

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Steinhoff

**Autoantikörper gegen exokrines Pankreas bei Morbus Crohn:
Nachweis unter Verwendung der rekombinanten Zielantigene
CUZD1 und GP2**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
an der Universität zu Lübeck
- Sektion Medizin -

vorgelegt von
Karola Paula Erika Aulinger-Stöcker
aus Lorenzreuth

Lübeck 2017

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gunther Weitz

Zweiter Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ulrich Wellner

Tag der mündlichen Prüfung: 5.3.2018

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 5.3.2018

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Autoantikörper gegen exokrines Pankreas bei Morbus Crohn:

Nachweis unter Verwendung der rekombinanten Zielantigene

CUZD1 und GP2

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Klinisches Bild der chronisch-entzündlichen Darmkrankheiten	1
1.2. Diagnostik	2
1.3. Therapie	4
1.4. Ätiologie	4
1.5. Autoantikörper	5
1.5.1. Fluoreszenzmuster der Autoantikörper, die mit Pankreas-Substraten reagieren	7
1.5.1.1. Spezifische Reaktion mit Pankreasgewebe	7
1.5.1.2. Reaktionen verschiedener weiterer Autoantikörper mit Pankreas	7
1.6. Pankreasantigene CUZD1 und GP2	15
1.6.1. CUZD1	15
1.6.2. GP2	17
2. PATIENTEN - HERKUNFT UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Material	22
3.1.1. Reagenzien für Immunfluoreszenztests	22
3.1.1.1. Antigensubstrate - Gewebe und Zellen	22
3.1.1.2. Chemikalien, Kontrollseren und markierte Antiseren	22
3.1.2. Reagenzien für ELISA	23
3.1.2.1. Antigen-beschichtete Reagenzgefäße	23
3.1.2.2. Chemikalien, Kontrollseren und markierte Antiseren	23

3.2. Geräte	24
3.2.1. Fluoreszenzmikroskop	24
3.2.2. ELISA Washer	24
3.2.3. ELISA Photometer	24
3.3. Methoden	25
3.3.1. Indirekter Immunfluoreszenztest	25
3.3.2. ELISA	27
3.3.2.1. ELISA mit direkter Antigen-Beschichtung	28
3.3.2.2. Capture-ELISA	28
3.3.3. Statistik – Exakter Test nach Fisher	29
4. ERGEBNISSE	30
4.1. Reaktion mit CUZD1- und GP2-transfizierten HEK293-Zellen	30
4.1.1. Visueller Unterschied Pankreasgewebe und rekombinante Zellsubstrate	30
4.2. Gegenüberstellung Immunfluoreszenz und ELISA	35
4.2.1. Auswertung Immunfluoreszenztest	35
4.2.2. ELISA mit direkter Antigen-Kopplung: Gemisch CUZD1 und GP2	36
4.2.3. CUZD1- und GP2-Capture-ELISA	36
4.3. Prävalenz der Autoantikörper gegen exokrines Pankreas (PAk) bei Morbus Crohn	39
4.3.1. Prävalenz der PAk, ermittelt durch Immunfluoreszenz mit Pankreasgewebe	39
4.3.2. Prävalenz der PAk, ermittelt durch Immunfluoreszenz mit transfizierten HEK-Zellen	40
4.3.2.1. Verteilung der Immunglobulin IgG-Subklassen	41
4.3.3. Prävalenz der PAk, ermittelt durch ELISA	42
4.3.3.1. ELISA mit direkter Antigen-Kopplung: Gemisch CUZD1 und GP2	43
4.3.3.2. CUZD1- und GP2-Capture-ELISA	43
4.4. Diagnostisches Potential Pankreasgewebe und transfizierte HEK293-Zellen	48

5. DISKUSSION	55
6. ZUSAMMENFASSUNG	61
7. LITERATURVERZEICHNIS	63
8. PUBLIKATIONEN	73
8.1. Posterpräsentationen	73
8.2. Veröffentlichungen	73
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	75
10. DANKSAGUNG	77
11. LEBENSLAUF	78

1. EINLEITUNG

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. Ihre Ursache ist noch nicht vollständig bekannt. Beide Erkrankungen unterscheiden sich in ihrem makroskopischen und histologischen Erscheinungsbild voneinander, Ähnlichkeiten in der klinischen Symptomatik können die Diagnostik jedoch häufig erschweren.

M. Crohn (Synonyme: Ileitis terminalis, Enteritis regionalis) kann sich von der Mundhöhle bis zum Anus ausdehnen, bevorzugt sind jedoch das terminale Ileum und das Colon betroffen. Die Entzündung kann alle Wandschichten durchdringen (transmural). Colitis ulcerosa bleibt hingegen in der Regel auf den Dickdarm begrenzt, die Entzündung befällt nur die Schleimhaut.

Beide Erkrankungen treten weltweit auf, die weiße Rasse ist aber bevorzugt betroffen. In westlichen Industrieländern beobachtet man chronisch-entzündliche Darmkrankheiten weitaus häufiger als in unterentwickelten Ländern. Innerhalb der Industrieländer besteht ein deutliches Nord-Süd-Gefälle. In Deutschland wird die Inzidenz des M. Crohn mit 2 bis 3 pro 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben, die Prävalenz mit 0,2 bis 0,5%. Die Inzidenz für Colitis ulcerosa betrug in den letzten Jahren 4 bis 10 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, die Prävalenz 0,4 bis 0,8% (Hoffmann et al., 2004; Hoffmann et al., 2008).

Beide Erkrankungen können sich in jedem Lebensalter erstmalig manifestieren, der Altersgipfel liegt im jungen Erwachsenenalter (Sandler et al., 2000). Bis zu 40% der Patienten erkranken bereits vor dem 20. Lebensjahr (Stange et al., 2001). Frauen sind von M. Crohn geringfügig häufiger betroffen (f:m=1,2), bei Colitis ulcerosa ist es umgekehrt (f:m=0,8; Shivananda et al., 1996).

1.1. Klinisches Bild der chronisch-entzündlichen Darmkrankheiten

Leitsymptome des **Morbus Crohn** sind Schmerzen und Durchfall, jedoch selten blutig. Der gesamte Darm kann betroffen sein. In 70% der Fälle ist das terminale Ileum entzündet (Ileitis terminalis), häufig ist auch das proximale Colon einbezogen (Ileozökalregion), daher sind die Schmerzen überwiegend rechts lokalisiert. Bei bis zu 50 Prozent der Patienten manifestiert sich Morbus Crohn auch extraintestinal, an den Gelenken (Arthralgie, Polyarthrit, Spondylarthrit, Spondylarthrit ankylopoetica), der Haut (Erythema nodosum, Pyoderma

gangraenosum), der Mundschleimhaut (Stomatitis aphthosa) oder den Augen (Iridozyklitis, Uveitis). Es treten häufig kutane, enterovesikale (mit rezidivierenden Harnwegsinfekten), enterovaginale, enteroenteritische (mit Kurzdarmsyndrom) oder perianale Fisteln auf, nicht selten als Erstmanifestation. Ebenso finden sich intra- und retroperitoneale Abszesse und Fissuren. Es besteht die Gefahr eines mechanischen Ileus durch Entzündung oder fibröse Strikturen.

Patienten mit **Colitis ulcerosa** leiden unter meist schleimig-blutigem Durchfall, Schleim- und Blutabgang auch ohne Diarrhoe, und Tenesmen. Schmerzen treten seltener auf als bei Morbus Crohn. Die Erkrankung beginnt nahezu immer im Rektum als „hämorrhagische Proktitis“. Meist ist das Sigma einbezogen, die Erkrankung kann das Bild einer „linksseitigen Colitis“ zeigen mit Ausbreitung bis zur linken Flexur. Lediglich bei 10% der Patienten ist das gesamte Colon befallen, nur ausnahmsweise das Ileum („Backwash-Ileitis“). Bei schweren Verläufen kann sich ein toxisches Megacolon bilden mit der Gefahr einer Darmwand-Perforation. Nach langjähriger Colitis ulcerosa und schwerem Verlauf besteht ein erhöhtes Karzinomrisiko. Extraintestinale Manifestationen finden sich weitaus seltener als bei Morbus Crohn. Colitis ulcerosa ist häufig mit primär-sklerosierender Cholangiitis vergesellschaftet.

1.2. Diagnostik

In der Diagnostik der chronisch-entzündlichen Darmkrankheiten stehen neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung heute Endoskopie und Histologie im Vordergrund. Darüber hinaus führt man Labor- und Ultraschalluntersuchungen durch.

Bei **Morbus Crohn** beobachtet man **endoskopisch** ein diskontinuierlich-segmentales Ausbreitungsmuster, das Ileum ist meistens stärker befallen als das Colon, selten das Rektum. Befallene Bezirke wechseln sich mit gesunden Bereichen ab („skip lesions“). Anfangs findet man disseminierte Schleimhautläsionen, fleckige Rötungen, scharf begrenzte, landkartenartige, longitudinale Ulzerationen und Aphthen, Abszesse, Fissuren und Fisteln. Da entzündlich verdickte und tief ulzerierte Schleimhautareale abwechselnd nebeneinander liegen, erinnert die Oberfläche an Pflastersteine („Pflastersteinrelief“). Mehrere Darmabschnitte können miteinander zu entzündlichen, bei der Untersuchung oft tastbaren „Konglomerat-Tumoren“ verkleben. Im Spätstadium treten häufig Stenosen auf,

oft mit prä-stenotischer Dilatation, vorzugsweise im terminalen Ileum, das bis auf Bleistiftstärke eingeengt sein kann.

Histologisch lässt sich eine Entzündung aller Wandschichten nachweisen (transmural). Es finden sich Mikrogranulome und Epitheloidzell-Granulome mit mehrkernigen Riesenzellen, und man beobachtet eine Hyperplasie der Lymphknoten.

Bei **Colitis-ulcerosa**-Patienten ist nur das Colon befallen, ausnahmsweise auch das terminale Ileum - wenn die Bauhin'sche Klappe entzündet ist, nicht mehr richtig abdichtet, und Coloninhalt in das Ileum übertreten kann („Backwash Ileitis“ – dieser Mechanismus lässt sich allerdings anzweifeln: Vielleicht ist die hohe Becherzellichte im terminalen Ileum ein besserer Erklärungsansatz). Das Ausbreitungsmuster ist kontinuierlich, die Entzündung nimmt von oral zum Rektum hin zu. Die Ulzera sind oberflächlich und unscharf begrenzt, Rötungen diffus. Die Schleimhaut ist hyperämisch, feingranuliert, ödematös und gekennzeichnet durch erhöhte Vulnerabilität, spontan oder durch Berührung mit dem Endoskop treten Kontaktblutungen auf. Eine Hyperregeneration der Schleimhaut führt oft zu Pseudopolypen. Bei chronischem Verlauf entsteht durch Aufhebung der Haustrierung und Verkürzung des Colons in der Röntgen-Kontrast-Darstellung ein Bild, das einem „Fahrradschlauch“ gleicht.

In den Gewebeproben der Patienten mit Colitis ulcerosa findet man histologisch nur flache Ulzerationen, die Entzündung bleibt intramural auf Mucosa und Submucosa begrenzt. Es können sich Kryptitis, Kriptenabszesse, und durch Hyperplasie anisomorphe Kripten ausbilden. Man beobachtet eine Epitheldysplasie und Schleimhautatrophie, die Anzahl der Becherzellen ist oft vermindert.

Neben dem Röntgen ergänzen Sonographie und Kernspin-Tomographie die Diagnostik. Laborparameter wie die Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit, des C-reaktiven Proteins und der Leukozytenzahl dienen der Beurteilung der entzündlichen Aktivität und der Verlaufskontrolle.

Differentialdiagnostisch muss bei blutigem Durchfall eine infektiöse Colitis ausgeschlossen werden, bei wässrigem Durchfall ein Colon irritabile oder eine Lactose-Intoleranz. Akute Unterbauchschmerzen lassen an eine Appendicitis, Yersinien-Lymphadenitis oder Divertikulitis denken, periumbilicale oder epigastrische Schmerzen können auch durch ein

Ulcus ventriculi oder duodeni, Dyspepsie, Lactose-Intoleranz oder ein Colon irritabile ausgelöst werden.

1.3. Therapie

Die **konservative Behandlung** der chronisch-entzündlichen Darmkrankheiten hat das Ziel, im akuten Krankheitsschub die Entzündung einzudämmen und während der Remission erneuten Schüben vorzubeugen. Es kommen in erster Linie Glucocorticoide zum Einsatz - intravenös, oral, oder rektal.

Systemisch wirksame Glucocorticoide werden nur bei schwerem Schub eines **Morbus Crohn** angewendet, sonst wegen der geringeren systemischen Nebenwirkungen das lokal wirksame Budesonid (Hoffmann et al., 2008). Steroid-refraktäre Fälle werden mit Azathioprin behandelt, oder mit Infliximab, einem monoklonalen Antikörper gegen das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor-alpha. Häufig ist es erforderlich, bei Morbus Crohn chirurgisch zu intervenieren, um Fisteln oder Obstruktionen zu exzidieren oder Abszesse zu drainieren.

Auch bei **Colitis ulcerosa** werden zur **konservativen Behandlung** schwerer Schübe Glucocorticoide eingesetzt, zur Dauertherapie dienen 5-Aminosalicylate (5-ASA = Mesalazin), Salazosulfapyridin oder Olsalazin (Stange et al., 2001). Azathioprin und sein aktiver Metabolit 6-Mercaptopurin können als Dauertherapie zur Einsparung von Glucocorticoiden gegeben werden, Ciclosporin und Tacrolimus bei steroidrefraktärem Schub. Diätetische Maßnahmen ergänzen die medikamentöse Therapie. Eine **operative Therapie** ist bei Colitis ulcerosa durch Resektion des Colon (Colectomie) möglich, jedoch nur als ultima ratio in lebensbedrohlichen Situationen (z.B. toxisches Megacolon) oder bei Nichtansprechen auf eine medikamentöse Therapie.

1.4. Ätiologie

Die Ursache der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist noch weitgehend unbekannt. Genetische, immunologische und Umweltfaktoren spielen bei der Pathogenese eine Rolle. Man vermutet, dass bei genetisch prädisponierten Personen eine Entgleisung des Immunsystems durch Stress oder andere auslösende Faktoren getriggert wird. Unter

anderem korreliert die Inzidenz der chronisch-entzündlichen Darmkrankheiten mit der industriellen Entwicklung.

Hinweise auf eine **genetische Disposition** geben die Beobachtungen, dass bei 10% der Patienten mit Morbus Crohn auch andere Familienmitglieder betroffen sind (Orholm et al., 1991). Eine hohe Konkordanz (50-60%) ist bei eineiigen Zwillingen zu beobachten, gegenüber 4% bei heterozygoten Zwillingen (Thompson et al., 1996). Durch Genom-Analysen konnte in der Region IBD1 auf dem Chromosom 16q ein Gen lokalisiert werden, das mit Morbus Crohn assoziiert ist (Hampe et al., 2001; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Träger einer oder mehrerer der drei identifizierten Mutationen im NOD2(=CARD15)-Gen haben gegenüber der Normalbevölkerung ein um das 30- bis 100-fache erhöhtes Risiko, an Morbus Crohn zu erkranken (Hampe et al., 2002).

1.5. Autoantikörper

Die **Unterscheidung** zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist manchmal schwierig, und häufig kann aus dem klinischen Bild, der endoskopischen Untersuchung und den histologischen Verfahren die Diagnose nicht eindeutig gestellt werden. Hier kann die Labordiagnostik mit der Bestimmung von Autoantikörpern zur Klärung zweifelhafter Fälle beitragen. **Antikörper gegen Bestandteile des Pankreas-Saftes** sind mit M. Crohn assoziiert, sie sind spezifische Marker für M. Crohn und Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Nur gelegentlich treten sie auch bei Colitis ulcerosa auf, und sehr selten bei Pankreatitis, hier jedoch in Form der Immunglobulinklasse IgA und nie in hoher Konzentration. Titer über 1:32 findet man ausschließlich bei M. Crohn (Stöcker et al., 1984).

Für Colitis ulcerosa wurden **Autoantikörper gegen intestinale Becherzellen** erstmals 1959 beschrieben (Broberger und Perlmann, 1959). Sie werden bei 28% der Patienten gefunden, jedoch so gut wie nie bei Patienten mit M. Crohn oder bei Gesunden (Stöcker et al., 1987). Damit stellen sie pathognomonische Marker und ein diagnostisches Merkmal für die Colitis ulcerosa dar.

Bereits im Jahr 1987 wurden **Autoantikörper gegen Granulozyten** (pANCA) als in humanen Gewebeschnitten fluoreszierende Strukturen beobachtet (Stöcker et al., 1987), jedoch noch nicht als solche identifiziert. Saxon et al. konnten zeigen, dass es sich um Granulozyten handelt (Saxon et al., 1990). 76% der Seren von Patienten mit Colitis ulce-

rosa und 7% der Seren von Patienten mit M. Crohn enthalten diese Antikörper. Die korrespondierenden Antigene, vorwiegend DNA-komplexiertes Laktoferrin und Azurocidin, wurden 2009 von unserer Arbeitsgruppe identifiziert, unter Einsatz des von mir etablierten Serumkollektivs (Teegen et al., 2009).

Von diagnostischer Bedeutung sind weiterhin **Antikörper gegen Saccharomyces cerevisiae** (ASCA, Anti Saccharomyces cerevisiae Antikörper), die man in 67% bei M. Crohn und in 2% bei Colitis ulcerosa findet (Main et al., 1988). Darüber hinaus wurden bei Patienten mit Morbus Crohn Antikörper gegen Cardiolipin und gegen Phosphatidylserin/Prothrombin häufiger gefunden als bei Colitis ulcerosa und bei Gesunden (Sipeki et al., 2015), sowie bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa signifikante Konzentrationen an Anti-IF16-Antikörpern (Anti interferon gamma inducible protein 16 antibodies) (Caneparo et al., 2016, Caneparo et al., 2017), deren Titer sich durch eine Infliximab-Therapie deutlich verringerte, und die somit als Biomarker für ein Ansprechen auf Infliximab dienen könnten. In jüngster Zeit wurden zudem Antikörper gegen SNRPB (Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B und B') als mögliche Marker bei Patienten mit Morbus Crohn identifiziert (Wang et al., 2017).

Eine klassische Methode für den **Nachweis** von Autoantikörpern ist die **indirekte Immunfluoreszenz**: Dünnschnitte gefrorenen Gewebes oder Zellpräparationen, die das korrespondierende Antigen enthalten, werden auf Objektträgern mit flüssigen Proben und Reagenzien zusammengebracht. Anschließend werden im Fluoreszenzmikroskop die charakteristischen Muster identifiziert. Die Beurteilung der Ergebnisse im Fluoreszenzmikroskop erfordert umfangreiche Erfahrung. Es gilt, spezifische Fluoreszenzmuster von unspezifischen zu unterscheiden und den Endpunkt einer Titrationsreihe zu bestimmen.

Ein alternatives Verfahren für den Antikörpernachweis ist der **ELISA** (Enzyme linked immunosorbent assay), bei dem das korrespondierende Antigen an eine feste Phase gekoppelt ist, zum Beispiel an Reaktionsgefäße aus Polystyrol. Um diesen Test anwenden zu können, muss das Antigen biochemisch isoliert sein und ein Verfahren zur Kopplung zur Verfügung stehen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt photometrisch und somit objektiv.

Die mit M. Crohn assoziierten **Autoantikörper gegen exokrines Pankreas** stellen sich in der Immunfluoreszenz in **zwei unterschiedlichen Mustern** dar: Man beobachtet entwe-

der eine netzig-granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma der Azinuszellen, die lumenwärts am stärksten ausgeprägt ist, oder es sind hell fluoreszierende Tropfen in den Azinuszell-Apices und im Lumen der Azini zu sehen (Stöcker et al., 1987). Gelegentlich treten beide Muster im selben Serum nebeneinander auf. Die Vermutung liegt nahe, dass im Pankreassaft zwei unterschiedliche Antigene vorliegen.

1.5.1. Fluoreszenzmuster der Autoantikörper, die mit Pankreas-Substraten reagieren

In der Immunfluoreszenz mit Pankreasgewebe als Substrat kann man eine Vielzahl verschiedener Autoantikörper darstellen, sowohl organspezifische, gegen die exokrinen und die endokrinen Strukturen gerichtete Autoantikörper, als auch nicht-organspezifische Antikörper.

1.5.1.1. Spezifische Reaktion mit Pankreasgewebe

Autoantikörper gegen exokrines Pankreas rufen auf den Gefrierschnitten zwei unterschiedliche Fluoreszenzmuster hervor: Bei einem Teil der Seren eine netzig-granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma der Azinuszellen, die sich zum Lumen hin deutlich verstärkt (netzig-granuläres Muster, Abbildungen 1 und 2), bei dem anderen Teil in den Lumina der Azini fluoreszierende Tropfen (tropfiges Muster, Abbildungen 3 und 4). Bei einigen Seren treten beide Muster gleichzeitig nebeneinander auf (Abbildungen 5 und 6). Die Langerhans'schen Inseln werden von den Morbus-Crohn-assoziierten Autoantikörpern nicht angefärbt. Abbildung 7 zeigt einen Gewebeschnitt, der mit einem Serum ohne Pankreas-reaktive Autoantikörper inkubiert wurde (negatives Ergebnis).

1.5.1.2. Reaktionen verschiedener weiterer Autoantikörper mit Pankreas

Einige weitere Autoantikörper reagieren mit Pankreasgewebe: In Abbildung 8 erkennt man **Autoantikörper gegen Inselzellen**, wie sie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 oder mit Stiff-Man-Syndrom auftreten. Das Zytoplasma aller Inselzellen ist glatt bis körnig angefärbt, die Inseln sind deutlich vor dem dunklen Hintergrund des Gewebeschnittes zu identifizieren. **Autoantikörper gegen Transglutaminase** (Abbildung 9) entsprechen den Autoantikörpern gegen Endomysium, man findet sie bei Patienten mit Gluten-sensitiver Enteropathie und bei Patienten mit Dermatitis herpetiformis Duhring. Sie reagieren mit dem Endothel der Blutgefäße und erzeugen eine lineare Fluoreszenz. **Antinukleäre Autoantikörper** (ANA, Abbildung 10) treten bei Lupus erythematodes und bei einer Reihe

weiterer Autoimmunkrankheiten auf. Je nach Zielantigen zeigen die Zellkerne ein homogenes, feingranuläres oder grobgranuläres Muster, oder es ist lediglich die Kernmembran angefärbt. **Autoantikörper gegen Mitochondrien** (Antimitochondriale Antikörper, AMA, Abbildung 11) sind diagnostische Marker der primär-biliären Leberzirrhose. Sie erzeugen eine granuläre Fluoreszenz des Zytoplasmas auf einer Vielzahl von Substraten. Die **Autoantikörper gegen Tropomyosin** (Abbildung 12) und gegen **Zytokeratin** (Abbildung 13) haben keine diagnostische Relevanz.

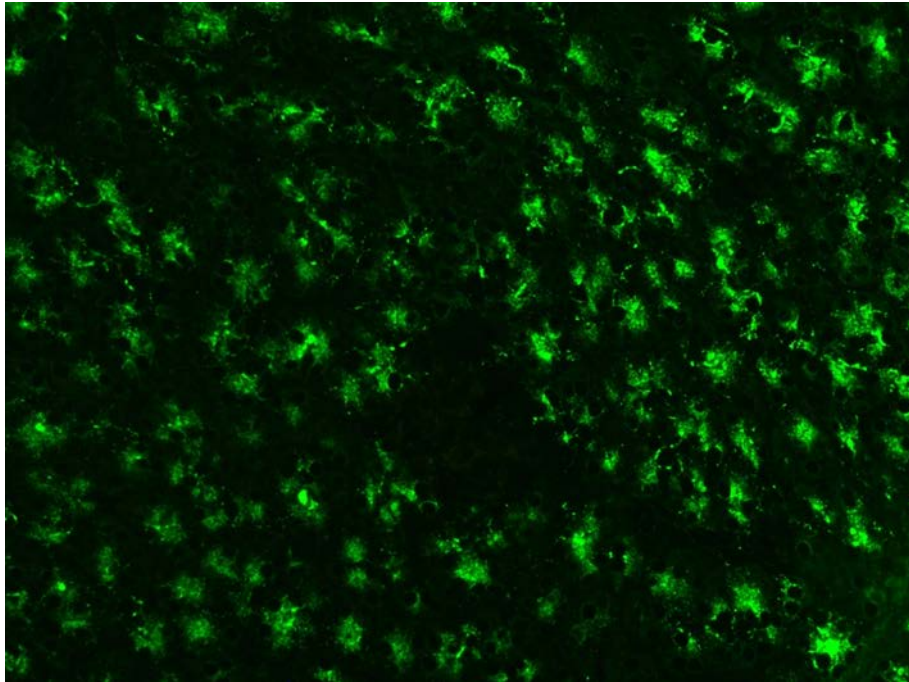


Abbildung 1: Autoantikörper gegen Azinuszellen des Pankreas, nachgewiesen im indirekten Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Muster netzig-granulär, Vergrößerung 200fach.

