritis	CYC GC
5	29	2002	+	–	+	8	1 :320	34	88	Diffus nekrotisierende extrakapillär proliferierende Glomerulonephritis	CYC GC

2.1.2 ELISA

2.1.2.1 Chemikalien und Lösungen

Material		Hersteller, Ort
Bovines Serumalbumin	BSA V	Paesel+Lorei, Duisburg
Fettfreies Milchpulver		Merck, Darmstadt
GIBCO™ phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung), pH: 7.4 ± 0.05	PBS 7,4	GibcoBRL, Eggenstein
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenkarbonat	$NaHCO_3$	Merck, Darmstadt
Natriumkarbonat	Na_2CO_3	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 1M	H_2SO_4	Merck, Darmstadt
Sukrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA
TBS (20mM Trizma Base, 150mM NaCl)		
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	$C_4H_{11}NO_3$	Paesel+Lorei, Duisburg
Tween®20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Merck, Darmstadt

2.1.2.2 Pufferlösungen

Pufferlösung	Zusammensetzung
Blockpuffer	PBS/1% BSA/5% Sucrose
Karbonat-Puffer	50mM, pH 9.6
Verdünnungspuffer	TBS/1% BSA
Waschpuffer	PBS/0.05% Tween®20

2.1.2.3 Antikörper etc.

Antikörper	Hersteller	Ort
Kaninchen-Anti-humanXCL1-Ak, biotinyliert	Serotec	Düsseldorf
Ortho-Phenylendiamin (OPD, Substratlösung für HRP)	DAKO	Hamburg
Rekombinantes menschliches XCL1 (Lymphotaktin)	R+D Systems	Wiesbaden
Ziege-Anti-humanXCL1-Ak, polyklonal	R+D Systems	Wiesbaden
Ziege-Anti-Kaninchen-Ak, Meerrettichperoxidase(HRP)-konjugiert (EnVision™ rabbit)	DAKO	Hamburg

2.1.2.4 Geräte und Zubehör

Gerät	Hersteller	Ort
inoLab® pH 720	WTW GmbH	Weilheim
LA620S Reference, Präzisionswaage	Sartorius AG,	Göttingen
MikroWin (ELISA Software)	Mikrotek Laborsysteme	Overath
Nunc F96 MicroWell™ Platten	Nunc	Wiesbaden
Tecan Spectra Mini (ELISA Lesegerät)	Tecan Deutschland	Crailsheim

2.1.3 Durchflusszytometrie

2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen

Material		Hersteller	Ort
Bovines Serumalbumin (BSA)		Paesel+Lorei	Duisburg
Brefeldin A		Sigma	Deisenhofen
CellWASH™		BD Biosciences	San Jose, CA, USA
FACSFlow™ sheath fluid		BD Biosciences	San Jose, CA, USA
FACS Lysing Solution (10x)		BD Biosciences	San Jose, CA, USA
Fetales Kalbsserum		GibcoBRL	Eggenstein
Ionomycin		Sigma	Deisenhofen
Isocove's modifiziertes Dulbecco's Medium	IMDM	GibcoBRL	Eggenstein
Paraformaldehyd		Merck	Darmstadt
Penicillin/ Streptomycin		Cambrex Bio Sciene Verviers	Verviers, Belgien
Phorbol-12-myristat-13-acetat	PMA	Sigma	Deisenhofen
Phosphat-gepufferte Salzlösung	PBS	GibcoBRL	Eggenstein
Saponin		Sigma	Deisenhofen

2.1.3.2 Antikörper (Ak) etc.

Antikörper	Hersteller	Ort
Anti-CD3-Ak	Becton Dickinson	Heidelberg
Anti-CD4-Ak	Becton Dickinson	Heidelberg
Anti-CD8-Ak	Becton Dickinson	Heidelberg
Anti-CD25-Ak	Becton Dickinson	Heidelberg
Anti-CD69-Ak	Becton Dickinson	Heidelberg
Anti-HLA-DR-Ak	Becton Dickinson	Heidelberg
IgG_1/IgG_{2a} Isotypenkontrolle	Becton Dickinson	Heidelberg
Maus-Anti-humanXCL1-Ak	R&D Systems	Wiesbaden
Ziege-Anti-Maus-Ak, Phycoerythrin(PE)-markiert	Dianova	Hamburg

2.1.3.3 Geräte und Zubehör

Gerät	Hersteller	Ort
CellQuest™ v3.3	Becton Dickinson	Heidelberg
FACSCalibur, 2-Laser-Durchflusszytometer mit Sortierfunktion	Becton Dickinson	Heidelberg
inoLab® pH 720	WTW GmbH	Weilheim
LA620S Reference, Präzisionswaage	Sartorius AG	Göttingen
Rotixa/A (Zentrifuge)	Hettich	Tuttlingen

2.1.4 Immunhistochemie

2.1.4.1 Chemikalien und Lösungen

Material	Formel/Kürzel/Zusammensetzung	Hersteller, Ort
aqua bidestillata	H_2O	
Bovines Serumalbumin	BSA V	Paesel+Lorei, Duisburg
Ethanol (100%, 90%, 70%)	EtOH	Chemie Vertrieb Hannover, Hannover
Konzentrierte Salzsäure (c(HCl) = 5 mol/l (5 N))	c(HCl)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	$C_4H_{11}NO_3$	Paesel+Lorei, Duisburg
TRIS-buffered Saline (TBS)	0.5M Tris-HCl (pH7.6), 1.5M NaCl	
Tween®20 (Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat)	$C_{58}H_{114}O_{26}$	Merck, Darmstadt
Xylol (100 %)	C_8H_{10}	Merck, Darmstadt

2.1.4.2 Puffer

Puffer	***Zusammensetzung***
Citratpuffer (pH 6.0)	9ml Lösung A (4,2g Citronensäure Monohydrat ad 200ml H_2O) **+** 41ml Lösung B (14,7g Trinatrium-citratdihydrat ad 500ml H_2O) **ad** 500ml H_2O
Verdünnungspuffer	TBS/1% BSA V
Waschpuffer	TBS/0,5% Tween®20

2.1.4.3 Geräte und Zubehör

Gerät/Zubehör	**Hersteller**	**Ort**
cell^F® Software	Olympus	Hamburg
F-View II (schwarz-weiß Kamera)	Olympus	Hamburg
inoLab® pH 720	WTW GmbH	Weilheim
IX71 (inverses Mikroskop)	Olympus	Hamburg
LA620S Reference, Präzisionswaage	Sartorius AG	Göttingen
Schmalbandfilter, hochtransparent	AHF	Tübingen

2.1.4.4 Antikörper etc.

Material	Antigen		Hersteller	Ort
4‘,6‘-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)			Merck	Darmstadt
Kaninchen-Anti-humanXCL1-Ak, polyklonal	XCL1		TEBU-Bio	Offenbach
Maus-Anti-humanCD4-Ak, monoklonal	CD4	NCL-CD4-368	Novocastra	Dossenheim
Maus-Anti-humanCD8-Ak, monoklonal	CD8	NCL-CD8-295	Novocastra	Dossenheim
Maus-Anti-humanCD68-Ak, monoklonal	CD68	NCL-CD68-KP1	Novocastra	Dossenheim
Vectashield® mounting Medium			Vector Laboratories	Burlingame, USA
Ziege-Anti-Kaninchen-Ak, Indocarbodicyanin(Cy5)-konjugiert			Dianova	Hamburg
Ziege-Anti-Maus-Ak, Indocarbocyanin(Cy3)-konjugiert			Dianova	Hamburg

2.1.5 Stimulation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten mit rekombinantem XCL1

Material	Hersteller	Ort
Anti-humanXCL1-Ak	R&D Systems	Wiesbaden
humanes XCL1, rekombinant	R&D Systems	Wiesbaden
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	GibcoBRL	Eggenstein
PeliKine Compact™ human IL-8 ELISA kit	Sanquin Reagents	Amsterdam, Niederlande
RPMI 1640	GibcoBRL	Eggenstein
TriZol- Reagenz	GibcoBRL	Eggenstein

2.2 Methoden

2.2.1 ELISA

2.2.1.1 Prinzip

Mittels eines ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kann spezifisch die Existenz bestimmter Moleküle in Lösungen nachgewiesen werden. Dies beruht auf der spezifischen Interaktion von Antikörpern mit ihrem Antigen. Die Wände einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, sog. *wells,* werden dabei mit dem *Capture*-Antikörper beschichtet. Nach der Entfernung nicht gebundener *Capture*-Antikörper wird die Lösung mit dem nachzuweisenden Antigen zugegeben. Dieses bindet an den *Capture*-Antikörper. Ungebundenes Probenmaterial wird wiederum mittels eines weiteren Reinigungsvorgangs entfernt. Anschließend wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop auf dem nachzuweisenden Molekül erkennt. Dieser „Detektions"-Antikörper ist biotinyliert und kann somit durch ein Avidin-HRP Konjugat gebunden werden. Das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*) setzt in einer enzymatischen Reaktion ein Substrat um. Nach dem Ablauf einer vorher definierten Zeitspanne (5-30min) wird die Enzym-Substrat-Reaktion durch das Hinzufügen einer „Stopplösung" (H_2SO_4) beendet. Das entstandene Produkt kann durch seine Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge in einem Photometer nachgewiesen werden. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Menge des Epitops und somit des nachzuweisenden Moleküls. Mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe kann somit die Konzentration des nachzuweisenden Moleküls bestimmt werden.

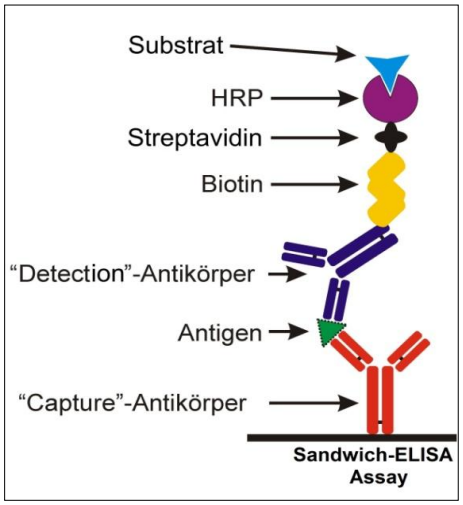


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Antigennachweises mittels Sandwich-ELISA-Assay

2.2.1.2 Vorgehen

Um die Lymphotaktin-Spiegel in Serumproben zu bestimmen, wurde folgende ELISA-Methode etabliert:

96-*well*-Mikrotiterplatten wurden mit jeweils 100 µl polyklonaler Ziege-Anti-humanXCL1-Antikörpers (R&D Systems, Minneapolis, USA), 1:50 verdünnt mit 50mM Karbonat-Puffer (pH 9.6), beschichtet („coating“) und bei einer Temperatur von 4°C über Nacht inkubiert.

Am Folgetag wurden die Platten viermal mit je 200 µl/*well* Waschpuffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung (GIBCO PBS, Invitrogen, Carlsbad, USA)/0,05% Tween20 (Merck, Darmstadt, Deutschland)) gewaschen und anschließend mit 200 µl Blockpuffer (PBS/1%BSA/5%Sukrose)/*well* abgesättigt um weitere unspezifische Bindungen zu verhindern („*blocking*“). Nach einer Stunde wurde dieser Vorgang durch erneutes Waschen (siehe oben) abgeschlossen.

Anschließend wurden nach 1:10 Verdünnung des Serums mit PBS/0,05% Tween20/5% fettfreier Trockenmilch jeweils 100 µl/*well* (in Doppelbestimmung) sowie die Standards hinzu gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Eine Sieben-Punkt-Standardkurve wurde mittels einer Verdünnungsreihe mit rekombinantem humanem Lymphotaktin (R&D Systems) erstellt. Ein Waschvorgang wie oben beschrieben schloss sich auch hier an.
Als nächster Schritt folgte eine Inkubation mit biotinyliertem Kaninchen-Anti-humanXCL1-Antikörper (Serotec, Düsseldorf), 1:200 in Verdünnungspuffer (TBS/1% BSA) verdünnt, für 60 Minuten bei RT.
Nach einem weiteren Waschvorgang wurden je 100 µl/*well* mit *horseradish peroxidase* (HRP, Meerrettichperoxidase) konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (EnVision™rabbit, DAKO, Hamburg) nach vorheriger Verdünnung (1:50 mit Verdünnungspuffer) appliziert, um spezifisch gebundene Antikörper zu detektieren. Nach 60-minütiger Inkubation erfolgte ein weiterer Waschvorgang.
Nun wurde die Substratlösung für die *HRP*, ortho-Phenylendiamin (OPD; DAKO) mit einem Volumen von 100 µl/well hinzu gegeben. Die nun ablaufende Reaktion wurde nach 30-minütiger Inkubation bei RT unter Ausschluss von Licht durch Zugabe von Stopplösung (1 N H_2SO_4) beendet.

Die Messung der Extinktion wurde innerhalb von 30 Minuten mittels ELISA-Reader (Tecan Spectra Mini, Tecan Deutschland, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 490 nm durchgeführt und die Ergebnisse mit geeigneter Software (MikroWin®) ausgewertet. Die Standardkurve wurde anhand der bekannten Lymphotaktinkonzentrationen der XCL1-Verdünnungsreihe errechnet. Der Detektionsgrenzwert lag bei 0,4 ng/ml.

2.2.2 Durchflusszytometrie

2.2.2.1 Prinzip

Als Durchflusszytometer bezeichnet man ein physikalisch-optisches Messsystem, welches mittels einer Messstelle zur multiparametrischen Analyse Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Zellen untersucht. Diese Zellen werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln zu einem Analysepunkt geleitet, wo sie vom fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle (meist ein LASER) beleuchtet werden.
Beim Durchtritt der Zellen durch den Laserstrahl entstehen Streulichtsignale, deren Signalstärke in einem engen Winkel zum einfallenden Laserstrahl (FSC, Forward Angle Light Scatter, „Vorwärtslichtstreuung“, 0-10°) in Relation zur Zellgröße, im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl (SSC, Side Angle Light Scatter, „Seitlichtstreuung“, 90°) in Relation zur Granularität der untersuchten Partikel, steht.
Mit Hilfe dieser beiden Parameter lassen sich die verschiedenen Zellpopulationen anhand morphologischer Unterschiede differenzieren und auf diese Weise die Lymphozyten von den Monozyten und den Granulozyten trennen.

