

Aus der Medizinischen Klinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

---

**Expression von rekombinanten Antigenen zur  
Untersuchung der Autoantikörperspezifität bei  
Goodpasture Syndrom**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Constance Angela Huyke  
aus Erfurt

Würzburg, im Juli 2004

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Kai-Olaf Netzer

Koreferent: Prof. Dr. med. C. Wanner

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 2005

Die Promovendin ist Ärztin.

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	EPIDEMIOLOGIE .....	1
1.2	KLINISCHER VERLAUF .....	2
1.3	THERAPEUTISCHE OPTIONEN .....	2
1.4	PATHOGENESE - AUFBAU DES GOODPASTURE-ANTIGENS .....	3
1.5	PATHOGENESE DES GOODPASTURE-SYNDROMS - ROLLE DER B-ZELLEN .....	8
1.6	PATHOGENESE DES GOODPASTURE-SYNDROMS – ROLLE DER T-ZELLEN.....	9
1.7	GOODPASTURE UND ANDERE FORMEN DES RENOPULMONALEN SYNDROMS....	11
1.8	FRAGESTELLUNG .....	12
<b>2</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>13</b>
2.1	TRANSFORMATION .....	13
2.2	TRANSFEKTION.....	15
2.3	AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE.....	16
2.4	WESTERN BLOT .....	18
2.4.1	<i>Gelelektrophorese</i> .....	18
2.4.2	<i>Western Blot</i> .....	19
2.4.3	<i>Detektion</i> .....	20
2.5	PROTEINFÄRBUNG .....	21
2.6	PATIENTENSEREN .....	21
2.7	MATERIAL .....	22
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>26</b>
3.1	ANTI-GBM-SEREN REAGIEREN UNTERSCHIEDLICH MIT DEN CHIMÄREN.....	26
3.1.1	<i>Gruppe 1: C2 &gt; C6</i> .....	29
3.1.2	<i>Gruppe 2: C2 &lt; C6 &lt;&lt; C2.6</i> .....	29
3.1.3	<i>Gruppe 3: C2 &lt; C6 = C2.6</i> .....	31
3.2	ANTI-GBM-AUTOANTIKÖRPER BEI VASKULITIS-PATIENTEN ERFASSEN ANDERE EPITOPE.....	32
3.3	AUSWERTUNG DER PATIENTENDATEN .....	33
3.3.1	<i>Patientenseren mit Anti-GBM-Antikörpern</i> .....	33
3.3.1.1	<i>Allgemeine klinische Angaben</i> .....	33

3.3.1.2	Therapie und Outcome .....	34
3.3.2	<i>Patienten mit Vaskulitis</i> .....	36
3.3.2.1	Allgemeine klinische Angaben.....	36
3.3.2.2	Therapie und Outcome .....	37
3.3.3	<i>Keine Korrelation zwischen Reaktivität der Autoantikörper und klinischem Befallsmuster</i> .....	38
3.3.4	<i>Die Nierenfunktion eines Patienten am Therapieende korreliert nicht mit unterschiedlichen Antikörperpopulationen</i> .....	39
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>44</b>
4.1	FEINSPEZIFITÄT DER AUTOANTIKÖRPER.....	44
4.2	REAKTION DER ANTI-GBM-ANTIKÖRPER BEI VASKULITIS-PATIENTEN.....	49
4.3	KEINE KORRELATION ZWISCHEN OUTCOME UND AUTOANTIKÖRPER-SPEZIFITÄT BEI GOODPASTURE SYNDROM .....	47
4.4	KEINE KORRELATION ZWISCHEN AUTOANTIKÖRPERSPEZIFITÄT UND KLINISCHEM BEFALLSMUSTER.....	49
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>55</b>

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen:

Abb. 1 Schematische Illustration der supramolekularen Netzwerkbildung von Typ IV-Kollagen (Sundaramoorthy et al, 2002a).....	5
Abb. 2 Lineare Ablagerungen von IgG in der glomerulären Basalmembran bei Goodpasture-Syndrom (Nizze & Böcker, 1997).....	8
Abb. 3 Schematische Darstellung der $\alpha 1/\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Chimären. Die weißen Kreise entsprechen den $\alpha 1$ -Resten, die schwarzen Kreise den ersetzten Abschnitten aus $\alpha 3$ . Disulfidbrücken sind durch kurze Linien dargestellt (Netzer et al, 1999h) .....	13
Abb. 4 Versuchsaufbau Affinitätschromatographie. [1] Säule mit ANTI-FLAG®M2 AFFINITY GEL, [2] darüber geschichteter Zellkulturüberstand, [3] aufzureinigender Zellkulturüberstand (400 ml), [4] Eluat, [5] „Auslaufschutz“ mit TBS-Puffer pH 7,4; [6] Silikonschläuche, bei den Waschsritten wurde das System geöffnet, [7] Haltevorrichtung .....	17
Abb. 5 Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern 1: 500 entwickelt. Dieser reagiert gleich stark mit $\alpha 3$ , $\alpha 1$ und den Chimären.....	20
Abb. 6 Serum GP AH aus der Gruppe 3 als repräsentatives Beispiel für die Reaktion $\text{C2} < \text{C6} = \text{C2.6}$ .....	26
Abb. 7 Verschiedene Reaktionsmuster gegenüber den Chimären. Gruppe 1: $\text{C2} > \text{C6}$ ; Gruppe 2: $\text{C2} < \text{C6} \ll \text{C2.6}$ ; Gruppe 3: $\text{C2} < \text{C6} = \text{C2.6}$ .....	27
Abb. 8 Reaktivität der Seren der Gruppe 1: $\text{C2} > \text{C6}$ .....	28
Abb. 9 Reaktivität der Gruppe 2: $\text{C2} < \text{C6} \ll \text{C2.6}$ .....	28
Abb. 10 Reaktivität der Gruppe 3: $\text{C2} < \text{C6} = \text{C2.6}$ .....	29
Abb. 11 Verschiedene Verdünnungen von GP H11 .....	30
Abb. 12 Proteinfärbung mit Coomassie-Blau. Eine Gleichverteilung von Protein der Spuren $\alpha 3$ bis C6 ist erkennbar.....	31
Abb. 13 Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern 1: 500 entwickelt. Gleich starke Reaktion mit $\alpha 3$ , $\alpha 1$ und den Chimären, da der Antikörper gegen das bei allen vorhandene Flag-Epitop gerichtet ist. Dies deutet auf eine gleichmässige Verteilung der Proteinmenge hin.....	31

Abb. 14	Reaktivität der Vaskulitis-Seren mit den Goodpasture-Epitopen.....	32
Abb. 15	Vergleich der Autoantikörper - Reaktivität und dem klinischen Befallsmuster: Gruppe 1 (n=2), Gruppe 2 (n=7) und Gruppe 3 (n=5). Deutlich erkennbar ist die relative Gleichverteilung von rein renalem und kombiniert pulmorenalem Befall bei den Gruppen 2 und 3 .....	38
Abb. 16	Vergleich der Autoantikörper - Reaktivität und der Nierenfunktion (Outcome) am Therapieende: Gruppe 1 (n=2), Gruppe 2 (n=7), Gruppe 3 (n=5). Gut erkennbar die ähnliche Verteilung von Nieren gesunden, Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und Dialysepatienten bei den Gruppen 2 und 3. ....	40
Abb. 17	Häufigkeit verschiedener Antikörpertiterhöhen je nach Outcome .....	41
Abb. 18	Vergleich der Sequenzen von $\alpha 3$ und $\alpha 1$ . Die differierenden Aminosäuren sind in Clustern gelegen und beinhalten auch die Bindungsorte für die Anti-GBM- Autoantikörper (Netzer, 1999) .....	46
Abb. 19	Darstellung des Goodpasture-Epitops. Die Abschnitte $E_A$ und $E_B$ liegen in räumlicher Nähe zueinander im Inneren des Moleküls an der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten. Die Autoantikörper binden an den Regionen $E_A$ , $E_B$ oder $E_{AB}$ (Borza et al, 2000e; Borza et al, 2002f).....	47
Tab. 1	Eingesetzte Materialien und Herstellernachweis .....	22
Tab. 2	Symptome bei Diagnosestellung bei Goodpasture-Patienten .....	34
Tab. 3	Outcome hinsichtlich klinischer und serologischer Daten.....	35
Tab. 4	Symptome bei Diagnosestellung bei Vaskulitis-Patienten.....	37
Tab. 5	Übersicht über klinische und serologische Daten aller Patienten .....	42

## Verzeichnis der Abkürzungen:

GBM	<b>G</b> lomeruläre <b>B</b> asalmembran
KG	<b>K</b> örpergewicht
ANCA	<b>A</b> nti-Neutrophile <b>C</b> ytoplasmatische <b>A</b> ntikörper
C-ANCA	<b>c</b> ytoplasmatic staining ANCA
P-ANCA	<b>p</b> erinuclear staining ANCA
C-Terminus	<b>C</b> arboxy-Terminus
N-Terminus	<b>A</b> mino-Terminus
NC	<b>n</b> ichtcollagen
RPGN	<b>r</b> apid <b>p</b> rogressive <b>G</b> lomerulonephritis
HLA	<b>h</b> uman <b>l</b> eucocyte <b>a</b> ntigen
MHC	<b>m</b> ajor <b>h</b> istocompatibility <b>c</b> omplex
CD	<b>c</b> luster of <b>d</b> ifferentiation
SLE	<b>s</b> ystemischer <b>L</b> upus <b>e</b> rythematodes
MPO	<b>M</b> yeloperoxidase
C2, C2.6, C6	<b>C</b> himäre <b>2, 2.6, 6</b>
CNI	<b>c</b> hronische <b>N</b> iereninsuffizienz
AK	<b>A</b> utoantikörper
OD	<b>O</b> ptische <b>D</b> ichte
NF	<b>N</b> ierenfunktion

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Das Goodpasture-Syndrom ist seit fast 90 Jahren bekannt. Der Pathologe Ernest W. Goodpasture beschrieb 1919 erstmals zwei Fälle mit auffälligem Lungenbefund (hyaline Membranen in den Alveolen bei fehlendem mikrobiellen Befund). Beide Patienten waren an der Influenza-Pandemie verstorben. Einer der beiden zeigte auch Zeichen einer Systemerkrankung mit renaler Beteiligung (Salama et al, 2001b). Heute versteht man darunter folgende Symptom-Trias: Eine rapid progrediente Glomerulonephritis, die in der Biopsie die meisten Glomeruli erfasst, begleitet von Lungenblutungen, sowie das Vorhandensein von Anti-GBM-Autoantikörpern (Lerner et al, 1967), (Wilson & Dixon, 1973). Neben der klassischen Form mit Nieren- und Lungenbeteiligung existieren auch Verläufe mit alleinigem Nieren- (35 %) oder Lungenbefall ( $\leq 5$  %) (Netzer et al, 1998a; Turner, 2001). Das Goodpasture-Syndrom ist selten, die Inzidenz beträgt nur 0,5-1 Fall pro Millionen Einwohner und Jahr in Großbritannien (Turner & Rees, 1991), in der asiatischen und afrikanischen Bevölkerung sogar noch weniger. Betrachtet man alle Fälle mit rapid progredienter Glomerulonephritis, ist das Goodpasture-Syndrom bei 20 % die Ursache (Couser, 1988), bei allen Glomerulonephritis-Fällen liegt die Häufigkeit bei 1-3 % (Wilson & Dixon, 1974). Die Erkrankung kann prinzipiell in jeder Altersklasse auftreten, Häufigkeitsgipfel finden sich in der Gruppe der 20-30jährigen sowie bei den 50-65jährigen. Die Ursache des Goodpasture-Syndroms ist unbekannt. Jedoch scheint ein Zusammenhang mit der Inhalation von toxischen Dämpfen wie Benzin oder intermittierenden viralen (Daly et al, 1996) oder bakteriellen Atemwegsinfekten (Rees et al, 1977) zu bestehen. Die meisten Patienten erleiden nur einen Schub der Erkrankung, in seltenen Fällen kommt es zu Rückfällen bis zu Jahren nach der Erstdiagnose. Diese stehen oft in Zusammenhang mit fortgesetztem Rauchen (Levy et al, 1996).



## 1.2 Klinischer Verlauf

Die Initialsymptome weisen in keine spezifische Richtung, grippeähnliche Symptome mit Fieber, Schwäche und Müdigkeit treten auf (Merkel et al, 1994). Oftmals geht der Lungenbefall dem Nierenbefall um Wochen bis Monate voraus (Briggs et al, 1979). Das Spektrum des pulmonalen Befalls reicht von unproduktivem Husten und geringer Kurzatmigkeit bis zu schwersten Hämorrhagien, die zur Beatmungspflichtigkeit führen. Hämoptysen allein sind zur Einschätzung der Schwere der Lungenblutungen unzureichend (Turner, 2001). Zur Sicherung bedarf es auf jeden Fall der radiologischen Diagnostik. Fleckige oder diffuse alveoläre Verschattungen auf der Thoraxaufnahme sind ein häufiges Bild (Saxena et al, 1995). Schwere Blutungen können zur transfusionspflichtigen Anämie führen.

Der Nierenbefall äußert sich klinisch später, vor allem bei isoliertem Befall. Anfangs bestehen oft Hämaturie und Proteinurie. Das Serumkreatinin ist häufig erhöht und dient als Ausdruck für die beginnende Niereninsuffizienz. Daneben gilt es auch als prognostischer Marker für das Wiedererlangen der Nierenfunktion (Merkel et al, 1994). Hypertonie als Frühsymptom ist ungewöhnlich, sie tritt meist nur im Rahmen des Nierenversagens auf (Salama et al, 2001b). Im Verlauf kann die Nierenfunktion bedingt durch die rapid progrediente Glomerulonephritis innerhalb von Tagen verloren gehen. Ein rasches therapeutisches Eingreifen ist daher geboten.

## 1.3 Therapeutische Optionen

Unbehandelte Patienten erlangen nur zu einem kleinen Prozentsatz die Nierenfunktion wieder, während die Mehrheit eine bleibende Niereninsuffizienz entwickelt. Auch besteht eine erhöhte Mortalität insbesondere an pulmonalen Blutungen. Diese Tatsache lässt sich durch ältere Publikationen belegen (Benoit et al, 1964).

Der Krankheitsverlauf ließ sich durch die Einführung einer Kombinationstherapie aus Immunsuppressiva und Plasmapherese in den 1970er Jahren erheblich verbessern (Peters et al, 1982; Lockwood et al, 1977), sowohl in Hinsicht auf Lungen-Hämorrhagien, eine stabilere Nierenfunktion und eine höhere Überlebensrate. Dieser Therapieansatz hat bis heute seine Gültigkeit bewahrt. Der alleinige Einsatz von Glucocorticoiden hatte sich nicht bewährt, da die Steroide zwar die Lungenblutungen

stoppen konnten, jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung der Nierenfunktion hatten (Benoit et al, 1964).

Das am häufigsten eingesetzte Protokoll besteht aus Prednisolon in einer Dosierung von 1-2 mg/kg KG und Tag, Cyclophosphamid in einer Dosierung von 2-3 mg/kg KG und Tag und so vielen Plasmapheresen, bis die Anti-GBM-Autoantikörper nicht mehr nachweisbar sind (Merkel et al, 1998). Trotzdem wird bei Patienten mit einem Serumkreatinin von  $\geq 500 \mu\text{mol/l}$  nur selten eine Erholung der Nierenfunktion beobachtet (Merkel et al, 1994; Herody et al, 1993). Deshalb ist eine frühzeitige Therapieeinleitung von essentieller Bedeutung. Die Dauer der Therapie beträgt in der Regel 6-9 Monate, bis mindestens 3 Monate nach Verschwinden der Antikörper.

Patienten, die bereits bei Diagnosestellung ein irreversibles Nierenversagen haben, ohne dass es je zu Lungenblutungen gekommen ist, können unbehandelt bleiben, da die Nebenwirkungen der Behandlung dann überwiegen. Hier zu nennen wäre vor allem das Infektionsrisiko als allgemeine unerwünschte Wirkung bei jeder Immunsuppression.

Eine spätere Nierentransplantation kann meist unproblematisch durchgeführt werden, wenn zwischen dem Zeitpunkt der letzten Antikörper-Produktion und der Transplantation 9-12 Monate liegen (Netzer et al, 1998a).

#### **1.4 Pathogenese - Aufbau des Goodpasture-Antigens**

In allen tierischen Organismen treten Basalmembranen auf. Sie bilden eine Form von spezialisierter Extrazellulärsubstanz, die in sehr vielen Körpergeweben vorkommt. Basalmembranen liegen unter Epi- und Endothelien, umgeben Muskel-, Fett- und Nervenzellen. Basalmembranen spielen eine wichtige Rolle für die strukturelle Unterstützung von Geweben und die Bildung von Kompartimenten, sie haben Filterfunktion für Makromoleküle und sie können das Wachstum, die Differenzierung und die Migration von Zellen beeinflussen (Junqueira & Carneiro, 1996). Sie sind bis zu  $1 \mu\text{m}$  dick und haben einen vierschichtigen Aufbau: Lamina rara externa, Lamina densa, Lamina rara interna, Lamina fibroreticularis. In Glomerulum und Lungenalveolen fehlt die Lamina fibroreticularis. Die einzelnen Bestandteile werden von den umliegenden Zellen aus Epi- bzw. Endothel sowie aus mesenchymalen Zellen synthetisiert. Es existieren vier Hauptkomponenten: Glykoproteine wie Typ IV-Kollagen, Laminin und Entactin sowie Proteoglykane wie Heparansulfat (Timpl, 1989). Die einzelnen

molekularen Bausteine (Protomere) lagern sich zu einem großen irregulären Netzwerk zusammen (Timpl & Brown, 1996).

Kollagen Typ IV gehört zu der großen Familie der Kollagene mit über 20 Subtypen, die alle eine strukturelle Besonderheit aufweisen: die Tripelhelix (Myllyharju & Kivirikko, 2001). Drei helikale Polypeptidketten ( $\alpha$ -Ketten) aus über 1000 Aminosäureresten treten dabei zusammen. Dabei müssen die  $\alpha$ -Ketten nicht homolog sein. Für die Stabilität der Tripelhelix sorgen zahlreiche Glycinreste (Wiederholungssequenz Gly-X-Y). Am C- und N-Terminus wird das Molekül von globulären (nichtkollagenen) Domänen flankiert.

Sechs homologe, genetisch aber verschiedene  $\alpha$ -Ketten sind bei Kollagen Typ IV bekannt ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ) (Zhou & Reeders, 1996). Aus evolutionsbiologischer Sicht kann man diese in zwei Gruppen einteilen:  $\alpha 1$ -artige ( $\alpha 1, \alpha 3, \alpha 5$ ) und  $\alpha 2$ -artige ( $\alpha 2, \alpha 4, \alpha 6$ ), wovon  $\alpha 3$  und  $\alpha 4$  die Ältesten zu sein scheinen (Netzer et al, 1998b). Die verschiedenen  $\alpha$ -Ketten sind sehr variabel über die Gewebe verteilt. Die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Kette kommt ubiquitär in allen Basalmembranen vor (Hudson et al, 1993b) und nimmt den Löwenanteil des Kollagen Typ IV ein.  $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$  und  $\alpha 6$  haben eine restriktivere Verteilung.

Die  $\alpha 3$ -Kette, die für die Pathogenese des Goodpasture-Syndroms entscheidend ist, kommt zumeist im Glomerulum und in den Tubuli semniferi vor, daneben auch in Lunge, Auge, Innenohr und Plexus choroideus (Hudson et al, 1993b; Kahsai et al, 1997). Basalmembranen von Plazenta, Leber oder Haut enthalten hingegen kaum  $\alpha 3$  (Kashtan & Michael, 1996).

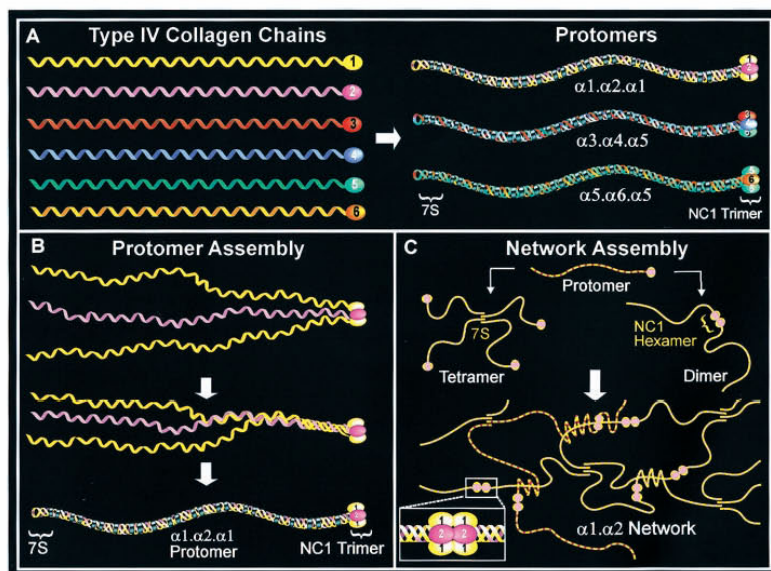
In der Niere ließ sich durch immunhistochemische Studien folgende Verteilung ermitteln: die glomeruläre Basalmembran enthält die Ketten  $\alpha 1$ - $\alpha 5$ , die Bowman'sche Kapsel die Ketten  $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$  und  $\alpha 6$ . Im Mesangium kommen ebenfalls  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Ketten vor (Ninomiya et al, 1995; Seki et al, 1998). Die Ketten  $\alpha 3, \alpha 4$  (zusammen mit  $\alpha 5$ ) kommen ausschließlich in der glomerulären Basalmembran vor, während  $\alpha 6$  seinen Ursprung in der Bowman'schen Kapsel nimmt.

