

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik
Institut für Pathologie mit Molekularpathologie und Zytopathologie

Direktor des Institutes
Prof. Dr. med. Guido Sauter

Bedeutung des intrarenalen plasmazellulären Infiltrates in der ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Markus Joachim von Wardenburg
aus Koblenz

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 17.12.2018

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Thorsten Wiech

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. Jan-Eric Turner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	<i>Rapid progrediente Glomerulonephritiden.....</i>	5
1.2	<i>Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper.....</i>	6
1.3	<i>ANCA-assoziierte nekrotisierende Glomerulonephritis.....</i>	7
1.4	<i>Pathogenese der ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis</i>	8
2	Material und Methoden	10
2.1	<i>Gewebeproben.....</i>	10
2.2	<i>Immunhistochemie</i>	10
2.3	<i>Herstellung der Neufuchsin-Lösung</i>	11
2.4	<i>Geräte und Software</i>	12
2.5	<i>Lichtmikroskopie.....</i>	12
2.6	<i>Auswertung der Plasmazelldichte</i>	13
2.6.1	<i>Interstitieller und periglomerulärer Raum.....</i>	13
2.6.2	<i>Glomeruläre Schädigung.....</i>	14
2.7	<i>ANCA Klassifikation</i>	14
3	Ergebnisse	15
3.1	<i>Basischarakteristika</i>	15
3.2	<i>Therapien und klinischer Verlauf.....</i>	15
3.3	<i>Plasmazellinfiltrat</i>	16
3.4	<i>Plasmazellinfiltration und glomeruläre Schädigung</i>	16
3.5	<i>Plasmazellinfiltration und glomeruläre Filtrationsrate</i>	21
4	Diskussion	25
5	Zusammenfassung.....	30
6	Summary	31
7	Abkürzungsverzeichnis	32
8	Abbildungsverzeichnis	34

9	Tabellenverzeichnis	36
10	Literaturverzeichnis.....	37
11	Danksagung	42
12	Lebenslauf.....	43
13	Eidesstattliche Erklärung.....	45

1 Einleitung

1.1 *Rapid progrediente Glomerulonephritiden*

Die rapid progrediente Glomerulonephritis (RPGN) ist ein klinisches Syndrom mit einem rasch fortschreitenden Nierenversagen. Sie ist gekennzeichnet durch die Klinik des nephritischen Syndroms mit glomerulärer Hämaturie, Proteinurie, Ödemen, Hypertonus und einem charakteristischen histologischen Korrelat. In der Histologie findet sich eine nekrotisierende Glomerulonephritis (Falk und Jennette 2010). Durch die intra- und extrakapilläre Nekrose mit Zerstörung der Kapillarintegrität kommt es zum Influx inflammatorischer Zellen und zur Proliferation der Parietalzellen. Es bilden sich sog. Halbmonde aus, die anfangs zellreich sind und im Verlauf zunehmend fibrös umgebaut werden. Nach dem englischen Begriff für Halbmond ‚crescent‘ wird die nekrotisierende Glomerulonephritis auch als Crescent Glomerulonephritis beschrieben (Alscher et al. 2008). Theoretisch kann jede Glomerulonephritis die Form einer RPGN annehmen und nekrotisierend verlaufen. Klassischerweise wird die nekrotisierende Glomerulonephritis nach ihrem Erscheinungsbild in der Immunhistochemie in drei Typen unterteilt: Beim Typ 1 findet sich eine lineare Ablagerung von Immunglobulin G entlang der glomerulären Basalmembran, die der Erkrankung auch ihren Namen gibt, die Anti-Basalmembran-Antikörper-Erkrankung oder auch abgekürzt Anti-GBM-Erkrankung. Beim Typ 2 lagern sich Immunkomplexe granulär ab. Der Ablagerungstyp nennt sich dementsprechend auch der Immunkomplextyp. Entsprechend der Genese finden sich die Immunkomplexe mesangial, subendothelial und/oder subepithelial. Auch sind die Komplexe entsprechend der auslösenden Erkrankung unterschiedlicher Subklassen: IgA, IgG, und/oder IgM. Die verursachenden Erkrankungen sind bei dieser Form v.a. der systemische Lupus erythematodes, die IgA-Nephritis, die para- bzw. postinfektiöse Glomerulonephritis (GN) sowie die verschiedenen membranproliferativen Glomerulonephritiden (MPGN). Der dritte und gleichzeitig häufigste Typ der nekrotisierenden Glomerulonephritis zeichnet sich dadurch aus, dass sich keine oder sehr wenige Immundepots in der Immunhistochemie finden. Daher wird dieser Typ auch als pauci-immun bezeichnet (lateinisch pauci=wenige). Die pauci-immune nekrotisierende Glomerulonephritis wird vorrangig durch die ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) verursacht (Kallenberg 2011).

1.2 Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper

Bei den antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) handelt es sich um Autoimmunantikörper, die gegen Strukturen des eigenen Körpers gerichtet sind. Es gibt zwei verschiedene Erscheinungsbilder der ANCA, die man anhand ihres Immunfluoreszenzmusters in cytoplasmatische (c) und perinukleäre (p) ANCA unterscheidet (Jennette et al. 2011). Weiterhin werden die ANCA anhand der verschiedenen Zielantigene, gegen welche sie gerichtet sind, unterschieden. Die beiden Hauptzielantigene sind die Proteinase 3 (PR3) und die Myeloperoxidase (MPO). Die cANCA finden sich vor allem bei der Granulomatosis mit Polyangiitis (GPA, ehemals Morbus Wegener) und sind meist gegen die PR3 gerichtet. Die pANCA kommen häufig bei der mikroskopischen Polyangiitis (MPA) und in der Hälfte der Fälle einer eosinophilen granulomatösen Polyangiitis (EGPA, ehemals Churg-Strauss-Syndrom) vor und sind meist gegen die Myeloperoxidase (MPO) gerichtet (Furuta u. Jayne 2013). Die Proteinase 3 ist eine Serinprotease der primären Granula von neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Morgen et al. 2006, Müller et al. 2007). Freigesetzt wirkt sie proteolytisch, womit sie der Abwehr von Mikroorganismen dient. Zudem wird postuliert, dass im Rahmen der Immunantwort eine Interaktion der Proteinase 3 mit Makrophagen und CD4⁺-T-Zellen stattfindet und es so zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen kommt (Novick et al. 2006). Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, welches sich ebenfalls in primären Granula von neutrophilen Granulozyten und Monozyten findet (Morgen et al. 2006). MPO katalysiert die Umwandlung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zur hypochlorigen Säure (HClO). Zur Abwehr von Mikroorganismen setzen neutrophile Granulozyten sogenannte NETs (neutrophil extracellular traps) frei. Diese NETs bestehen aus kondensiertem Chromatin und behindern die Beweglichkeit der Keime. Der reaktive Sauerstoff, der zur NET-Formation benötigt wird, wird von der Myeloperoxidase produziert (Papayannopoulos et al. 2010). Während die Zielantigene MPO und PR3 seit längerem bekannt sind (Falk et al. 1988), wurde vor knapp zehn Jahren ein weiterer ANCA beschrieben (Kain et al. 2008). Dieses dritte Zielantigen der ANCA soll das lysosomale Membranprotein-2 (LAMP-2) sein. Es ist ein Membranprotein und findet sich nicht nur an der Oberfläche von Vesikeln neutrophiler Granulozyten, sondern zusätzlich auch an der Oberfläche von Endothelzellen (Kain et al. 2012). Diese Vesikel beinhalten MPO oder PR3 und sind daher wichtig für die Abwehr von Mikroorganismen (Schreiber et al. 2012). LAMP-2 besitzt zudem die Eigenschaft, an die Zelloberfläche

zu wandern, um dort die Zelle bei verschiedenen Zellfunktionen zu unterstützen (Gough u. Fambrough 1997). Mögliche Funktionen sind dabei zum Beispiel die Antigenpräsentation (Zhou et al. 2005), die Adhäsion (Sawada et al. 1993) wie auch die zelluläre Homöostase (Dice 2007). Im menschlichen Körper sind drei unterschiedliche Subtypen des LAMP-2 bekannt: LAMP-2A, LAMP-2B und LAMP-2C. Sie weisen jedoch alle identische extrazelluläre Epitope auf ihrer Oberfläche auf (Eskelinen et al. 2005). Bisher ist ein signifikanter Nachweis der LAMP-2 Antikörper bei Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis jedoch noch keiner anderen Arbeitsgruppe gelungen (Kain et al. 2012).

1.3 ANCA-assoziierte nekrotisierende Glomerulonephritis

ANCA finden sich vor allem bei den Kleingefäßvaskulitiden. Man unterscheidet verschiedene Stadien der ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV). Meist beginnen sie in einem lokalisierten Stadium, das erst in ein frühes systemisches und später in ein generalisiertes Stadium übergeht. Im generalisierten Fall sind meist lebenswichtige Organe betroffen, insbesondere die Nieren. Im limitierten lokal begrenzten Stadium äußert sich eine AAV klinisch zumeist mit einer Entzündung der oberen Atemwege. Häufig kommt es hierbei zu einer chronischen Rhinitis bzw. einer Sinusitis mit Ulzerationen der Schleimhaut im HNO-Bereich (Weidner et al. 2004). Nicht selten findet sich dann bei Befall des Respirationstraktes eine therapieresistente Pneumonie mit pulmonalen Noduli. Manchmal kommt es dabei zu einer generalisierten Pneumonitis oder zu einer lebensbedrohlichen pulmonalen Hämorrhagie (Berden et al. 2012b). Die alveoläre Blutung ist jedoch meist Bestandteil der generalisierten Erkrankung, die vor allem die Nieren betrifft. Statistisch kommt es zur Nierenbeteiligung in ca. 70% der GPA-Erkrankungen und in bis zu 100% der Fälle bei der MPA (Sinico et al. 2013). Meist präsentiert sich die AAV dann als nekrotisierende Glomerulonephritis mit dem klinischen Bild einer RPGN (Pallan et al. 2009). Neben der Lunge und den Nieren sind das periphere Nervensystem und die Haut ebenfalls häufiger beteiligt. Seltener finden sich eine Beteiligung von Auge, Herz, Darm und zentralem Nervensystem. Theoretisch kann jedes Organ in Mitleidenschaft gezogen werden. Der erste große Schritt in der Behandlung der vorher nicht therapierbaren ANCA-assoziierten Erkrankungen wurde mit der Einführung der Cyclophosphamid-Therapie gemacht, da sich zuvor unter reiner Steroidtherapie eine 1-Jahres-Mortalität

von ca. 80% fand (Flossmann et al. 2011). Die Nierenbeteiligung der AAV mit nekrotisierender Glomerulonephritis führt jedoch weiterhin zu entscheidender Morbidität und Mortalität der Patienten (Day et al. 2010). Betrachtet man beispielsweise den Fall eines AAV-Patienten mit initial schwerem, dialysepflichtigem Nierenversagen, so ist die Frühmortalität des Patienten innerhalb der ersten vier Monate aktuell mit 14% trotz neuer Medikamente weiterhin inakzeptabel hoch. Neben dem respiratorischen Versagen bei pulmonaler Hämorrhagie sind die mit der immunsuppressiven Therapie assoziierten Infekte die häufigste Todesursache in den ersten Monaten nach Erkrankungsbeginn (Lionaki et al. 2009). Priorität hat, die Therapie für die Patienten insoweit zu optimieren, dass die Lebensdauer verlängert und die Lebensqualität der Patienten erhöht wird. Hierbei scheint ein wichtiger Ansatz zu sein, die akute Inflammation vom chronischen, irreversiblen Schaden zu unterscheiden. Das Ziel der Behandlung ist, nicht den chronischen Schaden, sondern die aktive Vaskulitis immunsuppressiv zu behandeln.

