

Aus dem Institut für Ernährungsmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Christian Sina

**Eine isoformspezifische Analyse von  
gegen GP2 gerichteten Autoantikörpern bei Patienten  
mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

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

vorgelegt von  
Carlotta Pietsch  
aus Münster  
Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Sina

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Czymek

Tag der mündlichen Prüfung: 23.5.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.5.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
1.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie	2
1.1.4	Pathogenese	3
1.1.5	Pathologie	4
1.1.6	Klinik	5
1.1.7	Diagnostik	6
1.1.8	Therapie	8
1.1.9	Prognose	9
1.2	Autoantikörper bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	10
1.2.1	Allgemeines	10
1.2.2	Antikörper Muster	11
1.3	Autoantigen Glykoprotein 2	14
1.3.1	Lokalisation	14
1.3.2	Isoformen	14
1.3.3	Homologie	15
1.3.4	Funktion	15
1.4	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Patientenkollektiv	18
2.2	Zellbiologische Methoden	19
2.2.1	Zellkultur	19
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer	19
2.2.3	Transfektion von HEK-293 Zellen mit GP2	19

2.2.4	Zytotoxizitätsassay .....	20
2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	21
2.3.1	Proteinextraktion.....	21
2.3.2	Roti®-Quant Proteinbestimmung .....	21
2.3.3	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) .....	21
2.3.4	Coomassie Blau Färbung .....	22
2.3.5	Gelelektrophorese und Western Blot.....	22
2.3.6	Enzyme-linked-Immunsorbent Assay (ELISA).....	22
2.4	Statistische Methoden .....	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1	Reinheitsbestimmung von rekombinanten humanen GP2 Proteinen .....	25
3.2	Vermehrte Expression von Glykoprotein 2 Isoform 4 im Ileum und Kolon von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ...	26
3.3	Autoantikörper in Morbus Crohn Seren binden hochaffin an humanes rekombinantes Glykoprotein 2 in der ELISA-Analyse .....	30
3.4	Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben signifikant hohe Autoantikörperlevel gegen beide Isoformen von Glykoprotein 2.....	31
3.5	Analyse von Autoantikörperlevel und Phänotypen .....	35
3.6	Der Einfluss von Morbus Crohn Seren auf GP2 exprimierende Zellen ...	47
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
4.1	Überexpression von GP2-#4 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen .....	50
4.2	Autoantikörper im Serum von chronisch-entzündlichen Darmerkrankten binden an ein gemeinsames Epitop beider Isoformen .....	52
4.3	Phänotypen Analyse .....	54

4.4	Seren von Morbus Crohn Patienten zeigen keinen Einfluss auf GP2 exprimierende Zellen .....	55
4.5	Ausblick und Limitationen.....	56
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Materialliste .....</b>	<b>58</b>
6.1	Instrumente .....	58
6.2	Gebrauchsmaterialien .....	60
6.3	Reagenzien .....	60
6.4	Antikörper.....	62
6.5	Puffer und Medien.....	62
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>10</b>	<b>Ethik.....</b>	<b>80</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>82</b>
<b>12</b>	<b>Veröffentlichung .....</b>	<b>83</b>
12.1	Publikation in der Fachzeitschrift Inflammatory Bowel Diseases.....	83
12.2	Postervorstellung auf der DGVS-Jahrestagung 2019 .....	84

## Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>engl.</i> Amino acids
Ak	Antikörper
Aak	Autoantikörper
anti-GP2	Autoantikörper gegen GP2-Protein
ASCA	Anti- <i>Saccharomyces-cerevisiae</i> -Antikörper
CARD 15	<i>engl.</i> Caspase recruitment domain-containing protein 15
CDC	<i>engl.</i> Complement-dependent cytotoxicity
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CU	Colitis ulcerosa
CUZD1	<i>engl.</i> CUB and zona pellucida-like domains protein 1
ED	Erstdiagnose
GIT	Gastrointestinaltrakt
GP2	<i>engl.</i> Zymogen granule membrane glycoprotein 2
GPI-Anker	Glycophosphatidylinositol-Anker
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
kDa	Kilo Dalton
MC	Morbus Crohn
M-Zellen	<i>engl.</i> Microfold cells

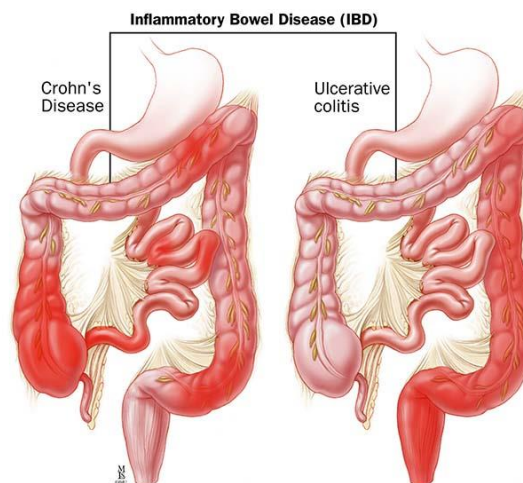
n	Anzahl
NFκB	<i>engl.</i> nuclear factor-κB
NOD2	<i>engl.</i> Nucleotide-binding oligomerization domain 2
PAB	<i>engl.</i> Pancreatic autoantibodies
PAMP	<i>engl.</i> Pathogen Associated Molecular Pattern
pANCA	Atypische perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
PP	Peyer-Plaques
PRR	<i>engl.</i> Pattern recognising Receptor
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
RANKL	<i>engl.</i> Receptor Activator of NF-κB Ligand
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TLR	<i>engl.</i> Toll-like receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
Std.	Stunde
Min.	Minuten

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

### 1.1.1 Definition

Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU) sind Erkrankungen, bei denen schubweise Entzündungen im Darm auftreten. MC und CU zählen zum Formenkreis der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED). Bei MC tritt die Entzündung diskontinuierlich und segmental auf. Ein typischer Manifestationsort ist das terminale Ileum, prinzipiell kann aber der gesamte Gastrointestinaltrakt (GI) befallen sein. Bei CU ist die Entzündung in der Regel auf das Kolon beschränkt. Vom Rektum breitet sich die Entzündung kontinuierlich nach oral aus. Die langanhaltende Einordnung als reine Autoimmunerkrankung ist mittlerweile obsolet und MC und CU gelten als komplexe Barriere-Erkrankungen (Goyette *et al.*, 2007; Herold, 2018; Renz-Polster & Krautzig, 2013; Wehkamp *et al.*, 2016).



**Abbildung 1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.** Morbus Crohn (links): Entzündungen können diskontinuierlich im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten. Colitis ulcerosa (rechts): Entzündungen treten nur im Rektokolon auf und breiten sich kontinuierlich nach oral aus (Meyerhoff Inflammatory Bowel Disease Center, 2020)

### 1.1.2 Epidemiologie

In der Regel zeigen sich Erstmanifestationen von MC zwischen dem 15. - 35. Lebensjahr und von CU zwischen dem 25. - 35. Lebensjahr oder dem 60. - 80. Lebensjahr. Prinzipiell ist ein Krankheitsbeginn auch in der frühen Jugend möglich, bis zu 1.500 Kinder erhalten jährlich in Deutschland die Diagnose einer CED. Die Inzidenz von MC und CU liegt in Deutschland bei ca. 4 - 6/100.000/Jahr. Die Inzidenz

und Prävalenz sind in den industrialisierten Ländern am höchsten. Im Zuge der zunehmenden Industrialisierung kann ein weiterer Inzidenzanstieg in den Schwellenländern beobachtet werden. Die weltweite Prävalenz betrug 1990 noch 3,7 Millionen, 2017 bereits 6,8 Millionen. Es besteht ein Nord-Süd-Gefälle, mit einer Krankheitshäufung in nördlichen Regionen. Die höchste bekannte Prävalenz liegt für CU mit 505/100.000 in Norwegen und für MC mit 322/100.000 in Deutschland vor. Ebenso verzeichnet Nordamerika eine Vielzahl an Krankheitsfälle. In den USA beträgt die Prävalenz von CU bei 286/100.000 und in Kanada bei 319/100.000 (Alatab *et al.*, 2020; Carter, 2004; Gearry, 2016; Jacobsen *et al.*, 2006; Ng, Shi, *et al.*, 2017; Wehkamp *et al.*, 2016).

Eine geschlechtsspezifische Verteilung liegt bei MC vor und hängt von der Herkunft ab. In den USA und Europa sind mehr Frauen als Männer an MC erkrankt, während in Asien etwa doppelt so viele Männer wie Frauen erkrankt sind. Bei CU besteht kein Verteilungsunterschied zwischen den Geschlechtern (Blumenstein *et al.*, 2019).

### 1.1.3 Ätiologie

MC und CU sind Erkrankungen multifaktorieller Genese, deren genauen Ursachen nicht abschließend geklärt sind. Ätiologisch potent sind sowohl genetische - als auch Umweltfaktoren und eine gestörte Barrierefunktion der Darmschleimhaut kombiniert mit defizitärer Regulation des adaptiven Immunsystems (Bossuyt, 2006; Goyette *et al.*, 2007; Herold, 2018; Kasper & Burghardt, 2014; Xavier & Podolsky, 2007). Der herausragende unabhängige Risikofaktor für die Entwicklung des MC oder der CU ist die positive Familienanamnese. Das Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades ist im Falle von MC 30-fach, im Fall von CU 15-fach höher im Vergleich zur Bevölkerung. Erkrankte MC Patienten haben in 2 - 16 %, bei CU in 7 - 11 % der Fälle einen ebenfalls erkrankten Verwandten ersten Grades. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von mit CED assoziierten Risikoloci identifiziert worden. Das bisher am besten validierte Gen ist CARD15, welches für das Protein Nucleotide binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) codiert (Ahmad *et al.*, 2002; Uhlen *et al.*, 2015). Bei 10 - 15 % der MC Patienten ist CARD15 homozygot mutiert. Eine homozygote NOD2-Genmutation erhöht das Krankheitsrisiko um das 17-fache. Durch die Funktionsverlustmutation kommt es vermutlich zu einer Schwächung der physiologischen Barrierefunktion des Darms. Mehr als 160 Genloci gelten als Risikogene für CU (Baumgart & Carding, 2007; Girardin *et al.*, 2003;

Spehlmann *et al.*, 2008). Neben genetischen Faktoren spielen auch Umweltfaktoren eine Rolle. Zum einen lässt sich ein Inzidenzgradient von Nord nach Süd beobachten, mit einer Akkumulation in Nordeuropa und Nordamerika. Zum anderen ist die Inzidenz in Industriestaaten deutlich höher als in Entwicklungsländern. Diverse Umwelteinflüsse und Lebensstile stehen in stetiger Diskussion, die Entstehung einer CED zu fördern. Dazu gehören: fehlendes Stillen in der Kindheit, Antibiotikaeinnahme in der Kindheit, übermäßige Hygiene und Diäten mit exzessivem Konsum fermentierter Oligo-, Di-, und Monosaccharide und Polyole (FODMAPS) (Barrett *et al.*, 2008; Baumgart & Carding, 2007; Gibson & Shepherd, 2005; Hovde, 2012). Unabhängige, reproduzierbare Risikofaktoren stellen Appendektomie und das Rauchen dar (J. Preiß *et al.*, 2014). Raucher erkranken häufiger an MC. Das Erkrankungsrisiko für CU steigt durch zurückliegenden Nikotinkonsum und sinkt durch aktuellen Konsum (Herold, 2018; Tysk *et al.*, 1988).

#### **1.1.4 Pathogenese**

Die genaue Pathogenese von CED ist noch nicht vollends erklärt, jedoch konnten in den letzten Jahren differenziertere Einblicke in die Komplexität der pathogenetisch relevanten Faktoren erlangt werden. Die Barrierefunktion des einschichtigen Zylinderepithels des Darms wird durch Tight-Junctions reguliert, welche nach distal hin eine stetig geringer werdende Ionenpermeabilität und einen steigenden transepithelialen elektrischen Widerstand aufweisen. Das Epithel von CED Patienten weist eine erhöhte Permeabilität auf und erlaubt Pathogenen die Barriere zu überwinden und das Darmepithel zu infiltrieren (Mankertz & Schulzke, 2007; Watanabe *et al.*, 2004).

Präzise Signalwege sichern im homöostatischen Darm eine Koexistenz von einerseits oraler Toleranz gegenüber Antigenen der Nahrung und Akzeptanz kommensaler Bakterien und andererseits effizienter Immunität gegenüber Pathogenen (Peterson & Artis, 2014; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Verschiedene Mutationen von intestinalen Epithelzellen konnten, vor allem im Mausmodell, dieses Äquilibrium ruinieren und so zu CED ähnlichen Symptomen führen (Adolph, *et al.*, 2013; Greten *et al.*, 2004; Peterson & Artis, 2014; Van der Sluis *et al.*, 2006). So kommt es zum Beispiel durch eine veränderte Toll-like-Rezeptor (TLR) Expression zu einer gestörten Reaktion auf Antigenstrukturen. MC Patienten zeigen eine signifikante Runterregulierung von TLR-3 und, sowohl MC Patienten als auch CU Patienten, eine Hochregulierung von TLR-4 (Cario & Podolsky, 2000). TLRs gehören zur Gruppe

der Pattern-Recognition Rezeptoren (PRR). Je nach Lokalisierung können diese den nukleären Faktor, der an den Promotor leichter  $\kappa$ -Ketten von B-Lymphozyten bindet (NF $\kappa$ B) aktivieren oder inhibieren (Gewirtz *et al.*, 2001; Gribar *et al.*, 2008). Im Mäuseversuch konnte eine veränderte TLR-Signalkaskade mit pathologisch erhöhter proinflammatorischer Aktivität gegenüber kommensaler Bakterien assoziiert werden (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Ebenfalls zur Gruppe der PRR zählt NOD2, welches in den Paneth-Zellen des Darms exprimiert wird. Dort reguliert es die Expression antimikrobieller Peptide. Bei Funktionsverlustmutationen kommt es zu einer geringeren Produktion von antimikrobiellen Peptiden und infolgedessen zu einer Schwächung der Barrierefunktion.

Hinzukommend präsentiert sich das intestinale Immunsystem bei CED Patienten verändert. Atypische Antigen-präsentierende Zellen scheinen potent T-Zellen aktivieren zu können, Zytokine werden übermäßig produziert, auto- und überreaktive T-Zellen unzureichend eliminiert und eine Dysbalance regulierender und Effektor-T-Zellen führen in der Summe zu einer Entzündungsreaktion mit lokaler Gewebestruktion (Baumgart & Carding, 2007; Courth *et al.*, 2015; Gewirtz *et al.*, 2001; Goyette *et al.*, 2007; Murphy & Weaver, 2018; Peterson & Artis, 2014; Watanabe *et al.*, 2004).

### 1.1.5 Pathologie

Der Befall von MC ist diskontinuierlich („skip-lesion“) und tritt präferiert im terminalen Ileum und Kolon auf, grundsätzlich kann jedoch jeder Teil des Gastrointestinaltraktes (GIT) befallen sein. Typischerweise zeigt sich ein transmurales, ausgeprägtes Entzündungsgeschehen. Endoskopisch imponieren Ulcera („Snail-Trails“), aphtöse Mukosadefekte („*Pin-point-lesion*“) und ein „Plastersteinrelief“ der Schleimhaut, welches durch den Wechsel von Schleimhautentzündungen und -ulzera zustande kommt. Mikroskopisch können sie nicht verkäsende Epitheloidzellgranulome zeigen. Es finden sich Riesenzellen, die Lamina propria ist lymphozytär infiltriert und es imponieren spaltförmige Ulzerationen (Herold, 2018; Ishimoto, 2004; Renz-Polster & Krautzig, 2013; Wehkamp *et al.*, 2016).

Colitis ulcerosa befällt stets das Rektum und breitet sich kontinuierlich nach proximal aus. Endoskopisch zeigt sich im Anfangsstadium eine ödematös gerötete Schleimhaut mit Ulzerationen der oberflächigen Schichten und Kontaktblutungen. Diese kann im chronischen Verlauf das Faltenrelief und die Haustrierung verlieren, sodass die überbleibenden Schleimhautbereiche als „Pseudopolypen“ erscheinen.

Mikroskopisch ist die Schleimhaut durch Granulozyten infiltriert. Es kommt zu Kryptenatrophien und -abszessen. Im fortgeschrittenen Stadium kann es außerdem zu Epitheldysplasien kommen, welche als Vorläuferläsionen das intestinale Malignom Risiko stark erhöhen (Herold, 2018).

### 1.1.6 Klinik

Die Symptome treten schubweise auf, das heißt Phasen entzündlicher Aktivität wechseln sich mit Remissionsphasen ab. Das Rezidivrisiko nach einem Schub liegt bei 30 % innerhalb eines Jahres. Typischerweise zeigen sich sowohl intestinale - als auch extraintestinale Symptome. Die Symptome sind heterogen und die individuelle Ausprägung divers.

Zu den intestinalen Symptomen zählen chronische unblutige (MC) oder blutige (CU) Diarrhö, Schmerzen, welche vor allem den rechten Unterbauch betreffen (MC) und Tenesmen. Zusätzlich leiden bis zu 35 % der MC Patienten unter Fisteln, außerdem kann es zu Stenosen kommen. 40 % der Patienten zeigen Fisteln im Analbereich, welche zusammen mit anorektalen Abszessen oft die Erstsymptome des MC sind. Extraintestinale Manifestationen zeigen sich bei 20 - 40 % der Patienten mit CED. Befallen sein können: die Gelenke (Arthritis, Sakroiliitis, Spondylitis ankylosans), die Augen (Iritis, anteriore Uveitis, Episkleritis, Konjunktivitis) und die Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum). Leberbefall (PSC) zeigt sich bei CU häufiger als bei MC. Ein Teil der MC Patienten zeigen orale Manifestation (Aphten der Mundschleimhaut, Stomatitis).

Als extraintestinale Komplikation kann es zu einem Malabsorptionssyndrom kommen. Die häufigste CED assoziierte Erkrankung ist eine Eisenmangelanämie (Herold, 2018; J. Preiß *et al.*, 2014; Renz-Polster & Krautzig, 2013; Wehkamp *et al.*, 2016). Klinisch werden CED nach Montreal klassifiziert (Kucharzik *et al.*, 2019; Satsangi, 2006). Für MC wird das Alter bei Diagnose, die Lokalisation der Entzündung und das biologische Verhalten unterschieden, während CU anhand der Entzündungsausdehnung eingeteilt wird (Tabelle 1, Tabelle 2).

<b>Alter bei Diagnose</b>	A1	< 16 Jahre
	A2	17 - 40 Jahre
	A3	> 40 Jahre

<b>Lokalisation</b>	L1	Ileum
	L2	Kolon
	L3	Ileokolon
	L4	oberer Gastrointestinaltrakt
<b>Biologisches Verhalten</b>	B1	nicht strikturierend, nicht penetrierend
	B2	strikturierend
	B3	penetrierend
	+p	perianal

Tabelle 1. Morbus Crohn Einteilung nach Montreal (Satsangi, 2006)

<b>Ausdehnung</b>	<b>Einteilung</b>	<b>Beschreibung</b>
Proktitis	E1	limitiert auf das Rektum
Linksseitenkolitis	E2	Befall maximal bis zur linken Flexur
Pankolitis	E3	Befall über die linke Flexur hinaus

Tabelle 2. Ausdehnung der Colitis Ulcerosa nach Montreal (Satsangi, 2006)

### 1.1.7 Diagnostik

Die Diagnostik erweist sich in der Praxis als kompliziert. Im Median vergehen zwischen ersten Symptomen und Diagnosestellung 13 Monate (Albert *et al.*, 2008).

10 % aller Patienten können durch die existierenden diagnostischen Möglichkeiten weder dem MC noch der CU zugeordnet werden und erhalten deshalb die temporäre Diagnose einer nicht klassifizierbaren Colitis (Colitis indeterminata). Bei Kindern und Jugendlichen beträgt der Anteil bis zu 22 % (J. Preiß *et al.*, 2014; Price, 1978; Tremaine, 2011).

Ein diagnostisches Schema bei Patienten mit Verdacht auf CED ist in Abbildung 2 dargestellt.

Laut aktueller Leitlinie soll die Diagnose durch eine Kombination aus klinischer Erscheinung und aus endoskopischen, histologischen, radiologischen und laborchemischen Befunden gestellt werden.

Während einer Ileokoloskopie sollten gemäß Leitlinie Stufenbiopsien zur histologischen Aufarbeitung entnommen werden. Eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie kann bei MC die Diagnosestellung unterstützen (Abbildung 2). Bei Verdacht auf eine nicht-entzündliche Ätiologie kann Calprotectin als fäkaler Entzündungsmarker untersucht werden. Calprotectin hat für CU eine Sensitivität von 79 % und für MC eine Sensitivität von > 90 %, ist bei reinem Dünndarmbefall aber oft negativ. Zur differenzialdiagnostischen Abgrenzung der CEDs wird zudem eine Rektumbiopsie empfohlen. Die serologischen Antikörpermarker *Saccharomyces cerevisiae* -Antikörper (ASCA) und atypische perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (pANCA) sollten nur im Falle einer nicht klassifizierbaren Colitis genutzt werden und zählen aufgrund der niedrigen Sensitivität nicht zur Routinediagnostik. Das für MC typische Antikörpermuster ist ASCA+/pANCA- und für CU ASCA-/pANCA+ (Baumgart, 2009; Herold, 2018; Lecis *et al.*, 2002; Masoodi *et al.*, 2011; Meißner, 2017; J. Preiß *et al.*, 2014; Renz-Polster & Krautzig, 2013).

**Basic diagnostic evaluation for patients with suspected ulcerative colitis or Crohn's disease as performed in the author's university hospital outpatient practice.\* The evidence levels and recommendation grades given are those of the ECCO Consensus (4, 7).**

Directed diagnostic technique	Ulcerative colitis	Evidence level and recommendation grade	Crohn's disease	Evidence level and recommendation grade
<b>History</b> Onset of manifestations, blood/mucus in stool, tenesmus, fecal incontinence, nocturnal diarrhea, travel and dietary history, bowel infections, use of NSAID, cigarette smoking, family history of CD or UC, appendectomy status	Yes	EL 5, RG D	Yes	EL 5, RG D
<b>Current findings</b> Pulse, BP, temperature, weight, height, BMI, abdomen, inspection of the perineum, digital rectal examination, examination for extra-intestinal manifestations (eyes, skin, joints, muscles)	Yes	EL 5, RG D	Yes	EL 5, RG D
<b>Laboratory tests</b> Electrolytes, urea, creatinine, complete blood count, ESR, liver enzymes, bilirubin, alkaline phosphatase, transferrin, ferritin, vitamin B12, folic acid, CRP, urinalysis	Yes	EL 5, RG D except for CRP and ESR	Yes	EL 5, RG D except for CRP, EL 2 RG B
<b>Stool tests</b> Stool testing for bacterial organisms and resistance, <i>C. difficile</i> , lactoferrin or calprotectin	Yes	<i>C. diff.</i> EL 4, RG C Calprotectin EL 2b, RG B	Yes	EL 5, RG D except for <i>C. diff.</i> EL 2, RG B

**Basic diagnostic evaluation for patients with suspected ulcerative colitis or Crohn's disease as performed in the author's university hospital outpatient practice.\* The evidence levels and recommendation grades given are those of the ECCO Consensus (4, 7).**

Directed diagnostic technique	Ulcerative colitis	Evidence level and recommendation grade	Crohn's disease	Evidence level and recommendation grade
<b>Endoscopy</b>				
EGD with biopsies	No		Yes, if symptomatic	EL 5, RG A
Colonoscopy with ileoscopy and stepwise biopsy	Yes	EL 5, RG D	Yes	EL 1b, RG A
<b>Imaging studies</b>				
Ultrasound of the abdomen and bowel	Yes	EL 3, RG C	Yes	EL 1a, RG A
Extended small bowel diagnostic testing (conventional or CT/MR-Sellink)	No		Yes	EL 1b, RG A
Search for extra-intestinal complications (US, CT, MRI)	Yes, if suspected	EL 2b, RG B	Yes, if suspected	EL 1c, RG A
Search for fistulae or abscesses (US, CT, MRI)			Yes, if suspected	EL 1c, RG A
Capsule endoscopy (WCE)	No		Yes, if terminal ileum normal or not visualizable, or if other imaging studies are negative	EL 2, RG B
Virtual colography	No	EL 4, RG C	No	
MRCP	If PSC is suspected		If PSC is suspected	EL 2a, RG B
ERC(P) with balloon dilatation	If PSC is present with dominant strictures		If PSC is present with dominant strictures	
<b>Consultation or collaborative treatment with other medical specialties</b>	When indicated		When indicated	
Surgery, rheumatology, dermatology, ophthalmology, gynecology, urology				

\*There is no gold standard for diagnostic testing (ECCO, EL 5, RG D). This list is intended as an orientation for the reader and no claim of completeness is made. For certain patterns of disease involvement, in the presence of complications, or before certain types of treatment, other diagnostic techniques can and should be used.  
 ECCO, European Crohn's and Colitis Organization; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; CD, Crohn's disease; UC, ulcerative colitis; BP, blood pressure; BMI, body-mass index; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; C. diff., Clostridium difficile; EGD, esophagogastroduodenoscopy; US, ultrasonography; CT, computerized tomography; MRI, magnetic resonance imaging; WCE, wireless capsule endoscopy; MRCP, magnetic resonance cholangiopancreatography; ERC(P), endoscopic retrograde cholangio(pancreatic)graphy; PSC, primary sclerosing cholangitis

**Abbildung 2. Beispielhafte Basisdiagnostik bei Patienten mit Verdacht auf Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Baumgart, 2009).**

### 1.1.8 Therapie

Die Therapie von MC ermöglicht keine vollständige Heilung. In der Regel wird konservativ therapiert. Die Behandlung unterteilt sich in Remissionsinduktion eines Schubes und Remissionserhaltung. Medikamentös werden zur Remissionsinduktion topische oder systemische Steroide, Immunsuppressiva (Azathioprin) oder Biologika (TNF-a-Blocker) eingesetzt. Zur Remissionserhaltung stehen u.a. Azathioprin oder 6-Mercaptopurin zur Verfügung (Abbildung 3). Eine chirurgische Therapie ist nur bei Komplikationen indiziert und wird darmsparend vollzogen. Diesbezügliche Indikationen sind zum Beispiel Abszesse, schwere Komplikationen wie Perforationen oder Ileitumoren und Stenosen. Abszesse können drainiert, Perforationen oder Ileitumoren minimal-invasiv operiert und Stenosen ballondilatiert (< 5 cm) oder darmsparend resektiert (> 5 cm) werden.

Postoperativ ist eine medikamentöse Remissionserhaltung indiziert (Herold, 2018; J. Preiß *et al.*, 2014; Wehkamp *et al.*, 2016).

Die Remission eines CU-Schubs wird mit Aminosalicylaten oder lokalen Steroiden induziert, bei schweren Schüben mit systemischer Steroid-Therapie, TNF-a-Blockern oder Calcineurin-Inhibitoren. Bei mangelndem Erfolg kann auf Integrin-Inhibitoren zurückgegriffen werden. In der Erhaltungstherapie wird bevorzugt die Wirkstoffklasse genutzt, welche zuvor erfolgreich die Remission induzieren konnte (Abbildung 3). Im Gegensatz zu MC kann CU operativ geheilt werden. Eine chirurgische Therapie ist bei Perforationen, medikamentös nicht beherrschbaren Schüben, therapierefraktären Blutungen, Dysplasien und kolorektalem Karzinom indiziert. Der elektive Standard ist eine restaurative Proktokolektomie mit protektivem Ileostoma, welcher eine Kontinenz von > 90 % erzielt (Herold, 2018; Kucharzik *et al.*, 2019). Die Therapie kann durch eine Ernährungsberatung, Schmerztherapie und/oder Psychotherapie ergänzt werden (Carter, 2004; Kucharzik *et al.*, 2019; J. Preiß *et al.*, 2014).

