



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Autoimmunreaktionen gegen Proteine des
exokrinen Pankreas im diagnostischen Umfeld von
chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Sektion Naturwissenschaften, Universität zu Lübeck
und dem Institut für Experimentelle Immunologie, Euroimmun

vorgelegt von

**Thomas Nitzsche
aus Erfurt**

Lübeck, 2019

Hauptberichterstatter: Prof. Dr. Christian Sina

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Peters

Tag der Prüfung: 19.12.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 3.1.2020

Inhalt

1	Zusammenfassung / Abstract.....	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Abstract.....	3
2	Einleitung	5
2.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	5
2.2	Colitis ulcerosa und Morbus Crohn: die zwei Hauptformen von CED	7
2.3	Primär sklerosierende Cholangiitis und andere CED-assoziierte extraintestinale Erkrankungen	15
2.4	Diagnostische Verfahren bei CED	17
2.4.1	Endoskopie und andere bildgebende Verfahren.....	17
2.4.2	Histologie	18
2.4.3	Stuhluntersuchungen	19
2.4.4	Hämatologische Tests	20
2.4.5	Serologie.....	21
2.5	Pankreatische Antigene in der differentiellen CED-Diagnostik	24
2.6	Ziele der vorliegenden Arbeit	28
3	Materialien.....	29
3.1	Chemikalien	29
3.2	Verbrauchsmaterialien	30
3.3	Puffer und Stoffgemische.....	33
3.4	Antikörper	35
3.5	Laborgeräte	36
3.6	Software.....	38
3.7	Webbasierte Dienste.....	38
4	Methoden.....	39

4.1	Indirekte Immunfluoreszenz	39
4.2	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest	42
4.3	Elektronenmikroskopie	44
4.4	Analytische proteinbiochemische Methoden	46
4.5	Rekombinante Darstellung von Zielproteinen.....	50
4.6	Deglykosylierungsreaktionen	52
4.6.1	Enzymatische Deglykosylierung.....	53
4.6.2	Malaprade-Reaktion	53
4.7	Protein-Interaktion	54
4.7.1	Bead-basierte Interaktionsexperimente.....	54
4.7.2	Plattenbasierte Interaktionsexperimente	55
4.7.3	<i>Spin down</i> Interaktionsexperimente	55
4.7.4	Biochemische Kenngrößen der Interaktion	57
4.8	Analytik von Stuhlproben.....	58
4.8.1	Extraktion von Antigen und Antikörpern aus Fäzes.....	58
4.8.2	Fäzes-Analytik.....	59
4.9	Statistik.....	60
4.9.1	Lagemaße	60
4.9.2	Statistische Güteparameter.....	61
4.9.3	Grafische Darstellung.....	63
5	Ergebnisse	65
5.1	Klinische Relevanz von pankreatischen Autoantikörpern in der Diagnostik von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	66
5.1.1	Studienkollektiv	66
5.1.2	Ermittelte Prävalenzen serologischer Parameter	67
5.1.3	Konkordanzen pankreatischer Antigene.....	71

5.1.4	Titer-Untersuchung von spezifischen Autoantikörpern im zeitlichen Verlauf...	73
5.1.5	CUZD1 und GP2 sind klinisch relevante Antigene bei CED	75
5.2	Entwicklung PAK-spezifischer ELISA.....	78
5.2.1	Anreicherung von CUZD1	78
5.2.2	Anreicherung von α GP2	80
5.2.3	Anreicherung von β GP2	85
5.2.4	ELISA zum Nachweis von Autoantikörpern gegen CUZD1 und GP2	87
5.3	GP2 spezifisches Immunglobulin A in PSC	89
5.3.1	Studienkollektive	90
5.3.2	Anti-GP2 IgA ist hochprävalent in PSC.....	91
5.3.3	Klinische Relevanz von Anti-GP2 IgA in PSC und CCA	93
5.4	Autoantikörper gerichtet gegen GP2-Isoformen in CED und PSC	96
5.4.1	Studienkollektive	97
5.4.2	PSC-Patienten zeigen Autoantikörper gegen α GP2, MC-Patienten gegen das β -Isomer.....	97
5.5	Isotypenuntersuchung von pankreatischen Autoantikörpern in CED	99
5.5.1	IgA Subklassenuntersuchung	100
5.5.2	IgG Subklassenuntersuchung.....	101
5.6	Glykoepitope bei GP2.....	103
5.7	Lokalisierung der pankreatischen Antigene im Gastrointestinaltrakt.....	107
5.7.1	Pankreas.....	107
5.7.2	Pankreassaft.....	110
5.7.3	Darm	110
5.7.4	Fäzes	114
5.7.5	Leber und Gallenblase.....	115
5.8	GP2 bindet Oberflächenproteine von Mikroorganismen	116

5.8.1	Anreicherung von FimH.....	116
5.8.2	GP2-Interaktion mit Mikroorganismen.....	119
5.8.3	FimH ist ein Ligand von GP2.....	121
5.8.4	GP2-Interaktion ist pH-abhängig.....	125
5.8.5	Einfluss von Patientenseren auf die GP2/FimH-Interaktion.....	126
5.9	Stuhluntersuchungen.....	126
5.9.1	Fäzes-Probenkollektiv.....	127
5.9.2	Inflammationsmarker.....	127
5.9.3	Immunglobuline im Stuhl.....	130
5.9.4	Unbekannte Stuhlbestandteile inhibieren die FimH/GP2-Interaktion.....	133
6	Diskussion.....	135
6.1	Klinische Relevanz von CUZD1 und GP2.....	135
6.2	Stuhluntersuchungen als nichtinvasive Diagnostikmethode im Umfeld von CED.....	139
6.3	Funktionale Charakterisierung des GP2.....	142
6.3.1	GP2 interagiert mit Enterobakterien.....	143
6.3.2	GP2 als THP-Analogon im Darm?.....	148
7	Literaturverzeichnis / Quellen.....	151
8	Anhang.....	173
8.1	Abkürzungen.....	173
8.2	Publikationen.....	177
8.3	Poster.....	177
8.4	Danksagung.....	178

1 Zusammenfassung / Abstract

1.1 Zusammenfassung

Die diagnostischen Stützpfeiler der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sind Patientenanamnese, Endoskopie und Histologie. Damit lassen sich jedoch 10-15% der CED-Patienten nicht eindeutig in deren Hauptentitäten Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) unterscheiden. Die Serologie stützt die klinische Diagnostik. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der CED-assoziierten Autoimmunreaktionen gegen die pankreatischen Antigene (PAg) *CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1* (CUZD1) und *pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein 2* (GP2).

In einer retrospektiven Studie wurden zunächst 360 klinisch charakterisierte CED-Patienten (136 CU und 224 MC-Patienten) serologisch im indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) mit rekombinanten, antigenproduzierenden Zellen (RC-IIFT, Substrat: rPAg1, rPAg2) auf Autoantikörper (AAk) gegen CUZD1 und GP2 untersucht. Bei 25,0% der MC-Patienten konnte Anti-CUZD1 nachgewiesen werden (CU: 5,9%), bei 18,8% Anti-GP2 (CU: 2,9%). Gesunde Blutspender waren negativ für beide. Zusätzlich wurden die IIFT-Ergebnisse in selbst entwickelten *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) bestätigt. Die Ergebnisse belegen die starke Assoziation der Anti-PAg AAK zu MC ($p < 0,001^{***}$).

Die wenigen Anti-GP2 positiven CU-Patienten besaßen ausschließlich GP2 spezifische AAK der Klasse IgA und litten zusätzlich an primär sklerosierender Cholangiitis (PSC). Aufgrund dieser Vorergebnisse wurden 136 Patienten des PSC-Forschungszentrums der Universität Oslo unabhängig von deren CED-Status auf Anti-PAg untersucht. Bei mehr als der Hälfte dieser PSC-Patienten (52,2%) wurden ebenfalls Anti-GP2 IgA nachgewiesen. Anti CUZD1 IgA und IgG sowie Anti-GP2 IgG blieben hingegen unauffällig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Ergebnis zusätzlich in einem unabhängigen deutschen PSC-Kollektiv mit 180 Patienten der Universität Heidelberg bestätigt (46,7% Anti-GP2 IgA). Damit konnte zum ersten Mal ein Zusammenhang von Anti-GP2 IgA zur PSC nachgewiesen werden ($p < 0,001^{***}$,

OR=55,7). Ferner zeigten diese Anti-GP2 IgA positiven PSC-Patienten einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf, häufigere Lebertransplantationen und eine damit verbundenen geringeren Überlebensrate. Auch die Ausbildung von Gallengangskarzinomen waren in dieser Patientengruppe statistisch signifikant häufiger (Prävalenz 36%, $p < 0.001^{***}$).

Weiterführende Versuche mit verschiedenen GP2-Isoformen als Zielantigenen (α - bzw. β GP2) verdeutlichten, dass die spezifischen Anti-GP2 IgA bei PSC-Patienten ausschließlich gegen die α -Form gerichtet sind. Damit ist der Nachweis von α GP2 spezifischen IgA ein neuer, potentiell prognostischer Marker bei hepatobiliären Erkrankungen und ein zusätzlicher serologischer Parameter im klinischen Risikomanagement bei PSC. Im Gegensatz dazu sind CUZD1- sowie β GP2-spezifische AAK mit MC assoziiert.

1.2 Abstract

The diagnostic methods of choice of inflammatory bowel diseases (IBD) are patient history, endoscopy and histology. However, 10-15% of IBD patients cannot be clearly differentiated into its main entities, Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Serology supports clinical diagnostics. The aim of this work was the investigation of IBD-associated autoimmune reactions against the pancreatic antigens (PAg) CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1 (CUZD1) and pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein 2 (GP2).

In a retrospective study, 360 clinically characterized IBD patients (224 CD and 136 UC patients) were serologically tested for CUZD1- and GP2-specific autoantibodies (AAb) by recombinant cell indirect immunofluorescence (RC-IIFT, substrate: rPAg1 and rPAg2). Anti-CUZD1 AAb were detected in 25.0% of CD patients (UC: 5.9%) and in 18.8% anti-GP2 AAb (UC: 2.9%). Healthy blood donors remained negative. In addition, the IIFT results were confirmed in self-developed enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). These results proof the strong association of anti-PAg to CD ($p < 0.001$).

It was noticeable that the few anti-GP2 positive UC patients exclusively had GP2-specific AAb of class IgA. In addition, the majority of these patients suffered from primary sclerosing cholangitis (PSC). Based on these preliminary results 136 patients from PSC Research Center of the University of Oslo were screened for anti-PAg. Anti-GP2 IgA was highly prevalent in about 50% of PSC patients. Anti-CUZD1 IgA and IgA such as anti-GP2 IgG remained normal. Within this thesis this result was additionally confirmed by an independent german PSC collective with 180 patients from the University of Heidelberg (anti-GP2 IgA: 46.7%). By this a novel correlation between anti-GP2 IgA and PSC could be shown ($p < 0.001$, OR = 55.7). Furthermore, these anti-GP2 IgA positive PSC patients showed a significantly more severe course of the disease, attached to more frequent liver transplants and a lower survival rate. The development of bile duct carcinomas is more frequent in this patient group (prevalence 36%, $p < 0.001$).

Further experiments with different GP2 isoforms as target antigens (α - and β GP2) showed that the specific AAb in PSC patients are exclusively directed against α GP2.

Thus, the detection of α GP2-specific IgA is a new and potential prognostic marker in hepatobiliary diseases and an additional serological parameter in clinical risk management of PSC. In contrast CUZD1- and β GP2-specific AAb are associated to CD.

2 Einleitung

2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) zeichnen sich durch einen anhaltenden- oder periodisch wiederkehrenden Verlauf aus und manifestieren sich als unkontrollierte intestinale Entzündungsreaktionen (Podolsky, 2002; Xavier *and* Podolsky, 2007). Abdominelle Schmerzen und Diarrhoe sind dabei keine Seltenheit (Hoffmann *et al.*, 2009). Assoziiert sind unter anderem rheumatische Erkrankungen sowie neurologische oder psychische Störungen (Abraham, 2015), die den Leidensdruck der Patienten weiter erhöhen. Bereits 1761 beschrieb der Anatom Giovanni Battista Morgagni in seinem Werk *De sedibus et causis morborum* u. a. Darmveränderungen mit CED-Phänotyp (Morgagni, 1761). Er legte damit den Grundstein für systematische Untersuchungen von krankhaften Veränderungen im Gastrointestinaltrakt (GI). Später, im 19. und 20. Jahrhundert, folgte die Abgrenzung zu Infektionskrankheiten wie Darmtuberkulose (Koch, 1882) oder Cholera (Koch, 1884) sowie anderen, den Darm betreffenden, funktionellen Erkrankungen wie das Reizdarmsyndrom (RDS) (Brown, 1950) oder Nahrungsmittelunverträglichkeiten (Gee, 1888).

Ätiologie und Pathogenese sind nicht abschließend verstanden. Es werden mehrere Ursachen diskutiert, die schlussendlich zu einer gestörten intestinalen Barrierefunktion führen:

a) genetische Faktoren:

In zahlreichen Studien ist eine familiäre Häufung von CED-Fällen belegt (Halme *et al.*, 2006). So entwickeln z. B. mehr als 30% der Kinder von CED-betroffenen Eltern diese Krankheit, 50-75% monozygotische Zwillinge besitzen denselben pathologischen Phänotyp. In genomweiten Metaanalysen wurden verschiedene CED-relevante Loci identifiziert, deren Genprodukte im Immunsystem (Duerr *et al.*, 2006) und bei Autophagie-Prozessen (Hampe *et al.*, 2007) beteiligt sind. Ein Beispiel hierfür sind Mutationen im Gen für das *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2)

(Philpott *et al.*, 2014). NOD2 ist ein Rezeptorprotein, welches vor allem in Granulozyten und dendritischen Zellen lokalisiert ist (Gutierrez *et al.*, 2002). Es bindet bakterielle Oberflächenmoleküle (Peptidoglykane) und stimuliert als Teil des angeborenen Immunsystems die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. NOD2 ist auf Chromosom 16 kodiert. Eine Leserastermutation führt zu einer verkürzten Version des Proteins. Es konnte gezeigt werden, dass diese fehlerhafte Variante immunologisch inaktiv ist (Ogura *et al.*, 2001). Allerdings besitzen nur weniger als 25% der CED-Patienten diese Veränderung (Ahmad *et al.*, 2002). Ein hoch-prävalenter genetischer Marker wurde bei CED bis dato nicht gefunden.

b) Mikrobiota:

Der gesamte GI enthält ca. 10^{14} Mikroorganismen (MO) (Ley *et al.*, 2006), überwiegend zusammengesetzt aus den Stämmen *Bacteroidetes* (Gram-negative Stäbchenbakterien) und *Firmicutes* (Gram-positive Kokken und Stäbchen). *Proteobacteria* mit den bekannten Vertretern *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) spielen dagegen eine nur untergeordnete Rolle. Diese sog. Kommensalen beeinflussen maßgeblich das angeborene und adaptive Immunsystem. 16S rRNA Analysen zeigten, dass sich nicht nur die Zusammensetzung der mikrobiellen Flora bei CED ändert, sondern dass sich ebenso quantitative Unterschiede zu gesunden Probanden ergeben (Frank *et al.*, 2007). Es ist allerdings noch unklar, ob diese Dysbakterie in Zusammenhang mit genetischen Risikofaktoren steht oder ggf. als Folge von chronischen Entzündungsreaktionen auftreten. Auch werden weitere Faktoren wie Ernährungsgewohnheiten und andere Lebensumstände diskutiert, die ebenso Einfluss auf das sensible Gleichgewicht der intestinalen MO aufweisen.

c) Umweltfaktoren:

CED kommt vor allem in der industrialisierten Welt vor. Die Inzidenz steigt mit dem Entwicklungsgrad des Landes (Ng *et al.*, 2013). Auch konnte gezeigt werden, dass Migranten bei Umsiedlung in eine Region mit höherer CED-Prävalenz auch ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung der Krankheiten besitzen (Barreiro-de Acosta *et al.*, 2011). Die Ursache hierfür ist weitgehend unbekannt. Es werden vor allem hygienische Standards und andere

Risikofaktoren wie prozessierte Nahrung sowie einseitige Diäten, übermäßiger Gebrauch von Antibiotika (Hviid *et al.*, 2011) oder auch Stress diskutiert (Bernstein and Shanahan, 2008). Die meisten Erklärungsversuche zielen dabei auf ein beeinträchtigt bzw. nicht voll entwickeltes Immunsystem und ein bereits angesprochenes Ungleichgewicht der intestinalen Kommensalen ab.

Die verschiedenen Pathogenesefaktoren beeinflussen sich gegenseitig und wirken auf das Immunsystem (Abb. 2-1). So wird im wissenschaftlichen Konsens nicht von einem einzigen CED-Auslöser gesprochen, sondern von einem Zusammenspiel verschiedener Einflüsse, die im CED-Phänotyp resultieren können.

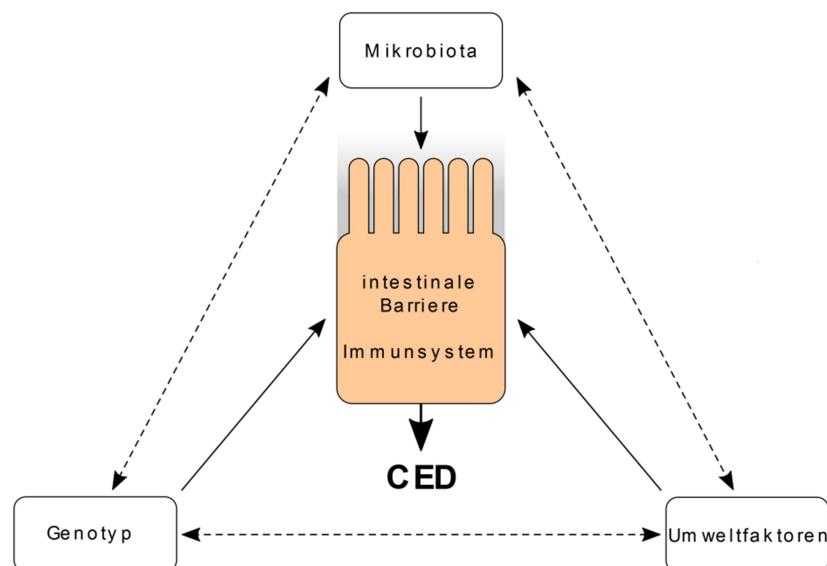


Abb. 2-1: CED-Pathogenesefaktoren

Ätiologie und Pathogenese von CED sind weitgehend unbekannt. Der Phänotyp von CED ist das Resultat aus Wechselwirkungen verschiedener biotischer- und abiotischer Risikofaktoren.

2.2 Colitis ulcerosa und Morbus Crohn: die zwei Hauptformen von CED

Die beiden häufigsten Differenzialdiagnosen der CED sind die *Colitis ulcerosa* (CU) und der *Morbus Crohn* (MC). Symptomatisch ähneln sich beide Entitäten, es liegen jedoch verschiedene Pathomechanismen zugrunde, die sich auf Art und Lokalisierung der Entzündung auswirken und unterschiedliche Therapieansätze bedingen.

CU wurde erstmals 1859 in einem Obduktionsbericht von Samuel Wilks namentlich beschrieben (Wilks, 1859) – interessanterweise wurde mehr als ein Jahrhundert später dieser Fall als MC klassifiziert (Fielding, 1985). Weitere Untersuchungen von Wilks und Moxon (Wilks and Moxon, 1875), Allchin (Allchin, 1885) und Hale-White (Hale-White, 1888) prägten und charakterisierten den Phänotyp von CU. Hauptsymptome sind blutige Diarrhoe, abdominelle Schmerzen und Fieber. Nicht selten folgen Appetit- und Gewichtsverlust sowie das Auftreten von Nährstoffmangel. Erste Studien aus den 1960er Jahren schätzen einen CU-Fall auf 1.000 Personen (Evans and Acheson, 1965). Mittlerweile wird in entwickelten Ländern sogar eine Prävalenz von 0,15-0,3% angegeben (Ordas *et al.*, 2012). Die Inzidenz liegt bei neun bis 20 Fällen pro 100.000 Einwohnern und Jahr, Tendenz steigend. Die Erstdiagnose der Krankheit findet dabei häufig zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr statt. Frauen wie Männer sind dabei gleichermaßen stark betroffen (Ngo *et al.*, 2014). Bei CU beginnt die chronische Entzündung am Rektum und schreitet kontinuierlich aufsteigend zum Kolon fort. Je nach anatomischer Ausbreitung wird zwischen *Proktitis*, *Linksseitiger Colitis* und *Pankolitis* unterschieden (Silverberg *et al.*, 2005). Ist in seltenen Fällen neben dem Dickdarm auch das terminale Ileum betroffen, spricht man von einer sog. Backwash-Ileitis.

Die Krankheit tritt dabei rezidivierend in Schüben auf. So folgen auf beschwerdefreie Zeiträume (Remission) Phasen mit akuter Symptomatik (Schub). Der zugrundeliegende Entzündungsprozess ist dabei zumeist nur auf die Mukosa beschränkt. Mechanistisch wird vor allem eine Dysregulation der *tight junction* im intestinalen Epithel und die Rolle von natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) im Zusammenspiel mit Interleukin (IL) 13 diskutiert (Danese and Fiocchi, 2011) (Abb. 2-2):

Intestinale Epithelzellen bilden eine intakte Darmbarriere und schützen den Organismus vor Pathogenen und anderen z. T. auch toxischen Substanzen aus dem Darmlumen. Multiproteinkomplexe, *tight junctions* verschließen Zellzwischenräume und übernehmen zusätzliche regulatorische Funktionen (Permeabilität von Nährstoffen, Ionen und Wasser). In CU scheint dieses System gestört. Über eine Dysregulation sog. Claudine (Bestandteile der *tight junctions*) kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit für intestinale MO und andere Bestandteile des Lumens (Oshima *et al.*, 2008). Vor allem Glykolipide auf der MO-Oberfläche, bzw. auch solche, die von den Epithelzellen selbst präsentiert werden, führen zur Aktivierung

und Proliferation von NKT-Zellen und zur Freisetzung von IL 13. Dies verstärkt wiederum die Dysregulation der *tight junctions* und aktiviert zusätzliche zytotoxische NKT-Zellen, was schlussendlich in einem Barrierschaden resultiert (Heller *et al.*, 2005).

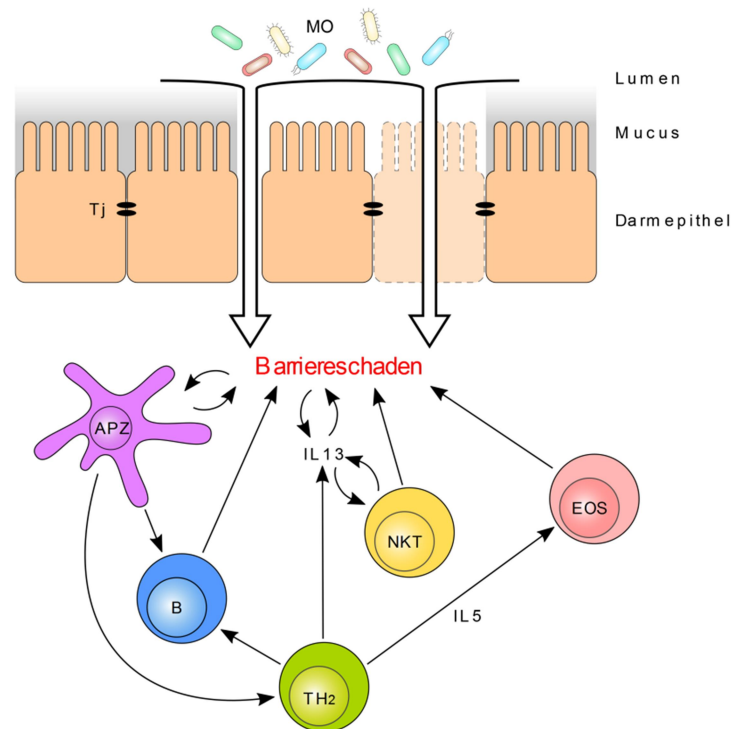


Abb. 2-2 Hypothetischer Pathomechanismus von CU

Der Pathomechanismus von CU ist bisher noch nicht abschließend aufgeklärt. In der Wissenschaft werden vor allem Dysfunktionen der *tight junctions* diskutiert (Oshima *et al.*, 2008), die einen vermehrten Einstrom von intestinalen MO zur Folge haben. Antigen-präsentierende Zellen und natürliche Killerzellen prozessieren diese Lumenbestandteile (auch kommensale MO) und aktivieren über Interleukine weitere Teile des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Inflammatorische Prozesse werden verstärkt. Es entsteht ein chronischer intestinaler Barrierschaden mit entsprechendem klinischen Phänotyp. APZ: Antigen-präsentierende Zellen, B: B-Zelle, EOS: Eosinophiler Granulozyt, IL 5: Interleukin 5, IL 13: Interleukin 13, MO: Mikroorganismen, NKT: Natürliche Killerzelle, TH₂: T-Helferzelle Typ II, Tj: *tight junctions*.

Der Einstrom von luminalen Antigenen führt ferner zur Aktivierung von weiteren Bestandteilen des angeborenen Immunsystems, vor allem Makrophagen und dendritischen Zellen. Diese prozessieren nun auch nicht-pathogene MO (Kommensalen) und produzieren pro-inflammatorische Zytokine. Außerdem werden T-Helferzellen Typ 2 (TH₂) aktiviert. Diese sezernieren zum einen vermehrt IL 13 (Rückkopplung NKT-Zellen) und zum anderen IL 5, welches eosinophile Granulozyten aktiviert und somit den apoptotischen bzw. nekrotischen Effekt

(Rothenberg and Hogan, 2006) auf das Darmepithel weiter verstärkt. Die inflammatorischen Prozesse werden schlussendlich auch durch die Produktion von Antikörpern (Ak) bzw. Interaktion/Aktivierung von B-Zellen mit T-Helferzellen gefördert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Darmbarriere in CU-Patienten signifikant gestört ist (Schmitz *et al.*, 1999). Eine Heilung ist bis heute nicht möglich, lediglich die Abmilderung der Symptome und Verlängerung der Remission. Die Therapie richtet sich dabei nach dem Schweregrad und Ausbreitung der Erkrankung. Es werden vor allem Aminosalicylate wie Mesalazin bzw. Sulfasalazin eingesetzt (Mahadevan, 2004). Die Azobindung von Sulfasalazin wird im Darm von einer bakteriellen Azoreduktase gespalten, es entsteht Mesalazin und Sulfapyridin (Abb. 2-3). Aminosalicylate wirken vielfältig. Als Radikalfänger verhindern sie z. B. Zellschäden durch freie reaktive Sauerstoffspezies (Ahnfelt-Ronne *et al.*, 1990).

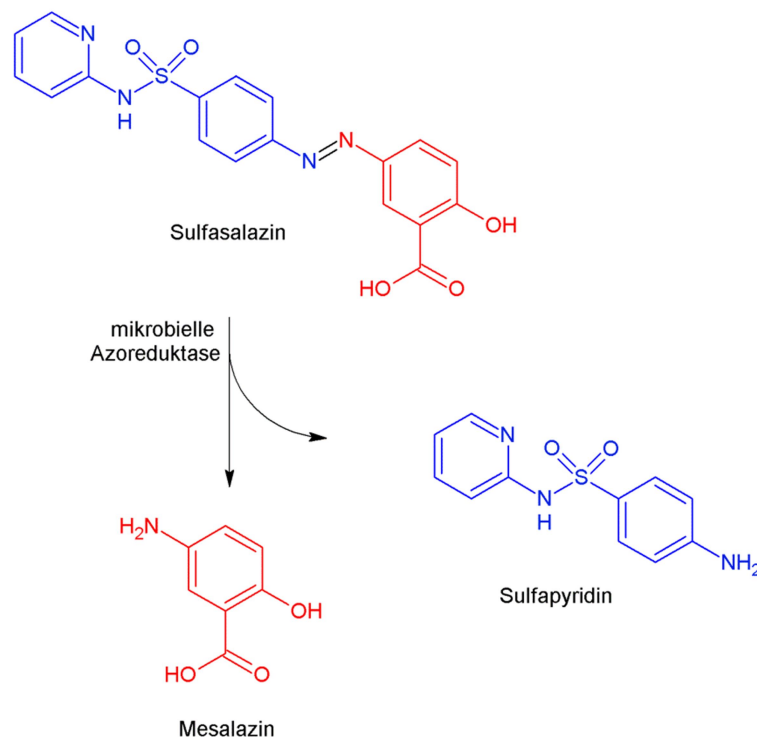


Abb. 2-3 Enzymatische Spaltung von Sulfasalazin in Mesalazin und Sulfapyridin

In der CU-Therapie werden vor allem Aminosalicylate eingesetzt um eine Remission einzuleiten oder zu verlängern. So wird z. B. Sulfasalazin oral eingenommen und im Dickdarm durch mikrobielle Azoreduktase zu Mesalazin und Sulfapyridin gespalten. Beide Produkte dieser Reduktionsreaktion wirken entzündungshemmend und können zur Linderung der CU-Symptome beitragen.

Außerdem beeinflussen sie das Immunsystem, indem sie inhibitorisch auf die Freisetzung von IL 1 (Mahida *et al.*, 1991) und dem Tumornekrosefaktor (TNF) (Kaiser *et al.*, 1999) wirken und die Chemotaxis von Leukozyten verhindern (Nielsen *et al.*, 1988). Aminosalicylate werden meist bei schwächeren CU-Formen eingesetzt und können eine Remission einleiten oder erhalten.

Bei stärkerer Ausprägung der Krankheit werden vor allem Kortikosteroide als Entzündungshemmer eingesetzt (Ford *et al.*, 2011). Bei weiterer Progression der Krankheit, Komplikationen oder einem fehlenden Ansprechen des Patienten auf medikamentöse Behandlungen erfolgt in letzter Konsequenz eine operative Entfernung des gesamten Kolons (Kolektomie) (Bach and Mortensen, 2007). Aus dem terminalen Ileum wird dabei ein Reservoir (Ileoanaler Pouch) gebildet und mit dem Rektum verbunden.

Die zweite Hauptform der CED, MC, wurde – wenngleich bereits früher erwähnt – 1932 entscheidend durch den amerikanischen Arzt Burrill B. Crohn geprägt (Crohn *et al.*, 1932). Im Gegensatz zu CU treten die hier transmuralen Entzündungen diskontinuierlich im gesamten GI auf (Hendy and Hart, 2013). Eine Häufung findet sich meist im terminalen Ileum und Kolon. Hauptsymptome sind ähnlich zu CU abdominelle Schmerzen und Diarrhoe. MC tritt ebenso vor allem in industriell entwickelten Ländern auf. Hier wird eine Prävalenz von bis zu 0,2% angegeben (Molodecky *et al.*, 2012). Die Inzidenzen schwanken zwischen 0,3 bis 20 Fälle pro 100.000 Einwohnern und Jahr. Auch hier steigen die Fallzahlen, interessanterweise vor allem in Entwicklungsländern (Logan and Bowlus, 2010). Die Erstdiagnose von MC ist meist zwischen dem 15. und 35., sowie zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr (Behzadi *et al.*, 2015). Ethnische Besonderheiten scheinen keinen Einfluss auf das Auftreten von MC zu haben. Lediglich geschlechtsspezifische Studien zeigen ein leicht erhöhtes Auftreten bei Frauen (Wagtman *et al.*, 2001). Rauchen gilt dagegen bei MC als Risikofaktor und führt zu Komplikationen im Verlauf der Krankheit. Bei CU wirkt der Konsum von Zigaretten sogar protektiv (Mahid *et al.*, 2006). Die Klassifikation in MC unterscheidet sich deutlich zu CU. In der Klinik hat sich vor allem die Montreal-Klassifikation von 2005 durchgesetzt (Silverberg *et al.*, 2005) (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Montreal-Klassifizierung in MC (Silverberg *et al.*, 2005)

Parameter	Montreal Klassifikation
Erstdiagnose, Alter	A1: <16 Jahre
	A2: 17-40 Jahre
	A3: >40 Jahre
Lokalisierung	L1: terminales Ileum
	L2: Kolon
	L3: Ileokolon
	L4: oberer GI
	L4+: unterer GI
Manifestation der Entzündung	B1: nicht strikturierend (nicht verengend)
	B2: strikturierend
	B3: penetrierend
	B3p: perianal penetrierend

MC verläuft ebenso rezidivierend. Der Pathomechanismus ist Gegenstand aktueller Forschung. Im Gegensatz zu CU stehen vor allem genetische Defekte und Makrophagenaktivität im Fokus der wissenschaftlichen Diskussion (Boyapati *et al.*, 2015), siehe Abb. 2-4:

Studien zeigen, dass MC-Patienten eine erhöhte intestinale Permeabilität für Lumenbestandteile aufweisen (Peeters *et al.*, 1994). Allerdings ist ungeklärt, ob dies eine Voraussetzung für die Ausbildung der Krankheit oder eine direkte Folge der chronischen Entzündungsreaktion ist. Bei diesen Vorgängen scheinen jedoch genetische Faktoren eine Rolle zu spielen. So gibt es bei MC-Patienten u. a. Hinweise auf Polymorphismen und veränderte Expressionsraten von Mucin-Genen (Moehle *et al.*, 2006). Mucine sind stark glykosylierte, extrazelluläre Proteine, die durch ihren gelbildenden Charakter zum Aufbau der intestinalen Barriere beitragen (Bansil and Turner, 2006). Störungen beeinflussen den protektiven Effekt der Barriere direkt.

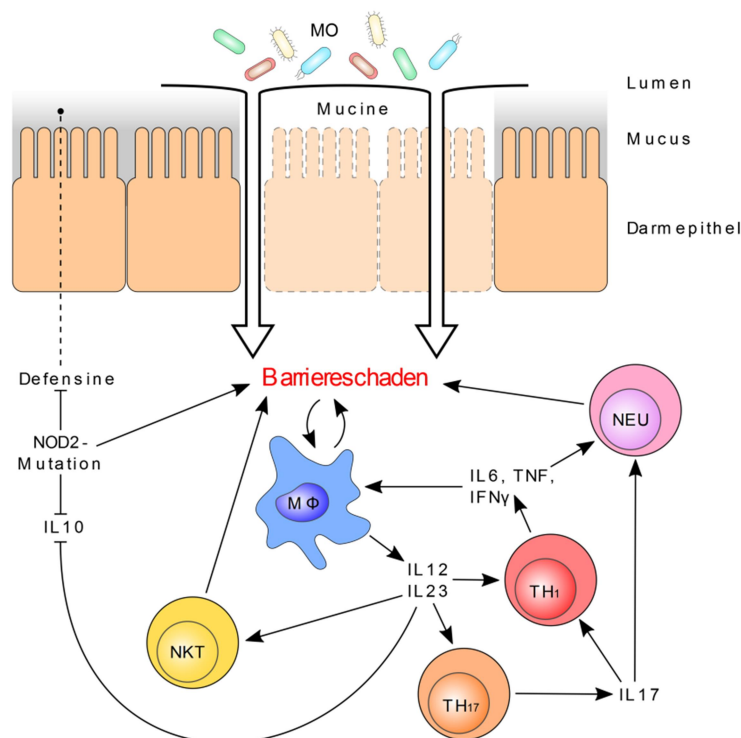


Abb. 2-4 Hypothetischer Pathomechanismus von MC

Die Pathogenese von MC ist Gegenstand aktueller Forschung. Es werden Mucin-Defekte diskutiert, die durch zusätzliche Läsionen der intestinalen Barriere einen gesteigerten Einstrom von luminalen Bestandteilen zur Folge hat. Makrophagen prozessieren somit auch kommensale Bakterien, proliferieren und aktivieren vor allem über IL 12 und IL 23 TH₁, TH₁₇ und NKT-Zellen. Über eine Feedbackschleife werden weitere Makrophagen und neutrophile Granulozyten aktiviert, die die inflammatorischen Prozesse weiter vorantreiben (Mills, 2008). Der Barrierschaden wird zusätzlich durch genetische Defekte begünstigt. Eine Mutation in NOD2 führt zur Hemmung der Defensin-Produktion (Wehkamp *et al.*, 2005) und Suppression von IL 10 (anti-inflammatorisches Zytokin) (Taylor *et al.*, 2006). IFN γ : Interferon γ , IL 6: Interleukin 6, IL 10: Interleukin 10, IL 13: Interleukin 13, IL 17: Interleukin 17, IL 23: Interleukin 23, M Φ : Makrophagen, MO: Mikroorganismen, NEU: neutrophiler Granulozyt, NKT: natürliche Killer-T-Zellen, TH₁: T-Helferzelle Typ 1, TH₁₇: T-Helferzelle Typ 17, TNF: Tumornekrosefaktor.

Ein weiteres Beispiel sind die bereits angesprochenen *loss-of-function*-Mutationen im *nod2* Gen. NOD2 nimmt eine zentrale Schnittstelle in Autophagieprozessen und der T-Zell-Aktivierung ein (Shaw *et al.*, 2011). Als zytosolischer Sensor in Makrophagen und Epithelzellen interagiert NOD2 mit bakteriellen Peptidoglykanen und aktiviert über weitere Signalwege (Inohara *et al.*, 2000) die Produktion von Defensinen (antimikrobielle Peptide) (Tsutsumi-Ishii and Nagaoka, 2002). Ein Defekt im NOD2 Gen führt zu einer Dysbalance der intestinalen Abwehr (Philpott and Girardin, 2009). Durch Läsionen der intestinalen Barriere, verstärkt durch die bereits angesprochenen Effekte, werden ferner Makrophagen aktiviert, welche Bestandteile des Lumens

prozessieren. Über Zytokine werden weitere Komponenten des Immunsystems aktiviert.

An dieser Stelle seien besonders IL 12 und IL 23 erwähnt (Teng *et al.*, 2015). Beide Peptidhormone fördern die Proliferation von naïven T-Zellen zu T-Helferzellen Typ 1 (TH₁) und -17 (TH₁₇), die ihrerseits vor allem neutrophile Granulozyten und weitere Makrophagen (Strober and Fuss, 2011) aktivieren. Ferner fördert IL 12 die Proliferation von NKT-Zellen. IL 23 wirkt suppressiv auf antiinflammatorische Faktoren wie IL 10 (Liu *et al.*, 2012).

Auch bei MC richtet sich die Therapie nach Schweregrad und Ausbreitungsmuster der Krankheit. Analog zu CU wird bei leichter Krankheitsausprägung Mesalazin eingesetzt. Budesonid, ein Kortikosteroid, wird zur Einleitung der Remission genutzt (Kuenzig *et al.*, 2014). Bei stärkerer Ausprägung werden Immunsuppressiva wie 6-Mercaptopurin bzw. dessen Vorläufer Azathioprin (Prefontaine *et al.*, 2009) oder monoklonale Antikörper gegen TNF wie Infliximab bzw. Adalimumab (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2013) verwendet. Trotz zahlreicher medikamentöser Möglichkeiten benötigt ca. die Hälfte aller MC-Patienten nach längerer Progression der Krankheit eine Darmresektion (Thia *et al.*, 2010).

Circa 10-15% der CED-Fälle können trotz intensiver klinischer Untersuchungen nicht in CU und MC differenziert werden (Geboes *et al.*, 2008). Price und Kollegen definierten diese Fälle in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts als *Colitis indeterminata* (Price, 1978). Betroffen sind vor allem Patienten nach Erstdiagnose. Im zeitlichen Verlauf ist meist eine eindeutige Klassifikation möglich. Bei ca. 14% der gesamten CED-Patienten ändert sich die Diagnose während der Therapie (Tontini *et al.*, 2015b).

CED sind bis heute nicht heilbar. Lediglich lassen sich Symptome abschwächen bzw. die Zeiträume der Remission verlängern. CED tritt weltweit mit steigender Inzidenz und vor allem in jungen Lebensjahren auf. Der chronische Verlauf bedingt jahrzehntelange Therapien, die mit einem großen Leidensdruck der Patienten einhergehen. Komplikationen wie Fistelbildungen und Abszesse bis hin zu Darmverschlüssen nehmen mit Krankheitsdauer zu. CED sind somit nicht nur eine klinische Aufgabenstellung sondern vielmehr eine Herausforderung für das gesamte gesellschaftliche und volkswirtschaftliche System.

2.3 Primär sklerosierende Cholangiitis und andere CED-assoziierte extraintestinale Erkrankungen

Mit steigender CED-Verlaufsdauer erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für überlappende Krankheitsmuster. So zeigen 25-40% der CED-Patienten extraintestinale Manifestationen (EIM) (Bernstein *et al.*, 2001).

Ein Beispiel hierfür ist die primär sklerosierende Cholangiitis (PSC). PSC tritt bei ca. 2-7% der CED-Patienten auf. Dagegen ist bei ca. 75% der PSC-Patienten CED (hauptsächlich CU) assoziiert (Vavricka *et al.*, 2015). PSC ist eine chronisch auftretende, inflammatorische Erkrankung. Die Entzündungen können im gesamten hepatobiliären System auftreten. Hauptsächlich sind jedoch die Gallenwege betroffen. Hauptsymptome sind Gewichtsverlust, Fatigue, Gelbsucht und Oberbauchschmerzen. Im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit kommt es zur Gewebsverhärtung (Sklerose). Die Prävalenz wird mit 4-16 Fällen auf 100.000 Einwohner angegeben, die Inzidenz mit bis zu 1,3 pro 100.000 Einwohner und Jahr (Hirschfield *et al.*, 2013). Betroffen sind überwiegend Männer mittleren Alters (Mendes and Lindor, 2010). Auch bei PSC ist die Pathogenese noch nicht geklärt. Wie in CED werden mehrere, das Immunsystem einschließende Mechanismen und genetische Faktoren diskutiert. Auch scheint eine Translokation von intestinalen Bestandteilen ins biliäre System durch inflammatorische- und strikturierende Prozesse möglich. Es ist allerdings unklar, ob diese Faktoren eine PSC auslösen, oder ob unterschiedliche zugrundeliegende Krankheiten zum PSC-Phänotyp führen (Tabibian and Lindor, 2013). Eine gezielte Therapie ist schwierig und abhängig vom jeweiligen Patienten. Immunmodulatorische Pharmaka zeigen kaum Wirkung (Culver and Chapman, 2011), lediglich eine Lebertransplantation stellt eine kurative Behandlungsmöglichkeit dar (Lutz *et al.*, 2013). PSC ist außerdem ein Haupt-Risikofaktor für die Ausbildung eines cholangiozellulären Karzinoms (CCA). Die CCA-Prävalenz in PSC wird mit 4-36% angegeben (Lazaridis and Gores, 2006). Die Lebenserwartung nach PSC-Erstdiagnose und ausbleibender Lebertransplantation beträgt ca. 10 Jahre (Tischendorf *et al.*, 2007).

Neben den hepatobiliären Symptomen gibt es weitere EIM, die assoziiert zu CED vorliegen können:

I. Dermatologische EIM:

Ca. 2-34% der Patienten zeigen ein breites Spektrum von Hautsymptomen (Tavarela Veloso, 2004). Diese schließen vor allem Entzündungen in der *Subkutis* (*Erythema Nodosum*), Schuppenflechte (*Psoriasis*) und lokale Geschwürbildungen (*Pyoderma gangraenosum*) ein. Ferner können begleitend Fieberschübe, Knötchen und andere Läsionen auftreten.

II. Muskuloskelettale EIM:

Assoziierte Manifestationen im Stütz- und Bewegungsapparat treten bei 5-20% der CED-Patienten auf (Jose and Heyman, 2008) und äußern sich durch Schmerzen und lokale Temperaturerhöhungen. Die entzündlichen Prozesse betreffen vor allem die Gelenke (*Arthritis*) und Wirbelsäule (*Sacroiliitis*).

III. Okulare EIM:

Weitere extraintestinal-assoziierte Symptome können entzündliche Prozesse der Augen beinhalten. Je nach Lokalisierung im Auge wird hauptsächlich zwischen *Skleritis* (Entzündung in der Lederhaut) und *Uveitis* (Entzündung in der mittleren Augenhaut) unterschieden. Zwischen 2-5% der CED-Erkrankten (Vavricka *et al.*, 2015) sind betroffen.

CED-assoziierte Symptome und entzündliche Prozesse können ebenso weitere Bereiche des Körpers wie z. B. das renale- oder pulmonale System einschließen. Auch steigt das Krebsrisiko (Bergeron *et al.*, 2010). Mehr als 25% der CED-Patienten entwickeln verschiedene EIM (Levine and Burakoff, 2011). Diese Progression und Überlagerung verschiedener Krankheiten erhöhen den Schweregrad der CED und muss differential-diagnostisch untersucht und therapiert werden.

2.4 Diagnostische Verfahren bei CED

Patienten werden initial meist mit Beschwerden des unteren GI in der Klinik vorstellig. Symptome wie Diarrhoe, Schmerzen und Fatigue sind dabei keine Seltenheit. Um CED von anderen, den Darm betreffenden Erkrankungen (z. B. Reizdarmsyndrom, Zöliakie oder Infektionskrankheiten) abzugrenzen, bedarf es differential-diagnostischer Methoden (Abb. 2-5). Ein Zusammenspiel dieser Methoden können ca. 90% der CED-Patienten eindeutig zwischen CU und MC unterscheiden (Henriksen *et al.*, 2006).

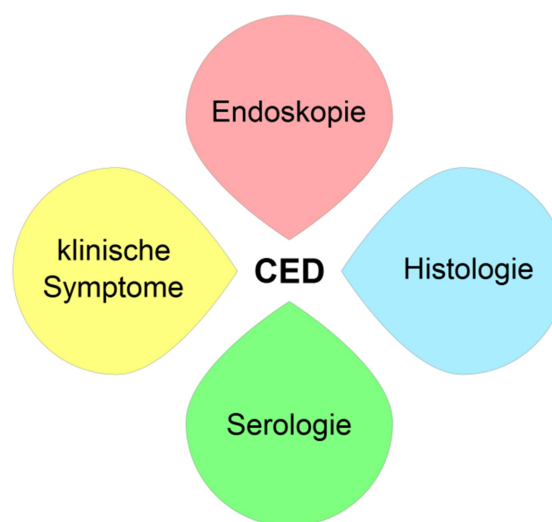


Abb. 2-5 Bereiche der differentiellen Diagnostik in CED

Zur klinischen Diagnosefindung werden diagnostische Methoden aus Serologie, Histologie und anderen bildgebenden Verfahren wie Endoskopien durchgeführt. Zusammen mit Symptomen und Patientenvorgeschichte bzw. Anamnese können 90% der CED-Patienten in CU oder MC klassifiziert werden (Henriksen *et al.*, 2006).

2.4.1 Endoskopie und andere bildgebende Verfahren

Die Endoskopie ist eine grundlegende Methode, die vor allem zur Feststellung der initialen CED-Diagnose und zur Differenzierung zwischen CU und MC eingesetzt wird (American Society for Gastrointestinal Endoscopy Standards of Practice *et al.*, 2015). Ferner lassen sich Aussagen über Ausbreitung und Aktivitätsstatus der zugrundeliegenden Krankheit sowie das Ansprechen von Therapien treffen. Im Umfeld von CED werden vor allem Koloskopien (mit Ileoskopie) und Gastroskopien durchgeführt. CU-Patienten zeigen im endoskopischen Bild die bereits

angesprochene, vom Rektum beginnende und kontinuierlich proximal aufsteigende Inflammation (Ödeme, Erytheme, Blutungen, Verlust Gefäßmuster) (Paine, 2014). MC ist durch den diskontinuierlichen Entzündungsverlauf gekennzeichnet. Die Inflammation kann hier auch den Dünndarm betreffen. Weitere Endoskopiebefunde bei MC sind Erytheme, Ulcera, segmentierte Läsionen und Stenosen.

Endoskopien sind aufwendige medizinische Eingriffe. Obwohl sie als sicher gelten, sind damit Risiken für den Patienten verbunden (Matharoo *et al.*, 2014). Um diese zu minimieren werden auch nicht-invasive radiologische Techniken wie Ultraschalluntersuchungen (Strobel *et al.*, 2011), Computertomographie (Horsthuis *et al.*, 2008) oder Magnetresonanztomographie (Gee and Harisinghani, 2011) genutzt. Allerdings beschränkt sich hier die diagnostische Relevanz vor allem auf MC und die Lokalisierung assoziierter Erkrankungen (Hendrickson *et al.*, 2002).

2.4.2 Histologie

In der Regel werden während einer Endoskopie Gewebeproben entnommen (Mowat *et al.*, 2011). Diese Biopsien werden histologisch untersucht und beurteilt (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: histologische Beurteilung von Gewebeproben in CED (Langner *et al.*, 2014)

Parameter	CU	MC
Kryptenarchitektur	unregelmäßig, Atrophie, Abszesse	unregelmäßig, fokal
Inflammation	kontinuierlich, diffus, proximale Abschwächung, transmukosal	diskontinuierlich, fokal, transmural
lymphoide Aggregate	Mukosa	transmural
Granuloma	kaum vorhanden	häufig
Mucin	Verminderung (Quantität Becherzellen erniedrigt)	keine Änderung

Krankheitsverlauf und Therapeutika haben jedoch einen großen Einfluss auf das Gewebe. Auch das Fehlen von typischen Beobachtungsparametern und

Überlagerung anderer Krankheiten mit ähnlichem mikroskopischem Phänotyp (z. B. Infektiöse Kolitis) erschwert die Diagnose. Die Histologie wird daher nicht losgelöst von anderen Diagnosemethoden betrachtet (Baumgart, 2012).

2.4.3 Stuhluntersuchungen

Bereits 1891 veröffentlichte John G. Bourke ein umfassendes Kompendium zur Nutzung von Fäzes in Medizin, Religion, Hexerei und Sexualität (Bourke, 1891). Heute werden medizinische Stuhluntersuchungen unter dem Begriff Koprologie zusammengefasst. Im Umfeld von CED sind Stuhluntersuchungen noch Gegenstand aktueller Forschungen. Die möglichen Vorteile sind jedoch offensichtlich: die nicht invasive, einfache und kostengünstige Probengewinnung ohne Ressourcenlimitierung.

Bei unbekannter Diagnose werden als Vortests Stuhlproben auf Infektionserreger (über Stuhlkultivierung sowie mikroskopische- und biochemische Analysen) und okkultes Blut untersucht. Gerade der Nachweis von Blut im Fäzes gibt Hinweise auf eine evtl. vorliegende chronische Darmerkrankung. Der wohl älteste Indikator hierfür ist Guajakharz (Greeger, 1971). Das Prinzip ist analog zu heute verwendeten chromogenen Chemikalien wie Aminophenazon (Cheesbrough, 2006) und Benzidine (Clark and Kruse, 1990): Hämoglobin und seine Derivate katalysieren die Oxidation des Chromogens unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Es folgt ein detektierbarer Farbumschlag. Weiterhin existieren immunbiochemische Testsysteme zum Nachweis von okkultem Blut, die mono- und polyklonale Antikörper nutzen. Studien zeigen, dass der Nachweis von okkultem Blut eine CED-Diagnose unterstützen (Moran *et al.*, 2015) oder Hinweise auf ggf. assoziierte Erkrankungen geben kann (Chen *et al.*, 1997).

Als Inflammationsmarker hat sich fäkales Calprotectin durchgesetzt. Calprotectin ist ein 48 kDa großer Heterokomplex, bestehend aus den Untereinheiten Calgranulin A (S100A8) und Calgranulin B (S100A9) (Walsham and Sherwood, 2016). Es bindet Kalzium und andere Übergangsmetalle und wirkt antimikrobiell. Calprotectin wird überwiegend in neutrophilen Granulozyten, ferner Monozyten und Makrophagen exprimiert. Bei aktiven Entzündungsprozessen ist es homogen im Stuhl verteilt und bis zu sieben Tage bei Raumtemperatur (RT) stabil (Røseth *et al.*, 1999). Als

Normalbereich wird eine Massenkonzentration von bis zu zehn $\mu\text{g/g}$ Fäzes angesehen. Die Toleranzgrenze von fäkalem Calprotectin liegt bei 50-100 $\mu\text{g/g}$ (Alibrahim *et al.*, 2015). Studien zeigen zwar hohe Sensitivität und Spezifität bei der Diskriminierung zwischen CED-Patienten und gesunden Probanden (Lehmann *et al.*, 2015), allerdings gibt es keine Korrelation zur klinischen Aktivität der Krankheit (Tontini *et al.*, 2015b). Auch ist eine Differenzierung zu anderen den Darm betreffenden inflammatorischen Erkrankungen nur bedingt möglich.

Ein ebenso diskutierter Marker könnte ein Protein aus der Transferrin-Familie darstellen: das Lactoferrin. Lactoferrin ist ein monomeres, basisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Interessanterweise gibt es große Homologien zwischen seinen beiden funktionellen Hauptdomänen: es wird diskutiert, dass das heute vorkommende Lactoferrin durch Genduplikation im Laufe der Evolution hervorgebracht wurde (Levay and Viljoen, 1995). In der Literatur werden drei Isoformen beschrieben (Furmanski *et al.*, 1989). Hauptfunktion ist die Bindung von freiem Eisen im Blut, Stuhl und anderen Körperflüssigkeiten (auch bei niedrigem pH-Wert) (Wally and Buchanan, 2007). Es wirkt dadurch antimikrobiell. Lactoferrin wird ebenso vor allem von neutrophilen Granulozyten und ferner von Epithelzellen sezerniert (Ward *et al.*, 1998). Fäkales Lactoferrin ist bei RT bis zu sieben Tage stabil (Guerrant *et al.*, 1992). Der Normwert wird mit bis zu sieben $\mu\text{g/g}$ Stuhl angegeben (Langhorst *et al.*, 2008). In einzelnen Studien konnte bereits eine Relevanz bei CED festgestellt werden (Kane *et al.*, 2003), allerdings hat sich die Bestimmung von fäkalem Lactoferrin im medizinischen Alltag bisher nicht durchgesetzt.

In der wissenschaftlichen Forschung werden weitere fäkale Markerproteine wie Neopterin (von Makrophagen sezernierter Mediator) und Polymorphonuklear-Elastase (von neutrophilen Granulozyten sezernierte Peptidase) diskutiert (Foell *et al.*, 2009). Bis heute konnte allerdings kein spezifischer CED-Marker im Stuhl gefunden werden (Lehmann *et al.*, 2015).

2.4.4 Hämatologische Tests

Die Bestimmung der Erythrozytensedimentationsrate, sowie Untersuchungen des Blutbildes (Leukozyten- und Thrombozytenzahl) können Hinweise auf vorliegende inflammatorische Prozesse liefern (Iskandar and Ciorba, 2012). Allerdings

unterliegen diese Analysen starken Schwankungen: Einflüsse wie Alter, Geschlecht, Medikation, Schwangerschaft und andere Lebensumstände wirken sich direkt auf die hämatologische Diagnostik aus. Außerdem weisen diese Untersuchungsmethoden kaum CED-Spezifität auf (Mendoza and Abreu, 2009). Daher rücken serologische Marker und die Untersuchung von (Auto-) Antikörpern in den Fokus der wissenschaftlichen Diskussion.

2.4.5 Serologie

C-reaktives Protein (CRP), erstmals 1930 beschrieben (Tillett and Francis, 1930), ist ein sog. Akut-Phase-Protein. Es wird nach IL 6 Stimulus in der Leber produziert und liegt in seiner aktiven Form als Homopentamer vor. Hauptfunktion ist die Initialisierung der Komplement-Kaskade über Bindung von Phosphocholin (Vermeire *et al.*, 2004). CRP wird mit einer Serumkonzentration von 0,8 mg/L angegeben (Ford *et al.*, 2003), erhöhte Werte mit >45 mg/L (Travis *et al.*, 1996). Die rapide Konzentrationserhöhung vom CRP im Serum bei inflammatorischen Prozessen (Kushner, 1990), sowie die relativ kurze Halbwertszeit von ca. 19 h (Kao *et al.*, 2006) machen dieses Protein zu einem potentiellen Marker. In klinischen Studien konnte die Relevanz von CRP im Umfeld von CED gezeigt werden (Solem *et al.*, 2005). Vor allem MC-Patienten wiesen erhöhte CRP-Werte bei Korrelation zum endoskopischen Befund auf. Weitere serologische Markerproteine wie z. B. Albumin (Mackenzie *et al.*, 2003) oder alkalische Phosphatase (Cappello *et al.*, 2014) werden kontroverser bei CED diskutiert.

Antikörper im Umfeld von CED lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Antikörper gegen mikrobielle Antigene aus kommensalen Mikroorganismen und Autoantikörper (AAk). Zu ersterer Gruppe gehören Anti-Glykan Antikörper. Sie binden vor allem glykosylierte Zellwandstrukturen von Mikroorganismen (Dotan *et al.*, 2006). Ein prominentes Beispiel sind die bereits 1988 (Main *et al.*, 1988) erwähnten Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) Tabelle 2-3). Zielantigen ist Phosphopeptidmannan (ca. 200 kDa große Oligomannose in der Zellwand von *S. cerevisiae*). Studien zeigen eine hohe Prävalenz von 50-70% bei MC und 5-15% bei CU (Reumaux *et al.*, 2003). Allerdings lassen sich Krankheiten wie Zöliakie (Toumi *et al.*, 2007) und Autoimmunhepatitis (Fagoonee *et al.*, 2009) nicht

ausschließen. Weitere Anti-Glykan Antikörper wie ACCA (*antichitobioside carbohydrate antibody*), ALCA (*antilaminaribioside carbohydrate antibodies*) und AMCA (*antimannobioside carbohydrate antibodies*) zeigen zwar ebenso eine Assoziation zu MC, die ermittelten Prävalenzen sind jedoch im Vergleich zu ASCA in CED-Kollektiven geringer (Malickova *et al.*, 2010).

In der Literatur werden weitere Antikörper gegen mikrobielle Antigene kontrovers diskutiert. Anti-OmpC (Antikörper gegen Porine der Zellwand von *E. coli*), Anti-CBir1 (Antikörper gegen bakterielles Flaggelin) und Anti-I2 (Antikörper gegen *Pseudomonas fluorescens*) sind Gegenstand aktueller Forschung. Eine abschließende Assoziation zu CED konnte bisher nicht gezeigt werden (Prideaux *et al.*, 2012).

AAk sind Immunglobuline, die gegen körpereigene, funktionelle Strukturen gerichtet sind (Shoenfeld *et al.*, 2013). In der serologischen Diagnostik von CED werden AAK gegen neutrophile Granulozyten (ANCA) mittels indirekter Immunfluoreszenz (IIFT) untersucht. Es werden zwei ANCA-Hauptmuster unterschieden: zytoplasmatisch-granulär (cANCA) und perinukleär (pANCA). Zielantigen von cANCA ist vor allem Proteinase 3 (Brockmann *et al.*, 2002). Bei pANCA wurden mehrere Zielantigene identifiziert: u. a. Myeloperoxidase, Serinproteasen (Cathepsin G, Elastase), Lactoferrin, β -Glucuronidase. Während cANCA hohe Prävalenzen für Vaskulitiden aufweist (Rao *et al.*, 1995), wurde 1990 erstmals eine Assoziation von pANCA zu CED beschrieben (Rump *et al.*, 1990). Heute werden pANCA-Prävalenzen von 20-85% bei CU und 2-28% bei MC angegeben (Tontini *et al.*, 2015b). Eine Weiterentwicklung in der Serologie unter Nutzung von prozessierten neutrophilen Granulozyten sind AAK gegen Desoxyribonukleinsäure-gebundenes Lactoferrin (DNS-geb. Lf) (Teegen *et al.*, 2009). Unter Hochsalzbedingungen werden hierbei die pANCA-Zielantigene von Ethanol-fixierten Granulozyten entfernt. Die Granulozyten werden danach mit humanem Lactoferrin inkubiert. Unter Anwesenheit von DNS (AAk gegen DNS-geb. Lf) konnten Prävalenzen von 72% bei CU und 10% bei MC ermittelt werden.

AAk gegen intestinale Becherzellen (BAk) können mit einer Spezifität von 100% und einer Prävalenz von 28% (Stöcker *et al.*, 1984) Hinweise auf CU geben. Becherzellen sind spezialisierte, Mukus-produzierende Epithelzellen. Die Anzahl der

Becherzellen nimmt im Darm distal zu (Abraham and Cho, 2009). Das Zielantigen der AAK ist bislang noch nicht identifiziert. In der IIFT findet Primatendarm als Substrat seine Anwendung. Als Weiterentwicklung können alternativ auch HT29-18N2-Zellen genutzt werden. Diese Adenokarzinom-Zellen differenzieren in einem speziellen Protein-freiem Medium und unter Glukoseentzug zu einem Monolayer mit Becherzell-Phänotyp (Phillips *et al.*, 1995).

Bereits 1987 konnten vor allem bei MC-Patienten AAK gegen Bestandteile des exokrinen Pankreas (PAk) nachgewiesen werden (Stöcker *et al.*, 1987). Die Prävalenz wurde mit 2% für CU und 39% für MC ermittelt. In der IIFT wurden zwei verschiedene Muster auf Pankreas (simian) beobachtet: zum einen ein netzartig-granuläres Muster im Zytoplasma von Azinuszellen und zum anderen ein tropfiges Muster in den Lumina der Azini (Stöcker *et al.*, 1984) (Abb. 2-6). Später konnten die entsprechenden Zielantigene identifiziert werden (Komorowski *et al.*, 2013; Aulinger-Stöcker, 2017): die Glykoproteine *CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1* (CUZD1) und *pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein 2* (GP2).

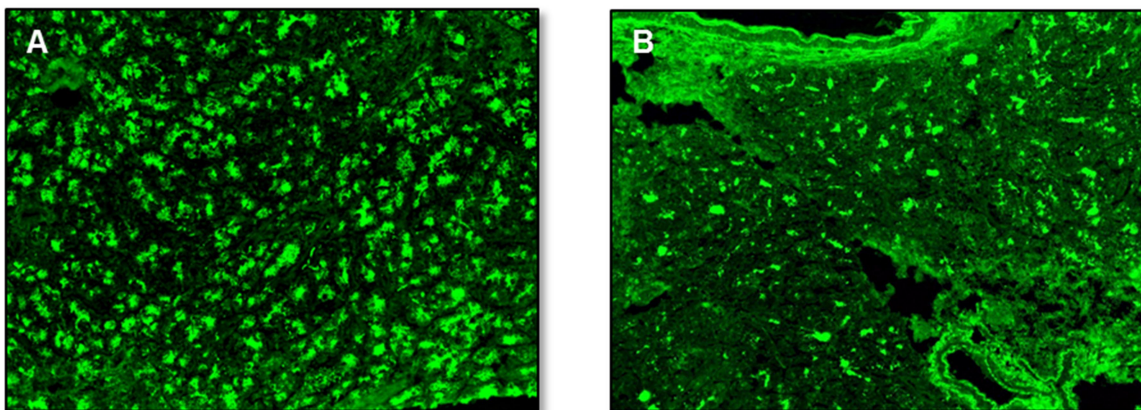


Abb. 2-6 PAK IIFT-Muster auf Pankreas

A: netzartiges Muster von CUZD1-spezifischen AAK, B: tropfiges Muster von GP2-spezifischen AAK, Vergrößerung jeweils 200-fach.

Serologische Marker- und Antikörperuntersuchungen haben das Potential die Diagnostik in CED minimal-invasiv zu unterstützen. Gerade die Kombination von ASCA und pANCA kann zwischen CU und MC hochspezifisch diskriminieren (Wen and Fiocchi, 2004). Allerdings sind die vorliegenden Sensitivitäten eher gering

einzuschätzen. Auch lassen sich andere ggf. assoziierte Erkrankungen nur schlecht differenzieren. Daher werden auch weiterhin verschiedene diagnostische Untersuchungen im Umfeld von CED durchgeführt und neue Marker und (Auto-) Antikörper wissenschaftlich erforscht.

Tabelle 2-3: Zusammenfassung wichtiger serologischer Parameter in CED

ASCA: Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae*, BAk: AAK gegen intestinale Becherzellen, DNS-geb. Lf: AAK gegen Desoxyribonukleinsäure-gebundenes Lactoferrin, immobilisiert an neutrophile Granulozyten, PAk: AAK gegen Bestandteile des exokrinen Pankreas, pANCA: Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper mit perinukleärem Muster in der IIFT

Serologische Parameter	Prävalenz [%]		
	CU	MC	Quelle
ASCA	5-15	50-70	(Reumaux <i>et al.</i> , 2003)
BAk	28	0	(Stöcker <i>et al.</i> , 1984)
DNS-geb. Lf	72	10	(Teegen <i>et al.</i> , 2009)
PAk	2	39	(Stöcker <i>et al.</i> , 1987)
pANCA	20-85	2-28	(Tontini <i>et al.</i> , 2015a)

2.5 Pankreatische Antigene in der differentiellen CED-Diagnostik

Autoantikörper gegen pankreatische Zielstrukturen (Langerhanssche Inselzellen des endokrinen Pankreas) wurden erstmals 1976 bei Diabetes Typ 1 identifiziert (Irvine *et al.*, 1976). Etwa ein Jahrzehnt später beobachteten Stöcker *et al.* über Immunfluoreszenz Autoantikörper gegen exokrine Bestandteile des Pankreas und zeigten, dass mehr als 30% der MC-Patienten diese Autoantikörper aufweisen (Stöcker *et al.*, 1984). 1991 wurde als mögliches Antigen ein Trypsin-sensitiver Proteinkomplex beschrieben (Seibold *et al.*, 1991). Später wurden mehrere Untereinheiten eines mehr als 800 kDa großen Komplexes diskutiert (Fricke *et al.*, 1999). Die Zielantigene blieben jedoch lange Zeit unbekannt. Eine Dekade später konnten CUZD1 (Komorowski *et al.*, 2013) und GP2 (Roggenbuck *et al.*, 2009; Stöcker *et al.*, 2009) als Antigene des exokrinen Pankreas im diagnostischen Umfeld von CED identifiziert werden.