1.4 Pathogenese der ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis

Zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen gibt es diverse Theorien. Auch zur Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitis gibt es mehrere Erklärungsversuche. Eine davon ist das ‚molecular Mimicry‘, demzufolge der Körper durch das Eindringen eines Antigens, welches dem Körper ähnliche Oberflächenproteine besitzt, Antikörper gegen diese produziert, die in der Folge die körpereigenen Strukturen angreifen können. Kain et al. (2012) konnten zeigen, dass eine Homologie der LAMP-2-Epitope P41-49 mit dem bakteriellen Adhesin FimH besteht. FimH findet sich auf der Oberfläche von gramnegativen Keimen, wie z.B. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis* und unterstützt die Anheftung der Bakterien am Epithel. Bildet der Körper nun im Rahmen eines Infektes mit gram-negativen Keimen Antikörper gegen FimH aus, so kann eine Kreuzreaktion dieser Antikörper gegen das körpereigene LAMP-2 entstehen. *In vitro* führten diese Antikörper zu Verletzungen des mikrovaskulären Endothels. Das Team um Kain et al. (2008) injizierten Ratten FimH-Antikörper und induzierten dadurch eine fokal nekrotisierende Glomerulonephritis. So lässt sich eine vorangegangene Infektion mit einem gram-negativen Keim als Auslöser der fokalen, nekrotisierenden Glomerulonephritis diskutieren. Viele Aspekte der Pathogenese der ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis sind bis

heute nicht vollständig geklärt. Warum beispielsweise die Erkrankung eines Patienten in Remission geht, während ein anderer Patient wiederholt unter Rezidiven leidet, ist unbekannt. Es ist bisher kein guter Biomarker bekannt, der Anhalt über Remissions- und Rezidivraten geben könnte. Lediglich PR3-positive ANCA scheinen mit einer etwas höheren Rezidivrate einherzugehen (Miloslavsky et al. 2013)

Auf der Suche nach prognostischen Kriterien findet sich die Theorie der langlebigen Plasmazellen. Neben kurzlebigen Plasmazellen, deren Lebensdauer von einigen Tagen bis hin zu Wochen variiert, existieren hiernach langlebige Plasmazellen, deren Lebensdauer im Bereich von Jahren bis Jahrzehnten liegt. Der Ursprung aller Plasmazellen ist die B-Zelle. Während der Fetalphase entstehen sie in der Leber, später übernimmt das Knochenmark die Produktion. Die dort gebildeten B-Zellen verlassen das Knochenmark, um in der Peripherie über Zwischenstufen weiter heran zu reifen. Die meisten B-Zellen zirkulieren zwischen Milz, Lymphknoten und Knochenmark, bis sie Kontakt mit einem Antigen haben. Nach diesem Kontakt sterben die B-Zellen entweder ab oder sie differenzieren mit Hilfe von Co-Stimulatoren zu Memory-B-Zellen oder aber zu Plasmablasten, die in der Lage sind, Antikörper zu produzieren und somit die Abwehr von Mikroorganismen zu unterstützen (Radbruch et al. 2006, Nutt et al. 2015). Einige dieser Plasmablasten können sich dann in Nischen zurückziehen und zu langlebigen Plasmazellen werden. Diese Nischen befinden sich vor allem im Knochenmark, aber auch im entzündlichen Gewebe (Hoyer et al. 2005). Langlebige Plasmazellen sind bisher keine Targets der aktuell verwendeten Immunsuppressiva und könnten somit für einen langen Zeitraum in der Lage sein, erkrankungsverantwortliche Antikörper zu produzieren und so dazu beitragen, das entzündliche Geschehen am Laufen zu halten (Hiepe et al. 2011). Im Nierengewebe von Patienten mit einer ANCA-assoziierten Glomerulonephritis zeigte sich in einer Micro-Array Analyse, dass die mit am stärksten regulierten Transkripte im verletzten Gewebe Transkripte von Immunglobulinen waren (Brix et al. 2015). Dies weist darauf hin, dass in der entzündeten Niere selbst eine große Anzahl von Antikörpern produziert wird. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, wo sich die Plasmazellen lokalisieren lassen und welche Auswirkung sie auf die Erkrankung haben.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Die dieser Dissertation zu Grunde liegende Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki konzipiert. Eine Genehmigung der örtlichen Ethikkommission wurde eingeholt (Ethikvotum Nummer PV3162). Verwendet wurden Nierenbiopsien von 41 Patienten mit histologisch gesicherter, ANCA-assoziiierter nekrotisierender Glomerulonephritis aus der RPGN-Studie der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

2.2 Immunhistochemie

Alle histologischen Schnitte der Nierenbiopsien wurden nach der APAAP-Methode gefärbt. Dabei handelt es sich um ein indirektes, immunhistochemisches Verfahren, bei dem nach dem Sekundärantikörper als Indikator ein Komplex aus alkalischer Phosphatase und Anti-Alkalischer-Phosphatase-Antikörper (APAAP) verwendet wird. Für die IgA- und die IgM-Färbungen wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet und für die IgG-Färbung wurde ein monoklonaler Antikörper genutzt. Die in einer 4%-igen Formalin-Lösung fixierten und in Paraffin eingebetteten, 3-4µm dicken Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert. Die Molekülvernetzungen wurden dann durch eine 15 minütige Protease-Anwendung aufgebrochen. Nach der Blockierung der Protease durch 100% Ethanol und dem Abfangen unspezifischer Bindungen mit gepuffertem, normalem Pferde-Serum, wurden die Schnitte 30 Minuten mit dem Primärantikörper behandelt. Darauffolgend wurden die Schnitte mit einem Brückenantikörper 15-20 Minuten behandelt und nach dem Abspülen zwischen den Antikörperbenetzungen zuletzt mit dem APAAP-Komplex für weitere 15-20 Minuten beschichtet. Als Reagenz für den APAAP-Komplex diente dabei eine Neufuchsin-Lösung. Die Zellkerne wurden anschließend mit einer Hämalaun-Färbung nach Böhmer angefärbt. Dafür wurden folgende Antikörper verwendet: IgA (DAKO, A 0262, Dänemark), IgG (Dianova, 209-005-088, Deutschland), IgM (DAKO, A 0425, Dänemark), Brückenantikörper für die IgA- und IgM-Färbungen (Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper, Dianova, 211-005-109), wie auch Sekundärantikörper für alle Färbungen (Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, DAKO, Z0259). Als weitere Reagenzien

wurden eine Protease (Sigma, P 8038) und normales Pferde-Serum (Vector, S 2000) verwendet. Für die Zusammenfassung der Reagenzien siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien für die Immunglobulinfärbungen

Reagenz	Firma	Produktnummer	Besonderheiten
IgA-AK	DAKO	A0262	
IgG-AK	Dianova	209-005-088	
IgM-AK	DAKO	A0425	
Maus-Anti-Kaninchen-AK	Dianova	211-005-109	Brücken-AK für IgA und IgM
Kaninchen-Anti-Maus-AK	DAKO	Z0259	Sekundär-AK für alle Färbung
Normales Pferde-Serum	Vector	S2000	
Protease	Sigma	P8038	
IgA-AK	DAKO	A0262	

2.3 Herstellung der Neufuchsin-Lösung

Zur Herstellung der Neufuchsin-Lösung wurden vier Teillösungen miteinander vermischt. Im Einzelnen wurden 7,5 ml der Lösung II mit 0,3ml der Lösung III vermengt. Danach wurden zunächst 150ml der Lösung I und zuletzt 750ml der Lösung IV hinzugefügt und gemischt. Lösung I bestand dabei aus 6,35g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 9,0g Natriumchlorid (NaCl), 25ml einmolarer Salzsäure (HCL), 1025ml zweifach destilliertem Wasser (Aqua bidestillata) und 1,0g Tween 20. Dadurch wurde ein Puffer bei pH 8,2 bis 8,4 aufgebaut. Lösung II war eine 4%-Natriumnitrit-Lösung, die unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt werden musste. Lösung III war die Neufuchsin-Stammlösung, bestehend aus 2,5g Neufuchsin und 50ml 2M HCL-Lösung. Lösung IV war eine Naphthol-AS-Bi-Phosphat-Lösung, bestehend aus 20mg Naphthol-AS-Bi-Phosphat und 750mg NN-Dimethylformamid. Die genaue Auflistung der verwendeten Chemikalien findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien für die Neufuchsin-Lösung

Reagenz	Firma	Produktnummer
Tris	Merck	8382
Neufuchsin	Aldrich Chemie	22931-8
NaCl	Merck	6404
Naphthol-AS-Bi-Phosphat	Serva	2998803
NN-Dimethylformamid	Sigma	D-4254

2.4 Geräte und Software

Zur Erstellung und Auswertung der mikroskopischen Bilder wurde das Mikroskop „Axio Imager.A2“ von Zeiss mit der Software „ZEN 2011“ (blue edition) von Zeiss verwendet. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Programmes „Prism“ des Herstellers „GraphPad“ erstellt. Zur Sammlung der Daten sowie zur Verfassung dieser Arbeit wurden die Programme Microsoft Excel und Microsoft Word aus dem Office Paket 2013 verwendet.

2.5 Lichtmikroskopie

Alle histologischen Schnitte der Nierenbiopsien wurden am Lichtmikroskop untersucht. Es erlaubt dabei unter Zuhilfenahme zweier Sammellinsen eine Vergrößerungen bis etwa das 1000-fache (Fritsche et al. 2013). Die dem Objekt nahe Linse heißt Objektiv und die dem Auge nahe Linse heißt Okular (lat. oculus = Auge). Beim Objektiv handelt es sich um eine Sammellinse mit besonders kurzer Brennweite, die es ermöglicht, dass man möglichst nah an das Objekt heranrücken kann, ohne ein virtuelles und somit nicht mehr sichtbares Bild zu erzeugen. Dies geschieht immer dann, wenn die Gegenstandsweite, der Abstand von der Linse zum Gegenstand, kleiner wird als die Brennweite, dem Abstand von der Linse zum Brennpunkt, dem Punkt, in dem sich alle Strahlen bündeln. Betrachtet man den Weg des Lichts zum Auge des Betrachters, so wird häufig das Licht in einer Lichtquelle unterhalb des zu betrachtenden Objektes produziert. Dadurch wird das Objekt durchstrahlt und das Licht nimmt seinen Weg,

zuerst durch das Objektiv, dann durch das Okular, woraufhin es schließlich durch die Augenlinse hindurch auf der Netzhaut abgebildet wird (Bannwarth et al. 2013).

