

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

**Institut für Pathologie, Sektion Nephropathologie**

**Direktor: Prof. Dr. Guido Sauter**

**Die Organisation des intrarenalen lymphozytären Infiltrates in der  
ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät der

Universität Hamburg

Vorgelegt von

Frau Elisabeth Marie Herden

geboren am 10.03.1989 in Darmstadt

Hamburg 2017

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.10.2017

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende : Prof. Dr. med. Thorsten Wiech

Prüfungsausschuss, zweite /r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Ulf Panzer

Prüfungsausschuss, dritte /r Gutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Gisa Tiegs

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung.....	6
1.1 Definitionen und Klassifikationen der ANCA-assoziierten Vaskulitiden.....	6
1.2 Epidemiologie der ANCA-assoziierten Vaskulitis .....	7
1.3 Ätiologie und Risikofaktoren der AAV.....	8
1.4 Pathogenese und Rolle der Lymphozyten.....	9
1.5 Sekundäre Lymphatische Organe, Struktur und Funktion.....	12
1.6 Klinik der AAV .....	13
1.6.1 Renale Manifestation .....	13
1.6.2 Manifestation der Lunge und oberen Atemwege.....	14
1.6.3 Manifestationen im Hals-Nase-Ohren-Bereich.....	15
1.6.4 Manifestationen der Haut .....	15
1.6.5 Andere Manifestationen .....	15
1.7 Diagnostik der AAV .....	16
1.8 Therapie und Prognose.....	16
1.9 Fragestellung.....	19
2. Material und Methodik .....	20
2.1 Patienten und Gewebeproben.....	20
2.1.2 Prinzip der Färbungen.....	20
2.1.3 APAAP-Methode.....	21
2.1.4 Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode.....	21
2.1.5 ABC-Methode.....	21
2.2. Auswertung .....	22
2.2.1 T-Zellen.....	23
2.2.2 B-Zellen.....	24
2.3. Statistik.....	24
3. Ergebnisse.....	25
3.1. Basischarakteristika der Patienten .....	25

3.2 Therapie und klinischer Verlauf der Patienten .....	25
3.3 Interstitielle T-Zellen und Nierenfunktion (GFR) .....	28
3.4 T-Zell-Infiltration im atrophischen Tubulointerstitium und Nierenfunktion (GFR) .....	28
3.5 T Zell-Infiltration im nicht-atrophischen Tubulointerstitium und Nierenfunktion (GFR) .....	28
3.6 T-Zell-Tubulitis und Nierenfunktion (GFR) .....	28
3.7 T-Zell-Periglomerulitis und Nierenfunktion (GFR) .....	29
3.8 B-Zell-Periglomerulitis und Nierenfunktion (GFR) .....	31
3.9 Organisation des Lymphozyteninfiltrates und Nierenfunktion (GFR) .....	31
3.10 Vergleich von ungeordnetem und organisiertem lymphozytären Infiltrat im Erreichen von terminaler Niereninsuffizienz .....	33
3.11 Akute tubuläre Schädigung und Nierenfunktion (GFR) .....	34
3.12 Die interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (IFTA) und Nierenfunktion (GFR) .....	35
4. Diskussion .....	37
5. Zusammenfassung .....	44
5. Conclusion .....	45
6. Literaturverzeichnis .....	456
7. Danksagung .....	533
8. Lebenslauf .....	534
9. Eidesstattliche Versicherung .....	55

Hypothese:

Die Organisation des intrarenalen lymphozytären Infiltrates beeinflusst den klinischen Verlauf und das Behandlungsergebnis der Patienten. Die zunehmende Organisation geht mit einer schlechteren Nierenfunktion im Verlauf einher.

Untersuchung:

Korrelationsanalysen von histologischer Untersuchung (im Besonderen der intrarenalen Lymphozytenorganisation) und dem klinischen Verlauf der ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis (insbes. der Nierenfunktion).

# 1. Einleitung

## 1.1 Definitionen und Klassifikationen der ANCA-assoziierten Vaskulitiden

Die ANCA-assoziierte Vaskulitis (AAV) ist eine Autoimmunerkrankung, die mit dem Vorhandensein von anti-neutrophilen zytoplasmatischen Autoantikörpern (ANCA) einhergeht. Charakteristischerweise kommt es zur nekrotisierenden Entzündung von kleinen Gefäßen (kleiner Arterien, Arteriolen, Venolen und Kapillaren) (Falk RJ 2000). Man unterscheidet drei verschiedene Erkrankungen, die unter dem Begriff der ANCA-assoziierten Vaskulitiden zusammengefasst werden: die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, ehemals Wegener'sche Granulomatose), die mikroskopische Polyangiitis (MPA) und die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, ehemals Churg-Strauss Syndrom, CSS) (Jennette JC 1994). Die GPA wird nach der Chapel Hill Consensus Conference (CHCC) über eine granulomatöse Entzündung definiert, welche häufig den Respirationstrakt involviert, sowie über eine nekrotisierende Vaskulitis, welche die kleinen bis mittleren Blutgefäße betrifft (Kapillaren, Venolen, Arteriolen und Arterien). Eine nekrotisierende Glomerulonephritis ist dabei zu Krankheitsbeginn in etwa 20%, im Verlauf in etwa 80% der Patienten nachweisbar (Hoffmann GS 1992). Die EGPA zeigt nach der CHCC-Definition eine eosinophile und granulomatöse Inflammation, welche auch den Respirationstrakt betrifft. Genauso zeigt sich eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen und mittelgroßen Gefäße. Die EGPA ist zusätzlich mit Asthma und einer Gewebs- und Bluteosinophilie assoziiert (Jennette JC 1994). Auch bei der MPA kommt es zu einer nekrotisierenden Vaskulitis der kleinen und mittleren Gefäße mit kaum oder keinerlei Ablagerungen von Immunglobulinen oder Komplementfaktoren („pauci-immun“). Sehr häufig tritt dabei eine nekrotisierende Glomerulonephritis auf (Jennette JC 1997). Im Gegensatz zur GPA und EGPA findet sich bei der MPA typischerweise keine granulomatöse Entzündung. Kriterien zur Diagnose der ANCA-assoziierten Vaskulitiden sind beispielsweise die American College of Rheumatology (ACR)-Kriterien oder die European Medicines Agency (EMA)-Algorithmen. Die ACR-Kriterien für die GPA (Leavitt RY 1990) beinhalten Anomalien im Röntgenbild des Thorax, im Urinsediment, nasale oder orale Entzündungen sowie bioptisch gesicherte granulomatöse Entzündungen eines Gefäßes oder eines perivaskulären Gewebeareals. Der EMA-Algorithmus versucht die CHCC- und ACR-Kriterien zu vereinen. Zur Diagnose einer MPA gelangt man erst nach Ausschluss einer GPA und EGPA. Um auf eine Nierenbiopsie verzichten zu können, werden Bildgebung der

Lunge, Untersuchung der oberen Atemwege auf beispielsweise blutige Krusten und Ulzerationen, Bronchoskopie mit Untersuchung des unteren Respirationstraktes, Urinsedimentanalyse und ANCA als Marker herangezogen (Watts R 2007). Keine der drei genannten Klassifikationen kann absolut verlässlich zwischen GPA und MPA unterscheiden. Auch die Sensitivität der Biopsie ist eingeschränkt, da jeweils nur ein Gewebsausschnitt erfasst wird.

Die ANCA sind Antikörper gegen Bestandteile im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten. Es werden zwei verschiedene Zielantigene der ANCA unterschieden: Proteinase 3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO). Nach der zytoplasmatischen Verteilung der Antigene finden sich die ANCA im indirekten Immunfluoreszenz-Test (IFT) entweder abgekürzt als ‚c‘ im gesamten Zytoplasma oder abgekürzt als ‚p‘ perinukleär gelegen. C-ANCA haben meist die Proteinase 3 zum Ziel und finden sich vor allem bei der GPA (65%), seltener bei der MPA (ca. 20%) und der EGPA (ca. 30%) (Hagen EC 1998). P-ANCA haben meist die Myeloperoxidase zum Ziel und finden sich in der IFT auf alkohol-fixierten humanen Granulozyten typischerweise zwar mit zytoplasmatischer aber vorwiegend perinukleärer Positivität. Diese finden sich bei über 50% der Patienten mit MPA und nur bei ca. 5-10% mit GPA. P-ANCA sind auch bei 30-70% der Patienten mit EGPA nachweisbar. (Keogh KA 2003, Sinico RA 2005, Sablé-Fourtassou R 2005). Die Begriffe cANCA und pANCA beziehen sich also auf spezifische Immunfluoreszenzmuster, nicht auf separate Antigene. Die unterschiedlichen ANCAs haben einen signifikanten prädiktiven Wert bezüglich des klinischen Krankheitsverlaufs, des Therapieansprechens und der Rückfallwahrscheinlichkeit der Erkrankungen. Beispielsweise haben die Patienten mit einer PR3-ANCA-positiven Vaskulitis ein höheres Rezidivrisiko und eine schlechtere Prognose als MPO-positive Patienten. Deswegen wird diskutiert, ob die Begriffe „Proteinase 3 ANCA-Erkrankung“, „Myeloperoxidase ANCA-Erkrankung“ und „ANCA negative Erkrankung“ nicht möglicherweise die besseren Bezeichnungen für die AAVs wären (Falk RJ 2010).

## **1.2 Epidemiologie der ANCA-assoziierten Vaskulitis**

Eine Studie aus dem Jahr 2000 zeigte, dass die Inzidenz der ANCA-assoziierten Vaskulitis (AAV) bei ca. 15,8- 24,6 pro Millionen Einwohner und das mediane Alter der Patienten bei 65 Jahren liegt (Watts RA 2000). Die Erkrankung ist unter der weißen Bevölkerung wesentlich weiter verbreitet (Falk RJ 1990). Die AAV-Subtypen zeigen

eine unterschiedliche geographische Verteilung. Watts et al. verglich 2001 in einer Studie eine Region im Osten Englands mit einer Region im Nordwesten Spaniens. Die drei Subtypen der AAV zusammen hatten eine ähnliche Inzidenz (18,9 pro 1 Millionen Einwohner im Osten Englands, 18,3 pro 1 Millionen Einwohner im Nordwesten Spaniens). Allerdings war die Inzidenz der GPA im Osten Englands wesentlich höher (10,6/Million) als im Nordwesten Spaniens (4,9/Million). Auch trat die EGPA vermehrt im Osten Englands auf, während die MPA gehäuft in Spanien vorkam. Unterschiedlich war auch der Altersdurchschnitt der AAV im Nord-Süd-Gefälle. Der Altersgipfel der Erkrankung lag im Norden Europas bei 65-74 Jahren. In Spanien war die betroffene Altersgruppe weiter gefächert bei 45-74 Jahren. Größte Unterschiede in der Verteilung der Subtypen sind vor allem im Vergleich der westlichen Welt mit dem asiatischen Raum vorhanden. In Japan dominiert die MPA, während die GPA dort äußerst selten ist (Watts RA 2001). Die Möglichkeit an einer AAV zu erkranken besteht über das gesamte Leben und nach Falk et al. sind beide Geschlechter gleich häufig betroffen.

### **1.3 Ätiologie und Risikofaktoren der AAV**

Die Ätiologie der AAV ist nicht vollends verstanden. Wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen geht man von einer multifaktoriellen Genese aus, bestehend aus genetischen und umweltbedingten Faktoren. Dadurch kommt es zu einer inadäquaten Lymphozytenaktivierung und einer Produktion von Antikörpern (ANCA), welche wiederum eine Gewebeschädigung hervorrufen (Cartin-Ceba R 2012). Faktoren zu selektieren, die in der Genese der Erkrankung eine Rolle spielen, stellt eine große Herausforderung dar und könnte in Zukunft zu einer verbesserten Therapie beitragen. Als ein möglicher Risikofaktor und Auslöser werden Infektionen angenommen. Eine Koinzidenz von infektiösen Prozessen und dem Einsetzen einer GPA wird häufig beobachtet. So finden sich bei Patienten mit GPA gehäuft Koagulase-positive Staphylokokken in der Nase (*Staphylokokkus aureus*) (Stegeman CA 1994, Popa ER 2003). Eine weitere mögliche Erklärung zur Entstehung fand sich mit der Identifizierung eines neuen jedoch bisher unbestätigten Subtyps der ANCA: der Antikörper gegen das Lysosomen-assoziierte Membranprotein 2 (LAMP-2). Kain und Rees zeigten in einer Arbeit, dass 90 % ihrer Patienten mit ANCA-positiver pauci-immuner nekrotisierender Glomerulonephritis einen ANCA gegen LAMP2 in sich trugen (Kain R 2008). Anti-LAMP-2-Antikörper koexistierten dort häufig mit PR3- und MPO-Antikörpern und selbst bei der ANCA-negativen pauci-immunen



Glomerulonephritis fanden sie sich in einer Vielzahl der Fälle. Die Arbeitsgruppe nahm an, dass diese Antikörper auch in der Entstehung einer ANCA-negativen Glomerulonephritis eine wichtige Rolle spielen (Peschel A 2014). Leider konnten andere Arbeitsgruppen das Vorkommen der LAMP2-Antikörper in ihren Patientenkollektiven mit AAV bisher nicht bestätigen (Roth AJ 2012). Kain et al. konnten zeigen, dass LAMP 2 und Fimbrien-behaftete Bakterien eine Homologie aufweisen, und auch der Fimbrienbestandteil eine nekrotisierende Glomerulonephritis bei Mäusen auslösen konnte (Kain R 2008). Dies würde eine Brücke zwischen einer Infektion (mit gramnegativen Keimen) und der Vaskulitis-Entstehung schlagen, und zwar aufgrund eines „Versehens“, eines sog. molekularen Mimikry. Ein weiterer möglicher Antikörper ist gegen Plasminogen gerichtet. Er fand sich in einer Arbeitsgruppe in 25% der Fälle und korrelierte mit dem Vorkommen von venösen Thrombembolien, histologischen Nierenläsionen und einer reduzierten Nierenfunktion (Bautz DJ 2008, Berden AE 2010). Genetische Faktoren sind kaum bekannt. Das Allel HLA-DRB1-15 findet sich bei Patienten mit einer PR3-assoziierten Vaskulitis häufiger, besonders unter Afroamerikanern (Cao Y 2011). Einige Medikamente wie zum Beispiel Rifampicin, Allopurinol, Hydralazin und Propylthiouracil scheinen die Bildung von ANCAs zu begünstigen (Choi HK 2000). Als ein weiterer Risikofaktor könnte ein Alpha-1-Antitrypsinmangel sein. Alpha-1-Antitrypsin stellt den wichtigsten PR3-Hemmer dar, ein Mangel dieses Enzyms zeigte in einer Studie ein erhöhtes Risiko der Entwicklung einer GPA an (Mahr AD 2010). Auch die Exposition gegenüber Staub von Kieselerde, Blei, Quecksilber und mit Levamisol verunreinigtem Kokain sollen potentielle Risikofaktoren für die Entwicklung einer AAV darstellen (Hogan SL 2001, Albert D 2004, Lott JP 2013).

#### **1.4 Pathogenese und Rolle der Lymphozyten**

Obwohl die Ätiologie der ANCA-assoziierten Vaskulitiden nicht geklärt ist, wird überwiegend akzeptiert, dass die Endothel-Schädigung durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme der ANCA-aktivierten neutrophilen Granulozyten erfolgt (Stegemann CA 1994). Davor sind allerdings Lymphozyten als die entscheidenden Immunzellen der adaptiven Immunität an der Entstehung der Immunerkrankung, wie der ANCA-assoziierten Vaskulitis mitverantwortlich. B-Lymphozyten werden das ganze Leben hindurch von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet. Naive B-Zellen migrieren nach einer Selektion und Deletion autoreaktiver Zellen in die

Milz (Burnet FM 1957). Dort reifen sie zu transienten T1-B-Lymphozyten. Der größte Teil dieser T1-B-Zellen wandert in die periarteriellen lymphatischen Milzfollikel und reift dort zu T2-B-Zellen (auch B2-Zellen genannt). Diese machen 80-90% der Milzzellen aus und zirkulieren zwischen Milz und peripheren Lymphknoten mit einer Halbwertszeit von 4,5 Monaten, falls sie keinen Antigenkontakt haben. Durch Antigenkontakt differenzieren sich B2-Lymphozyten zu antikörpersezernierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen, die in sekundären Lymphorganen wie den Peyerschen Plaques verweilen. Ein kleiner Teil der T1-B-Lymphozyten wandert in die marginale Zone der Milz und verbleibt dort mit einer Halbwertszeit von über 1 Jahr (auch B1-Zellen genannt). Bei Antigenkontakt migrieren sie in die peripheren Lymphknoten und aktivieren dort schnell die Immunabwehr über die Einbeziehung von Makrophagen und dendritischen Zellen und sezernieren sogenannte natürliche Antikörper. Dies sind IgM-Antikörper mit niedriger Antigenspezifität (z.B. stammen die natürlichen Blutgruppen-Antikörper anti-A und anti-B von diesen B1-Lymphozyten).