CUZD1 (bzw. UO-44) ist ein glykosyliertes membranassoziertes Protein mit einem Molekulargewicht von 68 kDa (607 Aminosäuren) und einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) bei pH 6. Sein Gen mit neun Exons ist auf Chromosom 10q26.13 lokalisiert (Liaskos *et al.*, 2013). Die Expression von CUZD1 ist nicht ausschließlich auf Pankreas beschränkt. Es werden auch Uterus und Ovarien in der Literatur beschrieben (Huynh *et al.*, 2001). CUZD1 beinhaltet unterschiedliche Domänen-Profile (Abb. 2-7): CUB- und *zona pellucida-like domains* (ZP). Die zwei N-terminalen CUB-Motive (CUB für Komplementfaktoren C1r/C1s, Uegf und Bmp1 (Leytus *et al.*, 1986), in denen das Motiv erstmals beschrieben wurde) umfassen jeweils ca. 110 Aminosäuren. Sie sind hochkonserviert und finden sich in der Natur in zahlreichen extrazellulären und membranassozierten Proteinen mit Funktionen wie Komplementaktivierung und Signaltransduktion wieder (Bork and Beckmann, 1993). Das C-terminale ZP-Motiv umfasst etwa 240 Aminosäuren. Charakteristisch sind acht konservierte Cysteinreste. Diese stabilisieren die Struktur der Domänen (überwiegend β -Faltblatt-Struktur) und ermöglichen intermolekulare Interaktionen (Jovine *et al.*, 2005). So wird u. a. auch eine Polymerisation von Proteinen mit ZP-Motiven zu Filamenten oder Matrices vermutet (Killick *et al.*, 1995). Neben den beiden Hauptdomänen gibt es zahlreiche hypothetische Glykosylierungsstellen für N- und O-Glykosylierungen. Interessanterweise findet sich am N-Terminus (Aminosäuren 1-17) ein konserviertes Motiv für eine Bindung von bzw. an Lipiden.

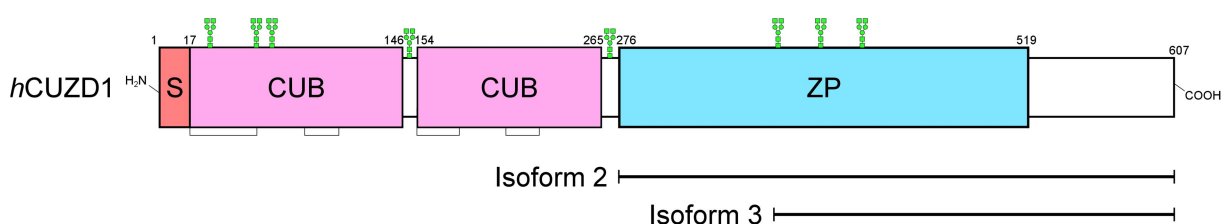


Abb. 2-7 Domänenstruktur von humanem CUZD1 (schematisch)

CUZD1 enthält mehrere Proteindomänen. Am N-Terminus befindet sich eine Bindestelle für Lipide, gefolgt von zwei CUB-Domänen und einer ZP-Domäne. Von CUZD1 wurden mehrere Isoformen beschrieben (Leong *et al.*, 2004): neben der kanonischen Isoform mit 607 Aminosäuren kommt eine verkürzte Isoform ohne CUB-Domänen (Isoform 2, 326 Aminosäuren) und eine Variante mit ausschließlich nur verkürzter ZP-Domäne (Isoform 3, 241 Aminosäuren) vor. S: Signalsequenz (Lipid-Bindestelle), CUB: CUB-Domäne (benannt nach C1r/C1s, Uegf und Bmp1), ZP: *zona pellucida-like domain*, : potentielle N-Glykosylierungsstellen, Zahlen geben Aminosäurenpositionen in der Proteinsequenz an, : Cystin, Profiluntersuchung durchgeführt mit MyHits (Pagni *et al.*, 2007).

Dieses Motiv wird für gewöhnlich in prokaryotischen Membranproteinen gefunden (*Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site profile*) (Hayashi and Wu, 1990), gibt jedoch Hinweise auf eine membranassoziierte Lokalisierung vom pankreatischen Antigen. Von CUZD1 werden drei Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen (Leong *et al.*, 2004): Isoform 1 (UniProt-ID Q86UP6-1) (UniProt, 2015) als kanonische Isoform mit den bereits angesprochenen 607 Aminosäuren (Abb. 2-7); Isoform 2 (UniProt-ID Q86UP6-2) fehlen in Bezug zur Isoform 1 Aminosäuren 1-281 (entspricht den CUB-Domänen); Isoform 3 fehlen Aminosäuren 1-366 (zusätzlich zu beiden CUB-Domänen sind Teile der ZP-Domäne deletiert). Die Funktion von CUZD1 ist noch unbekannt. In der wissenschaftlichen Diskussion finden sich Hinweise auf eine Beteiligung in Zellwachstums- und Proliferationsprozessen, da große Homologien zum Tumorsuppressor DMBT1 bestehen (Lualdi *et al.*, 2000) und das Protein im Kontext von Ovarialkarzinomen erhöht exprimiert im Gewebe und im Serum vorliegt (Leung *et al.*, 2012). CUB- und ZP-Domänen legen weitere unbekannte Interaktionen nahe.

GP2 (oder ZAP75) ist mit bis zu 40% das Hauptprotein der zymogenen Granula in pankreatischen Azini (Gómez-Lázaro *et al.*, 2010). Das Protein hat eine Molekülmasse von ca. 60 kDa (537 Aminosäuren), einen theoretischen pI bei pH 5 und ist stark glykosyliert. Das Proteinprofil (Abb. 2-8) zeigt analog zum CUZD1 eine N-terminale Bindungsstelle von bzw. an Lipide und eine ZP-Domäne.

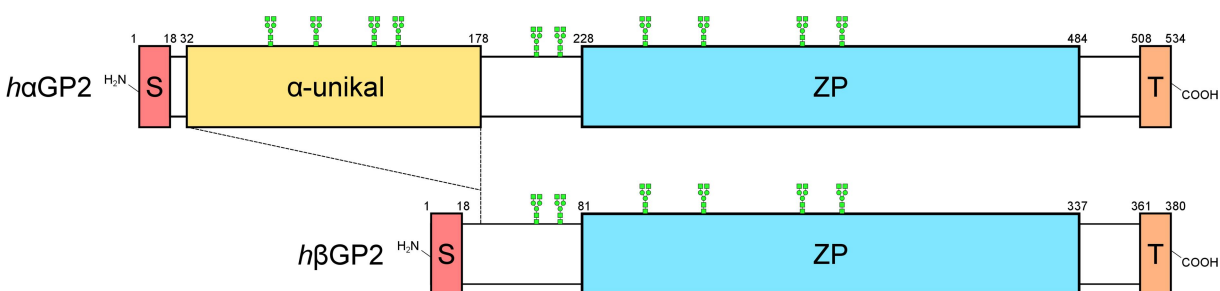


Abb. 2-8 Domänenstruktur von humanem GP2 (schematisch modifiziert nach Fukuoka, 2000)

Es sind mehrere Isoformen von GP2 beschrieben (Fukuoka, 2000). α GP2 entspricht dem Volllängenprotein. Die verkürzte β GP2 – Isoform entsteht durch alternatives Spleißen. Weitere Isoformen unterscheiden sich nur marginal vom α - bzw. β -Isomer. Alle GP2-Isoformen sind Multidomänen-Proteine, die neben einer N-terminalen Signalsequenz eine ZP- und eine C-terminale Transmembrandomäne aufweisen. S: Signalsequenz (Lipid-Bindestelle), ZP: *zona pellucida-like domain*, T: Transmembrandomäne (GPI-Anker), : potentielle N-Glykosylierungsstellen, Zahlen geben Aminosäurenpositionen in der Proteinsequenz an, Profiluntersuchung durchgeführt mit MyHits.

Am C-Terminus befindet sich ein Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) (Fukuoka, 2000). GPI-Anker werden post-translational im endoplasmatischen Retikulum am Proteingerüst kovalent verknüpft. Über dieses Strukturmerkmal werden Proteine an Lipid-Rafts der Plasmamembran lokalisiert (Fujita and Kinoshita, 2012). Phospholipasen spalten diese Bindung enzymatisch. GP2 wird über den GPI-Anker an der Granula-Membran des Pankreas gebunden und gespeichert. Nach hormonaler- oder neurologischer Stimulation (z. B. Nahrungsaufnahme) erfolgt die Freisetzung von GP2 (enzymatisch über Phospholipasen und pH-Änderung) mit anderen Zymogenen in den Pankreassaft. Über die ZP-Domäne erfolgt eine Zusammenlagerung mehrerer GP2-Moleküle zu löslichen Proteinkomplexen (Rindler and Hoops, 1990). Über den *Ductus pancreaticus* wird das Verdauungssekret in den Duodenum geleitet. Es wurden mehrere Isoformen von GP2 beschrieben: Isoform 1 (UniProt-ID P55259-1) umfasst als kanonischer Typus 537 Aminosäuren. Isoform Beta (UniProt-ID P55259-2) fehlen in Bezug zur Isoform 1 Aminosäuren 32-178 (Abb. 2-8). Diese Isoform scheint im Pankreas dominant vorzuliegen (Fukuoka, 2000). Die Isoform Alpha (UniProt-ID P55259-3) unterscheidet sich in nur drei Aminosäuren zur kanonischen Isoform 1. Isoform 2 (UniProt-ID P55259-4) unterscheiden sich in drei Aminosäuren zur Beta-Isoform.

Die Funktion von GP2 ist noch weitgehend unbekannt. Es konnte eine Interaktion mit *E. coli* Typ 1 Fimbrien gezeigt werden (Yu and Lowe, 2009). Des Weiteren wurde GP2 auf M-Zellen (spezialisierte Epithelzellen in der Darmwand, die für die Transzytose von Antigenen aus dem Darmlumen verantwortlich sind) nachgewiesen und eine Rolle in der mukosalen Immunantwort postuliert (Hase *et al.*, 2009).

Vor allem MC-Patienten zeigen serologisch Autoantikörper gegen CUZD1 und GP2 (Komorowski *et al.*, 2013). Damit sind diese pankreatischen Antigene (PAg) potentielle klinische Werkzeuge, die wichtige differential-diagnostische Hinweise liefern können. Die Zusammenhänge zur Pathogenese von MC sind bisher jedoch nicht verstanden.

2.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Durch den chronischen Verlauf von CED, die hohen Prävalenzen vor allem auch in jungen Lebensjahren (Prävalenz bei Kindern bis zu 0,5%) (Bernstein *et al.*, 2006) und die Notwendigkeit komplexer, langjähriger Therapien stellen diese Erkrankungen nicht nur relevante medizinische, sondern ebenso volkswirtschaftliche Herausforderungen dar (Burisch *et al.*, 2013). In der Diagnostik sind Endoskopien und andere invasive Methoden der Goldstandard, die den Leidensdruck der Patienten weiter erhöhen können. Allerdings lassen sich trotz allem noch immer ungefähr 10-15% der CED-Fälle nicht eindeutig zwischen CU und MC differenzieren (Geboes *et al.*, 2008). Eine zielgerichtete Therapie ist somit nur erschwert möglich. Verlässliche serologische Marker zur Diagnoseerstellung und zur Beurteilung der Therapieerfolge fehlen.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung von Autoimmunreaktionen im Kontext von CED. Fokus wird dabei auch auf die biochemische Charakterisierung der pankreatischen Autoantigene GP2 und CUZD1 gelegt sowie ihre Rolle als differentielle serologische Markerproteine bei CED diskutiert.

3 Materialien

Im folgenden Abschnitt werden die genutzten Materialien tabellarisch aufgeführt.

3.1 Chemikalien

Tabelle 3-1: Reinstoffe und Stoffgemische

Substanzen	Hersteller / Distributor
Acetonitril	Merck
Ammoniumsulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck
Dithiothreitol, DTT	Gerbu Biotechnik
Eisessig, CH_3COOH	Merck
Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Merck
Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid, EDC	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Merck
GSV 1 embedding media	Electron Microscopy Sciences
Glycerol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Merck
Harnstoff, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	Gerbu Biotechnik
HEPES	Gerbu Biotechnik
Imidazol, $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$	Merck
Kupfer(II)-sulfat-pentahydrat, CuSO_4	Merck
Methanol, CH_3OH	Merck
Methylcellulose	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (Hexahydrat), MgCl_2	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumcarbonat-Decahydrat, Na_2CO_3	Merck
Natriumchlorid, NaCl	Merck
Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4	Merck

Materialien

Natriumhydroxid, NaOH	Merck
Natrium(meta)periodat, NaIO ₄	Sigma-Aldrich
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Sigma-Aldrich
PBS	Euroimmun
PBS-T, Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween 20	Euroimmun
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich
Phenolrot	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
PIPES	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
PVP (Polyvinylpyrrolidon)	Sigma-Aldrich
Saccharose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Merck
Trichlorethanol, C ₂ H ₃ Cl ₃ O	Th. Geyer
Tris-b, C ₄ H ₁₁ NO ₃	Gerbu Biotechnik
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Uranylacetat, C ₄ H ₆ O ₆ U	Sigma-Aldrich

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-2: Chromatographie

Materialien	Hersteller / Distributor
Bio-Scale CHT Type I Mini Cartidges	Bio-Rad
Capto adhere, Säulenmaterial	GE Healthcare Life Sciences
CHT Ceramic Hydroxyapatite	Bio-Rad
HiTrap Desalting Säulen	GE Healthcare Life Sciences
HiTrap Q FF Säulen	GE Healthcare Life Sciences
Leersäulen (PP) mit PE-Filterelement	Macherey-Nagel
Minisart GF	Sartorius

Nickel Rapid Run, Säulenmaterial	ABT
Octyl Sepharose Fast Flow, Säulenmaterial	GE Healthcare Life Sciences
SP-Sepharose Fast Flow, Säulenmaterial	GE Healthcare Life Sciences
Spectra/Por Dialysemembran	Spectrum Medical Industries
Q-Sepharose Fast Flow, Säulenmaterial	GE Healthcare Life Sciences

Tabelle 3-3: Proteinanalytik und -assays

Substanzen	Hersteller / Distributor
Albuminazid	Euroimmun
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich
Blot Waschpuffer (WaPu), Blot Waschpuffer Plus (WaPu ⁺)	Euroimmun
Blot Substrat (BCIP/NBT)	Euroimmun
Bovines Serumalbumin (BSA)-Blocking-/Probenpuffer	Euroimmun
Carboxylierte Metal- <i>Beads</i>	TurboBeads
Casein Blocking-Puffer	Euroimmun
Casein Probenpuffer	Euroimmun
Color Protein Standard Broad Range	New England Biolabs
Coomassie-Brilliant-Blau R-250	Th. Geyer
ELISA PBS Beschichtungspuffer	Euroimmun
ELISA Waschpuffer	Euroimmun
Marker Spectra Multicolor	Fermentas
Nitrocellulosemembran	Whatman
NaCl 0,9% in H ₂ O	Fresenius-Kabi
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE LDS Probenpuffer, 4-fach Konzentrat	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE MES SDS Laufpuffer, 20-fach Konzentrat	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE Transfer Puffer, 20-fach Konzentrat	Thermo Fisher Scientific

Materialien

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
TMB-Substrat	Euroimmun

Tabelle 3-4: Proteine und Enzyme

Substanzen	Hersteller / Distributor
Benzonase	Merck
<i>Datura stramonium</i> Lectin, biotinylated (DSL)	Vector Laboratories
Factor Xa	New England Biolabs
<i>Galanthus nival</i> lectin, biotinylated (GNL)	Vector Laboratories
<i>Lens culinaris</i> agglutinin, biotinylated (LCA)	Vector Laboratories
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomato) Lectin, biotinylated (LEL)	Vector Laboratories
Marker Spectra Multicolor	Fermentas
N-Glycosidase F (PNGase F)	Sigma-Aldrich
<i>Phaseolus vulgaris</i> leucoagglutinin, biotinylated (PHA-L)	Vector Laboratories
<i>Pisum sativum</i> agglutinin, biotinylated (PSA)	Vector Laboratories
Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Trypsin	Promega

Tabelle 3-5: sonstige Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller / Distributor
96-Well ELISA Strip Plates	Greiner Bio-One
MTP AnchorChip 384 T F	Bruker
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml	Sarstedt
MaxiSorp-Mikrotiterplatten	Nunc
Vivaspin 20, 10.000 MWCO	VWR
Kunststoff-Messpipetten	Roth

3.3 Puffer und Stoffgemische

Tabelle 3-6: Puffer und Stoffgemische in der Chromatographie

Puffer	Zusammensetzung
AU	50 mM NaAcetat pH 4,5 8 M Harnstoff
PBS1000U	50 mM NaPhosphat pH 7,4 8 M Harnstoff 1.000 mM NaCl
HN	50 mM HEPES pH 7,0 50 mM NaCl
HN2000	50 mM HEPES pH 7,0 2 M NaCl
T-Eq	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mg/ml Phenolrot
TE-IEx	20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 2,5 mM EDTA 1 mM PMSF
TI500-Eq	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 500 mM Imidazol 10 mg/ml Phenolrot
TN	25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM NaCl
TN300-IEx	20 mM Tris-HCl (pH 8,5) 300 mM NaCl
TN1000-IEx	20 mM Tris-HCl (pH 8,5) 1 M NaCl
TNI150	5 mM Tris-HCl (pH 8,0) 300 mM NaCl 150 mM Imidazol
TNI20	5 mM Tris-HCl (pH 8,0) 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
TNI20MT (10x)	55 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1,8 M NaCl 220 mM Imidazol 550 mM MgCl ₂ 1% Triton X-100
TNUI-300	10 mM Tris-HCl pH 8,0 300 mM NaCl 8 M Harnstoff 300 mM Imidazol
TNUGI-20	10 mM Tris-HCl pH 8,0 300 mM NaCl 8 M Harnstoff 10% (w/v) Glycerol 20 mM Imidazol 10 mg/L Phenolrot

Materialien

Tabelle 3-7: Puffer und Stoffgemische in der Elektronenmikroskopie

Puffer	Zusammensetzung
Gelantineeinbettung, Fixierung	10% (w/v) Gelatine und PBS (Erwärmung)
FCS, Block	10% (w/v) FCS in PBS
Methylcellulose	2% (w/v) Methylcellulose in H ₂ O
PIPES-Stammlösung	0,4 M PIPES in H ₂ O (zum Lösen Zugabe 1 M NaOH)
PFA-Stammlösung	10% (w/v) PFA (H ₂ O auf 60°C erhitzt, Zugabe PFA, zum Lösen Zugabe 1 M NaOH)
PFA/PIPES, Fixierungspuffer	PIPES- und PFA-Stamm 1:1 mischen, aliquitert bei -20°C gelagert
PVP-Stamm	0,22 M Na ₂ CO ₃ 9 M PVP
PVP-Saccharose	PVP- und Saccharose-Stamm 1:3,5 mischen
Saccharose-Stamm	2,3 M Saccharose in PBS
Uranylacetat-Stamm	4% (w/v) Uranylacetat in H ₂ O, Lagerung 4°C / dunkel

Tabelle 3-8: sonstige Puffer und Stoffgemische

Puffer	Zusammensetzung
BCA-Arbeitslösung	10 mL Bicinchoninic Acid Solution 200 µl BCA Kupfer-Lösung
BCA BSA-Standards	500, 250, 125, 63, 31 µg/ml BSA 0,9% (w/v) NaCl
BCA Kupfer-Lösung	4% (w/v) CuSO ₄
Coomassie Entfärbelösung	10% (v/v) Eisessig 40% (v/v) Methanol
Coomassie Färbelösung	10% (v/v) Eisessig 40% (v/v) Methanol 400 mg/l Coomassie R250
Fäzes Extraktionspuffer	20 mM Natriumphosphat, pH 7,4 650 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM PMSF
Ponceau S Entfärbelösung	7% (v/v) Eisessig

Ponceau S Färbelösung	0,2% (w/v) Ponceau S 7,0% (v/v) Eisessig
MALDI-Extraktionslösung	5 mM n-Octylglucopyranosid 50% (v/v) Acetonitril 0,3% (v/v) Trifluoressigsäure
Neutralisationslösung	50 mM Tris
NHS Blockierungspuffer	500 mM Ethanolamin, pH 8,3 500 mM NaCl
TCE Färbelösung	20% (v/v) Ethanol 5% (v/v) TCE

3.4 Antikörper

Tabelle 3-9: Primärantikörper und Seren

Antikörper	Hersteller / Distributor
Anti His-Tag (Maus), monoklonaler Antikörper (mAk)	Merck, Sigma-Aldrich
Anti Calprotectin, mAk	Pierce
Anti-GP2, SA2679, pAk	Euroimmun (nur interne Nutzung)
Anti-GP2/CUZD1, SA4108, pAk	Euroimmun (nur interne Nutzung)
Anti CUZD1, TL2A11B9, mAk	Euroimmun (nur interne Nutzung)
Anti-GP2, TL4E10D7, mAk	Euroimmun (nur interne Nutzung)
Anti-Lactoferrin, pAk	Dianova
Anti-Lactoferrin, WG4B11A1-Eluat, mAk	Euroimmun (nur interne Nutzung)

Tabelle 3-10: Reporter-Antikörper

Antikörperkonjugat	Hersteller / Distributor
Anti-Human IgA-AP	Euroimmun
Anti-Human IgA-FITC	Euroimmun
Anti-Human IgA1-FITC	Biozol
Anti-Human IgA2-FITC	Biozol
Anti-Human IgA-POD	Euroimmun

Materialien

Anti-Human IgG-AP	Euroimmun
Anti-Human IgG-FITC	Euroimmun
Anti-Human IgG1-FITC	Sigma-Aldrich
Anti-Human IgG2-FITC	Sigma-Aldrich
Anti-Human IgG3-FITC	Sigma-Aldrich
Anti-Human IgG4-FITC	Sigma-Aldrich
Anti-Human IgG-POD	Euroimmun
Anti Kaninchen IgG-AP	Sigma-Aldrich
Anti Kaninchen IgG-POD	Sigma-Aldrich
Anti Maus IgG-AP	Euroimmun
Anti Maus IgG-POD	Dianova

3.5 Laborgeräte

Tabelle 3-11: Geräte, Chromatographie und Fraktionierung

Geräte	Hersteller / Distributor
Äkta pure 25, 150	GE Healthcare Life Sciences
BioLogic LP Chromatographieranlage	Bio-Rad
BioLogic DuoFlow Chromatographieranlage	Bio-Rad
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Dispergier-/Homogenisiersystem MICCRA D-9	Roth
EmulsiFlex-C3	Avestin
Fraktionssammler BioFrac™	Bio-Rad
Fraktionssammler F9-C	GE Healthcare Life Sciences
HiLoad 26/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare Life Sciences
HiScale 16/20, 26/20 Leersäulen	GE Healthcare Life Sciences
Megafuge 40R	Heraeus
Membranpumpe N811 KT.18	Hassa
Rotilabo-Mikropistille für 2 ml Gefäße	Roth

Ultrazentrifuge Optima L-90 K	Beckman Coulter Life Sciences
Vacuum-Manifold	Euroimmun (nicht im Verkauf)
Vornado Vortex Schüttler	Kisker Biotech
XK 16/20, 26/20 Leersäulen	GE Healthcare Life Sciences
Zeiss Axioskop 2	Zeiss
Zentrifuge Avanti J-E	Beckman Coulter Life Sciences
Zentrifuge Hettich Rotina	Hettich

Tabelle 3-12: Geräte, Proteinanalytik

Geräte	Hersteller / Distributor
Autoflex III	Bruker
Geldoc XR+	BioRad
Intelli-Mixer RM-2L	Elmi
PowerPac HC 300 W	BioRad
Power Supply EV265	Consort
TE 22 Mighty Small Transphor Tank Transfer Unit	GE Healthcare Life Sciences
WT15 Wipptisch	Biometra
XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 3-13: sonstige Geräte

Geräte	Hersteller / Distributor
Axioskop 2	Carl Zeiss
Brutschrank B6	Heraeus
Columbus Pro Washer	Tecan
Sunrise, Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan

Für die Elektronenmikroskopie wurde das Equipment der AG König, Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck genutzt.

3.6 Software

Tabelle 3-14: Softwareanwendungen

Software	Hersteller / Entwickler / Distributor
ChemSketch V12.0	Advanced Chemistry Development, Inc.
Gimp 2.8	GNOME Foundation
ImageJ V1.50i	National Institutes of Health, USA
Inkscape V0.91	Free Software Foundation, Inc.
MS Office V2010	Microsoft Corporation
PyMOL V1.2	DeLano Scientific LLC.
SigmaPlot V12.5	Systat Software, Inc.
yEd Graph Editor	yWorks

3.7 Webbasierte Dienste

Tabelle 3-15: Softwareanwendungen

Software	Entwickler
Lalign	(Huang and Miller, 1991)
MyHits	(Pagni <i>et al.</i> , 2007)
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	U.S. National Library of Medicine
NetNGlyc 1.0 Server	(Gupta <i>et al.</i> , 2004)
NetOGlyc 4.0 Server	(Steentoft <i>et al.</i> , 2013)
PRALINE multiple sequence alignment	(Heringa, 1999)
ProtParam	(Gasteiger <i>et al.</i> , 2005)
UniProt	(UniProt, 2015)

4 Methoden

Es wurden diverse immunologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt. Der Fokus lag vor allem auf Methoden der Immunfluoreszenz sowie der Darstellung von rekombinant-produzierten Zielproteinen. In weiterführenden Experimenten wurden sowohl biochemische Eigenschaften als auch Interaktionen dieser Proteine untersucht. Studien- und Patientendaten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sina, Gastroenterologie, Universität zu Lübeck, erhoben. Versuche unter Nutzung der Elektronenmikroskopie wurden gemeinsam mit der AG Prof. Dr. König, Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck bearbeitet. Biochemische Experimente fanden am Institut für experimentelle Immunologie der Euroimmun AG statt.

4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur qualitativen oder semi-quantitativen *in vitro* Bestimmung von AAK in humanen Seren und prozessierten Stuhlproben wurde der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) durchgeführt. In der IIFT wurden Gewebe oder Antigen-produzierende Zellen (*Recombinant Cell IFT*, RC-IFT) auf Objektträger (OT) immobilisiert. Proben (z. B. Patientenseren) wurden anschließend auf diesen Substraten inkubiert. Sind spezifische (Auto-) Antikörper vorhanden bilden sich Antigen-Antikörperkomplexe, die mit Hilfe eines Chromophor-konjugierten Reporterantikörpers detektiert werden konnten (Abb. 4-1). Als Chromophore wurden vor allem Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Cyanin 3 (Cy3) genutzt. Bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge bei 519 nm zeigte FITC im Fluoreszenzmikroskop grüne Signale, Cy3 bei 550 nm Anregung und 570 nm Emission rote Fluoreszenzen. Überlagerung von FITC- und Cy3 – Signalen in Kolokalisationsexperimenten ergeben eine gelbe Färbung.

Für die Durchführung wurde die TITERPLANE™-Technologie der Euroimmun AG genutzt (Stöcker and Scriba, 1984) (Abb. 4-2). Chipbasierte Objektträger mit verschiedenen Substraten wie z. B. Pankreasgewebe, *S. cerevisiae* oder GP2-

produzierende humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) wurden ebenfalls von Euroimmun bereitgestellt. Diese Substrate wurden mit 25-30 μ l verdünntem Probenmaterial (1:10 bis 1:10.000) je Reaktionsfeld für 30 min bei RT inkubiert.

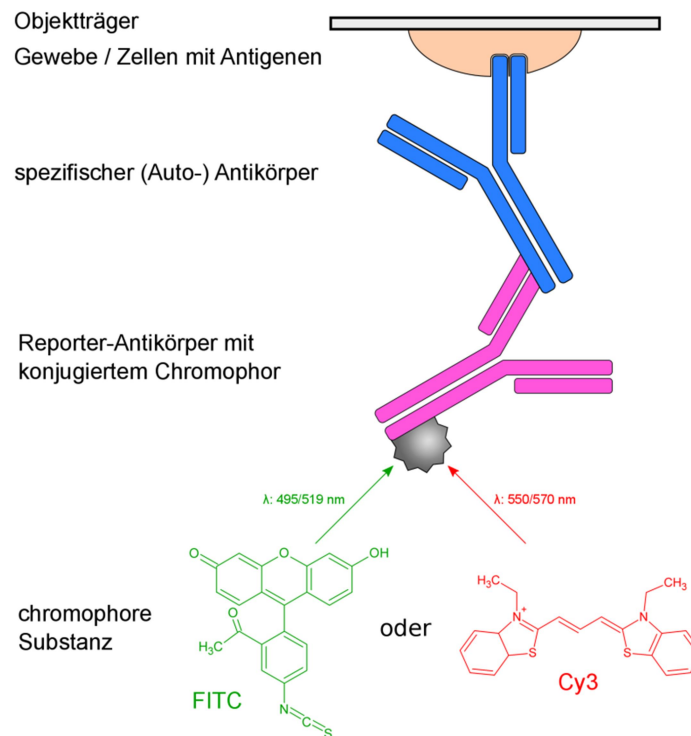


Abb. 4-1 Schema IIFT

Auf einem Objektträger sind Antigen-produzierende Zellen oder Gewebeschnitte immobilisiert, die mit Seren von Patienten oder Blutspendern (BS) inkubiert werden. Als Reporter wird ein speziesspezifischer Sekundärantikörper verwendet, der mit einem Chromophor konjugiert ist. Die Bewertung der Proben erfolgt mikroskopisch. Chromophore: FITC (Imhof *et al.*, 1999) mit einer Exzitationswellenlänge von $\lambda=495$ nm und Emission von $\lambda=519$ nm, Cy3 (Choi *et al.*, 2011) mit einer Exzitation von $\lambda=550$ nm und Emission von $\lambda=570$ nm.

Ungebundenes Material wurde in einem anschließenden Waschschriff mit PBS-T entfernt. Zur indirekten Detektion der AAK folgte die Inkubation (30 min, RT) mit einem Reporterantikörper. Nach einem zusätzlichen Waschschriff und dem Eindecken des OT erfolgte die Signalbewertung im Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2, Carl Zeiss). Studiendaten wurden von mindestens zwei weiteren Kollegen unabhängig voneinander bewertet. Diskrepante Seren wurden wiederholt bearbeitet und bewertet.

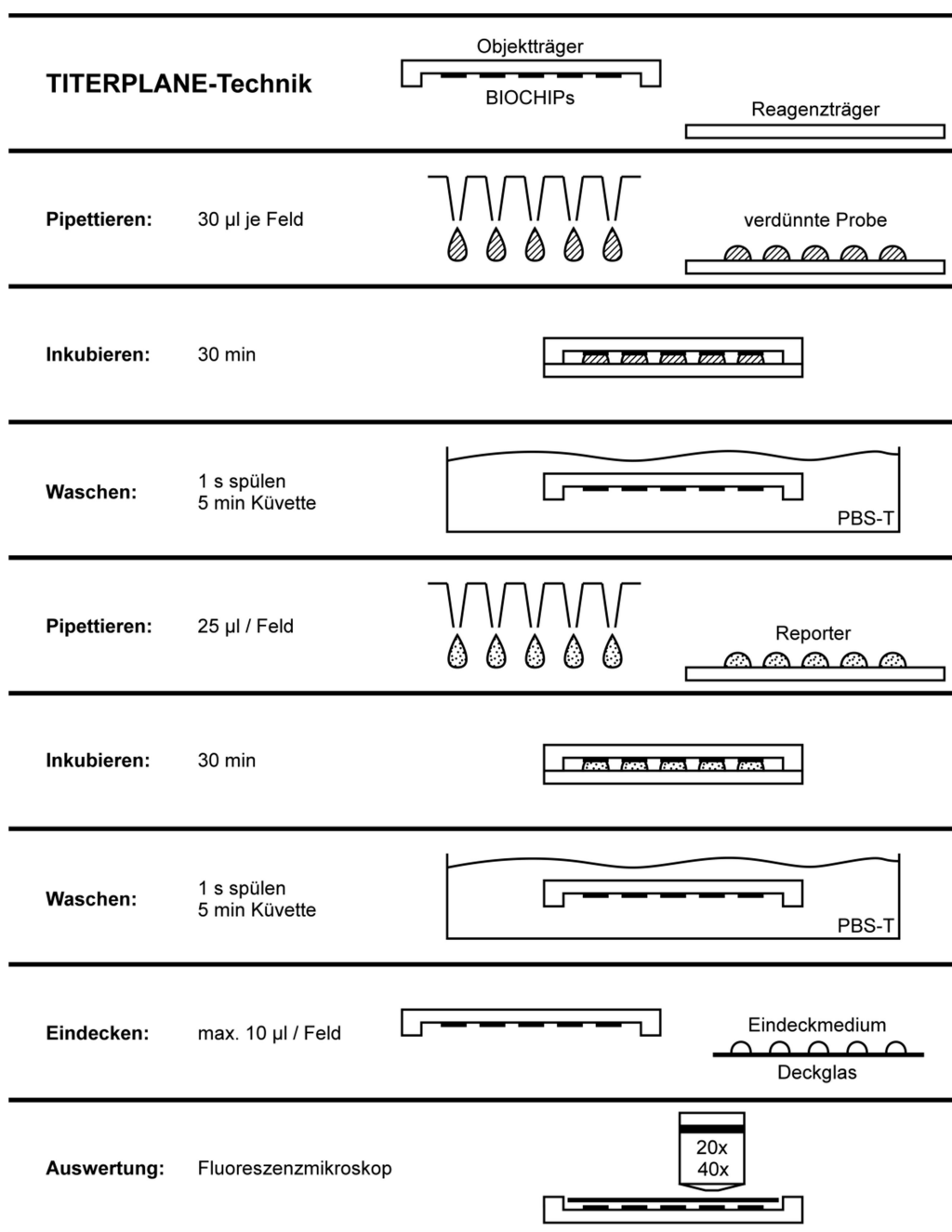


Abb. 4-2 TITERPLANE™-Technologie der Fa. Euroimmun (Stöcker and Scriba, 1984)

Zu untersuchende (Serum-) Proben werden auf bereitgestellte Objektträger inkubiert. Ungebundenes Material wird in einem anschließenden Waschschrift entfernt. Nach Inkubation mit dem Reporter-Antikörper werden die Signale mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. PBS-T: Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20.

Kompetitive IIFT nutzt im Probeninkubationsschritt ungebundenes rekombinantes Protein. Damit wird eine Konkurrenz zum immobilisierten Antigen auf dem OT um verfügbare AAK im Probenmaterial erzeugt. Aus der resultierenden Signalsenkung lassen sich Rückschlüsse auf z. B. im Gewebe vorhandene Antigene und deren Lokalisierung ziehen.

4.2 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest

Im Gegensatz zur IIFT werden beim Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) Proteine oder ganze Lysate auf die Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Antigen-Antikörperreaktionen werden wie in der IIFT über Chromogene nachgewiesen, wenngleich vor allem kolorimetrische Reportersysteme über enzymgenerierte Farbsignale im UV/Vis-Spektrum genutzt werden.

Als Chromogen kommt 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zum Einsatz. TMB ist ein aromatisches Amin (Absorptionsmaxima bei 210 nm und 285 nm Wellenlänge). Dieses Amin wird durch einen Peroxidase-(POD) konjugierten Reporterantikörper und unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid unvollständig oxidiert (Abb. 4-3). Kationisches- und radikalisches Zwischenprodukt liegen im Gleichgewicht vor und haben Absorptionsmaxima bei 370 nm und 652 nm Wellenlänge (Josephy *et al.*, 1982). Eine vollständige Oxidation von TMB wird durch Zugabe von Schwefelsäure (0,1 M; Stopplösung) erreicht. Es bildet sich ein stabiles Diimin-Derivat mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm.

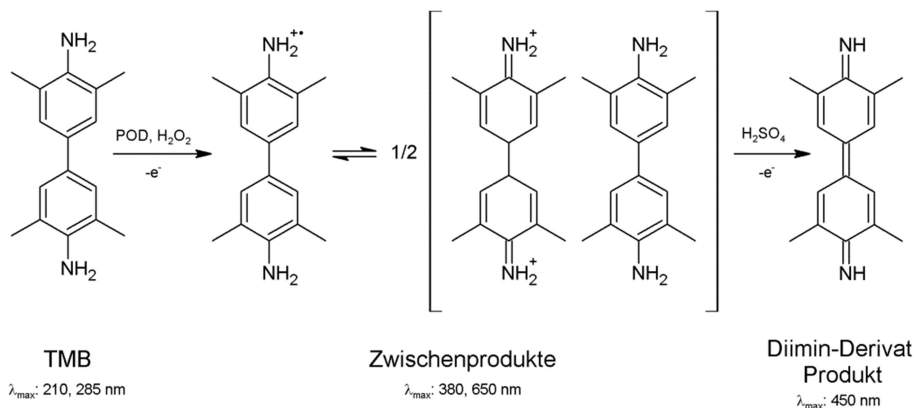


Abb. 4-3 TMB-Oxidation, modifiziert nach Josephy, 1982

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) enzymatisch durch Peroxidase (POD) unvollständig oxidiert (Josephy *et al.*, 1982). Durch Zugabe von Schwefelsäure werden die im Gleichgewicht vorliegenden kationischen bzw. radikalischen Zwischenprodukte zum stabilen Diimin-Derivat oxidiert. Das Produkt kann im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert werden.

Verschiedene ELISA-Methoden wurden eingesetzt. Im indirekten ELISA (Abb. 4-4, A) wurde jeweils 100 μl Antigen in verschiedenen Verdünnungsstufen für 2 h bei RT bzw. 12 h bei 4°C auf die Oberfläche einer Mikrotiterplatte (MaxiSorp®) beschichtet und anschließend für 2 h bei RT mit 0,5% (w/v) BSA bzw. 0,1% (w/v) Casein blockiert (siehe Tabelle 4-1). Nach einem Waschschrift mit PBS-T folgte die

Inkubation mit dem Zielantikörper (monoklonale Antikörper oder polyklonale Seren, Inkubation 2 h / RT). Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Detektion über einen POD-konjugierten und speziesspezifischen Sekundärantikörper. Der so entstandene Antigen-Antikörperkomplex wurde mit TMB-Substrat für 15 min bei RT (dunkel) inkubiert. Die Reaktion wurde im letzten Schritt mit 0,1 M Schwefelsäure abgestoppt und die Platte bei 450 nm Wellenlänge im Spektralphotometer gemessen. Im Sandwich-ELISA (Abb. 4-4, B) wurde ein zumeist monoklonaler und Zielprotein-spezifischer Antikörper auf die Mikrotiterplatte beschichtet (Beschichtungsdauer analog zum indirekten ELISA, siehe Tabelle 4-1). Nach einem Blockierungs- und Waschschrift folgte die Inkubation mit Antigen-haltiger Suspension. Die Detektion und Signalgenerierung erfolgt analog zum indirekten ELISA über einen POD-konjugierten Sekundärantikörper sowie TMB-Inkubation mit kolorimetrischer Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm. Der Vorteil eines Sandwich-ELISA ist, dass ein Antigen mit geringem Anreicherungsgrad in einer Suspension über den beschichteten Fängerantikörper nachgewiesen werden kann. Im indirekten ELISA ist dies durch Oberflächenlimitierung der einzelnen Reaktionsräume auf der Mikrotiterplatte nicht ohne weiteres möglich.

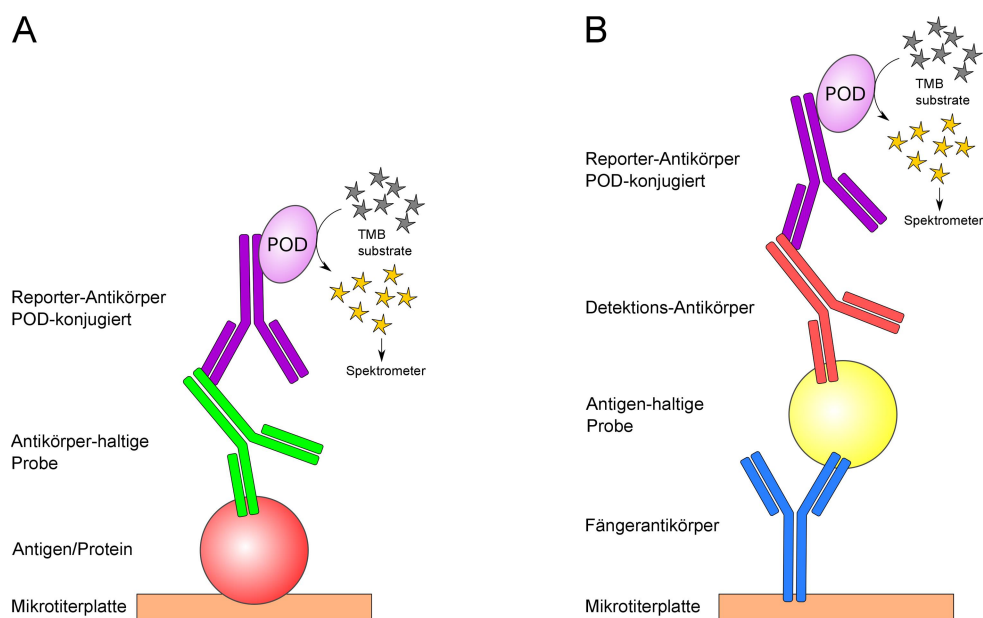


Abb. 4-4 ELISA-Methoden

Im indirekten ELISA (A) wird mit Hilfe eines beschichteten Antigens nach spezifischen Antikörpern in einer Probe gesucht. Signale werden über einen POD-konjugierten Reporterantikörper und TMB-Substratumsatz spektrometrisch ermittelt. Im Sandwich-ELISA (B) werden Antigen-haltige Suspensionen untersucht. Über einen immobilisierten Fängerantikörper werden spezifisch Proteine gebunden und über einen Detektions- und Reporterantikörper nachgewiesen. Auch hier erfolgt die Signalgenerierung über einen kolorimetrischen Mechanismus.

Tabelle 4-1 Inkubationsschema ELISA

Inkubationsschritt	indirekte ELISA	Sandwich-ELISA
Beschichtung	MaxiSorp® Mikrotiterplatte, 100 µl Antigenlösung verdünnt in Beschichtungspuffer (PBS), Inkubation: 2h / RT bzw. 12 h / 4°C	MaxiSorp® Mikrotiterplatte, 100 µl Antikörperlösung verdünnt in Beschichtungspuffer (PBS), Inkubation: 2h / RT bzw. 12 h / 4°C
Block	0,5% BSA- bzw. 0,1% Casein-Puffer 200 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 1h / RT	0,5% BSA- bzw. 0,1% Casein-Puffer 200 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 1h / RT
Waschen	ELISA-Waschpuffer (PBS), TECAN Columbus Pro Washer, drei Durchläufe	ELISA-Waschpuffer (PBS), TECAN Columbus Pro Washer, drei Durchläufe
Inkubation	Primärer Antikörper oder Serum, 100 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 30 min / RT	Antigen-haltige Probe, Verdünnung, 100 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 2 h / RT
Waschen	siehe oben	siehe oben
Inkubation	-	Primärer Antikörper oder Serum, 100 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 30 min / RT
Waschen	-	siehe oben
Detektion	Sekundärer Antikörper (POD- konjugiert), 100 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 30 min / RT	Sekundärer Antikörper (POD- konjugiert), 100 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 30 min / RT
Waschen	siehe oben	siehe oben
Substratreaktion	TMB-Substrat (gebrauchsfertig), 100 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 15 min / RT / dunkel	TMB-Substrat (gebrauchsfertig), 100 µl je Reaktionsfeld, Inkubation: 15 min / RT / dunkel
Reaktionsstopp	Stopplösung (0,1 M H ₂ SO ₄ , gebrauchsfertig), 100 µl je Reaktionsfeld	Stopplösung (0,1 M H ₂ SO ₄ , gebrauchsfertig), 100 µl je Reaktionsfeld
Signalausgabe	Spektralphotometer, λ=450 nm, Einheit: Absorption Units (AU)	Spektralphotometer, λ=450 nm Einheit: AU

4.3 Elektronenmikroskopie

Für Lokalisierungs- und Interaktionsexperimente wurde die Elektronenmikroskopie (EM) genutzt. Die Vorbereitung und Durchführung der Versuche fand in Kooperation mit der Universität zu Lübeck, AG Sina und AG König statt. Für die Experimente wurde die Infrastruktur der AG König genutzt.

Elektronenmikroskope werden immer dann eingesetzt, wenn besonders hohe Auflösungen erreicht werden sollen. So hat das menschliche Auge eine Auflösung von ca. 0,1-0,2 mm, die Lichtmikroskopie ca. 300 nm und die Elektronenmikroskopie bis zu 0,1 nm (Pennycook *et al.*, 2010). Eine Elektronenquelle erzeugt im Mikroskop freie Elektronen, die in einem Vakuumsystem über Elektronenlinsen auf ein zu untersuchendes Objekt (z. B. Gewebe oder Mikroorganismen) geleitet werden. Durch die Materialeigenschaften des Objektes wird die Bahn der Elektronen durch Beugung und Reflektion verändert. Detektoren bilden die Signale optisch ab.

Es wurden zwei unterschiedliche Techniken der Elektronenmikroskopie genutzt (Goodhew *et al.*, 2000). In der Rasterelektronenmikroskopie (REM) tastet ein fokussierter Elektronenstrahl zeilenartig die Oberfläche des Objektes ab. Über Beugung der Elektronen, Reflektion und Energieumwandlungsprozesse werden mithilfe verschiedener Detektoren optische Signale mit hoher Tiefenschärfe erzeugt. In der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wird der Elektronenstrahl durch das Objekt auf einen Detektor geleitet. Interaktionen der Elektronen mit dem Objekt stellen optisch Kontraste dar. In den Interaktionsuntersuchungen zum GP2 wurden Gold-konjugierte Antikörper genutzt. Gold besitzt eine hohe Elektronendichte, die die freien Elektronen aus dem Elektronenstrahl im Mikroskop reflektieren. Bei der Nutzung von 12 nm großen Goldpartikeln entsteht im TEM-Bild bei ca. 30.000-50.000-facher Objektvergrößerung ein schwarzes Kontrastsignal. Ähnlich zu erwähnten IIFT- und ELISA-Methoden können so Gewebeproben oder Mikroorganismen mit Zielproteinen inkubiert werden um Interaktionspartner nachzuweisen. Über spezifische Antikörper ist ebenso die Lokalisierung vom Zielprotein im Gewebe möglich. In einem Folgeschritt wird optional mit spezifischen Antikörpern inkubiert und über einen Gold-konjugierten Reporter das Signal erzeugt. Diese Signale geben Hinweise auf Proteininteraktionen bzw. Oberflächenwechselwirkungen mit dem Objekt.

Elektronenmikroskopie bedingt eine besondere Probenvorbereitung. Gewebe wurde nach Entnahme aus dem Organismus in ca. 5 mm große Stücke geschnitten und sofort in PFA/PIPES für zwei Stunden bei RT bzw. für 12 h bei 4°C fixiert. Eine schnelle Fixierung ist obligat um autokatalytische Prozesse zu minimieren. Nach der Fixierung wurden die Gewebe mit PVP-Saccharose für mindestens 12 h bei 4°C

entwässert (Kryoprotektion). Die so vorbereiteten Gewebestückchen wurden unter einer Stereolupe auf einen EM-Objektträger (Pin) aufgebracht (Kleber: GSV 1 embedding media), PVP-Reste wurden entfernt. Danach wurde das Objekt auf -196°C abgekühlt und Schnitte im Gefriermikrotom mit einer Schichtdicke von maximal 100 nm hergestellt (Temperaturen im Mikrotom: Objektträger: -110°C , Messer: -100°C , Kühlraum: -118°C). Diese sog. *sections* werden im Anschluss auf ein Raster (*Grid*) überführt und bis zur weiteren Bearbeitung in PBS bei 4°C gelagert.

Für die Aufarbeitung von Mikroorganismen und Zellen wurden diese sedimentiert ($1500 \times g$, 5 min, 4°C) und mit PBS gewaschen. Optional wurde das Sediment in 10% (w/v) Gelantine (37°C) eingebettet, danach analog zu Geweben mit PFA/PIPES fixiert und entsprechend der oben genannten Schritte weiter für die EM vorbereitet.

Zur Lokalisierung von Zielproteinen oder dem Nachweis von Interaktionen in der TEM wurden die hergestellten *Grids* mit 10% (w/v) FCS blockiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 4-5). Die Detektionsstrategie entspricht dabei den bisher beschriebenen Detektionsmethoden in IIFT und ELSIA. Als Reporter wird, wie bereits erwähnt, ein Gold-konjugierter Antikörper verwendet. Im letzten Schritt der Inkubation wird zur Kontrastoptimierung 0,4% (w/v) Uranylacetat in 2% (w/v) Methylcellulose verwendet. Uranylacetat lagert sich in das Gewebe ein und generiert dort eine höhere Elektronendichte (Kontrastverstärkung vom Hintergrund). Methylcellulose dient als Bindemittel. Zum Abschluss wird das zu untersuchende Objekt an der Luft getrocknet und elektronenmikroskopisch bei 20.000-60.000-facher Vergrößerungen beurteilt.

4.4 Analytische proteinbiochemische Methoden

Viele *in vitro* Reportersysteme basieren auf proteinbiochemischen Methoden. So dient eine kolorimetrische Signalgenerierung, durch z. B. Anlagerung von Farbstoffen an Zielstrukturen bzw. chemische- oder enzymatische Reaktionen, der qualitativen und quantitativen Bewertung eines Experiments. Neben der Fluoreszenz und ELISA spielte in dieser Arbeit die elektrophoretische Analytik eine entscheidende Rolle.

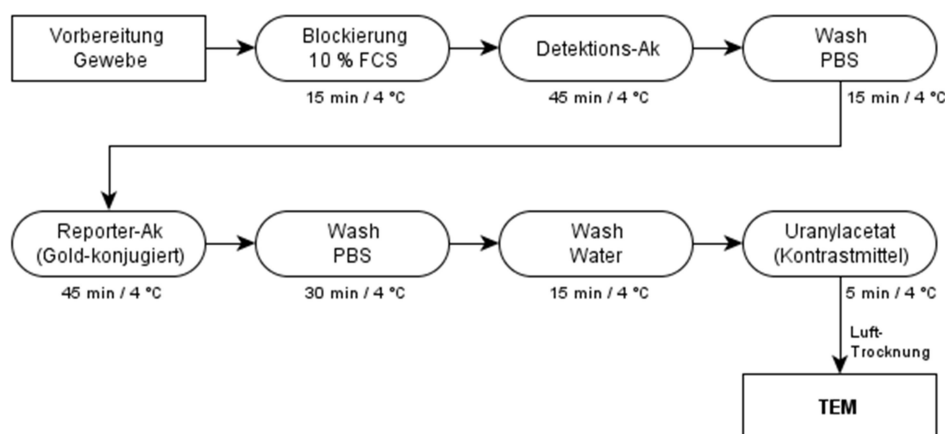


Abb. 4-5 TEM Inkubationsschema

Für die EM vorbereitetes Gewebe oder Zellen werden nach einem Blockierungsschritt mit FCS mit einem Ziel-Protein spezifischen Detektions-Ak inkubiert. Es folgen ein Waschschrift und die Inkubation mit dem Reporter-Ak. Zur Kontrastverstärkung wurde final mit Uranylacetat inkubiert. Anschließend erfolgte die Beurteilung der Präparate im Elektronenmikroskop.

Zu untersuchende, proteinhaltige Lösungen wurden zur Vorbereitung der Gelelektrophorese (Shapiro et al., 1967) mit Lithiumlaurylsulfat (LDS, NuPAGE® Probenpuffer, 4-fach-Konzentrat) behandelt. Dadurch wurden Ladungsunterschiede ausgeglichen und eine Trennung nach Molekulargewicht möglich. Eine optionale Reduzierung der Proben wurde mit 15 mM Dithiothreitol (DTT) erreicht. Die finale Denaturierung vor Probenauftrag auf ein Acrylamidgel (Gradientengel, 4-12%, Thermo Fisher Scientific) fand mit Hitze statt (70°C, 10 min). Gellauf (Gelkammer XCell SureLock Mini-Cell, Thermo Fisher Scientific) und Auftrennung der Probenmische erfolgten bei 200 V, 40 min, RT in einem 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Puffersystem (NuPage MES SDS Laufpuffer, Thermo Fisher Scientific). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele unspezifisch angefärbt. Als Farbstoff wurde Coomassie Brilliantblau G250 (Merck) verwendet. Dieser lagert sich an basische Aminosäurereste reversibel an (Fazekas de St Groth *et al.*, 1963). Vor der eigentlichen Anfärbung wurden die Gele mit Essigsäure-haltiger Lösung fixiert (Coomassie Entfärbelösung, 15 min, RT, Schüttelinkubator) um eine weitere Diffusion von Probenbestandteilen zu verhindern. Nach Fixierung wurden die Gele für 30 min (RT, Schüttelinkubator) mit Coomassie-Färbelösung inkubiert. Im Anschluss wurde der blaue Hintergrund mit Coomassie Entfärbelösung entfernt und die Signale dokumentiert. Als Alternative wurde eine TCE-Färbung durchgeführt (Kazmin *et al.*, 2002). TCE (2,2,2-Trichlorethanol) ist ein Chloralkanol, welches sich

unter UV-Licht kovalent an Tryptophane bindet. Diese so modifizierten und halogenierten Tryptophane emittieren ein detektierbares Fluoreszenzsignal (Ladner *et al.*, 2004). Die Gele wurden für 10 min (RT, Schüttelinkubator) in der TCE-Färbelösung inkubiert und danach mit Wasser gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte nach Anregung mit UV-Licht (Belichtungszeit 0,5 min, Geldokumentationsanlage Geldoc XR+, BioRad).

Für die spezifische Detektion von Zielproteinen wurden *Western Blots* (WB) (Burnette, 1981) angefertigt. Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proben auf Nitrocellulosemembranen (Whatman) wurde im Tankblotting-Verfahren (TE 22, GE, NuPAGE Transferpuffer) durchgeführt. Dafür wurden die bearbeiteten Gele auf eine Blotmembran überführt und für 1 h, 400 mA, RT geblottet. Mit Ponceau S wurde im Anschluss der Blotvorgang überprüft. Ponceau S lagert sich an positiv-geladene Aminogruppen von Proteinen reversibel an (Salinovich and Montelaro, 1986). Die so rot angefärbten Proteinbanden wurden dokumentiert. Nach vollständiger Entfärbung mit 50 mM Tris wurde die Membran blockiert (15 min, RT, Schüttelinkubator, WaPu⁺, Euroimmun) und für 30 min, 2 h (RT, Schüttelinkubator) mit dem Spezifitätsvermittelten primären Antikörper inkubiert. Nach einem Waschschrift (3x 5 min, RT, Schüttelinkubator, WaPu, Euroimmun) folgte der mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugierte Reporterantikörper (Inkubation 30 min, RT, Schüttelinkubator). Die kolorimetrische Detektion erfolgte mit 5 Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid- (NBT) Substrat (Euroimmun). Alkalische Phosphatase dephosphoryliert BCIP zu einem Indoxyl-Intermediat (Knecht and Dimond, 1984). Die Oxidation dieses Intermediats und gleichzeitiger Reduktion vom NBT erzeugt detektierbare, farbige (blau-violett) und schwerlösliche Aggregate auf der Blotmembran (Abb. 4-6).

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985) bestimmt. Proteinogene Bestandteile wie Cysteine, Cystine, Tyrosine, Tryptophane sowie die Peptidbindung reduzieren Kupferionen (Wiechelman *et al.*, 1988). Mit Bicinchoninsäure (BCA, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) bilden diese Cu⁺-Ionen farbige Komplexe, die bei einer Wellenlänge von 570 nm detektiert werden können (Abb. 4-7).

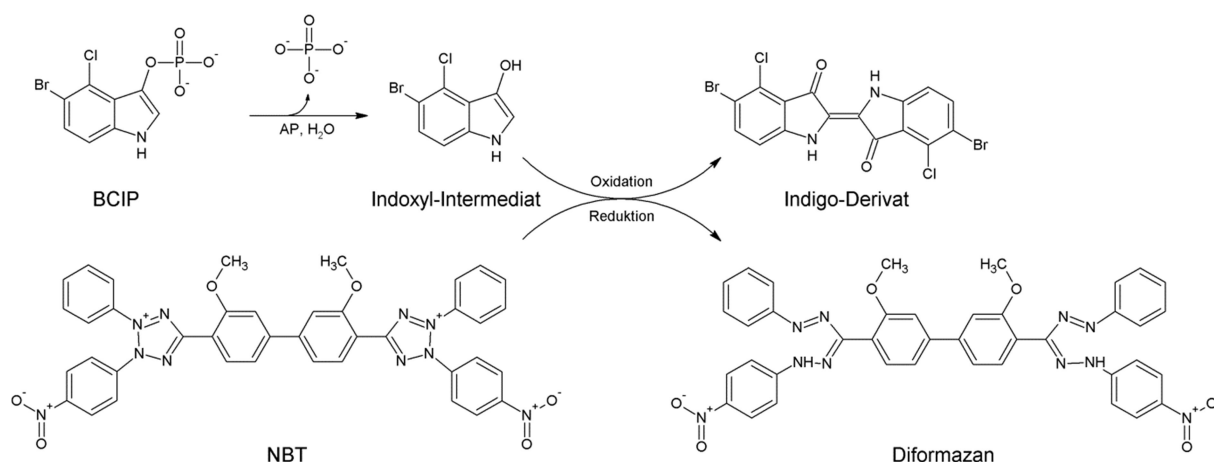


Abb. 4-6 AP-Reaktion mit BCIP/NBT, modifiziert nach Smejkal, 2001

Für die spezifische Detektion von Zielproteinen wird im WB ein mit Alkalischer-Phosphatase konjugierter Reporterantikörper genutzt. Die Alkalische Phosphatase (AP) dephosphoryliert das farblose 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) zu 5-Brom-4-chlor-indolyl (Indoxyl-Intermediat) (Smejkal und Kaul, 2001). Durch Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) wird dieses Intermediat zum 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. Dieses Indigo-Derivat bildet schwerlösliche blau-violette Aggregate. Die gleichzeitige Reduktion vom NBT zu blauem Diformazan verstärkt den kolorimetrischen Effekt.

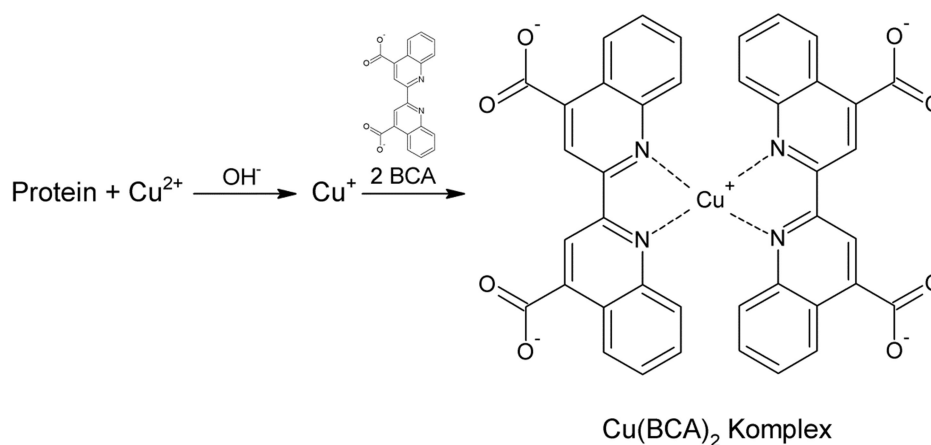


Abb. 4-7 Komplexierung Cu^+ im Bicinchoninsäure-Assay, modifiziert nach Sampson, 2013

Im Bicinchoninsäure- (BCA) Assay zur quantitativen Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration wird Cu^{2+} durch Proteinbestandteile (Cysteine, Cystine, Tyrosine, Tryptophane und die Peptidbindung selbst) zu Cu^+ oxidiert (Sampson *et al.*, 2013). BCA komplexiert diese einwertigen Kupferionen ($\text{Cu}(\text{BCA})_2$) und generiert ein kolorimetrisches Signal.

Zu untersuchende Proben wurden verdünnt im Assay eingesetzt. Als Referenz diente BSA in verschiedenen Konzentrationen (500, 250, 125, 63, 31 µg/ml). In eine Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) wurden 20 µl Probe vorgelegt und mit 200 µl BCA-Arbeitslösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte im Anschluss photometrisch (Sunrise, Tecan). In Bezug zur BSA-Referenz konnte die Gesamt-Proteinkonzentration der jeweiligen Proben ermittelt werden.

Der Nachweis von rekombinant-angereicherten Proteinen bzw. die Identifikation von Zielproteinen erfolgte massenspektrometrisch. Die Messungen wurden im Auftrag bei der Fa. Euroimmun, Abteilung Immunbiochemische Forschung, durchgeführt. Genutzt wurde ein MALDI-TOF Gerät (Matrix-unterstützte Laser-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer, Autoflex III, Bruker) (Jurinke *et al.*, 2004). Als Vorbereitung wurden die zu untersuchenden Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Entsprechende Banden wurden nach Anfärbung mit Coomassie dem Gel entnommen. Nach Entfärbung der Gelstücke mit Acetonitril folgte die enzymatische Fragmentierung der Zielproteine mit der Peptidase Trypsin (10 mg/ml, Promega), die Extraktion der entstanden Peptide mit MALDI-Extraktionslösung sowie die anschließende Präparation auf den MALDI-Chip (MTP AnchorChip 384 T F, Bruker). Im Gerät wurden die Proben mittels Laser weiter fragmentiert, ionisiert und in die Gasphase überführt. Über ein elektrisches Feld wurden die Ionen im Hochvakuum beschleunigt und mittels Ionenspiegel auf den Detektor geführt. Aus der daraus resultierenden Flugzeit der einzelnen Ionen im Feld konnte das Masse-zu-Ladungsverhältnis ermittelt werden. Über Datenbanken (z. B. NCBI) und entsprechende Sequenzvergleiche der Peptide erfolgte der Software-gestützte Rückschluss auf das Zielprotein.

4.5 Rekombinante Darstellung von Zielproteinen

Sowohl Interaktionsexperimente als auch kompetitive Assays benötigten rekombinant dargestelltes Protein. Für die Anreicherung von rekombinanten Zielproteinen wurden Methoden der *fast protein liquid chromatography* (FPLC) genutzt (Lottspeich and Engels, 2006). Grundlage der FPLC ist die unterschiedliche Verteilung einzelner Komponenten eines Stoffgemisches zwischen einer mobilen und einer stationären Phase. Die mobile Phase bildet dabei ein wässriges Puffersystem,

in welchem die aufzutrennende Probe eingebracht wird. Stationäre Phasen umfassen meist chemisch modifizierte Polysaccharide, Minerale oder Kunststoffe. Es werden dabei mehrere Trennprinzipien verfolgt: nach dem Siebprinzip werden die Einzelkomponenten nach ihrer Größe bzw. im Fall der FPLC nach dem hydrodynamischen Volumen aufgetrennt. In der sog. Gelfiltration (SEC) werden quervernetzte Dextrane als stationäre Phase genutzt, welche Poren unterschiedlicher Größe ausbilden. Kleinere Probenbestandteile können diese Poren passieren und haben so eine längere Laufstrecke und, damit verbunden, eine längere Verweilzeit auf der Säule. Sie eluieren nach größeren Komponenten, welche in diese Poren nicht einwandern können. Weitere FPLC-Methoden unterliegen dem Affinitätsprinzip. In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem die immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) eingesetzt. Als stationäre Phase dient hier eine modifizierte Agarose mit Iminodiessigsäure als funktionelle Gruppe. Über diesen Chelator werden Nickel und andere zweiwertige metallische Kationen an die Matrix lokalisiert (Abb. 4-8). Die Zielproteine verfügen über einen Polyhistidin-Tag (6-8 Histidine in der Aminosäuresequenz). Weitere Koordinationsstellen des immobilisierten Metallions interagieren mit dem His-Tag des Zielproteins. Das Zielprotein wird an die stationäre Phase reversibel gebunden. Über pH-Änderungen oder Imidazol (Histidin-Derivat) lässt sich das Zielprotein eluieren. Eine weitere Methode ist die Ionenaustauschchromatographie (IEx). Funktionelle Gruppen der stationären Phase sind meist quartäre Amine (Anionenaustauscher) oder Sulfopropylgruppen (Kationenaustauscher). Proteine mit geladenen Aminosäureresten erfahren eine Retention und können durch Zugabe von Salzen eluiert werden. Die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) nutzt unpolare Kohlenstoffketten oder Aromaten als funktionelle Gruppen der stationären Phase um hydrophobe Proteinbestandteile zu binden. Die Elution erfolgt mit polaren Lösungsmitteln.