**Evidenzgrade in der CED-Therapie\***

Morbus Crohn			Colitis ulcerosa		
Befall/Verlauf	Therapie	Evidenzgrad	Befall/Verlauf	Therapie*	Evidenzgrad
ileozökaler Befall	Budesonid	I	Proktitis	topisch Mesalazin plus topisch Steroide	II
	Mesalazin	II		topisch Tacrolimus	II
	Glukokortikoide (syst.)	I			
Kolonbefall	Sulfasalazin	I	Linksseitenkolitis wenn mesalazinrefraktär	Mesalazin (topisch + systemisch) dann Glukokortikoide	II
	Glukokortikoide	I			
Dünndarmbefall	Glukokortikoide	II	ausgedehnter Befall wenn mesalazinrefraktär	Mesalazin (topisch + systemisch) dann Glukokortikoide	I
					III
steroidrefraktärer Verlauf	TNFα-Antikörper oder anti-Integrin-Antikörper	I	schwerer Verlauf	Glukokortikoide i. v.	II
Remissionserhaltung (steroidabhängig)	Azathioprin	I	steroidrefraktärer Verlauf	Ciclosporin	I
	6-Mercaptopurin	II		Infliximab	I
	Methotrexat	II		Tacrolimus	II
	TNFα-Antikörper	I	Remissionserhaltung wenn mesalazinintolerant wenn Mesalazinrefraktär oder steroidabhängig	Mesalazin	I
	anti-Integrin-Antikörper	I		dann E. coli Nissle	I
				dann Azathioprin/6-Mercaptopurin, TNFα- oder Anti-Integrin-Antikörper	I

**Abbildung 3. Medikamentöse Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa** \* Die Einteilung der Evidenzgrade erfolgt nach J. C. Preiß *et al.*, 2014 (Wehkamp *et al.*, 2016).

### 1.1.9 Prognose

Die gegenwärtige Therapie des MC ermöglicht keine Heilung. Im Durchschnitt müssen 40 % der MC Patienten nach 5 Jahren und bis zu 70 % der Patienten nach 10 Jahren operativ versorgt werden. Die Erfolgsquote ist abhängig von der Lokalisation. Bei einer Resektion eines Ileumsegments beträgt sie in 10 Jahren 90 %. Der 10-Jahres-Erfolg einer Ileozökalresektion beträgt 40 %. Rezidive treten in

benachbarten Gebieten bei 10 - 60 % der Patienten auf, weshalb 20 % dieser im Zeitrahmen von 5 Jahren erneut chirurgisch behandelt werden müssen. Die Lebenserwartung von MC Patienten ist bei optimaler Therapie mit der Normalbevölkerung vergleichbar. CU Patienten haben bei Proktosigmoiditis eine Lebenserwartung, welche der der Allgemeinbevölkerung entspricht. Bei Pankolitis liegt das 20-Jahres-Überleben bei 80 %. Prognostisch relevant ist das Auftreten verschiedener Begleiterkrankungen, wie Nierensteine, Osteopenie, Osteoporose, PSC und kolorektalem Karzinom. Disziplinübergreifende regelmäßige Anamneseerhebung und adäquate Behandlung sind daher essenziell, um etwaige Komplikationen zu vermeiden. Prognostisch ungünstig ist vor allem bei pädiatrischen Patienten ein Malabsorptionssyndrom, da dies zu Wachstumsstörung führen kann (Herold, 2018; Hovde, 2012; J. Preiß *et al.*, 2014; Wehkamp *et al.*, 2016).

## **1.2 Autoantikörper bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

### **1.2.1 Allgemeines**

Antikörper/Immunglobuline (Ig) zählen zum humoralen Teil des spezifischen Immunsystems. Es handelt sich um Glykoproteine, welche von reifen Plasmazellen produziert werden und durch ihre Fähigkeit der Opsonierung, der direkten Neutralisierung und der Auslösung der Komplementkaskade eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen spielen. Der Fc-Teil des Immunglobulins bestimmt die Zugehörigkeit zu einer der 5 Antikörperklassen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). Immunglobulin G (IgG) ist der am höchsten konzentrierte Antikörper im Blut. Der Antikörper ist hochaffin und seine funktionelle Bedeutung liegt vor allem in der ausgeprägten Fähigkeit zur Opsonierung von Pathogenen und der Aktivierung des Komplementsystems. Im Serum bildet IgG eine langfristige Immunität. Immunglobulin A (IgA) kommt vor allem auf Schleimhautoberflächen des Darmes und der Atemwege vor. IgA wird in der Lamina propria synthetisiert und gelangt mittels Transzytose an das Darmepithel. Dort bindet es die Schleimschicht des Epithels und fungiert als neutralisierender Antikörper. Während der Fetalzeit entwickelt der Körper eine „immunologische Toleranz“. Antigene, die in diesem Zeitraum dem Immunsystem präsentiert werden, werden im weiteren Verlauf toleriert und lösen durch zwei Mechanismen keine Immunreaktion aus: 1. Klonale Deletion (autoreaktive Lymphozyten werden

zerstört) und 2. Klonale Anergie (Aktivierung und Reifung autoreaktiver Lymphozyten wird gehemmt). Reagiert ein Antikörper fehlerhaft auf körpereigenes Gewebe, indem er dieses als fremd erkennt, wird dieser als autoreaktiv bzw. Autoantikörper bezeichnet. Die Autoimmunreaktion ist vergleichbar mit der physiologischen Immunantwort, mit dem Unterschied, dass die Antikörper durch körpereigene Antigene aktiviert werden. Vermutlich entwickelt sich eine Autoimmunerkrankung auf dem Fundament einer genetischen Prädisposition, dem Versagen von Toleranzmechanismen und Umweltfaktoren wie eine Infektion (Elkon & Casali, 2008; Murphy & Weaver, 2018). Einen Sonderfall unter den Autoimmunerkrankungen nehmen die CED ein, denn das Antigen stellt nicht nur körpereigenes Gewebe dar, sondern auch die Mikroflora des Darmes. Es kommt zu einer Gewebszerstörung durch T-Effektorzellen, die Peptide der kommensalen Bakterien erkennen, und so durch die Initiierung von lokalen Entzündungen zu einer Gewebsschädigung führen (Dornmair *et al.*, 2003; Elson, 2000).

### **1.2.2 Antikörper Muster**

Verschiedene (Auto)Antikörper wurden in Zusammenhang mit CED beschrieben. Die am besten erforschten sind ASCA und pANCA, welche meist routinemäßig zur Differenzialdiagnostik der CED bestimmt werden. Des Weiteren wurden für MC die hoch spezifischen pankreatischen Autoantikörper (PAB) entdeckt, welche sich gegen das Glykoprotein 2 (GP2) und CUB and zona pellucida-like domains-containing protein 1 (CUZD1) richten.

#### **1.2.2.1 Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* und atypische perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Autoantikörper**

Bei Patienten mit MC werden häufiger als bei Gesunden Antikörper gegen Mikroorganismen der Darmflora gefunden. Bei MC Patienten sind ASCA in 60 - 70 % der Fälle nachweisbar, bei CU Patienten nur in 10 - 15 % (Conrad *et al.*, 2002).

Bei Gesunden beträgt der Anteil lediglich 0 - 5 %. Der Antikörper bindet das Mannan-Epitop von *S. cerevisiae*, eine Bäckerhefe (Bossuyt, 2006; Conrad *et al.*, 2002; Lerner, 2014; Tesija Kuna, 2013; Walkers *et al.*, 2004). pANCA zeigen eine Prävalenz von 60 - 80 % bei CU und 10 % bei MC. Diese Autoantikörper binden zytoplasmatische Antigene. Viele weitere Autoimmunerkrankungen insbesondere Vasculitiden sind mit ANCA assoziiert. pANCA tritt zudem bei primär sklerosierender

Cholangitis auf (Bossuyt, 2006; Conrad *et al.*, 2002; Lerner, 2014; Tesija Kuna, 2013; Walker *et al.*, 2004).

### 1.2.2.2 Pathogenetische und klinische Relevanz

ASCA ist gegen den Pilz *Saccharomyces cerevisiae* gerichtet und nicht gegen humane Antigene. Das vermehrte Auftreten dieser Antikörper bei Erkrankten könnte ein Epiphänomen der zerstörten Immuntoleranz des Darmes sein. Eine weitere Vermutung ist, dass diese Antikörper bei CED mit einem ähnlichen, aber bisher unbekanntem Antigen kreuzreagieren. ASCA konnte bei MC mit proximalem Befall und schwerem Verlauf assoziiert werden. Zur Kontrolle des Krankheitsverlaufes scheint ASCA ungeeignet, da der Titer über die Zeit stabil bleibt und sich unabhängig zu Krankheitsaktivität und Dauer verhält (Bossuyt, 2006; Lerner, 2014; Walker *et al.*, 2004). Das Vorkommen von pANCA bei MC macht eine Colitis-Ulcerosa-like-Kolitis (eine linksseitige Kolitis) wahrscheinlicher. Die Antikörper können ansonsten nicht mit klinischen Phänotypen oder der Krankheitsaktivität assoziiert werden, auch bleibt der Titer nach Kolektomie im Verlauf positiv. Bisweilen beschränkt sich der klinische Gebrauch in der Diagnostik auf die Fälle, deren Ergebnisse in der Standarddiagnostik unzulänglich sind (J. Preiß *et al.*, 2014). ASCA+ macht das Vorliegen eines MC weitaus wahrscheinlicher als einer CU, jedoch ist eine ausreichende Spezifität für MC nur in der kombinierten Erfassung mit ANCA gegeben (> 80 %). Dies wiederum mindert die Sensitivität um ca. 10 %, denn viele MC Patienten mit exklusivem Kolon-Befall und CU ähnlicher Kolitis zeigen ANCA-Positivität (J. Preiß *et al.*, 2014; Quinton *et al.*, 1998). Begrenzt ist der Nutzen auch dadurch, dass bis zu 48 % der Patienten mit Colitis-Indeterminata sowohl ASCA, als auch ANCA seronegativ sein können, sodass der erhoffte Vorteil in der Diagnosefindung oftmals ausbleibt (Joossens *et al.*, 2002).

### 1.2.2.3 Autoantikörper gegen pankreatische Glykoproteine

PAB sind Autoantikörper gegen die im exokrinen Pankreas sezernierten Glykoproteine, welche sich oft und in erhöhten Konzentrationen im Serum von Patienten mit MC finden. Bei ungefähr 27 - 39 % aller MC Erkrankten lassen sich PAB nachweisen, während bei CU und gesunden Kontrollen 0 - 5 % der Fälle positiv sind. Hohe PAB Titer finden sich exklusiv bei MC Patienten (Bogdanos *et al.*, 2011; Conrad *et al.*, 2014; Roggenbuck *et al.*, 2009; Stöcker *et al.*, 1987). PAB gehören zur Antikörper-Klasse IgG (ca. 67 %) und IgA (ca. 32 %) und sind mit über 98 % für MC

spezifisch (Bogdanos *et al.*, 2011). Mittels ELISA-Analyse und indirekter Immunfluoreszenz wurden die Zielantigene der PAB identifiziert: CUZD1 und GP2, zwei glykosylierte Proteine der zymogenen Granula des exokrinen Pankreas. Autoantikörper gegen CUZD1 bzw. GP2 zeigen ein retikulogranuläres bzw. droplet Fluoreszenzmuster (Conrad *et al.*, 2014; Komorowski *et al.*, 2013; Stöcker *et al.*, 1987). PAB gegen GP2 treten zu 18,8 - 30 % bei MC, zu 2,9 - 12 % bei CU und zu weniger als 5 % bei Gesunden auf (Michaels *et al.*, 2015; Op De Beéck *et al.*, 2012; Roggenbuck *et al.*, 2016).

#### 1.2.2.4 Pathogenetische und klinische Relevanz

Neben der ätiologischen Relevanz könnten PAB als nicht invasive MC-spezifische Marker die Differenzialdiagnostik von MC und CU erleichtern. PAB zeigen eine hohe Spezifität für MC, aber auch eine geringere Sensitivität. Bisher konnten PAB noch nicht als serologische Marker im klinischen Alltag etabliert werden (Conrad *et al.*, 2014; Conrad *et al.*, 2002; Komorowski *et al.*, 2013). Mit der jüngsten Entdeckung des Antigens GP2 kann eine pathogenetische Relevanz eben dieser Antikörper-Antigen Reaktion vermutet werden. Eine Beteiligung von anti-GP2 in der Entstehung von MC ist wahrscheinlich, da das Auftreten von anti-GP2 mit phänotypischen Charakteristika korreliert zu sein scheint (Tabelle 3) und außerdem das Autoantigen GP2 vielfältig immunologische Prozesse beeinflusst (1.3.4). In den letzten Jahren haben sich mehrere Arbeitsgruppen mit dem Auftreten von anti-GP2 und deren Assoziation von Phänotypen beschäftigt. Die Ergebnisse sind bisweilen widersprüchlich und in Tabelle 3 dargestellt.

	Pavlidis <i>et al.</i> , 2012	Op De Beéck <i>et al.</i> , 2012	Bogdanos <i>et al.</i> , 2012	Papp <i>et al.</i> , 2015	Michaels <i>et al.</i> , 2015	Pavlidis <i>et al.</i> , 2016	Shpoliansky <i>et al.</i> , 2020 <sup>+</sup>
Geschlecht	k.D.	k.A.	k.D.	k.D.	k.A.	k.D	k.A.
Alter bei Erstdiagnose	k.A.	k.D.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
L1	Pos.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
L2	Neg.	k.A.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	k.A.
L3	Pos.	k.A.	Pos.	k.A.	k.A.	Pos.	Pos.

**Tabelle 3. Bisherige Forschungsergebnisse zu den Assoziationen von Autoantikörper gegen GP2 und Phänotypen.** L1 = Ileale Lokalisation, L2 = Kolische Lokalisation, L3 = Ileokolische Lokalisation, k.D = keine Daten, k.A. = keine Assoziationen, Pos. = Positive Assoziation, Neg. = Negative Assoziation. \*Daten wurden im pädiatrischen Kollektiv erhoben, Modifiziert nach Michaels, 2017.

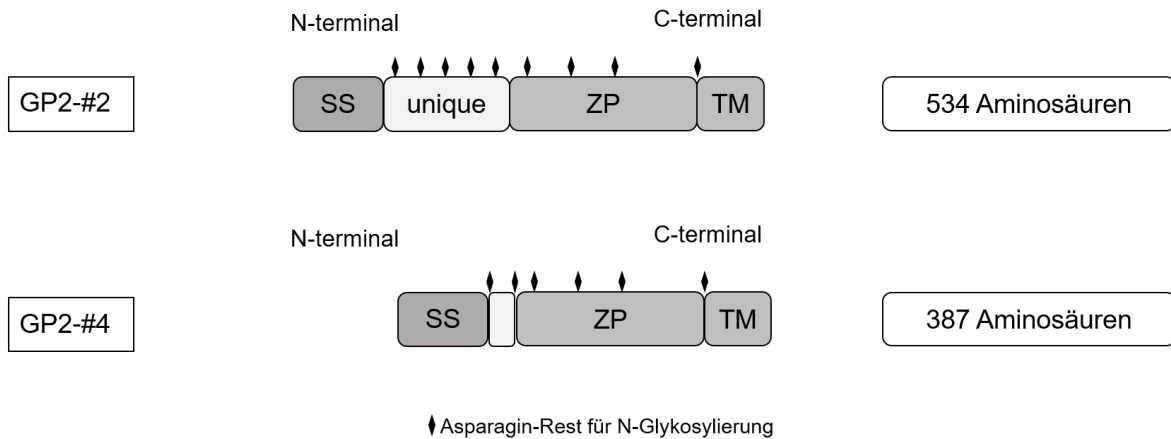
## 1.3 Autoantigen Glykoprotein 2

### 1.3.1 Lokalisation

GP2 ist ein glykosyliertes Protein, welches bis zu 35 - 40 % aller Proteine der zygoten Granula des exokrinen Pankreas ausmacht. Mittels GPI-Anker ist das Protein in der granulären Membran verankert. Nach Stimulation des Pankreas wird das Protein zur apikalen Membran transportiert und gelangt mit dem Pankreassaft in den Zwölffingerdarm. Die lösliche Form kann extrazellulär zu einem Netzwerk aggregieren. Des Weiteren wird GP2 auf der apikalen Membran von M-Zellen der Peyer-Plaques (PP) exprimiert. M-Zellen befinden sich auf dem Follikel-assoziierten Epithel der PP, einer Ansammlung von Lymphfollikeln (Ishimoto, 2004). Sie lassen sich im GIT nachweisen, mit Ausnahme des Kolons. Weitere Zellen des Immunsystems, welche GP2 exprimieren sind T-Zellen, B-Zellen und Monozyten (Roggenbuck *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Isoformen

Durch alternatives Spleißen entstehen 4 verschiedene Isoformen des GP2 Proteins, von denen 2 Spleißvarianten bei CED eine Autoimmunantwort provozieren (Fukuoka, 2000; D Roggenbuck *et al.*, 2016). Diese werden im Folgenden als Variante #2 und #4 bezeichnet (Abbildung 4). Variante #2 besteht aus 527 Aa und hat ein Molekulargewicht von approximativ 59,5 kDa, während Variante #4 aus 380 Aa besteht und 43 kDa hat. Die 147 fehlenden Aminosäuren der Version #4 entsprechen der 25-171 Region der Version #2 (Fukuoka, 2000). Aufgrund der ausgeprägten Glykosylierung und Aggregation nimmt die Masse des Proteins im nicht reduzierten Zustand auf bis zu 78 kDa zu (D. Roggenbuck *et al.*, 2009). C-terminal verfügt das Protein über eine Zona-pellucida Domäne, welche klassischerweise bei Proteinen vorkommt, die unter bestimmten Umweltbedingungen aggregieren können. Die N-Glykosylierung scheint entscheidend für die Autoantikörperbindung durch PAB zu sein (Komorowski *et al.*, 2013).



**Abbildung 4. Schematische Darstellung von der Proteinstrukturen von GP2-#2 und GP2-#4.** SS = Signalsequenz, unique = spezifische Domäne, ZP =Zona-pellucida-Domäne, TM = transmembranäre Domäne. (Modifiziert nach Derer *et al.*, 2020).

### 1.3.3 Homologie

Die Aminosäuresequenz von GP2 weist eine 85%ige Ähnlichkeit zu der von Uromodulin auf, einem Protein des Urintraktes. Uromodulin verfügt ebenfalls über einen GPI-Anker und wird in der aufsteigenden Henle-Schleife der Niere produziert. Das Protein bindet FimH<sup>+</sup> Bakterien und verhindert so die Kolonisation von beispielsweise *Escherichia coli* im Urintrakt. Damit verhindert es die Invasion von pathogenen Bakterien, was sich durch den Nachweis von vermehrten Infektionen des Urintraktes in Uromodulin knock-out Mäusen verdeutlicht (Coady *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2001; Roggenbuck *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2012). Aufgrund der molekularen Homologie von Uromodulin und GP2 ist eine partielle Überschneidung ihrer Funktion naheliegend.

### 1.3.4 Funktion

GP2 scheint keine relevante Funktion im Pankreas zu haben, sondern vielmehr eine wichtige Rolle im intestinalen Immunsystem zu spielen (Yu, Michie, & Lowe, 2004). Auf den M-Zellen fungiert es als Rezeptor zur Antigen-Transzytose. Im Zuge dessen bindet GP2 FimH<sup>+</sup> Bakterien, wozu enteropathogene *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* gehören (Krogfelt *et al.*, 1990; Westerlund-Wikström *et al.*, 2005). GP2 bewirkt so die Translokation von luminalen Antigenen über die epitheliale Barriere in die Lymphfollikel und initiiert eine Antigen-spezifische Immunreaktion. Als lösliche Form opsoniert GP2 Antigene und erleichtert deren Erkennung und Bekämpfung durch andere Immunzellen (Gullberg & Söderholm, 2006; Hase *et al.*, 2009; Schierack *et al.*, 2015). GP2 wirkt außerdem immunmodulierend, indem es

sowohl die humorale als auch zelluläre Immunantwort herunterregelt. Im Versuch justiert rekombinantes GP2-Protein die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-17 herunter, sowohl intraepithelial als auch in den peripheren T-Zellen des Blutes. Nach einer Stimulation von Caspase 3 und Caspase 8 kommt es durch GP2 zu einer Inhibierung der Apoptose von T-Zellen (Werner *et al.*, 2012).

#### **1.4 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der humanen intestinalen Expression von GP2-Isoformen, sowie die Untersuchung und funktionelle Einordnung von Autoantikörpern in Seren von CED Patienten. Die Ätiopathogenese von CED ist trotz beachtlicher Inzidenz nicht abschließend geklärt (Herold, 2018; Hovde, 2012; Kasper & Burghardt, 2014; Renz-Polster & Krautzig, 2013; Wehkamp *et al.*, 2016). Nach aktuellem Wissensstand kommt es durch komplexe Verflechtungen von genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen zu einer Dysbalance der intestinalen Homöostase. Das Darmepithel ist vermehrt durch Pathogene infiltriert (Palmela *et al.*, 2018). Durch eine pathologische Immunreaktion kommt es zu einem Übergewicht an proinflammatorischen Signalwegen und konsekutiv zu einem chronischen Entzündungsgeschehen (Goyette *et al.*, 2007; Herold, 2018; Kasper & Burghardt, 2014; Murphy & Weaver, 2018). Angesichts der multifaktoriellen und teils ungeklärten Genese stellt sich die Frage, ob bzw. welche wichtigen pathophysiologische Einflüsse bisher unentdeckt blieben. Eine zielgerichtete Forschung auf diesem Themenfeld kann weitere wichtige Teilfaktoren aufdecken, aus denen neue therapeutische und diagnostische Zugänge entwickelt werden können. Um das Auftreten komplizierter Fälle und akuter Krankheitsexazerbationen zu verringern, ist es essenziell, Patienten frühzeitig und adäquat zu behandeln. Dadurch würde zudem die mit Zunahme der Krankheitsschwere beachtlich steigenden Kosten für das Gesundheitssystem gesenkt (Bokemeyer, 2003; Hay & Hay, 1992; Prenzler *et al.*, 2009). Nachdem GP2 kürzlich als Autoantigen der für MC spezifischen PAB identifiziert werden konnte, sind GP2 und gegen GP2 gerichtete Autoantikörper in das Interesse der Forschung gerückt (Komorowski *et al.*, 2013; Roggenbuck *et al.*, 2009; Roggenbuck *et al.*, 2013). Das Autoantigen GP2 ist an einer Vielzahl von immunologischen Vorgängen beteiligt. Als spezifischer FimH+-Rezeptor ermöglicht es eine Transzytose und die Initiation einer spezifischen Immunreaktion, führt zur Antigen-Opsonierung

und ist außerdem durch die Regulierung von pro- und antiinflammatorischen Signalkaskaden immunmodulierend aktiv (Gullberg & Söderholm, 2006; Hase *et al.*, 2009; Schierack *et al.*, 2015; Werner *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2004). Im humanen Organismus werden zwei Isoformen des Glykoproteins exprimiert: die größere Variante GP2-#2 und durch alternatives Spleißen die kleinere Variante GP2-#4 (Fukuoka, 2000).

GP2 und Autoantikörper gegen GP2 wurden bereits in der Vergangenheit untersucht. Zahlreiche Arbeiten beschreiben die diagnostischen Möglichkeiten von anti-GP2-Autoantikörpern und den Zusammenhang mit klinischen Phänotypen (Bogdanos *et al.*, 2011; Degenhardt *et al.*, 2016; Michaels, 2017; Michaels *et al.*, 2015; Op De Beéck *et al.*, 2012). Vermutet wird, dass die Autoantikörper das Glykoprotein in seiner Funktion beeinträchtigen und eine pathophysiologische Relevanz bei der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung des chronisch entzündlichen Geschehens von CED haben. Diese Hypothese ist außerdem interessant, da sich das Entzündungsgeschehen von MC häufig im distalen Ileum lokalisiert, in dem GP2-bestückte M-Zellen reichlich vorkommen (Gullberg & Söderholm, 2006; Hase *et al.*, 2009; D. Roggenbuck *et al.*, 2009).

Bisherige Untersuchungen haben sich vor allem mit GP2-#2 befasst und nicht zwischen den Isoformen differenziert. Bisher ist ungeklärt, ob zwischen den Isoformen GP2-#2 und GP2-#4 des Proteins pathophysiologische Unterschiede bestehen. Weiterhin ist ungewiss, ob die beschriebenen Autoantikörper isoformspezifisch sind und ob sie Einfluss auf die Entwicklung von CED haben. Zur Erforschung der Unterschiede zwischen den Isoformen GP2-#2 und GP2-#4 und der Relevanz bezüglich MC und CU wurden folgende Fragen untersucht:

*Wie ist das Expressionsmuster der GP2-Isoformen?*

*Lässt sich ein CED-charakteristisches Expressionsmuster der Isoformen GP2-#2 und GP2-#4 erkennen?*

*Binden die Autoantikörper gegen GP2 isoformspezifisch und besteht ein Zusammenhang zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen?*

*Haben anti-GP2-Autoantikörper in humanen Seren Auswirkungen auf Zellen, die entweder GP2-#2 oder GP2-#4 exprimieren?*

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Die Untersuchungspopulation dieser Studie bestand aus 51 Probanden. Von diesen waren 30 diagnostiziert mit MC, sowie 9 mit CU. Des Weiteren wurden 12 Blutproben von gesunden Individuen untersucht. Gewebebiopsien bzw. Blutproben der MC und CU Patienten wurden während bzw. vor der Koloskopie an der Universitätsklinik Münster, Deutschland entnommen. Die detaillierten Informationen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Das Alter der Patienten wurde aus dem Jahr der Serumabnahme abzüglich des Geburtsjahres errechnet.

Das Befallsmuster der Krankheit wurde nach der Montreal-Klassifizierung eingeteilt (Tabelle 1, Tabelle 2). Für MC wurde in Befall des terminalen Ileums (L1), des Kolons (L2) oder des Ileokolons (L3) unterteilt. Für CU wurde zwischen Proktitis (E1), Linksseitenkolitis (E2) oder Pankolitis (E3) unterschieden (Kucharzik *et al.*, 2019; J. Preiß *et al.*, 2014). Die Diagnosen wurden nach klinischem Standard durch endoskopische und histologische Evaluation im Universitätsklinikum Münster gestellt. Die Endoskopien waren Teil der regulären Patientenbehandlung. Alle Teilnehmer haben mindestens 24 Stunden vor Untersuchung ihr Einverständnis erteilt und die Studie wurde vorab von der Ethikkommission genehmigt. Alle Seren wurden bei -80 °C gelagert und alle Biopsien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt.