Für die weitere immunologische Differenzierung der untersuchten Zellen kann die quantitative Fluorochromierung eingesetzt werden. Hierbei werden Fluoreszenzfarbstoffe an monoklonale Antikörper gekoppelt, welche an Oberflächenepitope des Untersuchungsmaterials binden und diese so sichtbar machen. Werden mehrere Fluorochrome gleichzeitig zur Messung verwendet, spricht man von einer Mehrfarbenfluoreszenzmessung. Die Anzahl ist durch die Überlappung der Emissionsspektren der Farbstoffe begrenzt. Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer (FACSCalibur®, Becton Dickinson, Heidelberg) erlaubt maximal den Einsatz von drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen pro Zelle, da andernfalls die Signale nicht eindeutig und überlappungsfrei zugeordnet werden können. Das Fluoreszenzlicht der Fluorochrome wird mit Wellenlängen-spezifischen Photomultiplierern in, der Quantität des emittierten Lichtes

proportionale, elektrische Signale umgewandelt. Nach Analyse der ermittelten Daten durch geeignete Software werden sie in Form von bivariaten Punktdiagrammen, sog. *Dot Plots*, dargestellt.

Als Fluorochrome werden u.a. die folgenden Substanzen verwendet:

Fluorescein (FITC, grüne Fluoreszenz, 495/520 nm (Exzitation/Emission)), R-Phycoerythrin (PE, grün-gelbe Fluoreszenz 564/575 nm) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP, rote Fluoreszenz 495/675nm).

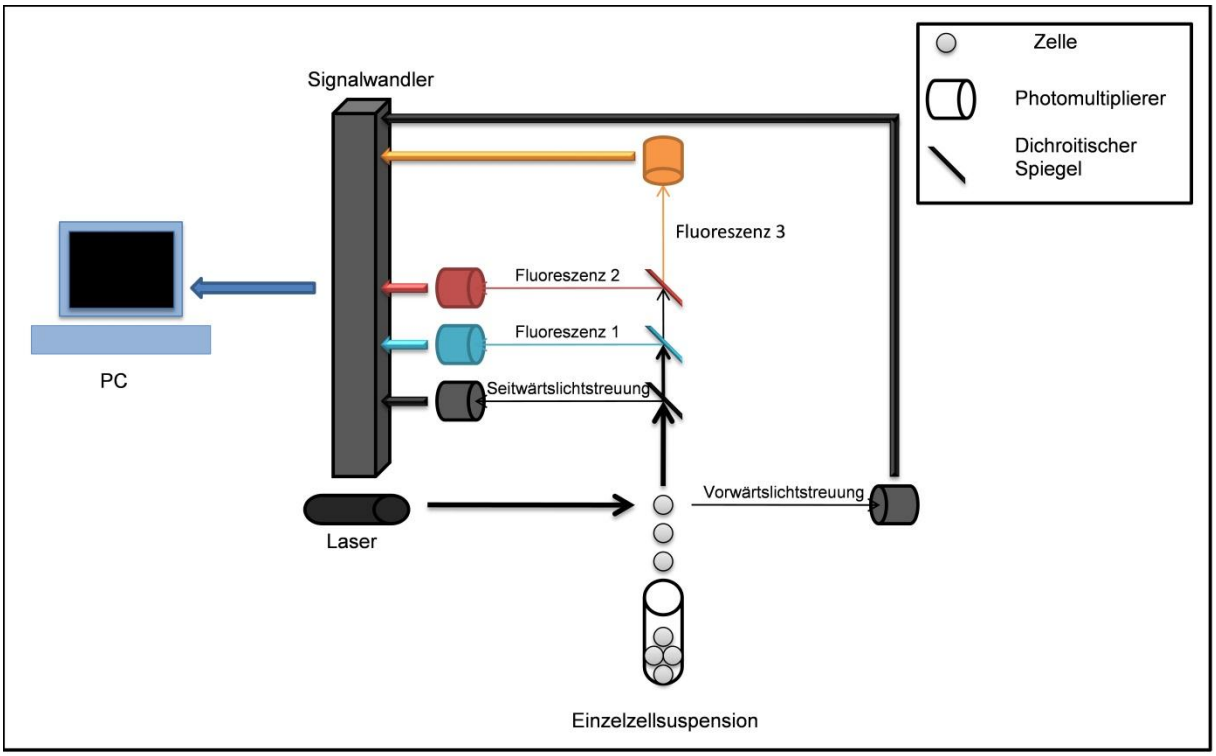


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers

2.2.2.2 Vorgehen (PBMC Markierung und Durchflusszytometrie)

Die PBMCs wurden mit Hilfe von Ficoll Hypaque® Dichtegradienten-Zentrifugation (Biotech, Berlin) aus heparinisiertem Blut isoliert. Zur Analyse der Oberflächenantigene CD4, CD8, CD25, CD69 und HLA-DR wurden die Zellen bei einer Dichte von $2x10^6$ Zellen/ml in PBS/0,1% BSA resuspendiert und mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen die oben genannten Oberflächenantigene gefärbt (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD69, anti-HLA-DR Antikörper und Isotypenkontrollen (IgG_1/IgG_{2a}); Becton Dickinson, Heidelberg).

Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 4°C mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, dann zweimal in PBS/0,1%BSA gewaschen und schließlich in 250µl PBS resuspendiert der durchflusszytometrischen Analyse unterzogen.

Um XCL1 in den PBMCs nachweisen zu können, wurden diese zunächst zwei Stunden mit 20ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; Sigma, Deisenhofen) und 1µg/ml Ionomycin mit einer Zelldichte von 2 x 10^6 Zellen/ml in Isocove's modifiziertem Dulbecco's medium (IMDM; GibcoBRL, Eggenstein) stimuliert, welchem 100IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und 10% fetales Kalbsserum zugesetzt wurde. Anschließend wurde mit Hilfe von Brefeldin A (5µg/ml; Sigma) die Freisetzung von XCL1 für fünf Stunden inhibiert. Die unstimulierten PBMC-Proben wurden lediglich mit Brefeldin A (5µg/ml) inkubiert.
Stimulierte und unstimulierte PBMCs wurden nach fünfstündiger Inkubation zentrifugiert (5 min bei 550G und 4°C) und mit PBS/1%BSA gewaschen. Die Färbung erfolgte mit Fluorophor-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4, CD8 und CD28 (alle Becton Dickinson).
Nach der Waschung mit PBS/1%BSA wurden die Zellen in einer Lösung aus PBS und 2% Paraformaldehyd 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nachdem sie in PBS/0,1% BSA plus 0,5% Saponin (Sigma) resuspendiert worden waren, wurden die PBMCs im nächsten Schritt mit einem primären monoklonalen Maus-Anti-human XCL1-Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden) für 30 Minuten inkubiert.
Im Anschluss an einen erneuten Waschvorgang mit PBS/0,1% BSA wurde der sekundäre Phycoerythrin(PE)-markierte Ziege-Anti-Maus-Antikörper (Dianova, Hamburg) zugegeben, 30 min inkubiert und dann erneut gewaschen.

Die PBMCs wurden in 250µl PBS/0,1% BSA resuspendiert und mit einem FACSCalibur-Zytometer mit zwei Lasern (Becton Dickinson) durchflusszytometrisch analysiert. Tote Zellen und Monozyten wurden mit Hilfe des Seitwärts- und Vorwärtsstreulichts von der Zählung ausgeschlossen („forward and side scatter gating"). Je Probe wurden mindestens 10000 Ereignisse gemessen und mit der CELLQUEST™-Software analysiert. Anschließend wurden nach weiterer Untersuchung der Daten bivariate *Dot plots* erstellt, um die Häufigkeit darzustellen, in der einzelne Zellen XCL1 und einen der untersuchten Oberflächenmarker koexprimierten. Zur Kontrolle der Spezifität des Färbeprozesses wurden Zielzellen mit einem (nach dem Isotyp passenden) Immunglobulin irrelevanter Spezifität bei

gleicher Konzentration für jeden Fluoreszenzkanal inkubiert. Die statistische Analyse der coexprimierten intrazellulären Chemokine wurde nach einem zuvor beschriebenen Verfahren (Blaschke et al. 2003) vorgenommen.

2.2.3 Immunhistochemie

2.2.3.1 Prinzip

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren zur Darstellung spezifischer Zellen bzw. von bestimmten Zellbestandteilen in histologischen Schnitten. Dabei kommen Antikörper zum Einsatz, die gegen spezifische Oberflächenmarker oder Antigene dieser Zellen gerichtet sind. Dies kann sowohl **direkt** (Farbstoff-gekoppelter Primärantikörper) als auch **indirekt** geschehen.

Bei der indirekten Immunhistochemie bindet ein Farbstoff/Enzym-gekoppelter Antikörper (Sekundärantikörper) an den Primärantikörper.
Da mehrere Sekundärantikörper an das Fc-Fragment des Primärantikörpers binden bzw. ein Enzym mehrere Substratmoleküle umsetzen kann, resultiert eine Signalverstärkung (kurz: *Antigen + Primärantikörper + Sekundärantikörper mit gekoppeltem Farbstoff (bzw. Enzym + Substrat/Chromogen) = Farbe)*. Die indirekte Immunhistochemie ermöglicht folglich die Darstellung geringerer Mengen Antigene als die direkte Immunhistochemie.

Bei der Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden Antikörper mit gekoppeltem Fluoreszenz-Farbstoff verwendet. Bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren diese Fluorochrome Licht einer definierten energieärmeren Wellenlänge. Im Mikroskop können sie so sichtbar gemacht und anhand ihrer spezifischen Fluoreszenzeigenschaften voneinander unterschieden werden.

2.2.3.2 Vorgehen

Vorbereitung

Die Vorbereitung der Gewebeproben erfolgte nach dem folgenden Schema:

Zunächst wurden in Paraffin fixierte Gewebeschnitte von 4-6 µm Dicke aus Nierenbiopsien von Patienten mit WG und Patienten mit benigner Nephrosklerose (Kontrolle) hergestellt.

Die beschichteten Objektträger wurden zweimal für je zehn Minuten in ein Bad aus Xylol (100%) getaucht. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für jeweils fünf Minuten in einer absteigenden Folge von Ethanol(EtOH)-Lösungen getaucht. Verwendet wurden hier zunächst 100%ige, dann 90%ige und zuletzt 70%ige Lösungen. Nach Abschluss der Reihe wurden die Objektträger vorsichtig mit Wasser gespült. Es folgten eine 5-minütige Behandlung mit TBS (TRIS Buffered Saline, 0,5M Tris, 1,5M NaCl, pH 7.6) und eine 10-minütige Behandlung mit Citratpuffer (pH 6.0, für Zusammensetzung siehe 2.1.4.3). In der Mikrowelle wurde nun der in Citratpuffer befindliche Objektträger samt Probe bei 300W für drei Minuten erhitzt. Verdunstete Pufferlösung wurde jedes Mal durch zweifach destilliertes Wasser ersetzt. Nach insgesamt dreimaliger Durchführung dieser Prozedur und einer Abkühlphase von 30 Minuten folgte ein 5-minütiges Bad in bidestilliertem Wasser und anschließend die immunhistochemische Färbung.

Indirekte Immunhistochemie

Die Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen Oberflächenepitope (CD4, CD8, CD68) und intrazelluläres Lymphotaktin(XCL1) wurde wie folgt durchgeführt:

Die vorbehandelten Gewebsschnitte wurden fünf Minuten mit Waschpuffer (TBS/0,5% Tween20) behandelt und für 60 Minuten bei RT mit einem Blockpuffer (Ziegenserum 1:10 mit TBS verdünnt) inkubiert. Die Schnitte wurden mit polyklonalem Kaninchen-Anti-humanXCL1-Antikörper (TEBU-Bio, Offenbach; 1:100 verdünnt in TBS/1%BSA) in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert. 30 Minuten nach Applikation von mit Cy5 (Indodicarbocyanin; Absorption 650 nm, Emission 670nm, infrarote Fluoreszenz)-konjugiertem Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (Dianova, Hamburg; 1:50 in TBS/1% BSA verdünnt) wurde spezifisch gebundener Antikörper nach Waschung mit TBS/0,5%Tween20 detektiert. Die

Markierung der Oberflächenmarker CD4, CD8 und CD68 erfolgte mit Hilfe von monoklonalen Maus-Anti-Human-Antikörpern (anti-CD4 mAk, NCL-CD4-368; anti-CD8 mAk, NCL-CD8-295; anti-CD68 mAk, NCL-CD68-KP1; alle Novocastra, Dossenheim) nach vorheriger Verdünnung (1:100 in TBS/1%BSA) über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden nach einem weiteren sorgfältigen Waschvorgang mit TBS/0,5% Tween20 mit Cy3 (Indocarbocyanin; Absorption 550 nm, Emission 570 nm rote Fluoreszenz)-konjugiertem Ziege-Anti-Maus-Antikörper (Dianova; 1:100 verdünnt) für 30 Minuten bei RT inkubiert. Den Negativkontrollen wurden irrelevante Antikörper der gleichen Spezies beigemengt oder Primär- bzw. Sekundärantikörper vorenthalten. Die Schnitte wurden dann mit *Vectashield® mounting medium* (Vector Laboratories, Burlingame, USA) behandelt, um die Fluoreszenz zu erhalten. Um die nukleäre DNS (Desoxyribonukleinsäure) sichtbar zu machen, wurde eine Kontrastfärbung mit 4`,6`-Diaminidino-2-phenylindolyl-dihydrogenchlorid (DAPI, Merck, Darmstadt) vorgenommen.

2.2.3.3 Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

In seinem Aufbau gleicht das Fluoreszenzmikroskop im Wesentlichen dem des Lichtmikroskops.