Das Biomaterial zur Darstellung von rekombinant-produzierten Proteinen wurde von der Fa. Euroimmun, Abt. Molekulabiologie Antigendarstellung, zur Verfügung gestellt. Sämtliche Klonierungs- und entsprechende Zellkulturarbeiten wurden im Auftrag durchgeführt. GP2 wurde aufgrund seiner umfangreichen Domain-Struktur sowie posttranslationaler Modifikationen (z. B. Glykosylierungen) eukaryotisch in HEK-Zellen produziert. Für FimH wurden die genetischen Informationen aus *Salmonella*

typhimurium (bereitgestellt durch die AG Rupp, Universität zu Lübeck) extrahiert, umklont und in *E. coli* produziert. Detaillierte Sequenzen unterliegen der betrieblichen Schweigepflicht, orientieren sich jedoch an den bereits genannten UniProt Einträgen. Ferner wurde mit His-Tags gearbeitet, um die Anreicherung über affinitätschromatographische Methoden zu erleichtern.

Es wurden Strategien für die Anreicherung von CUZD1, α - und β GP2, sowie für FimH als Interaktionspartner von GP2 entwickelt.

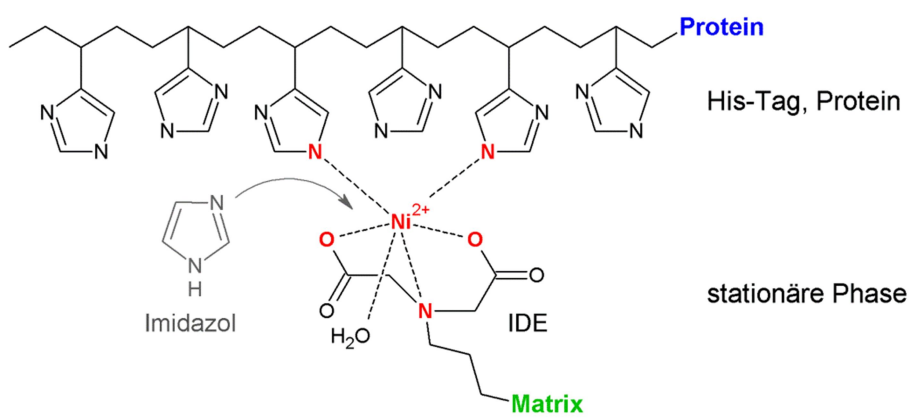


Abb. 4-8 immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Nickelionen (Ni^{2+}) werden über Iminodiessigsäure (IDE) an die stationäre Phase (Chromatographiesäule) lokalisiert. Weitere Koordinationsstellen vom Nickel binden Polyhistidin-Tags rekombinanter Proteine. Eine Elution vom gebundenen Zielprotein kann durch Imidazol oder pH-Änderungen erfolgen (Burgess and Deutscher, 2009).

4.6 Deglykosylierungsreaktionen

GP2 ist ein stark glykosyliertes Protein welches vom Pankreas sezerniert und über den Pankreassaft in den Darm geleitet wird. Die Glykosylierung erfolgt im Organismus posttranslational, zumeist über Asparagine (N-Glykosylierung) bzw. Serine und Threonine (O-Glykosylierung), ferner über Carbonylgruppen von Mannose-Resten und Tryptophanen (C-Glykosylierung) entsprechender Proteine (Moremen *et al.*, 2012). In Experimenten zur Deglykosylierung von Proteinen wurden die Zuckerreste von eukaryotischen Zielproteinen vor allem enzymatisch mit der Peptid N-Glycosidase F (PNGaseF) und chemisch mit Periodat eliminiert. Beide Verfahren sind sowohl mit ELISA- als auch IIFT-Methoden kompatibel.

4.6.1 Enzymatische Deglykosylierung

PNGaseF ist eine Glykosidase aus *Flavobacterium meningosepticum* (Tarentino et al., 1985). Das Enzym hydrolysiert die Glykosylamin-Bindung direkt am Asparagin und produziert so Kohlenhydrat-freie Peptide bzw. Proteine sowie ungebundene Oligosaccharide. Die Reaktion ist allerdings auf die N-Glykosylierung beschränkt, O-Glykosylierungen bleiben intakt.

Im Deglykosylierungsansatz wurden 8 mg Zielprotein in PBS mit 6 Units PNGaseF für 3 h bei 37°C und leichtem Schwenken inkubiert. Auf Zugabe von NP40 oder anderen Detergenzien wurde verzichtet. Die erfolgreiche Deglykosylierung wurde über Gelelektrophorese und Lektin-Inkubation im WB gezeigt (hier nicht dargestellt).

4.6.2 Malaprade-Reaktion

Die Spaltung von N- und O- glykosidischen Bindungen wurde chemisch durch Periodat erreicht. Diese sog. Malaprade Reaktion (Malaprade, 1926) spaltet vicinale Diolen oxidativ über einen cyclischen Periodsäureester (Übergangszustand) zu Carbonylverbindungen (Vollhardt and Schore, 2011) (Abb. 4-9).

Für die Reaktion wurden 20 µg Protein in PBS mit 0,1 M Periodatlösung für 120 min bei RT inkubiert (dunkel). Anschließend wurden Periodat und Zuckerreste sowie weitere niedermolekulare Reaktionsprodukte durch Waschvorgänge (PBS) mittels Spin-Konzentratoren entfernt. Der Nachweis der Deglykosylierung erfolgt über ein verändertes Permeationsverhalten des Zielproteins in der Gelelektrophorese bzw. über Lektin-Inkubation im WB und IIFT.

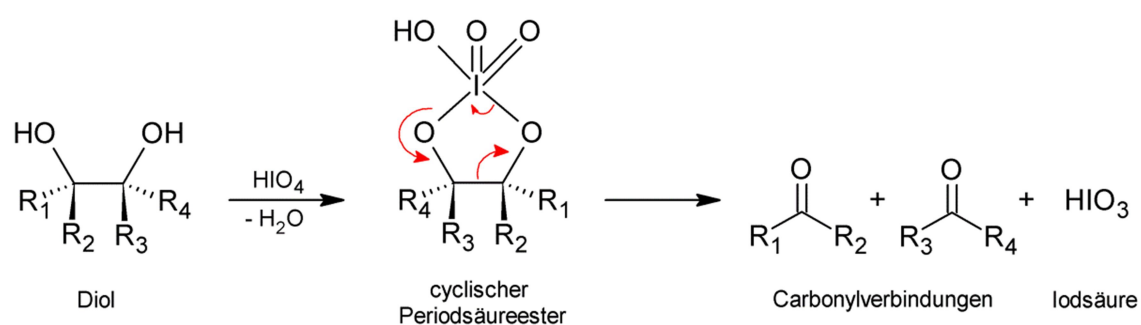


Abb. 4-9 Malaprade Reaktion

Oxidative Spaltung von vicinalen Diolen durch Periodsäure (modifiziert nach Malaprade, 1926).

4.7 Protein-Interaktion

In funktionellen Untersuchungen wurde die Interaktion von GP2 sowohl mit Mikroorganismen als auch mit rekombinant-produzierten Proteinen untersucht. Es wurden verschiedene Ansätze und Methoden genutzt, um eine mögliche Bindung aufzuzeigen. Dabei wurde ein Reaktionspartner an eine feste Phase (*Beads* oder Mikrotiterplatte) immobilisiert und mit freiem Liganden inkubiert. Kolorimetrische- und bildgebende Verfahren wurden zur Beurteilung der Interaktion genutzt.

4.7.1 Bead-basierte Interaktionsexperimente

Als Matrix für die beadbasierten Interaktionsexperimente wurden carboxylierte Metal-*Beads* (TurboBeads) verwendet. Die Kopplung von Proteinen gelang über NHS-Chemie (Fischer, 2010) (Abb. 4-10, A). Dabei wurden die Carboxylgruppen der *Beads* mit 0,4 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) und 0,1 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) zu einem Ester umgesetzt (Inkubation mit EDC / NHS: 20 min / RT). Nach einem Waschschrift mit 10 mM Natriumacetat (pH 4, Beadimmobilisierung über Magnet) wurde mit dem zu koppelnden Zielprotein (GP2) inkubiert (30 min / RT).

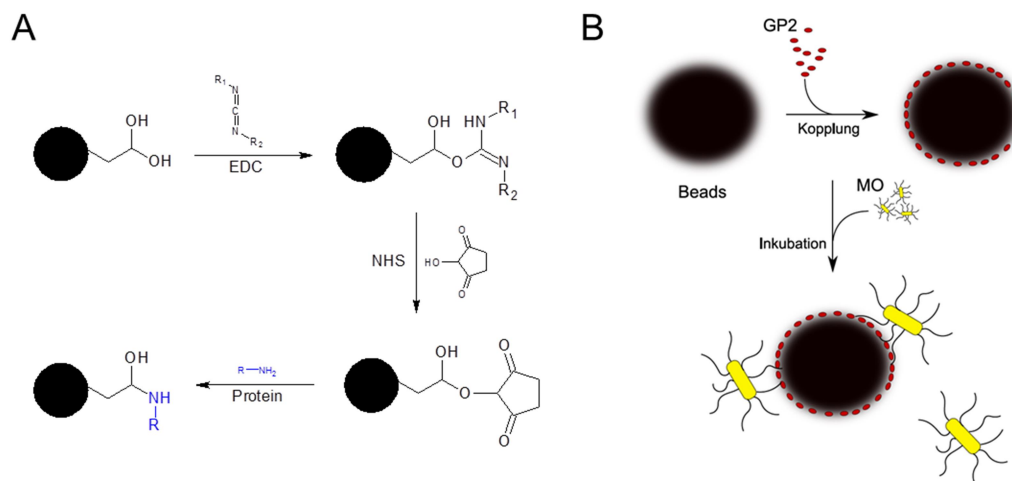


Abb. 4-10 Bead-basierter GP2-Interaktionsassay

Für Interaktionsexperimente wurde GP2 an carboxylierte *Beads* (TurboBeads) gekoppelt (A). Die Aktivierung der Bead-Carboxylgruppen erfolgte durch Reaktion mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) zu Acylisoharnstoff (instabil) und Umsetzung mit NHS (N-Hydroxysuccinimid) zu einem reaktiven und stabilen Ester. Durch nukleophile Substitution werden im Anschluss primäre und sekundäre Aminogruppen von Proteinen (z. B. Lysinreste) kovalent gebunden. NHS dient als Abgangsgruppe. Die GP2-gekoppelten *Beads* wurden im Anschluss mit Mikroorganismen (MO) inkubiert (B). Die Interaktion wurde in der Elektronenmikroskopie nachgewiesen. R: Proteinrest, R₁: -CH₂CH₃, R₂: -(CH₂)₃N⁺H(CH₃)₂CL⁻.

In dieser Substitutionsreaktion werden primäre Aminogruppen der Proteine kovalent an die *Beads* gekoppelt. NHS dient als Abgangsgruppe. Ethanolamin (500 mM in PBS) wurde im Anschluss als Blockreagenz genutzt. In weiterführenden Experimenten wurden diese GP2-gekoppelten *Beads* mit Mikroorganismen (*E. coli*, *S. typhimurium*) inkubiert (2 h, RT, Abb. 4-10, B). Die Beurteilung der Interaktion erfolgte elektronenmikroskopisch (REM).

4.7.2 Plattenbasierte Interaktionsexperimente

Plattenbasierte Interaktionsexperimente orientieren sich an der bereits beschriebenen ELISA-Technik (siehe Kapitel 4.2). Als Matrix wurden MaxiSorp-Mikrotiterplatten (Nunc) verwendet. Sowohl Mikroorganismen (Abb. 4-11) als auch proteinogene Interaktionspartner von GP2 (FimH, Abb. 4-12) wurden beschichtet. Bei der Nutzung von Mikroorganismen wurde im Anschluss manuell, bei Verwendung von rekombinanten Proteinen maschinell (Columbus Pro Washer, Tecan) mit PBS gewaschen. Nach einem Blockierungsschritt (BSA-Blockingpuffer, Euroimmun, 1 h / RT) erfolgte die Inkubation mit rekombinatem GP2 (2 h / RT). Der Nachweis der Interaktion wurde über die spezifische Detektion von GP2 mit einem monoklonalen Anti-GP2 Ak und über einen sekundären Anti-Maus POD-konjugierten Antikörper erbracht (Inkubation jeweils 30 min / RT). Ein resultierendes kolorimetrisches Signal wurde bei 450 nm Wellenlänge im Spektralphotometer (Sunrise, Tecan) gemessen.

4.7.3 Spin down Interaktionsexperimente

Diese Methode zur Untersuchung von GP2-Interaktionen mit Oberflächenbestandteilen von Mikroorganismen (hier *E. coli* und *S. typhimurium*) wurde ohne Matrix durchgeführt. Als stationäre Phase dienen im Ansatz die Mikroorganismen selbst. Die Bakteriensuspension wurde mit rekombinatem GP2 (löslich) für 60 min bei 4°C inkubiert. Ungebundenes lösliches Probenmaterial wurde durch Zentrifugation entfernt (Waschschritte mit PBS, Zentrifugation bei 4.000 x g / 10 min / 4°C, Zentrifugationsüberstand wurde jeweils verworfen). Gebundenes GP2 wurde mit einem GP2-spezifischen, monoklonalen Antikörper detektiert.

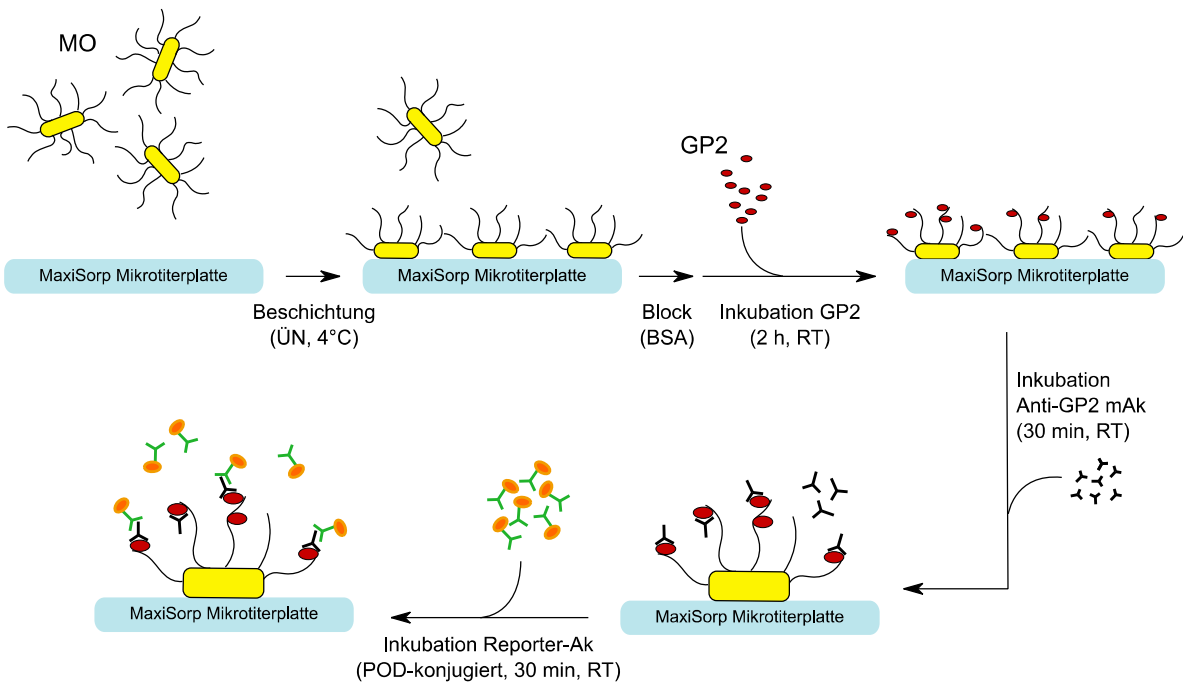


Abb. 4-11 GP2 Interaktionsassay, plattenbasiert mit Mikroorganismen

Mikroorganismen (MO, *E. coli*, *S. typhimurium*) wurden auf eine Mikrotiterplatte beschichtet und mit rekombinantem GP2 inkubiert. Die Interaktion wurde mit GP2-spezifischen Antikörpern (analog zur ELISA, 4.2) nachgewiesen.

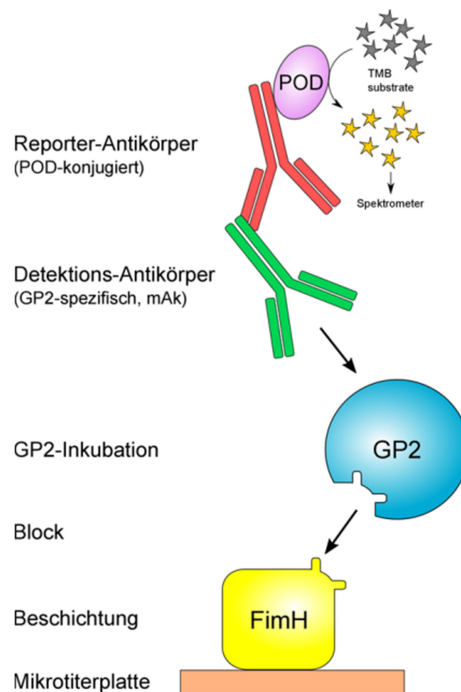


Abb. 4-12 GP2 Interaktionsassay, plattenbasiert mit rekombinanten Proteinen

Rekombinantes FimH wurde als Interaktionspartner auf eine Mikrotiterplatte beschichtet und nach einem Blockierungsschritt (BSA) mit GP2 inkubiert. GP2 (bzw. indirekt die Interaktion) wurde spezifisch mit einem monoklonalen Detektionsantikörper und entsprechendem speziesspezifischen und Peroxidase-(POD) konjugierten Reporter nachgewiesen.

Da dieser Antikörper konformationelle GP2-Epitope erkennt und somit nicht WB-reaktiv ist, wurde nach einem Waschschrift mit diesem spezifischem Antikörper inkubiert (30 min / 4°C). Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Probe in der Gelelektrophorese und WB untersucht. Über den spezifischen Nachweis des Detektions-Ak konnte indirekt auf eine GP2-MO-Interaktion geschlossen werden.

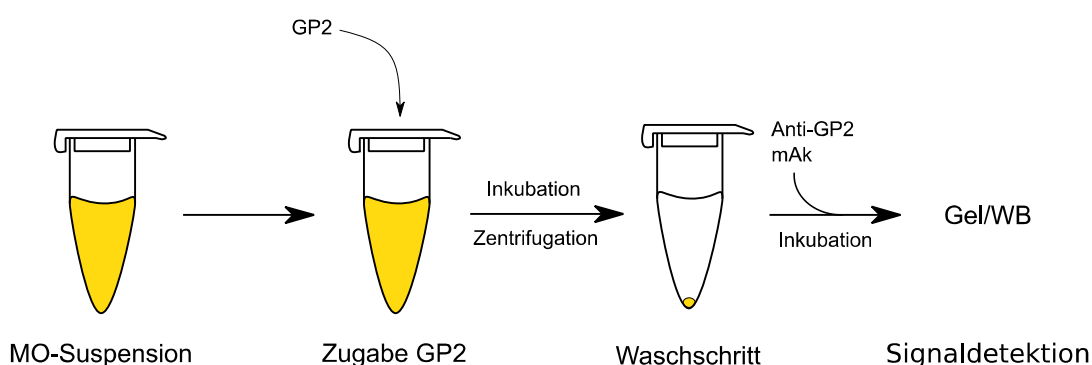


Abb. 4-13 GP2 Interaktionsassay, Spin down Format

Eine MO-Suspension wurde mit rekombinantem GP2 inkubiert (60 min / 4°C). Nach Zentrifugation (4.000 x g / 10 min / 4°C) und Waschschrift mit PBS wurde das Sediment mit einem GP2-spezifischen Detektions-Ak untersucht. Der Detektions-Ak (und damit indirekt eine GP2-MO Interaktion) konnte mittels Gelelektrophorese und WB nachgewiesen werden.

4.7.4 Biochemische Kenngrößen der Interaktion

Mit Hilfe von Titrations- und Konkurrenzexperimenten können Bindungskonstanten von Protein-Protein Interaktionen bestimmt werden. Dabei wird eine Interaktion biochemisch als Bindung eines Liganden an einen Rezeptor aufgefasst. Die Reaktion unterliegt dem Massenwirkungsgesetz. Als Dissoziationskonstante K_D (4-1) wird die Stärke der Interaktion und damit die Bindungsaffinität bezeichnet (Liddell and Weeks, 1996). Sie wird in mol/l bzw. M angegeben. Je kleiner die ermittelte K_D ist, desto stärker ist die Bindung. Die Bindungskapazität B_{max} (4-2) gibt die effektive Konzentration an Bindestellen des Rezeptors an (Einheit: mol/l bzw. M). Aus K_D und B_{max} kann das effektive Bindungspotential (BP) (Mintun *et al.*, 1984) berechnet werden (4-4). BP ist einheitenlos und korreliert zur Rezeptorkonzentration und zur Rezeptoraffinität zum Liganden. Damit ist es ein Maß für die Fähigkeit des Rezeptors, mit der Liganden-Bindungsstelle zu interagieren. K_D und BP werden vor allem für Vergleichszwecke herangezogen. Allerdings ist bei den theoretischen

Überlegungen zu beachten, dass eine Interaktion im Experiment von zahlreichen Bedingungen wie beispielsweise pH, Ionenstärke und Additive abhängig ist.

$$K_D = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]}$$

K_D : Dissoziationskonstante
 $[R]$: Konzentration Rezeptor
 $[L]$: Konzentration Ligand
 $[RL]$: Komplex, Messgröße

(4-1)

$$B_{max} = [R] + [RL]$$

B_{max} : Bindungskapazität

(4-2)

$$BP = \frac{B_{max}}{K_D}$$

BP : Bindungspotential

(4-3)

4.8 Analytik von Stuhlproben

In der CED-Diagnostik spielen vor allem endoskopische Methoden eine Rolle. Ferner werden Patientenserum auf diagnostische Marker und Autoantikörper untersucht. CED-Erkrankungen betreffen jedoch vor allem den Darm. Die Untersuchung von Stuhlproben könnte weitere wertvolle Informationen zur Krankheitsprogression liefern, allerdings finden sich in der Literatur nur wenige Hinweise auf CED-relevante Stuhlmarker. Daher wurden entsprechende Stuhlproben von CED-Patienten untersucht. Im Fokus standen vor allem unspezifische Inflammationsmarker und Autoantikörper in prozessierten Fäzes.

4.8.1 Extraktion von Antigen und Antikörpern aus Fäzes

Zur Aufarbeitung von Stuhl-Patientenproben wurde eine Methode zur Fäzes-Prozessierung etabliert (Abb. 4-14). Etwa 0,01-0,1 g Feuchtmasse Fäzes wurden der Patientenprobe entnommen und mit 10-fachen Volumen Fäzes-Extraktionspuffer überschichtet. In Voraustestungen zur Löslichkeit potentieller Zielproteine zeigte sich, dass 650 mM Natriumchlorid für die Solubilisierung und Stabilisierung von Zielproteinen wie z. B. Antikörpern ausreichend ist. Zellorganellen werden jedoch noch nicht aufgeschlossen. Die Homogenisierung erfolgte anschließend manuell und unter Nutzung von Dounce-Homogenisatoren (Roth) und einem Vortex Schüttler. Nach Inkubation der Ansätze für 10 min bei RT folgte eine Zentrifugation (20.000 x g, 10 min, 4°C). Der resultierende Überstand wurde für die Fäzes-Analytik eingesetzt.

Das Sediment wurde wiederholt mit Fäzes-Extraktionspuffer und anschließend mit Detergenzien (1% (w/v) Triton X-100) behandelt. Da die untersuchten Zielproteine bereits eine große Löslichkeit im Fäzes-Extraktionspuffer aufwiesen, konnten keine weiteren Informationen über die Detergenzextraktion generiert werden. Die etablierte Methode zur Prozessierung von Stuhlproben zeichnet sich durch einfache Arbeitsschritte und geringem präparativen Aufwand aus. Geringste Mengen an Patientenproben können parallel und mit geringem Zeitbedarf bearbeitet werden.

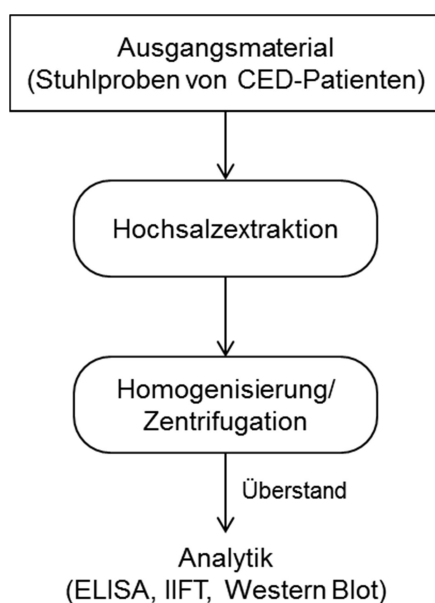


Abb. 4-14 Prozessierung Stuhlproben

Akquirierte Stuhlproben wurden mit 650 mM Natriumchlorid (Phosphat-gepuffert) überschichtet und homogenisiert (Dounce Homogenisator). Nach Zentrifugation wurde der resultierende Überstand für analytische Untersuchungen genutzt.

4.8.2 Fäzes-Analytik

Die Analytik zur Untersuchung prozessierter Stuhlproben orientieren sich an den bereits beschriebenen Methoden wie ELISA, IIFT und WB. Allerdings führten die heterogene Probenzusammensetzung und die, im Vergleich zu Seren, hohe enzymatische Aktivität innerhalb der Proben zu Anpassungen in den Assays. Vor allem wurden Proteaseinhibitoren (Sigma-Aldrich) und BSA eingesetzt, um die Proteolyse von Zielproteinen zu minimieren. Mikrobielles Wachstum wurde durch die bakterizide Wirkung von Natriumazid (Snyder and Lichstein, 1940) gehemmt. So konnten etablierte Systeme zur Untersuchung von Seren durch geringe Modifikationen auf Stuhlproben adaptiert werden.

4.9 Statistik

Zur Auswertung und Beurteilung empirischer Daten wurden statistische Mittel genutzt (Fahrmeir *et al.*, 2016).

4.9.1 Lagemaße

Lagemaße beschreiben Häufigkeitsverteilungen einzelner Stichproben oder ganzer Kohorten innerhalb einer Grundgesamtheit (Kollektiv). Das *arithmetische Mittel* (\bar{x}), als bekanntestes Lagemaß, gibt das Zentrum der Verteilung als rationale Zahl wieder. Es berechnet sich aus dem Quotient der aufaddierten Stichproben ($x_1 + \dots + x_n$) durch deren Anzahl (n) (4-4).

$$\bar{x} = \frac{1}{n}(x_1 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (4-4)$$

Allerdings wird das arithmetische Mittel stark von Extremwerten beeinflusst. Gerade bei klinischen Studien kann dies die Aussage verfälschen. Der *Median* (x_{med}) als robustes Lagemaß begrenzt den Einfluss dieser Schwankungen. Bei ungerader Proben- bzw. Werteanzahl gibt der Median den tatsächlichen mittleren Wert im Kollektiv wieder (4-5). Bei gerader Anzahl wird das arithmetische Mittel der beiden mittleren Werte gebildet (4-6).

$$x_{med} = x_{\left(\frac{n+1}{2}\right)} \quad n = \text{gerade} \quad (4-5)$$

$$x_{med} = \frac{1}{2} \left(x_{\left(\frac{n}{2}\right)} + x_{\left(\frac{n}{2}+1\right)} \right) \quad n = \text{ungerade} \quad (4-6)$$

Um die Streuung der Daten um ihr Zentrum weiter beschreiben zu können, wurden *Quantile* (Q) und *Stichprobenvarianzen* (s^2) bzw. *empirische Standardabweichungen* (s) genutzt. Quantile sind Schwellenwerte, welche die vorliegenden Daten in verschiedene Teile trennt. So gilt z. B. für das 25%-Quantil ($Q_{0,25}$), dass unterhalb dieser Schwelle 25% der Einzelwerte im Kollektiv liegen. Der Median entspricht dem 50%-Quantil ($Q_{0,5}$). Die Varianz beschreibt die Streuung der empirischen Daten um

den arithmetischen Mittelwert. Dazu werden von jedem Einzelergebnis die Abweichung vom Mittelwert aufaddiert, quadriert und durch die Probenanzahl ($n - 1$) geteilt (4-7). Die Standardabweichung ist die Wurzel der Varianz (4-8).

$$s^2 = \frac{1}{n-1} [(x_1 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2] = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (4-7)$$

$$s = +\sqrt{s^2} \quad (4-8)$$

4.9.2 Statistische Güteparameter

Zur Beurteilung von empirischen Rohdaten finden verschiedene statistische Güteparameter ihre Anwendung. Dabei wird die wissenschaftliche Fragestellung als statistisches Testsystem aufgefasst und eine dem jeweiligen Experiment entsprechende Alternativhypothese erstellt. Die Abgrenzung der Alternativhypothese zur Nullhypothese (Annahme über Grundgesamtheit) wird über statistische Wahrscheinlichkeiten gezeigt.

In klinischen Studien wird vor allem mit Inzidenzen und Prävalenzen gearbeitet. Inzidenzen bezeichnen Neuerkrankungen oder das Auftreten von neuen Parametern innerhalb einer Grundgesamtheit pro Zeitintervall (Kirkwood and Sterne, 2010). Prävalenzen beschreiben dagegen die Gesamtzahl an Erkrankungen oder klinischer Parameter innerhalb einer Population zu einem bestimmten Zeitpunkt. Beim gleichzeitigen Auftreten von klinischen- und/oder experimentellen Parametern wird von Konkordanzen gesprochen.

Die Güte von Testsystemen einzelne Stichproben bzw. Individuen einer Grundgesamtheit zu kategorisieren (in klinischen Studien in positiv oder negativ bzw. krank und gesund), wird über die Sensitivität und Spezifität bestimmt. Die Sensitivität gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, positive oder kranke Patienten als positiv zu identifizieren. Die Spezifität bezeichnet die Fähigkeit des Tests, negative oder gesunde Patienten als negativ zu kategorisieren. Daneben wird zwischen dem positiven (PPV) und negativen prädikativen Vorhersagewert (NPV) unterschieden. Der PPV (oder Präzisionsrate) gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Patient mit positivem Testergebnis tatsächlich positiv/krank ist, der NPV (oder Segreganz)

entsprechend bei negativem Testergebnis negativ bzw. gesund. Die Genauigkeit des Testsystems (*Accuracy*, ACC) gibt an, wie gut der Assay zwischen den verschiedenen Kohorten (im Beispiel gesund und krank) separiert.

Um einen Zusammenhang zweier Merkmale (z. B. Diagnose *versus* experimentellen Parameter) aufzuzeigen wurde das sog. Quotenverhältnis (OR) bestimmt. Dieses Assoziationsmaß berechnet sich aus den absoluten Werten oder Wahrscheinlichkeiten beider Merkmale ($R(A)$ und $R(B)$) (4-9). Ist das Ergebnis größer als eins, liegt ein statistischer Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen vor. Ist das Ergebnis gleich eins, liegt kein Zusammenhang vor. Ist es kleiner als eins schließen sich beide Merkmale statistisch aus.

$$OR = \frac{R(A)}{R(B)} \quad (4-9)$$

Abb. 4-15 zeigt die Zusammenhänge der verschiedenen Güteparameter eines Testsystems im Überblick.

		<i>Erkrankung bzw. Parameter</i>		
		positiv	negativ	
<i>Testsystem</i>	positiv	a	b	$PPV = \frac{a}{a + b}$
	negativ	c	d	$NPV = \frac{d}{c + d}$
$ACC = \frac{a + d}{a + b + c + d}$		$Sensitivität = \frac{a}{a + c}$	$Spezifität = \frac{d}{b + d}$	$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$

Abb. 4-15 Übersicht Zusammenhang verschiedener Güteparameter

Beurteilungsparameter: a: richtig positiv, b: falsch negativ, c: falsch positiv, d: richtig negativ
 ACC: Testgenauigkeit, NPV: negativer prädikativer Wert, OR: Quotenverhältnis (*odds ratio*), PPV: positiver prädikativer Wert. Modifiziert nach Fahrmeir, 2016.

Um statistische Unterschiede zwischen der Alternativ- und Nullhypothese aufzuzeigen, wurden Signifikanztests durchgeführt. Beim Vergleich zweier Merkmale wurde der T-Test (Student, 1908) angewendet, bei Multiparametervergleich der ANOVA-Test (Box, 1953). Die Wahrscheinlichkeiten (p) wurden dabei aus der Probenanzahl, dem arithmetischen Mittelwert der Stichproben und deren

Standardabweichung bzw. Varianzen in Bezug auf entsprechende Wahrscheinlichkeitsverteilungen ermittelt. Wahrscheinlichkeiten von unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. In der Bewertung wurden folgende Abstufungen vorgenommen: nicht signifikant (n.s.), $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

4.9.3 Grafische Darstellung

Um experimentelle Daten zusammenzufassen und optisch aufzuarbeiten, wurden neben Linien- und Boxdiagrammen zusätzliche Variationen genutzt.

In *Box-Whisker* Diagrammen (z. B. Abb. 5-3) sind verschiedene Lagemaße dargestellt. Das untere Ende der Box kennzeichnet das 25% Quantil, das obere Ende das 75% Quantil. Die gesamte Länge der Box wird als Interquartilsabstand (IQR) bezeichnet. Die Linie innerhalb der Box zeigt den Median. Die Whisker oder Antennen zeigen Werte außerhalb vom IQR, respektive das 10%- bzw. 90% Quantil. Extremwerte wurden als Punkte dargestellt.

Mathematisch geschätzte Überlebensraten im zeitlichen Verlauf und in Abhängigkeit von diskreten medizinischen Parametern können mit Hilfe von *Kaplan-Meier* Plots (Kaplan and Meier, 1958) dargestellt werden (z. B. Abb. 5-21). Dafür werden Patienten über einen vorgegebenen Zeitraum (Erstdokumentation/Erstdiagnose eines Patienten bzw. Studienbeginn bis Studienende) beobachtet. In diesem Beobachtungszeitraum werden für jeden Zeitpunkt die noch eingeschlossenen Probanden bzw. Ausfälle (Zensierung oder Tod) ermittelt (= Risikomenge), daraus die bedingte Überlebenshäufigkeit errechnet und grafisch dargestellt. Die so geschätzte Überlebensrate kann direkt aus dem Kaplan-Meier Plot abgelesen werden. Über die Fläche unterhalb der Kurve lassen sich Mittelwerte berechnen und vergleichen.

Grenzwertoptimierungskurven bzw. *ROC* Diagramme (Zweig and Campbell, 1993) zeigen wiederum eine Gegenüberstellung der bedingten Wahrscheinlichkeiten von Sensitivität und Spezifität eines klinisch-relevanten Parameters an (siehe z. B. Abb. 5-51). Aus dem resultierenden Graph lässt sich die diagnostische Güte des Parameters direkt ablesen: ideale (theoretische) Testsysteme haben eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. Im ROC-Diagramm würde man diese Systeme

links-oben im Diagramm wiederfinden. Die Fläche unterhalb der Kurve wäre genau eins. Die Diagonale im Plot entspricht wiederum der Ratewahrscheinlichkeit (Zufall). Das Testsystem liefert in diesem Fall keine validen Daten zur Diagnose. Der zu untersuchende Parameter wird sich je nach differenzialdiagnostischer Relevanz zwischen dem idealen- und dem zufälligen System befinden. Je weiter sich sein Wert für den Flächeninhalt unterhalb der Kurve dem mathematischen Maximum eins annähert, desto aussagekräftiger ist der Parameter. Zum Vergleich von klinischen Tests wird zusätzlich der Grenzwert mit bestem Kompromiss aus Sensitivität und Spezifität aus dem ROC-Diagramm abgelesen.

5 Ergebnisse

Zur Untersuchung pankreatischer Antigene und deren spezifischer Autoantikörper im Umfeld von CED wurden verschiedene Studien und Experimente durchgeführt (Abb. 5-1). Ausgehend von einem CED-Blutspenderkollektiv korreliert das Vorkommen von AAK gegen CUZD1 und GP2 zu einem distinkten klinischen Phänotyp. Außerdem zeigte sich eine bisher unbekannte Assoziation zu PSC und Cholangiokarzinoma. Die Funktion von CUZD1 und GP2 ist bisher noch weitgehend unbekannt. In der Literatur werden Hinweise beschrieben, dass die Pathogenese von CED und PSC auch mikrobiellen Ursprungs sein könnte (O'Toole *et al.*, 2012). Zur *in vitro* Untersuchung wurden die PAg rekombinant dargestellt (Fokus GP2) und die Interaktion bzw. Bindung mit Mikroorganismen und dem mikrobiellen Zielprotein (FimH) gezeigt. Die Generierung der Autoantikörper kann demnach ein Überlagerungseffekt, ausgelöst von vor allem mit GP2 beladenen Mikroorganismen, sein. CUZD1 und GP2 sind sich proteinbiochemisch ähnlich und konnten sowohl im Pankreas als auch in Stuhlproben nachgewiesen werden.

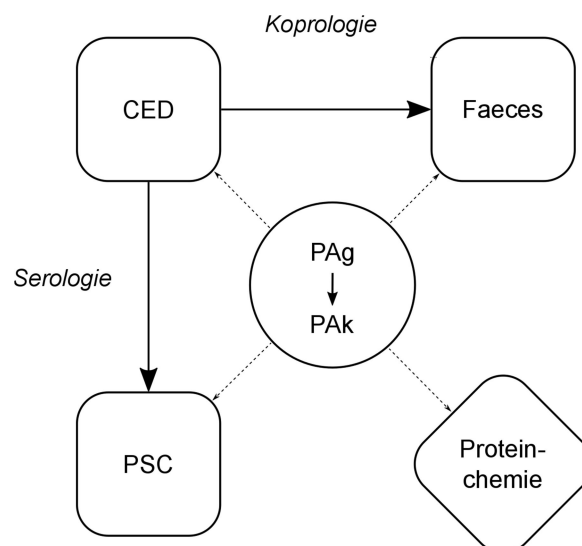


Abb. 5-1 Übersicht Schwerpunkte der Versuche

Es wurden serologische und koprologische Studien mit CED- und PSC Patientenkollektiven durchgeführt um Prävalenzen verschiedener CED-relevanter Parameter zu bestimmen. PAK zeigen Assoziationen zu einem differenzierbaren klinischen Phänotyp, allerdings ist die Funktion der pankreatischen Antigene bislang unbekannt. Da Hinweise auf Interaktionen mit Mikroorganismen bestehen, wurden die PAg rekombinant hergestellt und weiterführend auf Interaktionen untersucht.

5.1 Klinische Relevanz von pankreatischen Autoantikörpern in der Diagnostik von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind die beiden Hauptentitäten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Eine Differentialdiagnostik zur Abgrenzung anderer, den Darm betreffenden Krankheiten, bedingen im klinischen Alltag invasive endoskopische Techniken, die den Leidensdruck der Patienten weiter erhöhen. Ferner können bis zu 10% der CED-Fälle nicht eindeutig in CU oder MC unterschieden werden (Henriksen *et al.*, 2006).

Die vorliegende Studie untersucht mit Fokus auf PAK retrospektiv die Assoziation vom klinischen Phänotyp zum Vorkommen von (Auto-) Antikörpern in einem Patientenkollektiv mit gesicherter CED-Diagnose. Klinische Daten zum Alter der Patienten bei Erstdokumentation, Erkrankungsdauer, EIM und überlappende Krankheiten sowie Therapie und Medikation wurden erhoben. Dazu wurde der serologische Antikörperstatus zu den Parametern ANCA (pANCA), ASCA, Anti-DNS geb. LF, BAK und PAK, differenziert nach Immunglobulinklasse A (IgA) und G (IgG), bestimmt und statistisch bewertet.

Diese Studie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Sina, Gastroenterologie, Universität zu Lübeck und dem Institut für experimentelle Immunologie der Euroimmun AG durchgeführt.

5.1.1 Studienkollektiv

Zwischen 2005 und 2013 wurden insgesamt 577 Patienten mit CED-Symptomatik untersucht. Für den finalen Studieneinschluss wurden lediglich Patienten mit einer gesicherten CU- oder MC-Diagnose ausgewählt. Eine Diagnose galt als gesichert, wenn zur typischen klinischen Symptomatik die Endoskopie, Radiologie und/oder histologische Befunde übereinstimmten. Bei einem widersprüchlichen Befund mussten zwei weitere gleichartige Befunde mit entsprechender Diagnose vorliegen. Final wurden 360 Patienten mit einem Durchschnittsalter von ca. 40 Jahren in die Studie eingeschlossen (Tabelle 2-2). 136 Patienten dieser deutschen Kohorte zeigen eine gesicherte CU-Diagnose (entspricht 37,8%). 224 MC-Patienten (62,2%) waren involviert. Der Frauenanteil lag in der CU-Kohorte bei 54,4%, bei MC 64,3%.

Ferner wurden aus diesem Kollektiv 74 CED-Patienten (28 CU, 48 MC) im zeitlichen Verlauf untersucht, um longitudinale Aussagen zur (Auto-) Antikörper-Stabilität treffen zu können.

Tabelle 5-1 Übersicht Studienkollektiv

Parameter	CU (N=136)			MC (N=224)		
	Median	25% Quantil	75% Quantil	Median	25% Quantil	75% Quantil
Patientenalter bei erster CED-Dokumentation	30	21	44	25	19	36,8
Patientenalter in der Studie	42	30,3	54,8	39	29	50
Erkrankungsdauer [Jahre]	6	2	12,3	9,5	3	18
Anzahl operative Eingriffe	0	0	0	1	0	2

Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der Universität zu Lübeck genehmigt (Ethikvotum AZ 13/084A; AZ 05-112).

5.1.2 Ermittelte Prävalenzen serologischer Parameter

Von allen Patientenseren des Kollektivs wurde der (Auto-) Antikörperstatus bestimmt (Tabelle 5-2). Spezifische Signale ab einer Serum-Verdünnungsstufe von 1:10 wurden in der IIFT als positiv bewertet (Ausnahme ASCA: ASCA-IgA wurde ab einer Verdünnungsstufe von 1:100 positiv bewertet, ASCA-IgG ab 1:1.000).

Die serologischen Tests wurden im Institut für experimentelle Immunologie der Euroimmun AG durchgeführt.

Spezifische Signale zeigten unterschiedliche Muster auf den jeweiligen Substraten. Abb. 5-2 zeigt beispielhaft die IIFT-Muster von Anti-CUZD1, Anti-GP2, ASCA, BAK, AAK gegen DNS gebundenes Lactoferrin (DNS-geb. Lf) und pANCA.

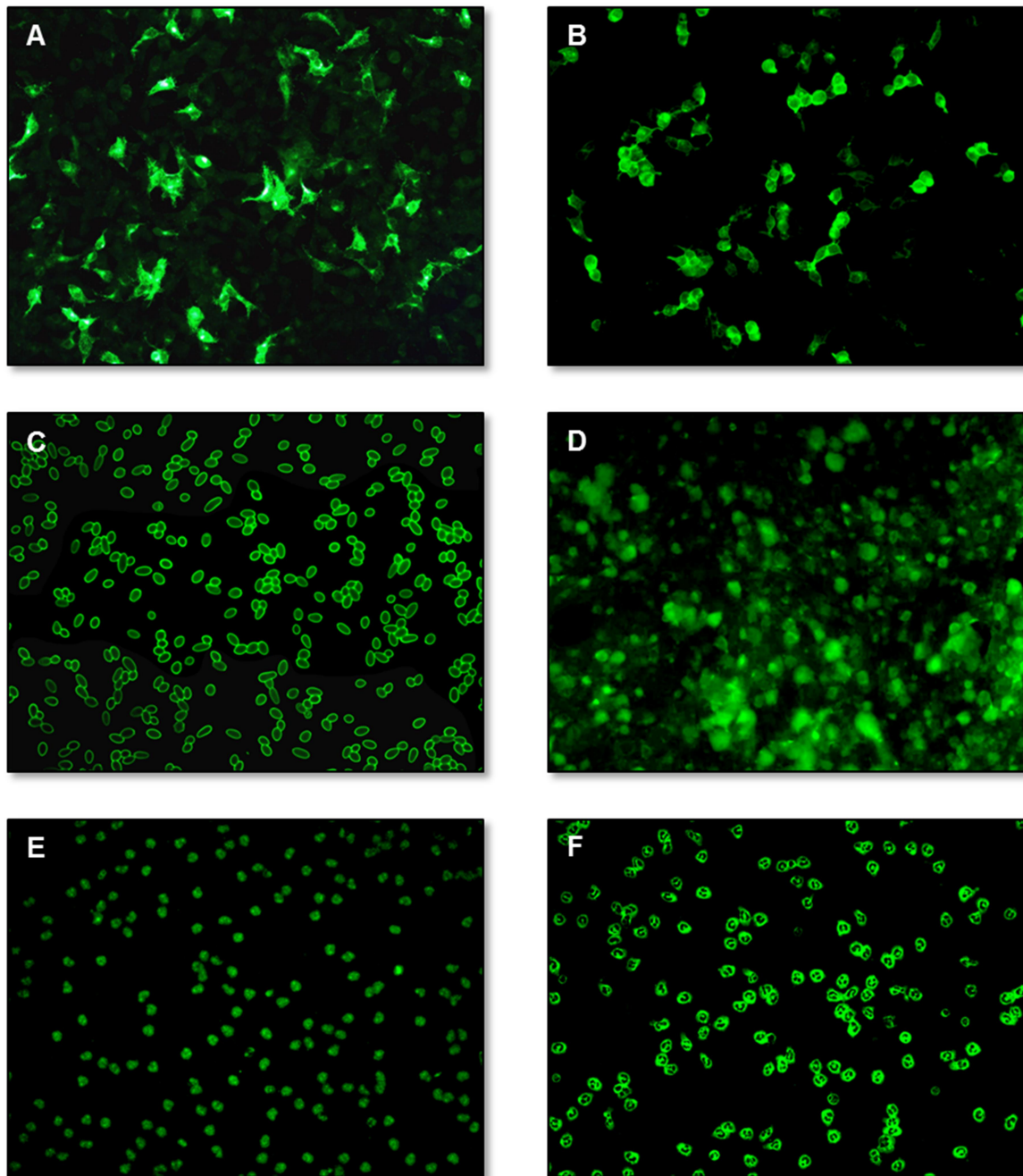


Abb. 5-2 IIFT, spezifische Signale unterschiedlicher Substrate zur serologischen Untersuchung von CED-Patienten

Substrate: A: CUZD1-produzierende HEK-Zellen, Vergrößerung 200-fach, B: GP2-produzierende HEK-Zellen, 200-fach, C: *S. cerevisiae*, 400-fache Vergrößerung, D: Becherzellen, 200-fach, E: DNS-geb. Lf auf Granulozyten, 200-fach, F: pANCA, 200-fach, Detektion: AAK-positives CED-Patientenserum, Reporterantikörper: Anti-Human IgG, FITC-konjugiert, Kameraeinstellungen: Belichtung: 300 ms, Grünverstärkung, Kontrast: 1, Gammakorrektur: 1,5.

Tabelle 5-2 Absolute und relative Häufigkeit von (Auto-) Antikörpern im CED-Kollektiv

Die jeweiligen serologischen Parameter wurden auf spezifische IgA und IgG mittels IIFT untersucht. IgA/IgG: (Auto-) Antikörper der Klassen IgA *oder* IgG wurden gefunden, IgA+IgG: (Auto-) Antikörper der Klassen IgA *und* IgG liegen gemeinsam vor

Serologische Parameter		CU (N=136)		MC (N=224)	
		Häufigkeit im Patientenkollektiv		Häufigkeit im Patientenkollektiv	
		Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]	Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]
Anti-CUZD1	IgA	4	2,9	36	16,1
	IgG	6	4,4	40	17,9
	IgA/IgG	8	5,9	56	25,0
	IgA+IgG	2	1,5	22	9,8
Anti-GP2	IgA	4	2,9	23	10,3
	IgG	0	0,0	35	15,6
	IgA/IgG	4	2,9	42	18,8
	IgA+IgG	0	0,0	17	7,6
ASCA	IgA	9	6,6	89	39,7
	IgG	3	2,2	101	45,1
	IgA/IgG	11	8,1	116	51,8
	IgA+IgG	1	0,7	75	33,5
BAk	IgA	3	2,2	1	0,4
	IgG	6	4,4	1	0,4
	IgA/IgG	6	4,4	1	0,4
	IgA+IgG	3	2,2	1	0,4
DNS-geb. Lf	IgA	17	12,5	4	1,8
	IgG	63	46,3	8	3,6
	IgA/IgG	64	47,1	10	4,5
	IgA+IgG	16	11,8	2	0,9
pANCA	IgA	54	39,7	12	5,4
	IgG	83	61,0	35	15,6
	IgA/IgG	94	69,1	40	17,9
	IgA+IgG	50	36,8	11	4,9

Die ermittelten Prävalenzen korrelieren zu vergleichbaren Studien (Kuna, 2013). Auffällig war, dass die wenigen CU-Patienten mit spezifischen Autoantikörpern

gegen GP2 (N=4) nur Immunglobuline der Klasse A aufwiesen. ASCA der Subklasse IgG wurden nur bei 2,2% (N=3) der CU-Patienten gefunden, bei MC 45,1% (N=101). Betrachtet man das gleichzeitige Vorhandensein von IgA und IgG Antikörpern spezifisch für *S. cerevisiae*, sinkt die Prävalenz in der CU-Kohorte auf 0,7% (N=1), bei MC auf 33,5% (N=75). DNS-geb. Lf zeigt beim gleichzeitigen Auftreten von spezifischen IgA und IgG Autoantikörpern bei CU 11,8% (N=16), MC hingegen nur 0,9% (N=2).

Bei semi-quantitativer Betrachtung der untersuchten (Auto-)Antikörper durch Titration der Serumproben auf den verschiedenen Substraten konnten Unterschiede zwischen der CU- und MC-Kohorte gezeigt werden (Abb. 5-3): Autoantikörper gegen CUZD1 (Median CU=1:32 [N=8], MC=1:100 [N=56]) und GP2 (Median CU=1:32 [N=4], MC=1:320 [N=42]) sowie ASCA (Median CU=1:320 [N=11], MC=1:1.000 [N=116]) zeigen stärkere spezifische Signale in der MC-Kohorte. DNS-geb. Lf (Median CU=1:100 [N=64], MC=1:32 [N=10]) sowie pANCA (Median CU=1:100 [N=94], MC=1:55 [N=40], P=0,042*) zeigten serologisch hohe spezifische AAK-Titer bei CU-Patienten.

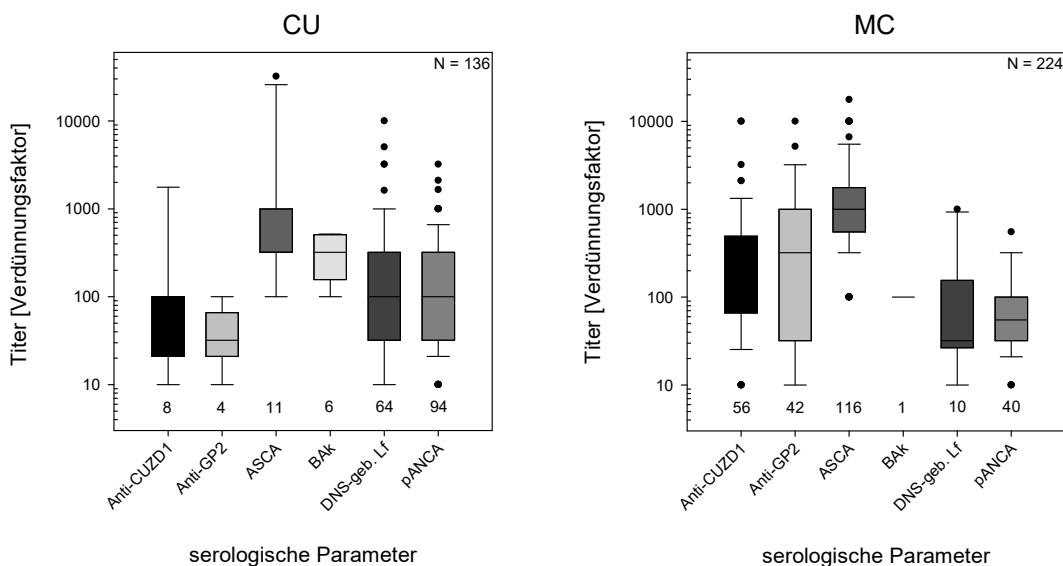


Abb. 5-3 Titer serologischer Parameter bei spezifischem Signal

Autoantikörper gegen CUZD1 und GP2 zeigen in der MC-Kohorte erhöhte Titer gegenüber CU-Patienten. Antikörper gegen Zielantigene in neutrophilen Granulozyten (pANCA) liegen mit erhöhten Titerstufen in der CU-Kohorte vor. Titerstufen beziehen sich auf spezifische und positive IgA- oder/und IgG-Signale. Zahlenangaben zeigen absolute Werte der Auszählung.

Mit Hilfe der einzelnen serologischen Tests lassen sich somit differentialdiagnostische Aussagen treffen (Abb. 5-4). CU-Patienten zeigen eine Häufung von pANCA (69,1% CU zu 17,9% MC, Quotenverhältnis (OR) = 12,69) und AAK gegen DNS-geb. Lf (47,1% CU zu 4,5% MC, OR=19,02). In 79,4% der CU-Kohorte konnten pANCA oder AAK gegen DNS-geb. Lf nachgewiesen werden. MC-Patienten zeigen vor allem ASCA (51,8% MC zu 8,1% CU, OR=12,65) und AAK gegen CUZD1 (25,0% MC zu 5,9% CU, OR=5,97) sowie GP2 (18,8% MC zu 2,9% CU, OR=7,61). 59,4% der MC-Patienten zeigen ASCA oder PAK.

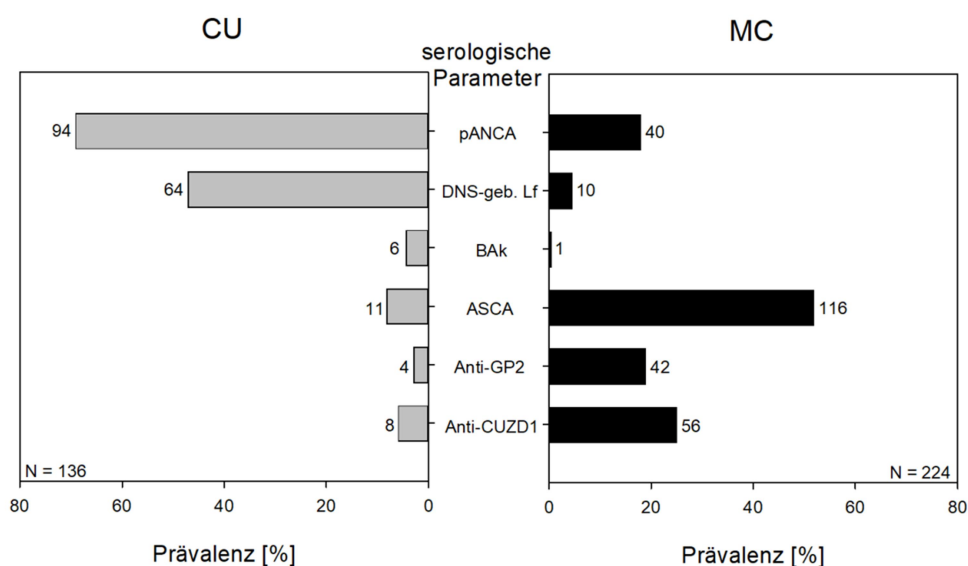


Abb. 5-4 Prävalenzen der untersuchten serologischen Parameter im CED-Kollektiv

CU-Patienten (linke Seite) sind hoch prävalent für pANCA und DNS-geb. Lf. MC-Patienten (rechte Seite) zeigen eine erhöhte Prävalenz bei ASCA sowie AAK gegen GP2 und CUZD1 sowie. Angaben zu Prävalenzen beziehen sich auf spezifische und positive IgA- oder/und IgG-Signale. Zahlenangaben im Diagramm zeigen absolute Werte (N) der Auszählung.

5.1.3 Konkordanzen pankreatischer Antigene

Erste serologische PAK-Untersuchungen wurden auf Pankreasgewebe durchgeführt (Stöcker *et al.*, 1987). Spezifische Signale wurden zwischen einem netzgranulären- und einem tropfigen Muster unterschieden. Später konnten die Zielantigene CUZD1 und GP2 den Mustern zugeordnet werden (Komorowski *et al.*, 2013; Aulinger-Stöcker, 2017). Bis zur Verfügbarkeit rekombinanter Substrate (RC-IFT) wurde weiterhin Pankreasgewebe in der Diagnostik genutzt. Tabelle 5-3 zeigt die serologischen Ergebnisse der CED-Kohorte auf Pankreas.

Tabelle 5-3 Untersuchung der CED-Seren auf Pankreas-Gewebe

CUZD1 und GP2 spezifische AAK zeigen serologisch in der IIFT auf Pankreasgewebe unterschiedliche Muster: CUZD1 zeigt ein netzig-granuläres Muster im Zytoplasma von Azinuszellen, GP2 ein tropfiges Muster im Lumen der Azini.

Serologische Parameter	Häufigkeit im Patientenkollektiv				
	CU (N=136)		MC (N=224)		
	Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]	Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]	
Pankreas, netziges Muster	IgA	4	2,9	30	13,4
	IgG	4	2,9	38	17,0
	IgA/IgG	6	4,4	49	21,9
	IgA+IgG	2	1,5	19	8,5
Pankreas, tropfiges Muster	IgA	4	2,9	16	7,1
	IgG	0	0,0	35	15,6
	IgA/IgG	4	2,9	36	16,1
	IgA+IgG	0	0,0	15	6,7

Im Vergleich zu rekombinanten Substraten (Tabelle 5-2, CUZD1 und GP2) zeigt sich, dass alle Patientenseren, die auf Pankreas positiv bewertet wurden, auch auf den rekombinanten Substraten ein spezifisches Signal zeigen. Allerdings ist die Sensitivität bei MC auf den Pankreassubstraten geringer (CUZD1: Pankreas 21,9%, rekombinant 25,0%, GP2: Pankreas 16,1%, rekombinant 18,8%). Rekombinante Substrate zeigen somit Vorteile gegenüber Pankreas und wurden im Folgenden ausschließlich für die weiteren Untersuchungen verwendet.

PAk und ASCA geben wie in 5.1.2 beschrieben Hinweise auf MC. 7,1% der MC-Patienten sind sowohl positiv für Anti-CUDZ1 als auch Anti-GP2 (0,7% bei CU). Ein gleichzeitiges Vorkommen von AAK gegen CUZD1 und ASCA erhöht die Spezifität für MC im untersuchten CED-Kollektiv auf 100%, Anti-GP2 und ASCA auf 98,5% (Angaben der Einzelprävalenzen sind in Tabelle 5-4 angegeben). Vor allem das Auftreten von IgG-spezifischen AAK gegen PAg und ASCA sind serologisch ein starker Hinweis auf MC. Konkordanzen zwischen pANCA und PAK (CU: 6,6%, MC: 4,5%) sowie DNS-geb. Lf und PAK (CU: 0,7%, MC: 0,4%) sind differentialdiagnostisch nicht aussagekräftig. Lediglich das gemeinsame Vorkommen von pANCA und DNS-geb. Lf gibt Hinweise auf CU (CU: 38,2%, MC: 3,6%).

Tabelle 5-4 Konkordanz PAK und ASCA

Überblick über das gemeinsame Auftreten von CUZD1 bzw. GP2 spezifischen Antikörpern und ASCA.

Serologische Parameter		CU (N=136)		MC (N=224)	
		Häufigkeit im Patientenkollektiv		Häufigkeit im Patientenkollektiv	
		Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]	Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]
Anti-CUZD1 und ASCA	IgA	0	0,0	17	7,6
	IgG	0	0,0	24	10,7
	IgA/IgG	0	0,0	32	14,3
	IgA+IgG	0	0,0	9	4
Anti-GP2 und ASCA	IgA	2	1,5	12	5,4
	IgG	0	0,0	22	9,8
	IgA/IgG	2	1,5	25	11,2
	IgA+IgG	0	0,0	9	4,0

5.1.4 Titer-Untersuchung von spezifischen Autoantikörpern im zeitlichen Verlauf

Einem Subkollektiv der untersuchten CED-Patienten wurden mehrfach Serumproben entnommen, um die serologische Titerentwicklung von spezifischen AAK im zeitlichen Verlauf zu beurteilen. Eingeschlossen wurden 28 CU- und 48 MC-Patienten, die in einem Zeitraum von bis zu drei Jahren zwei bis sieben Blutabnahmen aufwiesen (Median Zeitperiode zwischen zwei Blutabnahmen: 426 Tage). Für die Bewertung der Daten wurde bei positivem AAK-Befund die relative Änderung der Titerstufen betrachtet (zugrundeliegende Verdünnungen der Seren: 1:10, 1:32, 1:100, 1:320, 1:1.000, 1:3.200, 1:10.000). Die Titerstufe der Erst-Dokumentation galt dabei als Starttiter (0-Titer). Titeränderungen um jeweils eine Stufe nach unten/oben wurden als nicht spezifisch betrachtet (zugelassene Fehlertoleranz im Detektionssystem). Die Untersuchung der einzelnen Patienten erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. Dies machte eine Kategorisierung der Zeit nötig. So wurde folgende Klassifizierung der Zeit nach Erst-Dokumentation vorgenommen: wiederholte Probennahme nach 0-4 Monaten, zwischen 5 Monaten – 1 Jahr, zwischen 1-3 Jahre. Die Seren wurden entsprechend ihres Abnahmedatums bezogen auf die Erst-Dokumentation in diese Kategorien eingeteilt und mit anderen Patienten verglichen. Es zeigte sich, dass die

serologisch untersuchten AAK über den Zeitraum von bis zu drei Jahren stabil blieben (Abb. 5-5 und Abb. 5-6). Bei CUZD1-positiven MC-Patienten (N=19) konnte zwar eine leichte Abnahme der Titer detektiert werden (0-4 Monate: IgA -0,90 Titerstufen (TS) im Mittel, IgG -0,67 TS, 5 Monate – 1 Jahr: IgA -0,67 TS, IgG -0,78 TS, 1-3 Jahre: IgA -0,93 TS, IgG -0,08 TS), allerdings ist diese Abnahme nicht signifikant (p: IgA 0,90, IgG 0,17) und liegt noch immer in der tolerierten Fehlervarianzen des Experiments (Abb. 5-5). Ähnliches zeigt sich bei der Betrachtung von Anti-GP2 positiven MC-Patienten (N=12, p: IgA 0,187, IgG 0,174: 0-4 Monate: IgA -0,25 TS im Mittel, IgG -0,75 TS, 5 Monate - 1 Jahr: IgA 0,60 TS, IgG -0,20 TS, 1-3 Jahre: IgA 1,00 TS, IgG -0,67 TS). Die Signale ASCA-positiver MC Patienten (N=28) sind über den gewählten Zeitraum geradezu konstant: 0-4 Monate: IgA 0,50 TS im Mittel, IgG 0,00 TS, 5 Monate – 1 Jahr: IgA -0,07 TS, IgG 0,21 TS, 1-3 Jahre: IgA -0,07 TS, IgG -0,17 TS, p: IgA 0,186, IgG 0,452).

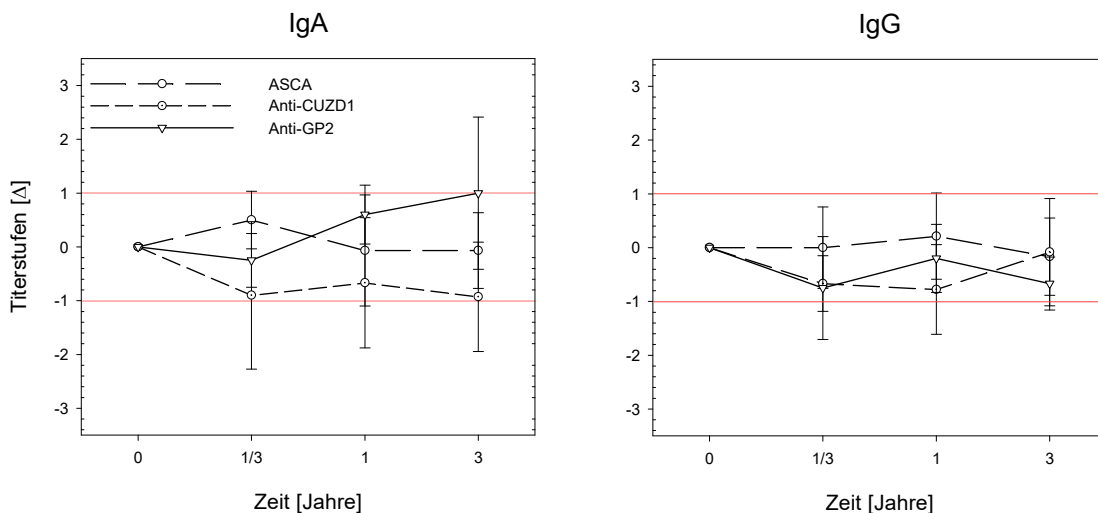


Abb. 5-5 Titerentwicklung bei Anti-CUZD1-, Anti-GP2- bzw. ASCA positiven MC-Patienten im zeitlichen Verlauf

Ausgehend von den Signalen zum Zeitpunkt 0 wurden die Mittelwerte der relativen Titeränderungen je Patient und Zeiteinheit differenziert nach AAK-Typ (IgA und IgG) aufgetragen. Es konnten keine signifikanten Änderungen detektiert werden. 0 Jahre: Ermittlung initialer Titer, 1/3 Jahre: Probenentnahmen zwischen 0-4 Monate, 1 Jahr: Probenentnahmen zwischen 5 Monaten bis 1 Jahr, 3 Jahre: Probenentnahmen 1-3 Jahre, rote Linien markieren die tolerierten Varianzen des Detektionssystems.