	Gesund	Morbus Crohn	Colitis Ulcerosa
Anzahl	12	30	9
Frauen	6	17	3
Männer	6	13	6
Medianalter (Spannweite)	n.a.	36,5 (23-73)	37 (31-53)
Medianalter bei Erstdiagnose, (Spannweite)	n.a.	22 (14-70)	31 (17-40)
Montreal-Klassifikation	n.a.	L1 = 9 L2 = 6 L3 = 15	E1 = 2 E2 = 1 E3 = 6
Medikamente			
Prednisolon	n.a.	4	3
Azathioprin	n.a.	5	1
Anti-TNF- $\alpha$	n.a.	28	6

**Tabelle 4. Überblick über die Studienpopulation.** L1 = Terminales Ileum, L2 = Kolon, L3 = Ileokolon, E1 = Proktitis, E2 = Linksseitenkolitis, E3 = Pankolitis, n.a.= nicht anwendbar.

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Zellen der adhären wachsenden Zelllinie HEK-293 wurden im Nährmedium (DMEM + 10 % FCS mit 1 % Penicillin/Streptomycin) unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 6 ml Dubblecos phosphatgepufferte Salzlösung (dPBS) gewaschen und dann mit 1 ml Accutase Lösung für 5 Minuten (min) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, bis sich die Zellen von der Flasche lösten. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Nährmedium resuspendiert (DMEM + 10 % FCS mit 1 % Penicillin/Streptomycin) und für 5 min bei 1,800 x g und RT zentrifugiert. Um eine Mykoplasmen-Kontamination auszuschließen, wurden alle 3 Monate Mykoplasmentests durchgeführt.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Um die entsprechende Zellanzahl für die Stimulation zu ermitteln, wurden 20µl der Zellsuspension 1:10 in dPBS und Trypanblau verdünnt, dieser Farbstoff dringt in die Zellemembran toter Zellen und färbt diese an. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer überführt und unter einem inversen Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden alle lebenden Zellen aus den vier Großquadranten gezählt und anschließend mit nachfolgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

### 2.2.3 Transfektion von HEK-293 Zellen mit GP2

Um das Glykoprotein 2 HEK-293 Zellen zu exprimieren wurden die Zellen mit dem jeweiligen Plasmid (GP2-#2, GP2-#4, pCMV-Leervektor) transfiziert.

In drei 10 cm Zellkulturschalen wurden jeweils 1,5x10<sup>6</sup> HEK-293-Zellen in DMEM-Medium + 10% FCS ohne Penicillin/Streptomycin ausgesät und unter sterilen Bedingungen über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Ansätze 1-3 wurden in DMEM-Medium (-/-) gelöst (Tabelle 5). Anschließend wurde Lipofectamin 2000 (1:50 in DMEM Medium (-/-)) im Verhältnis 1:1 hinzugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Das Endvolumen von 3000 µl des entsprechenden Ansatzes wurde abschließend tröpfchenweise in die entsprechende Platte überführt.

Ansatz	DNA-Vektor (Endkonzentration)	Verdünnung in DMEM-Medium (-/-)
1	pCMV6-empty (1 µg/µl)	1:62,5
2	pCMV-GP2-#2 (1µg/µl)	1:62,5
3	pCMV-GP2-#4 (1µg/µl)	1:62,5

**Tabelle 5. Übersicht der Transfektionsansätze.** Transfektionsansätze von HEK-293 Zellen mit den DNA-Vektoren für die Glykoprotein 2-Varianten; GP2#2 und GP2#4, sowie für den Leervektor.

#### 2.2.4 Zytotoxizitätsassay

Die komplementabhängige Zytotoxizität wurde mittels MTS-PMS-Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2H-tetrazolium bestimmt. In Anwesenheit von vitalen Zellen wird das Mono-Tetrazolium Salz (MTS) durch NAD(P)H-abhängige Dehydrogenase Enzyme zu Formazan reduziert. Dies führt zur Farbumschlagreaktion, welche photometrisch quantifiziert werden kann. Die Absorption steigt proportional zur Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen, sodass die antikörperabhängige Zelltoxizität bestimmt wurde, indem autoantikörperpositive Seren im Vergleich zu autoantikörpernegativen Seren getestet wurden.

50.000 Zellen der Transfektanten HEK-293-empty, -GP2 #2 und #4 (2.2.3) wurden mit 25 µl Nährmedium (DMEM + 10 % FCS mit 1 % Penicillin/Streptomycin) in einer 96-well-Platte kultiviert. 25 µl von den im Nährmedium (DMEM + 10 % FCS mit 1 % Penicillin/Streptomycin) verdünnten Seren (5 % v/v) wurden in die jeweiligen wells hinzu pipettiert und für 3 Stunden (Std.) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde je 10 µl MTS-Reagenz hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Substrat wurde durch leichtes Schütteln der Platten in den wells homogen verteilt. Die Absorption wurde bei 490 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 670 nm im Plattenleser gemessen. Alle Seren wurden in Dreifachbestimmung gemessen und anschließend wurde der Mittelwert (S) errechnet. Um die maximale Enzymaktivität zu bestimmen, wurden Zellen statt mit Serum mit PBS inkubiert. Der Wert wurde als „Lebendkontrolle“ (LK) definiert. Damit die Hintergrundabsorption von toten Zellen messbar wurde, wurden Zellen mit Triton X inkubiert und so der Zelltod induziert. Der Mittelwert wurde als „Todkontrolle“ (TK) definiert. Die Viabilität der GP2-transfizierten Zellen in Anwesenheit der Testseren wurde durch die folgende Formel errechnet:

$$\% \text{ viable Zellen} = \frac{(S) - (TK)}{(LK) - (TK)} \times 100$$

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinextraktion

Zunächst wurden die Zellpellets in 100 µl DLB (denaturing lysis buffer) Puffer mit einem Pestel in einem 1,5 ml Reagenzgefäßen homogenisiert und 5 min bei 100 °C aufgeköcht. Die Proben wurden dann kurz auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Proben gevortext und zwei Mal für 20 s in ein Ultraschallbad gestellt. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C und 12.000 xg für 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Proteinmenge mittels Roti®Quant bestimmt.

### 2.3.2 Roti®-Quant Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach Bradford bestimmt (Roth, 2016). Dafür wurden die Proben 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt und dann 50 µl verdünnte Probe mit 100 µl Roti®Quant (Reagenz 1 und Reagenz 2 16:1) für 15 min bei 60 °C inkubiert (Roth, 2016). Eine BSA Standardkurve (0µg/ml; 7,8125 µg/ml; 31,625 µg/ml; 62,5 µg/ml; 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml 1000µg/ml) wurde zur Konzentrationskalkulation genutzt.

Die Messung erfolgte im Spektralphotometer bei 590 nm, als Referenzwellenlänge galt 690 nm. Der Eichstandard und die Proben wurden stets in der Doppelbestimmung gemessen.

### 2.3.3 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE separiert Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts. Durch die Zugabe von SDS werden die Proteine denaturiert und von, zu ihrer Größe proportional, negativer Ladung umhüllt. Durch Zugabe von β-Mercaptoethanol werden außerdem die Disulfidbrücken gespalten. Die denaturierten Proteine werden nachfolgend durch das Anlegen einer elektrischen Spannung nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Zu 20 µg des Proteins wurde 5x SDS Puffer mit oder ohne β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt, mittels Vortex Mixer durchmischt und kurz anzentrifugiert. Ein 18-Fächer-4 - 12 %-Gradient-Polyacrylamid-Fertiggel wurde mit den Proben beladen. Als Molekülmassenstandard wurde 5 µl Protein™ Standard genutzt. Die Proteine wurden

bei 230 V für 30 min in 1 x Elektrophoresepuffer nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

### 2.3.4 Coomassie Blau Färbung

Coomassie-Brilliant-Blau Farbstoff färbt Proteine unspezifisch an, indem er mit den Seitenketten von Proteinen einen Komplex bildet. 1 µg des rekombinanten Proteins GP2-#2 oder rekombinanten Proteins GP2-#4 wurde mittels denaturierender SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen getrennt (2.3.3). Anschließend wurde das Gel über Nacht mit Coomassie Blau Puffer bei RT gefärbt. Zur Entfärbung wurde das Gel mehrmals mit Leitungswasser gewaschen.

### 2.3.5 Gelelektrophorese und Western Blot

Um die Proteine spezifisch nachzuweisen, wurden diese auf einem 4 - 12 %-Polyacrylamid-Gel separiert und mittels Semi-Dry-System bei 1A für 30 min in 1x Blottingpuffer auf eine PVDF (polyvinylidene difluoride) -Membran überführt.

Die Membran wurde für 1 Std. bei RT in 5 % (w/v) Magermilch/T-TBS geblockt und anschließend bei 4 °C über Nacht mit dem jeweiligen GP2-spezifischen primären Antikörpern (Tabelle 6) inkubiert. Die Membran wurde 2 x 20 min mit T-TBS gewaschen und 1 Std. bei RT mit dem HRP-konjugierten sekundären Antikörper (Tabelle 6) inkubiert und 2 x 20 min in T-TBS gewaschen. Danach wurden die Proteine durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Um eine gleichmäßige Proteinladung zu prüfen, wurden die Membran anschließend mit dem Antikörper gegen das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin (Tabelle 6) inkubiert. Zuvor wurde die Membran mit einem Stripping-Puffer für 20 min bei 56 °C in einem Wasserbad inkubiert und dann mehrfach in T-TBS gewaschen, um somit die vorher gebundenen Antikörper im Blot zu entfernen.

Antikörper	Verdünnung
Anti-human GP2 #2	1:500
Anti-human GP2 #2 und #4	1:500
Anti-human $\beta$ -Aktin	1:1000
sekundärer Antikörper HRP-konjugierter IgG- Antikörper	1:4000

**Tabelle 6. Übersicht der verwendeten Antikörper im Western Blot.** Die verwendeten Antikörper wurden in 5% (w/v) Magermilch-Pulver in T-TBS verdünnt.

### 2.3.6 Enzyme-linked-Immunsorbent Assay (ELISA)

Um Immunglobulin A und G gegen humanes GP2-#2 und GP2-#4 im Serum von Patienten mit CED nachzuweisen, wurde ein ELISA durchgeführt. Zur spezifischen

Detektion der Immunglobuline wird das Antigen in den Wells einer ELISA Platte fixiert. Nachdem die Serumproben hinzugefügt werden, kann eine Antikörper-Antigen-Bindung durch die Inkubation mit einem sekundären Antikörper detektiert werden. Dieser Antikörper ist an ein Enzym gekoppelt. Durch Zugabe des passenden Substrates entsteht eine Farbreaktion, die im Photometer messbar ist. Das Signal ist proportional zur Proteinmenge.

Die Wells einer ELISA Platte wurden mit jeweils 1 µg humanem rekombinanten GP2-#2 oder GP2-#4, welche in dPBS verdünnt wurden, über Nacht bei 4 °C beschichtet.

Dann wurde die Platte 3 Mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 Std. bei RT mit 300 µl Blocking Puffer inkubiert. Nach Entfernung des Puffers wurden die in dPBS verdünnten Seren von MC und CU Patienten den Wells hinzugefügt und 2 Std. bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte drei Mal gewaschen und anschließend mit in Verdünnungsmedium (reagent diluent) gelösten, HRP-konjugierten Antikörpern versehen. Der Detektionsantikörper wurde 1 Std. bei RT inkubiert. Nach einem Waschvorgang wurde das Substrat hinzugefügt. Die Farbsubstratreaktion vollzog sich unter abgedunkelten Bedingungen und wurde durch die Zugabe von 3M HCL nach 8 min gestoppt (Tabelle 7).

Die optische Dichte (OD) wurde im Mikroplatten Photometer bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm gemessen. Abschließend wurde die Antikörperaffinität in einem Titrations-ELISA untersucht. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe der Seren (1:4; 1:20; 1:100; 1:500; 1:2500) angesetzt und dann wie oben beschrieben verfahren. Alle Seren wurden in Doppelbestimmung untersucht.

Verwendung	Reagenz	Endkonzentration oder Verdünnung	Volumen pro well [µl]
Beschichtungsprotein	Humanes rekombinantes GP2-#2 oder GP2-#4	1 µg/ml	50
Proben	Humanes Serum	1:4	50
Detektionsantikörper	Anti-human HRP-konjugierter IgG Antikörper	1:4000	50
	Anti-human HRP-konjugierter IgA Antikörper	1:8000	50

Verwendung	Reagenz	Endkonzentration oder Verdünnung	Volumen pro well [µl]
Substrat	3,3',5,5; -tetramethylbenzidine (TMB)		100
Stopp-Lösung	3 M HCL	1M	50

Tabelle 7. Verwendete Reagenzien im ELISA.

## 2.4 Statistische Methoden

Mittels Shapiro-Wilk-Test und unter Auswertung der Q-Q-Diagramme wurden alle Daten auf eine Normalverteilung geprüft. Statistische Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test errechnet. Korrelation wurden durch eine Rangkorrelation nach Spearman bestimmt. Die Effektstärke wurde nach Cohen beurteilt (Cohen, 1992). Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  gewählt.

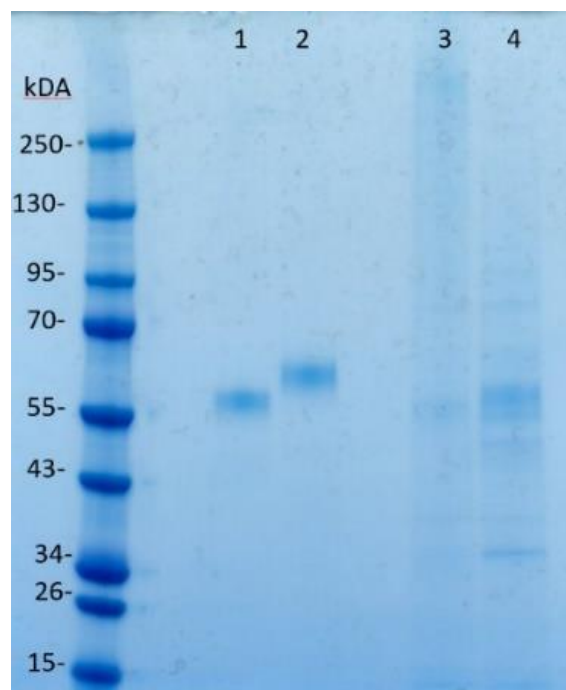
Alle Seren wurden stets basierend auf dem Signal der PBS-Kontrolle interpretiert. Die Ergebnisse sind mit Median und 95 % Konfidenzintervall dargestellt.

Die Ergebnisse wurden mittels EXCEL ausgewertet. Ergänzend wurden mit Graph-Pad Prism Version 8 die statische Auswertung vorgenommen und die Ergebnisse optisch dargestellt.

### 3 Ergebnisse

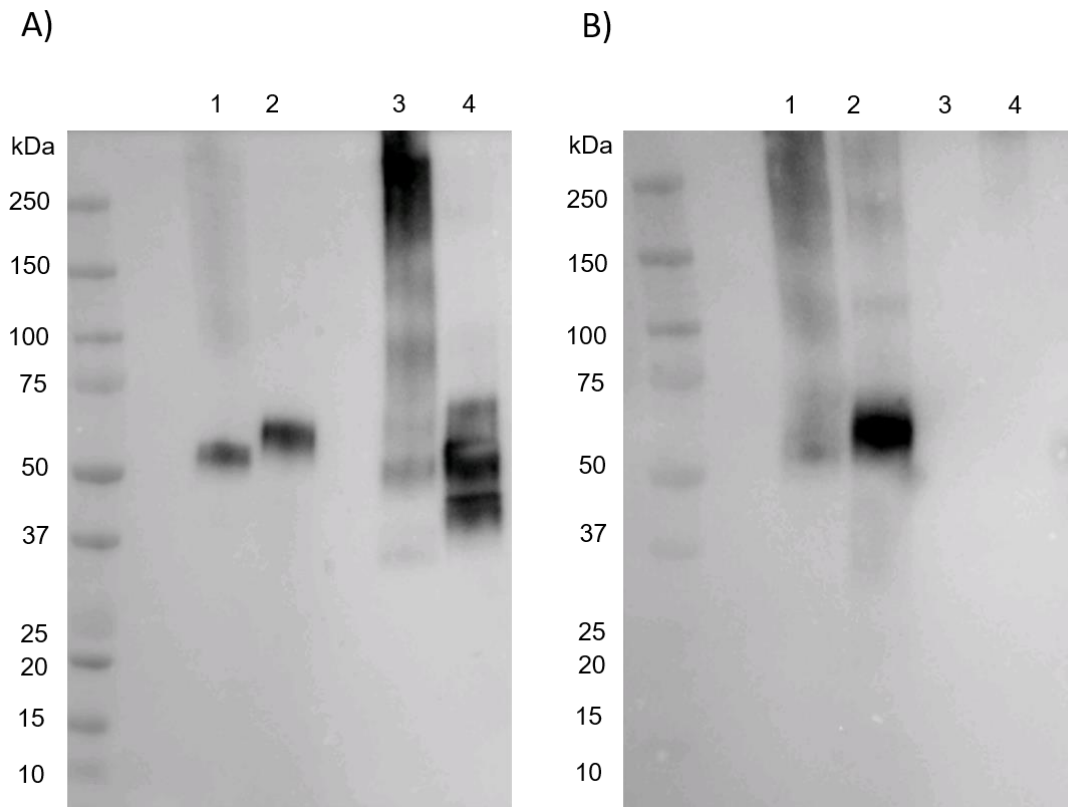
#### 3.1 Reinheitsbestimmung von rekombinanten humanen GP2 Proteinen

In der vorliegenden Arbeit wurden humanes rekombinantes GP2-#2 und GP2-#4 verwendet. Die Proteine wurde separiert durch denaturierende SDS-PAGE unter nicht-reduzierender und reduzierender Bedingung und anschließend mittels eine Coomassie Blau Färbung (Abbildung 5) und einem Western Blot Experiment (Abbildung 6) analysiert.



**Abbildung 5. Reinheitsbestimmung der rekombinanten humanen Proteine GP2-#2 und GP2-#4 (je 100ng/Bahn) mittels Coomassie Blau Färbung.** Die Proteine wurden durch denaturierende SDS-Page unter nicht-reduzierende und reduzierende Bedingung separiert und mittels Coomassie Blau Färbung analysiert. hGP2-#2 nicht-reduziert (1) , hGP2-#2 reduziert (2), hGP2-#4 nicht-reduziert (3), hGP2-#4 reduziert (4).

Mittels monoklonaler spezifischer Antikörper für GP2-#2 und für GP2-#2 und -#4 wurden die rekombinanten humanen Proteine im Western Blot detektiert. Die verwendeten Antikörper haben entweder ein gemeinsames Epitop der Isoformen GP2-#2 und GP2-#4 (Abbildung 6A) oder ein spezifisches Epitop von GP2-#2 (Abbildung 6B) gebunden.



**Abbildung 6. Reinheitsbestimmung von rekombinanten humanen Glykoproteinen im Western Blot.** Rekombinantes humanes Glykoprotein (je 100ng/Bahn) wurde durch denaturierende SDS-Page unter nicht-reduzierender und reduzierender Bedingung separiert und mit primärem anti-humanem Antikörper gegen Isoform 2 und 4 (A) oder primärem anti-humanem Antikörper gegen Isoform 2 (B) im Western Blot analysiert. hGP2-#2 nicht-reduziert (1), hGP2-#2 reduziert (2), hGP2-#4 nicht-reduziert (3), hGP2-#4 reduziert (4).

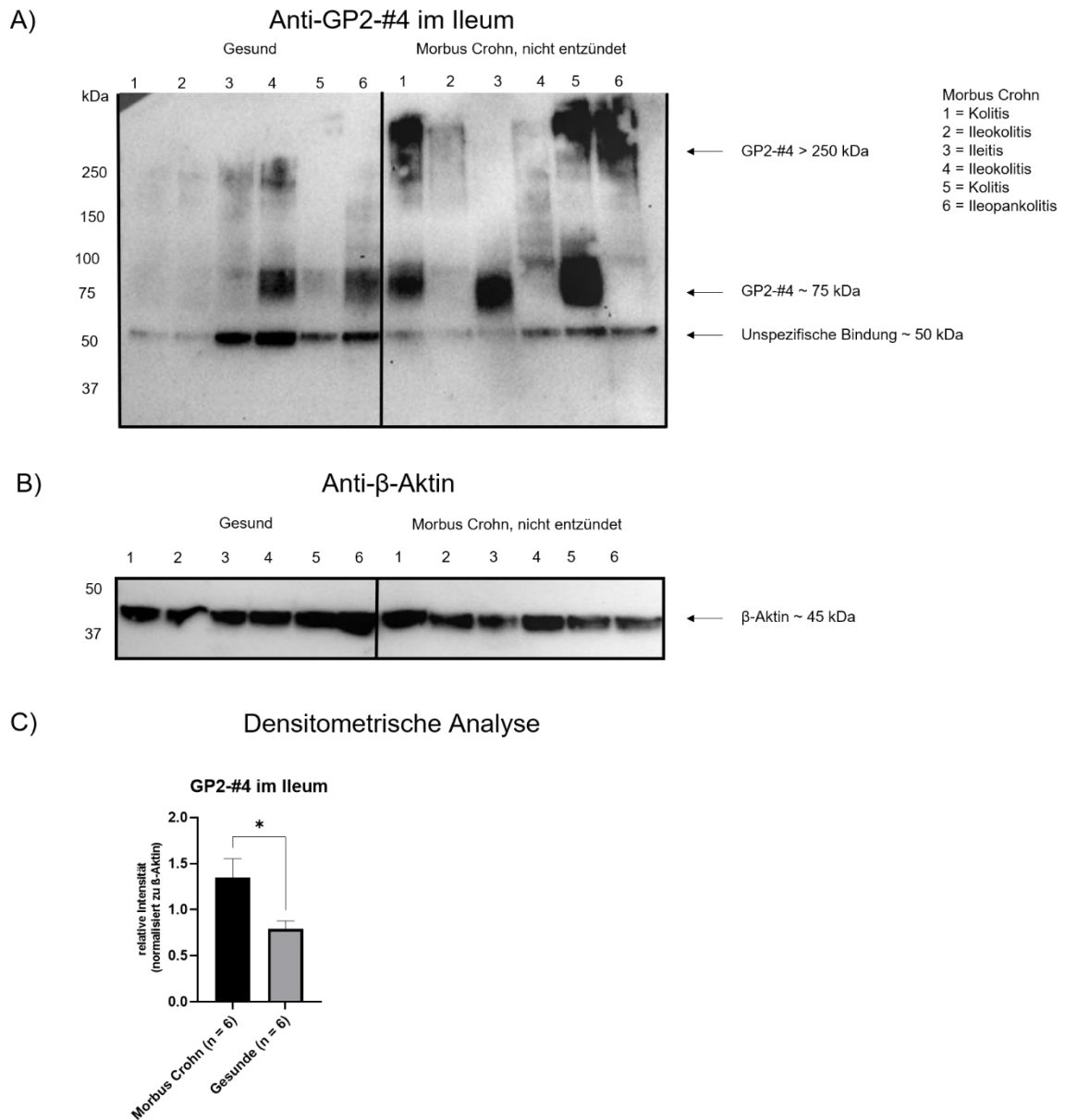
### 3.2 Vermehrte Expression von Glykoprotein 2 Isoform 4 im Ileum und Kolon von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

GP2 ist ein Protein des Gastrointestinaltraktes, welches unter anderem auf ileum-spezifischen M-Zellen exprimiert wird und darüber hinaus als lösliche Form mit dem Pankreassaft in den Gastrointestinaltrakt sezerniert wird. Um die Proteinexpression der Isoformen 2 und 4 von GP2 im Darm zu untersuchen, wurde daher ein Western Blot mit Ileum- und Kolonbiopsien von Gesunden und CED Patienten durchgeführt. Durch die Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern wurde die Expression der beiden Isoformen analysiert.

Die in diesem Kapitel (3.2) präsentierten Western Blots sind von Frau Ann-Kathrin Brethack im Rahmen ihrer Bachelorarbeit angefertigt worden. Um die Spezifität der

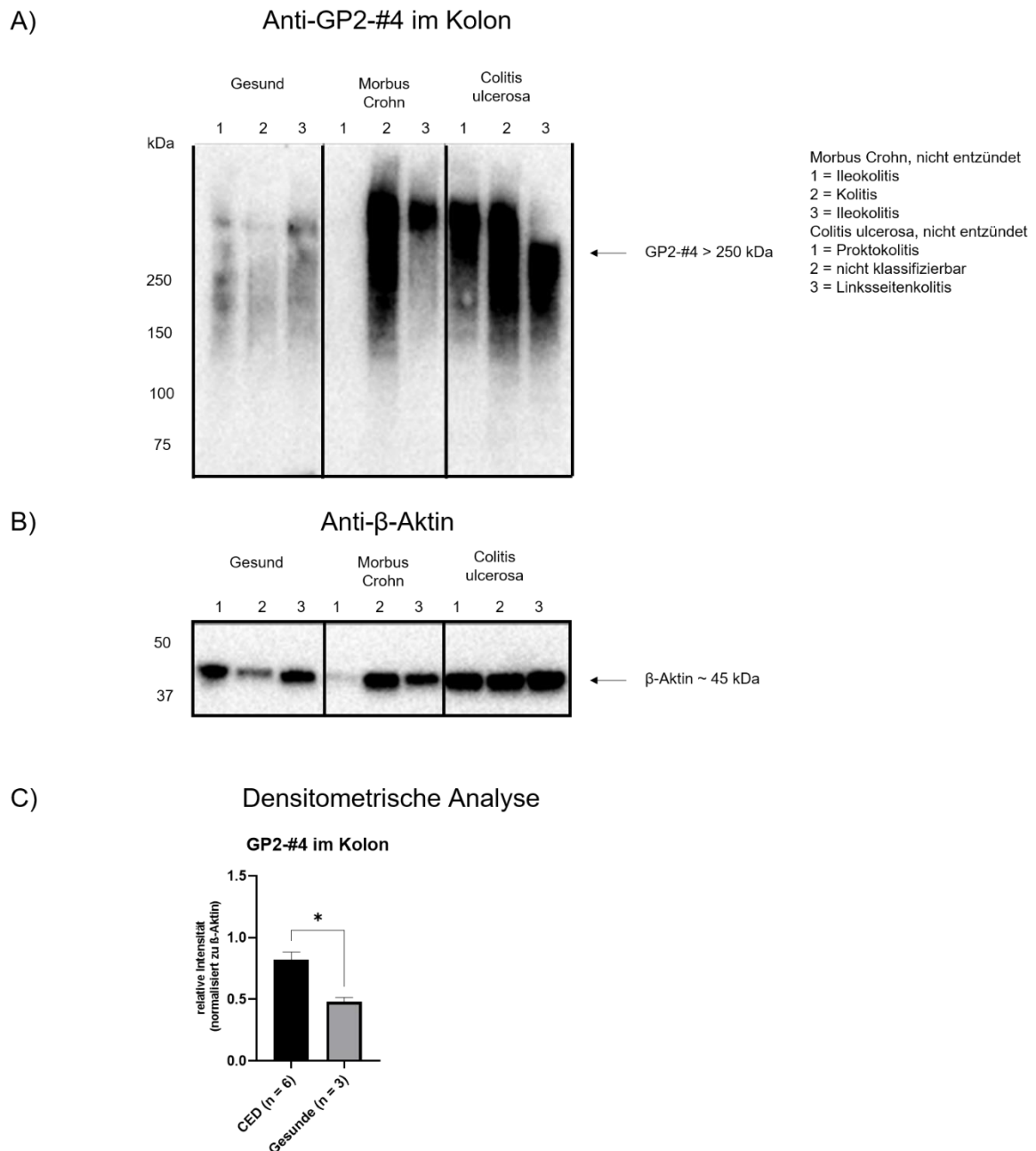
GP2-Banden der durchgeführten Western Blots zu überprüfen, wurde in einem Versuch unserer Arbeitsgruppe humanes GP2 in humanen LentiX-Zellen transient überexprimiert (nicht dargestellt). Die Bande bei ca. 50 kDa im Ileum wurde als unspezifische Antikörperbindung interpretiert, da sich diese auch in nicht GP2 exprimierenden Zellen detektieren ließ.

Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Expression von GP2-#4 im Ileum von MC Patienten verglichen mit Gesunden ( $p = 0,04$ ). Die Proteinexpression variierte je nach vorherrschendem Befallsmuster in den MC Biopsien. Die niedrigste ileale GP2-#4 Expression lag bei einer Ileokolitis vor. Patienten mit Ileitis präsentierten eine hohe Expression einer einzigen GP2-#4 Variante, deren Molekulargewicht bei ~75 kDa lag. Kolitis Patienten exprimierten zwei verschiedene Proteinvarianten: Neben einem ebenfalls ~75 kDa großen Protein, zeigte sich eine zweite Variante mit > 250 kDa (Abbildung 7).



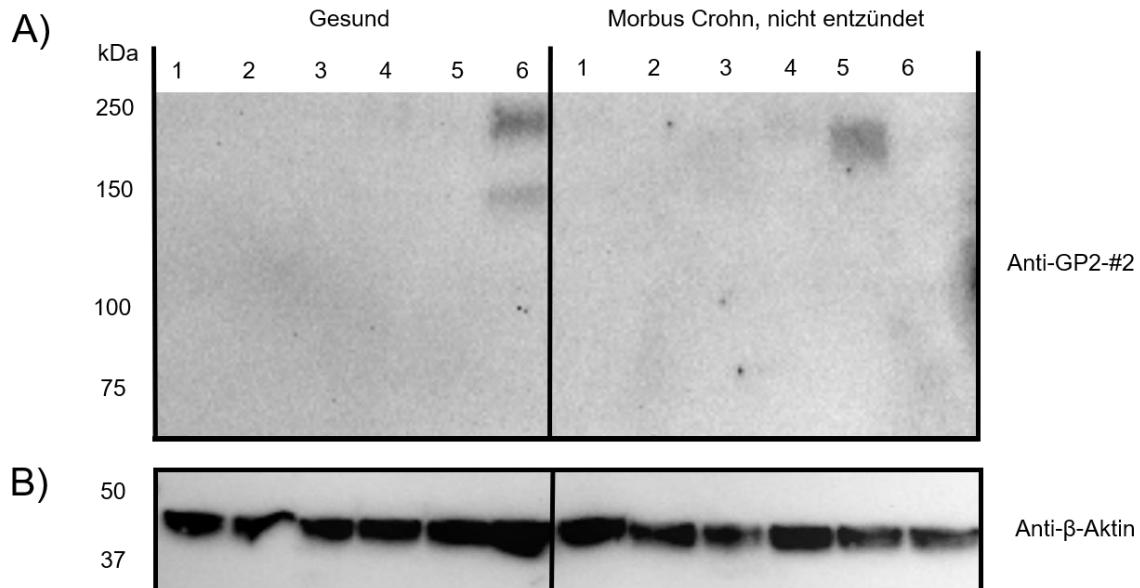
**Abbildung 7. Erhöhte Expression von GP2-#4 im Ileum von Morbus Crohn Patienten.** A) Humane Biopsien von Gesunden und Morbus Crohn (MC) Patienten aus dem Ileum wurden durch Western Blot-Analyse auf GP2-#4 untersucht. B) Western Blot-Analyse von β-Aktin wurde zur Ladungskontrolle genutzt. C) Densitometrische Analyse von GP2-#4 im Ileum von MC Patienten verglichen mit Gesunden. Dargestellt: Median und SEM, Mann-Whitney-U-Test: \* $p \leq 0,05$ .

Die Untersuchung der Kolonproben von CED Patienten zeigte eine deutlich erhöhte Expression von GP2-#4 im Vergleich zu Gesunden ( $p = 0,02$ ). Im Kolon zeigte sich ausschließlich eine große Proteinvariante mit einem Molekulargewicht von  $>250$  kDa. Im Gegensatz zum Ileum lag GP2-#4 im Kolon nicht als kleine Proteinvariante vor (Abbildung 8).



**Abbildung 8. Erhöhte Expression von GP2-#4 im Kolon von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.** A) Humane Biopsien aus dem Kolon wurden durch Western Blot-Analyse auf GP2-#4 untersucht. B) Western Blot-Analyse von  $\beta$ -Aktin wurde zur Ladungskontrolle genutzt. C) Densitometrische Analyse von GP2-#4 im Kolon von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen verglichen mit Gesunden. Dargestellt: Median und SEM, Mann-Whitney-U-Test:  $*p \leq 0,05$ .

Kolon- und Ileumproben von CED Patienten und Gesunden wurden auf die Expression von GP2-#2 untersucht. Im Ileum und im Kolon lag keine Expression des Proteins vor (Abbildung 9).

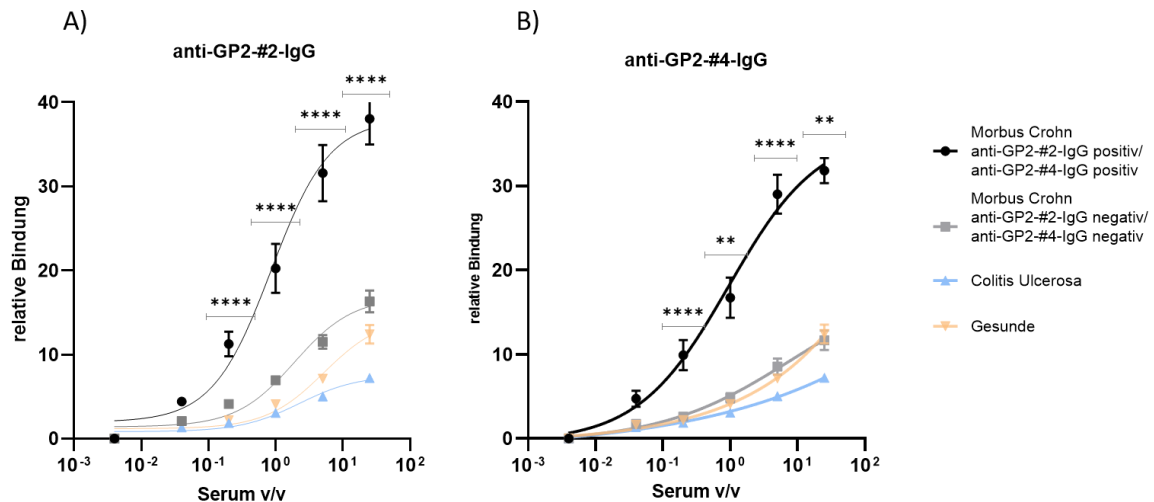


**Abbildung 9. Keine intestinale Expression von GP2-#2.** A) Humane Biopsien von Gesunden und Morbus Crohn Patienten aus dem Ileum wurden durch Western Blot-Analyse auf GP2-#2 untersucht. B) Western Blot-Analyse von  $\beta$ -Aktin wurde zur Ladungskontrolle genutzt. 1 - 6: Gesunde Kontrollen, 7 - 12: Morbus Crohn, nicht entzündet, A) anti-GP2-#2-Antikörper, B) anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper.

### 3.3 Autoantikörper in Morbus Crohn Seren binden hochaffin an humanes rekombinantes Glykoprotein 2 in der ELISA-Analyse

Zur Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen humanem GP2-#2 bzw. GP2-#4 und IgG wurden die Seren titriert und mittels ELISA gemessen. Die Darstellung der so gemessenen relativen Bindung gegen den Logarithmus der verdünnten humanen Serumproben präsentierte eine für Antikörper-Antigen-Reaktionen typische sigmoidale Kurve (Abbildung 10). MC Seren zeigten eine signifikant höhere Bindungsaffinität gegenüber GP2-#2 und GP2-#4. In den Verdünnungen 1:4, 1:20, 1:100 und 1:500 war  $p < 0,0001$ . In der Verdünnung 1:2500 waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar. Zudem konnten hochsignifikant anti-GP2-#4-IgG-Autoantikörper im Serum von MC Patienten nachgewiesen werden. In den Verdünnungen 1:20 und 1:500 betrug  $p < 0,0001$ , in den Verdünnungen 1:4 und 1:100 war  $p < 0,01$ . Ab einer Verdünnung von 1:2500 waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Die Seren von CU Patienten und Gesunden

zeigten in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen für GP2-#2 und GP2-#4 ein nahezu identisches Bindungsverhalten. Es ließen sich keine Veränderung der Bindungsaffinitäten nachweisen.



**Abbildung 10. IgG-Autoantikörper gegen humanes Glykoprotein 2 in humanen Seren.** Die Bindungsaffinitäten von Morbus Crohn (MC) Seren gegenüber hGP2-#2 und -#4 wurden im ELISA untersucht. Dargestellt sind die Titrationskurve der untersuchten Seren und die Analyse von (A) anti-GP2-#2-IgG-Bindungsaffinität bzw. (B) anti-GP2-#4-IgG-Bindungsaffinität. Die Bindungsaffinitäten von MC Seren wurden verglichen mit den Bindungsaffinitäten Gesunder. Dargestellt: Titration als logarithmische Funktion mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts, Kruskal-Wallis-Test: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$

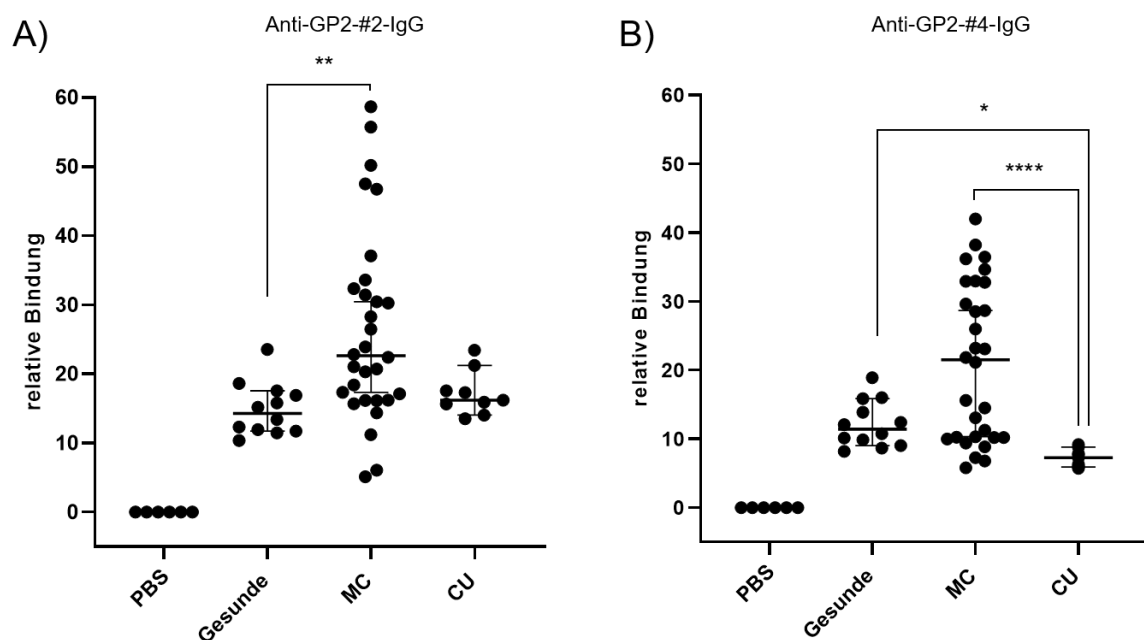
### 3.4 Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben signifikant hohe Autoantikörperlevel gegen beide Isoformen von Glykoprotein 2

Bisherige Forschungsergebnisse belegen, dass ungefähr ein Drittel aller MC Patienten PAB positiv sind. Bei Gesunden und CU Patienten ist die PAB Serologie negativ. Zur Vertiefung der aktuellen Forschung wurde im folgenden Versuch eine isoformspezifische GP2-Autoantikörper-Analyse durchgeführt. Dafür wurden Seren von CED Patienten (MC  $n = 30$ , CU  $n = 9$ ) und Gesunden auf IgA und IgG Antikörpersubtyp und Autoantigen GP2-#2 und GP2-#4 untersucht.

IgG-Autoantikörper gegen GP2-#2 wurden bei Gesunden und CED Erkrankten detektiert (Abbildung 11A). CU Patienten (Mittelwert 17,2) verfügten über ein höheres Antikörperlevel als Gesunde (Mittelwert 14,90), der Unterschied war nicht

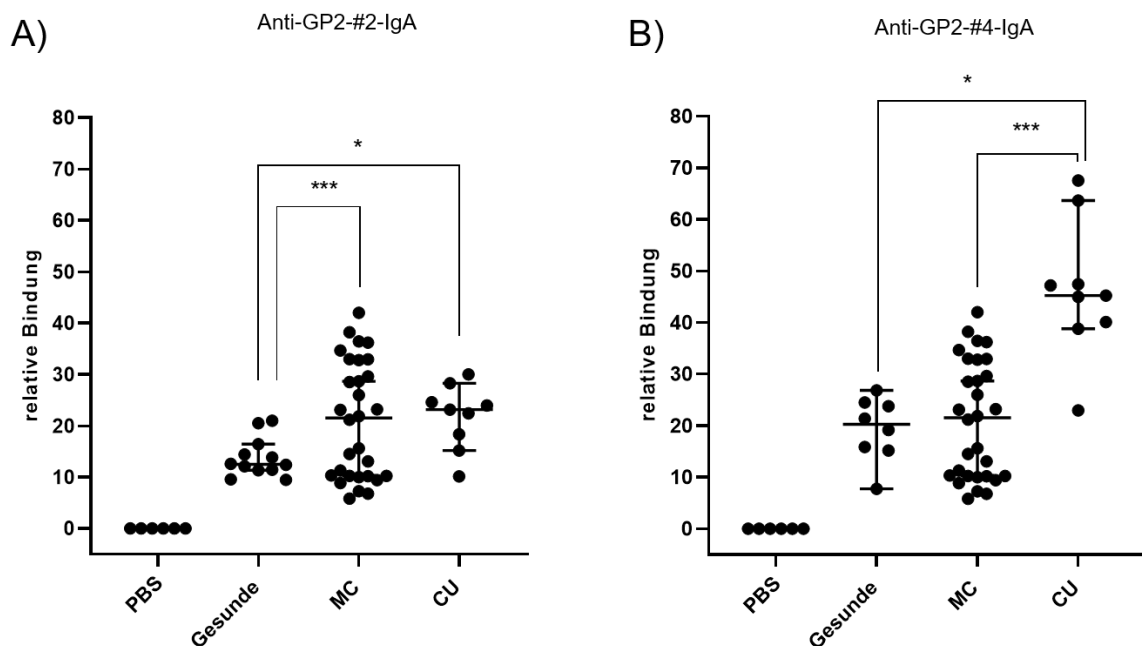
signifikant. MC Seren differenzierten sich von Gesunden durch ein signifikant erhöhtes Autoantikörperlevel (Mittelwert 26,45 vs. 14,9,  $p = 0,002$ ). Insgesamt zeigten 47 % ( $n = 14$ ) der MC Seren anti-GP2-#2-IgG-Autoantikörperlevel über der 95 % Perzentile des Medians aller Gesunden ( $> 23,53$ ). Aus der Gruppe der CU Seren lag kein Autoantikörperlevel über diesem Wert.

IgG-Autoantikörper gegen GP2-#4 lagen bei Gesunden und CED Erkrankten vor (Abbildung 11B). Anti-GP2-#4-IgG-Autoantikörper wurden am niedrigsten in der Gruppe der CU Patienten gemessen (Mittelwert 7,2). Das Autoantikörperlevel von CU Patienten war signifikant niedriger als bei MC Patienten (Mittelwert 7,2 vs. 21,07,  $p < 0,0001$ ) und als bei Gesunden (Mittelwert 7,2 vs. 12,68,  $p = 0,02$ ). Zwischen der Gruppe der MC Patienten und Kontrollen bestand kein signifikanter Unterschied. Es zeigten jedoch 47 % ( $n = 14$ ) der MC Seren Autoantikörperlevel über der 95 % Perzentile des Medians aller Gesunden ( $> 22,89$ ). Die Autoantikörperlevel der CU Seren lagen alle unterhalb dieses Wertes.



**Abbildung 11. IgG-Autoantikörperlevel gegen humanes Glykoprotein #2 und humanes Glykoprotein #4 im Serum von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.** IgG-Autoantikörper gegen rekombinantes humanes GP2-#2 (A) und GP2-#4 (B) wurden mittels ELISA im Serum von Gesunden und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gemessen. A) Morbus Crohn (MC) Seren zeigen signifikant höhere Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 als Gesunde. B) Colitis ulcerosa (CU) Seren zeigen signifikant niedrigere Autoantikörperlevel gegen GP2-#4 als Gesunde und als MC Seren. Die Seren wurden 1:4 in PBS verdünnt und in Relation zur PBS-Kontrollmessung gesetzt. Dargestellt: Median mit 95 % Konfidenzintervall, Kruskal-Wallis-Test: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ . Gesunde  $n = 12$ , MC  $n = 30$ , CU  $n = 9$ .

Es waren IgA-Autoantikörper gegen GP2-#2 und gegen GP2-#4 bei Gesunden und zudem, in signifikant höheren Konzentrationen, bei CED Patienten nachweisbar. Die IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 waren bei CED Seren signifikant höher als bei Seren von Gesunden. CU Seren differenzierten sich durch signifikant höhere anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel von Gesunden (Mittelwert 21,79 vs. 13,76,  $p = 0,01$ ). MC Seren zeigten ebenso signifikant erhöhte Autoantikörperlevel im Vergleich mit Seren von Gesunden (Mittelwert 24,64 vs. 13,76,  $p = 0,0001$ ). Autoantikörperlevel über der 95 % Perzentile des Medians aller Gesunden ( $> 20,99$ ) waren bei 60 % der MC Seren ( $n = 18$ ) und 66 % der CU Seren ( $n = 6$ ) nachweisbar. IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#4 waren bei CU Seren signifikant höher im Vergleich zu Seren von Gesunden (Mittelwert 46,44 vs. 19,30,  $p = 0,01$ ) und MC Seren (Mittelwert 46,44 vs. 22,38,  $p = 0,0005$ ). Autoantikörperlevel über der 95 % Perzentile des Medians aller Gesunden ( $> 26,83$ ) waren bei 23 % der MC Seren ( $n = 7$ ) und 88 % der CU Seren ( $n = 8$ ) nachweisbar.



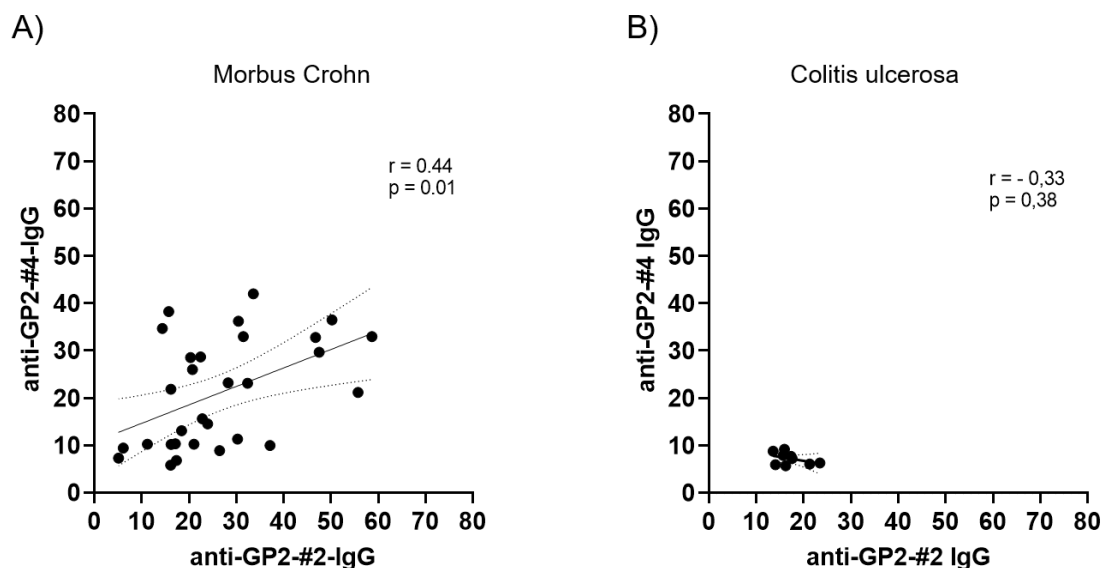
**Abbildung 12. Erhöhte IgA-Autoantikörperlevel in Seren von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.** IgA-Autoantikörper gegen rekombinantes humanes GP2-#2 (A) und humanes GP2-#4 (B) wurden mittels ELISA-Analyse detektiert. A) Anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind im Vergleich zu Gesunden ( $n = 12$ ) signifikant erhöht. B) Anti-GP2-#4-IgA-Autoantikörperlevel sind in CU Seren signifikant höher als in Seren von MC Patienten und Gesunden ( $n = 8$ ). Die Messergebnisse wurden in Relation zur PBS-Kontrollmessungen gesetzt. Dargestellt: Median mit 95 % Konfidenzintervall, Kruskal-Wallis-Test: \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , MC  $n = 30$ , CU  $n = 9$ .

Die Autoantikörper in den Seren wurden auf einen Zusammenhang zwischen den Bindungen an die zwei Isoformen geprüft.

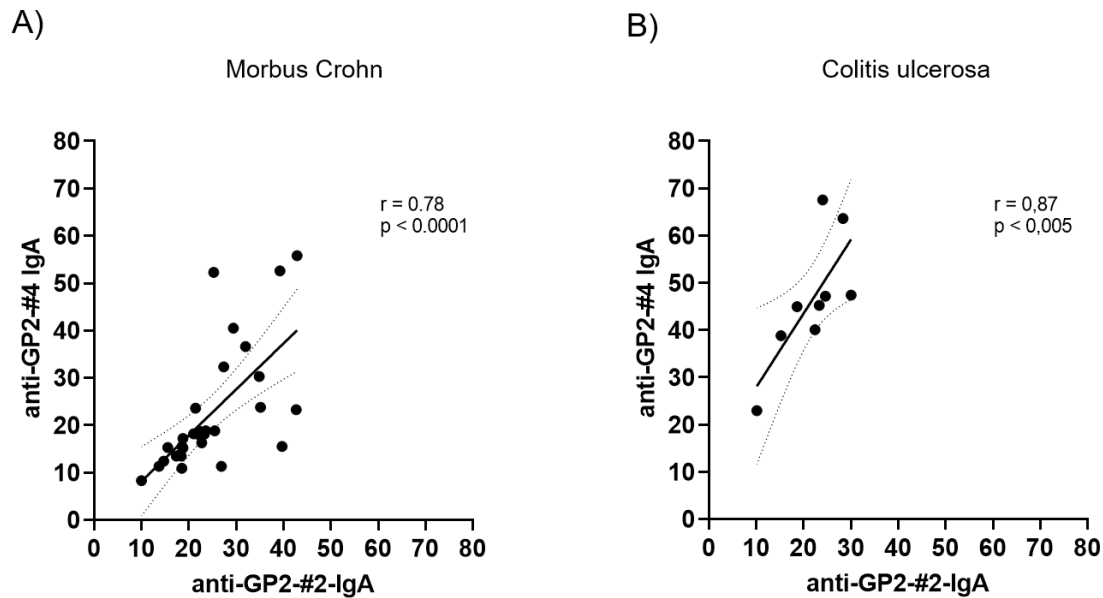
Es bestand bei MC Seren ein signifikanter Zusammenhang zwischen der IgG-Autoantikörperbindung an GP2-#2 und GP2-#4 ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,01$ ).

IgG-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 und GP2-#4 in CU Seren wurden ebenso auf einen Zusammenhang geprüft. Es bestand keine Korrelation ( $r = -0,33$ ,  $p = 0,38$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 und GP2-#4 der MC Seren korrelierten ebenfalls miteinander. Das Ergebnis war hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) und zeigte eine starke Effektstärke ( $r = 0,78$ ). Ein signifikanter Zusammenhang mit starker Effektstärke wurde zwischen anti-GP2-#2-IgA und anti-GP2-#4-IgA in Seren von CU Patienten ( $n = 9$ ) nachgewiesen ( $r = 0,87$ ,  $p < 0,005$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 veranschaulicht.



**Abbildung 13. IgG-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 und gegen GP2-#4 korrelieren miteinander.** Autoantikörperlevel in Seren von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wurden mittels ELISA-Analyse bestimmt und auf eine Korrelation geprüft. A) IgG-Autoantikörperlevel in Morbus Crohn Seren ( $n = 30$ ) korrelieren signifikant miteinander ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,01$ ). B) IgG-Autoantikörperlevel in Colitis Ulcerosa Seren ( $n = 9$ ) korrelieren nicht miteinander ( $r = -0,33$ ,  $p = 0,38$ ). Dargestellt: lineare Regression und 95 % Konfidenzintervall, Korrelationsanalyse nach Spearman.



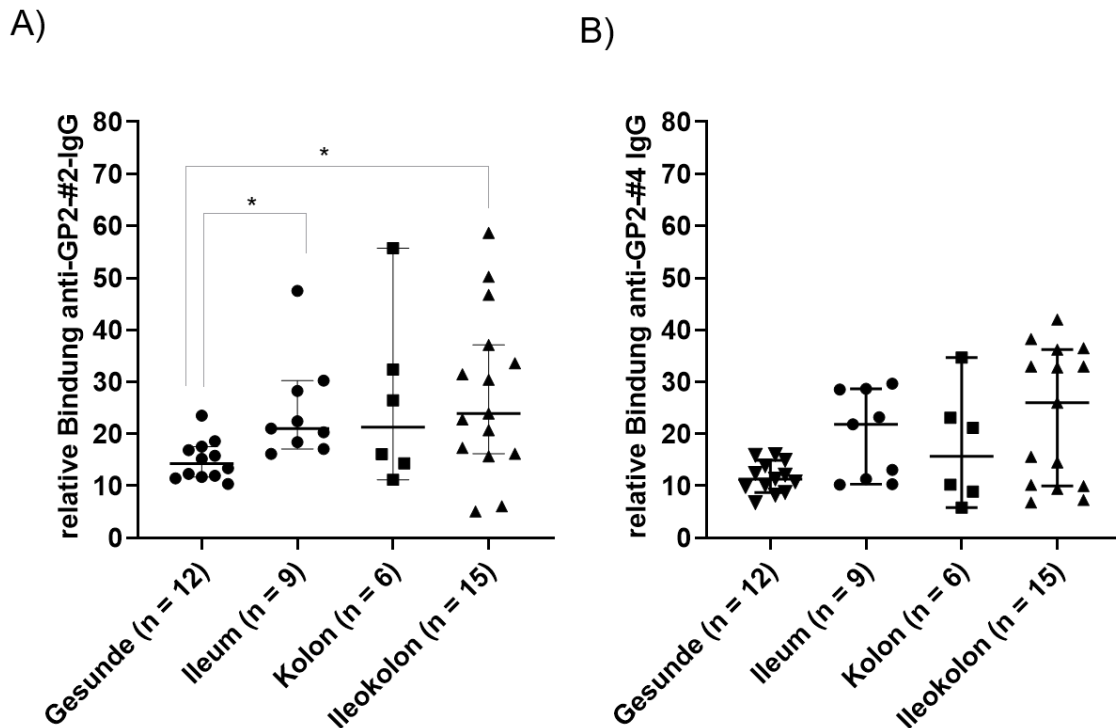
**Abbildung 14. IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2 Isoformen korrelieren in Seren von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.** Anti-GP2-#2-IgA- und anti-GP2-#4-IgA-Autoantikörperlevel wurden mittels ELISA-Analyse bestimmt. Autoantikörperlevel in (A) Morbus Crohn Seren ( $n = 30$ ) und (B) Colitis Ulcerosa Seren ( $n = 9$ ) korrelieren hochsignifikant und stark miteinander ( $r = 0,78$ ,  $p < 0,0001$  und  $r = 0,87$ ,  $p < 0,005$ ). Dargestellt: lineare Regression und 95 % Konfidenzintervall, Korrelationsanalyse nach Spearman.