2.6 Auswertung der Plasmazellichte

Die interstitielle Plasmazellichte wurde in ein periglomeruläres und ein tubulointerstitielles Kompartiment eingeteilt. Es wurden die IgG-, IgA- und IgM-positiven Plasmazellen getrennt voneinander betrachtet und die gesamte Plasmazellichte berechnet. Anschließend wurde die Dichte mit histopathologischen und klinischen Parametern korreliert wie den verschiedenen Stadien der glomerulären Schädigung, der Erkrankungssubtypen, des Geschlechts und der Nierenfunktion. Ausgewertet wurden alle periglomerulären Räume und die tubulointerstitiellen Hotspots jeder Biopsie.

2.6.1 Interstitieller und periglomerulärer Raum

Alle Glomeruli und ihre periglomerulären Flächen wurden mit einem 20x-Objektiv und einem 10x-Optovar abgelichtet, also in 200-facher Vergrößerung ausgewertet. Alle tubulointerstitiellen Bilder wurden mit einem 40x-Objektiv und mit einem 10x-Optovar fotografiert, also in 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Bei den glomerulären Bildern wurde das Glomerulus mit einem Kreis markiert. Der Bereich, der sich in einem Radius von 50 μm um das Glomerulus herum befand, wurde als periglomerulärer Raum definiert und mit Hilfe des Computerprogramms „ZEN“ ausgemessen. Im Anschluss wurden alle in den Immunglobulinfärbungen positiv gefärbten Plasmazellen in diesem Bereich gezählt und so die periglomeruläre Plasmazellichte bestimmt. Da der Raum eines jeden tubulointerstitiellen Bildes exakt $37400\mu\text{m}^2$ umfasste und kein Bereich markiert werden musste, wurden in diesen Bildern alle gefärbten Plasmazellen gezählt.

2.6.2 Glomeruläre Schädigung

Die Glomeruli wurden nach verschiedenen Stadien der Schädigung eingeteilt. Es wurde unterschieden in nicht vaskulitisch betroffene Glomeruli und in Glomeruli mit fibrinoider Nekrose, zellulärem, fibrozellulärem und fibrösem Halbmond sowie sklerotisiertem Glomerulus. Die pathologische Beurteilung wurde von Herrn Prof. T. Wiech durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurden die Biopsien nach der nachfolgend erläuterten Klassifikation nach Berden eingeteilt.

2.7 ANCA Klassifikation

Die Klassifikation nach Berden stammt aus der Arbeitsgruppe von Fr. Prof. I. Bajema (Berden et al. 2010). Hier werden die Biopsien in vier Klassen entsprechend der Schädigung der Glomeruli unterteilt. Diese sind die fokale, die Halbmond-, die sklerotische und die gemischte Klasse. Das am häufigsten vorliegende Erscheinungsbild der Glomeruli entscheidet in welche Klasse die Biopsie eingeteilt wird. Sind über 50% der Glomeruli normal, sklerotisch oder besitzen Halbmonde, spricht man von dem entsprechenden Typ. Dominiert bei der Untersuchung keine der genannten Schädigungsformen, so spricht man vom gemischten Typ.

3 Ergebnisse

3.1 Basischarakteristika

In der zur Verfassung dieser Dissertation durchgeführten Studie wurden die Biopsien von 41 Patienten mit gesicherter ANCA-assoziiierter nekrotisierender Glomerulonephritis auf ihr Plasmazellinfiltrat hin untersucht. Bei 24 dieser Patienten (58,5% des Patientenkollektivs) wurde die Diagnose einer mikroskopischen Polyangiitis (MPA) gestellt, bei weiteren 17 Patienten (41,5%) lag eine Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) vor. Eine detaillierte Auflistung der Basischarakteristika zeigt die folgende Tabelle 3.

Tabelle 3: Basischarakteristika des Patientenkollektivs

Anzahl der Patienten – n	41
Alter - Jahre \pm SD	61,7 \pm 13,3
Männliches Geschlecht – n (%)	32 (78)
Weibliches Geschlecht – n (%)	9 (22)
Diagnose	
Granulomatose mit Polyangiitis	17 (41,5)
Mikroskopische Polyangiitis	24 (58,5)
Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Diagnose	
Kreatinin Clearance – ml/min \pm SD	36,1 \pm 19,4
Dialysepflichtigkeit zum Zeitpunkt des Einschlusses – n (%)	9 (22)

3.2 Therapien und klinischer Verlauf

Der Studienbeobachtungszeitraum der Patienten war im Schnitt 24,7 Monate. 95% der Patienten erhielten eine Therapie mit Cyclophosphamid und gut ein Viertel von ihnen wurde zusätzlich einer Plasmaseparation unterzogen. 10 Patienten erlitten im Laufe der Zeit ein renales Rezidiv, 4 Patienten verstarben und 4 weitere entwickelten eine terminale, dialysepflichtige Niereninsuffizienz (Tabelle 4).

Tabelle 4: Therapie und Folgen für die Patienten

Beobachtungszeitraum – Monate \pm SD	24 \pm 13,1
Induktionstherapie	
Cyclophosphamid – n (%)	39 (95,1)
Plasmapherese – n (%)	10 (24,4)
Folgen	
Terminale Niereninsuffizienz – n (%)	4 (9,8)
Renales Rezidiv – n (%)	10 (24,4)
Todesfälle – n (%)	4 (9,8)

3.3 Plasmazellinfiltrat

In den histopathologischen Untersuchungen des humanen Nierengewebes wurde das Plasmazellinfiltrat sowohl in der IgG-, IgA- und IgM-Färbung im periglomerulären und tubulointerstitiellen Raum getrennt voneinander untersucht.

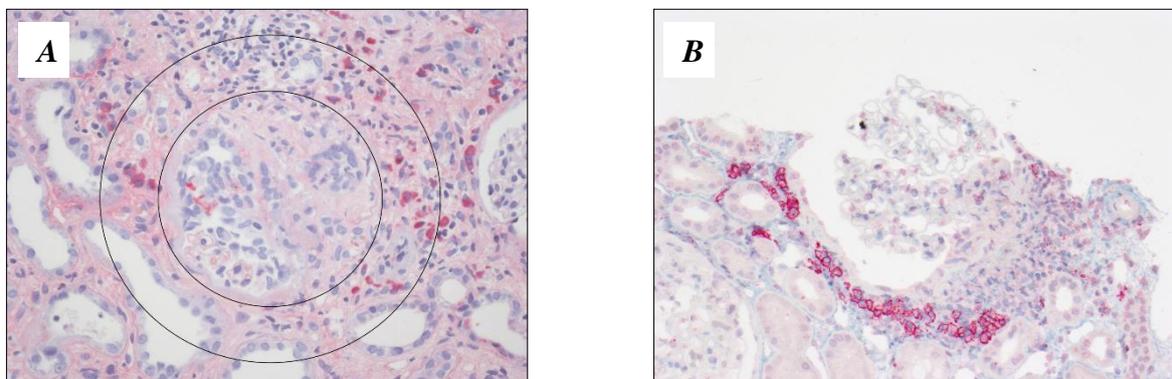


Abbildung 1A: Begrenzung des Glomerulus (kleiner Kreis) mit Definition des periglomerulären Raumes im Abstand von 50 μ m um das Glomerulus (Bereich zwischen kleinem und großem Kreis)

Abbildung 1B: Kapselruptur der Bowman'schen Kapsel.

Abbildung 1A zeigt dabei den Vorgang der Definition des periglomerulären Raumes und in Abbildung 1B sieht man die Ruptur der Kapsel eines Glomerulus als Zeichen eines starken Entzündungsgeschehens. Typische Beispiele für die verschiedenen Färbungen und untersuchten Areale sind in Abbildung 2 A-F dargestellt.

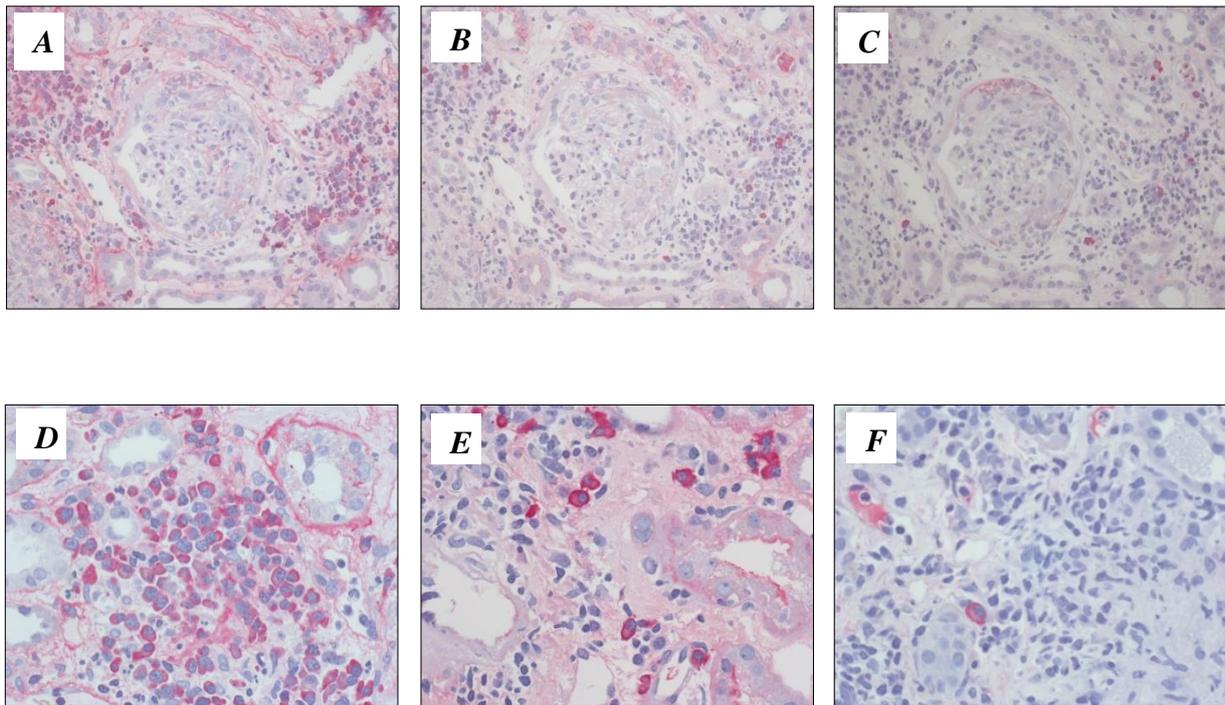


Abbildung 2: Repräsentative Bilder der Immunglobulin-Färbungen. A-C zeigen Glomeruli mit periglomerulärem Raum, D-F zeigen tubulointerstitielle Areale. A und D sind IgG-Färbungen, B und E sind IgA-Färbungen, C und F sind IgM-Färbungen.