Für die Beurteilung von Anti-DNS-geb. Lf und pANCA wurden CU-Patienten untersucht. Auch bei diesen Parametern zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Titer über den gewählten Zeitraum (Anti-DNS-geb. Lf: N=17, 0-4 Monate: IgA

nicht erhoben, IgG 0,17 TS im Mittel, 5 Monate – 1 Jahr: IgA 0,60 TS, IgG -0,21 TS, 1-3 Jahre: IgA 0,14 TS, IgG 0,32 TS, p: IgA 0,454, IgG 0,780, pANCA: N=21, 0-4 Monate: IgA 0,33 TS im Mittel, IgG 0,29 TS, 5 Monate – 1 Jahr: IgA 0,30 TS, IgG -0,25 TS, 1-3 Jahre: IgA 0,60 TS, IgG 0,94 TS, p: IgA 0,869, IgG 0,063, Abb. 5-6). Das Subkollektiv enthielt weiterhin vier CU- sowie zehn MC-Patienten, die zum Zeitpunkt null bei den betrachteten Parametern AAK-negativ waren. Diese Patienten entwickelten im beobachteten Untersuchungszeitraum keine AAK.

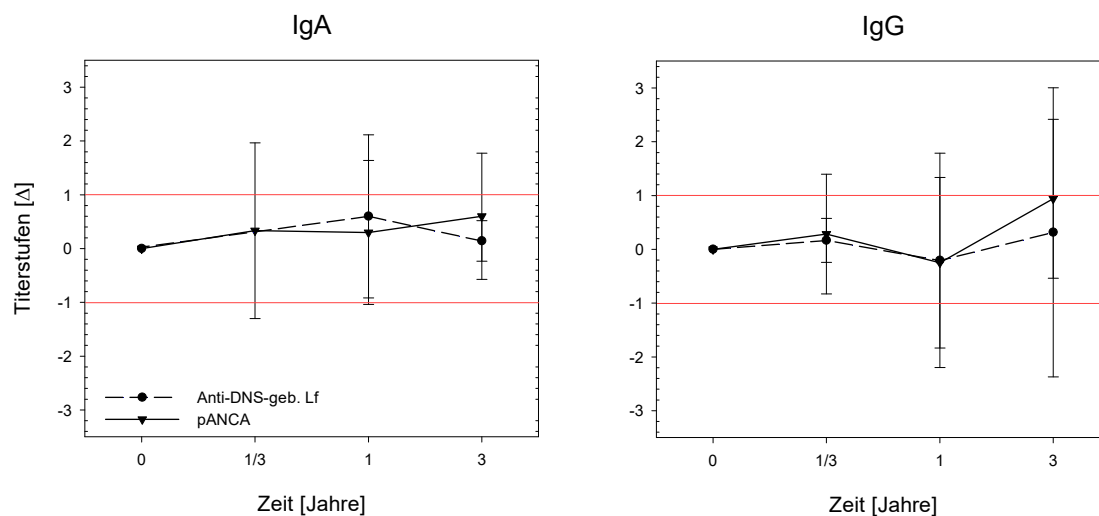


Abb. 5-6 Titerentwicklung bei Anti-DNS-geb. Lf.- bzw. pANCA positiven CU-Patienten im zeitlichen Verlauf

Auch die untersuchten Anti-DNS-geb. Lf.- bzw. pANCA positiven CU-Patienten zeigten keine Änderungen der Titer im zeitlichen Verlauf.

5.1.5 CUZD1 und GP2 sind klinisch relevante Antigene bei CED

Zum CED-Kollektiv wurden ebenso klinische Daten erhoben. Die Auswertung und Korrelation dieser Daten zur Serologie erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Sina, Gastroenterologie, Universität zu Lübeck.

Es konnte gezeigt werden, dass Anti-CUZD1 positive MC-Patienten ein signifikant jüngeres Patientenalter bei Erstdiagnose aufweisen (Anti-CUZD1 positiv 19,5 Jahre; negativ 27,5 Jahre; $p < 0,001^{***}$; Tabelle 5-5). Daraus resultiert auch das jüngere Patientenalter bei AAK-Testung. In Tabelle 5-6 sind weitere klinische Daten korreliert mit dem Auftreten von AAK spezifisch für CUZD1 aufgeführt. Auffällig ist, dass die Entzündung dabei meist ileokolisch auftritt (OR=2,360, $p=0,016^*$). Eine isolierte Lokalisation im Ileum ist dagegen nur gering prävalent (OR=0,212, $p=0,007^{**}$).

Ergebnisse

Tabelle 5-5 Korrelation MC-Patientendaten und AAK gegen CUZD1

Zahlenangaben als Median bzw. Signifikanzen, Daten auf Basis von 224 MC-Patienten

	Anti-CUZD1 positiv	Anti-CUZD1 negativ	p
Patientenalter bei AAK-Testung	35,0	41	0,015*
Erstdiagnose, Patientenalter	19,5	27,5	<0,001***
Erkrankungsdauer, Jahre	11	9	0,167
chirurgische Eingriffe, Anzahl	1	1	0,156

Des Weiteren zeigen sich signifikant perianale Komplikationen bei Anti-CUZD1 positiven MC-Patienten (OR=2,609, p=0,002**). Die Sensitivität beträgt dabei 37,8%, die Spezifität 81,1%. Der positive prädikative Wert (PPV) entspricht dabei 50%, die Segreganz (NPV) 72,3%.

Tabelle 5-6 Häufigkeitsverteilung klinischer Daten in Abhängigkeit von AAK gegen CUZD1

medizinische Parameter		Parameter positiv, %	Parameter negativ, %	OR	p
Geschlecht, weiblich		25,0	25,0	1	1
Lokalisierung der Entzündung	Ileum	7,9	28,8	0,212	0,007**
	Kolon	23,1	25,7	0,868	0,734
	ileokolisch	30,3	15,6	2,360	0,016*
	oberer GI	34,4	23,9	1,665	0,210
Manifestation der Entzündung	nicht strikturierend, nicht penetrierend	21,7	26,4	0,776	0,445
	strikturierend	25,3	23,6	1,099	0,778
	penetrierend	29,0	23,4	1,340	0,500
	perianal	37,8	18,9	2,609	0,002**
EIM (nicht differenziert)		33,3	22,0	1,778	0,081
Medikation	Kortikosteroide	21,9	26,5	0,777	0,457
	Immunsuppressiva	29,1	20,9	1,552	0,161
	Anti-TNF	20,8	25,5	0,768	0,617
	Salicylate	22,5	26,4	0,808	0,517

Anti-GP2 positive Patienten zeichnen sich ebenso durch ein jüngeres Erkrankungsalter (Anti-GP2 positiv 20 Jahre, negativ 26 Jahre, $p=0,003^{**}$, Tabelle 5-7) und einen damit längeren Krankheitsverlauf aus (Anti-GP2 positiv 14 Jahre, negativ 9 Jahre, $p=0,003^{**}$).

Tabelle 5-7 Korrelation MC-Patientendaten und AAK gegen GP2

Zahlenangaben als Median bzw. Signifikanzen, Daten auf Basis von 224 MC-Patienten

	Anti-GP2 positiv	Anti-GP2 negativ	p
Patientenalter bei AAK-Testung	36,5	39	0,466
Erstdiagnose, Patientenalter	20	26	0,003**
Erkrankungsdauer, Jahre	14	9	0,046*
chirurgische Eingriffe, Anzahl	1	1	0,948

Die Entzündungen unterscheiden sich deutlich zur Kohorte mit Anti-CUZD1 AAK. Klinischen Daten in Assoziation zu AAK gegen GP2 bei MC-Patienten werden in Tabelle 4-8 gezeigt. Eine ileokolische Lokalisation konnte nicht festgestellt werden. Der Kolon ist bei dieser Patientengruppe signifikant weniger betroffen als andere Darmbereiche (OR=0,193, $p=0,015^*$). Die Manifestation der Entzündung ist allerdings strikturierend (OR=2,441, $p=0,016^*$, Sensitivität=25,3%, Spezifität=87,8%, PPV=57,1%, NPV=64,6%), was weitere Komplikationen wie Stenosen im Krankheitsverlauf auslösen kann. Auch zeigt sich in dieser Kohorte eine Assoziation zur Medikation: so treten GP2 spezifische AAK signifikant häufiger bei der Gabe von Immunsuppressiva wie Azathioprin auf (OR=0,193, $p=0,015^*$). Mit Hilfe dieser Ergebnisse lassen sich ggf. Therapien anpassen.

Die klinischen Daten belegen die Assoziation von PAK und MC. Ein Zusammenhang von PAK zu chirurgischen Eingriffen, Geschlecht des Patienten und EIM konnte nicht festgestellt werden. Allerdings zeigten die wenigen Anti-GP2 IgA positiven CU-Patienten PSC als überlappende Krankheit.

Ergebnisse dieser Studie wurden publiziert (Michaels *et al.*, 2015).

Tabelle 5-8 Häufigkeitsverteilung klinischer Daten in Abhängigkeit von AAK gegen GP2

medizinische Parameter		Parameter positiv, %	Parameter negativ, %	OR	p
Geschlecht, weiblich		15,3	25,0	0,541	0,074
Lokalisierung der Entzündung	Ileum	21,1	18,5	1,176	0,712
	Kolon	5,1	21,9	0,193	0,015*
	ileokolisch	22,1	13,0	1,897	0,100
	oberer GI	21,9	18,6	1,224	0,665
Manifestation der Entzündung	nicht strikturierend, nicht penetrierend	13,0	20,9	0,567	0,141
	strikturierend	25,3	12,2	2,441	0,016*
	penetrierend	9,7	18,7	0,465	0,221
	perianal	24,3	16,2	1,661	0,146
EIM (nicht differenziert)		21,7	17,7	1,288	0,499
Medikation	Kortikosteroide	20,5	18,4	1,149	0,698
	Immunsuppressiva	25,5	12,7	2,341	0,016**
	Anti-TNF	16,7	19,4	0,832	0,749
	Salicylate	18,8	19,3	0,966	0,923

5.2 Entwicklung PAK-spezifischer ELISA

Um die Ergebnisse der IIFT zu validieren wurden PAK-spezifische ELISA entwickelt. Für eine entsprechende Plattenbeschichtung wurden Strategien zur rekombinanten Darstellung von CUZD1 und GP2 (α - und β -Isomer) erarbeitet.

5.2.1 Anreicherung von CUZD1

Für *in vitro* Untersuchungen wurde CUZD1 rekombinant aus eukaryotischer Produktion (Fa. Euroimmun) dargestellt. Dafür wurde nach entsprechender Klonierung die genetische Information mittels Polyethylenimin in HEK-Zellen transfiziert. Nach sieben-tägiger Expression des Zielproteins in Zellkultur bei 37°C, 8% (v/v) Kohlenstoffdioxid und 95% relative Luftfeuchte wurde sezerniertes CUZD1 aus dem Kulturmedium angereichert.

Die Anreicherungsstrategie umfasst mehrere sequenzielle Einzelschritte (Abb. 5-7). Kulturüberstand mit sezerniertem Zielprotein wurde im initialen Schritt der Prozessierung sequenziell mit Ammoniumsulfat gefällt (Sedimentierung von CUZD1 bei 45% (w/v) Ammoniumsulfat). Nach Umpufferung (TN-Puffer) folgten Methoden der FPLC (Abb. 5-8): mit Hilfe vom multimodalen *capto adhere*-Säulenmaterial (ionische- und hydrophobische Interaktionen sowie Ausbildung von Wasserstoffbrücken) konnte bereits ein Anreicherungsgrad von >80% erreicht werden. Um weitere Bestandteile des Kulturmediums wie Rinderserumalbumine (BSA) oder Makroglobuline abzutrennen wurde das fraktionierte Zwischenprodukt über HIC aufgearbeitet. CUZD1 erfährt in diesem Schritt keine Retention und ist im Säulendurchfluss nach Probenauftrag vorhanden, Mediumproteine wurden abgetrennt. Im letzten Schritt wurde CUZD1 isokratisch über SEC angereichert. Interessanterweise eluiert CUZD1 direkt nach dem Totvolumen der Säule. Dies ist ein biochemischer Hinweis auf einen hohen Aggregationsgrad des Zielproteins. Im Anschluss wurde das Präparat konzentriert. CUZD1 zeigte in unspezifischen Färbungen der Gelelektrophorese keine Signale. Der Nachweis erfolgt im Western Blot und ELISA. Die Bestätigung der Signale wurde in der Massenspektrometrie erbracht (hier nicht dargestellt). Neben ELISA und Western Blot wurde die immunologische Aktivität von CUZD1-Präparaten in der kompetitiven IIFT getestet (Abb. 5-9). Die Inkubation vom Präparat mit Anti-CUZD1 IgG positiven CED-Patientenseren führte zur signifikanten Signalsenkung in der IIFT. Das dargestellte CUZD1 ist immunologisch aktiv und konnte für weiterführende Experimente genutzt werden.

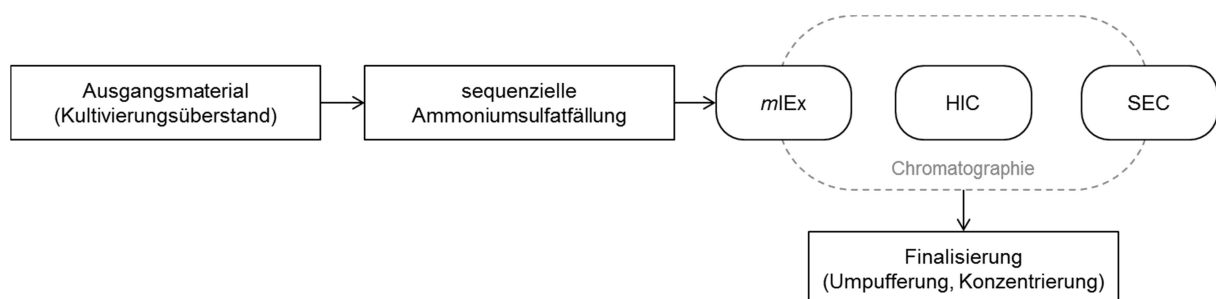


Abb. 5-7 Strategie zur Darstellung von CUZD1

Rekombinantes CUZD1 wurde in HEK-Zellen produziert und extrazellulär sezerniert. Anschließend wurde das Zielprotein aus dem Kulturüberstand gefällt (45% (w/v) Ammoniumsulfat) und über multimodalen Ionenaustauscher (Capto adhere, mIEx), hydrophobe Interaktion (Octylsepharose, HIC) und Gelfiltration (S200pg, SEC) angereichert. Nach erfolgreicher Darstellung wurde das Protein bei -80°C gelagert.

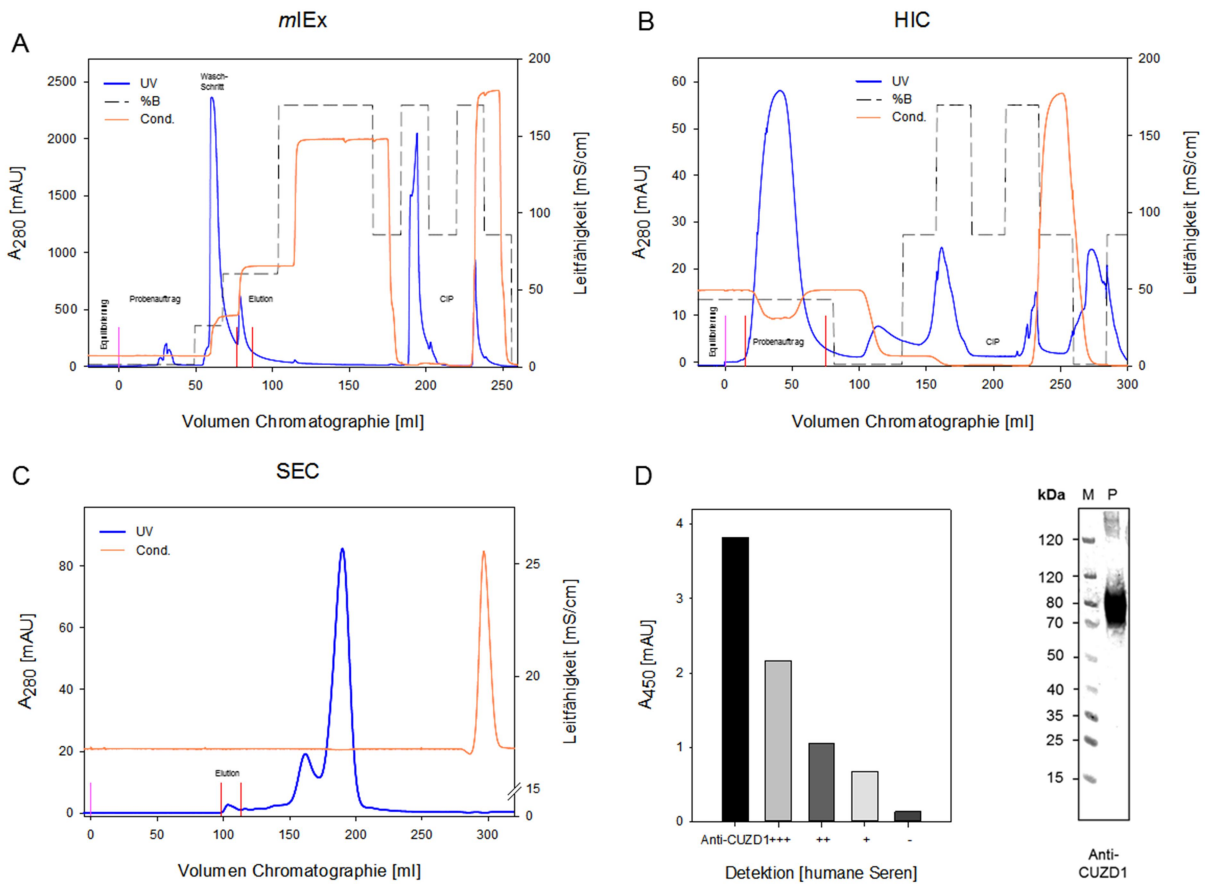


Abb. 5-8 Darstellung von CUZD1

CUZD1 wurde über verschiedene chromatographische Anreicherungsschritte dargestellt: (A) Nutzung eines multimodalen Ionenaustauschers (*capto adhere*, mIEX). Die Elution von CUZD1 im HEPES-gepufferten wässrigen System erfolgte mit 150 mM NaCl. Entsprechende Fraktionen wurden gepoolt und (B) mittels hydrophober Interaktion (Octylsepharose, HIC) prozessiert. CUZD1 erfährt in dieser Chromatographie keine Retention auf der Säule. Allerdings können so weitere Bestandteile des Kulturmediums (z. B. Makroglobuline) abgetrennt werden. Im finalen Schritt der Anreicherung wurde (C) eine Gelfiltration (SEC) durchgeführt. CUZD1 eluiert in dieser isokratischen Methode direkt nach dem Totvolumen der Säule. Dies ist ein Hinweis auf ein großes hydrodynamisches Volumen vom Zielprotein. Der Nachweis von CUZD1 wurde über (D) Capture-ELISA unter Verwendung eines monoklonalen CUZD1-spezifischen Fängerantikörpers und polyklonalem CUZD1-spezifischem Kaninchen- bzw. auch humanen Patientenseren (Charakterisierung in der IIFT, +++: Anti CUZD1-IgG hoch positiv, ++: positiv, +: schwach positiv, -: negativ) sowie im Western Blot erbracht (M: Marker, P: CUZD1-Präparat). In der Massenspektrometrie konnte CUZD1 eindeutig identifiziert werden. Elution von CUZD1 in dem jeweiligen Chromatogramm rot markiert.

5.2.2 Anreicherung von α GP2

Die Strategie zur Darstellung von rekombinantem α GP2 umfasst verschiedene, aufeinanderfolgende Einzelschritte (Abb. 5-10).

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung von rekombinantem GP2 wurde Biomaterial eines eukaryotischen Expressionssystem genutzt (HEK-Zellen).

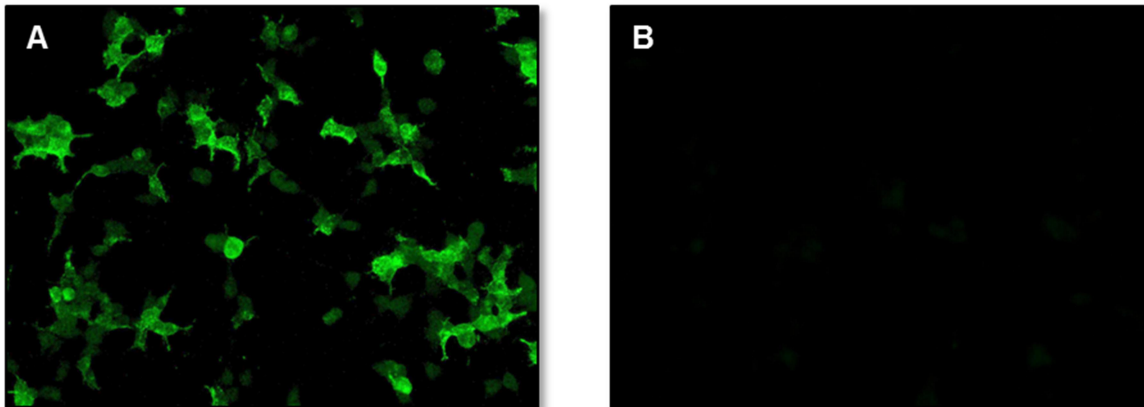


Abb. 5-9 Validierung des dargestellten CUZD1

Kompetitive IIFT zur Überprüfung des dargestellten rekombinanten CUZD1. Die Detektion erfolgte mit humanem Anti-CUZD1 IgG positivem Patientenserum (MC-Patient). In der Competition (Verdünnung CUZD1 1:10) zeigte sich eine deutliche Signalsenkung. Das Präparat ist immunologisch aktiv. Reporter: Anti-Human FITC, Vergrößerung: 200-fach, Kameraeinstellungen: Belichtung 300 ms, Grünverstärkung, Kontrast: 1, Gammakorrektur: 1,5.

Über ein Sekretionssignal wird GP2 aus den Zellen ausgeschleust, über einen GPI-Anker jedoch an die Zelloberfläche lokalisiert. Am GPI-Anker von GP2 wurde eine Factor Xa-Schnittstelle auf molekularer Ebene hinzugefügt. Damit konnte das GP2 enzymatisch freigesetzt werden (pro Hyperflask® wurden 10 µg Factor Xa hinzugegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert). Nach Zentrifugation (10 min, 2900 x g, 4°C) wurden die Zellen verworfen. Der GP2-haltige Zellkulturüberstand wurde für die anschließende IMAC vorbereitet: zur Minimierung von unspezifischen Bindungen an die Säule wurden dem Zellkulturüberstand 20 mM Imidazol zugegeben (Puffer TNI20MT, 10-fach Konzentrat) und der pH mit Natriumhydroxid auf pH 8 eingestellt.

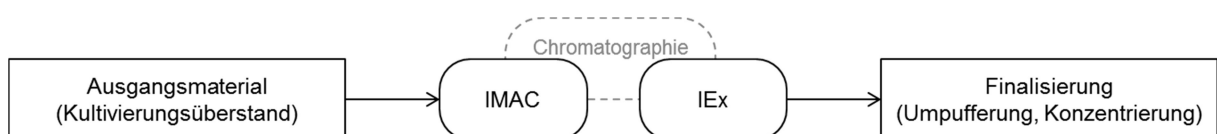


Abb. 5-10 Strategie zur Darstellung von αGP2

αGP2 wird aus Zellkultivierungsüberstand aufgearbeitet. Mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) kann bereits ein hoher Anreicherungsgrad von GP2 erreicht werden. Die Nutzung eines zusätzlichen Ionenaustauschers (IEx, hier Anionenaustauscher) führt zur weiteren Erhöhung des Isolierungsgrades. Im Anschluss wurde die Probe umpufferung, konzentriert und bei -80°C für weiterführende Versuche gelagert.

Nach Filtration (Minisart GF, 0,7 µm Porengröße) wurde der prozessierte Zellkulturüberstand in einem ersten Chromatographieschritt über IMAC angereichert.

Dabei interagiert der N-terminale His-Tag des Proteins mit, über Nitrilotriessigsäure immobilisierte, Nickel-Ionen. Das Protein erfährt eine Retention auf der Säule. Eluiert wurde kompetitiv mit Imidazol. Für die Methode wurde das Äkta pure Chromatographiesystem genutzt. Zur Equilibrierung der Säule wurde mit vier Säulenvolumen (CV) Wasser, 1 CV Elutionspuffer (TNI-150) und 6 CV Probenauftragspuffer (TNI-20) gespült (Abb. 5-11, A). Danach wurde die Probe im Verhältnis 10:1 (prozessierter Kultivierungsüberstand zu Säulenvolumen) aufgetragen und mit 6 CV TNI-20 gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 CV TNI-150. Bei mehreren aufeinanderfolgenden Chromatographien bzw. wiederholter Nutzung der Säulen fand im Anschluss eine Regeneration mit 1 CV Nickelchlorid sowie Spülvorgängen mit Wasser statt. Der Nachweis der erfolgreichen Chromatographie wurde elektrophoretisch erbracht. Fraktionen vom Probenauftrag (als Referenz), Durchfluss (Probenanteile ohne Retention auf der Säule), Waschschrift und Elution wurden in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Im anschließenden WB wurden die Proben sowohl unspezifisch (Ponceau-Färbung) auf deren Bestandteile als auch Antikörper-basierend, GP2-spezifisch untersucht. Es zeigte sich, dass Hauptverunreinigungen aus dem Kulturüberstand (vor allem bovines Serumalbumin aus fetalem Kälberserum, Zusatz in der Zellkultur) entfernt werden konnte (Abb. 5-11, B). Der Anreicherungsgrad von GP2 lag nach dieser Chromatographie bereits bei >80%. Um weitere Verunreinigungen zu entfernen wurde im Anschluss eine IEX durchgeführt. Dafür wurde Q-Sepharose (starker Anionenaustauscher) genutzt. Als funktionelle Gruppen sind quartäre Amine auf dem Säulenmaterial immobilisiert. Diese interagieren pH-abhängig mit negativ-geladenen Proben- bzw. Proteinbestandteilen und hält diese zurück. Eluiert wird kompetitiv mit Anionen (hier Cl⁻ aus Natriumchlorid). Die gepoolte IMAC-Probe wurde vor Probenauftrag optional verdünnt (1:2 in TE-IEx) bzw. dialysiert (Spectra/Por®, 6-8 kDa Cutoff, gegen TE-IEx) um die Ionenstärke bzw. Natriumchloridkonzentration der Probe signifikant zu senken. Die IEx-Säule wurde mit 2 CV Wasser, 5 CV TN1000-IEx und 10 CV TE-IEx equilibriert (Abb. 5-12, A). Nach Probenauftrag und Waschschrift (10 CV TE-IEx) wurde mit verschiedenen Natriumchloridkonzentrationen eluiert (300, 350, 500, 1.000 mM, jeweils 4 CV). Das Zielprotein findet sich in Fraktionen mit 300 mM Natriumchlorid wieder (Nachweis über Gelelektrophorese und WB, Abb. 5-12, B).

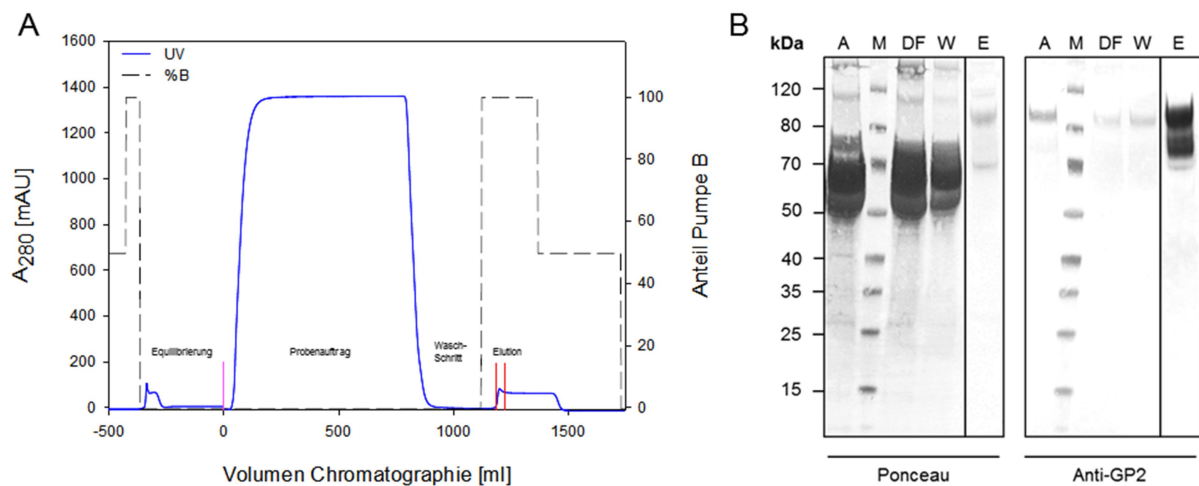


Abb. 5-11 Darstellung α GP2, IMAC

GP2 wird in einem ersten Chromatographieschritt über Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) angereichert. Nach Equilibrierung der IMAC-Säule findet der Probenaufrag mit GP2-haltigem prozessiertem Biomaterial statt. Eluiert wird im Anschluss mit 150 mM Imidazol. Der Nachweis der erfolgreichen Chromatographie bzw. Anreicherung von GP2 erfolgte elektrophoretisch. A: IMAC Chromatogramm, blau: Absorptionssignal bei 280 nm Wellenlänge (UV) in Abhängigkeit zum Chromatographievolumen, gestrichelt-schwarz: Programmvorgaben (%B, erlaubt Rückschluss auf Zugabe vom Elutionspuffer), rot: gepoolte GP2-haltige Fraktionen, B: elektrophoretische Analytik zur Chromatographie, Gelelektrophorese zur Auftrennung nach Molekülmasse, im WB wurden die Proteine unspezifisch mit Ponceau angefärbt, der Nachweis von GP2 erfolgte über einen spezifischen polyklonalen Anti-GP2 Antikörper, Spuren: A: Probenaufrag, M: Marker, DF: Durchfluss, W: Waschschrift, E: Elution.

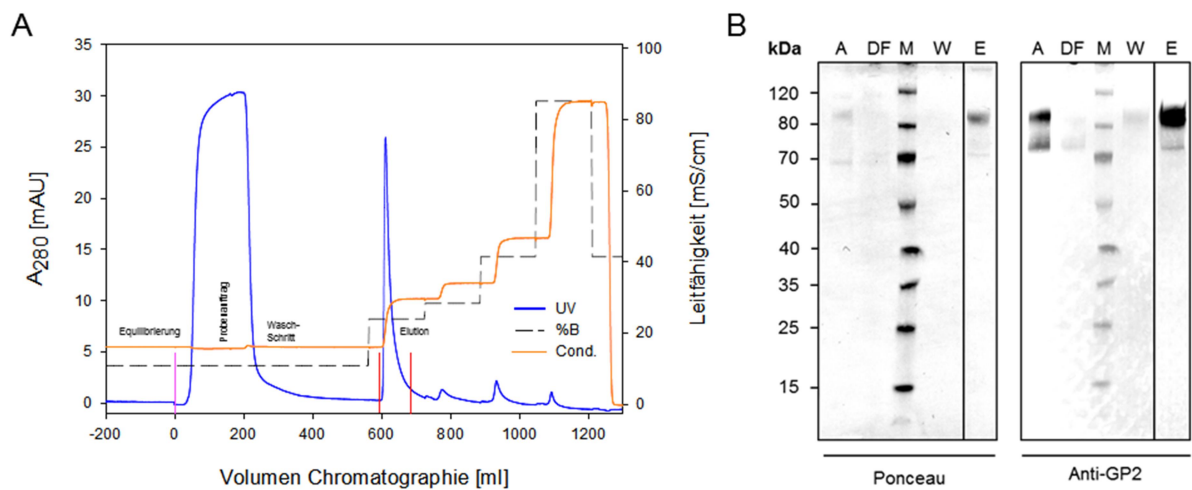


Abb. 5-12 Darstellung α GP2, IEX

In einer zweiten Chromatographie wurde ein Anionenaustauscher (IEXA) genutzt um einen höheren Anreicherungsgrad von GP2 zu erreichen. Nach Equilibrierung der Säule und Probenaufrag folgte die Elution einer schrittweisen Strategie. Die Hauptelution vom Zielprotein erfolgte mit 300 mM Natriumchlorid. Der Nachweis einer erfolgreichen Chromatographie erfolgte abermals elektrophoretisch. A: IEX-Chromatogramm, blau: Absorptionssignal bei 280 nm Wellenlänge (UV) in Abhängigkeit zum Chromatographievolumen, orange: Leitfähigkeit (Cond., Rückschluss auf Ionenstärke im Volumenstrom), gestrichelt-schwarz: Programmvorgaben (%B), rot: gepoolte GP2-haltige Fraktionen, B: Westernblot, Spuren: A: Probenaufrag, DF: Durchfluss, M: Marker, W: Waschschrift, E: Elution.

Sowohl im Chromatogramm als auch in der Analytik lässt sich ein hoher Anreicherungsgrad feststellen. Nach der IEx wurden die gepoolten GP2-haltigen Fraktionen in TN300-IEx umgepuffert und konzentriert (Vivaspin 20, 10 kDa Cutoff). Die finale gelelektrophoretische Analytik zeigte eine starke GP2-Bande bei ca. 80 kDa (verändertes Permeationsverhalten vermutlich aufgrund starker Glykosylierung, Abb. 5-13). Im Präparat lag GP2 mit einem Anreicherungsgrad von >95% (densitometrische Untersuchung) vor. Die Identität wurde mittels Massenspektrometrie bestätigt. Die durchschnittliche Massenkonzentration des Präparates lag bei 1,1 mg/ml. Pro Anreicherung wurden ca. 3,5 mg α GP2 dargestellt.

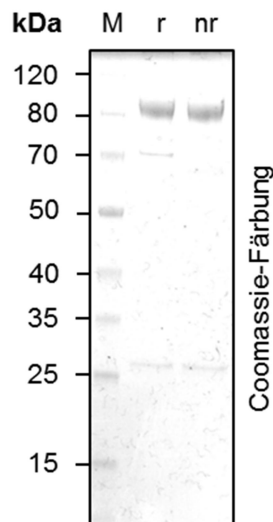


Abb. 5-13 α GP2-Präparat

Gelelektrophorese der finalen α GP2-Probe. GP2 wurde reduziert (r) und nicht reduziert (nr) aufgetragen (Reduzierung mit Dithiothreitol). Neben GP2 bei ca. 80 kDa zeigen sich schwache Banden bei ca. 25-30 kDa die in der Massenspektrometrie (hier nicht gezeigt) als Apolipoprotein identifiziert wurden. M: Marker.

Die Überprüfung korrekt dargestellter Epitope des angereicherten Zielproteins erfolgte in der kompetitiven IIFT. Als Substrat wurden immobilisierte, α GP2-produzierende, HEK-Zellen genutzt. Als Detektionsantikörper Anti-GP2 positive CED-Patientenseren. Ohne Zugabe von rekombinantem GP2 konnte in der IIFT ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 5-14, A). Im kompetitiven Assay unter zusätzlicher Nutzung von freiem angereichertem α GP2 in der Inkubation kam es zur erwarteten Signalschwächung (Abb. 5-14, B). Die konformationellen GP2-Epitope scheinen korrekt ausgebildet zu sein.

Die Anreicherung ist damit erfolgreich. Wenn nicht differenziert angegeben, wurde α GP2 für weiterführende Experimente genutzt.

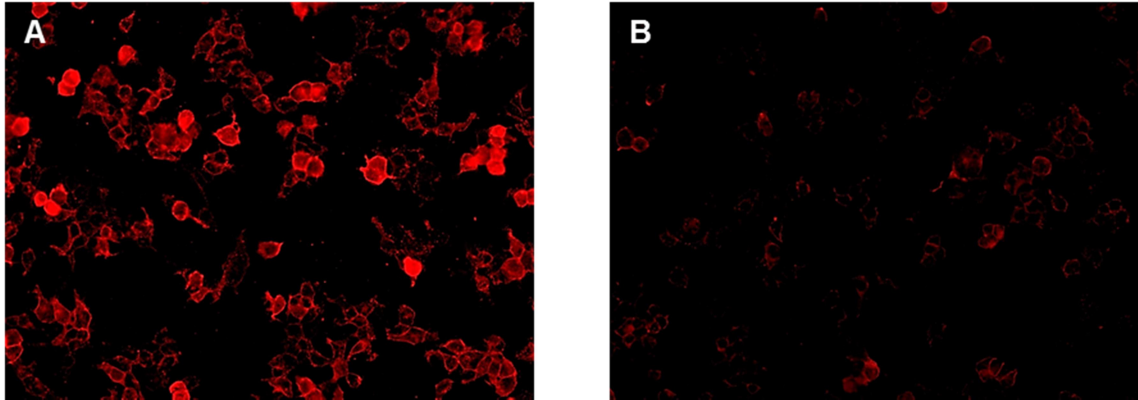


Abb. 5-14 Validierung des dargestellten α GP2

Die Überprüfung vom finalen Präparat erfolgte in der IIFT. Im kompetitiven Assay konnte unter Nutzung von α GP2-produzierenden HEK-Zellen und Zugabe des dargestellten α GP2-Präparates ein deutlicher Signalverlust festgestellt werden (Vergleich A und B). Konzentration rekombinantproduziertes α GP2 im kompetitiven Ansatz: 32 μ g/ml, Reporter: Anti-Human Cy3, Vergrößerung: 200-fach, Kameraeinstellungen: Belichtung 300 ms, Rotverstärkung, Kontrast: 1, Gammakorrektur: 1,5.

5.2.3 Anreicherung von β GP2

Aufgrund hoher Sequenzidentität der GP2-Isomere wurde die Strategie zur Darstellung von rekombinantem β GP2 an die Anreicherung von α GP2 angelehnt. Ausgangsmaterial war ebenso prozessierter Zellkulturüberstand aus eukaryotischer Expression. Die anschließende Prozessierung des Zielproteins über IMAC führte zur signifikanten Abreicherung von Mediumbestandteilen (Abb. 5-15). Die β GP2-haltigen IMAC-Elutionsfraktionen wurden in einem zweiten Chromatographieschritt über IEx (Q-Sepharose, GE) angereichert (Abb. 5-16). Eluiert wurde mit 250-350 mM NaCl. Die WB-Analytik zeigte ein Doppelsignal zwischen 60-70 kDa. Beide Signale konnten in der Massenspektrometrie als β GP2 identifiziert werden. Die durchschnittliche Massenkonzentration betrug 1 mg/ml. Pro Anreicherung wurden ca. 3 mg β GP2 dargestellt. Analog zum α -Isomer wurde auch die Anreicherung von β GP2 in der kompetitiven IIFT untersucht (Abb. 5-17).

Beide GP2-Isomere sind immunologisch aktiv und wurden für weiterführende Experimente genutzt.

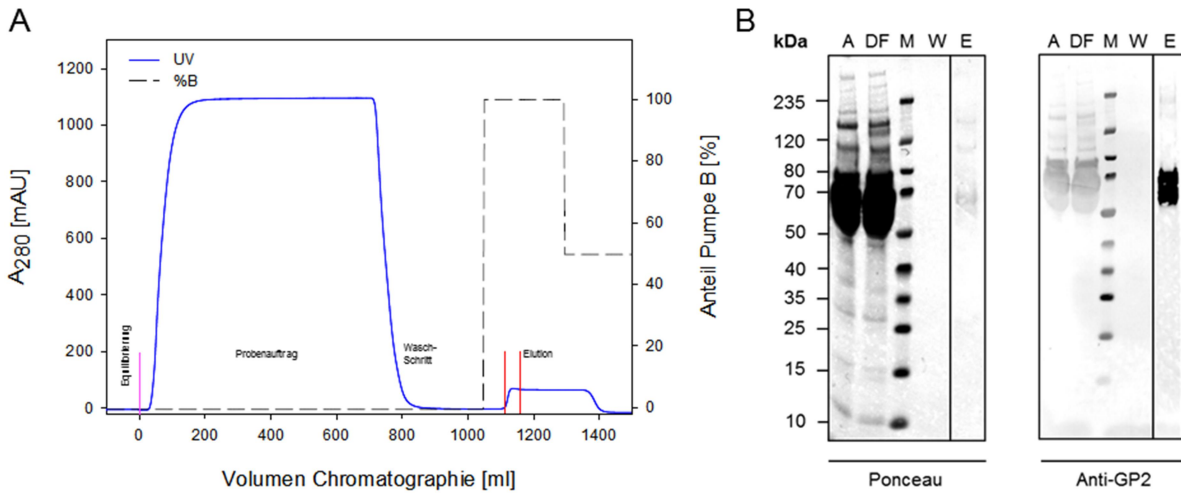


Abb. 5-15 Darstellung β GP2, IMAC

Analog zum α -Isomer wird β GP2 im ersten Schritt der Darstellung über IMAC angereichert. Prozessierter Zellkulturüberstand wird nach Equilibrierung der IMAC-Säule aufgetragen (A, magenta). Die Elution erfolgt mit 150 mM Imidazol. blau: UV₂₈₀-Signal, schwarz: Programmvorgabe, rot: gepoolte Fraktionen. In der Elektrophorese und im WB (B) zeigt sich die Entfernung von Mediumbestandteilen (vor allem bovines Serumalbumin, ca. 65 kDa). Das Zielprotein ist mit dem spezifischen Anti-GP2 Antikörper bei 60-70 kDa nachweisbar. Spuren: A: Probenauftrag, DF: Durchfluss, M: Marker, W: Waschschritt, E: Elution.

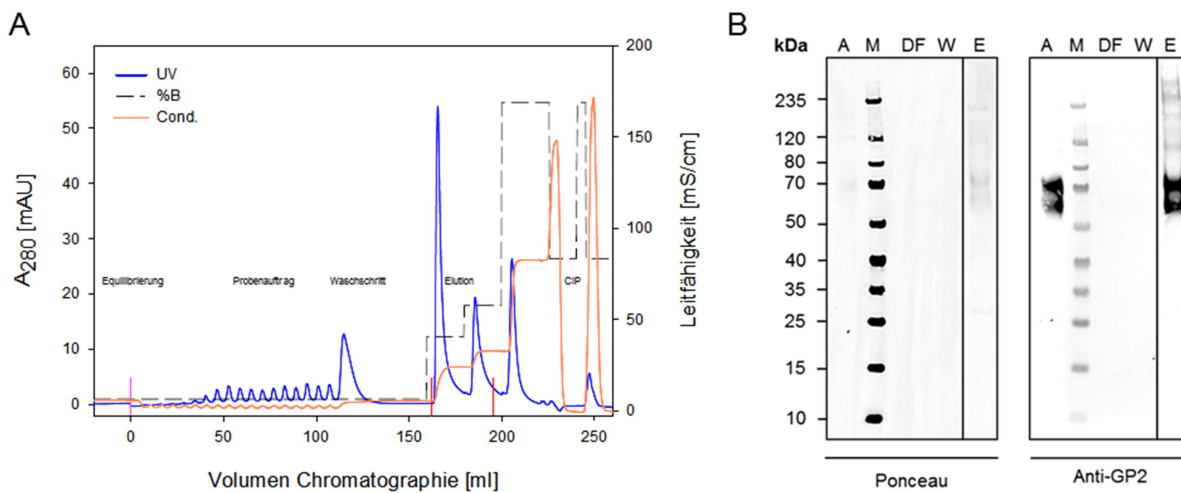


Abb. 5-16 Darstellung β GP2, IEX

Im zweiten Anreicherungs-schritt von β GP2 wurde ein starker Anionenaustauscher (Q-Sepharose, GE) genutzt. Nach Equilibrierung und manuellem Probenauftrag konnte das β -Isomer mit 250-350 mM NaCl eluiert und in der Analytik nachgewiesen werden. A: IEX-Chromatogramm, orange: Leitfähigkeit (Cond., Rückschluss auf Ionenstärke im Volumenstrom), B: Westernblot, Spuren: A: Probenauftrag, DF: Durchfluss, M: Marker, W: Waschschritt, E: Elution.

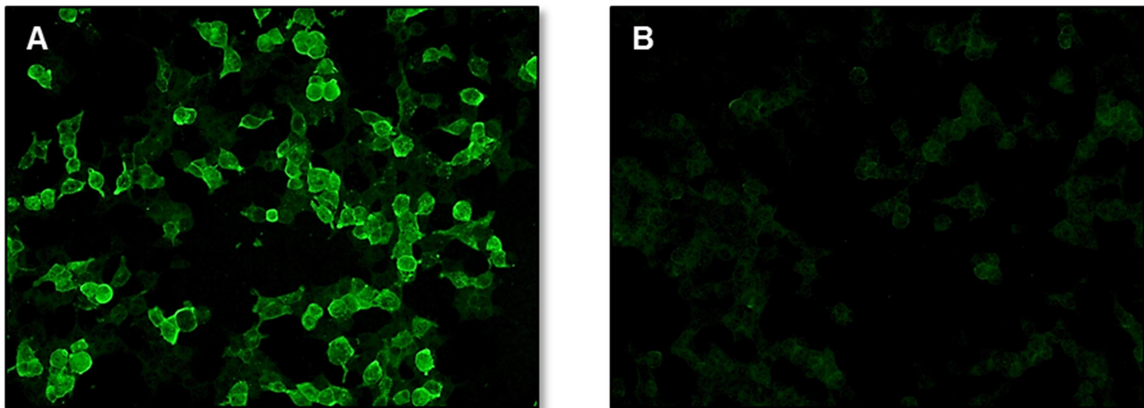


Abb. 5-17 Validierung des dargestellten β GP2

Die finale Anreicherungsprobe wurde in der kompetitiven IIFT auf immunologische Aktivität überprüft. β GP2-produzierende HEK-Zellen wurden auf OT immobilisiert. Das Antigen im Anschluss über spezifische AAK eines CED-Patientenserums detektiert (A). Parallel wurde das Serum mit angereichertem β GP2 (50 mg/ml) inkubiert und so eine Konkurrenz um die AAK generiert. Die signifikante Signalsenkung (B) ist ein deutlicher Hinweis auf die korrekte Konformation des Zielantigens. Reporter: Anti-Human FITC, Vergrößerung: 200-fach, Kameraeinstellungen: Belichtung 300 ms, Grünverstärkung, Kontrast: 1, Gammakorrektur: 1,5

5.2.4 ELISA zum Nachweis von Autoantikörpern gegen CUZD1 und GP2

Zur Entwicklung PAg-spezifischer ELISA wurde rekombinant dargestelltes Protein auf eine ELISA-Platte (MaxiSorp, Nunc) beschichtet (Anti-CUZD1 IgA: 0,5 μ g, IgG: 1 μ g, Anti-GP2 IgA: 0,5 μ g, IgG: 1 μ g, 100 μ l je Ansatz, Inkubation: 2 h / RT). Nach einem Blockierungs-Schritt mit Casein (Casein Blocking-Puffer, Euroimmun, Inkubation: 1 h / RT) wurden CED-Patientenserum in einer Verdünnung von 1:32 (Anti-GP2 IgA) bzw. 1:100 (Anti CUZD1 IgA/IgG, Anti GP2-IgG) für 30 min bei RT inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte unter Nutzung eines speziesspezifischen Anti-human Reporter-Antikörpers (konjugiert mit POD, Anti-IgA/IgG) und TMB-Substrat bei $\lambda=450$ nm. Für die Bewertung nach positiven oder negativen Signalen liegen Sereninkubationen von gesunden Blutspendern (BS, N=23) zugrunde (hier nicht gezeigt). Für den Anti-CUZD1 ELISA wurde das Dreifache des 75%-Quartils der Blutspendersignale als Schwelle gewählt (Anti-CUZD1 IgA: 0,24 AU, IgG: 0,12 AU, siehe Abb. 5-18), für Anti-GP2 IgA das 3,5-fache vom 75%-Quartils (0,42 AU), für IgG das Zweifache (0,38 AU).

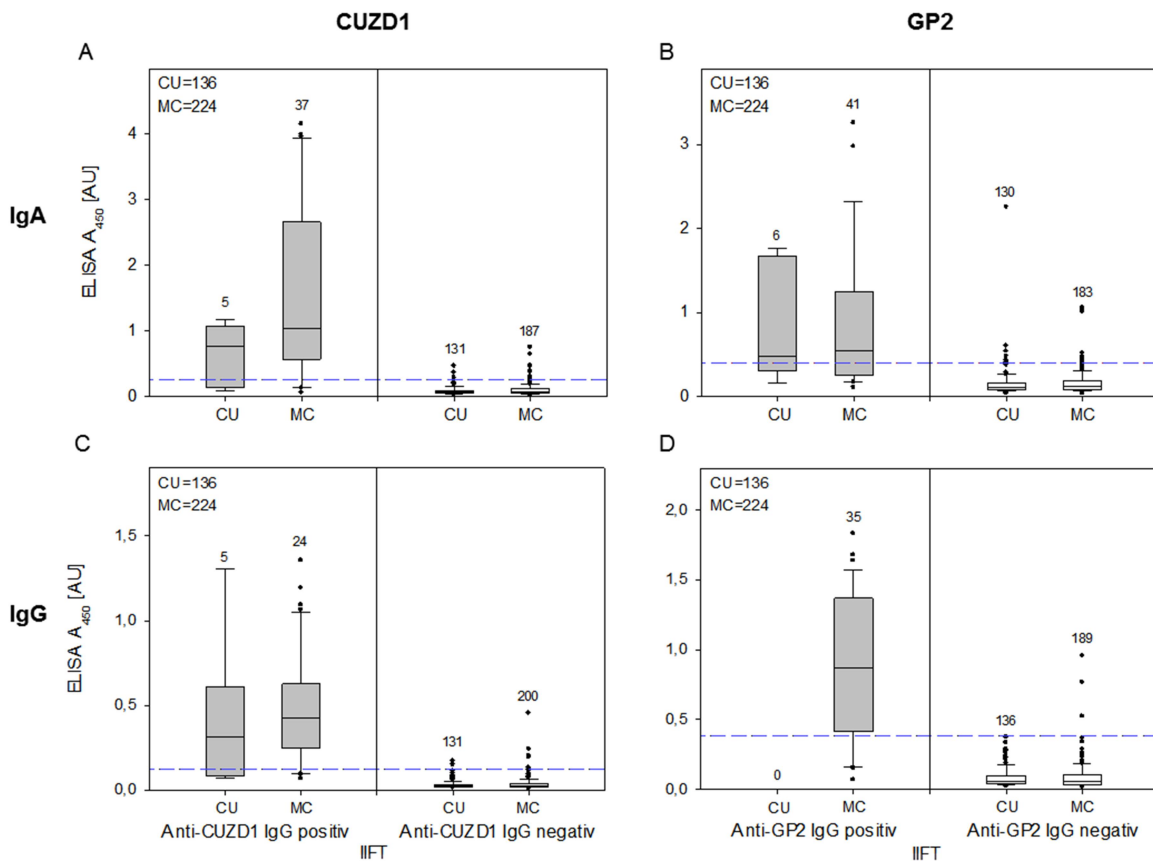


Abb. 5-18 Vergleich PAK-spezifische IIFT und ELISA

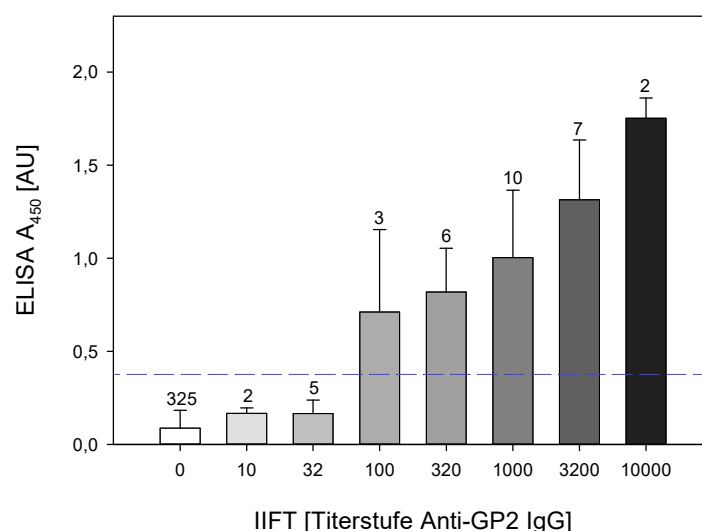
Klinisch charakterisierte CED-Seren wurden sowohl in IIFT als auch in PAK-spezifischen ELISA untersucht (A,C: CUZD1-spezifisch, B,D GP2: spezifisch). Eine weitere Differenzierung wurde nach spezifischen IgA (oberen) bzw. -IgG (unten) vorgenommen. In den Abbildungen wurde die positiv/negativ-Bewertung der IIFT gegen die Signalstärke entsprechender CED-Seren (CU oder MC) aufgetragen. Die gestrichelte Linie (blau) zeigt den Grenzwert, ab welcher Signalstärke positiv bewertet wurde (AntiCUZD1 IgA: 0,24 AU, IgG: 0,12 AU, Anti-GP2 IgA: 0,42 AU, IgG: 0,38 AU). Die Signale in der IIFT und ELISA korrelieren. Über die Daten der ELISA konnten die Bewertungen aus der IIFT validiert werden. Zahlenangaben entsprechen der Anzahl untersuchter Patientenseren.

Die Ergebnisse der ELISA korrelieren zur IIFT. Über 95% der in der IIFT AAK-positiv bewerteten Patientenseren konnten in der ELISA bestätigt werden (siehe Tabelle 5-9, Abb. 5-18, Prävalenzen der ELISA: Anti CUZD1 CU: IgA: 4,4%, IgG: 4,4%, MC: IgA: 19,6%, IgG: 19,2%, Anti GP2 CU: IgA: 6,6%, IgG: 0%, MC: IgA: 9,4%, IgG: 13,4%). Auch stimmen die Signalstärken der ELISA mit den Titerstärken der IIFT überein (siehe Abb. 5-19 am Beispiel GP2-spezifischer IgG). Lediglich in der IIFT schwach-positiv bewertete Seren können bis dato nicht oder nur schwer in der ELISA nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen und Assay-Anpassungen sind hier nötig, um Signalstärken und Grenzwerte zu optimieren.

Tabelle 5-9 Vergleich PAK-spezifische IIFT und ELISA, Prävalenzen

Zahlenangaben geben positiv bewerte Signale als absolute Zahl und Prävalenz (%) bezogen auf das zugrunde liegende CU- bzw. MC-Kollektiv wieder

Serologische Parameter		CU (N=136)		MC (N=224)	
		Häufigkeit im Patientenkollektiv		Häufigkeit im Patientenkollektiv	
		IIFT	ELISA	IIFT	ELISA
Anti-CUZD1	IgA	4 / 2,9%	6 / 4,4%	36 / 16,1%	44 / 19,6%
	IgG	6 / 4,4%	6 / 4,4%	40 / 17,9%	43 / 19,2%
Anti-GP2	IgA	4 / 2,9%	9 / 6,6%	23 / 10,3%	21 / 9,4%
	IgG	0 / 0%	0 / 0%	35 / 15,6%	30 / 13,4%

**Abb. 5-19 Vergleich PAK-spezifische IIFT und ELISA Titeruntersuchungen**

IIFT-Titerstufen und ELISA-Signale wurden gegenübergestellt. Die Anzahl der untersuchten CED-Seren je Titerstufe wurde als natürliche Zahl angegeben, die gestrichelte Linie (blau) zeigt den Schwellenwert der ELISA (0,38 AU). Die Signale der ELISA korrelieren zum ermittelten IIFT-Titer. Schwach-positive Signale in der IIFT wurden aufgrund der ermittelten Schwelle im ELISA als negativ bewertet.

5.3 GP2 spezifisches Immunglobulin A in PSC

PAk sind mit MC assoziiert. Wie in Kapitel 5.1.2 beschrieben, zeigten jedoch einige CU-Patienten ebenso GP2-spezifische IgA. Nach Korrelation mit den klinischen Daten dieser Patienten war auffällig, dass gehäuft als EIM eine PSC vorlag (ca. 33%

aller Anti-GP2 IgA positiven CU-Patienten). Die Untersuchung weiterer PSC-Proben zeigte das Auftreten dieser AAK in etwa 50% der Seren, unabhängig von einer CED-Diagnose. Klinische Daten belegen ferner eine Assoziation zur Ausbildung cholangiozelluläre Karzinoma (CCA).

Die Studie wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Sina, Gastroenterologie, Universität zu Lübeck, dem Institut für experimentelle Immunologie der Euroimmun AG, der Sektion Lebertransplantation, Universität Heidelberg und dem norwegischen PSC-Forschungszentrum, Universität Oslo, durchgeführt.

5.3.1 Studienkollektive

Zur Ermittlung von PAK bei PSC wurden unterschiedliche Patientenkollektive untersucht (Tabelle 5-10). Zwischen 2008 und 2012 wurden 136 PSC-Seren vom norwegischen PSC-Forschungszentrum an der Universität Oslo akquiriert. Zur Validierung der Ergebnisse wurde ein zweites PSC-Kollektiv der Universität Heidelberg untersucht (180 Patienten, zusammengetragen zwischen 2006 und 2015). Als Kontrollen dienten Kohorten aus 52 gesunden Blutspendern, 62 CU-Patienten, 56 CCA-Patienten ohne PSC, 20 Patienten mit sekundär sklerosierender Cholangiitis (SSC) sowie 18 Seren von Autoimmunhepatitis- (AIH) Patienten.

Alle Proben wurden serologisch mit Fokus auf PAK untersucht und in Assoziation zu klinischen Daten bewertet. Die serologischen Tests fanden im Institut für experimentelle Immunologie der Euroimmun AG statt, die Korrelation klinischer Daten zur Serologie jeweils in der Gastroenterologie, Universität zu Lübeck bzw. der Sektion Lebertransplantation, Universität Heidelberg und dem PSC-Forschungszentrum, Universität Oslo.

Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der Universität zu Lübeck (Ethikvotum AZ 13/084A; AZ 05-112), der Universität Heidelberg (S-043/2011) und dem *Regional Committees for Medical and Health Research Ethics South-Eastern Norway B* (2011/2572) genehmigt.

Tabelle 5-10 Übersicht Studienkollektive

AIH: Autoimmunhepatitis, CCA: Cholangiokarzinom, HC: Kontrollen (gesund), PSC (D): deutsches PSC-Kollektiv, PSC (N): norwegisches PSC-Kollektiv, SSC: sekundär sklerosierende Cholangiitis, N: Anzahl, %: Anteil

Parameter	PSC-Kollektive		Kontroll-Kollektive					
		PSC (N)	PSC (D)	AIH	CCA	CU	HC	SSC
Patientenanzahl		136	180	18	56	62	52	20
Geschlecht, männlich	N	107	141	8	30	48	40	16
	%	77,5	67,4	44,4	53,6	77,4	76,9	80,0
Patientenalter bei Erst-diagnose (MW) [Jahre]		34,2	33,7	35,2	63,7	-	-	50,7
Patientenalter in der Studie (MW) [Jahre]		41,4	40,7	46,0	64,5	41,0	41,4	53,5
Erkrankungsdauer (MW) [Jahre]		4,3	7,5	10,7	0,8	6,0	-	3,0
Colitis indeterminata	N	10	4	-	-	-	-	-
	%	7,3	2,2	-	-	-	-	-
CU	N	81	99	-	-	62	-	-
	%	59,1	55,0	-	-	100	-	-
MC	N	11	18	-	-	-	-	-
	%	8,0	10	-	-	-	-	-
Karzinom (biliär)	N	19	20	-	56	0	0	0
	%	13,8	11,1	-	100	0	0	0
Lebertransplantation	N	33	50	8	0	0	0	4
	%	23,9	27,8	44,4	0	0	0	20,0

5.3.2 Anti-GP2 IgA ist hochprävalent in PSC

Initial wurde das norwegische PSC-Kollektiv auf PAK (IgA und IgG) untersucht (Tabelle 5-11). Mit einer Prävalenz von 52,2% (N=71) zeigte sich im Vergleich zu gesunden Blutspendern eine deutliche Häufung von Anti-GP2 IgA Signalen in der IIFT (Abb. 5-20, $p < 0,001^{***}$, OR=55,7). Die Signale hatten im Median eine Titrationsstufe von 1:100. Die Beobachtungen aus 5.1.2 konnten damit bestätigt werden. Anti-GP2 IgG (1,5%, N=2) sowie Anti-CUZD1 (IgA: 11,0%, N=15, IgG: 10,3%, N=14) zeigten keine Auffälligkeiten.

Ergebnisse

Ebenso lassen das gemeinsame Auftreten von GP2- und CUZD1-spezifischen Immunglobulinen (IgA: 8,8%, N=12, IgG: 0,7%, N=1) keine weiteren differentialdiagnostische Aussagen zu. Auch die Untersuchung von weiteren CED-relevanten serologischen Parametern wie ASCA oder pANCA zeigten keine atypischen Signale bzw. Prävalenzen.

Tabelle 5-11 Prävalenzen serologischer CED-Parameter im norwegischem PSC-Kollektiv

AAk-Typus	Anzahl absolut (Prävalenz [%])					
	Anti-CUZD1	Anti-GP2	ASCA	BAk	DNS-geb. Lf	pANCA
IgA	15 (11,0)	71 (52,2)	28 (20,6)	1 (0,7)	19 (14,0)	53 (39,0)
IgG	14 (10,3)	2 (1,5)	26 (19,1)	2 (1,5)	36 (26,5)	75 (55,1)
IgA+IgG	5 (3,7)	1 (0,7)	16 (11,8)	0 (0,0)	4 (2,9)	32 (23,5)
IgA / IgG	24 (17,6)	72 (52,9)	38 (27,9)	3 (2,2)	51 (37,2)	96 (70,6)

Zur Validierung der PAK-Ergebnisse wurde ein zweites PSC-Kollektiv aus Deutschland (Heidelberg) untersucht. Auch hier zeigte sich mit 46,7% eine hohe Prävalenz für das Vorkommen von GP2-spezifischen IgA (Abb. 5-20). Anti-GP2 IgG sowie AAK spezifisch für CUZD1 zeigten analog zum norwegischem Kollektiv keine Besonderheiten.

Erhöhte Anti-GP2 IgA Prävalenzen in Subkohorten von CCA- (Prävalenz 35,7%, N=20) und SSC-Patienten (Prävalenz 55,0%, N=11) geben Hinweise auf gemeinsame Pathogenese-Mechanismen bzw. zugrundeliegende Manifestationen der Erkrankungen. Weitere Kontrollseren von AIH- und CU-Patienten zeigten mit Fokus auf PAK keine Auffälligkeiten (Abb. 5-20).

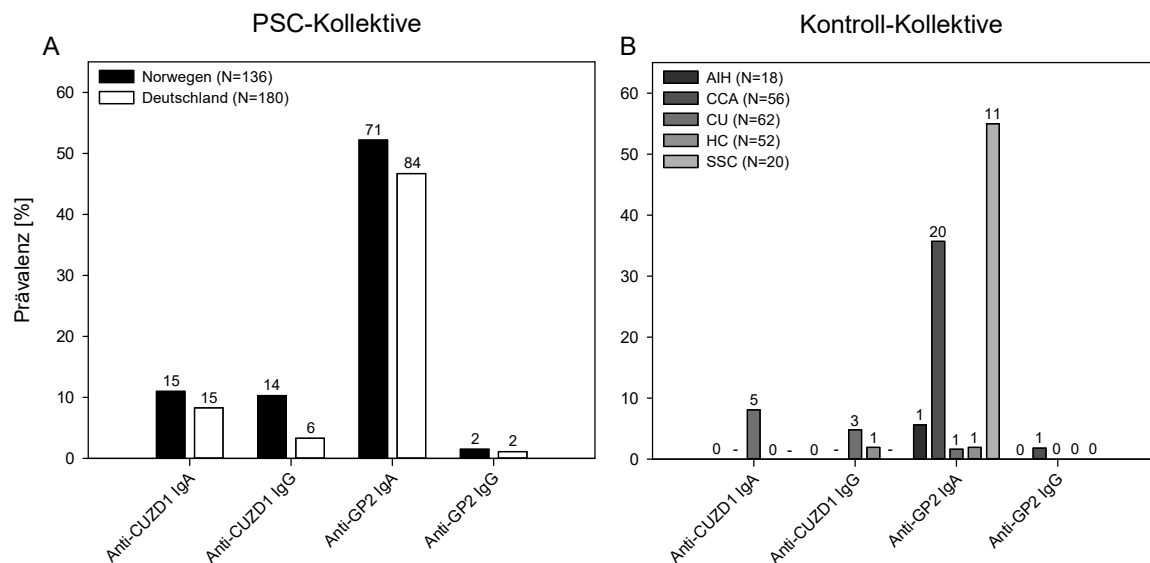


Abb. 5-20 Untersuchung unterschiedlicher Patientenkollektive auf PAK

(A) Das PSC-Validierungskollektiv aus Deutschland zeigte in der IIFT eine Häufung von Anti GP2 IgA. Die Prävalenzen korrelieren zu den Beobachtungen der norwegischen Kohorte. (B) CCA- und SSC-Patienten sind in den Subkollektiven ebenso hoch-prävalent für Anti-GP2 IgA. AIH- und CU-Patienten sowie die gesunden Blutspender zeigten keine Auffälligkeiten.