Jede Kette ist durch eine kollagene und zwei nichtkollagene Domänen charakterisiert. Der kollagene Anteil besteht aus ca. 1400 Aminosäureresten mit oben beschriebener Gly-X-Y-Sequenz. Er wird mehr als 20mal von kurzen, nichtkollagenen Abschnitten durchbrochen, wodurch eine größere Flexibilität des Gesamtmoleküls resultiert. Am N-

Terminus befindet sich die 7S-Domäne mit einer Länge von 15-20 Aminosäureresten. Der C-Terminus wird flankiert von ca. 230 Aminosäureresten der globulären NC1-Domäne (nichtkollagen) (Hudson et al, 1989; Hudson et al, 1993b; Hudson et al, 1993a). Die genaue Aminosäuresequenz der sechs Ketten ist bekannt.

Da die Tripelhelix aus 6 Ketten generiert werden kann, ergeben sich 56 mögliche Kombinationen von Monomeren (Gunwar et al, 1991a; Gunwar et al, 1991b; Hudson et al, 1993a). Einige Tumore sezernieren  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  im Verhältnis 2:1 (Wisdom, Jr. et al, 1992), daneben existieren jedoch nur wenige weitere Isoformen.

Die einzelnen tripel-helicalen Protomere treten in einem komplizierten Netzwerk zusammen (Abb. 1). Über Interaktionen am C-Terminus treten zwei Protomere durch ihre NC1-Domänen zusammen und bilden Dimere. Aufgrund der Interaktion von jeweils drei NC1-Abschnitten jedes Protomers kann man auch von einem NC1-Hexamer sprechen. Am N-Terminus bilden sich aus vier Molekülen ein Tetramer (Timpl et al, 1981; Yurchenco & Furthmayr, 1984). Di- und Hexamere lagern sich dann selbständig zu einem unregelmäßigen, maschendrahtartigen Netzwerk zusammen. Vor allem  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Ketten reagieren in der beschriebenen Weise.



**Abb. 1** Schematische Illustration der supramolekularen Netzwerkbildung von Typ IV-Kollagen (Sundaramoorthy et al, 2002)

A: Zusammenfügen der sechs verschiedenen Ketten zu Protomeren

B: Beginn dieses Vorgangs an der NC1-Domäne

C: Bildung eines Netzwerks

Daneben existiert in der glomerulären Basalmembran ein davon abweichendes  $\alpha 3/\alpha 4$ -Netzwerk, das mittels unterschiedlichen Methoden beschrieben wurde (Boutaud et al, 2000; Gunwar et al, 1998). Dieses beruht auf zusätzlichen End-zu-Seit-Verbindungen. Charakteristische Disulfidbrücken zwischen  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  geben dem Molekül eine höhere Stabilität (Gunwar et al, 1998).

Die Bowman'sche Kapsel enthält einen weiteren Netzwerk-Typus aus den Ketten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  (Borza et al, 2002), der erstmals in der Basalmembran glatter Muskelzellen beschrieben wurde (Borza et al, 2001).

Die NC1-Domäne spielt bei vielen Schritten der Netzwerkbildung eine wichtige Rolle. Zum einen initiiert die Interaktion zwischen den NC1-Domänen eines Protomers das Verdrillen der drei kollagenen Domänen zur Tripelhelix (Dolz et al, 1988). Zum anderen stellt die NC1-Domäne über Kopf-an-Kopf-Verbindungen den Kontakt zu einem anderen Protomer her wie bereits beschrieben. Daneben vermag die NC1-Domäne auch über besondere molekulare Erkennungssequenzen die Spezifität der einzelnen Ketteninteraktionen zu steuern. Dies betrifft sowohl die Kettenauswahl beim initialen Zusammenfügen der Protomere, als auch die Auswahl und Verbindung der Protomere beim Erstellen des Netzwerks (Borza et al, 2001; Boutaud et al, 2000). Die Bildung eines solchen Kollagen Typ IV-Netzwerkes ist essentiell für die Entstehung von Gewebefunktion sowie deren Erhaltung. Eine Mutation in den Ketten  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  oder  $\alpha 5$  führt zum Verlust des Netzwerks, was die pathophysiologische Grundlage des Alport-Syndroms ist (Boutaud et al, 2000) [progredienter Innenohr-Taubheit und Niereninsuffizienz (Kashtan & Michael, 1996)].

Die NC1-Domäne besteht aus zwei homologen Untereinheiten A am aminoterminalen Ende und B am carboxyterminalen Ende, die sich zu 35 % entsprechen. Lange Zeit gelang es nicht, die genaue räumliche Struktur der NC1-Domäne darzustellen (Stubbs et al, 1990). Ein Modell, basierend auf Computeranalysen und Vergleichen der Primärstruktur verschiedener NC1-Moleküle (Netzer et al, 1998b), beschrieb als Sekundärstruktur einen Kern aus 6  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen und einer  $\alpha$ -Helix mit hydrophobem Charakter. Inzwischen ist die Kristall-Struktur des  $[(\alpha 1)_2\alpha 2]_2$ -Hexamers beschrieben (Sundaramoorthy et al, 2002). Da eine hohe Übereinstimmung zwischen den 6 NC1-Domänen besteht, müssen  $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ -Hexamere eine ähnliche Struktur haben. Die oben vorgeschlagene Struktur kann hierdurch bestätigt werden. Die beiden NC1-

Trimere interagieren an der Grenzfläche nur über hydrophil-hydrophobe Anziehungs- und Abstoßungskräfte und benötigen keine zusätzlichen Disulfidbrücken.

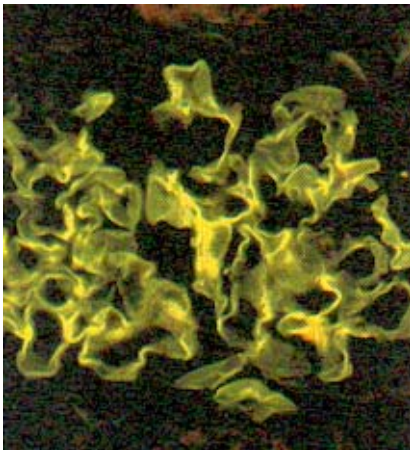
Durch die Markierung mit ketten-spezifischen Antikörpern ist inzwischen auch die räumliche Anordnung der  $\alpha 3$ -,  $\alpha 4$ - und  $\alpha 5$ -Ketten und damit der Quartärstruktur gelungen (Borza et al, 2002). Jedes Trimer besteht aus  $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ . Bei Bildung eines Hexamers treten immer die beiden  $\alpha 4$ -NC1-Domänen in Verbindung. Der Aminoterminus der Untereinheit A von  $\alpha 3$  reagiert mit dem carboxyterminalen Ende der Untereinheit B von  $\alpha 5$  (Borza et al, 2002).

Seit 1987 ist bekannt, dass das Goodpasture-Antigen auf der  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne lokalisiert ist (Butkowski et al, 1987; Saus et al, 1988). Zwei Regionen sind hierbei entscheidend:  $\text{GP}_A$  und  $\text{GP}_B$  (die Positionen 17-31 und 127-141 einnehmend; frühere Bezeichnung  $E_A$  und  $E_B$ ) (Netzer et al, 1999). Gegen diese ist 50-90 % der Autoreaktivität gerichtet. Die beiden Epitope gleichen sich stark: 7 Aminosäuren von 15 sind identisch und beide liegen an einer homologen Position auf den jeweiligen Untereinheiten. Durch Faltung des Moleküls werden sie in räumliche Nähe zueinander gebracht und bilden das diskontinuierliche Epitop  $\text{GP}_{AB}$ . Essentiell für die Struktur des Epitopes sind vier Disulfidbrücken (Abb. 3). Gehen diese durch Reduktion verloren, sinkt die Antikörperbindung rapide (Netzer et al, 1999). Die Goodpasture-Epitope haben eine kryptische Natur. Antikörper können die  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne nicht erreichen, solange diese in Hexameren assoziiert ist. Erst nach Dissoziation der Hexamere ist eine Bindung möglich (Borza et al, 2000; Wieslander et al, 1985). Da wichtige Aminosäurereste in  $\text{GP}_A$  hydrophob sind, entstand die Idee, dass die Epitope zwischen den interagierenden NC1-Domänen in Inneren des Hexamers liegen (David et al, 2001). Nach den neuen Erkenntnissen liegen die Epitope nahe der Tripelhelix, aber entfernt von der Oberfläche zwischen den Trimeren (Sundaramoorthy et al, 2002).  $\text{GP}_A$  liegt an der Grenzfläche zwischen den  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ - und  $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ -Domänen.  $\text{GP}_B$  ist an der Grenzfläche zwischen den  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ - und  $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne lokalisiert (Borza et al, 2002).

## 1.5 Pathogenese des Goodpasture-Syndroms - Rolle der B-Zellen

Das Goodpasture-Syndrom zählt zu den klassischen Autoimmunerkrankungen. Sie ist B-Zell- und antikörpervermittelt und richtet sich gegen ein spezifisches Epitop ( $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne).

Dass die Autoantikörper eine entscheidende Rolle spielen, lässt sich durch die Übertragbarkeit der Erkrankung auf Affen erhärten, denen Antikörper von Goodpasture-Patienten injiziert wurden (Lerner et al, 1967), sowie durch den therapeutischen Erfolg der Plasmapherese. Die Autoantikörper können durch die direkte Immunfluoreszenz dargestellt werden (Abb. 2). Es besteht eine pathognomonische lineare Ablagerung von IgG entlang der glomerulären und alveolären Basalmembran. Diese korreliert dem  $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$ -Kollagen-Netz, das nur dort existent ist.



**Abb. 2** Lineare Ablagerungen von IgG in der glomerulären Basalmembran bei Goodpasture-Syndrom (Nizze & Böcker, 1997)

Die Menge der zirkulierenden Autoantikörper korreliert mit dem gewebsgebundenen Anteil (Kalluri et al, 1996a). Untersuchungen mittels Affinitätschromatographie ergaben, dass es sich bei 1 % des Gesamt-IgG von Patienten mit Goodpasture-Syndrom um Autoantikörper handelt (Hellmark et al, 1997b). Die Autoantikörper sind auf alle IgG-Subklassen verteilt, den Hauptanteil nehmen IgG1 ein. Manche Patienten haben auch eine große IgG4-Fraktion (Segelmark et al, 1990).

Die Autoantikörper haben eine enge Spezifität. Trotz der großen Übereinstimmung zwischen den  $\alpha 1$ - $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ -Domänen von bis zu 83 % (Borza et al, 2002) binden

85 % der Autoantikörper exklusiv an  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ . Lediglich eine geringe Anzahl an Patienten besitzt daneben auch Antikörper gegen  $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$  und  $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$  (15 und 3 %) (Kalluri et al, 1995).

Auch der kollagene Anteil der  $\alpha 3(\text{IV})$ -Kette konnte als möglicher Sitz weiterer Epitope ausgeschlossen werden (Leinonen et al, 1999). Nicht alle der 15 Aminosäuren von  $\text{GP}_A$  und  $\text{GP}_B$  sind für die Antikörperbindung gleich entscheidend. Eine Studie ergab, dass rekombinante  $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$  mit nur 7 ersetzten Aminosäuren aus  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  ebenfalls erkannt wurden (Gunnarsson et al, 2000). Entscheidend für die Bindung von  $\text{GP}_A$  sind vier Aminosäuren: Alanin 18, Isoleucin 19, Valin 27 und Prolin 28 (David et al, 2001).

Die Pathogenese des Goodpasture-Syndroms ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es scheint durch toxische oder entzündliche Schädigung der alveolären Basalmembran (und damit zur Schädigung des Netzwerkes) zur Freisetzung des normalerweise kryptischen Antigens zu kommen, wodurch der Autoimmunprozess in Gang gesetzt wird. Es erscheint paradox, dass die Autoantikörper nun an native GBM binden können, obwohl wegen der kryptischen Natur des Antigens dieses in Hexameren assoziiert ist und somit nicht von Antikörpern erreicht werden kann. Ein Artikel (Borza et al, 2000) bietet folgenden Lösungsansatz: Auch unter physiologischen Bedingungen könnten  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Monomere existieren, die mit Hexameren ein Äquilibrium bilden. Autoantikörper binden nun die Monomere und verschieben das Gleichgewicht. Resultat ist ein Funktionsverlust.

## **1.6 Pathogenese des Goodpasture-Syndroms – Rolle der T-Zellen**

Während die Rolle der B-Zellen und der Autoantikörper beim Goodpasture-Syndrom klar beschrieben ist, ist der Einfluss der T-Zellen auf das Krankheitsgeschehen noch nicht so gut erfasst. Die B-Zell-Antwort steht unter der regulierenden Kontrolle durch die T-Zellen. Ein gestörter Kontrollmechanismus kann B-Zell-Autoimmunphänomene auslösen, was durch Berichte über die Myasthenia gravis belegt werden kann (Drachman, 1994).

Frühe Hinweise auf eine T-Zell-Beteiligung ergaben sich durch den Nachweis vermehrter T-Zellen ( $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$ ) in den Glomeruli von Patienten mit RPGN (Neale et al, 1988).



Auch die starke Assoziation von Goodpasture und HLA DR2, die 80 % der GP-Patienten aufweisen (Fisher et al, 1997), legt die große Bedeutung von T-Zellen nahe. Besonders für HLA DRB1\*15 und DRB1\*04 besteht eine hohe Empfänglichkeit für das Goodpasture Syndrom. Für HLA DRB1\*07 hingegen bestand eine negative Assoziation (Fisher et al, 1997).

Als T-Zell-Antigen wird auch die  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne erkannt. T-Zellen von Patienten proliferieren, wenn sie mit  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  inkubiert werden (Derry et al, 1995). Die Hauptpeptide, die den T-Zellen in Abhängigkeit von DR 15-Molekülen präsentiert werden, sind drei 9 Aminosäuren lange Kernsequenzen, beginnend an Position 29, 38 und 169 der  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne (Phelps et al, 1996; Phelps et al, 1998). Experimentell konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch andere Abschnitte der  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne mit der gleichen bis höheren Intensität vom DR15-Molekül gebunden werden als die natürlich bevorzugten. Diese Tatsache deutet auf die Existenz weiterer Prozessierungsfaktoren hin (Phelps et al, 1998).

Auch konnte 1996 der erste  $\text{CD8}^+$  T-Zell-Klon isoliert werden, der natürlich MHC Klasse I restringiert ist (Merkel et al, 1996).

HLA DRB1\*07 hat eine höhere Bindungsaffinität zu der  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne als HLA DRB1\*15. Demnach hat das HLA DRB1\*07-Molekül einen protektiven Effekt, weil es während der Prozessierung die von  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  stammenden Peptide abzufangen vermag, bevor diese HLA DRB1\*15 restringierte T-Zellen zu einer pathologischen Antwort stimulieren können (Phelps et al, 2000).

Das Goodpasture-Antigen wird in der Medulla des Thymus exprimiert, wo es sich in der Nähe der Hassall'schen Körperchen befindet. Der Bezug zu diesen Strukturen impliziert eine T-Zell-Apoptose und damit eine negative Selektion (Wong et al, 2001). Einige T-Zellen scheinen jedoch der Deletion zu entgehen. In der akuten Krankheitsphase steigt die Zahl der  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen stark an und fällt im Zeitverlauf wieder ab. Dies kann als Hinweis auf eine wiedergewonnene Thymus-Kontrolle interpretiert werden und damit das Ausbleiben von Rückfällen erklären (Salama et al, 2001a). Des Weiteren ist das Auftreten von  $\text{CD25}^+$  Zellen beschrieben worden, die erstmals drei Monate nach dem Ausbruch der Erkrankung auftraten und die Antwort gegen das Goodpasture-Antigen unterdrücken konnten (Salama et al, 2003). Auch das spricht für das meist einmalige Auftreten der Erkrankung.

Studien am Maus-Modell haben ergeben, dass die T-Zell-Antwort gegen  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  über Th1-Zellen vermittelt wird. Diese sind nicht nur für die Antikörperproduktion wichtig, sondern auch für die Steuerung des Entzündungsvorgangs (Kalluri et al, 1997).

### **1.7 Goodpasture und andere Formen des renopulmonalen Syndroms**

Neben dem Goodpasture-Syndrom existiert eine Vielzahl weiterer Erkrankungen unterschiedlicher Pathogenese, die klinisch unter dem Bild eines renopulmonalen Syndroms mit Hämoptysen und Glomerulonephritis verlaufen können. Hierzu zählen Kollagenosen wie SLE, viele Vaskulitiden wie Purpura Schönlein-Henoch, Morbus Wegener, Panarteriitis nodosa, Mikroskopische Polyangiitis und weitere (Wilson, 1996). Die Bestimmung von Autoantikörpern (Saxena et al, 1995) und der Bestandteile des Komplementsystems kann bei der Diagnosestellung helfen. Das Goodpasture-Syndrom und die systemischen Vaskulitiden besitzen beide normales Komplement, weshalb eine Unterscheidung von Anti-GBM-Autoantikörpern und Anti-Neutrophilen-Cytoplasmatischen-Antikörper (ANCA) wichtig ist (Westman et al, 1997), beide Populationen machen über 80 % der auftretenden Antikörper beim renopulmonalem Syndrom aus (Saxena et al, 1995). Bei den ANCA unterscheidet man per Immunfluoreszenz zwei Typen: C-ANCA (zentral) und P-ANCA (perinucleär). Das C-ANCA-Autoantigen besitzt eine Größe von 29 kDa und entspricht der Proteinase 3 (Jenne et al, 1990). Das P-ANCA-Autoantigen ist variabler. Es entspricht meistens dem Enzym Myeloperoxidase (MPO) (Falk et al, 1990), obwohl auch andere Neutrophilen-Enzyme in Frage kommen, wie die humane Elastase, Kathepsin G oder Lactoferrin (Kallenberg et al, 1994). Es wurde auch von Fällen berichtet, in denen MPO-ANCA auch ein C-ANCA-Reaktionsmuster in der Immunfluoreszenz aufweisen (Segelmark et al, 1994). Der Nachweis von ANCA ist assoziiert mit vaskulitischen Erkrankungen wie Morbus Wegener und Mikroskopischer Polyangiitis (van der Woude et al, 1985; Falk & Jennette, 1988). Der Nachweis von C-ANCA ist hoch charakteristisch für einen Morbus Wegener. Diese Erkrankung weist folgende Kennzeichen auf: 1. Nekrotisierende Vaskulitis der kleinen bis mittleren Gefäße (Kapillaren, Venolen, Arteriolen und Arterien), 2. Granulomatöse Entzündung im Respirationstrakt, 3. Nekrotisierende Glomerulonephritis (Savage et al, 2000). Der obere Respirationstrakt ist zu 90 %

befallen, die Niere zu 80 %. Daneben können alle Organsysteme generalisiert befallen werden. Rückfälle sind im Gegensatz zum Goodpasture-Syndrom nicht selten.

Mit dem Nachweis von P-ANCA geht die Mikroskopische Polyangiitis zu 70 % einher (Braun, 1999). Auch hierbei sind kleinere und bisweilen auch mittlere Gefäße von einer nekrotisierenden Vaskulitis befallen. Es finden sich keine Ablagerungen von Immunkomplexen in den Gefäßwänden. Im Unterschied zum M. Wegener treten aber keinerlei Granulome auf (Jennette et al, 2001). Nierenbefall mit RPGN ist sehr häufig, er kann auch isoliert bestehen. Lungenbefall kann ebenfalls auftreten.

M. Wegener und Mikroskopische Polyangiitis sind häufigere Ursachen für das kombinierte Auftreten von RPGN und Hämoptysen als das Goodpasture-Syndrom (Andrassy et al, 1991).