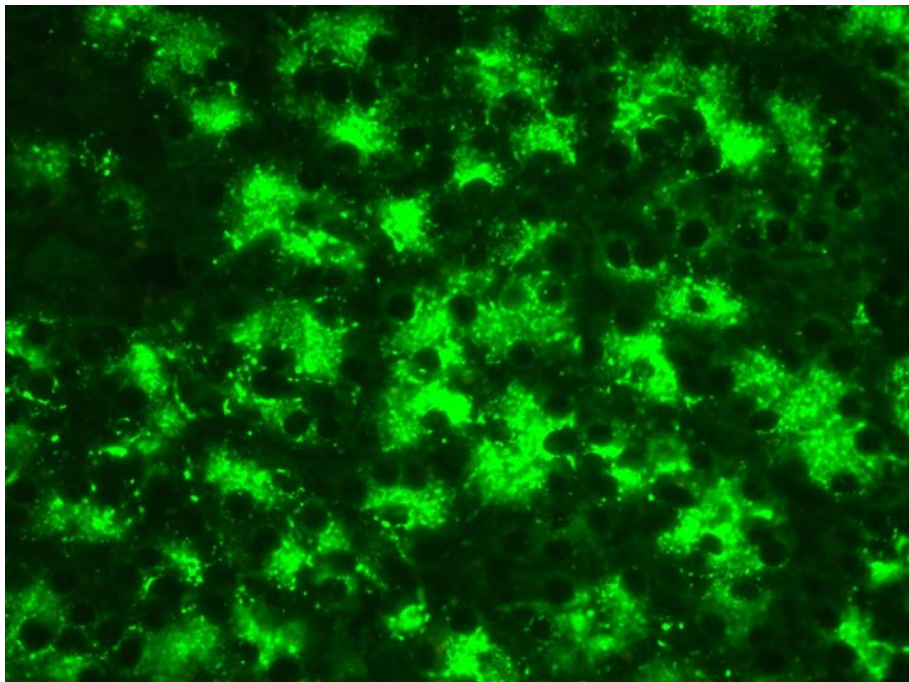


Abbildung 2: Autoantikörper gegen Azinuszellen des Pankreas, nachgewiesen im indirekten Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Muster netzig-granulär, Vergrößerung 400fach.

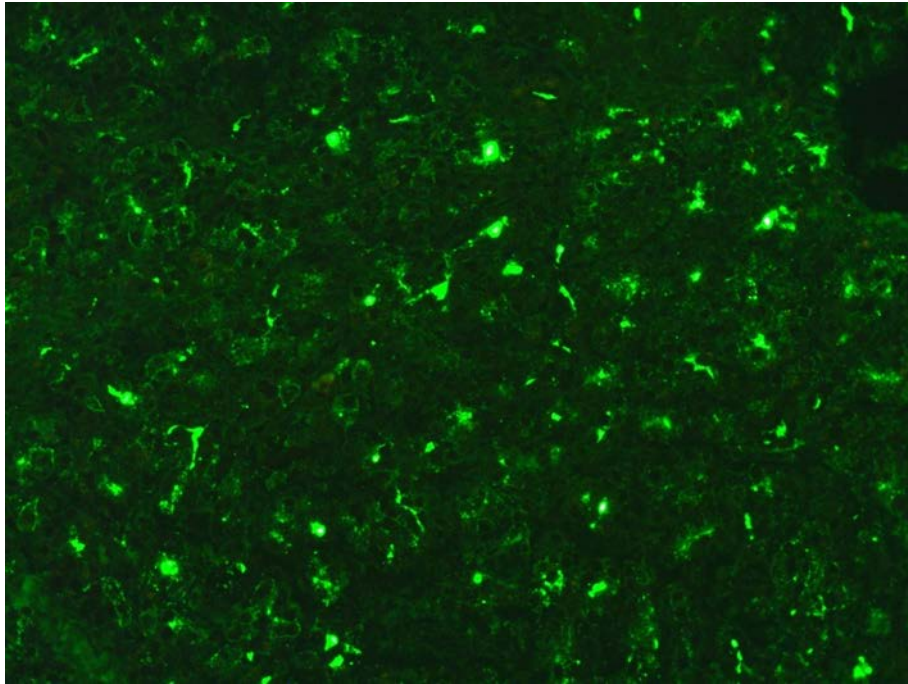


Abbildung 3: Autoantikörper gegen Azinuszellen des Pankreas, nachgewiesen im indirekten Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Muster tropfig, Vergrößerung 200fach.

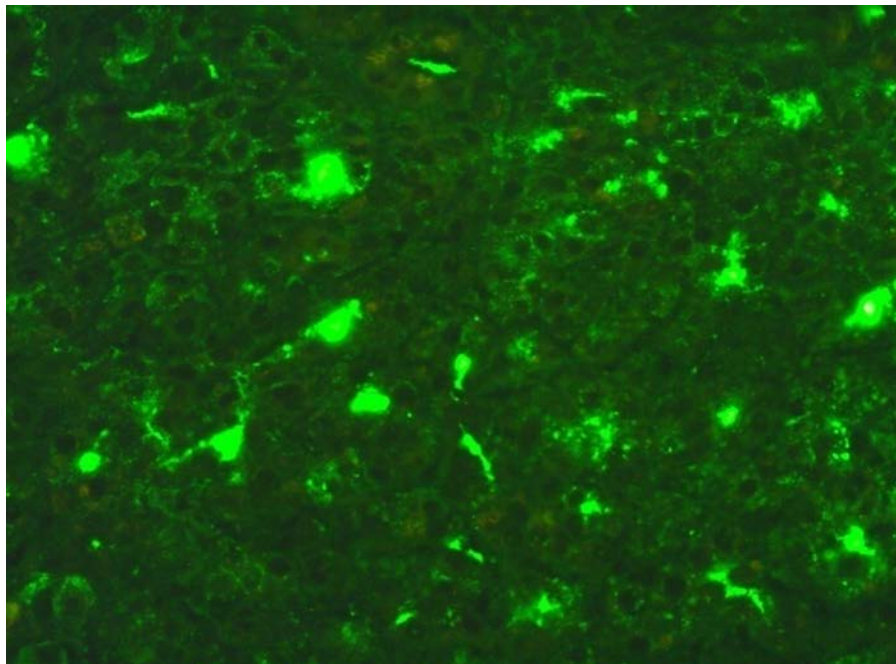


Abbildung 4: Autoantikörper gegen Azinuszellen des Pankreas, nachgewiesen im indirekten Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Muster tropfig, Vergrößerung 400fach.

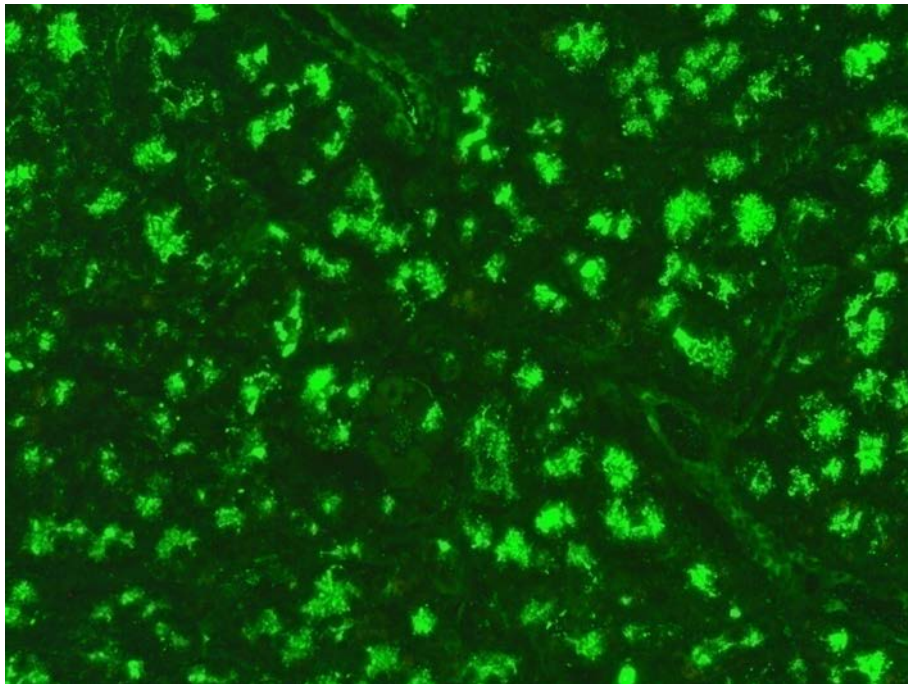


Abbildung 5: Autoantikörper gegen Azinuszellen des Pankreas, nachgewiesen im indirekten Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Musterkombination netzig-granulär und tropfig, Vergrößerung 200fach.

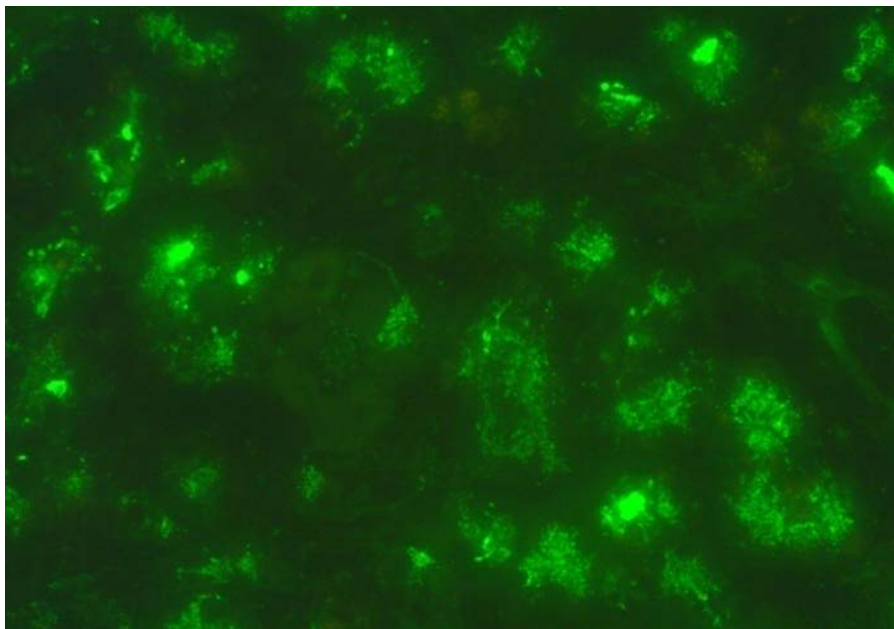


Abbildung 6: Autoantikörper gegen Azinuszellen des Pankreas, nachgewiesen im indirekten Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Musterkombination netzig-granulär und tropfig, Vergrößerung 400fach.

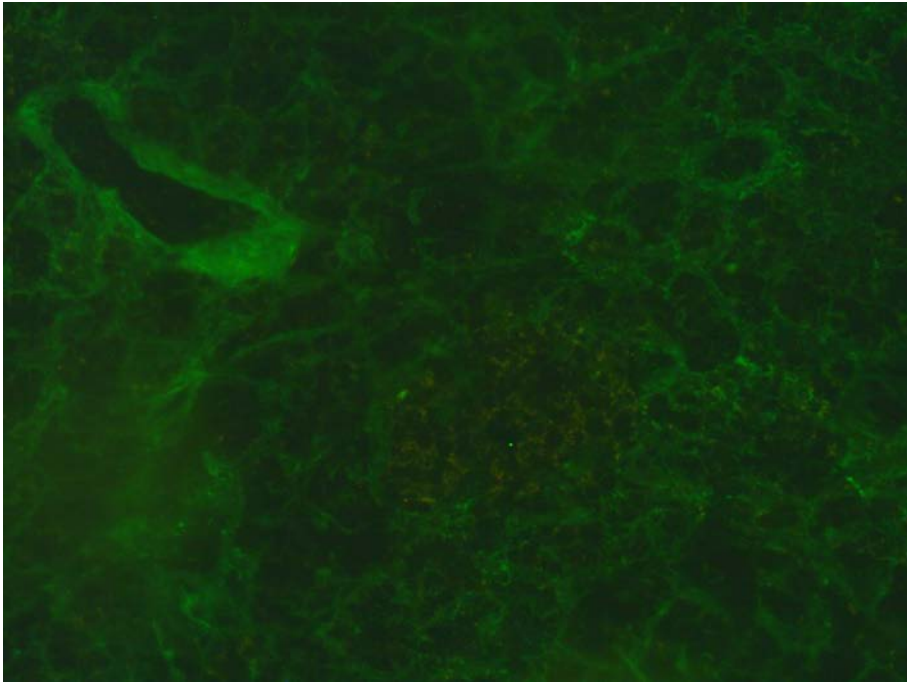


Abbildung 7: Indirekter Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Serum ohne Pankreas-reaktive Autoantikörper (negatives Ergebnis).

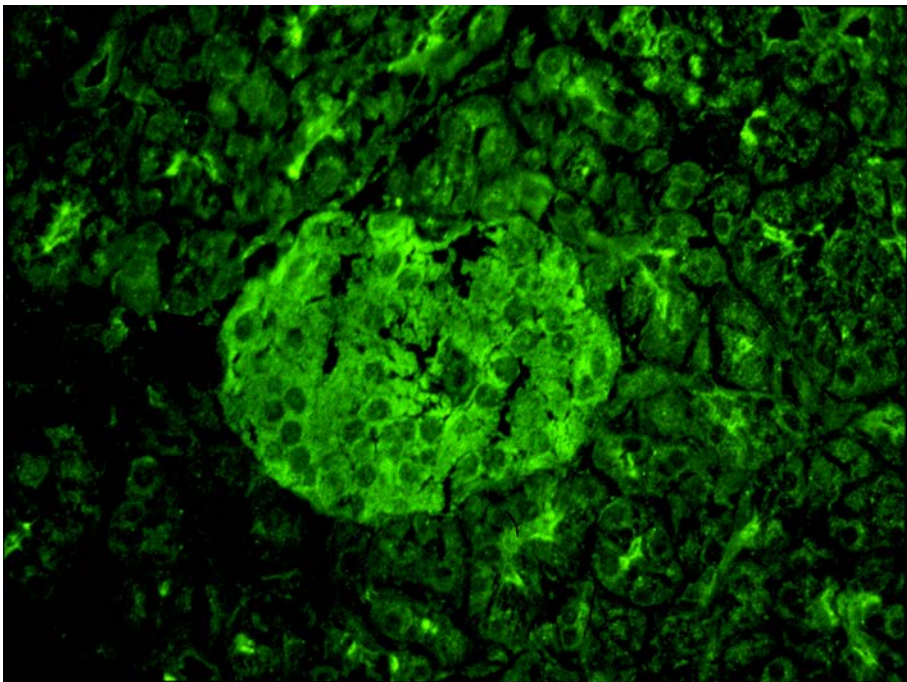


Abbildung 8: Indirekter Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Autoantikörper gegen Inselzellen.

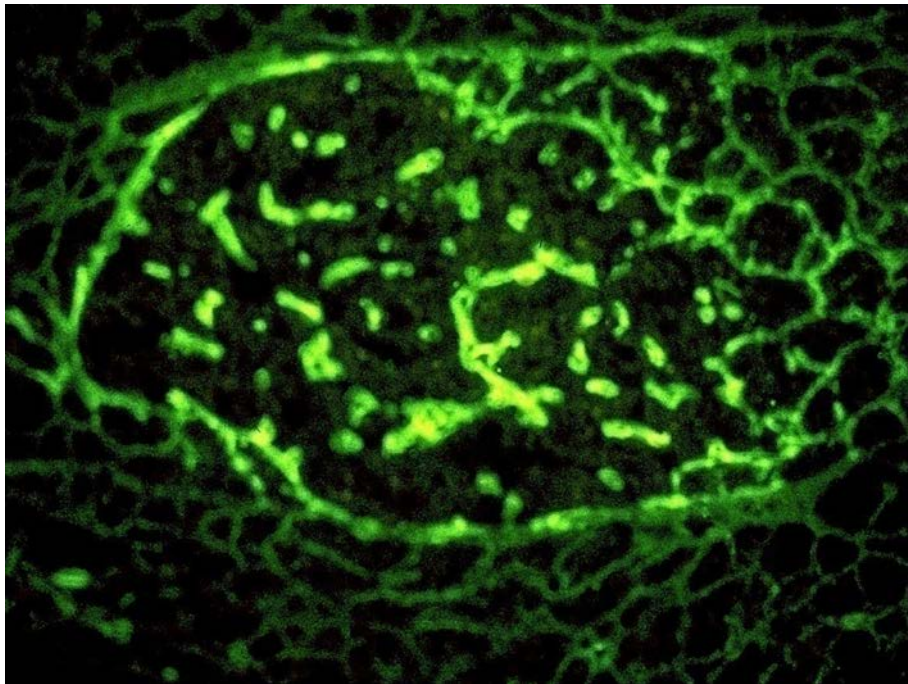


Abbildung 9: Indirekter Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Autoantikörper gegen Gewebs-Transglutaminase (entspricht Autoantikörpern gegen Endomysium).

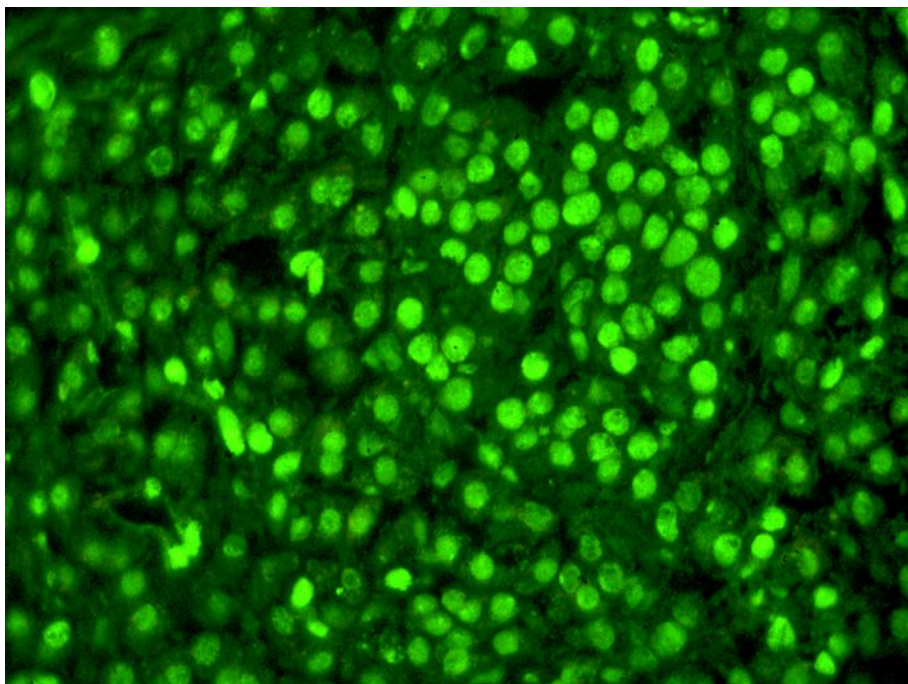


Abbildung 10: Indirekter Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Autoantikörper gegen Zellkerne (Antinukleäre Antikörper, ANA).

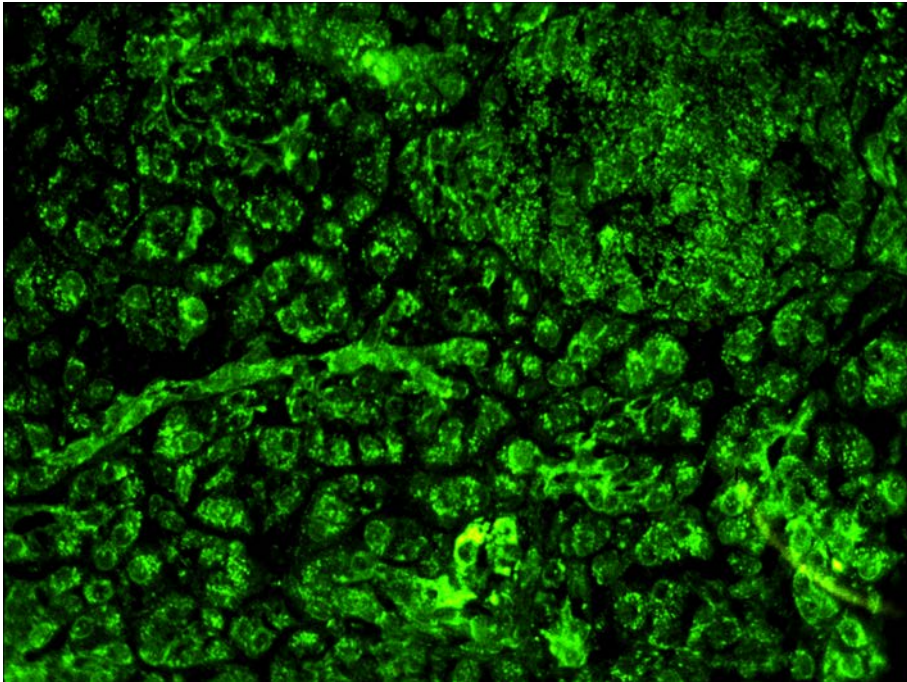


Abbildung 11: Indirekter Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Autoantikörper gegen Mitochondrien (Anti-Mitochondrien Antikörper, AMA).

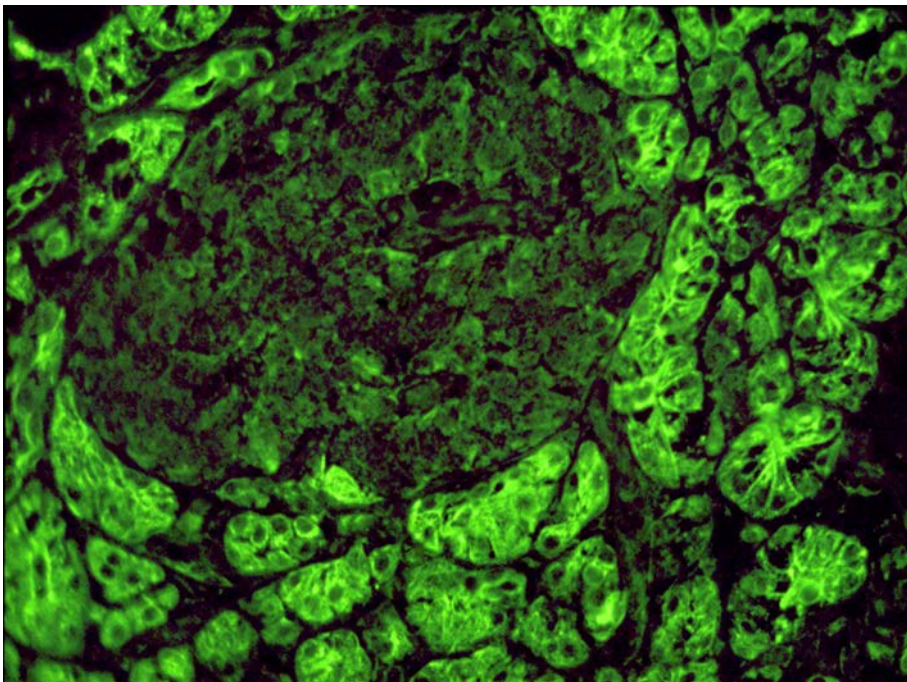


Abbildung 12: Indirekter Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Autoantikörper gegen Tropomyosin.

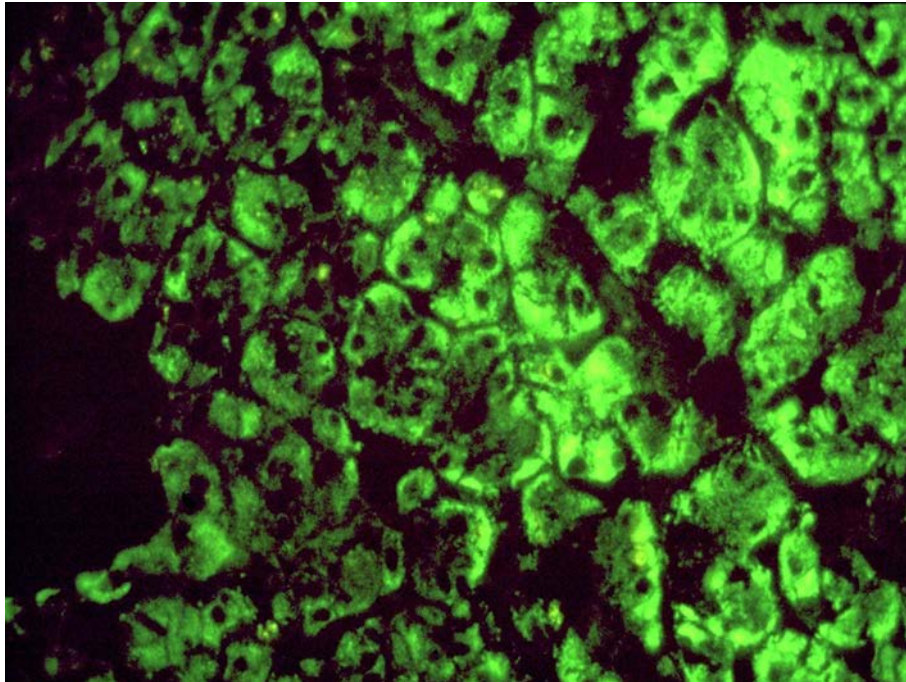


Abbildung 13: Indirekter Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe, Autoantikörper gegen Zytokeratin.

1.6. Pankreasantigene CUZD1 und GP2

Im Jahr 2008 gelang es, die vermuteten korrespondierenden Antigene zu identifizieren und zu isolieren. Es handelt sich um zwei Glycoproteine aus dem Pankreassekret: **CUZD1** (Muster netzig-granulär) und **Glycoprotein 2** (Muster tropfig) (Komorowski et al., 2008; Komorowski et al., 2013). Das Glycoprotein 2 wurde parallel dazu von einer Arbeitsgruppe aus Dresden als Antigen beschrieben (Roggenbuck et al., 2009).

1.6.1. CUZD1

CUZD1 (Calmodulin-ubiquitin and zona-pellucida-like domain-containing protein1 precursor) ist ein Membran-assoziiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 68.153 Da, das außer im exokrinen Pankreas auch in den Ovarien und im Uterus exprimiert werden soll. Allerdings reagieren nach meiner Erfahrung die Autoantikörper nicht mit diesen Geweben. Synonyme für CUZD1 sind: UO-44, ERG-1, Integral membrane-associated Protein 1

(=ITMAP1), USG, UTCZP. Das Molekül enthält zwei Calmodulin-ubiquitin (CUB)-Domänen und eine Zona-pellucida-like (ZP)-Domäne.