3.4 Plasmazellinfiltration und glomeruläre Schädigung

Das Plasmazellinfiltrat wurde mit klinischen Parametern und dem Stadium der glomerulären Schädigung korreliert. In den vaskulitisch geschädigten Glomeruli wurde eine hoch signifikante Erhöhung der Plasmazelldichte gegenüber den normalen, nicht angegriffenen Glomeruli gefunden (Abbildung 3). Dabei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Dichte der infiltrierenden Plasmazellen im periglomerulären Raum im Vergleich zu interstitiellen Arealen (Abbildung 4) dargestellt werden. In diesen sowie den folgenden Abbildungen steht ‚ns‘ für nicht signifikant (also $p \geq 0,05$) und die Sterne geben den Grad der Signifikanz wieder (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Die durchschnittliche Dichte der Plasmazellen, gemittelt aus periglomerulärer und tubulointerstitieller Dichte, war bei Patienten mit einer mikroskopischen Polyangiitis nicht signifikant unterschiedlich derer mit einer Granulomatosis mit Polyangiitis (Abbildung 5a). Dabei unterschied sich die Dichte der Plasmazellen weder zwischen den Geschlechtern noch zwischen vorbehandelten und noch nicht therapierten Patienten (Abbildung 6).

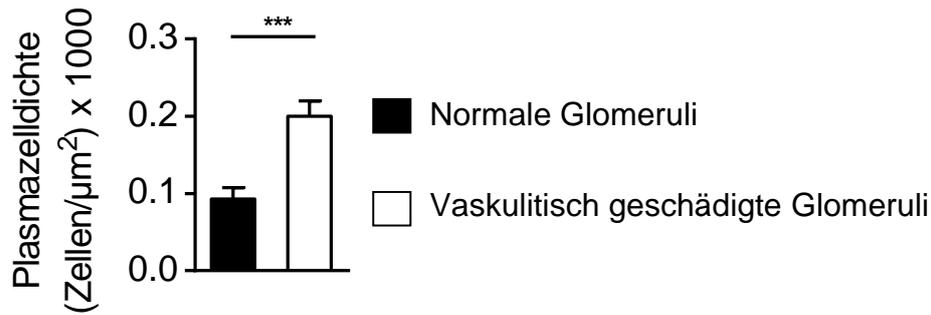


Abbildung 3: Vergleich der Plasmazellidichte in normalen und geschädigten Glomeruli

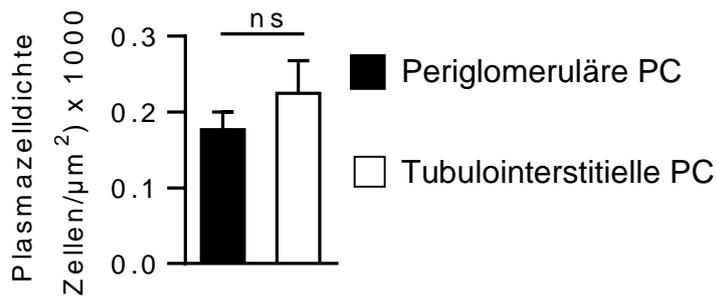


Abbildung 4: Vergleich der periglomerulären und tubulointerstitiellen Plasmazellidichte

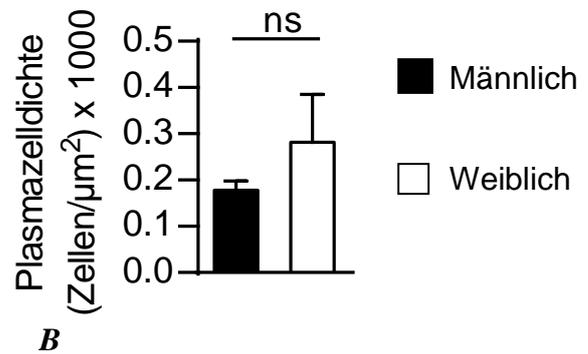
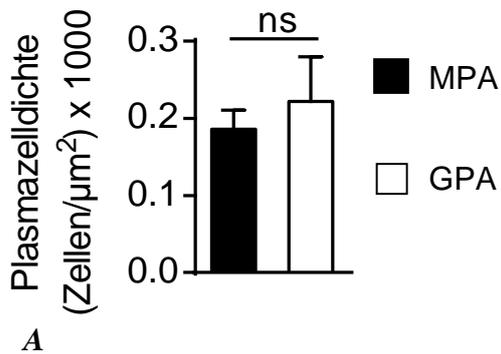


Abbildung 5A: Plasmazellidichte in den Subgruppen der ANCA Vaskulitis, der mikroskopischen Polyangiitis (MPA) und der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)

Abbildung 5B: Vergleich der Plasmazellidichte zwischen beiden Geschlechtern

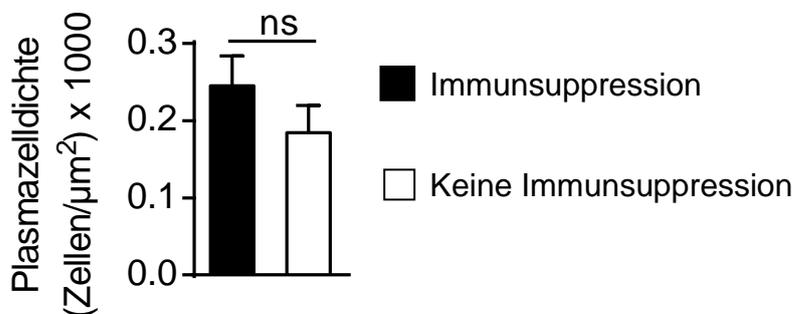


Abbildung 6: Plasmazellidichte in Biopsien von Patienten, die vor der Biopsie bereits eine Immunsuppression (IS) erhalten hatten und diejenigen Patienten, bei denen vor der Biopsie noch keine IS initiiert worden war.

In einem zweiten Schritt wurde untersucht, in welchem Stadium der glomerulären Entzündung das periglomeruläre Plasmazellinfiltrat auftrat. Bereits in einem frühen Stadium der Entzündung mit Fibrinpräzipitaten und zellulärer Halbmondbildung zeigte sich eine signifikante Vermehrung der periglomerulären Plasmazellen (Abbildung 7). Dieses Infiltrat blieb erhalten und zeigte sich auch noch in den späteren Entzündungsstadien (fibrozellulärer Halbmond und sklerosierte Glomeruli) (Abbildung 8). Im Fall einer ausgeprägten glomerulären Schädigung kann es zu einer Zerstörung der Bowman'schen Kapsel kommen. Es zeigte sich während der Untersuchungen, dass im Fall einer Ruptur der Kapsel die periglomeruläre Infiltration der Plasmazellen signifikant erhöht war (Abbildung 9)

Zudem wurde im Rahmen der Studie differenziert, welcher Klassentyp von Immunglobulinen vorrangig in den verschiedenen Schädigungsgraden vertreten war. Dabei zeigte sich, dass in allen Schädigungsgraden der Klassenswitch zu IgG bereits vollzogen wurde, da überall die IgG-Plasmazelldichte signifikant erhöht war gegenüber der Dichte der IgM. Lediglich das frühe Stadium der fibrinoiden Nekrose unterscheidet sich hierbei und zeigte in den Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 10).

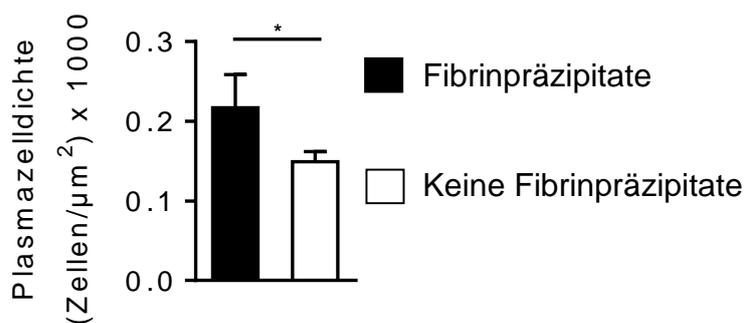


Abbildung 7: Plasmazelldichte in Korrelation zum Vorhandensein von Fibrinpräzipitaten

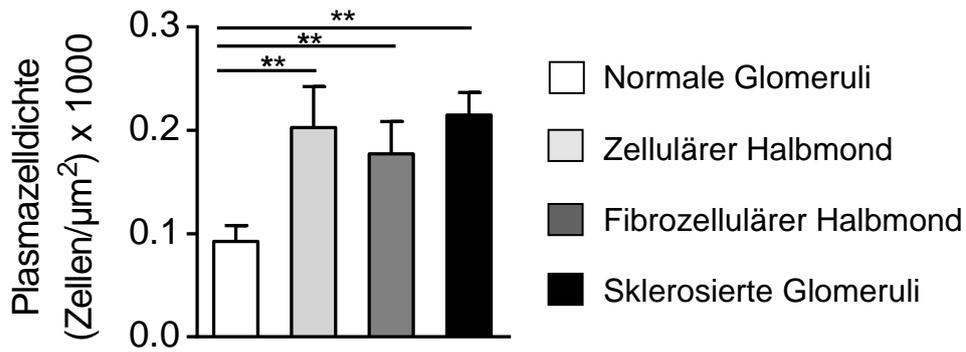


Abbildung 8: Vergleich der Plasmazellendichte im Verlauf der glomerulären Schädigung

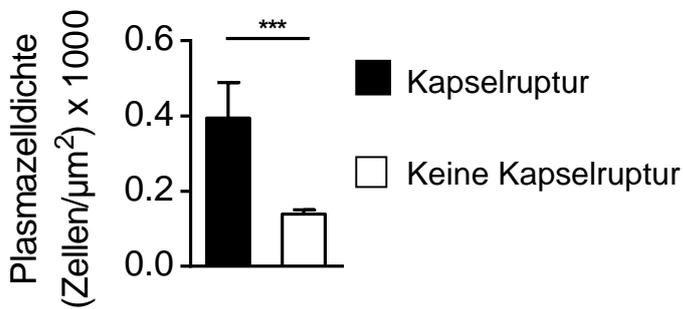


Abbildung 9: Vergleich der Plasmazellendichte bei Glomeruli mit und ohne Kapselruptur