Seit 1989 ist bekannt, dass eine Subpopulation von Patienten mit Anti-GBM-Autoantikörpern auch positive ANCA aufweist (O'Donoghue et al, 1989). Seitdem haben sich viele Studien mit dieser Koexistenz beschäftigt (Weber et al, 1992; Jayne et al, 1990). 30 % der Patienten mit Anti-GBM-Autoantikörpern hatten positive ANCA, bei 8 % der Patienten mit ANCA-Titern ließen sich ebenfalls Anti-GBM-Antikörper nachweisen (Jayne et al, 1990). Eine andere Studie ergab, dass 22 % der Patienten mit Anti-GBM-Autoantikörpern nachweisbare ANCA besaßen, die zumeist (74 %) gegen die Myeloperoxidase gerichtet waren (Short et al, 1995).

## 1.8 Fragestellung

Sowohl beim klassischen Goodpasture-Syndrom, bei der isolierten Form der rasch progredienten Nephritis (Anti-GBM-Nephritis), als auch bei „doppelt“ positiven Patienten mit ANCA-positiver Vaskulitis treten polyklonale Autoantikörper gegen  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  auf.

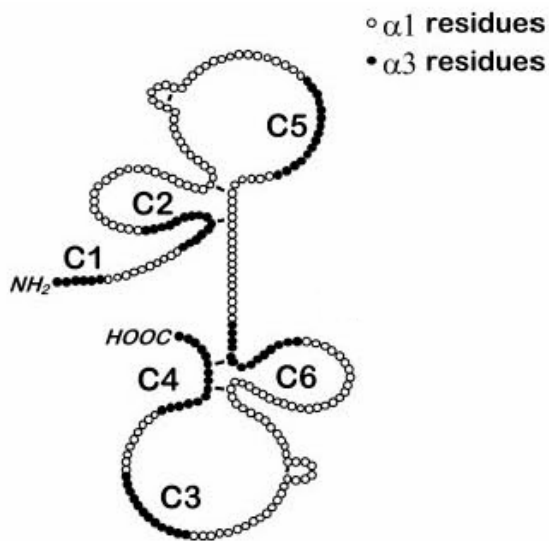
Zwei Epitope ( $\text{GP}_A$  und  $\text{GP}_B$ ) sind für die Antikörperbindung relevant: die Aminosäuren 17-31 und 127-141. Mittels rekombinanter chimärer Antigene (C2, C6 und C2.6) können verschiedene Anteile des Antigens getrennt dargestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob unterschiedliche klinische Verläufe mit der Feinspezifität der Autoantikörper in Zusammenhang stehen.

## 2 Methoden

### 2.1 Transformation

Bei der Transformation kamen 5 verschiedene DNA-Moleküle (Abb. 3) zum Einsatz: zwei codierten die nativen Proteine  $\alpha 3$  und  $\alpha 1$  und drei die chimären  $\alpha 3/\alpha 1(\text{IV})$  NC1-Moleküle C2, C2.6 und C6.



**Abb. 3** Schematische Darstellung der  $\alpha 1/\alpha 3(\text{IV})$ NC1-Chimären. Die weißen Kreise entsprechen den  $\alpha 1$ -Resten, die schwarzen Kreise den ersetzten Abschnitten aus  $\alpha 3$ . Disulfidbrücken sind durch kurze Linien dargestellt (Netzer et al, 1999)

Zur Erfolgskontrolle der Transformation wurde das Plasmid pUC18 verwendet.

100  $\mu\text{l}$  einer Suspension kompetenter *E. coli* (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) wurden mit 0,85  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (25 mM) versetzt und unter gelegentlichen Schütteln auf Eis 10 min inkubiert.

Nach Zugabe von 50 ng DNA wurde erneut 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C für 45 s und einer nochmaligen Inkubation auf Eis für 2 min wurde die Suspension unter Zugabe von 0,9 ml SOC-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur Selektion wurden die Bakterien auf LB-Agar mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin ausplattiert.

Die resistenten Klone wurden nach Übernacht-Flüssigkultur mittels 200 mM NaOH lysiert und die DNA im Miniprep (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellerprotokolls aufgearbeitet.

Hierbei wurden zunächst störende Proteine aus dem Lysat durch den Zusatz von 3,0 M Kaliumacetat bei 4 °C ausgefällt und bei 12.000 x g abzentrifugiert. Über einen DNA-bindenden Ionenaustauscher konnte die DNA aus dem Überstand aufgereinigt und eluiert werden. Durch Zusatz von Isopropanol wurde die DNA präzipitiert. Sie wurde anschließend zur Kontrolle in einem 2 % Agarose-Gel bei 120 V aufgetrennt.

Für ein erstes Protein-Screening wurde die Plasmid-DNA, frei von Salzen, Ethanol und Calcium-Ionen, unter Zugabe von Methionin in ein In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem aus Kaninchen-Retikulozyten (TnT<sup>®</sup> Quick Coupled Transcription/Translation Systems, Promega, Mannheim, Deutschland) eingebracht. Pro 25 µl-Ansatz verwendet man 20 µl TnT<sup>®</sup>QuickMasterMix, 0,5 µl 1 mM Methionin, 2 µl DNA-Plasmid (0,5 µg/µl) sowie 2,5 µl nuclease-freies Wasser. Anschließend wurde für 90 min bei 30 °C inkubiert (siehe Herstellerprotokoll). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 2 µl - Aliquots mit 20 µl 2 % - SDS-Puffer versetzt und für 2 min auf 100 °C erhitzt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Die Proteinlysate wurden im Western Blot untersucht.

Nach positivem Ergebnis erfolgte ein Ansatz von 250 ml Flüssigkultur für jedes der 5 Plamide (LB-Medium mit Ampicillin) sowie die Aufarbeitung der Bakterienklone im EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierzu wurden die Bakterien nach mehreren Waschschritten mit 50 mM Tris-Puffer pH 8,0 in 200 mM NaOH mit 1 % SDS lysiert. Nach 5 min Inkubation erfolgt der Zusatz eines Neutralisationspuffers (3,0 M Kaliumacetat pH 5,5) und eine 30 min Inkubation auf Eis. Im Anschluss folgten mehrere Zentrifugationsschritte bei 20.000 x g sowie eine Applikation des Überstandes auf eine vorbereitete, äquilibrierte Qiagen-Säule nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die DNA wurde dann mittels QF-Puffer (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8,5, 15 % Isopropanol, von Qiagen) eluiert und unter Zusatz von 70 % Isopropanol präzipitiert. Gleich darauf erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 15.000 x g und 4 °C für 30 min. Der Überstand wurde abgossen, die präzipitierte DNA vorsichtig mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 min

unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde die luftgetrocknete DNA in 250 µl TE-Puffer gelöst und photometrisch bei 260/280 nm vermessen.

## 2.2 Transfektion

Da Bakterienkulturen die komplexe Struktur der  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne (und damit auch der Chimären) nicht korrekt falten können, ist ein eukaryotisches Expressionssystem notwendig. Hierfür haben sich humane embryonale Nierenzellen (HEK-293, ACC 305, DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bewährt und wurden auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Die Zellen wurden in DMEM (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 10 % FCS (FCS 585X / 605L, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 3 mM L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) sowie Penicillin/Streptomycin (50 mg/l) in unbeschichteten Zellkulturflaschen über mehrere Tage kultiviert. Nach Erreichen einer ausreichenden Dichte konnten sie später in Sechs-Lochplatten vereinzelt werden. 70-80 % konfluente Zellen wurden dann durch Calcium Phosphat Kopräzipitation transfiziert.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen nochmals 1:2 gesplittet, um ein gleichmäßiges Monolayer zu erhalten. Drei Stunden vor dem Versuch wurden die Zellen nochmals mit frischem Medium versorgt.

Zur Transfektion wurden zunächst 10 µg der durch den Maxiprep gewonnenen Plasmid-DNA mit einem Zehntel des Probenvolumens 3 M NaAc-Lösung (pH 5,2) versetzt und mit dem 2,5fachen Volumen an 100 % Ethanol ausgefällt. Nach erneutem Lösen in 70 % Ethanol und Abzentrifugieren wurde das Pellet in 450 µl  $\frac{1}{10}$  TE-Puffer suspendiert.

Unter Zusatz von 50 µl einer 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde die DNA tropfenweise zu 500 µl HBS-Puffer pH 7,12 gegeben. Sobald der Niederschlag erkennbar war, wurde die Zellkultur mit der Lösung bei 37 °C inkubiert.

Nach drei Stunden wurde das Kulturmedium aspiriert. Die Zellen wurden nun für 30 s einem „Glycerol-Schock“ (15 % Glycerol in PBS) ausgesetzt, bevor das Medium ersetzt wurde.

Alle verwendeten Puffer kamen steril filtriert zur Anwendung.

Nach 48 h begann die Selektion mit 250 µg/ml G418. Resistente Klone wurden isoliert und der Kulturüberstand bereits in diesen frühen Stadien per Western Blot auf die Expression rekombinanter Proteine untersucht.

Klone mit entsprechender Expression wurden daraufhin weiterkultiviert, bis sie in zweistöckigen 400 ml-Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) vermehrt werden konnten. Der Überstand mit dem sezerniertem Protein konnte nach 48 h Kultur in serumfreiem Medium geerntet werden. Nach Zentrifugation (20 min bei 3000 g) wurde der geklärte Überstand mit EDTA (2 mM) versetzt und bei -20 °C eingefroren. Die Zellkultur wurde danach für weitere 48 h mit serumhaltigem Medium versetzt, bevor ein zweiter Ansatz mit serumfreiem Medium folgen konnte. Pro Zellkulturansatz wurden insgesamt 800 ml proteinhaltiger Überstand geerntet und weiter aufgearbeitet.

### **2.3 Affinitätschromatographie**

Das zu untersuchende Protein wurde durch die nachfolgenden Schritte aus dem Zellkultur-Überstand isoliert und aufgereinigt.

Chromatographie-Säulen wurden zu diesem Zweck mit ANTI-FLAG®M2 AFFINITY GEL (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) (Abb. 4 [1]) beschichtet. Das Agarose-Gel enthält monoklonale Maus-IgG-Antikörper, die gegen das Flag-Epitop der aufzureinigenden rekombinanten Proteine gerichtet sind. Die Säulen wurden mit TBS-Puffer pH 7,4 äquilibriert ohne das Gelbett aufzuwirbeln. Zur Regeneration wurden dreimal 5 ml 0,1 M Glycin-HCl pH 3,5 auf die Säule gegeben, dann folgte ein Waschschrift mit 5 ml TBS pH 7,4, um den pH-Wert wieder anzuheben.

Die Säule wurde anschließend mit drei bis vier ml des Zellkultur-Überstandes überschichtet (Abb. 4 [2]) und das System geschlossen. 400 ml Überstand (Abb. 4 [3]), zur besseren pH-Stabilität mit 50 ml TBS pH 7,4 versetzt, flossen nur der Schwerkraft folgend durch die Säule. Eine zweite Passage über Nacht erhöhte die Proteinausbeute.

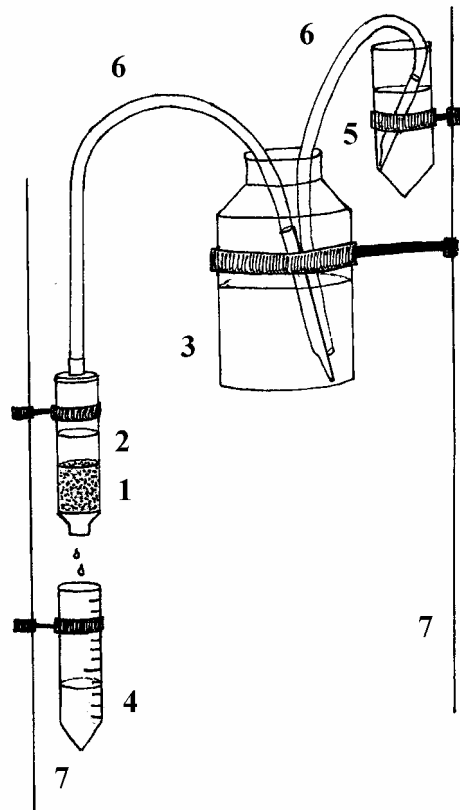
Im Anschluss wurde die Säule mit 50 ml TBS gewaschen. Dabei war auf einen vollständigen Durchlauf des Puffers zu achten. Durch Zugabe von zweimal 2 ml FLAG®PEPTIDE (Sigma) konnte das Protein kompetitiv aus der Bindung an die Säule verdrängt und in Fraktionen eluiert werden. Das lösliche Peptid wurde dabei in einer Konzentration von 100 µg/ml in TBS-Puffer eingesetzt.

Nach dem Einsatz wurde die Säule durch das Ansäuern des pH-Werts mit dreimal 5 ml Glycin-HCl pH 3,5 vom FLAG-Peptid befreit. Die folgenden Waschschriffe wurden mit TBS-Puffer unter Zusatz von 0,02 % Natrium-Azid durchgeführt, um der bakteriellen Besiedelung vorzubeugen. Die Säule konnte dann mehrere Monate aufbewahrt und wiederverwendet werden.

Alle beschriebenen Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Das Eluat wurde anschließend bei 4 °C in TBS-Puffer pH 7,4 unter permanentem Rühren dialysiert, um Protein und Reste des FLAG-Peptides zu trennen. Der erste Pufferwechsel erfolgte nach vier Stunden, der zweite am nächsten Tag.

Danach wurden die Proteinlösungen durch Zentrifugation mit Centricon Plus-20-Röhrchen konzentriert und photometrisch vermessen. Eine Extinktion von 1,6 OD bei 280 nm entsprach einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Aliquots konnten bei 4 °C für eine kürzere Zeit, bei -20 °C für Monate aufbewahrt werden.



**Abb. 4** Versuchsaufbau Affinitätschromatographie. [1] Säule mit ANTI-FLAG®M2 AFFINITY GEL, [2] darüber geschichteter Zellkulturüberstand, [3] aufzureinigender Zellkulturüberstand (400 ml), [4] Eluat, [5] „Auslaufschutz“ mit TBS-Puffer pH 7,4; [6] Silikonschläuche, bei den Waschschriffen wurde das System geöffnet, [7] Haltevorrichtung



## 2.4 Western Blot

Die Patientenseren wurden mittels der Western Blot-Methode untersucht.

Probenvorbereitung:

Von den fünf verschiedenen Proteinchimären wurden jeweils 250 ng bzw. 500 ng pro Spur aufgetragen.

Ein Volumenanteil des Proteins, der der oben angegebenen Menge entsprach, wurde im Verhältnis 1:2 mit Laemmli-Puffer versetzt. Danach wurden die Proben im Heizblock bei 95 °C für zwei Minuten gekocht. Um ein weiteres Denaturieren des Proteins zu unterbinden, wurde auf die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol verzichtet.

### 2.4.1 Gelelektrophorese

Zum Einsatz kamen SDS-Polyacrylamid-Gele mit einem Acrylamidgehalt von 15 %.

Das Gel wurde nach folgender Vorschrift angesetzt:

Trenngel:

1. 40 % Acrylamid 1:37	3,75 ml
2. 4X Lower Tris pH 8,8	2,50 ml
3. 10 % SDS	0,10 ml
4. Aqua dest.	3,65 ml
5. 10 % APS	60 $\mu$ l
6. TEMED	4 $\mu$ l

Sammelgel:

1. 40 % Acrylamid 1:37	0,2 ml
2. 4X Upper Tris pH 6,8	0,5 ml
3. 10 % SDS	20 $\mu$ l
4. Aqua dest.	1,5 ml
5. 10 % APS	20 $\mu$ l
6. TEMED	4 $\mu$ l

Nach vorsichtigem Durchmischen wurde zuerst das Trenngel in die Gelkammer eingefüllt, nach der abgeschlossenen Polymerisation das Sammelgel darüberschichtet und der Kamm eingesetzt.

Nach dem Ziehen des Kammes wurde die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt.

Die Proben (250 ng pro Spur) wurden repetitierend nach folgendem Schema aufgetragen: Protein-Standard,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_1$ , C2, C2.6, C6.

Bei den für die Testung von Patientenserum vorgesehenen Blots wurde noch eine Spalte Rinderserumalbumin (BSA) in äquivalenter Proteinmenge zwischen dem Standard und  $\alpha_3$  eingefügt.

Solange die Proben im Sammelgel konzentriert wurden, war das Netzgerät auf 100 V eingestellt, um diesen Vorgang zu beschleunigen. Die Passage des Trenngels erfolgte bei 20 mA pro Gel (Voltzahl automatisch eingestellt), um die Auftrennung zu optimieren und benötigte eineinhalb bis zwei Stunden.

#### **2.4.2 Western Blot**

Nach Ablauf der Gelelektrophorese wurde das Gel zusammen mit einer Nitrozellulosemembran in die Blotkammer übertragen.

Zuvor waren die Blotting-Pads in einer Lösung aus 25 ml Transfer Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 100 ml Methanol, auf 500 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, eingeweicht worden, bis alle Luftblasen entwichen waren.

Die Schichtung in der Kammer erfolgte nach unten anschließendem Schema von der Kathode zur Anode:

1. Blotting Pad
2. Blotting Pad
3. SDS-Gel
4. Nitrozellulosemembran
5. Blotting Pad
6. SDS-Gel
7. Nitrozellulosemembran
8. Blotting Pad
9. Blotting Pad

Die Kammer wurde mit dem Transfer-Puffer (mit Methanol) gefüllt. Das Blotten erfolgte bei 30 V für 90 min. Während dieses Versuchsschritts musste mit Eis gekühlt werden, um der Erwärmung der Kammer entgegenzuwirken.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran unmittelbar nach dem Blotten für 30 min in eine Lösung von 5 % Milchpulver in TBS-Puffer pH 7,4 eingelegt.

Nach dem Abgießen des Milchpulvers kamen die Membranen mit dem Primär-Antikörper in Kontakt. Hierzu wurden die Antikörper in 0,05 % Milchpulver in TBS gelöst und davon 3 ml zu jeder Membran gegeben. Der mit allen Chimären in gleicher Intensität reagierende Anti-Flag-Antikörper (Abb. 5) wurde in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt; er diente als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinauftragung. Sonst wurden Patientenseren, je nach Stärke der Farbreaktion 1:50, 1:100 oder 1:200 verdünnt, als Primär-Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle dienten Seren aus dem Normalkollektiv in gleicher Verdünnung. Bei 4 °C wurden die Membranen unter kontinuierlicher Rotation auf einem Rollenmischer über Nacht inkubiert.

Alle Antikörper-Lösungen konnten in Abhängigkeit des Titers drei- bis viermal eingesetzt werden, sofern sie bei 4 °C gelagert wurden.

Am nächsten Tag erfolgten drei zehnmütige Waschschrirte mit 0,05 % Tween 20 (SIGMA) in TBS, bevor die Membranen mit dem Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:5000 in 0,05 % Milchpulver in TBS) für eine Stunde inkubiert wurden. Als Antikörper diente beim Einsatz von Anti-Flag-Antikörpern ein Goat-anti-mouse-Antikörper aufgrund des murinen Ursprungs, bei Verwendung von Patientenseren ein Anti-Human-IgG+IgM-Antikörper. Beide Sekundär-Antikörper waren mit alkalischer Phosphatase gekoppelt.



$\alpha 3$   $\alpha 1$  C2 C2.6 C6

**Abb. 5** Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern 1: 500 entwickelt. Dieser reagiert gleich stark mit  $\alpha 3$ ,  $\alpha 1$  und den Chimären

### 2.4.3 Detektion

Zur Detektion kam ein Farbsystem, basierend auf der enzymatischen Umwandlung durch alkalische Phosphatase, zum Einsatz.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran noch drei weitere Male, wie bereits beschrieben gewaschen, um den nicht gebundenen Anteil an Sekundär-Antikörper zu entfernen.

Dann folgte der Zusatz von 10 ml einer Substratlösung für das Enzym. Diese Lösung beinhaltete 65 µl BCIP und 65 µl NBT in AP-Puffer pH 9,5.

In Abhängigkeit von der Menge der gebundenen Antikörper zeigte sich nach einigen Minuten auf der Membran eine charakteristische Blaufärbung (Abb. 5).

Nach dem Stoppen der Reaktion durch fließendes Wasser war die Färbung stabil.

Anschließend konnten die gefärbten Blots mit Hilfe eines speziellen Programms (Quantity One Quantification Software, Biorad, München, Deutschland) analysiert werden.

## **2.5 Proteinfärbung**

Als weitere Nachweismethode diente die Proteinfärbung. Analog zum Western Blot wurden die Proben vorbereitet, auf 15 % Acrylamid-Gel aufgetragen, die Gelelektrophorese durchgeführt und im Anschluss mit Coomassie-Blau gefärbt.

250 mg Coomassie-Blau wurden in 45 ml Methanol, 10 ml Eisessig mit Wasser, auf 100 ml aufgefüllt, gelöst.

Das Gel wurde mit einem geeigneten Volumen Farblösung überschichtet und über Nacht inkubiert.

Danach wurde die Lösung abgeschüttet. Durch Waschen in der oben beschriebenen Methanol-Eisessig-Wasser-Mischung über 3 h konnten überschüssige Farbreste entfernt werden.

Da gefärbtes Gel nicht stabil ist, wurde das Ergebnis eingescannt.