5.3.3 Klinische Relevanz von Anti-GP2 IgA in PSC und CCA

Zusätzlich zur serologischen Untersuchung wurden klinische Daten der Patienten erhoben und entsprechend zum Auftreten von GP2-spezifischen IgA korreliert (Tabelle 5-12). Das Patientenalter bei PSC-Erstdiagnose unterschied sich nur in der deutschen PSC-Kohorte signifikant (Anti-GP2 positiv: 34,5 Jahre, negativ: 27,5 Jahre, $p < 0,001^{***}$, norwegisches Kollektiv: Anti-GP2 IgA positiv: 34,0 Jahre, negativ: 34,7 Jahre, $p = 0,880$). Jedoch konnte gezeigt werden, dass der *mayo PSC risk score* (MRS) mit 0,80 im norwegischem Kollektiv und -0,12 im deutschen Kollektiv bei Patienten mit AAK deutlich über denen ohne AAK lag (norwegisches Kollektiv -0,35, $p = 0,001^{**}$, deutsches Kollektiv -0,64, $p < 0,001^{***}$). Der MRS wird genutzt, um das PSC-Risiko von Patienten zu bestimmen. Er errechnet sich aus dem Patientenalter, Konzentration verschiedener Marker wie Bilirubin sowie weiterer medizinischer Diagnostik. Patienten mit Werten unterhalb von Null haben nach diesem Modell ein geringes PSC-Risiko, bis zwei besteht mittleres Risiko und Werte oberhalb von zwei haben ein erhöhtes Risiko.

Im norwegischen Kollektiv wurden zusätzlich verschiedene PSC-Marker untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Senkung von Serumalbumin bei Vorhandensein von Anti-GP2 IgA (AAk positiv 39 g/dl, negativ 42 g/dl, $p=0,001^{**}$). Dies gibt Hinweise auf eine gesenkte Proteinproduktion in der Leber aufgrund von beispielsweise Läsionen oder Fehlfunktionen (Green and Flamm, 2002). Alkalische Phosphatase liegt erhöht im Serumlevel vor (Hinweis auf z. B. Gallenstauung, AAk positiv 321 U/l, negativ 158 U/l, $p<0,001^{***}$). Zur Detektion von Leberschädigungen bzw. auch für Verlaufskontrollen (Therapieerfolg) wird in PSC die Aktivität von Aminotransferasen im Blut ermittelt. Normwerte der Alanin- (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) werden mit <40 U/l beziffert (Kim *et al.*, 2004). Anti-GP2 IgA positive PSC-Patienten zeigen gegenüber AAk-negativen Patienten stark erhöhte Aminotransferase-Werte (ALT: AAk positiv 129 U/l, negativ 53 U/l, $p<0,001^{***}$, AST: AAk positiv 97 U/l, negativ 43 U/l, $p<0,001^{***}$). Auch Bilirubin liegt erhöht vor (norwegisches PSC-Kollektiv: AAk positiv 29,3 $\mu\text{mol/l}$, negativ 12,4 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001^{***}$, deutsches PSC-Kollektiv: AAk positiv 22,2 $\mu\text{mol/l}$, negativ 12,8 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001^{***}$).

Interessanterweise zeigt sich keine Korrelation von PSC-Patienten mit assoziierter CED zum Auftreten von GP2-spezifischen IgA (norwegisches PSC-Kollektiv: AAk positiv 73,2% der Patienten, negativ 75,0%, $p=0,850$, deutsches PSC-Kollektiv: AAk positiv 72,6%, negativ 66,7%, $p=0,42$). Allerdings unterscheidet sich die Ausbildung von Karzinomen. CCA liegt in beiden PSC-Kollektiven deutlich erhöht bei positivem Anti-GP2 IgA Befund vor: im norwegischem Kollektiv mit 19,7% gegenüber 3,1% bei AAk-negativen PSC-Patienten ($p<0,001^{***}$), im deutschen Kollektiv mit 13,1% gegenüber 4,2% ($p<0,001^{***}$). Gallenblasenkarzinomata lagen nur im norwegischen PSC-Kollektiv erhöht vor (AAk positiv 4,2%, negativ 0%). Allerdings lassen sich aufgrund der geringen Fallzahlen von Patienten mit Gallenblasenkarzinoma keine gesicherten Aussagen treffen.

Auch Lebertransplantationen wurden häufiger bei Anti-GP2 IgA positiven Patienten durchgeführt (norwegisches PSC-Kollektiv: AAk positiv 28,2% der Patienten, negativ 20,0%, $p=0,320$, deutsches PSC-Kollektiv: AAk positiv 38,1%, negativ 18,8%, $p=0,005^{**}$).

Tabelle 5-12 Korrelation klinischer Parameter zum Vorhandensein GP2-spezifischer IgA

ALT: Alanin-Aminotransferase, AST: Aspartat-Aminotransferase, Gamma GT: γ -Glutamyltransferase
 MRS: *mayo PSC risk score*, PSC (D): deutsches PSC- Kollektiv, PSC (N): norwegisches PSC-
 Kollektiv, CCA: Cholangiokarzinom

Parameter	PSC (N)			PSC (D)		
	Anti-GP2 IgA positiv	Anti-GP2 IgA negativ	p	Anti-GP2 IgA positiv	Anti-GP2 IgA negativ	p
Patientenalter bei AAK- Testung	41,1	40,4	0,341	39,0	42,5	0,015*
Erstdiagnose, Patientenalter	34,0	34,7	0,880	27,5	34,46	<0,001***
Erkrankungsdauer, Jahre	2,78	0,94	0,046*	7,04	5,33	0,170
MRS	0,80	-0,35	0,001**	-0,12	-0,64	<0,001***
Albumin [g/dl]	39	42	0,001**			
Alkalische Phosphatase [U/l]	321	158	<0,001***			
ALT [U/l]	129	53	<0,001***			
AST [U/l]	97	43	<0,001***			
Bilirubin [μ mol/l]	29,3	12,4	<0,001***	22,2	12,8	<0,001***
Gamma GT [U/l]	273	212	0,111			
Kreatinin [μ mol/l]	63	67	0,186			
zusätzlich CED-Diagnose [%]	73,2	75,0	0,850	72,6	66,7	0,42
CCA [%]	19,7	3,1	<0,001***	13,1	4,2	0,031*
Gallenblasenkarzinom [%]	4,2	0	<0,001***	2,4	3,1	0,762
Lebertransplantation [%]	28,2	20,0	0,320	38,1	18,8	0,005**

Anti-GP2 IgA positive Patienten beider PSC-Kollektive zeigen nach statistischer Bewertung eine deutlich geringer wahrscheinliche Überlebensrate (Abb. 5-21). Im norwegischen Kollektiv liegt der Median bei Anti-GP2 positiven PSC-Patienten bei 2,5 Jahren, bei AAK-negativen Patienten 3,2 Jahre ($p=0,016^*$, Beobachtungszeitraum vier Jahre). Im deutschen Kollektiv wurde bei AAK-positiven Patienten ein Median von 5,2 Jahren ermittelt, bei AAK-negativen Patienten 6,4 Jahre ($p=0,018^*$, Beobachtungszeitraum zehn Jahre). Dies könnte auf die gezeigte Assoziation von

GP2-spezifischen IgA zu Komplikationen wie der Ausbildung von Karzinomen zurückzuführen sein. CUZD1-spezifische IgA oder -IgG haben keinen Einfluss auf die wahrscheinliche Überlebensrate (Jendrek *et al.*, 2017).

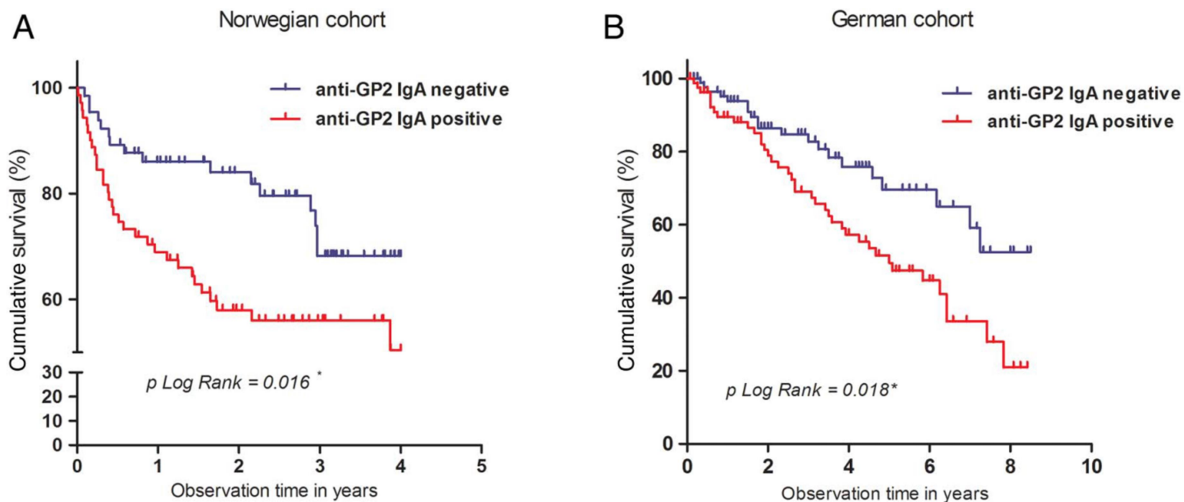


Abb. 5-21 Kaplan-Meier-Plot zur Darstellung der wahrscheinlichen Überlebensrate von PSC-Patienten in Abhängigkeit zum Vorliegen von Anti-GP2 IgA

(A) Untersuchungen des norwegischen PSC-Kollektivs zeigen einen signifikanten Unterschied in vier Jahren Beobachtungszeit ($p=0,016^*$). Anti-GP2 IgA positive Patienten haben mit 2,5 Jahren (Median) eine geringere Überlebensrate als AAK-negative Patienten (Median 3,2 Jahre). (B) Auch in der deutschen PSC-Kohorte konnte dieser Unterschied festgestellt werden (Beobachtungszeitraum zehn Jahre, $p=0,018^*$, Median Überlebensrate Anti-GP2 IgA positive Patienten 5,2 Jahre, AAK-negative Patienten 6,4 Jahre). Kaplan-Meier-Plot bereitgestellt durch AG Sina, Gastroenterologie, Universität zu Lübeck.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation von Anti-GP2 IgA zu PSC besteht. Ferner kann das Auftreten dieser AAK bei PSC-Patienten Hinweise auf CCA und andere Komplikationen geben, die sich auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der betroffenen Patienten auswirken. Die serologische Untersuchung von (PSC-) Patientenserum auf GP2-spezifische IgA stellt damit ein mögliches neues Diagnostiksystem in biliären Erkrankungen dar.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden publiziert (Jendrek *et al.*, 2017).

5.4 Autoantikörper gerichtet gegen GP2-Isoformen in CED und PSC

Im menschlichen Organismus kommt GP2 in mehreren Isoformen vor (siehe 2.5). Hauptunterscheidungsmerkmal ist ein unikaler Aminosäurenanteil am N-Terminus

des α -Isomers (beim β GP2 fehlt dieser). Um mögliche Rückschlüsse auf das tatsächliche Antigen und entsprechende Epitope zu ziehen, wurden in der IIFT verschiedene Patientenserum auf α - und β GP2 produzierenden HEK-Zellen als Substrat inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass CU- und PSC-Patienten vor allem Autoantikörper gegen das α -Isomer generieren. MC-Patienten sowohl gegen α - als auch β GP2.

5.4.1 Studienkollektive

Untersucht wurde das CED-Kollektiv aus 5.1 und das deutsche PSC-Kollektiv aus 5.2. Insgesamt wurden somit 360 CED- (136 CU, 224 MC) sowie 180 PSC-Seren analysiert.

5.4.2 PSC-Patienten zeigen Autoantikörper gegen α GP2, MC-Patienten gegen das β -Isomer

Die untersuchten Kollektive zeigen unterschiedliche Prävalenzen und AAK-Verteilungen hinsichtlich der GP2-Isomerenbindung (Tabelle 5-13). Seren von CU-Patienten zeigen eine Prävalenz von 8,1% α GP2 (N=11, Titer: Median 1:32, $Q_{0,25}$ 1:21, $Q_{0,75}$ 1:66) und 2,9% β GP2 spezifische IgA (N=4, Titer: Median 1:32). Spezifische IgG konnte nicht nachgewiesen werden. In Seren von MC-Patienten konnten AAK gegen beide GP2-Isoformen gefunden werden: Anti α GP2 IgA mit 12,5% (N=28, Titer: Median 1:100, $Q_{0,25}$ 1:32, $Q_{0,75}$ 1:100), IgG 16,5% (N=37, Titer: Median 1:100, $Q_{0,25}$ 1:32, $Q_{0,75}$ 1:100), Anti β GP2 IgA 12,1% (N=27, Titer: Median 1:320, $Q_{0,25}$ 1:100, $Q_{0,75}$ 1:3.200), IgG 17,4% (N=39, Titer: Median 1:1.000, $Q_{0,25}$ 1:210, $Q_{0,75}$ 1:3.200). PSC-Patienten zeigen, wie bereits geschildert, vor allem Anti-GP2 IgA. Zu 46,7% (N=84, Titer: Median 1:32, $Q_{0,25}$ 1:32, $Q_{0,75}$ 1:100) binden diese das α -Isomer von GP2. Lediglich 1,1% (N=2, Titerstufe jeweils 1:100) der Seren des Kollektivs interagieren mit β GP2.

Betrachtet man in den Kollektiven nur die Anti-GP2 positiven Seren und vergleicht die Anteile entsprechend spezifischer Anti-GP2 AAK, stellt man fest, dass bei CU- und PSC-Patienten α GP2 spezifische Antikörper eine dominante Rolle spielen (Abb. 5-22). So sind 66,7% (N=8) der Anti-GP2 IgA positiven CU-Seren gegen α GP2 gerichtet.

Tabelle 5-13 Vergleich der AAK gegen α - bzw. β GP2 in unterschiedlichen Kollektiven

		CU (N=136)		MC (N=224)		PSC (D) (N=180)	
		Häufigkeit im Patientenkollektiv		Häufigkeit im Patientenkollektiv		Häufigkeit im Patientenkollektiv	
Serologische Parameter		Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]	Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]	Anzahl (absolut)	Prävalenz [%]
Anti- α GP2	IgA	11	8,1	28	12,5	84	46,7
	IgG	0	0	37	16,5	2	1,1
	IgA/IgG	11	8,1	44	19,6	84	46,7
	IgA+IgG	0	0	21	9,4	2	1,1
Anti- β GP2	IgA	4	2,9	27	12,1	2	1,1
	IgG	0	0	39	17,4	2	1,1
	IgA/IgG	4	2,9	42	18,8	2	1,1
	IgA+IgG	0	0	24	10,7	2	1,1

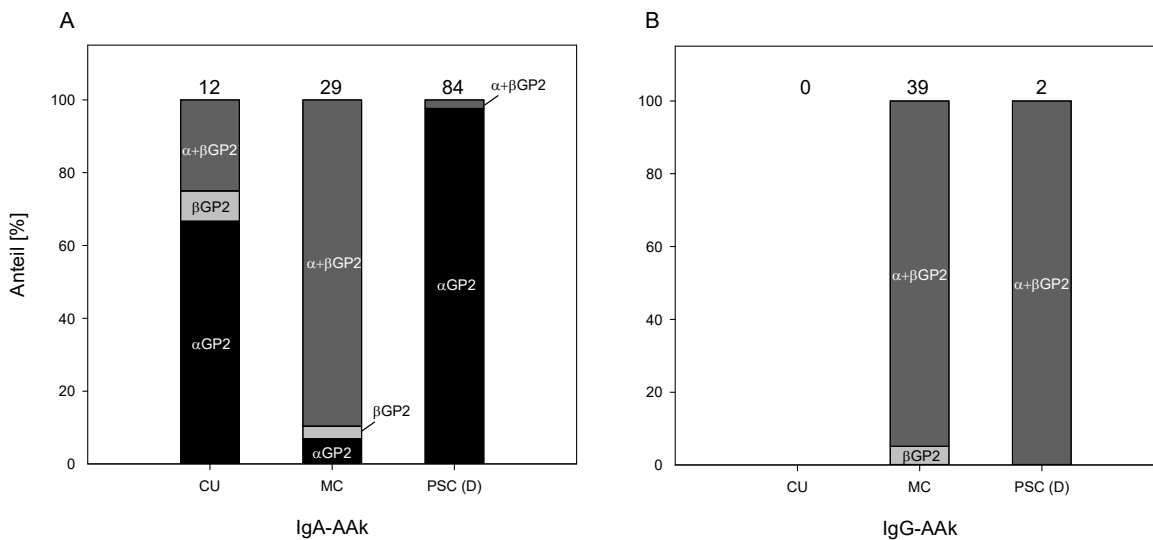


Abb. 5-22 Anteile detektierter AAK gegen GP2-Isoformen

Die Abbildungen zeigen die Verteilung von α - bzw. β GP2 spezifischen IgA (A) und IgG (B) in verschiedenen Patientenkollektiven. CU- und PSC Patienten weisen nahezu ausschließlich AAK gegen α GP2 auf. Das Epitop scheint im α -unikalen Proteinanteil zu liegen. MC-Patienten zeigen vermehrt Signale auf β GP2. Da zusätzlich zumeist Signale auf α GP2-Substraten detektiert wurden, scheint das Epitop im Konsensusanteil des Proteins zu liegen.

Lediglich 8,3% (N=1) interagieren mit der β -Isoform, 25% (N=3) sowohl gegen α - als auch β GP2. Anti-GP2 positive Seren der PSC-Kohorte zeigen mit 97% (N=84) eine Bindung zum α -Isomer. Spezifische Signale zum β -Isomer sind lediglich in Seren von zwei PSC-Patienten (<5%) detektiert worden. Im Vergleich zu CU- und PSC-

Patienten zeigen MC-Patienten überwiegend Signale auf sowohl α - als auch auf β GP2 Substrat.

Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten bestehen. Auch die entsprechenden Titer unterschieden sich. Während bei den CU-Patienten relativ schwache GP2-positive Signale detektiert wurden (Anti- α GP2 IgA: Median Titer 1:32, $Q_{0,25}$ 1:32, $Q_{0,75}$ 1:32, Anti- β GP2 positiv: Median Titer 1:32, $Q_{0,25}$ 1:15,5, $Q_{0,75}$ 1:32) zeigten sich deutlich stärkere Signale bei MC-Patienten (Anti- α GP2 IgA: Median Titer 1:100, $Q_{0,25}$ 1:32, $Q_{0,75}$ 1:100, IgG: Median Titer 1:320, $Q_{0,25}$ 1:100, $Q_{0,75}$ 1:3.200 Anti- β GP2 IgA: Median Titer 1:100, $Q_{0,25}$ 1:32, $Q_{0,75}$ 1:100, IgG: Median Titer 1:1.000, $Q_{0,25}$ 1:210, $Q_{0,75}$ 1:3.200). PSC-Seren zeigten hauptsächlich Anti- α GP2 IgA Signale mit einem Titermedian von 1:32 ($Q_{0,25}$ 1:32, $Q_{0,75}$ 1:100). Bei gleichzeitigem Auftreten von α - und β GP2 spezifischen AAK gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den entsprechenden Titern (IgA: Median Anti- α - bzw. β GP2 jeweils 1:100, IgG: Median Anti- α GP2 1:320, Anti- β GP2 1:1.000).

Beide GP2-Substrate sind, wie gezeigt, semi-quantitativ vergleichbar und von diagnostischem Nutzen. Der Nachweis von β GP2-spezifischen AAK in Patientenseren deutet auf zugrundeliegenden MC hin.

Abweichungen der Prävalenzen einzelner Parameter zu vorangegangenen Studien resultieren aus Toleranzen des Detektionssystems. Aus den Ergebnissen lassen sich Überlegungen hinsichtlich unterschiedlicher Epitope und Progression der Krankheiten ableiten. Auch kann die serologische Untersuchung von Patienten auf AAK spezifisch für beide GP2-Isomere differentialdiagnostische Informationen liefern.

5.5 Isotypenuntersuchung von pankreatischen Autoantikörpern in CED

Es konnte gezeigt werden, dass GP2-spezifische IgA vor allem bei PSC eine Rolle spielen (5.3.2), PAg-spezifische IgG bei MC (5.1.2). Eine Differenzierung nach Ig-Subklassen ist in der Routinediagnostik bisher jedoch nicht erfolgt. Es sind zwei IgA-Subklassen bekannt (IgA1 und IgA2), die sich vor allem in ihrer *Hinge*-Region unterscheiden (Kerr, 1990). Beide Isoformen kommen im Menschen sowohl als Monomer (hauptsächlich im Serum) als auch in dimerer Form (sekretorische Antikörper im Mukus) vor. IgA1 ist die dominante IgA-Spezies im Serum (Furtado et

al., 2004). Vom IgA2 sind drei weitere Allotypen bekannt: IgA2m(1), IgA2m(2) und IgA2(n). Funktionelle Untersuchungen dieser Allotypen sind Gegenstand aktueller Forschung.

Bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden vier IgG-Subtypen identifiziert (Schur, 1988): IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Sie unterscheiden sich vor allem in ihrem konstanten Bereich und der *Hinge*-Region, wenngleich ca. 90% ihrer Aminosäuresequenz hoch konserviert vorliegen. IgG1 bezeichnet die IgG-Hauptklasse und bindet vor allem lösliche Antigene und Membranproteine (Vidarsson *et al.*, 2014). IgG2 interagiert zumeist mit glykosylierten Antigenen auf Oberflächen von Mikroorganismen. IgG3 ist ein pro-inflammatorischer Effektor-Antikörper mit kurzer Halbwertszeit im Blut und IgG4 wird neben IgE in Zusammenhang mit Allergenen gebracht. Über Langzeitexposition mit entsprechendem Antigen kann IgG4 zur dominanten IgG-Spezies im Blut werden (Aalberse *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IgA1 die dominante IgA-Spezies im Blut ist. Unterschiede zwischen CED- und PSC-Patienten konnten nicht festgestellt werden. IgG1 bindet vor allem CUZD1. Hinweise auf Glykoepitope konnten durch Beobachtung von Anti-GP2 IgG2 Interaktion gewonnen werden.

5.5.1 IgA Subklassenuntersuchung

Die Differenzierung der IgA-Subtypen wurde in der IIFT mit unterschiedlichen, kommerziell erhältlichen Ak durchgeführt. Die angewandte Methode machte eine Drei-Schritt Inkubation obligat. Im ersten Schritt wurden die Patientenseren auf HEK-CUZD1- bzw. -GP2-Substraten gegeben. Danach folgten die Inkubationen mit dem Spezifität-vermittelten IgA1- bzw. IgA2-Ak und anschließend der Cy3-konjugierte Reporterantikörper. Die Untersuchungen wurden im Institut für experimentelle Immunologie der Euroimmun AG durchgeführt. Für die Experimente wurden Proben verschiedener Kollektive verwendet. Vom CED-Kollektiv wurden 36 CUZD1- und 23 GP2-IgA positive Patientenseren untersucht. Die Wiederfindungsrate beim CUZD1-Parameter lag >80% (30 von 36 Seren). Bei GP2 wurden fünf zusätzliche Patienten gefunden, die ein schwaches, jedoch spezifisches Signal aufwiesen. Dem gegenüber wurden Seren aus dem deutschen PSC-Kollektiv (Heidelberg) geprüft. Bezogen auf CUZD1 wurden in diesem Kollektiv 13 von 15 untersuchten Patientenseren positiv

bewertet. Die Wiederfindungsrate bei GP2 betrug 100% (84 von 84 untersuchten PSC-Patientenseren). In beiden Kollektiven konnte gezeigt werden, dass IgA1 der dominante IgA-Subtypus im Blut ist (korreliert zur Literatur) (Furtado *et al.*, 2004). Sowohl CUZD1- als auch GP2-IgA positive Seren zeigen ausschließlich spezifisches IgA1 (Abb. 5-23). IgA2 konnte in ca. 20% der Seren nachgewiesen werden, allerdings nur bei gleichzeitigem Auftreten von IgA1. Unterschiede zwischen den verschiedenen Kollektiven konnten nicht festgestellt werden (MC: CUZD1 IgA1: 83,3%; IgA1+2: 16,7%; GP2 IgA1: 89,3%; IgA1+2: 10,7%; PSC: CUZD1 IgA1: 92,3%; IgA1+2: 7,7%; GP2 IgA1: 76,2%; IgA1+2: 23,8%). Ein Nutzen für die CED- oder PSC-Diagnostik ist nach bisherigem Erkenntnisstand nicht gegeben.

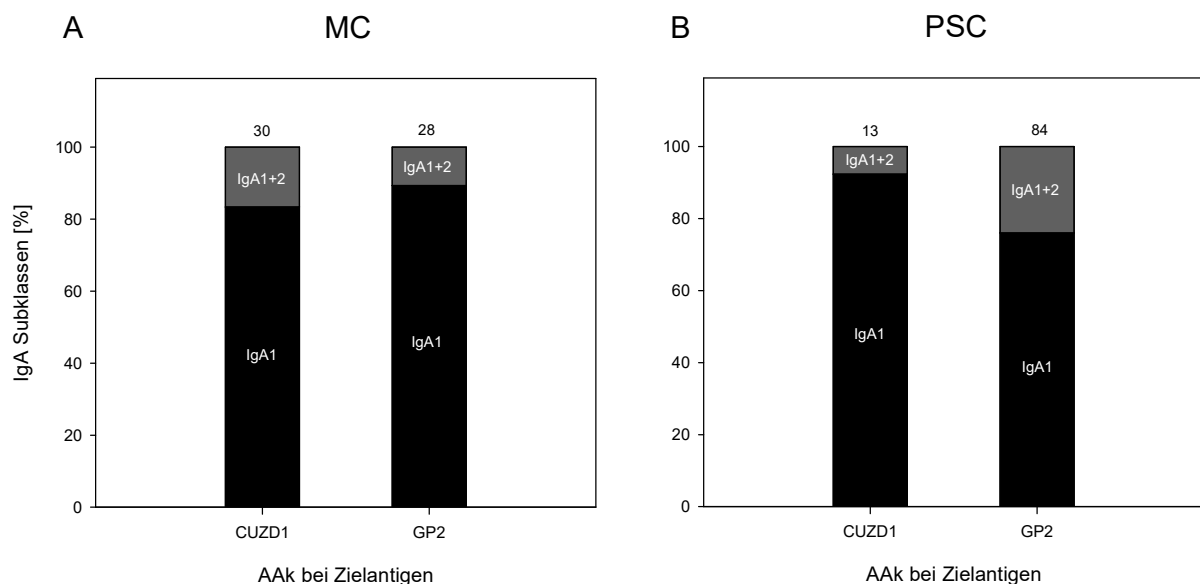


Abb. 5-23 Untersuchung PAk-positiver Patienten auf IgA-Subtypen

In der IIFT wurden (A) MC- und (B) PSC-Patienten auf PAg-spezifische IgA1 bzw. IgA2 untersucht. Der dominante Substypus im Blut ist IgA1. IgA2 tritt lediglich in ca. 20% der Seren parallel zum IgA1 auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen MC- und PSC-Patienten konnte nicht festgestellt werden.

5.5.2 IgG Subklassenuntersuchung

Zur Untersuchung der IgG-Isoformen wurden 38 Anti-CUZD1 und 31 Anti-GP2 IgG-positive Seren des CED-Kollektives aus Kapitel 5.1 für die Auswertung hinzugezogen. Die Beurteilung fand in der IIFT auf rekombinanten Substraten statt. Es wurde zwischen α - und β GP2 differenziert. Die serologischen Tests wurden im Institut für experimentelle Immunologie der Euroimmun AG durchgeführt.

Im Vergleich zur Studie in Kapitel 5.1 konnten mit den alternativen Reporterantikörpern nur 50% der Anti-CUZD1 positiven Seren wiedergefunden werden (Abb. 5-24, A). Dies ist wahrscheinlich aufgrund der eher geringen Titerstufen von CUZD1-positiven Seren und dem geänderten Reportersystem zu erklären. Die Konzentration der einzelnen Subklassen im Blut ist im Vergleich zum Gesamt-IgG deutlich geringer. GP2-spezifische IgG zeigten in Kapitel 5.1 deutlich höhere Titer. In der Subklassenuntersuchung konnten >95% der AAK-positiven Patienten erneut positiv getestet werden (Wiederfindungsrate Anti- α GP2: 100%, Anti- β GP2: 97%).

Es zeigte sich, dass CUZD1 mit 31,6% ausschließlich von IgG1 bzw. mit 42,1% von IgG2 gebunden wird (Abb. 5-24, B). In 26,3% der Anti-CUZD1 IgG-positiven Patienten treten IgG1 und IgG2 gleichzeitig auf. IgG3 und IgG4 konnten nicht nachgewiesen werden. Sowohl α - als auch β GP2 spezifische IgG unterscheiden sich deutlich zum CUZD1. Es konnte gezeigt werden, dass IgG2 als dominanter Subtypus bei beiden GP2-Isoformen vorliegt (α GP2: 51,6%, β GP2: 50,0%). Damit ergeben sich Hinweise darauf, dass glykosylierte Epitope bei der AAK-Wechselwirkung eine Rolle spielen. IgG1 konnte nur zusammen mit IgG2 in 41,9% der Fälle auf α GP2-Substrat sowie 40,0% auf β GP2 beobachtet werden. Ferner konnte in zwei Patientenproben Anti-GP2 IgG3 nachgewiesen werden. Spezifische IgG4 wurden nicht gefunden.

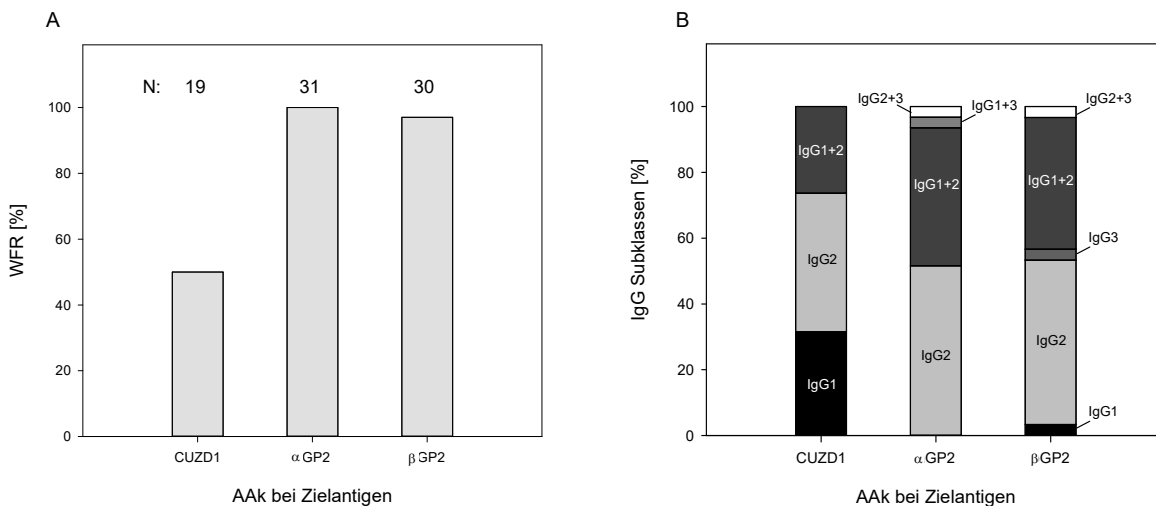


Abb. 5-24 Untersuchung PAK-positiver Patienten auf IgG-Subtypen

Ausgehend von der Untersuchung von pankreatischen AAK in einem CED-Kollektiv (siehe Kapitel 5.1) wurden 38 Anti-CUZD1 und 31 Anti-GP2 AAK positive Patienten sowie 21 Kontrollseren (CED-Kollektiv, PAK-negativ) auf IgG1-4 untersucht. Die Wiederfindungsrate (A) von Anti-CUZD1 AAK lag unter Nutzung der Subtyp-spezifischen Reporter-Ak bei lediglich 50%, bei Anti-GP2 AAK >95%. (B) GP2-spezifische AAK sind vom Typ IgG2 (sowohl isoliert-vorliegend, als auch gemeinsam mit den Subtypen IgG1 und IgG3). CUZD1-spezifische IgG sind vom Typ IgG1 oder IgG2. N: Anzahl Seren, WFR: Wiederfindungsrate.

5.6 Glykoepitope bei GP2

Bereits bei der Untersuchung ausgewählter CED-Seren auf Anti-GP2 AAK in der IIFT und im WB war auffällig, dass positive IIFT-Signale im WB nicht bestätigt werden konnten (Abb. 5-25). Dies liefert starke Hinweise auf konformationelle Epitope. In der IIFT wurden GP2-produzierende HEK-Zellen als Substrat genutzt. Das GP2 wurde auf diese Weise in seiner nativen Konformation von den Zellen präsentiert und bindet AAK der Patientenseren. Im WB bzw. für die vorangegangene Gelelektrophorese wird rekombinant dargestelltes GP2 aus HEK-Produktion denaturiert aufgetragen. Durch die Probenvorbereitung kommt es zur Linearisierung und strukturellen Veränderung von GP2. Sequenzielle Epitope bleiben unbeeinflusst, konformationelle Epitope werden dagegen aufgehoben. Für eine weiterführende Untersuchung der GP2-Epitope und ferner, um die Ergebnisse zum Anti-GP2 IgG2 (Kapitel 5.5.2) zu überprüfen, wurden zusätzlich 30 ASCA-positive CED-Seren des Subkollektives auf IgG-Isoformen untersucht. Der IgG2-Anteil wird in einem validen System entsprechend hoch erwartet. Es konnte gezeigt werden, dass zu 83,3% ausschließlich ASCA-IgG2 vorliegen (Abb. 5-26). IgG1 und IgG2 kommen gemeinsam in 3,3% der Patientenseren vor, IgG2+IgG3 in 13,3%.

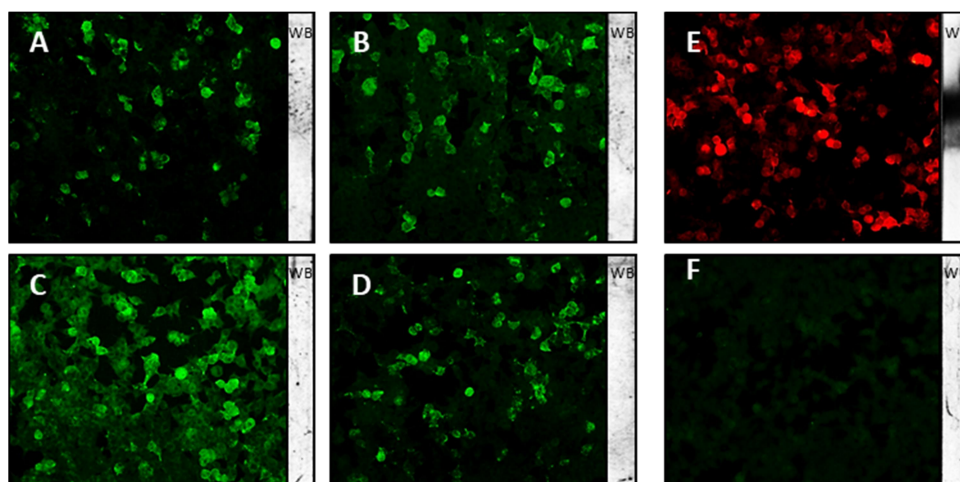


Abb. 5-25 Hinweise auf konformationelle GP2 Epitope

Anti-GP2 positive CED-Seren wurden sowohl in der IIFT als auch im WB (inkubierter WB-Streifen rechts am entsprechenden IIFT-Bild) getestet. In der IIFT können spezifische Signale detektiert werden. GP2 liegt in seiner nativen Konformation vor. Durch die denaturierende Probenvorbereitung der Gelelektrophorese/WB wird die native Konformation vom Zielantigen stark verändert. AAK der entsprechenden CED-Seren binden nicht mehr ihr Zielantigen. Der WB ist negativ. Darstellung IIFT- und WB Signale verschiedener Seren, A-D: humane Anti-GP2 positive CED-Seren, FITC-Reporter, IIFT positiv, WB negativ, E: Kaninchen Anti-GP2 pAb, Positivkontrolle, Cy3-Reporter-Ak, IIFT positiv, WB positiv, F: Serum eines gesunden Blutspenders, Negativkontrolle, FITC-Reporter, IIFT negativ, WB negativ, Substrat: GP2-produzierende HEK-Zellen, 200-fache Vergrößerung.

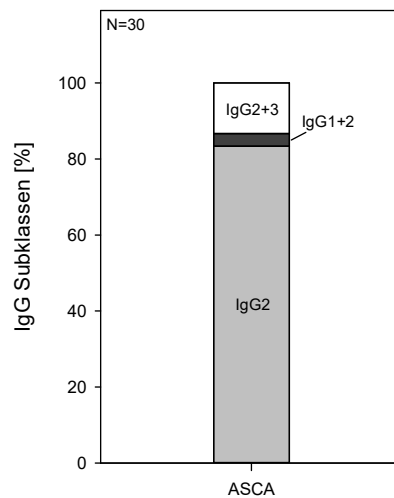


Abb. 5-26 Verteilung IgG1-4 bei ASCA-positiven CED-Patienten

Ergebnisvalidierung (zu Abb. 5-24). ASCA zeigt eine ähnliche Verteilung der IgG-Subklassen wie die Isomere von GP2. Gerade IgG2 spielt die dominante Rolle in beiden Systemen. Damit konnte der Hinweis auf ein glykosyliertes Epitop weiter untermauert werden.

GP2 ist ein stark glykosyliertes Protein. *In silico* Untersuchungen der GP2-Aminosäuresequenz zeigen acht potentielle N- sowie neun O-Glykosylierungsstellen (Abb. 5-27).

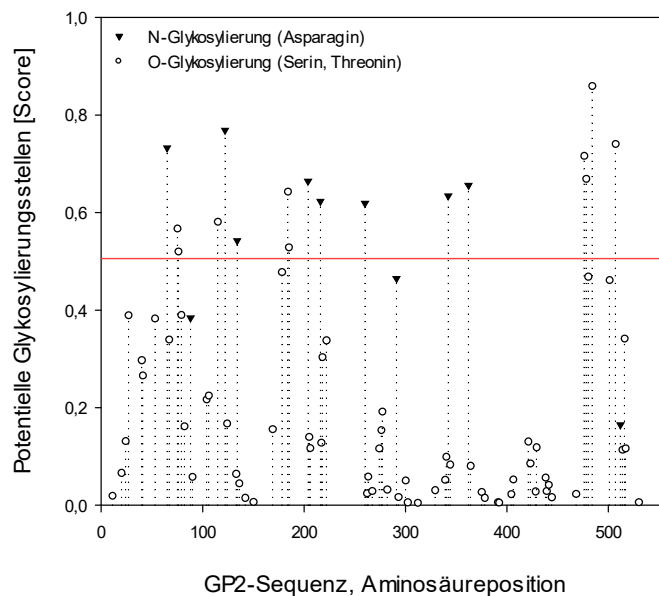


Abb. 5-27 Potentielle GP2-Glykosylierungsstellen

Untersuchung der GP2-Sequenz (UniProt-ID P55259) auf potentielle Glykosylierungsstellen. Für N-Glykoside (Untersuchung vorhandener Asparagine in der GP2-Sequenz) wurde der NetNGlyc 1.0 Server (Gupta *et al.*, 2004), für O-Glykoside (Untersuchung Serine und Threonine) der NetOGlyc 4.0 Server (Steenoft *et al.*, 2013) genutzt. Es wurden acht N-glykosidische Stellen (Aminosäureposition 65, 122, 134, 204, 216, 260, 342, 362), sowie neun potentielle O-Glykane (Position 75, 76, 115, 184, 185, 476, 478, 484, 507) in der GP2-Aminosäuresequenz gefunden. Die rote Linie in der Abbildung markiert den Schwellenwert (Score 0,5), der für eine positive Vorhersage überschritten werden muss.

Die rekombinante Darstellung von GP2 erfolgt nach eukaryotischer Expression. Die Glykosylierung vom Zielprotein lässt sich sowohl über Lektine nachweisen (Abb. 5-28), allerdings wird sich die Glykosylierung im rekombinanten Produktionssystem zur *in vivo* Glykosylierung unterscheiden.

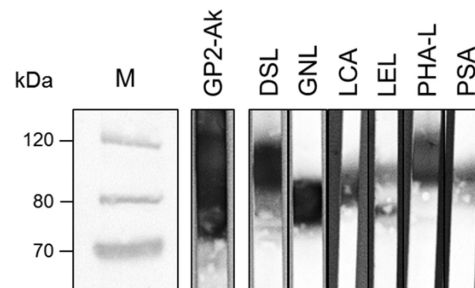


Abb. 5-28 Glykosylierungsnachweis von α GP2 mit Lektinen

Rekombinantes GP2 wurde elektrophoretisch untersucht. Ein anschließender WB wurde in Streifen geschnitten und mit unterschiedlichen Lektinen inkubiert. Die Signale deuten auf Glykosylierung hin, ggf. werden unterschiedliche Varianten von GP2 detektiert. M: Protein-Größenmarker, GP2-Ak: GP2-spezifischer Antikörper, DSL: *Datura stramonium* (Gemeiner Stechapfel) Lektin, bindet N-Acetylglucosamin-Reste, GNL: *Galanthus nivalis* (Kleines Schneeglöckchen) Lektin, bindet Mannose-Reste, LCA: *Lens culinaris* (Linse) Agglutinin, Mannose- und Glucose-Spezifität, LEL: *Lycopersicon esculentum* (Tomate) Lektin, bindet N-Acetylglucosamine, PHA-L: *Phaseolus vulgaris* (Bohne) Leucoagglutinin, Galactose-Spezifität, PSA: *Pisum sativum* (Erbse) Agglutinin, Mannose-Spezifität.

Die Subklassenverteilung GP2-spezifischer Immunglobuline (Abb. 5-24) ähnelt der Verteilung von ASCA (Abb. 5-26). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf glykosidische Epitopanteile bei GP2 sein. Weiterführend wurden GP2-Deglykosylierungsexperimente durchgeführt. Dabei wurde rekombinant-produziertes GP2 (sowohl das α -, als auch das β -Isomer) mit Periodat behandelt, um eine Elimination der Carbonylreste zu erreichen (Malaprade-Reaktion) (Malaprade, 1926). Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen, z. T. enzymatischen Deglykosylierungsmethoden: es werden sowohl N- als auch O-Glykane gespalten.

Die erfolgreiche Deglykosylierung wurde sowohl im Westernblot als auch im ELISA unter Nutzung von Lektinen (Zuckerrest-bindende Proteine zumeist aus Pflanzen oder Mikroorganismen) nachgewiesen (Abb. 5-29). Änderungen im Permeationsverhalten der Elektrophorese nach Deglykosylierung ist ein weiteres Indiz für eine erfolgreiche Deglykosylierung, wenngleich nicht sichergestellt werden konnte, dass eine vollständige Glykosylierung stattfand.

Die eigentliche Untersuchung auf glykosidische Epitope fand mit Anti-GP2 IgG2 AAK positiven humanen Patientenseren statt. Dafür wurden die GP2-Isomere als

Referenz unbehandelt (glykosyliert bei rekombinanter Produktion in HEK-Zellen) sowie deglykosyliert in der ELISA auf eine MaxiSorp®-Platte beschichtet und mit entsprechenden Seren inkubiert. Als Reporter wurde ein speziesspezifischer POD-konjugierter Antikörper verwendet. Es zeigte sich eine signifikante Signalsenkung in der ELISA, sowohl beim deglykosyliertem α GP2 (Mittelwert Signalsenkung gegenüber Referenz 64,5%, $p < 0,001^{***}$, $N=9$), als auch beim β -Isomer (Signalsenkung 59,8%, $p < 0,001^{***}$, $N=7$, Abb. 5-30). Aufgrund des starken Glykosylierungsgrades von GP2, des hohen Anti-GP2 IgG2-Anteils in der Analytik bei CED und der Ergebnisse aus den Deglykosylierungsexperimenten lässt sich feststellen, dass glykosidische Epitope in der GP2-Analytik eine dominierende Rolle spielen. Analytik-Systeme unter Nutzung von prokaryotisch-produzierten Proteinen scheinen für diagnostische Zwecke nicht geeignet.

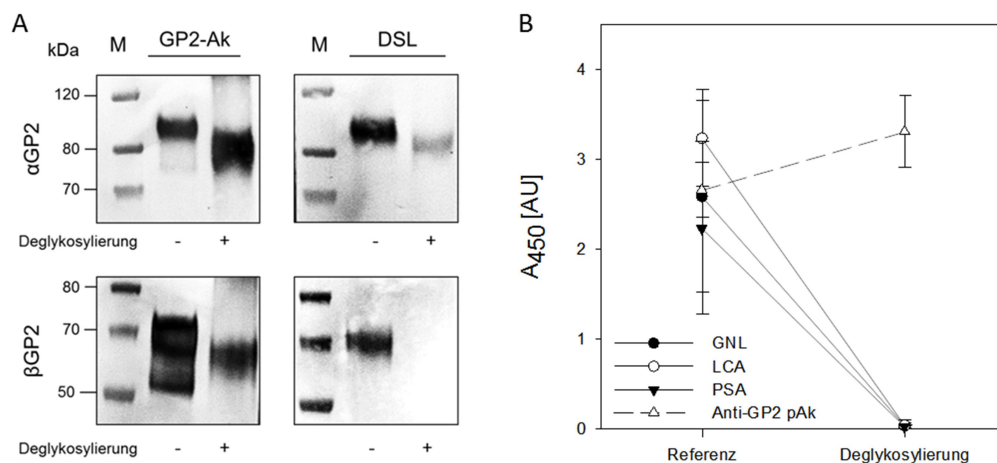


Abb. 5-29 Deglykosylierung der GP2-Isomere

Durch Periodat-Behandlung von α - bzw. β GP2 konnten Zuckerreste an deren Oberfläche über die Malaprade-Reaktion entfernt werden. Die Beurteilung der Deglykosylierung fand analytisch über Elektrophoreseverfahren und ELISA statt. In der Elektrophorese bzw. Western-Blot (A) wurden beide GP2-Isomere vor bzw. nach Deglykosylierung aufgetragen und mit GP2-spezifischem Antikörper (GP2-Ak) bzw. Lektinen (hier beispielhaft mit DSL) untersucht. Es zeigte sich sowohl bei α GP2 als auch beim β -Isomer ein verändertes Gel-Permeationsverhalten sowie eine deutliche Signal-schwächung in der Lektinanalytik gegenüber nicht-deglykosyliertem Protein. Ferner wurden beide Isomere im ELISA (B) auf eine MaxiSorp®-Platte beschichtet und mit biotinylierten Lektinen (hier mit GNL, LCA und PSA) inkubiert. Die Signalausgabe erfolgte kolorimetrisch über POD-konjugiertes ExtrAvidin® als Reporter. Auch im ELISA zeigte sich nach Deglykosylierung eine deutliche Signalsenkung (Überprüfung Detektionssystem mit polyklonalem Anti-GP2 Antikörper (Anti-GP2 pAk), generiert nach Kaninchenimmunisierung). DSL: *Datura stramonium* (Gemeiner Stechapfel, N-Acetylglucosamin-Spezifität), GNL: *Galanthus nivalis* (Kleines Schneeglöckchen, Mannose-Spezifität), LCA: *Lens culinaris* (Linse, Mannose- und Glucose-Spezifität), PSA: *Pisum sativum* (Erbse, Mannose-Spezifität), M: Protein-Größenmarker.

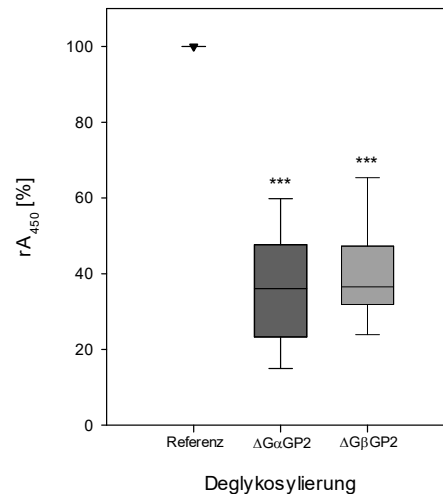


Abb. 5-30 Glykoepitope bei GP2

Deglykosyliertes GP2 (ΔG) zeigt im Vergleich zum glykosylierten Protein (Referenz, unbehandelt) eine deutliche Signalsenkung. Dies ist ein Hinweis auf Glykoepitope. Im ELISA wurde glykosyliertes sowie deglykosyliertes GP2 beschichtet und mit Anti-GP2 IgG2 positiven CED-Seren (N α GP2: 9, N β GP2: 7) detektiert. Zum Vergleich der Proben wurden die jeweiligen absoluten Referenzwerte je Serum auf 100% definiert und die absoluten Signale je Deglykosylierungsansatz relativ zur Referenz bezogen.

5.7 Lokalisierung der pankreatischen Antigene im Gastrointestinaltrakt

Wie bereits gezeigt, spielen AAK gegen Pankreasproteine bei MC und ferner PSC eine Rolle. Dabei ist die Funktion der eigentlichen Zielproteine nicht bekannt. Zur Validierung bisheriger Ergebnisse wurden Untersuchungen zur Lokalisierung der PAg im entsprechenden Gewebe durchgeführt. In der Literatur ist die Produktion von CUZD1 und GP2 im Pankreas beschrieben (Gómez-Lázaro *et al.*, 2010). Über den Pankreassaft werden die Proteine in den Dünndarm sezerniert. Im Folgenden werden Lokalisierungsexperimente der PAg in Pankreas, Pankreassaft, Dünndarm, Dickdarm und Fäzes beschrieben. Aufgrund der positiven Anti-GP2 IgA-Ergebnisse bei PSC-Patienten wurden zusätzlich Leber und Gallenblase in der IIFT untersucht.

5.7.1 Pankreas

Der Pankreas ist ein 13-15 cm langes sekretorisches Organ im Abdomen des Menschen (Mader and Galliard, 2005). Er beinhaltet zwei Gewebetypen: der endokrine Bereich (Langerhans-Inseln) produziert vor allem Peptidhormone wie Insulin und Glukagon. Exokrin werden Verdauungsenzyme bzw. deren Vorstufen wie Trypsinogen oder Proelastase über den Pankreassaft in das Duodenum sezerniert.

Für die Untersuchungen wurde in einer Sektion Pankreas aus Ratte (*Rattus norvegicus forma domestica*, Wistar, weiblich) entnommen, fixiert und für die EM vorbereitet (Schichtdicke der Gefrierschnitte <100 nm). Für die PAg-Detektion wurde ein nicht-kommerzieller Antikörper der Fa. Euroimmun AG verwendet (Anti-PAg Kaninchenserum). Ein mit 12 nm Goldpartikeln-konjugierter sekundärer Ak diente als Reporter. Die Bewertung der Schnitte erfolgte mittels TEM. EM-Versuche wurden in Kooperation mit der AG König, Universität zu Lübeck durchgeführt. Resultierende Signale konzentrieren sich, wie in der Literatur beschrieben (Gómez-Lázaro *et al.*, 2010), auf den exokrinen Pankreas (Abb. 5-31).

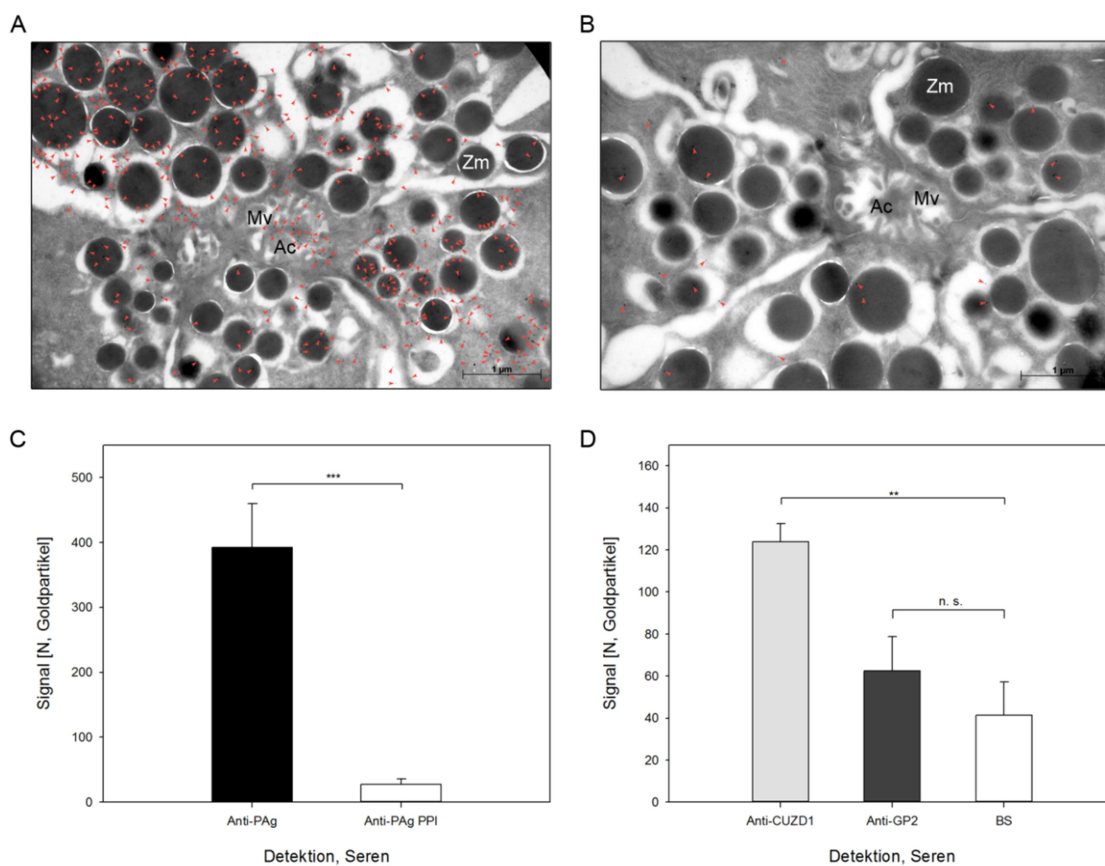


Abb. 5-31 PAg-Lokalisierung im Pankreas

Gefrierschnitte von Rattenpankreas wurden mit PAg-spezifischen Antikörpern inkubiert und im Transmissionselektronenmikroskop untersucht. PAg-Signale fokussieren sich auf Azini und kontrastreiche Zymogengranula (Hinweis auf hohe Elektronendichte). A: TEM-Bild, 30.000-fache Vergrößerung, Inkubation Anti-PAg Kaninchenserum, B: TEM-Bild, 30.000-fache Vergrößerung, Präimmenserum (Anti-PAg PPI), Negativkontrolle, C: Auszählung TEM-Signale, N je Serum pro Bildauschnitte = 3, $p < 0,001$, D: Detektion mit CED-Patientenserum, Differenzierung nach CUZD1- und GP2 spezifischen Signalen, N je Serum und Bildauschnitte = 2, Kontrollinkubation mit gesunden humanen Blutspender, signifikanter Unterschied zwischen CUZD1 und BS, $p = 0,008$, Unterschied GP2 zu BS nicht signifikant, Ac: Acinus, BS: Blutspenderserum, gesund (Negativkontrolle), CUZD1: CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1, MV: Mikrovilli, PAg: pankreatische Antigene (CUZD1, GP2), GP2: Glykoprotein 2, Zm: Zymogengranula, Goldsignale in der TEM gekennzeichnet durch rote Pfeile (▲).

Im Detail finden sich detektierbare Goldpartikel im Bereich der kontrastreichen Zymogengranula und Acini (bzw. deren Schaltstücke). Vereinzelt zeigen sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zellen und Golgi-Apparat (hier nicht dargestellt). Zellkern, Mitochondrien und Bereiche des endokrinen Pankreas weisen keine Signale auf. Pankreatische Verdauungsenzyme bzw. deren Vorstufen werden an den Ribosomen des rauen ER produziert, posttranslational modifiziert und über den Golgi-Apparat zu den zymogenen Körnchen transportiert (Pandol, 2011). Die Zymogengranula dienen als Speicher für Verdauungsenzyme und deren Vorstufen. Über einen äußeren Reiz (z. B. Nahrungsaufnahme) und lokaler Milieuänderung (vor allem pH) werden die Enzymvorstufen in das Gangsystem des Pankreas sezerniert (Bockemühl *et al.*, 2013). Die TEM-Bilder zeigen, dass die PAg sowohl in den Speichergranula, als auch in den Mikrovilli-besetzten Azini (Endstück Drüsengang) lokalisiert sind. Eine Sezernierung über den Pankreassaft ist damit wahrscheinlich.

Zur Validierung spezifischer GP2-Signale im Pankreas wurden zusätzliche IIFT-Experimente durchgeführt. In kompetitiven Ansätzen konnte eine Signallöschung unter Nutzung von rekombinant dargestellten GP2 auf Pankreas-Substrat gezeigt werden (Abb. 5-32). CUZD1 und GP2 konnten eindeutig im Pankreas lokalisiert werden.

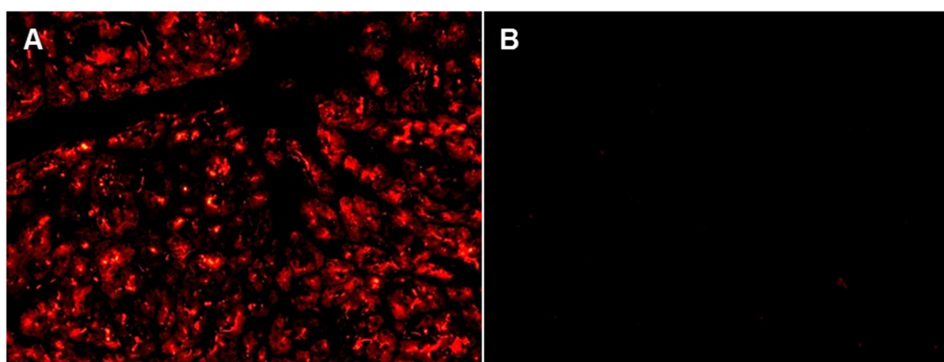


Abb. 5-32 GP2-Lokalisierung im Pankreas, Validierung

In kompetitiven IIFT-Experimenten wurden die TEM-Signale der GP2-Lokalisierung im Pankreas validiert. GP2 konnte eindeutig im Pankreas nachgewiesen werden. A: Lokalisierung von GP2 im Pankreasgewebe (Affe) mit MC-Patientenserum, B: Konkurrenz mit rekombinant-produzierten GP2 (100 µg/ml) auf Pankreas, im Vergleich zu A Signallöschung, Vergrößerung 200-fach, Kameraeinstellungen: Belichtung 200 ms, Rotverstärkung, Kontrast: 1, Gammakorrektur: 1,5.

5.7.2 Pankreassaft

Die PAg-Lokalisierung im Pankreassaft erfolgte mittels IIFT und ELISA. In der IIFT wurde Pankreasgang-Gewebe aus *Macaca mulatta* (Rhesusaffe) als Substrat genutzt und mit einem nicht kommerziellen PAg-spezifischen Antikörper inkubiert (Anti-PAg, Kaninchenserum, 1:200). Als Kontrollen wurde mit Kaninchen-Präimmunserum sowie kompetitiv mit freiem rekombinanten GP2 gearbeitet. Ein speziesspezifischer und Cy3-konjugierter Antikörper diente als Reporter. Im Experiment zeigten sich deutliche Signale im Lumen des Pankreasganges (Abb. 5-33, A). Das entsprechende Präimmunserum war hier negativ (Abb. 5-33, B). Ferner ließen sich die GP2-spezifischen Signale im kompetitiven Assay durch Zugabe von rekombinanten humanen GP2 (50 µg/ml) deutlich senken (Abb. 5-33, C).

Für den ELISA wurden in Kooperation mit der Universität zu Lübeck, Klinik für Allgemeine Chirurgie, humane Pankreassaftproben akquiriert und auf CUZD1 bzw. GP2 untersucht. Die Spezifität vermittelten nicht-kommerzielle mAk (Fa. Euroimmun AG). Im *Capture*-ELISA wurden die mAk als Fängerantikörper direkt auf die Platte beschichtet. Nach einem Blockierungsschritt mit Casein wurde Pankreassaft inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte mit einem polyklonalen Anti-PAg Kaninchenserum und einem POD-konjugierten, speziesspezifischen Reporterantikörper im kolorimetrischen Assay. Mit Hilfe des ELISA konnten spezifische Signale von CUZD1 und GP2 ermittelt werden (Abb. 5-33, D). Der Nachweis der PAg im Pankreassaft konnte somit über zwei unabhängige Methoden gezeigt werden. Nach Kalibrierung der ELISA mit rekombinantem Protein konnte für GP2 eine Massenkonzentration von 1-2 µg/ml nachgewiesen werden (hier nicht dargestellt). Die Konzentration der PAg im Pankreassaft ist jedoch abhängig von mehreren Faktoren wie z. B. Nahrungsaufnahme und Gesundheitszustand des Spenders. Der angegebene Wert hat damit nur qualitativen Charakter, da klinische Daten der Patienten bei Bearbeitung der Proben nicht vorlagen und die Werte im Tagesverlauf schwanken.

5.7.3 Darm

CUZD1 und GP2 werden in der Bauchspeicheldrüse produziert und gemeinsam mit weiteren Pankreasproteinen über den Pankreassaft sezerniert.

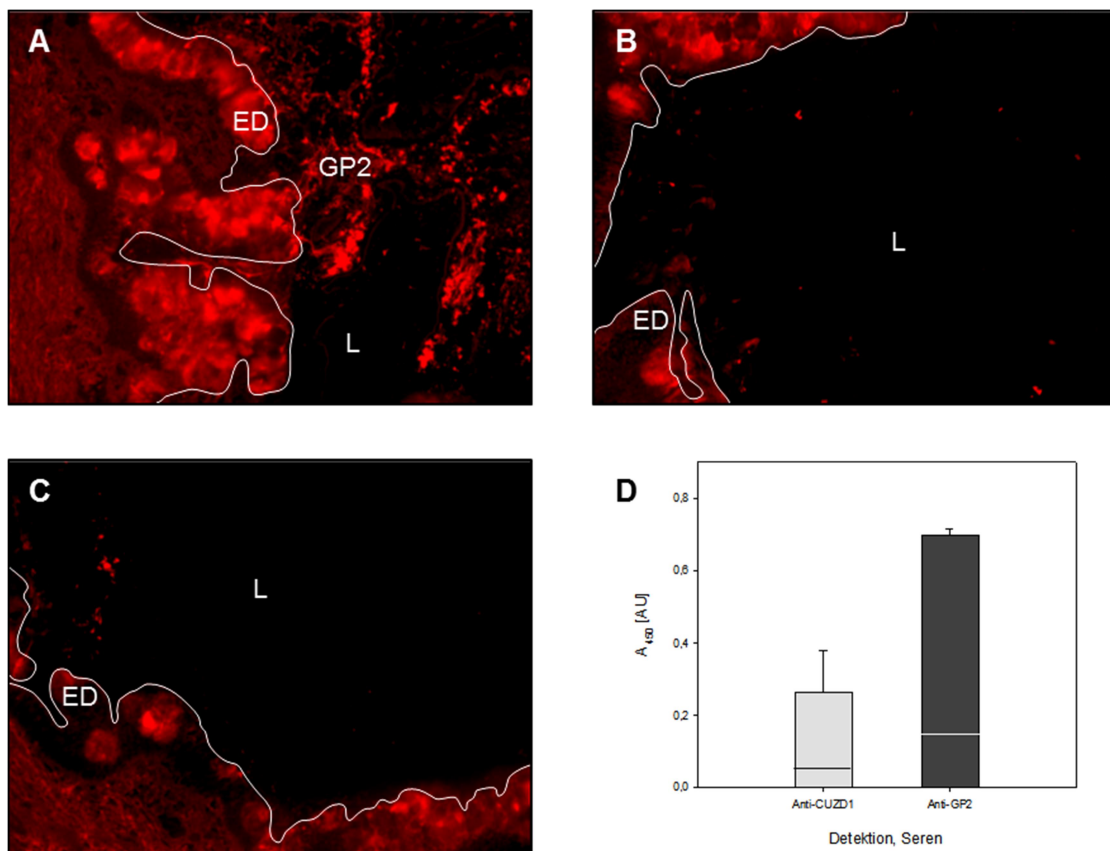


Abb. 5-33 Lokalisierung von PAG im Pankreassaft

PAG konnten sowohl in IIFT (A-C) als auch in der ELISA (D) nachgewiesen werden. In der IIFT zeigt ein Anti-PAG Antikörper spezifische Signale im Lumen von *Macaca mulatta* Pankreasgang (A). Präimmunsereum und GP2-Kompetition zeigen eine deutliche Signalabschwächung (B+C). In einem Capture-ELISA konnten CUZD1 und GP2 im Pankreassaft von Chirurgie-Patienten nachgewiesen werden. A: Anti-PAG Kaninchenserum, 1:200, B: Präimmunsereum (Anti-PAG PPI), 1:200, C: Anti-PAG Kaninchenserum, Kompetition mit rekombinantem GP2, D: Capture ELISA in Pankreassaft mit spezifischer Detektion von CUZD1 und GP2, CUZD1: CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1, ED: Epithel Duodenum (Grenze zum Lumen weiß gekennzeichnet), GP2: Glykoprotein 2, L: Lumen, Gewebe (Pankreasgang) aus *Macaca mulatta*.