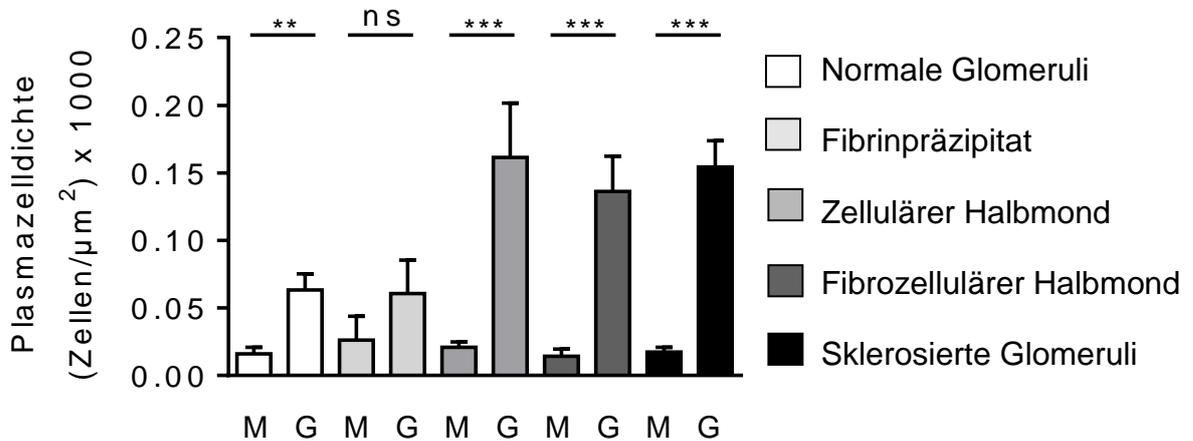


Abbildung 10: Vergleich der Dichte von IgM- (hier „M“) und IgG-Plasmazellen (hier „G“) in den verschiedenen Schädigungsgraden

3.5 Plasmazellinfiltration und glomeruläre Filtrationsrate

Weiterhin wurde die Plasmazellinfiltration mit der Nierenfunktion korreliert. Die Dichte des Plasmazellinfiltrates nahm mit fallender glomerulärer Filtrationsrate (GFR) zu, sowohl zum Zeitpunkt der ersten Biopsie als auch bei der Follow-up-Untersuchung nach zwei Jahren (Abbildung 11a & 11b).

Zum Zeitpunkt der ersten Biopsie wiesen jene Patienten, die damals bereits dialysepflichtig waren, nicht mehr Plasmazellen in ihrem Nierengewebe auf als diejenigen Patienten, welche noch kein Nierenersatzverfahren benötigten (Abbildung 12). Allerdings zeigte sich in der Follow-up-Untersuchung nach zwei Jahren, dass diejenigen Patienten, die im Verlauf terminal niereninsuffizient geworden waren, initial in ihren Biopsien eine höhere Plasmazelldichte besaßen (Abbildung 13)

Schließlich ergab die Studie weiterhin, dass die Plasmazelldichte der Nierenbiopsie bei denjenigen Patienten signifikant erhöht war, die im Verlauf des Beobachtungszeitraumes verstarben (Abbildung 14).

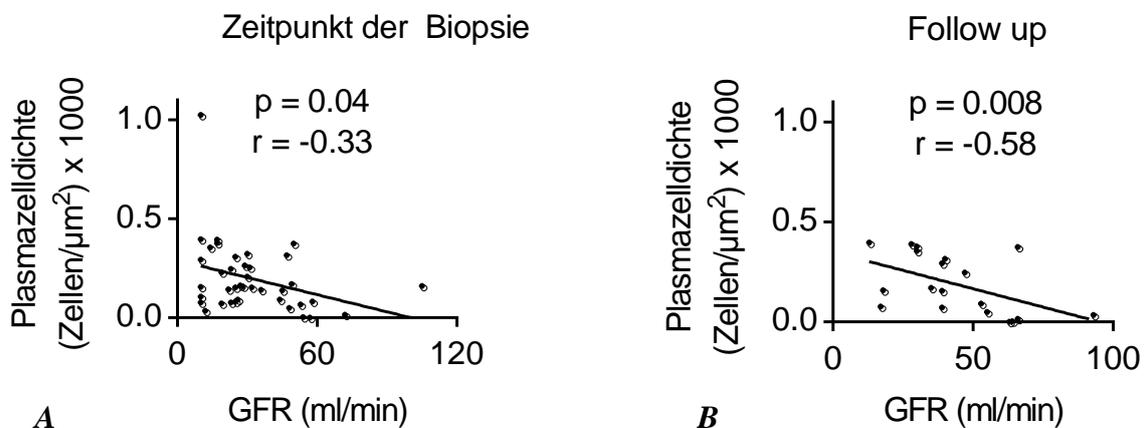


Abbildung 11A: Die Plasmazelldichte korrelierte negativ mit der GFR zum Zeitpunkt der Biopsie

Abbildung 11B: Die Plasmazelldichte korrelierte negativ mit der GFR im Follow-up

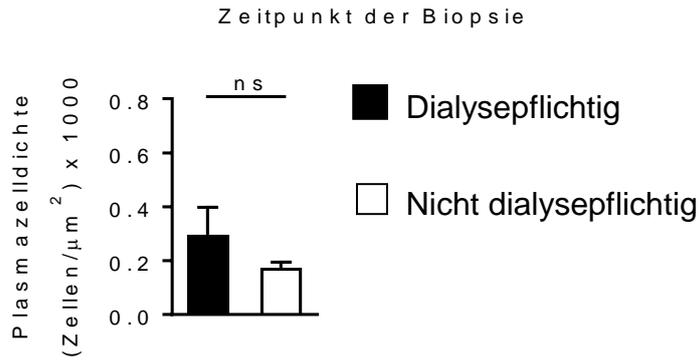


Abbildung 12: Vergleich der Plasmazellidichte aller dialysepflichtigen und nicht-dialysepflichtigen Patienten

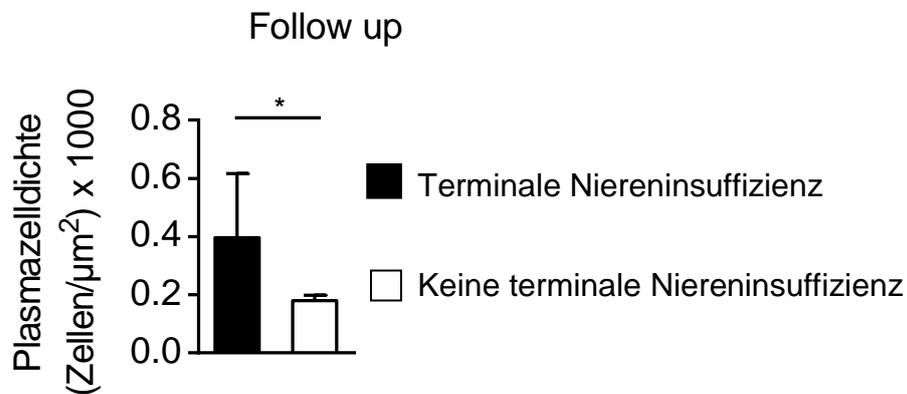


Abbildung 13: Vergleich der Plasmazellidichte bei Patienten mit kompensierter Nierenfunktion und Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz

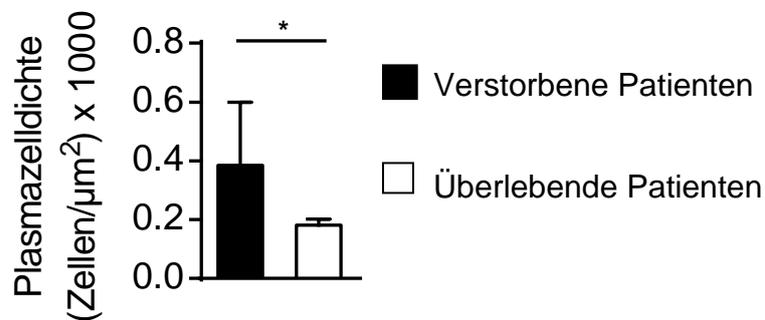


Abbildung 14: Vergleich der Plasmazellidichte der verstorbenen Patienten mit den nicht-verstorbenen

Trotz aggressiver immunsuppressiver Therapie geht die ANCA-assoziierte nekrotisierende Glomerulonephritis mit Rezidiven einher. Daher wurden die acht vorhandenen Rebiopsien nach dem oben beschriebenen Schema untersucht. Es zeigten sich frische Nekrosen im Sinne eines Rezidivs in 4 Biopsien, die anderen 4 präsentierten lediglich Narben im Sinne einer abgelaufenen Entzündung.

Zwar unterschied sich die absolute Plasmazelldichte in den Rebiopsien mit Rezidiven hierbei nicht signifikant ($p=0,07$) von den Biopsien ohne nachweisbares Rezidiv (Abbildung 15a), dennoch ist hier ein Trend erkennbar. Vergleicht man nun die Plasmazelldichte in Relation zur Dichte in der Initialbiopsie, so ist eine Erhöhung der Dichte in den Biopsien bei Patienten mit Rezidiven signifikant ersichtlich (Abbildung 15b).

Ebenfalls untersucht wurde, ob ein Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil an IgG4⁺-Plasmazellen und der Nierenfunktion vorhanden sei. Dabei wurde die Nierenfunktion anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR) gemessen. Ein solcher Zusammenhang zwischen dem Funktionsgrad der Nieren und dem IgG4⁺-Plasmazellen-Anteil ließ sich jedoch nicht nachweisen (Abbildung 16).

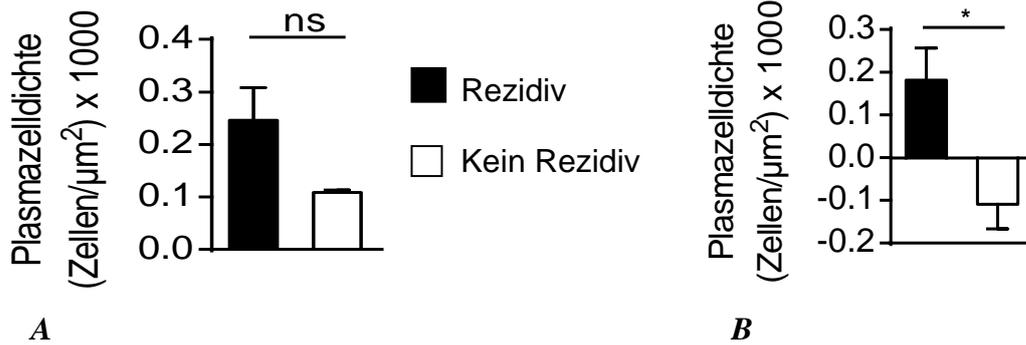


Abbildung 15A: Absolute Plasmazellichte in Rebiopsien von Patienten mit einem Rezidiv und ohne ein Rezidiv

Abbildung 15B: Relative Plasmazellichte im Vergleich zur Initialbiopsie von Patienten mit einem Rezidiv und ohne ein Rezidiv

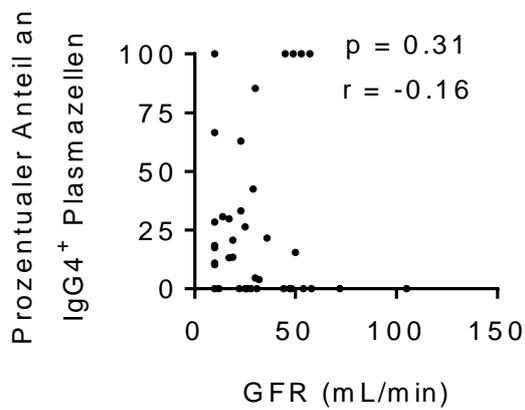


Abbildung 16: Prozentualer Anteil von $IgG4^{+}$ Plasmazellen in Korrelation zur GFR

4 Diskussion

Im Fall der ANCA-assoziierten Vaskulitiden verläuft die renale Entzündung häufig fokal und in Schüben, was die Vorhersagekraft des nierenbiopsischen Ergebnisses einschränkt. Trotzdem gibt es seit Jahren Bemühungen, die Histologie zu klassifizieren und Prädiktoren für ein gutes bzw. schlechtes Outcome der Patienten festzulegen.