## **2.6 Patientenseren**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 23 Patientenseren untersucht. 14 Patienten waren am Goodpasture Syndrom erkrankt, 7 an Morbus Wegener sowie zwei an mikroskopischer Polyangiitis. Die Seren wurden aus verschiedenen immunologischen Einsendelabors bezogen, mit denen eine Kooperation bestand.

Die klinischen Verlaufsdaten wurden von den jeweiligen Medizinischen Kliniken zugesandt. Aus Gründen des Datenschutzes wurden die Daten mittels eines standardisierten Fragebogens erfasst und den mit Nummern kodierten Seren zugeordnet. Die Fragebögen enthielten neben Angaben zur Person den zeitlichen Verlauf der Erkrankung unter getrennter Symptomerfassung (Allgemeines Krankheitsgefühl, Husten, blutiges Sputum, Lungenblutungen), die durchgeführten Therapien, das

Outcome nach Therapieabschluss, sowie Laborparameter wie Kreatinin im Verlauf und Höhe des Antikörpertiters.

## 2.7 Material

Neben bereits erwähnten Produkten und Herstellern wurden folgende Substanzen verwendet:

**Tab. 1** Eingesetzte Materialien und Herstellernachweis

### Bakterienkultur

Epicurian Coli® XL1-Blue superkompetent cells	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lennox L-Broth-Base-Medium (20g auf 1l Wasser)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland

### Zellkultur

Dulbecco's Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FCS (fetales Kälberserum) 605 L / 585 X	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Hepes (N-2-(Hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethansulfonsäure))	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland

CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycerol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
G418 (Geneticin)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### **Affinitätschromatographie**

---

Anti-Flag®M2AffinityGel	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Flag®Peptide	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycin 99 %	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

### **Western Blot**

---

Acrylamid 40 % 1:37 (Acrylamid/bisacrylamid)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat) 98 %	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylendiammin)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Methanol	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
TrisGlyTransferBuffer 25X	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SeeBlue™ Pre-Stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BSA (Bovine Albumin Fraction V)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Nonfat dry milk	Carnation, USA
Anti-Flag®M2 F-3165	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Alkaline phosphatase-conjugated	Dianova, Hamburg, Deutschland
AffiniPure Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)	

Alkaline phosphatase-conjugated AffiniPure Rabbit-Anti-Human IgG+IgM	Dianova, Hamburg, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
NBT (Nitro blue tetrazolium)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DMF (N,N-Dimethylformamid)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
<hr/>	
Eisessig (Essigsäure 98 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Coomassie-Blau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

### Verwendete Geräte und Materialien

Zellkulturflaschen, klein und 6Loch	Sarstedt, USA
Zellkulturflaschen, zweistöckig	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Affinitätschromatographie	
Glass Econo-Column 1,0 X 10	Biorad, München, Deutschland
Silikonschlauch 3,0 X 5,0 mm	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
SpectraPor®CE Cellulose Ester Membran 5.000	Spectrum Laboratories Inc., USA
Spin Columns: Centricon Plus-20	Millipore, Eschborn, Deutschland
Western Blot	
<hr/>	
Nitrocellulose Membran Filter Paper	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sandwich	
Blotkammer: Dual Gel Caster Mighty	Hoefler, San Francisco, USA
Small SE 245	
Gelelektrophorese-Kammer: Xcell 2 E	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
19001	
<hr/>	
Centrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 46 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Waagen: PM 6100 und AE 240	Mettler, Zürich, Schweiz
UV-Spektrometer Lambda 12	Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland

**Puffer, selbst hergestellt:**

TE pH 7,1: 1fach

1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

TBS pH 7,4 1fach

50 mM Tris

150 mM NaCl

Laemmli-Puffer

SDS- Laufpuffer 10fach

250 mM Tris

2 M Glycin

7 mM SDS

200 mM Tris

6 % SDS

15 % Glycerol

10 mg Bromphenolblau

HBS pH 7,12 2fach

140 mM NaCl

25 mM Hepes

Lower Tris pH 8,8 4fach

750 mM Tris

Upper Tris pH 6,8 4fach

PBS pH 7,2-7,4 10fach

6.8 M NaCl

130 mM KCl

75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>500 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

250 mM Tris

Alkalische Phosphatase Puffer (AP) pH 9,5

50 mM Tris

50 mM NaCl

1 M MgCl<sub>2</sub>

NBT

50 mg/ml in 70 % DMF

BCIP

26 mg/ml in DMF

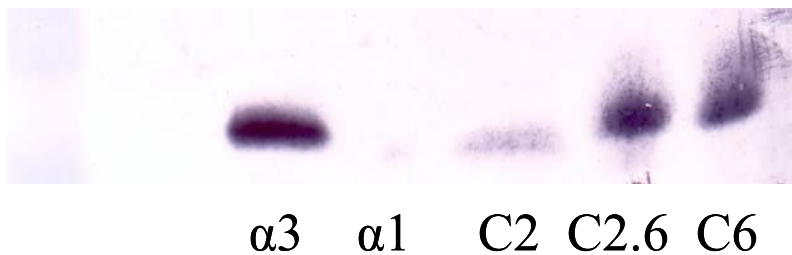


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Anti-GBM-Seren reagieren unterschiedlich mit den Chimären

Zunächst wurden alle Patientenserumproben mit einem Panel von drei Testantigenen (C2, C6, C2.6) und zwei Kontrollantigenen ( $\alpha 1$  als Negativkontrolle,  $\alpha 3$  als Positivkontrolle) getestet. Die  $\alpha 3$ -Kette entspricht dem nativen Antigen des Typ IV-Kollagens. Auch  $\alpha 1$  ist am Aufbau des Typ IV-Kollagens beteiligt. Es ist jedoch immunologisch inert. Zwei Regionen der  $\alpha 3$ -Kette sind besonders wichtig für die Antikörperbindung, da sie Disulfidbrücken enthalten, die für die sterische Struktur des Antigens unerlässlich sind: die Aminosäuren 17-31 und 127-141 (Netzer et al, 1999). Für die Chimären wurde die  $\alpha 1$ -Kette so verändert, dass sie jeweils unterschiedliche Molekülregionen von  $\alpha 3$  expremiert. Die gereinigten Antigene hatten in der SDS-Gelelektrophorese eine Größe von 25-30 kDa.

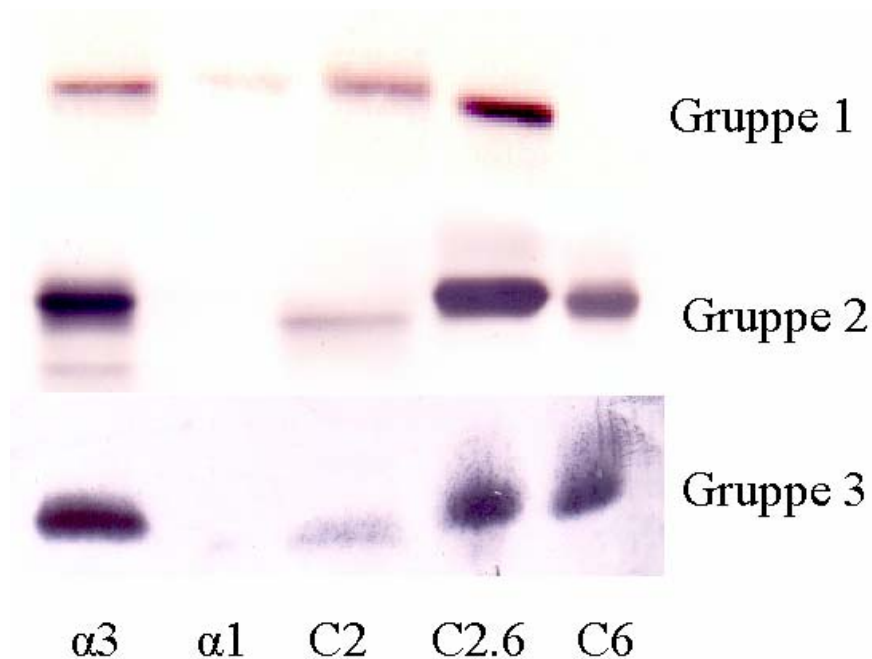
Die Reaktivität gegenüber  $\alpha 3$  als dem nativen Antigen wurde 100 % gesetzt, die Reaktivität gegenüber  $\alpha 1$  wurde als unspezifische Kreuz-Reaktion (Netzer et al, 1999) von allen anderen Werten subtrahiert. Von den chimären Proteinen wies C2.6 die höchste Reaktivität auf. Die anderen Chimären reagierten schwächer, C6 dabei meist stärker als C2 (Abb. 6). In nur zwei Fällen überstieg die Reaktivität mit C2 die von C6.



**Abb. 6** Serum GP AH aus der Gruppe 3 als repräsentatives Beispiel für die Reaktion  $C2 < C6 = C2.6$

Untersuchte Goodpasture-Patienten:

Bei den 14 untersuchten Goodpasture-Patienten ließen sich anhand des Western Blots drei Gruppen unterscheiden, die sich in ihrem Reaktionsmuster deutlich voneinander abgrenzen (Abb. 7). Dabei war eine unterschiedliche Reaktivität mit den drei Chimären, welche verschiedene Anteile des Goodpasture-Epitops repräsentieren, besonders auffällig. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf individuell verschiedene Antikörperpopulationen mit unterschiedlicher Bevorzugung einzelner Epitopregionen ziehen. Besonders die komplexe sterische Struktur des Epitops ist dabei zu beachten.



**Abb. 7** Verschiedene Reaktionsmuster gegenüber den Chimären. Gruppe 1:  $C2 > C6$ ; Gruppe 2:  $C2 < C6 \ll C2.6$ ; Gruppe 3:  $C2 < C6 = C2.6$

Bei allen drei Gruppen waren außerdem Seren zu beobachten, bei denen die Reaktivität von den Chimären C2.6 und teilweise auch der anderen C2 oder C6, die Reaktivität von  $\alpha 3$  (und damit 100 %) überstieg,.

Die folgenden drei Abbildungen haben das Ziel, die drei verschiedenen Western Blot - Gruppen näher zu charakterisieren:

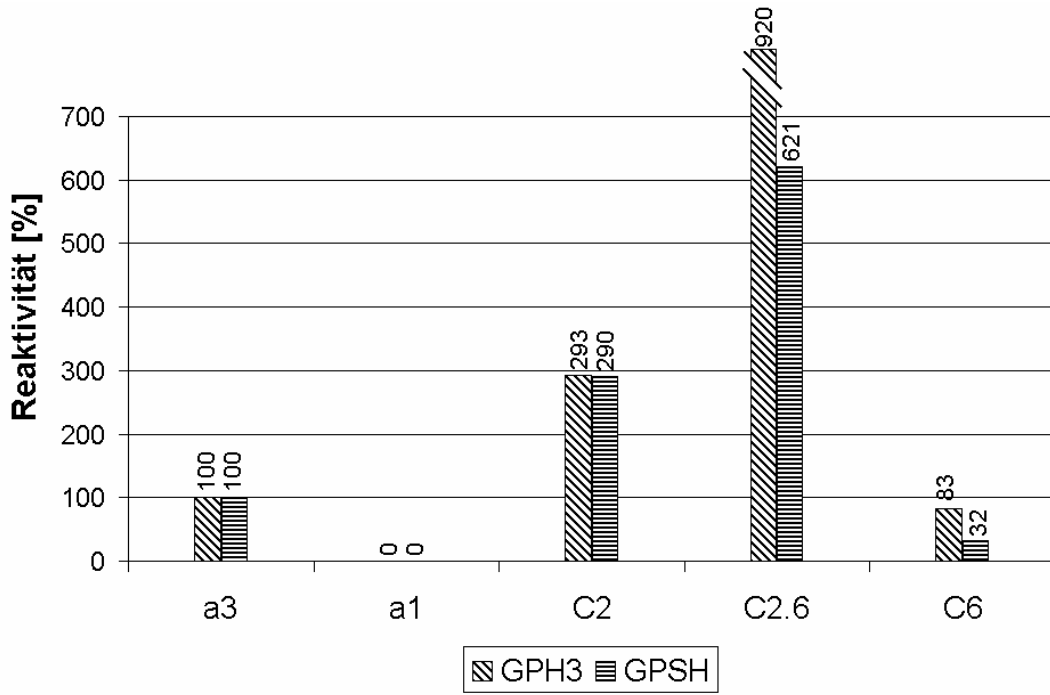


Abb. 8 Reaktivität der Seren der Gruppe 1: C2 > C6

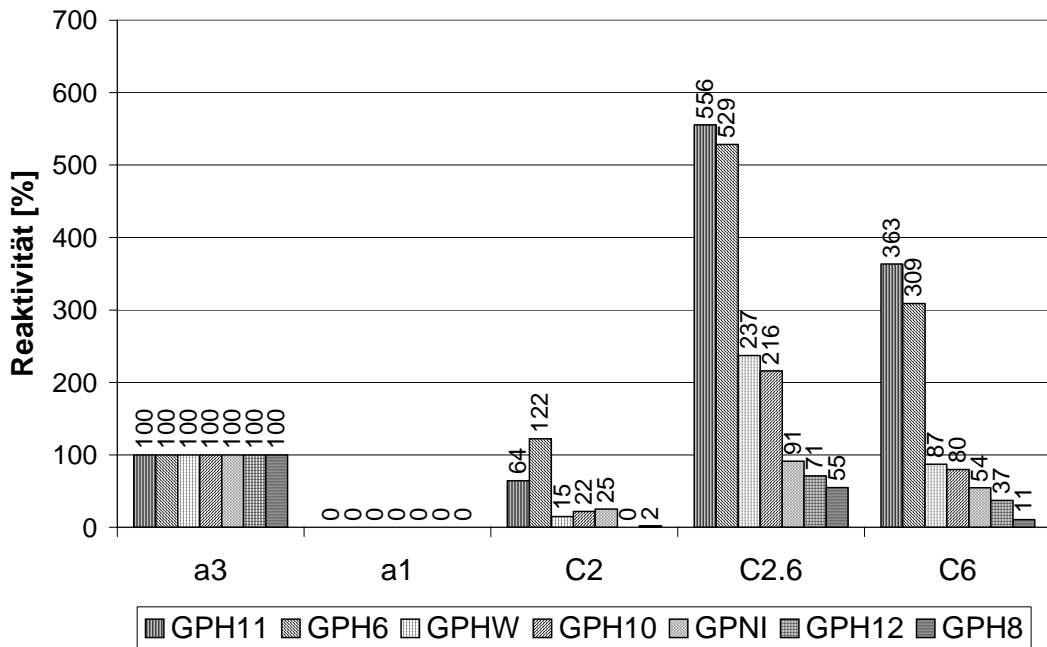


Abb. 9 Reaktivität der Gruppe 2: C2 < C6 << C2.6

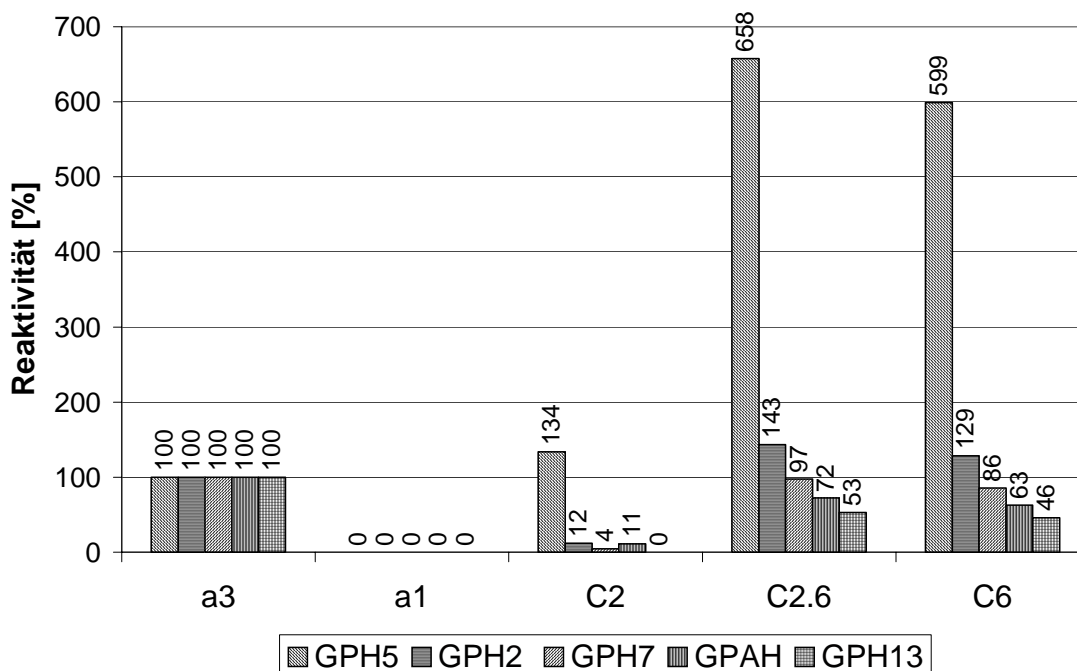


Abb. 10 Reaktivität der Gruppe 3:  $C2 < C6 = C2.6$

### 3.1.1 Gruppe 1: $C2 > C6$

Zur ersten Gruppe (Abb. 8) zählten nur zwei Seren: GP H3 und GP SH. Die Reaktivität gegenüber der Chimäre C2 lag um ein Vielfaches über der Reaktivität mit der Chimäre C6 (um das Vierfache höher bei GP H3 und um das Zehnfache höher bei GP SH). Diese Tatsache unterschied diese Seren deutlich von den beiden anderen Gruppen.

Dieses Ergebnis deutet auf eine Bevorzugung der Epitopregion GP<sub>A</sub> hin. Des weiteren erreicht C2.6 das Reaktivitäts-Maximum. C2.6 repräsentiert die Gesamtheit der beiden GP<sub>A</sub> und GP<sub>B</sub> in ihrer sterischen Anordnung.

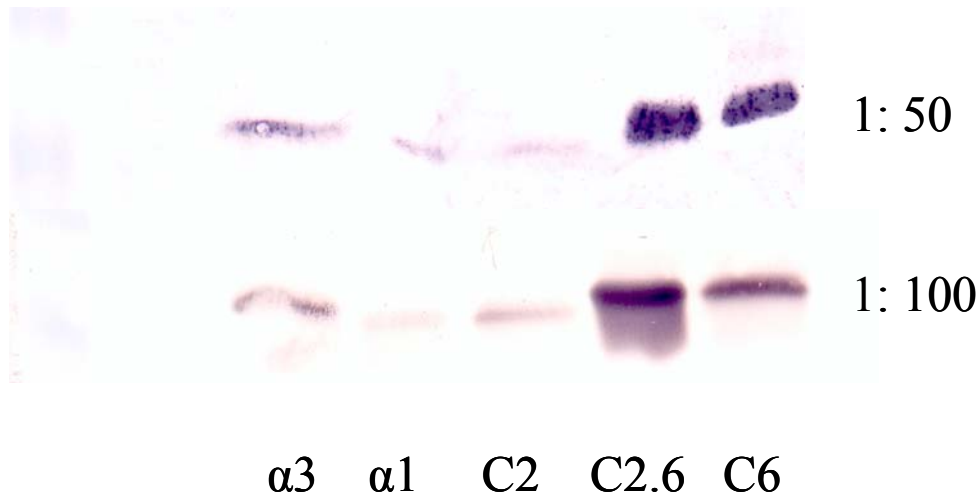
Bei beiden Seren übertraf die Reaktivität von C2.6 die von  $\alpha 3$ .

### 3.1.2 Gruppe 2: $C2 < C6 \ll C2.6$

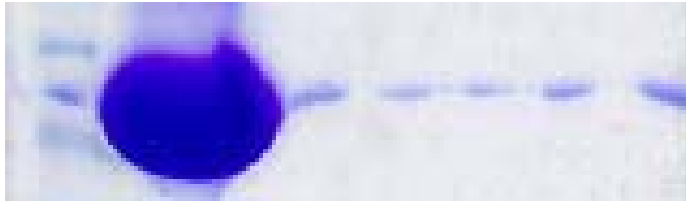
Die zweite Gruppe (Abb. 9) nahm mit 7 Seren den Löwenanteil ein. Das charakteristische Merkmal dieser Seren war ihre geringere Reaktion mit C2 im Vergleich zu der Chimäre C6. Die Reaktivität mit der dritten Chimäre C2.6 übertraf die von C6 stark, meist um das Zwei- bis Dreifache. Damit war die Reaktion dieser Seren

eine völlig andere als die der ersten Gruppe. Hier gab es offenbar verschiedene Kollektive von Seren mit unterschiedlicher Bevorzugung der beiden Epitope GP<sub>A</sub> (entspricht C2 – Gruppe 1) und GP<sub>B</sub> (entspricht C6 – Gruppe 2).