Das aus einer Lichtquelle (meist Laser, Quecksilberdampf- oder Xenonleuchte) emittierte Licht trifft auf einen „Anregungsfilter“ (optischer Filter, der aus dem Spektrum der Lichtquelle das Anregungsspektrum des Floureszenzfarbstoffes herausfiltert). Das Licht wird nun im Mikroskop von einem sog. dichroitischen (=dichromatischen) Spiegel auf das Präparat reflektiert. Trifft der Lichtstrahl auf das Fluorochrom-markierte Objekt, beginnt dieses zu fluoreszieren, Licht langwelligeren Spektrums wird emittiert. Dieses langwelligere Licht wird durch den dichroitischen Spiegel vom reflektierten „Anregungslicht“ getrennt. Der Spiegel besitzt eine kritische Wellenlänge (zu wählen nach der verwendeten Substanz), kurzwelligere Strahlung wird reflektiert, während langwelligere durch ihn passieren kann. Mittels eines Emissionsfilters kann das Licht nun noch auf ein bestimmtes Wellenspektrum eingeengt werden (Fluoreszenzlicht kann mehrere Emissionsspitzen verschiedener Wellenlängen haben). So gelangt es dann durch das Okular zum Auge des Betrachters bzw. zur Kamera des angeschlossenen Computers (siehe Abb. 9)

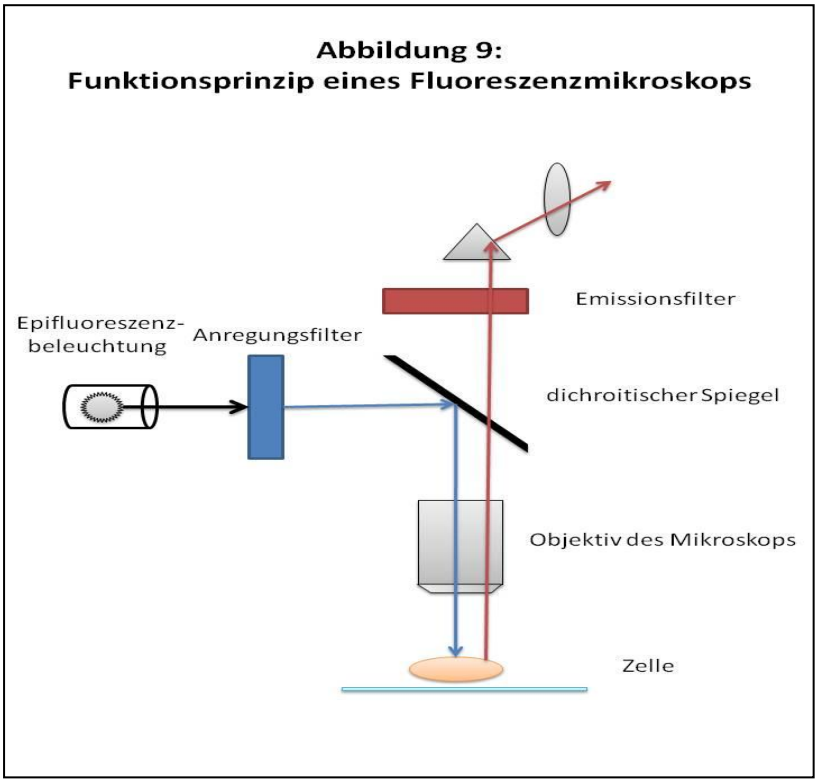


Abbildung 9: Funktionsprinzip des Fluoreszenzmikroskops

2.2.3.4 Mikroskopische Analyse

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden unter Benutzung eines inversen Fluoreszenzmikroskopes (IX71, Olympus, Hamburg) untersucht. Dieses Gerät ist sowohl mit einer HBO-Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe als auch einer XBO-Xenon-Kurzbogenlampe ausgestattet, um eine optimale Exzitation zu gewährleisten. Hochtransparente Schmalband-Filter (AHF, Tübingen) wurden für die jeweiligen Kanäle verwendet.

Eine höchst sensible Schwarz-Weiß-Kamera (F-VIEW II, Olympus), angeschlossen an einen PC mit installierter cell^F® Software (Olympus), wurde zur Aufnahme von Schwarz-Weiß-Bildern jedes Fluoreszenzkanals verwandt. Diese einzelnen Bilder wurden dann mit Hilfe der „multifluorescence imaging process“(MFIP) Funktion von cell^F® zu farbigen Bildern mit 3x16 Bit überlagert und ausgewertet.

2.2.4 Stimulation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PNG) mit rekombinantem XCL1

Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNG) wurden mit Hilfe von Dextran-Sedimentation, Dichtegradienten-Zentrifugation und hypotoner Lyse der verbliebenen Erythrozyten aus dem Blut isoliert (Dubravec, Spriggs et al. 1990). Die Reinheit der isolierten Zellen wurde durch Erstellung eines Differentialblutbildes (differential cell count) mit Wright-Färbung überprüft. Schließlich wurden die PNG gewaschen und mit RPMI 1640 Medium (GibcoBRL), mit 1% Insulin-Transferrin-Selenium (ITS, GibcoBRL) und 100IU/ml Penicillin/100µg/ml Streptomycin, bei einer Dichte von $5x10^6$/ml resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit rekombinantem, humanen XCL1 (100, 200, 500ng/ml, R&D Systems) für 24 Stunden stimuliert. Den Kontroll-Zellsuspensionen wurde Anti-humanXCL1-Antikörperlösung (1000ng/ml, R&D Systems) zugegeben.

Die Überstände der PNG-Zellkulturen wurden vor und nach Stimulation mit XCL1 gesammelt. Die PNG wurden in TriZol® Reagenz (GibcoBRL) für RNA(Ribonukleinsäure)-Isolation resuspendiert. Anschließend wurde eine quantitative RT-PCR (Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion), wie zuvor von Blaschke et al. etabliert (Blaschke et al. 2003), durchgeführt.

In den zellfreien Überständen wurde die IL-8 Konzentration mittels ELISA gemessen. Die Durchführung des Tests erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Sanquin, Amsterdam, Niederlande). Die Nachweisgrenze für IL-8 lag bei 3 pg/ml. Zur Untersuchung der Kinetik wurden die IL-8-Konzentrationen vor Zusatz des XCL1 sowie nach 1h, 2h, 12h und 24h Inkubation gemessen. Zur Prüfung der Dosisabhängigkeit wurden PNG mit verschiedenen Konzentrationen von XCL1 stimuliert (100ng/ml, 200ng/ml, 500ng/ml).

2.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der *Prism* 5.0 Software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Alle ermittelten Werte werden als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Statistische Unterschiede wurden mit *Student`s t-Test* untersucht. Die statistische Analyse der XCL1-Serumkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des *Mann-Whitney U Tests*. Die *P*-Werte wurden mit zweiseitigen Berechnungen bestimmt. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem *P*-Wert von <0.05 bewertet.

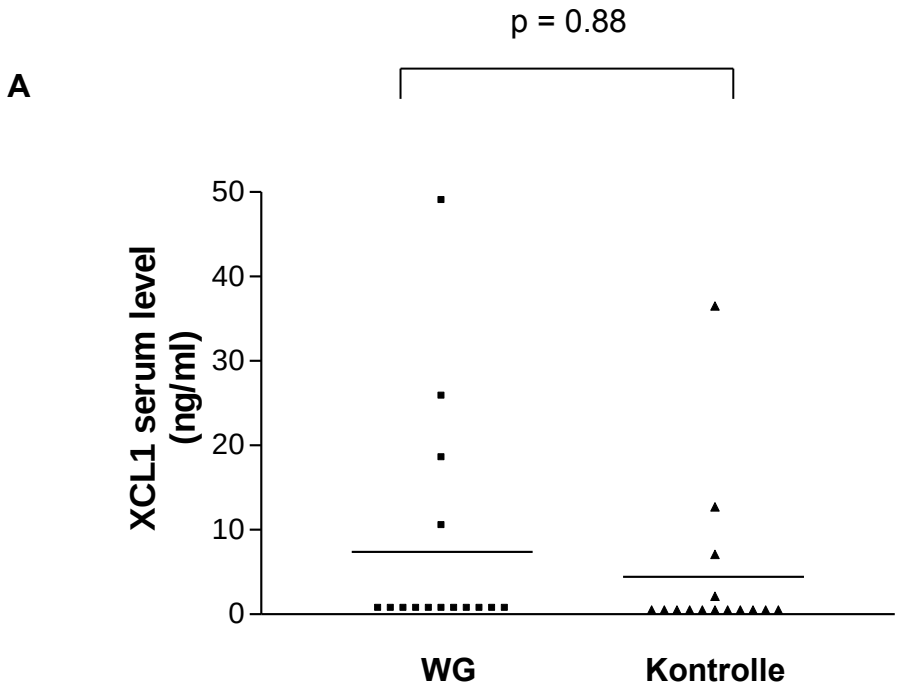
3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Präsenz des C-Klasse Chemokins Lymphotaktin in Sera, mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Nierengewebsproben von WG-Patienten analysiert und die mögliche funktionelle Bedeutung dieses Chemokins für die Pathogenese dieser Erkrankung untersucht.

3.1 Analyse der Serum-XCL1-Spiegel von WG-Patienten und gesunden Kontrollen

Von 16 Patienten mit Wegener'scher Granulomatose und 16 in Alter und Geschlecht vergleichbaren gesunden Probanden wurden Serumproben gewonnen. Die XCL1-Serumkonzentrationen der WG-Patienten lagen zwischen 0,68 ng/ml und 48,9 ng/ml (Mittelwert: 7,4 ± 13,9ng/ml). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen (p= 0.88; vgl. Abb. 10a). Des Weiteren wurden anhand von BVAS (Birmingham Vasculitis Activity Score) und CRP-Spiegeln Lymphotaktin-Serumkonzentrationen bei Patienten mit aktiver Erkrankung (n= 6) und solchen in vollständiger Remission (n= 10) verglichen. Auch in diesem Fall ließ sich kein signifikanter Unterschied der XCL1-Serumspiegel detektieren (p=0.71; vgl. Abb. 10b).

Abb. 10: XCL1-Serumkonzentrationen von WG-Patienten und gesunden Kontrollen



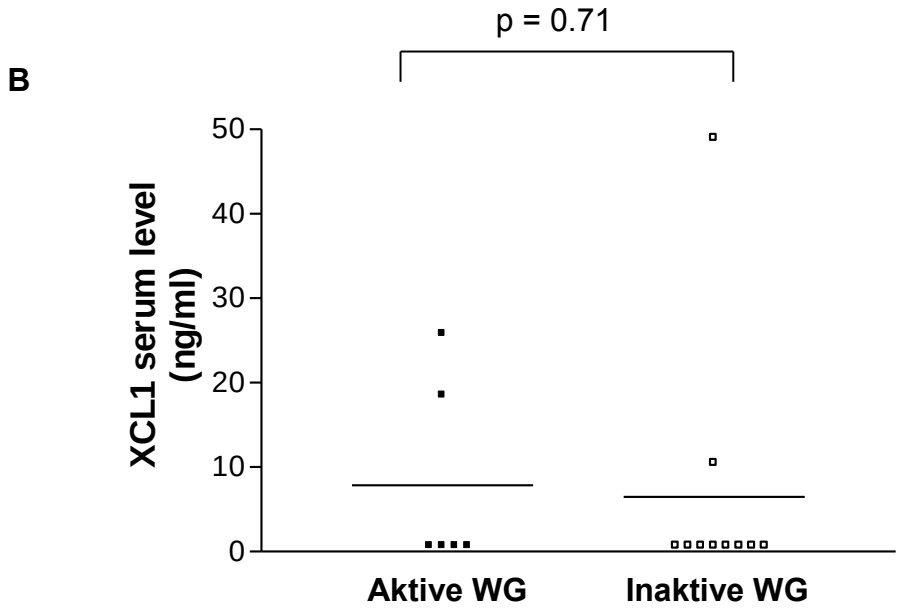


Abbildung 10: Messung der Serum-XCL1-Konzentrationen in Sera von 16 WG-Patienten und 16 gesunden Kontrollen mittels ELISA. A: Im Vergleich der XCL1-Konzentrationen von Gesunden und WG-Patienten ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (p=0.88). B: Auch zwischen Patienten mit aktiver Erkrankung und Patienten in Remission konnte keine signifikante Differenz detektiert werden (p=0.71) (Blaschke et al 2009, S. 2498).

3.2 Immunphänotypisierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten in WG-Patienten und Kontrollen

Zur Immunphänotypisierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten wurden zunächst PBMC aus Blutproben von WG-Patienten und gesunden Kontrollen isoliert. Durchflusszytometrische Untersuchungen dieser PBMCs zeigen eine signifikant erhöhte Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 oder HLA-DR bei CD4⁺- (Abb. 11a) und CD8⁺-T-Zellen (Abb. 11b) von WG-Patienten.

Abb. 11: Koexpression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 oder HLA-DR

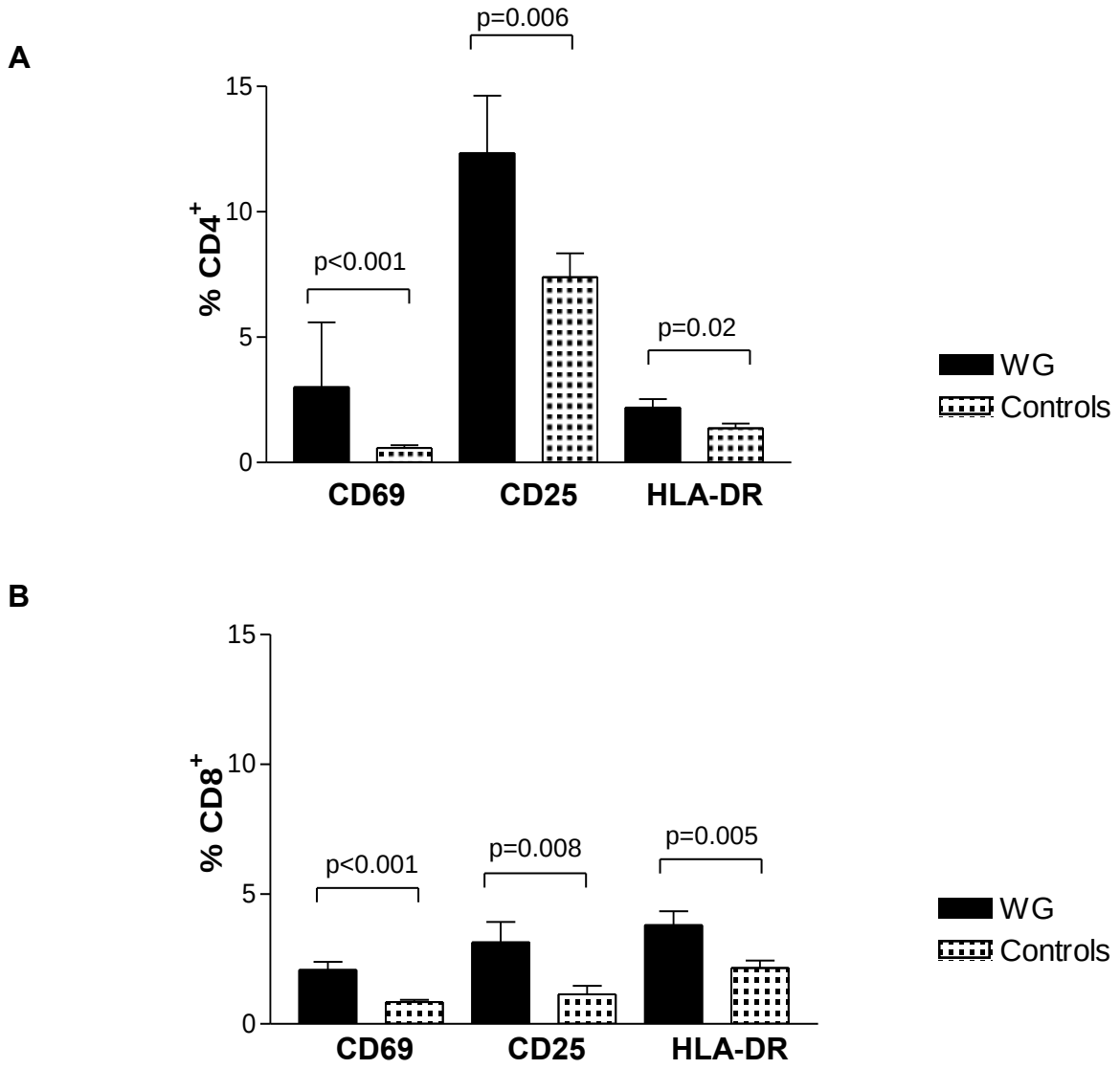


Abbildung 11: PBMC wurden von 16 WG-Patienten und 16 gesunden Kontrollen gewonnen. Ein signifikant größerer Anteil sowohl der CD4⁺- (A) als auch CD8⁺- (B) T-Lymphozyten der WG-Patienten exprimierten im Vergleich zu den Kontrollen die Aktivierungsmarker CD25, CD69 oder HLA-DR (Blaschke et al 2009, S. 2494).