T-Lymphozyten werden ebenfalls im Knochenmark gebildet. Sie migrieren als naive T-Zellen (Thymozyten) in den Thymus und reifen dort. Naive T-Lymphozyten (Th0) tragen in der Zellmembran T-Zell-Rezeptoren (TCR), die aus MHC-Molekülen mit CD3- und CD4-Molekülen (CD4-Zellen), MHC-Molekülen mit CD3- und CD8-Molekülen (CD8-Zellen) und überwiegend alpha/beta-Ketten, selten gamma/delta-Ketten bestehen. Die naiven T-Lymphozyten mit alpha/beta-Ketten durchlaufen eine zweistufige Selektion. Zunächst werden sie den Epithelzellen im Thymuskortex präsentiert und bei hoher Affinität gegen diese Selbst-Peptide und Selbst-MHC-Moleküle als autoreaktiv erkannt und in der Medulla durch dendritische Zellen und Makrophagen eliminiert (negative Selektion). Die überlebenden T-Lymphozyten werden in der Thymusmedulla gegenüber Makrophagen und dendritischen Zellen auf Antigenspezifität geprüft und die automatische Apoptose nur dann ausgeschaltet, wenn eine hohe Spezifität vorliegt (positive Selektion). Weniger als 5% der T-Lymphozyten überleben die beiden Selektionsprozesse und wandern als CD4-Zellen bzw. T-Helferzellen mit Th1-, Th2 und Th17 (s.u.) oder CD8- (zytotoxische T-) Zellen in die Lymphknoten. Die wenigen naiven T-Zellen mit gamma/delta-Ketten migrieren schnell aus dem Thymus und reifen an vielen Stellen wie dem Darm-assoziierten Immunsystem. Dort können sie bei Antigenkontakt eine zytotoxische Aktivität entfalten. Die adaptive Immunität muss eine effiziente Abwehr gegen eine Vielzahl verschiedener Antigene gewährleisten. Dazu werden die Antigene zunächst durch

antigenpräsentierende Zellen der angeborenen Immunität wie Makrophagen und dendritische Zellen prozessiert und an der Zellmembran den TCR der T-Lymphozyten präsentiert. Die TCR weisen eine ungeheure Vielfalt auf ( $10^{12}$  bis  $10^{15}$  verschiedene Rezeptoren). Darunter sind auch solche, die sich als Autoimmunreaktion gegen Selbst-Peptid-MHC-Komplexe richten, da die negative Selektion im Thymus nicht hundertprozentig vollständig verläuft. Dies erlangt in der Regel jedoch keinen Krankheitswert, da die Selbst-MHC-Komplexe in zu niedriger Konzentration im Körper vorhanden sind. Allerdings können bestimmte autoaggressive T-Zellen (Driver cells) sehr wohl Autoimmunreaktionen auslösen. Den Driver cells wirken regulatorische T-Zellen (Treg) und Natural Killer cells (NK-Zellen) entgegen. Durch die antigeninduzierte Aktivierung von T-Zellen sezernieren diese eine Vielzahl von Zytokinen. Die Zytokine stimulieren einerseits die Differenzierung naiver T-Zellen in T-Helfer-, T-Suppressor- und die Immunreaktion regulierende T-Zellen (Treg) und anschließend eine klonale Proliferation der spezifizierten Zellen (Tosi MF 2005). Einige der sezernierten Zytokine, insbesondere Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), wirken außerdem direkt inflammatorisch (Marx M 2010). Zum anderen stimulieren die ausgeschütteten Zytokine die Bildung von Antikörpern aus Plasmazellen und die Aktivierung von Makrophagen. Alle diese Mechanismen zusammen (aktivierte B- und T-Zellen, Makrophagen und Komponenten der angeborenen Immunität) sorgen für eine effektive Abwehr mit Elimination des pathogenen Antigens (Delves PJ 2000). Die T-Helferzellen lassen sich noch weiter aufteilen. Wenn die CD4-positiven Zellen aktiviert werden, differenzieren sie sich in die bisher bekannten drei Untergruppen, die sog. Th1, Th2 und Th17 Zellen. Dabei unterscheiden sich diese u.a. durch die Zytokine, die sie sezernieren. Th1 Zellen bilden IFN $\gamma$  und Interleukin 2 (IL2) und aktivieren darüber Makrophagen, Th2 Zellen sezernieren IL4, und die erst kürzlich entdeckten Th17 Zellen sind charakterisiert durch die Expression von IL17 und IL22 (Summers SA 2009, Zhu J 2010). Es herrscht ein Ungleichgewicht zwischen autoreaktiven T-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen (Tregs) in der ANCA-Vaskulitis (Cartin-Ceba R 2012). Außerdem wurden bei Patienten mit aktiver GPA höhere Level von aktivierten CD4-positiven Zellen berichtet als bei Patienten in Remission. Des Weiteren zeigten sich bei diesen Patienten auch erhöhte Spiegel der Th1 Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Die Monozyten dieser Patienten setzten große Mengen an IL12 frei, welches wiederum in hohem Maße die Freisetzung von Th1 Zytokinen anregte (Marinaki S 2006).

ANCA werden durch Plasmazellen sezerniert. Im Falle der ANCA-assoziierten

Vaskulitis finden sich B-Lymphozyten vermehrt in angegriffenem Gewebe z.B. der Niere und den Atemwegen. Ebenso ist die Anzahl der zirkulierenden und aktivierten B-Zellen im Gegensatz zu Gesunden erhöht (Popa ER 1999). B-Zellen unterstützen die *in situ* stattfindende Inflammation und führen somit auf Dauer zu einer Chronifizierung der Entzündung und zu fibrotischem Schaden (Shen Y 2012). Dass die B-Zellen eine wichtige Rolle in der AAV spielen, zeigt sich auch an der Wirkung des B-Zell-depletierenden Medikaments Rituximab. Steinmetz et al. fanden in einer Studie, dass die B- und T-Zellen eine gewisse Organisation aufweisen können, die bis hin zur Ausbildung von lymphknotenähnlichen Gebilden führen kann (Steinmetz OM 2008). Ob diese Organisation eine Rolle bei der Entstehung einer AAV spielt und ob sie einer Auswirkung auf die Prognose der Patienten hat, konnte bisher allerdings nicht sicher gezeigt werden.

### **1.5 Sekundäre Lymphatische Organe, Struktur und Funktion**

Als sekundäre lymphatische Organe werden Lymphknoten, Milz, Tonsillen, Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT), Darm-assoziiertes Gewebe (GALT) und Bronchialsystem-assoziiertes lymphatisches Gewebe (BALT) bezeichnet. Dorthin gelangen die B- und T-Lymphozyten nach ihrer vollständigen Ausreifung im Knochenmark oder im Thymus über das Blut. Trifft dort ein Lymphozyt auf ein entsprechendes Antigen, wird eine Immunantwort ausgelöst. Diese sekundären lymphatischen Gewebe besitzen stark gegliederte Strukturen mit unterschiedlichen Bereichen für B- und T-Zellen. Hinzu kommen in den Geweben enthaltene Makrophagen, dendritischen Zellen und Stromazellen, die durch spezifische Wechselwirkungen zu einer speziellen Kompartimentierung beitragen. Direkt unter der Kapsel der Lymphknoten befinden sich organisierte B-Zell-Follikel, weiter innen parakortikal und parafollikulär die T-Zell-Regionen. Zentral in den B-Zell-Regionen befinden sich die follikulären dendritischen Zellen, die wohl hauptsächlich auf die Präsentation von Antigen-Antikörper-Komplexen an die B-Zellen spezialisiert sind. Um Lymphozyten an ihren Bestimmungsort zu locken, werden von den sich entwickelnden Geweben Lympho-Zytokine (eine Untergruppe der TNF-Proteinfamilie) sezerniert, welche die Lymphozyten dorthin lenken. Um dort in die Kompartimente zu migrieren, sind besondere Chemokine nötig. Die B-Zellen exprimieren den Rezeptor CXCR5. Der Ligand dieses Rezeptors ist CXCL13. Damit Lymphozyten in die lymphatischen Gewebe eintreten können, besitzen Lymphknoten hoch-endotheliale Venulen (HEV).

In die Milz hingegen gelangen die Lymphozyten über einfache Blutgefäße (Murphy K 2009). In der gesunden Niere befindet sich normalerweise kein lymphatisches Gewebe. Bei entzündlichen und fibrosierenden Erkrankungen kann es allerdings zu dichten Ansammlungen von Leukozyten kommen (Steinmetz OM 2008).

## **1.6 Klinik der AAV**

Da die AAV zahlreiche Organe befallen kann, sind Anzahl und Ausprägung der Symptome sehr variabel. Patienten mit einer ANCA-assoziierten Vaskulitis präsentieren sich klinisch zu etwa 70% mit allgemeinen Krankheitssymptomen wie Fieber, wandernden Gelenkschmerzen, Unwohlsein und Gewichtsverlust (Savage CO 1985, Agard C 2003, Cordier JF 1990). Diese unspezifischen Symptome können unter Umständen schon Monate bis Jahre vor der Diagnosestellung auftreten (Lhote F 1996). Die hauptsächlichen Manifestationsorte der ANCA-assoziierten Vaskulitis sind Niere, Lunge, obere Atemwege, Hals-Nasen-Ohren, Haut und Gelenke. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben.

### **1.6.1 Renale Manifestation**

Die renale Manifestation einer AAV zeigt sich klinisch meist als rapid progrediente Glomerulonephritis (RPGN), und die häufigste Ursache einer RPGN ist die ANCA-assoziierte Vaskulitis (Rutgers A 2010). Diese kann anfänglich symptomarm verlaufen aber auch direkt mit einer Dialysepflichtigkeit einhergehen und lebensbedrohlich sein (Cordier JF 1990, Chen YX 2013). Dabei findet sich eine Proteinurie und Hämaturie mit dysmorphen Erythrozyten im Sediment, was aber von den Patienten unbemerkt bleiben kann (Savage CO 1985, Chung SA 2010, Hoffman GS 1992). Bei erstmaliger Vorstellung der Patienten mit AAV zeigt sich nur bei ca. 18% eine Glomerulonephritis. Allerdings entwickelt sich diese im Verlauf der Erkrankung bei bis zu 85% der Patienten (Hoffman GS 1992). Der histologische Befund ist parallel zur Schwere des klinischen Verlaufes sehr variabel und kann von fokaler und segmentaler Glomerulonephritis mit fast normaler Nierenfunktion zu schwerer, diffus nekrotisierender Glomerulonephritis mit dialysepflichtigem Nierenversagen reichen (Jennette JC 1994, Savage CO 1985). Dabei kann es sich auch um eine renal limitierte Form der GPA oder MPA handeln (Hauer HA 2002). Besonders die GPA zeigt in 80-100% eine renale Beteiligung (Guillevin L 1999). Die renale Histologie der AAV ist charakterisiert durch eine pauci-immune, nekrotisierende Halbmond-Glomerulonephritis (Villiger PM 2010). Dieses

histologische Bild entsteht durch die Nekrose von glomerulären Kapillaren, einhergehend mit einer extrakapillären Zellproliferation in Form von sog. Halbmonden (engl. crescent). Es kommt dabei zu mehr oder weniger dichten periglomerulären und interstitiellen entzündlichzelligen Infiltraten. Selten findet sich eine nekrotisierende Vaskulitis präglomerulärer Arterien oder eine leukozytoklastische Vaskulitis der peritubulären Kapillaren im Mark (sog. medulläre Angiitis). Typisch im Gegensatz zu anderen Glomerulonephritisformen ist das weitgehende Fehlen von glomerulären Immunglobulin- oder Komplement-Ablagerungen. Deshalb bezeichnet man diese Form der Glomerulonephritis als pauci-immun. Die oben beschriebene histopathologische Befundkonstellation ist wegweisend für die Diagnose der AAV. Dabei sind häufig nicht alle Glomeruli von den Läsionen betroffen. Finden sich in weniger als 50% Halbmonde oder Nekrosen, handelt es sich um eine fokale Form. Bei über 50% um eine diffuse Form. Gleichzeitig können sich diese Schädigungen nur auf Teile des Glomerulus beziehen (segmental) oder auf den kompletten Glomerulus (global). Die European Vasculitis Study Group (EUVAS) hat eine histopathologische Klassifikation für ANCA-assoziierte Glomerulonephritiden mit einer Einteilung in vier Kategorien erarbeitet: die fokale, die Halbmond- (crescentic), die sklerotische und die gemischte Klasse. Fokal bedeutet, dass mindestens 50% der Glomeruli normal sind. Bei der Halbmond-Kategorie zeigen die Hälfte oder mehr der Glomeruli zelluläre Halbmonde. Als sklerotisch wird die Biopsie bezeichnet, wenn 50% oder mehr der Glomeruli global vernarbt sind. Alle anderen Fälle werden als gemischt klassifiziert (Berden AE 2010). Ebenso können auch Tubuli und das Interstitium in verschiedener Ausprägung betroffen sein.

### **1.6.2 Manifestation der Lunge und oberen Atemwege**

Eine pulmonale Beteiligung kann sich verschieden darstellen. Klinisch kommt es zu Heiserkeit, Husten, Dyspnoe, Hämoptysen und pleuritischen Schmerzen (Savage CO 1985). Im schlimmsten Falle entwickelt sich eine alveoläre Hämorrhagie, die vor allem bei der MPA in bis zu 55% auftreten kann. Weitere Veränderungen können restriktive oder obstruktive pulmologische Krankheitsbilder sein. Restriktive Veränderungen entstehen typischerweise nach Blutungen, die zu einer Fibrose führen können. Obstruktive Störungen finden sich häufig bei der EGPA mit Asthma (Gómez-Puerta JA 2009). Insgesamt sind ca. 90% der Patienten mit einer GPA von einer Manifestation der oberen Atemwege betroffen, zumeist mit granulomatösen Veränderungen (Seo P

2004). Die Thorax-Bildgebung kann pulmonale Knoten, Kavernen, diffuse Verdichtungen und Infiltrate zeigen (Cordier JF 1990).

### **1.6.3 Manifestationen im Hals-Nase-Ohren-Bereich**

Manifestationen im Hals-Nase-Ohren-Bereich kommen sowohl bei der MPA als auch bei der GPA vor. Wesentlich häufiger in bis zu 90% sind sie allerdings bei der GPA anzutreffen. Dabei kommt es zu blutigen Krusten in der Nase, blutigem Schnupfen über eine längere Zeitspanne, nasalen Ulzerationen, Sinusitis, Otitis media und Polychondritis. Auch Ohrenscherzen oder ein Hörverlust sind möglich. Typisch für Patienten mit GPA ist eine Destruktion des Knorpels, was zu einer sog. Sattelnase führen kann (Jennette JC 1997, Hoffman GS 1992, Seo P 2004).

### **1.6.4 Manifestationen der Haut**

Die Ausprägung der Hautmanifestation ist variabel. Annähernd 50% der Patienten mit GPA entwickeln eine Hautveränderung. Diese können ein erster Vorbote für eine renale Beteiligung sein. Die häufigste Manifestation einer AAV der Haut stellt die leukozytoklastische Vaskulitis dar, welche besonders an den unteren Extremitäten zur Purpura führt. Auch andere Veränderungen, wie Ulzerationen oder kutane Knoten sind möglich (Daoud MS 1994).

### **1.6.5 Andere Manifestationen**

Theoretisch kann jedes Organ von einer AAV betroffen sein, die weiteren üblichen Manifestationen sind jedoch Nervensystem, Herz und Auge. Am Auge kann sich eine AAV als Pseudotumor, Skleritis, Keratitis oder Retinitis manifestieren. Dabei kann es sich um eine auf das Auge limitierte AAV handeln oder häufiger im systemischen Stadium auftreten (Schmidt J 2011). Die nervale Manifestation einer AAV kann zu Störungen des zentralen sowie des peripheren Nervensystems führen (Magnus T 2012). Im Gegensatz zu renalen und pulmonalen Manifestationen sind die neuronalen Veränderungen meist nicht lebensbedrohlich, können in seltenen Fällen allerdings mit schweren zerebralen Ischämien einhergehen. Eine nervale Beteiligung findet sich bei ca. 37% der Patienten mit MPA, bei 51% mit GPA und 76% mit EGPA. Dabei dominiert häufig eine Störung eines peripheren Nervs als Mononeuritis multiplex. Störungen des zentralen Nervensystems sind unter anderem arachnoidale Hämorrhagien, cerebrovaskuläre Insulte und diffuser Kopfschmerz (Zhang W 2009). Zusätzliche

Manifestationen können am Herzen als Kardiomyopathie, im Gastrointestinaltrakt mit blutiger Enterokolitis und im Urogenitaltrakt oder an der Parotis auftreten, sind aber selten (Seo P 2004).

### **1.7 Diagnostik der AAV**

Eine rasche Diagnose der AAV ist von großer Bedeutung, um das schnelle Einleiten einer Therapie zu gewährleisten und somit die Organfunktionen und das Leben des Patienten zu erhalten (Jayne D 2009). Einer sorgfältigen Anamnese und körperlichen Untersuchung folgt die labordiagnostische Serumbestimmung der ANCA und anderer Faktoren wie Kreatinin mit eGFR. Die meisten Routine-Laboruntersuchungen sind allerdings eher unspezifisch und differenzialdiagnostisch nützlich. Weiterhin ist eine Urinanalyse mit Hinblick auf Hämaturie, Proteinurie und das Vorhandensein eines aktiven Urinsediments mit dysmorphen Erythrozyten und ggf. Erythrozytenzylindern essentiell. Bei pulmonalen Symptomen ist eine Bildgebung der Lunge, meist eine Computertomographie notwendig, um Infiltrate, Knoten oder Verschattungen auszuschließen. (Cordier JF 1990). Um den Verdacht einer AAV zu bestätigen, stellt die Nierenbiopsie den Goldstandard der Diagnostik dar. Die histologischen Nierenbefunde der AAV werden in Kapitel 1.6.1 beschrieben.