Über die Funktion des CUZD1 ist wenig bekannt. Weitere Proteine mit einer ZP-Domäne neben CUZD1 sind GP2, Uromodulin, Mucin (im Ductus pancreaticus) und β -Tectorin (im Innenohr). In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass Proteine mit einer ZP-Domäne oft in fibrillären oder gelatinösen Kompartimenten der extrazellulären Matrix zu finden sind, wobei die ZP-Domäne als Filament-bildendes Agens wirkt (Killick et al., 1995). Sie könnten eine Rolle beim intra- und extrazellulären Molekül-Transport spielen (De Lisle et al., 2000) und zur Bildung und Stabilität der Zymogengranula beitragen (Kasik, 1998). Weiterhin sollen sie dem Schleimhautschutz dienen (Thim et al., 2000; Mashimo et al., 1996).

Das Glycoprotein Gp-340/DMTB1 aus der gleichen Proteinfamilie ist eine Komponente der angeborenen Immunität (Madsen et al., 2010), allerdings reagiert es nicht mit den Morbus-Crohn-assoziierten Pankreas-Antikörpern. Es soll für die Induktion von Zellproliferation und Zelldifferenzierung von Bedeutung sein (Huynh et al., 2001) und einen Marker für das Ovarialkarzinom darstellen (Leong et al., 2007; Leung et al., 2012). Ein polyklonales Antiserum vom Kaninchen gegen CUZD1 inhibierte die Anheftung und Proliferation von Zellen des Ovarialkarzinoms (Leong et al., 2004). Eine weitere Studie zeigt, dass CUZD1 eine Rolle bei der Karzinogenese spielen könnte (Liaskos et al., 2013): mRNA für CUZD1 wird bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom überexprimiert, die Serumlevel des CUZD1 sind bei Ovarialkarzinom und Pankreaskarzinom erhöht. Menschliches CUZD1 wird auf dem Chromosom 10q26.13 kodiert, bei bösartigen Tumoren beobachtet man häufig einen Nucleotid-Verlust in dieser Region.

Durch Experimente mit **Knockout-Mäusen** konnte die physiologische Rolle des CUZD1 in vivo untersucht werden (Imamura et al., 2002): In Lebensdauer, Wachstum und Fruchtbarkeit unterscheiden sich Knockout-Mäuse nicht vom Wildtyp. Größe, Form und Zusammensetzung (mit Ausnahme des CUZD1) der Granula in den pankreatischen Azinuszellen bleiben unverändert, sodass CUZD1 wohl keine Rolle bei der Bildung der Granula spielt. Eine durch Cholin-Mangeldiät (CDE: Choline-deficient, ethionine-containing) und Coerulein induzierte Pankreatitis verläuft bei Knockout-Mäusen schwerer als beim Wildtyp, histologische Schädigungen wie Gewebsödeme und Nekrosen der Azinuszellen sind deutlicher ausgeprägt, die Serum-Lipase und -Amylase sind im Vergleich erhöht. Knockout-Mäuse zeigen eine höhere Sterblichkeitsrate bei CDE-induzierter Pankreatitis. Möglicher-

weise spielt CUZD1 eine Rolle bei der Bindung des Trypsins an die Darmschleimhaut, wo es als Festphasen-gebundenes Enzym seine Wirkung besser entfalten kann als wäre es in Lösung. Das legen Bindungsexperimente mit Gefrierschnitten des Darmes nahe, sowie ein nachweisbarer Anstieg der Trypsinaktivität in Biopsien nach Zugabe eines Extraktes von Pankreas-Antigen (W. Stöcker, persönliche Mitteilung).

1.6.2. GP2

Glycoprotein 2 (GP2, Pancreatic zymogen granule membrane major glycoprotein) ist ein 78 kDa Molekül, das in den Zymogengranula und im Lumen der Azini nachgewiesen werden kann. Es bildet den Hauptbestandteil der Membranproteine der Zymogengranula und ist über Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in der Lipidmembran der Granula verankert. 45% des GP2 der Granula liegen in gelöster Form vor und befinden sich innerhalb des Lumens der Azini und der Pankreasgänge (Beaudoin et al., 1991).

Beide Antigene, CUZD1 und GP2, werden mit den Verdauungsenzymen des exokrinen Pankreas in den Darm sezerniert. Der Sekretionsmodus unterscheidet sich für GP2 von dem der übrigen Proteine des Pankreas (Laforest et al., 1992). Im Gegensatz zu den Verdauungsenzymen wird GP2 im Darm nicht durch Proteolyse aktiviert, sondern bereits im Pankreas intrazellulär durch sequentielle Spaltung modifiziert (Fritz et al., 2002). Es bildet große Aggregate und ein fibrilläres Netzwerk in Pankreassaft und Darmlumen.

Im Pankreas werden vier Isoformen des GP2 exprimiert, die sich in der Länge ihrer Aminosäureketten unterscheiden (Roggenbuck et al., 2016). Isoform 1 besteht aus 537 Aminosäuren, bei der Isoform 2 (534 AS) fehlen die Aminosäuren 179 bis 181, bei der Isoform 3 (390 AS) die Aminosäuren 32 bis 178, bei der Isoform 4 (387 AS) fehlen die Aminosäuren 31 bis 180.

Fukuoka beschrieb zwei Isoformen des GP2, eine lange α - (527 AS) und eine kurze β -Form (380 AS) (Fukuoka, 2000). Die α -Form ist nahezu identisch mit Isoform 2, die β -Form nahezu identisch mit Isoform 4. Sie unterscheiden sich lediglich durch die fehlenden Aminosäuren 1 bis 7. Isoformen 1 und 2 sind an Position 65, 122 und 362 glykosiliert, die Isoformen 3 und 4 nur an Position 362. Disulfidbrücken und Lipidierung sind in allen Formen gleich (Röber et al., 2017).

Auch für **GP2** ist die physiologische Rolle bisher nicht vollständig geklärt. Man weiß, dass es Verdauungsenzyme bindet, wie zum Beispiel die Amylase. Vermutet wurde, dass es an Protein Sorting und Packaging der Verdauungsenzyme in den Granula und bei der Sekretion der Verdauungsenzyme beteiligt ist. Außerdem soll es die Endozytose und das Membran-Recycling im Anschluss an die Sekretion beeinflussen. Wie Experimente mit Knockout-Mäusen gezeigt haben, ist GP2 aber weder für die Bildung („formation“) der Zymogengranula noch für die exokrine Pankreasfunktion von essentieller Bedeutung (Yu et al., 2004/2). Die Zymogengranula der **Knockout-Mäuse** unterschieden sich in Größe, Anzahl und Dichte lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch nicht von denen des Wildtyps. Die Knockout-Mäuse überlebten trotz fehlender GP2-Bildung, sie zeigten keine Anzeichen einer Malabsorption, weder Wachstumsverzögerung noch Gewichtsverlust oder Diarrhoe. Werden Azinuszellen in Primärkulturen mit dem Cholezystokinin stimuliert, ist die Amylasefreisetzung in den Überstand bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen gleich, die Enzymsekretion wird also durch GP2 nicht beeinflusst, und es erscheint somit unwahrscheinlich, dass GP2 eine entscheidende Funktion innerhalb der Azinuszellen besitzt. Die Formation der Granula und das Protein Sorting werden beeinträchtigt, wenn man die Bildung des GPI-Ankers oder der cholesterinreichen Mikrodomäne verhindert (Schmidt et al., 2001), nicht jedoch durch Abwesenheit von GP2.

In den Experimenten von Yu et al. zeigte sich weiterhin, dass GP2 ähnlich wie CUZD1 eine protektive Rolle bei einer durch Cholin-Mangeldiät oder durch Coerulein induzierten Pankreatitis spielt. Eine GP2-Überexpression in der Azinuszell-Linie AR4-2J hat keinen Einfluss auf die Granula-Formation oder auf die Cholezystokinin-stimulierte Sekretion (Yu et al., 2004/1).

GP2 zeigt immunologische Kreuzreaktivität mit Phospholipase A2 und ähnelt diesem Enzym in der Aminosäuresequenz (Withiam-Leitch et al., 1993). Es ist zu 88% homolog zu Tamm-Horsfall-Protein (THP, Uromodulin) der Niere (Hoops et al., 1991), das im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife gebildet wird und ebenfalls über GPI in der Zellmembran verankert ist, es stellt den Hauptanteil der physiologisch im Urin vorhandenen Proteine dar. Auch die Funktion des THP ist nicht vollständig bekannt. Beide Glycoproteine sind möglicherweise an der Abwehr gegen Mikroben beteiligt. GP2 ist in der Lage, sich an E. coli Typ-1 Fimbrien zu binden (Yu et al., 2009; Hase et al., 2009), ähnlich wie das THP (Pak et al., 2001). Wie THP bindet sich auch das GP2 an Scavenger-Rezeptoren, jedoch ist bisher nur die Bindung an den SREC-I Rezeptor auf Endothelzellen bekannt,

nicht an SR-AI oder SR-BI (Hölzl et al., 2011). Die Interaktion des GP2 mit SREC-I könnte die Antigen-Clearance und die Immunantwort beeinflussen. Hinweise auf eine Rolle des GP2 als endogener Immunmodulator geben die Beobachtungen, dass rekombinantes GP2 die Anzahl menschlicher Darmepithelzellen vermindert. Es beeinflusst zudem die Proliferation, Apoptose und Aktivierung mukosaler und peripherer T-Zellen und die Zytokin-Sekretion (Werner et al., 2012). GP2 findet man an der Außenmembran von M-Zellen im Follikel-assoziierten Epithel gesunder Darmschleimhaut (Terahara et al., 2008), weiterhin in den Konjunktiven und im mehrschichtigen Plattenepithel der Tränengänge von Mäusen (Kimura et al., 2015). GP2 wird auf menschlichem embryonalem Pankreas exprimiert, das lässt vermuten, dass es ein spezifischer Oberflächenmarker multipotenter pankreatischer Vorläuferzellen ist (Cogger et al., 2017).

Beide Glykoproteine haben eine C-terminale Zona-pellucida-Domäne – das ist charakteristisch für Proteine, die unter bestimmten Umweltbedingungen polymerisieren (Rindler et al., 1990; Jovine et al., 2005). Es wäre daher plausibel, dass sie Bakterien aggregieren und sie daran hindern, die Darmschleimhaut zu besiedeln oder zu penetrieren. Die Bildung von Autoantikörpern gegen CUZD1 und GP2 bei M. Crohn könnte die Folge einer speziellen mikrobiellen „Challenge“ sein (Rolhion et al., 2007). Für diese Hypothese spricht, dass Autoantikörper gegen Tamm-Horsfall-Protein nach einem Urogenitalinfekt auftreten (Lynn et al., 1984).

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, ob die Glycoproteine CUZD1 und GP2 tatsächlich die korrespondierenden Antigene für die Morbus-Crohn-assoziierten Autoantikörper darstellen. Weiterhin war zu prüfen, ob rekombinant hergestellte Pankreas-Antigen-Substrate in der Diagnostik das Pankreasgewebe ersetzen können. Dazu habe ich über einen Zeitraum von 20 Monaten Seren von 365 Patienten mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa oder mit Verdacht auf eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung (CED) prospektiv gesammelt und die Krankenakten ausgewertet. 96 der Seren stammten von Patienten mit diagnostisch gesichertem Morbus Crohn. Zusätzlich habe ich Seren von 50 gesunden Kontrollpersonen eingesetzt.

In allen Seren habe ich mit einem etablierten **Immunfluoreszenztest** Autoantikörper gegen Pankreas-Azini an Gewebeschnitten von Primatenpankreas bestimmt. Parallel dazu habe ich die Seren mit Zellsubstraten zur Reaktion gebracht, in denen die beiden mutmaßlichen Zielantigene CUZD1 und GP2 separat rekombinant exprimiert waren. Die hu-

mane Zell-Linie HEK293 (Human embryonic kidney cells) bildete das antigene Zellsubstrat, nicht transfizierte HEK239-Zellen dienten als Negativkontrolle. Zusätzlich habe ich die 96 Seren der Patienten mit gesichertem Morbus Crohn und Kontrollseren mit drei verschiedenen **ELISA** getestet, die CUZD1 und GP2 als Antigene enthielten.

2. PATIENTEN - HERKUNFT UND VORBEREITUNG DER SERUMPROBEN

Die Serumproben habe ich im Zeitraum vom 1. August 2005 bis zum 31. März 2007 gesammelt. Sie stammen von Patienten der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck, Abteilung für Gastroenterologie. Ein Teil wurde auf der Station 41b, der andere Teil ambulant in der gastroenterologischen Poliklinik behandelt. Allen diesen Patienten wurde zu diagnostischen Zwecken Blut entnommen. Es handelt sich um insgesamt 365 Serumproben von 271 vordiagnostizierten Patienten: 167 mit Morbus Crohn, 69 mit Colitis ulcerosa, 14 mit Colitis indeterminata und 21 mit Verdacht auf eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung.

Die Krankenakten der Patienten habe ich sorgfältig ausgewertet und vorhandene Befunde erfasst. Für die Studie ausgewählt wurden dann nur die Seren derjenigen Patienten, bei denen sowohl das klinische Bild als auch der endoskopische Befund und die histologische Begutachtung übereinstimmend und zweifelsfrei die Diagnose Morbus Crohn ergaben. Ein klinisch erfahrener Experte hat dann, ohne vorherige Kenntnis der serologischen Befunde, meine Patientenauswahl überprüft und die endgültige Kategorisierung vorgenommen. Insgesamt 96 Patienten (65 Frauen, 31 Männer, Altersspanne 17 bis 83 Jahre, im Mittel 40 Jahre) entsprachen den streng definierten Auswahlkriterien. Als Vergleichskollektiv dienten Seren 50 gesunder Blutspender (32 Frauen, 18 Männer, Altersspanne 18 bis 52 Jahre, im Mittel 26 Jahre).

Die Proben wurden innerhalb von 12 Stunden nach der Blutentnahme bei 3.000 g zentrifugiert, das Serum in Portionen zu 30 µl in Schlauchsegmente aus Polyvinylchlorid luftdicht eingeschweißt und bei -80 Grad Celsius aufbewahrt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Reagenzien für Immunfluoreszenztests

Alle Substrate und Reagenzien für die indirekte Immunfluoreszenz wurden mir von der Euroimmun AG zur Verfügung gestellt.

3.1.1.1. Antigensubstrate - Gewebe und Zellen

Objektträger für den Nachweis von Autoantikörpern gegen Pankreas, bestückt mit Biochip[®]-Mosaiken aus den Substraten:

- HEK293-Zellen transfiziert mit GP2 (Glycoprotein 2, Acc. No. P55259, UniProt)
- HEK293-Zellen transfiziert mit CUZD1 (Calmodulin-ubiquitin and zona-pellucida-like domain-containing protein1 precursor; Glycoprotein Acc. No. Q86UP6, UniProt)
- HEK293-Zellen untransfiziert, Invitrogen GmbH
- Gefrierschnitte von Primatenpankreas

3.1.1.2. Chemikalien, Kontrollseren und markierte Antiseren

Sämtliche Reagenzien sind Bestandteil der Produktpalette der Euroimmun AG und sind kommerziell erhältlich.

- Salz für Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), 0,15M, pH 7,2: EURO-IMMUN AG, Bestellnummer ZF 1100-1000
- Tween20: EUROIMMUN AG, Bestellnummer ZF 1100-0102
- Fluoreszein-konjugiertes Antihumanserum
 - spezifisch gegen humanes gesamt-IgA: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bestellnummer F9384
 - spezifisch gegen humanes gesamt-IgG: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bestellnummer F9887
 - spezifisch gegen humanes IgG₁: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bestellnummer F0767
 - spezifisch gegen humanes IgG₂: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bestellnummer F4516

- spezifisch gegen humanes IgG₃: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bestellnummer F4641
- spezifisch gegen humanes IgG₄: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Bestellnummer F9890
- Kontrollseren
 - Kontrollserum positiv für Antikörper gegen Pankreas-Azini (CUZD1-Kontrolle): EUROIMMUN AG, Bestellnummer CA 1391-0101
 - Kontrollserum positiv für Antikörper gegen Pankreassekret (GP2-Kontrolle): EUROIMMUN AG, Bestellnummer CA 1392-0101
 - Kontrollserum positiv für Antikörper gegen intestinale Becherzellen: EUROIMMUN AG, Bestellnummer CA 1381-0101
 - Kontrollserum negativ: EUROIMMUN AG, Bestellnummer CA 1000-0105
- Eindeckmedium: EUROIMMUN AG, Bestellnummer ZF 1200-0199

3.1.2. Reagenzien für ELISA

Alle erforderlichen Substrate und Reagenzien zum Nachweis der Autoantikörper gegen Pankreas mittels ELISA wurden mir als Forschungsreagenzien zur Verfügung gestellt (Euroimmun-Mikrotiter-ELISA®). Die Antigene zur Herstellung dieser ELISA wurden aus zellfreiem Überstand von homogenisiertem Pankreas affinitäts-chromatographisch isoliert und anschließend die Antigen-haltigen Fraktionen identifiziert aufgrund ihrer Fähigkeit, Pankreas-Antikörper zu neutralisieren.

3.1.2.1. Antigen-beschichtete Reagenzgefäße

Beschichtete Mikrotitergefäße aus Polystyrol bilden die Antigen-präsentierende Festphase.

- Reagenzgefäße für den Direkt-ELISA: beschichtet mit einem Extrakt aus homogenisiertem humanem Pankreas, enthaltend CUZD1 und GP2 als Gemisch
- Reagenzgefäße für den Anti-CUZD1-Capture-ELISA: beschichtet mit dem monoklonalen Antikörper Maus HL1b gegen CUZD1 und anschließend mit CUZD1
- Reagenzgefäße für den Anti-GP2-Capture-ELISA: beschichtet mit dem monoklonalen Antikörper Maus HL2a gegen GP2 und anschließend mit GP2

3.1.2.2. Chemikalien, Kontrollseren und markierte Antiseren

- Positives Kontrollserum: A4274, EUROIMMUN AG
- Negatives Kontrollserum: BS83, EUROIMMUN AG

- Enzymkonjugat: Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG, Kaninchen, EURO-IMMUN AG, Charge B071121RM
- Probenpuffer: Casein Probenpuffer, EUROIMMUN AG, Charge C070827AA
- Waschpuffer: 0,05% PBS-Tween20
- Salz für PBS (pH 7,2). EUROIMMUN AG
- Tween20: Sigma Aldrich Chemie GmbH
- Chromogen-Substrat: TMB/H₂O₂, EUROIMMUN AG, Charge C070828AA
- Stopplösung: 0,5M Schwefelsäure, EUROIMMUN AG, Charge C070709AA

3.2. Geräte

3.2.1. Fluoreszenzmikroskop

ZEISS Axio Imager A1, Seriennummer 3517-000-389

Sonderanfertigung 425141-0000-000 000000-0239-500 90°Prisma 425141-0012-0000

3.2.2. ELISA Washer

TECAN Columbus Washer, Fa. TECAN Trading AG, Switzerland

3.2.3. ELISA Photometer

TECAN Sunrise Reader, Fa. TECAN Trading AG, Switzerland

3.3. Methoden

3.3.1. Indirekter Immunfluoreszenztest

Für den Nachweis der Autoantikörper durch indirekte Immunfluoreszenz werden Dünnschnitte (4 μm) gefrorenen Gewebes oder Zellkultur-Monolayer angefertigt und zuerst mit Patientenserum, danach mit einem Fluoreszein-markierten Antihumanserum inkubiert.

Zur Herstellung der Testsubstrate wird cDNA für die beiden Antigene CUZD1 und GP2 mit Hilfe eukaryontischer Vektoren in HEK293-Zellen geschleust, sodass die Zell-Linie das entsprechende Antigen exprimiert. Diese transfizierten rekombinanten Zellen werden auf Glasobjektträger aufgebracht, mit Azeton fixiert und dann im indirekten Immunfluoreszenztest eingesetzt.

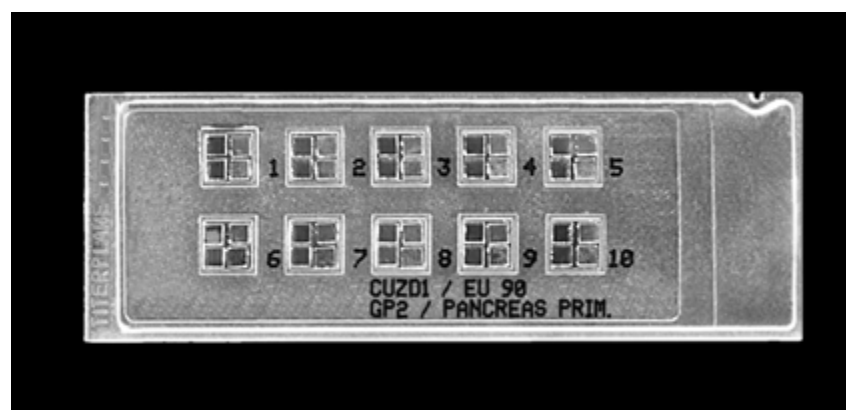


Abbildung 14: Objektträger für die indirekte Immunfluoreszenz, 10 kleine Mosaiken aus je vier Biochips pro Reaktionsfeld.

In meiner Arbeit habe ich die Titerplane-Technik und die Biochip-Technologie eingesetzt (Stöcker W., 1985; Stöcker K. et al., 1985): Im Gegensatz zum herkömmlichen Verfahren werden dabei Zellen oder Gewebeschnitte nicht direkt auf die Objektträger aufgebracht, sondern zuerst auf 0,15 mm dünne Glasträger, die dann maschinell in Fragmente (Biochips) unterteilt und auf Objektträger geklebt werden. Pro Reaktionsfeld werden ein oder mehrere Biochip-Mosaiken unterschiedlicher Gewebe oder Zellen nebeneinander aufgebracht und dann in einem gemeinsamen Tropfen Probe oder Reagenz inkubiert (Abbildung 14).

Bei herkömmlichen Immunfluoreszenztests werden die Gefrierschnitte oder Zellen in einer feuchten Kammer mit verdünntem Serum überschichtet. Im Unterschied dazu werden mit der Titerplane-Technik die Proben und das markierte Antiserum nicht direkt auf die Objektträger pipettiert, sondern auf die Reaktionsfelder eines Reagenzträgers. Die Objektträger mit den Biochips werden dann von oben auf die Reagenzträger gelegt, sodass alle Biochips mit den Reagenzien in Kontakt kommen und die Reaktionen gleichzeitig gestartet werden. Beliebig viele Proben können nebeneinander inkubieren. Die Serumproben werden zunächst im Verhältnis 1:10 mit PBS-Tween20 verdünnt. Je 25 µl Probe pipettiert man auf die Reagenzträger, legt dann die Objektträger kopfüber auf und inkubiert eine Stunde lang bei Raumtemperatur. Anschließend werden die Objektträger 15 Minuten lang in PBS-Tween20 gewaschen. Im nächsten Schritt wird wiederum eine Stunde lang mit je 20 µl eines unverdünnten Fluoreszein-markierten Antihumanserums vom Kaninchen inkubiert und danach erneut für 15 Minuten in PBS-Tween20 gewaschen. Zum Schutz vor Austrocknung und zur Stabilisierung des pH-Wertes (8,4) werden pro Reaktionsfeld 10 µl einer Lösung aus PBS-Tween20 und Glycerin (1+9) aufgetropft und ein Deckglas aufgelegt.

Autoantikörper des Serums gegen Strukturen des Gewebes oder gegen die Zellen lagern sich während der ersten Inkubation an das Gewebe. Alle nicht gebundenen Antikörper werden beim anschließenden Waschvorgang entfernt. Während des zweiten Inkubations-schrittes binden sich die Fluoreszein-markierten Antikörper an das bereits ans Gewebe fixierte humane Immunglobulin. Die Fluoreszenz wird nach dem zweiten Waschvorgang und dem Eindecken unter dem Mikroskop an den entsprechenden Gewebestrukturen abgelesen. Die Bewertung der Fluoreszenz-Intensität erfolgt visuell semiquantitativ in sechs Stufen:

Intensität:	Bedeutung:
0	keine spezifische Fluoreszenz, Ergebnis negativ
(+)	spezifische Fluoreszenz sehr schwach zu erkennen, Ergebnis schwach positiv
+	spezifische Fluoreszenz schwach zu erkennen, Ergebnis positiv
++	spezifische Fluoreszenz gut zu erkennen, Ergebnis positiv
+++	starke spezifische Fluoreszenz, Ergebnis positiv
++++	sehr starke spezifische Fluoreszenz, Ergebnis positiv

Zur Beurteilung der Fluoreszenz werden die mikroskopischen Bilder der untersuchten Seren mit antikörperfreien Seren gesunder Kontrollpersonen verglichen. Mit einer ausreichend großen Anzahl negativer Seren kann man davon ausgehen, dass als positiv erkannte, Zielantigen-haltige Strukturen zuverlässig identifiziert werden können. Um in Zweifelsfällen spezifische Befunde eindeutig zu bestimmen, verdünnt man die Proben in definierten Schritten weiter. Bei höheren Verdünnungen unterscheiden sich die spezifischen Signale deutlich von negativen, insbesondere wenn zuvor störende unspezifische Antikörper im Serum enthalten waren. Die letzte Verdünnung, bei der das Ergebnis noch positiv ist, bezeichnet man als Titer.

Die Patientenproben habe ich zunächst in der Verdünnung 1:10 eingesetzt, bei positivem Ergebnis werden die Autoantikörper austitriert, der Verdünnungsfaktor von Stufe zu Stufe ist 3,162 (Quadratwurzel aus 10), sodass sich die Titerstufen 1:10, 1:32, 1:100, 1:320, 1:1000, 1:3200 usw. ergeben.