Der *Ductus pancreaticus* (Pankreasgang) sammelt den Pankreassaft und mündet gemeinsam mit dem *Ductus choledochus* (Gallengang) in das Duodenum. Da die Funktion der beiden Zielproteine unbekannt ist, erfolgte die Lokalisierung im Darm differenziert auf Dünndarm (Duodenum) und Dickdarm (Kolon). Für den PAG-Nachweis im Duodenum wurde in der IIFT Gewebe von *Macaca mulatta* als Substrat verwendet und mit Anti-PAG positiven- und polyklonalen Serum inkubiert. Es konnten keine spezifischen Signale in der Darmwand des Duodenums in der IIFT nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich im Darmlumen Signale (Abb. 5-34, A,

körnig im Mukusbereich), die durch Zugabe von rekombinantem GP2 kompetitiv neutralisiert werden konnten (Abb. 5-34, B).

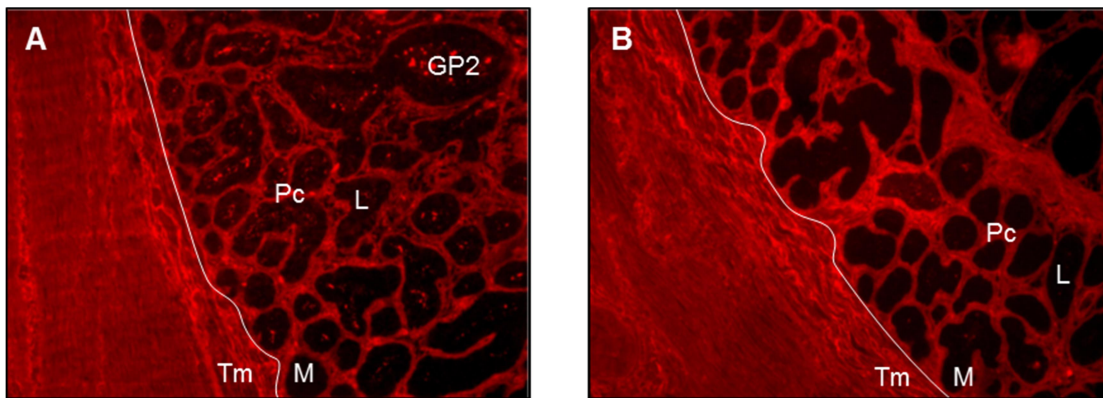


Abb. 5-34 GP2-Lokalisierung im Duodenum

In der IIFT wurden spezifische GP2-Signale im Lumen des Duodenums (*Macaca mulatta*) nachgewiesen (körnig-granuläres Muster, Mukusbereich). A: GP2-positives humanes Serum, B: Konkurrenz mit rekombinantem GP2 (5 µg), GP2: Glykoprotein 2, L: Lumen, M: Mukus, Pc: *Plica circularis*, TM: *Tunica muscularis*, Trennschicht weiß gekennzeichnet.

Das Substrat wird vor OT-Beschichtung zwar gewaschen, jedoch verbleiben Reste des Darminhalts in den kryptenartigen Vertiefungen des Darmlumens der Gefrierschnitte. Hier lässt sich vor allem GP2 mit entsprechenden AAK-positiven humanen Seren nachweisen. CUZD1 konnte bislang nicht valide nachgewiesen werden. GP2-spezifische Signale konnten ebenso auf Kolon-Substrat (*Macaca mulatta*), abermals im Darmlumen, detektiert werden (Abb. 5-35).

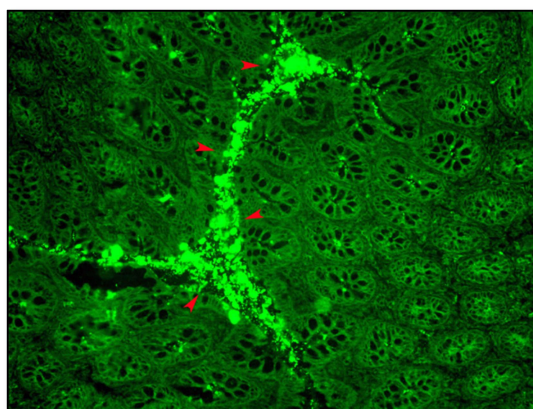


Abb. 5-35 GP2-Lokalisierung im Dickdarm

GP2-Lokalisierung im Kolonbereich. Als Substrat wurde Affendarm in der IIFT genutzt. Die Detektion der spezifischen Signale erfolgte mit einem monoklonalen Anti-GP2- und einen FITC-konjugierten Reporterantikörper. Die körnigen Signale (siehe rote Pfeile im Bild) beschränken sich auf das Darmlumen. Vergrößerung 200-fach.

Für weiterführende Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Universität zu Lübeck, Gastroenterologie, Biopsieproben von CED-Patienten untersucht. Der Fokus lag auf inflammatorischen Bereichen innerhalb des Kolons (*Colon transversum*) von MC-Patienten. Als Kontrolle diente gesundes Darmgewebe von Nicht-CED-Patienten. Die Biopsien wurden im Institut für Anatomie, Universität zu Lübeck, für die TEM vorbereitet und mit PAg-spezifischen Antikörpern (Anti-PAg, Kaninchenserum) inkubiert. Als Reporter wurde abermals ein Gold-konjugierter Antikörper verwendet. Inflammatorische Kolon-Bereiche zeigten eine stark erhöhte Anzahl von PAg-spezifischen Signalen im Mikrovilli- und Glykokalixbereich (Abb. 5-36, A). Kontrollen mit gesundem Gewebe sowie Inkubation mit Präimmenserum zeigten keine Auffälligkeiten (Abb. 5-36, B-D).

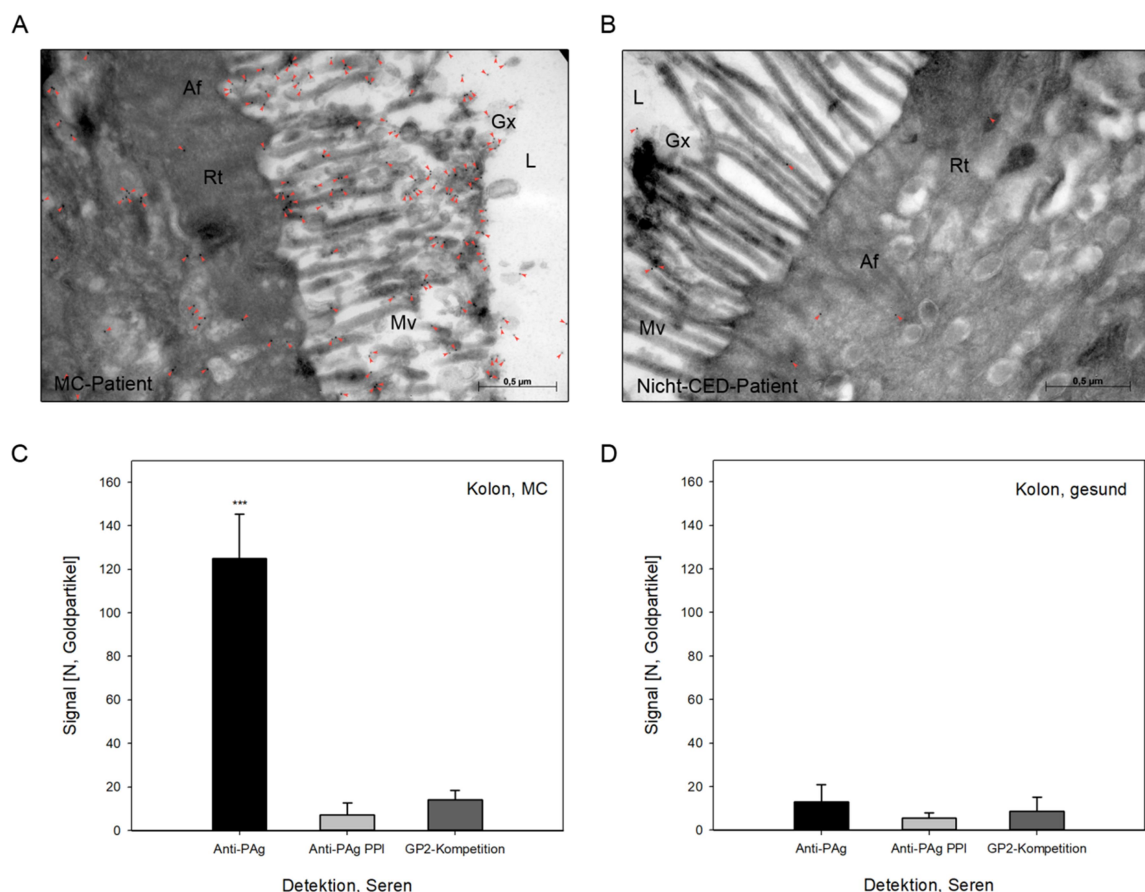


Abb. 5-36 PAg-Lokalisierung im Kolon

Kolon-Biopsien (*Colon transversum*) von CED-Patienten wurden in TEM-Experimenten mit PAg-spezifischen Antikörpern untersucht. Es zeigten sich starke Signale (rote Pfeile) in inflammatorischen Kolonbereichen (Fokus Mikrovilli und Glykokalix) eines MC-Patienten (A). Kontrollbiopsien von Nicht-CED-Patienten (B) zeigten keine Auffälligkeiten. Dies gilt ebenso für Inkubation mit Präimmenserum (Anti-PAg PPI, Auszählung Signale verschiedener Bildausschnitte in C+D). Die Konkurrenz mit rekombinantem GP2 zeigte eine deutliche Signalabschwächung (C). Af: Aktinfilamente, Gx: Glykokalix, L: Lumen, Mv: Mikrovilli, Rt: terminales Netzwerk.

Eine Differenzierung zwischen CUZD1 und GP2 ist aufgrund der verwendeten Antikörper nicht möglich. Allerdings konnten in Konkurrenzexperimenten mit rekombinantem GP2 die Signale signifikant erniedrigt werden.

Die Ergebnisse deuten auf eine Hochregulierung der GP2-Expression und eine Funktion vom Zielprotein im Gastrointestinaltrakt hin. Bei MC könnte die Funktion von GP2 durch das Auftreten von spezifischen Anti-GP2 AAK gestört sein. Weiterführende Experimente zu GP2-Interaktion und Untersuchungen von Stuhlproben sind daher sinnvoll.

5.7.4 Fäzes

Aufgrund der Ergebnisse im Kolon wurden weiterführend Stuhlproben von CED-Patienten auf PAg untersucht. Fäzes-Proben (N=67) wurden in Kooperation mit der Universität zu Lübeck, Gastroenterologie, AG Sina akquiriert. Die Extraktion der Proben und anschließende immunologische Untersuchungen fanden bei der Euroimmun AG, Institut für experimentelle Immunologie, statt. Um nach CUZD1 und GP2 differenzieren zu können, wurde ein *Capture*-ELISA unter Nutzung von PAg-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Sowohl CUZD1 als auch GP2 konnten in den Stuhlextrakten (lösliche Stuhlanteile) nachgewiesen werden (Abb. 5-37).

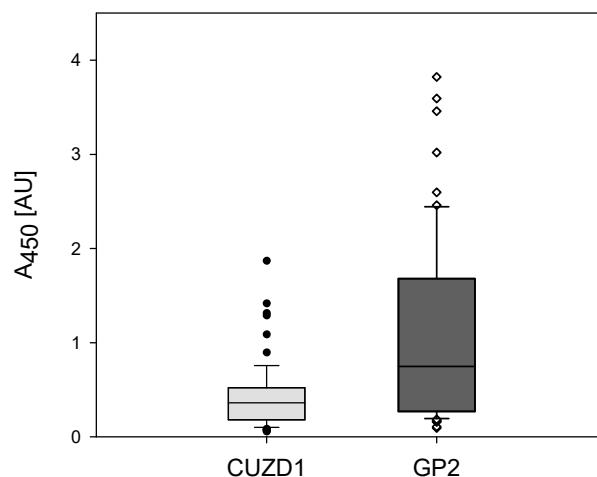


Abb. 5-37 CUZD1 und GP2 im Stuhl

Capture-ELISA zur spezifischen Detektion von CUZD1 und GP2 in CED-Fäzesproben (N=67). Sowohl CUZD1 als auch GP2 lassen sich in wässrigen Stuhlextrakten nachweisen.

Entsprechende Werte schwanken zwar in den einzelnen Tests um 1-2 Absorptionseinheiten, allerdings liegen die Signale deutlich über dem Hintergrund (hier nicht dargestellt). Damit konnten die pankreatischen Zielproteine sowohl im Pankreas, als auch im Pankreassaft, Darmlumen sowie in Stuhlproben nachgewiesen werden.

5.7.5 Leber und Gallenblase

Im Abschnitt 5.3 konnte eine Assoziation von GP2-spezifischen IgA und PSC gezeigt werden, allerdings gibt es bisher keine Hinweise, dass GP2 im hepatobiliären System vorkommt bzw. dort eine funktionelle Rolle spielt. Um weiterführende Untersuchungen durchzuführen wurde Leber, Gallengang und Gallenblase aus *Macaca mulatta* als Substrat in der IIFT genutzt und analog zur Detektion im Pankreasgang (5.7.2) und Duodenum (5.7.3) mit GP2-spezifischen Antikörpern untersucht.

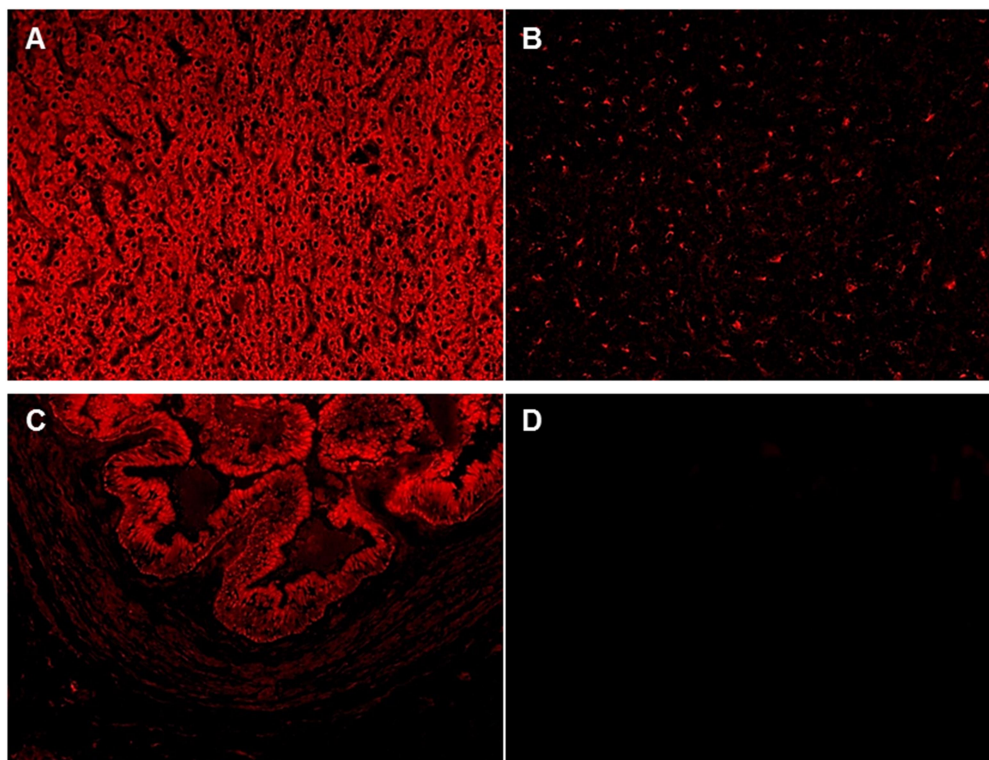


Abb. 5-38 Titration von rekombinantem GP2 auf Leber und Gallenblase

GP2 wurde auf Gewebe des hepatobiliären Systems aus *Macaca mulatta* inkubiert und anschließend spezifisch detektiert. Es zeigen sich proportional zur verwendeten freien GP2-Konzentration Signale. Dies deutet auf Interaktionen von GP2 mit Oberflächenmolekülen hin. A: Leber; Inkubation mit 2,5 μg rekombinantem GP2; B: Leber; 0,25 μg GP2; C: Gallenblase; 2,5 μg GP2; D: Gallenblase; 0,25 μg GP2.

In den Experimenten konnten keine validen Signale oder Muster auf den Geweben detektiert werden (hier nicht dargestellt). Allerdings zeigten sich Signale in kompetitiven Experimenten unter Nutzung von rekombinantem GP2 proportional zur eingesetzten freien GP2-Konzentration (Abb. 5-38). Dies deutet auf eine Interaktion von GP2 mit Oberflächenmolekülen im hepatobiliären System hin.

5.8 GP2 bindet Oberflächenproteine von Mikroorganismen

GP2 konnte sowohl im Pankreas als auch im Darm sowie Stuhl nachgewiesen werden. Eine distinkte Funktion vom Protein ist jedoch bisher noch weitgehend unbekannt. Aufgrund der Homologie zum Tamm-Horsfall-Protein (THP) werden immunmodulatorische Aufgaben vom CED-Zielantigen im menschlichen Organismus postuliert (Hase *et al.*, 2009). Auch finden sich in der Literatur Hinweise auf Interaktionen mit Mikroorganismen (Yu and Lowe, 2009). Die vorangegangenen Lokalisierungsexperimente (5.7.3) deuten auf eine Involvierung in Inflammationsprozessen und eine Funktion von GP2 im Darm hin. Durch rekombinante Darstellung von GP2 konnten *in vitro* Interaktionsexperimente mit MO und proteinogenen Liganden durchgeführt werden. GP2 bindet Oberflächenmoleküle von *E. coli* und *S. typhimurium*. Ein GP2-Bindungspartner ist FimH (bakterielles Adhäsionsprotein). Die Hinweise aus der Literatur konnten damit bestätigt werden. Außerdem zeigte sich, dass die Interaktion *in vitro* pH-abhängig ist: eine starke Bindung konnte vor allem im sauren pH-Milieu gezeigt werden. Im alkalischen pH-Bereich nehmen entsprechende Signale ab. Die Ergebnisse weisen auf eine protektive Funktion von GP2 im Darm hin. Durch die Bindung und Blockierung von FimH kann die Adhäsion von pathogenen MO (vor allem gramnegativ und Fimbrien Typ 1-tragend) an die Darmwand verhindert werden.

5.8.1 Anreicherung von FimH

FimH ist ein Multidomain-Protein und *in vivo* vor allem Bestandteil von Fimbrien gramnegativer Enterobakterien (z. B. *Salmonella enterica*, *E. coli*) (Yue *et al.*, 2012; Geibel *et al.*, 2013). Über seine Pilin-Domain (C-terminal) erfolgt die Verknüpfung zu weiteren bakteriellen Fim-Proteinen und somit die Integration in den Pilus. Die *Lectin-domain* von FimH (N-terminal) bindet glykosylierte, genauer mannosylierte

Oberflächen. FimH trägt damit zur mikrobiellen Adhäsion im Gastrointestinaltrakt höherer Lebewesen bei. Für die Experimente dieser Arbeit wurde ausschließlich nur die *Lectin-domain* verwendet und als FimH bezeichnet.

Die Strategie zur Anreicherung von rekombinant-produziertem FimH (Abb. 5-39) ist ähnlich zur Darstellung von GP2. Auch hier wird ein in der Aminosäuresequenz vorhandener His-Tag (poly-Histidin Sequenz) für eine Affinitätschromatographie (IMAC) genutzt. Ein anschließender Anionenaustauscher erhöht den Isolierungsgrad. FimH wurde allerdings rekombinant und unter denaturierenden Bedingungen aus *E. coli* angereichert. Der Chromatographie erfolgte im *Batch*-Format.

Die entsprechende Zellsuspension wurde 3 h nach Induktion der Gen-Expression für 10 min bei 3500 rcf und 4°C zentrifugiert (Hettich Rotina). Der Mediumüberstand wurde verworfen, die sedimentierten Zellen bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

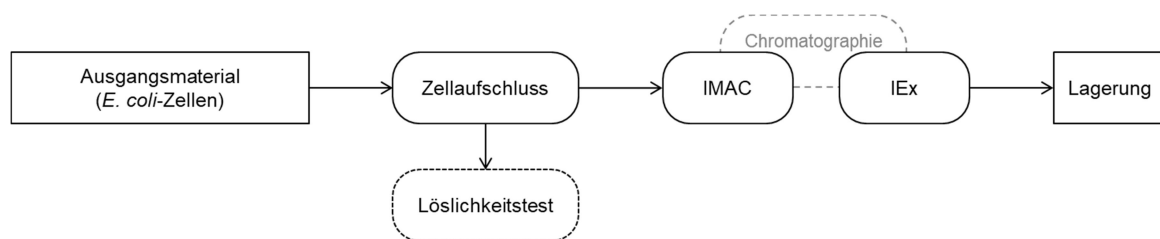


Abb. 5-39 Strategie zur Darstellung von rekombinantem FimH

Rekombinantes FimH wurde aus *E. coli* angereichert. Nach Zellaufschluss zeigte sich in einem Löslichkeitstest, dass das Zielprotein in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies, IB, Abb. 5-40*) vorlag. Es wurde daraufhin denaturierend mit Chaotropen gearbeitet. Die Anreicherung erfolgte im *Batch*-Format mit sequenzieller IMAC und Kationenaustausch-Chromatographie.

FimH wurde intrazellulär produziert (Abb. 5-40, A). Die Sekretion vom rekombinanten Protein mittels Signalpeptid war nicht erfolgreich. Daher mussten die Zellen nach Resuspendierung im Hochdruckhomogenisator (EmulsiFlex, Avestin) lysiert werden. Die Zugabe von Benzonase (0,2 µl Benzonase [250 U/µl] pro 1 mL Zellsuspension) verhinderte die Aggregation von Nukleinsäuren. Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM) wurde als Peptidase-Inhibitor zugegeben. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min bei $1,8 \cdot 10^4$ rcf und 4°C lag das Zielprotein im Sediment vor (siehe Abb. 5-40, A, Spur S). Um die Löslichkeitseigenschaften besser einzuschätzen, wurden ein Test mit Detergenz (2% (w/v) Triton X-100) und Chaotrop (8 M Harnstoff) durchgeführt.

FimH ist trotz Detergenz nicht löslich (Abb. 5-40, B). Lediglich Harnstoff überführt FimH in die wässrige Phase nach Zentrifugation (10 min, $1,8 \cdot 10^4$ rcf, 4°C). Die folgenden Anreicherungsschritte wurden aufgrund dieser Ergebnisse denaturierend durchgeführt. Die darauffolgenden Chromatographieschritte wurden sequenziell im *Batchformat* durchgeführt. Entsprechende Matrices wurden dafür in Leersäulen (Macherey-Nagel) überführt und mit Probe bzw. Puffer überschichtet. Nach Inkubation wurde die mobile Phase über ein Vakuumsystem abgezogen und optional fraktioniert. Im ersten Schritt der Chromatographie wurde FimH über IMAC angereichert. Nach Überführung der Nickel-NTA-Sepharose in die Leersäule wurde die gepackte Säule mit jeweils 2 CV TI500-Eq, T-Eq und TNUGI-20 äquiliert. Danach folgte der Probenauftrag im Verhältnis 1:4 (Säulen- zu FimH-haltigem Auftragsvolumen). Der Durchfluss wurde zu analytischen Zwecken gesammelt, die Säule im Anschluss mit 6 CV TNUGI-20 gewaschen. Die Elution fand mit 300 mM Imidazol (Puffer: TNUI-300) statt. Der FimH-Anreicherungsgrad nach IMAC betrug $>80\%$ (Abb. 5-41, A).

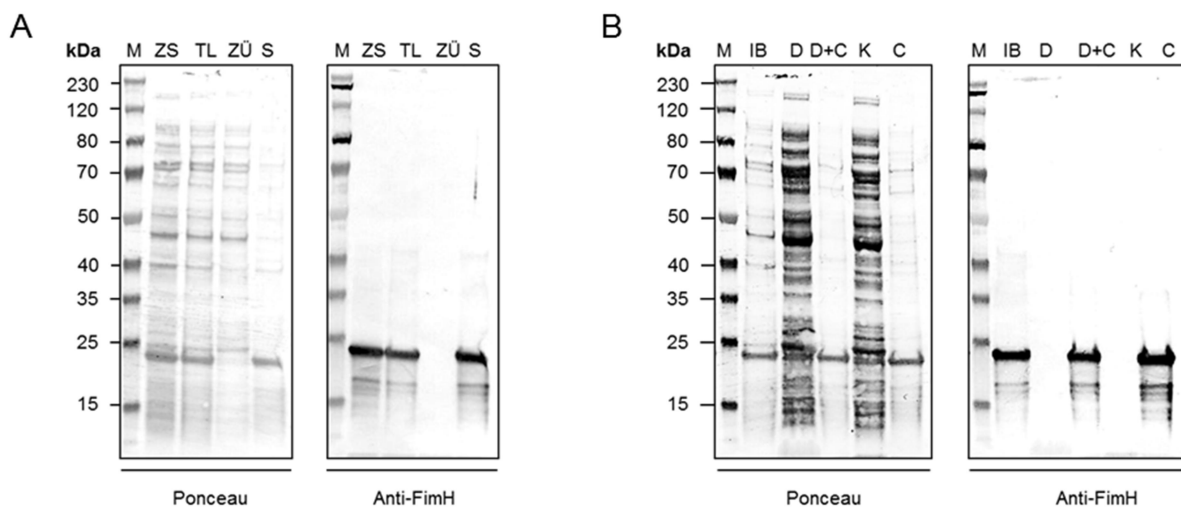


Abb. 5-40 Darstellung FimH, Zellaufschluss und Löslichkeitstest

FimH wurde intrazellulär in *E. coli* produziert. Die Zellen wurden im Anschluss an die Kultivierung lysiert und das Zielprotein auf seine Löslichkeitseigenschaften hin untersucht. Es zeigte sich, dass das Zielprotein unlöslich im Sediment nach Zentrifugation vorlag (A, M: Marker, ZS: Zellsuspension, TL: Lysat, ZÜ: Zellkulturüberstand, S: Sediment, jeweils unspezifisch mit Ponceau bzw. spezifisch über Anti-His Antikörper gefärbt). Untersuchungen mit Detergenzien und Chaotropen (B) gaben Hinweise auf das Vorliegen vom Zielprotein in Einschlusskörperchen. Die Anreicherung erfolgte daher denaturierend mit Harnstoff (M: Marker, IB: Fraktion Einschlusskörper, D: Detergenzfraktion (Triton X-100 Extrakt), D+C: Detergenz- und Chaotropextrakt (Triton, Harnstoff), K: Referenz- bzw. Kontrollansatz mit Tris-basiertem Puffersystem, C: Chaotropansatz).

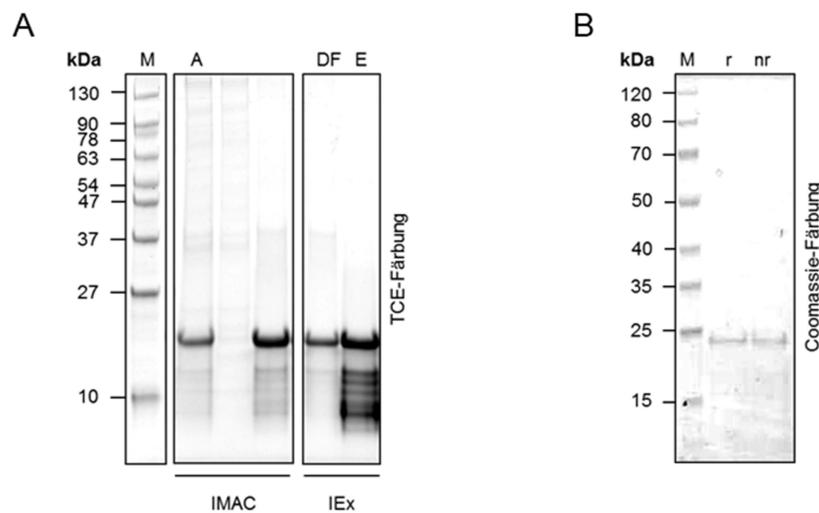


Abb. 5-41 Darstellung FimH, Chromatographie

FimH wurde in Anwesenheit von Harnstoff (Chaotrop) sequenziell über IMAC und Kationenaustausch-Chromatographie angereichert. A: Chromatographie-Analytik, M: Marker, A: Probenauftrag, DF: Durchfluss, E: Elutionsfraktion (Elutionsfraktion der IMAC = Auftrag IEx), B: Präparatgel, konzentrationsnormiert, r: FimH reduziert aufgetragen (Reduzierung mit 15 mM DTT), nr: FimH nicht reduziert aufgetragen.

Als Vorbereitung für die folgende IEx wurden die IMAC-Elutionsfraktionen gepoolt und gegen AU-Puffer dialysiert. Bei der IEx kam ein Kationenaustauscher (SP Sepharose, GE) zum Einsatz. Nach Vorbereitung und Equilibrierung der Säule mit 2 CV AU-Puffer wurde die Probe im Verhältnis 1:20 (Säulenvolumen zu Probenvolumen) aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit 6 CV AU-Puffer erfolgte die kompetitive Elution mit freien Kationen (1 M Natriumchlorid im PBS1000U-Puffer). Nach elektrophoretischer Analytik (Abb. 5-41, A) wurde das finale Präparat (Abb. 5-41, B) bei -20°C gelagert. Der Anreicherungsgrad von FimH lag bei $>90\%$, die finale Massenkonzentration zwischen 1-3 mg/ml. Je Anreicherungsrunde konnten >20 mg Protein dargestellt werden.

5.8.2 GP2-Interaktion mit Mikroorganismen

Zur Untersuchung einer möglichen GP2-Funktion wurden unterschiedliche Interaktionsassays entwickelt und durchgeführt. Als stationäre Phase dienten dabei Magnetpartikel oder Mikrotiterplatten, über die eine Immobilisierung eines Reaktionspartners realisiert wurde. Für die Detektion wurden WB und andere bildgebende Verfahren (EM) genutzt.

Erste Hinweise auf eine Interaktion konnten in EM-Versuchen mit *S. typhimurium* gezeigt werden. Die Mikroorganismen wurden mit rekombinantem GP2 inkubiert. Anschließend wurde mit GP2-spezifischem mAk und TEM detektiert (Abb. 5-42). Es zeigten sich deutliche Signale am MO-Korpus und an flagellen- bzw. fimbrienartigen MO-Strukturen. Hintergrund und Kontrollen (Inkubation mit BSA) blieben unauffällig. Für weitere Untersuchungen wurden die Experimente auf ein plattenbasiertes Format, angelehnt an ELISA-Techniken, adaptiert. Die MO (*E. coli*, *S. typhimurium*) wurden beschichtet, die Plattenoberfläche im Anschluss mit BSA blockiert. Nach Zugabe und Inkubation der so vorbereiteten Platte wurden Signale mit unterschiedlichen GP2-spezifischen mono- und polyklonalen Ak bzw. Seren generiert. Um ein Abspülen der im Vergleich zu Proteinen relativ großen MO zu minimieren, wurden alle Inkubations- und Waschschriff manuell und unter Minimierung von Scherkräften durchgeführt. In diesem plattenbasierten Ansatz konnten eindeutige und GP2-spezifische Signale detektiert werden (Abb. 5-43). Die EM-Ergebnisse wurden hiermit bestätigt. GP2 bindet MO-Bestandteile.

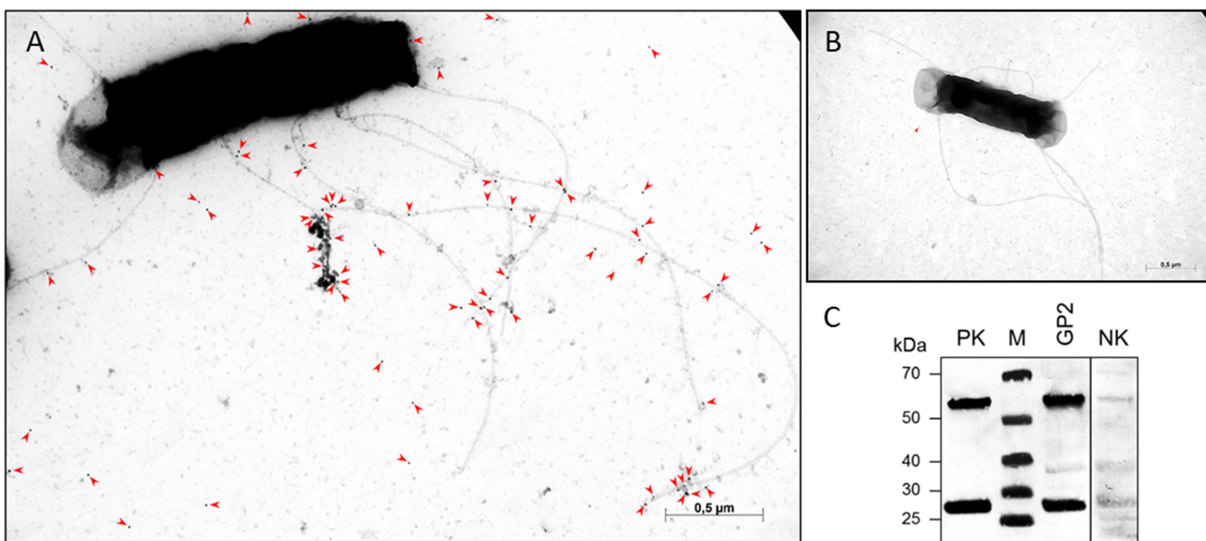


Abb. 5-42 GP2-Interaktion mit *S. typhimurium*

S. typhimurium wurde sowohl mit rekombinantem GP2 (A) als auch mit BSA (Kontrolle, B) inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Waschschriffen mit PBS mit einem GP2-spezifischen Antikörper. Nach EM-Probenvorbereitung wurden die einzelnen Ansätze in der TEM bei 50.000-facher Vergrößerung beurteilt. Es zeigten sich GP2-spezifische Signale (rote Markierungen) am MO-Korpus und Fimbrien bzw. flagellenartigen MO-Strukturen. In einem weiteren Kontrollexperiment (Spin down, C) wurden die Ansätze gelelektrophoretisch beurteilt. Der Nachweis von gebundenem GP2 erfolgte indirekt über Detektion des Anti-GP2 mAk. Durch Reduzierung wurden zwei Banden des Ak in Anwesenheit von GP2 detektiert (leichte- und schwere Ak-Kette). PK: Positivkontrolle (Auftrag Anti-GP2 mAk), M: Marker, GP2: MO-Inkubation mit GP2 und anschließender Detektion mit Anti-GP2 mAk, NK: Negativkontrolle, MO-Inkubation mit BSA und anschließender Detektion mit Anti-GP2 mAk.

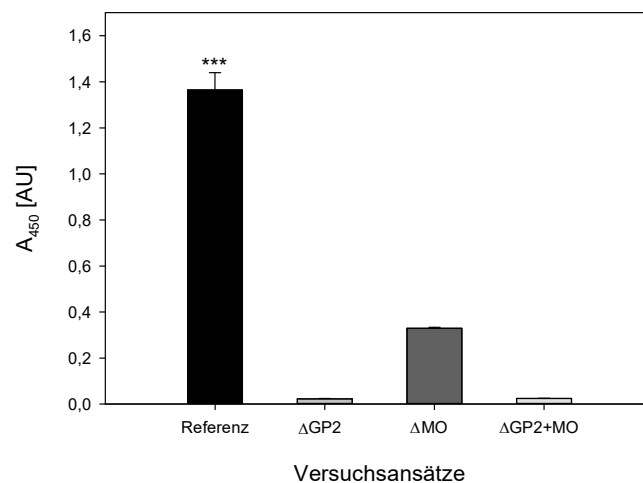


Abb. 5-43 Plattenbasiertes GP2-MO Interaktionsexperiment

Mikroorganismen (*E. coli*) wurden auf eine Mikrotiterplatte beschichtet und mit rekombinantem GP2 inkubiert. Die Detektion erfolgte nach entsprechenden Waschschritten mit GP2-spezifischen Ak bzw. Seren. Es konnten spezifische Interaktionssignale detektiert werden. Kontrollansätze ohne Zugabe von GP2 oder MO (Δ GP2, Δ MO, Δ GP2+MO) zeigten einen signifikanten Signalverlust (>80%, $p < 0,001^{***}$).

Als Kontrolle wurden zusätzlich analoge Versuche mit rekombinant dargestelltem CUZD1 durchgeführt. Es konnten keine Signale in entsprechenden Experimenten detektiert werden (hier nicht dargestellt). Eine Interaktion von CUZD1 mit Mikroorganismen konnte in diesen Experimenten nicht gezeigt werden.

5.8.3 FimH ist ein Ligand von GP2

Als weiteren Experimenttyp zur Untersuchung der Interaktion von GP2 mit MO wurden Magnetpartikel eingesetzt. GP2 wurde dafür über NHS-Chemie kovalent an carboxylierte Metall-Beads gekoppelt und mit MO inkubiert. In den einzelnen Waschschrritten wurden die GP2-Beads über Magneten immobilisiert. Ungebundenes Material konnte so entfernt werden. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze für die EM vorbereitet und im REM bewertet. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen zwar keine/kaum Mikroorganismen, allerdings konnten fimbrien- oder flaggelenartige Strukturen beobachtet werden, die in direktem Kontakt zu den Beads vorkommen (Abb. 5-44). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Fimbrien durch Scherkräfte oder mechanistisch während des Versuchs vom MO abgelöst wurden. Die Bindung zum GP2 bleibt jedoch erhalten.

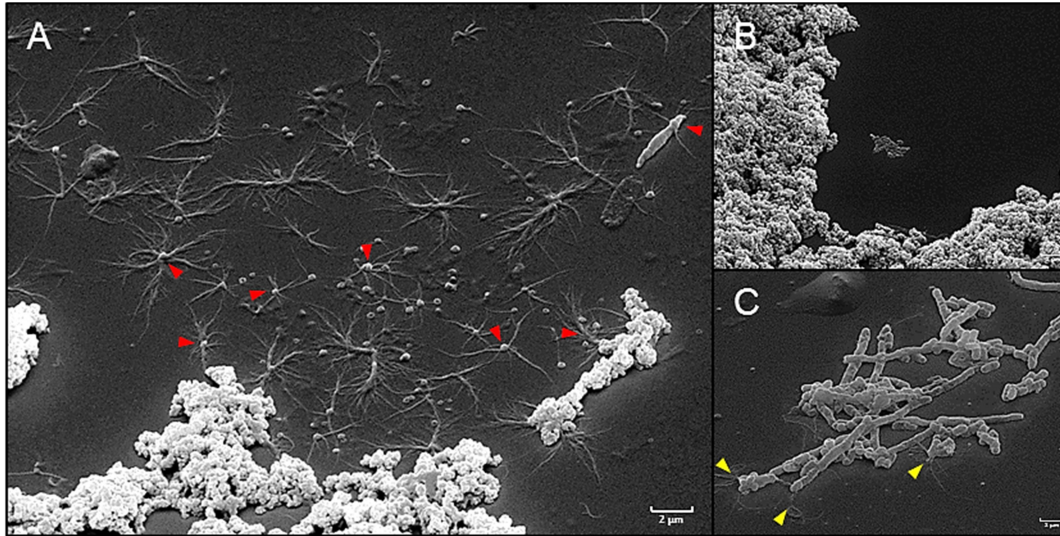


Abb. 5-44 Interaktion GP2-MO, REM

*Bead*basierter Interaktionsassay zum Nachweis der Bindung von GP2 und MO-Bestandteilen. Rekombinantes GP2 wurde kovalent an Metall-*Beads* gekoppelt und mit *E. coli* inkubiert. Im der REM konnten zwar kaum MO im Ansatz nachgewiesen werden, allerdings zeigten sich an *Beads* gebundene Fimbrien (A, rot markiert). B: Kontrolle, GP2-gekoppelte *Beads* ohne MO-Inkubation, C: MO-Kontrolle ohne GP2-Bead Inkubation, Markierung fimbrien- bzw. flagellenartiger Strukturen, REM: 2.000 Zeilen, 32 ms / Zeile, 25 kV, 3700-fache Vergrößerung, Auflösung 10 nm.

Eine weitere Beobachtung war der kompetitive Effekt von Mannose auf die Interaktion (Abb. 5-45). Zusammen mit den REM-Ergebnissen und den Hinweisen aus der Literatur (Yu and Lowe, 2009) konnte der Schluss gezogen werden, dass FimH ein Interaktionspartner von GP2 ist.

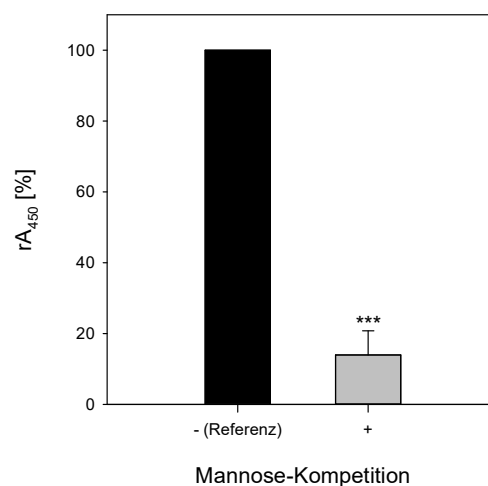


Abb. 5-45 Interaktion GP2-MO, Mannose-Kompetition

E. coli wurde auf eine Mikrotiterplatte beschichtet und mit rekombinanten GP2 inkubiert. Zusätzlich wurde beim GP2-Inkubationsschritt im kompetitiven Ansatz 1% (w/v) Mannose genutzt. Die Zugabe von Mannose führte zu einer signifikanten Signalenkung im Experiment ($p < 0,001^{***}$). FimH besitzt als bakterielles Fimbrienprotein eine Mannose-Lektinaktivität. Diese *in vitro* Ergebnisse deuten auf eine Interaktion von GP2 mit FimH hin.

FimH wurde sowohl als Vollängenprotein als auch nur der Lektin-Domänebereich rekombinant hergestellt. Beide FimH-Varianten interagieren mit GP2. Aufgrund des besseren Löslichkeitsverhaltens wurden weiterführende Experimente mit der Lektin-Domäne von FimH durchgeführt. Die Bindung beider Zielproteine konnte in Protein-Protein Interaktionsstudien gezeigt werden (Abb. 5-46). Allerdings war unklar, welches Protein den aktiven Bindungspartner bzw. Liganden darstellt. Um sich dieser Frage zu nähern, wurden beide Proteine bei verschiedenen pH-Werten durch Hitze denaturiert (70°C, 15 min) und im plattenbasierten Interaktionsexperiment getestet. Die Denaturierung von FimH hatte kaum Einfluss auf die Interaktionen (Abb. 5-47, A). Eine signifikante Signalsenkung ($p < 0,001^{***}$) zeigten jedoch dagegen die Ansätze mit denaturiertem GP2 (Detektionssystem ist von einer GP2-Denaturierung unbeeinflusst, hier nicht dargestellt). Dies deutet darauf hin, dass FimH im biochemischen Sinn den Liganden darstellt. Aufgrund der starken Glykosylierung von GP2 scheint eine Stabilisierung der Bindung durch die Lektinaktivität von FimH jedoch wahrscheinlich.

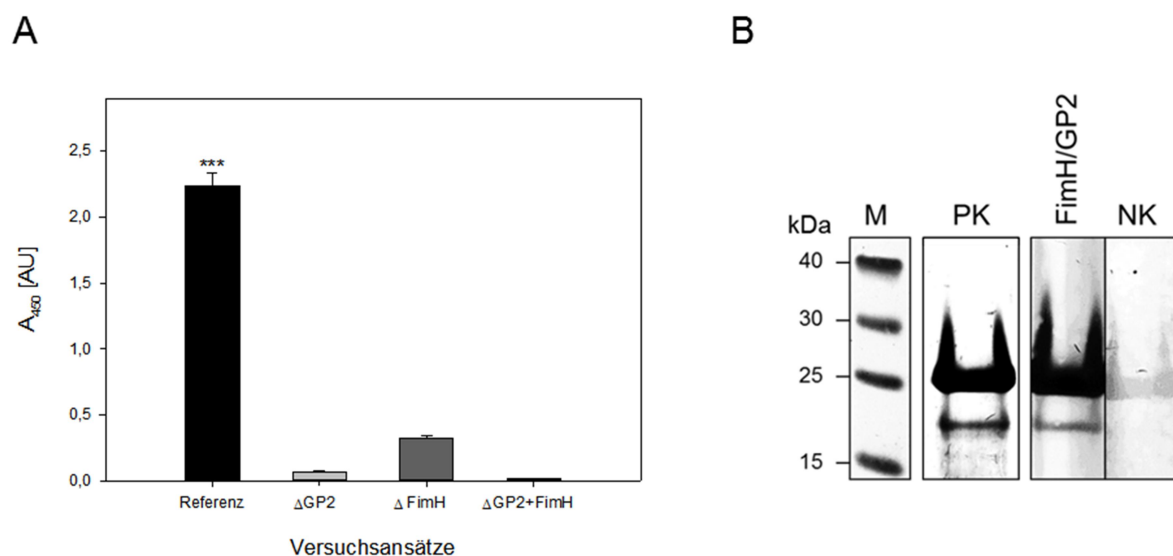


Abb. 5-46 Plattenbasiertes GP2-FimH Interaktionsexperiment

Analog zu MO/GP2-Interaktionsexperimenten (Abb. 5-43) wurde rekombinant-produziertes FimH (Lektindomäne) auf eine Mikrotiterplatte beschichtet und nach einem Blockierungsschritt mit GP2 inkubiert. Die GP2-spezifische Detektion zeigte deutliche kolorimetrische Signale ($p < 0,001^{***}$) bei nur schwachen Hintergrundsignalen entsprechender Kontrollansätze (A). In Validierungsexperimenten (B) wurde FimH elektrophoretisch aufgearbeitet und im WB mit GP2 inkubiert. Die Signale konnten bestätigt werden. M: Marker, PK: Positivkontrolle, FimH/GP2: Interaktionsansatz, NK: Negativkontrolle.

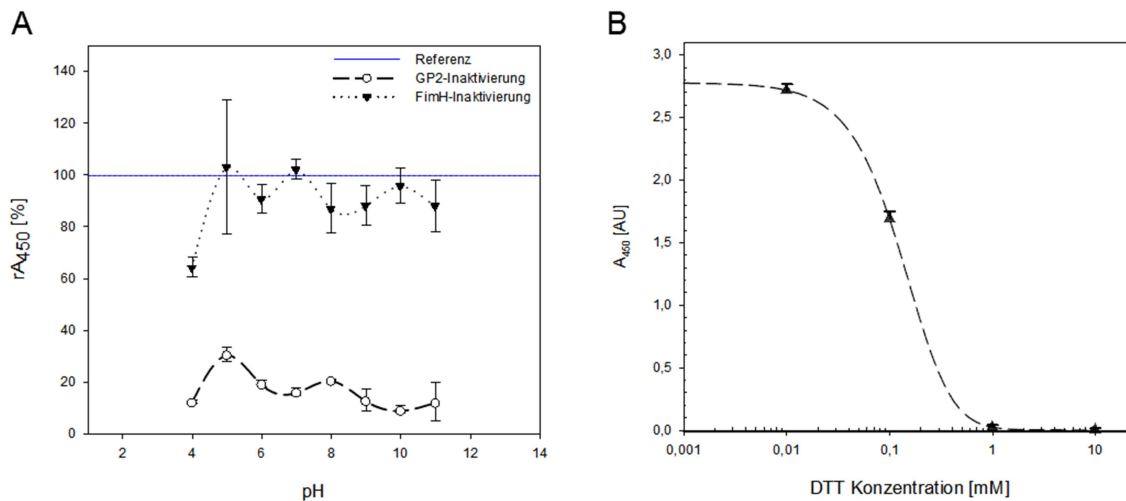


Abb. 5-47 Einfluss der Denaturierung und Reduzierung im GP2-Interaktionsexperiment

Zur Untersuchung der GP2- und FimH-Interaktion wurden beide Proteine im Vergleich zum etablierten Referenzexperiment hitzedenaturiert und bei verschiedenen pH-Werten eingesetzt (A). Die absoluten Signale wurden in Relation zur Referenz (100%) aufgetragen. Die Inaktivierung von FimH führte kaum zu Signaländerungen. Eine signifikante Signalsenkung zeigte sich jedoch bei GP2-Denaturierung ($p < 0,001^{***}$, $N=3$). Untersuchungen der Interaktion unter reduzierenden Bedingungen zeigten eine Abhängigkeit der Signalstärke zur DTT-Konzentration (B). Das Detektionssystem wird im Experiment von DTT nicht beeinflusst (hier nicht dargestellt). Dies deutet auf Interaktion und Bindungsstabilisierung durch Cystine hin.

Eine zusätzliche Untersuchung der Interaktion unter reduzierenden Bedingungen (DTT als Reduzierungsmittel) zeigte ebenso eine deutliche Signalsenkung (Abb. 5-47, B). GP2 verfügt in seiner Aminosäuresequenz über 29 Cysteine, FimH über 2. Vor allem die ungerade Anzahl von Cysteinen bei GP2 könnte für die Ausbildung von intermolekularen Cystinen dienen. Wechselwirkungen mit Interaktionspartnern könnten dadurch verstärkt werden.

In Titrationsexperimenten konnten biochemische Kenngrößen der Protein-Protein Interaktion ermittelt werden. Dafür wurden die Konzentrationen vom Liganden (FimH) variabel gehalten. Bei konstanter GP2-Konzentration (10 $\mu\text{g/ml}$) konnte aus dem resultierenden Kurvenverlauf (Abb. 5-48) eine K_D von $1,4 \cdot 10^{-7}$ M bestimmt werden (SigmaPlot V12.5). B_{max} wurde mit $3,6 \cdot 10^{-6}$ M ermittelt. Das BP liegt bei 25,7. Die GP2-FimH Interaktion ist damit schwächer als eine Antigen-Antikörperbindung ($K_D < 1 \cdot 10^{-9}$ M) (Boder *et al.*, 2000), jedoch stärker als schwache oder unspezifische Bindungen ($K_D \sim 1 \cdot 10^{-6}$ M) (Jiang and Barclay, 2009).

Auch in diesem Modellsystem wurde CUZD1 untersucht. Eine CUZD1-FimH Interaktion konnte nicht gezeigt werden (hier nicht dargestellt). Ebenso konnte eine

mögliche Wechselwirkung von CUZD1 und GP2 über die ZP-Proteindomäne nicht bestätigt werden. Die Funktion von CUZD1 bleibt weiter unbekannt und unterscheidet sich signifikant von GP2.

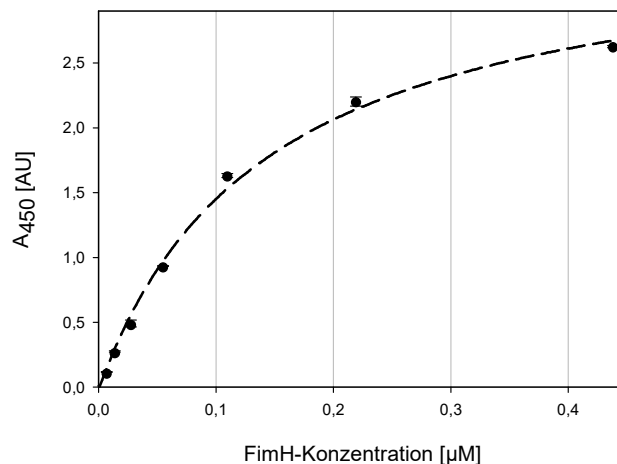


Abb. 5-48 GP2-FimH Interaktion, Titration

Titrationsexperiment zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D), Bindungskapazität des Rezeptors (B_{max}) und Bindungspotential (BP). Die GP2-Konzentration wurde im Experiment konstant gehalten, FimH als Ligand variabel. Aus der resultierenden Titrationskurve konnte eine $K_D=0,14 \mu\text{M}$, $B_{max}=3,6 \mu\text{M}$ und $BP=25,7$ ermittelt werden (Berechnung mit SigmaPlot). $N=3$ (unabhängige Experimente).

5.8.4 GP2-Interaktion ist pH-abhängig

Bereits in den Interaktionsuntersuchungen mit denaturiertem Zielprotein (Abb. 5-47) konnte ein Einfluss des pH beobachtet werden. In weiterführenden Experimenten wurden die Konzentrationen der Interaktionspartner konstant gehalten (GP2: $5 \mu\text{g/ml}$, FimH: $10 \mu\text{g/ml}$), der pH jedoch variiert (pH 4-11). Es zeigten sich sowohl unter Einsatz von Mikroorganismen (*E. coli*, *S. typhimurium*, Abb. 5-49, A) als auch mit rekombinantem FimH (Abb. 5-49, B) als Interaktionspartner von GP2 deutliche pH-abhängige Signalunterschiede. Im sauren Milieu wurden stärkere Signale detektiert (Optimum pH 5-6) als bei alkalischen pH-Werten. Das Detektionssystem blieb von den pH-Änderungen unbeeinflusst (hier nicht dargestellt).

Diese Beobachtung korreliert zum vorliegenden pH im Gastrointestinaltrakt (Fallingborg, 1999). Über die Magensäure wird der pH im Bereich des Pfortners dramatisch gesenkt. Über den Gallen- und Pankreassaft findet eine sukzessive Neutralisierung auf einen Bereich zwischen pH 6-7,5 statt. Der pH im Dickdarm liegt zwischen 5,5-6,5. Das im Experiment ermittelte Optimum deutet auf eine

Hauptfunktion des GP2 im Darm hin. Eine Interaktionsfunktion des GP2 im alkalischen Pankreas bzw. Pankreassaft erscheint nicht plausibel.

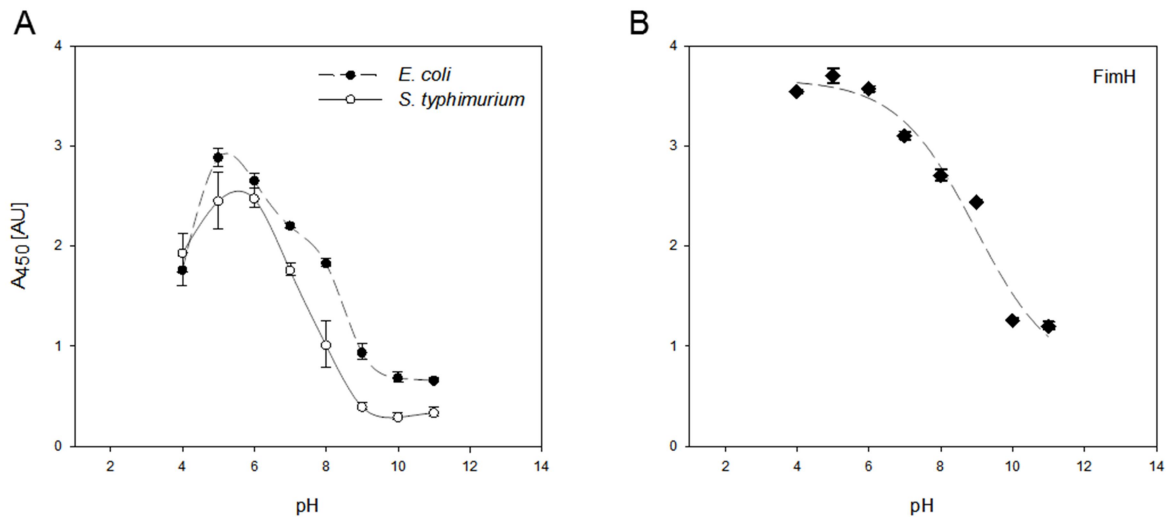


Abb. 5-49 pH-Abhängigkeit der GP2-FimH Interaktion

Sowohl MO (A, *E. coli*, *S. typhimurium*) als auch rekombinantes FimH (B) wurden im GP2-Interaktionsexperiment bei variablen pH (pH 4-11) getestet. Es zeigten sich Unterschiede in den resultierenden Signalstärken: im sauren Bereich konnten gegenüber alkalischem pH-Milieu stärkere Signale beobachtet werden. Ein Optimum zeigte sich bei pH 5,5-6. N=3.

5.8.5 Einfluss von Patientenseren auf die GP2/FimH-Interaktion

In anschließenden Untersuchungen wurde der kompetitive Effekt von CED-Patientenseren auf die GP2-FimH Bindung untersucht. Es zeigte sich eine Störung der Interaktion, die allerdings unabhängig von Patientendiagnose und Vorhandensein von PAg-spezifischen AAK auftrat (Kompetition: CU-Seren: 83,3%, N=35, MC-Seren: 85,7%, N=30, Nicht-CED-Seren: 80,5%, N=27, $p > 0,05$, hier nicht dargestellt). Daraufhin wurde ein Modellwechsel vorgenommen und Stuhlproben von CED-Patienten untersucht.

5.9 Stuhluntersuchungen

CED mit CU und MC als Hauptentitäten umfassen Krankheiten, die sich vor allem im GI manifestieren. Stuhluntersuchungen als diagnostische Methode in CED spielen jedoch in der Anamnese eine untergeordnete Rolle und beschränken sich zumeist auf allgemeine Inflammationsmarker wie fäkales Calprotectin und Lactoferrin

(Sipponen *et al.*, 2008a). Bereits in den hier beschriebenen Lokalisierungsexperimenten (5.7.4) konnten sowohl CUZD1 als auch GP2 als MC-assoziierte PAg im Stuhl nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte GP2 eine Interaktion mit Enterobakterien (5.8.2). Zur weiterführenden Untersuchung wurden in Kooperation mit der AG Sina, Gastroenterologie, Universität zu Lübeck, Stuhlproben von CED-Patienten gesammelt und eine Methode zur parallelen Aufarbeitung und Extraktion von Fäzesproben entwickelt. Die daraus resultierenden Extrakte wurden auf Markerproteine und spezifische Immunglobuline hier untersucht.

5.9.1 Fäzes-Probenkollektiv

Für die Fäzes-Untersuchung wurden zusätzlich zu den akquirierten CED-Patientenseren (5.1.1) Stuhlproben erhoben (Ethikvotum AZ 13/084A; AZ 05-112). Eingeschlossen wurde Fäzes von CED-Patienten mit zum damaligen Zeitpunkt gesicherter und eindeutiger Diagnose. Als Kontrollen dienten Proben von Nicht-CED-Patienten. Eine weitere Differenzierung nach Geschlecht, Alter und Erkrankungsdauer wurde nicht vorgenommen.

5.9.2 Inflammationsmarker

Zur Methodenetablierung wurden prozessierte wässrige Stuhlextrakte auf CED-relevante Inflammationsmarker untersucht. Fäkales Lactoferrin (80 kDa) konnte dabei sowohl im Westernblot (Abb. 5-50, A) als auch in einem Capture-ELISA (Abb. 5-50, B) nachgewiesen werden. Für den ELISA wurde als Fängerantikörper ein intern-produzierter mAk (Euroimmun) genutzt, zur Detektion das polyklonale Serum eines mit rekombinanten Lactoferrin immunisierten Kaninchens. Die Stuhlproben wurden in einer 1:1.000 Gesamtverdünnung eingesetzt und qualitativ sowie semi-quantitativ untersucht.

Es zeigte sich, dass CED-Patienten signifikant-erhöhte Signale gegenüber Nicht-CED-Patienten im Lactoferrin-spezifischen ELISA aufwiesen ($p=0,002^{**}$, hier nicht dargestellt). Differentialdiagnostisch änderte sich dieses Bild: hier wiesen nur die CU-Patienten signifikante Unterschiede auf (Abb. 5-50, B, $p<0,001^{***}$). Die MC- und Nicht-CED-Kohorte zeigten ähnliche Signalverteilungen ($p=0,962$).

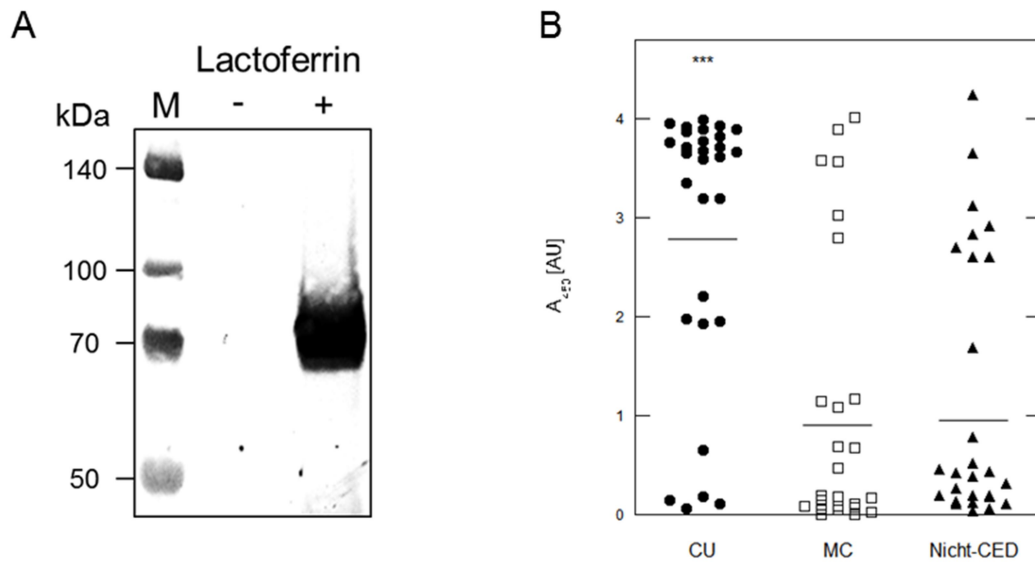


Abb. 5-50 Qualitativer Lactoferrinnachweis in Stuhlproben

Lactoferrin konnte in prozessierten Stuhlproben im Westernblot (A) nachgewiesen werden. Unter Nutzung eines pAk zeigte sich ein deutliches Signal bei ca. 80 kDa in der Inkubation (M: Marker, (-): vorcharakterisierte Stuhlprobe, Lactoferrin negativ, (+): vorcharakterisierte Stuhlprobe, Lactoferrin positiv). Im Capture-ELISA (B) konnte Lactoferrin ebenfalls nachgewiesen und differentialdiagnostisch beurteilt werden. CU-Patienten zeigten signifikant höhere Lactoferrin-spezifische Signale als MC- bzw. Nicht-CED-Patienten ($p < 0,001^{***}$). MC- und Nicht-CED-Patientenproben zeigten ähnliche Signalverteilungen ($p = 0,962$). N: CU: 30, MC: 30, Nicht-CED: 33).

Damit scheint Lactoferrin als Inflammationsmarker vor allem bei CU erhöht vorzuliegen. Dies wird auch in entsprechenden *Receiver-Operating-Characteristic* (ROC)-Kurven zur Testbeurteilung deutlich. Beim Vergleich der Signale von CU- und Nicht-CED- Patienten (Abb. 5-51, A) kann bei einem Grenzwert von 2,5 µg/g fäkalem Lactoferrin (entspricht 1,8 AU im Capture-ELISA) eine Test-Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 75,8% erreicht werden. Die Testgenauigkeit liegt bei soliden 77,8%, die Fläche unterhalb der Kurve (AUC) bei 0,81. Im Vergleich dazu zeigt die Analyse der untersuchten MC- zu Nicht-CED-Proben (Abb. 5-51, B) eine Sensitivität von lediglich 40% und eine Spezifität von 66,7%. Die Unterschiede zwischen beiden Kohorten sind nicht signifikant ($p = 1,399$), die Testgenauigkeit und AUC liegen unter 50% (bzw. 0,5). Mit diesen Resultaten konnte gezeigt werden, dass eine semi-quantitative Bestimmung von fäkalem Lactoferrin die Patientenbeurteilung in der CED-Differenzialdiagnostik und im Zusammenspiel mit anderen Verfahren unterstützen und wertvolle Informationen liefern kann.