### 3.5 Analyse von Autoantikörperlevel und Phänotypen

Die bisherigen Erkenntnisse in Bezug auf Autoantikörper und phänotypische Charakteristika in CED Kollektiven sind widersprüchlich. Zur Überprüfung bisheriger Hypothesen und zur differenzierten Betrachtung möglicher isoformspezifischer Unterschiede wurde eine phänotypische Assoziation zu anti-GP2-Autoantikörpern in Seren von MC Patienten geprüft. Fehlende klinische Werte führten zum Ausschluss des Falles aus der entsprechenden Analyse.

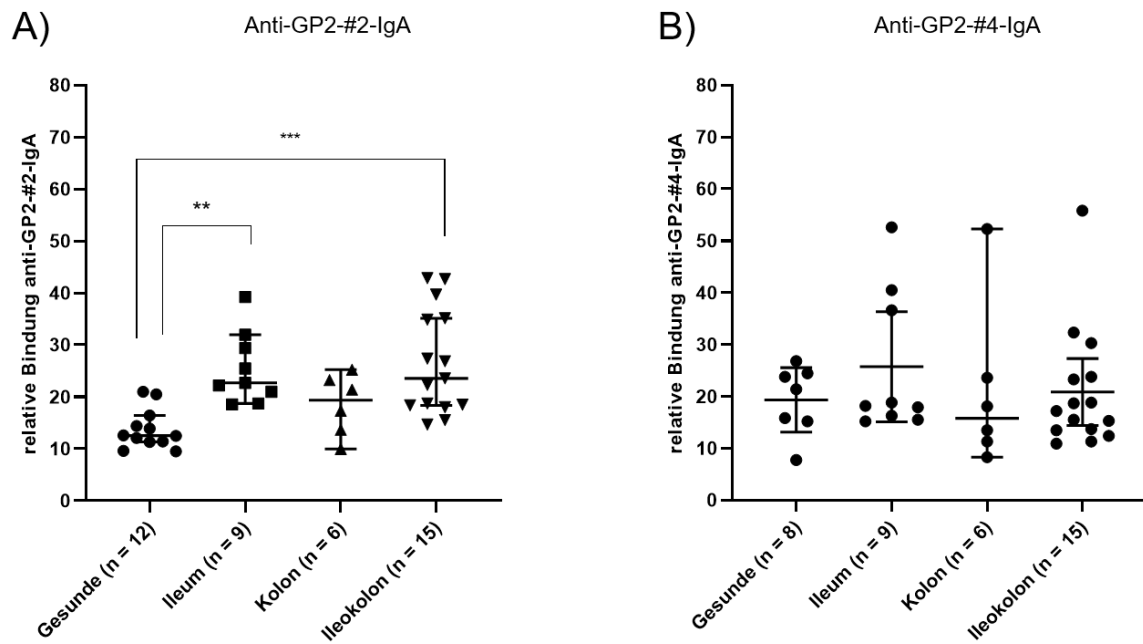
Hohe Level von anti-GP2-#2-IgG wurden mit einem Befall von Ileum und Ileokolon assoziiert ( $p = 0,04$  und  $p = 0,01$ ). Die mittels ELISA bestimmten Anti-GP2-#2-IgG-Level betragen im Mittel bei Gesunden 14,9, bei CED mit Befall von Ileum 24,6, von Kolon 26 und von Ileokolon 27,7. Patienten mit Befall von Ileum zeigten ein mittleres anti-GP2-#4-IgG-Autoantikörperlevel von 19,7. Bei Kolonbefall lagen die Autoantikörperlevel durchschnittlich bei 17,3. Es zeigte sich kein signifikant erhöhter Wert im Vergleich zum durchschnittlichen Wert von 11,6 bei Gesunden. Bei Krankheitslokalisation im Ileokolon lag mit 23,4 das höchste anti-GP2-#4-IgG-

Autoantikörperlevel vor. Die Beobachtung lag unter dem Signifikanzniveau ( $p = 0,08$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 abgebildet.



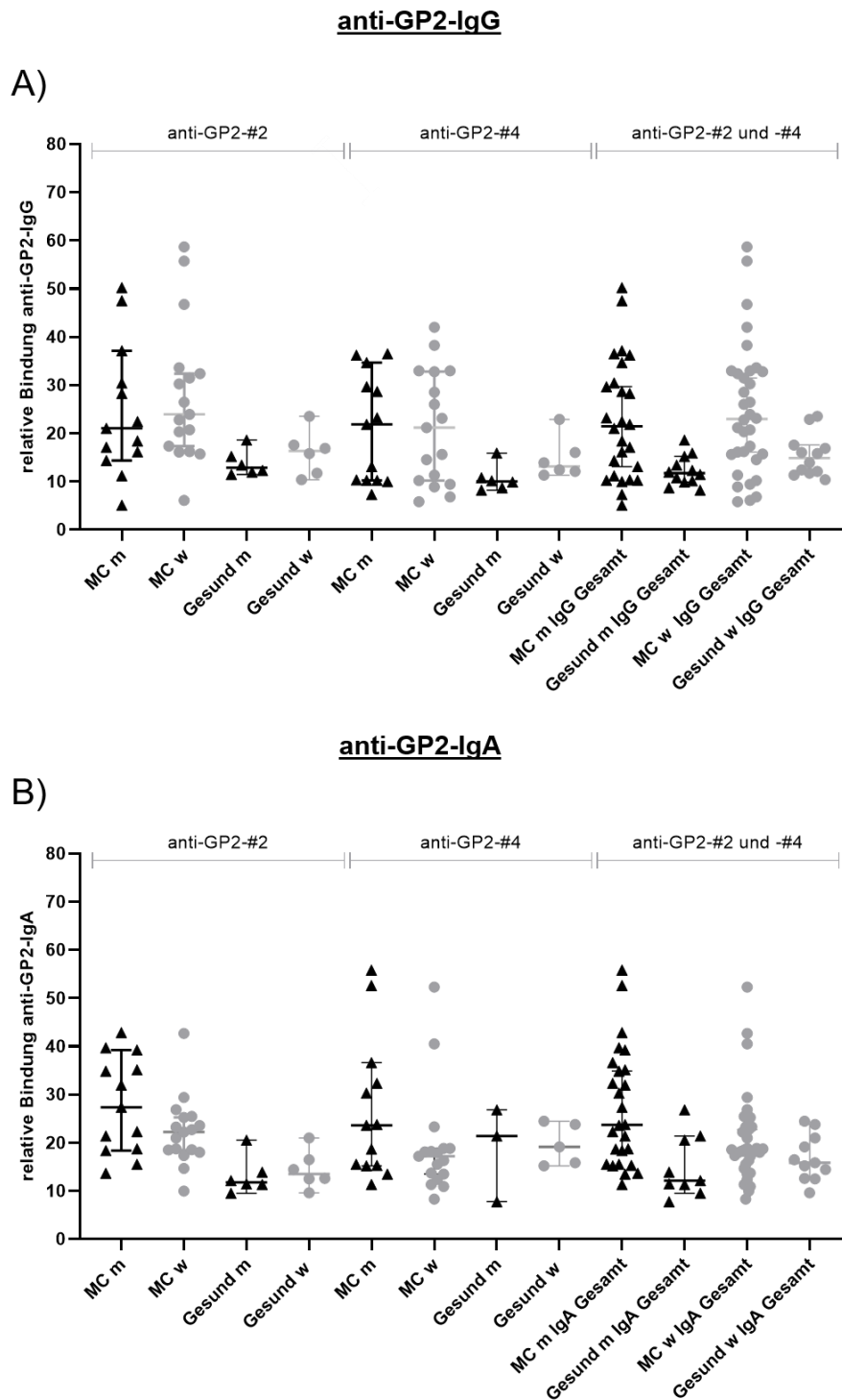
**Abbildung 15. Krankheitsaktivität im Ileum und Ileokolon ist assoziiert mit hohen IgG-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2.** Anti-GP2-#2 und anti-GP2-#4-IgG-Level wurden mittels ELISA gemessen und nach Krankheitslokalisation differenziert. A) Anti-GP2-#2-IgG-Level sind signifikant erhöht, wenn Ileum ( $p = 0,04$ ) oder Ileokolon ( $p = 0,01$ ) betroffen sind. B) Anti-GP2-#4-IgG-Level sind am höchsten bei Befall von Ileokolon, Dargestellt; Median und 95 % Konfidenzintervall. Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zu Gesunden: \* $p \leq 0,05$ .

Bei Beteiligung des Ileums und Ileokolons zeigten sich neben hohen IgG-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 ebenfalls hochsignifikant erhöhte anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel (Abbildung 16). Die durchschnittlichen Autoantikörperlevel betragen im Ileum 25,47, im Kolon 18,47 und im Ileokolon 26,6. Proben von Patienten mit Krankheitslokalisation im Ileum ( $p = 0,0001$ ) oder Ileokolon ( $p = 0,0003$ ) ließen sich anhand der anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörper signifikant von Gesunden unterscheiden. Die Autoantikörperlevel Gesunder lagen durchschnittlich bei 13,77. IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#4 zeigten keine lokalisationspezifischen Unterschiede.



**Abbildung 16. Hohe Anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel sind assoziiert mit Krankheitslokalisierung im Ileum und Ileokolon.** Anti-GP2-#2- und anti-GP2-#4-IgA-Level wurden mittels ELISA-Analyse gemessen und nach Krankheitslokalisierung differenziert. A) Anti-GP2-#2-IgA Level sind signifikant erhöht, wenn Ileum ( $p = 0,0011$ ) oder Ileokolon ( $p = 0,0003$ ) betroffen ist. B) Anti-GP2-#4-IgA-Level zeigen keine Assoziation zu einer bestimmten Lokalisation. Dargestellt; Median und 95 % Konfidenzintervall. Kruskal-Wallis-Test im Vergleich zu Gesunden: \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ .

GP2-Autoantikörperlevel wurden aufgegliedert nach Autoantikörperisotyp (IgG, IgA oder Ig Gesamt) und Antigenisoform (GP2-#2 oder GP2-#4), um dann eine geschlechtsspezifische Analyse durchzuführen (Abbildung 17). Abbildung 17A zeigt die anti-GP2-#2- und anti-GP2-#4-IgG-Autoantikörperlevel der männlichen und der weiblichen MC Patienten sowie der männlichen und weiblichen Kontrollgruppe. Außerdem sind die anti-GP2-IgG-Gesamt-Autoantikörperlevel der weiblichen und männlichen MC Patienten und der Kontrollgruppe dargestellt. Es bestand kein MC-spezifischer Unterschied zwischen den Geschlechtern. Abbildung 17B stellt die anti-GP2-#2-, anti-GP2-#4-IgA- und anti-GP2-IgA-Gesamt-Autoantikörperlevel der MC Patienten und der Gesunden entsprechend des Geschlechtes dar. Es bestand kein MC-spezifischer Unterschied zwischen den Geschlechtern.

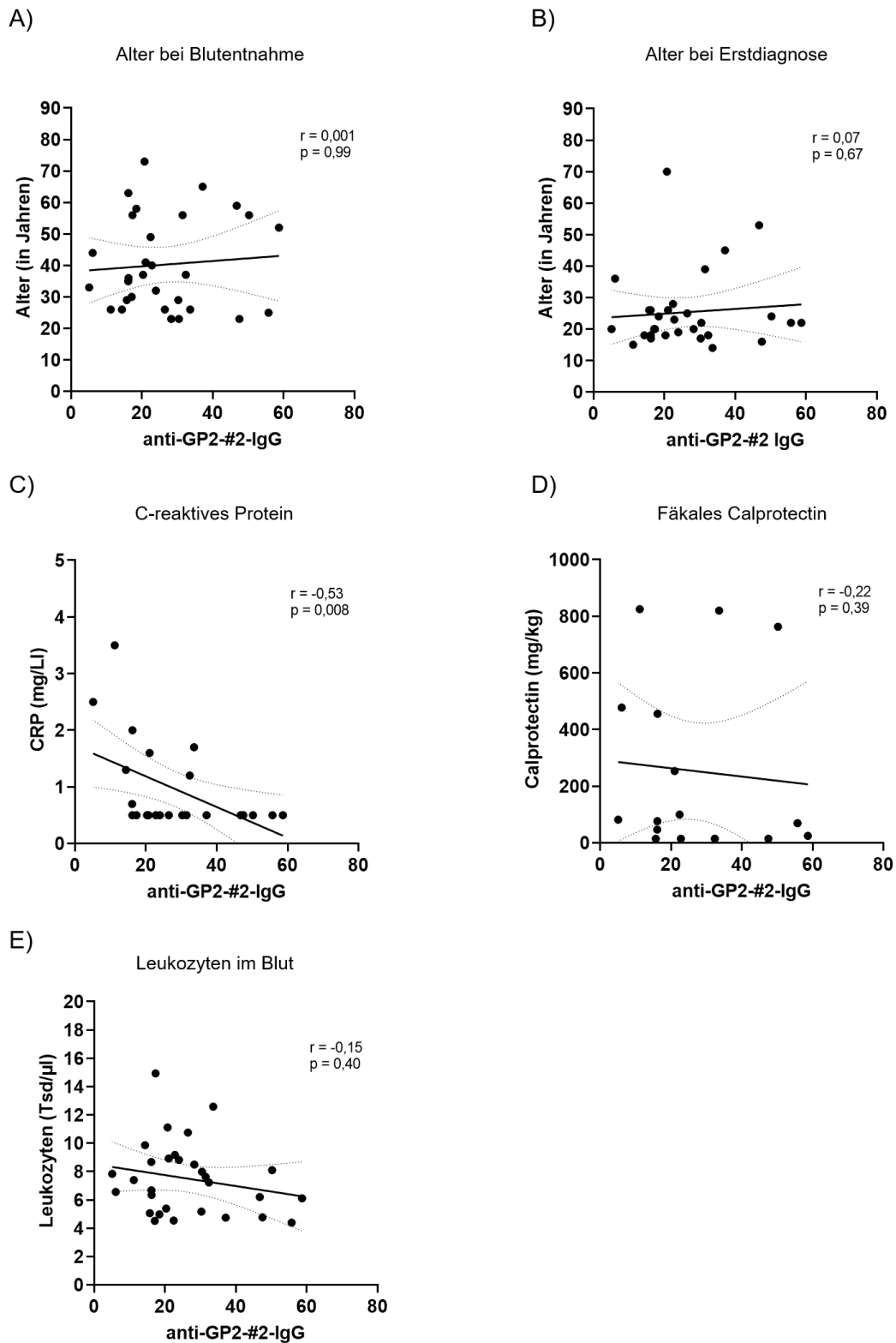


**Abbildung 17. Geschlechterspezifische Autoantikörperlevel.** Die Autoantikörperlevel wurden nach Autoantikörperisotyp IgG (A) und IgA (B) sowie Antigenisoform GP2-#2 und GP2-#4 geschlechtsspezifisch nach männlich (m) und weiblich (w) im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht. Es existieren keine Morbus Crohn (MC) spezifischen Unterschiede. Dargestellt; Median und 95 % Konfidenzintervall. Kruskal-Wallis-Test im Vergleich von MC und Gesunde, männlich zu weiblich. A) MC m: n = 13, MC w: n = 17, Gesund m: n = 6, Gesund w: n = 6, MC m IgG Gesamt: n = 26, MC w IgG Gesamt: n = 34, Gesund m IgG Gesamt: n = 12, Gesund w IgG Gesamt: n = 12, B) MC m: n = 13, MC w: n = 17, Gesund m: -#2 n = 6, Gesund w -#2: n = 6, Gesund m -#4 n = 3, Gesund w -#4 n = 5, MC m IgA Gesamt: n = 26, MC w IgA Gesamt: n = 34, Gesund m IgA Gesamt: n = 9, Gesund w IgA Gesamt: n = 11.

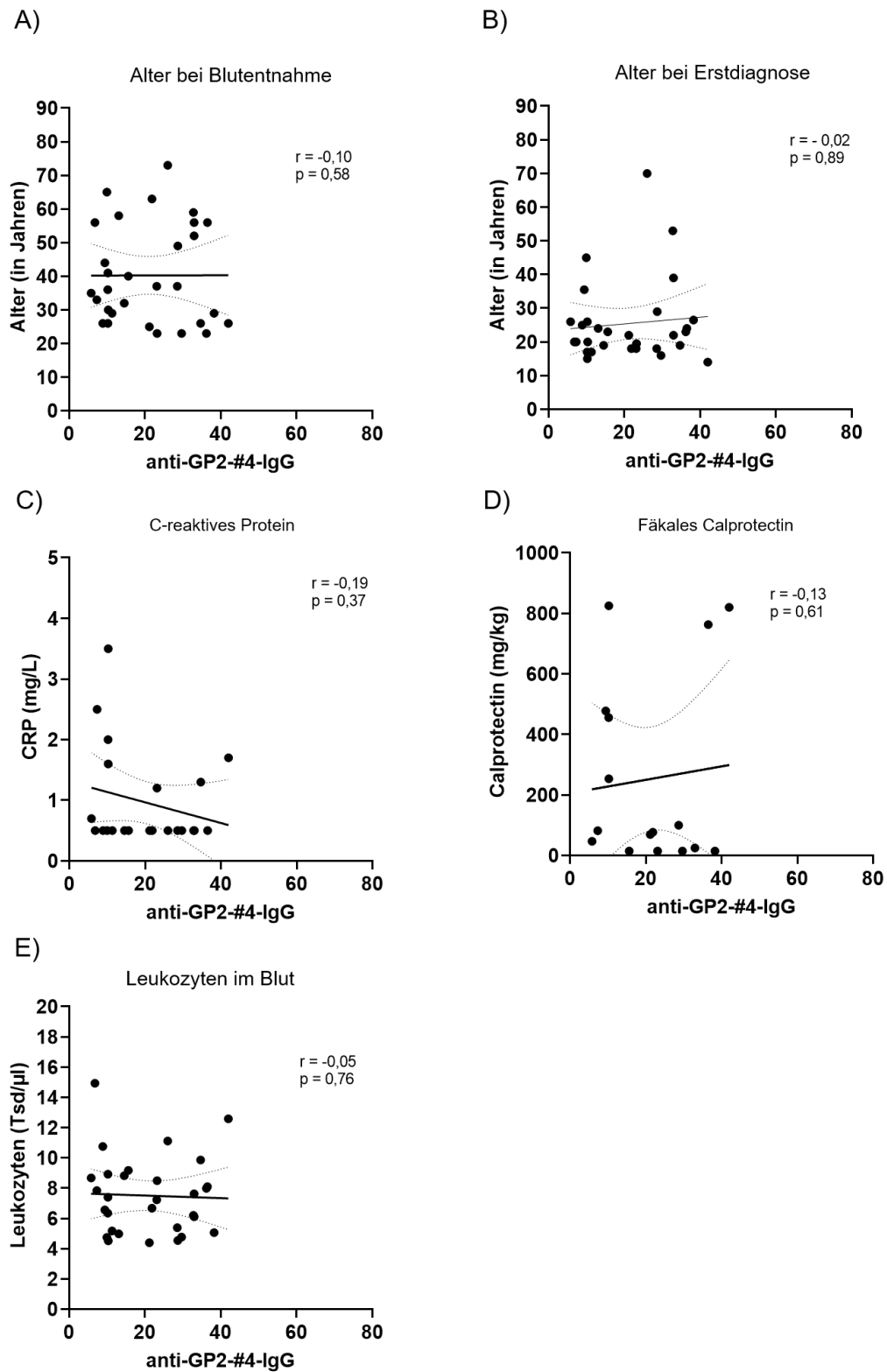
Ein hohes anti-GP2-#2-IgG-Autoantikörperlevel korrelierte mit dem Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) im Blut. Die signifikante Korrelation war negativ mit starkem Effekt ( $r = -0,53$ ,  $p < 0,01$ ). Ein Zusammenhang zwischen anti-GP2-#2-IgG-Autoantikörper und den Entzündungsparametern Leukozyten im Blut und Calprotectin bestand nicht.

Das Alter des Patienten bei Blutentnahme und bei Erstdiagnose stand in keinem Zusammenhang zum anti-GP2-#2-IgG-Autoantikörperlevel (Abbildung 18).

Die Merkmale wurden ebenso auf einen Zusammenhang mit den gemessenen anti-GP2-#4-IgG-Autoantikörperlevel analysiert. Bei keinem der Merkmale bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang (Abbildung 19).

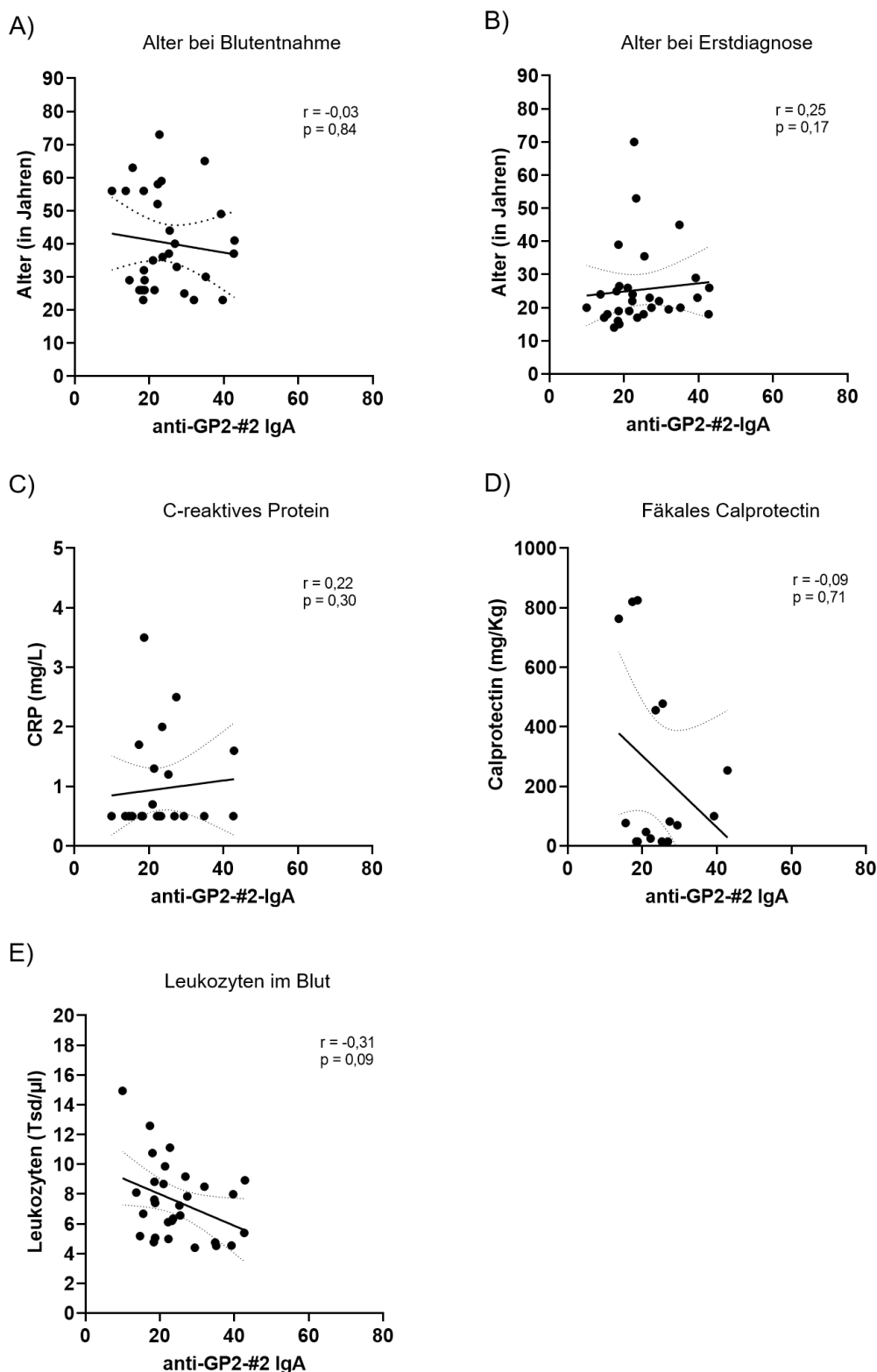


**Abbildung 18. Anti-GP2-#2-IgG-Autoantikörperlevel korrelieren signifikant mit dem CRP-Wert im Patientenserum.** Leukozyten im Blut, Calprotectin, Alter bei Blutentnahme und Alter bei Erstdiagnose stehen in keinem nachweisbaren Zusammenhang zur Höhe des Autoantikörperlevels. C) CRP und anti-GP2-#2-IgG-Autoantikörperlevel zeigen eine negative Korrelation ( $r = -0,53$ ,  $p = 0,008$ ). Dargestellt: lineare Regression und 95 % Konfidenzintervall. Korrelationsanalyse nach Spearman. A)  $n = 30$ , B)  $n = 30$ , C)  $n = 23$ , D)  $n = 16$ , E)  $n = 30$ .