3.3 Vergleich der Expression von XCL1 in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes von WG-Patienten und gesunden Kontrollen

Die intrazelluläre Expression von Lymphotaktin in PBMCs wurde nach Färbung des Chemokins ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert. In den unstimulierten PBMCs ließ sich weder bei den WG-Patienten noch bei den Kontrollen eine konstitutive Produktion von XCL1 nachweisen.

Nach fünfstündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin konnte in 14,38 ± 2,41% der $CD8^+$- und 5,2 ± 1,29% der $CD4^+$-T-Zellen eine Expression von XCL1 nachgewiesen werden (Abb. 12A). Im Vergleich der WG-Patienten mit den gesunden Kontrollen zeigten erstere einen signifikant höheren Prozentsatz von XCL1-exprimierenden $CD4^+$- und $CD8^+$-T- Zellen ($p=0.003$ bzw. $p=0.001$).

Um die XCL1-exprimierenden Subtypen der $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Lymphozyten näher zu charakterisieren, erfolgte die farbliche Markierung des kostimulatorischen Moleküls CD28 auf PBMCs. Der Vergleich von WG-Patienten und Kontrollen von $CD4^+$-T-Zellen, welche den Oberflächenmarker CD28 nicht exprimierten ($CD4^+CD28^-$), zeigte, dass ein signifikant größerer Anteil der $CD4^+CD28^-$- Zellen von WG-Patienten XCL1 produzierte ($p=0.007$) (siehe Abb. 12B). Darüber hinaus wurde eine XCL1-Produktion durch $CD8^+CD28^-$-T-Zellen überwiegend bei WG-Patienten gefunden (Abb. 12C), der Unterschied zu den Kontrollen war aber statistisch nicht signifikant (Abb. 12C). Die durchflusszytometrische Analyse der aus WG-Patienten isolierten T-Zellen zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen WG-Patienten mit aktiver und solchen mit inaktiver Erkrankung bezüglich der Expressionshäufigkeit in sowohl $CD4^+$- als auch $CD8^+$-T-Zellen ($p<0.001$)(Abb. 12D).

Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse der XCL1-Expression von PBMC von WG-Patienten und gesunden Kontrollen

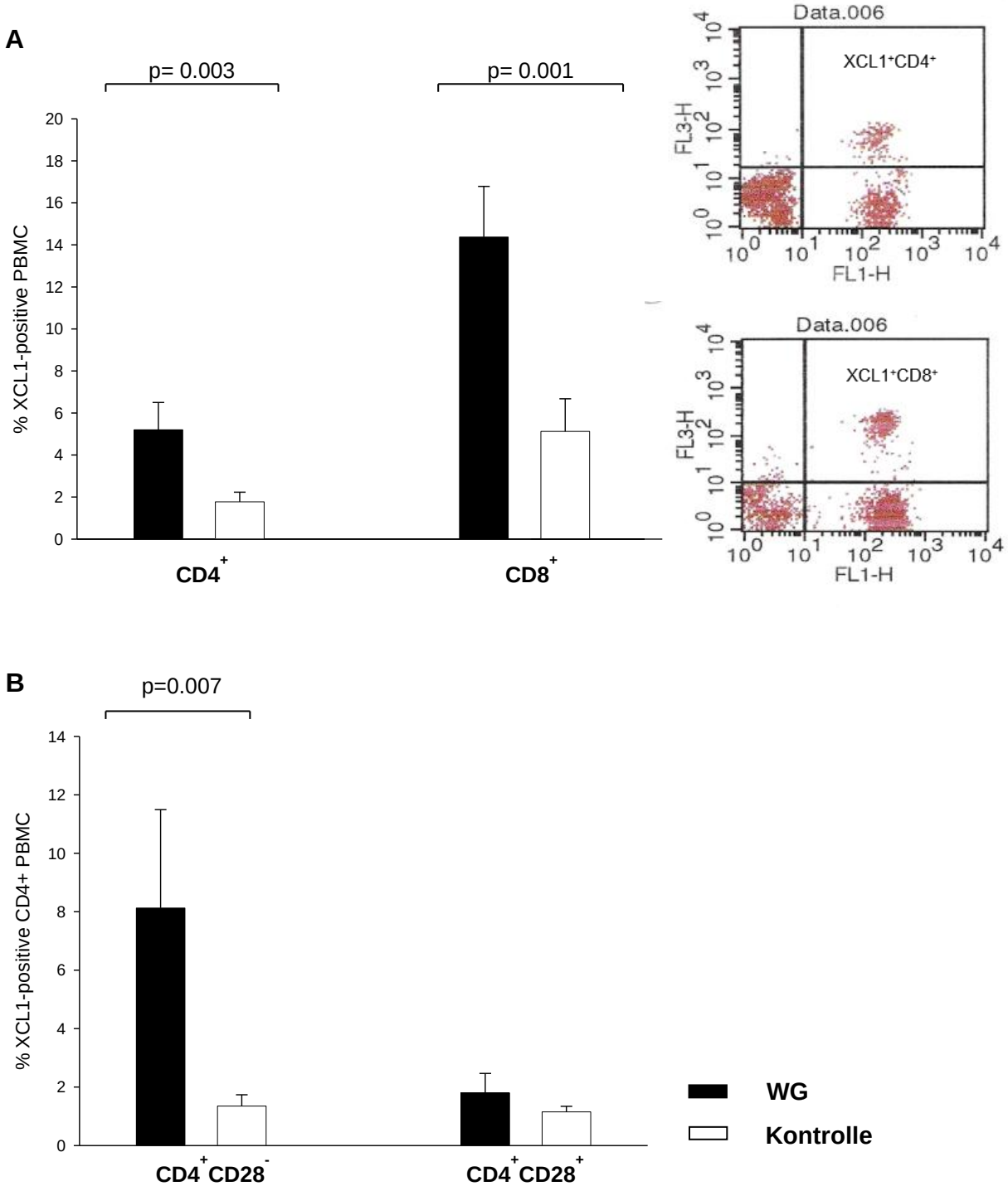


Abbildung 12: Analyse der XCL1-Expression in PBMC nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Ein signifikant höherer Anteil der $CD4^+$- bzw. $CD8^+$-T-Lymphozyten von WG-Patienten exprimierte XCL1 im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe (A). Ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war der Anteil der XCL1-produzierenden $CD28^-CD4^+$-T-Zellen (p=0.007)(B)(Blaschke et al 2009, S.2495).

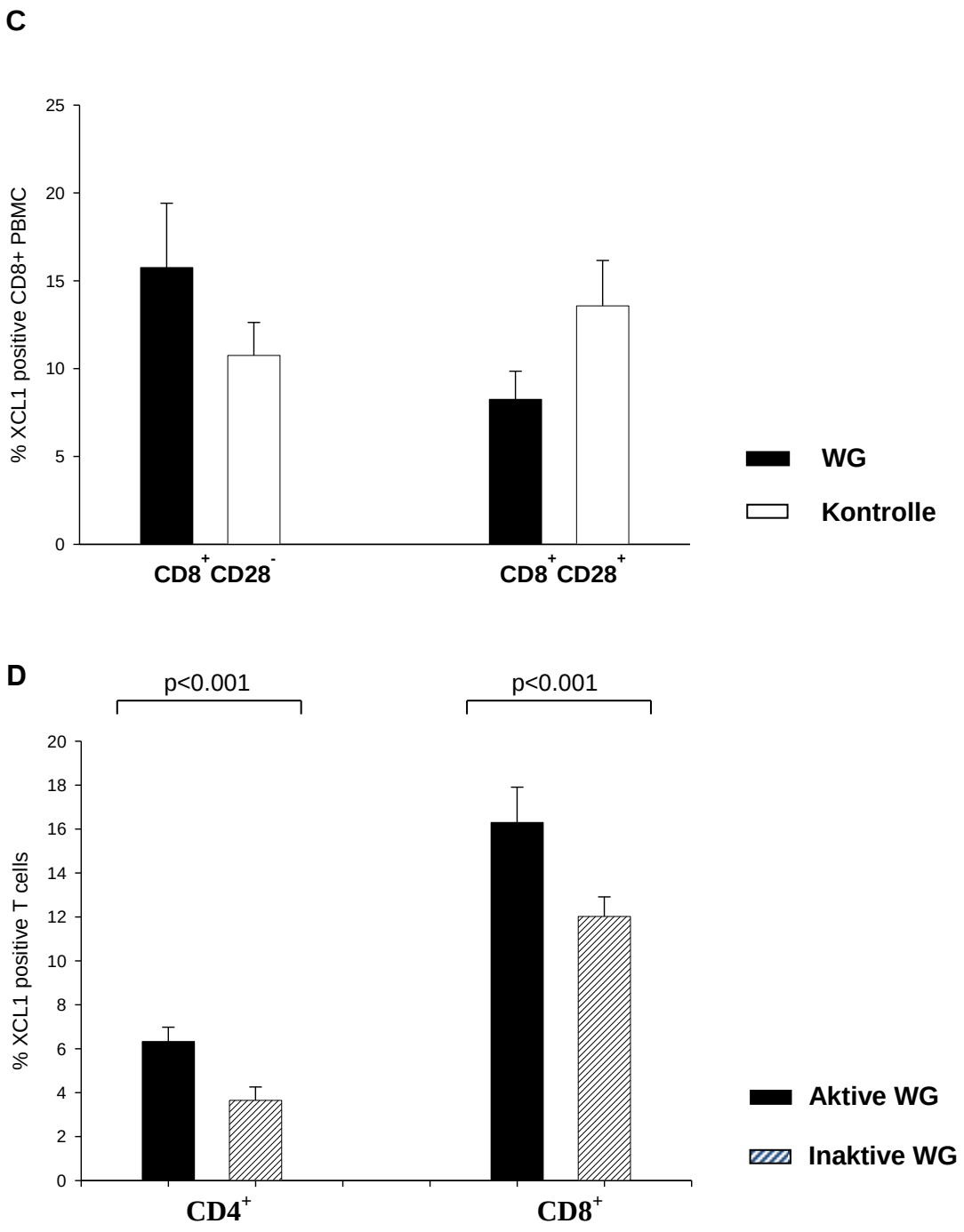


Abbildung 12 (Fortsetzung): XCL1-Produktion fand sich hauptsächlich in der CD28⁻-Subpopulation der CD8⁺-T-Zellen von WG-Patienten. Es bestand jedoch keine statistisch signifikante Differenz zwischen WG-Patienten und Kontrollen bezüglich des Anteils der XCL1-exprimierenden CD8⁺CD28⁻-T-Lymphozyten (C). Im Vergleich zwischen Patienten mit aktiver und inaktiver WG-Erkrankung zeigten jene mit aktiver WG einen signifikant höheren Anteil XCL1-produzierender CD4⁺-und CD8⁺-T-Zellen (D) (Blaschke et al 2009, S. 2495).

3.4 Expression von XCL1 in Biopsien des Nierengewebes von WG-Patienten

Um die Expression von Lymphotaktin an Orten der aktiven granulomatösen Entzündung zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von Nierenbiopsien von WG-Patienten angefertigt. Die Nierengewebeproben von fünf WG-Patienten, die zur weiteren diagnostischen Abklärung bei serologischem Verdacht auf eine systemische Vaskulitis entnommen worden waren, wurden mittels immunhistochemischer Doppelfärbung von XCL1 und den Oberflächenmarkern CD4, CD8 und CD68 weiter analysiert.

Wie Tabelle 4 zeigt, lag bei allen Patienten eine hohe Krankheitsaktivität (gemessen mit BVAS-Score und CRP-Serumspiegeln) vor. Zusätzlich war bei allen Patienten cANCA (Titer 1:160 – 1:640) und PR3 (7 - 279U/ml) nachweisbar. Klinisch manifestierte sich die Nierenbeteiligung als Mikrohämaturie mit Akanthozyten und/oder Proteinurie (sog. aktives nephritisches Sediment). In drei Fällen lag histopathologisch eine fokal-segmentale, in zwei Fällen eine diffuse nekrotisierende Glomerulonephritis vor. Extrakapilläre Proliferation mit Halbmondbildung war in drei Fällen nachweisbar.

Die immunhistochemische Färbung für XCL1/Lymphotaktin zeigte eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der granulomatösen Läsionen (Abb. 13). XCL1 konnte überwiegend in den lymphozytären Infiltrationen des Interstitiums nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Glomeruli. Mit Hilfe der Doppelmarkierungen (CD4, CD8, CD68; Cy3-konjugiert, grüne Fluoreszenz) konnte XCL1 (Cy5-konjugiert, rote Fluoreszenz) in $CD4^+$(Abb. 13)- und in $CD8^+$(Abb.14)-T-Zellen, aber nicht in ortsständigen Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie ($CD68^+$-Makrophagen, Abb. 15) nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Expression von XCL1 und den Zelloberflächenantigenen CD4 oder CD8 wird als eine gelbe Markierung – durch Überlagerung der entsprechenden roten und grünen Fluoreszenz sichtbar. Weder die Isotypenkontrollen noch die Gewebeschnitte von Biopsien von Patienten mit benigner Nephrosklerose, IgA Nephropathie (ohne Abbildung) oder Lupusnephritis WHO Klasse IV (Abb. 16) zeigten eine Expression von XCL1.

Um die verschiedenen einzelnen Antikörperfärbungen voneinander unterscheiden zu können, wurde zur Auswertung der jeweiligen Intensitäten der einzelnen Fluoreszenzen die Software cell^F® (Olympus, Hamburg) eingesetzt. Die Intensität

der Fluoreszenz für Cy3 (grün) und Cy5 (rot) auf der horizontalen Linie wurde als Intensitätskurve am unteren Bildrand eingesetzt (Abb. 13 und 14). Wie bereits bei der durchflusszytometrischen Analyse der PBMCs waren auch bei der Untersuchung der Gewebeschnitte die $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Lymphozyten als Hauptquelle der XCL1-Expression bei WG-Patienten nachweisbar. In Gewebeschnitten aus Nierenbiopsien von Patienten mit fokal segmentaler Nephrosklerose zeigte sich keine XCL1-Expression (ohne Abbildung). Die oben genannten Kontrollen zeigten keine spezifischen Färbungen.