Ich habe Objektträger eingesetzt, die mit Biochips aus vier unterschiedlichen Substraten pro Reaktionsfeld bestückt waren: Biochip-Mosaik aus Pankreasgewebe, CUZD1-transfizierten HEK-Zellen, GP2-transfizierten HEK-Zellen und nicht transfizierten HEK-Zellen. Jede Testreihe habe ich sechsmal parallel durchgeführt, mit sechs unterschiedlichen Zweitantikörpern: Fluoreszein-markiertes Antihumanserum der Klassen IgA, IgG, und der Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄.

3.3.2. ELISA

Für die 96 Seren meines Studienkollektivs und die 50 Seren gesunder Kontrollpersonen habe ich Autoantikörper gegen Pankreas-Azini zusätzlich zur Immunfluoreszenz auch mit drei verschiedenen ELISA-Systemen bestimmt: Bei einem war die reaktive Oberfläche mit einem Antigengemisch aus aufgereinigtem Pankreas-Homogenat direkt beschichtet, die beiden anderen waren monospezifische ELISA - ein Capture-ELISA mit aufgereinigtem CUZD1 als spezifischem Antigen und ein Capture-ELISA mit aufgereinigtem GP2 als spezifischem Antigen. Die Sekundär-Antikörper bei allen hier eingesetzten ELISA richteten sich gegen die Immunglobulinklasse IgG.

3.3.2.1. ELISA mit direkter Antigen-Beschichtung

Die biochemisch definierten, aufgereinigten Antigene sind bei einem ELISA mit direkter Beschichtung an eine feste Phase gebunden. Diese wird im Allgemeinen vom Inneren der Reaktionsgefäße gebildet, in denen die Reagenzien inkubiert und gemessen werden. Im ersten Inkubationsschritt nach der Beschichtung wird mit Probenmaterial inkubiert. Die Antikörper binden sich in den positiven Fällen an das Antigen. Um sie sichtbar zu machen, wird in einem zweiten Schritt ein spezifischer Anti-Human-Antikörper zugegeben, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Durch Zugabe einer Chromogen-Substratlösung wird die aus der Reaktion des Enzyms mit dem Substrat resultierende Farbveränderung photometrisch bestimmt.

Als Reagenzgefäße für den Direkt-ELISA dienen Mikrotiterplatten. Beschichtet wird mit einem Extrakt aus homogenisiertem humanem Pankreas, der ein Gemisch aus CUZD1 und GP2 enthält. Je 100 µl der in Casein-Puffer 1:200 verdünnten Patientenproben und positiven und negativen Kontrollseren werden in die Reaktionsgefäße pipettiert und 30 Minuten lang bei 20°C inkubiert. Nach drei Waschvorgängen mit je 200 ml 0,05% PBS-Tween20 pro Reaktionsgefäß werden dann je 100 µl des Enzymkonjugats, eines Peroxidase-markierten Anti-Human-Antikörpers, in die Reagenzgefäße pipettiert und für 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Das Konjugat koppelt sich während dieses zweiten Inkubationsschrittes an die zuvor gebundenen Antikörper. Es wird wieder dreimal mit 0,05% PBS-Tween20 gewaschen, anschließend für 15 Minuten mit je 100 µl der Chromogen-Substratlösung TMB/H₂O₂ inkubiert. Durch Zugabe von je 100 µl einer Stopplösung (0,5M H₂SO₄) wird die Reaktion beendet. Die Messung erfolgt photometrisch bei 450 nm in einem ELISA-Reader, die ermittelte Extinktion korreliert mit der Antikörperkonzentration im Patientenserum.

3.3.2.2. Capture-ELISA

Im Gegensatz zum klassischen ELISA mit Direktbeschichtung ist beim Capture-ELISA das Antigen nicht unmittelbar an die feste Phase gebunden, sondern über einen spezifischen monoklonalen Antikörper. Die Epitope des Antigens sind dadurch in der Regel den Autoantikörpern in den Patientenproben besser und vollständiger zugänglich, und die Nachweisempfindlichkeit des Tests ist höher. Der Testablauf des Capture-Elisa erfolgt nach dem gleichen Schema.

3.3.3. Statistik – Exakter Test nach Fisher

Die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Immunfluoreszenztests mit Pankreasgewebe und mit transfizierten HEK-Zellen sowie der drei verwendeten ELISA wurde anhand der Kennzahlen Sensitivität und Spezifität überprüft. Die generelle Abhängigkeit der beiden Tests wurde mithilfe des Exakten Tests nach Fisher untersucht. Als Signifikanzniveau wurde dabei $\alpha=0,05$ festgelegt.

Der Exakte Test nach Fisher (Fisher-Yates-Test, exakter Chi-Quadrat-Test) ist eine Sonderform des Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstests. Er überprüft die Unabhängigkeit zweier diskreter Merkmale und liefert auch dann exakte Resultate, wenn die Stichprobe und damit die erwarteten und beobachteten Häufigkeiten klein sind. Man berechnet mit ihm, ob eine signifikante Abweichung von der Nullhypothese (= kein Zusammenhang zwischen den Variablen) vorliegt und erhält als Ergebnis einen Wert p. Je kleiner der errechnete p-Wert ist, desto eher kann die Nullhypothese abgelehnt werden.

Software für die Berechnung der Sensitivität und der Spezifität und für den Exakten Test nach Fisher ist online verfügbar:

https://www.medcalc.org/calc/diagnopstic_test.php

<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contiongency2/>

4. ERGEBNISSE

Alle Seren meines Patientenkollektivs habe ich zunächst mit einem indirekten Immunfluoreszenztest untersucht. Pankreasgewebe und transfizierte HEK-Zellen, in denen die vermuteten Zielantigene CUZD1 und GP2 enthalten waren, dienten als Substrat. Die Seren der Patienten mit gesichertem M. Crohn habe ich anschließend mit drei verschiedenen ELISA-Systemen getestet, die ebenfalls CUZD1 und GP2 als Ziel-Antigene aufwiesen.

4.1. Reaktion mit CUZD1- und GP2-transfizierten HEK293-Zellen

Als mögliche Alternative zu humanem Pankreasgewebe für den Einsatz in der indirekten Immunfluoreszenz wurden HEK293-Zellen mit den Antigenen CUZD1 und GP2 transfiziert und neben Pankreasgewebe als Substrat verwendet. Die Muster beider Zellpopulationen unterscheiden sich eindeutig voneinander: Die CUZD1-transfizierten Zellen weisen eine granuläre Fluoreszenz im Zytoplasma auf (Abbildungen 15 und 16), das Zytoplasma der GP2-transfizierten Zellen ist hingegen homogen-tropfig angefärbt (Abbildungen 17 und 18). In beiden Fällen ist nur ein Teil der Zellen des Blickfeldes transfiziert und reaktiv. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen CUZD1- bzw. GP2-transfizierte HEK-Zellen, die mit einem Serum ohne Autoantikörper inkubiert wurden (negatives Kontrollserum). HEK293-Zellen ohne Transfektion zeigen mit Autoantikörpern gegen Pankreas-Azini keine spezifische Reaktion (Abbildung 21).

4.1.1. Visueller Unterschied Pankreasgewebe und rekombinante Zellsubstrate

Mit Pankreasgewebe erhält man zwei unterschiedliche Fluoreszenzmuster der gegen die Azinuszellen gerichteten Autoantikörper, auf den transfizierten Zellen beobachtet man jeweils nur ein spezifisches Muster: Dabei produzieren diejenigen Seren, die eine netzgranuläre Fluoreszenz im Zytoplasma der Azinuszellen des Pankreas erzeugen, auch ein granuläres Muster im Zytoplasma der CUZD1-transfizierten Zellen. Dagegen rufen Seren mit dem tropfigen Muster des Pankreas im Zytoplasma der GP2-transfizierten Zellen eine homogen-tropfige Reaktion hervor.

Da im Pankreasgewebe eine Vielzahl von Antigenen enthalten ist, können sich viele unterschiedliche, auch nicht-organspezifische Autoantikörper mit entsprechenden Reaktionsmustern darstellen und die Morbus-Crohn-Serologie stören. Falls die spezifischen Autoantikörper nur in niedriger Konzentration vorhanden sind, besteht die Gefahr, dass sie

durch diese unerwünschte Fluoreszenz überdeckt werden, und das Ergebnis fälschlich als negativ interpretiert wird. Die rekombinanten Zellen beinhalten kein so breites Antigen-spektrum, entsprechend seltener wird der Test beeinträchtigt. Die Auswertung ist daher mit rekombinanten Zellen einfacher, und man erzielt verlässlichere Ergebnisse.

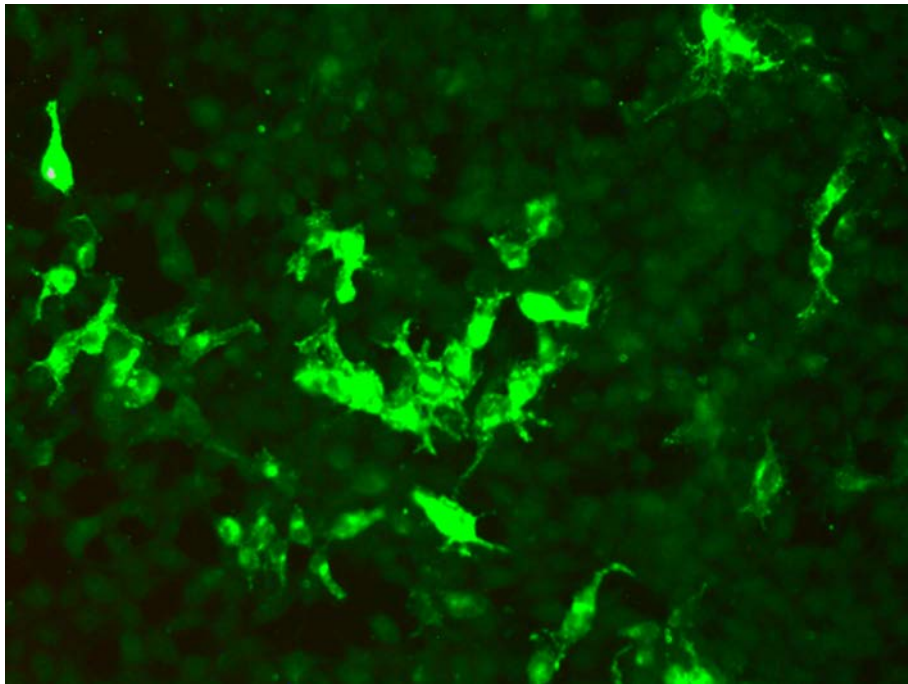


Abbildung 15: Indirekter Immunfluoreszenztest mit CUZD1-transfizierten HEK293-Zellen, Autoantikörper gegen CUZD1, Vergrößerung 200fach.

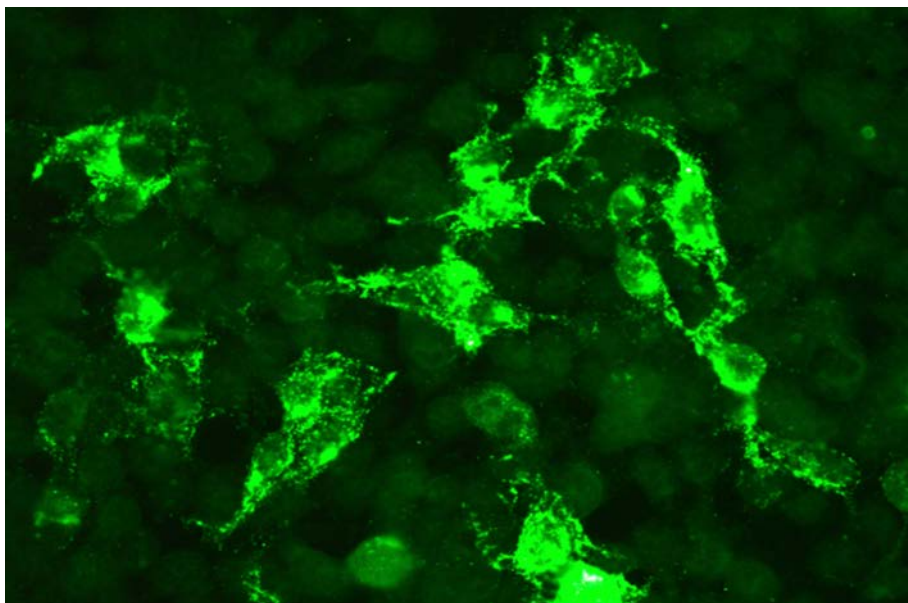


Abbildung 16: Indirekter Immunfluoreszenztest mit CUZD1-transfizierten HEK293-Zellen, Autoantikörper gegen CUZD1, Vergrößerung 400fach.

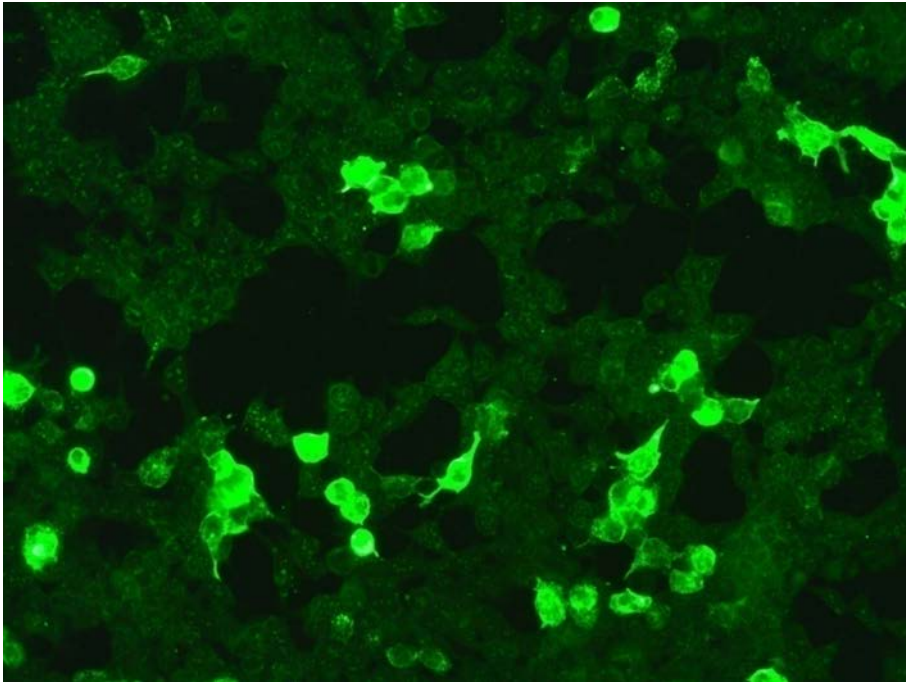


Abbildung 17: Indirekter Immunfluoreszenztest mit GP2-transfizierten HEK293-Zellen, Autoantikörper gegen GP2, Vergrößerung 200fach.

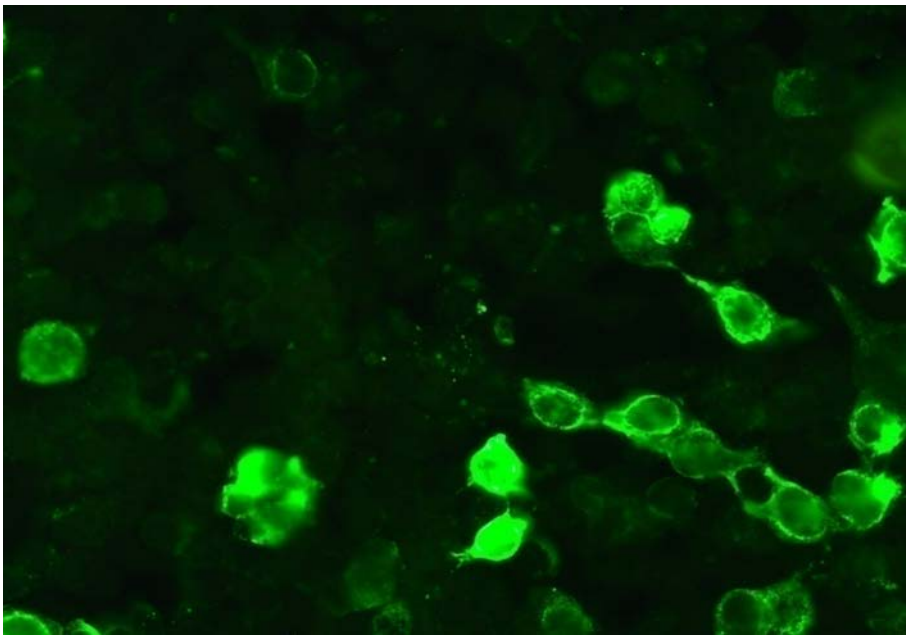


Abbildung 18: Indirekter Immunfluoreszenztest mit GP2-transfizierten HEK293-Zellen, Autoantikörper gegen GP2, Vergrößerung 400fach.

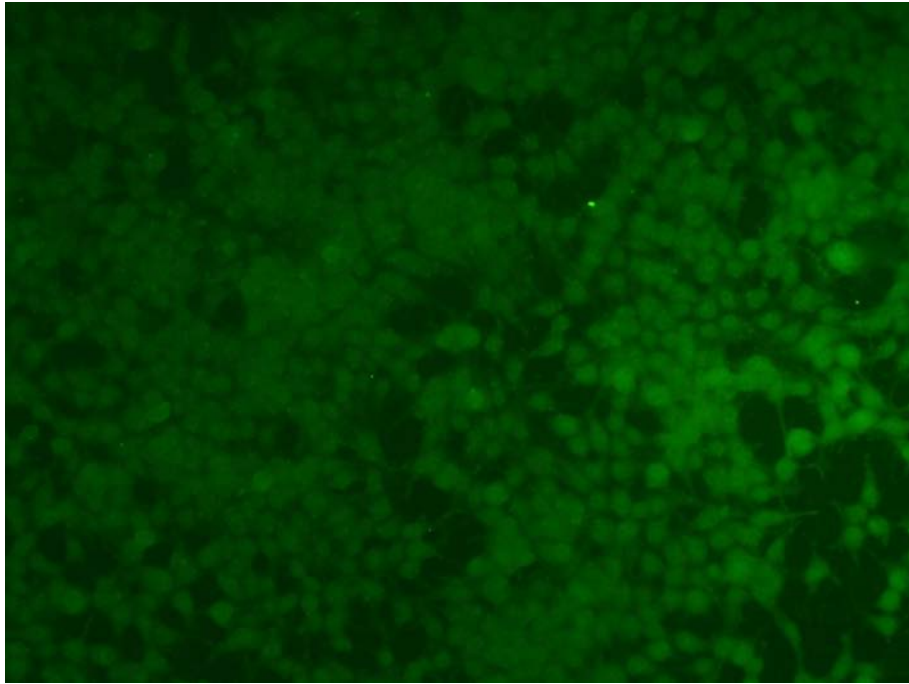


Abbildung 19: Indirekter Immunfluoreszenztest mit CUZD1-transfizierten HEK293-Zellen, Serum ohne Autoantikörper (negatives Ergebnis).

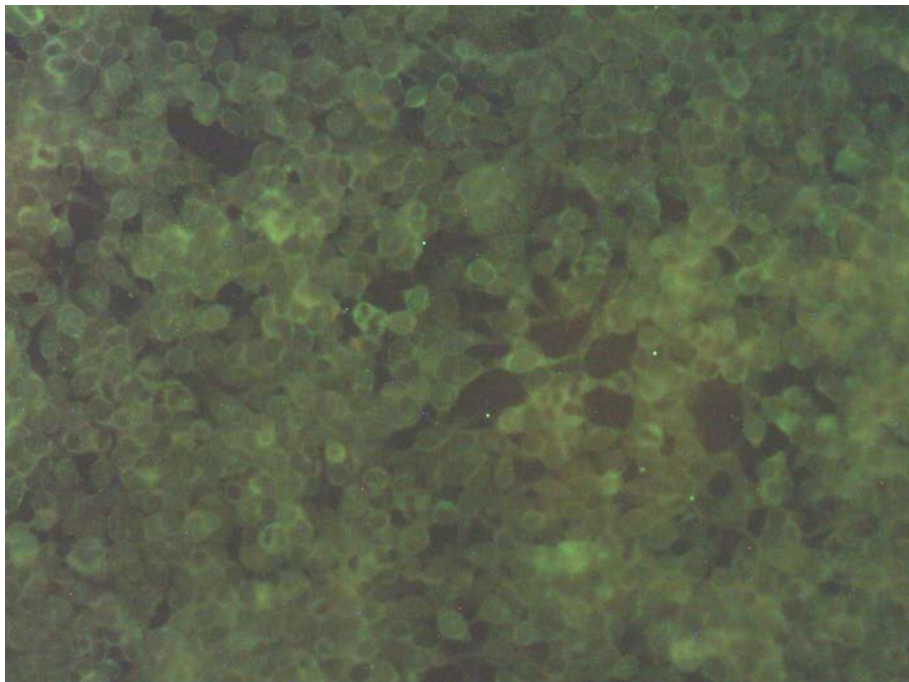


Abbildung 20: Indirekter Immunfluoreszenztest mit GP2-transfizierten HEK293-Zellen, Serum ohne Autoantikörper (negatives Ergebnis).

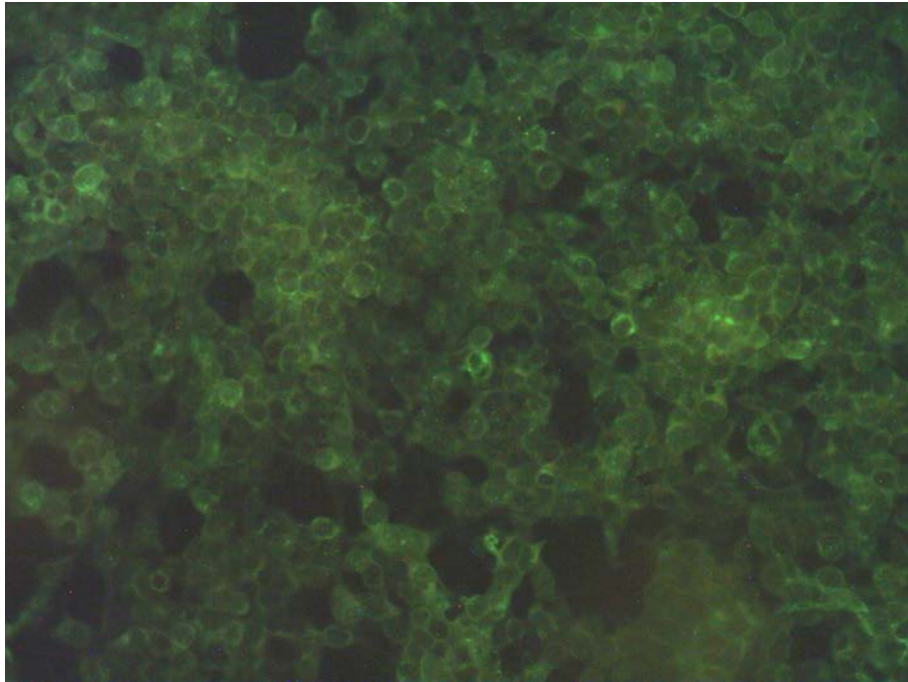


Abbildung 21: Indirekter Immunfluoreszenztest mit nicht transfizierten HEK293-Zellen, Serum mit Autoantikörpern gegen Pankreas-Azini (kombiniertes Muster netzig-granulär und tropfig).

4.2. Gegenüberstellung Immunfluoreszenz und ELISA

Mit dem Immunfluoreszenztest steht eine seit langem etablierte Methode zur Verfügung, mit deren Hilfe eine breite Palette von Autoantikörpern an Gewebeschnitten oder Zellpräparaten untersucht werden kann. Aufwendige Verfahren zur Identifizierung und Isolierung der Antigene, wie für die Herstellung der ELISA, sind nicht erforderlich.

Beim ELISA handelt es sich um eine einfach durchzuführende, zuverlässige und sensitive Testmethode. Die photometrische Erfassung des Signals erfolgt objektiv quantifizierbar. Anders als bei Immunfluoreszenztests können die Ergebnisse deshalb ohne große Erfahrung und unabhängig von den Vorkenntnissen des Untersuchers interpretiert werden.

4.2.1. Auswertung Immunfluoreszenztest

Reaktionen der Autoantikörper gegen exokrines Pankreas sind an Pankreasgewebe gelegentlich schwierig auszuwerten, insbesondere dann, wenn zusätzliche Antikörper, bei-

spielsweise gegen Mitochondrien oder Zellkerne, oder unspezifische Hintergrundfluoreszenzen vorliegen. Sind Autoantikörper gegen CUZD1 und GP2 in einem Serum gleichzeitig vorhanden, kann man sie auf Gewebeschnitten oft nur schwer voneinander unterscheiden. Verwendet man hingegen rekombinante Zellen als Substrat, lassen sich die Antikörper wie beim ELISA eindeutig differenzieren.

4.2.2. ELISA mit direkter Antigen-Kopplung: Gemisch CUZD1 und GP2

Der verwendete Direkt-ELISA war mit einem Antigengemisch aus CUZD1 und GP2 aus Pankreashomogenat beschichtet. Mit diesem Substrat lässt sich zwar feststellen, ob eine positive Reaktion vorliegt, die Antikörper dann einzeln zu identifizieren, ist jedoch nicht möglich.

4.2.3. CUZD1- und GP2-Capture-ELISA

Mittels monospezifischer Capture-ELISA werden Anti-CUZD1- und Anti-GP2-Antikörper separat gemessen. Im Falle einer positiven Reaktion lassen sich die vorliegenden Antikörper eindeutig identifizieren und differenzieren. Beide Capture-ELISA reagieren im gleichen Sinn wie Pankreasgewebe und Zellen.