Auffallend ist auch das inhomogene Verhalten der Seren gegenüber C2.6 in Relation zu  $\alpha 3$ . Wie bereits erwähnt, ist die Reaktivität von  $\alpha 3$  als dem nativen Protein immer 100 % gesetzt. Bei drei der Seren lag die Reaktivität von C2.6 als der am stärksten reagierenden Chimäre zwischen 55 und 91 % der von  $\alpha 3$ . Die anderen vier Seren zeigten ein abweichendes Verhalten. Obwohl die Seren kräftig mit  $\alpha 3$  reagierten, war die Bindung der Autoantikörper an die Chimären, besonders an C2.6 sowie in zwei Fällen auch an C6 um ein Vielfaches höher als die von  $\alpha 3$  bei gleicher Proteinmenge. Auch wiederholte Messungen der Seren mit verschiedenen Verdünnungsstufen (Abb. 11) als auch mit anderen Methoden (Abb. 12) (siehe auch Abb. 13) erbrachten das gleiche Ergebnis. Offenbar ermöglichte die  $\alpha 1$ -Umgebung des Epitops eine bessere Zugänglichkeit bestimmter antigener Strukturen bei einigen Autoantikörpern.



**Abb. 11** Verschiedene Verdünnungen von GP H11



BSA  $\alpha 3$   $\alpha 1$  C2 C2.6 C6

**Abb. 12** Proteinfärbung mit Coomassie-Blau. Eine Gleichverteilung von Protein der Spuren  $\alpha 3$  bis C6 ist erkennbar.



$\alpha 3$   $\alpha 1$  C2 C2.6 C6

**Abb. 13** Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern 1: 500 entwickelt. Gleich starke Reaktion mit  $\alpha 3$ ,  $\alpha 1$  und den Chimären, da der Antikörper gegen das bei allen vorhandene Flag-Epitop gerichtet ist. Dies deutet auf eine gleichmässige Verteilung der Proteinmenge hin.

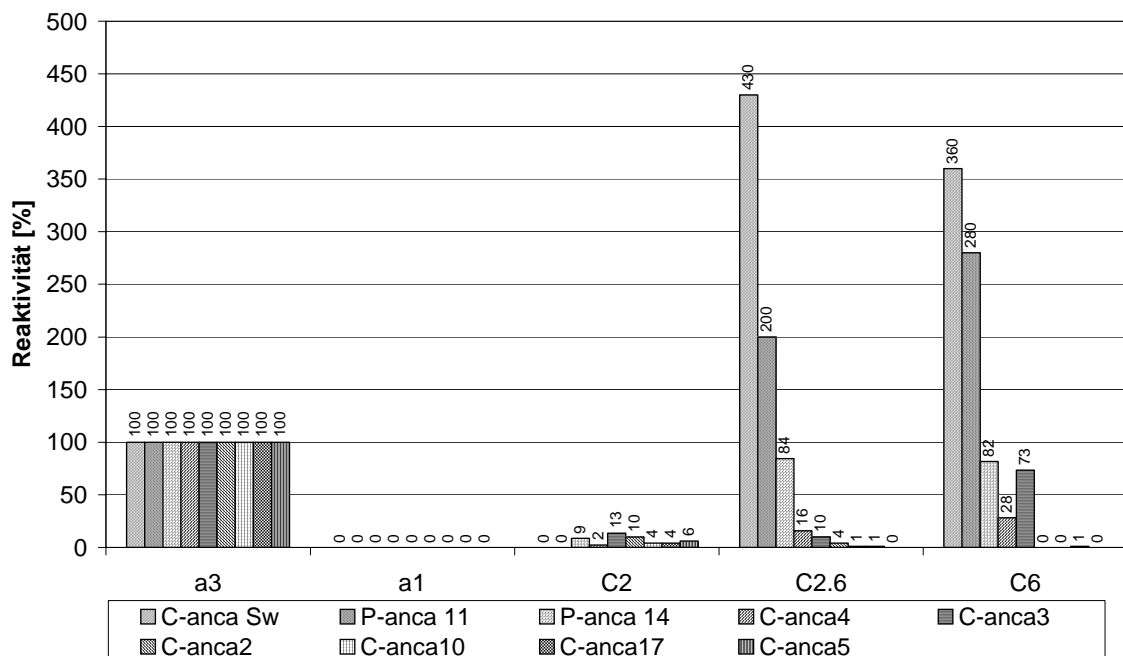
### 3.1.3 Gruppe 3: $C2 < C6 = C2.6$

Als dritte Gruppe (Abb. 10) konnten fünf Seren beschrieben werden. Sie waren durch ihre Reaktion  $C2 < C6 = C2.6$  zu charakterisieren. Damit standen sie der zweiten Gruppe näher als der ersten. Im Unterschied zu Gruppe 2 bestanden hier nur geringe Differenzen in der Reaktivität mit C2.6 und C6. Die Chimäre C6 wies durchgehend rund 90 % der Reaktivität von C2.6 auf.

Auch bei der dritten Gruppe trat das oben beschriebene Phänomen der unterschiedlichen Relationen von  $\alpha 3$  und C2.6. Drei Seren lagen mit ihren Werten für C2.6 unter denen von  $\alpha 3$ . Die anderen wiesen höhere Werte für C2.6 auf.

### 3.2 Anti-GBM-Autoantikörper bei Vaskulitis-Patienten erfassen andere Epitope

Weiterhin wurden auch ANCA-positive Seren auf ihre Reaktivität mit dem Goodpasture-Antigen bzw. seinen antigenen Bestandteile untersucht, da häufig verschiedene Autoantikörper gemeinsam auftreten. Dabei handelte es sich um 7 Seren von Patienten mit Morbus Wegener (C-ANCA-positiv) und um zwei Patientenseren mit mikroskopischer Polyangiitis (P-ANCA-positiv). Diese zeigten ein anderes Reaktionsverhalten (Abb. 14).



**Abb. 14** Reaktivität der Vaskulitis-Seren mit den Goodpasture-Epitopen

$\alpha 3$  zeigte bei allen 9 Seren eine nachweisbare Bande. Keines der Seren reagierte mit der Negativkontrolle  $\alpha 1$ . Die Chimären reagierten sehr unterschiedlich. Keines der Seren reagierte mit C2. Drei der Seren (C-ANCA 5, 10 und 17) reagierten zwar mit  $\alpha 3$ , wiesen aber keine nennenswerte Reaktion mit den Chimären auf (maximal 4 %). Diese Reaktion stimmt nicht mit den bei den Goodpasture-Seren beobachteten Gruppen überein. Bei den Goodpasture-Seren trat zumeist die Reaktion  $C6 < C2.6$  oder  $C6 =$

C2.6 auf. Dem gegenüber wiesen nur 5/9 der untersuchten Vaskulitis-Seren eine signifikante Reaktion mit den Chimären auf.

Zwei Seren (C-ANCA 3 und 4) reagierten außer mit  $\alpha 3$  fast ausschließlich mit C6 (73 % und 27 %). Zwei weitere banden an C6 und C2.6 (C-ANCA SW , P-ANCA 11), zeigten jedoch keinen „Synergismus“, d.h. keine Steigerung der Reaktivität durch die Abbildung der beiden Epitope GP<sub>A</sub> und GP<sub>B</sub> in der Chimäre C2.6.

Nur ein Serum (P-ANCA 14) reagierte ähnlich wie die Goodpasture-Seren:  $\alpha 3 > C2.6 > C6 > C2$ .

Bei den Vaskulitis-Seren wiesen die zusätzlichen Anti-GBM-Autoantikörper eine deutliche Variabilität auf. Ein Teil ähnelte den Goodpasture-Seren, andere scheinen nicht die gleichen Epitope zu erfassen, da ihr Chimären-Reaktionsmuster von den Goodpasture-Seren deutlich abweicht.

### **3.3 Auswertung der Patientendaten**

#### **3.3.1 Patientenseren mit Anti-GBM-Antikörpern**

In diese Gruppe fielen 14 Patienten.

##### **3.3.1.1 Allgemeine klinische Angaben**

Die Diagnose „Goodpasture-Syndrom“ gründete sich auf den histologische Nachweis einer diffusen extrakapillären Glomerulonephritis (klinisches Bild: rapid progrediente Glomerulonephritis - RPGN) sowie auf das Vorhandensein von oben genannten Antikörpern.

7 der Patienten zeigten eine pulmorenale Verlaufsform des Goodpasture-Syndrom (50 %), 6 Patienten wiesen nur eine Anti-GBM-Nephritis ohne Lungenbeteiligung auf (43 %), ein Patient hatte nur eine pulmonale Symptomatik. Einer der Patienten erlitt bereits drei rekurrente Schübe.

Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 8:6. Das Alter der untersuchten Gruppe lag zwischen 24 und 74 Jahre, 5 der Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwischen 24-32 Jahre alt. Ein weiterer Häufigkeitsgipfel lag bei 55-66 Jahren (6 Patienten).

10 der Patienten zeigten allgemeine Krankheitssymptome wie Gewichtsabnahme, Schwäche und trockenen Husten (Tab. 2) bereits mehrere Wochen bis Monate vor



Diagnosestellung. Bei 8 Patienten konnten Hämoptysen festgestellt werden. Diese verliefen meist mild, ein Patient jedoch wurde beatmungspflichtig.

9 der Patienten wiesen bei Diagnosestellung eine begleitende Hypertonie auf, die bei den meisten jungen Patienten (n=3) nach Therapie wieder sistierte.

Laboruntersuchungen ergaben bei 10 der Patienten eine Anämie mit einem durchschnittlichen Hämoglobin von 8,2 mg/dl. Der Urin zeigte in 12 Fällen eine Proteinurie (0,9-3,0 g pro Tag) sowie in 10 Fällen eine Hämaturie (meist Mikrohämaturie). 13 Patienten wiesen ein erhöhtes Serumkreatinin auf (durchschnittlich 5,4 mg/dl bei Streuung der Werte von 1,6-12,5 mg/dl).

Die Antikörper-Titer lagen im Mittel bei 1:80 (Streuung 1:40-1:320). Ein Patient wies neben einem anti-GBM-Titer (1:160) auch einen positiven Titer gegen C-ANCA auf (1:80 bei GP HW).

Anamnestisch konnte ermittelt werden, dass 9 der Patienten Raucher waren.

**Tab. 2** Symptome bei Diagnosestellung bei Goodpasture-Patienten

	Anzahl	Prozent
Allgemeinsymptome	10	71
Husten	9	64
Hämoptysen	8	57
Anämie	10	71
Proteinurie	12	85
Hämaturie	10	71
erhöhtes Serumkreatinin	13	93
- mit terminaler Niereninsuffizienz	7	
- ohne terminale Niereninsuffizienz	6	
Hypertonie	9	64

### **3.3.1.2 Therapie und Outcome**

Alle Patienten erhielten eine Kombination aus Plasmapherese und Immunsuppressiva.

Die Dauer der Plasmapherese lag zwischen 3 und 12 Tagen.

Die medikamentöse Therapie bestand aus Steroiden (Methylprednisolon oder Prednison) und Cyclophosphamid (in drei Fällen Umstellung auf Ciclosporin A (n=2) bzw. Azathioprim wegen Leukopenie).

Das Steroid wurde in einer Konzentration von 250-500 mg Methylprednisolon über drei Tage appliziert, dann in einer Konzentration von 1 mg/kg KG pro Tag weitergegeben. Drei Patienten erhielten eine Cyclophosphamid-Stoßtherapie mit einer monatlichen Dosis von 1000 mg i.v., die anderen 11 Patienten bekamen eine orale Therapie mit 1-2 mg/kg KG Cyclophosphamid pro Tag.

Die durchschnittliche Therapiedauer nach Remissionseinleitung betrug 9 Monate.

7 Patienten bekamen ein Nierenversagen und mussten intermittierend dialysiert werden. Das Ausgangs-Serumkreatinin lag zwischen 5,6 und 12,5 mg/dl. Die Anzahl der Dialysen betrug 4 bis 9.

**Tab. 3** Outcome hinsichtlich klinischer und serologischer Daten

	normale Nierenfunktion (n=7)	CNI ohne Dialysepflicht (n=4)	CNI mit Dialysepflicht (n=3)
Alter	24,29,30,32, 39,48,55	55,56,57,66	31,65,74
Lungenbefall	5	1	2
Geschlecht (m/w)	5/2	1/3	2/1
Initial-Kreatinin			
≤ 2 mg/dl	5		
≤ 6 mg/dl	2	3	
≥ 6 mg/dl		1	3
Anti-GBM- Antikörper- Titer	1 : 80	1 : 80	1 : 160

Bei 11 Patienten konnte die Nierenfunktion verbessert werden. 7 Patienten (Tab. 3) hatten nach Therapieabschluss eine normale Nierenfunktion (Serumkreatinin 0,9-1,0 mg/dl). Davon lag das Kreatinin vor Therapiebeginn bei 5 Patienten bei ≤ 2 mg/dl, bei 2 Fällen bei ≤ 6 mg/dl. 4 Patienten befanden sich nach Therapieende im Stadium I der

chronischen Niereninsuffizienz mit erhöhtem Serumkreatinin (1,4-2,3 mg/dl). Das Ausgangskreatinin dieser Patienten lag hier bei 3 Fällen bei  $\geq 2$  mg/dl und bei einem Patienten  $\geq 6$  mg/dl.

Bei drei Patienten konnte die Nierenfunktion nicht wieder hergestellt werden, diese verblieben dialysepflichtig. Einer der Dialysepatienten verstarb drei Monate nach Therapiebeginn an einer Sepsis.

Alle Patienten der Altersgruppe 24-32 Jahre (n=4) erlangten eine normale Nierenfunktion wieder. Das Ausgangskreatinin lag deutlich niedriger (durchschnittlich 1,6 mg/dl) als bei den älteren Patienten (zwischen 55-74 Jahren), die häufiger niereninsuffizient blieben (Ausgangskreatinin rund 6,9 mg/dl). Auch waren die jüngeren Fälle nicht durch eine gleichzeitig bestehende Hypertonie belastet.

Die anti-GBM-Titer waren nach einem Zeitraum von vier Wochen bis drei Monaten nach Therapieeinleitung nicht mehr nachweisbar.

### **3.3.2 Patienten mit Vaskulitis**

Zu dieser Gruppe zählten 9 Patienten.

#### **3.3.2.1 Allgemeine klinische Angaben**

7 Patienten litten an Morbus Wegener, bei zweien wurde die Diagnose einer mikroskopischen Polyangiitis gestellt. Die Diagnosesicherung erfolgte mittels des Nachweises von C-ANCA (M. Wegener) bzw. P-ANCA (mikroskopische Polyangiitis) sowie durch die Histologie (Nachweis einer granulomatösen/nekrotisierenden Vaskulitis).

Alle Patienten wiesen eine renale Beteiligung im Sinne einer Glomerulonephritis auf, 4 Patienten hatten daneben eine pulmonale Beteiligung. Außerdem waren bei 5 Patienten noch andere Organsysteme, z.B. Nervensystem, in Mitleidenschaft gezogen. Bei 3 Patienten trat ein weiterer Schub der Erkrankung auf, ein Patient erlitt zwei Rezidive. Der Zeitpunkt der Erstdiagnose lag durchschnittlich 5 Jahre zurück (zwischen 1-14 Jahren).

Die Altersverteilung lag zwischen 27 und 74 Jahren, die meisten Patienten (n=5) standen im sechsten Lebensjahrzehnt und damit dem zweiten Altersgipfel der Goodpasture-Patienten nahe. Alle Betroffenen waren männlichen Geschlechts.

**Tab. 4** Symptome bei Diagnosestellung bei Vaskulitis-Patienten

	Anzahl	Prozent
Allgemeinsymptome	8	89
Hämoptysen	4	44
Anämie	3	33
Proteinurie	7	78
Hämaturie	5	56
erhöhtes Serumkreatinin	9	100
- mit terminaler Niereninsuffizienz	0	
- ohne terminale Niereninsuffizienz	9	
Hypertonie	8	89

8 Patienten wiesen allgemeine Krankheitssymptome (Tab. 4) auf (Gewichtsabnahme, Myalgien, Fieber, Husten) bereits mehrere Wochen bis Monate vor Diagnosestellung auf. Bei 4 Patienten traten Hämoptysen auf, die jedoch in keinem Fall zu Beatmungspflicht führten.

Hypertonie als begleitendes Symptom trat bei 8 Fällen auf.

Laborchemisch zeigte sich bei drei Patienten eine Anämie (Hb = 9,0 mg/dl). Die Nierenfunktion aller Patienten präsentierte sich mit einem anfänglich erhöhten Serumkreatinin von durchschnittlich 2,4 mg/dl (Streuung 1,2-4,6 mg/dl und damit niedriger als bei den Goodpasture-Patienten gleichen Alters) sowie mit Hämaturie und/oder mit Proteinurie (zwischen 1,1 und 3,2 g/d).

Die Antikörpertiter lagen im Durchschnitt bei 1: 2560 (1:320-1:10240).

### **3.3.2.2 Therapie und Outcome**

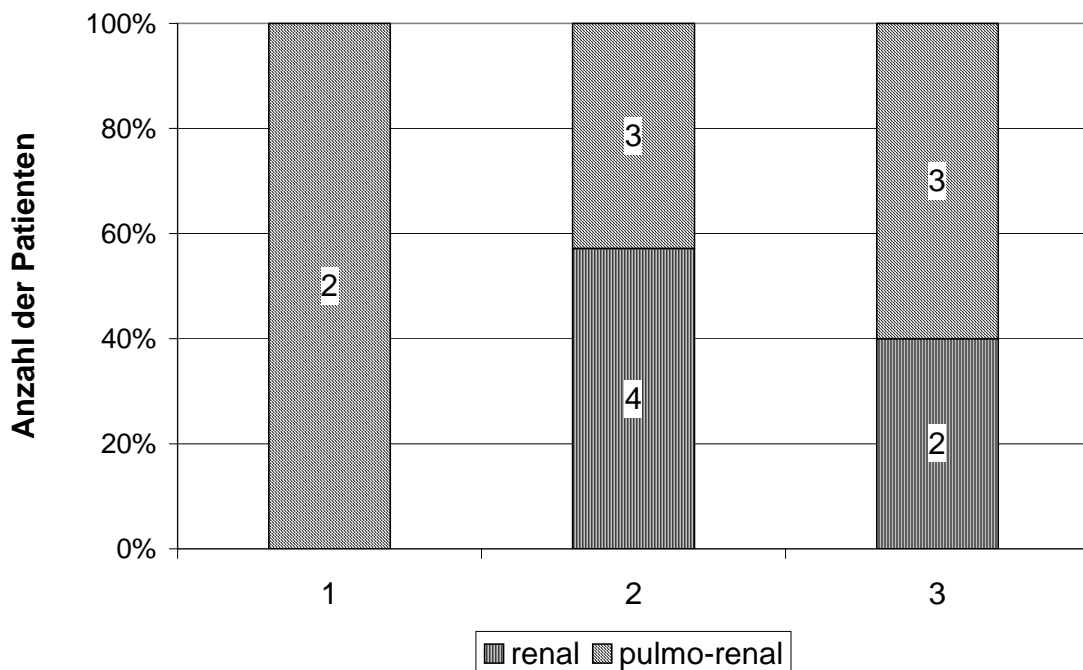
Analog zu den Goodpasture-Fällen wurde allen Vaskulitis-Patienten eine Kombinationstherapie aus Steroiden (anfangs 250-500 mg pro Tag, dann Reduktion) und Cyclophosphamid verabreicht. Cyclophosphamid wurde gepulst in einer Dosierung von 1000-1200 mg alle 4 Wochen über einen Zeitraum von 6 Monaten appliziert, danach oral in einer Dosis von 2 mg/kg KG weiter gegeben (Dauer 12-18 Monate). Die Rezidivpatienten erhielten entweder eine weitere Kombinationstherapie (n=3), ein

Patient wurde auf Azathioprin umgestellt, ein weiterer auf Methotrexat.. Eine Dialyse erübrigte sich bei allen Patienten.

5 Patienten erlangten nach Therapieende eine normale Nierenfunktion zurück (Serumkreatinin 0,9-1,0 mg/dl). Das Serumkreatinin vor Therapie lag bei allen unter 2 mg/dl. 4 Patienten behielten auch 6 Monate nach der Therapie nur eine eingeschränkte Nierenfunktion (Serumkreatinin zwischen 1,6-3,2 mg/dl). Darunter befanden sich ein Patient mit mikroskopischer Polyangiitis, zwei der M. Wegener-Rezidivpatienten sowie eine M. Wegener -Erstdiagnose.

Ingesamt hatten die Vaskulitis-Patienten ein besseres Outcome als die gleich alte Gruppe der Goodpasture-Patienten.