Abb. 13-16: Expression von XCL1 in Nierenbiopsien von Patienten mit WG

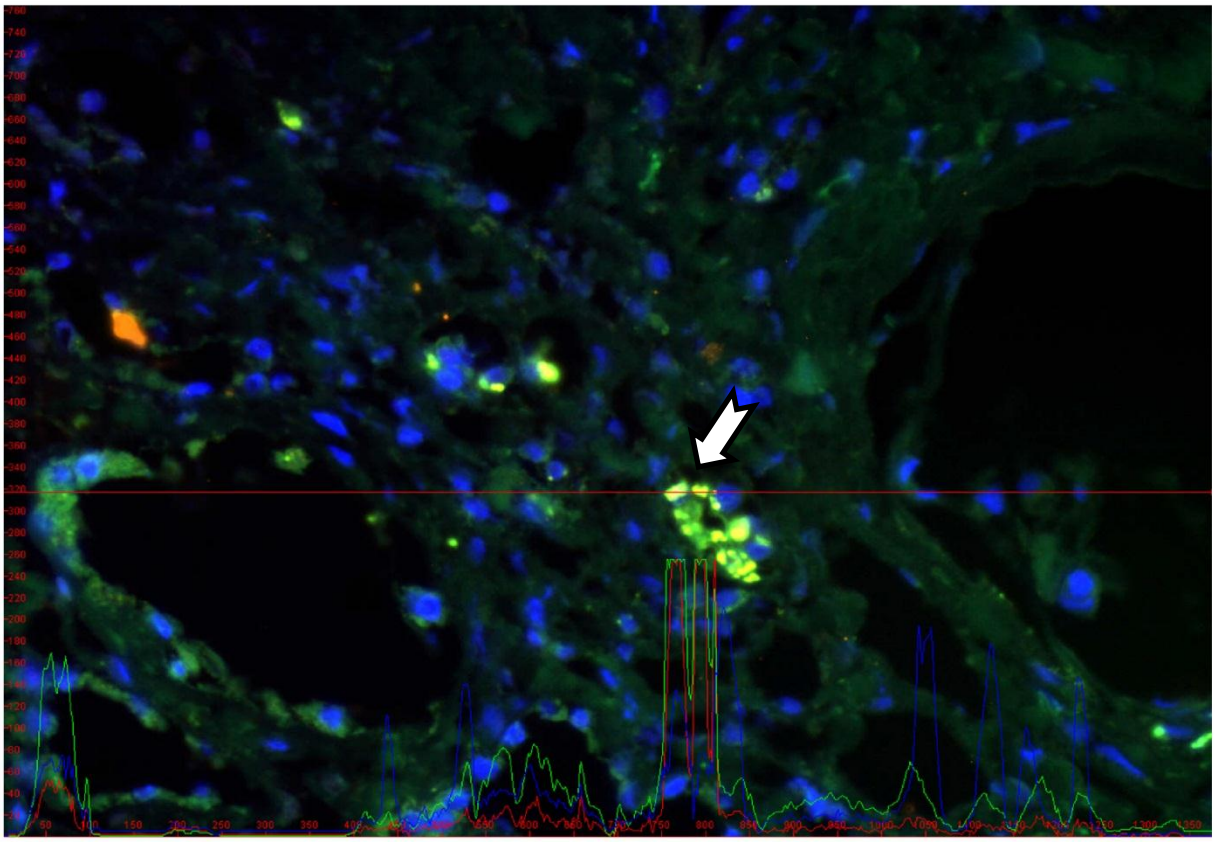


Abbildung 13: XCL1-Expression konnte in interstitiellen Lymphozyteninfiltraten nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Glomeruli. Doppelfärbung für XCL1 (Cy5-konjugiert, rot) und CD4 (Cy3-konjugiert, grün) zeigte, dass CD4^{+}-T-Zellen XCL1 exprimierten, die Co-Lokalisation von CD4 und XCL1 wird dargestellt durch gelbe Fluoreszenz (Pfeil) (Blaschke et al 2009, S. 2496).

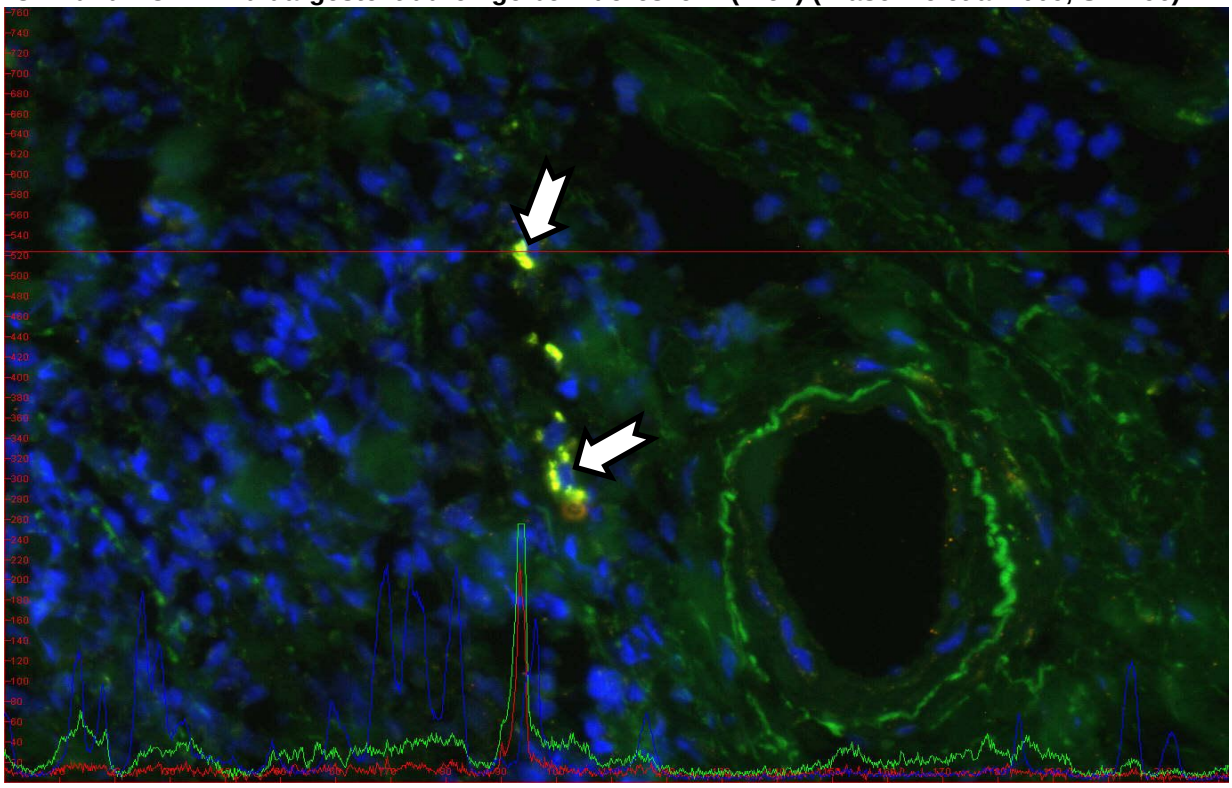


Abbildung 14: XCL1-Expression konnte in interstitiellen Lymphozyteninfiltraten nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Glomeruli. Doppelfärbung für XCL1 (Cy5-konjugiert, rot) und CD8 (Cy3-konjugiert, grün) zeigte, CD8^{+}-T-Zellen XCL1 exprimierten, die Co-Lokalisation von CD8 und XCL1 wird dargestellt durch gelbe Fluoreszenz (Pfeile) (Blaschke et al 2009, S. 2496).

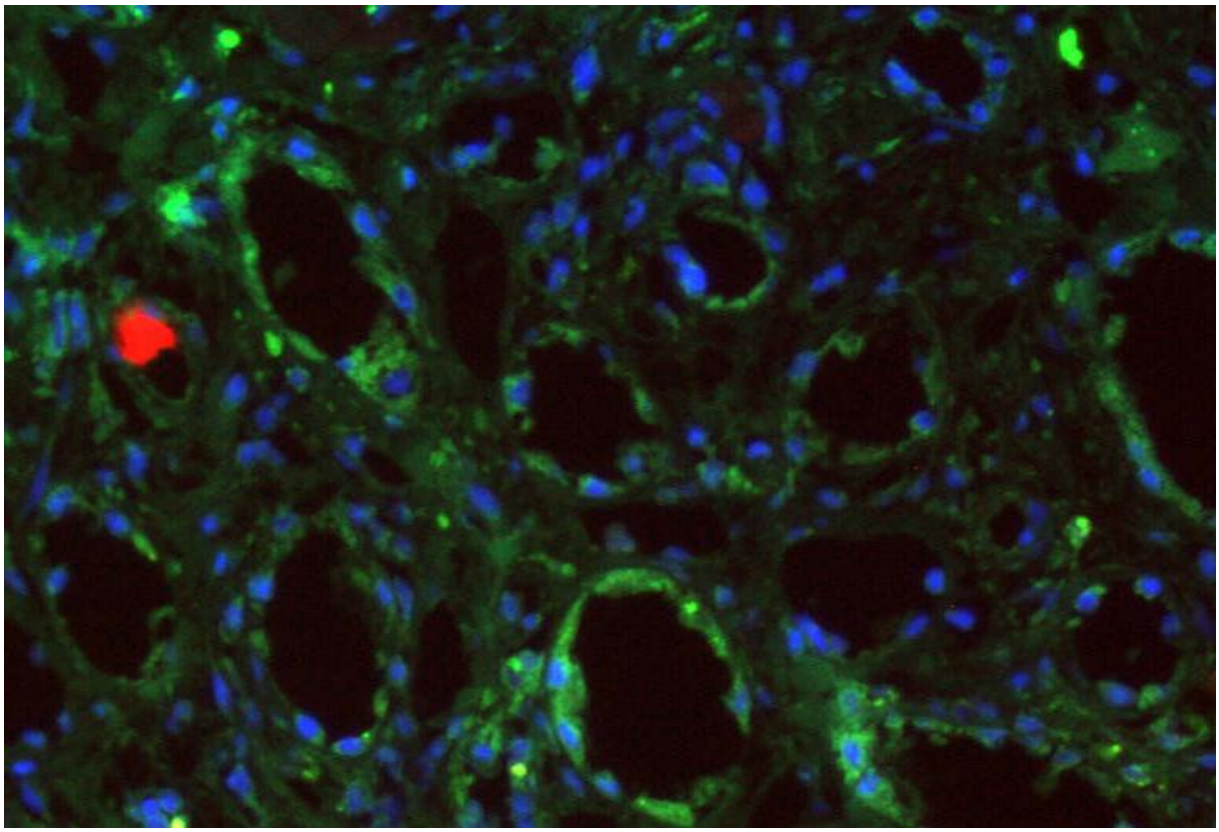


Abbildung 15: Makrophagen zeigten keine XCL1-Expression. (Blaschke et al 2009, S. 2496)

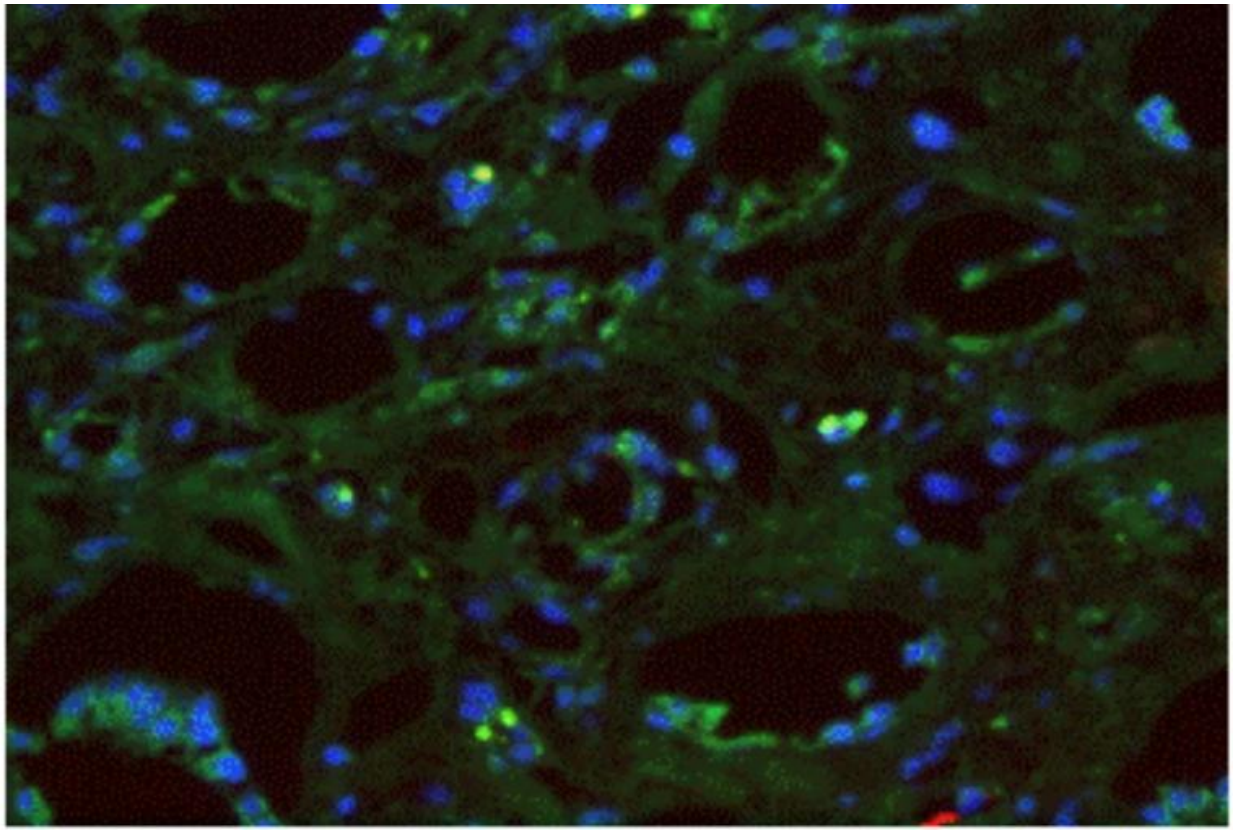


Abbildung 16: Die Isotypenkontrollen und Biopsien von Patienten mit Lupusnephritis WHO-Klasse IV (Abb 16.), benigner Nephrosklerose oder IgA-Nephritis (beide nicht abgebildet) zeigten ebenfalls keine Expression von XCL1 (Blaschke et al 2009, S. 2496).

3.5 Vermehrte Expression von IL-8 in XCL1-stimulierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNG)

Um die Funktion von XCL1 bei WG zu analysieren, wurden PNGs aus WG-Patienten isoliert und *in vitro* mit verschiedenen Konzentrationen von humanem rekombinanten XCL1 stimuliert.