In den Abbildungen 22 und 23 wird der Direkt-ELISA (Beschichtung mit einem Extrakt aus homogenisiertem humanem Pankreas, enthaltend CUZD1 und GP2 als Gemisch) den beiden Capture-ELISA gegenübergestellt.

Seren, die im Immunfluoreszenztest ein netzig-granuläres Muster ergeben hatten (schwarze Punkte), wurden sowohl im Anti-CUZD1-ELISA als auch im Direkt-ELISA als positiv identifiziert (Abbildung 22). Entsprechendes gilt für die Resultate der Seren mit tropfigem Fluoreszenzmuster (rote Punkte): Direkt-ELISA und Anti-GP2-ELISA erkennen diese Seren als positiv (Abbildung 23). Auch die Gegenüberstellung der beiden Capture-ELISA macht den Bezug des CUZD1 auf das netzig-granuläre und des GP2 auf das tropfige Muster augenfällig (Abbildung 24).

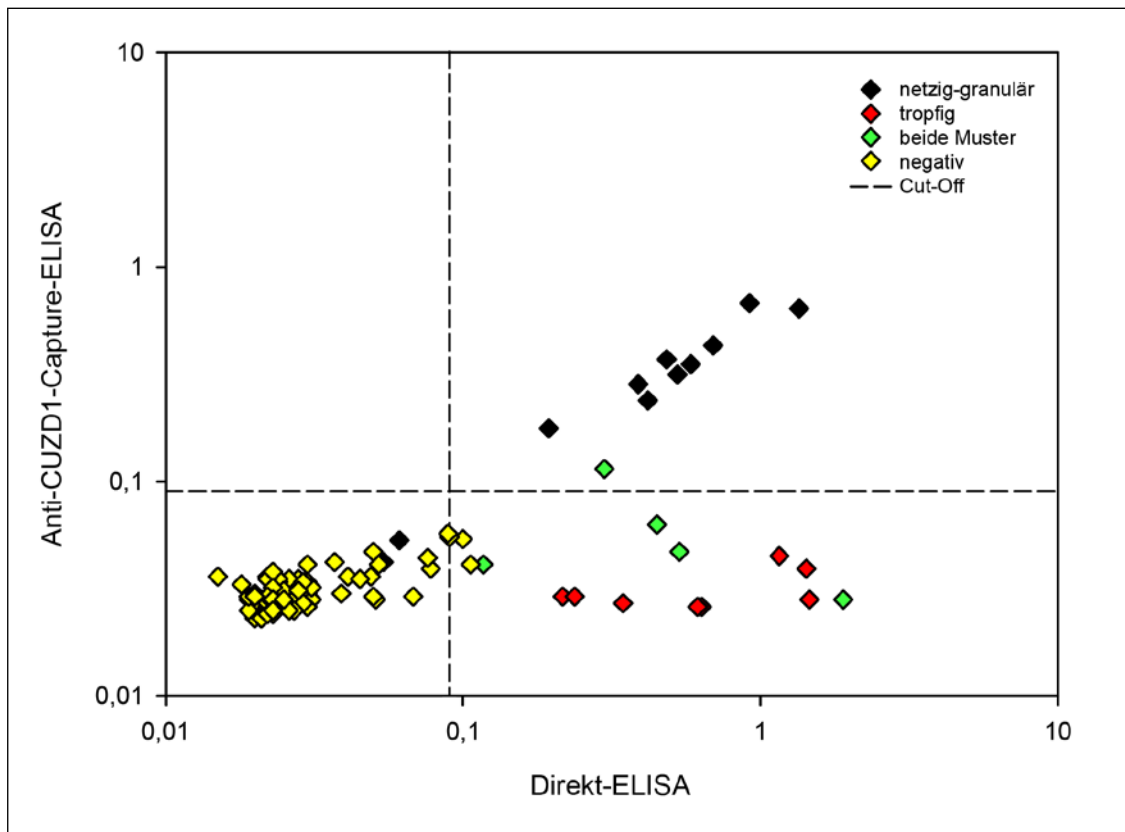


Abbildung 22: Gegenüberstellung direkt beschichteter ELISA (Beschichtung: Extrakt aus homogenisiertem humanem Pankreas, CUZD1 und GP2 als Gemisch enthaltend) und Anti-CUZD1-Capture-ELISA.

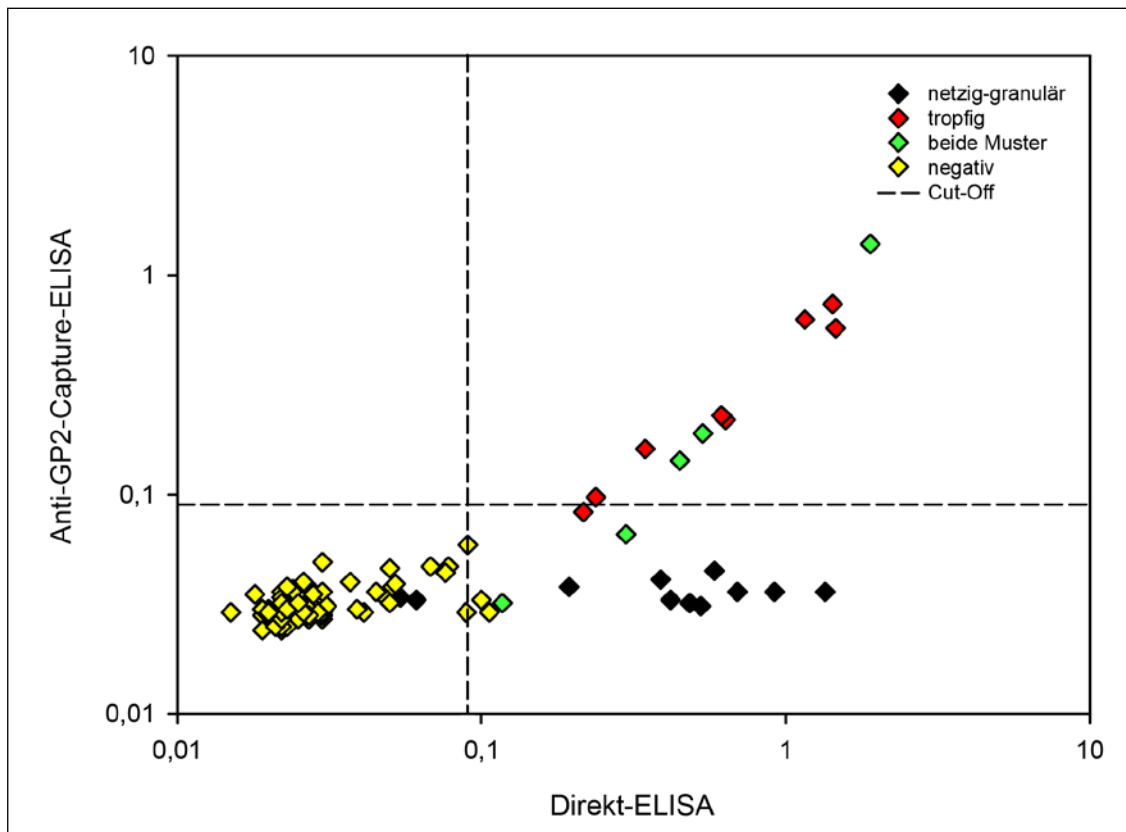


Abbildung 23: Gegenüberstellung direkt beschichteter ELISA (Beschichtung: Extrakt aus homogenisiertem humanem Pankreas, CUZD1 und GP2 als Gemisch enthaltend) und Anti-GP-Capture-ELISA.

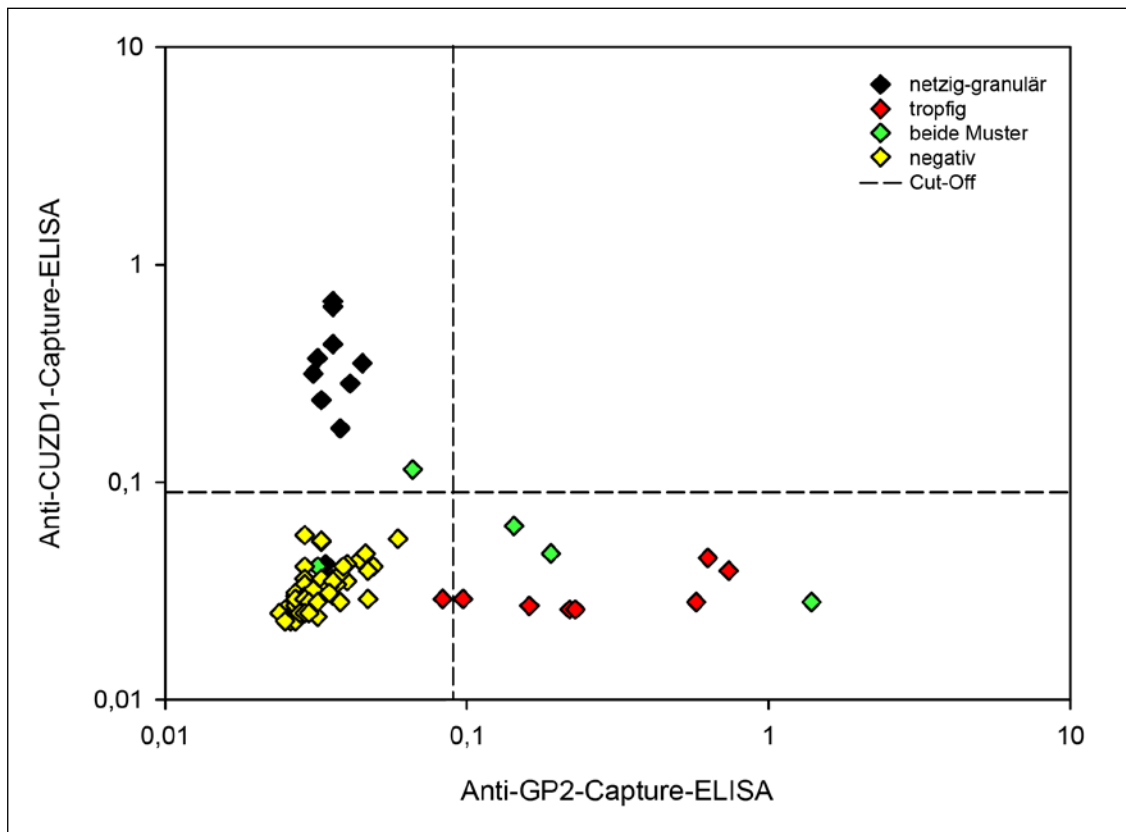


Abbildung 24: Gegenüberstellung Anti-CUZD1-Capture-ELISA und Anti-GP2-Capture-ELISA.

4.3. Prävalenz der Autoantikörper gegen exokrines Pankreas (PAk) bei Morbus Crohn

Von 360 Patienten meines Studienkollektivs waren 96 an einem Morbus Crohn erkrankt, 39 an einer Colitis ulcerosa, bei den übrigen Patienten konnte eine Diagnose nicht zweifelsfrei gestellt werden.

4.3.1. Prävalenz der PAK, ermittelt durch Immunfluoreszenz mit Pankreasgewebe

Mit Pankreasgewebe als Substrat zeigten die Seren von insgesamt 30 der 96 (31,2%) Patienten mit Morbus Crohn Autoantikörper gegen Azinuszellen des Pankreas, bei Colitis ulcerosa waren es 5,0%. Die Ergebnisse aus früheren Studien (Stöcker et al., 1984) wurden damit annähernd bestätigt, auch hinsichtlich der Geschlechterverteilung: 23 von 65 Frauen (35,4%) und 7 von 31 Männern (22,6%) mit Morbus Crohn waren Antikörper-

positiv (Verhältnis Frauen zu Männer 1,6; bei Stöcker et al. 1984: 0,9). Bei keiner der 50 gesunden Kontrollpersonen enthielt das Serum Pankreasantikörper.

Von den 30 positiven Proben aus meinem Kollektiv zeigten 16 Seren ausschließlich netzig-granuläre Fluoreszenz, bei 8 Seren trat ein ausschließlich tropfiges Muster auf, beide Muster gleichzeitig fand ich bei 6 Seren. Insgesamt konnte man demnach das netzig-granuläre Muster 22-mal beobachten: 16-mal allein, und 6-mal in Kombination mit dem tropfigen Muster. Das tropfige Muster konnte 14-mal nachgewiesen werden: 8-mal allein und 6-mal in Kombination mit dem netzig-granulären Muster.

Die Pankreasantikörper gehörten den Immunglobulinklassen IgA und IgG an. Bei den 30 positiven Seren war es 6-mal die Klasse IgA (20,0%), 18-mal (60,0%) nur die Klasse IgG, und in 6 Fällen (20,0%) IgA und IgG gleichzeitig. Insgesamt wurde somit in den 30 positiven Seren 12-mal spezifisches IgA und 24-mal spezifisches IgG nachgewiesen.

4.3.2. Prävalenz der PAK, ermittelt durch Immunfluoreszenz mit transfizierten HEK-Zellen

Parallel zum Pankreasgewebe habe ich HEK293-Zellen, die mit den Antigenen CUZD1 und GP2 transfiziert waren, als Substrat für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. In 34 der 96 getesteten Seren konnte ich **mit transfizierten HEK293-Zellen**, CUZD1 und GP2 zusammengenommen, Autoantikörper nachweisen (35,4%; 26 von 65 weiblichen und 8 von 31 männlichen Morbus-Crohn-Patienten). Keines der Kontrollseren reagierte mit diesen Zellen.

9 der 34 Pankreas-Antikörper bestanden nur aus IgA (26,4%), 17 nur aus IgG (50,0%), und in 8 Fällen (23,5%) fanden sich IgA und IgG nebeneinander. Insgesamt ließen sich demnach in den 34 positiven Seren 17-mal IgA und 25-mal IgG nachweisen.

Separat betrachtet, reagierten im Immunfluoreszenztest **mit CUZD1-transfizierten Zellen** als Substrat 25 der 96 Seren (26,0%). Bei den 25 positiven Morbus-Crohn-Patienten handelte es sich um 19 Frauen (29,2% von 65) und 6 Männer (19,4% von 31). Keines der Kontrollseren zeigte auf den CUZD1-transfizierten Zellen eine positive Reaktion.

Die insgesamt 25 Anti-CUZD1-Antikörper bestanden in 8 Fällen (32,0%) aus IgA, in 12 Fällen (48,0%) aus IgG, und in 5 Fällen (20,0%) fanden sich Antikörper beider Klassen,

IgA und IgG, sodass PAK-IgA-Antikörper insgesamt 13-mal und PAK-IgG-Antikörper insgesamt 17-mal auftraten.

Die Sensitivität der CUZD1-transfizierten Zellen im Vergleich zum Pankreasgewebe betrug für IgA und für IgG 100,0%, die Spezifität für IgA 96,5%, für IgG 98,8%. Die Signifikanz p , ermittelt mit dem exakten Test nach Fisher, ergab für IgA den Wert $2,54 \times 10^{-11}$, für IgG den Wert $2,57 \times 10^{-17}$. Der Zusammenhang beider Tests ist somit statistisch signifikant.

Mit GP2-transfizierten Zellen als Substrat reagierten 15 der getesteten Seren (15,6% von 96), 11 der 15 positiven Morbus Crohn Patienten waren Frauen (16,9% von 65), und 4 waren Männer (12,9% von 31). Sämtliche Kontrollseren zeigten auch hier negative Ergebnisse.

Antikörper der Klasse IgA allein fanden sich in 1 von 15 positiven Seren (6,7%), der Klasse IgG allein in 9 Seren (60%), und Antikörper beider Klassen nebeneinander in 5 Seren (33,3%). Insgesamt trat somit 6-mal IgA und 14-mal IgG auf.

Die Sensitivität der GP2-transfizierten Zellen im Vergleich zum Pankreasgewebe betrug für IgA und IgG 100,0%, die Spezifität für IgA 97,8%, für IgG 98,8%. Die Signifikanz p ergab für IgA den Wert $4,52 \times 10^{-6}$, für IgG den Wert $3,47 \times 10^{-15}$. Der Zusammenhang beider Tests ist somit statistisch signifikant.

Keines der 96 Morbus-Crohn-Seren zeigte auf den nicht-transfizierten Zellen eine spezifische Reaktion. Damit war gezeigt, dass in den transfizierten Zellen CUZD1 und GP2 die Zielantigene darstellen und nicht eine andere Struktur dieser Zellen.

4.3.2.1. Verteilung der Immunglobulin IgG-Subklassen

Zur weiteren Differenzierung der Autoantikörper habe ich alle Seren nicht nur mit Anti-Human-Antikörpern der Klasse IgA und IgG getestet, sondern zusätzlich auch Testreihen durchgeführt mit Anti-Human-Antikörpern der Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄. Wenn in der Standardverdünnung (1:10) Autoantikörper der Klasse IgG nachweisbar waren, habe ich die Subklassen bestimmt. Wie Tabelle 1 zeigt, überwiegen IgG₁ und IgG₂, weitaus seltener sind die Subklassen IgG₃ und IgG₄. Entsprechendes wurde bereits früher berichtet (Müller-Ladner et al., 1996). Hinsichtlich der IgG-Subklassen-Verteilung

ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Pankreasgewebe und den beiden rekombinanten Zell-Substraten.

Im Allgemeinen war bei den IgG-Subklassen eine Unterscheidung zwischen positivem und negativem Ergebnis mit den transfizierten Zellen leichter möglich als mit den Gewebeschnitten, weil weniger unspezifische Fluoreszenz auftrat. Insbesondere die Antikörper der Subklasse IgG₂ ließen sich mit transfizierten Zellen besser beurteilen.

	IgG gesamt	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄
Pankreas netzig-granulär	16	8	6	0	1
CUZD1-transfizierte HEK293-Zellen	17	8	5	0	1
Pankreas tropfig	13	6	9	2	0
GP2-transfizierte HEK293-Zellen	14	6	11	2	0
untransfizierte Zellen	0	0	0	0	0

Tabelle 1: Autoantikörper gegen exokrines Pankreas bei Patienten mit eindeutiger Diagnose M. Crohn. Anzahl der Seren mit Antikörpern der Immunglobulinklasse IgG_{gesamt} und der Immunglobulin-Subklassen IgG₁₋₄, ermittelt durch indirekte Immunfluoreszenz. Vergleich der Substrate Pankreasgewebe und transfizierte HEK293-Zellen.

4.3.3. Prävalenz der PAK, ermittelt durch ELISA

Drei unterschiedliche ELISA wurden zur Ermittlung der Antikörperkonzentration eingesetzt: Ein ELISA mit direkter Antigen-Kopplung, ein CUZD1-Capture-ELISA und ein GP2-Capture-ELISA. Da die Tests neu entwickelt und nicht standardisiert sind, standen keine Kalibratoren zur Verfügung. Die Bestimmung derjenigen Extinktion, von der an ein Ergebnis als positiv gewertet wird (Cut-off), wurde daher anhand der für gesunde Kontrollperso-

nen ermittelten Werte vorgenommen. Für alle drei Varianten des ELISA wurde der Cut-off auf 0,09 festgelegt.

4.3.3.1. ELISA mit direkter Antigen-Kopplung: Gemisch CUZD1 und GP2

Bei der Messung mittels Direkt-ELISA wurden Autoantikörper in 25 der 96 getesteten Patienten-Seren angezeigt (26,0%; 6 Männer, 19 Frauen). Die ermittelten Extinktionswerte reichten von 0,090 bis 1,348. Die für das gesunde Kontrollkollektiv gemessenen Werte variierten zwischen 0,018 und 0,085.

4.3.3.2. CUZD1- und GP2-Capture-ELISA

In 10 der 96 getesteten Seren (10,4%; 1 Mann, 9 Frauen) war die Reaktion im CUZD1-Capture-ELISA positiv, mit Extinktionen zwischen 0,114 und 0,680. Für die Seren der Kontrollgruppe ergaben sich Werte im Bereich von 0,027 bis 0,049. Der GP2-Capture-ELISA zeigte ebenfalls in 10 Seren (10,4%; 3 Männer, 7 Frauen) Antikörper an, die Extinktionen lagen zwischen 0,097 und 1,385. Die Werte für die gesunden Kontrollpersonen lagen im Bereich von 0,030 bis 0,055.

Nahezu alle Patienten-Seren mit einem positiven Ergebnis in der indirekten Immunfluoreszenz reagierten auch im Direkt-ELISA positiv (Abbildung 25 und Tabelle 2). Nur zwei Immunfluoreszenz-positive Seren wurden vom ELISA nicht erfasst. In beiden Fällen war auf dem Pankreasgewebe ein netzig-granuläres Muster zu erkennen (Titer 1:10 bzw. 1:100), mit CUZD1-transfizierten HEK-Zellen ergab sich ein Titer von 1:100 bzw. 1:1000.

Umgekehrt waren in drei Seren, für die sich im Direkt-ELISA ein niedrig positives Resultat ergab, im Immunfluoreszenztest auf Pankreasgewebe keine Antikörper nachweisbar. Eines davon wurde jedoch sowohl mit CUZD1-, als auch mit GP2-transfizierten Zellen als positiv identifiziert. Das zweite zeigte im Immunfluoreszenztest mit Gewebeschnitten und mit CUZD1-transfizierten Zellen Autoantikörper der Klasse IgA an. Das dritte war mit einer Extinktion $E=0,090$ nur im Direkt-ELISA grenzwertig positiv, mit den beiden Capture-ELISA und den Immunfluoreszenztests wurden keine Antikörper nachgewiesen.

Die Sensitivität des Direkt-ELISA im Vergleich zum Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe betrug 91,7%, die Spezifität 95,8%. Die Signifikanz p ergab den Wert $2,20 \times 10^{-16}$. Der Zusammenhang beider Tests ist somit statistisch signifikant.

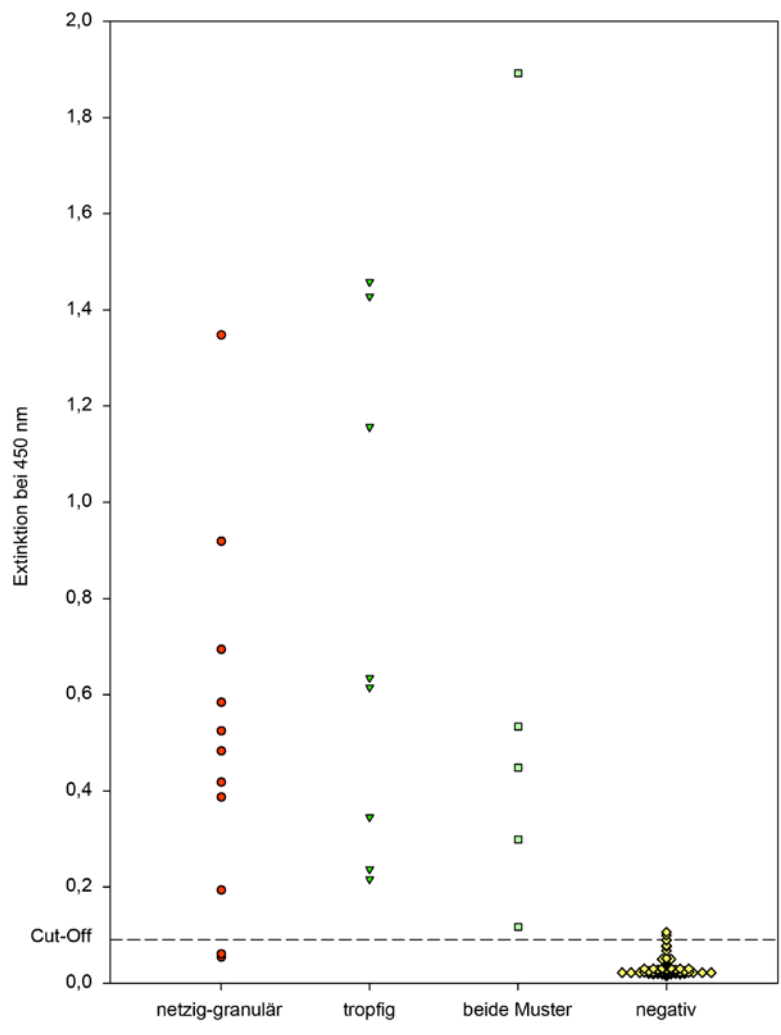
Die mit dem CUZD1-Capture-ELISA erzielten Ergebnisse stimmten ebenfalls mit den Resultaten der Immunfluoreszenz weitgehend überein (Abbildung 26 und Tabelle 3). Mit Pankreasgewebe als Substrat fand sich bei 11 Seren ein netzig-granuläres Muster, 9 davon wurden auch vom CUZD1-Capture-ELISA erfasst, in den beiden anderen Fällen war der ELISA negativ. Wenn beide Muster nebeneinander (5 Fälle) auftraten, wurde im CUZD1-ELISA nur 1 Serum als positiv erkannt, 4 zeigten eine negative Reaktion.

Alle im CUZD1-Capture-ELISA positiven Seren hatten in der Immunfluoreszenz ein netzig-granuläres Muster gezeigt, entweder allein (9 Seren) oder in Kombination mit tropfigem Muster (1 Serum). Keines der Seren, die auf dem Pankreas ein tropfiges Muster aufwiesen, war in diesem ELISA positiv.

Die Sensitivität des CUZD1-Capture-ELISA im Vergleich zum Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe betrug 62,5%, die Spezifität 100,0%. Die Signifikanz p ergab den Wert $7,10 \times 10^{-10}$. Der Zusammenhang beider Tests ist somit statistisch signifikant.