### 3.3.3 Keine Korrelation zwischen Reaktivität der Autoantikörper und klinischem Befallsmuster



**Abb. 15** Vergleich der Autoantikörper - Reaktivität und dem klinischen Befallsmuster: Gruppe 1 (n=2), Gruppe 2 (n=7) und Gruppe 3 (n=5). Deutlich erkennbar ist die relative Gleichverteilung von rein renalem und kombiniert pulmorenalem Befall bei den Gruppen 2 und 3

Bei Betrachtung der obigen Abbildung (Abb. 15) fällt vor allem eine relativ gleiche Verteilung der Fälle mit pulmonaler Mitbeteiligung und isoliertem Nierenbefall über alle ermittelten Gruppen auf. 8 Fälle haben Lungen- und Nierenbefall, 6 Fälle ein rein renales Krankheitsbild.

Bei den Seren mit  $C2 < C6 \ll C2.6$  (Gruppe 2) waren es drei Fälle von 7 insgesamt mit einem Vollbild des Goodpasture-Syndroms, bei den Seren mit dem Charakteristikum  $C2 < C6 = C2.6$  (Gruppe 3) hatten drei der fünf Fälle eine pulmonale Beteiligung– GP H2, GP H7 und GP H13. Die beiden Seren mit dem Kennzeichen  $C2 > C6$  (Gruppe 1) wiesen beide Lungen- und Nierenbeteiligung auf.

Dem stehen vier Fälle mit ausschließlichem Nierenbefall in Gruppe 2 gegenüber, zwei Fälle in der dritten Gruppe.

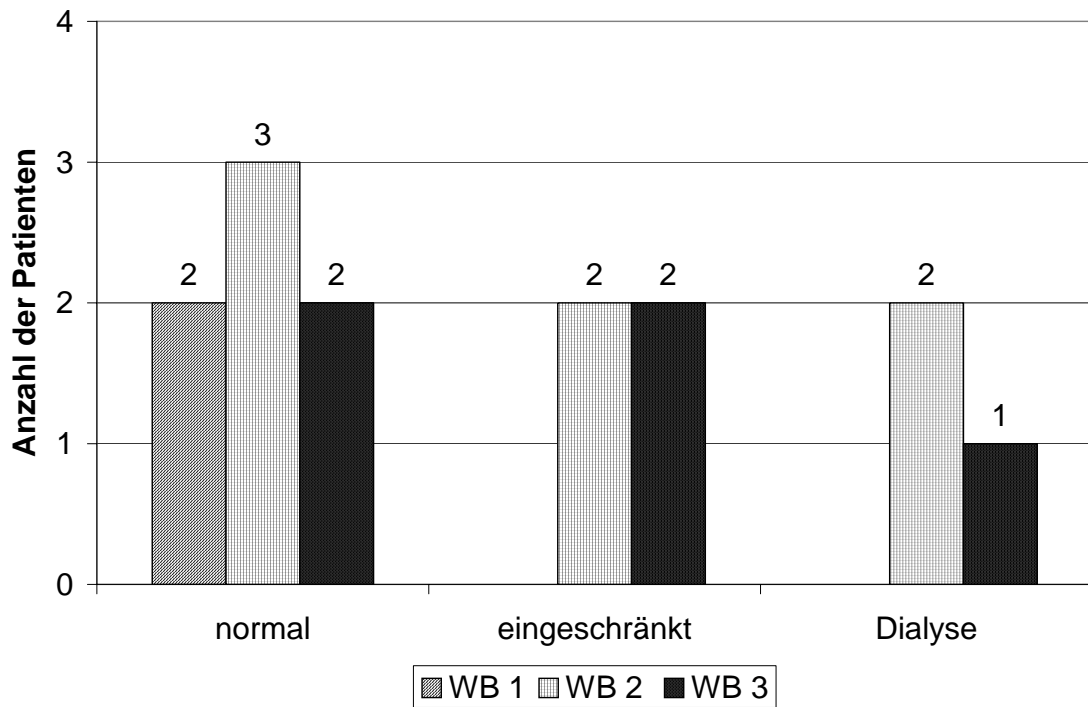
Das Verhältnis von pulmorenal Erkrankten zu rein renal betroffenen Patienten liegt demnach bei Gruppe 2 bei 40 : 60 und bei Gruppe 3 bei 60 : 40. Jedoch erscheint dieser Umstand aufgrund der kleinen Anzahl der getesteten Seren nicht als signifikant.

Interessant ist der Umstand, dass beide Seren der ersten Gruppe von Patienten mit dem Vollbild des Goodpasture-Syndroms stammten. Ob das auch bei einer größeren Anzahl von untersuchten Seren der Fall ist, könnte Gegenstand einer weiterführenden Untersuchung sein.

Insgesamt scheint sich das Befallsmuster des Goodpasture-Syndroms nicht in verschiedenen Antikörperpopulationen mit unterschiedlichen Spezifitäten für Lunge und Niere niederzuschlagen.

### **3.3.4 Die Nierenfunktion eines Patienten am Therapieende korreliert nicht mit unterschiedlichen Antikörperpopulationen**

Da sich Lungenveränderungen besser als eine eingeschränkte Nierenfunktion zurückbilden und somit der Nierenbefall entscheidend für die Prognose eines Patienten ist, stellte sich im Verlauf dieser Arbeit auch die Frage, ob bestimmte Antikörperpopulationen mit einer unterschiedlichen Regeneration der Nierenfunktion - dem Outcome - korrelieren.



**Abb. 16** Vergleich der Autoantikörper - Reaktivität und der Nierenfunktion (Outcome) am Therapieende: Gruppe 1 (n=2), Gruppe 2 (n=7), Gruppe 3 (n=5). Gut erkennbar die ähnliche Verteilung von Nieren gesunden, Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion und Dialysepatienten bei den Gruppen 2 und 3.

Die obige Abbildung zeigt die Beziehung zwischen der Reaktivität der Autoantikörper und dem Outcome der jeweiligen Patienten. Auch hier zeigten sich kaum Unterschiede in der Reaktivität mit den verschiedenen Chimären und der Nierenfunktion am Therapieende .

7 Patienten erlangten eine normale Nierenfunktion wieder, 4 hatten Einschränkungen, drei blieben dialysepflichtig.

Sowohl unter den Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion, als auch unter den dialysepflichtigen Patienten waren die Western Blot - Gruppen 2 und 3 vertreten. Die Nierengesunden dagegen rekrutierten sich aus allen drei bestehenden Western Blot - Gruppen. Aus der Gruppe  $C2 < C6 \ll C2.6$  waren drei Patienten nierengesund ( $\approx 40\%$ ), jeweils zwei waren eingeschränkt bzw. dialysepflichtig. Von den 6 Patienten der Gruppe  $C2 < C6 = C2.6$  hatten zwei Patienten eine voll funktionierende Niere ( $40\%$ ), bei zwei Fällen mit Einschränkung und einem mit Dialyse.

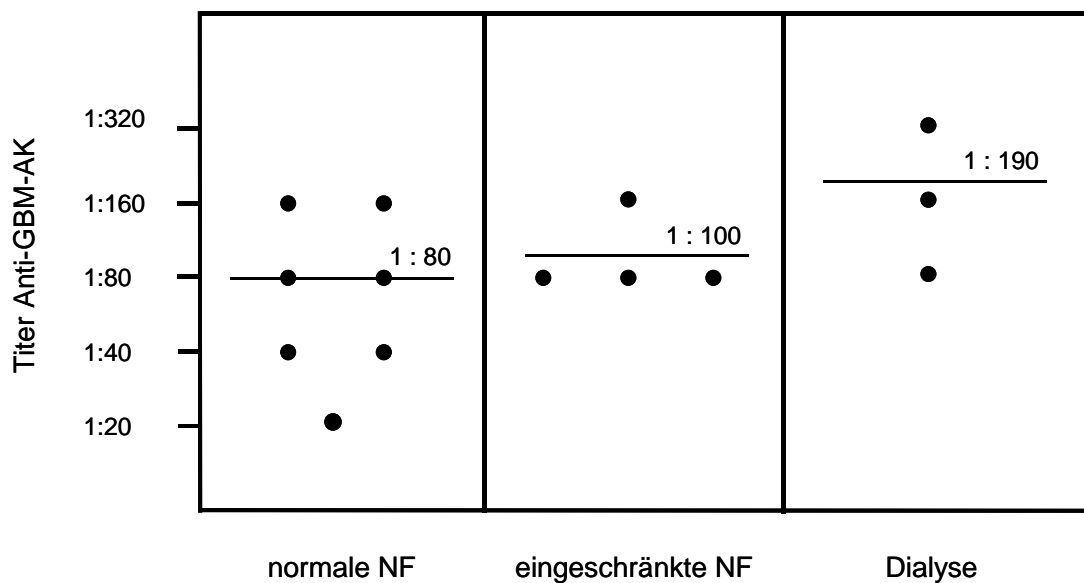
Interessanterweise stammen beide Patienten mit  $C2 \geq C6$  (Gruppe 1) – GP SH und GP H3 - aus der Gruppe der Nierengesunden. Da es sich hierbei nur um Einzelfälle handelt, lässt sich hieraus keine allgemeingültige Aussage ableiten.

Im Chi-Quadrat-Test erwiesen sich die Unterschiede zwischen den drei Gruppen als nicht signifikant ( $p = 0.72$ ).

Unterschiede im Outcome lassen sich daher nicht auf unterschiedliche Antikörperspezifitäten zurückführen.

Auch hinsichtlich der Höhe des Antikörpertiters unterschieden sich Patienten mit normaler bzw. eingeschränkter Nierenfunktion nur gering (Abb. 17). Der Titer bei den Patienten mit normaler Nierenfunktion betrug durchschnittlich 1:80, der durchschnittliche Titer der Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion betrug 1:100. Bei den Fällen mit normaler Nierenfunktion bestand allerdings eine höhere Variabilität als bei denen mit eingeschränkter Nierenfunktion. Dieser Unterschied erscheint aufgrund der relativ geringen Datenmenge nicht als signifikant.

Lediglich die dialysepflichtigen Fälle hatten einen höheren Titer (durchschnittlich 1:190), was auf eine Bedeutung der Antikörpertiterhöhe für den Verlauf hindeuten könnte.



**Abb. 17** Häufigkeit verschiedener Antikörpertiterhöhen je nach Outcome



Tab. 5 Übersicht über klinische und serologische Daten aller Patienten

Pat.-Nr.	Alter [a]	G*	Klinik	Hypertonie	Kreatinin [mg/dl]	Therapiebeginn	Hb [mg/dl]	Proteinurie	Hämaturie	max. AK-Titer	Nf*	Kreatinin [mg/dl]	Therapieende	W-Blot Gruppe
GP SH	48	w	Lunge, Niere	ja	8,1		8,9	ja	ja	1:40	N	0,9		1
GP H3	39	m	Lunge, Niere	ja	2,0		9,8	ja	ja	1:20	N	1,0		1
GP H8	29	m	nur Niere	nein	1,6		7,0	ja	ja	1:160	N	0,9		2
GP H12	32	m	Lunge, Niere	nein	1,8		7,5	nein	nein	1:80	N	1,0		2
GP H6	55	w	nur Niere	ja	3,0		10,0	ja	ja	1:160	N	1,0		2
GP H10	56	w	nur Niere	nein	2,4		12,9	ja	ja	1:80	E	2,2		2
GP HW	55	m	Lunge, Niere	ja	5,8		8,2	ja	nein	1:160	E	1,3		2
GP NI	74	w	nur Niere	ja	7,3		9,0	ja	ja	1:80	D	7,3		2
GP H11	31	m	Lunge, Niere	ja	11,9		8,1	ja	ja	1:320	D	11,6		2
GP H7	30	m	nur Lunge	nein	1,0		11,5	nein	nein	1:80	N	0,9		3
GP H13	24	m	Lunge, Niere	nein	2,0		8,8	ja	nein	1:40	N	1,0		3
GP AH	66	w	nur Niere	ja	6,7		10,0	ja	ja	1:80	E	1,7		3
GP H5	57	w	nur Niere	ja	5,6		6,5	ja	ja	1:80	E	1,6		3

Pat.-Nr.	Alter [a]	G*	Klinik	Hypertonie	Kreatinin [mg/dl]	Therapiebeginn	Hb [mg/dl]	Proteinurie	Hämaturie	max. AK-Titer	Nf*	Kreatinin [mg/dl]	Therapieende	W-Blot Gruppe
GP H2	65	m	Lunge, Niere	ja	12,5		8,2	ja	ja	1:160	D	11,4		3
C* 2	27	m	Lunge, Niere	ja	1,6		7,9	ja	ja	1:320*	N	1,0		V
C* 4	52	m	Lunge, Niere	ja	1,3		10,2	ja	nein	1:2560*	N	1,0		V
C* 5	32	m	Lunge, Niere	ja	2,3		11,3	ja	ja	1:640*	N	0,9		V
C* 10	33	m	nur Niere	nein	1,9		12,1	ja	ja	1:1280*	N	1,0		V
C* SW	52	m	nur Niere	ja	4,6		8,9	ja	ja	1: 10.240*	E	3,2		V
C* 3	51	m	nur Niere	ja	4,2		8,5	ja	ja	1:1280*	E	1,4		V
C* 17	65	m	Lunge, Niere	ja	2,3		13,2	ja	nein	1:1280*	E	1,6		V
P** 11	74	m	nur Niere	ja	1,3		12,8	ja	ja	1:10.240**	N	1,1		V
P** 14	66	m	Lunge, Niere	ja	2,2		10,0	ja	ja	1:640**	E	2,7		V, wie GP

\* NF: Nierenfunktion,

- N: normal
- E: eingeschränkt, aber nicht dialysepflichtig
- D: dialysepflichtig

\*G: Geschlecht

\*C: C-ANCA, auch bei Antikörper-Titern

\*\*P: P-ANCA, auch bei Antikörper-Titern

V: Vaskulitis-Seren siehe weiter vorn

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Autoantikörper verschiedener Patienten - Goodpasture-Syndrom bzw. M. Wegener (C-ANCA positiver Vaskulitis) hinsichtlich ihrer Reaktivität mit den verschiedenen Epitopen des Goodpasture-Autoantigens.

Es wurde die Hypothese geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen Antikörperspezifität und klinischen Besonderheiten hergestellt werden kann.

### 4.1 Feinspezifität der Autoantikörper

Alle 14 untersuchten Goodpasture-Seren reagierten stark mit der  $\alpha 3$  (IV)NC1-Domäne, die in der allgemeinen Literatur als Sitz des Autoantigens beschrieben ist (Butkowski et al, 1987; Hudson et al, 1993b; Kalluri et al, 1995; Saus et al, 1988). Übereinstimmend zeigten alle Seren eine nur sehr schwache Reaktivität mit der  $\alpha 1$ -Kette, die als immunologisch „inert“ anzusehen ist (Dehan et al, 1996). Chimäre C2.6, die die Goodpasture-Epitope GP<sub>A</sub> und GP<sub>B</sub> enthält, hatte die höchste Reaktivität mit den Seren. Bis auf zwei Fälle reagierten die Seren stärker mit C6 als mit C2. Dies steht in Kontrast zu früheren Untersuchungen (Netzer et al, 1999), in denen die untersuchten Seren stärker mit C2 als mit C6 reagierten. Um eine Verwechslung auszuschließen, wurde in der vorliegenden Untersuchung die Identität der Chimären durch eine Sequenzierung der DNA aus den HEK-293 sowie aus den Plasmiden nachgewiesen. Bei zwei der Western Blots (GP SH und GP H3) lag das Ergebnis C2 > C6 vor, was sich mit der oben genannten Beobachtung deckt. Darüber hinaus wurden Untersuchungen an vier kommerziell erhältlichen Seren der Wieslab AG (Lund, Schweden) durchgeführt. Interessanterweise reagierten zwei der Seren mit C2 stärker als mit C6, die anderen beiden zeigten den umgekehrten Fall. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der oben erwähnten Studie wurden nur relativ kleine Fallzahlen untersucht (8 Seren bei Netzer et al., 1999 und 14 Seren in der vorliegenden Arbeit), wobei sich schon abzeichnet, dass die Seren individuell unterschiedlich mit den Chimären C2 (enthält Epitop GP<sub>A</sub>) und C6 (enthält Epitop GP<sub>B</sub>) reagieren. Es bestehen methodische Unterschiede zwischen den beiden Arbeiten, die dies teilweise erklären könnten. In (Netzer et al, 1999) wurden für die Western Blots 200 ng Protein pro Spur aufgetragen

und die Seren 1:100 verdünnt. In der vorliegenden Arbeit wurden 250-500 ng Protein pro Spur aufgetragen und die Seren meist 1: 50 verdünnt.

Ferner wurde für die vorliegende Arbeit ein mitteleuropäisches Patientenkollektiv rekrutiert. Da bei der Auslösung des Goodpasture-Syndroms Viren als epithelschädigende Faktoren eine Rolle spielen (Daly et al, 1996), könnten hierbei Unterschiede zwischen den Kontinenten angenommen werden.

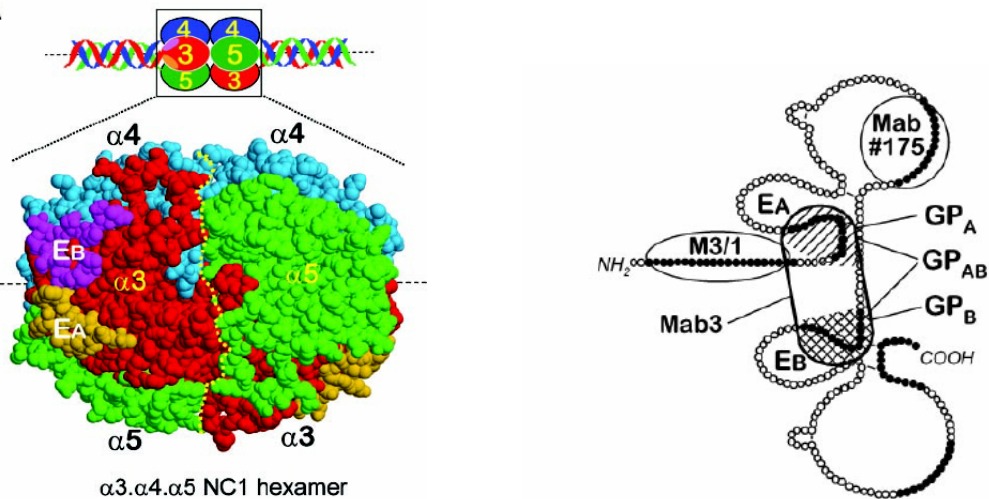
Als mögliche Ursache für das Auftreten verschiedener Antikörperpopulationen GP<sub>A</sub>, GP<sub>B</sub> und GP<sub>AB</sub> wird ein gemeinsamer Ursprung und nachfolgende Affinitätsreifung der Autoantikörper mit geringer Variation der Epitopspezifität (Borza et al, 2000) angenommen.

Beim Goodpasture-Antigen scheinen in der Gesamtschau der eigenen und in der Literatur (Hellmark et al, 1999a; Kalluri et al, 1996b; Neilson et al, 1993; Netzer et al, 1999; Ryan et al, 1998) veröffentlichten Resultate mehrere Areale (insbesondere GP<sub>A</sub>, GP<sub>B</sub>) für die Bindung der Autoantikörper bedeutsam zu sein. Im hier untersuchten Kollektiv erwies sich GP<sub>B</sub> in den meisten Fällen als immunodominant.

Auffällig war die Tatsache, dass einige Seren um ein Mehrfaches stärker an die Chimäre C2.6 (GP<sub>AB</sub>) als an  $\alpha$ 3, das native Antigen, binden.

$\alpha$ 3(IV)NC1 nimmt eine Sonderstellung unter allen  $\alpha$ -Ketten ein. Obwohl eine große Übereinstimmung in den Sequenzen besteht, ist nur die  $\alpha$ 3-Kette in der Lage, ein Goodpasture-Syndrom auszulösen. So löst die Übertragung rekombinanter  $\alpha$ 3(IV)NC1-Domänen im Tierversuch ein Goodpasture-Syndrom aus, die der  $\alpha$ 1(IV)NC1-Domäne jedoch nie (Sado et al, 1998). Auch untersuchte Patientenserum reagierten mit Abstand am stärksten auf  $\alpha$ 3(IV)NC1, einige auch schwach mit anderen  $\alpha$ -Ketten, jedoch keine mit der  $\alpha$ 1-Kette (Dehan et al, 1996).





**Abb. 19** Darstellung des Goodpasture-Epitops. Die Abschnitte  $GP_A$  und  $GP_B$  liegen in räumlicher Nähe zueinander im Inneren des Moleküls an der Grenzfläche zwischen den Untereinheiten. Die Autoantikörper binden an den Regionen  $GP_A$ ,  $GP_B$  oder  $GP_{AB}$  (Borza et al, 2000; Borza et al, 2002)

Hellmark et al. beschrieben hingegen den Gewinn von Antigenität („gain of function“) für das rekombinante Protein, wenn in die  $\alpha 1$ -Kette Aminosäuren von  $\alpha 3$  eingefügt wurden, und einen Funktionsverlust beim umgekehrten Vorgehen (Hellmark et al, 1999a; Hellmark et al, 1999b), wobei die ausgetauschten Aminosäuren nicht hundertprozentig mit denen der vorliegenden Arbeit übereinstimmten.