Die cDNA-Microarray-Analyse von RNA-Proben aus stimulierten und unstimulierten Zellkulturen wiesen auf eine mögliche Hochregulation der IL-8-Produktion bei den stimulierten PNGs hin. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde der Überstand der PNG-Kulturen mittels ELISA auf sezerniertes IL-8 untersucht. Abbildung 17 zeigt, dass IL-8-Produktion bei den XCL1-stimulierten PNG-Kulturen signifikant erhöht war. Die Stimulation mit 100ng/ml XCL1 über 24h erhöhte die IL-8-Spiegel auf das bis zu 20-fache (Abb. 17a). Diese Steigerung konnte durch die additive Gabe von anti-humanXCL1-Antikörpern vollständig blockiert werden. Die Zunahme der IL-8-Produktion war zeit- (Abb. 17b) und dosisabhängig (Abb. 17c). Die in den Abbildungen 17 a-c gezeigten Ergebnisse wurden durch mindestens drei unabhängige Experimente bestätigt.

Abb. 17: IL-8-Produktion in mit XCL1-stimulierten PNG

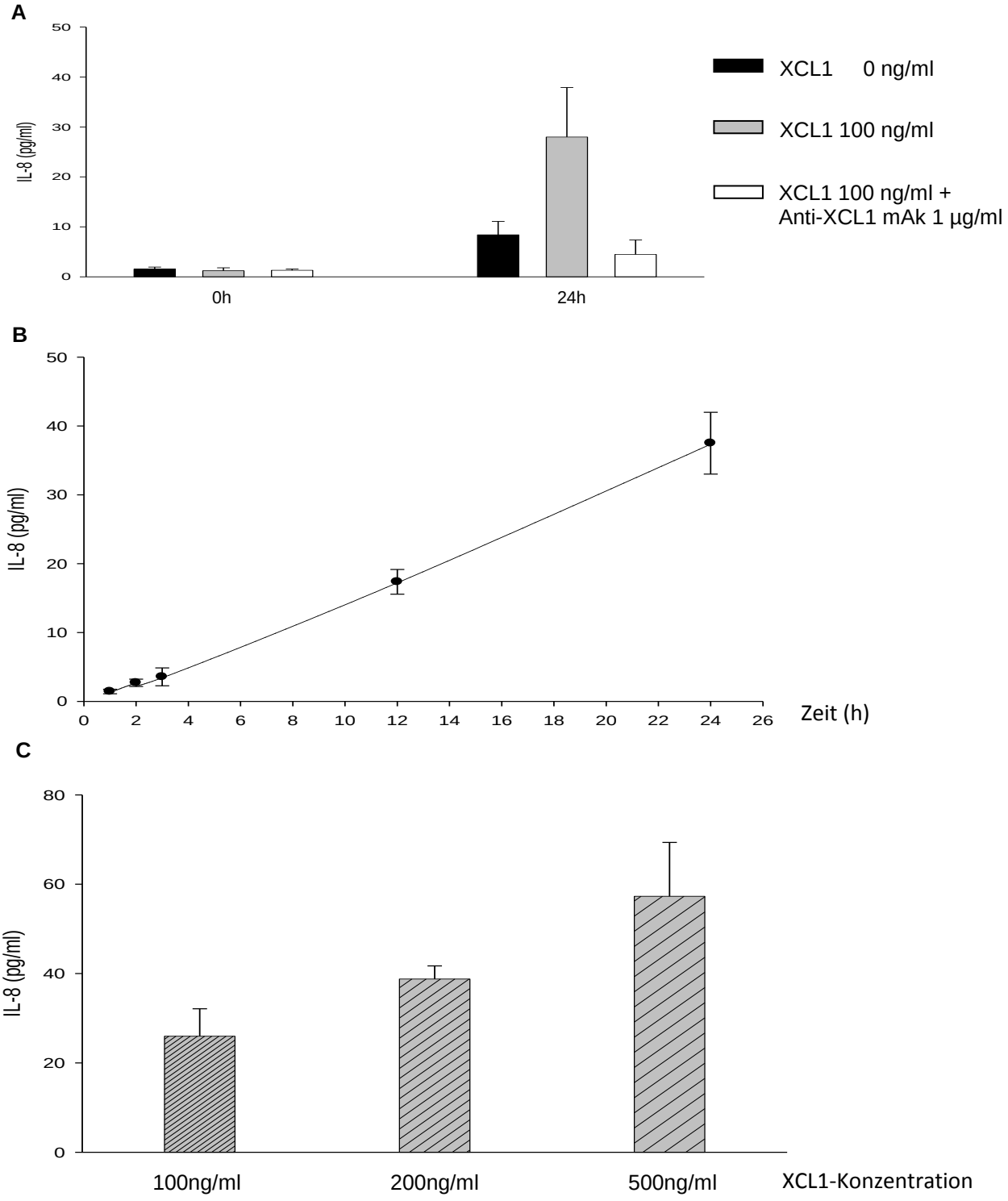


Abbildung 17: Mit Hilfe eines ELISA-Tests ermittelte IL-8-Konzentrationen aus dem Überstand von mit XCL1-stimulierten PNG-Zellkulturen (A). Kinetik der XCL1-induzierten IL-8-Freisetzung aus PNG (B). Dosisabhängigkeit der XCL1-induzierten IL-8-Freisetzung (C) im Überstand mit verschiedenen Konzentrationen (100ng/ml, 200ng/ml, 500ng/ml) in XCL1-stimulierten PNG-Kulturen (Blaschke et al 2009, S. 2497).

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde erstmalig die Expression und die funktionelle Rolle von Lymphotaktin (XCL1) in Serum, PBMC und Nierenbiopsien von Patienten mit Wegener'scher Granulomatose untersucht.

4.1 Analyse der XCL1-Serumkonzentrationen

Die durchgeführten Serumanalysen bezüglich der XCL1-Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WG-Patienten und Kontrollen zeigen. Auch eine Korrelation zwischen Serumspiegeln und klinischer Aktivität bei WG-Patienten ließ sich nicht erkennen. Da die Patienten zum Zeitpunkt der Probengewinnung jedoch schon mit Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid, Methotrexat und/oder Azathioprin behandelt wurden (siehe Tabelle 1), sind diese Ergebnisse zunächst als vorläufig zu betrachten. Eine Bestimmung der XCL1-Serumkonzentrationen sollte nachfolgend auch bei WG-Patienten vor Beginn der Therapie erfolgen. Sollten die in dieser Arbeit erhobenen Daten dann bestätigt werden, könnte dies im Zusammenhang mit den immunhistochemischen Daten dieser Studie als Hinweis darauf gewertet werden, dass XCL1 seine Wirkung vorwiegend im Bereich der lokalen aktiven Entzündung entfaltet.

4.2 Durchflusszytometrische Analyse der PBMC

Frühere Studien haben gezeigt, dass HLA-DR$^+$CD4$^+$- T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Granulomen im Rahmen der Pathogenese der WG spielen. Diese T-Zell-Subpopulation scheint - durch verstärkte Produktion der T_H1-Zytokine IFN-γ und TNF-α im peripheren Blut (Ludviksson et al. 1998) und an Orten der granulomatösen Entzündung (Csernok et al. 1999) - die Expansion von T_H1-Typ-CD4$^+$-Zellen zu stimulieren. Die vorliegende durchflusszytometrische Analyse der PBMC von WG-Patienten zeigt, dass ein signifikant höherer Anteil sowohl an CD4$^+$- als auch CD8$^+$-T-Zellen die Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR im Vergleich zu den gesunden Kontrollen exprimieren. Darüber hinaus ergaben die vorliegenden Untersuchungen, dass bei WG-Patienten der Anteil XCL1-positiver CD4$^+$- und CD8$^+$-T-Zellen ebenfalls höher ist. Da XCL1 funktionell die Rolle eines T_H1-Zytokins bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen übernimmt (Dorner et al. 2002), unterstützen diese Befunde die Hypothese, dass auch bei der WG eine T_H1-vermittelte T-Zell-Antwort vorliegt.

$CD4^+$-T-Lymphozyten, welche das kostimulatorische Molekül CD28 nicht exprimieren ($CD28^-$), zeigen ein T_H1-Typ-Zytokinprofil (IFN-γ, TNF-α). Dieser Zelltyp wurde bei WG-Patienten in peripherem Blut und in granulomatösen Läsionen nachgewiesen. Es wird vermutet, dass die freigesetzten Zytokine die Monozytenakkumulation und die Granulomentstehung fördern (Komocsi et al. 2002). Die vorgenommenen Untersuchungen zeigten in Übereinstimmung mit Untersuchungsdaten einer früheren Studie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (Blaschke et al. 2003), dass XCL1 vorwiegend in $CD4^+CD28^-$- und $CD8^+CD28^-$-T-Zellen nachweisbar war.

4.3 Analyse der Expression von XCL1 in Nierenbiopsien

Histopathologisch ist die Nierenbeteiligung im Rahmen der WG durch eine disseminierte nekrotisierende Glomerulonephritis mit interstitieller Akkumulation von T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen gekennzeichnet. Die Infiltration des Interstitiums mit mononukleären Zellen zeigt eine enge Assoziation mit der Progression von interstitieller Fibrose und Niereninsuffizienz (Atkins et al. 1996). Betrifft die zelluläre Infiltration die Glomeruli, ist dies häufig mit der Bildung von Halbmonden assoziiert. In der vorliegenden Arbeit ließ sich XCL1 mit Hilfe der immunhistochemischen Untersuchung insbesondere im Bereich der aktiven Entzündung in interstitiellen $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Lymphozyten nachweisen.

Im Rahmen entzündlicher Erkrankungen der Niere spielen Chemokine, welche an der Regulation der Rekrutierung und Aktivierung mononukleärer Zellen beteiligt sind, eine wesentliche Rolle (Schlöndorff et al. 1997; Anders et al. 2003). Dabei zeigte sich, dass insbesondere CC- und CXC-Chemokine vermehrt exprimiert werden. Bei der Wegener'schen Granulomatose fanden sich erhöhte Konzentrationen der CC-Chemokine RANTES (Regulated On Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted, CCL5), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1) (Cockwell et al. 1998; Torheim et al. 2005) und des CXC-Chemokins IL-8 (Cockwell et al. 1999). Da eine vermehrte Expression der mRNA des CX_3C-Chemokins Fraktalkin (CX3CL1) in Nierenbiopsien nachgewiesen werden konnte und auch der Komplex aus CX3CL1 und seinem Rezeptor CX3CR1 im peripheren Blut vermehrt vorkommt (Bjerkeli et al. 2007), wird derzeit vermutet, dass Fraktalkin an der Entstehung der disseminierten Vaskulitis bei WG beteiligt ist.

Die Expression von XCL1 in der Niere wurde in einer früheren Studie anhand eines Tiermodells untersucht (Natori et al. 1998). Die hierbei verwendeten Wistar-

Kyoto(WKY)-Ratten wurden mit Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran behandelt, um eine RPGN zu induzieren. Im Vergleich exprimierte das Gewebe der Nieren mit RPGN größere Mengen XCL1-mRNA als das Gewebe der gesunden Kontrollen. In normalen unveränderten Glomeruli war XCL1-mRNA nicht nachweisbar. *In-vitro*-Ergebnisse zeigten hingegen in kultivierten glomerulären Mesangialzellen und vaskulären Endothelzellen eine XCL1-Expression nach vorheriger Stimulation mit Interleukin-1β. Diese Zellen sind demnach eine potentielle Quelle einer intrinsischen XCL1-Produktion in der Niere.
In den aktuellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fand sich XCL1 in Gewebeproben von WG-Patienten ausschließlich in interstitiellen $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise durch unterschiedliche pathogenetische Mechanismen der humanen WG und der experimentellen anti-GBM-induzierten RPGN in Wistar-Kyoto-Ratten erklären. Darüber hinaus müssen die aus *in-vitro*-Experimenten mit kultivierten Mesangial- und Endothelzellen gewonnenen Erkenntnisse nicht zwingend die tatsächlich *in vivo* ablaufenden Pathomechanismen widerspiegeln.

Die Infiltration der Glomeruli mit $CD8^+$-Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation und Progression einer RPGN. Dieser Infiltration geht eine vermehrte Expression von XCL1-mRNA im Nierengewebe voraus, wie in funktionellen Analysen von XCL1 bereits gezeigt werden konnte (Natori et al. 1998). In einem Tiermodell mit WKY-Ratten, bei denen mit nephrotoxischem Serum (NTS) eine RPGN induziert wurde, konnte *in vivo* durch Depletion der $CD8^+$-Zellen die Entstehung einer Proteinurie verhindert werden. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten eine fehlende Infiltration mit $CD8^+$-T-Zellen und in der Folge auch eine Reduktion der Infiltration der Glomeruli mit Makrophagen (Kawasaki et al. 1992). Unter Berücksichtigung der bekannten chemotaktischen Wirkung von XCL1 auf $CD8^+$-Zellen und NK-Zellen (Kelner et al. 1994; Kennedy et al. 1995; Muller et al. 1995) könnte XCL1 in diesem Tiermodell der RPGN eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Lymphozyten und insbesondere der Anreicherung von $CD8^+$-Zellen spielen. Diese Funktion von XCL1 könnte dabei auch für die Pathogenese der WG-induzierten RPGN von Bedeutung sein.

Bisher waren Untersuchungen zur Expression des C-Klasse Chemokins XCL1 bei Glomerulonephritis beim Menschen auf die IgA-Nephropathie beschränkt (Ou et al.

2002). Diese Erkrankung stellt die häufigste Form einer primären Erkrankung der Glomeruli dar und repräsentiert eine der Hauptursachen der terminalen Niereninsuffizienz („end-stage renal disease“). Eine Erhöhung der XCL1-mRNA-Spiegel korrelierte in diesen Untersuchungen mit der Präsenz von glomerulären Halbmonden und der tubulointerstitiellen Fibrose. Eine vermehrte Expression von XCL1 konnte in untersuchten IgA-Nephropathie-Nierenbiopsien im Bereich der Nierenrinde lokalisiert werden. In Interstitium und Glomeruli der Kontrollen konnten nur geringe Mengen von XCL1 nachgewiesen werden. Dieser Befund deckt sich mit denen der aktuell vorliegenden Arbeit. Allerdings zeigte sich bei der IgA-Nephropathie, im Gegensatz zur WG, im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung eine XCL1-Produktion in Tryptase-positiven Zellen des Interstitiums, bei denen es sich vermutlich um Mastzellen handelt.

4.4 Analyse der funktionellen Bedeutung von XCL1 bei WG

Zur Analyse der möglichen funktionellen Bedeutung von Lymphotaktin für die Pathogenese der WG wurden in der vorliegenden Arbeit *in-vitro*-Stimulationsexperimente mit PNG durchgeführt, da diese den Lymphotaktinrezeptor XCR1 nachweislich exprimieren. Polymorphkernige Neutrophile spielen bei der Initiation der Gefäßentzündung (Vaskulitis) bei WG eine wichtige Rolle (Huang et al. 2001).