### **1.8 Therapie und Prognose**

Da die AAV eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung ist, ist ein gutes Krankheits- und Therapie-Management von essentieller Bedeutung. Es wird eine schnelle Diagnose, ein früher Beginn der Behandlung, ein möglichst baldiges Erreichen einer Remission zur Prävention von Organschäden angestrebt. Ziel ist dann der Erhalt der Remission und das Vermeiden von Medikamenten-induzierten Schäden (Ntatsaki E 2014). Als Induktionsschema bei Patienten mit einer erstdiagnostizierten AAV mit Nierenbeteiligung haben sich Glukokortikoide (GC) in Kombination mit Cyclophosphamid (CYC) oder Rituximab (RTX) etabliert. Eine solch aggressive Immunsuppression ist insofern gerechtfertigt, als dass eine unbehandelte GPA historisch in bis zu 90% der Fälle innerhalb von zwei Jahren zum Tode führte (Hoffmann GS 1992). Das im Folgenden beschriebene Therapieregime basiert auf den Europäischen Empfehlungen der Rheumatologie und Nephrologie (Yates ARD 2016, EULAR und ERA/EDTA Empfehlungen). Die initiale Gabe der Glukokortikoide sollte nach drei Tagen intravenöser Pulstherapie (á 500mg) täglich als orales Prednisolon



(1mg/kg bis zu 60mg) gegeben werden und dann zügig auf 10mg in 12 Wochen reduziert werden. Cyclophosphamid sollte zu Beginn alle zwei Wochen als intravenöser (i.v.) Puls, später alle drei Wochen gegeben werden. Dabei sollte die Standarddosis von 15 mg/kg je nach Alter und Nierenfunktion individuell angepasst werden. Die Dauer der Cyclophosphamid-Gabe sollte zwischen drei und sechs Monaten liegen. Bei einer Unverträglichkeit sollte auf Rituximab umgestellt werden. Rituximab ist seit April 2013 für die Behandlung der AAV offiziell zugelassen (DGRh, 2014) und gilt als genauso effektiv wie Cyclophosphamid. Es wird bevorzugt bei jungen Patienten eingesetzt, um eine Infertilität zu vermeiden. Es werden vier wöchentliche Boli á 375 mg/qm KOF/Woche verabreicht. Als Medikamente zur Erhaltungstherapie kommen dann Azathioprin (2mg/kg KG), Methotrexat (MTX, 20-30mg/Woche) und Mycophenolatmofetil (MMF, 2g/Tag) in Frage. Auch Rituximab kann nun bisher off-label als Erhaltungstherapie verwendet werden (500mg alle 4-6 Monate). Bei erfolgreicher Remission sollte die Medikamentengabe über mindestens 24 Monate fortgesetzt werden.

Für die Therapiestratifikation muss unterschieden werden, ob es sich um eine milde Manifestation oder um eine schwerwiegendere Form handelt. Eine milde Manifestation zeigt sich bei Patienten ohne Nachweis einer aktiven Glomerulonephritis und keiner Bedrohung der Organfunktionen oder des Lebens. Dagegen definiert sich eine ernsthafte Manifestation einer AAV mit drohenden Organversagen, welche lebensbedrohlich sein können. Demnach werden Patienten mit einer milden Manifestation als Initialtherapie mit Glukokortikoiden und Methotrexat behandelt. Bei Nichtansprechen auf Methotrexat oder Persistenz der Erkrankung muss stattdessen auf Cyclophosphamid oder Rituximab umgestellt werden. Liegt eine schwerere Manifestation vor, sollten die Glukokortikoide gleich mit Cyclophosphamid oder Rituximab kombiniert werden.

Zusätzlich müssen weitere Maßnahmen erfolgen, um therapiebedingte Komplikationen möglichst zu minimieren. Dazu gehören regelmäßige Laboruntersuchungen zur Überprüfung der Elektrolyte und der Leberfunktion, Urinalysen um medikamenten-induzierte Harnblasenschäden des Cyclophosphamids zu detektieren, Serum-Immunglobulin-Untersuchungen vor einer Rituximab-Therapie zur Vermeidung einer Hypogammaglobulinämie, die Pneumozystis jirovecii Prophylaxe und die Behandlung von Staphylokokkus aureus bei Patienten mit Nasenbesiedlung. Des Weiteren sind das Screening für zervikale

intraepitheliale Neoplasien, eine Osteoporose-Prophylaxe, das Tuberkulose-Screening und die prophylaktischen Impfungen gegen Pneumokokken, Influenza und Hepatitis B zu erwähnen. Schließlich sind die individuelle Ermittlung von kardiovaskulärem, thrombembolischem und Risiko einer Infertilität abzuschätzen.

Bei einem Rezidiv sollten mögliche Ursachen identifiziert und gleichzeitig die Immunsuppression angepasst werden. Die Prednisolongabe sollte erhöht werden und meist wird die Gabe von Rituximab oder Cyclophosphamid erneut erforderlich. Dass eine Plasmaseparation bei organbedrohender Vaskulitis von Vorteil ist, postuliert bisher nur eine Studie. Die Mepex-Studie zeigte, dass Patienten im ersten Jahr ein geringeres Risiko für eine terminalen Niereninsuffizienz hatten wenn sie zusätzlich zur Standardtherapie mit Cyclophosphamid und oralen Steroiden eine Plasmaseparation erhielten. Allerdings zeigte sich kein Überlebensvorteil und im späteren Verlauf auch kein Unterschied im Nierenüberleben mehr (Lee T 2014, Jayne DRW 2007). Bezüglich des Profits eines Plasmaaustausches wird derzeit die PEXIVAS-Studie durchgeführt (Walsh M 2013). Ob Cyclophosphamid oder Rituximab die bessere Option für eine Therapie darstellt, wurde in zwei Studien untersucht. Zum einen verglich das National Institute of Health (NIH) eine Induktionstherapie mit Rituximab mit der Gabe von oralem Cyclophosphamid (Stone JH 2010). Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Medikamente bezüglich des Erreichens einer Remission innerhalb von sechs Monaten. Bei Patienten, die allerdings schon ein Rezidiv erlitten hatten, zeigte Rituximab bei 34 von 51 der Patienten (67%) eine Remission, im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit einer Remission bei 21 von 50 Patienten (42%)(Stone JH 2010). Die Anzahl der Patienten die sich nach 18 Monaten weiterhin in Remission befanden, war in beiden Gruppen ähnlich. Auch die unerwünschten Arzneimittelwirkungen hielten sich die Waage. In einer zweiten Studie (RITUXVAS) wurde Patienten mit neu diagnostizierter AAV entweder Rituximab in Kombination mit zwei intravenösen Cyclophosphamid-Pulsen oder nur Cyclophosphamid verabreicht (Jones RB 2010). Nach 12 Monaten zeigte sich zwischen den beiden Gruppen der RITUXVAS-Studie kein signifikanter Unterschied bezüglich der Remissionsraten und unerwünschten Nebenwirkungen.

Im Alltag wird die Therapie mit Cyclophosphamid heutzutage meist als intravenöser Puls verabreicht. Ein Überlebensvorteil hat diese im Vergleich zur oralen Therapie in Studien nicht erbracht (Hogan SL 2005). Der Vergleich der beiden Verabreichungsmodi zeigte auch keinen Unterschied bezüglich der Remissionsraten.

Bei der intravenösen Therapie kam es zu einer höheren Anzahl an renalen Rezidiven, die jedoch keine Verschlechterung des Nierenüberlebens mit sich brachte. Es traten weniger Fälle von Leukopenien auf und die kumulative Dosis des Cyclophosphamids war geringer. Bezüglich der Anzahl an Todesfällen zeigte sich im Verlauf kein Unterschied. Ebenso gab es keinen Unterschied bezüglich terminaler Niereninsuffizienz (de Groot K 2001). Obwohl sich die Prognose der Patienten durch die Therapie mit Glukokortikoiden und Cyclophosphamid deutlich verbessert hat, erleidet immer noch ein signifikanter Teil der Patienten ein Rezidiv der Erkrankung (Jones RB 2009). Zunächst ist eine komplette Remission unter der Cyclophosphamid- bzw. Rituximab-Therapie in ca. 80% der Fälle möglich (Berden AE 2012).

Die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei ca. 80%. Besonders pulmonale Hämorrhagien und ein hohes Alter der Patienten bei bereits stark eingeschränkter Nierenfunktion sind neben therapiebedingten Todesfällen die Ursachen für die hohe Mortalität in den ersten Jahren der Erkrankung (Savage COS 1997). Fast alle Patienten erleiden ernste Schädigungen durch die Erkrankung (86%) oder die Behandlung (42%) (Hoffman GS 1992). Bei etwa 25% der Erkrankten kommt es innerhalb von 4-5 Jahren zu einer terminalen Niereninsuffizienz, welche eine Dialyse notwendig macht. Diese wiederum birgt ein erhöhtes Risiko, an den kardiovaskulären und Infekt-Komplikationen zu versterben (Lionaki S 2009).

## **1.9 Fragestellung**

Die schlechte Prognose und der sehr variable Verlauf der AAV sind eine große Herausforderung. Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob und in welchem Maße die Organisation von B- und T-Lymphozyten in der Nierenbiopsie von AAV-Patienten eine prognostische Aussage zum Krankheitsverlauf der Patienten erlaubt. Dazu wurde als Kriterium für die Beeinträchtigung der Nierenfunktion die GFR den Stadien der lymphozytären Infiltration gegenübergestellt. Ziel war es herauszufinden, ob der Organisationsgrad der intrarenalen Lymphozyten einen prognostischen Wert für die AAV hat.

## **2. Material und Methodik**

Um die Hypothese zu überprüfen, dass ein höheres Organisationslevel der renal infiltrierenden B- und T-Lymphozyten mit einem schlechteren Krankheitsverlauf der Patienten mit AAV einhergeht, wurden mikroskopische Untersuchungen an Nierenbiopsien von Patienten mit einer ANCA-assoziierten PRGN der prospektiven RPGN Studie der III. Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Eppendorf mit dem Ethikvotum PV3162 nach vorher festgelegten Kriterien vorgenommen.

### **2.1 Patienten und Gewebeproben**

Es wurden Nierenbiopsien von 63 Patienten (14 weiblich, 49 männlich) mit einer ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis (ANCA-GN) im Zeitraum von 2008 bis 2012 verwendet. Die Biopsien stammten aus der Sektion Nephropathologie des Institutes der Pathologie der Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Die klinischen Daten des Patientenkollektivs stammten aus der Datenbank der RPGN Studie.

#### **2.1.2 Prinzip der Färbungen**

Für die Immunhistochemie wurden Paraffinschnitte aus Formalin-fixierten Gewebeproben (ca. 2µm Dicke) hergestellt. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholkonzentrationsreihe konnten B- und T-Lymphozyten angefärbt werden. Als Oberflächenmarker dienten T-lymphozytäres CD3 (Cluster of Differentiation) und B lymphozytäres CD20. Im Falle einer ausgeprägten Organisation (siehe 2.2) der intrarenalen Lymphozyten wurden folliculäre dendritische Zellen mit CD21 markiert. Zunächst wurde eine Doppelmarkierung von CD3 (T-Lymphozyten) und CD20 (B- Lymphozyten) mit DakoHRP und Zytomed POLAP vorgenommen. Um die beiden Antigene in verschiedenen Farben für die Beurteilung am Lichtmikroskop darzustellen, wurde neben der APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode) zur Markierung der B-Zellen zusätzlich der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex für die Färbung der T-Zellen verwendet. Die APAAP-Methode lieferte ein rötlich-pinkes- und die Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode ein braunes Färberegebnis.

### **2.1.3 APAAP- Methode**

Die immunhistologische Färbung der B-Lymphozyten wurde mittels APAAP-Methode angefertigt. Diese Methode ermöglichte einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers. Für diese immunhistologische Färbereaktion benötigte man drei Antikörper: 1. Einen primären Antikörper, der gegen das nachzuweisende Antigen (hier CD20) gerichtet ist. 2. Einen polyklonalen Anti-Maus-IgG Brückenantikörper vom Kaninchen der sowohl den primären als auch den dritten benötigten Antikörper bindet. 3. Ein Anti-Kaninchen-Kunststoff Polymer, das intestinale alkalische Phosphatase gebunden hat und das von dem Brückenantikörper gebunden wird. Setzt man nach der Bindung des letzten Antikörpers Naphthol-As-Biphosphat, das Substrat der alkalischen Phosphatase, hinzu, ergibt sich ein Spaltprodukt, das mit Neufuchsin einen roten Farbniederschlag bewirkt.

### **2.1.4 Streptavidin-Biotin-Peroxidase- Methode**

Zusätzlich zur APAAP-Methode wurde für die benötigte Doppelfärbung die Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode für T-Lymphozyten (CD3) verwendet. Dabei wurde der primäre Antikörper gegen CD3 mit einem sekundären anti-Maus-Antikörper verbunden, welcher mit Biotin konjugiert ist. In der dritten Inkubation mit einem Streptavidin-Myrrhenschwamm-Peroxidase-Komplex bindet das Streptavidin an das Biotin des zweiten Antikörpers. Die Entwicklung des Färbeergebnisses erfolgt durch eine Benzidin-Reaktion, bei der ein brauner Farbniederschlag entsteht.

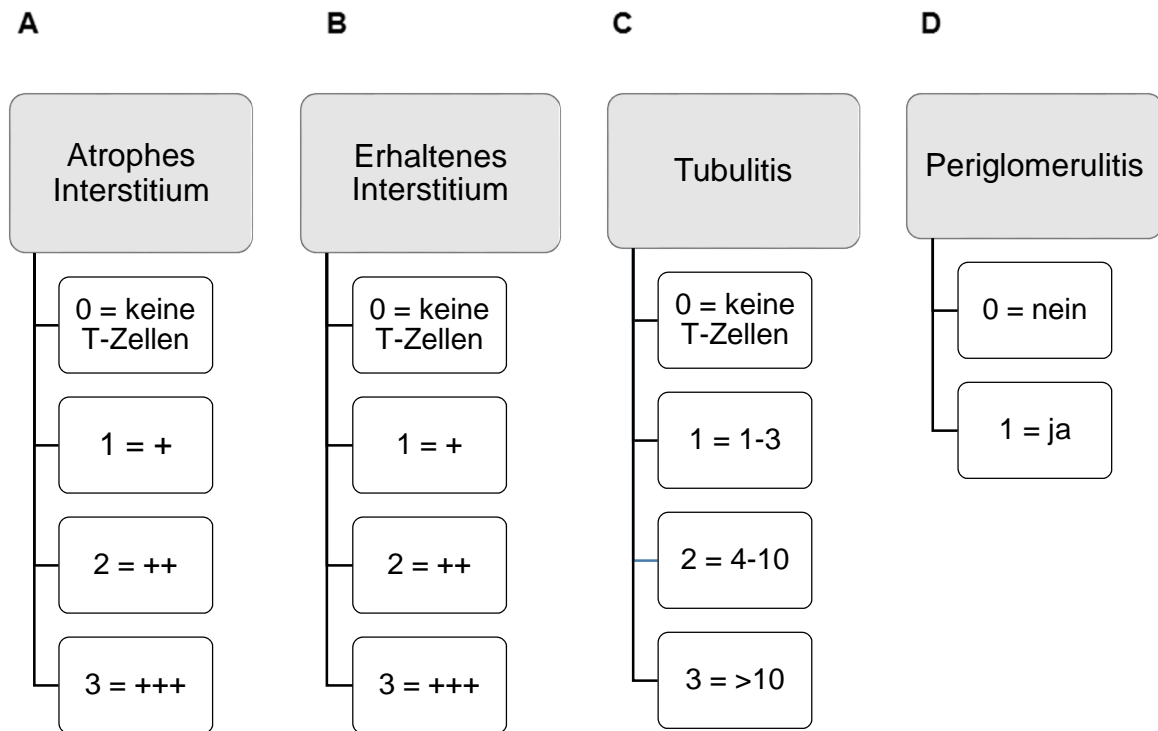
### **2.1.5 ABC-Methode**

Im Falle einer höheren Organisation der Lymphozyten wurden die Gewebeschnitte noch mit der ABC-Methode angefärbt, um den Marker CD21 der folliculären dendritischen Zellen darzustellen. Das Färbeergebnis war rot. Als sekundäre Antikörper wurden BA-2000: Anti-Maus IgG (H+L) biotinyliert und AK-5000: VECTASTAIN ABC Alkalische Phosphatase Kit Standard verwendet. Das Anfärben der Biopsien erfolgte nach dem Standard der Nephropathologie. Die Biopsien wurden an einem Zeiss Scope A1 (Seriennummer 3333000804) und einem Zeiss Axioskop 20 (Seriennummer 125095) Mikroskop beurteilt.