Auch in der vorliegenden Untersuchung reagierte keines der Seren in nennenswertem Umfang mit der nativen  $\alpha 1$ -Kette.

## 4.2 Keine Korrelation zwischen Outcome und Autoantikörperspezifität bei Goodpasture Syndrom

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem Outcome eines Patienten hinsichtlich seiner Nierenfunktion und den bei ihm vorhandenen Autoantikörper-Subgruppen untersucht.

Am Ende verteilten sich nierengesunde Patienten ebenso wie Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion bzw. Dialysepflicht ohne signifikanten Unterschied auf die ermittelten Westernblotgruppen (Abb. 16). Dies spricht gegen eine mit den vorliegenden Fallzahlen zu ermittelnde Korrelation.

Eine Publikation der Universität Lund, die ebenfalls mit rekombinanten Proteinen die Autoantikörper verschiedener Goodpasture-Patienten untersuchte, kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass Spezifität und Affinität der Autoantikörper keinen Einfluss auf das Ausmaß des renalen Schadens (und damit auf die Prognose) eines Patienten haben (Segelmark et al, 2003). Die Höhe des gemessenen Antikörpertiters hatte in dieser Veröffentlichung (Segelmark et al, 2003) eine Korrelation mit der Nierenfunktion. Ein niedriger Titer wies auf ein besseres renales Überleben hin. Frühere Publikationen fanden ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Höhe des Antikörpertiters und dem Ausmaß des renalen Schadens (Herody et al, 1993; Unanue & Dixon, 1967; Savage et al, 1986).

Auch in der hier vorliegenden Arbeit schien der Trend in diese Richtung zu weisen. Die dialysepflichtigen Patienten hatten im Mittel höhere Titer als solche mit normaler bzw. leicht eingeschränkter Nierenfunktion.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Merkel et al, 1994, die keinen Zusammenhang zwischen Autoantikörpertiter bei Diagnosestellung und dem Outcome fanden.

Hinsichtlich der Prognose des Goodpasture-Syndroms ist vor allem die Entwicklung der Nierenfunktion relevant, da pulmonale Symptome durch die Corticosteroid-Therapie besser rückbildungsfähig sind. Obwohl ältere Publikationen eine hohe Sterblichkeit aufgrund von pulmonalen Blutungen beschrieben (Benoit et al, 1964), ist heute der pulmonale Befall für die Prognose eines Patienten im Vergleich mit isoliertem Nierenbefall somit nicht mehr entscheidend (Herody et al, 1993). Die zuvor erwähnte Untersuchung (Merkel et al, 1994) arbeitete einen Zusammenhang zwischen der Prognose und der Höhe des Serumkreatinins ( $\leq 600 \mu\text{mol/l}$  bzw.  $\geq 600 \mu\text{mol/l}$ ) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung heraus. Auch in (Savage et al, 1986; Herody et al, 1993) ergaben sich eine Korrelation zwischen Serumkreatinin und Prognose.

Bei den hier untersuchten Goodpasture-Patienten verhält es sich ähnlich. Keiner der 7 Patienten wies bei Diagnosestellung ein Serumkreatinin von  $\geq 6 \text{ mg/dl}$  ( $\geq 600 \mu\text{mol/l}$ ) auf.

Auch in der Langzeitbeobachtung spielt das initiale Serumkreatinin für den individuellen Verlauf eines Patienten eine entscheidende Rolle. Levy et al. ermittelten eine Fünfjahresüberlebensrate für den Patienten und für seine Nierenfunktion von

jeweils 94 % bei Patienten mit einem initialen Serumkreatinin von  $\leq 500 \mu\text{mol/l}$ . Für Patienten mit einem Serumkreatinin von  $\geq 500 \mu\text{mol/l}$  bei Diagnosestellung lagen die Daten bei 44 % und 13 % (Überleben des Patienten und renales Überleben) (Levy et al, 2001).

Das Alter des Patienten hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Prognose. In der vorliegenden Arbeit hatte von den jüngeren Patienten (24-32 Jahre alt) ein größerer Anteil eine normale Nierenfunktion als von den der Gruppe 55-74 Jahre. Auch die Studie aus Lund ergab eine schlechtere Prognose der Erkrankung für ältere Patienten (Segelmark et al, 2003). Weiterhin wurde dieser Zusammenhang von anderen Studien bestätigt (Levy et al, 2001; Savage et al, 1986).

Teilweise liegen die Gründe hierfür sicherlich in dem mit zunehmenden Alter häufigeren Auftreten von Begleiterkrankungen, die die Niere vorschädigen können und weniger „Reserven“ älteren Patienten, sowie an der vielleicht schneller eingeleiteten Spezialdiagnostik bei jüngeren Patienten.

### **4.3 Keine Korrelation zwischen Autoantikörperspezifität und klinischem Befallsmuster**

In der vorliegenden Arbeit fand sich keine Korrelation unterschiedlicher klinischer Befallsmuster mit den verschiedenen Reaktionsmustern der Goodpasture-Seren. In den beiden größeren mit dem Western Blot ermittelten Gruppen lag der Anteil an pulmonalem Mitbefall bei 40 und 60 %.

Auch bei Segelmark et al ließ sich bei Patienten mit und ohne Lungenbefall kein Unterschied hinsichtlich Spezifität und Konzentration der Anti-GBM-Autoantikörper ermitteln (Segelmark et al, 2003).

### **4.4 Reaktion der Anti-GBM-Antikörper bei Vaskulitis-Patienten**

Das Vorkommen von mehreren Antikörperpopulationen bei einem Patienten ist keine Seltenheit. Ungefähr 30 % aller Patienten mit Anti-GBM-Autoantikörpern besitzen zusätzliche ANCA (Bosch et al, 1991). Auch ein Teil der Patienten mit ANCA und dem klinischen Bild einer Vaskulitis entwickeln Anti-GBM-Autoantikörper (Jayne et al, 1990). Die hier untersuchten Vaskulitis-Patienten fallen in die letztere Kategorie.



Alle Seren reagierten analog zu den Goodpasture-Patienten mit der  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne. Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen, die belegen, dass Anti-GBM-Antikörper bei ANCA-positiven Patienten auch gegen das Goodpasture-Autoantigen gerichtet sind (Charytan et al, 2003; Hellmark et al, 1997a). Bisher sind noch keine Untersuchungen über die Feinstruktur dieser Autoantikörper erschienen. In der vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass nur ein kleiner Teil ( $n=3$ ) der Seren ähnlich den Goodpasture-Seren reagiert, der andere, weitaus größere Anteil nicht mit den chimären Antigenen ( $\text{GP}_A$ ,  $\text{GP}_B$  oder  $\text{GP}_{AB}$ ) reagiert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachten könnte ein unterschiedlicher Entstehungsmechanismus der Autoantikörperbildung bei der Vaskulitis sein. Die Autoantikörper sind auch gegen andere Anteile der  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne gerichtet und reagieren dann nicht mit den Chimären. Weiterführende Untersuchungen mit anderen Chimären könnten darüber Aufschluss bringen. Auch die Entwicklung und Etablierung eines klinischen Tests zur Erfassung dieser unterschiedlichen Autoantikörperpopulationen bei Patienten, die an Goodpasture Syndrom oder an einer Erkrankung aus dem vaskulitischen Formenkreis leiden, erscheint von großer Bedeutung, da diese Krankheitsbilder sich in ihrer Prognose deutlich unterscheiden.

Die genaue Art der Beziehung zwischen ANCA und Anti-GBM-Autoantikörpern ist noch ungeklärt. Eine Erklärung ist, dass die Vaskulitis infolge ANCA Schäden an der glomerulären Basalmembran verursacht, welche dann zur Bildung von Anti-GBM-Autoantikörpern prädisponiert (Serratrice et al, 2004). Auf der anderen Seite könnte die Rekrutierung von Leukozyten beim Goodpasture-Syndrom auch zur Bildung von ANCA anregen. Auch könnte das Immunsystem durch gemeinsame ätiologische Faktoren zur Bildung von Autoantikörpern per se angeregt werden, deren Spezifität von weiteren Faktoren abhängt (z.B. MHC). Short et. al konnten nachweisen, dass beide Autoantikörperpopulationen nebeneinander existieren (Short et al, 1995).

Die Tatsache, dass das gleichzeitige Vorhandensein von ANCA und Anti-GBM-Antikörpern als prognostisch günstiger anzusehen ist als nur Anti-GBM-Antikörper allein, lässt sich durch mehrere Studien belegen (Bosch et al, 1991; Short et al, 1995; Segelmark et al, 2003).

Ein abweichendes Resultat ergab sich beim Vergleich von im Durchschnitt jüngeren Goodpasture-Patienten (durchschnittlich 37 Jahre alt) mit deutlich älteren (im Mittel 70

Jahre alt) „doppelt“ positiven Patienten (mit mehr Begleiterkrankungen) (Saxena et al, 1995).

In einem weiteren Artikel (Charytan et al, 2003) wurde die Hypothese vertreten, dass bei einem Vaskulitis-Patienten (z.B. Morbus Wegener) aufgetretene Anti-GBM-Autoantikörper keine pathogenetische Bedeutung haben und das Krankheitsbild von ANCA und der zellulären Immunität maßgebend bestimmt wird. Auch in der hier vorliegenden Untersuchung treten Unterschiede zwischen den Vaskulitis-Patienten und den Goodpasture-Patienten hinsichtlich Schwere des Krankheitsbildes und des Outcomes auf. Beim Vergleich identischer Altersgruppen hatten die Vaskulitis-Patienten ein niedrigeres Serumkreatinin vor Therapiebeginn und eine bessere Nierenfunktion bei Therapieende. Über die schlechteste Nierenfunktion verfügten jedoch meist die Patienten, deren Autoantikörperreaktionsmuster dem von Goodpasture-Patienten ähnelten.

Dies wirft die Frage auf, ob es sich bei diesen Patienten nicht primär um ein Goodpasture Syndrom mit sekundärer ANCA Bildung handelt. Auch legt diese Beobachtung die Vermutung nahe, dass die Spezifität der Anti-GBM-Autoantikörper doch eine Bedeutung für den Krankheitsverlauf bei doppelt positiven Patienten könnte, im Gegensatz zu den zitierten Beobachtungen von Charytan et al. (2003).

## 5 Zusammenfassung

Das Goodpasture-Syndrom zählt zum Formenkreis von Autoimmunerkrankungen, die klinisch unter dem Bild eines pulmorenalen Syndroms verlaufen.

Als Goodpasture-Syndrom wird hierbei die Trias aus rapid progredienter Glomerulonephritis, begleitenden Lungenblutungen und dem Auftreten von Anti-GBM-Autoantikörpern bezeichnet.

Neben dieser klassischen Form existieren auch Verläufe, die nur die Nieren (35 %) oder nur die Lunge (5 %) betreffen.

Die B-Zell-vermittelte Immunität trägt den Hauptanteil am Krankheitsgeschehen. Die Autoantikörper sind gegen die NC1-Domäne der  $\alpha 3$ -Ketten des glomerulären Basalmembran Kollagen (Typ IV) gerichtet. In der indirekten Immunfluoreszenz sind als Korrelat dafür charakteristische lineare Ablagerungen von Immunkomplexen zu sehen. Das Goodpasture-Autoantigen ist Bestandteil eines speziellen Kollagennetzwerkes, das nur in der glomerulären und alveolaren Basalmembran vorkommt.

Das Goodpasture-Autoantigen ist von diskontinuierlicher Struktur. Für die Antikörperbindung sind vor allem die Aminosäureabschnitte 17-31 ( $GP_A$ ) und 127-141 ( $GP_B$ ) von  $\alpha 3(IV)NC1$  verantwortlich. Sie werden durch Faltung des Moleküls in räumliche Nähe zueinander gestellt.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob unterschiedliche klinische Verläufe mit verschiedenen Autoantikörperpopulationen korrelieren.

Versuche mit rekombinanten Antigenen zeigten die Existenz mehrerer möglicher Autoantikörpersubklassen. 12 der 14 Seren reagierten stärker mit der Chimäre C6 (entspricht dem Epitop  $GP_B$ ) als mit C2 (entspricht dem Epitop  $GP_A$ ), die beiden anderen Seren hatten ein umgekehrtes Reaktionsverhalten. Sie hatten eine höhere Affinität zu C2 ( $GP_A$ ) als zu C6 ( $GP_B$ ). Von den 12 Seren mit der Reaktion  $C2 < C6$  reagierten 5 Seren etwa gleich stark mit C6 und C2.6 (entspricht  $GP_{AB}$ ). Bei dieser Gruppe richtete sich die Affinität der Autoantikörper hauptsächlich gegen das Epitop  $GP_B$ , das in beiden Chimären enthalten ist. Sieben Seren hatten das Charakteristikum  $C2 < C6 \ll C2.6$ . Hier hatten die Autoantikörper die höchste Affinität zu dem Epitop

GP<sub>AB</sub> als „Gesamtepitop“. Die einzelnen Epitopanteile GP<sub>A</sub> und GP<sub>B</sub> konnten allein keine so starke Bindung erzeugen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung des Goodpasture Syndroms und den Autoantikörpersubklassen zu untersuchen.

In den beiden größeren Gruppen (n=5 und n=7) waren Patienten mit und ohne Lungenbefall eingeschlossen. Die beiden Seren mit C2 > C6 wiesen ebenfalls eine Beteiligung von Lunge und Niere auf. Mit den vorliegenden Fallzahlen war keine Korrelation zu den Autoantikörpersubklassen zu ermitteln.

Das Outcome hinsichtlich der Nierenfunktion wurde ebenfalls auf einen Zusammenhang mit den Autoantikörpersubklassen hin untersucht.

Auch hier ergab sich bei den untersuchten Fallzahlen keine Korrelation mit verschiedenen Autoantikörpersubklassen. Das initiale Serumkreatinin bei Diagnosestellung und in gewissem Umfang auch die Höhe des Antikörpertiters waren die entscheidenden Faktoren.

Der zweite Aspekt der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit sogenannten „doppelt“ positiven Patienten mit pulmorenalem Syndrom.

Diese gehören zu einer Untergruppe von Vaskulitis-Fällen, die neben ANCA auch Anti-GBM-Autoantikörper vorweisen. Klinisch verlaufen diese Fälle oftmals sehr ähnlich wie ein Goodpasture-Syndrom.

Die neun untersuchten Patienten mit C-ANCA (n=7) bzw. P-ANCA (n=2) und Anti-GBM-Autoantikörpern reagierten alle mit der  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -Domäne, jedoch reagierte nur ein Serum Goodpasture-typisch. Die anderen 8 Seren zeigten entweder keinen Synergismus (n=2) oder reagierten nur sehr schwach (< 16 %) mit den Chimären (n=6). Das legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Anti-GBM-Antikörper bei Vaskulitis-Patienten in der Regel nicht mit denen von einfach positiven Goodpasture-Patienten übereinstimmen, sondern gegen verschiedene Substrukturen der Epitope gerichtet sind. Weiterführende Untersuchungen könnten in dieser Frage Klarheit verschaffen. Die Ergebnisse könnten auch zur Entwicklung eines diagnostischen Tests führen, der die Differenzierung der Autoantikörper erlaubt und die Diagnosestellung erleichtert.

Auch bei diesen Patienten fand sich keine Kopplung an den klinischen Verlauf. Insgesamt hatten die „doppelt“ positiven Patienten jedoch einen günstigeren Verlauf als gleich alte „einfach“ positive Goodpasture-Patienten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Andrassy,K., Kuster,S., Waldherr,R., & Ritz,E. (1991) Rapidly progressive glomerulonephritis: analysis of prevalence and clinical course. *Nephron*, **59**, 206-212.
- Benoit,F.L., Rulon,D.B., Doolan,P.D., Theil,G.B., & Watten,R.H. (1964) Goodpasture's syndrome: A clinicopathologic entity. *Am.J.Med.*, **37**, 424-444.
- Borza,D.B., Bondar,O., Ninomiya,Y., Sado,Y., Naito,I., Todd,P., & Hudson,B.G. (2001) The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes. *J.Biol.Chem.*, **276**, 28532-28540.
- Borza,D.B., Bondar,O., Todd,P., Sundaramoorthy,M., Sado,Y., Ninomiya,Y., & Hudson,B.G. (2002) Quaternary organization of the goodpasture autoantigen, the alpha 3(IV) collagen chain. Sequestration of two cryptic autoepitopes by intrapromoter interactions with the alpha4 and alpha5 NC1 domains. *J.Biol.Chem.*, **277**, 40075-40083.
- Borza,D.B., Netzer,K.O., Leinonen,A., Todd,P., Cervera,J., Saus,J., & Hudson,B.G. (2000) The goodpasture autoantigen. Identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the alpha3(IV) collagen chain. *J.Biol.Chem.*, **275**, 6030-6037.
- Bosch,X., Mirapeix,E., Font,J., Borrellas,X., Rodriguez,R., Lopez-Soto,A., Ingelmo,M., & Revert,L. (1991) Prognostic implication of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with myeloperoxidase specificity in anti-glomerular basement membrane disease. *Clin.Nephrol.*, **36**, 107-113.
- Boutaud,A., Borza,D.B., Bondar,O., Gunwar,S., Netzer,K.O., Singh,N., Ninomiya,Y., Sado,Y., Noelken,M.E., & Hudson,B.G. (2000) Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J.Biol.Chem.*, **275**, 30716-30724.
- Braun,M. (1999) Primäre Vaskulitiden. Innere Medizin (ed. by H. Renz-Polster & J. Braun), pp. 1006-1007. Urban & Fischer Verlag, München.
- Briggs,W.A., Johnson,J.P., Teichman,S., Yeager,H.C., & Wilson,C.B. (1979) Antiglomerular basement membrane antibody-mediated glomerulonephritis and Goodpasture's syndrome. *Medicine (Baltimore)*, **58**, 348-361.
- Butkowski,R.J., Langeveld,J.P., Wieslander,J., Hamilton,J., & Hudson,B.G. (1987) Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen. *J.Biol.Chem.*, **262**, 7874-7877.

- Charytan,D.M., Le,D.D., Grossman,J.M., Holthaus,K.A., & Kalluri,R. (2003) Antiglomerular basement membrane autoantibodies are nonpathogenic in Wegener's granulomatosis. *Am.J.Med.*, **115**, 414-415.
- Couser,W.G. (1988) Rapidly progressive glomerulonephritis: classification, pathogenetic mechanisms, and therapy. *Am.J.Kidney Dis.*, **11**, 449-464.
- Daly,C., Conlon,P.J., Medwar,W., & Walshe,J.J. (1996) Characteristics and outcome of anti-glomerular basement membrane disease: a single-center experience. *Ren Fail*, **18**, 105-12.
- David,M., Borza,D.B., Leinonen,A., Belmont,J.M., & Hudson,B.G. (2001) Hydrophobic amino acid residues are critical for the immunodominant epitope of the Goodpasture autoantigen. A molecular basis for the cryptic nature of the epitope. *J.Biol.Chem.*, **276**, 6370-6377.
- Dehan,P., Weber,M., Zhang,X., Reeders,S.T., Foidart,J.M., & Tryggvason,K. (1996) Sera from patients with anti-GBM nephritis including goodpasture syndrome show heterogenous reactivity to recombinant NC1 domain of type IV collagen alpha chains. *Nephrol Dial Transplant*, **11**, 2215-22.
- Derry,C.J., Ross,C.N., Lombardi,G., Mason,P.D., Rees,A.J., Lechler,R.I., & Pusey,C.D. (1995) Analysis of T cell responses to the autoantigen in Goodpasture's disease. *Clin Exp Immunol*, **100**, 262-8.
- Dolz,R., Engel,J., & Kuhn,K. (1988) Folding of collagen IV. *Eur.J.Biochem.*, **178**, 357-366.
- Drachman,D.B. (1994) Myasthenia gravis. *N.Engl.J.Med.*, **330**, 1797-1810.
- 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. *Ann.Intern.Med.*, **113**, 656-663.
- Falk,R.J. & Jennette,J.C. (1988) Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N.Engl.J.Med.*, **318**, 1651-1657.
- Fisher,M., Pusey,C.D., Vaughan,R.W., & Rees,A.J. (1997) Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease is strongly associated with HLA-DRB1 genes. *Kidney Int.*, **51**, 222-229.
- Gunnarsson,A., Hellmark,T., & Wieslander,J. (2000) Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J.Biol.Chem.*, **275**, 30844-30848.
- Gunwar,S., Ballester,F., Kalluri,R., Timoneda,J., Chonko,A.M., Edwards,S.J., Noelken,M.E., & Hudson,B.G. (1991a) Glomerular basement membrane.