Die XCL1-stimulierten PNG zeigten im Rahmen der in dieser Arbeit vorgenommenen Experimente eine von der Dauer und Dosis der Stimulation abhängige verstärkte Expression von Interleukin-8. Durch die additive Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen humanes XCL1 ließ sich diese Stimulation der IL-8-Produktion blockieren. IL-8 wird bei WG-Patienten also demnach nicht nur in Endothelzellen und Monozyten, sondern auch in PNG produziert.

Viele WG-Patienten zeigen erhöhte IL-8-Serumspiegel (Torheim et al. 2005). Es wurde bereits beschrieben, dass die für WG spezifischen Antikörper cANCA (Ralston et al. 1997) und ihr spezifisches Antigen Proteinase-3 (Berger et al. 1996) die Freisetzung von IL-8 in Endothelzellen und Monozyten fördern. Da es sich beim CXC-Chemokin IL-8 um ein starkes Chemoattraktans für PNG handelt (Baggiolini und Clark-Lewis 1992), welches im Zusammenspiel mit TNF-α die Freisetzung lytischer Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies aus PNG induziert (siehe 1.4.5.3, S.24), kann eine Schädigung des umgebenden Gewebes (z.B. Gefäßwände)

resultieren. Diese Tatsachen weisen auf eine wichtige Rolle dieses Chemokins in der Pathogenese der disseminierten nekrotisierenden, granulomatösen Vaskulitis, wie sie bei WG vorkommt, hin. Die lokale Produktion von XCL1 im Nierengewebe könnte also über die Stimulation der IL-8-Freisetzung aus PNG wesentlich zur Entzündung der Gefäße beitragen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass XCL1 bei WG in $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen exprimiert wird. Unter Berücksichtigung der bekannten Funktion als ein wichtiges T-Zell-Attraktans könnte XCL1 in der Pathogenese der WG möglicherweise die Infiltration und Wanderung der pathogenetisch relevanten T-Zellpopulationen unterstützen.

Darüber hinaus könnte die lokale Expression von XCL1 durch interstitielle T-Zellen durch Stimulation der IL-8-Freisetzung aus PNG zur granulomatösen Vaskulitis beitragen.

Weitere Studien müssen die funktionelle Bedeutung des Chemokins Lymphotaktin analysieren und sollten zeigen, ob XCL1 daher tatsächlich ein neues Zielmolekül für die Therapie dieser Form der disseminierten Vaskulitis sein kann.

5 Zusammenfassung

Bei den primär systemischen Vaskulitiden/Vaskulitis-Syndromen, wie beispielsweise der Wegener‘schen Granulomatose (WG), tritt in bis zu 20% der Fälle aufgrund einer rapid progredienten Glomerulonephritis (RPGN) eine terminale Niereninsuffizienz auf. Histopathologisch ist der Befall der Niere durch die Ausbildung von granulomatösen Läsionen mit deutlicher Infiltration von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNG) und T-Lymphozyten charakterisiert. Die Mechanismen, welche zur T-Zell-Aktivierung und -Infiltration führen, sind bislang ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression und Funktion von Lymphotaktin (XCL1), einem C-Klasse-Chemokin, in der Pathogenese der Wegener’schen Granulomatose untersucht.

Serumproben und mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden von je 16 WG-Patienten und 16 nach Alter und Geschlecht vergleichbaren gesunden Probanden gewonnen. Die XCL1-Serumkonzentrationen wurden mit Hilfe eines ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt.

Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR und der Immunphänotyp von $XCL1^{+}$-T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Darüber hinaus wurden Nierenbiopsien von fünf WG-Patienten mit immunhistochemischer Doppelmarkierung für XCL1 und die Zelloberflächenantigene CD4, CD8 und CD68 analysiert. Gewebeproben mit benigner Nephrosklerose dienten als Kontrolle. Um die funktionelle Rolle von XCL1 zu untersuchen, wurden polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PNG) *in vitro* mit Lymphotaktin stimuliert und anschließend bezüglich ihrer Interleukin-8-Produktion mit unstimulierten Kontrollen verglichen.

Die Serumkonzentrationen von XCL1 unterschieden sich zwischen WG-Patienten und gesunden Kontrollprobanden nicht signifikant ($p=0.5$). Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass im Vergleich zu den Kontrollen ein signifikant höherer Anteil der $CD4^{+}$- und $CD8^{+}$-T-Lymphozyten von WG-Patienten eine Koexpression der Aktivierungsmarker CD25, CD69 und HLA-DR aufwies ($p<0.05$). Weiterhin konnte XCL1 hauptsächlich in den $CD4^{+}CD28^{-}$- und $CD8^{+}CD28^{-}$-T-Lymphozyten von WG-Patienten detektiert werden. Die Untersuchung der Nierenbiopsien zeigte eine XCL1-

Expression in interstitiellen $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen bei WG-assoziierter RPGN, in $CD68^+$ Monozyten/Makrophagen hingegen nicht. Die *in-vitro*-Stimulation der PNG mit XCL1 führte zu einem signifikanten, zeit- und dosisabhängigen Anstieg der IL-8-Produktion.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das C-Klasse-Chemokin Lymphotaktin in Fällen von Wegener'scher Granulomatose mit Nierenbeteiligung hauptsächlich in $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Lymphozyten produziert wird. Unter Berücksichtigung der bekannten Funktion von XCL1 als lymphozytenspezifisches Chemoattraktans, könnte XCL1 eine Schlüsselrolle bei der Modulation der T-Zell-Rekrutierung bei WG-assoziierter rapid progressiver Glomerulonephritis spielen. Darüber hinaus lassen die vorgenommenen Funktionsuntersuchungen vermuten, dass XCL1 die vaskuläre Entzündung durch die Induktion vermehrter IL-8-Produktion in polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten unterstützen könnte.

6 Literaturverzeichnis

Aasarod K, Bostad L, Hammerstrom J, Jostad S, Iversen BM (2001): Wegener's granulomatosis: inflammatory cells and markers of repair and fibrosis in renal biopsies –a clinicopathological study. Scand J Nephrol; 35 (5): 401-410.

Albert D, Clarkin C, Komoroski J, Brensinger CM, Berlin JA (2004): Wegener's granulomatosis: Possible role of environmental agents in ist pathogenesis. Arthritis Rheum; 51 (4): 656-664.

Alcorta D, Preston G, Munger W, Sullivan P, Yang JJ, Waga I, Jennette JC, Falk R (2002): Microarray studies of gene expression in circulating leukocytes in kidney diseases. Exp Nephrol; 10 (2): 139-149.

Anders HJ, Vielhauer V, Schlondorff D (2003): Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. Kidney Int; 63 (2): 401-415.

Anderson P (2001): TB vaccines: progress and problems.Trends Immunology; 22 (3): 160-168.

Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ, Song Q, Lan HY (1996): Modulators of crescentic glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol; 7 (11): 2271-2278.

Baggiolini M (1998): Chemokines and leukocyte traffic. Nature; 392 (6676): 565-568.

Baggiolini M, Clark-Lewis I (1992). "Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine." FEBS Lett; 307 (1): 97-101.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. Adv Immunol; 55: 97-179.

Belmont HM (2006): Treatment of ANCA-associated systemic vasculitis. Bull NYU Hosp Jt Dis; 64 (1-2): 60-66.

Berger SP, Seelen MA, Hiemstra PS, Gerritsma JS, Heemskerk E, van der Woude FJ, Daha MR (1996): Proteinase 3, the major autoantigen of Wegener's granulomatosis, enhances IL-8 production by endothelial cells in vitro. J Am Soc Nephrol; 7 (5): 694-701.

Bjerkeli V, Damas JK, Fevang B, Holter JC, Aukrust P, Froland SS (2007): Increased expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, in Wegener's granulomatosis--possible role in vascular inflammation. Rheumatology (Oxford); 46 (9): 1422-1427.

Blaschke S, Brandt P, Wessels JT, Müller GA (2009): Expression and Function of the C-Class Chemokine Lymphotactin (XCL1) in Wegener's Granulomatosis. J Rheumatol.; 36 (11): 2491-500. (Epub 2009 Oct 1)

Blaschke S, Middel P, Dorner BG, Blaschke V, Hummel KM, Kroczek RA, Reich K, Benoehr P, Koziolek M, Muller GA (2003): Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 48 (7): 1858-1872.

Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JC, Havran WL (1996): Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia.
J Immunol; 157 (3): 985-992.

Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ, Oost W, Hermans J, Kallenberg CG, Limburg PC, Tervaert JW (2000): Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. Arthritis Rheum; 43 (9): 2025-2033.

Carlsson B, Wallin J, Pirskanen R, Matell G, Smith CI (1990): Different HLA DR-DQ associations in subgroups of idiopathic myasthenia gravis. Immunogenetics; 31 (5-6): 285-290.

Cerdan C, Serfling E, Olive D (2000): The C-class chemokine, lymphotactin, impairs the induction of Th1-type lymphokines in human CD4(+) T cells. Blood; 96 (2): 420-428.

Clore GM, Appella E, Yamada M, Matsushima K, Gronenborn AM (1990): Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. Biochemistry; 29 (7): 1689-1696.

Cockwell P, Howie AJ, Adu D, Savage CO (1998): In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis. Kidney Int; 54 (3): 827-836.

Cockwell P, Brooks CJ, Adu D, Savage CO (1999): Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis. Kidney Int; 55 (3): 852-863.

Csernok E, Schmitt WH, Ernst M, Baiton DF, Gross WL (1993): Membrane surface proteinase 3 expression and intracytoplasmic immunoglobulin on neutrophils from patients with ANCA-associated vasculitides. Adv Exp Med Biol 336: 45-50.

Csernok E, Trabandt A, Muller A, Wang GC, Moosig F, Paulsen J, Schnabel A, Gross WL (1999): Cytokine profiles in Wegener's granulomatosis: predominance of type 1 (Th1) in the granulomatous inflammation. Arthritis Rheum 42 (4): 742-750.

Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B, Baggiolini M (1989): The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. J Exp Med 170 (5): 1787-1792.

de Groot K, Reinhold-Keller E (2009): [Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis.]. Z Rheumatol.; 68 (1): 49-63.

de Lind van Wijngaarden RA, van Rijn L, Hagen EC, Watts RA, Gregorini G, Tervaert JW, Mahr AD, Niles JL, de Heer E, Bruijn JA, Bajema IM (2008): Hypotheses on the etiology of antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated vasculitis: the cause is hidden, but the result is known. Clin J Am Soc Nephrol 3 (1): 237-252.

Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N: Harrisons Innere Medizin.- Dt. Ausg. der 15. Auflage / in Zusammenarbeit mit der Charité, 15.Auflage; ABW Wissenschaftsverlag; Berlin, Leiben 2002.

Dorner B, Muller S, Entschladen F, Schroder JM, Franke P, Kraft R, Friedl P, Clark-Lewis I, Kroczek RA (1997): Purification, structural analysis, and function of natural ATAC, a cytokine secreted by CD8(+) T cells. J Biol Chem; 272 (13): 8817-8823.

Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, Huser MB, Kaufmann SH, Radbruch A, Flesch IE, Kroczek RA (2002): MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A; 99 (9): 6181-6186.

Dubravec DB, Spriggs DR, Mannick JA, Rodrick ML (1990): Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. Proc Natl Acad Sci U S A; 87 (17): 6758-6761.

Duna GF, Cotch MF, Galperin C, Hoffman GS (1998): Wegener's granulomatosis: role of environmental exposures. Clin Exp Rheumatol; 16 (6): 669-674.

Elzouki AN, Segelmark M, Wieslander J, Eriksson S (1994): Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. J Intern Med; 236(5): 543-548.

Falk RJ, Terrell RS, Charles RA, Jennette JC (1990): Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A; 87(11): 4115-4119.

Fauci AS, Haynes BF, Katz P, Wolff SM (1983): Wegener's granulomatosis: prospective clinical and therapeutic experience with 85 patients for 21 years. Ann Intern Med; 98 (1): 76-85.

Ferraro AJ, Day CJ, Drayson MT, Savage CO (2005): Effective therapeutic use of rituximab in refractory Wegener's granulomatosis. Nephrol Dial Transplant; 20 (3): 622-625.

Finkel TH, Torok TJ, Ferguson PJ, Durigon EL, Zaki SR, Leung DY, Harbeck RJ, Gelfand EW, Saulsbury FT, Hollister JR, et al. (1994): Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotising vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? Lancet; 343 (8908): 1255-1258.

Fujinaga M, Chernaia MM, Halenbeck R, Koths K, James MN (1996): The crystal structure of PR3, a neutrophil serine proteinase antigen of Wegener's granulomatosis antibodies. J Mol Biol 261 (2): 267-278. (siehe auch http://www.pdb.org/pdb/explore.do?structureId=1FUJ)

Giancarlo B, Silvano S, Albert Z, Mantovani A, Allavena P (1996): Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin. Eur J Immunol; 26 (12): 3238-3241.

Godkin A, Jewell D (1998). The pathogenesis of celiac disease. Gastroenterology 115 (1): 206-210.

Haubitz M, Woywodt A, de Groot K, Haller H, Goebel U (2005): Smoking habits in patients diagnosed with ANCA associated small vessel vasculitis. Ann Rheum Dis; 64 (10): 1500-1502.

Hedrick JA, Saylor V, Figueroa D, Mizoue L, Xu Y, Menon S, Abrams J, Handel T, Zlotnik A (1997): Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. J Immunol; 158(4): 1533-1540.

Henseler T (1997): The genetics of psoriasis. J Am Acad Dermatol; 37 (2 Pt 3): S1-11.

Hoffman GS, Kerr GS, Leavitt RY, Hallahan CW, Lebovics RS, Travis WD Rottem M, Fauci AS (1992): Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. Ann Intern Med; 116 (6): 488-498.

Hogan SL, Cooper GS, Savitz DA, Nylander-French LA, Parks CG, Chin H, Jennette CE, Lionaki S, Jennette JC, Falk RJ (2007): Association of silica exposure with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody small-vessel vasculitis: a population-based, case-control study. Clin J Am Soc Nephrol 2 (2): 290-299.

Huang H, Li F, Cairns CM, Gordon JR, Xiang J (2001): Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. Biochem Biophys Res Commun; 281 (2): 378-382.

Iking-Konert C, Vogl T, Prior B, Wagner C, Sander O, Bleck E, Ostendorf B, Schneider M, Andrassy K, Hansch GM (2008): T lymphocytes in patients with primary vasculitis: expansion of CD8+ T cells with the propensity to activate polymorphonuclear neutrophils. Rheumatology (Oxford) 47 (5): 609-616.

Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, Yano S, Bar-Eli M, Radinsky R, Pettaway CA, Dinney CP (2000): Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. Clin Cancer Res 6 (5): 2104-2119.

Jayne DR, Gaskin G, Rasmussen N, Abramowicz D, Ferrario F, Guillevin L, Mirapeix E, Savage CO, Sinico RA, Stegemann CA, Westmann KW, van der Woude FJ, de Lind van Wijngaarden RA, Pusey CD (2007): Randomized trial of plasma exchange or high-dosage methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis. J Am Soc Nephrol 18 (7): 2180-2188.