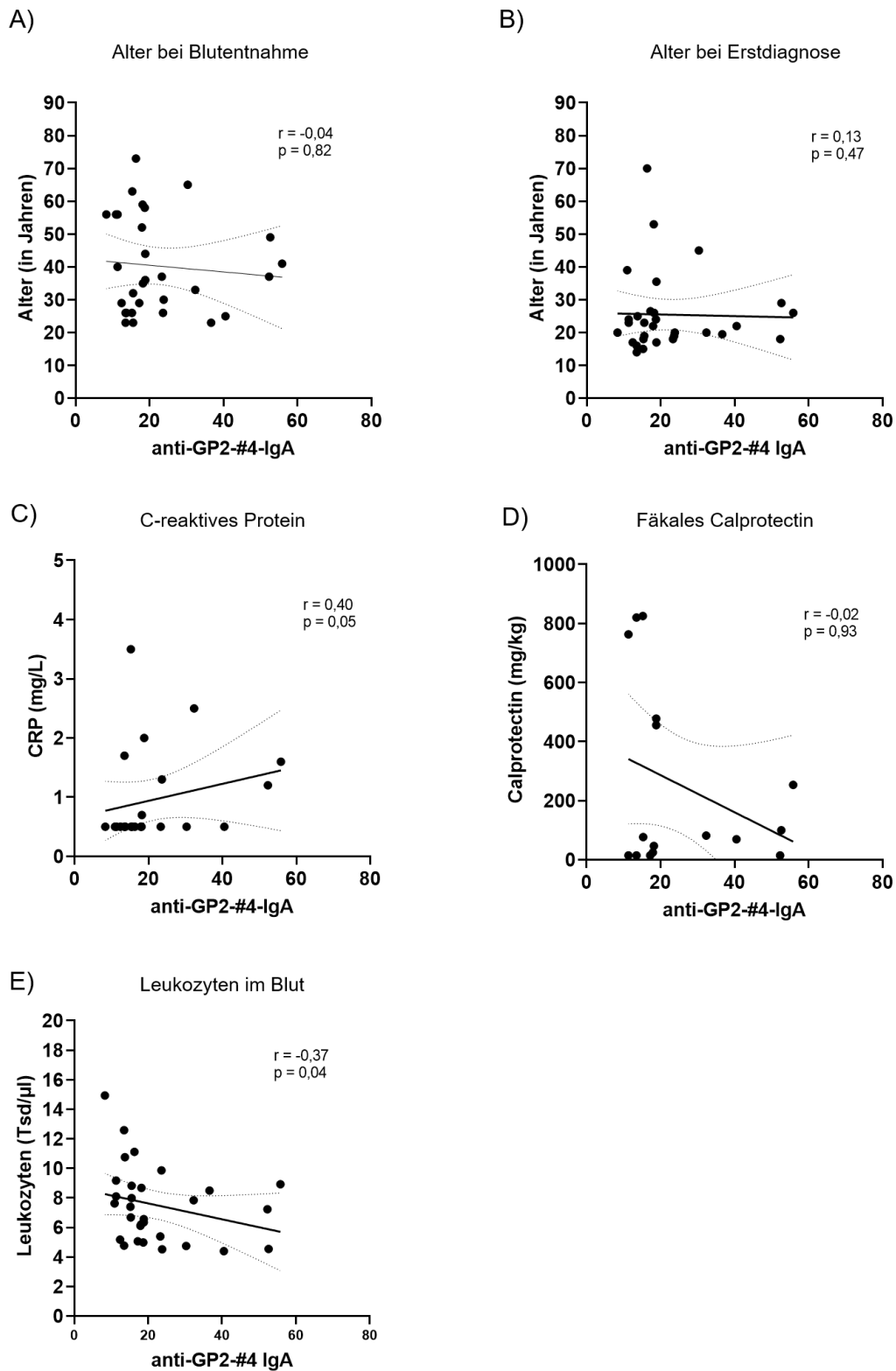


**Abbildung 19. Anti-GP2-#4-IgG-Autoantikörperlevel stehen in keinem Zusammenhang zu den untersuchten Merkmalen.** Untersucht wurden Leukozyten im Blut, Calprotectin, Alter bei Blutentnahme, CRP im Blut und Alter bei Erstdiagnose. Die analysierten Parameter korrelieren nicht miteinander. Dargestellt: lineare Regression und 95 % Konfidenzintervall. Korrelationsanalyse nach Spearman. A)  $n = 30$ , B)  $n = 30$ , C)  $n = 23$ , D)  $n = 16$ , E)  $n = 30$ .

In der Analyse der IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 (Abbildung 20) bzw. GP2-#4 (Abbildung 21) und phänotypischen Merkmalen wurden weitere Zusammenhänge festgestellt. Eine negative Korrelation bestand zwischen der Anzahl der Leukozyten im Blut und dem IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#4 ( $r = -0,37$ ,  $p = 0,04$ ). Die Höhe des CRP Blutwertes stand in einem positiven Zusammenhang zum anti-GP2-#4-IgA-Autoantikörperlevel ( $r = 0,40$ ,  $p = 0,05$ ). Für die anderen Eigenschaften konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

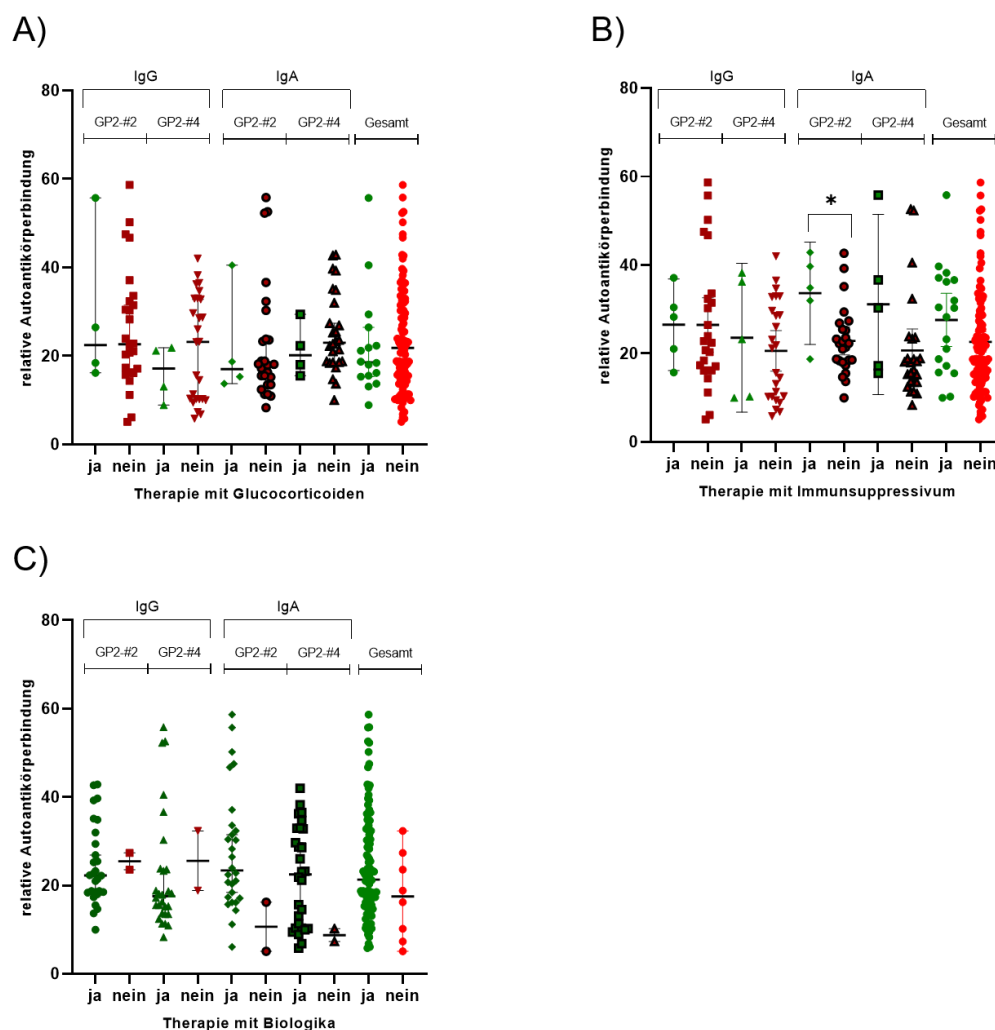


**Abbildung 20. Zusammenhang zwischen Anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel und phänotypischen Charakteristika von MC Patienten.** Die Parameter Leukozyten im Blut, CRP, Calprotectin, Alter bei Blutentnahme und bei Erstdiagnose korrelieren nicht mit der Höhe des Autoantikörperlevels im Serum von Morbus Crohn Patienten. Dargestellt: lineare Regression und 95 % Konfidenzintervall. Korrelationsanalyse nach Spearman. A)  $n = 30$ , B)  $n = 30$ , C)  $n = 23$ , D)  $n = 16$ , E)  $n = 30$ .



**Abbildung 21. Leukozyten und CRP im Blut korrelieren mit anti-GP2-#4-IgA-Autoantikörperlevel.** Die Parameter Calprotectin, Alter bei Blutentnahme und bei Erstdiagnose korrelieren nicht mit der Höhe des Autoantikörperlevels. C) CRP im Blut korreliert positiv mit anti-GP2-#4-IgA ( $r = 0,40$ ,  $p = 0,05$ ). E) Die Anzahl der Leukozyten und anti-GP2-#4-IgA zeigen eine negative Korrelation ( $r = -0,37$ ,  $p = 0,04$ ). Dargestellt: lineare Regression und 95 % Konfidenzintervall. Korrelationsanalyse nach Spearman. A)  $n = 30$ , B)  $n = 30$ , C)  $n = 23$ , D)  $n = 16$ , E)  $n = 30$ .

Die MC Patienten ( $n = 30$ ) wurden mit Medikamenten aus der Gruppe der Glukokortikoide (Prednisolon), Immunsuppressiva (Azathioprin) und Biologika (TNF- $\alpha$ -Blocker) behandelt. Unter Prednisolontherapie ( $n = 4$ ) lagen die Autoantikörperlevel durchschnittlich niedriger als bei nicht therapierten Patienten (Mittelwert 22,2 vs. 23,9). Patienten die Azathioprin erhielten ( $n = 5$ ) hatten höhere Autoantikörperlevel als nicht therapierte Patienten (Mittelwert 27,6 vs. 22,6). Wenn TNF- $\alpha$ -Blocker in der Medikation vorlagen ( $n = 28$ ), war das Autoantikörperlevel höher als bei nicht therapierten Patienten (Mittelwert 24,07 vs. 17,6). IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 zeigten bei MC Patienten, die das Immunsuppressivum Azathioprin erhielten, signifikant höhere Werte als bei nicht therapierten Patienten ( $p = 0,02$ ). Zwischen den pharmakologisch therapierten und nicht therapierten MC Erkrankten gab es ansonsten keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der IgG- oder IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 und GP2-#4 (Abbildung 22).

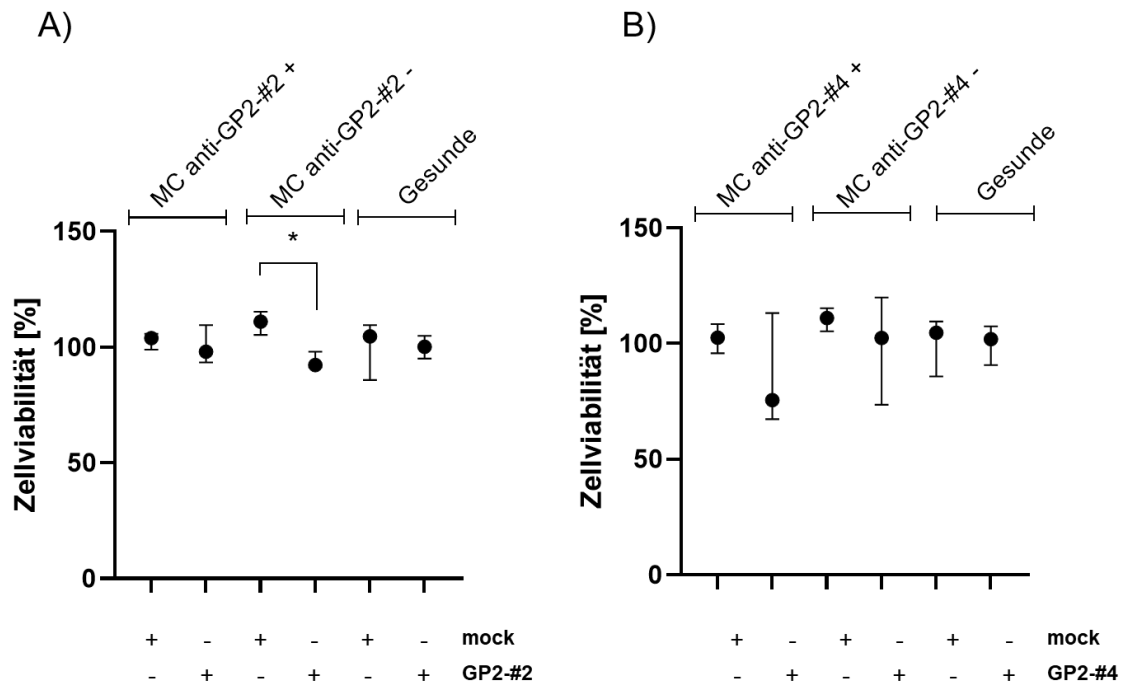


**Abbildung 22. Korrelation der medikamentösen Therapie und dem Autoantikörperlevel im Serum von MC Patienten.** A) Therapie mit dem Glukokortikoid Prednisolon ( $n = 4$ ) und korreliert nicht mit dem

Autoantikörperlevel, B) Therapie mit dem Immunsuppressivum Azathioprin (n = 5) korreliert signifikant mit dem anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel ( $p = 0,02$ ). C) Therapie mit dem Biologika TNF- $\alpha$ -Blocker (n = 28) korreliert nicht mit dem Autoantikörperlevel. Dargestellt: Mittelwert und 95 % Konfidenzintervall, Mann-Whitney-Test im Vergleich Therapierte und Nicht-Therapierte: \* $p \leq 0,05$ .

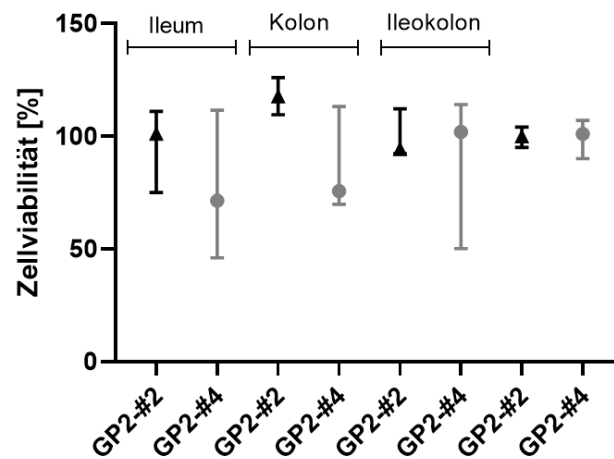
### 3.6 Der Einfluss von Morbus Crohn Seren auf GP2 exprimierende Zellen

Immunglobuline können über den klassischen Weg der Komplementkaskade eine Zellyse bewirken. Nachdem im vorherigen Versuch isoformspezifische anti-GP2 Autoantikörper in Seren von CED Patienten nachgewiesen wurden, sollte im Folgeversuch eine immunologische Relevanz dieser untersucht werden. Um dafür *in vitro* die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) von Patientenseren an humanen GP2-#2 und GP2-#4 exprimierenden Zelllinien zu überprüfen, wurde ein MTS-Test durchgeführt. Dafür wurden mit GP2-#2 und GP2-#4 transfizierte Zellen sowie Zellen mit Kontrollvektoren (mock) mit den jeweiligen Seren inkubiert. Es wurde anschließend der Einfluss der Seren auf GP2 exprimierenden Zellen mit dem Einfluss auf mock-Zellen verglichen. Abbildung 23A zeigt, dass Seren von anti-GP2-#2-positiven MC Patienten zu keinem signifikanten Einfluss auf die Viabilität GP2-#2 exprimierender Zellen im Vergleich zu den mock-Zellen führte (Mittelwert 102 vs. 99). Der Einfluss der MC Kontrollgruppe zeigte einen signifikanten Effekt auf transfizierte Zellen (Mittelwert 110 vs. 94,  $p = 0,02$ ). Gesunde Kontrollen zeigten keinen Effekt (Mittelwerte 100 vs. 100). Abbildung 23B zeigt, dass die Inkubation mit anti-GP2-#4-positiven MC Seren zu keinem signifikanten Einfluss auf die transfizierten Zellen führte (Mittelwert 102 vs. 85). MC Kontrollseren und Gesunde Kontrollen zeigten ebenso keinen signifikanten Unterschied zwischen GP2-#4 exprimierenden und nicht-exprimierenden Zellen. (Mittelwert 110 vs. 98 und 100 vs. 100).



**Abbildung 23. Einfluss von Morbus Crohn Seren auf die Zellviabilität von GP2 exprimierenden Zellen.** Der Einfluss von A) anti-GP2-#2 bzw. B) anti-GP2-#4 positiven Morbus Crohn Seren auf GP2 exprimierende Zellen wurde mit nicht-exprimierende Zellen (mock) verglichen. Die Zellviabilität wurde im MTS-Assay gemessen. Dargestellt: Median und 95 % Konfidenzintervall. Kruskal-Wallis-Test, \* $p < 0,05$ . A) MC anti-GP2-#2 +  $n = 12$ , MC anti-GP2-#2 -  $n = 3$ , Gesunde  $n = 3$ , B) MC anti-GP2-#4 +  $n = 13$ , MC anti-GP2-#4 -  $n = 3$ , Gesunde  $n = 3$ .

Abschließend wurde ein Zusammenhang der Ergebnisse mit dem zur Zeit der Serumsabnahme vorherrschenden Befallsmustern überprüft. Die untersuchten Seren wurden dafür anhand der klinischen Entzündungslokalisation aufgliedert. Die Zellviabilität von GP2-#2 exprimierenden Zellen (schwarz) wurde am stärksten dezimiert, wenn das Entzündungsgeschehen im Ileum lokalisiert war ( $n = 3$ , Mittelwert 95). Seren von Patienten mit Kolitis ( $n = 2$ , Mittelwert 117) und Ileokolitits ( $n = 3$ , Mittelwert 99) zeigten einen geringeren Effekt. Die Zellviabilität von GP2-#4 exprimierenden Zellen (hellgrau) wurde am stärksten dezimiert, wenn das Entzündungsgeschehen im Ileum lokalisiert war ( $n = 4$ , Mittelwert 75). Seren von Patienten mit Kolitis ( $n = 5$ , Mittelwert 88) und Ileokolitits ( $n = 4$ , Mittelwert 92) zeigten auch hier einen geringeren Effekt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 24 veranschaulicht und erreichten keine statistische Signifikanz.



**Abbildung 24. Seren von Patienten führen zu keinen zytotoxischen Effekten gegenüber GP2-#2 oder GP2-#4 exprimierenden Zellen.** Durch ein MTS-Assay wurden der Einfluss von anti-GP2 positiven Morbus Crohn (MC) Seren auf GP2 transfizierte Zellen untersucht. Die Ergebnisse wurden nach dem klinisch vorherrschenden Befallsmuster aufgegliedert. Zellen exprimierten GP2-#2 (schwarz) oder GP2-#4 (grau). Anzahl der MC Seren und Mittelwerte der Zellviabilität für GP2-#2 bzw. GP2-#4 bei Befall von Ileum (n = 3 und 95 bzw. n = 4 und 75) Kolon (n = 2 und 117 bzw. n = 5 und 88) und Ileokolon (n = 7 und 99 bzw. n = 4 und 92). Anzahl Gesunde und Mittelwerte der Zellviabilität für GP2-#2 und GP2-#4 (jeweils n = 3 und 99). Dargestellt: Median und 95 % Konfidenzintervall, Kruskal-Wallis-Test  $p > 0.05$ .

## 4 Diskussion

Autoantikörper gegen Glykoprotein 2 stehen in Verdacht an der Pathophysiologie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurden die Isoformen des Autoantigens Glykoprotein 2-#2 und -#4 in ihrer Expression im humanen Gewebe untersucht. Anschließend wurden gegen GP2 gerichtete Autoantikörper in humanen Seren nach Antikörperisotyp (IgG oder IgA) und Spezifität gegenüber den Proteinisoformen (GP2-#2 und GP2-#4) analysiert. Die Ergebnisse wurden im Kontext des klinischen Phänotyps beurteilt. Abschließend wurde die Auswirkung von CED Seren auf GP2-exprimierende Zellen untersucht.

### 4.1 Überexpression von GP2-#4 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster der GP2 Isoformen #2 und #4 im Ileum und Kolon anhand von endoskopisch gewonnenen Biopsien analysiert. Die Ergebnisse des Western Blots zeigten, dass GP2-#2 weder im intestinalen Gewebe von Gesunden noch von Erkrankten exprimiert wird. Im Gegensatz dazu konnte GP2-#4 im Ileum und Kolon nachgewiesen werden. Dies führt zu dem Schluss, dass es kein ubiquitäres Vorkommen beider GP2 Isoformen gibt und ausschließlich GP2-#4 intestinal exprimiert wird.

Hase *et al.* zeigten, dass GP2 auf ileumspezifischen M-Zellen exprimiert wird (Hase *et al.*, 2009). Der erbrachte Nachweis von großen Mengen GP2-#4 im Ileum lässt sich demzufolge auf die dichte Besiedlung des Ileums mit M-Zellen zurückführen. Ferner wurde GP2-#4 im Kolongewebe nachgewiesen. Bekannterweise existieren keine M-Zellen im Kolon, sodass GP2-#4 auf einer weiteren, kolonspezifischen Zelle exprimiert werden müsste. Weiterführende Forschungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass GP2-#4 im Kolon hauptsächlich auf L-Zellen exprimiert wird (Derer *et al.*, 2020).

Die präsentierten Ergebnisse werfen die Frage auf, welche Faktoren zur Überexpression von GP2-#4 im Gewebe CED Erkrankter führen. Aktuelle *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe belegen, dass die GP2-#4 Expression durch zwei Faktoren stimuliert wird: Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und das bakterielle

Adhäsion FimH. Die kolorektale Tumorzelllinie Difi zeigt eine endogene Expression von GP2-#2 und GP2-#4 mRNA Transkripten auf. *In vitro* führte die Stimulation dieser Zelllinie mit TNF- $\alpha$  zu einer signifikant erhöhten Expression von GP2-#4 (Derer *et al.*, 2020). Intestinal induziert TNF- $\alpha$  Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) die Differenzierung von M-Zellen (Wood *et al.*, 2016). Reimund *et al.* belegten 1996 eine übermäßige Produktion des Zytokins TNF- $\alpha$  bei MC Patienten (Reimund *et al.*, 1996). Zusammenfassend wird die intestinale Überexpression von GP2-#4 möglicherweise TNF- $\alpha$  abhängig induziert oder unterhalten.

GP2 weist eine Homologie zu Uromodulin auf (Hoops & Rindler, 1991). Mayrer *et al.* wiesen nach, dass die intravenöse Applikation von Uromodulin im Mausmodell eine zelluläre Immunantwort gegenüber Uromodulin provoziert und in einer tubulointerstitiellen Nephritis mündet (Mayrer *et al.*, 1982). Im Tiermodell unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung von Mäusen mit humanem GP2 zu einer ausgesprochenen Immunreaktion führt (Derer *et al.*, 2020). GP2 provoziert, wie das strukturverwandte Protein Uromodulin, eine immunologische Reaktion, respektive könnte zwischen der nachgewiesenen Überexpression von GP2-#4 und dem Auftreten von Autoantikörpern eine Kausalität bestehen.

Interessanterweise wurden im Ileum von CED Patienten inäquale GP2-#4 Proteinvarianten detektiert, während in intestinalen Biopsien von Gesunden ausschließlich eine kleine Proteinform nachgewiesen wurde. Dies wirft die Frage auf, ob sich die verschiedenen Proteinvarianten in ihrer Funktionalität unterscheiden. Analog zu dem bereits gut erforschten Protein Uromodulin besitzt GP2 eine ZP-Domäne. Die ZP-Domäne dieser Proteinfamilie reguliert die Polymerisation der Protein (Jovine *et al.*, 2002). Es ist bekannt, dass GP2 als lösliche Form aggregiert (Rindler & Hoops, 1990). Durch die Ausbildung einer Matrix wird das Epithel vor einer Invasion mit FimH+ Bakterien geschützt (Schaeffer *et al.*, 2009; Yu & Lowe, 2009). Das Molekulargewicht von GP2 in den Western Blots humaner Biopsien unterscheidet sich von den kalkulierten Proteinmassen und den unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE detektierten Proteinbanden. Der Nachweis von Proteinen mit großem Molekulargewicht kann mit der Bildung von extrazellulären Polymeren und der umfangreichen Glykosylierung erklärt werden. Die detektierten Varianten von GP2-#4 im Ileum von ~75 kDa und >250 kDa entsprechen vermutlich Monomeren und Polymeren. Darüber hinaus könnte dies bedeuten, dass bei CED Patienten Proteine funktioneller Varianz vorliegen. Die Abwesenheit großer Proteinaggregate könnte

ein Hinweis darauf sein, dass GP2 im Ileum dieser Patienten FimH+ Bakterien nicht adäquat eliminieren kann. Coady *et al.* zeigten, dass das strukturverwandte Protein Uromodulin mit FimH+ Bakterien Aggregate bildet und so Harnwegsinfekte verhindert (Coady *et al.*, 2018). Interessant in dem Zusammenhang ist, dass ausschließlich GP2-#4 FimH+ positive Bakterien zu binden scheint. Jüngst belegte unsere Arbeitsgruppe mittels ELISA, dass eine konzentrationsabhängige Bindung von FimH+ Bakterien an GP2-#4 besteht. Im Kontrast dazu zeigte sich keine Bindung zwischen GP2-#2 und FimH+ Bakterien (Derer *et al.*, 2020).

Derzeit herrscht Konsens über die Relevanz einer immunologischen Dysfunktion als anteilige Ursache an CED (Herold, 2018; Murphy & Weaver, 2018). Die dargestellte intestinal Expression und CED-spezifische Überexpression von GP2-#4 könnte, im Kontext der aktuellen Forschung, für eine pathophysiologische Relevanz von GP2-#4 sprechen.

## **4.2 Autoantikörper im Serum von chronisch-entzündlichen Darmerkrankten binden an ein gemeinsames Epitop beider Isoformen**

Seit Langem wird eine autoimmunologische Komponente in der Ätiopathogenese von CED diskutiert (Baumgart *et al.*, 2007; Herold, 2018; Murphy & Weaver, 2018). PAB wurden erstmalig 1987 als hochspezifische MC Marker beschrieben und sind seither in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt (Stöcker *et al.*, 1987). Roggenbuck *et al.* identifizierten GP2 als eine Zielstruktur von PAB (Roggenbuck *et al.*, 2009). Im nächsten Schritt dieser Arbeit wurden daher die Seren von Gesunden und CED Patienten auf GP2-#2 und GP2-#4 spezifische Autoantikörper untersucht. Dafür wurden die Bindungsfähigkeiten von Autoantikörpern in humanen Seren an rekombinantes GP2-#2 und GP2-#4 mittels ELISA getestet. In der vorliegenden Arbeit wurden GP2-Autoantikörper bei allen CED Patienten und bei Gesunden detektiert. MC Patienten zeigten signifikant erhöhte IgG-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2. CU Patienten und Gesunden zeigten erhöhte IgG-Autoantikörperlevel insbesondere gegen GP2-#2 gemessen wurden. Michaels *et al.* beziferten die Prävalenz von anti-GP2-IgG mit Werten zwischen sieben und 44 % (Michaels, 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden bei 47 % der MC Seren deutlich erhöhte anti-GP2-IgG Autoantikörperlevel gemessen.

Aus der Gruppe der CED Seren zeigten 60 % der MC Seren und 66 % der CU Seren stark erhöhte anti-GP2-#2-IgA-Level. Deutlich erhöhte anti-GP2-#4-IgA-Level wurden bei 23 % der MC Seren und 88 % der CU Seren detektiert. Bisher wurden Prävalenzen von anti-GP2-IgA bei CED zwischen null und 37 % beschrieben (Bonneau *et al.*, 2015; Michaels, 2017). Im Vergleich zu anderen Arbeiten zeigt diese Arbeit eine deutlich erhöhte Autoantikörperprävalenz bei CED Erkrankten und bei Gesunden.