- Identification of dimeric subunits of the noncollagenous domain (hexamer) of collagen IV and the Goodpasture antigen. *J Biol Chem*, **266**, 15318-24.
- Gunwar,S., Ballester,F., Noelken,M.E., Sado,Y., Ninomiya,Y., & Hudson,B.G. (1998) Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *J.Biol.Chem.*, **273**, 8767-8775.
- Gunwar,S., Noelken,M.E., & Hudson,B.G. (1991b) Properties of the collagenous domain of the alpha 3(IV) chain, the Goodpasture antigen, of lens basement membrane collagen. Selective cleavage of alpha (IV) chains with retention of their triple helical structure and noncollagenous domain. *J.Biol.Chem.*, **266**, 14088-14094.
- Hellmark,T., Burkhardt,H., & Wieslander,J. (1999a) Goodpasture disease. Characterization of a single conformational epitope as the target of pathogenic autoantibodies. *J.Biol.Chem.*, **274**, 25862-25868.
- Hellmark,T., Niles,J.L., Collins,A.B., McCluskey,R.T., & Brunmark,C. (1997a) Comparison of anti-GBM antibodies in sera with or without ANCA. *J.Am.Soc.Nephrol.*, **8**, 376-385.
- Hellmark,T., Segelmark,M., Unger,C., Burkhardt,H., Saus,J., & Wieslander,J. (1999b) Identification of a clinically relevant immunodominant region of collagen IV in Goodpasture disease. *Kidney Int.*, **55**, 936-944.
- Hellmark,T., Segelmark,M., & Wieslander,J. (1997b) Anti-GBM antibodies in Goodpasture syndrome; anatomy of an epitope. *Nephrol Dial Transplant*, **12**, 646-8.
- Herody,M., Bobrie,G., Gouarin,C., Grunfeld,J.P., & Noel,L.H. (1993) Anti-GBM disease: predictive value of clinical, histological and serological data. *Clin Nephrol*, **40**, 249-55.
- Hudson,B.G., Kalluri,R., Gunwar,S., Noelken,M.E., Mariyama,M., & Reeders,S.T. (1993a) Molecular characteristics of the Goodpasture autoantigen. *Kidney Int.*, **43**, 135-139.
- Hudson,B.G., Reeders,S.T., & Tryggvason,K. (1993b) Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J.Biol.Chem.*, **268**, 26033-26036.
- Hudson,B.G., Wieslander,J., Wisdom,B.J., Jr., & Noelken,M.E. (1989) Goodpasture syndrome: molecular architecture and function of basement membrane antigen. *Lab Invest*, **61**, 256-269.



- Jayne,D.R., Marshall,P.D., Jones,S.J., & Lockwood,C.M. (1990) Autoantibodies to GBM and neutrophil cytoplasm in rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int.*, **37**, 965-970.
- Jenne,D.E., Tschopp,J., Ludemann,J., Utecht,B., & Gross,W.L. (1990) Wegener's autoantigen decoded. *Nature*, **346**, 520.
- Jennette,J.C., Thomas,D.B., & Falk,R.J. (2001) Microscopic polyangiitis (microscopic polyarteritis). *Semin.Diagn.Pathol.*, **18**, 3-13.
- Junqueira,L.C. & Carneiro,J. (1996) Allgemeines zur Histologie. Histologie, pp. 106-107. Springer Verlag, Berlin.
- Kahsai,T.Z., Enders,G.C., Gunwar,S., Brunmark,C., Wieslander,J., Kalluri,R., Zhou,J., Noelken,M.E., & Hudson,B.G. (1997) Seminiferous tubule basement membrane. Composition and organization of type IV collagen chains, and the linkage of alpha3(IV) and alpha5(IV) chains. *J.Biol.Chem.*, **272**, 17023-17032.
- Kallenberg,C.G., Brouwer,E., Weening,J.J., & Tervaert,J.W. (1994) Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int.*, **46**, 1-15.
- Kalluri,R., Danoff,T.M., Okada,H., & Neilson,E.G. (1997) Susceptibility to anti-glomerular basement membrane disease and Goodpasture syndrome is linked to MHC class II genes and the emergence of T cell-mediated immunity in mice. *J Clin Invest*, **100**, 2263-75.
- Kalluri,R., Melendez,E., Rumpf,K.W., Sattler,K., Muller,G.A., Strutz,F., & Neilson,E.G. (1996a) Specificity of circulating and tissue-bound autoantibodies in Goodpasture syndrome. *Proc Assoc Am Physicians*, **108**, 134-9.
- Kalluri,R., Sun,M.J., Hudson,B.G., & Neilson,E.G. (1996b) The Goodpasture autoantigen. Structural delineation of two immunologically privileged epitopes on alpha3(IV) chain of type IV collagen. *J.Biol.Chem.*, **271**, 9062-9068.
- Kalluri,R., Wilson,C.B., Weber,M., Gunwar,S., Chonko,A.M., Neilson,E.G., & Hudson,B.G. (1995) Identification of the alpha 3 chain of type IV collagen as the common autoantigen in antibasement membrane disease and Goodpasture syndrome. *J Am Soc Nephrol*, **6**, 1178-85.
- Kashtan,C.E. & Michael,A.F. (1996) Alport syndrome. *Kidney Int.*, **50**, 1445-1463.
- Leinonen,A., Netzer,K.O., Boutaud,A., Gunwar,S., & Hudson,B.G. (1999) Goodpasture antigen: expression of the full-length alpha3(IV) chain of collagen IV and localization of epitopes exclusively to the noncollagenous domain. *Kidney Int.*, **55**, 926-935.
- Lerner,R.A., Glassock,R.J., & Dixon,F.J. (1967) The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J.Exp.Med.*, **126**, 989-1004.

- Levy, J.B., Lachmann, R.H., & Pusey, C.D. (1996) Recurrent Goodpasture's disease. *Am.J.Kidney Dis.*, **27**, 573-578.
- Levy, J.B., Turner, A.N., Rees, A.J., & Pusey, C.D. (2001) Long-term outcome of anti-glomerular basement membrane antibody disease treated with plasma exchange and immunosuppression. *Ann Intern Med*, **134**, 1033-42.
- Lockwood, C.M., Pinching, A.J., Sweny, P., Rees, A.J., Pussell, B., Uff, J., & Peters, D.K. (1977) Plasma-exchange and immunosuppression in the treatment of fulminating immune-complex crescentic nephritis. *Lancet*, **1**, 63-67.
- Merkel, F., Kalluri, R., Marx, M., Enders, U., Stevanovic, S., Giegerich, G., Neilson, E.G., Rammensee, H.G., Hudson, B.G., & Weber, M. (1996) Autoreactive T-cells in Goodpasture's syndrome recognize the N-terminal NC1 domain on alpha 3 type IV collagen. *Kidney Int.*, **49**, 1127-1133.
- Merkel, F., Netzer, K.O., Gross, O., Marx, M., & Weber, M. (1998) Therapeutic options for critically ill patients suffering from progressive lupus nephritis or Goodpasture's syndrome. *Kidney Int.Suppl*, **64**, S31-S38.
- Merkel, F., Pullig, O., Marx, M., Netzer, K.O., & Weber, M. (1994) Course and prognosis of anti-basement membrane antibody (anti-BM-Ab)-mediated disease: report of 35 cases. *Nephrol Dial Transplant*, **9**, 372-6.
- Morrison, K.E., Germino, G.G., & Reeders, S.T. (1991) Use of the polymerase chain reaction to clone and sequence a cDNA encoding the bovine alpha 3 chain of type IV collagen. *J.Biol.Chem.*, **266**, 34-39.
- Myllyharju, J. & Kivirikko, K.I. (2001) Collagens and collagen-related diseases. *Ann.Med.*, **33**, 7-21.
- Neale, T.J., Tipping, P.G., Carson, S.D., & Holdsworth, S.R. (1988) Participation of cell-mediated immunity in deposition of fibrin in glomerulonephritis. *Lancet*, **2**, 421-424.
- Neilson, E.G., Kalluri, R., Sun, M.J., Gunwar, S., Danoff, T., Mariyama, M., Myers, J.C., Reeders, S.T., & Hudson, B.G. (1993) Specificity of Goodpasture autoantibodies for the recombinant noncollagenous domains of human type IV collagen. *J.Biol.Chem.*, **268**, 8402-8405.
- Netzer, K.O. (1999) Erkrankungendes Typ IV Kollagens der Gefäßbasalmembranen - Pathogenese des hereditären Alport Syndroms und des autoimmunen Goodpasture Syndroms. Habilitationsschrift, Universität Köln.
- Netzer, K.O., Leinonen, A., Boutaud, A., Borza, D.B., Todd, P., Gunwar, S., Langeveld, J.P., & Hudson, B.G. (1999) The goodpasture autoantigen. Mapping the major conformational epitope(s) of alpha3(IV) collagen to residues 17-31 and 127-141 of the NC1 domain. *J.Biol.Chem.*, **274**, 11267-11274.

- Netzer,K.O., Merkel,F., & Weber,M. (1998a) Goodpasture syndrome and end-stage renal failure--to transplant or not to transplant? *Nephrol.Dial.Transplant.*, **13**, 1346-1348.
- Netzer,K.O., Suzuki,K., Itoh,Y., Hudson,B.G., & Khalifah,R.G. (1998b) Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis. *Protein Sci.*, **7**, 1340-1351.
- Ninomiya,Y., Kagawa,M., Iyama,K., Naito,I., Kishiro,Y., Seyer,J.M., Sugimoto,M., Oohashi,T., & Sado,Y. (1995) Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. *J.Cell Biol.*, **130**, 1219-1229.
- Nitze,H. & Böcker,W. (1997) Glomeruläre Erkrankungen. Pathologie (ed. by W. Böcker, H. Denk, & Ph. U. Heitz), p. 740. Urban & Schwarzenberg, München.
- O'Donoghue,D.J., Short,C.D., Brenchley,P.E., Lawler,W., & Ballardie,F.W. (1989) Sequential development of systemic vasculitis with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies complicating anti-glomerular basement membrane disease. *Clin.Nephrol.*, **32**, 251-255.
- Peters,D.K., Rees,A.J., Lockwood,C.M., & Pusey,C.D. (1982) Treatment and prognosis in antibasement membrane antibody-mediated nephritis. *Transplant.Proc.*, **14**, 513-521.
- Phelps,R.G., Jones,V., Turner,A.N., & Rees,A.J. (2000) Properties of HLA class II molecules divergently associated with Goodpasture's disease. *Int.Immunol.*, **12**, 1135-1143.
- Phelps,R.G., Jones,V.L., Coughlan,M., Turner,A.N., & Rees,A.J. (1998) Presentation of the Goodpasture autoantigen to CD4 T cells is influenced more by processing constraints than by HLA class II peptide binding preferences. *J.Biol.Chem.*, **273**, 11440-11447.
- Phelps,R.G., Turner,A.N., & Rees,A.J. (1996) Direct identification of naturally processed autoantigen-derived peptides bound to HLA-DR15. *J.Biol.Chem.*, **271**, 18549-18553.
- Rees,A.J., Lockwood,C.M., & Peters,D.K. (1977) Enhanced allergic tissue injury in Goodpasture's syndrome by intercurrent bacterial infection. *Br.Med.J.*, **2**, 723-726.
- Ryan,J.J., Mason,P.J., Pusey,C.D., & Turner,N. (1998) Recombinant alpha-chains of type IV collagen demonstrate that the amino terminal of the Goodpasture autoantigen is crucial for antibody recognition. *Clin Exp Immunol*, **113**, 17-27.

- Sado,Y., Boutaud,A., Kagawa,M., Naito,I., Ninomiya,Y., & Hudson,B.G. (1998) Induction of anti-GBM nephritis in rats by recombinant alpha 3(IV)NC1 and alpha 4(IV)NC1 of type IV collagen. *Kidney Int*, **53**, 664-71.
- Salama,A.D., Chaudhry,A.N., Holthaus,K.A., Mosley,K., Kalluri,R., Sayegh,M.H., Lechler,R.I., Pusey,C.D., & Lightstone,L. (2003) Regulation by CD25+ lymphocytes of autoantigen-specific T-cell responses in Goodpasture's (anti-GBM) disease. *Kidney Int.*, **64**, 1685-1694.
- Salama,A.D., Chaudhry,A.N., Ryan,J.J., Eren,E., Levy,J.B., Pusey,C.D., Lightstone,L., & Lechler,R.I. (2001a) In Goodpasture's disease, CD4(+) T cells escape thymic deletion and are reactive with the autoantigen alpha3(IV)NC1. *J.Am.Soc.Nephrol.*, **12**, 1908-1915.
- Salama,A.D., Levy,J.B., Lightstone,L., & Pusey,C.D. (2001b) Goodpasture's disease. *Lancet*, **358**, 917-920.
- Saus,J., Wieslander,J., Langeveld,J.P., Quinones,S., & Hudson,B.G. (1988) Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J.Biol.Chem.*, **263**, 13374-13380.
- Savage,C.O., Harper,L., Cockwell,P., Adu,D., & Howie,A.J. (2000) ABC of arterial and vascular disease: vasculitis. *BMJ*, **320**, 1325-8.
- Savage,C.O., Pusey,C.D., Bowman,C., Rees,A.J., & Lockwood,C.M. (1986) Antiglomerular basement membrane antibody mediated disease in the British Isles 1980-4. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)*, **292**, 301-304.
- Saxena,R., Bygren,P., Arvastson,B., & Wieslander,J. (1995) Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome. *J Intern Med*, **238**, 143-52.
- Segelmark,M., Baslund,B., & Wieslander,J. (1994) Some patients with anti-myeloperoxidase autoantibodies have a C-ANCA pattern. *Clin.Exp.Immunol.*, **96**, 458-465.
- Segelmark,M., Butkowski,R., & Wieslander,J. (1990) Antigen restriction and IgG subclasses among anti-GBM autoantibodies. *Nephrol Dial Transplant*, **5**, 991-6.
- Segelmark,M., Hellmark,T., & Wieslander,J. (2003) The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular-basement-membrane antibodies. *Nephron Clin.Pract.*, **94**, c59-c68.
- Seki,T., Naito,I., Oohashi,T., Sado,Y., & Ninomiya,Y. (1998) Differential expression of type IV collagen isoforms, alpha5(IV) and alpha6(IV) chains, in basement membranes surrounding smooth muscle cells. *Histochem.Cell Biol.*, **110**, 359-366.
- Serratrice,J., Chiche,L., Dussol,B., Granel,B., Daniel,L., Jego-Desplat,S., Disdier,P., Swiader,L., Berland,Y., & Weiller,P.J. (2004) Sequential development of

- perinuclear ANCA-associated vasculitis and anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am.J.Kidney Dis.*, **43**, e26-e30.
- Short,A.K., Esnault,V.L., & Lockwood,C.M. (1995) Anti-neutrophil cytoplasm antibodies and anti-glomerular basement membrane antibodies: two coexisting distinct autoreactivities detectable in patients with rapidly progressive glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*, **26**, 439-45.
- Stubbs,M., Summers,L., Mayr,I., Schneider,M., Bode,W., Huber,R., Ries,A., & Kuhn,K. (1990) Crystals of the NC1 domain of human type IV collagen. *J.Mol.Biol.*, **211**, 683-684.
- Sundaramoorthy,M., Meiyappan,M., Todd,P., & Hudson,B.G. (2002) Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes. *J.Biol.Chem.*, **277**, 31142-31153.
- Timpl,R. (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur.J.Biochem.*, **180**, 487-502.
- Timpl,R. & Brown,J.C. (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*, **18**, 123-132.
- Timpl,R., Wiedemann,H., van,D., V, Furthmayr,H., & Kuhn,K. (1981) A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur.J.Biochem.*, **120**, 203-211.
- Turner,A.N. (2001) Goodpasture's disease. *Nephrol.Dial.Transplant.*, **16 Suppl 6**, 52-54.
- Turner,N. & Rees,A.J. (1991) Antiglomerular basement membrane disease. Oxford Textbook of Nephrology, pp. 438-456. Oxford University Press, Oxford.
- Unanue,E.R. & Dixon,F.J. (1967) Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms. *Adv.Immunol.*, **6**, 1-90.
- van der Woude,F.J., Rasmussen,N., Lobatto,S., Wiik,A., Permin,H., van Es,L.A., van der,G.M., van der Hem,G.K., & The,T.H. (1985) Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet*, **1**, 425-429.
- Weber,M.F., Andrassy,K., Pullig,O., Koderisch,J., & Netzer,K. (1992) Antineutrophil-cytoplasmic antibodies and antiglomerular basement membrane antibodies in Goodpasture's syndrome and in Wegener's granulomatosis. *J Am Soc Nephrol*, **2**, 1227-34.
- Westman,K.W., Bygren,P.G., Eilert,I., Wiik,A., & Wieslander,J. (1997) Rapid screening assay for anti-GBM antibody and ANCA; an important tool for the differential diagnosis of pulmonary renal syndromes. *Nephrol Dial Transplant*, **12**, 1863-8.

- Wieslander, J., Langeveld, J., Butkowski, R., Jodlowski, M., Noelken, M., & Hudson, B.G. (1985) Physical and immunochemical studies of the globular domain of type IV collagen. Cryptic properties of the Goodpasture antigen. *J. Biol. Chem.*, **260**, 8564-8570.
- Wilson, C.B. (1996) Renal response to immunological glomerular injury. *The Kidney* (ed. by B. Brenner), pp. 1253-1391. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Wilson, C.B. & Dixon, F.J. (1973) Anti-glomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.*, **3**, 74-89.
- Wilson, C.B. & Dixon, F.J. (1974) Diagnosis of immunopathologic renal disease. *Kidney Int.*, **5**, 389-401.
- Wisdom, B.J., Jr., Gunwar, S., Hudson, M.D., Noelken, M.E., & Hudson, B.G. (1992) Type IV collagen of Engelbreth-Holm-Swarm tumor matrix: identification of constituent chains. *Connect. Tissue Res.*, **27**, 225-234.
- Wong, D., Phelps, R.G., & Turner, A.N. (2001) The Goodpasture antigen is expressed in the human thymus. *Kidney Int.*, **60**, 1777-1783.
- Yurchenco, P.D. & Furthmayr, H. (1984) Self-assembly of basement membrane collagen. *Biochemistry*, **23**, 1839-1850.
- Zhou, J. & Reeders, S.T. (1996) The alpha chains of type IV collagen. *Contrib. Nephrol.*, **117**, 80-104.

## **Danksagung**

Es ist mir ein Anliegen, Herrn Prof. Dr. med G. Ertl, Direktor der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg, für die Möglichkeit der Anfertigung der vorgelegten Arbeit zu danken.

Herrn Prof. Dr. med. C. Wanner, Leiter der Nephrologie, danke ich herzlich für die Möglichkeit, im Nephrologischen Labor promovieren zu können und für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. K.-O. Netzer für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, die wertvollen Ratschläge und die großzügige Unterstützung zu jeder Zeit, insbesondere auch nach dem Weggang von der Universität.

Ebenso möchte ich allen kooperierenden Kliniken und Instituten für die Überlassung der Seren und der klinischen Daten meinen Dank aussprechen.

Desweiteren möchte ich herzlich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Nephrologischen Labors danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit durch ihre Hilfe unterstützt haben. Vielen Dank an Gertraud Baier, Marita Bartrow, Carmen Bauer, Elke Baumeister, Sylvia Renker, Margarethe Röder, Dr. K. Heermeier, Dr. S. Heimpel, Dr. T. Metzger und Dr. U. Raff.

Ganz herzlich möchte ich auch meinen Freunden und ehemaligen Labor-Kollegen Andrea Franz und Martin Wagner (von den ersten gemeinsamen Sonntagen über der Zellkultur bis zum Schließen der Lücken im Material-Teil) bedanken, die ich sonst nicht kennengelernt hätte.

Zum Schluss möchte ich meiner ganzen Familie, meiner Patentante und meinen Freunden danken, die mich in den letzten Jahren immer unterstützt und gestärkt haben. Mein besonderer Dank gilt Steffen, der mich durch alle Hochs und Tiefs der Arbeit begleitet und mir oft wieder Mut gemacht hat.

Ein kleiner Nachsatz sei auch Kasimir, meinem Nachbarskater, gewidmet, der mir während des Zusammenschreibens oft Gesellschaft geleistet hat.

## **Lebenslauf**

Am 09. Mai 1977 wurde ich als Tochter des Arztehepaares Dr. med. Rüdiger Huyke und PD Dr. med. Renate Huyke, geb. Jucht, in Erfurt geboren.

1984 wurde ich dort an der POS „Wilhelm Pieck“ eingeschult. Von 1985-1990 besuchte ich die POS „Friedrich Fröbel“ in Schweina, ab 1990 das Staatliche Gymnasium in Bad Liebenstein. Dort legte ich 1996 das Abitur ab.

Nach der Immatrikulation zum Wintersemester 1996/97 an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg begann ich mit dem Studium der Humanmedizin. Nach bestandenem Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im März 2002 wechselte ich an die Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, wo ich im Sommer 2003 das Medizinische Staatsexamen bestand und die Erlaubnis für die Tätigkeit als Ärztin im Praktikum erlangte.

Im März 2004 begann ich meine Tätigkeit als Ärztin im Praktikum an der Universitätshautklinik in Freiburg.