Jennette JC, Falk RJ (1994): The pathology of vasculitis involving the kidney. Am J Kidney Dis 24(1): 130-141.

Jennette JC, Nickeleit V: Anti-Glomerular Basement Membrane Glomerulonephritis and Goodpasture's Syndrome. In: Heptinstall's Pathology of the Kidney, 6th Edition. Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM and Silva FG; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006**:** 613 - 643.

Kalman B, Lublin FD (1999): The genetics of multiple sclerosis. A review. Biomed Pharmacother; 53 (8): 358-370.

Kao RC, Wehner NG, Skubitz KM, Gray BH, Hoidal JR (1988): Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. J Clin Invest; 82 (6): 1963-1973.

Kaufmann SH (2002): Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. Ann Rheum Dis; 61 Suppl 2: ii54-58.

Kawasaki K, Yaoita E, Yamamoto T, Kihara I (1992): Depletion of CD8 positive cells in nephrotoxic serum nephritis of WKY rats. Kidney Int; 41 (6): 1517-1526.

Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, et al. (1994): Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. Science; 266 (5189): 1395-1399.

Kennedy J, Kelner GS, Kleyensteuber S, Schall TJ, Weiss MC, Yssel H, Schneider PV, Cocks BG, Bacon KB, Zlotnik A (1995): Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. J Immunol; 155 (1): 203-209.

Keogh KA, Wylam ME, Stone JH, Specks U (2005): Induction of remission by B lymphocyte depletion in eleven patients with refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. Arthritis Rheum; 52 (1): 262-268.

Keogh KA, Ytterberg SR, Fervenza FC, Carlson KA, Schroeder DR, Specks U (2006): Rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial. Am J Respir Crit Care Med; 173(2): 180-187.

Kitching AR, Holdsworth SR, Tipping PG (1999a): IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol; 10 (4): 752-759.

Kitching AR, Tipping PG, Holdsworth SR (1999b): IL-12 directs severe renal injury, crescent formation and Th1 responses in murine glomerulonephritis. Eur J Immunol; 29 (1): 1-10.

Komocsi A, Lamprecht P, Csernok E, Mueller A, Holl-Ulrich K, Seitzer U, Moosing F, Schnabel A, Gross, WL (2002): Peripheral blood and granuloma CD4(+)CD28(-) T cells are a major source of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in Wegener's granulomatosis. Am J Pathol; 160 (5): 1717-1724.

Kraan MC, Patel DD, Haringman JJ, Smith MD, Weedon H, Ahern MJ, Breedveld FC, Tak PP (2001): The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). Arthritis Res; 3 (1): 65-71.

Kuloglu ES, McCaslin DR, Kitabwalla M, Pauza CD, Markley JL, Volkman BF (2001): Monomeric solution structure of the prototypical 'C' chemokine lymphotactin. Biochemistry; 40 (42): 12486-12496.

Kuloglu ES, McCaslin DR, Markley JL, Volkman BF (2002): Structural rearrangement of human lymphotactin, a C chemokine, under physiological solution conditions. J Biol Chem; 277 (20): 17863-17870.

Lamprecht P, Moosig F, Csernok E, Seitzer U, Schnabel A, Mueller A, Gross WL (2001): CD28 negative T cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis. Thorax; 56 (10): 751-757.

Lane SE, Watts RA, Bentham G, Innes NJ, Scott DG (2003): Are environmental factors important in primary systemic vasculitis? A case-control study. Arthritis Rheum; 48 (3): 814-823.

Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima K (1989): Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. Immunology; 68 (1): 31-36.

Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L (1999): Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. Inflammation; 23 (3): 217-230.

Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP, Calabrese LH, Fries JF, Lie JT, Lightfoot RW Jr., et al. (1990): The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum; 33(8): 1101-1107.

Ludviksson BR, Sneller MC, Chua KS, Talar-Williams C, Lanford CA, Ehrhardt RO, Fauci AS, Strober W (1998): Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+ CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: reversal with IL-10. J Immunol; 160 (7): 3602-3609.

Manger B : Checkliste XXL Rheumatologie, 3. Überarbeitete Auflage; Thieme Verlag; Stuttgart 2005

Matsushima K, Oppenheim JJ (1989): Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. Cytokine; 1 (1): 2-13.

Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ (1988): Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. J Exp Med; 167 (6): 1883-1893.

Mayet W, Schwarting A, Barreiros AP, Schlaak J, Neurath M (1999): Anti-PR-3 antibodies induce endothelial IL-8 release. Eur J Clin Invest; 29 (11): 973-979.

Mayet WJ, Csernok E, Szymkowiak C, Gross WL, Meyer zum Buschenfelde KH (1993): Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. Blood; 82 (4): 1221-1229.

Middel P, Thelen P, Blaschke S, Polzien F, Reich K, Blaschke V, Wrede A, Hummel KM, Gunawan B, Radzun HJ (2001): Expression of the T-cell chemoattractant chemokine lymphotactin in Crohn's disease. Am J Pathol; 159 (5): 1751-1761.

Modi WS, Chen ZQ (1998): Localization of the human CXC chemokine subfamily on the long arm of chromosome 4 using radiation hybrids. Genomics; 47 (1): 136-139.

Moosig F, Csernok E, Wang G, Gross WL (1998): Costimulatory molecules in Wegener's granulomatosis (WG): lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on T cells. Clin Exp Immunol; 114 (1): 113-118.

Muller S, Dorner B, Korthauer U, Mages HW, D'Apuzzo M, Senger G, Kroczek RA (1995): Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes. Eur J Immunol; 25 (6): 1744-1748.

Murphy PM, Tiffany HL (1991): Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. Science; 253 (5025): 1280-1283.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev; 52 (1): 145-176.

Naruse K, Ueno M, Satoh T, Nomiyama H, Tei H, Takeda M, Ledbetter DH, Coillie EV, Opdenakker G, Gunge N, Sakaki Y, Iio M, Miura R (1996): A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2. Genomics; 34 (2): 236-240.

Natori Y, Ou ZL, Yamamoto-Shuda Y, Natori Y (1998): Expression of lymphotactin mRNA in experimental crescentic glomerulonephritis. Clin Exp Immunol; 113 (2): 265-268.

Nomiyama H, Imai T, Kusuda J, Miura R, Callen DF, Yoshie O (1998): Human chemokines fractalkine (SCYD1), MDC (SCYA22) and TARC (SCYA17) are clustered on chromosome 16q13. Cytogenet Cell Genet; 81 (1): 10-11.

Nuyts GD, Van Vlem E, De Vos A, Daelemans RA, Rorive G, Elseviers MM, Schurgers M, Segaert M, D'Haese PC, De Broe ME (1995): Wegener granulomatosis is associated to exposure to silicon compounds: a case-control study. Nephrol Dial Transplant; 10 (7): 1162-1165.

Ooi JD, Holdsworth SR, Kitching AR (2008): Advances in the pathogenesis of Goodpasture's disease: from epitopes to autoantibodies to effector T cells.
J Autoimmun; 31 (3): 295-300.

Ordway D, Higgins DM, Sanchez-Campillo J, Spencer JS, Henao-Tamayo M, Harton M, Orme IM, Gonzalez Juarrero M (2007): XCL1 (lymphotactin) chemokine produced by activated CD8 T cells during the chronic stage of infection with Mycobacterium tuberculosis negatively affects production of IFN-gamma by CD4 T cells and participates in granuloma stability. J Leukoc Biol; 82 (5): 1221-1229.

Ou ZL, Hotta O, Natori Y, Sugai H, Taguma Y, Natori Y (2002): Enhanced expression of C chemokine lymphotactin in IgA nephropathy. Nephron; 91 (2): 262-269.

Pagnoux C, Teixeira L (2007): [Wegener's granulomatosis]. Presse Med; 36 (5 Pt 2): 860-874.

Petrek M, Kolek V, Szotkowska J, du Bois RM (2002): CC and C chemokine expression in pulmonary sarcoidosis. Eur Respir J; 20 (5): 1206-1212.

Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M (1988): A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. J Exp Med; 167 (5): 1547-1559.

Popa ER, Tervaert JW (2003): The relation between Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis: current knowledge and future directions. Intern Med; 42 (9): 771-780.

Porges AJ, Redecha PB, Kimberly WT, Csernok E, Gross WL, Kimberly RP (1994): Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. J Immunol; 153 (3): 1271-1280.

Radford DJ, Luu NT, Hewins P, Nash GB, Savage CO (2001): Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells. Arthritis Rheum; 44 (12): 2851-2861.

Ralston DR, Marsh CB, Lowe MP, Wewers MD (1997): Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fcgamma receptors. J Clin Invest; 100 (6): 1416-1424.

Rarok AA, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG (2002): Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. J Am Soc Nephrol; 13(9): 2232-2238.

Reveille JD, Wilson RW, Provost TT, Bias WB, Arnett FC (1984): Primary Sjogren's syndrome and other autoimmune diseases in families. Prevalence and immunogenetic studies in six kindreds. Ann Intern Med; 101 (6): 748-756.

Reynolds J, Norgan VA, Bhambra U, Smith J, Cook HT, Pusey CD (2002): Anti-CD8 monoclonal antibody therapy is effective in the prevention and treatment of experimental autoimmune glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol; **13** (2): 359-369.

Rollins BJ (1997): Chemokines. Blood 90 (3): 909-928.

Rumsaeng V, Vliagoftis H, Oh CK, Metcalfe DD (1997): Lymphotactin gene expression in mast cells following Fc(epsilon) receptor I aggregation: modulation by TGF-beta, IL-4, dexamethasone, and cyclosporin A. J Immunol; 158 (3): 1353-1360.

Savage CO, Pottinger BE, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD (1992): Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. Am J Pathol; 141 (2): 335-342.

Schlesier M, Kaspar T, Gutfleisch J, Wolff-Vorbeck G, Peter HH (1995): Activated CD4+ and CD8+ T-cell subsets in Wegener's granulomatosis. Rheumatol Int; 14 (5): 213-219.

Schlöndorff D, Nelson PJ, Luckow B, Banas B (1997): Chemokines and renal disease. Kidney Int; 51 (3): 610-621.

Schroder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E (1987): Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. J Immunol; 139 (10): 3474-3483.

Schroder JM, Mrowietz U, Christophers E (1988): Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity. J Immunol; 140 (10): 3534-3540.

Schulz BS, Michel G, Wagner S, suss R, Beetz A, Peter RU, Kemeny L, Ruzicka T (1993): Increased expression of epidermal IL-8 receptor in psoriasis. Down-regulation by FK-506 in vitro. J Immunol; 151 (8): 4399-4406.

Segelmark M, Elzouki AN, Wieslander J, Eriksson S (1995): The PiZ gene of alpha 1-antitrypsin as a determinant of outcome in PR3-ANCA-positive vasculitis. Kidney Int; 48 (3): 844-850.

Singh S, Varney M, Singh RK (2009): Host CXCR2-dependent regulation of melanoma growth, angiogenesis, and experimental lung metastasis. Cancer Res; 69 (2): 411-415.

Sodhi A, Montaner S, Gutkind JS (2004): Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. Nat Rev Mol Cell Biol; 5 (12): 998-1012.

Specks U, Fervenza FC, McDonald TJ, Hogan MC (2001): Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy. Arthritis Rheum; 44 (12): 2836-2840.

Stastny P, Gao XY, Fernandez-Vina M (1991): Immunogenetics of rheumatoid arthritis and juvenile arthritis. Recenti Prog Med; 82 (7-8): 409-416.

Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, Marks RM (1989a): Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-alpha, LPS, and IL-1 beta. Science; 243 (4897): 1467-1469.

Strieter RM, Phan SH, Showell HJ, Remick DG, Lynch JP, Genord M, Rainford C, Eskandari M, Marks RM, Kunkel SL (1989b): Monokine-induced neutrophil chemotactic factor gene expression in human fibroblasts. J Biol Chem; 264 (18): 10621-10626.

Thomas KM, Pyun HY, Navarro J (1990): Molecular cloning of the fMet-Leu-Phe receptor from neutrophils. J Biol Chem; 265 (33): 20061-20064.

Tipping PG, Holdsworth SR (2006): T cells in crescentic glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 17 (5): 1253-1263.

Torheim EA, Yndestad A, Bjerkeli V, Halvorsen B, Aukrust P, Froland SS (2005): Increased expression of chemokines in patients with Wegener's granulomatosis - modulating effects of methylprednisolone in vitro. Clin Exp Immunol; 140 (2): 376-383.

Tran EH, Kuziel WA, Owens T (2000): Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice deficient in either the chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha or its CCR5 receptor. Eur J Immunol; 30 (5): 1410-1415.

van Rossum AP, Limburg PC, Kallenberg CG (2003): Membrane proteinase 3 expression on resting neutrophils as a pathogenic factor in PR3-ANCA-associated vasculitis. Clin Exp Rheumatol 21 (6 Suppl 32): S64-68.

Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M (1987): Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. Biochem Biophys Res Commun; 149 (2): 755-761.

Wang CR, Liu MF, Huang YH, Chen HC (2004): Up-regulation of XCR1 expression in rheumatoid joints. Rheumatology (Oxford); 43 (5): 569-573.

Wang JD, Nonomura N, Takahara S, Li BS, Azuma H, Ichimaru N, Kokado Y, Matsumiya K, Miki T, Suzuki S, Okuyama A (1998): Lymphotactin: a key regulator of lymphocyte trafficking during acute graft rejection. Immunology; 95 (1): 56-61.

Waugh DJ, Wilson C (2008): The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res; 14 (21): 6735-6741.

Westman KW, Bygren PG, Olsson H, Ranstam J, Wieslander J (1998): Relapse rate, renal survival, and cancer morbidity in patients with Wegener's granulomatosis or microscopic polyangiitis with renal involvement. J Am Soc Nephrol; 9 (5): 842-852.

Witko-Sarsat V, Lesavre P, Lopez S, Bessou G, Hieblot C, Prum B, Noel LH, Guillevin L, Ravaud P, Sermet-Gaudelus I, Timsit J, Grunfeld JP, Halbwachs-Mecarelli L (1999): A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. J Am Soc Nephrol; 10 (6): 1224-1233.

Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O (1995): Molecular cloning of a novel C or gamma type chemokine, SCM-1. FEBS Lett; 360 (2): 155-159.

Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Takagi S, Yoshie (1998): Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. J Biol Chem; 273 (26): 16551-16554.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Oppenheim JJ, Leonard EJ (1987): Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. Proc Natl Acad Sci U S A; 84 (24): 9233-9237.

Yoshimura T, Robinson EA, Appella E, Matsushima K, Sowalter SD, Skeel A, Leonard EJ (1989): Three forms of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) distinguished by different lengths of the amino-terminal sequence. Mol Immunol; 26 (1): 87-93.