Eine wichtige Beobachtung dieser Arbeit ist, dass eine Korrelation von IgG- bzw. IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 und GP2-#4 im Serum von MC Patienten besteht. Zudem existierte ein Zusammenhang zwischen anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel und anti-GP2-#4-IgA-Autoantikörperlevel in CU Seren. Autoantikörper in den Seren von Gesunden zeigten im Gegensatz dazu keinen Zusammenhang zwischen der Bindung an GP2-#2 und GP2-#4. Eine denkbare Erklärung dieser Beobachtung ist, dass CED-spezifische Autoantikörper die GP2-Isoformen im gleichen Maße binden können, während Gesunde lediglich eine Isoform, vorrangig GP2-#2, binden. Möglicherweise binden Autoantikörper von CED Patienten das Antigen an einem gemeinsamen Epitop beider Isoformen, während Autoantikörper von Gesunden isoformspezifisch GP2-#2 binden. Nach Analyse der GP2-Proteinstruktur unserer Arbeitsgruppe wurde die Hypothese aufgestellt, dass CED-spezifische-Autoantikörper die endständigen 39 Aminosäuren der spezifischen Domäne und die Zona pellucida-Domäne binden, während die Autoantikörper im Serum von Gesunden die spezifische Domäne von GP2-#2 binden (Derer *et al.*, 2020). Mittels ELISA wurden außerdem Hinweise generiert, dass MC-spezifischen Autoantikörper zwei diverse Bindungsverhalten zeigen: eine weitaus häufigere Variante scheint ein gemeinsames Epitop von GP2-#2 und GP2-#4 zu binden und die zweite Variante mit einem isoformspezifischen Bindungsverhalten seltener ist (Derer *et al.*, 2020).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Autoantikörper sowohl bei Gesunden als auch bei CED Patienten auftreten. Pathophysiologisch bedeutsam könnte sein, dass CED-spezifische Autoantikörper ein anderes Bindungsverhalten zeigen als die Autoantikörper, die in Seren von Gesunden detektiert wurden. Folgender Zusammenhang wäre möglich; Eine durch TNF- $\alpha$  übermäßig induzierte Expression von GP2-#4 (vgl. 4.1) triggert die Entwicklung von Autoantikörpern. CED-spezifische Autoantikörper binden GP2-#4 und behindern so die Adhäsion von FimH+ Bakterien

(Derer *et al.*, 2020). Die ineffiziente Elimination von Pathogenen mündet in einer übermäßigen Besiedlung des Darmes mit *E. coli* Bakterien (Palmela *et al.*, 2018). Diese immunologische Dysfunktion könnte dann das mikrobiologische Ungleichgewicht im Darm von CED Patienten aggravieren.

### 4.3 Phänotypen Analyse

Über die Beziehung zwischen Autoantikörpern und Phänotypen herrscht Unklarheit. Die Fragestellung ist jedoch von erheblicher klinischer Relevanz, da eine serologische GP2-Autoantikörper-Untersuchung die klinische Befunderhebung und Verlaufskontrolle erleichtern könnte. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse sollen im Folgenden mit bereits publizierten Arbeiten verglichen und eingeordnet werden.

In dieser Arbeit wurden anti-GP2-#2-IgG-Autoantikörperlevel und anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel mit einer ilealen und ileokolischen Entzündungslokalisation assoziiert. Ein Zusammenhang von anti-GP2-IgG-Autoantikörpern und Entzündung im Ileum und Ileokolon wurde auch von Pavlidis *et al.* beschrieben. Anti-GP2-IgA wurde nicht untersucht (Pavlidis *et al.*, 2012). Im selben Jahr postulierten Bogdanos *et al.* eine Assoziation zwischen anti-GP2-IgG und anti-GP2-IgA mit ileokolischem Befall (Bogdanos *et al.*, 2012). Eine negative Assoziation zwischen kolischer Lokalisation und anti-GP2-Status wurde von Bogdanos *et al.*, Pavlidis *et al.* und Papp *et al.* beschrieben. In dieser Arbeit zeichnete sich eine Tendenz zu niedrigen anti-GP2-#4-Level bei Kolitis ab, signifikant konnten die Ergebnisse aber nicht bestätigt werden. Von selbigen Autoren wurde ein negativer Zusammenhang zwischen anti-GP2-Status und dem Patientenalter bei Erstdiagnose beschrieben. Diese Beobachtungen wurden nicht bestätigt.

CRP wird in den aktuellen Leitlinien als Marker für die klinische Entzündungsaktivität empfohlen (Herold, 2018; Kucharzik *et al.*, 2019; J. Preiß *et al.*, 2014). Tatsächlich korrelierte Anti-GP2-#4-IgA mit diesem Entzündungsmarker. Zwischen anti-GP2-#2-IgG und CRP im Serum der Patienten und zwischen anti-GP2-#4-IgA und Leukozyten bestand eine negative Korrelation. Ein stimmiger Zusammenhang zwischen Entzündungswerten und Autoantikörperstatus war nicht erkennbar.

Das anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel war bei Patienten höher, die Azathioprin einnahmen. Michaels assoziierte eine immunsuppressive Therapie mit positivem

anti-GP2-IgG-Status. Die Ergebnisse sind nur eingeschränkt vergleichbar, da neben Azathioprin außerdem die Einnahme von Tacrolimus, Cyclophosphamid, 6-Mercaptopurin und Methotrexat miteinbezogen wurde (Michaels, 2017). In anderen Arbeiten wurde der Zusammenhang mit einer immunsuppressiven Therapie entweder nicht untersucht (Op De Beéck *et al.*, 2012; Papp *et al.*, 2015) oder nicht bestätigt (Pavlidis *et al.*, 2012).

#### **4.4 Seren von Morbus Crohn Patienten zeigen keinen Einfluss auf GP2 exprimierende Zellen**

Trotz intensiver Forschung ist zurzeit noch unklar, ob anti-GP2-Autoantikörper ein Epiphänomen darstellen oder ob sie im direkten Zusammenhang zur immunologischen Dysfunktion und zum Barrierschaden im Darm von CED Erkrankten stehen. Im abschließenden Schritt der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob Patientenserum zur CDC führen. Antigen-Antikörper-Komplexe können im Zuge dessen über den klassischen Aktivierungsweg das Komplementsystem aktivieren. Das Komplementsystem kann wiederum Effektorzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems aktivieren und deren Zusammenspiel initiieren. Verschiedene Mechanismen resultieren in einer Zellzerstörung und einem Entzündungsgeschehen (Derer *et al.*, 2014; Murphy & Weaver, 2018). Denkbar wäre außerdem, dass anti-GP2-markierte Zielzellen über eine antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität zerstört werden. Lymphozyten könnten die F<sub>c</sub>-Domäne von Immunglobulinen erkennen und als Effektorzellen den Zelltod initiieren (Murphy & Weaver, 2018).

In dieser Arbeit beeinträchtigten autoantikörperpositive Seren die Viabilität von GP2 exprimierenden Zellen nicht. Aufgrund der geringen Fallzahl der MC Kontrollgruppe wird die statistische Aussagekraft des als signifikant gemessene Ergebnis als gering eingeschätzt. MC Seren in denen zuvor hohe Autoantikörperlevel detektiert wurden verringern die Viabilität von GP2-#4 exprimierenden Zellen stärker als von GP2-#2 exprimierenden Zellen, dieses Ergebnis zeigte aber keine statistische Signifikanz. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass gegen GP2 immunisierte Mäuse nach einer Infektion mit *Salmonella Typhimurium* im Vergleich zu nicht immunisierten Mäusen einen exazerbierten Entzündungsverlauf im Zökum und außerdem eine vermehrte Bakterienlast in der Leber, dem Ileum und der Milz aufwiesen (Derer *et al.*, 2020). Das proinflammatorische Geschehen im Darm von CED Patienten wird

möglicherweise durch GP2-#4-Autoantikörper initiiert oder aufrechterhalten wird. Eine CDC wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen. Denkbare andere Mechanismen sind die intestinale Adhäsion und Infiltration von darmpathogenen Enterobakterien (*in vivo* nachgewiesen), als Folge einer ineffizienten Elimination von FimH+ Bakterien.

#### **4.5 Ausblick und Limitationen**

Die Limitation der vorliegenden Arbeit ergibt sich aus der kleinen Fallzahl. Allgemeingültige Aussagen bezüglich Antikörpermuster und Phänotypen-Assoziation sollten nach Analysen von größerer Kollektiven getroffen werden und sind lohnende Ansatzpunkte für weitere Studien. Es bleibt zu klären, ob ein Autoantikörper-Screening in Zukunft die Diagnostik von CED unterstützen kann und, ob isoformspezifische Autoantikörper-Bestimmungen eine klinische Vorhersage erlauben können.

In dieser Arbeit wurden isolierte Untersuchungen durchgeführt und es konnten erste Hinweise auf eine zelltoxische Wirkung generiert werden. Aufgrund der Komplexität und des Zusammenspiels vieler Komponenten einer Autoimmunreaktion sollten weitere Untersuchungen im Kontext des funktionellen Gesamtorganismus angeschlossen werden. Interessante weitere Erkenntnisse konnten bereits anhand eines Mausmodells unserer Arbeitsgruppe erlangt werden.

Eine spannende Forschungsfrage mit erheblicher klinischer Relevanz ist, ob eine Elimination der Autoantikörper aus den Seren von CED Patienten zur Verbesserung der Symptome führen könnte. Die Erforschung dieser Thematik könnte neue therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung von CED aufzeigen.

## 5 Zusammenfassung

**Grundlagen** Die Genese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist unklar. Zwei Isoformen des Glykoproteins 2 (GP2-#2 und GP2-#4) provozieren bei CED eine Immunantwort. In der Arbeit sollte die Expression dieser Isoformen untersucht werden, sowie gegen GP2 gerichtete Autoantikörper (Aak) in Seren von CED Patienten und Gesunden funktionell analysiert werden.

**Methodik** Mittels Western Blot wurde die intestinale Expression von GP2 in humanen Biopsien untersucht. Anti-GP2-Aak wurden mittels ELISA in Serumproben von 39 CED Patienten (30 Morbus Crohn, 9 Colitis ulcerosa) gemessen und die Zusammenhänge zu Phänotypen ausgewertet. Eine komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) der Seren auf GP2-exprimierende Zellen wurde im MTS-Assay bestimmt.

**Ergebnisse** Intestinal wurde lediglich GP2-#4 exprimiert. In ilealen und kolischen CED-Biopsien wurde GP2-#4 überexprimiert ( $p = 0,04$  und  $p = 0,02$ ). Aak lagen bei Gesunden und CED Patienten vor. Morbus Crohn (MC) Patienten differenzierten sich von Gesunden durch signifikant erhöhte anti-GP2-#2-IgG- und anti-GP2-#2-IgA-Level ( $p = 0,002$  und  $p = 0,0001$ ) und von Colitis ulcerosa (CU) Patienten durch höhere anti-GP2-#4-IgG-Level ( $p < 0,0001$ ). CU Patienten zeigten im Vergleich zu Gesunden erhöhte anti-GP2-#2- und anti-GP2-#4-IgA-Level ( $p = 0,01$ ) und zu MC Patienten erhöhte anti-GP2-#4-IgA-Level ( $p = 0,0005$ ). IgG- und IgA-Aak in MC Seren banden gleichermaßen GP2-#2 und -#4 ( $r = 0,44$ ,  $p = 0,01$  und  $r = 0,78$ ,  $p < 0,0001$ ), ebenso IgA-Aak in CU Seren ( $r = 0,87$ ,  $p < 0,005$ ). Es bestand ein Zusammenhang zwischen anti-GP2-Autoantikörperlevel und Phänotypen. Ileale und ileokolische Krankheitslokalisationen wurden mit anti-GP2-#2-IgG- ( $p = 0,04$  und  $p = 0,01$ ) und anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörpern ( $p = 0,001$  und  $p = 0,0003$ ) assoziiert. MC Seren führten *in vitro* zu keiner CDC gegenüber GP2-exprimierenden Zellen.

**Diskussion** GP2-#4 bindet intestinal FimH+ Bakterien und wird im Gewebe von CED Patienten überexprimiert. Dies könnte die Bildung von Aak induzieren und so eine Bakterienelimination inhibieren. Aak, die ein gemeinsames Epitop von GP2-#2 und GP2-#4 binden, scheinen CED-spezifisch zu sein, wohingegen Aak mit GP2-#2 spezifischer Bindung bei Gesunden auftreten. Ob die Elimination von gegen GP2-#4 gerichteten Aak künftig eine therapeutische Strategie in der Behandlung von Patienten mit CED werden könnte, sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

## 6 Materialliste

### 6.1 Instrumente

Instrument	Typ	Firma (Hauptsitz)
8-Kanal-Pipette		Eppendorf (Hamburg, DEU)
Autoklave	VX-75	Systec (Linden, DEU)
Zell-Inkubator	Heracell Vios 160i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X3 FR	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
ChemiDoc™	XRS+	BioRad (Hercules, CA, USA)
Sicherheitswerkbank	Class II Typ A/B3	Nuaire (Plymouth, MN, USA)
Elektrophorese Kammer	Criterion™ Cell	BioRad (Hercules, CA, USA)
Elektrophorese Power Supply	PowerPac™ Basic	BioRad (Hercules, CA, USA)
Elektrophorese Power Supply	3000Xi	BioRad (Hercules, CA, USA)
Kühler (-20°C)		Liebheer (Bulle FR, CHE)
Kühler (-80°C)	MDF-U4086S	Sanyo Electronic Co (Osaka, Japan)
Heizblock		Boekel Scientific (Feasterville, PA, USA)
Horizontale Elektrophorese Kammer		VWR (Radnor, PA, USA)
Eismaschine	R44A Typ 09	Manitowoc Ice, Inc (Manitowoc, WI, USA)
Inkubator	INCU-Line	VWR (Radnor, PA, USA)
Inverses Mikroskop	Primovert	Carl Zeiss AG (Oberkochen, BW, DEU)
Laborwaage	Ern PFB	Seca (Hamburg, HH, DEU)
Magnetrührer	Basic Serie	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Mikrowelle		Bosch (Stuttgart, BW, DEU)
Wasseraufbereitungssystem	Barnstead™ GenPure™ Pro UV-TOV/UF	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Multipipette <sup>R</sup>	M4	Eppendorf (Hamburg, HH, DEU)

<b>Instrument</b>	<b>Typ</b>	<b>Firma (Hauptsitz)</b>
Neubauer Zählkammer		LO-Laboroptik (Lancing, GBR)
pH Meter	pH 3110	WTW (Weilheim, BY, DEU)
Pipetten		Eppendorf (Hamburg, HH, DEU)
Pipettor		VWR (Radnor, PA, USA)
Gekühlte Zentrifuge	2K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, NI, DEU)
Kühlschrank		Liebher (Bulle FR, CHE)
Semidry blotting System	Trans-blot SD Semi-dry Transfer Cell	BioRad (Hercules, CA, USA)
Schüttler	Mini Rocker Rocking Plattform	BioRad (Hercules, CA, USA)
Tischorbitalschüttler	MaxQ™ 4000	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Spektralmikroplatten-Leser	SpectraMax <sup>R</sup> iD3	Molecular Devices (San José, CA, USA)
Tischzentrifuge	MiniStar	VWR (Radnor, PA, USA)
Ultraschallbad	Sonorex RK 102 Transistor	Bandelin (Berlin, BE, DEU)
Vortexer	MS Minishaker	Werner Hassa GmbH (Lübeck, SH, DEU)
Wasserbad		Köttermann (Uetze, NI, DEU)
Laminiergerät		Severin (Sundern, NRW, DEU)

## 6.2 Gebrauchsmaterialien

Material	Firma (Hauptsitz)
18-well 4-12% Gradient Gel	BioRad (Hercules, CA, USA)
96-well Maxisorp ® Mikrotiterplatte, flacher Boden	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Blotting Filter Papier	BioRad (Hercules, CA, USA)
Combitips® (2,5 ml; 5 ml)	Eppendorf (Hamburg, HH, DEU)
Filterpipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, NRW, DEU)
Glasware	DWK Life Science (Wertheim, BW, DEU)
Immun-Blot® PVDF Membran	Millipore (Burlington, MA, USA)
Parafilm M	Carl Roth (Karlsruhe, BW, DEU)
Sterile Pipette (5 ml; 10 ml; 25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, NRW, DEU)
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, NRW, DEU)
Reagiergefäße (15 ml; 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, NRW, DEU)
Sterile Puderfreie Untersuchungshandschuhe	Ansell Healthcare GmbH (München, BY, DEU)
Sterile TC-Platte-96-well	Sarstedt AG & Co. Kg (Nümbrecht, NRW, DEU)
T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co. Kg (Nümbrecht, NRW, DEU)

## 6.3 Reagenzien

Reagenz	Firma (Hauptsitz)
3,3', 5,5; -tetramethylbenzidine (TMB) Single Solution	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
6x Loading dye	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Accutase®	Geyer Th. GmbH & Co KG (Hamburg, HH, DEU)
Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, NI, DEU)
Penicillin/Streptomycin	Geyer Th. GmbH & Co KG (Hamburg, HH, DEU)
Bacto Agar	Fisher Scientific GmbH, (Schwerte, NRW, DEU) Katalog-Nr.: 10455513
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH (Carlsbad, CA, USA)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Geyer Th. GmbH & Co. KG (Hamburg, HH, DEU)
Bromphenolblau Natrium Salz	Merck (Darmstadt, HE, DEU)
Coomassie brilliant blue G250	Serva (Heidelberg, BW, DEU)
Dulbecco's phosphate buffered saline (dPBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, BW, DEU)

<b>Reagenz</b>	<b>Firma (Hauptsitz)</b>
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich ((St. Louis, MO, USA)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, BW, DEU)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, HE, DEU)
Phosphatase-Inhibitor II	Geyer Th. GmbH & Co. KG (Hamburg, HH, DEU)
Phosphatase-Inhibitor III	Geyer Th. GmbH & Co. KG (Hamburg, HH, DEU)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Rekombinantes humanes GP2-#2 (590 µg/ml)	LifeSpan BioScience (Seattle, WA, USA)
Rekombinantes humanes GP2-#4 (150 µg/ml)	OriGene Technologies Inc (Rockville, MD, USA) Katalog-Nr.: TP307512
Roti®Quant	Carl Roth (Karlsruhe, BW, DEU)
Sodium Chloride (NaCl)	AppliChem (Darmstadt, HE, DEU)
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt, HE, DEU)
Tris Acetat	AppliChem (Darmstadt, HE, DEU)
Trypan Blau	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Tween 20	Geyer Th. GmbH & Co. KG (Hamburg, HH, DEU)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DMEM	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Katalog-Nr.: 41965-039, Gibco
Triton-X100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Katalog-Nr.: T-9284
pCMV6-Entry-GP2 V2	AmsBio LLC (Abingdon, OX, GB) Katalog-Nr.:RC216763
pCMV6-Entry-GP2 V4	AmsBio LLC (Abingdon, OX, GB) Katalog-Nr.:RC207512
Automatische Pipette Accurpette	VWR (Radnor, PA, USA)
Chemiluminescent Immobilon Western HRP Substrat	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Zelllinie HEK-293	ATCC (Manassas, VA, USA)

## 6.4 Antikörper

Antikörper	Firma (Hauptsitz)
Anti-human GP2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Katalog-Nr.: HPA015739
Anti-human GP2	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Katalog-Nr: HPA016668
Anti-human IgA HRP (0,5 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Katalog-Nr.: PA1-74395
Anti-human IgG HRP (1 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Katalog-Nr.: 62-8420
Anti-human $\beta$ -Aktin	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) Katalog-Nr.: 4967

## 6.5 Puffer und Medien

Chemikalien	Zusammensetzung
Blotting Puffer, 1x	50ml 10x Blotting Puffer 350ml destilliertes Wasser 100ml Methanol (20%)
Blotting Puffer, 10x	0,25 M Tris 1,92 M Glycerin
Coomassie brilliant blue Puffer	1g Coomassie brilliant blue G250 50% Methanol 10% Eisessig 40% destilliertes Wasser
TBS 10x	Lübeck 200mM Tris, 1,4M NaCl pH=7,6
Elphopuffer 5x	Lübeck, 125 mM Tris 960 mM Glycerin 0,5% w/v SDS pH=8,4
TAE Puffer 1x	1:50 Lösung von 50x TAE Buffer
TAE Puffer 50x	1M Tris 0,5 M EDTA 5,7% Eisessig Destilliertes Wasser pH = 8
Denaturing lysis buffer (DLB)	10 mM Tris 1% SDS pH = 7,4 1:100 Protease inhibitor cocktail 1:50 Phosphatase Inhibitor II & III Destilliertes Wasser

<b>Chemikalien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Elektrophorese Puffer 1x	1:5 Lösung von 5x Elektrophorese Puffer
Elektrophorese Puffer 5x	125 mM Tris 960 mM Glycerin 0,5 % SDS Destilliertes Wasser pH = 8,4
ELISA Blocking Puffer	1 % BSA 1x dPBS
ELISA Reagent Diluent	0,1 % BSA 0,05 % Tween 20 1x dPBS
TBS 10x	200 mM Tris 1,4 M NaCl pH = 7,6
TBS 1x	100 ml von 10x TBS 900 ml destilliertes Wasser 1 ml Tween 20 (0,1%)
SDS Puffer 5x	1563 µl 1M Tris, pH = 6,8 2500 µl Glycerin 500 µl β-Mercaptoethanol 0,5 g SDS 437 µl destilliertes Wasser Bromphenolblau Natrium Salz
ELISA Waschpuffer	0,05 % Tween 20 1x dPBS
ELISA Blocking Puffer	1 % w/v BSA 1x dPBS
Reagent Diluent	0,1 % w/v BSA 0,05 % v/v Tween 20 1x dPBS
Stripping Puffer	4 ml 10 % SDS 1,25 ml 1 M Tris, pH = 6,8 100 µl β-Mercaptoethanol 14,64 ml destilliertes Wasser

## 7 Literaturverzeichnis

- Adolph, T. E., Tomczak, M. F., Niederreiter, L., Ko, H.-J., Böck, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J. N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., Flak, M. B., Cusick, J. L., Kohno, K., Iwawaki, T., Billmann-Born, S., Raine, T., Bharti, R., Lucius, R., Kweon, M.-N., ... Blumberg, R. S. (2013). Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature*, *503*(7475), 272–276. <https://doi.org/10.1038/nature12599>
- 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., Barnardo, M., Cullen, S., Welsh, K. I., & Jewell, D. P. (2002). The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn’s disease. *Gastroenterology*, *122*(4), 854–866. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32413>
- Alatab, S., Sepanlou, S. G., Ikuta, K., Vahedi, H., Bisignano, C., Safiri, S., Sadeghi, A., Nixon, M. R., Abdoli, A., Abolhassani, H., Alipour, V., Almadi, M. A. H., Almasi-Hashiani, A., Anushiravani, A., Arabloo, J., Atique, S., Awasthi, A., Badawi, A., Baig, A. A. A., ... Naghavi, M. (2020). The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, *5*(1), 17–30. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30333-4](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30333-4)
- Albert, J., Kotsch, J., Köstler, W., Behl, S., Kaltz, B., Bokemeyer, B., Dollinger, M., Haerting, J., & Fleig, W. (2008). Course of Crohn’s Disease Prior to Establishment of the Diagnosis. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, *46*(2), 187–192. <https://doi.org/10.1055/s-2007-963524>
- Barrett, J. C., Hansoul, S., Nicolae, D. L., Cho, J. H., Duerr, R. H., Rioux, J. D., Brant, S. R., Silverberg, M. S., Taylor, K. D., Barmada, M. M., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, L. W., Green, T., Griffiths, A. M., Kistner, E. O., Murtha, M. T., Regueiro, M. D., Rotter, J. I., ... Daly, M. J. (2008). Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn’s disease. *Nature Genetics*, *40*(8), 955–962. <https://doi.org/10.1038/ng.175>
- Baumgart, D. C. (2009). The Diagnosis and Treatment of Crohn’s Disease and

- Ulcerative Colitis. *Deutsches Arzteblatt Online*, 106, 123–133. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0123>
- Baumgart, D. C., & Carding, S. R. (2007). Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *The Lancet*, 369(9573), 1627–1640. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60750-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60750-8)
- Blumenstein, I., Siegmund, B., & Sonnenberg, E. (2019). Geschlechtsspezifische Unterschiede bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Der Gastroenterologe*, 14(2), 102–107. <https://doi.org/10.1007/s11377-019-0323-8>
- Bogdanos, D. P., Rigopoulou, E. I., Smyk, D. S., Roggenbuck, D., Reinhold, D., Forbes, A., Laass, M. W., & Conrad, K. (2011). Diagnostic value, clinical utility and pathogenic significance of reactivity to the molecular targets of Crohn's disease specific-pancreatic autoantibodies. *Autoimmunity Reviews*, 11(2), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.09.004>
- Bogdanos, D. P., Roggenbuck, D., Reinhold, D., Wex, T., Pavlidis, P., von Arnim, U., Malfertheiner, P., Forbes, A., Conrad, K., & Laass, M. W. (2012). Pancreatic-specific autoantibodies to glycoprotein 2 mirror disease location and behaviour in younger patients with Crohn's disease. *BMC Gastroenterology*, 12(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-12-102>
- Bokemeyer, B. (2003). Cost of General Medical Care of Patients Suffering from Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 41(9), 963–964. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41830>
- Bossuyt, X. (2006). Serologic Markers in Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Chemistry*, 52(2), 171–181. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.058560>
- Cario, E., & Podolsky, D. K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infection and Immunity*, 68(12), 7010–7017.
- Carter, M. J. (2004). Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 53(suppl\_5), v1–v16. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.043372>
- Coady, A., Ramos, A. R., Olson, J., Nizet, V., & Patras, K. A. (2018). Tamm-Horsfall Protein Protects the Urinary Tract against *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 86(12), 1–10. <https://doi.org/10.1128/IAI.00451-18>

- Cohen, J. (1992). A Power Primer. *Psychological Bulletin*, 112(1), 115–159. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2011.01.025>
- Conrad, K., Bogdanos, D., & Roggenbuck, D. (2014). Chapter 51 – Antipancreatic Autoantibodies. In *Autoantibodies* (Third Edit, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56378-1.00051-4>
- Conrad, K., Schmechta, H., Klafki, A., Lobeck, G., Uhlig, H. H., Gerdi, S., & Henker, J. (2002). Serological differentiation of inflammatory bowel diseases. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 14(2), 129–135. <https://doi.org/10.1097/00042737-200202000-00006>
- Courth, L. F., Ostaff, M. J., Mailänder-Sánchez, D., Malek, N. P., Stange, E. F., & Wehkamp, J. (2015). Crohn's disease-derived monocytes fail to induce Paneth cell defensins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(45), 14000–14005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510084112>
- Degenhardt, F., Dirmeier, A., Lopez, R., Lang, S., Kunst, C., Roggenbuck, D., Reinhold, D., Szymczak, S., Rogler, G., Klebl, F., Franke, A., & Rieder, F. (2016). Serologic Anti-GP2 Antibodies Are Associated with Genetic Polymorphisms, Fibrostenosis, and Need for Surgical Resection in Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(11), 2648–2657. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000936>
- Derer, S., Beurskens, F. J., Rosner, T., Peipp, M., & Valerius, T. (2014). Complement in Antibody-Based Tumor Therapy. *Critical Reviews in Immunology*, 34(3), 199–214. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2014009761>
- Derer, S., Brethack, A.-K., Pietsch, C., Jendrek, S. T., Nitzsche, T., Bokemeyer, A., Hov, J. R., Schäffler, H., Bettenworth, D., Grassl, G. A., & Sina, C. (2020). Inflammatory Bowel Disease–associated GP2 Autoantibodies Inhibit Mucosal Immune Response to Adherent-invasive Bacteria. *Inflammatory Bowel Diseases*, 26(12), 1856–1868. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa069>
- Dornmair, K., Goebels, N., Weltzien, H.-U., Wekerle, H., & Hohlfeld, R. (2003). T-Cell-Mediated Autoimmunity. *The American Journal of Pathology*, 163(4), 1215–1226. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63481-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63481-5)