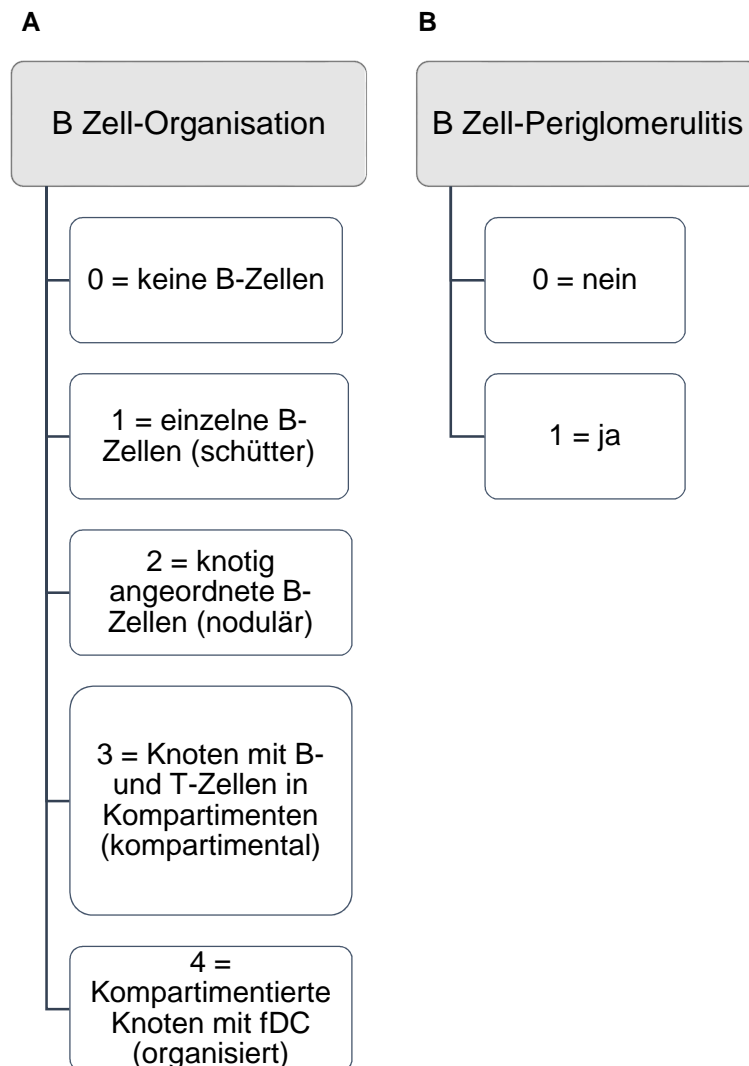
## 2.2. Auswertung

Die Nierenbiopsieschnitte wurden lichtmikroskopisch beurteilt. Dafür wurden zuvor verschiedene Kategorien und Stadien der lymphozytären Infiltration festgelegt, nach denen die Schnitte betrachtet wurden (Abbildung 1 und 2).

**Abbildung1: Untersuchung des T-lymphozytären Infiltrates**



**Abbildung 2: Untersuchung des B-lymphozytären Infiltrates und der Organisation**



### 2.2.1 T-Zellen

Das T-Zellinfiltrat wurde in atrophem und mikrostrukturell erhaltenem Tubulointerstitium getrennt voneinander untersucht. Des Weiteren wurden die T-Zell-Tubulitis und Periglomerulitis inspiziert. Bis auf die Periglomerulitis, welche lediglich in vorhanden und nicht vorhanden eingeteilt wurde, wurden vier semiquantitative Stadien festgelegt. Das interstitielle Kompartiment wurde wie folgt eingeteilt. Im Stadium 0 fehlte jegliches T-Zellinfiltrat. Stadium 1 enthielt vereinzelt verstreute T-Lymphozyten (schütter/scattered). Im Stadium 2 gab es ein moderates T-Lymphozyteninfiltrat (moderat) und im Stadium 3 fand sich ein dichtes T-Zellinfiltrat (dicht/severe). Die T-Zelltubulitis wurde entsprechend der Banff-Klassifikation eingeteilt (Weidemann A, 2015). Im Stadium 0 fanden sich keine T-Zellen im Tubulusquerschnitt. Im Stadium 1

zeigten sich 1-3 T-Lymphozyten und im Stadium 2 4-10 T-Lymphozyten im Tubulus-Querschnitt. Im Stadium 3 lagen mehr als 10 T-Lymphozyten intratubulär.

### **2.2.2 B-Zellen**

Es wurden fünf Stadien definiert, beginnend mit Stadium 0, in dem sich kaum B-Zellen fanden. Stadium 1 entsprach ungeordnet verteilten B-Zellen (schütter verteilt/scattered). Im Stadium 2 fanden sich knotig angeordnete B-Zellen (nodulär). Im Stadium 3 zeigten sich noduläre Lymphozyteninfiltrate, in denen T- und B-Zellen in Kompartimenten angeordnet waren. Im Falle einer ausgeprägten lymphozytären Organisation wurden, wie bereits in Kapitel 2.1.5 erwähnt, zusätzlich folliculäre dendritische Zellen (fDC) mit Anti-CD21 markiert. Dendritische Zellen bilden das Zentrum der lymphknotenähnlichen Formationen. Im Stadium 4 fanden sich in den knotigen Lymphozytenanordnungen zusätzlich folliculäre dendritische Zellen. Auch für die B Zellen wurde eine Einteilung der Periglomerulitis in vorhanden und nicht-vorhanden vorgenommen.

Ergänzend wurde die interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (IFTA) sowie der akute, potentiell reversible Tubulusschaden mit der GFR korreliert. Die Festlegung des prozentualen Ausmaß des betroffenen Nierengewebes wurde von Dr. M. de las Noriega des Institutes für Pathologie vorgenommen. Die histologischen Befunde wurden dem histopathologischen Stadium der Erkrankung und der glomerulären Filtrationsrate zugeordnet, um so Zusammenhänge zwischen renaler Funktion und histologischen Befunden zu erkennen. Die histologische Charakterisierung erfolgte zunächst in der Übersichtsvergrößerung (25x). Anschließend wurden die Zellstrukturen bei stärkerer Vergrößerung (200x und 400x) quantifiziert. Die Klassifikation der histologischen Ergebnisse bezüglich der mikroskopischen Beurteilung wurden von Dr. S. Brix und Prof. T. Wiech validiert. Die Beurteilung der Biopsien in Bezug auf die EULAR ANCA-Klassifikation und die verschiedenen Stadien der glomerulären Schädigungen wurden von Prof. Wiech durchgeführt (Berden A 2010).

### **2.3. Statistik**

Für die Korrelationsanalysen wurde der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient-Test durchgeführt und in den direkten Vergleichsanalysen zweier untersuchter histologischer Parameter der Zweistichproben t-Test.



### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Basischarakteristika der Patienten**

Es wurden die Daten von 63 Patienten erhoben, wovon 32 (50.8%) an einer GPA und 31 (49.2%) an einer MPA erkrankt waren. Es waren 50 (79.4%) Männer und 13 (20.6%) Frauen. Das Durchschnittsalter des Kollektivs zu Beginn der Erkrankung lag bei 63.2 +/- 12.6 Jahren. Die glomeruläre Filtrationsrate zur Zeit der Erstdiagnose betrug 31.3 +/- 17.1 ml/min bei den Patienten, die nicht dialysepflichtig waren. Bei Diagnosestellung der AAV benötigten 16 (25.4%) Patienten einen Nierenersatz (Tabelle 2).

#### **3.2 Therapie und klinischer Verlauf der Patienten**

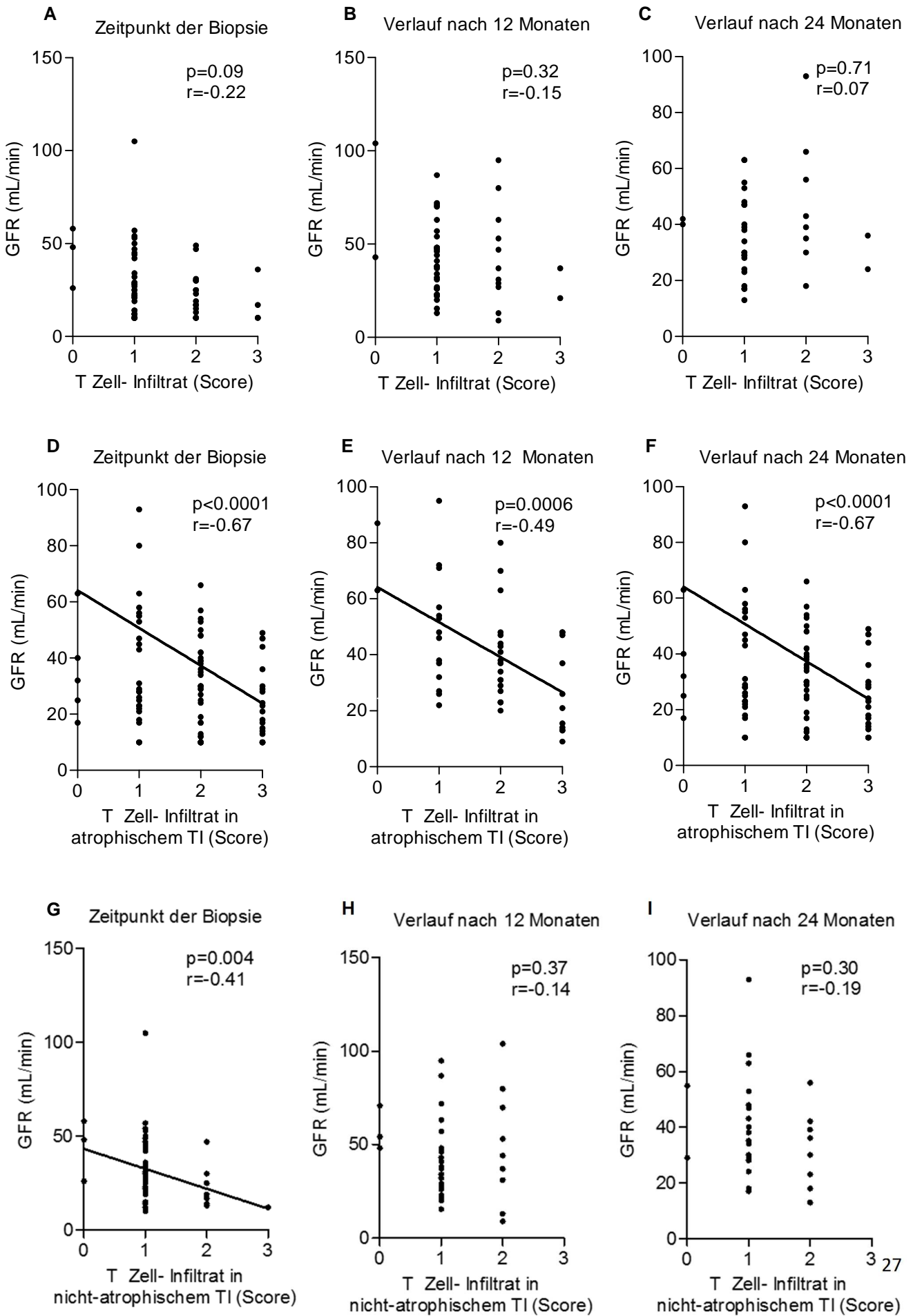
Alle Patienten erhielten eine Steroidtherapie beginnend mit einem Kortison-Puls. Es wurden 60 (95.2%) Patienten mit Cyclophosphamid induziert, die übrigen drei Patienten erhielten eine Induktion mit Rituximab. Zusätzlich wurden 20 (31.7%) Patienten mit einem Plasmaaustausch therapiert.

Der durchschnittliche Beobachtungszeitraum war 23.7 +/- 13.0 Monate. Dabei erlitten 13 (20.6%) Patienten ein Major-Rezidiv der AAV. Außerdem wurden 11 (17.5%) Patienten terminal niereninsuffizient und benötigten dauerhaft ein Nierenersatzverfahren. Während des Follow-up verstarben 9 (14.3%) Patienten.

**Tabelle 1: Basischarakteristika der Patienten**

Patienten	63
Granulomatose mit Polyangiitis - n (%)	32 (50.8)
Mikroskopische Polyangiitis – n (%)	31 (49.2)
Alter (Jahre ± SD)	63.2 ± 12.6
Männliches Geschlecht – n (%)	50 (79.4)
Follow-up (Monate ± SD)	23.7 ± 13.0
eGFR (ml/min ± SD)	31.3 ± 17.1
Dialyse zur Zeit der Diagnose – n (%)	16 (25.4)
Renales Rezidiv – n (%)	13 (20.6)
Terminale Niereninsuffizienz – n (%)	11 (17.5)
Cyclophosphamid – n (%)	60 (95.2)
Plasmapherese – n (%)	20 (31.7)
Tod – n (%)	9 (14.3)

**Abbildung 3: Korrelationen der T Zell-Infiltration**



**Abbildung 3:** Spearman Korrelationen der interstitiellen T Zell-Infiltration mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Unterteilt wird das Infiltrat nach Lokalisation in das gesamte Interstitium (**A – C**), atrophes (**D – F**) und erhaltenes Interstitium (**G – I**). Untersucht wurden die Zeitpunkte Biopsie (**A, D, G**), nach 12 Monaten (**B, E, H**) und nach 24 Monaten (**C, F, I**).

### **3.3 Interstitielle T-Zellen und Nierenfunktion (GFR)**

Zunächst wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem T-Zellinfiltrat des gesamten Interstitiums und der glomerulären Filtrationsrate (GFR) besteht. Eine Korrelation fand sich dabei nicht. (Abbildung 3A – C).

### **3.4 T-Zell-Infiltration im atrophischen Tubulointerstitium und Nierenfunktion (GFR)**

Die T-Zell Infiltration im atrophischen interstitiellen Nierengewebe korrelierte negativ mit der Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Biopsie und im Follow-up (Abbildung 3D - F).

### **3.5 Interstitielle T Zell-Infiltration im nicht- atrophischen Tubulointerstitium und Nierenfunktion (GFR)**

Es wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem interstitiellen T Zell-Infiltrat im nicht-atrophischen Tubulointerstitium mit der GFR besteht. Eine negative Korrelation fand sich zum Zeitpunkt der Biopsie, nicht aber im Follow up (Abbildung 3G - I).

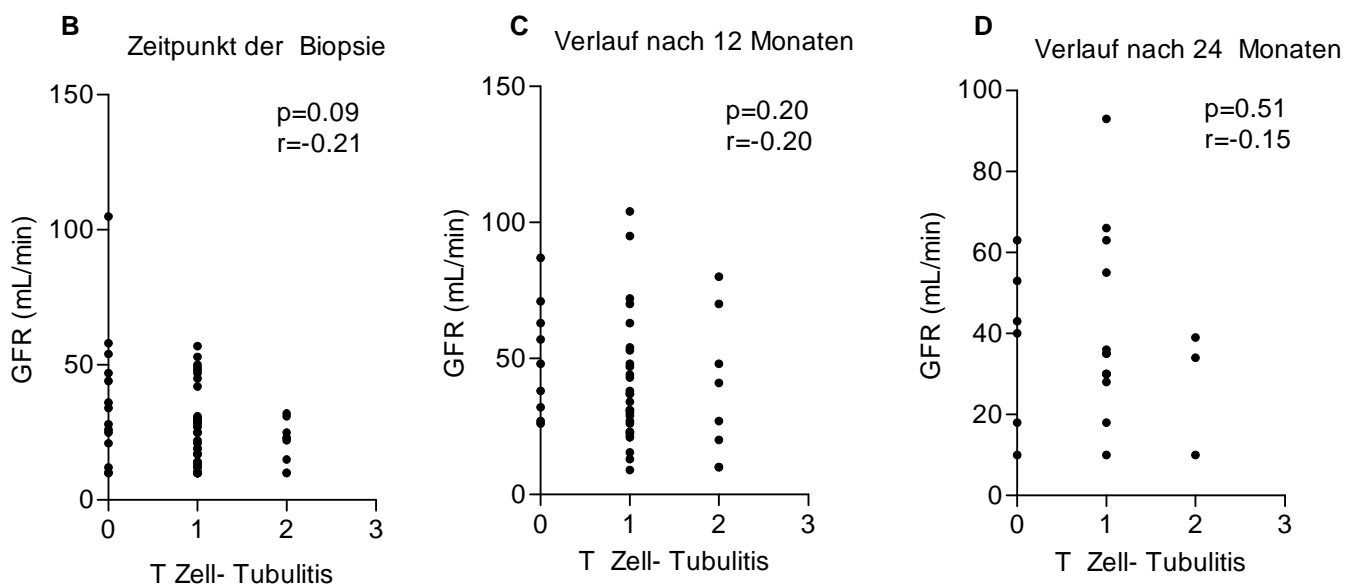
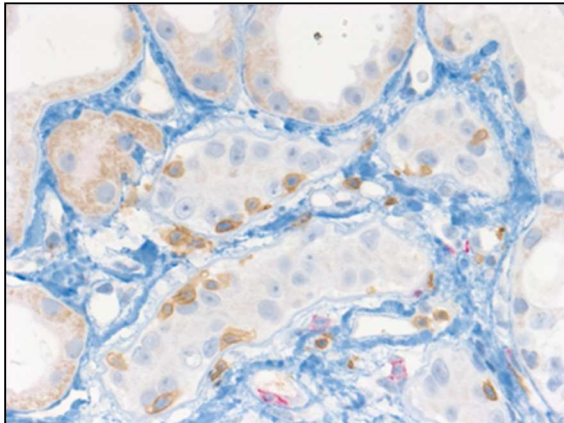
### **3.6 T-Zell-Tubulitis und Nierenfunktion (GFR)**

Die T-Zell-Tubulitis wurde wie im Material- und Methodik-Teil beschrieben nach der Banff-Klassifikation eingeteilt. Dafür wurden die Tubulusquerschnitte wie oben beschrieben nach Anzahl der T-Zellen beurteilt.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose als auch nach 12 und 24 Monaten zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Schweregrad der Tubulitis und der Nierenfunktion (Abbildung 4).