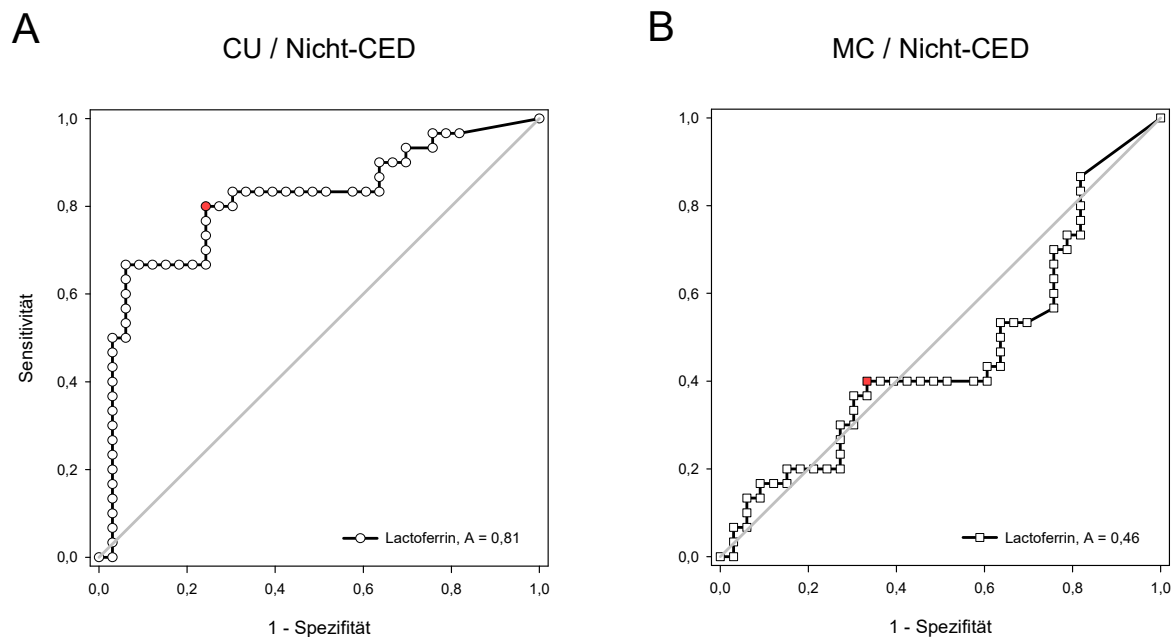


Abb. 5-51 Differenzialdiagnostische ROC-Analyse von Lactoferrin-spezifischen Assays

Wässrige Extrakte von CED- und Nicht-CED-Patienten-Stuhlproben wurden in einem Lactoferrin-spezifischen Capture-ELISA vermessen. Die Beurteilung des Assays erfolgte über *Receiver-Operating-Characteristics* (ROC). CU-Patienten zeigen im Vergleich deutlich erhöhte Signale. Der Test unterscheidet signifikant zwischen CU und Nicht-CED. MC-Patienten zeigen keine Unterschiede zu Nicht-CED-Patienten. CU: Konfidenzintervall (CI) 0,70-0,92, $p < 0,001^{***}$, AUC: 0,81, Grenzwert (rote Markierung): 2,5 µg/g, Sensitivität 80,0%, Spezifität 75,8%, MC: CI: 0,32-0,61, $p = 1,399$ (nicht signifikant), AUC: 0,46, Grenzwert: $< 0,1$ µg/g, Sensitivität 40%, Spezifität 66,7%.

Neben Lactoferrin gilt Calprotectin als Goldstandard bei Untersuchungen von fäkalen Inflammationsmarkern. Parallel zur Entwicklung des Lactoferrin-Assays wurde bei der Fa. Euroimmun AG, Abteilung Point of Pharmacy, ein Testverfahren zur quantitativen Bestimmung von fäkalem Calprotectin entwickelt. Für die Untersuchungen wurde das gleiche Kollektiv wie für Lactoferrin genutzt. Auch Calprotectin konnte deutlich und unter Nutzung von kommerziellen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 5-52, A). Die ermittelte Calprotectinkonzentrationen korreliert zum fäkalem Lactoferrin ($r^2 = 0,71$), obwohl eine etwa 10-fach höhere Gesamtmenge von Calprotectin in den Stuhlproben detektiert werden konnte.

Calprotectin liegt analog zum Lactoferrin erhöht in Proben von CED-Patienten vor. Interessanterweise sind diese Unterschiede im Serum weniger stark ausgeprägt als in Stuhlproben: bei 69 untersuchten CED-Patienten im Alter zwischen 17-80 Jahren (Median 46 Jahre) konnte eine Calprotectin-Serumkonzentration von 13 µg/ml sowie eine Konzentration im Stuhl von 426 µg/g ermittelt werden (hier nicht dargestellt,

publiziert) (Koeppel *et al.*, 2016). Nicht-CED-Patienten (N=28, Alter zwischen 18-77 Jahre, Median 42 Jahre) zeigten im Serum 8 µg/ml Calprotectin ($p=0,007^{**}$, Bezug CED), im Stuhl dagegen 53 µg/g ($p<0,001^{***}$). Sowohl fäkales Lactoferrin als auch Calprotectin haben somit das Potential, die Diagnosestellung in der Klinik zu unterstützen.

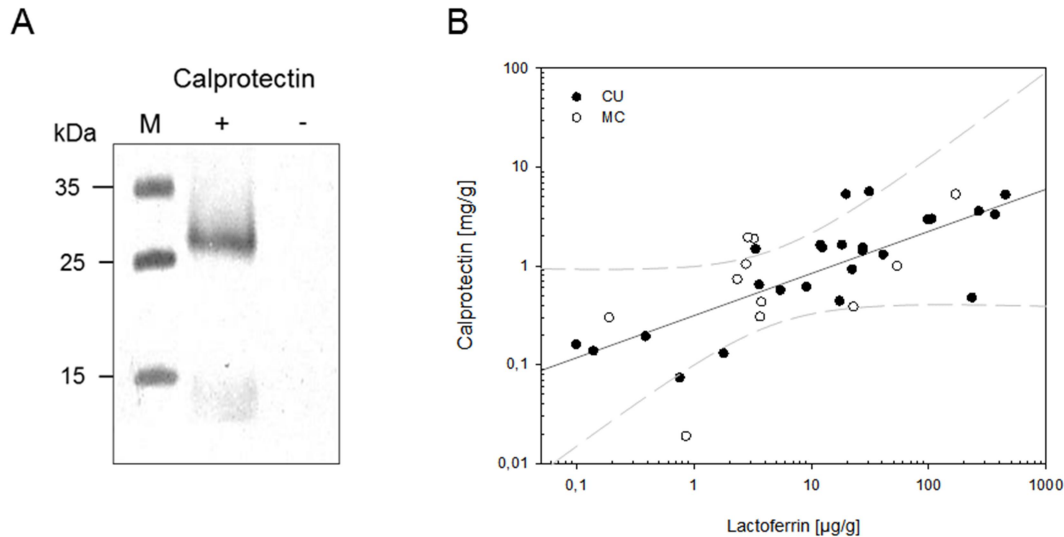


Abb. 5-52 Gegenüberstellung fäkales Calprotectin und Lactoferrin bei CED-Patienten

Calprotectin konnte im WB (A) nachgewiesen werden. Die Bande bei ca. 30 kDa deutet auf das Dimer hin. Die Untereinheit S100A9 zeigt bei 14 kDa ein schwaches Signal. Calprotectin im Stuhl korreliert zum Lactoferrin (B), allerdings ist die Calprotectin-konzentration um Faktor 10 höher. Konfidenzintervall 95%, $r^2 = 0,71$.

5.9.3 Immunglobuline im Stuhl

CUZD1 und GP2 konnten in humanen Stuhlproben nachgewiesen werden (5.7.4). Allerdings scheinen diese Ergebnisse keine differenzialdiagnostische Relevanz in CED zu besitzen (CUZD1: CU/MC $p=0,215$, GP2:CU/MC $p=0,338$, Abb. 5-53), da untersuchte Stuhlproben von Nicht-CED-Patienten vergleichbare Ergebnisse zeigten (CUZD1: $p=0,064$, GP2: $p=0,766$, hier nicht dargestellt). Daher wurden die Stuhlproben neben den CED-relevanten Antigenen auch auf spezifische Antikörper hin untersucht. Stuhlproben sind heterogen zusammengesetzt. Im Vergleich zu Seren ist IgA die Haupttität der Immunglobuline im Stuhl (Samson *et al.*, 1973), die Untersuchungen mittels *Capture*-ELISA bestätigten die Literaturdaten (hier nicht dargestellt). Allerdings zeigten sich keine Unterschiede in den Gesamt-IgA Signalen von CED-Patientenproben im Vergleich zu Nicht-CED-Proben ($p=0,133$, Abb. 5-54, A).

Auch differenzialdiagnostisch konnten keine signifikanten Aussagen generiert werden (p : CU/MC=0,197, CU/Nicht-CED=0,064, MC/Nicht-CED=0,566).

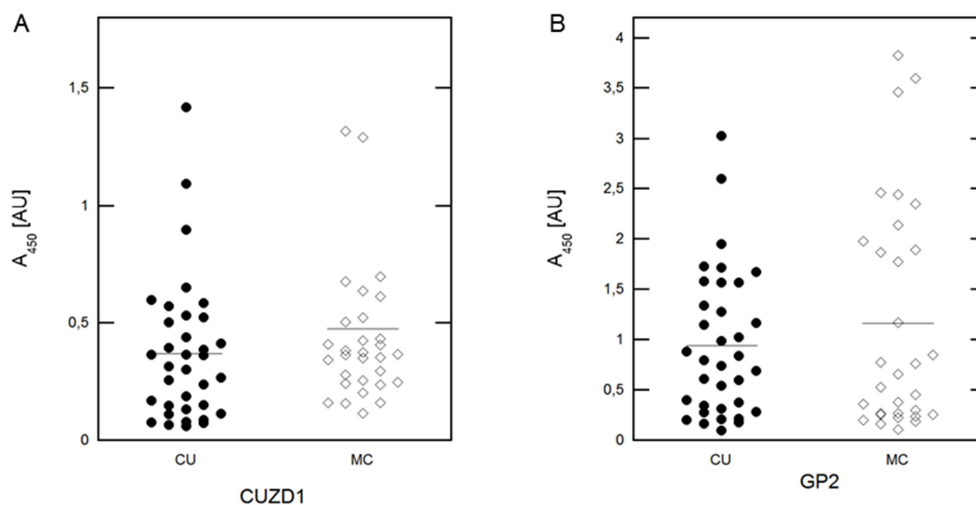


Abb. 5-53 Differenzialdiagnostische Untersuchung von CUZD1 und GP2 im Stuhl

CU- und MC-Patienten wurden auf PAg im Stuhl untersucht (Capture ELISA von Fäzes-Extrakten). Es konnte keine differenzialdiagnostische Korrelation der Signale zu CED-Subtypen festgestellt werden. Auftrag der reduzierenden Einzelsignale im Capture ELISA, A: spezifische CUZD1-Analytik, keine signifikanten Unterschiede zwischen CU- und MC-Patienten ($p = 0,215$), B: Untersuchung auf GP2, CU- und MC-Patienten zeigen ähnliche Signalverteilungen ($p = 0,338$), N: CU: 35 Patientenproben, MC: 31.

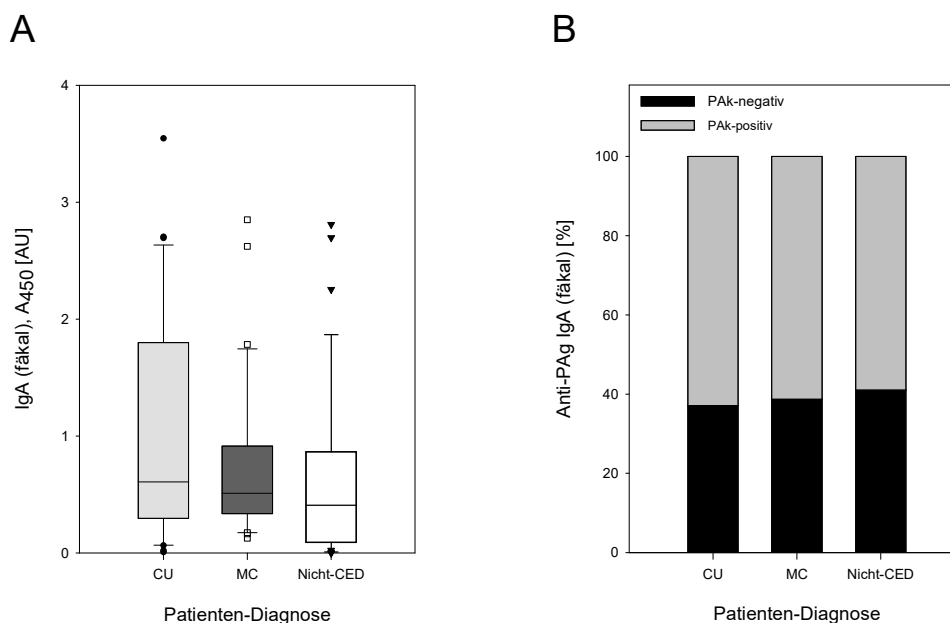


Abb. 5-54 Untersuchung von fäkalem Gesamt- und PAg-spez. IgA

Prozessierte Stuhlproben wurden im Capture ELISA auf Gesamt-IgA untersucht (A). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten (CU-, MC- und Nicht-CED-Patienten, $p=0,133$). Auch die Untersuchung auf fäkale PAK in der IIFT (B) zeigte keine krankheitsbedingte Assoziation bzw. klinische Relevanz zu CED. N: CU:35, MC: 31, Nicht-CED: 39.

Die Untersuchung wurde auf PAg-spezifische IgA erweitert. Diese konnten zwar in der IIFT (modifiziertes Protokoll) nachgewiesen werden, anders als im Serum zeigte sich jedoch keine Assoziation zu CED (Abb. 5-54, B). Ein interessanter Nebenbefund war, dass allein Anti-GP2 IgA nachgewiesen wurden (sowohl auf Pankreas-Gewebe mit atypisch-tropfigem Muster [Abb. 5-55, A], als auch auf rekombinantem Substrat [Abb. 5-55, B]). CUZD1-spezifische Immunglobuline konnten nicht nachgewiesen werden. In Experimenten zur Subklassendifferenzierung (Abb. 5-56) wurden im Vergleich zum Serum sowohl Anti-GP2 IgA1 als auch IgA2 identifiziert.

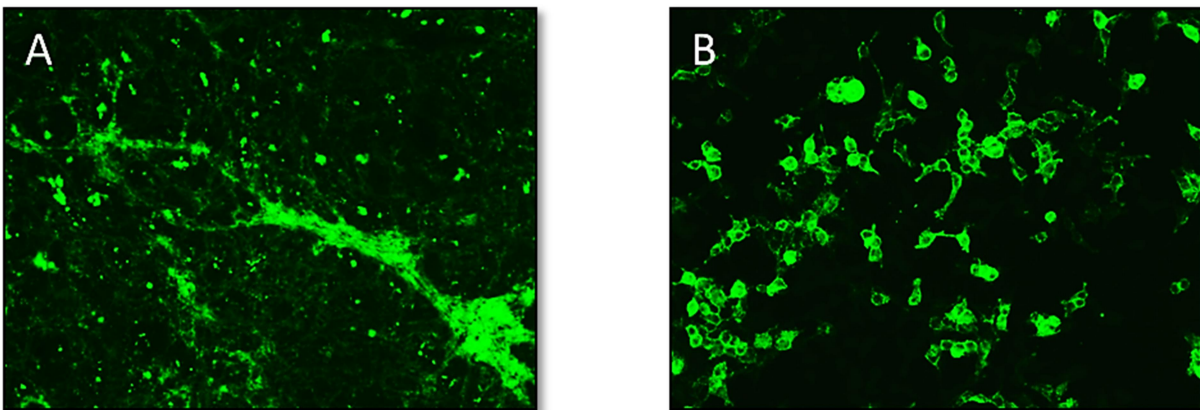


Abb. 5-55 GP2-spezifische IgA-Detektion in der IIFT

Nachweis von Anti-GP2 IgA in der IIFT auf Pankreas (A, atypisch tropfiges Muster) und rekombinantem Substrat (B). Vergrößerung: 200-fach, FITC konjugierter Reporter.

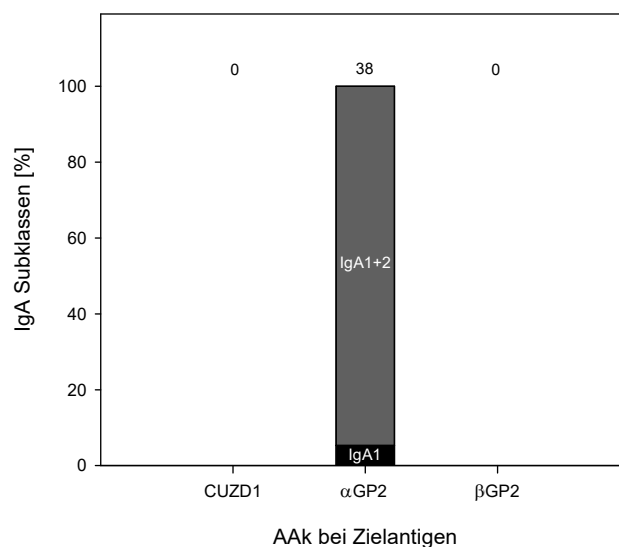


Abb. 5-56 PAg-spezifische IgA in Stuhlproben, Subklassenuntersuchung

In der IIFT wurden 38 PAK-positive CED-Patienten untersucht. Es wurden ausschließlich IgA, spezifisch gegen α GP2, detektiert (Titerstufen: Min 1:10, Max 1:320, Median 1:32). Im Gegensatz zu den untersuchten Seren (5.5.1) wurde neben IgA1 auch spezifisches IgA2 detektiert.

Gegebenenfalls kann die spezifische IgA2-Detektion im Blut als Nachweis einer Barriestörung dienen. Ferner konnten im Stuhl lediglich Antikörper gegen α GP2 nachgewiesen werden (Anti- β GP2 Ak negativ). Das konformationelle Hauptepitop (WB negativ, hier nicht dargestellt) scheint im α -unikalen Aminosäurebereich vorzuliegen.

5.9.4 Unbekannte Stuhlbestandteile inhibieren die FimH/GP2-Interaktion

In 5.8.5 wurde bereits der Einfluss von humanen Patientenseren auf die Interaktion von GP2 und FimH untersucht, allerdings hemmen Serumbestandteile das Experiment in solchem Ausmaß, dass keine valide Testkonfiguration eingestellt werden konnte. Da GP2 seine Hauptfunktion nach bisherigen Erkenntnissen vor allem im GI ausübt, wurde ein Modellwechsel vorgenommen. Stuhlproben von CED- und Nicht-CED-Patienten wurden wässrig extrahiert, die resultierenden Extrakte im kompetitiven Interaktionsassay getestet. Auch bei der Nutzung von Stuhlproben konnte eine Konkurrenz festgestellt werden, allerdings ist diese Konkurrenz Anti-GP2 IgA unabhängig ($p=0,077$, Abb. 5-57, A).

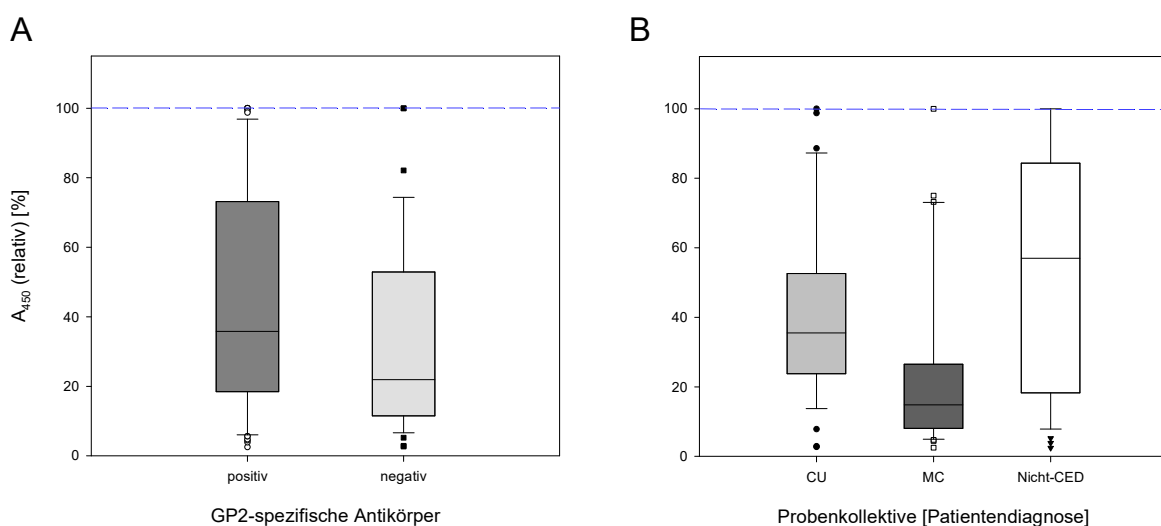


Abb. 5-57 Interaktion von GP2 und FimH, Konkurrenz mit humanen Stuhlproben

Im etablierten GP2-FimH-Interaktionsassay wurden prozessierte Stuhlproben von CED- und Nicht-CED-Patienten untersucht und ein kompetitiver Effekt festgestellt. Allerdings ist (A) die Konkurrenz unabhängig von GP2-spezifischen Antikörpern ($p=0,077$). Signifikante Unterschiede zeigen sich erst bei differenzialdiagnostischer Betrachtung der verschiedenen Patientenkohorten (B): CU/Nicht-CED $p=0,042^*$, MC/Nicht CED $p<0,001^{***}$, CU/MC $p=0,013^*$. N: CU: 35, MC: 31, Nicht-CED: 39.

Vielmehr konnten jedoch differenzialdiagnostische Effekte beobachtet werden: CU- und MC-Patienten zeigen gegenüber Nicht-CED-Patienten eine signifikante Störungen des Interaktionsassays (CU/Nicht-CED: $p=0,042^*$, MC/Nicht: $p<0,001^{***}$, N: CU=35, MC=31, Nicht-CED=39). Auch besteht ein Unterschied in der CED-Kohorte zwischen CU- und MC-Patienten ($p=0,013^*$).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von GP2 durch noch unbekannte Fäzes-Bestandteile oder Interaktionspartner (z. B. mikrobiellen Ursprungs oder unbekannte körpereigene Produkte) gestört oder manipuliert wird. Proben von MC-Patienten zeigen dabei die signifikant-größten kompetitiven Effekte in der gewählten Testkonfiguration. Versuche zur Identifikation bislang unbekannter Interaktionspartner und zur Ableitung weiterer GP2-Funktionen sollten durchgeführt werden.

6 Diskussion

6.1 Klinische Relevanz von CUZD1 und GP2

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen umfassen heterogene Krankheitsbilder. Die beiden Hauptformen CU und MC werden vor allem über invasive Verfahren diagnostiziert. Serologische Marker sind Gegenstand aktueller Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurden Autoimmunreaktionen im Umfeld von CED serologisch untersucht. Klinisch vorcharakterisierte CU- und MC-Patienten wurden retrospektiv auf PAK, ferner auf ASCA, BAg, DNS-geb. Lf und pANCA getestet. CU-Patienten zeigen gegenüber MC deutlich erhöhte Prävalenzen bei pANCA und DNS-geb. Lf. Eine Korrelation von pANCA mit CU wurde erstmals 1990 von Rump *et al.* beschrieben. Weitere publizierte Studien folgten: veröffentlichte Prävalenzen von 20-85% (Rump *et al.*, 1990) entsprechen den Ergebnissen dieser Arbeit. DNS-geb. Lf wurde initial 2009 von Teegen *et al.* beschrieben. Die publizierte Prävalenz von 67% bei CU-Patienten wurde in dieser Arbeit nicht erreicht. Gegebenenfalls ist dies auf Unterschiede in der Kohortengröße und -zusammensetzung bzw. Diagnosestellung der eingeschlossenen Patienten zurückzuführen. Weitere Studien zum DNS-geb. Lf wurden bis *dato* nicht publiziert. Eine parallele serologische Untersuchung von pANCA und DNS-geb. Lf unterstützt jedoch die Diagnosestellung in CED. Beide Parameter korrelieren mit CU (pANCA oder DNS-geb. Lf positiv: Sensitivität 81,7%, Spezifität 86,8%).

BAk wurden initial mit einer Prävalenz von 28% bei CU beschrieben (Stöcker *et al.*, 1984). Im Jahr 1997 publizierten Folwaczny *et al.* Prävalenzen von 39% bei CU- und 30% bei MC-Patienten (Folwaczny *et al.*, 1997). Spätere Studien korrigierten diese im Vergleich hohen Werte nach unten: 2009 beschrieb Lakatos *et al.* BAK-Prävalenzen von 15,4% bei CU- und 1,4% bei MC-Patienten (Lakatos *et al.*, 2009), 2012 Kovacs *et al.* 12,2% bei CU und 1,9% bei MC (Kovacs *et al.*, 2012). Die vorliegende Arbeit setzt den Trend zu fallenden Prävalenzen von BAK im Umfeld von CED fort. Dies könnte vor allem in Weiterentwicklungen der genutzten Testsysteme begründet sein. Historisch wurde in der IIFT Darmgewebe (human und simian) für

serologische Untersuchung genutzt. Nachteile dieses Biomaterials liegen in Schwankungen der Becherzellquantität und -differenzierung (aufgrund der Entnahme unterschiedlicher Darmsegmente, Alter der Spender etc.) und der Beobachtung bzw. Beurteilung unterschiedlicher Muster (z. B. wolkig, kristallin). Später wurden immortale humane Kolonzellen (HT29-18N2) genutzt, die *in vitro* zu Becherzellen differenzieren (Phillips *et al.*, 1995), sowie ELISA-basierte Systeme (Hibi *et al.*, 1994). Diese technischen oder auch präparativen Entwicklungen haben Einfluss auf die Sensitivität und Spezifität des Testsystems. Auch lassen sich demographische und ökotrophologische Phänomene nicht ausschließen. Die BAK-Entstehung und Progression ist bis heute nicht abschließend geklärt.

MC-Patienten zeigen erhöhte Werte bei ASCA und PAK. ASCA wird dabei als serologischer Goldstandard bei MC betrachtet. Publierte Prävalenzen (Prideaux *et al.*, 2012) von 29-69% bei MC (CU: 0-29%) entsprechen dieser Studie. Ein Fokus dieser Arbeit wurde auf die Untersuchung von PAK bzw. Antikörper gerichtet gegen CUZD1 und GP2 gelegt. Beide pankreatischen Proteine wurden als Zielantigene bei MC identifiziert (Roggenbuck *et al.*, 2009; Komorowski *et al.*, 2013). Die Prävalenzen von PAK wurden bei MC mit 35,4% ermittelt. Es folgten weitere Studien unterschiedlicher Arbeitsgruppen: Anti-CUZD1 wurde mit Prävalenzen von 3-16% bei CU- sowie 21-26% bei MC-Patienten beschrieben, Anti-GP2 mit 2-19% bei CU bzw. 10-54% bei MC (Kovacs *et al.*, 2012; Papp *et al.*, 2015; Pavlidis *et al.*, 2015; Aulinger-Stöcker, 2017). Diese Ergebnisse korrelieren zu den Beobachtungen dieser Arbeit (Anti-CUZD1: CU=5,9%, MC=25,0%, Anti-GP2: CU=2,9%, MC=18,8%). Auch konnten diese in der IIFT-generierten Ergebnisse in einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Anti-CUZD1- bzw. Anti-GP2 spezifischen ELISA validiert werden (Anti-CUZD1: CU=7,4%, MC=26,8%, Anti-GP2: CU=6,6%, MC=15,6%). Gesunde Blutspender zeigten keine PAg-spezifischen AAK (Untersuchung von $N_{\text{Serum}} > 100$).

Die zusätzliche Untersuchung von PAK untermauert die MC-Diagnosestellung in der Differenzialdiagnostik. In dieser Arbeit konnte eine Sensitivität von 35,6% und eine Spezifität von 90,4% ermittelt werden. Diese Werte entsprechen Literaturangaben (Spezifität 31,3%, Sensitivität 90,7%) (Zhang *et al.*, 2017). Auch gegenüber weiteren serologischen Markern (in der Literatur diskutiert) zeigen die PAg CUZD1 und GP2 Vorteile: Sensitivität/Spezifität ACCA 9-21% / 84-97% (Prideaux *et al.*, 2012), ALCA

15-26% / 92-96%, AMCA 12-28% / 82-97%, Anti-OmpC 29% / 81%, Anti-I2 44,4-50% / 58-58,3% (Tesija Kuna, 2013; Kovacs *et al.*, 2014). Ferner ist noch erwähnenswert, dass PAK-Titer auch über einen längeren Beobachtungszeitraum (>3 Jahre) stabil bleiben. Dies könnte ggf. auf die kontinuierliche Antigen-Produktion des Pankreas und Sezernierung in den Darm zurückzuführen sein. Im Darmlumen existieren zwar immunologische Toleranzmechanismen, allerdings gibt es Hinweise, dass diese bei CED gestört sind (Duchmann *et al.*, 1995; Duchmann *et al.*, 1997; Baumgart and Carding, 2007; Sakaguchi *et al.*, 2008).

Ein Therapieerfolg lässt sich somit am zeitlichen Verlauf der PAK-Titer nicht ableiten, für eine initiale Diagnostik in der Klinik ist die serologische Untersuchung von PAK neben den etablierten Systemen (Koloskopien bzw. die serologische Untersuchung von ASCA und pANCA) jedoch empfehlenswert. Auch lassen sich Progression, distinkte Phänotypen bzw. auch die Lokalisation der Krankheit (MC) bei PAK-positiven Patienten folgern. Literaturhinweise auf ein geringeres Patientenalter bei Erstdiagnose konnten ebenso bestätigt werden wie die Kolonbeteiligung bei Anti-CUZD1 positiven MC-Patienten bzw. Manifestation im Ileum mit strikturierender Verlaufsform bei Anti-GP2 Positivität (Bogdanos *et al.*, 2012; Pavlidis *et al.*, 2012; Papp *et al.*, 2015; Pavlidis *et al.*, 2016).

Im untersuchten CED-Kollektiv fielen Anti-GP2 IgA positive CU-Seren auf, von denen ein Großteil als extraintestinale Manifestation eine PSC ausbildete. Durch folgende und gezielte Untersuchung von PSC-Patientenseren (und entsprechender Kollektivvergrößerung) konnte eine bisher unbekannte Assoziation von PSC und GP2-spezifischen IgA-AAk in zwei unabhängigen Patientenkohorten beobachtet werden (Prävalenz jeweils ca. 50%). Anti-GP2 IgA-positive Patienten zeigten einen deutlich schwereren Krankheitsverlauf sowie, abgeleitet davon, häufigere Lebertransplantationen und geringere Überlebensraten. Außerdem konnte eine signifikante Korrelation zur Ausbildung von Gallengangskarzinomata (CCA) beobachtet werden, unabhängig von weiteren Risikofaktoren wie z. B. Krankheitsdauer, Patientenalter und Bilirubinlevel. Anti-GP2 IgA scheint damit vielmehr ein Marker für Krankheiten des hepatobiliären Systems und PSC-assoziiierter CCA zu sein (GP2-spezifische IgG sowie Anti-CUZD1 AAK zeigten keine erhöhten Werte). Neben Anti-GP2 IgA sind lediglich pANCA als AAK bekannt, die in PSC ähnlich hohe Prävalenzen aufweisen

(Hov *et al.*, 2008). Allerdings ließ sich bis *dato* kein signifikanter Phänotyp nachweisen, was eine klinische Aussagekraft mindert. Weiterführend scheint Anti-GP2 IgA bereits sehr früh in der Krankheitsprogression stabil vorzuliegen (46,9% der entsprechenden Seren zeigten bereits Signale bei Serenentnahmen <1 Jahr nach Erstdiagnose). Damit ist dieser Parameter auch als prognostisches Diagnostikum zur Optimierung von Patienten-Risikoeinschätzungen, Anpassungen von Therapien und als Hinweis auf assoziierte Karzinomata ein *Novum*. Weitere, vor allem prospektive Studien, sind jedoch nötig um diese Aussagen zu untermauern.

Durch die verschiedenen Studien innerhalb dieser Arbeit konnte die klinische Relevanz von CUZD1 und GP2 als PAg gezeigt werden. Der Nachweis von CUZD1-spezifischen AAK deutet dabei auf CED, genauer MC hin. In der Literatur wird CUZD1 selbst auch als Markerprotein für Ovarialkarzinoma diskutiert (Leung *et al.*, 2012; Liaskos *et al.*, 2013). Allerdings konnte eine Assoziation bis *dato* nicht abschließend geklärt werden. Auch werden in diesem Zusammenhang fehlerhafte kommerziell erhältliche Untersuchungsmethoden genannt, die zu falschen Hypothesen führten (Prassas *et al.*, 2014). Neben CED konnten Anti-CUZD1 IgA auch im Umfeld von Zöliakie nachgewiesen werden (Komorowski, 2012). Weitere Hinweise zu assoziierten Krankheiten sind nicht bekannt.

Anti-GP2 AAK spielen, wie in dieser Arbeit gezeigt, vor allem in CED/MC sowie PSC eine Rolle. Dabei sind mehrere GP2-Isoformen bekannt (Fukuoka, 2000). Interessanterweise findet sich das α GP2-Isomer (Typ IV) als nahezu exklusives Zielantigen bei PSC und ferner bei CU während AAK gegen das β -Isomer (Typ II) so gut wie nicht vorkommen. Das konformationelle Epitop der bei PSC/CU vorkommenden AAK scheint demnach im α -unikalen GP2-Anteil zu liegen. Antikörper gegen das β -Isomer (Typ II) spielen vor allem bei MC eine Rolle. Da die entsprechenden AAK auch mit dem α -Isomer (Typ IV) kreuzreagieren, ist ein Epitop im gemeinsamen Sequenzbereich beider Isoformen wahrscheinlich. Über AAK-Isotypenuntersuchungen und weiterführende Deglykosylierungsexperimente konnten Glykoepitope nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen korrelieren zur Literatur (Komorowski *et al.*, 2013). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei Detektion von β GP2-spezifischen AAK, MC als dominante CED-Entität vorliegt. Es wird empfohlen, beide GP2-Isoformen in der Differenzialdiagnostik einzusetzen.

GP2 bzw. GP2-spezifische AAK werden in der Literatur weiterführend auch im Umfeld der Zöliakie diskutiert (Bonaci-Nikolic *et al.*, 2012; Gross *et al.*, 2014). Diese Beobachtungen konnten in eigenen Versuchen nicht bestätigt werden (nicht veröffentlichte Daten, nicht in dieser Arbeit). Eventuell liegen Störungen in der mukosalen Immunabwehr oder Barrierefunktion des Darmepithels zugrunde, die überlappende Effekte auslösen und entsprechende AAK generieren.

Der positive Nachweis von GP2-spezifischen AAK lässt sich ferner diagnostisch zum Ausschluss von Krankheiten nutzen. So zeigte Hellwig *et al.* bereits 1986, dass eine Assoziation der PAK zu Erkrankungen des Pankreas wie Pankreatitis oder Pankreas-Karzinomen nicht vorliegt (Hellwig *et al.*, 1986). Damit konnte auch bewiesen werden, dass sich Krankheiten des Pankreas immunologisch und mechanistisch von CED unterscheiden. Auch gesunde Blutspender zeigen keine PAK.

6.2 Stuhluntersuchungen als nichtinvasive Diagnostikmethode im Umfeld von CED

Die Diagnostik in CED ist bisher mit (minimal-)invasiven Eingriffen verbunden. Koloskopien mit Gewebeentnahmen und anschließender Histologie sind der Goldstandard. Blutuntersuchungen werden mitunter zur Untermauerung von Diagnosestellungen durchgeführt. Die Koprologie spielt bis dato jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Dabei ließen sich Fäzes-Proben mit wenig Aufwand und ohne invasiven Eingriff auch redundant gewinnen. In der vorliegenden Arbeit wurden Stuhlproben von CED-Patienten gesammelt und eine schnelle und einfache Methode entwickelt, geringste Probemengen parallel zu bearbeiten. Kritisch für die Entwicklung war vor allem die Ionenstärke im eingesetzten Puffersystem. Zu wenig Ionenstärke (geringe chaotrope Eigenschaften des Salzes) führte zur Aggregation von Zielkomponenten wie Immunglobulinen, Inflammationsmarkern und PAg. Eine zu hohe Salzkonzentration führte zur Degradation von Zellkernen und Makrokomponenten der Probe. Eine gute Löslichkeit der Zielkomponenten wurde bei 650 mM NaCl erreicht. Der Einsatz von Detergenzien zeigte für die untersuchten Parameter keine Vorteile. Als Validierung wurden Calprotectin und Lactoferrin untersucht. Vor allem Calprotectin dient als Marker für Inflammationsreaktionen im Magen-Darm-Trakt (Walsham and Sherwood, 2016; Ramraj *et al.*, 2017). Die

Ergebnisse korrelieren zur Literatur. Lactoferrin wird seltener in Zusammenhang mit CED untersucht (Menees *et al.*, 2015). Analog zum Calprotectin wird Lactoferrin vor allem von neutrophilen Granulozyten sezerniert (Dai *et al.*, 2007). Fäkales Lactoferrin zeigt somit die Chemotaxis-gesteuerte Einwanderung der Granulozyten aus der Darmwand in das Darmlumen infolge von entzündlichen Prozessen an (Sugi *et al.*, 1996). Dadurch ist dieses Protein, auch hinsichtlich entsprechender Halbwertszeiten im Stuhl (Walker *et al.*, 2007), ein guter Inflammationsmarker.

Fäkales Lactoferrin konnte in einem eigens entwickelten Testsystem nachgewiesen werden. Die resultierenden Signale korrelieren zur Calprotectin-Bestimmung, wenngleich eine ca. 10-fach geringere Konzentration von Lactoferrin gegenüber Calprotectin in den jeweiligen Stuhlproben gemessen wurde. CU-Patienten zeigen gegenüber MC-Patienten und Nicht-CED-Kontrollen erhöhte Lactoferrinkonzentrationen. Dieses Ergebnis war insofern überraschend, da in der aktuellen Literatur fäkales Lactoferrin als allgemeiner Entzündungsmarker in CED beschrieben wird (Lundberg *et al.*, 2005). Differenzialdiagnostisch nutzbare Konzentrationsunterschiede von Lactoferrin im Stuhl von CU- und MC-Patienten werden dagegen kontrovers diskutiert (Lopez *et al.*, 2017). Lediglich eine Publikation zeigt im Vergleich bei CED eine erhöhte Lactoferrin-Konzentration bei CU-Patienten auf (Peen *et al.*, 1993). Eine gerichtete Spezifität scheint nach ersten Überlegungen auch wenig plausibel, da Lactoferrin von Bestandteilen der unspezifischen Immunabwehr gebildet wird und so generell das Vorhandensein einer Entzündungsreaktion anzeigt. Die Entzündungsbereiche bei CU-Patienten beschränken sich jedoch zumeist auf obere Schichten der Mukosa im Rektum und Kolon. Die Transitzeit von sezerniertem Lactoferrin im Darm/Stuhl ist entsprechend kurz. MC-Patienten zeigen diskontinuierliche transmurale Entzündungsbereiche im gesamten GI (vor allem Ileum) (Graham, 1995). Im Vergleich liegt hier eine längere Transitzeit zugrunde. Proteolytische Prozesse und Umlagerungen sind bei der hohen intrinsischen Enzymaktivität im Stuhl wahrscheinlich. Dies wirkt sich wiederum negativ auf die Qualität der Analyseergebnisse aus. Ferner könnten die Unterschiede von fäkalem Lactoferrin bei CU- bzw. MC-Patienten auch auf unterschiedliche Medikation bzw. Therapieansätze zurückzuführen sein. Dies stand jedoch in der vorliegenden Studie nicht im Fokus.

In der Literatur finden sich ferner Hinweise auf erhöhte Lactoferrinkonzentrationen bei aktiver CU und MC (Kane *et al.*, 2003; Dai *et al.*, 2007; Sipponen *et al.*, 2008b). Eine Differenzierung der eingeschlossenen Patienten auf CED-Aktivitätsstatus bei Probenentnahme wurde in der retrospektiven Studie nicht vorgenommen. Lactoferrin zeigt jedoch neben Calprotectin seinen diagnostischen Wert. Zum einen liefert dieser Parameter wertvolle Hinweise auf inflammatorische Prozesse im Darm, zum anderen kann er zur Validierung von weiteren Inflammationsmarkern in einem parallelen Kontrollsystem eingesetzt werden.

In den Stuhluntersuchungen wurden neben bekannten Inflammationsmarkern zur Validierung des Testsystemes auch Immunglobuline untersucht. Die qualitative Ig-Analytik stimmt mit Literaturdaten überein (Gelzayd *et al.*, 1968b): Hauptanteil bildet IgA im Stuhl. Einen erhöhten IgG-Anteil bei Patienten mit Barrierschaden konnte nicht festgestellt werden. Allerdings liegen reine Stuhluntersuchungen und keine Fokussierung auf entzündete Bereiche innerhalb des Darms zugrunde (Gelzayd *et al.*, 1968a). Interessant war die Untersuchung von spezifischen PAK im Stuhl. Mit den etablierten Systemen konnten lediglich GP2-spezifische IgA nachgewiesen werden. Keine der insg. >150 untersuchten Stuhlproben zeigten spezifische IgG- oder CUZD1-spezifische Ak. Anti-GP2 IgA waren dabei ausnahmslos nur gegen das α -Isomer gerichtet. Dieses entspricht dem Reaktionsverhalten bei Patienten mit PSC und deutet auf eine Prozessierung von GP2 im Darm sowie unterschiedliche zugrunde liegende immunologische Mechanismen in Bezug auf die serologischen Daten hin. Einen diagnostischen Nutzen scheint die Detektion von PAK im Stuhl jedoch nicht zu besitzen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass im Stuhl GP2-spezifische IgA1 und IgA2 parallel vorliegen (im But vor allem Anti-GP2 IgA1). Die Detektion von IgA2 im Blut könnte damit auf einen Barrierschaden und Autoimmunität im Zusammenhang mit CED hindeuten. Die spezifischen PAK-Signale korrelieren jedoch nicht zur Diagnose. So zeigen auch gesunde Spender und andere Nicht-CED-Patienten Prävalenzen um 40%. Insofern könnte der serologische Nachweis von IgA gegen α GP2 auch ein Zeichen für den Barrierschaden bei PSC sein (serologische Prävalenz von Anti- α GP2 IgA in PSC entspricht der Prävalenz des Antikörpers in humanen Stuhlproben).

Die Untersuchung von Stuhlproben stellt noch heute Diagnostiker vor Probleme. Automatisierte Systeme zur Probenprozessierung und verlässliche Marker sind rar. Stuhlproben sind im Vergleich zu Blut oder Liquor inhomogene Stoffgemenge. Die Bestandteile und deren Konzentrationen sind abhängig von Nahrung und dessen Aufnahme, Stoffwechsel- bzw. Verdauungsstatus und weiteren biotischen und abiotischen Faktoren. Auch gesellschaftlich sind Stuhlproben und deren Untersuchungen noch immer ein Tabu-Thema. Allerdings liefern Stuhlproben ein großes diagnostisches Potential. Stuhlproben sind einfach zu generieren. Es sind keine invasiven oder mikroinvasiven Methoden nötig für die Entnahme. Gerade bei der Untersuchung von Säuglingen und Kindern sind Stuhluntersuchungen ein Gewinn (Heida *et al.*, 2016). Allerdings bedarf es weiterer Untersuchungen, neuer Marker und viel Überzeugungsarbeit, um die Koprologie effektiv im klinischen Umfeld einzusetzen.

6.3 Funktionale Charakterisierung des GP2

GP2 ist ein ca. 60 kDa großes Multidomänen-Protein, welches unlängst als Zielantigen bei MC identifiziert wurde (Roggenbuck *et al.*, 2009; Stöcker *et al.*, 2009; Komorowski *et al.*, 2013). Es zeigt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (dargestellt aus eukaryotischer Produktion) eine starke Glykosylierung. Diese Glykosylierung lässt sich über Lektine nachweisen (Kapitel 5.6) kann jedoch auch indirekt über ein verändertes Permeationsverhalten in der Elektrophorese beobachtet werden (Laufhöhe bei ca. 100 kDa). Auch lässt sich in der Gelfiltration (FPLC) ein erhöhtes hydrodynamisches Volumen ermitteln (Abb. 6-1, ca. 150 kDa). Zwar lassen sich Multimerisierungen (Homo- oder Heteromere) aufgrund der im Experiment ermittelten Molekülmassen nicht final ausschließen, eine Interaktion über ZP-Domäne (Jovine *et al.*, 2005) konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (nicht veröffentlichte Daten, nicht in dieser Arbeit).

In vivo wird GP2 hauptsächlich im exokrinen Pankreas produziert (Hoops *et al.*, 1993) und über GPI-Anker an die Membran der zymogenen Körnchen lokalisiert. Die Beobachtungen dieser Arbeit (IIFT, Elektronenmikroskopie) korrelieren zur Literatur (Yu *et al.*, 2004). Nach proteolytischer Spaltung wird das Protein über den Pankreassaft in das Duodenum geleitet.

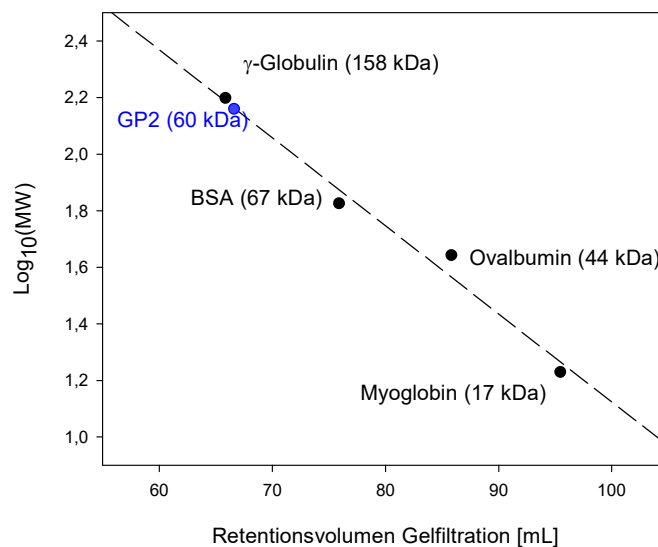


Abb. 6-1 Gelfiltration GP2

Gelfiltration (FPLC) von angereichertem GP2 mit einer kalibrierten Säule (HiLoad 16/60, S200 pg, GE). Als Kalibratoren wurden Myoglobin (17 kDa), Ovalbumin (44 kDa), BSA (67 kDa) und γ -Globulin (158 kDa) genutzt. Durch Regression ($r^2=0,9800$) der resultierenden Retentionsvolumen gegenüber dem entsprechenden Molekulargewicht lassen sich Rückschlüsse auf unbekannte Proteine ziehen. GP2 (60 kDa) eluiert aufgrund seines erhöhten hydrodynamischen Volumens respektive bei ca. 150 kDa großen Proteinen.

Die Vereinigung vom *Ductus choledochus* (Gallengang) und *Ductus pancreaticus* (Bauchspeicheldrüsengang) vor der Mündung in den Dünndarm im Menschen (Fischel, 2013) ist ein interessanter Nebenaspekt zu den GP2-betreffenden Beobachtungen in PSC (Kapitel 5.3). GP2 konnte in dieser Arbeit zwar nicht valide in der Leber, Gallengang oder Gallenblase nachgewiesen werden. Allerdings wurden nach Inkubation mit rekombinantem GP2 und dessen spezifischer Detektion undifferenzierte Signale im Gewebe festgestellt. Dies deutet auf eine Bindung bzw. Interaktion des GP2 mit hepatobiliären Bestandteilen hin. Über Strikturen und Gewebeschäden könnten somit Bestandteile des Darmlumens bzw. auch aus dem Pankreassaft über den Gallengang bis zur Leber gelangen und im hepatobiliären System Immunreaktionen auslösen. Entsprechende Theorien zur Entstehung von PSC belegen diese Hypothese (Eaton *et al.*, 2013). Mit dem Nachweis von GP2 in humanen Stuhlproben konnte auch die Ausscheidung des PAg gezeigt werden.

6.3.1 GP2 interagiert mit Enterobakterien

Die Funktion von GP2 ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. Durch den starken Glykosylierungsgrad (und damit der Ähnlichkeit zu Bestandteilen der

Darmmukosa) sowie der Sekretion und Lokalisierung von Pankreas in das Duodenum wird die Hauptfunktion von GP2 im Darm vermutet.

Im Jahr 2009 publizierten sowohl Yu und Lowe (Yu and Lowe, 2009) als auch die Arbeitsgruppe um Hiroshi Ohno (Hase *et al.*, 2009) die Interaktion von GP2 mit Enterobakterien. Allerdings wurden ab diesem Zeitpunkt keine weiteren Ergebnisse zu funktionellen Untersuchungen von GP2 veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit konnte der bakterienbindende Charakter von GP2 sowohl mit *E. coli* als auch mit *S. typhimurium* reproduziert werden. Die Bestätigung von FimH als GP2-Interaktionspartner erfolgte nach rekombinanter Darstellung beider Proteine im entsprechenden Bindungsassay. Die im Experiment ermittelten K_D von $1,4 \cdot 10^{-7}$ M deutet auf eine spezifische, mittelstarke Bindung hin. Über weiterführende Denaturierungsversuche konnte gezeigt werden, dass, im biochemischen Sinn, GP2 den aktiven Bindungspartner darstellt, FimH dagegen den Liganden. *In vivo* scheint jedoch auch die Lektin-Aktivität von FimH über Bindungen glykosylierter GP2-Reste zur Stabilisierung der Interaktionen plausibel. Auch spielen Cysteine bei der Bindung eine Rolle, da Signalstärken mit steigender Konzentration an Reduktionsmittel (DTT) im FimH-GP2 Interaktionsexperiment sinken. Es ist allerdings unklar, ob Cysteinbrücken intermolekular zwischen GP2 und FimH ausgebildet werden oder lediglich die Struktur des GP2 intramolekular stabilisieren. In *in silico* Modellierungen kann eine Interaktion der GP2-ZP-Domäne mit FimH abgeleitet werden (Abb. 6-2).

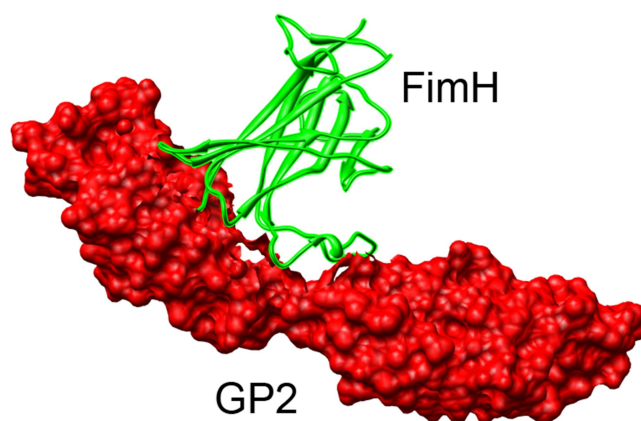


Abb. 6-2 Modell der Interaktion GP2-FimH

Das Interaktionsmodell basiert auf den Strukturdaten von GP2 (ZP-Domain, rot, PDB: 3qw9_1) und FimH (*E. coli*, grün, PDB: 1KLF). Es zeigt eine mögliche Interaktion beider Proteine basierend auf Wasserstoffbrücken und molekularer Geometrie. Modellierung mit Swiss Modell (Biasini *et al.*, 2014), Interaktion und Refinement mit PatchDock (Duhovny *et al.*, 2002) und FireDock (Andrusier *et al.*, 2007).

ZP-Domänen ermöglichen Polymerisierungen und intermolekulare Bindungen (Jovine *et al.*, 2005), allerdings bedingen diese Motive eine korrekte Konformation für ihre biochemische Aktivität. Durch ZP-Motiventfernung bzw. gerichteter GP2-Mutagenese könnten in weiterführenden Experimenten die an der Interaktion beteiligten Proteindomänen untersucht werden.

Zusätzlich wurde bei den GP2-Interaktionsuntersuchungen eine bisher nicht bekannte pH-Abhängigkeit der Interaktion festgestellt. Im sauren Milieu (pH-Optimum bei 5,5) zeigen sich sowohl auf MO-Ebene als auch unter Nutzung von rekombinantem FimH signifikant stärkere Signale im Experiment. Wahrscheinlich ist dies auf konformationelle Änderungen des GP2 zurückzuführen. Dies deutet jedoch auf eine pH-Sensitivität des GP2 hin. Es ist zu vermuten, dass die biochemische Aktivität von GP2 im stark alkalischen Milieu der Sekretion (Pankreas bzw. Pankreassaft) evolutionär inhibiert wird. Eine Aktivierung könnte durch den sauren Speisebrei aus dem Mangel im Dünndarm und durch lokale pH-Änderungen, die z. B. auf Stoffwechselprodukte von Enterobakterien zurückzuführen sind, erfolgen.

In vitro Untersuchungen zum GP2 zeigen ebenso, dass das Protein neben FimH als Ligand weitere Interaktionen ausbildet. Dazu gehören schwache Interaktionen mit BSA und Casein (wurden als Blockierungsreagenz bei plattenbasierten Experimenten verwendet), jedoch auch Bindungen zu unbekanntem intra- und extrazellulären Bestandteilen von Prokaryonten. In der TEM wurden z. B. Signale im Umfeld von beschädigten *S. typhimurium*-Zellen detektiert (Abb. 6-3). Wurden lysierte Zellen im GP2-Interaktionsassay eingesetzt, konnten deutlich höhere Signale generiert werden (hier nicht dargestellt). Auch der gezeigte kompetitive Effekt von prozessierten Stuhlproben auf die GP2-FimH Interaktion gibt Hinweise auf unbekannte Reaktionspartner im Stuhl, die sich ggf. nach weiterführenden Untersuchungen auch differentialdiagnostisch nutzen lassen könnten. Eine Korrelation zu GP2-spezifischen Ak im Stuhl und hohem kompetitiven Effekt konnte nicht gezeigt werden, allerdings scheinen vor allem MC-Patienten unbekannte Stuhlkomponenten zu enthalten, die die Funktion des GP2 beeinflussen. Auch deuten erste Experimente auf einen unbekanntem GP2-Einfluss auf die Propagation von MO hin. In einfachen Kultivierungsversuchen (*E. coli*) konnte ein verzögertes Bakterienwachstum unter Zugabe von GP2 aufgezeigt werden (Abb. 6-4).

Dies deutet auf eine bislang unbekannte bakteriostatische Funktion des GP2 hin. Allerdings müssten hierzu weitere Experimente folgen, um valide Aussagen treffen und Mechanismen ableiten zu können.

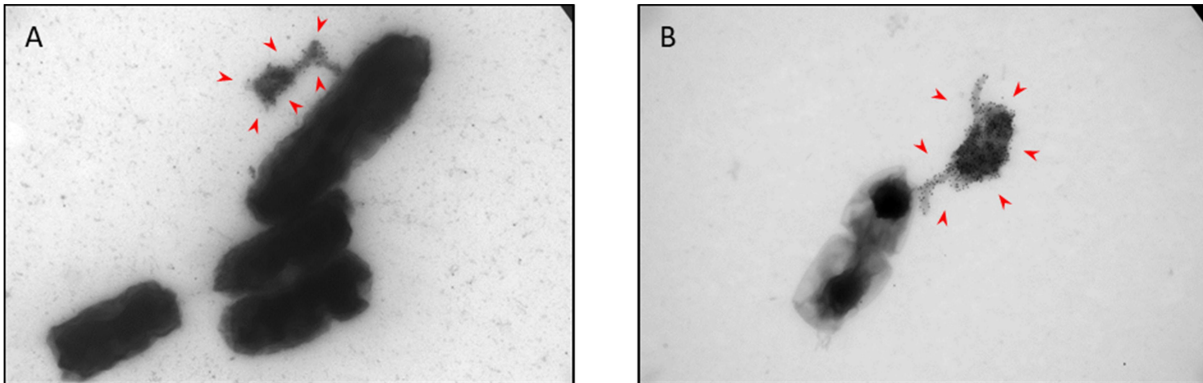


Abb. 6-3 TEM, *S. typhimurium*

Mikroorganismen wurden mit rekombinant dargestelltem GP2 inkubiert, GP2 im Anschluss spezifisch detektiert. Es konnten zahlreiche Signale im Umkreis von, bei der Präparation beschädigten, Zellen detektiert werden. Die Signale wurden initial als Artefakte bewertet. Durch die Bindungseigenschaften des GP2 könnten hier jedoch unbekannte Interaktionen mit intrazellulären Bestandteilen nachgewiesen worden sein. Vergrößerung: 55.000-fach.

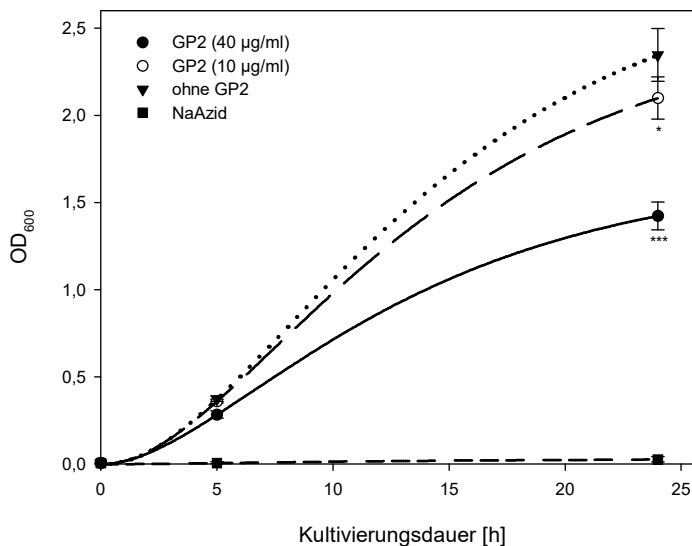


Abb. 6-4 *E. coli*-Kultivierung in Anwesenheit von GP2

In der Kultivierung von *E. coli* wurde GP2 (10 µg bzw. 40 µg GP2 pro 1 ml Kultivierungssuspension) als Additiv zugegeben. Als Referenz diente die Zugabe von GP2-Probenpuffer (ohne GP2) sowie als Kontrolle für bakterizide Wirkung Natriumazid (NaAzid) (Skipper and Westermann, 1973). GP2 zeigte eine konzentrationsabhängige OD₆₀₀-Senkung im Vergleich zur Referenz (GP2: 5 µg: p=0,047 (*), 20 µg: p<0,001 (***) , Messung nach 24 h Kultivierung). Dies deutet auf eine verzögerte MO-Propagation und einen bakteriostatischen Effekt von GP2 hin. Datensatz: Anzahl unabhängiger Versuche = 3.

Als Kontrolle wurde in den einzelnen Experimenten rekombinant-angereichertes CUZD1 mitgeführt. Eine MO-Bindung analog zum GP2 konnte ebenso wenig gezeigt werden wie eine FimH-Interaktion. Eine in der Literatur angedeutete Interaktion von CUZD1 und GP2 (Roggenbuck *et al.*, 2013) konnte in eigenen Versuchen nicht bestätigt werden.

Weiterführende Experimente zu den durchgeführten Interaktionsstudien deuten auf einen zusätzlichen immunmodulatorischen Charakter von GP2 hin. So wurden Granulozyten mit GP2 inkubiert. In diesen IIFT-Experimenten zeigten sich GP2-spezifische, titrierbare, cANCA-typische Signale (Abb. 6-5). Dies deutet ggf. auf eine Schnittstelle zu Komponenten des Immunsystems hin. Opsonierung und andere auch regulatorische Prozesse scheinen möglich. TEM-Beobachtungen von erhöhter GP2-Konzentration in entzündeten Darm-Bereichen von MC-Patienten (siehe Abb. 5-36, Kapitel 5.7.3) könnten diese These weiter unterstützt.

Fokussierende Experimente sind nötig, um einen möglichen immunmodulatorischen Charakter von GP2 zu untersuchen. In Hinsicht auf den therapeutischen Einsatz von Immunsuppressiva bei CED wäre das Wissen über alternative Abwehrmechanismen von Vorteil für den Patienten.

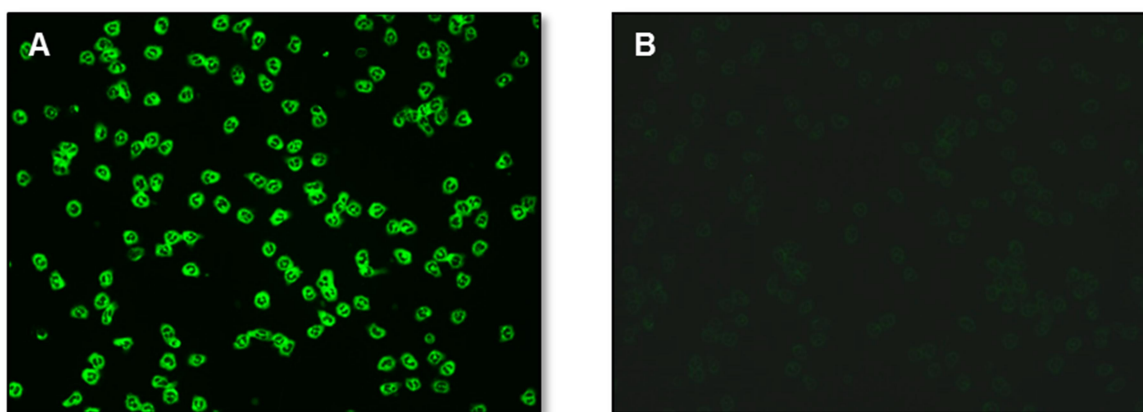


Abb. 6-5 Hinweise auf GP2-Granulozyteninteraktion in der IIFT

GP2 wurde in der IIFT auf Ethanol-fixierten Granulozyten inkubiert (GP2-Konzentration: 32 µg/ml) und anschließend mit spezifischen Antikörper nachgewiesen. Es zeigten sich (A) spezifische titrierbare Signale, die auf eine Interaktion von GP2 mit Granulozytenbestandteilen schließen lässt. B: Kontrolle ohne GP2, Vergrößerung jeweils 200 fach, Kameraeinstellungen: Belichtung: 300 ms, Grünverstärkung, Kontrast: 1, Gammakorrektur: 1,5

6.3.2 GP2 als THP-Analogon im Darm?

Retrospektiv betrachtet weisen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten biochemischen und funktionellen Eigenschaften von GP2 große Übereinstimmungen zum Tamm-Horsfall-Protein (THP) der Niere auf.

THP wurde in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals beschrieben (Tamm and Horsfall, 1950). 1985 wurde ein Protein mit immunsuppressiven Eigenschaften aus dem Urin einer schwangeren Frau isoliert und als Uromodulin publiziert (Muchmore and Decker, 1985). Später konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um THP handelte (Pennica *et al.*, 1987), weswegen heute beide Bezeichnungen parallel verwendet werden. THP ist ein stark glykosyliertes (Halim *et al.*, 2012), ca. 70 kDa (640 Aminosäuren) großes Protein (Devuyst *et al.*, 2005) mit einem theoretischen pI von 5,05. Es ist auf Chromosom 16 des *UMOD*-Gens codiert (Baillie *et al.*, 2017), wird jedoch exklusiv in den Epithelzellen der Henleschen Schleife / Niere exprimiert (Bachmann *et al.*, 1990).

Seine Domänenstruktur (Abb. 6-7) umfasst eine N-terminale Signalsequenz zur Sekretion des Proteins (Rampoldi *et al.*, 2011), drei aufeinander folgende EGF-Domänen (epidermal growth factor-like domains, Protein-Protein-Interaktion, Calciumbindung), eine ZP-Domäne und einen C-terminalen GPI-Anker. Vom Protein sind fünf Isoformen bekannt (UniProt: P07911). THP ist das Hauptprotein im Urin (Ausscheidungsrate von ca. 50 mg pro Tag) (Kobayashi and Fukuoka, 2001) mit einer Halbwertszeit von ca. 16 h (Grant and Neuberger, 1973). In der Literatur werden THP immunmodulatorische Funktionen wie Interaktion mit Lymphozyten und Immunglobulinen sowie Bindung von Mikroorganismen (unspezifische Abwehr von Harnwegsinfektionen) beschrieben (Serafini-Cessi *et al.*, 2003).