- Elkon, K., & Casali, P. (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 4(9), 491–498. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0895>
- Elson, C. O. (2000). Commensal bacteria as targets in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 119(1), 254–257. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.9159>
- Fukuoka, S.-I. (2000). Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding  $\alpha$  (large) and  $\beta$  (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1491(1–3), 376–380. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00057-9)
- Gearry, R. B. (2016). IBD and Environment: Are There Differences between East and West. *Digestive Diseases*, 34(1–2), 84–89. <https://doi.org/10.1159/000442933>
- Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., & Madara, J. L. (2001). Cutting Edge: Bacterial Flagellin Activates Basolaterally Expressed TLR5 to Induce Epithelial Proinflammatory Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 167(4), 1882–1885. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1882>
- Gibson, P. R., & Shepherd, S. J. (2005). Personal view: food for thought - western lifestyle and susceptibility to Crohn's disease. The FODMAP hypothesis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 21(12), 1399–1409. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02506.x>
- Girardin, S. E., Hugot, J., & Sansonetti, P. J. (2003). Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends in Immunology*, 24(12), 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.10.007>
- Goyette, P., Labbé, C., Trinh, T. T., Xavier, R. J., & Rioux, J. D. (2007). Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: Genotypes, phenotypes and personalized medicine. *Annals of Medicine*, 39(3), 177–199. <https://doi.org/10.1080/07853890701197615>
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z.-W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., & Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 118(3), 285–296.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.013>

- Gribar, S. C., Anand, R. J., Sodhi, C. P., & Hackam, D. J. (2008). The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(3), 493–498. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607358>
- Gullberg, E., & Söderholm, J. D. (2006). Peyer's Patches and M Cells as Potential Sites of the Inflammatory Onset in Crohn's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072(1), 218–232. <https://doi.org/10.1196/annals.1326.028>
- Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S., Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., Yabashi, A., Waguri, S., Nakato, G., Kimura, S., Murakami, T., Imura, M., Hamura, K., Fukuoka, S.-I., Lowe, A. W., ... Ohno, H. (2009). Uptake through glycoprotein 2 of FimH<sup>+</sup> bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 462(7270), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature08529>
- Hay, J. W., & Hay, A. R. (1992). Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 14(4), 309–317. <https://doi.org/10.1097/00004836-199206000-00009>
- Herold, G. (2018). *Innere Medizin*. Herold, Gerd.
- Hoops, T. C., & Rindler, M. J. (1991). Isolation of the cDNA encoding glycoprotein-2 (GP-2), the major zymogen granule membrane protein: Homology to uromodulin/Tamm-Horsfall protein. *Journal of Biological Chemistry*, 266(7), 4257–4263.
- Hovde, Ø. (2012). Epidemiology and clinical course of Crohn's disease: Results from observational studies. *World Journal of Gastroenterology*, 18(15), 1723–1731. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i15.1723>
- Ishimoto, H. (2004). Endoscopic identification of Peyer's patches of the terminal ileum in a patient with Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, 10(18), 2767. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i18.2767>
- Jacobsen, B. a, Fallingborg, J., Rasmussen, H. H., Nielsen, K. R., Drewes, A. M., Puho, E., Nielsen, G. L., & Sørensen, H. T. (2006). Increase in incidence and

- prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18(6), 601–606. <https://doi.org/10.1097/00042737-200606000-00005>
- Joossens, S., Reinisch, W., Vermeire, S., Sendid, B., Poulain, D., Peeters, M., Geboes, K., Bossuyt, X., Vandewalle, P., Oberhuber, G., Vogelsang, H., Rutgeerts, P., & Colombel, J. (2002). The value of serologic markers in indeterminate colitis: A prospective follow-up study. *Gastroenterology*, 122(5), 1242–1247. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32980>
- Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E., & Wassarman, P. M. (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biology*, 4(6), 457–461. <https://doi.org/10.1038/ncb802>
- Kasper, H., & Burghardt, W. (2014). *Ernährungsmedizin und Diätetik* (12th ed.). Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
- Komorowski, L., Teegen, B., Probst, C., Aulinger-Stöcker, K., Sina, C., Fellermann, K., & Stöcker, W. (2013). Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: The glycoproteins CUZD1 and GP2. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(10), 780–790. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.10.011>
- Krogfelt, K. A., Bergmans, H., & Klemm, P. (1990). Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of Escherichia coli type 1 fimbriae. *Infection and Immunity*, 58(6), 1995–1998. <https://doi.org/10.1128/IAI.58.6.1995-1998.1990>
- Kucharzik, T., Dignass, A. U., Atreya, R., Bokemeyer, B., Esters, P., Herrlinger, K., Kannengießer, K., Kienle, P., Langhorst, J., Lügering, A., Schreiber, S., Stallmach, A., Stein, J., Sturm, A., Teich, N., & Siegmund, B. (2019). Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 57(11), 1321–1405. <https://doi.org/10.1055/a-1015-7265>
- Lecis, P., Germanà, B., Papa, N., Bertiato, G., Doglioni, C., Galliani, E., & Biedo, F. C. (2002). [p-ANCA and ASCA antibodies in the differential diagnosis between ulcerative rectocolitis and Crohn's disease]. *Recenti progressi in medicina*, 93(5), 308–313. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050913>

- Lerner, A. (2014). Autoantibody Profile in Inflammatory Bowel Disease. In *Autoantibodies* (Third Edit, Issue 2006, pp. 419–424). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56378-1.00049-6>
- Mankertz, J., & Schulzke, J.-D. (2007). Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(4), 379–383. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32816aa392>
- Masoodi, I., Tijjani, B. M., Wani, H., Hassan, N. S., Khan, A. B., & Hussain, S. (2011). Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review. *German Medical Science: GMS e-Journal*, 9, Doc03. <https://doi.org/10.3205/000126>
- Mayrer, A. R., Kashgarian, M., Ruddle, N. H., Marier, R., Hodson, C. J., Richards, F. F., & Andriole, V. T. (1982). Tubulointerstitial nephritis and immunologic responses to Tamm-Horsfall protein in rabbits challenged with homologous urine or Tamm-Horsfall protein. *Journal of Immunology*, 128(6), 2634–2642. <http://www.jimmunol.org/content/128/6/2634.abstract>
- Meißner, T. (2017). Biomarker machen die Therapie einfacher. *CME*, 14(7–8), 28–28. <https://doi.org/10.1007/s11298-017-6261-1>
- Meyerhoff Inflammatory Bowel Disease Center. (2020). *About IBD: Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*. [https://www.hopkinsmedicine.org/inflammatory\\_bowel\\_disease\\_center/about\\_ibd/](https://www.hopkinsmedicine.org/inflammatory_bowel_disease_center/about_ibd/)
- Michaels, M. A. (2017). Autoantikörper gegen die pankreatischen Glykoproteine GP2 und CUZD1 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen - Eine Phänotypen-Analyse -. Universität zu Lübeck.
- 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. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(12), 2864–2872. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000564>

- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie* (9th ed.). Springer Spektrum.
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, *390*(10114), 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Op De Beéck, K., Vermeire, S., Rutgeerts, P., & Bossuyt, X. (2012). Antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in inflammatory bowel diseases. *Gut*, *61*(1), 162.3-164. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.233148>
- Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S. C., & Colombel, J.-F. (2018). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, *67*(3), 574–587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>
- Papp, M., Sipeki, N., Tornai, T., Altorjay, I., Norman, G. L., Shums, Z., Roggenbuck, D., Fechner, K., Stöcker, W., Antal-Szalmás, P., Veres, G., & Lakatos, P. L. (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]. *Journal of Crohn's and Colitis*, *9*(8), 659–668. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv087>
- Park, S. W., Choi, K., Kim, I. C., Lee, H. H. B., Hooper, N. M., & Park, H. S. (2001). Endogenous glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C releases renal dipeptidase from kidney proximal tubules in vitro. *Biochemical Journal*, *353*(2), 339. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3530339>
- Pavlidis, P., Romanidou, O., Roggenbuck, D., Mytilinaïou, M. G., Al-Sulttan, F., Liaskos, C., Smyk, D. S., Koutsoumpas, A. L., Rigopoulou, E. I., Conrad, K., Forbes, A., & Bogdanos, D. P. (2012). Ileal Inflammation May Trigger the Development of GP2-Specific Pancreatic Autoantibodies in Patients with Crohn's Disease. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*(M), 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/640835>

- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, *14*(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Preiß, J., Bokemeyer, B., Buhr, H., Dignaß, A., Häuser, W., Hartmann, F., Herrlinger, K., Kaltz, B., Kienle, P., Kruis, W., Kucharzik, T., Langhorst, J., Schreiber, S., Siegmund, B., Stallmach, A., Stange, E., Stein, J., & Hoffmann, J. (2014). Aktualisierte S3-Leitlinie – „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ 2014. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, *52*(12), 1431–1484. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1385199>
- Preiß, J. C., Bokemeyer, B., & Buhr, H.-J. (2014). Aktualisierte S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des M . Crohn. *AWMF Leitlinienregisternummer 021-004, 021*, 1–121.
- Prenzler, A., Mittendorf, T., Conrad, S., von der Schulenburg, J.-M., & Bokemeyer, B. (2009). Die direkten Kosten der Versorgung von Patienten mit Morbus Crohn aus der Perspektive der Gesetzlichen Krankenversicherung. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, *47*(07), 659–666. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1109059>
- Price, A. (1978). Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *Journal of Clinical Pathology*, *31*(6), 567–577. <https://doi.org/10.1136/jcp.31.6.567>
- Quinton, J., Sendid, B., Reumaux, D., Duthilleul, P., Cortot, A., Grandbastien, B., Charrier, G., Targan, S. R., Colombel, J., & Poulain, D. (1998). Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut*, *42*(6), 788–791. <https://doi.org/10.1136/gut.42.6.788>
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*, *118*(2), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>
- Reimund, J. M., Wittersheim, C., Dumont, S., Muller, C. D., Kenney, J. S., Baumann, R., Poindron, P., & Duclos, B. (1996). Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal

- intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut*, 39(5), 684–689. <https://doi.org/10.1136/gut.39.5.684>
- Renz-Polster, H., & Krautzig, S. (2013). *Basislehrbuch Innere Medizin* (5th ed.). Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
- Rindler, M. J., & 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. *European Journal of Cell Biology*, 53(1), 154–163. <http://europemc.org/abstract/MED/2076702>
- Roggenbuck, D., Hausdorf, G., Martinez-Gamboa, L., Reinhold, D., Buttner, T., Jungblut, P. R., Porstmann, T., Laass, M. W., Henker, J., Buning, C., Feist, E., & Conrad, K. (2009). Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut*, 58(12), 1620–1628. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.162495>
- Roggenbuck, D., Reinhold, D., Baumgart, D. C., Schierack, P., Conrad, K., & Laass, M. W. (2016). Autoimmunity in Crohn's Disease—A Putative Stratification Factor of the Clinical Phenotype. In *Advances in Clinical Chemistry* (1st ed., Vol. 77, pp. 77–101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.06.002>
- Roggenbuck, Dirk, Reinhold, D., Werner, L., Schierack, P., Bogdanos, D. P., & Conrad, K. (2013). Glycoprotein 2 Antibodies in Crohn's Disease. In *Advances in clinical chemistry* (Vol. 60, pp. 187–208). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407681-5.00006-4>
- Roth, C. (Carl R. G. + co K. (2016). Roti@Quant. In *Gebrauchsanweisung*.
- Satsangi, J. (2006). The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), 749–753. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.082909>
- Schaeffer, C., Santambrogio, S., Perucca, S., Casari, G., & Rampoldi, L. (2009). Analysis of Uromodulin Polymerization Provides New Insights into the Mechanisms Regulating ZP Domain-mediated Protein Assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 20(2), 589–599. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0876>
- Schierack, P., Rödiger, S., Kolenda, R., Hiemann, R., Berger, E., Grzymajło, K., Swidsinski, A., Juretzek, T., Meissner, D., Mydlak, K., Reinhold, D., Nolan, L.

- K., & Roggenbuck, D. (2015). Species-specific and pathotype-specific binding of bacteria to zymogen granule membrane glycoprotein 2 (GP2). *Gut*, *64*(3), 517 LP – 519. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307854>
- Spehlmann, M. E., Begun, A. Z., Burghardt, J., Lepage, P., Raedler, A., & Schreiber, S. (2008). Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: Results of a nationwide study. *Inflammatory Bowel Diseases*, *14*(7), 968–976. <https://doi.org/10.1002/ibd.20380>
- Stöcker, W., Otte, M., Ulrich, S., Normann, D., Finkbeiner, H., Stöcker, K., Jantschek, G., & Scriba, P. C. (1987). Autoimmunity to Pancreatic Juice in Crohn's Disease Results of an Autoantibody Screening in Patients with Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *22*(sup139), 41–52. <https://doi.org/10.3109/00365528709089774>
- Tesija Kuna, A. (2013). Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochemia Medica*, *23*(1), 28–42. <https://doi.org/10.11613/BM.2013.006>
- Tremaine, W. J. (2011). Diagnosis and treatment of indeterminate colitis. *Gastroenterology & Hepatology*, *7*(12), 826–828. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22347823>
- Tysk, C., Lindberg, E., Jarnerot, G., & Floderus-Myrhed, B. (1988). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*, *29*(7), 990–996. <https://doi.org/10.1136/gut.29.7.990>
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Ponten, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, *347*(6220), 1260419–1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. C. (2006). Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection.

- Gastroenterology*, 131(1), 117–129.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>
- Walker, L. J., Aldhous, M. C., Drummond, H. E., Smith, B. R. K., Nimmo, E. R., Arnott, I. D. R., & Satsangi, J. (2004). Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) in Crohn's disease are associated with disease severity but not NOD2/CARD15 mutations. *Clinical and Experimental Immunology*, 135(3), 490–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2003.02392.x>
- Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., & Strober, W. (2004). NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunology*, 5(8), 800–808. <https://doi.org/10.1038/ni1092>
- Wehkamp, J., Götz, M., Herrlinger, K., Steurer, W., & Stange, E. F. (2016). Inflammatory Bowel Disease: Crohn's disease and ulcerative colitis. *Deutsches Arzteblatt Online*, 113(5), 72–81. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0072>
- Werner, L., Paclik, D., Fritz, C., Reinhold, D., Roggenbuck, D., & Sturm, A. (2012). Identification of Pancreatic Glycoprotein 2 as an Endogenous Immunomodulator of Innate and Adaptive Immune Responses. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2774–2783. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103190>
- Westerlund-Wikström, B., & Korhonen, T. K. (2005). Molecular structure of adhesin domains in Escherichia coli fimbriae. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6–7), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.06.010>
- Wood, M. B., Rios, D., & Williams, I. R. (2016). TNF- $\alpha$  augments RANKL-dependent intestinal M cell differentiation in enteroid cultures. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 311(3), C498–C507. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00108.2016>
- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427–434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>
- Yu, S., & Lowe, A. W. (2009). The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds Escherichia colitype 1 Fimbriae. *BMC Gastroenterology*, 9(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-9-58>
- Yu, S., Michie, S. A., & Lowe, A. W. (2004). Absence of the Major Zymogen Granule

Membrane Protein, GP2, Does Not Affect Pancreatic Morphology or Secretion.  
*Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 50274–50279.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M410599200>

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.	1
Abbildung 2. Beispielhafte Basisdiagnostik bei Patienten mit Verdacht auf Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.	8
Abbildung 3. Medikamentöse Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.	9
Abbildung 4. Schematische Darstellung von der Proteinstrukturen von GP2-#2 und GP2-#4.	15
Abbildung 5. Reinheitsbestimmung der rekombinanten humanen Proteine GP2-#2 und GP2-#4 mittels Coomassie Blau Färbung.	25
Abbildung 6. Reinheitsbestimmung von rekombinanten humanen Glykoproteinen im Western Blot.	26
Abbildung 7. Erhöhte Expression von GP2-#4 im Ileum von Morbus Crohn Patienten.	28
Abbildung 8. Erhöhte Expression von GP2-#4 im Kolon von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.	29
Abbildung 9. Keine intestinale Expression von GP2-#2.	30
Abbildung 10. IgG-Autoantikörper gegen humanes Glykoprotein 2 in humanen Seren.	31
Abbildung 11. IgG-Autoantikörperlevel gegen humanes Glykoprotein #2 und humanes Glykoprotein #4 im Serum von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.	32
Abbildung 12. Erhöhte IgA-Autoantikörperlevel in Seren von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.	33
Abbildung 13. IgG-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2 und an GP2-#4 korrelieren miteinander.	34
Abbildung 14. IgA-Autoantikörperlevel gegen GP2 Isoformen korrelieren in Seren von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.	35
Abbildung 15. Krankheitsaktivität im Ileum und Ileokolon ist assoziiert mit hohen IgG-Autoantikörperlevel gegen GP2-#2.	36
Abbildung 16. Hohe Anti-GP2-#2-IgA-Autoantikörperlevel sind assoziiert mit Krankheitslokalisation im Ileum und Ileokolon.	37
Abbildung 17. Geschlechterspezifische Autoantikörperlevel.	39

Abbildung 18. Anti-GP2-#2-IgG-Autoantikörperlevel korrelieren signifikant mit dem CRP-Wert im Patientenserum.	41
Abbildung 19. Anti-GP2-#4-IgG-Autoantikörperlevel stehen in keinem Zusammenhang zu den untersuchten Merkmalen.	42
Abbildung 20. Zusammenhang zwischen Anti-GP2-#2-IgA und phänotypischen Charakteristika von MC Patienten.	44
Abbildung 21. Leukozyten und CRP im Blut korrelieren mit anti-GP2-#4-IgA-Autoantikörperlevel.	45
Abbildung 22. Korrelation der medikamentösen Therapie und dem Autoantikörperlevel im Serum von Morbus Crohn Patienten.	46
Abbildung 23. Einfluss von Morbus Crohn Seren auf die Zellviabilität von GP2 exprimierenden Zellen.	48
Abbildung 24. Seren von Patienten führen zu keinen zytotoxischen Effekten gegenüber GP2-#2 oder GP2-#4 exprimierenden Zellen.	49

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Morbus Crohn Einteilung nach Montreal.	6
Tabelle 2. Ausdehnung der Colitis ulcerosa nach Montreal.	6
Tabelle 3. Bisherige Forschungsergebnisse zu den Assoziationen von Autoantikörper gegen GP2 und Phänotypen.	14
Tabelle 4. Überblick über die Studienpopulation.	18
Tabelle 5. Übersicht der Transfektionsansätze.	20
Tabelle 6. Übersicht der verwendeten Antikörper im Western Blot.	22
Tabelle 7. Verwendete Reagenzien im ELISA.	24

## 10 Ethik

Die Versuche wurden genehmigt durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (AZ 13/084A) und der Universität Münster (AZ 2016-305-b-S).



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn  
PD Dr. med. Christian Sina  
Medizinische Klinik I

im Hause

### Ethik-Kommission

Vorsitzender:  
Herr Prof. Dr. med. A. Katalinic  
Stellv. Vorsitzender  
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler  
Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

Geschäftsstelle: Dr. phil. A. Hüppe  
Tel.: +49 451 500 5854  
Fax: +49 451 500 3026  
ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 13-084A

Datum: 30. April 2013

### **Pankreatische Autoantikörper (pAB) und phänotypologische Datenanalyse bei Morbus Crohn Hier: Erweiterung der Anzeige - Ihr Schreiben vom 30.01.2014**


Sehr geehrter Herr Dr. Sina,

mit Ihrem o.g. Schreiben informieren Sie die Ethik-Kommission über Ihre geplante Erweiterung um die Patientenkohorte, deren Autoantikörperstatus in einer abgeschlossenen Studie bestimmt wurde (05-112).

Es werden ausschließlich bereits vorliegende anonymisierte Daten verarbeitet.

Die Ethik-Kommission hat keine Bedenken.

Mit freundlichem Gruß bin ich

  
Prof. Dr. med. A. Katalinic  
Vorsitzender

## Patientenschutz | Forschungsfreiheit

ÄRZTEKAMMER  
WESTFALEN-LIPPEWESTFÄLISCHE  
WILHELMS-UNIVERSITÄT  
MÜNSTERETHIK  
KOMMISSIONder Ärztekammer Westfalen-Lippe und  
der Westfälischen Wilhelms-Universität

Ethik-Kommission Münster · Gartenstraße 210 – 214 · 48147 Münster

Herrn  
 PD Dr. med. Dominik Bettenworth  
 Universitätsklinikum-Münster  
 Med. Klinik und Poliklinik B (Stoffw. u.  
 Gastroenterologie)  
 Albert-Schweitzer-Campus 1  
 48149 Münster

Gartenstraße 210 – 214  
 48147 Münster, Germany  
 Tel.: +49 (0)251 929 2460  
 Fax: +49 (0)251 929 2478  
 E-Mail: ethik-kommission@aeckwl.de  
 www.ethik-kommission.uni-muenster.de  
 27. Juli 2016

**Unser Aktenzeichen:**                    **2016-305-b-S**                    (bitte immer angeben!)

Prüfplancode:                                Gastrointestinaltrakt

Sponsor:

Titel des Forschungsvorhabens:

„Identifizierung von Biomarkern bei Patienten mit chronische entzündlichen Barrierestörungen des Gastrointestinaltraktes“

Sehr geehrter Herr Doktor Bettenworth,

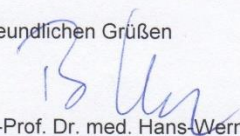
Sie haben der Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster mit Schreiben vom 11.07.2016 mitgeteilt, dass Sie sich an der oben genannten multizentrischen Studie beteiligen wollen. Dafür danken wir Ihnen. Die Kommission hat die oben näher bezeichneten Unterlagen zur Kenntnis genommen.

Danach schließt sich unsere Kommission dem Erstvotum der **Ethik-Kommission, Medizinische Fakultät der Universität zu Lübeck Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck an.** - Somit bestehen seitens der Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster grundsätzlich weder ethische noch juristische Bedenken gegen Ihre Beteiligung an der oben genannten Studie. Sie sind damit Ihrer Berufspflicht nach § 15 Abs. 1 der Berufsordnung der Ärztekammer Westfalen-Lippe nachgekommen.

Die Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der WWU Münster bittet um Zusendung von SAE-Meldungen mit entsprechender Stellungnahme der erstvotierenden Ethik-Kommission nur dann, wenn ein verändertes Nutzen-Risiko-Profil der Prüfsubstanz vorliegt.

Für die Entscheidung der Ethik-Kommission erhebt die Ärztekammer Westfalen-Lippe Gebühren nach Maßgabe ihrer Verwaltungsgebührenordnung. Über die ermäßigten Gebühren erhalten Sie von der Ärztekammer einen gesonderten Bescheid.

Mit freundlichen Grüßen

  
 Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Werner Bothe M.A.  
 Vorsitzender der Ethik-Kommission

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. H.-W. Bothe M.A. phil  
 Stellvertretende Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel, Prof. Dr. phil. C. Frantz, Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Müller

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Vollendung meiner Dissertation unterstützt haben.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Christian Sina und meiner Betreuerin, Dr. rer. nat. Stefanie Derer danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im Institut für Ernährungsmedizin anfertigen zu können. Besonderes danken möchte ich für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik, die ausgezeichnete Betreuung und die fachliche Unterstützung.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. med. Dominik Bettenworth und Dr. med. Arne Bokemeyer für die Kooperation.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern der AG Molekulare Gastroenterologie für die herzliche Aufnahme und die Heranführung an das experimentelle Arbeiten bedanken. Insbesondere möchte ich Ann-Kathrin Brethack, Annika Sünderhauf, Heidi Schlichting, Kerstin Skibbe und Maren Hicken erwähnen. Vielen Dank für Eure stetige Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern Ilse Lore und Michael Pietsch und meinem Großvater Manfred Pietsch danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung.

Ich möchte meiner Schwester Lioba Pietsch danken, die zu jedem Zeitpunkt ein offenes Ohr für mich hat und mich mein ganzes Leben liebevoll begleitet.

## 12 Veröffentlichung

### 12.1 Publikation in der Fachzeitschrift *Inflammatory Bowel Diseases*

Im März 2020 wurden Teile der Ergebnisse zur Publikation in der Fachzeitschrift *Inflammatory Bowel Diseases* zur Veröffentlichung zugelassen.

#### **Inflammatory Bowel Disease–associated GP2 Autoantibodies Inhibit Mucosal Immune Response to Adherent-invasive Bacteria**

Stefanie Derer, PhD,<sup>\*,#</sup> Ann-Kathrin Brethack,<sup>\*,#</sup> Carlotta Pietsch,<sup>\*</sup> Sebastian T. Jendrek, MD,<sup>†</sup> Thomas Nitzsche, PhD,<sup>\*,‡</sup> Arne Bokemeyer, MD,<sup>§</sup> Johannes R. Hov, MD,<sup>¶</sup>, Holger Schäffler, MD<sup>\*\*</sup>, Dominik Bettenworth, MD,<sup>§</sup> Guntram A. Grassl, PhD,<sup>††</sup>, und Christian Sina, MD<sup>\*,‡‡</sup>

\*Institut für Ernährungsmedizin, Molekulare Gastroenterologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland; † Klinik für Rheumatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck, Deutschland ; ‡ Institut für experimentelle Immunologie, Euroimmun, Lübeck, Deutschland; § Medizinische Klinik B für Gastroenterologie and Hepatologie, Universität Münster, Münster, Deutschland; ¶ Institute of Clinical Medicine, Universität Oslo, Oslo, Norwegen; ¶¶ Norwegian PSC Research Center, Section of Gastroenterology and Research Institute of Internal Medicine, Division of Surgery, Inflammatory Diseases and Transplantation, Oslo Universitätsklinikum, Oslo, Norwegen; \*\* Klinik II, Abteilung für Gastroenterologie, Rostock Universitätsmedizin Rostock, Germany; †† Institut für Medizinische Mikrobiologie Krankenhaushygiene Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), Hannover- Braunschweig, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland; ‡‡ Medizinische Klinik 1, Sektion für Ernährungsmedizin Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland

# Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen.

## 12.2 Postervorstellung auf der DGVS-Jahrestagung 2019

Am 03.10.2019 wurden Teile der Ergebnisse auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) in Wiesbaden vorgestellt.

**„Glykoprotein 2 Variante 4 gerichtete Autoantikörper inhibieren die Immunantwort gegenüber invasiven adhärennten Bakterien bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen“**

Brethack AK<sup>1</sup>, Pietsch C<sup>1</sup>, Bokemeyer A<sup>2</sup>, Bettenworth D<sup>2</sup>, Hov J<sup>3</sup>, Grassl G<sup>4</sup>, Sina C<sup>1,5</sup>, Derer S<sup>1</sup>

Institut 1 UKSH Campus Lübeck, Institut für Ernährungsmedizin, Lübeck, Deutschland; 2 Medizinische Klinik B für Gastroenterologie und Hepatologie, Universitätsklinikum Münster, Münster, Deutschland; 3 Research Institute of Internal Medicine, Oslo University Hospital Rikshospitalet, Oslo, Norwegen; 4 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene und Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland; 5 Medizinische Klinik 1, Sektion für Ernährungsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Lübeck, Deutschland