## Abbildung 4: T Zell-Tubulitis

A

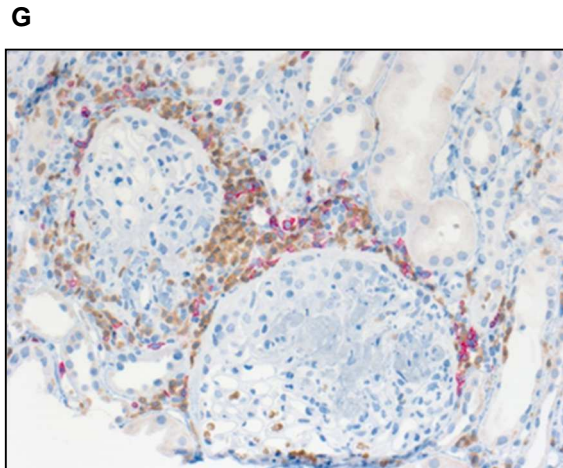
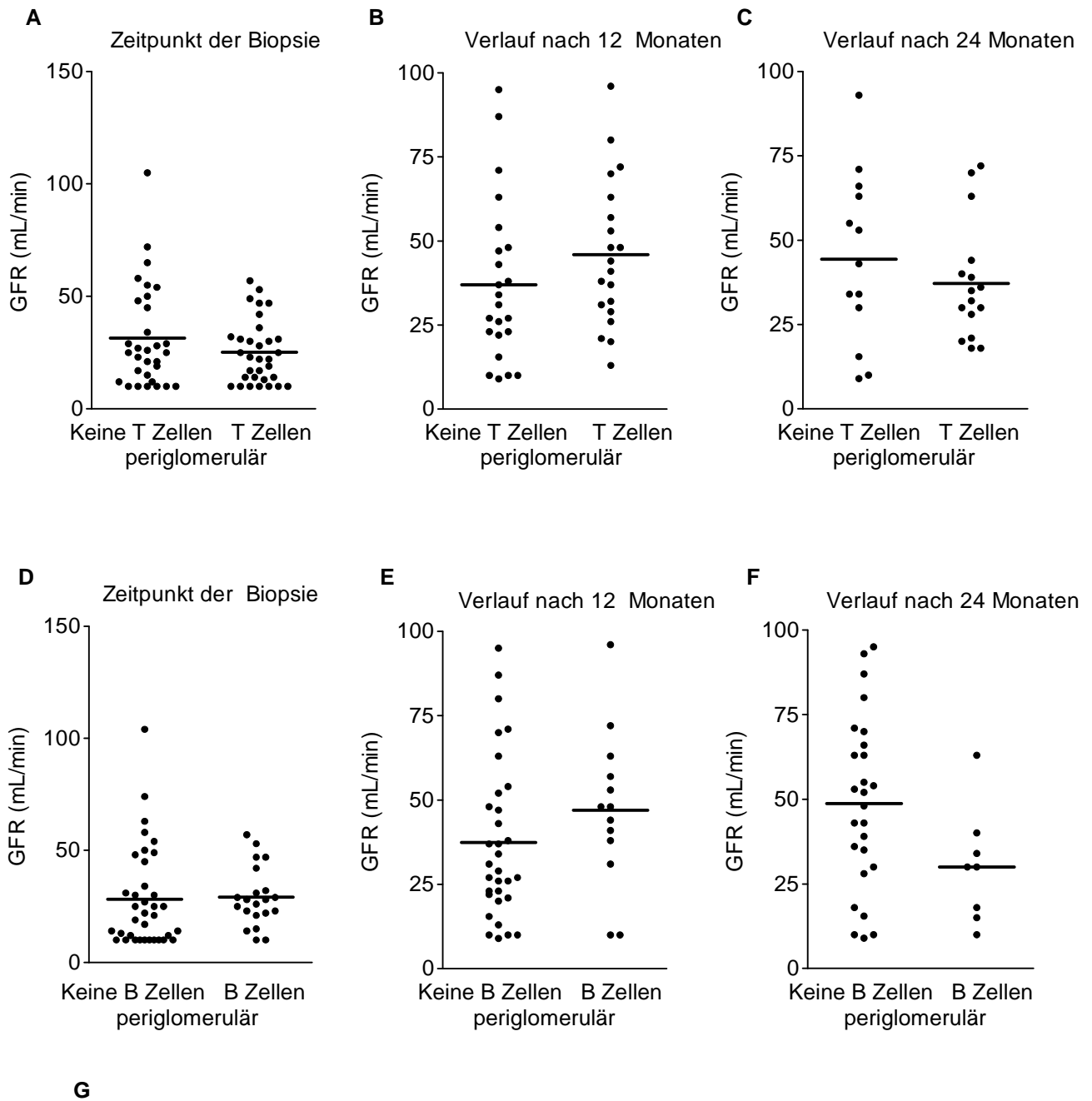


**Abbildung 4:** T-Zell-Tubulitis. **A** CD3-Färbung der T-Zellen mit brauner Färbung. Spearman Korrelation der T-Zell-Tubulitis mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zu den Zeitpunkten der Biopsie (**B**), nach 12 Monaten (**C**) und nach 24 Monaten (**D**).

### 3.7 T-Zell-Periglomerulitis und Nierenfunktion (GFR)

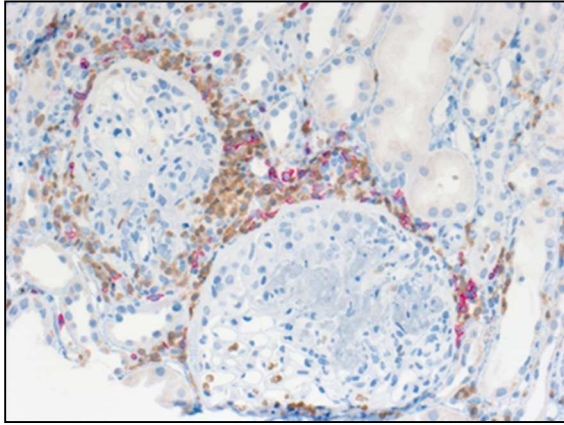
Die Periglomerulitis der T-Zellen wurde in „vorhanden“ und „nicht vorhanden“ eingeteilt. Zum Zeitpunkt der Biopsie als auch im Follow-up zeigte sich, dass eine bestehende T-Zell-Periglomerulitis in der Gewebeprobe nicht mit einer schlechteren Nierenfunktion der Patienten einherging (Abbildung 5A- C).

### Abbildung 5: Periglomerulitis



**Abbildung 5:** Periglomerulitis. Vergleich der Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Biopsie und im Follow-up zwischen Patienten mit und ohne T-Zell-Periglomerulitis (**A – C**) sowie mit und ohne B-Zell-Periglomerulitis (**D – F**). Verglichen wird die GFR zum Zeitpunkt der Biopsie (**A, D**), nach 12 Monaten (**B, E**) und nach 24 Monaten (**C, F**). **G** zeigt eine representative T-Zell-Periglomerulitis.

### 3.8 B-Zell-Periglomerulitis und Nierenfunktion (GFR)



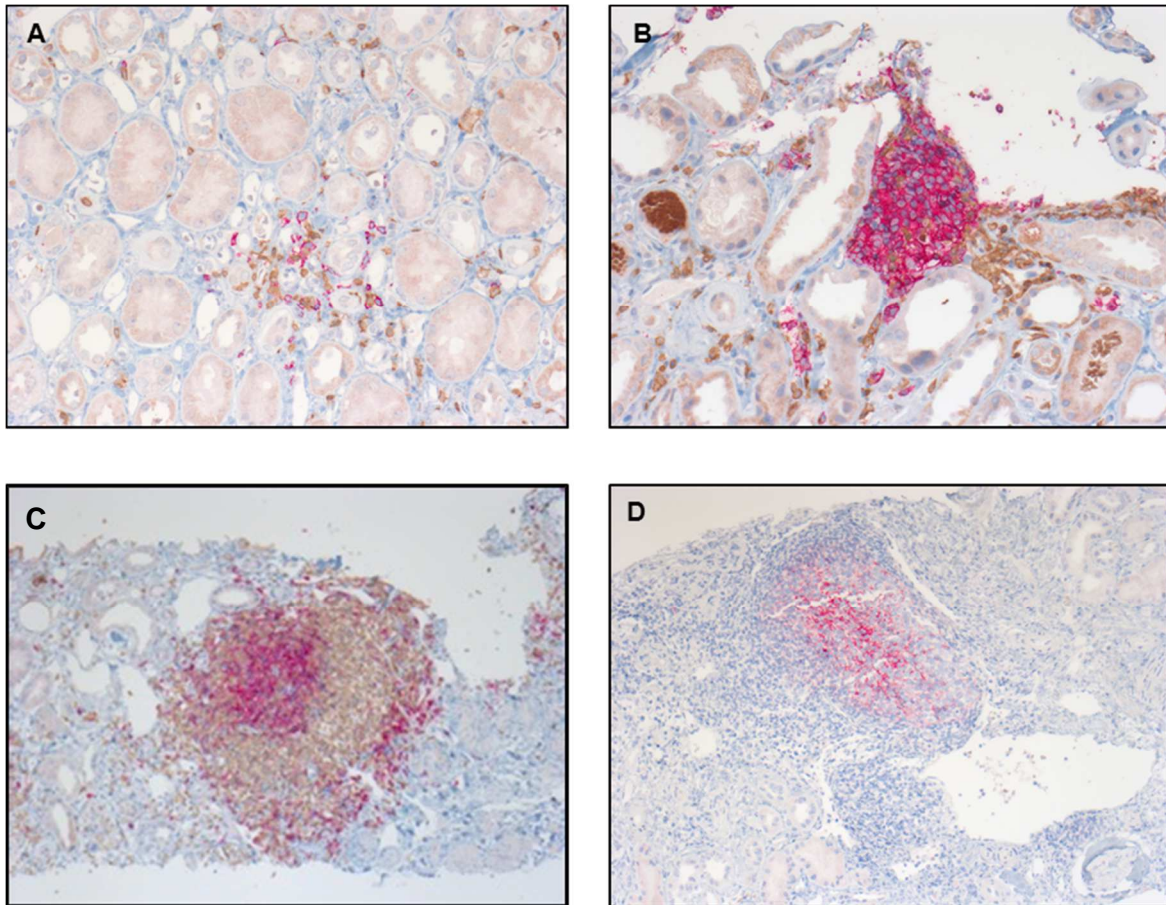
Wie bei den T-Zellen wurden die 63 Biopsien auch auf eine B-Zell-Periglomerulitis hin untersucht. Sie wurde ebenfalls in „vorhanden“ und „nicht vorhanden“ eingeteilt. Auch bei der B-Zell-Periglomerulitis zeigte sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie nach 12 Monaten und 24 Monaten Follow-up keine Korrelation zur Nierenfunktion (Abbildung 5D - F).

### 3.9 Organisation des Lymphozyteninfiltrates und Nierenfunktion (GFR)

Die lymphozytäre Organisation wurde wie oben beschrieben in fünf Grade von null bis vier eingeteilt (Abbildung 6).

Je höher das Organisationsniveau der Lymphozyten war, desto eingeschränkter zeigte sich die Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Biopsie und im Beobachtungszeitraum. In einem direkten Vergleich zwischen den Organisations-niveaus „einzeln verstreuter“ und „nodulär angeordneter“ Zellen, zeigte sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine statistisch signifikante Abweichung der Mittelwerte beider Gruppen. Im Follow-up zeigte sich allerdings eine statistisch signifikant niedrigere GFR des höheren Organisationslevels (Abbildung 6E, F, G).

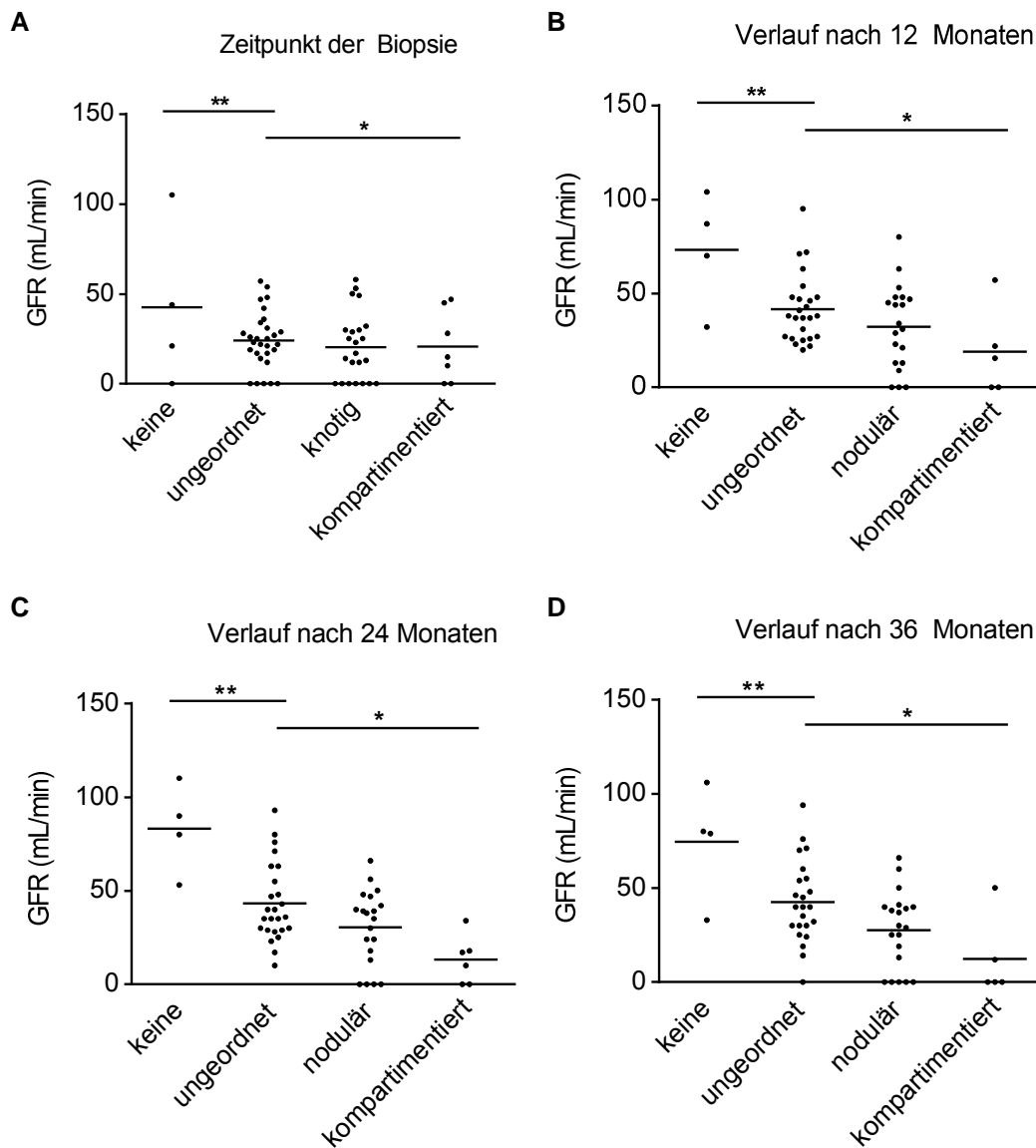
## Abbildung 6: Organisation des lymphozytären Infiltrats



**Abbildung 6:** Organisation der lymphozytären Zellen: **A** Vereinzelte Zellen in 200-facher Vergrößerung, **B** nodulär angeordnete Zellen in 200-facher Vergrößerung, **C** knotig und kompartimentiert angeordnete B- und T-Zellen in 100-facher Vergrößerung und **D** folliculär dendritische Zellen in knotig und kompartimentiert angeordneten B- und T-Zellen in 100-facher Vergrößerung. Der Farbniederschlag zeigt die Färbung der T-Zellen über den T-Zell-Marker CD3 in braun. Bei der Färbung der B-Zellen über den spezifischen B-Zell-Marker CD20 zeigen sich die B-Zellen rot. In der CD21-Färbung zeigen sich ebenso die folliculären dendritischen Zellen rot.



## Abbildung 7: Korrelation der Organisation mit der GFR



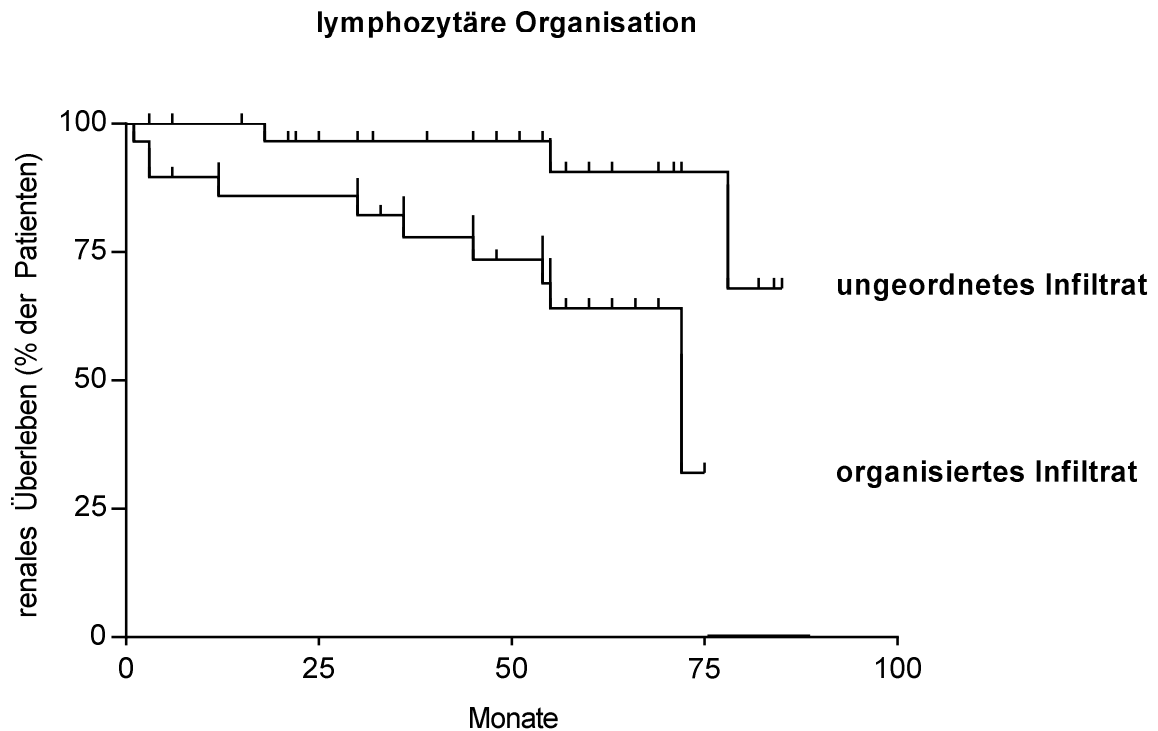
**Abbildung 7:** Korrelation der Organisation des Zellinfiltrates mit der Nierenfunktion im Verlauf der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis. Die Biopsien sind nach dem lymphozytären Organisationslevels aufgeteilt nach kein Infiltrat, ungeordnetes Infiltrat, nodulär angeordnetes Infiltrat und in kompartmentiertes Infiltrat. **A** GFR zum Zeitpunkt der Biopsie. **B**, **C** und **D** zeigen die GFR nach 12, 24 und 36 Monaten.

### 3.10 Vergleich von ungeordnetem und organisiertem lymphozytären Infiltrat im Erreichen einer terminalen Niereninsuffizienz

Das renale Überleben in Bezug auf die Organisation des intrarenalen B- und T-Zellinfiltrates zeigt, dass Patienten mit einem organisierten Infiltrat in ihrer Biopsie häufiger terminal niereninsuffizient werden als Patienten mit einem ungeordneten

lymphozytären Infiltrat (Abbildung 8).

**Abbildung 8: Lymphozytäre Organisation und terminale Niereninsuffizienz**

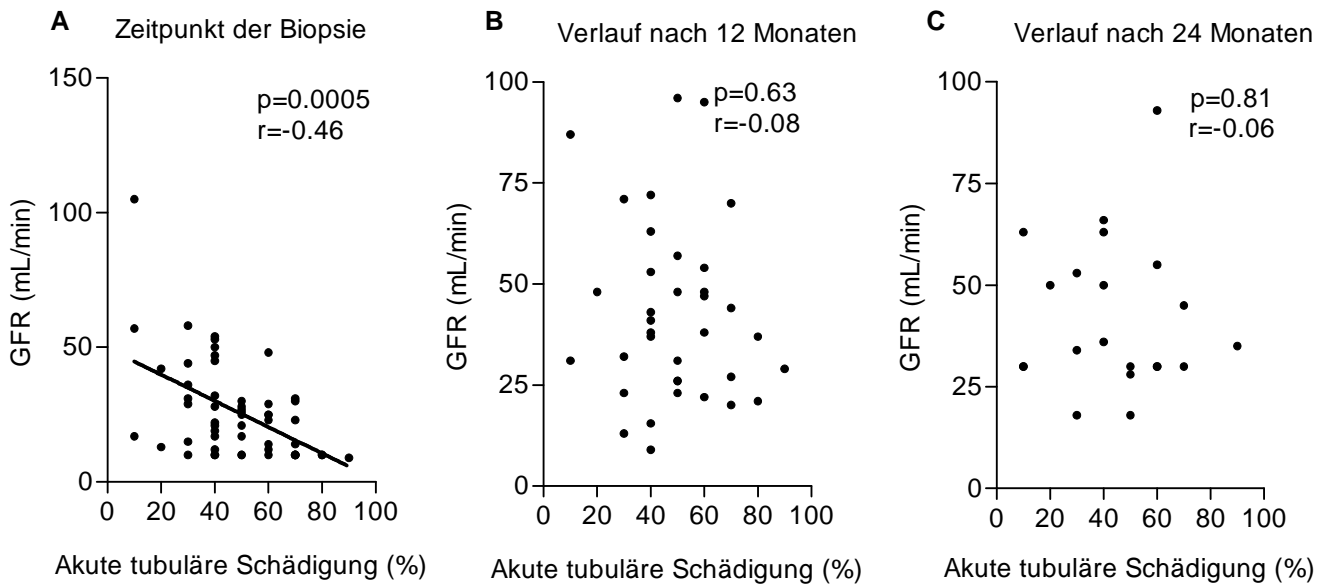


**Abbildung 8:** Kaplan Meier Überlebenskurve für das Erreichen einer terminalen Niereninsuffizienz mit dauerhafter Dialysepflicht. Unterteilt sind die Patienten in zwei Gruppen; Patienten mit Biopsien mit ungeordnetem lymphozytären Infiltrat und Patienten mit Biopsien mit organisiertem lymphozytären Infiltrat.

### 3.11 Akute tubuläre Schädigung und Nierenfunktion (GFR)

Es wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Schweregrad der akuten Schädigung der Nierentubuli und der Nierenfunktion besteht. Zum Zeitpunkt der Biopsie war eine negative Korrelation der akuten tubulären Schädigung und der Abnahme der Nierenfunktion zu erkennen. Nach einem und nach zwei Jahren war diese nicht mehr nachzuweisen. (Abbildung 9A - C)

### Abbildung 9: Akute tubuläre Schädigung und Nierenfunktion

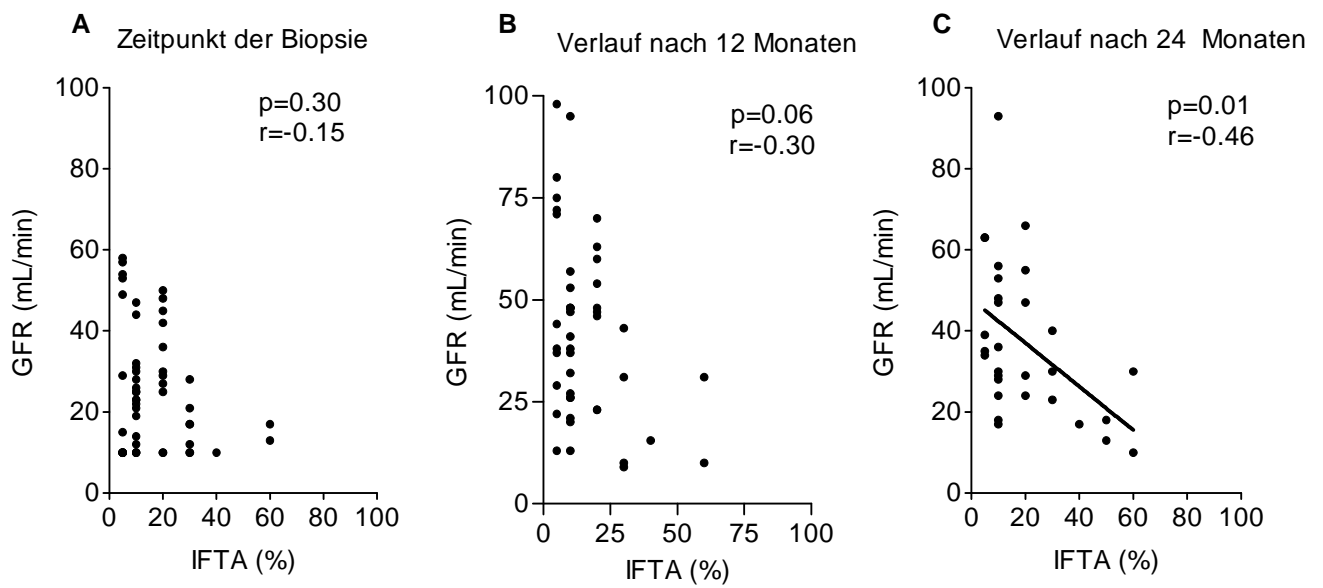


**Abbildung 9:** Spearman-Korrelationen der akuten tubulären Schädigung mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zu den Zeitpunkten der Biopsie (A), nach 12 Monaten (B) und nach 24 Monaten (C).

### 3.12 Die interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie (IFTA) und Nierenfunktion (GFR)

Es ist vorbeschrieben, dass der Schweregrad der interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie (IFTA) negativ mit der Nierenfunktion korrelieren (Berden AM 2012). Je ausgeprägter die IFTA ist, desto schlechter soll die Nierenfunktion im Verlauf sein. Bei Diagnosestellung zeigte sich in unseren Untersuchungen keine Korrelation. Nach einem Jahr und noch eindeutiger nach zwei Jahren fand sich eine Korrelation zum Nierenversagen (Abbildung 10A - C).

### Abbildung 10: Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie und Nierenfunktion



**Abbildung 10:** Spearman Korrelationen der interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie (IFTA) mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zu den Zeitpunkten der Biopsie (**A**), nach 12 Monaten (**B**) und nach 24 Monaten (**C**).

## 4. Diskussion

Die ANCA-assoziierte Vaskulitis (AAV) ist der häufigste Grund für eine rapid progrediente Glomerulonephritis und geht mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität der Patienten einher. Zur Diagnosesicherung gilt die Nierenbiopsie als Goldstandard (Jenette JC 2003). Verschiedene nephrologische und nephropathologische Arbeitsgruppen haben sich in den letzten Jahrzehnten auf der Suche nach Prognosemarker in der AAV mit der Nierenbiopsie beschäftigt (Bajema, Renhis, NDT, 2016). Während die initiale Nierenfunktion bei Diagnosestellung ein anerkannter klinischer Prognosefaktor für das Erreichen einer terminalen Niereninsuffizienz bei AAV ist, sind verschiedene histopathologische Merkmale unbestätigt geblieben oder umstritten. Es scheint, dass einzig beim Ausmaß der interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie (IFTA) wiederholt gezeigt werden konnte, dass es mit dem Nierenversagen im Verlauf korreliert (Hauer HA 2002, Berden AE 2012). Andere tubulointerstitielle Merkmale, insbesondere die Infiltration von Lymphozyten in der renalen ANCA Erkrankung wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit untersucht. Angelehnt an eine Veröffentlichung, die eine intrarenale Organisation des lymphozytären Infiltrates in der AAV beschreibt, wurde hier untersucht, ob dieses Infiltrat einen Einfluss auf die Nierenfunktion hat und als prognostischer Marker verwendet werden kann (Steinmetz OM, 2008). Zuvor war in der Transplantationsmedizin postuliert worden, dass ein B-Zell-reiches Infiltrat zu einem schlechten Nierentransplantatüberleben führt (Hippen BE 2005, Tsai EW 2006, Martins HL 2007). Die dann folgenden Studien konnten dies nicht einheitlich bestätigen und eine B-Zell-Depletion ist im klinischen Einsatz bei der therapierefraktären Abstoßungstherapie weiterhin umstritten (Doria C 2006, Bagnasco SM 2007). Aktuell laufen Phase 3 Interventionsstudien zur Anti-B-Zelltherapie in der Nierentransplantation.

Steinmetz et al. haben in einer Studie 2008 das tubulointerstitielle B- und T-Zellinfiltrat bei Lupus- und ANCA-assoziiierter Glomerulonephritis genauer betrachtet. Das Infiltrat wurde in vier mikroanatomische Grade eingeteilt, um zu untersuchen, ob die Organisation der Lymphozyten eine Rolle für die renale Prognose spielt. Level eins beschreibt dabei vereinzelt Zellen im Nierengewebe, in Level zwei zeigen sich knotige Ansammlungen, welche in Level drei in B- und T-Zell-Kompartimente unterschieden werden können. In Level vier zeigt sich ein zusätzliches zentrales Netzwerk follikulärer dendritischer Zellen, welches typisch für sogenannte sekundäre

lymphatische Gewebe ist. Bei vier Patienten dieser Studie konnte eine zweite Biopsie im Verlauf gewonnen werden. In drei der Biopsien fand sich ein Fortschreiten des Organisationsniveaus. Allerdings wurden diese Verlaufsbiopsien nicht nach der viermonatigen Induktionstherapie entnommen, sondern beim Auftreten eines Rezidivs nach 23, 36, 73 und 116 Monaten. Damit bleibt die Frage offen, ob die immunsuppressive Medikation in diesen Fällen das Organisieren der B-Zellen nicht verhindern und damit die Entzündung weiter fortschreiten konnte, oder ob sich diese Formationen nach dem Ansprechen auf die Therapie erneut gebildet haben. Auch aufgrund der geringen Patientenzahl ist diese Beobachtung schwierig zu deuten. Zusätzlich wurde der Reifegrad der B-Zellen in der Studie genauer untersucht. Dabei zeigte sich in den Biopsaten, dass die meisten der B-Zellen reife, nicht Antikörperbildenden B-Zellen sind, welche aber in der Lage sind, T-Helfer-Zellen zu aktivieren. Zudem untersuchte die Arbeitsgruppe das Chemokin CXCL13 und den dazugehörigen Rezeptor CXCR5, denen eine Schlüsselrolle in der Bildung von ektope lymphatischem Gewebe zugeschrieben wird. Die CXCL13-Expression korrelierte mit der Anzahl der intrarenalen B-Zellen und auf B-Zellen konnte man immunhistochemisch den korrespondierenden Rezeptor CXCR5 nachweisen. In Regionen, die negativ für den B-Zell-Marker CD20 waren, fanden sich keine CXCL13- oder CXCR5-positiven Zellen. Die Zellen, die das Chemokin CXCL13 exprimierten, zeigten die Morphologie dendritischer Zellen. Eine aus diesen Funden entstandene Hypothese ist, dass durch den Aufbau von intrarenalem, lymphatischem Gewebe B- und T-Zellen so in der Niere verweilen, eine chronische Entzündung auslösen und für einen schlechten klinischen Verlauf verantwortlich sein könnten. Diese Studie macht deutlich, dass eine weitere Untersuchung der B-Zellen und der Formation von sekundärem lymphatischem Gewebe in der Niere von prognostischem Wert sein kann und daher in einem größeren Kollektiv weiter untersucht werden sollte.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigen die T-Zellinfiltrate im Interstitium und im tubulären Apparat in Form der Tubulitis keinen Einfluss auf die Nierenfunktion im Verlauf. In der AAV gab es bisher eine Publikation, welche die T-Zell-Tubulitis nach Rituximabtherapie als prognostischen Marker für die Nierenfunktion nach 1 Jahr postulierte; allerdings waren in dieser Studie nach 2 Jahren einzig die initiale GFR und die tubuläre Atrophie unabhängige Prognosemarker (Berden AE, 2012).

Weitere prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf die Behandlung von schwer kranken AAV-Patienten evaluierten 2014 Teawoo Lee et al. Dabei wurden

Patientenüberleben, Nierenüberleben (terminale Niereninsuffizienz) und Ansprechen auf eine Behandlung (nicht dialysepflichtig, eGFR > 20 ml/min per 1,73 qm, keine aktive systemische Vaskulitis vier Monaten nach Biopsieentnahme) als Endpunkte betrachtet. Zusätzlich wurde die Frage beleuchtet, welche Vorteile und Risiken eine immunsuppressive Therapie für diese Patienten hat und ob es vielleicht eine Grenze gibt, nach der die Fortführung einer Therapie nicht weiter von Nutzen ist, sondern das Risiko überwiegt. Die Studie konnte zeigen, dass die meisten Patienten, die innerhalb von vier Monaten auf die Therapie ansprachen und so nicht dialysepflichtig blieben, sich auch nach einem Jahr mit einer stabilen Nierenfunktion zeigten. Wenn sich bis zu einem Zeitraum von 4 Monaten nach Diagnose und Therapiebeginn kein Ansprechen zeigte, kam es auch kaum noch zu einer Besserung (ca. 5%). Ein Ansprechen auf die Therapie nach 4 Monaten war ein unabhängiger Marker für eine Dialyseunabhängigkeit nach 12 Monaten. Risikofaktoren für einen schlechteren Langzeitausgang in dieser Studie waren ein hohes Alter, das Nicht-Ansprechen auf die Therapie innerhalb von vier Monaten, weniger als 10% normale Glomeruli in der Biopsie, Arteriosklerose, eine Behandlung ausschließlich mit Glukokortikoiden anstatt mit zusätzlichem Cyclophosphamid (Guillevin L 1999), eine eGFR kleiner 10 ml/min per 1,73 qm und ein hoher Chronizitätsindex. Der Chronizitätsindex beinhaltete die glomeruläre Sklerose, interstitielle Fibrose, fibrosierte Halbmonde und tubuläre Atrophie. Die Studie fand keine Grenze, an der eine AAV so weit fortgeschritten und die klinischen Parameter so schlecht waren, dass eine Therapie nicht mehr sinnvoll war. Auch bei schlechter GFR und einem hohen Chronizitätsindex konnte eine frühe Diagnose und Therapie mit Glukokortikoiden und Cyclophosphamid in 14% der Fälle noch positiv auf den Verlauf der Erkrankung einwirken. So stellt sich die Frage, welche weiteren Faktoren es geben könnte, die für ein Therapieansprechen und den Behandlungsverlauf verantwortlich sind. Nur circa die Hälfte der teils schwerkranken Patienten sprach in dieser Studie suffizient auf die Standardtherapie an. Dies zeigt, wie aggressiv die Erkrankung ist und macht deutlich, dass es alternativer Therapieverfahren bedarf. Besonders zu Beginn der immunsuppressiven Therapie besteht ein stark erhöhtes Risiko, an den Folgen von Infektionen zu versterben. Innerhalb der ersten 4 Monate verstarben in der besagten Studie 14% der AAV-Patienten auf Grund von pulmonalen Hämorrhagien, kardiovaskulären Ereignissen und Infektionen. Nach 12 Monaten waren vor allem die kardiovaskulären Ereignisse für die weitere Mortalität der AAV Patienten mit 17% verantwortlich.