Diese Doktorarbeit zeigt nun, dass Plasmazellen einen Teil des akuten entzündlichen Infiltrates in der Niere bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden ausmachen. Wohl aufgrund des pauci-immunen Charakters der Erkrankung wurde diesen Zellen in der Niere und der lokalen Antikörperproduktion bisher wenig Beachtung geschenkt.

Bereits beschrieben ist die Anwesenheit von B-Zellen und T-Zellen in unterschiedlich stark ausgeprägten Organisationsstrukturen in der renalen ANCA-assoziierten Erkrankung sowie der Lupusnephritis (Steinmetz et al. 2008, Espeli et al. 2011, Brix et al. 2018). Das Team um Berden et al. (2012a) konnte zudem bereits einen Zusammenhang zwischen der renalen T-Zell-Tubulitis und der glomerulären Filtrationsrate ein Jahr nach Therapiebeginn mit Rituximab bei Patienten mit einer AAV darstellen.

Diese Doktorarbeit beschreibt nun, wie intrarenale Plasmazellen bereits in einem frühen Stadium der Entzündung, während der Ablagerung von Fibrinpräzipitaten und der zellulären Halbmondbildung, auftreten.

Die periglomeruläre Plasmazelldichte ist dabei über alle Stadien der glomerulären Schädigung signifikant höher als bei den gesunden, nicht geschädigten Glomeruli. Sie ist am höchsten dort, wo es aufgrund eines starken Entzündungsgeschehens zur Ruptur der Kapsel kommt. Im interstitiellen Raum findet sich zwar bei den an einer AAV erkrankten Patienten kein signifikanter Unterschied in der Plasmazelldichte im Vergleich zum periglomerulärem Raum, jedoch wurden interstitiell nur die sog. Hot Spots ausgezählt, sodass nur die Aussage getroffen werden kann, dass periglomerulär die Plasmazelldichte nicht höher ist als in den interstitiellen Clustern. Im frühen Stadium der glomerulären Schädigung finden sich prozentual mehr IgM-positive Plasmazellen als bei älteren Schädigungen. Dies erklärt sich aus dem zeitlichen Verlauf einer Entzündung, da in einer frühen Phase vor allem Immunglobuline der Klasse M zu finden sind, die später dann einen Klassenswitch zu den Immunglobulinen der Klasse G erfahren. Das Ausmaß dieser Erkenntnisse spiegelt sich dabei allerdings vor allem im klinischen Verlauf der Patienten wieder, da ein höheres, intrarenales

Plasmazellinfiltrat mit einem schlechteren Outcome der an einer AAV erkrankten Patienten verbunden ist. So findet sich beispielsweise eine signifikant höhere Plasmazellendichte bei Patienten, die im Verlauf eine terminale, dialysepflichtige Niereninsuffizienz entwickelten.

Die Biopsien von im Verlauf verstorbener Patienten weisen eine höhere Dichte an periglomerulären Plasmazellen auf. Somit ist die Plasmazellendichte mit der Mortalität der Patienten assoziiert. Auch bei Patienten mit einem rezidivierenden Verlauf der ANCA-Vaskulitis ist die Plasmazellendichte der Rebiopsien im Vergleich zur Initialbiopsie signifikant erhöht gegenüber der Plasmazellendichte von Rebiopsien rezidivfreier Patienten.

Die intrarenale Infiltration von Plasmazellen in der ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis ist somit ein Zeichen für die Aktivität der Vaskulitis und verbunden mit einem erhöhten Risiko für eine terminale Niereninsuffizienz und die Gesamtmortalität der Patienten.

Bisherige Untersuchungen zielten vor allem auf die Analyse von im peripheren Blut untersuchten, aktivierten B-Zellen, den Grad ihrer Aktivierung sowie ihr Verhältnis zur Aktivität des autoimmunen Geschehens ab. Dabei konnte zwar gezeigt werden, dass der mittlere prozentuale Anteil an CD38-positiven B-Zellen bei Patienten mit einer generalisierten und aktiven GPA signifikant höher war, als bei Patienten mit einer limitierten Granulomatose oder in der Kontrollgruppe, jedoch konnte keine Korrelation zwischen dem Grad der Aktivierung und der Aktivität der Erkrankung gezeigt werden (Popa et al. 1999).

Auf der Suche einer möglichen Verbesserung der Behandlung von ANCA-assoziierten Vaskulitiden könnte nach den vorliegenden Ergebnissen ein potentieller Therapieansatz die Plasmazelldepletion sein.

Die multizentrische RAVE-Studie untersuchte 197 ANCA-positive MPA- und GPA-Patienten. Dabei wurde die Standard-Therapie zur Remissionsinduktion (Cyclophosphamid) mit einer Therapie mit Rituximab, einem chimären, monoklonalen CD20-Antikörper, jeweils in Kombination mit einem Glukokortikoid verglichen. Dieser Antikörper führt zu einer selektiven Depletion von CD20-positiven B-Zellen. Die Studie ergab, dass die Rituximab-Therapie dem Standard im Verlauf von 18 Monaten sowohl in der Dauer der Remission als auch in der Häufigkeit und der Schwere von Rezidiven nicht unterlegen war (Specks et al. 2013). Die Rituximab-Therapie in Kombination mit

Glukokortikoiden wies sogar ein besseres Ansprechen bei Patienten mit einer rezidivierenden Erkrankung unabhängig vom initialen Therapieschema auf (Stone et al. 2010, Miloslavsky et al. 2014). Dies konnte auch die retrospektive Studie von Pendergraft et al. (2014) zeigen, der zur Folge mittels kontinuierlicher B-Zell-Depletion im peripheren Blut durch Rituximab auch bei Rezidivpatienten immer eine komplette Remission erreicht werden konnte und jedes größere Rezidiv auf das Ausschleichen der Therapie zurückzuführen war. Das Team um Guillevin et al. (2014) konnte im längerfristigen Verlauf von 28 Monaten einen Vorteil einer Erhaltungstherapie mit Rituximab gegenüber Azathioprin hinsichtlich der Remission zeigen ohne Nachweis eines höheren Risikos eines schweren unerwünschten Ereignisses. Cortazar et al. (2016) wiederum zeigten, dass die B-Zell-spezifische Therapie mit Rituximab insbesondere zu einer starken Reduktion des ANCA-Titers bei deutlich geringerer Reduktion des Gesamt-IgG-Levels führte. So fiel in der Induktionsphase der ANCA-Titer um 47% pro Monat bei Patienten mit anti-MPO-Antikörpern bzw. um 48% pro Monat bei Patienten mit anti-PR3-Antikörper, wohingegen der Gesamt-IgG-Level in beiden Gruppen lediglich um 6% pro Monat fiel. Dies ist vor allem in Anbetracht des Risikos einer therapiebedingten opportunistischen Infektion von Interesse. Da die mit einer immunsuppressiven Therapie assoziierten Infektionen eine der häufigsten Todesursachen sind, möchte man insbesondere dieses Risiko möglichst reduzieren (Lionaki et al. 2009). Die B-Zell-spezifische Therapie mit Rituximab erhielt inzwischen Einzug in die aktuellen Empfehlungen zum Management einer ANCA-assoziierten Vaskulitis der European League Against Rheumatism und der European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (Yates et al. 2016).

Man sollte hierbei jedoch nicht unerwähnt lassen, dass Therapien mit Biologicals, wie Rituximab, deutlich kostenintensiver sind als in diesem Fall die Standard-Therapie mit Cyclophosphamid. So betragen beispielsweise rechnerisch im Durchschnitt allein die Kosten für die Medikamente einer Remissionsinduktionstherapie eines 80kg schweren Patienten mit Rituximab 9850 Euro, während eine Therapie mit Cyclophosphamid nur rund 250 Euro kostet (Rote Liste 2016). Dabei würde dem Patienten zuerst alle 2 Wochen, später alle 3 Wochen die Standarddosis von 15 mg/kg Körpergewicht, also in diesem Fall 1,2g Cyclophosphamid, über einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten und weniger als 6 Monaten zukommen. Für die Berechnung wurde in diesem Fall das Mittel, also 4,5 Monate angenommen. Die Empfehlungen für Rituximab belaufen sich auf 375mg pro Woche und Quadratmeter Körperoberfläche über einen Zeitraum von

4 Wochen. Bei einer angenommenen durchschnittlichen Körperoberfläche eines erwachsenen Patienten von rund $1,73\text{m}^2$ macht dies $648,75\text{mg}$ Rituximab pro Woche (Ntatsaki et al. 2014).¹

Einen weiteren potentiellen Therapieansatz eröffnete die Arbeitsgruppe von Herrn Kettritz und Herrn Schreiber. Sie konnte im ANCA-Mausmodell eine Wirksamkeit von Bortezomib, einem Proteasominhibitor, zeigen. Das Bortezomib reduzierte durch myeloperoxidase-spezifische Plasmazellverminderung die Anzahl an MPO-spezifischen Plasmazellen, somit den anti-MPO-Titer und beugte der Entstehung der nekrotisierenden Glomerulonephritis vor (Bontscho et al. 2011).

Bortezomib gehört zur Standardtherapie eines multiplen Myeloms, jedoch ist es in Fällen von Autoimmunerkrankungen bisher nur in Einzelfällen eingesetzt (Neubert et al. 2008, Novikov et al. 2016). Im Versuch von Bontscho et al. (2011) verstarben 3 von 23 Mäusen innerhalb von 36 Stunden nach der ersten Medikamentengabe an einem toxischen Lungenschaden, eines toxischen Effekts des Bortezomib.