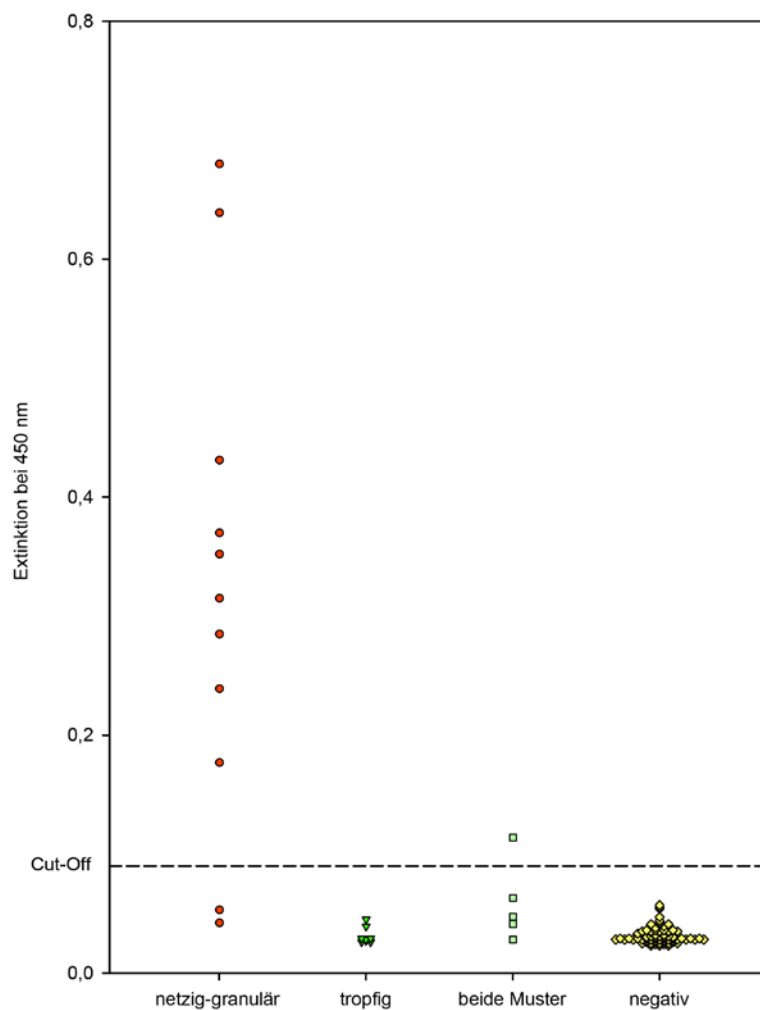
Auch mit dem GP2-Capture-ELISA konnten die Immunfluoreszenz-Ergebnisse bestätigt werden (Abbildung 27 und Tabelle 4). Von den 96 eindeutigen Crohn Patienten der Studie wiesen in diesem ELISA 10 eine Extinktion über 0,09 auf, davon hatten 7 Seren auch mit Pankreasgewebe ein tropfiges Muster ergeben, bei 3 der Seren waren im Immunfluoreszenztest beide Muster zu erkennen. Für alle 11 Proben, die ein netzig-granuläres Muster gezeigt hatten, waren die Ergebnisse im GP2-ELISA negativ. In drei Fällen erfasste der GP2-ELISA die Antikörper nicht, die mit Pankreasgewebe ein tropfiges Muster (1 Serum) oder beide Muster (2 Seren) gezeigt hatten.

Die Sensitivität des GP2-Capture-ELISA im Vergleich zum Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe betrug 100,0%, die Spezifität 96,5%. Die Signifikanz p ergab den Wert $2,54 \times 10^{-11}$. Der Zusammenhang beider Tests ist somit statistisch signifikant.



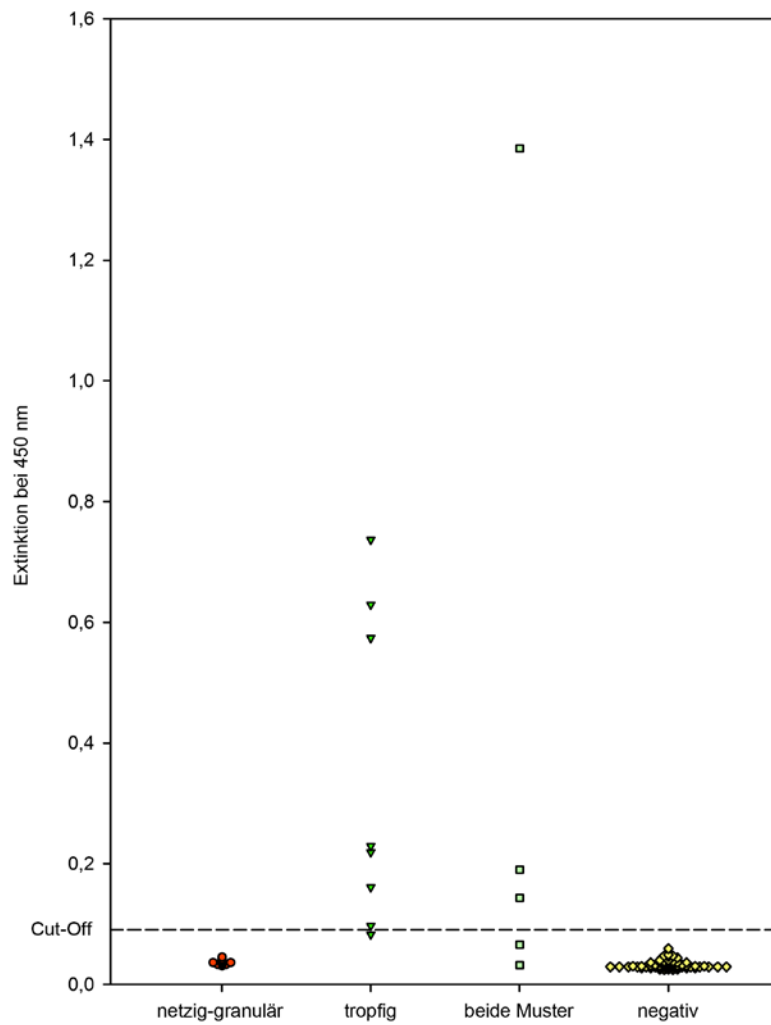
n=96		Pankreas			
		netzig-granulär	tropfig	beide Muster	negativ
Direkt-ELISA	positiv	9	8	5	3
	negativ	2	0	0	69

Abbildung 25 und **Tabelle 2**: Autoantikörper gegen Pankreas-Antigene, Vergleich der Ergebnisse aus Immunfluoreszenztest (Substrat Pankreasgewebe, IgG) und direkt beschichtetem ELISA (Beschichtung: Extrakt aus homogenisiertem humanem Pankreas, CUZD1 und GP2 als Gemisch enthaltend, IgG).



n=96		Pankreas			
		netzig-granulär	tropfig	beide Muster	negativ
Anti-CUZD1-Capture ELISA	positiv	9	0	1	0
	negativ	2	8	4	72

Abbildung 26 und **Tabelle 3**: Autoantikörper gegen Pankreas-Antigene, Vergleich der Ergebnisse aus Immunfluoreszenztest (Substrat Pankreasgewebe, IgG) und Anti-CUZD1-Capture-ELISA (IgG).



n=96		Pankreas			
		netzig-granulär	tropfig	beide Muster	negativ
Anti-GP2-Capture ELISA	positiv	0	7	3	0
	negativ	11	1	2	72

Abbildung 27 und **Tabelle 4**: Autoantikörper gegen Pankreas-Antigene, Vergleich der Ergebnisse aus Immunfluoreszenztest (Substrat Pankreasgewebe, IgG) und Anti-GP2-Capture-ELISA (IgG).

4.4. Diagnostisches Potential Pankreasgewebe und transfizierte HEK293-Zellen

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenztests mit den Substraten Pankreasgewebe, CUZD1- und GP2-transfizierte HEK293-Zellen habe ich in Tabelle 5 für IgA und in Tabelle 6 für IgG aufgetragen.

Es hat sich eindeutig gezeigt, dass das netzig-granuläre Fluoreszenzmuster des Pankreasgewebes und die CUZD1-Reaktion der transfizierten Zellen konkordant sind, wie sich auch das tropfige Fluoreszenzmuster und die spezifische Fluoreszenz-Reaktion der GP2-transfizierten Zellen im Einklang befinden:

Alle Seren, die eine netzig-granuläre Fluoreszenz auf dem Pankreasgewebe zeigten, waren auch positiv auf den mit CUZD1 transfizierten Zellen (IgA 8 Seren, IgG 11 Seren). Alle Seren, die auf dem Pankreasgewebe tropfige Fluoreszenz zeigten, waren auch positiv auf den mit GP2 transfizierten Zellen (IgA 2 Seren, IgG 8 Seren).

Diejenigen Seren, die auf den Pankreas-Schnitten beide Muster nebeneinander erzeugten, netzig-granulär und tropfig, waren auch auf beiden Zellvarianten positiv, sowohl auf den mit CUZD1 transfizierten, als auch auf den mit GP2 transfizierten Zellen (IgA 2 Seren, IgG 5 Seren).

Wenn ein Serum auf dem Pankreasgewebe nur tropfiges Muster erzeugte, waren nie gleichzeitig im selben Serum die CUZD1-transfizierten Zellen positiv. Ebenso fand sich in keiner Probe die Kombination aus nur netzig-granulärem Muster auf Pankreasgewebe und positivem Resultat auf GP2-transfizierten Zellen.

In einigen Fällen erzielte man mit den transfizierten Zellen eine positive Reaktion, mit Pankreasgewebe ergab sich aber ein negatives Resultat (CUZD1: IgA 3 Seren, GP2: IgA 2 Seren; Doppelantikörper CUZD1 und GP2: IgG 1 Serum). Umgekehrt ergab sich nie eine positive Reaktion mit Pankreasgewebe, wenn der Test mit transfizierten Zellen negativ war. Die transfizierten Zellen wiesen mit 35,4% positiv gemessener Seren eine höhere Nachweis-Empfindlichkeit auf als das Pankreasgewebe (31,2%).

IgA n=96		Pankreasgewebe			
		netzig-granulär	tropfig	beide Muster	negativ
Transfizierte HEK293-Zellen	CUZD1	8	0	0	3
	GP2	0	2	0	2
	beide	0	0	2	0
	negativ	0	0	0	79

Tabelle 5: Indirekte Immunfluoreszenz, Autoantikörper gegen exokrines Pankreas bei 96 Patienten mit sicher diagnostiziertem M. Crohn, Vergleich der Substrate Pankreasgewebe und transfizierte HEK293-Zellen, IgA.

IgG n=96		Pankreasgewebe			
		netzig-granulär	tropfig	beide Muster	negativ
Transfizierte HEK293-Zellen	CUZD1	11	0	0	0
	GP2	0	8	0	0
	beide	0	0	5	1
	negativ	0	0	0	71

Tabelle 6: Indirekte Immunfluoreszenz, Autoantikörper gegen exokrines Pankreas bei 96 Patienten mit sicher diagnostiziertem M. Crohn, Vergleich der Substrate Pankreasgewebe und transfizierte HEK293-Zellen, IgG.

Alle Seren, bei denen in der Standardverdünnung (1:10) Autoantikörper nachzuweisen waren, habe ich austitriert, also ermittelt, bei welcher Serumverdünnung das Resultat negativ wird. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden so gewählt, dass der Abstand zwischen ihnen dem Faktor 3,162 (Quadratwurzel aus 10) entspricht, also 1:32, 1:100, 1:320 usw. Der angegebene Antikörpertiter bezeichnet somit die höchste Verdünnungsstufe des Patientenserums, bei der gerade noch Antikörper nachzuweisen waren.

Es zeigte sich, dass mit den rekombinanten Substraten deutlich höhere Titer für die Antikörper gegen das exokrine Pankreas gemessen werden als mit den Gewebeschnitten (Abbildungen 28 und 29). Mit anderen Worten: Die transfizierten Zellen sind sensitiver als das Pankreasgewebe. Das geht auch aus den Diagrammen in den Abbildungen 30 und 31 hervor. Wären die Titer für rekombinante Zellen und Gewebeschnitte genau gleich, würden alle Punkte auf der eingezeichneten Winkelhalbierenden liegen. Würden sich mit Pankreasgewebe höhere Titer ergeben als mit den HEK-Zellen, lägen alle Punkte rechts unterhalb der Geraden. Es finden sich jedoch alle (CUZD1) bzw. die meisten (GP2) Messwerte links oberhalb der Geraden, ein Hinweis auf die höhere Sensitivität der rekombinanten Zellen.

Bezüglich der diagnostischen Spezifität erwiesen sich die Substrate Pankreasgewebe und transfizierte HEK-Zellen als gleichermaßen zuverlässig: Keines der drei Substrate zeigte mit den 50 Seren gesunder Kontrollpersonen eine positive PAK-Reaktion.

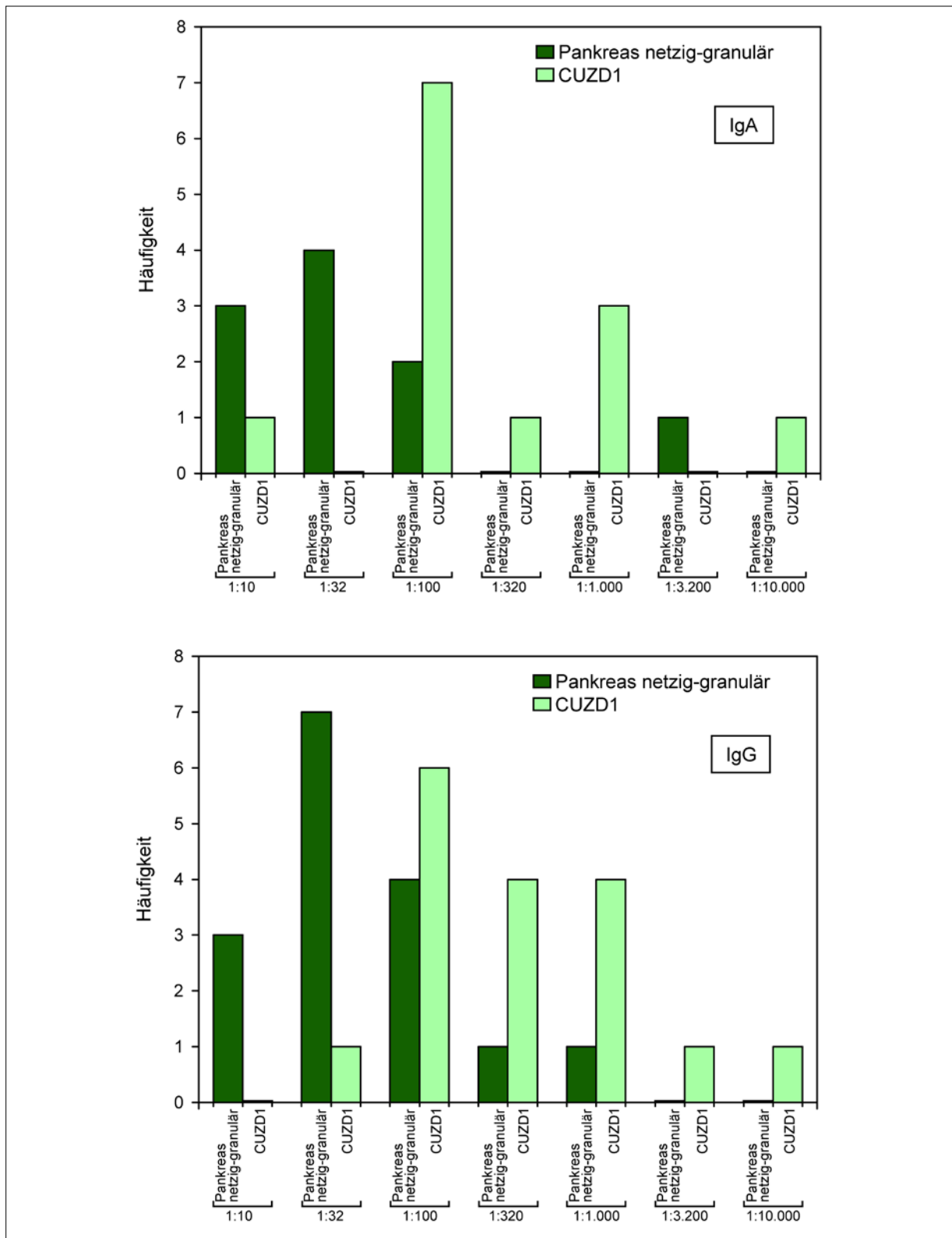


Abbildung 28: Indirekter Immunfluoreszenztest, Häufigkeit der ermittelten Antikörper-Titer mit den Substraten Pankreasgewebe (Muster netzig-granulär) und CUZD1-transfizierte HEK293-Zellen.

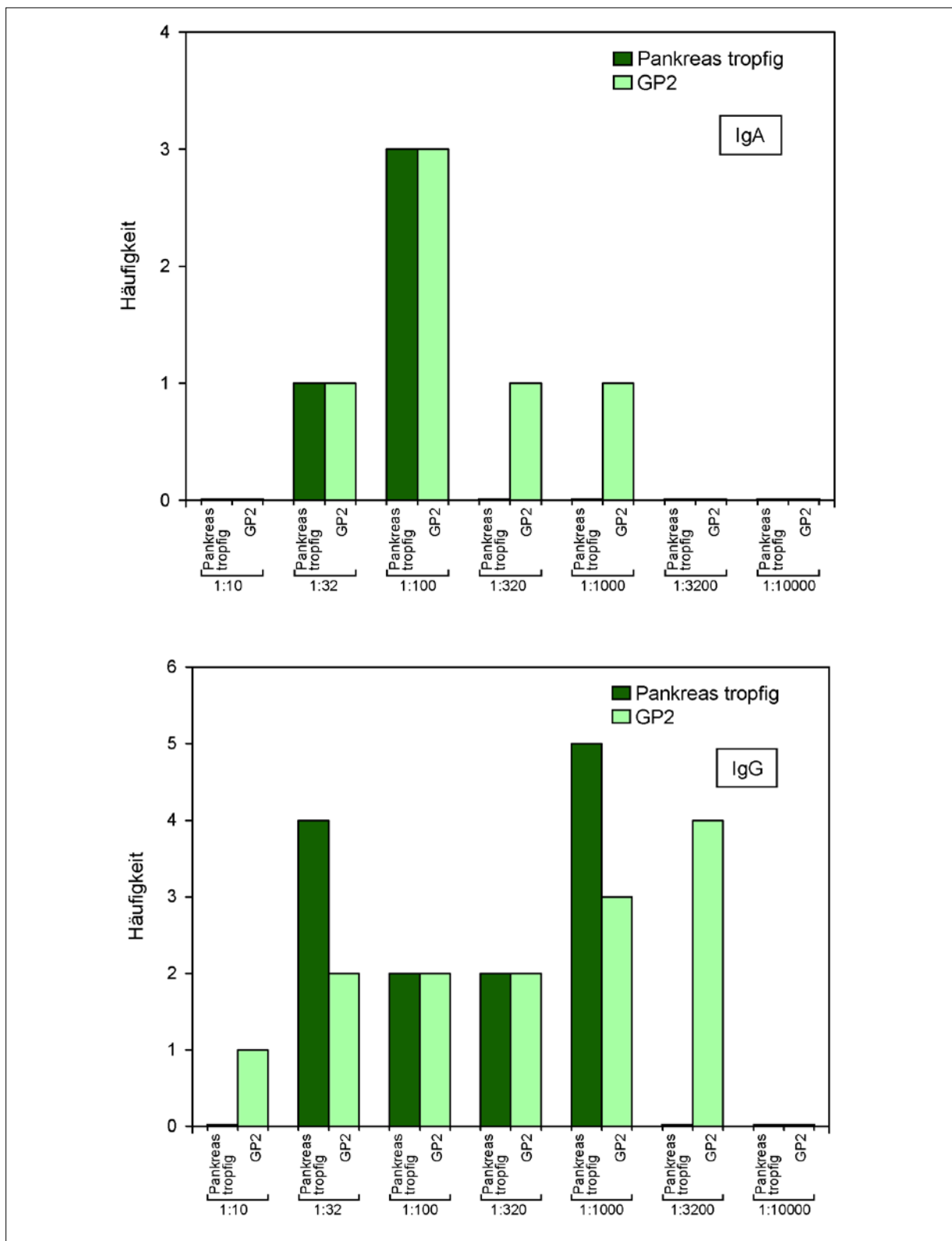


Abbildung 29: Indirekter Immunfluoreszenztest, Häufigkeit der ermittelten Antikörper-Titer mit den Substraten Pankreasgewebe (Muster tropfig) und GP2-transfizierte HEK293-Zellen.

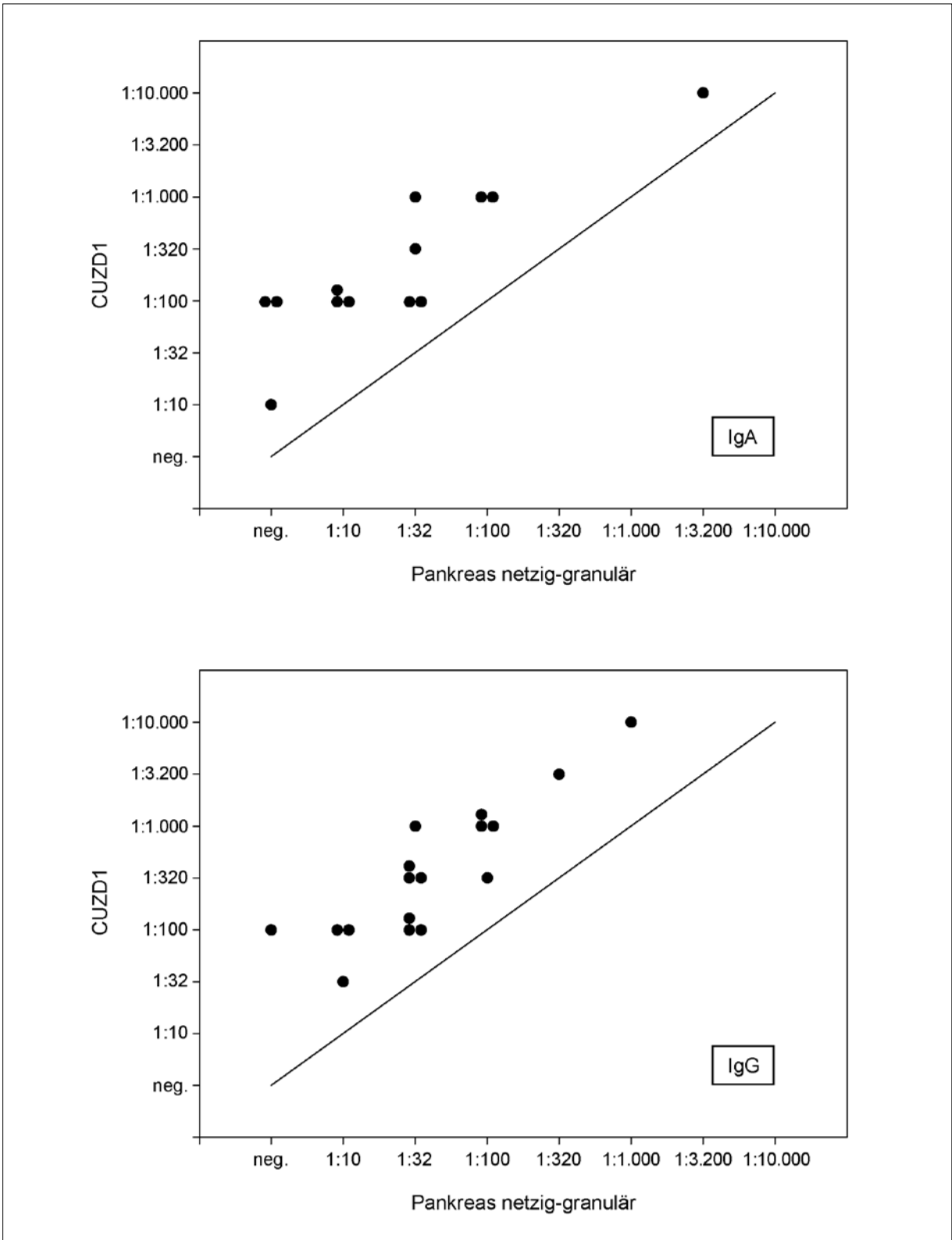


Abbildung 30: Indirekter Immunfluoreszenztest, Vergleich der Titer für die Substrate Pankreasgewebe (Muster netzig-granulär) und CUZD1-transfizierte Zellen.