In größeren Patientenkohorten mit autoimmunen Nierenerkrankungen wurde die lymphozytäre Organisation bisher nur bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) untersucht (Chang A 2011, Shen Y 2012). Chang et al. verwendeten Nierenbiopsien von 68 Patienten mit einer Lupusnephritis (LN). Bei über der Hälfte der Patienten konnten tubulointerstitiell lymphozytäre Infiltrate ausgemacht werden, die teilweise Keimzentren mit folliculären dendritischen Zellen (fDC) aufwiesen. Somit konnten drei verschiedene Muster an Infiltraten beschrieben werden. In 48% zeigten sich diffus verstreute B-Zellen im Tubulointerstitium (scattered), in 46% konnten gut umschriebene Aggregate von CD20+ B-Zellen als auch CD3+ T-Zellen erkannt werden. In weiteren 6% der Fälle wiesen diese Aggregate zusätzliche Keimzentren auf, in denen sich zentral eine Ansammlung von CD21-positiven fDCs zeigte. Zusätzlich lagen die B-Zellen meist zentral, während sich die T-Zellen eher in der Peripherie dieser Aggregate formierten. Um herauszufinden, ob dieses neu entstandene ektopye lymphatische Gewebe eine Funktion besitzt, wurden in dieser Studie die Gewebsschnitte mit dem Proliferationsmarker Ki-67 angefärbt. Bei 64% der Zell-Aggregate konnte eine positive Anfärbung für Ki-67 gesehen werden. Seltener waren diffuse Zellinfiltrate positiv (18%). Eine Doppelfärbung mit Ki-67 und CD20 bzw. CD3 zeigte viele Ki-67+/CD20+ Zellen im Keimzentrum allerdings nicht in den übrigen T- und B-Zell-Aggregaten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die lymphozytäre *in situ*-Organisation mit der Ausbreitung der tubulointerstitiellen Inflammation korrelierte. Je schwerer die Gesamtentzündung, desto eher zeigten sich T- und B-Zell-Aggregate mit Keimzentren. Diese Keimzentren bei der LN unterstützten die Hypothese, dass *in situ* eine Antigen-spezifische klonale Expansion von B-Zellen geschieht. Mit einer Laser-Mikrodissektion (LCM) und real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) wurden nun schwere und leichte Immunglobulinketten aus den Keimzentren und aus dem Tubulointerstitium der Nierenbiopsien sequenziert und charakterisiert. Es konnte am Beispiel einer Patientin gezeigt werden, dass das Repertoire der exprimierten Immunglobulin-Antigen-Klone der Gamma- und Lambda-Ketten der Keimzentren in der Umgebung präsent waren, während die Klone der Lambdaketten des Parenchyms nicht in den Keimzentren zu finden waren. Diese zeigten sich zusätzlich stark mutiert. Das Keimzentrum steuerte also Antigenketten zu dem Repertoire des Parenchyms bei, aber nicht umgekehrt. Weitere Analysen dieser Klone verdeutlichten, dass eine somatische Hypermutation und eine Antigen-gesteuerte klonale Selektion stattfand. Die klonale Selektion war wesentlich weniger



vielfältig in Fällen mit höher organisierten B- und T-Zell-Aggregaten. Nach dieser Studie könnte die Organisation der B- und T-Zell-Formationen weitreichende Folgen haben, indem sie möglicherweise in der Lage ist, nierenspezifische Antikörper zu bilden, die dort zu einer Chronifizierung der Entzündung führen könnten. Die Identifikation von Antigenen und Faktoren, die dazu führen, dass sich B-Zellen lokal ansiedeln und ausbreiten, könnte helfen, neue Biomarker und Therapieansätze zu finden. Die Erforschung der B- und T-Zell-Formierung und -Wirkung vor Ort könnte auch in der AAV zu einem besseren Verständnis der Erkrankung und neuen Therapieansätzen führen. Allerdings bleibt zu beachten, dass sich die „pauci-immune“ Glomerulonephritis bei AAV nicht durch das Ablagern von Immunkomplexen auszeichnet und sich so von der LN unterscheidet. Somit stellt diese Studie auch für unsere Untersuchungen interessante Aspekte dar, kann aber nicht direkt übertragen werden. Um den Mechanismus der LN weiter zu erforschen untersuchten auch Shen et al. tubulointerstitielle Zellinfiltrate in 192 Nierenbiopsien (Shen Y 2012). Dafür wurden die Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt, eine Gruppe mit 118 Patienten mit intrarenalen B-Zell-Infiltraten und eine Gruppe mit 74 Patienten ohne B-Zellen. In der Gruppe mit B-Zell-Infiltraten fanden sich die B-Zellen hauptsächlich im Tubulointerstitium, während in den Glomeruli nur vereinzelte B-Zellen zu finden waren. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass die Gruppe, die B-Zellen in der Biopsie beinhaltete, im Vergleich zu der B-Zell-armen Gruppe eine höhere Krankheitsaktivität nach dem Systemischen-Lupus-Erythematoses-Krankheitsaktivitätsindex (SLEDAI), höhere Serumharnstoff- und Serumkreatinin-Werte aufwies. Zusätzlich fanden sich die B-Zellinfiltrate häufiger in der Klasse IV der International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) Klassifikation für Lupus Nephritis. Es zeigten sich keine Unterschiede in den beiden Gruppen bezüglich Alter, Geschlecht, Komplementverbrauch, Dauer der Erkrankung, und Proteinurie. Um die Infiltrate genauer zu untersuchen, wurden die Biopsien hier analog der anderen Publikation in vier Level eingeteilt. Keinerlei B-Zellinfiltrat sondern ausschließlich T-Zellen zeigten 38,5% der Patienten. In 44,8% fanden sich schütter verteilte B-Zellen, in 8,9% der Patienten noduläre B-Zellinfiltrate. Kompartimentiert organisierte Zellinfiltrate wurden in 7,8% der Biopsien beobachtet. Es fanden sich keine follikulären dendritischen Zellen. Unklar ist, ob die Formation von interstitiellen Aggregaten sekundär als Reaktion auf die Lupusglomerulonephritis entsteht oder unabhängig von dieser auftritt. Da der systemische Lupus, wie auch die

Nierenaffektion viele verschiedene morphologische Gestalten annehmen kann, liegen ggf. auch bei der lymphozytären Antwort verschiedene Krankheitsmechanismen vor.

Um die Zusammenhänge zwischen der intrarenalen Lymphozyteninfiltration bei AAV in Hinblick auf verwertbare prognostische Aussagen zu untersuchen, wurden in der hier vorliegenden Arbeit mehrere histopathologische Parameter mit der GFR als Maß der Nierenfunktion verglichen. Dafür wurden intrarenale B- und T-Lymphozyten, wie in der Einleitung beschrieben, eingeteilt. Folgende Faktoren ergaben signifikante Korrelationen: Die T-Zell-Infiltration im nicht-atrophischen Tubulointerstitium korrelierte negativ mit der GFR zum Diagnosezeitpunkt. Dass im weiteren Verlauf keine Korrelation mehr zu finden war könnte damit zusammenhängen, dass durch die Reversibilität der akuten Schädigung ein Therapieerfolg möglich ist, der sich in einer Verbesserung der GFR der Patienten ausdrückt.

Die T-Zell-Infiltration im atrophem Tubulointerstitium hingegen korrelierte zunehmend negativ mit der GFR im Verlauf. So scheint dieses Infiltrat den irreversiblen Schaden wieder zu spiegeln. Eine andere Möglichkeit ist, dass die T-Zellen in das zunächst noch potentiell reversibel geschädigte Nierengewebe eindringen und durch die Entzündung dafür sorgen, dass der akute Schaden in eine chronische vernarbende Reaktion, also eine Tubulusatrophie und interstitielle Fibrose übergeht (Wilde B 2010). Alternativ wird angenommen, dass es sich bei dem T-Zell-Infiltrat im atrophem Tubulointerstitium im Sinne eines Abräumfiltrates nur um ein unspezifisches sekundäres Phänomen handelt. Der Grad der T-Zell-Infiltration in der Biopsie könnte evtl. prognostisch verwertet werden, da ein Zusammenhang zwischen der Niereninsuffizienz und dem höheren Ausmaß der T-Zell-Infiltration in nicht-atrophem Tubulointerstitium zum Diagnosezeitpunkt und in atrophem Tubulointerstitium in den Verlaufsuntersuchungen nachgewiesen werden konnte. Besonderes Augenmerk wurde auf die Organisation des lymphozytären Infiltrates gelegt. Der Nachweis des Vorkommens und die mögliche Rolle der intrarenalen B-Lymphozyten bei der AAV sind als Fragestellung zuvor noch nicht in einem größeren Kollektiv untersucht worden. Eine zunehmende Organisation des lymphozytären Infiltrates zeigte eine Korrelation mit dem Nierenversagen sowohl zum Zeitpunkt der Diagnose als auch in den Verlaufsbeobachtungen. Patienten mit einem organisierten Infiltrat erreichten häufiger eine terminale Niereninsuffizienz als Patienten mit einem schütter verteilten Infiltrat. Der akute Tubulusschaden korrelierte mit der Verminderung der GFR zum

Diagnosezeitpunkt. Im weiteren Verlauf hatte er allerdings keinen Einfluss mehr auf die Nierenfunktion. Weiterhin konnte nachvollzogen werden, dass die interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie, wie bereits mehrfach beschrieben, negativ mit der GFR im Verlauf korreliert. Dies ist nicht überraschend, da die interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie den irreversibel geschädigten Anteil des Nierengewebes repräsentiert. Interessant und wichtig ist es aber, zu untersuchen, wodurch diese tubulointerstitiellen Vernarbungen entstehen. Dies könnte einerseits durch die irreversible glomeruläre Schädigung im Rahmen des Absterbens des gesamten Nephrons geschehen. Andererseits könnte die häufig sehr deutliche tubulointerstitielle Entzündung der AAV auch direkt das Tubulointerstitium schädigen. Durch die Bildung von Lymphfollikel-ähnlichen Strukturen könnte diese Entzündung dann möglicherweise weiter verstärkt und aufrechterhalten werden.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die lymphozytäre Organisation und die interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie mit einer Reduktion der GFR im Verlauf assoziiert und daher von prognostischer Bedeutung sind. Diese als relevant herausgearbeiteten histologischen Veränderungen könnten möglicherweise in Zukunft zu einer verbesserten Risikoeinschätzung und differenzierteren Therapie bei Patienten mit AAV eingesetzt werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die ANCA-assoziierte Vaskulitis ist der häufigste Grund für eine rapid progrediente Glomerulonephritis. Diese aggressive Erkrankung geht mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität einher. Der Goldstandard zur Diagnose der AAV stellt die Nierenbiopsie dar. Bislang sind histologisch allerdings nur wenige Faktoren bekannt, die eine frühzeitige prognostische Abschätzung erlauben. In der vorliegenden Studie wurden 63 Nierenbiopsien auf unterschiedliche gewebemorphologische Parameter untersucht, um mögliche weitere Prognoseparameter für die AAV zu identifizieren. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Organisation der lymphozytären Infiltration gelegt. Wir konnten bestätigen, dass die histopathologisch nachweisbaren chronischen Gewebsschädigungen, die interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie einen prognostischen Wert in Hinblick auf die Nierenfunktion im Verlauf haben. Wir konnten des Weiteren zum ersten Mal zeigen dass eine zunehmende Organisation des lymphozytären Infiltrates in der AAV mit mehr Dialysepflichtigkeit im Verlauf einhergeht. Somit kann unseres Erachtens nach der Nachweis dieser histologischen Konstellationen in Zukunft möglicherweise zu einer verbesserten Risikostratifizierung und differenzierteren Therapie der Patienten mit AAV beitragen.

## **5. Conclusion**

The ANCA- associated vasculitis is the most frequent reason for a rapidly progressive glomerulonephritis. AAV is a very aggressive disease which causes a high morbidity and mortality. Today`s gold standard to diagnose AAV is a biopsy of the kidney. Unfortunately very few histologic features are known which make an early prognosis possible. In our study different morphologies of 63 biopsies of the kidney were observed in order to find new parameters for identification of the AAV. A special focus was put on the organization of the lymphocytic infiltration. We could confirm that detectable histopathologic chronic damage of the tissue, interstitial fibrosis and tubular atrophy show a predictive value for the essential kidney function. Furthermore we could prove for the first time that an increasing organization of lymphocytic infiltration during the AAV is accompanied with an augmentation for patients in need of dialysis. Consequently the evidence of this histologic constellation should give an improved stratification of risk and should allow a more differentiated therapy of patients with AAV in the future.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agard C.; Mouthon L.; Mahr A.; Guillevin L.; (2003): Microscopic polyangiitis and polyarteritis nodosa: how and when do they start? In: *Arthritis and rheumatism* 49 (5), S. 709–715. DOI: 10.1002/art.11387.
- Albert D.; Clarkin C.; Komoroski J.; Brensinger C. M.; Berlin J. A.; (2004): Wegener's granulomatosis: Possible role of environmental agents in its pathogenesis. In: *Arthritis and rheumatism* 51 (4), S. 656–664. DOI: 10.1002/art.20534.
- Bagnasco SM.; Tsai, W.; Rahman, M. H.; Kraus, E. S.; Barisoni, L.; Vega, R. et al. (2007): CD20-positive infiltrates in renal allograft biopsies with acute cellular rejection are not associated with worse graft survival. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 7 (8), S. 1968–1973. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2007.01885.x.
- Bautz D. J.; Preston G. A.; Lionaki S.; Hewins P.; Wolberg A. S.; Yang J.J.; et al. (2008): Antibodies with dual reactivity to plasminogen and complementary PR3 in PR3-ANCA vasculitis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19 (12), S. 2421–2429. DOI: 10.1681/ASN.2008030270.
- Berden A. E.; Ferrario F; Hagen E. C.; Jayne D R.; Jennette, J. C.; Joh K.; et al. (2010): Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. In: *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 21 (10), S. 1628–1636. DOI: 10.1681/ASN.2010050477.
- Berden A. E.; Jones R. B.; Erasmus D. D.; Walsh M.; Noël L.-H.; Ferrario F. et al. (2012): Tubular lesions predict renal outcome in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated glomerulonephritis after rituximab therapy. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23 (2), S. 313–321. DOI: 10.1681/ASN.2011040330.
- Berden A. E.; Nolan S. L.; Morris H. L.; Bertina R. M.; Erasmus D. D.; Hagen E. C. et al. (2010): Anti-plasminogen antibodies compromise fibrinolysis and associate with renal histology in ANCA-associated vasculitis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21 (12), S. 2169–2179. DOI: 10.1681/ASN.2010030274.
- Burnet F. M. (1976): A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 26 (2), S. 119–121.
- Burnet F. M. (1976): A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production using the Concept of Clonal Selection. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 26 (2), S. 119–121. DOI: 10.3322/canjclin.26.2.119.
- Cao Y.; Schmitz J. L.; Yang J.; Hogan S. L.; Bunch D.; Hu Y. et al. (2011): DRB1\*15 allele is a risk factor for PR3-ANCA disease in African Americans. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 22 (6), S. 1161–1167. DOI: 10.1681/ASN.2010101058.
- Cartin-Ceba R.; Peikert T.; Specks U. (2012): Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis. In:

*Current rheumatology reports* 14 (6), S. 481–493. DOI: 10.1007/s11926-012-0286-y.

Chang A.; Henderson S. G.; Brandt D.; Liu N.; Guttikonda R.; Hsieh C. et al. (2011): In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186 (3), S. 1849–1860. DOI: 10.4049/jimmunol.1001983.

Chen Y.-X.; Chen N. (2013): Pathogenesis of rapidly progressive glomerulonephritis: what do we learn? In: *Contributions to nephrology* 181, S. 207–215. DOI: 10.1159/000348633.

Choi H. K.; Slot M. C.; Pan G.; Weissbach C. A.; Niles J. L.; Merkel P. A. (2000): Evaluation of antineutrophil cytoplasmic antibody seroconversion induced by minocycline, sulfasalazine, or penicillamine. In: *Arthritis and rheumatism* 43 (11), S. 2488–2492. DOI: 10.1002/1529-0131(200011)43:11<2488::AID-ANR16>3.0.CO;2-X.

Chung S. A.; Seo P. (2010): Microscopic polyangiitis. In: *Rheumatic diseases clinics of North America* 36 (3), S. 545–558. DOI: 10.1016/j.rdc.2010.04.003.

Cohen C. D.; Calvaresi N.; Armelloni S.; Schmid H.; Henger A.; Ott U. et al. (2005): CD20-positive infiltrates in human membranous glomerulonephritis. In: *Journal of nephrology* 18 (3), S. 328–333.

Cordier J. F.; Valeyre D.; Guillevin L.; Loire R.; Brechot J. M. (1990): Pulmonary Wegener's granulomatosis. A clinical and imaging study of 77 cases. In: *Chest* 97 (4), S. 906–912.

Daoud M. S.; Gibson L. E.; DeRemee R. A.; Specks U.; el-Azhary R. A.; Su W. P. (1994): Cutaneous Wegener's granulomatosis: clinical, histopathologic, and immunopathologic features of thirty patients. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 31 (4), S. 605–612.

Delves P. J.; Roitt, I. M. (2000): The immune system. Second of two parts. In: *The New England journal of medicine* 343 (2), S. 108–117. DOI: 10.1056/NEJM200007133430207.

Empfehlungen zum Einsatz von Rituximab bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Online verfügbar unter <http://dgrh.de/9480.html>.

Doria C.; Di Francesco F.; Ramirez C. B.; Frank A.; Iaria M.; Francos G. et al. (2006): The presence of B-cell nodules does not necessarily portend a less favorable outcome to therapy in patients with acute cellular rejection of a renal allograft. In: *Transplantation proceedings* 38 (10), S. 3441–3444. DOI: 10.1016/j.transproceed.2006.10.173.

Falk R. J.; Hogan S.; Carey T. S.; Jennette J. C. (1990): Clinical course of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and systemic vasculitis. The Glomerular Disease Collaborative Network. In: *Annals of internal medicine* 113 (9), S. 656–663.

Falk R. J.; Jennette J. C. (1997): ANCA small-vessel vasculitis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 8 (2), S. 314–322.

Falk R. J.; Nachman P. H.; Hogan S. L.; Jennette J. C. (2000): ANCA glomerulonephritis and

vasculitis: a Chapel Hill perspective. In: *Seminars in nephrology* 20 (3), S. 233–243.

Gómez-Puerta J. A.; Hernández-Rodríguez J.; López-Soto A.; Bosch X. (2009): Antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides and respiratory disease. In: *Chest* 136 (4), S. 1101–1111. DOI: 10.1378/chest.08-3043.

Groot K. de; Adu D.; Savage C. O. (2001): The value of pulse cyclophosphamide in ANCA-associated vasculitis: meta-analysis and critical review. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16 (10), S. 2018–2027.

Guillevin L.; Durand-Gasselín B.; Cevallos R.; Gayraud M.; Lhote F.; Callard P. et al. (1999): Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory findings in eighty-five patients. In: *Arthritis and rheumatism* 42 (3), S. 421–430. DOI: 10.1002/1529-0131(199904)42:3<421::AID-ANR5>3.0.CO;2-6.

Hagen E. C.; Daha M. R.; Hermans J.; Andrassy K.; Csernok E.; Gaskin G. et al. (1998): Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. In: *Kidney international* 53 (3), S. 743–753. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00807.x.

Hauer H. A.; Bajema I. M.; van Houwelingen H. C.; Ferrario F.; Noël L.-H.; Waldherr R. et al. (2002): Renal histology in ANCA-associated vasculitis: differences between diagnostic and serologic subgroups. In: *Kidney international* 61 (1), S. 80–89. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00089.x.

Hippen B. E.; DeMattos A.; Cook W. J.; Kew C. E.; Gaston R. S. (2005): Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 5 (9), S. 2248–2252. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2005.01009.x.

Hoffman G. S.; Kerr G. S.; Leavitt R. Y.; Hallahan C. W.; Lebovics R. S.; Travis W. D. et al. (1992): Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. In: *Annals of internal medicine* 116 (6), S. 488–498.

Hogan S. L.; Satterly K. K.; Dooley M. A.; Nachman P. H.; Jennette J. C.; Falk R. J. (2001): Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12 (1), S. 134–142.

Hogan S. L.; Falk R. J.; Chin H.; Cai J.; Jennette C. E.; Jennette J. C.; Nachman P. H. (2005): Predictors of relapse and treatment resistance in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-vessel vasculitis. In: *Annals of internal medicine* 143 (9), S. 621–631.

Jayne D. (2009): The diagnosis of vasculitis. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 23 (3), S. 445–453. DOI: 10.1016/j.berh.2009.03.001.

Jayne D. R. W.; Gaskin G.; Rasmussen N.; Abramowicz D.; Ferrario F.; Guillevin L. et al.



(2007): Randomized trial of plasma exchange or high-dosage methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18 (7), S. 2180–2188. DOI: 10.1681/ASN.2007010090.

Jennette J. C.; Falk R. J.; Andrassy K.; Bacon P. A.; Churg J.; Gross W. L. et al. (1994): Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. In: *Arthritis and rheumatism* 37 (2), S. 187–192.

Jennette J. C. (2003): Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. In: *Kidney international* 63 (3), S. 1164–1177. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00843.x.

Jones R. B.; Ferraro A. J.; Chaudhry A. N.; Brogan P.; Salama A. D.; Smith K. G. C. et al. (2009): A multicenter survey of rituximab therapy for refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (7), S. 2156–2168. DOI: 10.1002/art.24637.

Jones R. B.; Tervaert J. W. C.; Hauser T.; Luqmani R.; Morgan M. D.; Peh C. A. et al. (2010): Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. In: *The New England journal of medicine* 363 (3), S. 211–220. DOI: 10.1056/NEJMoa0909169.

Kain R.; Exner M.; Brandes R.; Ziehermayr R.; Cunningham D.; Alderson C. A. et al. (2008): Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. In: *Nature medicine* 14 (10), S. 1088–1096. DOI: 10.1038/nm.1874.

Keogh K. A.; Specks U. (2003): Churg-Strauss syndrome: clinical presentation, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and leukotriene receptor antagonists. In: *The American journal of medicine* 115 (4), S. 284–290.

Leavitt R. Y.; Fauci A. S.; Bloch D. A.; Michel B. A.; Hunder G. G.; Arend W. P. et al. (1990): The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. In: *Arthritis and rheumatism* 33 (8), S. 1101–1107.

Lee T.; Gasim A.; Derebail V. K.; Chung Y.; McGregor J.A.G.; Lionaki S. et al. (2014): Predictors of treatment outcomes in ANCA-associated vasculitis with severe kidney failure. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9 (5), S. 905–913. DOI: 10.2215/CJN.08290813.

Lhote F.; Cohen P.; Génèreau T.; Gayraud M.; Guillevin L. (1996): Microscopic polyangiitis: clinical aspects and treatment. In: *Annales de médecine interne* 147 (3), S. 165–177.

Lhote F.; Cohen P.; Guillevin L. (1998): Polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome. In: *Lupus* 7 (4), S. 238–258.

Lionaki S; Hogan S. L.; Jennette C. E.; Hu Y.; Hamra J. B.; Jennette, J. C. et al. (2009): The clinical course of ANCA small-vessel vasculitis on chronic dialysis. In: *Kidney international* 76 (6), S. 644–651. DOI: 10.1038/ki.2009.218.

Lott J. P. (2013): Re: levamisole-adulterated cocaine: a case series. In: *Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM* 26 (1), S. 98. DOI:10.3122/jabfm.

2013.01.120266.

Magnus T.; Melms A.; Kötter I.; Holle J. U. (2012): Neurologische Manifestationen von Vaskulitiden und primäre ZNS-Vaskulitis. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 71 (7), S. 551–563. DOI: 10.1007/s00393-012-0957-0.

Mahr A. D.; Edberg J. C.; Stone J. H.; Hoffman G. S.; St Clair E. W.; Specks U. et al. (2010): Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (12), S. 3760–3767. DOI: 10.1002/art.27742.

Marinaki S.; Kältsch A.-I.; Grimminger P.; Breedijk A.; Birck R.; Schmitt W. H. et al. (2006): Persistent T-cell activation and clinical correlations in patients with ANCA-associated systemic vasculitis. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21 (7), S. 1825–1832. DOI: 10.1093/ndt/gfl097.

Martins H. L.; Silva C.; Martini D.; Noronha I. L. (2007): Detection of B lymphocytes (CD20+) in renal allograft biopsy specimens. In: *Transplantation proceedings* 39 (2), S. 432–434. DOI: 10.1016/j.transproceed.2007.01.042.

Marx M (2010), Analyse und Klassifikation von intrarenalen B- Zell- Infiltraten bei Patienten mit Lupusnephritis. Med. Dissertation. Universität Hamburg

Murphy K. M.; Travers P.; Walport M.; Janeway C. A.; Ehrenstein M.; Seidler L. (2014): Janeway Immunologie. 7., Aufl., korrigierter Nachdr. 2014. Berlin: Springer Spektrum.

Murphy K, Travers P, Walport M., 7. Auflage, Spektrum, 2009. S 14: Janeway Immunologie. In: Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage, S. 378–383.

Nogueira E.; Hamour S.; Sawant D.; Henderson S.; Mansfield N.; Chavele K.-M. et al. (2010): Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 25 (7), S. 2209–2217. DOI: 10.1093/ndt/gfp783.

Ntatsaki E.; Carruthers D.; Chakravarty K.; D'Cruz D.; Harper L.; Jayne D. et al. (2014): BSR and BHRP guideline for the management of adults with ANCA-associated vasculitis. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 53 (12), S. 2306–2309. DOI: 10.1093/rheumatology/ket445.

Peschel A.; Basu N.; Benharkou A.; Brandes R.; Brown M.; Dieckmann R. et al. (2014): Autoantibodies to hLAMP-2 in ANCA-negative pauci-immune focal necrotizing GN. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25 (3), S. 455–463. DOI: 10.1681/ASN.2013030320.

Popa E. R.; Stegeman C. A.; Bos N. A.; Kallenberg C. G.; Tervaert J. W. (1999): Differential B- and T-cell activation in Wegener's granulomatosis. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 103 (5 Pt 1), S. 885–894.

Popa E. R.; Tervaert J. W. Cohen (2003): The relation between Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis: current knowledge and future directions. In: *Internal medicine*

(Tokyo, Japan) 42 (9), S. 771–780.

Roth A. J.; Brown M. C.; Smith R. N.; Badhwar A. K.; Parente O.; Chung J. et al. (2012): Anti-LAMP-2 antibodies are not prevalent in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody glomerulonephritis. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 23 (3), S. 545–555. DOI: 10.1681/ASN.2011030273.

Rutgers A.; Sanders J. S. F.; Stegeman C. A.; Kallenberg C. G. (2010): Pauci-immune necrotizing glomerulonephritis. In: *Rheumatic diseases clinics of North America* 36 (3), S. 559–572. DOI: 10.1016/j.rdc.2010.05.002.

Sablé-Fourtassou R.; Cohen P.; Mahr A.; Pagnoux C.; Mouthon L.; Jayne D. et al. (2005): Antineutrophil cytoplasmic antibodies and the Churg-Strauss syndrome. In: *Annals of internal medicine* 143 (9), S. 632–638.

Savage C. O.; Harper L.; Adu D. (1997): Primary systemic vasculitis. In: *Lancet (London, England)* 349 (9051), S. 553–558.

Savage C. O.; Winearls C. G.; Evans D. J.; Rees A. J.; Lockwood C. M. (1985): Microscopic polyarteritis: presentation, pathology and prognosis. In: *The Quarterly journal of medicine* 56 (220), S. 467–483.

Schmidt J.; Pulido J. S.; Matteson E. L. (2011): Ocular manifestations of systemic disease: antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. In: *Current opinion in ophthalmology* 22 (6), S. 489–495. DOI: 10.1097/ICU.0b013e32834bdfe2.

Seo P.; Stone J. H. (2004): The antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides. In: *The American journal of medicine* 117 (1), S. 39–50. DOI: 10.1016/j.amjmed.2004.02.030.

Shen Y.; Sun C.-Y.; Wu F.-X.; Chen Y.; Dai M.; Yan Y.-C.; Yang C.-D (2012): Association of intrarenal B-cell infiltrates with clinical outcome in lupus nephritis: a study of 192 cases. In: *Clinical & developmental immunology* 2012, S. 967584. DOI: 10.1155/2012/967584.

Sinico R. A.; Di Toma L.; Maggiore U.; Bottero P.; Radice A.; Tosoni C. et al. (2005): Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. In: *Arthritis and rheumatism* 52 (9), S. 2926–2935. DOI: 10.1002/art.21250.

Stegeman C. A.; Tervaert J. W.; Sluiter W. J.; Manson W. L.; Jong P. E. de; Kallenberg C. G. (1994): Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. In: *Annals of internal medicine* 120 (1), S. 12–17.

Steinmetz O. M.; Panzer U.; Kneissler U.; Harendza S.; Lipp M.; Helmchen U.; Stahl R. A. K. (2005): BCA-1/CXCL13 expression is associated with CXCR5-positive B-cell cluster formation in acute renal transplant rejection. In: *Kidney international* 67 (4), S. 1616–1621. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00244.x.

Steinmetz O. M.; Velden J.; Kneissler U.; Marx M.; Klein A.; Helmchen U. et al. (2008): Analysis and classification of B-cell infiltrates in lupus and ANCA-associated nephritis. In: *Kidney international* 74 (4), S. 448–457. DOI: 10.1038/ki.2008.191.

Stone J H.; Merkel P. A.; Spiera R.; Seo P.; Langford C. A.; Hoffman G. S. et al. (2010): Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. In: *The New England journal of medicine* 363 (3), S. 221–232. DOI: 10.1056/NEJMoa0909905.

Summers S. A.; Steinmetz O. M.; Li M.; Kausman J. Y.; Semple T.; Edgton K. L. et al. (2009): Th1 and Th17 Cells Induce Proliferative Glomerulonephritis. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (12), S. 2518–2524. DOI: 10.1681/ASN.2009030337.

Tosi M. F. (2005): Innate immune responses to infection. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 116 (2), S. 241-9; quiz 250. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.05.036.

Tsai E. W.; Rianthavorn P.; Gjertson D. W.; Wallace W. D.; Reed E. F.; Ettenger R. B. (2006): CD20+ lymphocytes in renal allografts are associated with poor graft survival in pediatric patients. In: *Transplantation* 82 (12), S. 1769–1773. DOI: 10.1097/01.tp.0000250572.46679.45.

Villiger P. M.; Guillevin L. (2010): Microscopic polyangiitis: Clinical presentation. In: *Autoimmunity reviews* 9 (12), S. 812–819. DOI: 10.1016/j.autrev.2010.07.009.

Walsh M.; Merkel P.A.; Peh C. A.; Szpirt W.; Guillevin L.; Pusey C. D. et al. (2013): Plasma exchange and glucocorticoid dosing in the treatment of anti-neutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis (PEXIVAS): protocol for a randomized controlled trial. In: *Trials* 14, S. 73. DOI: 10.1186/1745-6215-14-73.

Watts R. A.; Gonzalez-Gay M. A.; Lane S. E.; Garcia-Porrúa C.; Bentham G.; Scott D. G. (2001): Geoepidemiology of systemic vasculitis: comparison of the incidence in two regions of Europe. In: *Annals of the rheumatic diseases* 60 (2), S. 170–172.

Watts R.; Lane S.; Hanslik T.; Hauser T.; Hellmich B.; Koldingsnes W. et al. (2007): Development and validation of a consensus methodology for the classification of the ANCA-associated vasculitides and polyarteritis nodosa for epidemiological studies. In: *Annals of the rheumatic diseases* 66 (2), S. 222–227. DOI: 10.1136/ard.2006.054593.

Weidemann A.; Büttner M.; Amann K.; Wiesener M. (2015): BANFF-Klassifikation der Histologie von Nierentransplantaten und therapeutische Konsequenzen. In: *Nephrologe* 10 (2), S. 113–123. DOI: 10.1007/s11560-014-0912-y.

Wilde B; Thewissen M.; Damoiseaux J.; van Paassen P.; Witzke O.; Tervaert J. W. C. (2010): T cells in ANCA-associated vasculitis: what can we learn from lesional versus circulating T cells? In: *Arthritis research & therapy* 12 (1), S. 204. DOI: 10.1186/ar2923.

Zhang W.; Zhou G.; Shi Q.; Zhang X.; Zeng X-F; Zhang F.-C. (2009): Clinical analysis of nervous system involvement in ANCA-associated systemic vasculitides. In: *Clinical and experimental rheumatology* 27 (1 Suppl 52), S. S65-9.

Zhu J.; Yamane H.; Paul W. E. (2010): Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations \*. In: *Annu. Rev. Immunol.* 28 (1), S. 445–489. DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.

## **7. Danksagung**

Frau Dr. Silke Brix danke ich besonders für die Betreuung Ratschlägen zur Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wiech, der mir ermöglicht hat, in seiner Klinik diese Doktor-Arbeit zu erstellen und mir dabei stets Hilfestellung bot.

Zudem danke ich auch Frau Ulrike Langbehn für die Einarbeitung sowie Durchführung der Färbung und Erstellung der Gewebeschnitte.

Ebenso gebürt mein Dank Frau Dr. M. Mercedes Noirga. Ohne die von ihr vorgenommenen Festlegung des Ausmaßes der IFTA und des potentiell reversiblen Tubulusschadens wäre die Arbeit in wesentlichen Teilen nicht möglich gewesen.

Abschließend danke ich meinen Eltern für ihr stetes Interesse und Anteilnahme an meinem Studium, dem Fortgang dieser Arbeit, insbesondere meinem Vater für viele hilfreiche Diskussionen.

## **8. Lebenslauf**

### **Angaben zur Person**

Name: Elisabeth Marie Herden  
Wohnort: Feldhoopstücken 41e  
22529 Hamburg  
Telefon: 015784467597  
E-Mail: elisabethmarieherden@web.de  
Geburtsdatum: 10.03.1989  
Geburtsort: Darmstadt  
Familienstand: ledig  
Konfession: evangelisch  
Eltern: Herr Dr. med. Horst Herden und Frau Dr. med. Almut Franke- Herden  
Geschwister: Herr Dr. rer. nat. Tobias Herden und Herr Dr. med. Johannes Herden

### **Schulbildung**

08/1996 – 06/1997: Freie Waldorfschule Darmstadt  
08/1997 - 05/2008: Freie Waldorfschule Marburg Abschluss: Abitur

### **FSJ**

08/2008- 06/2009 Freiwilliges Soziales Jahr als Rettungssanitäterin bei den Johannitern in Hamburg

### **Studium**

10/2009-06/2016: Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg  
Abschluss: Staatsexamen

### **Beruf**

09/2016: Beginn als Assistenzärztin in der Inneren Medizin im Evangelischen Krankenhaus Alsterdorf

## **9. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....