Auf die Frage nach der hohen Rezidivrate bei der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Dichte an Plasmazellen in den Biopsien von Patienten mit Rezidiven im Vergleich zur Initialbiopsie signifikant erhöht ist (siehe Abb. 15b). Diese Plasmazellen könnten vermutlich lokal das entzündliche Geschehen mit antreiben und somit auf Dauer mit zu einem Rezidiv beitragen.

In diesem Zusammenhang ist es wichtig, die oben schon erläuterte Theorie der langlebigen Plasmazellen in Erinnerung zu rufen, der zur Folge es nicht nur die kurzlebigen Plasmazellen mit kurzer Halbwertszeit gibt, sondern auch solche, die in sog. Nischen deutlich länger bestehen bleiben können. Beide Plasmazelltypen sind dabei an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Autoimmungeschehens durch die Produktion von Autoantikörpern beteiligt. Bisher zielt die Therapie jedoch hauptsächlich auf die kurzlebigen Zellen ab, während langlebige Plasmazellen weitestgehend nicht erreicht werden. Sie bestehen weiter und könnten so die

¹ Die Daten zur Berechnung der durchschnittlich benötigten Medikamentenmenge wurden aufgrund mangelnder deutscher Leitlinien der Leitlinie zur Therapie von Erwachsenen mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis der „British Society for Rheumatology“ (BSR) und der „British Health Professionals in Rheumatology“ (BHPR) entnommen (Ntatsaki et al. 2014).

Entzündungsaktivität mit unterhalten (Radbruch et al. 2006, Hiepe und Radbruch 2016).

Entscheidend dafür, wohin die Plasmazelle wandert und ihre Nische findet, sind die Chemokin-Produktion des Entzündungsortes und die Chemokin-Rezeptoren der Plasmazelle. Es konnte gezeigt werden, dass Plasmazellen die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 tragen (Hauser et al. 2002, Muehlinghaus et al. 2005). Eine andere Arbeitsgruppe legte in ihren Untersuchungen von Plasmazellen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), wie z.B. Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa, einen besonderen Stellenwert auf ebendiese Rezeptoren. Bei diesen Erkrankungen kommt es ebenfalls zu autoimmunvermittelten, chronischen Entzündungen, hier jedoch nicht im Bereich der Nieren, sondern des Darms. Sie stellten bei Blutuntersuchungen dieser Patienten einen deutlich erhöhten Anteil an unreifen Plasmazellen gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe fest. Die in dieser Studie gezeigte Besonderheit war, dass gerade bei den Patienten mit einer Colitis Ulcerosa die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4 signifikant höher war als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Zudem konnte in den entzündeten Darmgeweben der CED-Patienten eine höhere mRNA-Konzentration der entsprechenden Chemokinrezeptor-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Hosomi et al. 2010).

Ebenso konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass Astrozyten im ZNS mit Hilfe von CXCL10 eine Chemotaxisfunktion ausüben und Plasmazellen anlocken können, die CXCR3 exprimieren (Phares et al. 2013).

Eine mögliche Hypothese und damit ein Ausblick für weiterführende Untersuchungen wäre daher, dass in der ANCA-assoziierten nekrotisierenden Glomerulonephritis, durch Chemotaxis mit Hilfe von CXCR3 und CXCL10, die Plasmazellen in die Nieren einwandern und dort die Inflammation lokal mit tragen.

5 Zusammenfassung

Glomerulonephritiden sind eine häufige Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz mit folgender Dialysepflichtigkeit von Patienten. Dabei ist die rapid progrediente Glomerulonephritis eine häufig auftretende und eine der gefürchtetsten Folgen einer ANCA-assoziierten Vaskulitis, die mit einem negativen Outcome für die Patienten einhergeht. In dieser Arbeit geht es um die Untersuchung der Nierenbiopsate von Patienten mit gesicherter ANCA-assoziiierter Glomerulonephritis, insbesondere in Hinblick auf ihr Plasmazellinfiltrat, um den Einfluss der Plasmazellen auf die Entzündung zu bestimmen und einen möglichen prädiktiven Faktor für das Outcome zu definieren.

Dabei wurde in einem ersten Schritt mit Hilfe von IgA-, IgG-, und IgM-Färbungen der periglomeruläre und der tubulointerstitielle Raum getrennt voneinander betrachtet und die relative Dichte von Plasmazellen berechnet. In einem zweiten Schritt wurde dann das Plasmazellinfiltrat im Verhältnis zur glomerulären Schädigung und zur Nierenfunktion, dargestellt durch die GFR, untersucht, um zu ergründen, wie sich die Plasmazelldichte in den jeweiligen Schädigungsgraden darstellt und ob sie sich damit als prädiktiver Faktor eignet. Quasi in allen Stadien war die IgG-Plasmazelldichte die Höchste. Die Daten zeigen, dass Plasmazellen schon in frühen Schädigungsstadien zu finden sind und sich die Dichte der Zellen mit zunehmender Schädigung im periglomerulären Raum erhöht. Am höchsten ist sie dort, wo es aufgrund eines starken Entzündungsgeschehens zur Ruptur der Kapsel kam. Ebenfalls sehr hoch stellt sie sich bei Patienten dar, die im Verlauf versterben oder eine terminale Niereninsuffizienz ausbilden. In einem dritten und letzten Schritt wurden Rebiopsate nach dem beschriebenen Schema untersucht, um Aussagen über die bei der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis häufig auftretenden Rezidiverkrankungen zu treffen. Dabei zeigt sich, dass bei Patienten mit einem Rezidiv die Plasmazelldichte in Relation zur Dichte in den Initialbiopsien signifikant erhöht ist.

Somit zeigt diese Arbeit, dass sich ein erhöhtes intrarenales Plasmazellinfiltrat negativ auf das Outcome der Patienten auszuwirken scheint.

Summary

In ANCA-associated vasculitis, renal involvement is a severe complication with great impact on morbidity and mortality of patients. The aim of this study was to determine the influence of intrarenal plasma cells on the local inflammation. We examined renal biopsies of patients with ANCA-associated glomerulonephritis investigating the plasma cell infiltration for a clinical correlation. The first step was to examine the periglomerular and the tubulointerstitial areas separately using IgA-, IgG- and IgM-staining. Then, we analyzed the plasma cell infiltration in relation to the glomerular damage and the renal function (measured as eGFR). The IgG-concentration was the highest. The highest density of intrarenal plasma cells was found in renal biopsies with a rupture of the Bowman's capsule. The plasma cell density was associated with the clinical outcome. Patients developing end stage renal disease had a higher density of plasma cells in their biopsy. Biopsies of patients who died during follow up showed a higher density of plasma cells than biopsies of patients who survived. Therefore, the plasma cell infiltration seems to be an element of the acute inflammation correlating with worse outcome. Finally, re-biopsies were examined. It appeared that the renal plasma cell concentration in patients with a relapse was increased in relation to the concentration of their initial biopsies. Hence, the data shows that an increased intrarenal infiltration of plasma cells is associated with a poor outcome in these patients. The density of intrarenal plasma cells could therefore be a useful predictor of renal insufficiency, relapse and mortality in these patients.

6 Abkürzungsverzeichnis

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitis
AK	Antikörper
APAAP	Alkaline Phosphatase – Anti-Alkaline Phosphatase
BSR	The British Society for Rheumatology
BHPR	British Health Professionals in Rheumatology
CD20	Cluster of Differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CXCR3/CXCR4	C-X-C - Motiv Chemokinrezeptor 3 bzw. 4
CXCL (9, 10, 11)	C-X-C - Motiv Ligand 9, 10 bzw. 11
EGPA	Eosinophilen granulomatösen Polyangiitis
et al	Lateinisch et alii / et aliae, zu Deutsch: und andere
etc	Lateinisch et cetera, zu Deutsch: und so weiter
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
ggf	Gegebenenfalls
GN	Glomerulonephritis
GPA	Granulomatosis mit Polyangiitis
HCL	Salzsäure
IFN- γ	Interferon Gamma
IgA	Immunglobulin A

IgM	Immunglobulin M
IS	Immunsuppression
LAMP-2	Lysosomal-assoziiertes Membranprotein 2
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MPGN	Membranproliferative Glomerulonephritis
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
ns	Nicht signifikant
PC	Plasmazelle
PR3	Proteinase 3
RPGN	Rapid progrediente Glomerulonephritis
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannte(n)
Th1-Zellen	T-Helfer-Zellen Gruppe 1

7 **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abbildung 1A: Definition des Glomerulus und des periglomerulären Raumes</i>	<i>Seite 16</i>
<i>Abbildung 1B: Kapselruptur aufgrund von massiven entzündlichen Effekten</i>	<i>Seite 16</i>
<i>Abbildung 2: Beispiele typischer mikroskopischer Bilder in den Immunglobulin-Färbungen</i>	<i>Seite 17</i>
<i>Abbildung 3: Vergleich der Plasmazelldichte in normalen und geschädigten Glomeruli</i>	<i>Seite 18</i>
<i>Abbildung 4: Vergleich der periglomerulären und tubulointerstitiellen Plasmazelldichte</i>	<i>Seite 18</i>
<i>Abbildung 5A: Plasmazelldichte in den Subgruppen der ANCA-Vaskulitis</i>	<i>Seite 18</i>
<i>Abbildung 5B: Vergleich der Plasmazelldichte zwischen beiden Geschlechtern</i>	<i>Seite 18</i>
<i>Abbildung 6: Plasmazelldichte in Biopsien von Patienten, die vor der Biopsie bereits eine Immunsuppression erhalten hatten und diejenigen Patienten, bei denen vor der Biopsie noch keine IS initiiert worden war</i>	<i>Seite 18</i>
<i>Abbildung 7: Plasmazelldichte in Korrelation zum Vorhandensein von Fibrinpräzipitaten</i>	<i>Seite 19</i>
<i>Abbildung 8: Vergleich der Plasmazelldichte im Verlauf der glomerulären Schädigung</i>	<i>Seite 20</i>
<i>Abbildung 9: Vergleich der Plasmazelldichte bei Glomeruli mit und ohne Kapselruptur</i>	<i>Seite 20</i>
<i>Abbildung 10: Vergleich der Dichte von IgM- und IgG-Plasmazellen in den verschiedenen Schädigungsgraden</i>	<i>Seite 20</i>

<i>Abbildung 11A: Die Plasmazelldichte korrelierte negativ mit der GFR zum Zeitpunkt der Biopsie</i>	<i>Seite 21</i>
<i>Abbildung 11B: Die Plasmazelldichte korrelierte negativ mit der GFR im Follow-up</i>	<i>Seite 21</i>
<i>Abbildung 12: Vergleich der Plasmazelldichte aller dialysepflichtigen und nicht dialysepflichtigen Patienten</i>	<i>Seite 22</i>
<i>Abbildung 13: Vergleich der Plasmazelldichte bei Patienten mit kompensierter Nierenfunktion und Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz</i>	<i>Seite 22</i>
<i>Abbildung 14: Vergleich der Plasmazelldichte der verstorbenen Patienten mit den nicht-verstorbenen</i>	<i>Seite 22</i>
<i>Abbildung 15A: Absolute Plasmazelldichte in Rebiopsien von Patienten mit einem Rezidiv und ohne ein Rezidiv</i>	<i>Seite 24</i>
<i>Abbildung 15B: Relative Plasmazelldichte im Vergleich zur Initialbiopsie von Patienten mit einem Rezidiv und ohne ein Rezidiv</i>	<i>Seite 24</i>
<i>Abbildung 16: Prozentualer Anteil von IgG4+ -Plasmazellen in Korrelation zur GFR</i>	<i>Seite 24</i>