Die Parallelen von GP2 zum THP sind unverkennbar. Schon in einem *in silico* Sequenzvergleich offenbaren sich mit über 70% Ähnlichkeit und 50% Sequenzidentität (Alignment THP, Uniprot P07911, GP2, Uniprot P55259) (Huang and Miller, 1991) große Übereinstimmungen (Abb. 6-6). Auch auf Strukturebene gleichen sich beide Proteine (Abb. 6-7): N-terminale Signalsequenz, ZP-Domäne und C-terminaler GPI-Anker lassen auf ähnliche biologische Funktionen schließen. Beide Proteine sind stark glykosyliert.

```

sp|P07911|UROM_HUMAN  MGQPSLTWMLMVVASWFITTAATDTSEARWCSECHSNATCTEDEAVTTCQEGFTGDGLTCVDLDECAIPGAHNCSAN
sp|P55259|GP2_HUMAN   MP-----HLMERMVGSGLLWLALVSCILTQAS-----
*                               * :.*.* * : * .* :. *

sp|P07911|UROM_HUMAN  SSCVNTPGSFSCVCEPGRFLSPGLGCTDVDECAEPGLSHCHALATCVNVVGSYLCVCPAGYRGDGHCECSPGSCGPGLD
sp|P55259|GP2_HUMAN  -----AVQRYGNPIEAS--SYGLDLD
* * * * * * * * * *

sp|P07911|UROM_HUMAN  CVPEG--DALVCADPCQAHRTLDEYWRSTYEGEGY-ACDTLRGWYRFVGGGARMACETCVVLRNCNTAAPMWLNGTHPS
sp|P55259|GP2_HUMAN  CGAPGTPEAHVCFDPCQNYTLLEDFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGGGVRMSETCVQVHRCQTDAPMWLNGTHPA
* . * : * * * * * : * * * : * * * . * . * . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|P07911|UROM_HUMAN  SDEGIVSRKACAHWSGHCCLDASVQVKACAGGYVYNLTAPPECHLAYCT--DPSSVEGTCEE-CSIDEDCKSNNGRW
sp|P55259|GP2_HUMAN  LGDGITNHTACAHWSGNCCFWKTEVLVKACPGGYHVYRLEGTWCNLYRYCTVPRDPSTVEDKCEKACRPEECLALNSTW
.* * . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|P07911|UROM_HUMAN  HCQCKQDFNITDISLEHRLECGANDMKVSLGKQLKSLGF-DKVFMYLSDSRCSGFNDRDNRDWSVVTTPARDGPCGTV
sp|P55259|GP2_HUMAN  CGFCRQDLNSDVSLSLQPLDQCGPREIKVKDKCLLGGGLGEEVIAIYLRDPNCSSILQTEERNWVSVTSPVQASACRNI
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|P07911|UROM_HUMAN  LTRNETHATYSNTLYLADEIIIRDNLNIKINFACSYPLDMKVSCLKTALQPMVSALNIRVGGTGMTVRMALFQTPSYTQPY
sp|P55259|GP2_HUMAN  LERNQTHAIYKNTLSLVNDFIIRDITLNIQFCAYPLDMKVSQAALQPIVSSLNVSVDGNGEIVRMALFQDQNYTNPY
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|P07911|UROM_HUMAN  QGSSVTLSTEAFLYVGTMLDGGDLRSFALLMTNICYATPSSNATDPLKYFIIQDRCPHTRDSTIQVVENGESSQGRFSVQM
sp|P55259|GP2_HUMAN  EGDVELSVESVLYVGAILEQGDTSRFNLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIIRNSCSNQRDSTIHVEENGQSSESRFSVQM
:* . * * * . * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * : * * * * * * * * * * * * * *

sp|P07911|UROM_HUMAN  FRFAGNYDLVYLHCEVYLCDTMNEKCKPTCSGTRFRSG-SVIDQSRVNLGPIITRKGVQAT--VSRAFSSLGLLKVWLPL
sp|P55259|GP2_HUMAN  FMFAGHYDLVFLHCEIHLCDLSLNEQCQPSCSRQVRSEVPAIDLARVLDLGPITRRGAQSPGVMNGTPSTAGFLVAVMPV
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

sp|P07911|UROM_HUMAN  LLSATLTLTFQ
sp|P55259|GP2_HUMAN  LLTVLLAWLF-
* * . * : *

```

Abb. 6-6 Alignment THP / GP2

THP (Uniprot P07911) und GP2 (Uniprot P55259) zeigen große Homologiebereiche was auf ähnliche biologische Funktionen schließen lässt. Sequenzidentität (*): 52.8%, Sequenzähnlichkeit (. bzw.): 77.0%, Lalign (Huang and Miller, 1991).

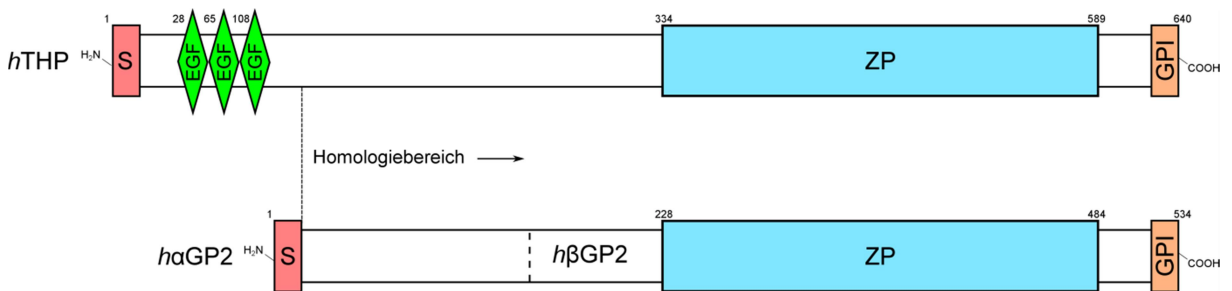


Abb. 6-7 Domänenstruktur von humanem THP und GP2

THP und GP2 zeigen im Vergleich große strukturelle Homologien. So verfügen beide Proteine über eine N-terminale Signalsequenz (S), eine ZP-Domäne (zona pellucida-like domain) und einen C-terminalen GPI-Anker. EGF: epidermal growth factor-like domains, Datengrundlage: ExPASy-Prosite (Sigrist et al., 2002), THP (Uniprot P07911), GP2 (Uniprot P55259).

In der Literatur finden sich sowohl bei THP (Pak *et al.*, 2001) als auch bei GP2 (Yu and Lowe, 2009) Hinweise auf Interaktionen mit Enterobakterien. Als Zielprotein wurde FimH identifiziert. Immunmodulatorische Eigenschaften von GP2 wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht systematisch untersucht, wenngleich Beobachtungen und weiterführende Literatur (Werner *et al.*, 2012) auf entsprechende Funktionen hindeuten. In diesem Zusammenhang sei jedoch noch einmal auf die bisher unveröffentlichte Korrelation von GP2-spezifischen Antikörpern zur therapeutischen Gabe von Immunsuppressiva hingewiesen. Sollten immunmodulatorische GP2-Eigenschaften bestehen, könnte durch die Verabreichung von Immunsuppressiva die GP2-Produktion über alternative Signalwege hochreguliert werden. Die Induktion von autoimmunen Prozessen wäre in diesem Fall begünstigt. Durch die kontinuierliche Sezernierung von GP2 lassen sich auch die über lange Zeiträume konstanten AAK-Titer erklären.

Die Polymerisation von THP als weitere biologische Funktion ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass diese Gelbildung des THP bei der Rückresorption von Wasser in der Niere die Tubuli in Form hält (Wiggins, 1987) bzw. die Bildung einer Schutzschicht auf dem Epithel innerhalb des Harnleiters die Ansiedlung von MO verhindert. Eine Polymerisierung von GP2 analog zu THP (Schaeffer *et al.*, 2009) konnte nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte jedoch CUZD1 (enthält ebenfalls eine ZP-Domäne) in der rekombinanten Darstellung Aggregations- bzw. Polymerisationseigenschaften (Abb. 5-8c, Gelfiltration). Eine Interaktion von CUZD1 mit FimH konnte in Bindungsexperimenten wiederum nicht gezeigt werden. Allerdings verfügt CUZD1 analog zum THP über EGF-Domänen.

GP2 zeigt sowohl strukturelle Homologien als auch funktionelle Eigenschaften von THP. Auf Basis dieser Datenlagen lässt sich postulieren, dass GP2, ggf. gemeinsam mit dem parallel identifizierten CUZD1 (Komorowski *et al.*, 2013), die biologischen Funktionen des THP im heterogenen Milieu des Darms umsetzen.

7 Literaturverzeichnis / Quellen

- Aalberse, R.C., Stapel, S.O., Schuurman, J., and Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 39, 469-477.
- Abraham, B.P. (2015). Symptom management in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 953-967.
- Abraham, C., and Cho, J.H. (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361, 2066-2078.
- Ahmad, T., Armuzzi, A., Bunce, M., Mulcahy-Hawes, K., Marshall, S.E., Orchard, T.R., Crawshaw, J., Large, O., de Silva, A., Cook, J.T., *et al.* (2002). The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 122, 854-866.
- Ahnfelt-Ronne, I., Nielsen, O.H., Christensen, A., Langholz, E., Binder, V., and Riis, P. (1990). Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid. *Gastroenterology* 98, 1162-1169.
- Albrahim, B., Aljasser, M.I., and Salh, B. (2015). Fecal calprotectin use in inflammatory bowel disease and beyond: a mini-review. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 29, 157-163.
- Allchin, W.H. (1885). A case of extensive ulceration of the colon. *Trans path Soc Lond* 36, 199.
- American Society for Gastrointestinal Endoscopy Standards of Practice, C., Shergill, A.K., Lightdale, J.R., Bruining, D.H., Acosta, R.D., Chandrasekhara, V., Chathadi, K.V., Decker, G.A., Early, D.S., Evans, J.A., *et al.* (2015). The role of endoscopy in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc* 81, 1101-1121 e1101-1113.
- Andrusier, N., Nussinov, R., and Wolfson, H.J. (2007). FireDock: fast interaction refinement in molecular docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 69, 139-159.
- Aulinger-Stöcker, K.P.E. (2017). Autoantikörper gegen exokrines Pankreas bei Morbus Crohn: Nachweis unter Verwendung der rekombinanten Zielantigene CUZD1 und GP2 (Universität zu Lübeck).
- Bach, S.P., and Mortensen, N.J. (2007). Ileal pouch surgery for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 13, 3288-3300.
- Bachmann, S., Metzger, R., and Bunnemann, B. (1990). Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Histochemistry* 94, 517-523.
- Bailie, C., Kilner, J., Maxwell, A.P., and McKnight, A.J. (2017). Development of next generation sequencing panel for UMOD and association with kidney disease. *PLoS One* 12, e0178321.
-

- Bansil, R., and Turner, B.S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11, 164-170.
- Barreiro-de Acosta, M., Alvarez Castro, A., Souto, R., Iglesias, M., Lorenzo, A., and Dominguez-Munoz, J.E. (2011). Emigration to western industrialized countries: A risk factor for developing inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 5, 566-569.
- Baumgart, D.C. (2012). *Crohn's disease and ulcerative colitis: from epidemiology and immunobiology to a rational diagnostic and therapeutic approach* (Springer Science & Business Media).
- Baumgart, D.C., and Carding, S.R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369, 1627-1640.
- Behzadi, P., Behzadi, E., and Ranjbar, R. (2015). The Incidence and Prevalence of Crohn's Disease in Global Scale. *SOJ Immunol* 3, 1-6.
- Bergeron, V., Vienne, A., Sokol, H., Seksik, P., Nion-Larmurier, I., Ruskone-Fourmesttraux, A., Svrcek, M., Beaugerie, L., and Cosnes, J. (2010). Risk factors for neoplasia in inflammatory bowel disease patients with pancolitis. *Am J Gastroenterol* 105, 2405-2411.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Rawsthorne, P., and Yu, N. (2001). The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 96, 1116-1122.
- Bernstein, C.N., and Shanahan, F. (2008). Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 57, 1185-1191.
- Bernstein, C.N., Wajda, A., Svenson, L.W., MacKenzie, A., Koehoorn, M., Jackson, M., Fedorak, R., Israel, D., and Blanchard, J.F. (2006). The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 101, 1559-1568.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., *et al.* (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42, W252-258.
- Bockemühl, J., Ottenjann, R., Zeitz, M., and Lux, G. (2013). *Ökosystem Darm IV: Immunologie, Mikrobiologie, Funktionsstörungen, Klinische Manifestation, Klinik und Therapie akuter und chronischer Darmerkrankungen* (Springer-Verlag).
- Boder, E.T., Midelfort, K.S., and Wittrup, K.D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10701-10705.
- Bogdanos, D.P., Roggenbuck, D., Reinhold, D., Wex, T., Pavlidis, P., von Arnim, U., Malfertheiner, P., Forbes, A., Conrad, K., and Laass, M.W. (2012). Pancreatic-specific autoantibodies to glycoprotein 2 mirror disease location and behaviour in younger patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 12, 102.

-
- Bonaci-Nikolic, B., Spuran, M., Andrejevic, S., and Nikolic, M. (2012). Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in patients with gluten-sensitive enteropathy: a possible serological trap. *Clin Chim Acta* 413, 822-823.
- Bork, P., and Beckmann, G. (1993). The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 231, 539-545.
- Bourke, J.G. (1891). *The Scatalogic Rites of All Nations*. Washington, DC: WH Lowdermilk.
- Box, G.E. (1953). Non-normality and tests on variances. *Biometrika* 40, 318-335.
- Boyapati, R., Satsangi, J., and Ho, G.T. (2015). Pathogenesis of Crohn's disease. *F1000Prime Rep* 7, 44.
- Brockmann, H., Schwarting, A., Kriegsmann, J., Petrow, P., Gaumann, A., Müller, K.-M., Galle, P.R., and Mayet, W. (2002). Proteinase-3 as the major autoantigen of c-ANCA is strongly expressed in lung tissue of patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Research & Therapy* 4, 1.
- Brown, P.W. (1950). The irritable bowel syndrome. *Rocky Mt Med J* 47, 343-346.
- Burgess, R.R., and Deutscher, M.P. (2009). *Guide to protein purification*, Vol 463 (Academic Press).
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P.L., and EpiCom, E. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J Crohns Colitis* 7, 322-337.
- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Cappello, M., Randazzo, C., Bravata, I., Licata, A., Peralta, S., Craxi, A., and Almasio, P.L. (2014). Liver Function Test Abnormalities in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Hospital-based Survey. *Clin Med Insights Gastroenterol* 7, 25-31.
- Cheesbrough, M. (2006). *District laboratory practice in tropical countries* (Cambridge university press).
- Chen, K., Jiao, D.A., Zheng, S., Zhou, L., Yu, H., Yuan, Y.C., Yao, K.Y., Ma, X.Y., and Zhang, Y. (1997). Diagnostic value of occult fecal blood testing for colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol* 3, 166-168.
- Choi, J.K., D'Urso, A., Trauernicht, M., Shabbir-Hussain, M., Holmes, A.E., and Balaz, M. (2011). 3,3'-diethylthiatricarbocyanine iodide: a highly sensitive chiroptical reporter of DNA helicity and sequence. *Int J Mol Sci* 12, 8052-8062.
- Clark, V.L., and Kruse, J.A. (1990). Clinical methods: the history, physical, and laboratory examinations. *JAMA* 264, 2808-2809.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L., and Oppenheimer, G.D. (1932). Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *Journal of the American Medical Association* 99, 1323-1329.
-

- Culver, E.L., and Chapman, R.W. (2011). Systematic review: management options for primary sclerosing cholangitis and its variant forms - IgG4-associated cholangitis and overlap with autoimmune hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 33, 1273-1291.
- Dai, J., Liu, W.Z., Zhao, Y.P., Hu, Y.B., and Ge, Z.Z. (2007). Relationship between fecal lactoferrin and inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 42, 1440-1444.
- Danese, S., and Fiocchi, C. (2011). Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 365, 1713-1725.
- Devuyst, O., Dahan, K., and Pirson, Y. (2005). Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol Dial Transplant* 20, 1290-1294.
- Dotan, N., Altstock, R., Schwarz, M., and Dukler, A. (2006). Anti-glycan antibodies as biomarkers for diagnosis and prognosis. *Lupus* 15, 442-450.
- Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., and Meyer zum Buschenfelde, K.H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102, 448-455.
- Duchmann, R., Neurath, M.F., and Meyer zum Buschenfelde, K.H. (1997). Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease. *Res Immunol* 148, 589-594.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhardt, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., *et al.* (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463.
- Duhovny, D., Nussinov, R., and Wolfson, H.J. (2002). Efficient unbound docking of rigid molecules. *Lecture notes in computer science* 2452, 185-200.
- Eaton, J.E., Talwalkar, J.A., Lazaridis, K.N., Gores, G.J., and Lindor, K.D. (2013). Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology* 145, 521-536.
- Evans, J.G., and Acheson, E.D. (1965). An epidemiological study of ulcerative colitis and regional enteritis in the Oxford area. *Gut* 6, 311-324.
- Fagoonee, S., De Luca, L., De Angelis, C., Castelli, A., Rizzetto, M., and Pellicano, R. (2009). Anti-Saccharomyces cerevisiae as unusual antibodies in autoimmune hepatitis. *Minerva gastroenterologica e dietologica* 55, 37-40.
- Fahrmeir, L., Heumann, C., Künstler, R., Pigeot, I., and Tutz, G. (2016). *Statistik: Der Weg zur Datenanalyse* (Springer-Verlag).
- Fallingborg, J. (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish medical bulletin* 46, 183-196.
- Fazekas de St Groth, S., Webster, R.G., and Datyner, A. (1963). Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* 71, 377-391.
- Fielding, J.F. (1985). "Inflammatory" bowel disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 290, 47-48.

-
- Fischel, A. (2013). *Grundriss der Entwicklung des Menschen* (Springer-Verlag).
- Fischer, M.J. (2010). Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. *Surface plasmon resonance: methods and protocols*, 55-73.
- Foell, D., Wittkowski, H., and Roth, J. (2009). Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut* 58, 859-868.
- Folwaczny, C., Noehl, N., Tschop, K., Endres, S.P., Heldwein, W., Loeschke, K., and Fricke, H. (1997). Goblet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives. *Gastroenterology* 113, 101-106.
- Ford, A.C., Bernstein, C.N., Khan, K.J., Abreu, M.T., Marshall, J.K., Talley, N.J., and Moayyedi, P. (2011). Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 106, 590-599; quiz 600.
- Ford, E.S., Giles, W.H., Myers, G.L., Rifai, N., Ridker, P.M., and Mannino, D.M. (2003). C-reactive protein concentration distribution among US children and young adults: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. *Clinical Chemistry* 49, 1353-1357.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., and Pace, N.R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13780-13785.
- Fricke, H., Birkhofer, A., Folwaczny, C., Meister, W., and Scriba, P.C. (1999). Characterization of antigens from the human exocrine pancreatic tissue (Pag) relevant as target antigens for autoantibodies in Crohn's disease. *Eur J Clin Invest* 29, 41-45.
- Fujita, M., and Kinoshita, T. (2012). GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821, 1050-1058.
- Fukuoka, S. (2000). Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding alpha (large) and beta (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. *Biochim Biophys Acta* 1491, 376-380.
- Furmanski, P., Li, Z.P., Fortuna, M.B., Swamy, C.V., and Das, M.R. (1989). Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that possess ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. *J Exp Med* 170, 415-429.
- Furtado, P.B., Whitty, P.W., Robertson, A., Eaton, J.T., Almogren, A., Kerr, M.A., Woof, J.M., and Perkins, S.J. (2004). Solution structure determination of monomeric human IgA2 by X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: a comparison with monomeric human IgA1. *J Mol Biol* 338, 921-941.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server (Springer).
-

- Geboes, K., Colombel, J.F., Greenstein, A., Jewell, D.P., Sandborn, W.J., Vatn, M.H., Warren, B., Riddell, R.H., and Pathology Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel, D. (2008). Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name? *Inflamm Bowel Dis* 14, 850-857.
- Gee, M.S., and Harisinghani, M.G. (2011). MRI in patients with inflammatory bowel disease. *J Magn Reson Imaging* 33, 527-534.
- Gee, S.J. (1888). On the coeliac affection. *St Bartholomew's Hospital Reports* 24, 17-20.
- Geibel, S., Procko, E., Hultgren, S.J., Baker, D., and Waksman, G. (2013). Structural and energetic basis of folded-protein transport by the FimD usher. *Nature* 496, 243-246.
- Gelzayd, E.A., Kraft, S.C., Fitch, F.W., and Kirsner, J.B. (1968a). Distribution of immunoglobulins in human rectal mucosa. II. Ulcerative colitis and abnormal mucosal control subjects. *Gastroenterology* 54, 341-347.
- Gelzayd, E.A., Kraft, S.C., and Kirsner, J.B. (1968b). Distribution of immunoglobulins in human rectal mucosa. I. Normal control subjects. *Gastroenterology* 54, 334-340.
- Gómez-Lázaro, M., Rinn, C., Aroso, M., Amado, F., and Schrader, M. (2010). Proteomic analysis of zymogen granules. *Expert review of proteomics* 7, 735-747.
- Goodhew, P.J., Humphreys, J., and Beanland, R. (2000). *Electron microscopy and analysis* (CRC Press).
- Graham, M.F. (1995). Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-an update. *Inflamm Bowel Dis* 1, 220-227.
- Grant, A.M., and Neuberger, A. (1973). The turnover rate of rabbit urinary Tamm-Horsfall glycoprotein. *Biochem J* 136, 659-668.
- Gregor, D.H. (1971). Occult blood testing for detection of asymptomatic colon cancer. *Cancer* 28, 131-134.
- Green, R.M., and Flamm, S. (2002). AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology* 123, 1367-1384.
- Gross, S., Bakker, S.F., van Bodegraven, A.A., van Hoogstraten, I.M., Gelderman, K.A., Bouma, G., Mulder, C.J., von Blomberg, B.M., and Bontkes, H.J. (2014). Increased IgA glycoprotein-2 specific antibody titres in refractory celiac disease. *J Gastrointest Liver Dis* 23, 127-133.
- Guerrant, R., Araujo, V., Soares, E., Kotloff, K., Lima, A., Cooper, W., and Lee, A. (1992). Measurement of fecal lactoferrin as a marker of fecal leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 1238-1242.
- Gupta, R., Jung, E., and Brunak, S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. Center for Biological Sequence Analysis at Technical University of Denmark DTU.
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., and Fernandez-Luna, J.L. (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and

- intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 277, 41701-41705.
- Hale-White, W. (1888). On simple ulcerative colitis and other intestinal ulcers. *Guy's Hosp Rep* 45, 131.
- Halim, A., Nilsson, J., Ruetschi, U., Hesse, C., and Larson, G. (2012). Human urinary glycoproteomics; attachment site specific analysis of N- and O-linked glycosylations by CID and ECD. *Mol Cell Proteomics* 11, M111 013649.
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M., and Kontula, K. (2006). Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 12, 3668-3672.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., *et al.* (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 39, 207-211.
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G.S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., and Kawano, S. (2009). Uptake through glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462, 226-230.
- Hayashi, S., and Wu, H.C. (1990). Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 22, 451-471.
- Heida, A., Holtman, G.A., Lisman-van Leeuwen, Y., Berger, M.Y., and van Rheenen, P.F. (2016). Avoid Endoscopy in Children With Suspected Inflammatory Bowel Disease Who Have Normal Calprotectin Levels. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 62, 47-49.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A.H., Burgel, N., Fromm, M., *et al.* (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129, 550-564.
- Hellwig, D., Otte, M., Reddig, U., Struve, D., and STOCKER, W. (1986). AUTOANTIBODY-PROFILES IN DISORDERS OF THE PANCREAS-THE AUTOIMMUNE REACTIONS AGAINST EXOCRINE PANCREAS IN PANCREATITIS DIFFER SIGNIFICANTLY FROM THOSE IN CROHNS-DISEASE. Paper presented at: Immunobiology (GUSTAV FISCHER VERLAG VILLENGANG 2, D-07745 JENA, GERMANY).
- Hendrickson, B.A., Gokhale, R., and Cho, J.H. (2002). Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 15, 79-94.
- Hendy, P., and Hart, A. (2013). A Review of Crohn's Disease. *EMJ Gastroenterol* 1, 116-123.
- Henriksen, M., Jahnsen, J., Lygren, I., Sauar, J., Schulz, T., Stray, N., Vatn, M.H., Moum, B., and Ibsen Study, G. (2006). Change of diagnosis during the first five years after onset of inflammatory bowel disease: results of a prospective follow-up study (the IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol* 41, 1037-1043.

- Heringa, J. (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* 23, 341-364.
- Hibi, T., Ohara, M., Kobayashi, K., Brown, W.R., Toda, K., Takaishi, H., Hosoda, Y., Hayashi, A., Iwao, Y., Watanabe, M., *et al.* (1994). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoprecipitation studies on anti-goblet cell antibody using a mucin producing cell line in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 35, 224-230.
- Hirschfield, G.M., Karlsen, T.H., Lindor, K.D., and Adams, D.H. (2013). Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 382, 1587-1599.
- Hoffmann, R., Kroesen, A.J., and Klump, B. (2009). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Handbuch für Klinik und Praxis (Georg Thieme Verlag).
- Hoops, T., Ivanov, I., Cui, Z., Colomer-Gould, V., and Rindler, M. (1993). Incorporation of the pancreatic membrane protein GP-2 into secretory granules in exocrine but not endocrine cells. *Journal of Biological Chemistry* 268, 25694-25705.
- Horsthuis, K., Stokkers, P.C., and Stoker, J. (2008). Detection of inflammatory bowel disease: diagnostic performance of cross-sectional imaging modalities. *Abdom Imaging* 33, 407-416.
- Hov, J.R., Boberg, K.M., and Karlsen, T.H. (2008). Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 14, 3781-3791.
- Huang, X., and Miller, W. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics* 12, 337-357.
- Huynh, H., Ng, C., Lim, K., Ong, C., Ong, C., Tran, E., Tuyen Nguyen, T., and Chan, T.M.G. (2001). Induction of UO-44 Gene Expression by Tamoxifen in the Rat Uterus and Ovary 1. *Endocrinology* 142, 2985-2995.
- Hviid, A., Svanstrom, H., and Frisch, M. (2011). Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut* 60, 49-54.
- Imhof, A., Megens, M., Engelberts, J., De Lang, D., Sprik, R., and Vos, W. (1999). Spectroscopy of fluorescein (FITC) dyed colloidal silica spheres. *The Journal of Physical Chemistry B* 103, 1408-1415.
- Inohara, N., Koseki, T., Lin, J., del Peso, L., Lucas, P.C., Chen, F.F., Ogura, Y., and Nunez, G. (2000). An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 27823-27831.
- Irvine, W., Gray, R., and McCallum, C. (1976). Pancreatic islet-cell antibody as a marker for asymptomatic and latent diabetes and prediabetes. *The Lancet* 308, 1097-1102.
- Iskandar, H.N., and Ciorba, M.A. (2012). Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Transl Res* 159, 313-325.
- Jendrek, S.T., Gotthardt, D., Nitzsche, T., Widmann, L., Korf, T., Michaels, M.A., Weiss, K.H., Liaskou, E., Vesterhus, M., Karlsen, T.H., *et al.* (2017). Anti-GP2 IgA autoantibodies are associated with poor survival and cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gut* 66, 137-144.

-
- Jiang, L., and Barclay, A.N. (2009). New assay to detect low-affinity interactions and characterization of leukocyte receptors for collagen including leukocyte-associated Ig-like receptor-1 (LAIR-1). *Eur J Immunol* 39, 1167-1175.
- Jose, F.A., and Heyman, M.B. (2008). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46, 124-133.
- Josephy, P.D., Eling, T., and Mason, R.P. (1982). The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates. *J Biol Chem* 257, 3669-3675.
- Jovine, L., Darie, C.C., Litscher, E.S., and Wassarman, P.M. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem* 74, 83-114.
- Jurinke, C., Oeth, P., and van den Boom, D. (2004). MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular biotechnology* 26, 147-163.
- Kaiser, G.C., Yan, F., and Polk, D.B. (1999). Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor kappaB activation in mouse colonocytes. *Gastroenterology* 116, 602-609.
- Kane, S.V., Sandborn, W.J., Rufo, P.A., Zholudev, A., Boone, J., Lyerly, D., Camilleri, M., and Hanauer, S.B. (2003). Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *The American journal of gastroenterology* 98, 1309-1314.
- Kao, P.C., Shiesh, S.-C., and Wu, T.-J. (2006). Serum C-reactive protein as a marker for wellness assessment. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 36, 163-169.
- Kaplan, E.L., and Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American statistical association* 53, 457-481.
- Kazmin, D., Edwards, R.A., Turner, R.J., Larson, E., and Starkey, J. (2002). Visualization of proteins in acrylamide gels using ultraviolet illumination. *Analytical biochemistry* 301, 91-96.
- Kerr, M. (1990). The structure and function of human IgA. *Biochemical journal* 271, 285.
- Killick, R., Legan, P.K., Malenczak, C., and Richardson, G.P. (1995). Molecular cloning of chick beta-tectorin, an extracellular matrix molecule of the inner ear. *J Cell Biol* 129, 535-547.
- Kim, H.C., Nam, C.M., Jee, S.H., Han, K.H., Oh, D.K., and Suh, I. (2004). Normal serum aminotransferase concentration and risk of mortality from liver diseases: prospective cohort study. *BMJ* 328, 983.
- Kirkwood, B.R., and Sterne, J.A. (2010). *Essential medical statistics* (John Wiley & Sons).
- Knecht, D.A., and Dimond, R.L. (1984). Visualization of antigenic proteins on Western blots. *Anal Biochem* 136, 180-184.
- Kobayashi, K., and Fukuoka, S. (2001). Conditions for solubilization of Tamm-Horsfall protein/uromodulin in human urine and establishment of a sensitive and accurate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. *Arch Biochem Biophys* 388, 113-120.
-

- Koch, R. (1882). Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner klinische Wochenschrift* 15, 221-230.
- Koch, R. (1884). Sechster Bericht der deutschen Wissenschaftlichen Commission zur Erforschung der Cholera, Geh Regierungsraths Dr Koch. *Dtsch Med Wochenschr* 10, 191-192.
- Koeppel, K., Kramp, S.L., Nitzsche, T., Sina, C., Schlumberger, W., and Herbst, V. (2016). Fecal calprotectin as marker of chronic inflammatory bowel disease. Poster, 10th International Congress on Autoimmunity 6.-10.4.2016, *Leipzig, Deutschland*
- Komorowski, L. (2012). Active celiac disease is associated with IgA antibodies against the exocrine pancreatic glycoproteins CUZD1 und GP2. 8 International Congress on Autoimmunity *Granada, Spanien*.
- Komorowski, L., Teegen, B., Probst, C., Aulinger-Stocker, K., Sina, C., Fellermann, K., and Stocker, W. (2013). Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: the glycoproteins CUZD1 and GP2. *J Crohns Colitis* 7, 780-790.
- Kovacs, M., Lakatos, P.L., Papp, M., Jacobsen, S., Nemes, E., Polgar, M., Solyom, E., Bodi, P., Horvath, A., Muller, K.E., *et al.* (2012). Pancreatic autoantibodies and autoantibodies against goblet cells in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55, 429-435.
- Kovacs, M., Muller, K.E., Papp, M., Lakatos, P.L., Csontos, M., and Veres, G. (2014). New serological markers in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20, 4873-4882.
- Kuenzig, M.E., Rezaie, A., Seow, C.H., Otley, A.R., Steinhart, A.H., Griffiths, A.M., Kaplan, G.G., and Benchimol, E.I. (2014). Budesonide for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002913.
- Kuna, A.T. (2013). Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochem Med (Zagreb)* 23, 28-42.
- Kushner, I. (1990). C-reactive protein and the acute-phase response. *Hosp Pract (Off Ed)* 25, 13, 16, 21-18.
- Ladner, C.L., Yang, J., Turner, R.J., and Edwards, R.A. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical biochemistry* 326, 13-20.
- Lakatos, P.L., Altorjay, I., Szamosi, T., Palatka, K., Vitalis, Z., Tumpek, J., Sipka, S., Udvardy, M., Dinya, T., Lakatos, L., *et al.* (2009). Pancreatic autoantibodies are associated with reactivity to microbial antibodies, penetrating disease behavior, perianal disease, and extraintestinal manifestations, but not with NOD2/CARD15 or TLR4 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Inflamm Bowel Dis* 15, 365-374.
- Langhorst, J., Elsenbruch, S., Koelzer, J., Rueffer, A., Michalsen, A., and Dobos, G.J. (2008). Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. *Am J Gastroenterol* 103, 162-169.

-
- Langner, C., Magro, F., Driessen, A., Ensari, A., Mantzaris, G.J., Villanacci, V., Becheanu, G., Borralho Nunes, P., Cathomas, G., Fries, W., *et al.* (2014). The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Arch* 464, 511-527.
- Lazaridis, K.N., and Gores, G.J. (2006). Primary sclerosing cholangitis and cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 26, 42-51.
- Lehmann, F.S., Burri, E., and Beglinger, C. (2015). The role and utility of faecal markers in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol* 8, 23-36.
- Leong, C.T., Ng, C.Y., Ong, C.K., Ng, C.P., Ma, Z.S., Nguyen, T.H., Tay, S.K., and Huynh, H. (2004). 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, 5707-5718.
- Leung, F., Soosaipillai, A., Kulasingam, V., and Diamandis, E.P. (2012). CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1 (CUZD1): a novel serological biomarker for ovarian cancer. *Clin Biochem* 45, 1543-1546.
- Levy, P.F., and Viljoen, M. (1995). Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80, 252-267.
- Levine, J.S., and Burakoff, R. (2011). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 7, 235-241.
- Ley, R.E., Peterson, D.A., and Gordon, J.I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837-848.
- Leytus, S.P., Kurachi, K., Sakariassen, K.S., and Davie, E.W. (1986). Nucleotide sequence of the cDNA coding for human complement C1r. *Biochemistry* 25, 4855-4863.
- Liaskos, C., Rigopoulou, E.I., Orfanidou, T., Bogdanos, D.P., and Papandreou, C.N. (2013). CUZD1 and anti-CUZD1 antibodies as markers of cancer and inflammatory bowel diseases. *Clinical and Developmental Immunology* 2013.
- Liddell, E., and Weeks, I. (1996). *Antikörper-Techniken* (Spektrum Akad. Verlag).
- Liu, Z., Feng, B.S., Yang, S.B., Chen, X., Su, J., and Yang, P.C. (2012). Interleukin (IL)-23 suppresses IL-10 in inflammatory bowel disease. *J Biol Chem* 287, 3591-3597.
- Logan, I., and Bowlus, C.L. (2010). The geoepidemiology of autoimmune intestinal diseases. *Autoimmun Rev* 9, A372-378.
- Lopez, R.N., Leach, S.T., Lemberg, D.A., Duvoisin, G., Garry, R.B., and Day, A.S. (2017). Fecal biomarkers in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 32, 577-582.
- Lottspeich, F., and Engels, J.W. (2006). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag 2. Auflage.
- Lualdi, E., Chiariello, E., and Finocchiaro, G. (2000). Identification of regulatory regions of the putative tumor suppressor gene DMBT1. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 673-675.
-

- Lundberg, J.O., Hellstrom, P.M., Fagerhol, M.K., Weitzberg, E., and Roseth, A.G. (2005). Technology insight: calprotectin, lactoferrin and nitric oxide as novel markers of inflammatory bowel disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2, 96-102.
- Lutz, H., Trautwein, C., and Tischendorf, J.W. (2013). Primary sclerosing cholangitis: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 110, 867-874.
- Mackenzie, M.L., Warren, M.R., and Wykes, L.J. (2003). Colitis increases albumin synthesis at the expense of muscle protein synthesis in macronutrient-restricted piglets. *The Journal of nutrition* 133, 1875-1881.
- Mader, S.S., and Galliard, P. (2005). *Understanding human anatomy & physiology* (McGraw-Hill Higher Education).
- Mahadevan, U. (2004). Medical treatment of ulcerative colitis. *Clin Colon Rectal Surg* 17, 7-19.
- Mahid, S.S., Minor, K.S., Soto, R.E., Hornung, C.A., and Galandiuk, S. (2006). Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 81, 1462-1471.
- Mahida, Y.R., Lamming, C.E., Gallagher, A., Hawthorne, A.B., and Hawkey, C.J. (1991). 5-Aminosalicylic acid is a potent inhibitor of interleukin 1 beta production in organ culture of colonic biopsy specimens from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 32, 50-54.
- Main, J., McKenzie, H., Yeaman, G.R., Kerr, M.A., Robson, D., Pennington, C.R., and Parratt, D. (1988). Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 297, 1105-1106.
- Malaprade, M. (1926). Titration potentiométrique de quelques acides oxydants. *Bull Soc chim* 39, 325.
- Malickova, K., Lakatos, P.L., Bortlik, M., Komarek, V., Janatkova, I., and Lukas, M. (2010). Anticarbhydrate antibodies as markers of inflammatory bowel disease in a Central European cohort. *European journal of gastroenterology & hepatology* 22, 144-150.
- Matharoo, M., Thomas-Gibson, S., Haycock, A., and Sevdalis, N. (2014). Implementation of an endoscopy safety checklist. *Frontline Gastroenterol* 5, 260-265.
- Mendes, F., and Lindor, K.D. (2010). Primary sclerosing cholangitis: overview and update. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 611-619.
- Mendoza, J.L., and Abreu, M.T. (2009). Biological markers in inflammatory bowel disease: practical consideration for clinicians. *Gastroenterol Clin Biol* 33 *Suppl* 3, S158-173.
- Menees, S.B., Powell, C., Kurlander, J., Goel, A., and Chey, W.D. (2015). A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. *Am J Gastroenterol* 110, 444-454.
- Michaels, M.A., Jendrek, S.T., Korf, T., Nitzsche, T., Teegen, B., Komorowski, L., Derer, S., Schroder, T., Baer, F., Lehnert, H., *et al.* (2015). Pancreatic
-

- Autoantibodies Against CUZD1 and GP2 Are Associated with Distinct Clinical Phenotypes of Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 21, 2864-2872.
- Mills, K.H. (2008). Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 38, 2636-2649.
- Mintun, M.A., Raichle, M.E., Kilbourn, M.R., Wooten, G.F., and Welch, M.J. (1984). A quantitative model for the in vivo assessment of drug binding sites with positron emission tomography. *Ann Neurol* 15, 217-227.
- Moehle, C., Ackermann, N., Langmann, T., Aslanidis, C., Kel, A., Kel-Margoulis, O., Schmitz-Madry, A., Zahn, A., Stremmel, W., and Schmitz, G. (2006). Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J Mol Med (Berl)* 84, 1055-1066.
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., *et al.* (2012). Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142, 46-54 e42; quiz e30.
- Moran, C.J., Kaplan, J.L., Winter, H.S., and Masiakos, P.T. (2015). Occult Blood and Perianal Examination: Value Added in Pediatric Inflammatory Bowel Disease Screening. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 61, 52-55.
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., and Nairn, A.V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 448-462.
- Morgagni, G.B. (1761). *De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis libri quinque. Venetiis: ex Thyppographia Remondiniana.*
- Mowat, C., Cole, A., Windsor, A., Ahmad, T., Arnott, I., Driscoll, R., Mitton, S., Orchard, T., Rutter, M., Younge, L., *et al.* (2011). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 60, 571-607.
- Muchmore, A.V., and Decker, J.M. (1985). Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women. *Science* 229, 479-481.
- Ng, S.C., Bernstein, C.N., Vatn, M.H., Lakatos, P.L., Loftus, E.V., Jr., Tysk, C., O'Morain, C., Moum, B., Colombel, J.F., *Epidemiology, et al.* (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 630-649.
- Ngo, S.T., Steyn, F.J., and McCombe, P.A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol* 35, 347-369.
- Nielsen, O.H., Verspaget, H.W., and Elmgreen, J. (1988). Inhibition of intestinal macrophage chemotaxis to leukotriene B4 by sulphasalazine, olsalazine, and 5-aminosalicylic acid. *Aliment Pharmacol Ther* 2, 203-211.
- O'Toole, A., Alakkari, A., Keegan, D., Doherty, G., Mulcahy, H., and O'Donoghue, D. (2012). Primary sclerosing cholangitis and disease distribution in inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10, 439-441.

- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., *et al.* (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 603-606.
- Ordas, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D.C., and Sandborn, W.J. (2012). Ulcerative colitis. *Lancet* *380*, 1606-1619.
- Oshima, T., Miwa, H., and Joh, T. (2008). Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* *23 Suppl 2*, S146-150.
- Pagni, M., Ioannidis, V., Cerutti, L., Zahn-Zabal, M., Jongeneel, C.V., Hau, J., Martin, O., Kuznetsov, D., and Falquet, L. (2007). MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences. *Nucleic Acids Res* *35*, W433-437.
- Paine, E.R. (2014). Colonoscopic evaluation in ulcerative colitis. *Gastroenterol Rep (Oxf)* *2*, 161-168.
- Pak, J., Pu, Y., Zhang, Z.T., Hasty, D.L., and Wu, X.R. (2001). 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*, 9924-9930.
- Pandol, S.J. (2011). The exocrine pancreas. Paper presented at: Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function (Morgan & Claypool Life Sciences).
- Papp, M., Sipeki, N., Tornai, T., Altorjay, I., Norman, G.L., Shums, Z., Roggenbuck, D., Fechner, K., Stocker, W., Antal-Szalmas, P., *et al.* (2015). 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 Crohns Colitis* *9*, 659-668.
- Pavlidis, P., Komorowski, L., Teegen, B., Liaskos, C., Koutsoumpas, A.L., Smyk, D.S., Perricone, C., Mytilinaiou, M.G., Stocker, W., Forbes, A., *et al.* (2016). Diagnostic and clinical significance of Crohn's disease-specific pancreatic anti-GP2 and anti-CUZD1 antibodies. *Clin Chem Lab Med* *54*, 249-256.
- Pavlidis, P., Romanidou, O., Roggenbuck, D., Mytilinaiou, M.G., Al-Sulttan, F., Liaskos, C., Smyk, D.S., Koutsoumpas, A.L., Rigopoulou, E.I., Conrad, K., *et al.* (2012). Ileal inflammation may trigger the development of GP2-specific pancreatic autoantibodies in patients with Crohn's disease. *Clin Dev Immunol* *2012*, 640835.
- Pavlidis, P., Shums, Z., Koutsoumpas, A.L., Milo, J., Papp, M., Umemura, T., Lakatos, P.L., Smyk, D.S., Bogdanos, D.P., Forbes, A., *et al.* (2015). Diagnostic and clinical significance of Crohn's disease-specific anti-MZGP2 pancreatic antibodies by a novel ELISA. *Clin Chim Acta* *441*, 176-181.
- Peen, E., Almer, S., Bodemar, G., Ryden, B.O., Sjolín, C., Tejle, K., and Skogh, T. (1993). Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut* *34*, 56-62.
- Peeters, M., Ghoo, Y., Maes, B., Hiele, M., Geboes, K., Vantrappen, G., and Rutgeerts, P. (1994). Increased permeability of macroscopically normal small bowel in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* *39*, 2170-2176.

-
- Pennica, D., Kohr, W.J., Kuang, W.J., Glaister, D., Aggarwal, B.B., Chen, E.Y., and Goeddel, D.V. (1987). Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. *Science* 236, 83-88.
- Pennycook, S.J., David, B., and Williams, C.B. (2010). Transmission electron microscopy: a textbook for materials science. *Microscopy and Microanalysis* 16, 111.
- Peyrin-Biroulet, L., Fiorino, G., Buisson, A., and Danese, S. (2013). First-line therapy in adult Crohn's disease: who should receive anti-TNF agents? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 345-351.
- Phillips, T.E., Ramos, R., and Duncan, S.L. (1995). HT29-18N2 differentiation in a protein-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31, 421-423.
- Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2009). Crohn's disease-associated Nod2 mutants reduce IL10 transcription. *Nat Immunol* 10, 455-457.
- Philpott, D.J., Sorbara, M.T., Robertson, S.J., Croitoru, K., and Girardin, S.E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* 14, 9-23.
- Podolsky, D.K. (2002). The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, 933-943.
- Prassas, I., Brinc, D., Farkona, S., Leung, F., Dimitromanolakis, A., Chrystoja, C.C., Brand, R., Kulasingam, V., Blasutig, I.M., and Diamandis, E.P. (2014). False biomarker discovery due to reactivity of a commercial ELISA for CUZD1 with cancer antigen CA125. *Clin Chem* 60, 381-388.
- Prefontaine, E., Sutherland, L.R., Macdonald, J.K., and Cepoiu, M. (2009). Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000067.
- Price, A.B. (1978). Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *J Clin Pathol* 31, 567-577.
- Prideaux, L., De Cruz, P., Ng, S.C., and Kamm, M.A. (2012). Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 18, 1340-1355.
- Rampoldi, L., Scolari, F., Amoroso, A., Ghiggeri, G., and Devuyst, O. (2011). The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int* 80, 338-347.
- Ramraj, R., Garcia, A., Mosen, D., Waiwai, L., and Smith, N. (2017). Utility of Fecal Calprotectin in Evaluation of Chronic Gastrointestinal Symptoms in Primary Care. *Clin Pediatr (Phila)*, 9922817744607.
- Rao, J.K., Weinberger, M., Oddone, E.Z., Allen, N.B., Landsman, P., and Feussner, J.R. (1995). The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener granulomatosis. A literature review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 123, 925-932.
- Reumaux, D., Sendid, B., Poulain, D., Duthilleul, P., Dewit, O., and Colombel, J.-F. (2003). Serological markers in inflammatory bowel diseases. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 17, 19-35.
-

- Rindler, M.J., and Hoops, T.C. (1990). 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, 154-163.
- Roggenbuck, D., Bogdanos, D., and Conrad, K. (2013). Loss of tolerance to one or two major targets in Crohn's disease or just cross-reactivity? *J Crohns Colitis* 7, e273-274.
- Roggenbuck, D., Hausdorf, G., Martinez-Gamboa, L., Reinhold, D., Buttner, T., Jungblut, P.R., Porstmann, T., Laass, M.W., Henker, J., Buning, C., *et al.* (2009). Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut* 58, 1620-1628.
- Røseth, A., Schmidt, P., and Fagerhol, M. (1999). Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* 34, 50-54.
- Rothenberg, M.E., and Hogan, S.P. (2006). The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24, 147-174.
- Rump, J.A., Schölmerich, J., Gross, V., Roth, M., Helfesrieder, R., Rautmann, A., Lüdemann, J., Gross, W.L., and Peter, H.H. (1990). A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Immunobiology* 181, 406-413.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.
- Salinovich, O., and Montelaro, R.C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156, 341-347.
- Sampson, D.L., Chng, Y.L., Upton, Z., Hurst, C.P., Parker, A.W., and Parker, T.J. (2013). The highly abundant urinary metabolite urobilin interferes with the bicinchoninic acid assay. *Anal Biochem* 442, 110-117.
- Samson, R.R., McClelland, D.B., and Shearman, D.J. (1973). Studies on the quantitation of immunoglobulin in human intestinal secretions. *Gut* 14, 616-626.
- Schaeffer, C., Santambrogio, S., Perucca, S., Casari, G., and Rampoldi, L. (2009). Analysis of uromodulin polymerization provides new insights into the mechanisms regulating ZP domain-mediated protein assembly. *Mol Biol Cell* 20, 589-599.
- Schmitz, H., Barmeyer, C., Fromm, M., Runkel, N., Foss, H.D., Bentzel, C.J., Riecken, E.O., and Schulzke, J.D. (1999). Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116, 301-309.
- Schur, P.H. (1988). IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr Allergy* 23, 1-11.
- Seibold, F., Weber, P., Jenss, H., and Wiedmann, K.H. (1991). 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, 1192-1197.
- Serafini-Cessi, F., Malagolini, N., and Cavallone, D. (2003). Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *Am J Kidney Dis* 42, 658-676.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E., and Maizel, J.V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28, 815-820.
- Shaw, M.H., Kamada, N., Warner, N., Kim, Y.G., and Nunez, G. (2011). The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends Immunol* 32, 73-79.
- Shoenfeld, Y., Meroni, P.L., and Gershwin, M.E. (2013). *Autoantibodies* (Newnes).
- Sigrist, C.J., Cerutti, L., Hulo, N., Gattiker, A., Falquet, L., Pagni, M., Bairoch, A., and Bucher, P. (2002). PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in bioinformatics* 3, 265-274.
- Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D., Bernstein, C.N., Brant, S.R., Caprilli, R., Colombel, J.F., Gasche, C., Geboes, K., *et al.* (2005). Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 19 *Suppl A*, 5A-36A.
- Sipponen, T., Karkkainen, P., Savilahti, E., Kolho, K.L., Nuutinen, H., Turunen, U., and Farkkila, M. (2008a). Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther* 28, 1221-1229.
- Sipponen, T., Savilahti, E., Kolho, K.L., Nuutinen, H., Turunen, U., and Farkkila, M. (2008b). Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis* 14, 40-46.
- Skipper, H.D., and Westermann, D.T. (1973). Comparative effects of propylene oxide, sodium azide, and autoclaving on selected soil properties. *Soil Biology and Biochemistry* 5, 409-414.
- Smejkal, G.B., and Kaul, C.A. (2001). Stability of nitroblue tetrazolium-based alkaline phosphatase substrates. *J Histochem Cytochem* 49, 1189-1190.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., and Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150, 76-85.
- Snyder, M.L., and Lichstein, H.C. (1940). Sodium azide as an inhibiting substance for gram-negative bacteria. *The Journal of Infectious Diseases*, 113-115.
- Solem, C.A., Loftus, E.V., Jr., Tremaine, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., and Sandborn, W.J. (2005). Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 11, 707-712.
- Steenoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva,

- L., *et al.* (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J* 32, 1478-1488.
- Stöcker, W., Otte, M., Ulrich, S., Normann, D., Finkbeiner, H., Stocker, K., Jantschek, G., and Scriba, P.C. (1987). Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 139, 41-52.
- Stöcker, W., Otte, M., Ulrich, S., Normann, D., Stocker, K., and Jantschek, G. (1984). [Autoantibodies against the exocrine pancreas and against intestinal goblet cells in the diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis]. *Dtsch Med Wochenschr* 109, 1963-1969.
- Stöcker, W., and Scriba, P.C. (1984). Die Anwendung einer neuen rationellen Immunofluoreszenztechnik in der klinischen Routinediagnostik.
- Stöcker, W., Teegen, B.P.C., Probst, C., Aulinger-Stöcker, K., Ludwig, D., Glocker, M., and Komorowski, L. (2009). CUZD and GP2 are the exocrine pancreas autoantigens in Crohns disease. From pathogenesis to Therapy of Autoimmune Diseases: Autoantigens, Autoantibodies, Auroimmunity Pabst Sci Publ, 463-473.
- Strobel, D., Goertz, R.S., and Bernatik, T. (2011). Diagnostics in inflammatory bowel disease: ultrasound. *World J Gastroenterol* 17, 3192-3197.
- Strober, W., and Fuss, I.J. (2011). Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140, 1756-1767.
- Student (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 1-25.
- Sugi, K., Saitoh, O., Hirata, I., and Katsu, K. (1996). Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. *Am J Gastroenterol* 91, 927-934.
- Tabibian, J.H., and Lindor, K.D. (2013). Primary sclerosing cholangitis: a review and update on therapeutic developments. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 103-114.
- Tamm, I., and Horsfall, F.L., Jr. (1950). Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. *Proc Soc Exp Biol Med* 74, 106-108.
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M., and Plummer, T.H., Jr. (1985). Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F. *Biochemistry* 24, 4665-4671.
- Tavarela Veloso, F. (2004). Review article: skin complications associated with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 4, 50-53.
- Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2006). Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 117, 433-442.
- Teegen, B., Niemann, S., Probst, C., Schlumberger, W., Stöcker, W., and Komorowski, L. (2009). DNA-Bound Lactoferrin Is the Major Target for Antineutrophil Perinuclear Cytoplasmic Antibodies in Ulcerative Colitis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173, 161-165.

- Teng, M.W., Bowman, E.P., McElwee, J.J., Smyth, M.J., Casanova, J.-L., Cooper, A.M., and Cua, D.J. (2015). IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nature medicine* 21, 719-729.
- Tesija Kuna, A. (2013). Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochemia medica* 23, 28-42.
- Thia, K.T., Sandborn, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., and Loftus, E.V., Jr. (2010). Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 139, 1147-1155.
- Tillett, W.S., and Francis, T. (1930). Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of experimental medicine* 52, 561-571.
- Tischendorf, J.J., Hecker, H., Kruger, M., Manns, M.P., and Meier, P.N. (2007). Characterization, outcome, and prognosis in 273 patients with primary sclerosing cholangitis: A single center study. *Am J Gastroenterol* 102, 107-114.
- Tontini, G.E., Mudter, J., Vieth, M., Atreya, R., Gunther, C., Zopf, Y., Wildner, D., Kiesslich, R., Vecchi, M., Neurath, M.F., *et al.* (2015a). Confocal laser endomicroscopy for the differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease: a pilot study. *Endoscopy* 47, 437-443.
- Tontini, G.E., Vecchi, M., Pastorelli, L., Neurath, M.F., and Neumann, H. (2015b). Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives. *World J Gastroenterol* 21, 21-46.
- Toumi, D., Mankai, A., Belhadj, R., Ghedira-Besbes, L., Jeddi, M., and Ghedira, I. (2007). Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 42, 821-826.
- Travis, S.P., Farrant, J.M., Ricketts, C., Nolan, D.J., Mortensen, N.M., Kettlewell, M.G., and Jewell, D.P. (1996). Predicting outcome in severe ulcerative colitis. *Gut* 38, 905-910.
- Tsutsumi-Ishii, Y., and Nagaoka, I. (2002). NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. *J Leukoc Biol* 71, 154-162.
- UniProt, C. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res* 43, D204-212.
- Vavricka, S.R., Schoepfer, A., Scharl, M., Lakatos, P.L., Navarini, A., and Rogler, G. (2015). Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 21, 1982-1992.
- Vermeire, S., Van Assche, G., and Rutgeerts, P. (2004). C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 10, 661-665.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5, 520.
- Vollhardt, K.P.C., and Schore, N.E. (2011). *Organische chemie* (John Wiley & Sons).

- Wagtman, M.J., Verspaget, H.W., Lamers, C.B., and van Hogezaand, R.A. (2001). Gender-related differences in the clinical course of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **96**, 1541-1546.
- Walker, T.R., Land, M.L., Kartashov, A., Saslowsky, T.M., Lysterly, D.M., Boone, J.H., and Rufo, P.A. (2007). Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker of disease activity in children and young adults with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **44**, 414-422.
- Wally, J., and Buchanan, S.K. (2007). A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *Biometals* **20**, 249-262.
- Walsham, N.E., and Sherwood, R.A. (2016). Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* **9**, 21-29.
- Ward, P.P., Mendoza, M.M., Saucedo-Cardenas, O., Teng, C.T., and Conneely, O.M. (1998). Restricted spatiotemporal expression of lactoferrin during murine embryogenesis. *Adv Exp Med Biol* **443**, 91-100.
- Wehkamp, J., Fellermann, K., and Stange, E.F. (2005). Human defensins in Crohn's disease. *Chem Immunol Allergy* **86**, 42-54.
- Wen, Z., and Fiocchi, C. (2004). Inflammatory bowel disease: autoimmune or immune-mediated pathogenesis? *Clin Dev Immunol* **11**, 195-204.
- Werner, L., Paclik, D., Fritz, C., Reinhold, D., Roggenbuck, D., and Sturm, A. (2012). Identification of pancreatic glycoprotein 2 as an endogenous immunomodulator of innate and adaptive immune responses. *J Immunol* **189**, 2774-2783.
- Wiechelman, K.J., Braun, R.D., and Fitzpatrick, J.D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175**, 231-237.
- Wiggins, R.C. (1987). Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions. *Clin Chim Acta* **162**, 329-340.
- Wilks, S. (1859). Morbid appearances in the intestines of Miss Bankes. *Med Times Gazette* **2**, 264-265.
- Wilks, S., and Moxon, W. (1875). *Lectures on Pathological Anatomy* **2**.
- Xavier, R.J., and Podolsky, D.K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**, 427-434.
- Yu, S., and Lowe, A.W. (2009). The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds *Escherichia coli* Type 1 fimbriae. *BMC Gastroenterol* **9**, 58.
- Yu, S., Michie, S.A., and Lowe, A.W. (2004). Absence of the major zymogen granule membrane protein, GP2, does not affect pancreatic morphology or secretion. *J Biol Chem* **279**, 50274-50279.
- Yue, M., Rankin, S.C., Blanchet, R.T., Nulton, J.D., Edwards, R.A., and Schifferli, D.M. (2012). Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro- and microevolution. *PLoS One* **7**, e38596.
- Zhang, S., Luo, J., Li, J., Wu, Z., Hu, C., Li, P., Deng, C., Zhang, F., Qian, J., and Li, Y. (2017). Retrospective evaluation of the clinical utility of serological

biomarkers in Chinese patients with inflammatory bowel disease: 2-year clinical experience. *Clin Chem Lab Med* 55, 865-875.

Zweig, M.H., and Campbell, G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 39, 561-577.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

AAk	Autoantikörper
ACC	Testgenauigkeit (<i>accuracy</i>)
Ag	Antigen
AIH	Autoimmunhepatitis
Ak	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ASCA	Antikörper gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
AU	Absorption Unit, Einheit Spektrometer
AUC	Fläche unterhalb der Kurve (<i>area under curve</i>)
BAk	AAk gegen intestinale Becherzellen
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
B _{max}	Bindungskapazität
BP	Bindungspotential
BS	Blutspender
BSA	Bovines Serumalbumin
cANCA	ANCA mit zytoplasmatischem Muster in der IIFT
CCA	Cholangiokarzinom

CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CU	<i>Colitis ulcerosa</i>
CUB	Proteindomäne, CUB für C1r/C1s, Uegf und Bmp1
CUZD1	<i>CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1</i>
CV	Säulenvolumen
Cy3	Cyanin 3
DNS-geb. Lf	AAk gegen Desoxyribonukleinsäure-gebundenes Lactoferrin, immobilisiert an neutrophile Granulozyten
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EGF	epidermal growth factor-like domain
EM	Elektronenmikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein isothiocyanat
GI	Gastrointestinaltrakt
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIM	extraintestinale Manifestationen
ELISA	Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest
FimH	<i>Lectin-domain</i> vom bakteriellen <i>Type 1 fimbrial adhesion</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GP2	<i>pancreatic secretory granule membrane major glycoprotein 2</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HC	Kontrollen, gesunde Blutspender (<i>healthy controls</i>)
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen

HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
IB	Einschlusskörperchen
IEx	Ionenaustauschchromatographie
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IQR	Interquartilsabstand
K _D	Dissoziationskonstante [M]
LDS	Lithiumlaurylsulfat
mAk	monoklonaler Antikörper
MC	<i>Morbus Crohn</i>
mIEx	Ionenaustauschchromatographie, multimodal
MO	Mikroorganismen
MRS	<i>mayo PSC risk score</i>
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NOD	<i>nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NPV	negativer prädikativer Wert (Segreganz)
OR	Quotenverhältnis, <i>odds ratio</i>
OT	Objektträger
PAg	pankreatische Antigene
PAk	AAk gegen Bestandteile des exokrinen Pankreas (PAg)

pAk	polyklonaler Antikörper, Serum
pANCA	ANCA mit perinukleärem Muster in der IIFT
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween 20
pl	Isoelektrischer Punkt
PNGaseF	Peptid N-Glycosidase F
POD	Meerrettich Peroxidase, Reporter-Konjugat in ELISA
PPV	positiver prädikativer Wert (Präzisionsrate)
PSC	Primär sklerosierende Cholangiitis
Q _x	Quantil mit Schwellenwert
RC-IFT	<i>Recombinant Cell IFT</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ROC	Receiver operating characteristic (Grenzwertoptimierungskurven)
RT	Raumtemperatur (20 °C, ± 2 °C)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEC	Gelfiltration, <i>size-exclusion chromatography</i>
SSC	Sekundär sklerosierende Cholangiitis
TCE	2,2,2-Trichlorethanol
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TH ₁	T-Helferzellen Typ 1
TH ₂	T-Helferzellen Typ 2
TH ₁₇	T-Helferzellen Typ 17
THP	Tamm-Horsfall-Protein
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor

TS	Titerstufen
WB	Western Blot
WFR	Wiederfindungsrate
ZP-Motiv	zona pellucida-like domain

8.2 Publikationen

Michaels, M.A., Jendrek, S.T., Korf, T., Nitzsche, T., Teegen, B., Komorowski, L., Derer, S., Schröder, T., Baer, F., Lehnert, H., Büning, J., Fellerman, K., Sina, C. (2015). Pancreatic Autoantibodies Against CUZD1 and GP2 Are Associated with Distinct Clinical Phenotypes of Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 12, 2864-2872, doi: 10.1097/MIB.0000000000000564

Jendrek, S.T., Gotthardt, D., Nitzsche, T., Widmann, L., Korf, T., Michaels, M.A., Weiss, K.H., Liaskou, E., Vesterhus, M., Karlsen, T.H., Mindorf, S., Schemmer, P., Bär, F., Teegen, B., Schröder, T., Ehlers, M., Hammers, C.M., Komorowski, L., Lehnert, H., Fellermann, K., Derer, S., Hov, J.R., Sina, C. (2016) Anti-GP2 IgA autoantibodies are associated with poor survival and cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gut*, ahead of print, doi: 10.1136/gutjnl-2016-311739

8.3 Poster

Autoreactive IgA Antibodies Against the Pancreatic Major Glycoprotein 2 Are Associated with Primary Sclerosing Cholangitis and related Biliary Tract Cancer

Jendrek, S.T., Gotthardt, D., Nitzsche, T., Korf, T., Michaels, M.A., Weiss, K.H., Liaskou, E., Vesterhus, M., Karlsen, T.H., Mindorf, S., Schemmer, P., Bär, F., Schröder, T., Ehlers, M., Hammers, C.M., Komorowski, L., Lehnert, H., Fellermann, K., Derer, S., Hov, J.R., Sina, C.
EASL, The International Liver Congress, 13.-17.4.2016, Barcelona, Spanien

Fecal calprotectin as marker of chronic inflammatory bowel disease

Koeppe, K., Kramp, S.L., Nitzsche, T., Sina, C., Schlumberger, W., Herbst, V.
10th International Congress on Autoimmunity, 6.-10.4.2016, Leipzig, Deutschland

8.4 Danksagung

Sehr geehrter Herr Prof. Stöcker, lieber Winfried. Ich danke dir für die Möglichkeit meine Promotion bei EUROIMMUN durchführen zu können und für die Überlassung des Themas.

Sehr geehrter Herr Dr. Komorowski, lieber Lars. Vielen Dank für deine vielen Anregungen, für deine Hilfe bei der Konzeption und auch für manch kritisches Gespräch, das mir die Augen öffnete.

Sehr geehrter Herr Prof. Sina, lieber Christian. Dir und deinem Team meinen herzlichsten Dank für eure großartige Unterstützung. Ohne euch wären viele Untersuchungen nicht möglich gewesen und unbekannte Zusammenhänge unentdeckt geblieben.

Ferner möchte ich mich bei Ihnen Herr Prof. Peters und Ihnen Herr Prof. Redecke für Ihre Bereitschaft bedanken, meine Arbeit konstruktiv zu diskutieren und zu bewerten sowie Mitglieder meiner Prüfungskommission zu sein.

Ein großer Dank geht an euch, liebe Kollegen von Euroimmun. Eure Hilfe und meine Anerkennung und Achtung sind unvergessen. Herausstellen möchte ich Stephi, die mich sowohl fachlich als auch handwerklich sehr unterstützt hat. Vielen Dank für deine offenen Augen und dein unermüdliches Engagement. Swantje und Bianca, vielen Dank für eure Expertise und den umfangreichen Einblick in die IIFT. Mein herzlichsten Dank auch an Claudi, Antje, David, Stephan, Andrea und die vielen anderen Kollegen aus der IBF und Molekularbiologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und mich auch in schwierigen Phasen unterstützten.

Ihnen, Herr Prof. Rupp, und ihrem Team möchte ich für die fachlichen Diskussionen und die Möglichkeit danken, eigene Experimente in ihrem Labor durchzuführen.

Für den Blick ins Detail möchte ich mich herzlich bei Ihnen, Herr Prof. König, sowie bei dir, Chris, bedanken. Die EM ist und bleibt eine spannende Technik, die die kleinen Dinge in den Vordergrund rückt. Vielen Dank für den Exkurs.

Einen sportlichen Gruß an die Kicker von Euroimmun und an den TSV Groß Grönau. Solang man mehr Tore schießt als der Gegner ist alles gut. Und wenn das Runde nicht ins Eckige will, war's wohl das Spiel ohne Ball ... oder der Schiedrichter.

Mein Dank geht auch an Sebastian, Stefanie, Anne, Marko, Stefan, Daniela, Kai, Phillip, Matze, Sandra und alle möglichen Leute für etliche Stunden des gemeinsamen Musizierens. Nur wenn der Bass zu den unermüdlichen Schlägen der Drums rollt, sich die Gitarren wie Bretter auf die tiefen Frequenzen legen und engelsgleiche Stimmen erklingen weiß man, dass man was richtig gemacht hat. Was wäre die Welt ohne Musik ... Play it loud and keep on rocking.

Meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Verwandten und Freunden danke ich für ihren Beistand und Rückhalt. Ihr erdet mich in schwierigen Situationen und seit für mich da, wenn Hilfe am dringendsten nötig ist.

Last but not least meinen größten Dank an dich, Willy. Du hast mir gezeigt, wie bunt die Welt sein kann. Jetzt haben wir es geschafft ... ;o)