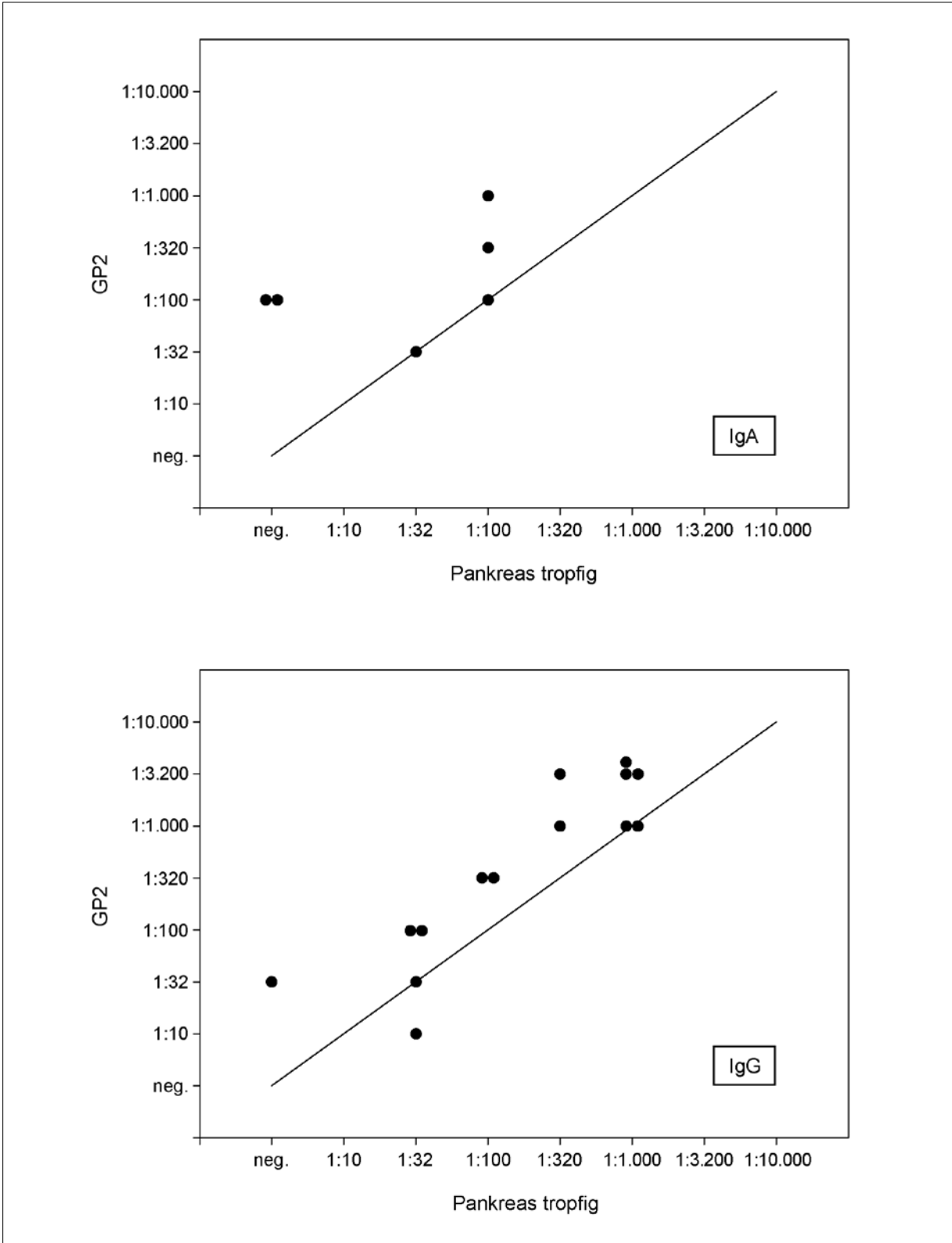


Abbildung 31: Indirekter Immunfluoreszenztest, Vergleich der Titer für die Substrate Pankreasgewebe (Muster tropfig) und GP2-transfizierte Zellen.

5. DISKUSSION

Autoantikörper gegen Sekretionsprodukte des exokrinen Pankreas findet man in Seren von Patienten mit Morbus Crohn. Sie gelten als pathognomonische Marker für diese Erkrankung (Stöcker et al., 1984; Stöcker et al., 1984/2; Finkbeiner et al., 1985; Stöcker et al., 1987; Seibold et al., 1991; Joossens et al., 2004). Im indirekten Immunfluoreszenztest mit Primatenpankreas erzeugen sie zwei unterschiedliche Muster: Eine netzig-granuläre und eine tropfige Fluoreszenz. Als Ziel-Antigene wurden die **Glycoproteine CUZD1 und GP2 identifiziert** (Stöcker et al., 2008; Aulinger-Stöcker et al., 2008; Roggenbuck et al., 2009; Komorowski, Aulinger-Stöcker et al., 2013). Die vorliegende Arbeit liefert den letzten Beweis, dass genau diese Glycoproteine mit den Morbus-Crohn-assoziierten Anti-Pankreas-Antikörpern reagieren. Diese Erkenntnis könnte als Wegweiser zur weiteren Aufklärung des Pathomechanismus der chronisch-entzündlichen Darmkrankheiten dienen.

Ich habe über zwei Jahre lang prospektiv an der Klinik für Innere Medizin der Universität Lübeck Patientenkollektive zusammengestellt und umfangreiche serologische Untersuchungen vorgenommen, unter Einsatz der indirekten Immunfluoreszenz und mehrerer Enzym-Immuntechniken. Im Immunfluoreszenztest habe ich mehrere Substrate miteinander verglichen: Humanes Pankreasgewebe mit rekombinanten humanen HEK293-Zellen, die mit CUZD1 oder mit GP2 transfiziert waren. Es hat sich gezeigt, dass das bekannte **netzig-granuläre** Fluoreszenzmuster von den Autoantikörpern gegen **CUZD1** hervorgerufen wird, das **tropfige** Muster von den Autoantikörpern gegen **GP2**.

Im gleichen Sinn reagierten die Seren auch in monospezifischen Anti-CUZD1- und Anti-GP2-Capture-ELISA. Laboratorien, in denen die indirekte Immunfluoreszenz nicht etabliert ist, können von jetzt an **Autoantikörper gegen CUZD1 und GP2 im ELISA nachweisen**.

Unabhängig von unseren Studien (Komorowski, Aulinger-Stöcker et al., 2013; Aulinger-Stöcker et al., 2008) wurde GP2 gleichzeitig von einer zweiten Arbeitsgruppe als Zielantigen bei chronisch-entzündlichen Darmkrankheiten beschrieben (Conrad et al., 2008; Roggenbuck et al., 2009). Das zweite, ebenso relevante Zielantigen CUZD1 wurde von dieser Gruppe jedoch übersehen. Mehr als die Hälfte der Morbus-Crohn-assoziierten Pankreas-Autoantikörper ist aber gegen CUZD1 gerichtet (Prävalenz: Anti-CUZD1 allein 19,8%, Anti-GP2 allein 9,4%, Antikörper gegen beide Antigene 6,2%).

Roggenbuck und seine Arbeitsgruppe vergleichen ihren Anti-GP2 ELISA [GP2(Sf9) ELISA] mit einem indirekten Immunfluoreszenztest, bei dem rekombinante Zellen als Substrat dienen. Sie finden in ihrem ELISA ebenso viele positive Anti-GP2-Autoantikörper bei Morbus Crohn wie unsere Gruppe mit den beiden rekombinanten Substraten Anti-CUZD1 und Anti-GP2 zusammen, und sie folgern daraus, dass ihr Test womöglich die Anti-CUZD1-Antikörper miterfasst. Als Erklärung dafür diskutieren sie eine Kreuzreaktivität und eine fehlerhafte Expression des GP2 in HEK293-Zellen (Roggenbuck et al., 2010). Diese Möglichkeit konnte experimentell durch Neutralisationsversuche und durch den Einsatz von nativem und rekombinantem Antigen eindeutig ausgeschlossen werden (Stöcker et al., 2013). Es zeigte sich zweifelsfrei, dass **Anti-CUZD1 und Anti-GP2 unterschiedliche Entitäten** sind: Versetzt man nämlich Pankreas-Antikörper-positive Morbus Crohn Seren mit nativem gereinigtem CUZD1, wird ausschließlich das netzig-granuläre Fluoreszenzmuster ausgelöscht, versetzt man die Seren mit isoliertem GP2, verschwindet im Immunfluoreszenztest ausschließlich das tropfige Muster. Entsprechend reagieren in einem Capture-ELISA, bei dem zuerst mit einem monoklonalen Maus-Anti-CUZD1 beschichtet wird, dann mit einer UEA I-aufgereinigten Pankreas-Fraktion, nur die Seren mit netzig-granulärem Fluoreszenzmuster, während von einem entsprechenden Test mit Anti-GP2 nur die Seren mit tropfigem Muster erfasst werden. Ein Vergleich zwischen dem von Roggenbuck und Conrad vertriebenen ELISA und zwei eigenen monospezifischen Capture-ELISA, bei denen Lysate von CUZD1- oder GP2-exprimierenden HEK293-Zellen verwendet wurden, hat klar erwiesen, dass es sich um zwei verschiedene Autoantikörper handelt (W. Stöcker, pers. Mitteilung). Dass Roggenbuck und Conrad für ihren kommerziellen ELISA eine so hohe Sensitivität ermittelt haben, dürfte an einer zu empfindlichen Kalibration liegen, wie die von Roggenbuck zu hoch gemessene Anti-GP2-Prävalenz bei Colitis ulcerosa zeigt (Stöcker et al., 2013).

Darüber hinaus ist von **Insektenzellen exprimiertes GP2** (GP2 (Sf9), Roggenbuck et al., 2010) **als Target-Antigen** für die Antikörper-Diagnostik **nicht geeignet**, weil die Autoantikörper hauptsächlich mit Glycoepitopen reagieren, die von Insektenzellen nicht authentisch exprimiert werden: Im Gegensatz zu Säugerzellen können Sf9 dem Proteingerüst nur einfache N-Glycane mit terminaler Mannose anlagern (Harrison et al., 2006). Möglicherweise kommt es dadurch zu einer artifiziellen Kreuzreaktivität zwischen GP2 und dem Mannan der *Saccharomyces cerevisiae*, was die hohe Konkordanz zwischen dem Anti-GP2(Sf9)- und dem (Roggenbuck) ASCA-ELISA nahelegt. Wie von Teegen und weiteren

Autoren bereits vor langer Zeit gezeigt wurde, besteht aber zwischen Morbus-Crohn-assoziierten Pankreas-Autoantikörpern und ASCA kein Zusammenhang (Teegen et al., 2000).

In die vorliegende Studie wurden nur solche Patienten einbezogen, bei denen sowohl klinisch als auch endoskopisch als auch histologisch eindeutig und zweifelsfrei die Diagnose Morbus Crohn gestellt werden konnte. Die strenge und **sorgfältige Auswahl der Patienten** bildet eine wesentliche Voraussetzung, um zuverlässige Resultate für die Prävalenz der Autoantikörper zu ermitteln. Mit Pankreasgewebe als Substrat konnten bei 31,2% der Patienten mit Morbus Crohn Autoantikörper gegen Azinuszellen nachgewiesen werden (Colitis ulcerosa 5,0%), beim Einsatz transfizierter HEK-Zellen erhöhte sich der Prozentsatz positiver Befunde auf 35,4%. Die Arbeitsgruppe Stöcker et al. (1987) ermittelte mit Pankreasgewebe bei M. Crohn eine Prävalenz von 39% und bei Colitis ulcerosa von 2%.

Diese Arbeit begründet sich zu großen Teilen auf dem **Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz**, deren Ergebnisse einer großen Subjektivität unterworfen sind. Die Beurteilung der Resultate mit dem Fluoreszenzmikroskop erfordert umfangreiche Erfahrung. Bei der Bewertung der Titerstufen muss man individuelle Differenzen von einer quadratischen Titerstufe in Kauf nehmen. Dennoch soll man das Potential der indirekten Immunfluoreszenz nicht unterschätzen, nahezu alle heute bekannten Autoantikörper sind unter Verwendung dieser Methode entdeckt worden. Demgegenüber ist die Datenakquisition bei den Enzymimmuntechniken objektiver, weil die Messwerte photometrisch ermittelt werden.

Einer der Erträge der vorliegenden Arbeit ist die **Verbesserung des diagnostischen Potentials** der Autoantikörper gegen Pankreas-Azini. Die mit **GP2 und CUZD1 transfizierten HEK293-Zell-Linien** sind dem **Pankreasgewebe** deutlich überlegen. Die Resultate sind einfacher und zuverlässiger abzulesen. **Unspezifische Fluoreszenz**, die bei Verwendung von Gefrierschnitten des Pankreas eine Beurteilung der Ergebnisse im Mikroskop häufig erschwert oder verfälscht, ist leichter zu identifizieren und tritt mit rekombinanten Zellsubstraten **erheblich seltener** auf. Insbesondere bei niedriger Antikörperkonzentration ist eine Unterscheidung zwischen positivem und negativem Ergebnis mit Gefrierschnitten oft nicht eindeutig zu treffen, besonders wenn gleichzeitig Antikörper gegen weitere Bestandteile des Gewebes vorhanden sind und zusätzlich mitreagieren. Mit den

transfizierten Zellen ließ sich darüber hinaus die **Empfindlichkeit** beim Nachweis der Pankreas-Antikörper **von 31,2% auf 35,4% steigern**.

Rekombinante Antigene exprimierende Kulturzellen stehen im Gegensatz zu Primaten-Pankreas **unbegrenzt und in reproduzierbarer Qualität als Substrate** zur Verfügung. Kultursubstrate werden bereits erfolgreich für die Bestimmung der Antikörper gegen intestinale Becherzellen eingesetzt (in Kultur gehaltene Enterocyten differenzieren sich nach Stimulation zu Becherzellen). Es ist zu wünschen, dass in Zukunft auch viele andere Zielstrukturen rekombinant dargestellt werden können, für die man bisher Pankreasgewebe einsetzt, wie zum Beispiel zur die Bestimmung der Autoantikörper gegen Inselzellen.

Immunfluoreszenz mit rekombinanten Zellsubstraten bedarf weder einer aufwändigen Isolierung noch eines zusätzlichen Verfahrensschrittes der Bindung eines Antigens an eine Oberfläche, wie bei den Enzymimmuntests. Antikörper, für die noch keine entsprechenden ELISA existieren, können im Immunfluoreszenztest nachgewiesen werden.

Die **Immunfluoreszenz** bietet die einzigartige Möglichkeit, in einem **Biochip-Mosaik die konventionellen Gewebe- oder Zell-Substrate zusammen mit rekombinanten Zellsubstraten** einzusetzen und parallel zusätzlich Antikörper gegen intestinale Becherzellen, Granulozyten (pANCA) und gegen die Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* zu untersuchen. Hierfür stellt man Mosaiken aus verschiedenen Substraten zusammen. Die Antikörper werden in ein und demselben Testfeld gleichzeitig nebeneinander mit einem einzigen Tropfen Serum getestet. Biochips mit folgenden Substraten werden hier für die indirekte Immunfluoreszenz als Substrate kombiniert: Gefrierschnitte von Primatenpankreas, Primatendarm, Kultur-Becherzellen, Ausstriche von *Saccharomyces cerevisiae*, sedimentierte Granulozyten und schließlich rekombinante CUZD1- und GP2-Zellen. Unter Verwendung dieser Mosaiken lässt sich die serologische Trefferquote bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen auf bis zu 85% erhöhen.

Mehrere Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren den **Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Pankreas-Antigen und dem klinischen Erscheinungsbild des Morbus Crohn** untersucht.

Bei Erwachsenen sind Anti-GP2-Antikörper (Klasse IgA) mit einem schnellerem Fortschreiten der Erkrankung und einem komplizierten Krankheitsverlauf verbunden. Die Zeit bis zu einem Operationsbedarf ist bei Patienten mit GP2-Antikörpern (IgA) und mit

CUZD1-Antikörpern (IgA) verkürzt, perianale Läsionen treten gehäuft auf (Papp et al., 2015).

Morbus-Crohn-Patienten mit Anti-GP2- und Anti-CUZD1-Antikörpern waren jünger bei Erstmanifestation und wiesen einen Befall von Ileum und Colon auf. Anti-GP2-Antikörper waren zudem vergesellschaftet mit Strikturen und der Notwendigkeit immunsuppressiver Behandlung (Michaels et al., 2015).

Andere Arbeitsgruppen bestätigten die Assoziation zwischen GP2 (IgG) und Krankheitsausdehnung (IgA und IgG), strikturierendem Verlauf und Operationsbedarf, nicht aber mit einem frühen Krankheitsbeginn (Rieder et al., 2013; Degenhardt et al., 2016). Krankheitsaktivität und fistulierender Verlauf zeigten in diesen Studien keinen Zusammenhang mit dem Vorhandensein der Antikörper.

Pavlidis et al., fanden einen Zusammenhang zwischen Anti-GP2-Antikörpern und frühem Krankheitsbeginn, ausgedehntem Befall, längerer Krankheitsdauer und strikturierendem Verlauf (Pavlidis et al., 2015; Pavlidis et al., 2016). Ein Zusammenhang zwischen Anti-CUZD1-Antikörpern und klinischem Erscheinungsbild wurde von dieser Gruppe nicht festgestellt.

In Serum und Faeces von Colitis-ulcerosa-Patienten mit einer Pouchitis finden sich höhere Konzentrationen der GP2-Antikörper, höher als bei Patienten ohne Pouchitis oder bei Personen, deren Colon aufgrund familiärer Polyposis entfernt worden war. Bei Patienten mit chronischer Pouchitis war GP2 in der Mukosa des Pouch erhöht, die Konzentration des GP2 war höher, wenn Patienten Crohn-ähnliche Komplikationen zeigten (Werner et al., 2013).

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass das Auftreten der Autoantikörper gegen CUZD1 und gegen unterschiedliche Isoformen des GP2 mit bestimmten klinischen Bedingungen assoziiert ist.

Eine nach GP2 Isoformen differenzierte Analyse in einem Kollektiv pädiatrischer Patienten zeigte, dass für die Diagnose Morbus Crohn Autoantikörper gegen die GP2-Isoformen 1 und 4 den besten prädiktiven Wert darstellen. Um M. Crohn von Colitis ulcerosa zu unterscheiden, erwiesen sich Anti-IgG-Antikörper gegen die GP2-Isoformen 3 und 4 als die geeignetsten Marker. Es zeigte sich auch hier, dass Anti-GP2-Antikörper mit komplizierte-

rem Verlauf und häufigeren Darmoperationen verbunden waren (Röber et al., 2017). Patienten mit einem ileoanalen Pouch, die Antikörper gegen die Isoformen 1 und 4 haben, neigen vermehrt dazu, im Pouch einen M. Crohn zu entwickeln (Cummings et al., 2017). Alle vier Isoformen scheinen mit einem verkürzten Zeitraum zwischen einer ersten und der zweiten Operation verbunden zu sein (Wölfel et al., 2017).

Signifikante Serumkonzentrationen der Anti-GP2-Antikörper (IgA) finden sich nicht nur bei Patienten mit Morbus Crohn, sondern auch bei Gallengangskarzinom, primär sklerosierender Cholangiitis (PSC) und sekundär sklerosierender Cholangiitis. Patienten mit PSC und Anti-GP2-Antikörpern haben zudem im Vergleich zu einer Kontrollgruppe geringere Überlebenschancen. Die Antikörper könnten somit als Biomarker für Erkrankungen der Gallengänge und Werkzeug für Risikobewertung bei PSC dienen (Jendrek et al., 2017).

Auch bei Patienten mit Gluten-sensitiver Enteropathie (Zöliakie) wurden Anti-GP2-Antikörper (der Klasse IgA) beschrieben (Laass et al., 2015; Roggenbuck et al., 2015). Die Titer korrelierten dabei mit dem Titer der krankheitsspezifischen Antikörper gegen Gewebstransglutaminase, mit der Krankheitsaktivität, und mit dem Ausmaß der Zottenatrophie. Unter Gluten-freier Diät verschwanden die GP2-Antikörper ebenso wie die Antikörper gegen Gewebstransglutaminase.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Autoantikörper gegen Pankreas-Azini sind spezifische Marker des Morbus Crohn. Sie rufen im indirekten Immunfluoreszenztest mit Gefrierschnitten des Pankreas eine positive Reaktion hervor, die sich unter dem Fluoreszenzmikroskop entweder als netzig-granuläre oder als tropfige Fluoreszenz des Zytoplasma der Azinuszellen darstellt. Zwei potentielle **Zielantigene** wurden vor kurzem aus Pankreasgewebe isoliert und identifiziert: die **Glycoproteine CUZD1** (Calmodulin-ubiquitin and zona-pellucida-like domain-containing protein1 precursor) und **GP2** (Glycoprotein 2; Pancreatic zymogen granule membrane major glycoprotein). In der vorliegenden Arbeit sollte die Prävalenz der Autoantikörper gegen CUZD1 und GP2 bei Morbus Crohn überprüft werden, unter Einsatz von Reagenzien auf der Basis der neu identifizierten Ziel-Antigene.

Die Studie beinhaltet 365 Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmkrankheit. Bei 96 von ihnen wurde anhand klinischer, endoskopischer und histologischer Befunde die Diagnose Morbus Crohn eindeutig gestellt. Von allen Patienten und 50 gesunden Blutspendern habe ich Autoantikörper gegen Pankreas-Azini im **indirekten Immunfluoreszenztest** bestimmt. Neben Primatenpankreas habe ich dafür CUZD1- und GP2-transfizierte HEK293-Zellen als Substrate eingesetzt. Untransfizierte HEK293-Zellen dienten zur Kontrolle.

Zusätzlich habe ich bei allen Probanden die Pankreas-Autoantikörper mit zwei verschiedenen **ELISA**-Varianten bestimmt: Bei Variante 1 bestand das Festphasen-Substrat aus einem Gemisch beider rekombinanter Antigene, bei Variante 2 wurden Anti-CUZD1 und Anti-GP2 durch monospezifische Capture-ELISA separat gemessen.

Die früher beschriebene Assoziation der Autoantikörper gegen exokrines Pankreas mit Morbus Crohn wurde bestätigt. Im Immunfluoreszenztest mit Pankreasgewebe als Substrat bei Morbus Crohn Patienten reagierten 30 von 96 Seren positiv (31,2%; Colitis ulcerosa 5,0%, Gesunde 0,0%). Mit CUZD1- und GP2-transfizierten HEK293-Zellen ließ sich der Anteil der als positiv erkannten Seren auf 35,4% steigern (Colitis ulcerosa: 7,7%, Gesunde 0,0%). Der Titer lag bei Anti-CUZD1 im Durchschnitt um den Faktor 10 höher als mit Pankreasgewebe gemessen, bei Anti-GP2 um den Faktor 3,2. Die bei Morbus Crohn gefundenen Autoantikörper gegen CUZD1 und gegen GP2 gehörten den **Immunglobulin-Klassen** IgA und IgG an, einige Seren enthielten Antikörper beider Klassen. Die IgG **Sub-**

klassen zeigten folgende Verteilung: IgG₁ 14-mal, IgG₂ 16-mal. IgG₃ trat nur in zwei Fällen auf, IgG₄ einmal.

Alle Seren, die auf Gewebeschnitten ein **netzig-granuläres Muster** erzeugten, zeigten mit **CUZD1**-transfizierten Zellen eine positive Reaktion. Alle Seren, die ein **tropfiges Muster** ausbildeten, reagierten positiv mit den **GP2**-transfizierten Zellen. Hingegen war für kein Serum mit einem ausschließlich tropfigen Muster eine positive Reaktion mit CUZD1-transfizierten Zellen zu beobachten, umgekehrt reagierte kein einziges Serum mit einem ausschließlich netzig-granulären Muster mit GP2-transfizierten Zellen. Des Weiteren konnte man mit den Antigen-spezifischen, auf gut charakterisierten monoklonalen Antikörpern basierenden Capture-ELISA sicher zwischen beiden Antikörpern unterscheiden. Damit wurde in dieser Arbeit bewiesen, dass die Glycoproteine CUZD1 und GP2 die vermuteten Zielantigene der Morbus-Crohn-assoziierten Autoantikörper gegen exokrines Pankreas darstellen.

Es wurde weiterhin offenkundig, dass sich CUZD1- und GP2-transfizierte HEK293-Zellen als Substrate für die indirekte Immunfluoreszenz besser eignen als Gefrierschnitte des humanen Pankreas. Zum einen stehen die transfizierten Zellen unbegrenzt und in reproduzierbarer Qualität zur Verfügung, zum anderen treten bei ihnen seltener unspezifische Störfluoreszenzen auf, die bei Gewebeschnitten das Ablesen oft erschweren – niedrig konzentrierte Antikörper sind dann bei den rekombinanten Zellen oft noch eindeutig zu erkennen, wenn sie bei Gewebeschnitten von unspezifischer Färbung überdeckt sind.

CUZD1- und GP2-transfizierte HEK293-Zellen werden bereits kommerziell verwendet und im Immunfluoreszenztest parallel zu Pankreasgewebe eingesetzt. In Zukunft werden sie, ergänzt durch ELISA, **die Gewebeschnitte als Substrate für die Bestimmung der Autoantikörper gegen Pankreas-Azini in der Diagnostik des Morbus Crohn ersetzen.**

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aulinger-Stoecker K, Probst C, Komorowski L, Teegen B, Torkler S, Ludwig D, Homann N, Stoecker W: Detection of Crohn's disease specific autoantibodies against exocrine pancreas by IIF using the newly identified proteoglycans CUZD1 and GP2 as recombinant target antigens. GUT 57(Suppl II): A143; 2008

Beaudoin AR, St-Jean P, Grondin G: Ultrastructural localization of GP2 in acinar cells of pancreas: presence of GP2 in endocytic and exocytic compartments. J Histochem Cytochem 39(5): 575-88; 1991

Broberger O, Perlmann P: Autoantibodies in human ulcerative colitis. J Exp Med 110: 657-674; 1959

Caneparo V, Pastorelli L, Pisani LF, Bruni B, Prodam F, Boldorini R, et al.: Distinct Anti-IFI16 and Anti-GP2 Antibodies in Inflammatory Bowel Disease and Their Variation with Infliximab Therapy. Inflamm Bowel Dis 22(12): 2977–2987; 2016

Caneparo V, Pastorelli L, Vanni E, Roggenbuck D, Boldorini R, Astegiano M, et al.: Validation of the clinical utility of IFI16-based markers in IBD. J Crohn's Colitis 11 Suppl 1: 166; 2017

Cogger KF, Sinha A, Sarangi F, McGaugh EC, Saunders D, Dorrell C, et al.: Glycoprotein 2 is a specific cell surface marker of human pancreatic progenitors. NATURE COMMUNICATIONS 8: 331; DOI: 10.1038/s41467-017-00561-0; 2017

Conrad K, Hausdorf G, Feist E, Reinhold D, Jungblut P, Porstmann T, et al.: Identification of GP2 as the major autoantigen of pancreatic autoantibodies. Report on the 6th congress on autoimmunity, Porto, Portugal, A1356; 2008

Cummings D, Lopez R, Cruise M, Roggenbuck D, Shen B, Rieder F: Loss of Tolerance to the Novel GP2 Isoforms 1 and 4 is Associated with but not Predictive of Crohn's Disease (CD) of the Pouch in Ulcerative Colitis (UC) Patients After Ileal-Pouch Anal Anastomosis (IPAA). Gastroenterology 152(5) Suppl 1: 789; 2017

De Lisle RC, Ziemer D: Processing of pro-Muclin and divergent trafficking of its products to zymogen granules and the apical plasma membrane of pancreatic acinar cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79(12): 892–904; 2000

Degenhardt F, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Kunst C, Roggenbuck D, et al.: Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated with Genetic Polymorphisms, Fibrostenosis, and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 22(11): 2648–2657; 2016

Finkbeiner H, Bock S, Burmester U, Grage D, Reddig U, Struve D, et al.: Autoantibodies to exocrine pancreas in Crohn's disease: the autoantigens are component of pancreatic juice. *Immunobiology* 170: 20-1; 1985

Fukuoka SI: Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding α (large) and β (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. *Biochimica et Biophysica Acta* 1491: 376-380; 2000

Fritz BA, Poppel CS, Fei MW, Lowe AW: Processing of the major pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2. *Pancreas* 24(4): 336-343; 2002

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennart-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis S, Schreiber S, Mathew CG: Association between insertion mutation in NOD2-Gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357: 1925-1928; 2001

Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJP, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Fölsch UR, Vatn M, Schreiber S: NOD2-Genotype and clinical course of Crohn's disease. *Lancet* 359: 1661-1665; 2002

Harrison RL, Jarvis DL: Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res* 68: 159-91; 2006

Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, et al.: Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462(7270): 226-30; 2009 Nov

Hözl MA, Hofer J, Kovarik JJ, Roggenbuck D, Reinhold D, Goihl A, et al.: The zymogen granule protein 2 (GP2) binds to scavenger receptor expressed on endothelial cells I (SREC-I). *Cellular Immunology* 267(2): 88-93; 2011

Hoffmann JC, Zeitz M, Bischoff SC, Brambs HJ, Bruch HP, Buhr HJ, Dignass A, Fischer I, Fleig W, Fölsch UR, Herrlinger K, Höhne W, Jantschek G, Kaltz B, Keller KM, Knebel U, Kroesen AJ, Kruis W, Matthes H, Moser G, Mundt S, Pox C, Reinshagen M, Reissmann A, Riemann J, Rogler G, Schmiegel W, Schölmerich J, Schreiber S, Schwandner O, Selbmann HK, Stange EF, Utzig M, Wittekind C: Diagnosis and therapy of ulcerative colitis: Results of an evidence-based consensus conference by the German Society of Digestive and Metabolic Diseases and the competence network on inflammatory bowel disease. *Z Gastroenterol* 42(9): 979-983; 2004 Sep

Hoffman JC, Preiß JC, Autschbach F, Buhr HJ, Häuser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Krieglstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M: Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease; results of a German evidence-based consensus conference. *Z Gastroenterol* 46(9): 1094-1146; 2008

Hoops TC, Rindler MJ: Isolation of the cDNA encoding glycoprotein-2 (GP-2), the major zymogen granule membrane protein. Homology to uromodulin/Tamm-Horsfall protein. *J Biol Chem* 266(7): 4257-63; 1991 Mar

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 599-603; 2001

Huynh H, Ng CY, Lim KB, Ong CK, Ong CS, Tran E, Tuyen Nguyen TT, Chan TW: Induction of UO-44 gene expression by tamoxifen in the rat uterus and ovary. *Endocrinology* 142(7): 2985-2995; 2001

Imamura T, Asada M, Vogt SK, Rudnick DA, Lowe ME, Muglia LJ: Protection from pancreatitis by the zymogen granule membrane protein integral membrane-associated protein-1. *J Biol Chem* 277(52): 50725-33; 2002 Dec 27

Jendrek ST, Gotthardt D, Nitzsche T, Widmann L, Korf T, Michaels MA, Weiss K-H, et al.: Anti-GP2 IgA autoantibodies are associated with poor survival and cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 66: 137–144; 2017

Joossens S, Vermeire S, Van Steen K, Godefroidis G, Claessens G, Pierik M, et al.: Pancreatic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 10(6): 771-7; 2004 Nov

Jovine L, Darie CC, Litscher ES, Wassarman PM: Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* 74: 83-114; 2005

Kasik, JW: A cDNA cloned from pregnant mouse uterus exhibits temporo-spatial expression and predicts a novel protein. *Biochem J* 330 (Pt 2): 947-50; 1998 Mar

Kimura S, Kishimoto A, Mutoh M, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T: GP2-expressing cells in the conjunctiva and tear ducts of mice: identification of a novel type of cells in the squamous stratified epithelium. *Biomedical Research (Tokyo)* 36 (4): 263-272; 2015

Killick R, Legan P, Malenczak C, Richardson G: Molecular cloning of chick beta-tectorin, an extracellular matrix molecule of the inner ear. *J Cell Biol* 129: 535–547; 1995

Komorowski L, Teegen B, Aulinger-Stoecker K, Probst C, Dähnrich C, Schlumberger W, Stöcker W: Detection of Crohn's disease associated autoantibodies against exocrine pancreas by ELISA. *Clin Chem Lab Med* 46(9): A188; 2008

Komorowski L, Teegen B, Probst C, Aulinger-Stöcker K, Sina C, Fellermann K, Stöcker W: Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: The glycoproteins CUZD1 and GP2. *J Crohn's Colitis* 7(10): 780-90; 2013 Nov

Laass MW, Röber N, Range U, Noß L, Roggenbuck D, Conrad K: Loss and Gain of Tolerance to Pancreatic Glycoprotein 2 in Celiac Disease. *PLoS ONE* 10(6): e0128104. doi:10.1371/journal.pone.0128104; 2015

Laforest L, St-Jean P, Beaudoin AR: A unique secretory behavior for GP2 in the exocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 184(2): 888-892; 1992

Leong CT, Ng CY, Ong CK, Ng CP, Ma ZS, Nguyen TH, Tay SK, Huynh H: Molecular cloning, characterization and isolation of novel spliced variants of the human ortholog of a rat

estrogen-regulated membrane-associated protein, UO-44. *Oncogene* 23(33): 5707-18; 2004 Jul

Leong CT, Ong CK, Tay SK, Huynh H: Silencing expression of UO-44 (CUZD1) using small interfering RNA sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin in vitro. *Oncogene* 26(6): 870-80; 2007 Feb

Leung F, Soosaipillai A, Kulasingam V, Diamandis EP: CUB and zona pellucida-like domain-containing protein1 (CUZD1): a novel serological biomarker for ovarian cancer. *Clin Biochem* 45(18): 1543-6; 2012 Dec

Liaskos C, Rigopoulou EI, Orfanidou T, Bogdanos DP, Papandreou CN: CUZD1 and Anti-CUZD1 Antibodies as Markers of Cancer and Inflammatory Bowel Diseases. *Clinical and Developmental Immunology*: Article ID 968041, 11 pages; Volume 2013

Lynn KL, Bailey RR, Groufsky A, Hunt JS, Bean AR, McGiven AR: Antibodies to Tamm–Horsfall urinary glycoprotein in patients with urinary tract infection, reflux nephropathy, urinary obstruction and paraplegia. *Contrib Nephrol* 39: 296–304; 1984

Madsen J, Mollenhauer J, Holmskov U: Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity. *Innate Immun* 16(3): 160-7; 2010

Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MA, Robson D, Pennington CR, Parratt D: Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 297: 1105 – 1106; 1988

Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC: Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 274: 262–265; 1996

Michaels MA, Jendrek ST, Korf T, Nitzsche T, Teegen B, Komorowski L, et al.: Pancreatic autoantibodies against CUZD1 and GP2 are associated with distinct clinical phenotypes of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 21: 2864-2872; 2015

Müller-Ladner U, Gross V, Andus T, Gschwendtner H, Roth M, Caesar I, Schölmerich J, Lang B: Distinct patterns of immunoglobulin classes and IgG subclasses of autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 8(6): 579-584; 1996

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-606; 2001

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen O: Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324 (2): 84-88; 1991

Pak J, Pu, Y, Zhang Z, Hasty DL, Wu X: Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J Biol Chem* 276(13): 9924-30; 2001 Mar

Papp M, Sipeki N, Tornai T, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, et al.: Rediscovery of the Anti-Pancreatic Antibodies and Evaluation of their Prognostic Value in a Prospective Clinical Cohort of Crohn's Patients: The Importance of Specific Target Antigens [GP2 and CUZD1]. *J Crohn's Colitis* 9(8): 659–668; 2015

Pavlidis P, Shums Z, Koutsoumpas AL, Milo J, Papp M, Umemura T, et al.: Diagnostic and clinical significance of Crohn's disease-specific anti-MZGP2 pancreatic antibodies by a novel ELISA. *Clin Chim Acta* 441(20): 176-181; 2015

Pavlidis P, Komorowski L, Teegen B, Liaskos C, Koutsoumpas AL, Smyk DS, et al.: Diagnostic and clinical significance of Crohn's disease-specific pancreatic anti-GP2 and anti-CUZD1 antibodies. *Clin Chem Lab Med* 54(2): 249-256; 2016

Rieder F, Franke A, Dirmeier A, Lopez R, Lang S, Roggenbuck D, Rogler G, Klebl F: Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated With Strictures and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. *Gastroenterology* 144 (5), Suppl: 1617; 2013 Mo1247

Rindler MJ, Hoops TC: The pancreatic membrane protein GP-2 localizes specifically to secretory granules and is shed into the pancreatic juice as a protein aggregate. *Eur J Cell Biol* 53(1): 154-63; 1990 Oct

Röber N, Noß L, Gohl A, Reinhold D, Jahn J, de Laffolie J, et al.: Autoantibodies Against Glycoprotein 2 Isoforms in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 0: 1–13; 2017

Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, Reinhold D, Büttner T, Jungblut PR, Porstmann T, Laass MW, Henker J, Büning C, Feist E, Conrad K: Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut* 58(12): 1620-8; 2009 Dec

Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, Gohl A, von Arnim U, Malfertheiner P, Büttner T, Porstmann T, Porstmann S, Liedvogel B, Bogdanos DP, Laass MW, Conrad K: Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin Chim Acta* 412(9-10): 718-24; 2010 Dec

Roggenbuck D, Vermeire S, Hoffman I, Reinhold D, Schierack P, Gohl A, et al.: Evidence of Crohn's disease-related anti-glycoprotein 2 antibodies in patients with celiac disease. *Clin Chem Lab Med* 53(9): 1349-1357; 2015

Roggenbuck D, Reinhold D, Baumgart DC, Schierack P, Conrad K, Laass MW: Autoimmunity in Crohn's Disease - A Putative Stratification Factor of the Clinical Phenotype. *Advances in Clinical Chemistry* 77 : 77-101; 2016

Rolhion N, Darfeuille-Michaud A: Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 13(10): 1277-83; 2007 Oct

Sandler RS, Eisen GM: Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB, Shorter RG (Hrsg.): *Inflammatory bowel diseases*. Baltimore: Williams & Wilkins: 89-112; 2000

Saxon A, Shanahan F, Lander C, Ganz T, Targan S: A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 86: 202-210; 1990

Schmidt K, Schrader M, Kern H-F, Kleene R: Regulated apical secretion of zymogens in rat pancreas. Involvement of the glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein GP-2, the lectin ZG16p, and cholesterol-glycosphingolipid-enriched microdomains. *J Biol Chem* 276: 14315-14323; 2001

Seibold F, Weber P, Jenss H, Wiedmann KH: Antibodies to a trypsin sensitive pancreatic antigen in chronic inflammatory bowel disease: specific markers for a subgroup of patients with Crohn's disease. *Gut* 32(10): 1192-7; 1991 Oct

Shivananda S, Lennard-Jones JE, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter I, et al.: Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between North and South? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 39: 690-697; 1996

Sipeki N, Davida L, Palyu E, Altorjay I, Harsfalvi J, Szalmas PA, et al.: Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 21(22): 6952–6964; 2015

Stange EF, Riemann J, von Herbay A, Lochs H, Fleig W, Schölmerich J, Kruis W, Porschen R, Bruch HP, Zeitz M, Schreiber S, Moser G, Matthes H, Selbmann HK, Goebell H, Caspary WF: Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa – Ergebnisse einer 'evidenz'-basierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen. Leitlinien der DGVS. *Z Gastroenterol* 39: 19-72; 2001

Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Stöcker K, Jantschek G: Autoantikörper gegen exokrines Pankreas und gegen intestinale Becherzellen in der Diagnostik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa. *Dtsch Med Wochenschr* 109: 1963-1969; 1984

Stöcker W, Otte M, Scriba PC: Zur Immunpathogenese des Morbus Crohn. *Dtsch Med Wochenschr* 109: 1984-1986; 1984

Stöcker W: Rationelle Histochemie mit einer neuen Mikroanalysemethode. *Acta Histochem (Jena)* 31 (Suppl): 269-82; 1985

Stöcker K, Stöcker W, Ritter-Frank Y, Scriba PC: Chemisch aktivierte Glasobjektträger für Gefrierschnitte und ihre Anwendung in der Autoantikörperdiagnostik. *Acta Histochem (Jena)* 31 (Suppl): 283-294; 1985

Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stöcker K, Jantschek G, Scriba PC: Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 22 (Suppl 139): 41-52; 1987

Stöcker W, Glocker MO, Probst C, Teegen B, Friedrich A, Sokolowski S, Komorowski L: Identification of two different proteoglycans from exocrine pancreas as the long sought

after autoantigens in Crohn's disease: CUZD1 and GP2. Report on the 6th International Congress on Autoimmunity, Porto, Portugal, A1177; 2008

Stöcker W, Probst C, Komorowski L: Crohn's disease-associated autoantibodies against the pancreatic glycoproteins CUZD1 and GP2 are separate entities (Reply to Dr. Roggenbuck et al.'s letter. *J Crohn's Colitis* 7 (7): e275-6; 2013 08

Teegen B, Müller-Kunert E, Zerbe B, Dährnich C, Groeury M, Humbel RL, et al.: Prevalence of antibodies against *Saccharomyces cerevisiae* in the diagnosis of chronic-inflammatory Bowel Disease. *J Lab Med* 24: 494; 2000

Teegen B, Niemann S, Probst C, Schlumberger W, Stöcker W, Komorowski L: DNA-Bound lactoferrin is the major target for antineutrophil perinuclear cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 161–165; 2009 Sep

Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, Nochi T, Pontes GS, Hase K, et al.: Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol* 180(12): 7840-6; 2008 Jun

Thim L, Mortz E: Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regulatory Peptides* 90: 61–68; 2000

Thompson N, Driscoll R, Pounder R, Wakefield A: Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: result of a British twin study. *BMJ* 312: 95-96; 1996

Wang H, Demirkan G, Bian X, Wallstrom G, Barker K, Karthikeyan K, et al.: Identification of Antibody Against SNRPB, Small Nuclear Ribonucleoprotein-Associated Proteins B and B', as an Autoantibody Marker in Crohn's Disease using an Immunoproteomics Approach. *J Crohn's Colitis* 11 (7): 848–856; 2017

Werner L, Paclik D, Fritz C, Reinhold D, Roggenbuck D, Sturm A: Identification of Pancreatic Glycoprotein 2 as an Endogenous Immunomodulator of Innate and Adaptive Immune Responses. *The Journal of Immunology* 189: 2774–2783; 2012

Werner L, Sturm A, Roggenbuck D, Yahav L, Zion T, Meirowithz E, et al.: Antibodies against glycoprotein 2 are novel markers of intestinal inflammation in patients with an ileal pouch. *J Crohn's Colitis* 7 (11): e522–e532; 2013

Withiam-Leitch M, Aletta JM, Koshlukova SE, Rupp G, Beaudoin AR, Rubin RP: Glycoprotein 2 of zymogen granule membranes shares immunological cross-reactivity and sequence similarity with phospholipase A2. *Biochem Biophys Res Commun* 194(3): 1167-1174; 1993

Wölfel G, Lopez R, Hösl J, Kunst C, Roggenbuck D, Mueller M, Rieder F: The Novel Isoforms 1 and 4 of Serum Anti-GP2 Antibody are Linked to Earlier Surgical Recurrence in Crohn's Disease (CD) Subjects After First Surgery. *Gastroenterology* 152 (5) Suppl 1: S368–S369; 2017

Yu S, Hao Y, Lowe AW: Effects of GP2 expression on secretion and endocytosis in pancreatic AR4-2J cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 320–325; 2004

Yu S, Michie SA, Lowe AW: Absence of the major zymogen granule membrane protein, GP2, does not affect pancreatic morphology or secretion. *J Biol Chem* 279(48): 50274-50279; 2004

Yu S, Loewe AW: The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *BMC Gastroenterol* 9: 58; 2009

8. PUBLIKATIONEN

8.1. Posterpräsentationen

Aulinger-Stöcker K, Probst C, Komorowski L, Teegen B, Torkler S, Ludwig D, Homann N, Stöcker W: Detection of Crohn's disease specific autoantibodies against exocrine pancreas by indirect immunofluorescence using human cells transfected with newly identified proteoglycans CUZD1 and GP2 as recombinant target antigens. 16th United European Gastroenterology Week 2008, Vienna, Austria. Session IBD: Diagnosis and monitoring

Komorowski L, Teegen B, Aulinger-Stöcker K, Probst C, Dährnich C, Schlumberger W, Stöcker W: Detection of Crohn's disease associated autoantibodies against exocrine pancreas by ELISA. Wissenschaftliche Präsentation zum 6th International Congress on Autoimmunity, Porto, Portugal, 2008

Komorowski L, Teegen B, Aulinger-Stöcker K, Probst C, Dährnich C, Schlumberger W, Stöcker W: Detection of Crohn's disease associated autoantibodies against exocrine pancreas by ELISA. Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 5th Annual Conference of the German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Mannheim, Germany, 2008, September 21-24

8.2. Veröffentlichungen

Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Stöcker K, Jantschek G: Autoantikörper gegen exokrines Pankreas und gegen intestinale Becherzellen in der Diagnostik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa. Dtsch Med Wochenschr 109: 1963-1969; 1984

Stöcker K, Stöcker W, Ritter-Frank Y, Scriba PC: Chemisch aktivierte Glasobjektträger für Gefrierschnitte und ihre Anwendung in der Autoantikörperdiagnostik. Acta Histochem (Jena) 31 (Suppl): 283-294; 1985

Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stöcker K, Jantschek G, Scriba PC: Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol 22 (Suppl 139): 41-52; 1987

Aulinger-Stöcker K, Probst C, Komorowski L, Teegen B, Torkler S, Ludwig D, Homann N, Stöcker W: Detection of Crohn's disease specific autoantibodies against exocrine pancreas by IIF using the newly identified proteoglycans CUZD1 and GP2 as recombinant target antigens. GUT 57(Suppl II, CD): A143; 2008

Komorowski L, Teegen B, Aulinger-Stöcker K, Probst C, Dährnich C, Schlumberger W, Stöcker W: Detection of Crohn's disease associated autoantibodies against exocrine pancreas by ELISA. Clin Chem Lab Med 46(9): A188; ©2008 Walter de Gruyter Berlin New York DOI 1515/CCLM.2008.270 Abstracts

Komorowski L, Teegen B, Aulinger-Stöcker K, Niemann S, Bogdanos DP, Ludwig D, Homann N, Stöcker W: High prevalence of p-ANCA in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis, results of analyses with lactoferrin-repleted granulocytes. J Crohn's Colitis 3(1): 122; 2009 Feb

Stöcker W, Teegen B, Probst C, Aulinger-Stöcker K, Ludwig D, Glocker MO, Komorowski L: CUZD1 and GP2 are the exocrine pancreas autoantigens in Crohn's disease. In: From Pathogenesis to Therapy of Autoimmune Diseases, by K. Conrad, E. K. L. Chan, M. J. Fritzler, R.L. Humbel, P. von Landenberg, Y. Shoenfeld (Eds.). Pabst Science Publishers 2009 ISBN978-3-89967-579-5

Komorowski L, Teegen B, Probst C, Aulinger-Stöcker K, Sina C, Fellermann K, Stöcker W: Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: The glycoproteins CUZD1 and GP2. J Crohn's Colitis 7(10): 780-90; 2013 Nov

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMA – Anti-Mitochondrien Antikörper

ANA – Antinukleäre Antikörper

AR 4-2 J – Azinus-Zell-Linie aus Ratten-Pankreas

AS – Aminosäure(n)

ASCA – Anti-Saccharomyces cerevisiae Antikörper

CED – chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

cDNA – cyclische Desoxyribonukleinsäure

CDE – Choline-deficient, ethionine-containing

CUB – Calmodulin-ubiquitin

CUZD1 – Calmodulin-ubiquitin and zona-pellucida-like domain-containing protein 1 precursor

Da – Dalton

DNA – Desoxyribonukleinsäure

E. coli – Escherichia coli

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

ERG-1 – Estrogen regulated protein 1

GPI – Glycosylphosphatidylinositol

GP2 – Glycoprotein 2, Pancreatic zymogen granule membrane major glycoprotein 2

Gp-340/DMTB1 – Glycoprotein 340/deleted in malignant brain tumors 1

HEK – Human embryonic kidney cells

IFI16 – Interferon gamma inducible protein 16

Ig – Immunglobulin

ITMAP1 – Integral membrane-associated protein 1

kDa – Kilodalton

M. – Morbus

PAk – Pankreas Antikörper

pANCA – perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies, Autoantikörper gegen Granulozytenzytoplasma, Antikörper gegen Myeloperoxidase

PBS – phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PSC – Primär sklerosierende Cholangiitis

Sf – Spodoptera frugiperda

SNRPB - Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B und B'

SREC-I - Scavenger receptor expressed by endothelial cells I
SR-AI - type I class A macrophage scavenger receptor
SR-BI - type I class B macrophage scavenger receptor
THP – Tamm-Horsfall-Protein
TMB - Tetramethylbenzidin
UEA I – Ulex europaeus agglutinin I
UO-44 – Uterus/ovary-specific protein 44
UTCZP – Uterine calmodulin ubiquitin zona pellucida protein
ZP – Zona pellucida

10. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand an der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck, Bereich Gastroenterologie, und im Institut für Experimentelle Immunologie, Euroimmun AG, Lübeck.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Fellermann, Bereichsleiter der Abteilung Gastroenterologie der Medizinischen Klinik I, danke ich ganz herzlich für die wissenschaftliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Winfried Stöcker, Vorstandsvorsitzender der Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG. Er hat mir die Mitarbeit an seinem Forschungsprojekt „Autoimmunität bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen“ ermöglicht, hat mir diese Arbeit übertragen, den Arbeitsplatz bereitgestellt und mich bei der Konzeption und Durchführung unterstützt.

Herrn Prof. Dr. med. Diether Ludwig, ehemals leitender Oberarzt der Abteilung Gastroenterologie der Medizinischen Klinik I, Universität zu Lübeck, jetzt Chefarzt der Abteilung für Innere Medizin der Segeberger Kliniken, danke ich für die Möglichkeit, die Patientenakten einzusehen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. nat. Lars Komorowski und Herrn Dr. rer. nat. Christian Probst für die Bereitstellung der spezifischen Antigene und für viele entscheidende Anregungen und Diskussionen,

Frau Dr. rer. hum. biol. Bianca Teegen für die Betreuung bei der Durchführung und Auswertung der Analysen, und

Herrn Dr. rer. hum. biol. Arne Schillert für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Jürgen Obernier (†) und Frau Doris Schröder aus der gastroenterologischen Poliklinik und dem Pflegeteam der Station 41b der Medizinischen Klinik I danke ich für die Blutentnahmen, und den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Stephanie Niemann, Frau Antje Friedrich und Frau Jacqueline Hildebrandt für die Unterstützung bei der Aufbereitung der Proben und bei der Durchführung der ELISA.

11. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Karola Aulinger-Stöcker, geb. Aulinger

Geburtsdatum: 27.09.1956

Geburtsort: Lorenzreuth, Landkreis Wunsiedel (Bayern)



Schulbildung

1962–1967 Volksschule Lorenzreuth

1967-1975 Helene-Lange-Gymnasium in Fürth (Bayern), Abschluss: Abitur

Studium

1975 Krankenpflegepraktikum am Kreiskrankenhaus Marktredwitz

1976-1983 Studium der Ernährungswissenschaft an der Justus-Liebig-Universität Gießen und an der Universität Hohenheim

Diplomarbeit bei Prof. Dr. med. Scriba, Klinik für Innere Medizin der Universität zu Lübeck

Thema: „Neue Verfahren, Gefrierschnitte auf Glasobjektträgern zu fixieren“. Abschluss: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin

Im Rahmen der Diplomarbeit Mitwirkung am Projekt „Autoantikörper bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa“

1983-1988 und

2003-2005 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

Famulaturen: Innere Medizin, Krankenhaus Ratzeburg
Innere Medizin-Onkologie, Universität zu Lübeck
Innere Medizin-Endokrinologie, Praxis
Kinderheilkunde, Praxis
Urologie, Universität zu Lübeck

Praktisches Jahr: Dermatologie: Universität zu Lübeck
Innere Medizin: Universität zu Lübeck
Chirurgie: University of Malta

Beruflicher Werdegang

1983-1987 Mitarbeit im Klinischen Labor 2 (Autoantikörperdiagnostik) an Prof. Scribas Klinik für Innere Medizin der Universität zu Lübeck

Seit 2005 Institut für Experimentelle Immunologie, Euroimmun Lübeck - Mitarbeit am Projekt „Autoimmunität bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen“

Lübeck, Mai 2017

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen oder sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe weder vorher noch gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt, und mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen.

Die Genehmigung der Ethikkommission zur Einsichtnahme in die Krankenakten der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und zur Testung der Serumproben auf Autoantikörper wurde am 12. Juli 2005 erteilt, Aktenzeichen 05-112.

Lübeck, Mai 2017

Karola Aulinger-Stöcker