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	<i>Auflistung der verwendeten Chemikalien für die Immunglobulinfärbungen</i>	<i>Seite 11</i>
<i>Tabelle 2:</i>	<i>Auflistung der verwendeten Chemikalien für die Neufuchsin-Lösung</i>	<i>Seite 12</i>
<i>Tabelle 3:</i>	<i>Basischarakteristika des Patientenkollektivs</i>	<i>Seite 15</i>
<i>Tabelle 4:</i>	<i>Therapie und Outcome der Patienten</i>	<i>Seite 16</i>

9 Literaturverzeichnis

1. Alscher D, Kettritz R, Krumme B (2008). Histologische Grundmuster glomerulärer Läsionen. In: Kuhlmann U (Hg.), Walb D (Hg.), Böhler J (Hg.). Nephrologie. 5. Überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme Verlagsgruppe.
2. Bannwarth H, Kremer BP, Schulz A (2013). Optik. In: Bannwarth H, Kremer BP, Schulz A. Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie: Vom Atom bis zur Atmung – für Biologen, Mediziner und Pharmazeuten. 3. erweiterte und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
3. Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, et al. Histopathologic Classification of ANCA-Associated Glomerulonephritis. *JASN* 2010; 21: 1628-1636.
4. Berden AE, Jones RB, Erasmus DD. Tubular Lesions Predict Renal Outcome in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Glomerulonephritis after Rituximab Therapy. *J Am Soc Nephrol* 2012a; 23:313-321.
5. Berden AE, Luqmani R, Jayne D, et al. Diagnosis and management of ANCA associated vasculitis. *BMJ* 2012b; 344:e26.
6. Bontscho J, Schreiber A, Manz RA, et al. Myeloperoxidase-Specific Plasma Cell Depletion by Bortezomib Protects from Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies-Induced Glomerulonephritis. *JASN* 2011; 22: 336-348.
7. Brix SR, Stege G, Disteldorf E, et al. CC Chemokine Ligand 18 in ANCA-Associated Crescentic GN. *JASN* 2015; 26: 2105-2117.
8. Brix SR, Noriega M, Herden EM, et al. Organisation of lymphocytic infiltrates in ANCA-associated glomerulonephritis. *Histopathology* 2018; doi: 10.1111/his.13487.
9. Cortazar FB, Pendergraft WF 3rd, Wenger J et al. The effect of continuous B cell depletion with rituximab on pathogenic autoantibodies and total IgG levels in ANCA vasculitis. *Arthritis Rheumatol.* 2016; doi: 10.1002/art. 40032.
10. Day CJ, Howie AJ, Nightingale P. Prediction of ESRD in Pauci-immune Necrotizing Glomerulonephritis: Quantitative Histomorphometric Assessment and Serum Creatinine. *Am J Kidney Dis* 2010; 55:250-258.

11. Dice JF. Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy* 2007; 3:295-299.
12. Eskelinen EL, Cuervo AM, Taylor MR. Unifying Nomenclature for the Isoforms of the Lysosomal Membrane Protein LAMP-2. *Traffic* 2005; 6:1058-1061.
13. Espeli M, Bökers S, Giannico G, et al. Local Renal Autoantibody Production in Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 296-305.
14. Falk RJ, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 1988; 318(25):1651-1657.
15. Falk RJ, Jennette JC. ANCA Disease: Where Is This Field Heading? *JASN* 2010; 21: 745-752.
16. Flossmann O, Berden A, de Groot K. Long-term patient survival in ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:488-494.
17. Fritsche O (2013). Linsenaugen sehen schärfer. In: Fritsche O. *Physik für Biologen und Mediziner*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
18. Furuta S, Jayne DR. Antineutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis: recent developments. *Kidney Int* 2013; 2:244-249.
19. Gough NR, Fambrough DM. Different Steady State Subcellular Distributions of the Three Splice Variants of Lysosome-associated Membrane Protein LAMP-2 Are Determined Largely by the COOH-terminal Amino Acid Residue. *Journal of Cell Biology* 1997; 137:1161-1169.
20. Guillevin L, Pagnoux C, Karras A et al. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*. 2014; 371(19): 1771-1780.
21. Hauser AE, Debes GF, Arce S, et al. Chemotactic Responsiveness Toward Ligands for CXCR3 and CXCR4 Is Regulated on Plasma Blasts During the Time Course of a Memory Immune Response. *J Immunol* 2002; 169: 1277-1282.
22. Herold G., Kindler J, Krone W et al. *Nephrologie*. In: Herold G, Erdmann E, Krone W et al. *Innere Medizin* 2012, im Eigenverlag.
23. Hiepe F, Dörner T, Hauser AE. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011; 7: 170-178.

24. Hiepe F, Radbruch A. Plasma cells as an innovative target in autoimmune disease with renal manifestations. *Nat Rev Nephrol.* 2016; 12(4):232-240.
25. Hosomi S, Oshitani N, Kamata N. Increased numbers of immature plasma cells in peripheral blood specifically overexpress chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 in patients with ulcerative colitis. *Clinical and Experimental Immunology* 2010; 163: 215-224.
26. Hoyer BF, Manz RA, Radbruch A, et al. Long-Lived Plasma Cells and Their Contribution to Autoimmunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2005; 1050: 124-133.
27. Jennette JC, Falk RJ, Gasim AH. Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20:263-270.
28. Kain R, Exner M, Brandes R. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* 2008; 10:1088-1096.
29. Kain R, Tadema H, McKinney EF. High prevalence of autoantibodies to hLAMP-2 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2012; 3:556-566.
30. Kallenberg CGM. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitides. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 59-63.
31. Lionaki S, Hogan SL, Jennette CE. The clinical course of ANCA small vessel vasculitis on chronic dialysis. *Kidney Int* 2009; 76:644-651.
32. Miloslavsky EM, Specks U, Merkel PA et al. Clinical outcomes of remission induction therapy for severe antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2013; 65(9).2441-2449.
33. Miloslavsky EM, Specks U, Merkel PA et al. Rituximab for the treatment of relapses in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(11):3151-3159.
34. Morgen MD, Harper L, Williams J. Anti-Neutrophil Cytoplasm-Associated Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:1224-1234.
35. Muehlinghaus G, Cigliano L, Huehn S, et al. Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood* 2005; 105: 3965-3971.

36. Müller A, Voswinkel J, Gottschlich S. Human Proteinase 3 (PR3) and Its Binding Molecules – Implications for Inflammatory and PR3-Related Autoimmune Responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1109:84-92.
37. Neubert K, Meister S, Weisel F, et al. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med.* 2008; 14(7):748-755.
38. Novick D, Rubinstein M, Azam T. Proteinase 3 is an IL-32 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:3316-3321.
39. Novikov P, Moiseev S, Bulanov N et al. Bortezomib in refractory ANCA-associated vasculitis: a new option? *Ann Rheum Dis.* 2016; 75(1):e9.
40. Ntatsaki E, Carruthers D, Chakravarty K et al. BSR and BHPR guideline for the management of adults with ANCA-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford).* 2014; 53(12):2306-2309.
41. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM et al. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(3):160-171.
42. Pallan L, Savage CO, Harper L. ANCA-associated vasculitis: from bench research to novel treatments. *Nat. Rev. Nephrol.* 2009; 5: 278-286.
43. Pendergraft WF 3rd, Cortazar FB, Wenger J et al. Long-term maintenance therapy using rituximab-induced continuous B-cell depletion in patients with ANCA vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9(4):736-744.
44. Phares TW, Stohlmann SA, Hinton DR, et al. Astrocyte-Derived CXCL10 Drives Accumulation of Antibody-Secreting Cells in the Central Nervous System during Viral Encephalomyelitis. *J. Virol.* 2013; 87: 3382-3388.
45. Popa ER, Stegeman CA, Bos NA. Differential B- and T-cell activation in Wegener's granulomatosis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:885-894.
46. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature Reviews* 2006; 6: 741-750.
47. Rote Liste® Service GmbH (Hg.), Rote Liste Stand 2016. [Online im Internet.] URL: <http://online.rote-liste.de>.

48. Sawada R, Lowe JB, Fukuda M. E-selectin-dependent Adhesion Efficiency of Colonic Carcinoma Cells Is Increased by Genetic Manipulation of Their Cell Surface Lysosomal Membrane Glycoprotein-1 Expression Levels. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268:12675-12681.
49. Schreiber A, Choi M, Kettritz R. ANCA-assoziierte Vaskulitiden – Neuere Aspekte der Entstehung. *Der Nephrologe* 2012; 7: 1-5.
50. Sinico RA, di Toma L, Radice A. Renal involvement in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody associated vasculitis. *Autoimmunity Reviews* 2013; 12:477-482.
51. Specks U, Merkel PA, Seo P et al. Efficacy of remission-induction regimens for ANCA-associated vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(5):417-427.
52. Steinmetz OM, Velden J, Kneissler U et al. Analysis and Classification of B-cell infiltrates in lupus and ANCA-associated nephritis. *JASN* 2008; 74:448-457.
53. Stone JH, Merkel PA, Spiera R et al. Rituximab versus Cyclophosphamide for ANCA-Associated Vasculitis. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(3):221-232.
54. Weidner S, Geuss S, Hafezi-Rachti S. ANCA-associated vasculitis with renal involvement: an outcome analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1403-1411.
55. Yates M, Watts RA, Bajema IM et al. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75(9):1583-1594.
56. Zhou D, Li P, Lin Y. Lamp-2a Facilitates MHC Class II Presentation of Cytoplasmic Antigens. *Immunity* 2005; 22: 571-581.

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter, Direktor des Instituts für Pathologie mit den Sektionen Molekularpathologie und Zytopathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf für die Zustimmung zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seinem Institut.

Zudem danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. T. Wiech für die gute Unterstützung insbesondere bei der praktischen Bearbeitung des Themas.

Besonders bedanken möchte ich mich aber auch bei Fr. Dr. med. S. Brix für die lange und gute Begleitung, die wertvollen Ratschläge und die hilfreiche Kritik.

Ein ganz großer Dank geht auch an meine Eltern und meinen Bruder Matthias, ihr seid immer für mich da, wenn ich euch brauche und ohne euch hätte ich es nicht geschafft! Euch dreien und meiner Studienkollegin und guten Freundin Amelie außerdem Dank für das geduldige Korrekturlesen.

11 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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: