

**Aus der Sektion Medizin
der Universität zu Lübeck
Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. med. K.-F. Klotz**

**Und dem Institut für Experimentelle Immunologie, Euroimmun
Direktor: Prof. Dr. med. W. Stöcker**

**Identifizierung DNA-komplexierter
Granulocytenproteine als Zielantigene
Colitis-ulcerosa-assoziiierter Autoantikörper**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. hum. biol.

an der Universität zu Lübeck

- Sektion Medizin -

vorgelegt von

Bianca Teegen, geb. Splitt

aus Schwerin

Lübeck 2012

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Winfried Stöcker

2. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Büning

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2013

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 05.06.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Identifizierung DNA-komplexierter Granulocytenproteine als Zielantigene Colitis-ulcerosa-assoziiierter Autoantikörper

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Klinisches Bild der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.....	4
1.2	Pathogenese und Therapie	6
1.3	Allgemeine Diagnostik.....	10
1.4	Autoantikörper.....	13
1.5	Zielstellung der Arbeit	21
2	Material und Geräte	22
2.1	Serumproben	22
2.2	Reagenzien	23
2.3	Geräte	30
3	Methoden	31
3.1	Indirekte Immunfluoreszenz (IIF).....	31
3.2	Antigen-Depletion und -Rekonstituierung.....	34
3.2.1	Behandlung der P-ANCA-Zielantigen-Substrate mit Salzlösungen	
	(Depletion) oder Nukleasen (Verdau).....	34
3.2.2	Rekonstituierung depletierter Granulocyten	35
3.2.3	Herstellung eines standardisierten Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten-Substrats	36
3.2.4	Laktoferrin-Applikation auf HEp-2-Zellen und Gewebeschnitte	37
3.3	Formaldehyd-Fixierung	37
3.4	Proteinchemische Methoden.....	38
3.4.1	Herstellung von Granulocyten-Extrakten.....	38
3.4.2	Chromatographie-Verfahren	38
3.4.3	Proteinfärbungen.....	39
3.4.4	Westernblot-Analytik	40
3.4.5	MALDI-ToF Massenspektrometrie	41
3.4.6	ELISA zum Nachweis CU-assoziiierter P-ANCA	42
3.5	Monoklonale P-ANCA	43
3.6	Molekularbiologische Methoden.....	45
3.7	Untersuchung der Prävalenz CU-assoziiierter P-ANCA.....	49

4	Ergebnisse	51
4.1	Einfluss verschiedener Reagenzien auf die Reaktivität der CU-relevanten P-ANCA-Testsubstrate	51
4.1.1	Effekt der Applikation hoher Ionenstärken	51
4.1.2	Effekt von Nukleasen	52
4.1.3	Effekt weiterer Reagenzien	55
4.2	Identität der Granulocyten-Hauptziel-Antigene	57
4.2.1	Protein-Chromatogramme.....	57
4.2.2	MALDI-ToF Massenspektrogramme	59
4.2.3	Rekombinantes Laktoferrin als IIFT-Substrat.....	62
4.2.4	Reaktivität Anti-Laktoferrin-Antikörper im Westernblot.....	63
4.3	Reaktivität DNA-komplexierter Granulocytenproteine (DNA-ANCA)	66
4.3.1	Reaktivität depletierter Granulocyten nach Rekonstitution.....	66
4.3.2	Alternative IFT-Substrate für die Laktoferrin-Applikation.....	73
4.3.3	Arretierung des Laktoferrins durch Formaldehyd	75
4.4	Autoantikörper-Prävalenzen.....	76
4.4.1	Prävalenz DNA-ANCA bei CED und PSC.....	76
4.4.2	IgG-Subklassen Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper	83
4.4.3	Reaktivität Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper im ELISA.....	83
4.4.4	Vorkommen von Anti-DNA-Azurocidin-Antikörpern bei CED	86
5	Diskussion.....	88
5.1	Identifikation der Zielantigene CU-assoziiierter P-ANCA	88
5.2	Physiologische Bedeutung Laktoferrin und Azurocidin	91
5.3	Neutrophil Extracellular Traps (NETs).....	94
5.4	Überwindung von Irrtümern zum fixierungsabhängigem Verhalten von P-ANCA	95
5.5	Prävalenz der DNA-ANCA bei CU, MC und PSC	97
6	Zusammenfassung.....	102
7	Literaturverzeichnis	105

1 Einleitung

Colitis ulcerosa (CU) gehört wie Morbus Crohn (MC) zu den chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED). Da beide Entitäten durch eine Entzündung der Darmschleimhaut charakterisiert sind, ähneln sich manche Symptome stark. Allerdings unterscheiden sich beide Krankheiten in Art, Ausdehnung und Lokalisation der Entzündung.

Die CU ist eine chronisch-rezidivierende Darmentzündung, die im Regelfall im Rektum beginnt und von dort kontinuierlich zum Kolon hin fortschreitet. Der Entzündungsprozess ist bei der CU auf die Schleimhaut beschränkt.

Die Entzündung bei MC dagegen kann den gesamten Gastrointestinaltrakt von der Mundhöhle bis zum Anus, insbesondere das untere Ileum und das Kolon betreffen. Sie verläuft diskontinuierlich: Entzündete und gesunde Bereiche liegen unmittelbar nebeneinander. Im Unterschied zur CU sind alle Schichten der Darmwand betroffen.

In 10% aller Fälle ist es trotz umfassender Diagnostik nicht möglich, zwischen CU und MC zu unterscheiden. Man spricht dann von einer Colitis indeterminata (Price, 1978). Meistens ist aber bei fortschreitender Erkrankung später eine eindeutige Diagnose als CU oder MC möglich.

In Deutschland sind mehr als 300.000 von CED betroffen (Prävalenz 0,4%). Die Inzidenz für CU wurde zuletzt mit 6 pro 100.000 Einwohner angegeben, die für MC mit 5 pro 100.000 Einwohner (Hoffmann et al., 2004, Hoffmann et al., 2008). Der Altersgipfel für die Erstmanifestation eines MC liegt bei 15 bis 24 Jahren, bei CU etwa 5 bis 10 Jahre später. Bei 15 bis 40% der Patienten treten die ersten Symptome vor dem 20. Lebensjahr auf (Stange et al., 2001). Während bei CU Männer geringfügig häufiger betroffen sind (RR 0,8), ist es bei MC umgekehrt (RR 1,2) (Timmer, 2004).

Oft ist die Lebensqualität der Patienten durch ihre chronische und in Schüben verlaufende Erkrankung stark beeinträchtigt. Neben Phasen hoher

Krankheitsaktivität treten oft lange Abschnitte relativer Gesundheit (Remission) auf.

1.1 Klinisches Bild der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Bereits 1761 beschrieb der italienische Anatom Giovanni Battista Morgagni einen Patienten mit einem Krankheitsbild, welches man heute einem Morbus Crohn zuordnen würde. 1932 veröffentlichten die amerikanischen Ärzte Burril B. Crohn, Leon Ginzburg und Gordon D. Oppenheimer zusammen eine wegweisende Arbeit zur „terminalen Ileitis“ (Crohn et al., 1932). Der Londoner Arzt Samuel Wilks berichtete 1859 erstmals von der Colitis ulcerosa (Wilks, 1859). Seine Arbeiten wurden 1931 durch Arthur Hurst bestätigt (Hurst, 1931).

Die klinischen Symptome der CU sind durch die entzündlichen Veränderungen und deren Folgen an der Darmwand bedingt. Typische Krankheitszeichen sind blutig-schleimige Diarrhöe und schmerzhafter Stuhldrang. Es kommt zu Gewichtsabnahme und spezifischen Mangelerscheinungen (Vitamine und Mineralstoffe), bei Kindern zu Wachstumsverzögerungen. Der MC manifestiert sich mit ähnlicher Symptomatik: Auch hier stehen lang anhaltende Diarrhöe, Leibschmerzen und Gewichtsverlust im Vordergrund.

Im Unterschied zu MC spielt sich die Entzündung bei CU nahezu ausschließlich in Rektum und Kolon ab. Mehrere Befallsmuster werden unterschieden: Laut Statistik sind 15% der Fälle ausschließlich auf das Rektum begrenzt (Proktitis), ein typischer Befund der Erstdiagnose. Bei 40% reicht die Entzündung bis zur linken Flexur des Kolons (Linksseitenkolitis). Das Colon transversum ist bei 25% mitbetroffen. 20% der Patienten leiden unter einer Pancolitis: Das gesamte Kolon ist entzündet. Sehr selten greift die Entzündung auf die hinteren Abschnitte des Ileums über (Backwash-Ileitis).

Typisch für MC ist dagegen das diskontinuierliche Befallsmuster. Bei 25 bis 40% der Betroffenen beschränkt sich die Darmentzündung auf das terminale Ileum. Das Rektum ist nur selten involviert. Bei 70% der Patienten sind auch

Bereiche des gesamten Gastrointestinaltrakts außerhalb von Ileum und Kolon betroffen.

Extraintestinale Manifestationen können ebenfalls zum Beschwerdebild beitragen. Dabei kommt es sowohl bei CU als auch bei MC zu Gelenkmanifestationen (Arthralgie, Arthritis, Synovialitis), Entzündungen der Augen (Uveitis, Episkleritis), der Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum) der Schleimhaut (Stomatitis aphthosa) sowie des Herzmuskels.

Insbesondere mit CU ist eine Erkrankung der Leber vergesellschaftet: die Primärsklerosierende Cholangiitis (PSC), eine chronisch-fibrosierende, die Gallengänge allmählich verschließende Leberkrankheit, die unbehandelt in eine Leberzirrhose übergeht. 16% der PSC-Patienten sind nicht auf Dauer medikamentös behandelbar und eine Lebertransplantation ist unumgänglich. Etwa 3 bis 8% aller Patienten mit CU haben gleichzeitig eine PSC. Umgekehrt liegt bei 50 bis 75% aller Patienten mit PSC eine CU vor (Raj und Lichtenstein, 1999, Reinshagen und Fölsch, 2004). Der Schweregrad der Darmkrankheit und der Gallenwegserkrankung korreliert nicht.

Eine lebensbedrohliche Komplikation der CU stellt das toxische Megakolon dar, eine massive Überdehnung des Kolons, bei dessen Entwicklung auch eine Cytomegalie-Virus-Infektion eine entscheidende Rolle spielen kann. Als schwerste Komplikation des toxischen Megakolons kann eine Darmperforation auftreten, in dessen Folge sich eine lebensbedrohliche Bauchfellentzündung entwickeln kann.

CU-Patienten haben ein erhöhtes Risiko, ein Kolonkarzinom zu entwickeln. Die Tumorgefahr steigt mit Ausdehnung und Dauer der Erkrankung und wird durch das Vorhandensein einer PSC noch erhöht. In der Studie von Eckbom et al. (Eckbom et al., 1990) war im Vergleich zu gesunden Personen das Tumor-Risiko für Patienten mit einer Proktitis um den Faktor 1,7, für Patienten mit einer Linksseitenkolitis um den Faktor 2,8 und für Patienten mit einer ausgedehnten Colitis um den Faktor 14,8 erhöht.

Im Allgemeinen wird der akute Schub einer CU mit den typischen klinischen Beschwerden, insbesondere blutig-schleimiger Diarrhöe und gegebenenfalls Bauchkrämpfen charakterisiert. Mit dem Begriff „fulminante Colitis“ werden lebensbedrohliche Verlaufsformen beschrieben. Für diese ist ein akutes Auftreten mit rapider Progression innerhalb von 7 bis 14 Tagen typisch. Zu den wichtigsten Symptomen gehören Fieber, Diarrhöe ($>10/d$), Anämie und ein reduzierter Allgemeinzustand. Der chronisch aktive Verlauf ist dadurch gekennzeichnet, dass Medikamente nicht ansprechen oder keine vollständige und dauerhafte Remission (<2 Rezidive pro Jahr) ausgelöst wird (Stange et al., 2001). Bei MC unterscheidet man zwischen akutem Schub, Remission, chronischem Verlauf sowie steroid-refraktärem und steroidabhängigem Verlauf (Hoffmann et al., 2008).

In Studien hat sich für die CU der Rachmilewitz-Index durchgesetzt, der sich sowohl aus einem klinischen Aktivitätsindex als auch einem endoskopischem Index zusammensetzt. Aufgrund seiner Komplexität hat er sich im klinischen Alltag aber nicht bewährt. Die Klassifikation nach Truelove und Witts wird für die Identifizierung besonders schwerer CU-Fälle eingesetzt (Truelove und Witts, 1955).

Für MC steht mit dem Crohn's Disease Activity Index (CDAI) nach Best ein Index zur Verfügung, der sehr gut die Aktivität der Erkrankung widerspiegelt. Vereinfachter, da nur auf die klinischen Parameter beschränkt, ist der Harvey-Bradshaw-Index. Beide Indizes reflektieren vor allem die Schwere der Erkrankung. Durch die Wien-Klassifikation wird eine Einteilung der Patienten nach Alter, Lokalisation und Phänotyp vorgenommen. Diese hat das Ziel, Patientensubgruppen nach objektivierbaren Variablen zu definieren.

1.2 Pathogenese und Therapie

Die Ätiologie der CED ist bisher unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung. Grundsätzlich geht man davon aus, dass das Zusammenspiel einer Reihe verschiedener Faktoren (Genetik, Immunsystem, Umwelt) eine Rolle spielt. Genetische Forschungen dokumentierten eine hohe Konkordanz bei monozygoten Zwillingen (Thompson et al., 1996). Eine Arbeitsgruppe (Orholm et al., 1991)

zeigte, dass Verwandte ersten Grades von CU- und MC-Patienten ein 10fach höheres Risiko haben, eine von beiden Erkrankungen zu bekommen. Auch für Verwandte zweiten Grades besteht ein erhöhtes Erkrankungsrisiko.

Die genannten Studien stellten die Basis für genomweite Untersuchungen von Familien mit CED-Betroffenen dar. Dabei wurden krankheitsspezifische Loci auf den Chromosomen 16 (IBD1) und 12 (IBD2) und potentielle Loci auf den Chromosomen 1, 3, 6 und 7 identifiziert (Hugot et al., 1996). Gleich drei Forschergruppen konnten 2001 erstmalig das Auftreten eines Krankheitsgens in der Region IBD1 auf Chromosom 16q entschlüsseln (Hugot et al., 2001, Hampe et al., 2001, Ogura et al., 2001). In anderen Kohorten konnte gezeigt werden, dass es einen klaren Zusammenhang zwischen Mutationen im NOD-2-Gen (neue Nomenklatur CARD15) und dem Auftreten von MC, insbesondere mit Ileumbefall, gibt. Die Höhe des Risikos, an MC zu erkranken, hängt davon ab, wie ausgeprägt die Mutationen sind und ob beide Allele betroffen sind. Allerdings ist diese Mutation bei Patienten aus Japan und Korea nicht vorhanden (Inoue et al., 2002).

Im Jahre 2008 konnte zudem gezeigt werden, dass einige Morbus-Crohn-Risiko-Gene (IL23R, IL12B, HLA, NKX2-3, MST1, 3p21.31 und CCNY) gleichzeitig ein Colitis ulcerosa-Risiko bergen (Franke et al., 2008, Fischer et al., 2008). Insgesamt spielen genetische Faktoren bei CU aber eine geringere Rolle als bei MC; dagegen ist bei CU eine stärkere Abhängigkeit von Umweltfaktoren erkennbar als bei MC.

Zahlreiche klinische und immunologische Studien sehen CED als Ergebnis einer fehlerhaften permanenten Aktivierung des mukosalen Immunsystems durch die normale Darmflora (Podolsky, 2002). Danach wird die abnormale Immunantwort durch Defekte der Barrierenfunktion des Darmepithels erleichtert. Auch ein inkompetentes Immunsystem wird diskutiert. Tiermodelle mit experimentell ausgelöster Colitis zeigen, dass sich auch bei Vorliegen einer ganz normalen Bakterien-Flora Entzündungsprozesse entwickeln können. In keimfreien Tieren und bei der Behandlung von Nagern mit Antibiotika entwickeln sich dagegen unter sonst gleichen Bedingungen keine Entzündung bzw. die Symptomatik war deutlich schwächer (Rath et al., 1996).

Für die CU konnte in einigen Studien eine Assoziation mit bestimmten HLA (Histokompatibilitätskomplex)-Klasse-II-Strukturen festgestellt werden (Yang et al., 1993, Shanahan, 2001). Die HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Proteine sind maßgeblich an der Entwicklung der körpereigenen Toleranz beteiligt. Das gehäufte Auftreten bestimmter HLA-Typen bei CU sowie die Organspezifität und die hohe Prävalenz von Autoantikörpern bei CU (P-ANCA, Anti-Becherzell-Antikörper) sind wichtige Hinweise für eine autoimmune Genese der Erkrankung. Gerade das exklusive Vorkommen der Autoantikörper gegen intestinale Becherzellen bei Colitis ulcerosa ist möglicherweise Ausdruck einer pathogenetisch maßgeblichen Autoimmunität (Stöcker und Schlumberger, 2007).

Interessanterweise zeigen einige Autoantikörper Kreuzreaktivitäten mit bakteriellen Antigenen (Seibold et al., 1998, Cohavy et al., 2000). Sie könnten zu einer molekularen Mimikry führen, das heißt, es werden ursprünglich Antikörper gegen bakterielle Antigene gebildet. Durch eine hohe Ähnlichkeit zu gewebespezifischen Strukturen werden nachfolgend auch spezifische Autoantikörper gebildet.

Gemäß den aktuellen Leitlinien zur Behandlung von CU werden Aminosalicylate (5-ASA) zur Dauerbehandlung empfohlen, da sie entzündungshemmend wirken und gleichzeitig das Kolonkarzinom-Risiko verringern (Stange et al., 2001). Aminosalicylate schwächen einerseits die körpereigene Produktion von Entzündungsstoffen (Leukotriene, Interleukine) ab und unterbinden andererseits ihre Wirkung durch Blockade der Leukotrien- und Interleukin-Rezeptoren im Gewebe. Das führt zu einer Abheilung der Darmschleimhaut, so dass sich neues Gewebe bilden kann. Bei nicht ansprechender Therapie oder zur Primärbehandlung schwerer Schübe werden Kortikosteroide verabreicht - sehr wirksame Entzündungshemmer mit gleichzeitig sehr breiter Wirkung. Sie hemmen u.a. die Synthese von Cytokinen, die wiederum an der Aktivierung von Lymphocyten beteiligt sind, verhindern die Entwicklung von Monocyten zu Makrophagen und verändern über einen membranstabilisierenden Effekt die Durchlässigkeit für verschiedene Substanzen. Die immunsuppressive Wirkung ist aber nicht selektiv. Zur längerfristigen Immunsuppression kann Azathioprin eingesetzt werden. Azathioprin wirkt durch eine Hemmung der Lymphocyten-differenzierung. Unter

Therapie mit Azathioprin gelangen 75% der Patienten in eine Remission, die oftmals über viele Jahre aufrecht gehalten werden kann, und es können die mit starken Nebenwirkungen verbundenen Steroide reduziert werden. Beim steroid-refraktären Schub hat sich der Einsatz von Cyclosporin oder Tacrolimus bewährt, beide hemmen die Funktion der T-Lymphocyten.

Die medikamentöse Therapie des MC ist ebenfalls auf die Behandlung akuter Entzündungsschübe und die Vorbeugung erneuter Entzündungen in entzündungsfreien Intervallen gerichtet. Gemäß den Leitlinien (Hoffmann et al., 2008) sollte bei leichten bis mittelschweren Schüben das lokal wirkende Steroid Budenosid eingesetzt werden. Bei höherer Krankheitsaktivität wird mit systemisch wirkenden Glukokortikoiden behandelt, steroidrefraktäre Fälle mit Azathioprin. Bei bis zu 70% dieser Patienten führte auch der Einsatz mit monoklonalen Antikörpern gegen den Tumor-Nekrose-Faktor- α (Infliximab) zu einem Therapieerfolg. Cyclosporin und Tacrolimus spielen bei der Behandlung des MC nur eine untergeordnete Rolle.

Bei CU sind in medikamentös-therapierefraktären Situationen Operationen nötig, bei denen in der Regel das Kolon komplett entfernt wird. Es wird ein ileoanaler Pouch angelegt, d.h. aus dem terminalen Ileum wird ein Reservoir geschaffen, welches den Dünndarminhalt sammelt und das Rektum ersetzt. Die direkte Entleerung wird damit hinausgezögert. Im Langzeitverlauf entwickeln 50% der CU-Patienten mit einem Pouch eine Pouchitis. Weitere Indikationen für Operationen sind das toxische Megakolon, Darmperforationen sowie Kolonkarzinome. Auch bei MC ist teilweise das Entfernen entzündeter Darmbereiche unumgänglich. Außerdem werden chirurgische Maßnahmen zur Erleichterung der Symptome bei Fisteln, Abszessen und Stenosen durchgeführt.

Durch eine gezielte Ernährungstherapie wird Unter- bzw. Mangelernährung entgegengewirkt. Diese Therapie findet meist ergänzend zur oralen Ernährung mittels Trinkdiäten oder über Sonden statt. Bei CU konnte kein positiver Einfluss der Ernährung auf die Remissionsinduktion und Remissionserhaltung belegt werden. Zurückhaltend wird bisher der Einsatz von Probiotika bei der Remissionserhaltung von der Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen beurteilt. Es gibt bisher nur wenige

Studien, die die Wirksamkeit der Gabe des *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 belegen (Stange et al., 2001).

1.3 Allgemeine Diagnostik

Die Diagnostik der CED stützt sich hauptsächlich auf klinische Untersuchung, Endoskopie und Histologie.

Eine **Endoskopie** des unteren Gastrointestinaltraktes mit Entnahme von Stufenbiopsien gehört zur Initialdiagnostik bei CED. Typische endoskopische Befunde für eine aktive CU sind eine diffus entzündete Schleimhaut mit Rötung und Ulzera, Rektumbefall (95%), kontinuierlicher Übergang zu den nicht entzündeten Bereichen und Kontaktblutungen.

Die Ultraschall-Untersuchung erlaubt die Beurteilung der Ausdehnung der Infiltration und möglicher Komplikationen. Die einfache und patientenfreundliche Durchführung ist von Vorteil, die Ergebnisse sind allerdings oftmals abhängig vom Untersuchenden. Durch Röntgenuntersuchungen wird insbesondere ein toxisches Megakolon diagnostiziert. Ergänzende bildgebende Verfahren wie Magnetresonanz- und Computertomografie sind bei unklaren Befunden oder Verdacht auf Komplikationen erforderlich.

Makroskopisch ist bei der CU in frühen Stadien eine entzündlich gerötete Schleimhaut mit Kontaktblutungen zu erkennen. Später liegen deutliche Geschwüre, Schleimhautzerstörungen und häufig sogenannte Pseudopolypen vor. Durch die Entnahme von Stufenbiopsien aus dem terminalen Ileum, dem Rektum und jedem Kolonsegment sowohl makroskopisch betroffener als auch freier Abschnitte ist eine Diagnosestellung mit einer Spezifität und Sensitivität in der Größenordnung von 80% möglich (Bentley et al., 2002).

Die frühesten makromorphologischen Läsionen der Darmschleimhaut bei MC sind aphthoide Läsionen, die sich häufig über mukosalen Lymphfollikeln entwickeln. Das charakteristische diskontinuierliche Befallsmuster zeichnet sich durch den Wechsel von segmentalen Läsionen und dazwischenliegenden weniger

betroffenen Abschnitten (skip lesions) aus. Verdickungen der Darmwand und Stenosen gehören zum typischen Bild. Im fortschreitenden Verlauf können sich tiefe Ulzerationen ausbilden und es entstehen ein sogenanntes Pflastersteinrelief, Fisteln und Abszesse.

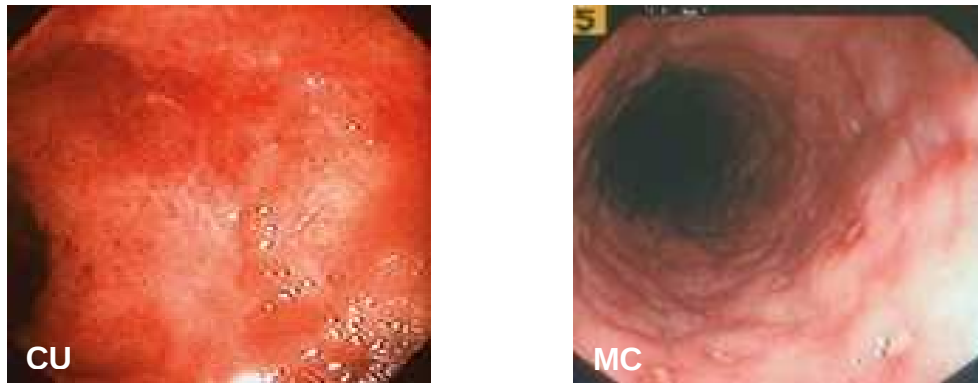


Abbildung 1: **Typische endoskopische Befunde bei CU und MC (Lashner, 2010)**

Charakteristische endoskopische Erscheinungsbilder: Erythem, Schleimhautödem und aufgehobene Gefäßzeichnung bei CU sowie streifenförmige Geschwüre mit Ausbildung eines Pflastersteinreliefs bei MC.

Die **histologische** Untersuchung von Biopsien bildet einen wichtigen diagnostischen Baustein. Aktive Phasen können von Rückbildungsphasen und inaktiven Stadien unterschieden werden. Charakteristisch für CU sind Störungen der Kryptenarchitektur, Kryptenatrophie, Mucinverlust im Randbereich der Ulzera sowie Infiltration der Mukosa durch Lymphocyten und Plasmazellen. Die CU wird als mukosale Erkrankung definiert (Wittekind und Rogler, 2004). In aktiven Stadien reicht die Entzündung aber fast immer in die obere Submukosa hinein. In der Rückbildungsphase der Ulzera wird die Entzündung vom Rand her geschlossen, die Krypten bekommen ein ungleichmäßiges Aussehen. Die Anzahl der schleimbildenden Becherzellen normalisiert sich. Auch in den Phasen einer inaktiven Colitis kommt es zu keiner vollständigen Regeneration der Darmschleimhaut. Häufig verbleibt eine abgeflachte Schleimhaut, teils mit Persistenz von Pseudopolypen.

Kennzeichnend für MC sind histomorphologische Veränderungen durch die zumeist transmurale Ausdehnung der Entzündung. Über alle Darmschichten

verteilt befinden sich Ansammlungen lymphoidzelliger Aggregate und Entzündungsinfiltrate. Die Mukosa zeigt häufig auch Stromaödeme. Störungen der Drüsenarchitektur sind deutlich geringer ausgeprägt als bei der CU. Typisch ist das Vorkommen epitheloidzelliger Granulome in den tieferen Schichten der Darmwand (bei ca. 50% der Patienten), welche teilweise mehrkernige Riesenzellen beinhalten. Die histopathologische Diagnose eines MC sollte nicht allein vom Vorhandensein epitheloidzelliger Granulome abhängig gemacht werden (von Herbay, 1999, Hoffmann et al., 2008).

Zusätzlich wird bei CU-Patienten nach intraepithelialen Neoplasien in den Schleimhautbiopsien gesucht, um ein Kolonkarzinom frühzeitig zu entdecken. Intraepitheliale Neoplasien des Darmepithels stellen sich histologisch als Modifikationen der Drüsenarchitektur sowie cytologische Veränderungen dar. Sie können in allen Abschnitten des Kolons und Rektums vorkommen und man findet sie auch in der Umgebung bereits vorhandener Karzinome.

Im Rahmen der **allgemeinen Labordiagnostik** stehen sowohl für die Diagnosestellung als auch für die Verlaufsbeurteilung zahlreiche Laborparameter zur Verfügung. Für die klinische Praxis sind besonders die Messung der Blutsenkung, ein Differentialblutbild und das C-reaktive Protein von Bedeutung. Zusätzlich ist die Bestimmung der Enzyme Gamma-Glutamyl-Transferase und Alkalische Phosphatase sinnvoll, die der Erkennung einer PSC dienen (Stange et al., 2001).

Der Nachweis von Calprotektin und Laktoferrin im Stuhl kann zur Ermittlung der inflammatorischen Aktivität bei bekannter CED genutzt werden (Sugi et al., 1996) und gibt dort im Rahmen eines Aktivitätsmonitorings Auskunft über einen Therapieerfolg. Zusätzlich dient er der Erkennung von Remissionen und Rezidiven. Beide Proteine werden in Granulocyten gebildet, die wiederum bei Entzündungen vermehrt ins Darmlumen abgegeben werden. Diese Untersuchungen werden insbesondere für Kinder empfohlen, da Stuhl als Untersuchungsmaterial stets vorhanden ist und so teilweise eine Endoskopie überflüssig wird. Sie erlauben allerdings keine Unterscheidung zwischen den infektiösen und den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen MC und CU. Für

die Differenzierung von Patienten mit einem aktiven Reizdarmsyndrom scheint dieser Test allerdings sehr gut geeignet zu sein, da in diesen Fällen keine erhöhte Entzündungsaktivität vorliegt.

Bakteriell bedingte Durchfallerkrankungen werden durch mikrobiologische Untersuchungen abgegrenzt. Bei immunsupprimierten Patienten müssen auch virale Erreger wie Cytomegalie- und Herpes-simplex-Viren beachtet werden.

In letzter Zeit wurde das Auftreten von Antikörpern gegen verschiedene mikrobielle Zielantigene insbesondere bei Patienten mit Morbus Crohn beschrieben: OmpC (ein *Escheria coli* outer membrane porin), I2 (eine mikrobielle Sequenz des *Pseudomonas fluorescens*) und CBir1 (ein Flagellin-Protein einiger Bakterien). Der Nutzen dieser Antikörpernachweise für die Diagnostik der CED wird sich erst in weiteren Studien zeigen.

1.4 Autoantikörper

Die Bestimmung von Autoantikörpern im Serum erweitert das diagnostische Spektrum. Im Vordergrund stehen Autoantikörper gegen intestinale Becherzellen, Granulocyten und exokrines Pankreas sowie Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae*.

Autoantikörper gegen intestinale Becherzellen (**BAk**) werden exklusiv bei 28% der Patienten mit Colitis ulcerosa (Spezifität 100%, 69% IgA und IgG, 23% nur IgG, 8% nur IgA) gefunden (Broberger und Perlmann, 1959, Stöcker et al., 1984b). Die Verteilung der Becherzellen im Darm entspricht der Krankheitslokalisation bei CU. Becherzellen nehmen im Darm von proximal nach distal zu. Das Duodenum enthält nur wenige Becherzellen und ist bei CU nicht betroffen. Im Rektum dagegen, welches bei einer CU stets involviert und Beginn der Entzündung ist, liegt die höchste Dichte an Becherzellen vor. BAK besitzen aufgrund ihrer Organspezifität und Krankheitsassoziation sowie ihrer oftmals sehr hohen Titer eine ähnlich große Signifikanz wie andere Autoantikörper bei gesicherten Autoimmunerkrankungen. Als Substrat für die Bestimmung der BAK mit dem Indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) wird in der Standard-Diagnostik

Primatendarm eingesetzt. In letzter Zeit wurde dieser durch die Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie HT29-18N2 ergänzt bzw. abgelöst. HT29-18N2 differenziert sich unter speziellen Kulturbedingungen spontan zu Becherzellen (Komorowski et al., 2004). Diese Zellen zeigen identisch zum Darm bei Inkubation mit Anti-BAK-positiven Seren eine unscharf begrenzte, wolkige Fluoreszenz. Das maßgebliche Zielantigen der Antikörper gegen Becherzellen ist noch nicht identifiziert.

Autoantikörper gegen Bestandteile des exokrinen Pankreas (**PAk**) sind pathognomonisch für Morbus Crohn. Die Prävalenz für MC beträgt 39% (55% IgA und IgG, 36% nur IgG, 9% nur IgA). Bei Patienten mit CU treten PAk sehr selten (2%) auf (Stöcker et al., 1984a). Zum Nachweis der PAk werden üblicherweise Gefrierschnitte mit Primatenpankreas in einem IIFT verwendet. Man unterscheidet zwei Reaktionsmuster, die sowohl einzeln als auch in Kombination auftreten können. Zum einen ein netzig-granuläres, zum anderen ein tropfiges Fluoreszenzmuster im Bereich der Azinuszellen. Die Inselzellen dagegen sind nicht an der Reaktion beteiligt. Für beide Fluoreszenzmuster konnte je ein Zielantigen identifiziert werden (Stöcker et al., 2008): Das netzig-granuläre Muster wird durch Antikörper gegen CUZD1 (CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1) und das tropfige Muster durch Antikörper gegen GP2 (Glycoprotein 2) hervorgerufen.

Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (**ASCA**) werden häufig bei MC-Patienten gefunden (Main et al., 1998). Die Prävalenz bei MC beträgt für IgA 67% und für IgG 64% (Teegen et al., 2000). Demgegenüber stehen jeweils nur 2% bei CU-Patienten und gesunden Probanden. Der Nachweis von ASCA im Serum von Betroffenen schließt allerdings nicht das Vorkommen einer Zöliakie aus, die Prävalenz liegt zwischen 38 und 43% (Damoiseaux et al., 2002, Desplat-Jego et al., 2007). Diagnostische Standardmethode ist ebenfalls ein IIFT mit Ausstrichen der Bäcker- oder Bierhefe als Antigen-Substrat. Es gibt allerdings auch ELISA-Testsysteme, bei denen aus der Zellwand der *Saccharomyces*-Hefe isoliertes Mannan, das Zielantigen der Antikörper, an eine Festphase gekoppelt wird. ASCA korrelieren weder signifikant mit PAk, noch können sie mit Pankreasantigen neutralisiert werden.

Bei den CED wird insbesondere die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Bestandteile der neutrophilen Granulocyten empfohlen. Neutrophile Granulocyten gehören zur ersten Linie der zellulären angeborenen Immunabwehr und dienen der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen. Sie werden kontinuierlich im Knochenmark gebildet und treten von dort in das Blut über, wo sie 40 bis 70% der Leukocyten ausmachen. 90% der Neutrophilen befinden sich im Knochenmark, ungefähr 10% im Blut, einige im Gewebe. Die Aufenthaltsdauer im Blut beträgt meist nur 6 bis 8 Stunden. Im Cytoplasma von Neutrophilen gibt es drei Arten unterschiedlich großer Lysosomen, die aufgrund ihres lichtmikroskopischen Aussehens als Granula bezeichnet werden. Die „azurophilen“ Granula werden auch primäre oder unspezifische Granula genannt und beinhalten neben Bestandteilen wie sauren Hydrolasen auch antimikrobielle Enzyme wie Defensine und Myeloperoxidase. Die Granulocyten-„spezifischen“ oder sekundären Granula enthalten verschiedene Enzyme wie Laktoferrin, Lysozym und Cathepsin G, während in den tertiären Granula vorwiegend Gelatinase vorliegt.

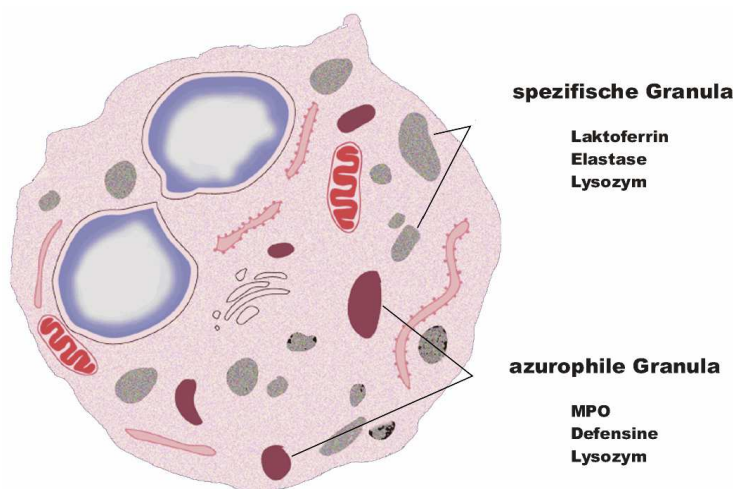


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus neutrophiler Granulocyten modifiziert nach King et al. (King et al., 2003)

Die Diagnostik der Autoantikörper gegen neutrophile Granulocyten (ANCA = Anti-Neutrophilen cytoplasmatische Antikörper) stützt sich primär auf die indirekte Immunfluoreszenz (IIF) und kann durch monospezifische ELISA und Immunblots ergänzt werden. Standardsubstrate für die IIF sind Ethanol- und Formaldehyd-fixierte humane Granulocyten. Es lassen sich mindestens zwei Fluoreszenzmuster unterscheiden: Eine körnige cytoplasmatische Fluoreszenz, welche die Zellkerne

ausschließt (C-ANCA: Cytoplasmatisches Muster), und eine vorwiegend glatte, zum Teil auch feinkörnige Fluoreszenz, die sich linienförmig um die Zellkerne der Granulocyten legt (P-ANCA: Perinukleäres Muster).

Ein C-ANCA-Muster (**Abbildung 3**) wird vor allem durch Antikörper gegen Proteinase 3 (PR3) verursacht, ein in den azurophilen Granula lokalisiertes Protein. Diese Antikörper haben eine Prävalenz von 80 bis 95% bei der Wegener'schen Granulomatose (van der Woude et al., 1985). Seltener findet man C-ANCA bei Mikroskopischer Arteriitis und Polyarteriitis nodosa. Ethanol- und Formaldehyd-fixierte Granulocyten ergeben im IIFT mit Antikörpern gegen PR3 ein körniges cytoplasmatisches Reaktionsmuster.

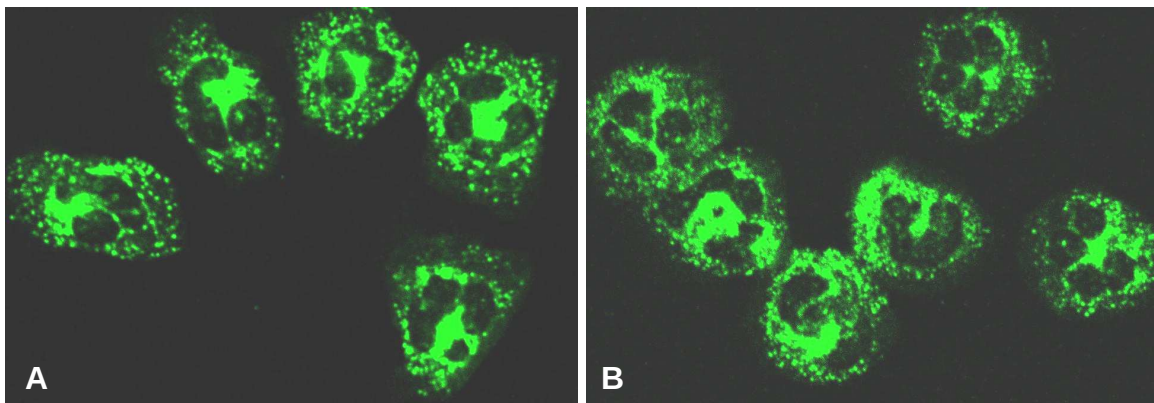


Abbildung 3: Autoantikörper gegen Proteinase 3

Reaktion mit humanen Ethanol- (A) bzw. Formaldehyd-fixierten Granulocyten (B). Vergrößerung 400 x.

Als Zielantigene der P-ANCA wurden bisher MPO, Laktoferrin, Elastase, Cathepsin G, Lysozym, β -Glucuronidase, Azurocidin, h-lamp-2, alpha-Enolase, Bactericidal Permeability-Increasing Protein (BPI) und Defensine beschrieben. Alle sind *in vivo* Bestandteile der sekretorischen Granula. P-ANCA reagieren, mit Ausnahme von Anti-MPO-Antikörpern, in der Regel nur mit Ethanol-fixierten Granulocyten mit dem beschriebenen perinukleären Muster. Bei Antikörpern gegen MPO, dem Haupt-Zielantigen der P-ANCA, ist jedoch auch eine deutlich körnige Fluoreszenz (**Abbildung 4**) im Cytoplasma der Formaldehyd-fixierten Granulocyten festzustellen. Das Antigen wird durch das Formaldehyd in den Granula fixiert und kann nicht mehr zum Zellkern diffundieren. Antikörper gegen

MPO findet man besonders häufig bei Patienten mit Mikroskopischer Polyangiitis und Churg-Strauss-Syndrom.

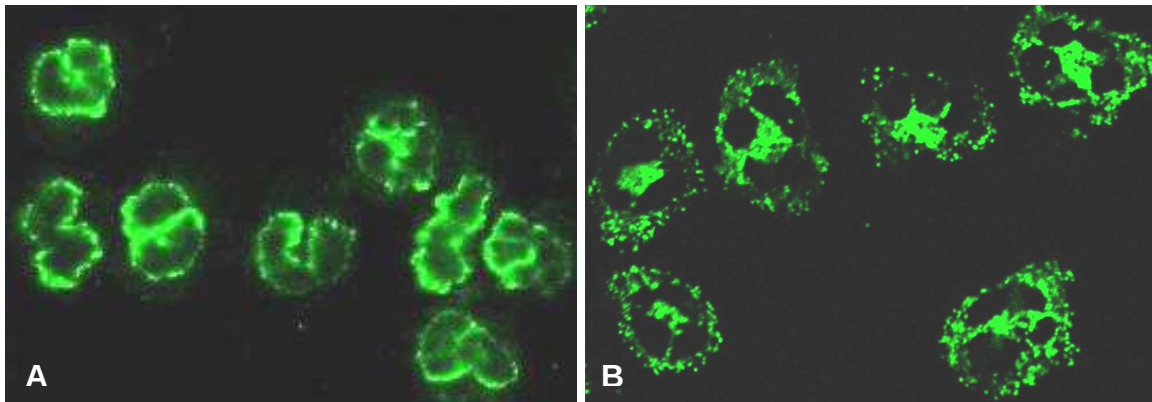


Abbildung 4: **Autoantikörper gegen MPO**

Humane Ethanol-fixierte Granulocyten: (A) perinukleäre Fluoreszenz; humane Formaldehyd-fixierte Granulocyten: (B) cytoplasmatisches granuläres Muster. Vergrößerung 400 x.

Wie entsteht das Fluoreszenzmuster der P-ANCA? Während der Inkubation mit dem Patientenserum diffundieren Zielantigene aus den cytoplasmatisch lokalisierten Granula an Bestandteile der Zellkerne, zu denen sie aufgrund ihrer positiven Ladung eine hohe Affinität besitzen. Es trifft nicht zu, dass sich die Antigene bereits während der Fixierung mit Ethanol umverteilen (Falk und Jennette, 1988). Sie lagern sich erst während der Seruminkubation um, was aufgrund der Unlöslichkeit von Proteinen in absolutem Ethanol auch naheliegend erscheint. Werden Ethanol-fixierte Granulocyten mit Formaldehyd nachfixiert, zeigen sie nämlich bei Antikörpern gegen Myeloperoxidase (MPO) auch ein C-ANCA-Muster.

P-ANCA treten auch bei einer Reihe nicht-vaskulärer Erkrankungen auf. Dazu gehören chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Autoimmunhepatitis (AIH) und PSC. Die wichtigsten Zielantigene der mit CED und PSC assoziierten P-ANCA sind in dieser Arbeit identifiziert worden.

CU-assoziierte P-ANCA zeigen eine glatte, zum Teil auch feingranuläre, perinukleäre Fluoreszenz (P-ANCA) und reagieren nicht mit herkömmlich Formaldehyd-fixierten Granulocyten (**Abbildung 5**). Dieser Reaktionstyp wurde

bisher als „formalinsensibel“ bezeichnet. Das gleiche Reaktionsmuster findet man auch bei der mit CU in Verbindung stehenden PSC. Die Prävalenz der P-ANCA für CU liegt bei 67% (MC 7%, Gesunde 0 bis 1%) (Stöcker et al., 1992). 39% der P-ANCA sind Antikörper der Immunglobulinklasse IgG, 58% IgA und IgG sowie 3% ausschließlich IgA.

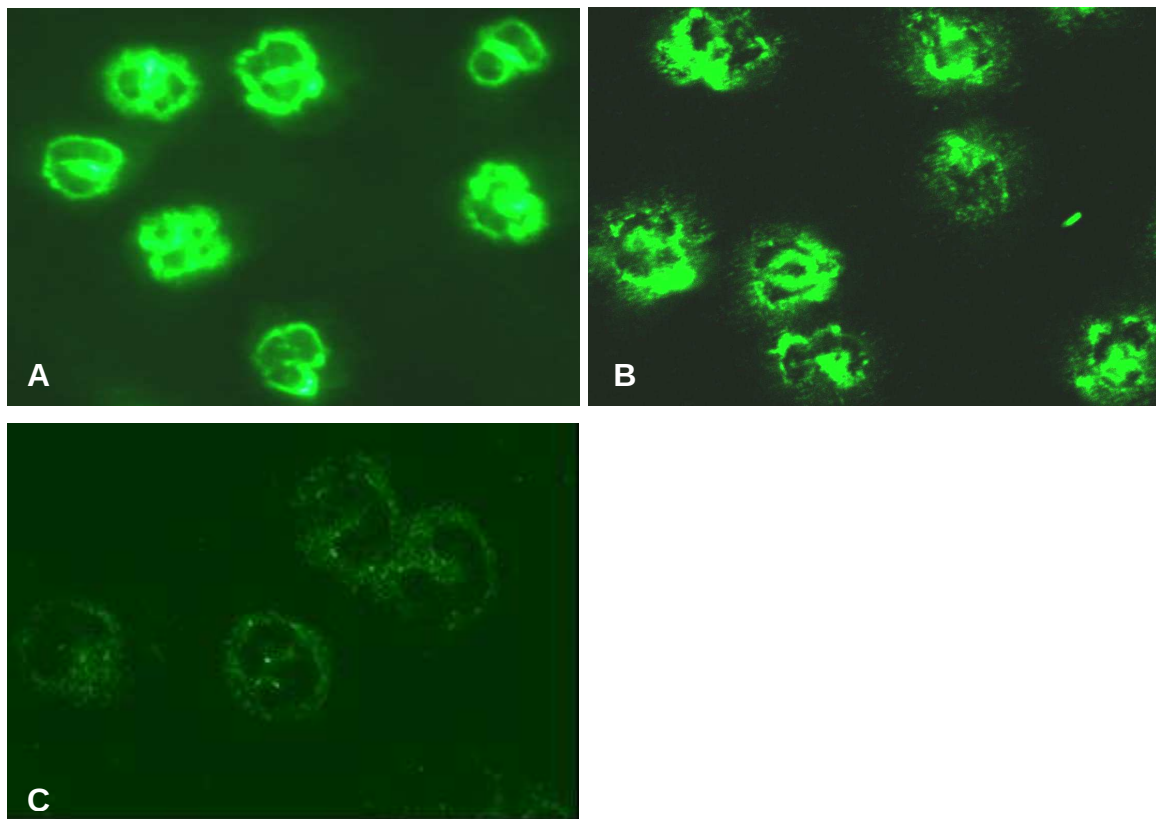


Abbildung 5: Autoantikörper gegen Granulocyten bei der Colitis ulcerosa

Bei der Colitis ulcerosa können die Autoantikörper gegen Granulocyten zwei verschiedene P-ANCA-Muster mit den humanen Ethanol-fixierten Granulocyten zeigen: Perinukleär glatt (A) und perinukleär granulär (B). Mit humanen herkömmlich Formaldehyd-fixierten Granulocyten erfolgt keine Reaktion (C). Vergrößerung 400 x.

Im Jahre 1991 berichteten Saxon et al. (Saxon et al., 1990), dass Seren von Patienten mit Colitis ulcerosa in der Immunfluoreszenz ein perinukleäres Muster zeigten, welches nicht durch Antikörper gegen MPO hervorgerufen wurde. Diese Antikörper wurden bereits 1987 beschrieben, allerdings wurden die Zielzellen (Granulocyten) nicht erkannt (Stöcker et al., 1987). In verschiedenen Arbeiten wurden hauptsächlich über Westernblot-Analysen oder ELISA, bei denen Mikrotiterplatten mit aufgereinigten Antigenen beschichtet wurden, auch Katalase (Roozendaal et al., 1998b), α -Enolase (Roozendaal et al., 1998b, Vermeulen et

al., 2008), Cathepsin G (Halbwachs-Mecarelli et al., 1992), Laktoferrin (Peen et al., 1993, Roozendaal et al., 1998b) und BPI (Zhao et al., 1995) als mögliche Zielantigene beschrieben. Es konnte allerdings bisher keine strikte Zuordnung zu einem nicht mit Formaldehyd-fixierten Granulocyten reagierendem P-ANCA festgestellt werden. Außerdem zeigten sie bei weitem nicht die Prävalenz wie P-ANCA.

Studie	n	<u>P-</u> <u>ANCA</u> %	<u>Cath.</u> <u>G</u> %	<u>Elast.</u> %	<u>Lys.</u> %	<u>Lakt.</u> %	<u>Kat.</u> %	<u>α-En.</u> %	<u>β-Glu.</u> %
Duerr et al., 1991	10	-	0	0	-	-	-	-	-
Nässberger et al., 1992	54	80	3	3	-	-	-	-	57
Hauschild et al., 1993	72	24	-	-	15	-	-	-	-
Schmitt et al., 1993	49	-	-	-	21	-	-	-	-
Peen et al., 1993	24	-	-	-	-	50	-	-	-
Mulder et al., 1993	67	51	-	-	-	22	-	-	-
Broekroelofs et al., 1994	67	49	0	0	-	4	-	-	-
Kossa et al., 1995	49	69	46	46	53	41	-	-	-
Yang et al., 1996	36	64	-	-	-	8	-	-	3
Walmsley et al., 1997	52	67	4	-	-	4	-	-	-
Sobajima et al., 1998	60	85	43	-	-	13	-	-	-
Roozendaal et al., 1998b	96	58	-	-	-	26	38	10	-

Tabelle 1: Übersicht der Prävalenz von Autoantikörpern gegen bisher identifizierte Granulocytenantigene bei CU-Patienten

Cath.G = Cathepsin G, Elast. = Elastase, Lys. = Lysozym, Lakt. = Laktoferrin, Kat. = Katalase, α-En. = α-Enolase, β-Glu. = β-Glucuronidase

(modifiziert nach X. Bossuyt ; 2006)

Zusätzlich wurde eine Reihe von nukleären Antigenen als Zielstrukturen für P-ANCA in Seren von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert. Wegweisend dafür waren Untersuchungen zur Lokalisation der P-ANCA-Reaktion bei CU mittels Laserscan-Mikroskopie, die bei 88% der Seren eine Kernlokalisation insbesondere an der Innenseite der Kernmembran ergab (Billing et al., 1995). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten eine Konzentration über dem Chromatin, wobei die Erkennung von dsDNA als

Zielantigen durch die eingesetzten Seren ausgeschlossen wurde. Mittels eines Immunblots charakterisierte eine japanische Gruppe bei CU Serum-Antikörper gegen die nukleären High-Mobility-Group-Proteine 1 und 2 (HMG1 & HMG2), die sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma vorkommen (Sobajima et al., 1997). Auch Histon H1 wurde als spezifisches Antigen der CU-assoziierten P-ANCA ermittelt (Eggena et al., 2000). Diese Ergebnisse wurden sehr kontrovers diskutiert, da diese Antigene nicht ausschließlich in neutrophilen Granulocyten oder anderen myeloiden Zellen, sondern auch in den meisten Körperzellen vorhanden sind – und die reagieren wiederum nicht mit den ANCA-positiven Seren. Es gibt auch keine weiterführenden Studien zur Häufigkeit dieser Proteine als Zielantigen der P-ANCA bei CU. Eine Gruppe um Terjung (Terjung et al., 1998) zeigte mit Hilfe der konfokalen Laserscan-Mikroskopie, dass nicht die Histone H1 bis H4, sondern die nukleären Lamina-Proteine Lamin A, B1 und C sowie Lamin-B-Rezeptoren mit dem Zielantigen der P-ANCA von Patienten mit CU, PSC und Typ 1 AIH co-lokalisiert sind. Daraus resultierend bestimmten sie ein 50 kDa Kernhüllen-Protein (isoelektrischer Punkt 6,0) in neutrophilen Granulocyten und einigen myeloiden Zelllinien (z. B. HL-60), das spezifisch mit P-ANCA-positiven Seren dieser Patientengruppen reagierte (Terjung et al., 2000). Weiterführend wurde das Protein später als Tubulin-beta Isotyp 5 identifiziert. Rekombinant hergestelltes Protein reagierte allerdings nur mit P-ANCA-positiven AIH-Seren (Terjung et al., 2005). Für die Autoimmunhepatitis gibt es ebenfalls Hinweise zum Vorkommen von Antikörpern gegen Laktoferrin, wobei bisher keine Korrelation zum gleichzeitigen Auftreten von P-ANCA festgestellt wurde (Ohana et al., 1998, Muratori et al., 2001).

Auch die Arbeitsgruppe von Vidrich hat die Hypothese vertreten, dass ein nukleäres Antigen Ziel dieser Antikörper ist. Nach einer Vorbehandlung der Granulocyten-Objektträger mit DNase verloren die P-ANCA-positiven Seren von Patienten mit CU ihre Reaktivität, oder sie konvertierten zu einem cytoplasmatischen Muster. Daraus wurde abgeleitet, dass das relevante Epitop ein bisher noch nicht eindeutig identifizierter Protein-DNA-Komplex ist oder dass das Vorhandensein von intakter DNA für die Aufrechterhaltung der Integrität des Epitops notwendig ist (Vidrich et al., 1995). Dieses Verfahren, welches von der Firma Prometheus entwickelt wurde und auch nur dort im Rahmen eines Test-

Panels eingesetzt wird, ist nicht unumstritten. Die DNase-Sensitivität der P-ANCA allein kann aber nicht als diagnostischer Marker für CU eingesetzt werden, da auch gleichzeitig viele Zellkern-Antigene durch DNase zerstört werden, was häufig Fehlbeurteilungen zur Folge hat.

Das Auftreten CU-assoziiierter P-ANCA steht weder mit Krankheitsaktivität (Reumaux et al., 2000), Krankheitslokalisation, Einnahme von Medikamenten oder Dauer der Erkrankung in einem Zusammenhang (Oudkerk et al., 1993). Allerdings können die Antikörper-Titer bei einer aktiven Erkrankung höher sein (Wiik, 2002). Bei MC treten angeblich P-ANCA insbesondere dann auf, wenn das Kolon beteiligt ist (Vasiliauskas et al., 1996)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bisher über 80% der Patienten mit CED allein mit Hilfe einer fundierten Serologie diagnostiziert werden konnten. Die parallele Bestimmung von PAK und ASCA ermöglicht einen Nachweis von 80% der MC-Patienten, da diese Antikörper nicht unmittelbar miteinander korreliert sind. Durch eine Untersuchung von BAK und P-ANCA konnten bisher 83% der an CU Erkrankten serologisch erfasst werden.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das oder die Colitis-ulcerosa-assoziierten P-ANCA-Zielantigene zu identifizieren und Testsysteme zur Diagnostik der CU zu entwickeln.

2 Material und Geräte

2.1 Serumproben

Seren von Patienten mit CED und PSC, ANCA-assoziiierter Vaskulitis (AAV), AIH und gesunder Probanden wurden in dieser Arbeit eingesetzt.

Im Bereich Gastroenterologie der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck wurden prospektiv konsekutiv 365 CED-Seren gesammelt. Gemäß der Deklaration von Helsinki lag von allen Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung vor. Die klinische Charakterisierung der Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wurden anhand einer eindeutigen Anamnese, einer Endoskopie und den Ergebnissen der histologischen Untersuchung des Biopsiematerials erhoben. Für die Studie wurden nur Patienten ausgewählt, bei denen alle Diagnosekriterien übereinstimmend für CU oder MC zutrafen. Je Patient wurde nur die erste Probe für die Studie verwendet (n=135). Unter den 39 Patienten, für die eine Colitis ulcerosa diagnostiziert wurde, waren 15 Männer und 24 Frauen mit einem Alter von 17 bis 86 Jahren (Altersdurchschnitt 42 Jahre). Zum Morbus-Crohn-Kollektiv (n=96) gehörten 31 Männer und 65 Frauen mit einer Altersspanne von 18 bis 73 Jahren (Altersdurchschnitt 38 Jahre).

Die Seren von Patienten mit einer Primär-sklerosierenden Cholangiitis (n=62) stellte freundlicherweise Dr. Dimitrios Bogdanos vom Institute of Liver Studies im King's College London UK zur Verfügung. 30 dieser Patienten hatten zusätzlich eine Colitis ulcerosa.

Serumproben von Patienten mit AAV und AIH, ausgewählt auf der Basis der serologischen Befunde, wurden vom Klinisch-immunologischen Labor Prof. Stöcker (Lübeck) zur Verfügung gestellt. 10 mit Ethanol- bzw. Formaldehyd-fixierten Granulocyten P-ANCA- bzw. C-ANCA-positiv (Titer $\geq 1:32$) getestete Proben zeigten alle Autoantikörper gegen MPO in einem ELISA ($\geq 2x$ Cut-off). Weitere 10 in einem Anti-PR3-ELISA positiv analysierte Seren ($\geq 2x$ Cut-off) zeigten alle eine C-ANCA-Reaktivität in der Immunfluoreszenz. Die Blutspender-seren stammen aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck.

2.2 Reagenzien

Reagenz

Hersteller/Lieferant

Aceton

T. Geyer Hamburg

Acetonitril

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Agarose

Carl Roth GmbH

Ammoniumchlorid (NH_4Cl)

Merck KGaA

Ammoniumhydrogencarbonat (NH_4HCO_3)

Merck KGaA

Ampicillin

Gerbu Biotechnik GmbH

ANCA-Profil-ELISA (EA 1200-1208-1 G)

EUROIMMUN AG

Anti-dsDNA-ELISA (EA 1571-9601 G)

EUROIMMUN AG

Anti-Laktotferrin-ELISA

EUROIMMUN AG

Anti-MPO-ELISA (EA 1211-9601 G)

EUROIMMUN AG

Anti-PR3-ELISA (EA 1206-9601-1 G)

EUROIMMUN AG

Azurocidin

Sino Biological Inc.

Benzonase

Merck KGaA

Calciumchlorid (CaCl_2)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Chloramphenicol

Carl Roth GmbH

Complete™ Proteaseinhibitor

Roche

Coomassie-Brilliant-Blau R-250

Merck KGaA

Dithiothreitol (DTT)

Gerbu Biochemicals GmbH

D-MEM high Glucose Medium

PAA Laboratories GmbH

dsDNA

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

DNase-I

Promega

Essigsäure

Merck KGaA

Ethanol

Merck KGaA

Ethidiumbromid

MP Biomedicals

Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)

Gerbu Biochemicals GmbH

ExGen500

Fermentas GmbH

FKS

PAA Laboratories

Reagenz

Formaldehyd
 Glutaraldehyd
 Granulocyten-Mosaik 3 (FB 1201-1010-3)
 Harnstoff
 HEp-2/Leber Affe (FB 1510-1010-1)

Heparin-Natrium
 Iodacetamid
 Anti-Human Immunglobulin G
 Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)
 Laktoferrin (Milch, bovin)

Laktoferrin (Milch, human)
 Laktoferrin (rekombinant Reis)
 LB-Medium
 6x MassRuler® Loading Dye Solution
 MassRuler® DNA Ladder Mix

Magnesiumsulfat (MgSO_4)
 Methanol
 Micrococcen Nuklease S7
 Myeloperoxidase
 Natriumacetat

Natriumazid
 Na_2HPO_4
 NaH_2PO_4
 Natriumcarbonat
 Natriumchlorid (NaCl)

Natriumchlorid-Lösung 0,9%
 Natriumthiosulfat-Pentahydrat
 NBT/BCIP-Substrat

Hersteller/Lieferant

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Merck KGaA
 EUROIMMUN AG
 Gerbu Biochemicals GmbH
 EUROIMMUN AG

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Merck KGaA
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Carl Roth GmbH
 Fermentas GmbH
 Fermentas GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 T. Geyer Hamburg
 Roche
 AROTEC DIAGNOSTICS LIMITED
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Gerbu Biochemicals GmbH
 Merck KGaA
 Merck KGaA
 Th. Geyer GmbH & Co. KG

Fresenius Kabi AG
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 EUROIMMUN AG

Reagenz

Hersteller/Lieferant

NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)
 NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)
 NuPAGE Transfer Buffer (20x)
 n-Octylglucopyranosid
 Percoll

Invitrogen GmbH
 Invitrogen GmbH
 Invitrogen GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 GE-Healthcare Europe GmbH

PFHM II (Hybridoma Medium Protein Free)
 Ponceau-S
 Propidiumiodid
 Protaminsulfat
 Salz für PBS (pH 7,2)

Invitrogen GmbH
 Serva
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 EUROIMMUN AG

Salzsäure (HCl)
 Schwefelsäure (H₂SO₄)
 Silbernitrat
 Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder
 Sucrose

VWR International GmbH
 EUROIMMUN AG
 Merck KGaA
 Fermentas GmbH
 Serva Electrophoresis GmbH

TMB/H₂O₂
 Trishydroxymethylaminomethan (Tris)
 Tris-Acetat
 Trifluoressigsäure
 Triton X-100

EUROIMMUN AG
 Gerbu Biochemicals GmbH
 Merck KGaA
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Trypsin
 Tween 20
 Universalpuffer
 UniversalpufferPlus
 Ziegenserum

Promega
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 EUROIMMUN AG
 EUROIMMUN AG
 PAA Laboratories

Antikörper und Enzymkonjugate

Anti-Laktoferrin (Kaninchen)
 Anti-Azurocidin (Kaninchen)
 Anti-His-Tag (Maus)
 FITC-markiertes Anti-Human-IgA (Ziege)
 FITC-markiertes Anti-Human-IgG (Ziege)
 FITC-markiertes Anti-Human-IgG1 (Maus)
 FITC-markiertes Anti-Human-IgG2 (Maus)
 FITC-markiertes Anti-Human-IgG3 (Maus)
 FITC-markiertes Anti-Human-IgG4 (Maus)
 FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)
 FITC-markiertes Anti-Maus-IgG (Ziege)
 Cy2-markiertes Anti-Maus-IgG (Ziege)
 Anti-Kaninchen-IgG-AP (Ziege)
 Anti-Maus-IgG-AP (Ziege)
 Anti-Human-IgG-AP (Ziege)
 Anti-Human-IgG-PolyHRP40 F(ab)2-fragments (Maus)

Hersteller/Lieferant

Dianova
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Merck KGaA
 EUROIMMUN AG
 EUROIMMUN AG
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Dianova
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH
 Dianova
 EUROIMMUN AG
 SDT GbR

Puffer

PBS-Tween

100 mM NaCl
10 mM Na₂HPO₄
2,5 mM NaH₂PO₄
0,2% Tween 20
pH 7,2

TBS

20 mM Tris
150 mM NaCl
pH 7,4

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat pH 8
1 mM EDTA

Lösungen für Proteinnachweis und -identifizierung durch MALDI-ToF

Waschlösung 1

30% Acetonitril
25 mM NH₄HCO₃

Waschlösung 2

50% Acetonitril
10 mM NH₄HCO₃

DTT-Lösung

10 mM DTT
100 mM NH₄HCO₃

Iodacetamid-Lösung

55 mM Iodacetamid
100 mM NH₄HCO₃

Trypsin-Lösung

10 µg/µl Trypsin
3 mM Tris-HCl, pH 8,5

Extraktionslösung

0,3% Trifluoressigsäure
5 mM n-Octylglucopyranosid
50% Acetonitril

Matrix-Lösung

5 mg/ml α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
50% (v/v) Acetonitril
0,1% (v/v) Trifluoressigsäure

Molekularbiologisches Material

Restriktionsenzyme

HindIII

XhoI

Hersteller/Lieferant

Fermentas GmbH

Fermentas GmbH

Molekularbiologische Kits

NucleoSpin® Plasmid

NucleoSpin® Extract II

Rapid DNA Ligation

Taq DNA Polymerase

Machery-Nagel GmbH & Co. KG

Machery-Nagel GmbH & Co. KG

Fermentas GmbH

Fermentas GmbH

Kulturzellen

HEK-293T (ATCC®-Nr.: CRL-1573™)

E.coli XL2-Blue

Invitrogen GmbH

Stratagene Europe Biocrest BV

cDNA/Vektor

Laktoferrin-cDNA (BC015823, ET338),

pEP7-*HindIII/XhoI*-Vektor

ImaGenes GmbH

EUROIMMUN AG

Verbrauchsmaterial

BD Falcon™ CultureSlides
 Corning® HYPERFlask-Zellkulturflaschen
 Filterpapier
 Inkubationswannen
 HiTrap rProtein A

MaxiSorp-Mikrotiterplatten
 Nitrocellulosemembran
 NuPAGE-Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm
 NucleoBond Xtra Midi (PC 100)
 NucleoBond Giga (PC 10.000)

Nunclon Multischalen, 24wells
 Quadripermschalen
 Vivaspin-Säulen
 Non Skirted, Thermo-Fast 96well Platten

Hersteller/Lieferant

VWR International GmbH
 Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG
 Whatman GmbH
 EUROIMMUN AG
 GE-Healthcare

NUNC GmbH und Co. KG
 Whatman GmbH
 Invitrogen GmbH
 Machery-Nagel GmbH & Co. KG
 Machery-Nagel GmbH & Co. KG

VWR International GmbH
 Sarstedt AG & Co.
 Sartorius Stedim Biotech S.A.
 biostep GmbH

2.3 Geräte

Gerät

Bruker Autoflex III Smartbeam

Columbus Pro washer

Eppendorf Reference

Eppendorf Centrifuge 5417R

Filtersatz 09

Filtersatz 15

Hettich Zentrifugen Rotanta 420

Hettich Zentrifugen Rotanta 460 R

Hettich Zentrifugen Rotanta 46 R

Hoefer TE Series

Primus 96 plus Thermocycler

Reinstwasseranlage

Rocking Platform

Spannungsgeber (Power Pac 300)

Sunrise Reader

XCell Sure Lock NOVEX

Zeiss Axioskop 2

Hersteller/Lieferant

Bruker Daltonics

Tecan Deutschland GmbH

Eppendorf AG

Eppendorf AG

Zeiss AG

Zeiss AG

Andreas Hettich GmbH & Co. KG

Andreas Hettich GmbH & Co. KG

Andreas Hettich GmbH & Co. KG

Hoefer Inc.

MWG-Biotech AG

Millipore, Milli Q

Biometra GmbH i.L.

Bio-Rad Laboratories GmbH

Tecan Deutschland GmbH

Invitrogen GmbH

Zeiss AG

3 Methoden

3.1 Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)

Eines der Standardverfahren zum Nachweis von Autoantikörpern ist der Indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT), bei dem Objektträger mit Gewebeschnitten, Zellen oder aufgereinigten Antigenen als Substrat verwendet werden. Die im Patientenserum gesuchten Antikörper binden sich an die Festphase-gebundenen Antigene. An die bei positiven Reaktionen entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe bindet sich in einem zweiten Inkubationsschritt ein Fluorochrom-markierter Anti-Human-Antikörper. Im Fluoreszenzmikroskop werden die gebundenen Antikörper visualisiert.

Für diese Arbeit wurde die standardisierte TITERPLANE™-Technik eingesetzt, bei der die Proben erst auf einen Reagenzträger pipettiert und anschließend die Objektträger kopfüber aufgelegt wurden. Dadurch entfiel die Verwendung einer feuchten Kammer und die Inkubation aller Proben wurde gleichzeitig gestartet. Das ermöglichte einen direkten Vergleich der Ergebnisse.

Für den Standard-Immunfluoreszenztest wurden je 25 µl der 1:10 in PBS-Tween verdünnten Proben auf die Reagenzträger pipettiert und nach dem Auflegen der Objektträger 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit PBS-Tween 5 Minuten gewaschen. Mit jeweils 20 µl des gebrauchsfertigen FITC-markierten Sekundärantikörpers wurde wiederum 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Objektträger mit Eindeckmedium eingedeckt und mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axioskop 2 (Carl Zeiss AG) unter Einsatz des für das Fluorophor FITC (Fluoresceinisoithiocyanat) geeigneten Filtersatzes 09 ausgewertet. Für die Bewertung von Zellen wurde eine 400fache und von Gewebeschnitten eine 200fache Vergrößerung eingesetzt.

Bei den Versuchen zur Zerstörung bzw. Extraktion der CU-assoziierten Zielantigene fand 30 Minuten lang eine Behandlung mit den verschiedenen Reagenzien vor dem Standard-Immunfluoreszenztest statt. Für eine Wiederherstellung der P-ANCA-Reaktion wurden depletierte Granulocyten mit

Granulocyten-Extrakten oder aufgereinigten Proteinen 60 Minuten lang beladen und nachfolgend der Standard-Immunfluoreszenztest durchgeführt.

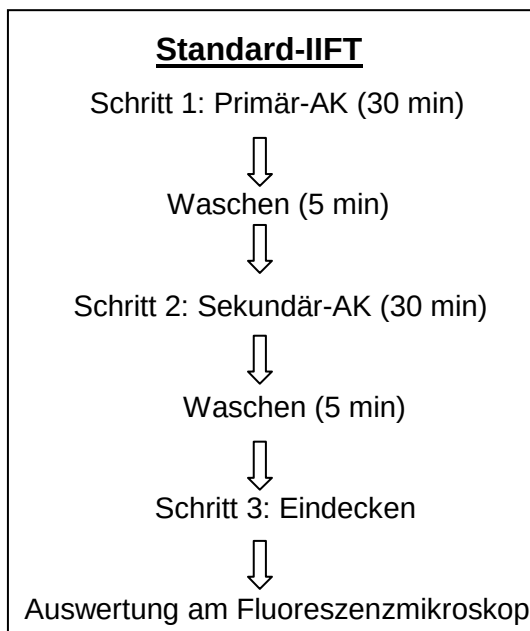


Abbildung 6: Inkubationsanleitung Indirekter Immunfluoreszenztest

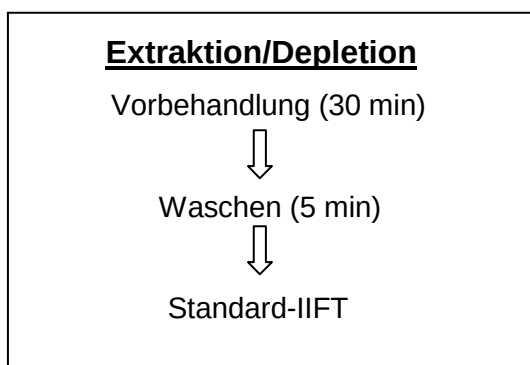


Abbildung 7: Inkubationsanleitung IIFT Extraktion/Depletion

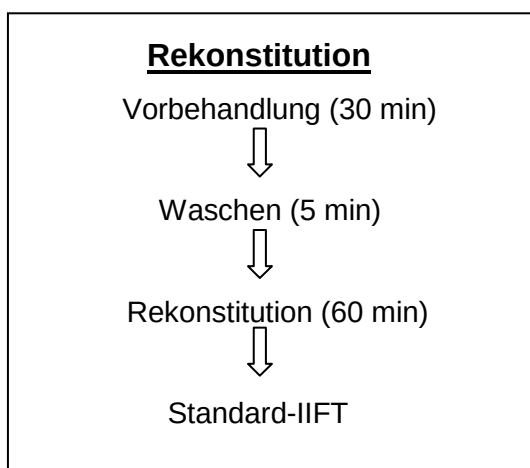


Abbildung 8: Inkubationsanleitung IIFT Rekonstitution

Zur **Herstellung der Granulocyten-Substrate** wurden 100 ml frisch abgenommenes Blut von gesunden Spendern mit 500 IE Heparin-Natrium versetzt. Je 15 ml heparinisiertes Blut wurden auf je 15 ml 0,9% NaCl in Percoll (1,09 g/ml) geschichtet und zentrifugiert (Hettich-Rotina 40 min, 4 °C, 355 x g). Die Granulocyten-haltige Fraktion wurde mit einer Pasteurpipette abgehoben, auf 15 ml 0,9% NaCl in Percoll (1,07 g/ml) geschichtet und anschließend zentrifugiert (Hettich-Rotina 30 min, 4 °C, 333 x g). Die Überstände wurden verworfen und auf die Sedimente jeweils 10 ml physiologische Kochsalzlösung pipettiert, vorsichtig resuspendiert und zentrifugiert (Hettich-Rotina 30 min, 4 °C, 333 x g). Die Sedimente wurden zur Eliminierung der verbliebenen Erythrocyten mit einem Lysepuffer (10 mM KHCO₃, 155 mM NH₄Cl, 0,1 mM EDTA in A. dest.) versetzt, 5 Minuten lang unter Schwenken inkubiert und zentrifugiert (Hettich-Rotina 7 min, 4 °C, 219 x g). Im Anschluss daran wurde 3 Mal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert (Hettich-Rotina 15 min, 4 °C, 333 x g). Danach wurde das Sediment in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und die Suspension auf eine Dichte von ca. 50 Granulocyten pro Blickfeld bei einer 250fachen Vergrößerung eingestellt.

Je 750 µl der Granulocytensuspension wurden auf Deckgläser (26 x 76 mm) gegeben. Nach 5 Minuten Sedimentation wurden der Überstand entfernt und die Zellen getrocknet. Eine Fixierung der Granulocyten-Substrate fand entweder in 96% Ethanol oder in einer 1%igen Formaldehyd-Aceton-Lösung 15 Minuten lang statt. Abschließend wurden die Deckgläser bei Raumtemperatur getrocknet, in Aluminium-Tüten versiegelt und danach bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert.

Für die **P-ANCA-Bestimmung** wurden Objektträger mit 10 Auftragestellen eingesetzt, auf denen jeweils 2 BIOCHIPS mit Ethanol- und Formaldehyd-fixierten Granulocyten bestückt waren. Dafür wurden die Deckgläser maschinell in 2,5 x 2,2 mm große BIOCHIPS geteilt und auf Objektträger geklebt. Die Inkubation der Seren wurde mittels Standard-Immunfluoreszenztest mit FITC-markiertem Anti-Human-IgA und Anti-Human-IgG durchgeführt.

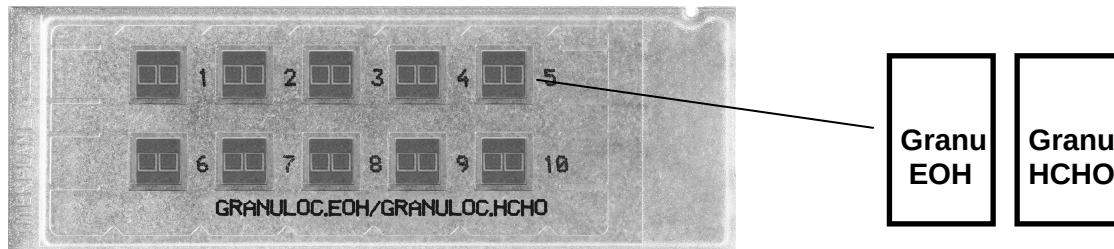


Abbildung 9: **Schematische Darstellung der bestückten Objektträger**

Je Feld 2 BIOCHIPS mit verschiedenen fixierten humanen Granulocyten. EOH = Ethanol-fixiert, HCHO = Formaldehyd-fixiert.

3.2 Antigen-Depletion und -Rekonstituierung

3.2.1 Behandlung der P-ANCA-Zielantigen-Substrate mit Salzlösungen (Depletion) oder Nukleasen (Verdau)

Objektträger mit Ethanol-fixierten Granulocyten wurden mit verschiedenen Reagenzien (≤ 4 M Harnstoff, ≤ 1 M Natriumchlorid, ≤ 1 M Magnesiumsulfat, $\leq 0,5\%$ (w/v) Protaminsulfat, ≤ 20 mM DTT und $\leq 1\%$ (v/v) Formaldehyd) in TBS-Puffer (pH 7,4) 30 Minuten lang behandelt und dann mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde dieses Substrat im IIFT eingesetzt und 5 P-ANCA-positive Seren von CU-Patienten (Verdünnung 1:10 in PBS-Tween) inkubiert. Alle Versuche wurden auch mit je einem Serum eines gesunden Probanden sowie mit einem Anti-MPO-positiven Serum durchgeführt.

Alternativ wurden Objektträger mit Ethanol-fixierten Granulocyten mit DNA verdauenden Enzymen 30 Minuten lang behandelt, mit PBS-Tween gewaschen und anschließend mit 5 P-ANCA-positiven Seren von CU-Patienten (Verdünnung 1:10 in PBS-Tween) inkubiert. Alle Versuche wurden auch mit je einem Serum eines gesunden Probanden sowie mit einem Anti-MPO-positiven Serum durchgeführt. Die Vorbehandlung der Substrate wurde mit TBS-Puffer (pH 7,4)

sowie den darin verdünnten Enzymen **Benzonase** (0,1% v/v) und **Nuklease S7** (52,5 E/ml) durchgeführt. Beide Enzyme benötigen jeweils einen Co-Faktor (Benzonase: 5 mM Magnesiumchlorid, Nuklease S7: 2 mM Calciumchlorid). Die Co-Faktoren wurden auch separat zur Vorbehandlung eingesetzt, ohne die Enzyme.

Der **DNase-I-Verdau** der Granulocyten fand nach den Vorgaben von Vidrich et al. statt. Dazu wurden Objektträger mit Ethanol-fixierten neutrophilen Granulocyten 30 Minuten lang bei 37 °C mit einer DNase-I-Lösung (3 U/ml in 40 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂) behandelt. Da sich schon allein die enzymfreie Inkubation bei 37 °C negativ auf den Zustand der Granulocyten auswirkte, wurde bei allen weiterführenden Untersuchungen die Behandlung mit DNase-I 2 Stunden lang bei Raumtemperatur anstelle bei 37 °C durchgeführt.

Zur Kontrolle des Einflusses der Reagenzien auf die Integrität der Granulocyten-DNA wurden die Objektträger nach der Vorbehandlung mit den unterschiedlichen Reagenzien 30 Minuten lang mit **Propidiumiodid** in einer Konzentration von 400 ng/ml in TBS inkubiert. Propidiumiodid ist ein hochspezifischer Farbstoff für DNA, der in hohem Maße mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Zur Auswertung am Mikroskop wurde der Filtersatz 15 (Zeiss) eingesetzt.

3.2.2 Rekonstituierung depletierter Granulocyten

Ethanol-fixierte Granulocyten wurden mit 1 M MgSO₄ 30 Minuten lang depletiert und mit PBS-Tween gewaschen. Im Anschluss daran wurden die depletierten Granulocyten mit Antigenen unterschiedlicher Quellen eine Stunde lang überschichtet und danach mit PBS-Tween gewaschen. Daraufgehend wurde ein IIFT mit verschiedenen charakterisierten Seren nach Standardanweisung durchgeführt. Parallel fand stets ein Antigen-freier Ansatz mit TBS (pH 7,4) statt. Analog wurden statt 1 M MgSO₄-depletierter Granulocyten auch Benzonase oder Nuklease S7 vorbehandelte Granulocyten als IIFT-Substrate eingesetzt und ihre Rekonstitutionsfähigkeit untersucht.

a) Rekonstituierung mit Granulocyten-Extrakten

Die in **3.4.1** hergestellten Granulocyten-Extrakte wurden jeweils in TBS (pH 7,4) verdünnt und für die Rekonstituierung depletierter Granulocyten eingesetzt. Danach wurde ein IIFT mit je 5 P-ANCA-positiven CU-Seren, einem Anti-MPO-positiven Serum und Seren gesunder Probanden nach Standardanweisung durchgeführt.

b) Rekonstituierung mit individuellen Proteinen

Depletierte Granulocyten wurden mit aufgereinigten Granulozytenproteinen (**Laktoferrin** aus humaner Milch, Sigma-Aldrich, 250µg/ml; Laktoferrin aus boviner Milch, Sigma-Aldrich, 250µg/ml; humanes rekombinantes Laktoferrin aus Reis, Sigma-Aldrich, 250µg/ml; **MPO** aus humanen neutrophilen Granulocyten, AROTEC DIAGNOSTICS LIMITED, 26 µg/ml; humanes rekombinantes **Azurocidin**, Sino Biological Inc., 20 µg/ml) in TBS eine Stunde lang überschichtet und mit PBS-Tween gewaschen. Im Anschluss fand ein IIFT mit 5 P-ANCA-positiven CU-Seren und 5 Seren gesunder Probanden nach Standardanweisung statt. Zusätzlich wurde ein IIFT mit Anti-MPO-positiven Seren, Anti-Laktoferrin- (Dianova 1:500 und Eurogentec 1:200), Anti-MPO- (Eurogentec 1:80) und Anti-Azurocidin-Antikörpern aus Kaninchen (Sigma-Aldrich, 1:200) in PBS-Tween und FITC-markiertem Anti-Kaninchen-IgG (1:200) in PBS-Tween sowie parallel dazu mit einem murinen Anti-His-Tag-Antikörper (Merck KGaA 1:200) in PBS-Tween und Markierung durch Cy2-konjugiertes Anti-Maus-IgG (Dianova 1:200) in PBS-Tween zur Kontrolle ausgeführt.

3.2.3 Herstellung eines standardisierten Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten-Substrats

Zur Standardisierung und Vereinfachung der Untersuchung von Antikörpern gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin mittels IIF wurden Immunfluoreszenz-Präparate hergestellt, bei denen die Depletion und die Rekonstituierung mit Laktoferrin bereits vorab durchgeführt wurden. Diese Substrate werden nachfolgend als Laktoferrin-rekonstituierte Granulocyten bezeichnet. Dazu wurden Deckgläser (66 x 100 mm) mit Granulocyten gesunder Spender beschichtet. Nach dem Trocknen wurde das Substrat 15 Minuten lang mit Ethanol fixiert (**3.1**).

Anschließend fand eine Extraktion mit 1 M MgSO_4 statt (30 min). Nach einem Waschschriff mit PBS-Tween wurden die Substrate mit 50 oder 250 $\mu\text{g/ml}$ Laktoferrin aus humaner Milch (Sigma-Aldrich) in TBS 1 Stunde lang beladen, erneut mit PBS-Tween gewaschen und mit Ethanol fixiert (5 min). Um die Spezifität des Nachweises der Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper zu kontrollieren, wurden parallel nicht-rekonstituierte Granulocyten eingesetzt.

Deckgläser mit Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten und nicht-rekonstituierten Granulocyten wurden anschließend maschinell in Biochips (3.1) fragmentiert, die Fragmente wurden auf Objektträger mit je 10 Feldern geklebt. Die Qualität dieser vorkonfektionierten Granulocyten-Substrate wurde zunächst im IIFT mit einem Panel charakterisierter humaner Seren und dem polyklonalen Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper (Dianova) überprüft.

3.2.4 Laktoferrin-Applikation auf HEp-2-Zellen und Gewebeschnitte

Analog zu depletierten Granulocyten wurden auch HEp-2-Zellen und Gefrierschnitte der Affenleber (FB 1510-1010-1, EUROIMMUN AG), die initial kein Laktoferrin besitzen, mit Laktoferrin aus humaner Milch (Sigma-Aldrich, 250 $\mu\text{g/ml}$ in TBS) beladen. Kontrollen wurden mit TBS durchgeführt. Überprüfung der Bindung von Laktoferrin an die Zellen durch IIF: Inkubation nach Standardanweisung im ersten Schritt parallel polyklonaler Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper (Dianova) und 5 P-ANCA-positive CU-Seren. Alle IIFT wurden auch mit Seren gesunder Probanden angesetzt.

3.3 Formaldehyd-Fixierung

Es wurde untersucht, wie sich eine Formaldehyd-Fixierung auf die Zielantigene der CU-assoziierten P-ANCA im Vergleich zur Myeloperoxidase unter Austestung verschiedener Fixierungsmodalitäten auswirkt. Ethanol-fixierte Granulocyten wurden in $\leq 1\%$ (w/v) Formaldehyd in TBS und zur Kontrolle in PBS-Tween ohne Formaldehyd 30 min lang getaucht. Zum Vergleich wurden Granulocyten-Substrate zuerst mit PBS-Tween (30 min) behandelt und anschließend mit Formaldehyd (30 min) fixiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die

Objektträger gründlich gewaschen. Anschließend wurden die Substrate im IIFT unter Verwendung 5 P-ANCA-positiver CU-Seren und 5 Anti-MPO-positiver Seren eingesetzt.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Granulocyten-Extrakten

Verschiedene Reagenzien wurden eingesetzt, um die potentiellen Zielantigene der CU-assoziierten P-ANCA intakt von den Granulocyten-Substraten zu extrahieren und darauffolgend zu analysieren. Granulocyten-Substrate (Größe 66 x 100 mm) mit Ethanol-fixierten Granulocyten (3×10^6) wurden schrittweise mit Puffern aufsteigender Ionenstärke unter Zusatz von Complete™ Proteaseinhibitor-Cocktail ausgewaschen: Übersichtung jedes Mal 30 Minuten lang mit je 10 ml TBS (pH 7,4), danach mit 300 mM NaCl in TBS, dann mit 550 mM NaCl in TBS oder alternativ mit 0,05% (v/v) Benzonase in 5 mM MgSO_4 /TBS. Die jeweiligen Überstände wurden durch Ultrafiltration mit einem Cut-off von 10 kDa (Vivaspin) auf je ca. 100 μl einkonzentriert und durch einen 3- maligen Pufferaustausch mit TBS (pH 7,4) entsalzt. Lagerung der Extrakte bis zum Gebrauch bei -20 °C.

3.4.2 Chromatographie-Verfahren

Für die **SDS-PAGE** wurden gebrauchsfertige diskontinuierliche 4-12% Bis-Tris Mini Gele (Invitrogen) mit der dazugehörigen XCell SureLock Mini-Cell-Apparatur eingesetzt. Die SDS-Gelelektrophorese wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Pro Auftragsspur wurden 10 μl Probengemisch bzw. 1 μg aufgereinigtes Laktoferrin (Sigma-Aldrich) oder MPO (AROTEC DIAGNOSTICS LIMITED) in 10 μl PBS mit 4 μl NuPAGE-Probenpuffer (Invitrogen) versetzt. Bei Arbeiten unter reduzierenden Bedingungen (Version A) wurde dieses Gemisch mit 1 μl 250 mM DTT versetzt, unter nichtreduzierenden Bedingungen (Version B) ohne Zusatz von DTT. Nach dem Erhitzen der Proben auf 70 °C (10 min) wurde das Gel mit 12 μl der vorbereiteten Probe pro Spur beladen. Als Lauflängenmarker wurde der Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder der Firma Fermentas verwendet. Das Probengemisch wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden in einem Tank-Blot-System unter Verwendung von NuPAGE-Transferpuffer (Invitrogen) eine Stunde lang bei 350 bis 400 mA auf Nitrocellulosemembranen überführt.

Zur Auftrennung der DNA wurde die **Agarose-Gelelektrophorese** eingesetzt. Es wurden 0,8%ige (w/v) Agarose-Gele in TAE-Puffer hergestellt, denen 0,1% Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Proben wurden in 6 x Ladepuffer (6 x MassRuler® Loading Dye Solution, Fermentas GmbH) und A. dest. aufgenommen. Zur Abschätzung der Molekülgröße wurde ein Größenmarker (MassRuler® DNA Ladder Mix, Fermentas GmbH) genutzt. In Abhängigkeit von der Gelgröße betrug die Laufzeit 10 bis 20 Minuten. Spannung konstant 160 V. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Gel zur Dokumentation fotografiert.

3.4.3 Proteinfärbungen

Die **Silberfärbung** der Gele wurde mit einer modifizierten Methode nach Heukeshoven (Heukeshoven und Dernick, 1988) durchgeführt.

Lösung	Komponenten	Färbezeit
Fixierung	30% Ethanol, 10% Essigsäure	30 min
Inkubation	30% Ethanol, 500 mM Natriumacetat, 1% (v/v) Glutaraldehyd, 1 Kristall $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30 min
Waschen	A. dest.	3 x 5 min
Färbung	0,1% (w/v) Silbernitrat, 0,02% Formaldehyd	15 min
Waschen	A. dest.	3 x 5 min
Entwicklung	240 mM Na_2CO_3 , 0,01% Formaldehyd	1 - 5 min
Stoppen	50 mM EDTA	5 min
Waschen	A. dest.	5 min

Tabelle 2: Modifizierte Silberfärbung nach Heukeshoven

Für die **Proteinfärbung mit Coomassie** wurden die Gele zuerst 3 x 5 Minuten lang mit A. dest. gewaschen. Anschließend wurden 20 ml der Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Lösung dazugegeben und über Nacht auf dem Wippschüttler gefärbt.

Mit einem Gemisch aus Essigsäure und Methanol (10/40% v/v) wurden die Gele entfärbt und zur Dokumentation eingescannt.

Die Nitrocellulosemembranen wurden nach Herstellerangaben mit **Ponceau S** (Serva) 5 Minuten lang gefärbt. Vor einer nachfolgenden Immundetektion wurden die Membranen mit 50 mM Tris komplett entfärbt.

3.4.4 Westernblot-Analytik

Alle Inkubationen zur Immundetektion wurden auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Die freien Proteinbindungsstellen auf der Blotmembran wurden mit UniversalpufferPlus (EUROIMMUN AG) nach Herstelleranweisung 15 min blockiert. Für die Untersuchung der Granulocyten-Extrakte wurden im ersten Westernblot-Inkubationsschritt die in UniversalpufferPlus verdünnten Antikörper (Kaninchen-Anti-MPO SA5490, 1:10.000; Kaninchen-Anti-Laktoferrin, Dianova 1:10.000) 3 Stunden lang mit den Streifen inkubiert. Zusätzlich wurden auch die in Zusammenarbeit mit Eurogentec generierten monoklonalen Anti-Laktoferrin-Antikörper (1:200) aus Maus für eine weitere Charakterisierung der humanen Laktoferrin-Varianten eingesetzt.

Humanes Laktoferrin aus Milch wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen elektrotransferiert und anschließend mit 10 CU-assoziierten P-ANCA, 5 Seren gesunder Probanden (jeweils 1:100) sowie einem Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper (SA6206, 1:10.000) 3 Stunden lang inkubiert. Das humane MPO wurde mit dem Kaninchen-Anti-MPO-Antikörper (SA5490, 1:10.000) und jeweils 5 Anti-MPO-positiven AAV-Seren und Seren gesunder Probanden (1:100) dargestellt. Nach dem Waschen mit Universalpuffer (EUROIMMUN AG) (3 x 5 min) folgte die Inkubation mit den mit Alkalischer Phosphatase (AP) markierten Sekundärantikörpern. Anti-Kaninchen-IgG-AP (Sigma) und Anti-Maus-IgG-AP (Dianova) wurden in einer Verdünnung 1:2.000 und Anti-Human-IgG-AP (EUROIMMUN AG) 1:10 in UniversalpufferPlus eingesetzt und je 30 Minuten lang inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde jeweils das NBT/BCIP-Chromogensubstrat dazugegeben und die Reaktion

nach 10 Minuten durch Zugabe von A. dest. gestoppt. Die Auswertung erfolgte an den getrockneten Teststreifen visuell, unter Zuhilfenahme des Lauflängenmarkers.

3.4.5 MALDI-ToF Massenspektrometrie

Die Granulocyten-Eluate aus **3.4.1** wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie (MALDI-ToF: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) untersucht. Nach einer speziellen Probenvorbereitung wurden die zu analysierenden Proben in eine Matrix aus α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure eingebettet und mittels eines Laserstrahls desorbiert. Die Fragmente wurden in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die einzelnen Ionen erreichten je nach Masse und Ladung zu unterschiedlichen Zeiten den Detektor (Time of Flight). Es ergab sich für jedes Protein ein spezifischer Fingerabdruck, an dem die Proteine unter Zuhilfenahme einer Datenbank identifiziert werden konnten.

Die einzelnen Proteinbanden wurden mit einem Skalpell aus den Coomassie-gefärbten Gelen geschnitten und in Reaktionsgefäße (Non Skirted, Thermo-Fast 96well Platten, biostep GmbH) überführt. Durch die schrittweise Zugabe und Entfernung von „Waschlösung 1“ (2 x je 20 min), „Waschlösung 2“ (20 min) und Acetonitril (10 min) wurden die Gelstücke entfärbt. Anschließend wurde die Flüssigkeit jeweils durch Zentrifugation ultrafiltriert. Zur Spaltung von Disulfidgruppen wurde DTT-Lösung zugesetzt und 30 Minuten lang bei 56 °C inkubiert. Danach wurde mit Iodacetamid-Lösung (20 min) alkyliert, mit Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen (15 min) und nach Zugabe von Acetonitril die Flüssigkeit wieder mittels Zentrifugation entfernt. Anschließend erfolgte eine enzymatische Spaltung mit Trypsin-Lösung, 6 Stunden lang bei 37 °C. Die entstandenen Fragmente wurden mit „Extraktionslösung“ 1 Stunde lang unter Schütteln extrahiert und die Extrakte bis zur MALDI-ToF-Analyse bei -20 °C gelagert.

Nach der proteolytischen Spaltung wurden die Peptidfragmente der Massenspektrometrie an einem Bruker Autoflex III Smartbeam unterworfen. Die resultierenden Spektren wurden mit der Mascot Software unter Nutzung der Swall-

Datenbank ausgewertet. Als Identifizierungs-Kriterium wurde ein Mascot Score >69 ($p < 0,05$) angesehen.

3.4.6 ELISA zum Nachweis CU-assoziiierter P-ANCA

Zum Nachweis der Antikörper gegen MPO, Proteinase 3 und Laktoferrin wurden ELISA der EUROIMMUN AG eingesetzt und dabei die Herstellerangaben befolgt. Die Seren der CU-Patienten wurden mit einem ANCA-Profil-ELISA (EUROIMMUN AG) auf ihre ANCA-Spezifität (PR3, MPO, Elastase, Cathepsin G, BPI und Laktoferrin) untersucht.

Zur Evaluierung von ELISA-Testsystemen zum Nachweis der CU-assoziierten P-ANCA wurden viele unterschiedliche Varianten konzipiert und getestet. Eine Kontrolle fand dabei jeweils mit P-ANCA-positiven CU-Seren, einem Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper (Dianova) und monoklonalen Maus-Anti-Laktoferrin-Antikörpern (Eurogentec) statt.

Die Herstellung der DNA-Präparation für den Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA wurde modifiziert nach einer Nukleosomen-Präparation aus Kalbsthymus unter Wegfall des Nuklease-S7-Verdau (Suer et al., 2004) durchgeführt: 25 g Kalbsthymus wurden in 300 ml 0,9% NaCl homogenisiert und filtriert. Das Filtrat wurde zentrifugiert (15 min, 4 °C, 1.000 xg) und die resultierenden Pellets dreimal mit 0,9% NaCl gewaschen. Aufreinigung der Zellkerne: aufeinanderfolgende Ultrazentrifugation durch Sucrosekissen (250 mM Sucrose in 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 3 mM CaCl_2 und 2 M Sucrose in 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 3 mM CaCl_2 , 0,5% (w/v) Triton X-100); 25 min, 4 °C, 3.689 xg bzw. 25 min, 4 °C, 13.317 xg). Die Zellkerne wurden mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) lysiert und nach einer Zentrifugation (25 min, 4 °C, 13.317 xg) in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA bei -20 °C gelagert.

Für den hier entwickelten Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA wurden MaxiSorp-Mikrotiterplatten (Nunc) zuerst mit je 25 µl der DNA-Präparation (1:200 in PBS) pro Well über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet, dann gewaschen (3 x mit PBS) und

mit 50 µl Laktoferrin aus humaner Milch (Sigma-Aldrich, 1:50 in PBS) 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Die klinisch charakterisierten Seren (39 CU, 96 MC, 62 PSC) sowie 50 Seren gesunder Probanden wurden 1:25 in Probenpuffer (0,5% (v/v) Ziegenserum, 0,05% Tween 20, 0,045% Natriumazid in PBS) verdünnt. Pro Well der beschichteten Mikrotiterplatten wurden jeweils 50 µl der verdünnten Proben eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS wurde mit je 100 µl des Sekundärantikörpers Maus-Anti-Human IgG-PolyHRP40 F(ab)2 (SDT GbR, 1:40.000) 30 Minuten lang inkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift fand eine Inkubation mit je 100 µl Chromogen/Substratlösung (TMB/H₂O₂, EUROIMMUN AG) statt. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von je 100 µl Stopplösung (0,5 M H₂SO₄, EUROIMMUN AG) beendet. Die Photometrie erfolgte bei 450 nm in einem ELISA-Reader (Tecan).

3.5 Monoklonale P-ANCA

Für den Einsatz als Positivkontrolle bei der Etablierung neuer standardisierter Testsysteme wurden 2 monoklonale Antikörper gegen Laktoferrin generiert.

Deckgläser mit Ethanol-fixierten Granulocyten wurden in physiologische Kochsalzlösung getaucht, die Zellen abgeschabt und zum Immunisieren von 4 Mäusen nach Standardprotokoll zur Firma Eurogentec (Köln) geschickt. Den Mäusen wurde zu 3 verschiedenen Zeitpunkten (Tage 0, 35 und 56) Blut entnommen und durch IIF mit Ethanol- und Formaldehyd-fixierten humanen Granulocyten, HEp-2-Zellen und Affenleber (Granulocyten-Mosaik 3, EUROIMMUN AG) sowie einem ANCA-Profil-ELISA (EUROIMMUN AG) untersucht. Der ELISA ermöglichte die Differenzierung von Antikörpern gegen die Granulocytenproteine Proteinase 3, MPO, Elastase, Cathepsin G, BPI und Laktoferrin. In allen 4 Mäuseseren wurden ab Tag 35 oder 56 mittels IIF Antikörper gegen Granulocyten nachgewiesen und alle Antigene des ANCA-Profil-ELISA reagierten positiv. Daraufhin wurden für alle Tiere bei Eurogentec Hybridome hergestellt. Die

resultierenden 4 x 768 Zellkultur-Überstände wurden wiederum auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Granulocyten mit einem IIFT untersucht.

23 von 768 Zellkultur-Überständen der Zellen einer Maus (Maus 1) reagierten in dem IIFT mit einem P- oder C-ANCA und wurden mit dem ANCA-Profil-ELISA weiterdifferenziert. Für 6 dieser Hybridome konnten ein oder mehrere Zielantigene (Laktotferrin, MPO, PR3, Cathepsin G) definiert werden (Tabelle 3).

Hybridome	PR3	MPO	Elastase	Cathepsin G	BP I	Laktotferrin	ANCA
WG3C4	(+)	(+)	-	-	-	+++	P-ANCA
WG4E1	-	-	-	-	-	+++	C-ANCA
WG4D5	++++	-	-	-	-	-	C-ANCA
WG4B11	-	-	-	-	-	++++	P-ANCA
WG5D1	-	-	-	(+)	-	-	C-ANCA
WG3D4	-	-	-	(+)	-	-	randbetont

Tabelle 3: **ANCA-reaktive Hybridome der Maus 1**

Für eine Subklonierung wurden die grau unterlegten Zellkultur-Überstände WG3C4 und WG4B11 ausgewählt.

Bei 2 von 3 Hybridomen (WG3C4 und WG4B11), in denen Anti-Laktotferrin-Antikörper vorhanden waren, wurde eine Subklonierung durchgeführt, aus der mehrere Zellklone hervorgingen, die Laktotferrin-spezifische monoklonale Antikörper exprimierten. Die resultierenden Zellklone wurden erneut überprüft, Gefrierkulturen angelegt und größeren Mengen von Zellkultur-Überständen produziert. Für die Aufreinigung der monoklonalen Antikörper wurde Protein A-Sepharose (GE Healthcare) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Bei keinem der ANCA-positiv getesteten Zellkultur-Überstände der Mäuse 2, 3 und 4 konnten Anti-Laktotferrin-Antikörper nachgewiesen werden. Von einem IIFT-reaktiven Überstand bei Maus 2, der ein sehr hoch positives P-ANCA zeigte, aber mit keinem der Zielantigene im ELISA reagierte, wurde ebenfalls eine Subklonierung durchgeführt. Es ließ sich aber bisher kein Zielantigen identifizieren.

Polyklonale Antikörper gegen Laktoferrin (SA6206) und MPO (SA5490) wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit Laktoferrin (rekombinant aus Reis, Sigma-Aldrich) bzw. MPO (schwere Kette, EUROIMMUN AG) nach einem Standard-Programm von 87 Tagen generiert (Eurogentec). Die Reaktivität der Seren wurde durch IIF mit Ethanol- und Formaldehyd-fixierten humanen Granulocyten und im Westernblot mit humanem Laktoferrin bzw. MPO überprüft.

3.6 Molekularbiologische Methoden

Ausgangspunkt für die **Herstellung rekombinanten Laktoferrins** war die Laktoferrin-cDNA der Firma ImaGenes (BC015823, ET338), die 3 Mutationen enthielt. Zur Korrektur dieser wurden 3 Teilstücke hergestellt, die über eine nachgeschaltete Overlap-PCR verbunden wurden. Dazu wurde die cDNA ET338 in LB-Medium unter Zusatz von Chloramphenicol angeimpft. Nach dem Schütteln der Probe über Nacht bei 37 °C und einer Zentrifugation, wurde die Plasmid-DNA mit dem „NucleoSpin® Plasmid“-Kit (Machery-Nagel GmbH & Co. KG) nach Angaben des Herstellers isoliert. Im Anschluss fand eine Standard-PCR (30 Zyklen; 2,4 min, 94 °C; 45 s, 56 °C; 10 s bei 72 °C) statt. Die 3 Fragmente wurden im Agarose-Gel analysiert und eluiert. Über eine Overlap-PCR (30 Zyklen; 2,5 min, 94 °C; 45 s, 56 °C; 2,5 min bei 72 °C) wurden die 3 aufgereinigten DNA-Fragmente miteinander verbunden.

Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten und einzeln weiterverarbeitet. Für die **Aufreinigung** der PCR-Produkte wurde die DNA mit Hilfe des „NucleoSpin® Extracts II“-Kits (Machery-Nagel GmbH & Co. KG) nach Herstellerangaben aus dem Gel eluiert. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend mit Hilfe der **Restriktionsenzyme** *Hind*III und *Xho*I sequenzspezifisch geschnitten, um die Ligation vorzubereiten (1 h, 37 °C).

Zur **DNA-Ligation** wurde das „Rapid DNA Ligation“-Kit (Fermentas GmbH) entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt, um die *Hind*III/*Xho*I geschnittenen DNA-Fragmente mit dem von der EUROIMMUN AG hergestellten pEP7-*Hind*III/*Xho*I-Vektor zu ligieren. Durch die **Transformation** konnte rekombinant hergestellte Plasmid-DNA in speziell vorbehandelte Zellen integriert

werden. Dafür wurden 20 µl kompetente Zellen (*E.coli* XL2-Blue) zum Ligationsansatz hinzugefügt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock 45 Sekunden lang bei 42 °C und eine erneute Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen 30 Minuten lang bei 37 °C auf einem Thermoschüttler kultiviert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten, versetzt mit 34 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Ampicillin, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden auf eine neue Agarplatte überführt.

Unter Verwendung der sense Primer EP593 und antisense Primer EP1299 wurde pro Klon jeweils eine **analytische PCR** mit einem „Taq DNA Polymerase“-Kit (Fermentas GmbH) durchgeführt (30 Zyklen; 2,5 min, 94 °C; 45 s, 56 °C; 3 min bei 72 °C). Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die Proben analysiert. Die korrekt getesteten Klone wurden über eine Flüssigkultur vermehrt. Dazu wurden sie in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin und Chloramphenicol suspendiert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 3.000 xg) wurde eine **Plasmid-Minipräparation** mit Hilfe eines „NucleoSpin® Plasmid“-Kits durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde nach *HindIII/XhoI*-Restriktionsverdau in einem Agarose-Gel analysiert. Zur funktionellen Analyse wurde eine Testexpression in HEK-293-Zellen unter Verwendung der aufgereinigten Plasmid-DNA eingesetzt.

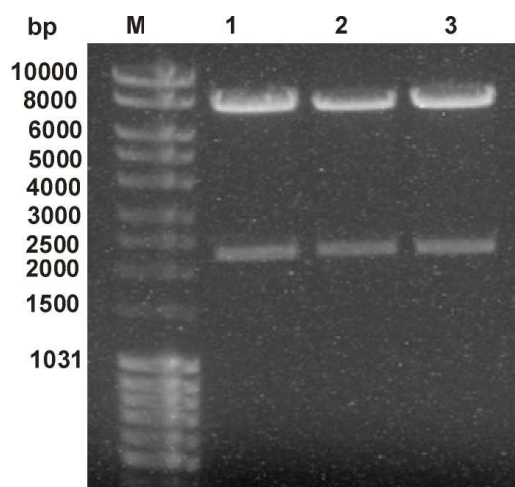


Abbildung 10: **Agarose-Gelelektrophorese der Laktotferrin-Plasmid-DNA**

Alle hier gezeigten analytisch isolierten Plasmide nach *HindIII/XhoI*-Restriktionsverdau haben die korrekte Größe. 1 bis 3: Klonnummern; bp = Basenpaare; M = Lauflängenstandard.

Eine Überprüfung der **klonierten DNA-Sequenzen** erfolgte durch die Firma Eurofins MWG GmbH.

Für die **präparative Aufreinigung** von Plasmid-DNA wurden Nucleobond PC-100- bzw. PC-10.000-Säulen nach Angaben des Herstellers (Machery-Nagel GmbH & Co. KG) verwendet und anschließend die Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl eingestellt. Die Nukleotid-Sequenz wurde durch einen Restriktionsverdau mit darauf folgender Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Für die **transiente Laktoferrin-Expression** wurden HEK-293-Zellen (ATCC®-Nr.: CRL-1573™) verwendet, die adhärent in einer Zellkultur wachsen. Zur Kultivierung wurde D-MEM high Glucose-Medium (PAA Laboratories GmbH) mit 10% FKS eingesetzt.

Die Expression der klonierten Plasmide fand parallel in BD Falcon™ 0,7 cm²-Culture-Slides (8-well) zur Herstellung von IIFT-Substraten und einer 24-Well-Platte (ca. 2 cm² pro well) für die analytische Kontrolle im Westernblot unter Verwendung von ExGen 500 Transfektionsagens (Fermentas GmbH) nach Angaben des Herstellers statt. Parallel wurde unter gleichen Bedingungen jeweils eine Kontrolle mit untransfizierten HEK-293-Zellen mitgeführt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen untersucht.

Für die analytische Probe wurden die Zellen abgeschabt und in Kulturmedium zentrifugiert (2 min, 21.000 xg). Überstand und Pellet wurden mit NuPAGE-Probenpuffer plus DTT versetzt und 10 Minuten lang auf 70 °C erhitzt. Nach einer Ultraschallbehandlung wurden alle Proben auf ein SDS-NuPAGE-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, nach Standardanweisung auf Nitrocellulosemembranen elektrotransferiert und mit einem Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper (Dianova, 1:500) und einem Maus-Anti-His-Tag-Antikörper (Merck KGaA, 1:2.000) und im nächsten Schritt mit AP-markiertem Anti-Kaninchen-IgG (Sigma) bzw. Anti-Maus-IgG (Dianova, je 1:2.000) 30 Minuten lang inkubiert.

Bei der Auswertung der analytischen Probe zeigte sich, dass das fertig prozessierte Laktoferrin aus dem Cytoplasma in das Zellkulturmedium abgegeben

worden war. Daraufhin wurde die Transfektion in einem größeren Maßstab in HYPERFlask-Zellkulturflaschen (1720 cm², Corning) durchgeführt. Dabei wurde ein proteinfreies Zellkulturmedium (PFHM II, Invitrogen) eingesetzt, was die nachfolgende Aufreinigung erleichterte.

Die „Culture-Slides“ mit den Zellen wurden in Aceton (10 min) getaucht und getrocknet. Anschließend wurde ein IIFT durchgeführt: Erster Schritt Kaninchen-Anti-Laktotferrin-Antikörper (Dianova, 1:200), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG (Sigma, 1:200). Eine zusätzliche Überprüfung der Reaktivität fand im IIFT statt: Erster Schritt Maus-Anti-His-Antikörper (Merck KGaA, 1:200), zweiter Schritt FITC-markiertes Anti-Maus-IgG (Sigma, 1:200). Beurteilung der Reaktion am Mikroskop: Es zeigte sich, dass 3 der getesteten 4 Expressionslinien spezifisch mit dem Kaninchen-Anti-Laktotferrin-Antikörper reagierten, aber keiner mit dem Maus-Anti-His-Tag-Antikörper.

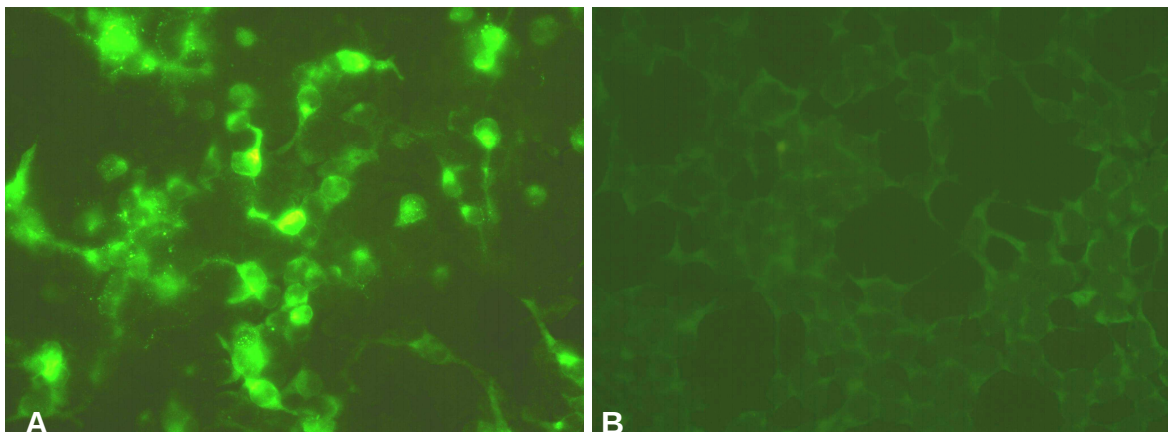


Abbildung 11: Laktotferrin-transfizierte (A) und untransfizierte (B) HEK-293-Zellen

Beispiel-Inkubation mit einem Kaninchen-Anti-Laktotferrin-Antikörper (1:200, 1. Inkubationsschritt) und Anti-Kaninchen-IgG, FITC-markiert (1:200, 2. Schritt). Vergrößerung 400 x.

Für die Herstellung eines diagnostischen Testreagenz für die **IIFT mit Laktotferrin-transfizierten HEK-293-Zellen** wurden HEK-293-Zellen auf in Quadripermschalen liegende Deckgläser (26 x 76 mm) gebracht und mit Laktotferrin-Plasmid-DNA transfiziert. Nach 4 Tagen wurden die Deckgläser mit Aceton (10 min) oder analog zu den neutrophilen Granulocyten mit Ethanol (15 min) fixiert. Parallel wurden jeweils untransfizierte HEK-293-Zellen eingesetzt. Die 4 Varianten wurden als Biochip-Mosaik auf Objektträger mit je

10 Reaktionsfeldern bestückt und im IIFT nach Standardanweisung eingesetzt. Untersucht wurden 7 P-ANCA-positive CU-Seren, 3 Seren gesunder Probanden (jeweils 1:10 in PBS-Tween) sowie ein Kaninchen-Anti-Laktotferrin-Antikörper (Dianova, 1:200).

3.7 Untersuchung der Prävalenz CU-assoziiierter P-ANCA

In den Seren der CU- (n=39), MC- (n=96) und PSC-Patienten (n=62) sowie der gesunden Probanden (n=50) wurden in einem IIFT mit Ethanol- und Formaldehyd-fixierten Granulocyten nach Standardanweisung ANCA bestimmt. Zur Spezifizierung der Immunglobulinklassen der P-ANCA wurden als Sekundärantikörper separat FITC-markiertes Anti-Human-IgA und Anti-Human-IgG (EUROIMMUN AG, gebrauchsfertig) eingesetzt.

Weiterhin wurden alle Seren in einem IIFT mit Laktotferrin-rekonstituierten Ethanol-fixierten Granulocyten (1 M MgSO₄ depletiert, 30 min; gewaschen; mit Laktotferrin aus humaner Milch (Sigma-Aldrich) überschichtet: 250 µg/ml in TBS; 60 min, gewaschen) nach Standardanweisung untersucht. Dafür wurden alle Seren 1:10 verdünnt. Zur Kontrolle wurden parallel auch depletierte nicht-rekonstituierte Granulocyten eingesetzt.

Die Fluoreszenz-Intensität wurde visuell semiquantitativ bewertet: 0 (keine spezifische Fluoreszenz) und 5 (sehr starke spezifische Fluoreszenz).

Intensität	Bedeutung
0	keine spezifische Fluoreszenz
1	spezifische Fluoreszenz sehr schwach zu erkennen
2	spezifische Fluoreszenz schwach zu erkennen
3	spezifische Fluoreszenz gut zu erkennen
4	starke spezifische Fluoreszenz
5	sehr starke spezifische Fluoreszenz

Tabelle 4: **semiquantitative Bewertung der Fluoreszenz-Intensität**

Bei den CU-Seren wurden zusätzlich noch die IgG-Subklassen der Anti-DNA-Laktotferrin-Antikörper mit Laktotferrin-rekonstituierten Granulocyten bestimmt, indem im zweiten Inkubationsschritt FITC-markiertes Anti-Human-IgG1, -IgG2, -

IgG3 und -IgG4 (Sigma-Aldrich, jeweils 1:50 und 1:20 in PBS-Tween) eingesetzt wurde.

Bei Vorliegen von Autoantikörpern gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin präsentierten sich die Zellkerne der Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten mit einem diffusen Muster: Ohne Rekonstitution zeigten die Zellen keine Reaktion. Reagierten die Zellkerne beider Granulocyten-Substrate gleich stark, wurde angenommen, dass Antikörper gegen Bestandteile der Zellkerne, wie z.B. gegen dsDNA, ssDNA, Histone oder Nukleosomen vorlagen. In dieser Studie wurde ein Ergebnis nur dann als positiv beurteilt, wenn entweder nur die Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten reagierten oder deren Reaktion mindestens eine Intensitätsstufe stärker war als bei den nicht-rekonstituierten Zellen.

In allen Proben wurden zusätzlich Antikörper mit dem Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA (3.4.6) bestimmt.

Des Weiteren wurden alle 39 CU-Seren, 96 MC-Seren, 41 der 62 PSC-Seren und 50 Seren gesunder Probanden mit Azurocidin-rekonstituierten Granulocyten (1 M MgSO_4 depletiert, 30 min; gewaschen; mit rekombinantem Azurocidin (Sino Biological Inc.) überschichtet: 20 $\mu\text{g/ml}$ in TBS; 30 min, gewaschen) nach Standardanweisung untersucht.

4 Ergebnisse

Die Zielantigene der CU-assoziierten P-ANCA wurden aus Ethanol-fixierten Granulocyten isoliert und analysiert. Es gelang, sie als „DNA-ANCA“ (vor allem DNA-komplexiertes Laktoferrin und DNA-komplexiertes Azurocidin) zu identifizieren. Des Weiteren wurden die Prävalenzen der entsprechenden Autoantikörper bei Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Primär sklerosierender Cholangiitis bestimmt.

4.1 Einfluss verschiedener Reagenzien auf die Reaktivität der CU-relevanten P-ANCA-Testsubstrate

4.1.1 Effekt der Applikation hoher Ionenstärken

Für MPO und Laktoferrin als zwei basische Hauptinhaltsstoffe der Granulocyten ist vielfach beschrieben, dass sie sich über eine Ionenbindung der DNA anlagern (Bennett et al., 1986, Murao et al., 1988, van Berkel et al., 1997). Zur Ablösung dieser und möglicherweise weiterer P-ANCA-Zielantigene vom Zellkern Ethanol-fixierter Granulocyten wurden die Zellen mit Salzlösungen hoher Ionenstärke behandelt (**1 M Magnesiumsulfat**). Nach einem Waschschrift mit PBS-Tween wurde das resultierende Substrat in einem IIFT mit humanen Seren nach Standardanweisung eingesetzt.

Die Vorbehandlung der Granulocyten mit 1 M MgSO_4 bewirkte, dass alle 5 bei den Vorversuchen eingesetzten P-ANCA-positiven CU-Seren keine P-ANCA-Reaktion mehr zeigten. Das Anti-MPO-positive Serum reagierte ebenfalls nicht mehr nach dieser Vorbehandlung. Das Serum eines gesunden Probanden blieb unverändert negativ. Aus diesen Ergebnissen ließ sich folgern: Entweder wurden die Zielantigene durch die Reagenzien zerstört oder aus den Zellen extrahiert. Deshalb konnten sie nicht mehr mit den Antikörpern der Serenproben reagieren.

Wurden die Granulocyten mit MgSO_4 in steigenden Stoffmengenkonzentrationen ≤ 1 M vorbehandelt, zeigten ab 250 mM 3 der 5 CU-Seren keine Reaktion mehr, bei den anderen beiden Seren war die Reaktivität vermindert. Ab 500 mM reagierte keines der 5 CU-Seren mehr.

Bei der Vorbehandlung mit **Natriumchlorid** ≤ 1 M ergaben sich ähnliche Resultate. Konzentrationen bis 250 mM beeinflussten die Reaktion der P-ANCA nicht. Bei 500 mM reagierten nur noch 3 der 5 CU-Seren, z. T. aber mit verringerter Intensität. Eine komplette Unterdrückung der P-ANCA-Reaktion aller 5 CU-Seren ergab sich bei 1 M NaCl. Es ist anzunehmen, dass die Inhibition von der Zunahme der Ionenstärke herrührt.

4.1.2 Effekt von Nukleasen

Eine Vorbehandlung der Granulocyten mit den Nukleasen **Benzonase** oder **Micrococcus Nuklease S7** resultierte ebenfalls in einem Verlust des perinukleären Musters aller 5 P-ANCA-positiven CU-Referenzseren. Der eingesetzte Verdünnungspuffer TBS selbst beeinflusste das P-ANCA-Ergebnis nicht.

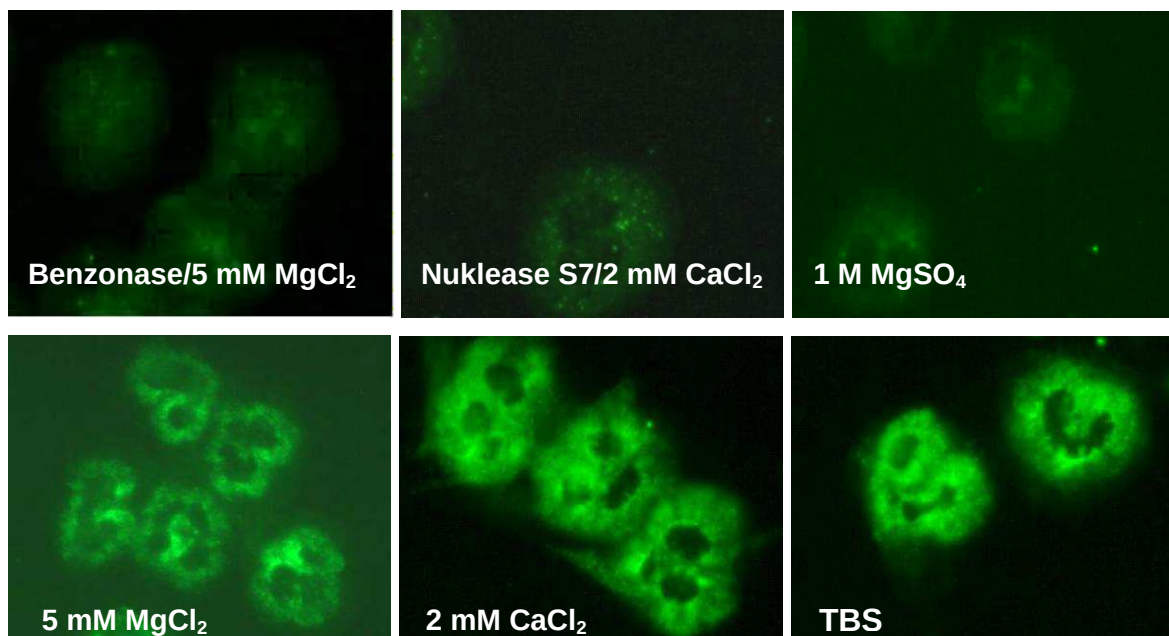


Abbildung 12: P-ANCA-Reaktivität eines CU-Serums nach Vorbehandlung der P-ANCA-Substrates

Einfluss der Vorbehandlung mit Benzonase, Nuklease S7, 1 M MgSO_4 bzw. der Co-Faktoren 5 mM MgCl_2 und 2 mM CaCl_2 (jeweils in TBS) sowie TBS auf die P-ANCA-Reaktion eines CU-Serums (Verdünnung 1:10, Anti-Human-IgG, FITC-markiert) mit Ethanol-fixierten Granulocyten (Vergrößerung 400 x).

Die Co-Faktoren allein (5 mM Magnesium für Benzonase, 2 mM Calcium für Nuklease S7) bewirkten gleichermaßen keine Veränderung der nachfolgenden Antikörperreaktion. Die Reaktion eines Anti-MPO-positiven Serums wurde durch Benzonase und Nuklease S7 hingegen ebenfalls komplett inhibiert. Das Serum eines gesunden Probanden reagierte weder vor noch nach Behandlung mit diesen Co-Faktoren der Granulocyten.

Die Behandlung mit **DNase-I** nach den Vorgaben von **Vidrich et al.** (30 Minuten bei 37 °C) veränderte die Ethanol-fixierten Granulocyten stark. Sie quollen extrem auf, so dass keine objektive Beurteilung der Fluoreszenz mehr möglich war. Diese Wirkung beruhte allerdings nicht auf der DNase-I an sich, sondern lag allein an der Temperatur, wie Kontrolluntersuchungen ergaben. Daraufhin fand bei den weiteren Untersuchungen die DNase-I-Vorbehandlung 2 Stunden lang bei Raumtemperatur (anstelle von 37 °C) statt: Die Ergebnisse der Temperatur-optimierten DNase-I-Behandlung variierten. Bei den meisten CU-assoziierten P-ANCA kam es zu dem von Vidrich et al. beschriebenen Reaktionsverlust, bei anderen (seltener) zu einer Musterkonvertierung von der perinukleären in eine eher cytoplasmatische Reaktion: Von 24 CU-Seren verloren 11 (45,8%) ihre P-ANCA-Reaktivität komplett, 7 (29,2%) zeigten danach eine glatte cytoplasmatische Reaktion. 6 Seren (25,0%) blieben nahezu unbeeinflusst, d.h. es war auch nach DNase-I-Verdau ein deutliches perinukleäres Muster sichtbar. Zudem war es bei wiederholten Untersuchungen schwierig, mit den gleichen Proben konstante Resultate zu erhalten.

Eindeutiger verhielten sich P-ANCA-positive AIH-Seren: 4 von 7 (57%) Seren verloren ihre P-ANCA-Reaktion nach DNase-I-Behandlung und 3 Seren (43%) konvertierten zu einem cytoplasmatischen Muster. Auf die Reaktion mit Antikörpern gegen Proteinase 3 hatte die DNase-I-Behandlung keinen Einfluss. Im Unterschied dazu variierte aber auch die Reaktion der Anti-MPO-positiven Seren. Von den beiden mitgeführten Kontrollen verlor eines die Reaktion und das andere konvertierte.

Aufgrund dieser Ergebnisse mit DNase-I-verdauten Granulocyten konnte keine sichere Differenzierung zwischen CU- und AIH-assoziierten P-ANCA sowie den

durch Antikörper gegen MPO hervorgerufenen P-ANCA vorgenommen werden. Ein zusätzlicher Einsatz Formaldehyd-fixierter Granulocyten parallel zu den Ethanol-fixierten Granulocyten wäre sinnvoller, da dann zumindest die Anti-MPO-positiven Seren deutlich abgegrenzt werden könnten. Die DNase-I-Vorbehandlung der Granulocyten ist nicht effektiv genug, um bei allen Seren die Reaktion der CU-assoziierten P-ANCA zu unterdrücken. Eine Behandlung mit Benzonase oder Nuklease S7 bewirkte dagegen stets eine eindeutige Inhibition der P-ANCA-Reaktion.

Nach Vorbehandlung mit den Nukleasen Benzonase oder Nuklease S7 (**Abbildung 13**) ließen sich die Zellkerne der Granulocyten nicht mehr mit **Propidiumiodid** anfärben. Nukleasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen in Nukleinsäuren und damit die Spaltung von DNA und RNA. Das Propidiumiodid konnte nicht mehr in die DNA interkalieren und dementsprechend fand keine Anfärbung der Zellkerne statt.

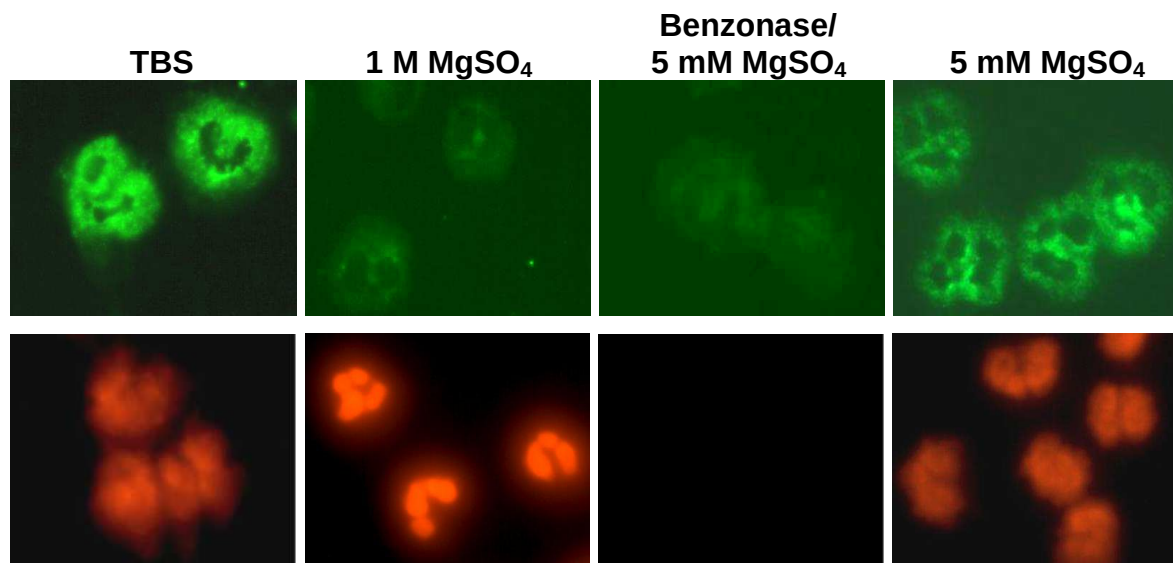


Abbildung 13: DNA-Abhängigkeit der P-ANCA-Zielantigene

P-ANCA-Reaktion nach Vorbehandlung Ethanol-fixierter Granulocyten mit verschiedenen Reagenzien: TBS, 1 M MgSO_4 , Benzonase/5 mM MgSO_4 , 5 mM MgSO_4 (jeweils in TBS). Gezeigt am Beispiel eines P-ANCA-positiven CU-Serums (Verdünnung 1:10, Anti-Human-IgG, FITC-markiert, Vergrößerung 400 x). Obere Reihe: Bilder der indirekten Immunfluoreszenz, untere Reihe: Darstellung der DNA 400 ng/ml Propidiumiodid.

Im Unterschied dazu blieb nach einer Vorbehandlung der Granulocyten mit Salzlösungen hoher Ionenstärke, welche die P-ANCA-Reaktion aufhebt, die DNA intakt, so dass sich die Zellkerne komplett durch Propidiumiodid anfärben ließen. Daraus lässt sich folgern, dass es auf intakte DNA im Zellkern ankommt, damit die CU-assoziierten P-ANCA reagieren können. Es wurde bereits früher gezeigt, dass sich die CU-assoziierten P-ANCA an das nukleäre Chromatin binden (Billing et al., 1995) und dass diese Reaktion zumindest bei vielen Seren durch eine Vorbehandlung des Granulocyten-Substrats mit DNase-I (siehe oben) aufgehoben werden kann. Bisher gab es allerdings keinen Hinweis auf die Natur des DNA-Bindungspartners.

4.1.3 Effekt weiterer Reagenzien

Eine Vorbehandlung der Ethanol-fixierten Granulocyten mit **Protaminsulfat** hat in beiden untersuchten Konzentrationen [$\leq 0,5\%$ (w/v)] die Bindung der CU-assoziierten P-ANCA an die Granulocyten inhibiert. Der genaue Wirkungsmechanismus des Protaminsulfats ist bisher unbekannt. Als stark kationisches Protein bindet es sich vermutlich an die negativ geladene DNA, so dass sich die Granulocytenproteine nachfolgend nicht mehr anlagern können oder abgelöst werden.

Formaldehyd bewirkte in der Konzentration von 1% wie erwartet bei allen 5 CU-Seren einen Fluoreszenzverlust. Die Wirkung war allerdings konzentrationsabhängig. Bei einer Behandlung mit $\leq 0,1\%$ iger Lösung wurde die Reaktion der P-ANCA nicht beeinflusst.

Die Vorbehandlung der Granulocyten mit **Harnstoff** (≤ 4 M) führte bei keinem der 5 CU-Seren zu einer Veränderung der Fluoreszenz. Daraus lässt sich schließen, dass die Konformation der CU-relevanten Granulocyten-Zielantigene im Hinblick auf die Bindung von Autoantikörpern und die Bindung an das Zellsubstrat sehr stabil ist.

Eine Vorbehandlung mit **DTT** (≤ 20 mM) beeinflusste ebenfalls nicht die P-ANCA-Reaktion. DTT spaltet Disulfidbrücken und schützt freie SH-Gruppen vor einer

Oxidation und wird deshalb bei der Isolierung und Aufreinigung von Proteinen und Enzymen eingesetzt. Für die CU-assoziierten P-ANCA konnte daraus abgeleitet werden, dass keine intakten Disulfidbrücken zur Antigenerkennung benötigt werden.

Die Vorbehandlung der Granulocyten mit dem Verdünnungspuffer TBS hatte keinen Einfluss auf die nachfolgende P-ANCA-Reaktion der CU-Seren.

Das Reaktionsverhalten Anti-MPO-positiver Seren (Vaskulitis) auf die verschiedenen Vorbehandlungen war nahezu identisch zu dem der CU-assoziierten P-ANCA. Wurden vor Beginn des IIFT hohe Ionenkonzentrationen, die Nukleasen Benzonase und Nuklease S7 sowie Protaminsulfat angewendet, zeigte sich keine Bindung der Antikörper. Während durch 1% Formaldehyd das Vaskulitis-assoziierte P-ANCA-Muster erwartungsgemäß in eine rein cytoplasmatische Reaktion (C-ANCA-Muster) konvertierte, ergab sich bei 0,1% Formaldehyd eine teils perinukleäre, teils cytoplasmatische Fluoreszenz. In einer Konzentration von 0,01% hatte Formaldehyd keinen Einfluss mehr. DTT und TBS bewirkten keine Veränderung der MPO-assoziierten P-ANCA-Reaktion. Damit ergab sich mit Ausnahme des Formaldehyds sowohl für MPO als auch für die CU-assoziierten P-ANCA-Antigene eine gleiche Charakteristik.

Die Reaktion mit dem Serum eines gesunden, P-ANCA-negativen Probanden wurde durch keines der Reagenzien beeinflusst.

4.2 Identität der Granulocyten-Hauptziel-Antigene

Die Granulocyten-Extrakte aus **3.4.1** wurden mit unterschiedlichen Methoden analysiert und Laktoferrin, MPO und Azurocidin als Hauptziel-Antigene identifiziert.

4.2.1 Protein-Chromatogramme

Granulocyten-Extrakte wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und über eine Silberfärbung oder einen Westernblot analysiert (**Abbildung 14**). Der Extrakt nach Behandlung mit TBS (1) zeigte in der Silberfärbung eine Vielzahl von Proteinbanden, die im Einzelnen kaum differenziert werden konnten, da sie sehr eng beieinander lagen. In den Extrakten nach weiterer Behandlung mit 300 mM NaCl (2) gefolgt von 550 mM NaCl (3) oder 0,05% Benzonase/ 5 mM MgSO₄ (4) waren Proteinbanden bei ca. 90, 72, 60, 50 und 30 kDa zu erkennen.

Für die Westernblot-Analytik wurden die Gele auf Nitrocellulosemembran elektrotransferiert und anschließend Streifen der Blotmembran mit polyklonalen Antikörpern gegen MPO und Laktoferrin inkubiert. MPO, Laktoferrin und Azurocidin wurden mit MALDI-ToF identifiziert (**4.2.2**).

Laktoferrin wurde in allen 4 Granulocyten-Extrakten nachgewiesen, wobei der TBS-Extrakt die geringste Konzentration enthielt. Das Glykoprotein Laktoferrin besteht aus einer Polypeptidkette, die sich in 2 Domänen faltet: N- und C-Domäne. Es hat ein Molekulargewicht von 78 kDa. Der Anti-Laktoferrin-Antikörper (Kaninchen) reagierte insbesondere mit 2 Proteinen bei ca. 90 und 50 kDa. Das größere Protein stellt die Hauptform des Laktoferrins dar, bei dem kleineren handelt es sich vermutlich um eine der beiden einzelnen Laktoferrin-Domänen, deren Molekulargewichte mit 47,5 und 33 kDa beschrieben werden (Mantel et al., 1994). Die andere der beiden Domänen konnte nicht nachgewiesen werden, da das eingesetzte Kaninchenserum möglicherweise nicht die entsprechende Immun-Reaktivität aufwies.

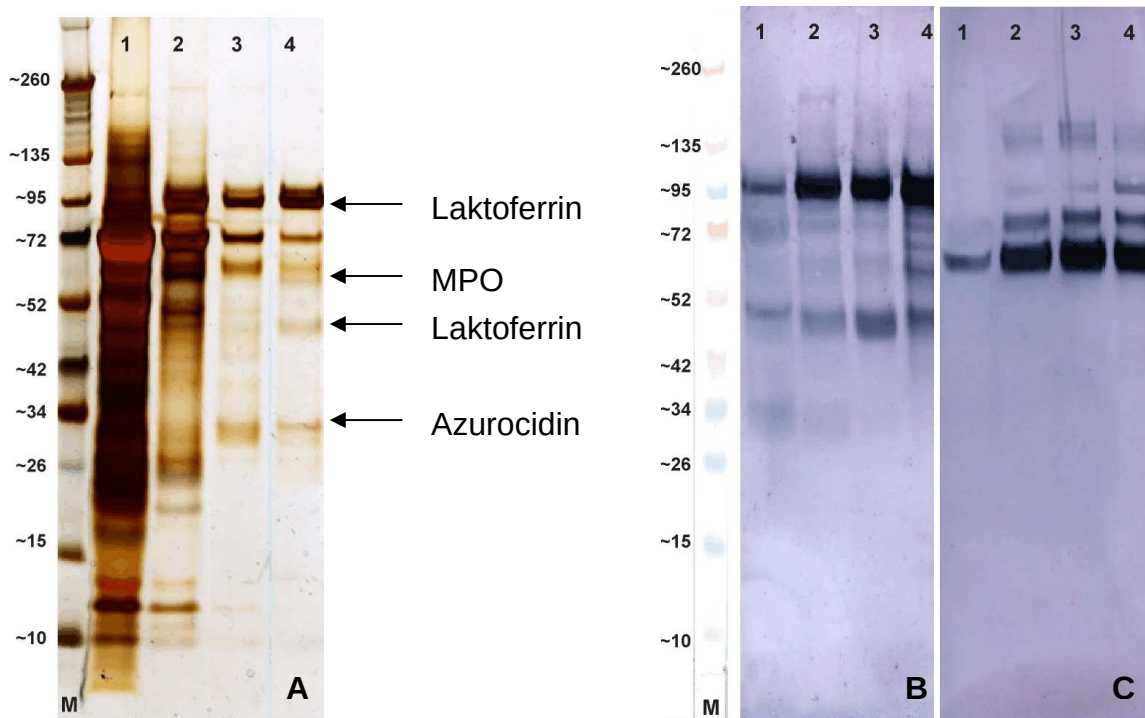


Abbildung 14: **Biochemische Analyse der Granulocyten-Extrakte**

Nachweis von Laktotferrin, MPO und Azurocidin im Granulocyten-Extrakt A) Silberfärbung, B) Westernblot-Inkubation mit einem Anti-Laktotferrin-Antikörper und C) mit einem Anti-MPO-Antikörper (jeweils aus Kaninchen, Verdünnung 1:10.000; Anti-Kaninchen-IgG: AP-markiert 1:2.000).

Extraktion mit (1) TBS, (2) 300 mM NaCl/TBS, (3) 550 mM NaCl/TBS, (4) 0,05% Benzonase in 5 mM MgSO_4 /TBS (4). Ein Größenmarker zeigt Proteine mit 260, 135, 95, 72, 52, 42, 34, 26, 15 und 10 kDa zum Vergleich an. Die Identifizierung des Azurocidins erfolgte mangels eines spezifischen Antikörpers mit der Massenspektrometrie.

MPO konnte ebenfalls in allen 4 Granulocyten-Extrakten nachgewiesen werden, wobei der TBS-Extrakt nur eine geringe Konzentration davon aufwies. Es handelt sich um ein Tetramer mit einem Molekulargewicht von 150 kDa, bei dem 2 identische Dimere durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Jedes Dimer besteht aus einer schweren (59 kDa) und einer leichten (13,5 kDa) Kette. Bei der Granulocytenreifung entsteht MPO in mehreren Prozessierungsschritten: Das primäre Translationsprodukt (80 kDa), bestehend aus einer leichten und einer schweren Untereinheit sowie einem Propeptid, wird zuerst glykosiliert (apoproMPO). Durch das Einfügen von Häm b als prosthetische Gruppe entsteht daraus proMPO mit einem Molekulargewicht von 89 kDa (Nauseef, 1986, Andersson et al., 1998). Nach einer Abspaltung des Propeptids bildet sich in den

azurophilen Granula enzymatisch aktive MPO, indem 2 Dimere über eine Disulfidbrücke verbunden werden. Mit dem eingesetzten Kaninchen-Anti-MPO-Antikörper reagierten sowohl die schwere Kette, als auch beide Vorstufen sowie das Voll-Längen-MPO, so dass im Westernblot Proteinbanden bei ca. 60, 80, 90 und 150 kDa angefärbt waren. Eine Ausnahme stellte der TBS-Extrakt dar, bei dem nur eine Bande von ca. 60 kDa angefärbt war. Voll-Längen-MPO ließ sich nur mit dem spezifischen Antikörper im (empfindlicheren) Immunblot, und nicht mit der Silberfärbung nachweisen.

4.2.2 MALDI-ToF Massenspektrogramme

Die Proteinbanden der Granulocyten-Extrakte aus **3.4.1** wurden aus einem SDS-Gel nach Coomassie-Färbung ausgeschnitten und mittels MALDI-ToF analysiert.

Granulocyten-Extrakt nach Behandlung mit	MG ¹ kDa	Identifiziertes Protein	Acc- Nr.	MG ² kDa	Mascot Score	Sequenzabdeckung %
300 mM NaCl	90	Laktoferrin	P02788	80,0	456	68
550 mM NaCl	90	Laktoferrin	P02788	80,0	529	75
0,05% Benzonase	90	Laktoferrin	P02788	80,0	594	61
300 mM NaCl	60	Myeloperoxidase	P05164	84,7	210	44
550 mM NaCl	60	Myeloperoxidase	P05164	84,7	243	42
0,05% Benzonase	60	Myeloperoxidase	P05164	84,7	244	32
550 mM NaCl	30	Azurocidin	P20160	27,3	102	52

Tabelle 5: **Ergebnisübersicht der MALDI-ToF-Analyse**

Identifizierte Granulocytenproteine unter Angabe des Molekulargewichtes (MG) in kDa (¹ geschätzt im Gel bzw. ² laut Datenbank), der Accessions-Nummer (Acc.-Nr.), des Mascot Scores und der Sequenzabdeckung in Prozent.

Bei der Suche in der Proteinsequenz-Datenbank SWALL ließen sich alle 3 Proteine mit dem Molekulargewicht von ca. 90 kDa jeweils als TRFL_HUMAN Lactotransferrin (precursor)/Laktoferrin - Homo sapiens (P02788) mit einem Score von >500 und einer Sequenzabdeckung von >60% identifizieren. Der Score gibt die Übereinstimmung des zu identifizierenden Proteins mit einem bekannten

Protein an. Je höher der Score, desto ist größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Protein korrekt identifiziert wurde. Als Identifizierungskriterium wurde im Allgemeinen ein Mascot Score >69 ($p < 0,05$) angesehen, der in allen Messungen für die in dieser Arbeit identifizierten Autoantigen-Komponente Laktoferrin deutlich übertroffen wurde.

Das ca. 72 kDa große Protein welches sich im Silbergel angefärbt hatte (Abbildung 14), wurde als Rinderserumalbumin (ALBU_BOVIN, P02769) bestimmt, welches bei der Präparation der Granulocyten eingesetzt wurde.

Eine Auswertung der Proteinbanden im Bereich von ca. 60 kDa ergab PERM_HUMAN Myeloperoxidase (P05164) mit Scores über 200. Es fällt auf, dass die Sequenzabdeckung unter 50% lag und dass das tatsächliche Molekulargewicht deutlich von dem des identifizierten Proteins (84,7 kDa) abwich: Vermutlich handelt es sich um die schwere Kette des MPO mit einem Molekulargewicht von 59 kDa, welche aber bisher noch keinen eigenen Datenbankeintrag besitzt.

Der 550 mM NaCl-Extrakt (Spur 3) und der Benzonase-Extrakt (Spur 4) zeigten nach Silber- und Coomassie-Färbung noch eine weitere deutliche Proteinbande bei ca. 30 kDa. Für diesen Bereich ergab die Auswertung der SWALL-Datenbank, dass es sich um das Protein CAP37_HUMAN Azurocidin (P20160) handelt. Azurocidin ist ebenfalls ein Bestandteil der neutrophilen Granulocyten.

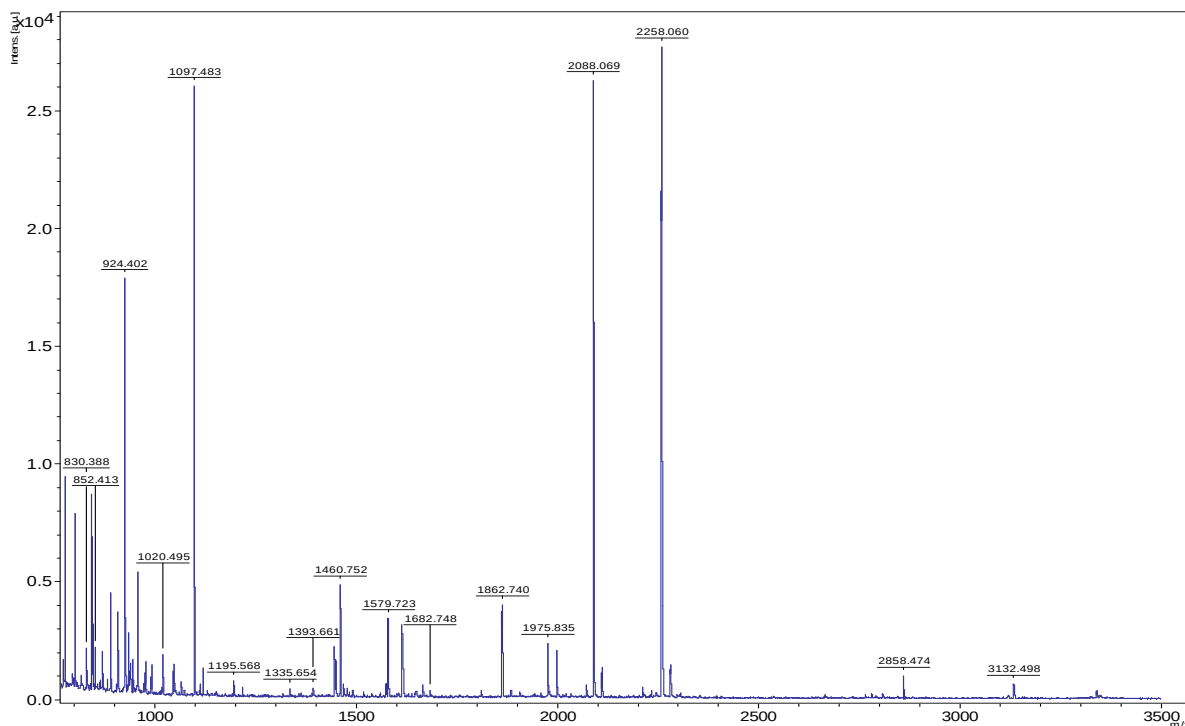


Abbildung 15: Massenspektrum Laktotferrin

Massenspektrum der Proteinbande bei ca. 90 kDa aus dem 550 mM-NaCl-Granulocyten-Extrakt, die als Laktotferrin identifiziert wurden. Angabe der präzisen Masse/Ladungs-Werte (m/z) der detektierten Peptid-Ionen-Signale.

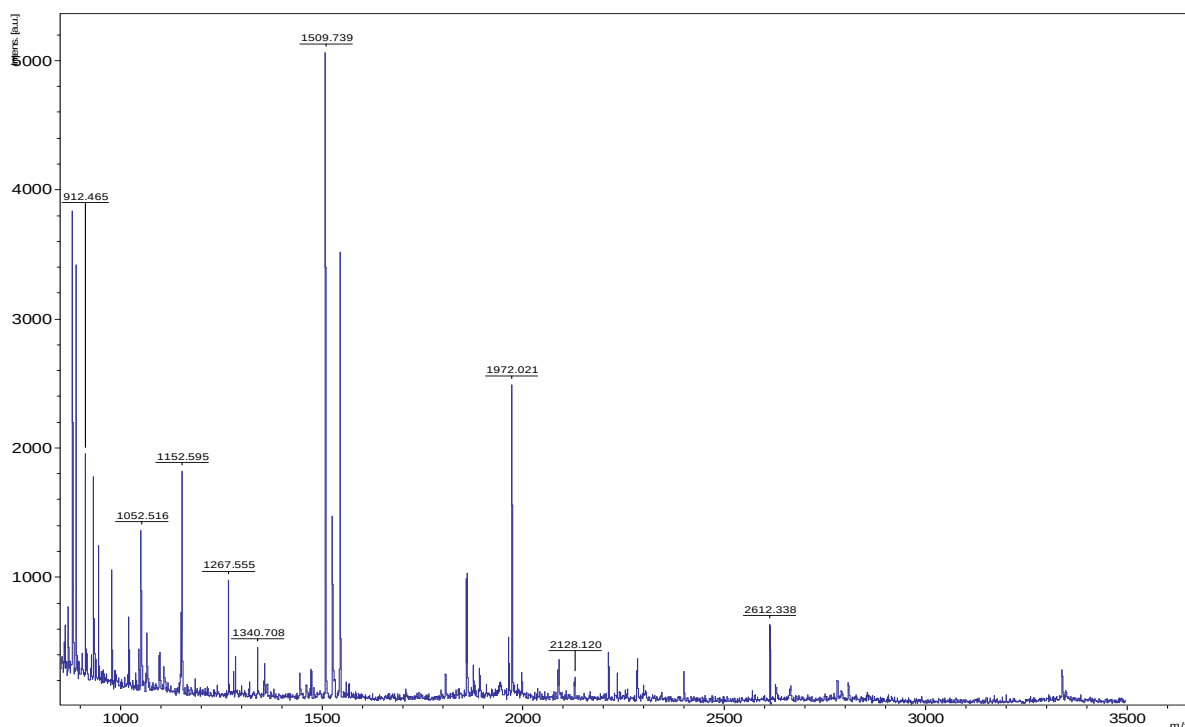


Abbildung 16: Massenspektrum MPO

Massenspektrum der Proteinbande bei ca. 60 kDa aus dem 550 mM-NaCl-Granulocyten-Extrakt, die als MPO identifiziert wurden.

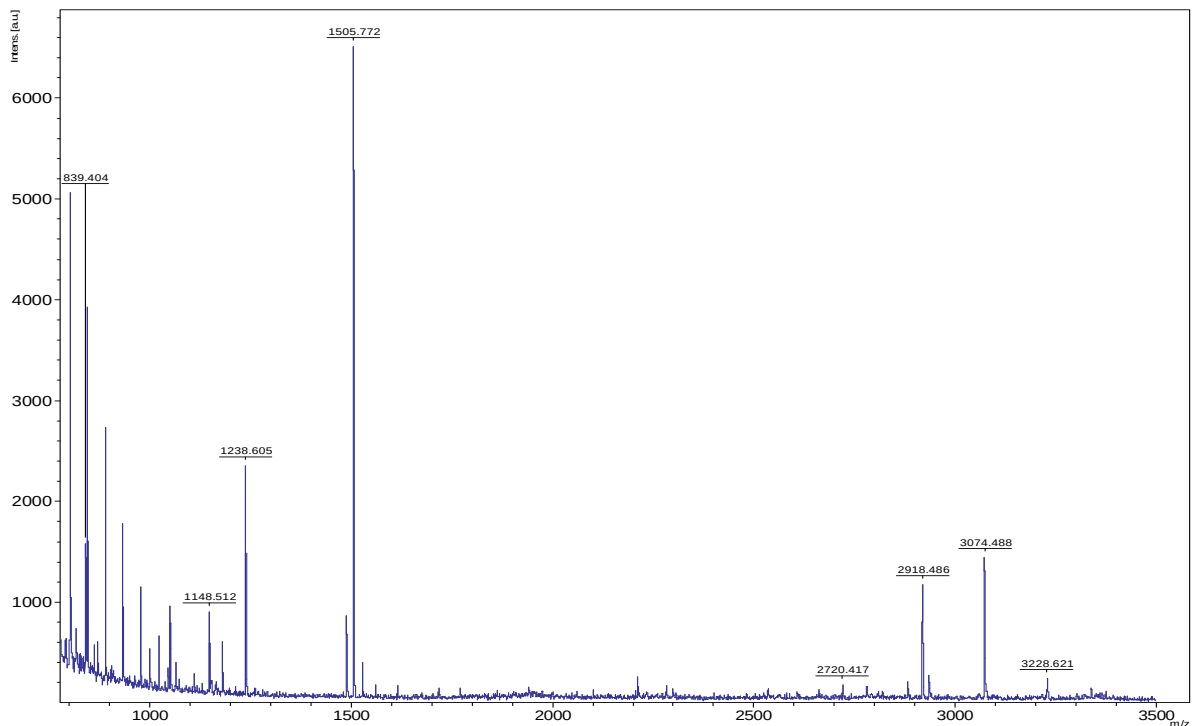


Abbildung 17: **Massenspektrum Azurocidin**

Massenspektrum der Proteinbande bei ca. 30 kDa aus dem 550 mM-NaCl-Granulocyten-Extrakt, die als Azurocidin identifiziert wurden.

4.2.3 Rekombinantes Laktoferrin als IIFT-Substrat

Nach der Identifizierung von Laktoferrin als Komponente des Haupt-Zielantigens der CU-assoziierten P-ANCA stellte sich die Frage, ob auch mit Laktoferrin-transfizierten humanen Säugerzellen CU-assoziierte P-ANCA spezifisch nachgewiesen werden können. Dafür wurden HEK-293-Zellen mit Laktoferrin-Plasmid-DNA transfiziert und anschließend mit Aceton oder Ethanol fixiert. Parallel wurden untransfizierte HEK-293-Zell-Substrate hergestellt und in einem IIFT mit humanen Seren und einem Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper inkubiert.

Die Laktoferrin-transfizierten Zellen zeigten nach Inkubation mit dem Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper eine selektive Reaktion. Die untransfizierten Zellen reagierten nicht mit dem Kaninchenserum.

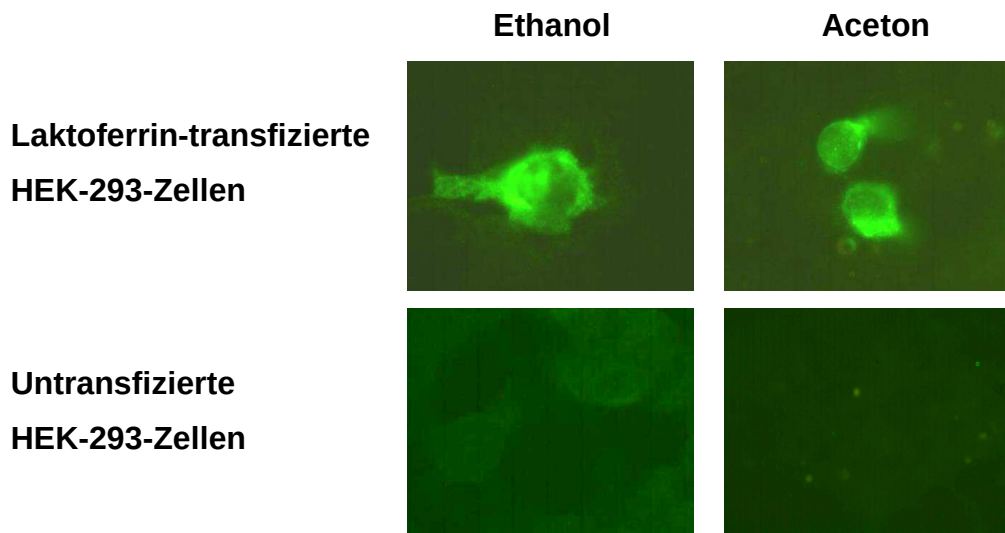


Abbildung 18: **Laktoferrin-transfizierte HEK-293-Zellen als IIFT-Substrat**

Laktoferrin-transfizierte und untransfizierte HEK-293-Zellen: IIFT, 1. Schritt Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper (1:200), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG (1:200). Ethanol- und Aceton-Fixierung. Vergrößerung 400 x.

Jedoch zeigte keines der untersuchten 10 humanen Referenzseren (Verdünnung 1:10), eine positive Reaktion mit den Laktoferrin-transfizierten HEK-293-Zellen hervor - weder die 7 P-ANCA-positiven CU-Seren, noch die der 3 gesunden Probanden.

4.2.4 Reaktivität Anti-Laktoferrin-Antikörper im Westernblot

Es wurde geprüft, ob Laktoferrin in einem Westernblot als Zielantigen eingesetzt werden könnte, um Anti-Laktoferrin-Antikörper in CU-Seren spezifisch nachzuweisen. Dazu wurden humanes Laktoferrin (aus Milch, rekombinant in Reis bzw. HEK-293 hergestellt) unter reduzierenden Bedingungen (Version A mit DTT) und nichtreduzierenden Bedingungen (Version B) elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen elektrotransferiert und diese Blots als Substrat eingesetzt.

In einer Westernblot-Inkubation mit spezifischen Antikörpern ergaben sich nur geringe Unterschiede zwischen dem Laktoferrin aus Milch und dem rekombinant in Reis generierten Laktoferrin. Die beiden in Zusammenarbeit mit Eurogentec hergestellten monoklonalen Antikörper zeigten mit der Version B deutliche Signale, mit der Version A aber nur eine geringe Reaktion. Der polyklonale

Kaninchen-Anti-Laktotferrin-Antikörper reagierte auch mit der Version A; allerdings auch jeweils deutlich schwächer als mit Version B.

Bei dem in HEK-293-Zellen generierten humanen Laktotferrin fand nur mit der Version B eine klare Reaktion mit dem Kaninchen-Anti-Laktotferrin-Antikörper statt. Die beiden monoklonalen Anti-Laktotferrin-Antikörper haben hier mit keiner Version reagiert, was vermutlich auf eine zu geringe Konzentration zurückzuführen ist.

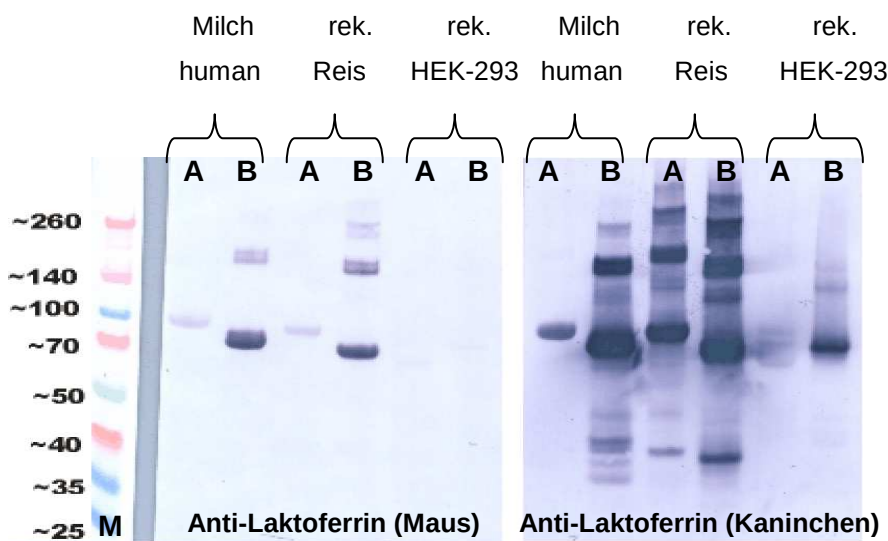


Abbildung 19: **Westernblot-Analytik nach SDS-Gelelektrophorese von humanem Laktotferrin**

Laktotferrin unterschiedlicher Quellen unter reduzierenden (A) und nicht reduzierenden Bedingungen (B): Humanes Laktotferrin aus Milch, rekombinant aus Reis und HEK-293: Inkubation mit Maus-Anti-Human Laktotferrin (1:200, Anti-Maus-IgG, AP-markiert 1:2.000) und Kaninchen-Anti-Human Laktotferrin (1:10.000, Anti-Kaninchen-IgG; AP-markiert 1:2.000).

Anschließend wurde versucht, CU-assoziierte Anti-Laktotferrin-Antikörper in humanen Seren mit einem Immunblot mit Laktotferrin aus humaner Milch nachzuweisen. Es wurden 10 mit der IIF vorcharakterisierte CU-Seren (Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktotferrin) sowie 5 Seren gesunder Probanden untersucht. Eine korrekt durchgeführte Inkubation wurde durch eine positive Reaktion der IgG-Kontrollbande angezeigt. Als Positivkontrolle wurde jeweils der Kaninchen-Anti-Laktotferrin-Antikörper (**Abbildung 20** Spur 1) inkubiert.

Viele CU-assoziierte P-ANCA waren nicht mit dem Westernblot identifizierbar. Mit der Version A konnte nicht zwischen den CU-Seren und den Seren gesunder Probanden unterschieden werden. Wurde das Laktoferrin nicht reduziert eingesetzt (Version B), färbten 5 von 10 CU-Seren den gleichen Bereich wie die Positivkontrolle. Bei den CU-Seren der Spuren 2 und 3, welche die deutlichsten Reaktionen zeigten, handelte es sich um die beiden einzigen auch im konventionellen „DNA-freien“ Anti-Laktoferrin-ELISA positiv getesteten Proben. Die weiteren im Westernblot mit humanem Laktoferrin reaktiven Seren waren im IIFT für DNA-komplexiertes Laktoferrin besonders stark positiv. Dagegen hat keines der 5 Seren gesunder Probanden mit der Version B im Westernblot reagiert.

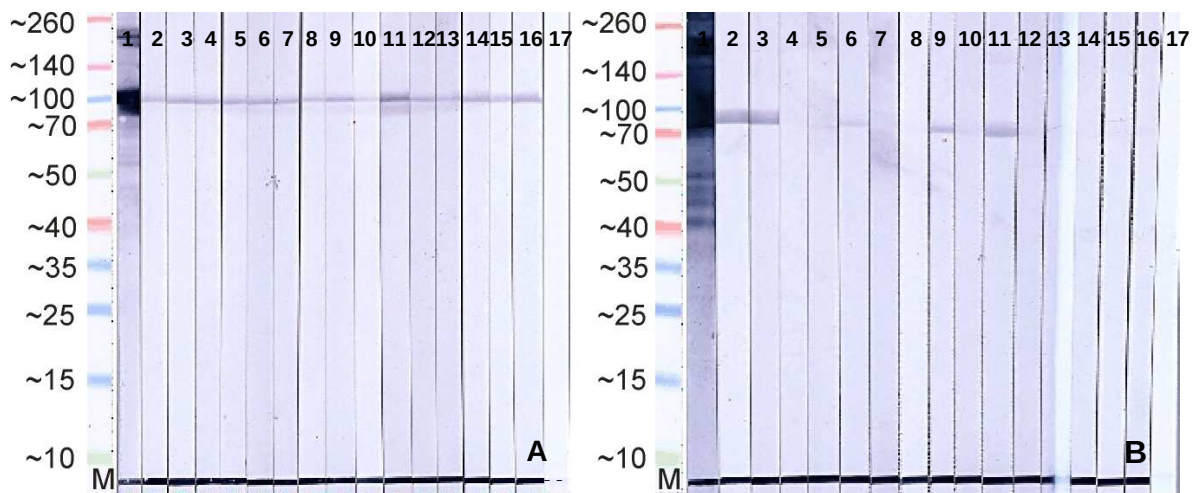


Abbildung 20: Westernblot-Analytik humaner Seren mit Laktoferrin aus humaner Milch

(A) unter reduzierenden; (B) nicht reduzierenden Bedingungen: Inkubation mit (Spur 1) Kaninchen-Anti-Human-Laktoferrin (1:10.000, Anti-Kaninchen-IgG; AP-markiert 1:2.000), (Spur 2 bis 11) Seren von CU-Patienten und (Spur 12 bis 16) Seren von gesunden Probanden (jeweils 1:200, Anti-Human-IgG; AP-markiert 1:10). Die Spur 17 ist eine Konjugatkontrolle, bei der ohne Serum ausschließlich das AP-markierte Anti-Human-IgG inkubiert wurde.

Analog zum Laktoferrin wurde auch mit aufgereinigtem MPO aus neutrophilen Granulocyten eine Westernblot-Analytik mit 5 Anti-MPO-positiv vorcharakterisierten Seren und 5 Seren gesunder Probanden sowie 1 Kaninchen-Anti-MPO-Antikörper als Positivkontrolle durchgeführt. Mit beiden Versionen zeigte nur 1 von 5 Anti-MPO-Seren zusätzlich zur Positivkontrolle ein deutliches Signal

(**Abbildung 21**). Die Reaktion dieses Serums war mit der Version A im Bereich der schweren Kette des MPO deutlich stärker als mit der Version B im Bereich des Volllängen-Proteins. Keines der Seren gesunder Probanden zeigte eine Reaktion.

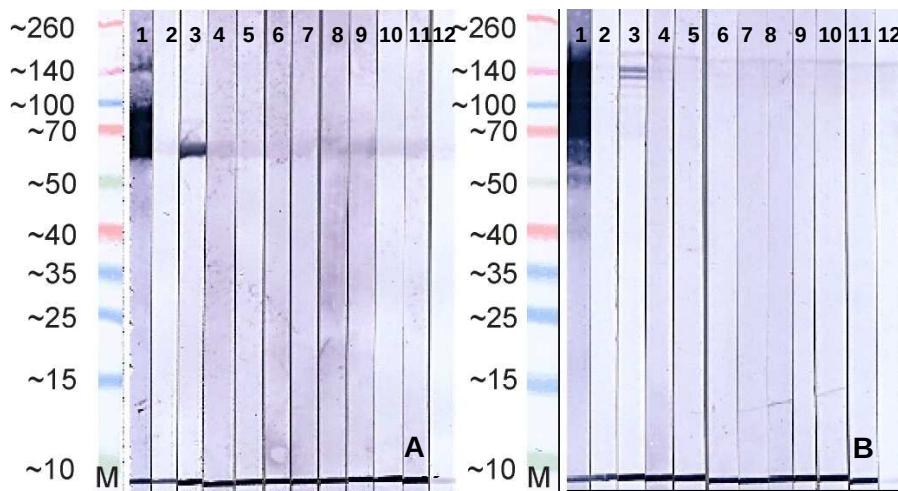


Abbildung 21: Westernblot-Analytik humaner Seren mit MPO aus humanen Granulocyten

(A) unter reduzierenden; (B) nicht reduzierenden Bedingungen: Inkubation mit (Spur 1) Kaninchen-Anti-Human-MPO (1:10.000, Anti-Kaninchen-IgG; AP-markiert 1:2.000), (Spur 2 bis 6) Seren von Anti-MPO-positiven AAV-Patienten und (Spur 7 bis 11) Seren von gesunden Probanden (jeweils 1:200, Anti-Human-IgG; AP-markiert 1:10). Die Spur 12 ist die Konjugatkontrolle, bei der ohne Serum ausschließlich das AP-markierte Anti-Human-IgG inkubiert wurde.

4.3 Reaktivität DNA-komplexierter Granulocytenproteine (DNA-ANCA)

4.3.1 Reaktivität depletierter Granulocyten nach Rekonstitution

Eine Behandlung Ethanol-fixierter Granulocyten mit Salzlösungen hoher Ionenstärke resultierte in einem Verlust der P-ANCA-Reaktivität mit CU-Seren. Um zu klären, ob dieser Verlust durch eine Zerstörung der entsprechenden Antigene bedingt war oder ob hier nur eine Elution stattfand, wurden 1 M MgSO_4 -behandelte Granulocyten zuerst mit unterschiedlichen (entsalzten) **Granulocyten-Extrakten (3.4.1)** versetzt und nachfolgend als Substrat für den IIFT mit P-ANCA-positiven CU-Seren verwendet.

Mit den Extrakten konnte die CU-P-ANCA-Reaktivität wieder voll hergestellt werden (Rekonstitution): Im Fluoreszenzmikroskop zeigte sich annähernd das gleiche Fluoreszenzmuster wie mit den normalen IIFT-Substraten (Ethanol-fixierte Granulocyten, **Abbildung 22**). Die stärkste Rekonstitutionsswirkung wurde mit dem 550 mM NaCl-Extrakt erzielt.

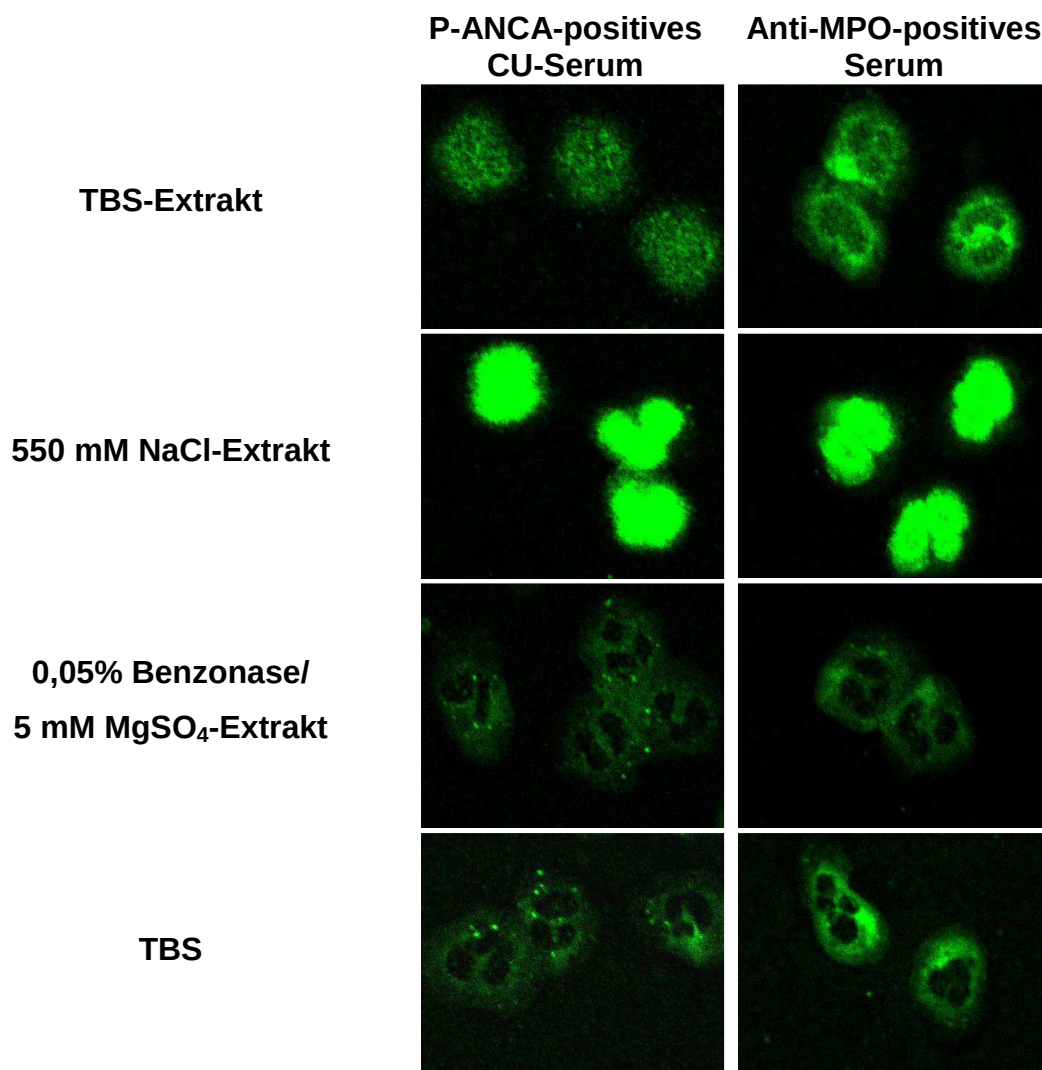


Abbildung 22: Rekonstitutionswirkung der Granulocyten-Extrakte

Depletierte Ethanol-fixierte Granulocyten (1 M MgSO₄), neu beladen mit TBS-Extrakt, 550 mM NaCl-Extrakt und 0,05% Benzonase/5 mM MgSO₄-Extrakt. Extrakte jeweils 1:5 in TBS (pH 7,4) verdünnt. Zur Kontrolle TBS ohne Antigenzusatz. IIFT, 1. Schritt humane Seren (Verdünnung jeweils 1:10), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Human-IgG (gebrauchsfertig). Vergrößerung 400 x.

Wurden die Granulocyten jedoch erst mit Benzonase oder Nuklease S7 behandelt und anschließend mit den Extrakten inkubiert, konnte mit keinem der Granulocyten-Extrakte eine P-ANCA-Reaktion wieder hergestellt werden.

Das untersuchte Anti-MPO-positive Referenzserum verhielt sich bei den Rekonstitutionsversuchen identisch: Die Anti-MPO-Reaktivität ließ sich durch Behandlung depletierter Granulocyten mit Granulocyten-Extrakten nach 3.4.1 wieder herstellen. Die P-ANCA-negativen Seren gesunder Probanden reagierten bei keiner der untersuchten Rekonstitutionsvarianten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die P-ANCA-Zielantigene durch Salzlösungen hoher Ionenstärke aus den Ethanol-fixierten Granulocyten eluieren lassen und dabei intakt bleiben.

Depletierte (1 M MgSO_4) und Nuklease-behandelte Granulocyten (Benzonase oder Nuklease S7) wurden mit verschiedenen definierten, in TBS gelösten aufgereinigten Proteinen sowie zur Kontrolle mit TBS allein 1 Stunde lang inkubiert. Entsprechend der biochemischen Analyse der Granulocyten-Extrakte wurden zuerst deren identifizierte Hauptbestandteile **Laktoferrin und MPO** zur Rekonstitution eingesetzt. Aufgrund der leichteren Verfügbarkeit wurde Laktoferrin aus humaner Milch verwendet. Die Rekonstitutionswirkung wurde jeweils durch IIF mit definierten Referenzseren (CU-assoziierten P-ANCA (n=5), Anti-MPO-ANCA (n=3)) und Seren gesunder Probanden (n=5) überprüft.

Nach Rekonstitution mit **Laktoferrin** reagierten ausschließlich die 5 CU-Seren. Im Vergleich zum perinukleären ANCA-Standard-Muster mit Ethanol-fixierten Granulocyten färbte sich hier allerdings der gesamte Kern diffus, aber deutlich an. Die Anti-MPO-positiven Seren und die der gesunden Probanden zeigten dagegen nur sehr schwache Reaktionen im Cytoplasma Laktoferrin-rekonstituierter Granulocyten. Ein Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper bewirkte übereinstimmend mit den humanen Seren eine komplette Reaktion mit den Zellkernen der Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten.

In Unterschied zu den mit Salzlösungen hoher Ionenstärke depletierten Granulocyten waren die Granulocyten nach Vorbehandlung mit Benzonase oder Nuklease S7 und einer anschließenden Rekonstitution mit Laktoferrin nicht mehr in der Lage, mit den CU-Seren zu reagieren. Es ist davon auszugehen, dass die für P-ANCA bei Colitis ulcerosa relevanten Zielantigene der Granulocyten aus einem Komplex aus DNA und Laktoferrin bestehen. Deshalb wurden diese Antikörper nachfolgend als DNA-ANCA bezeichnet.

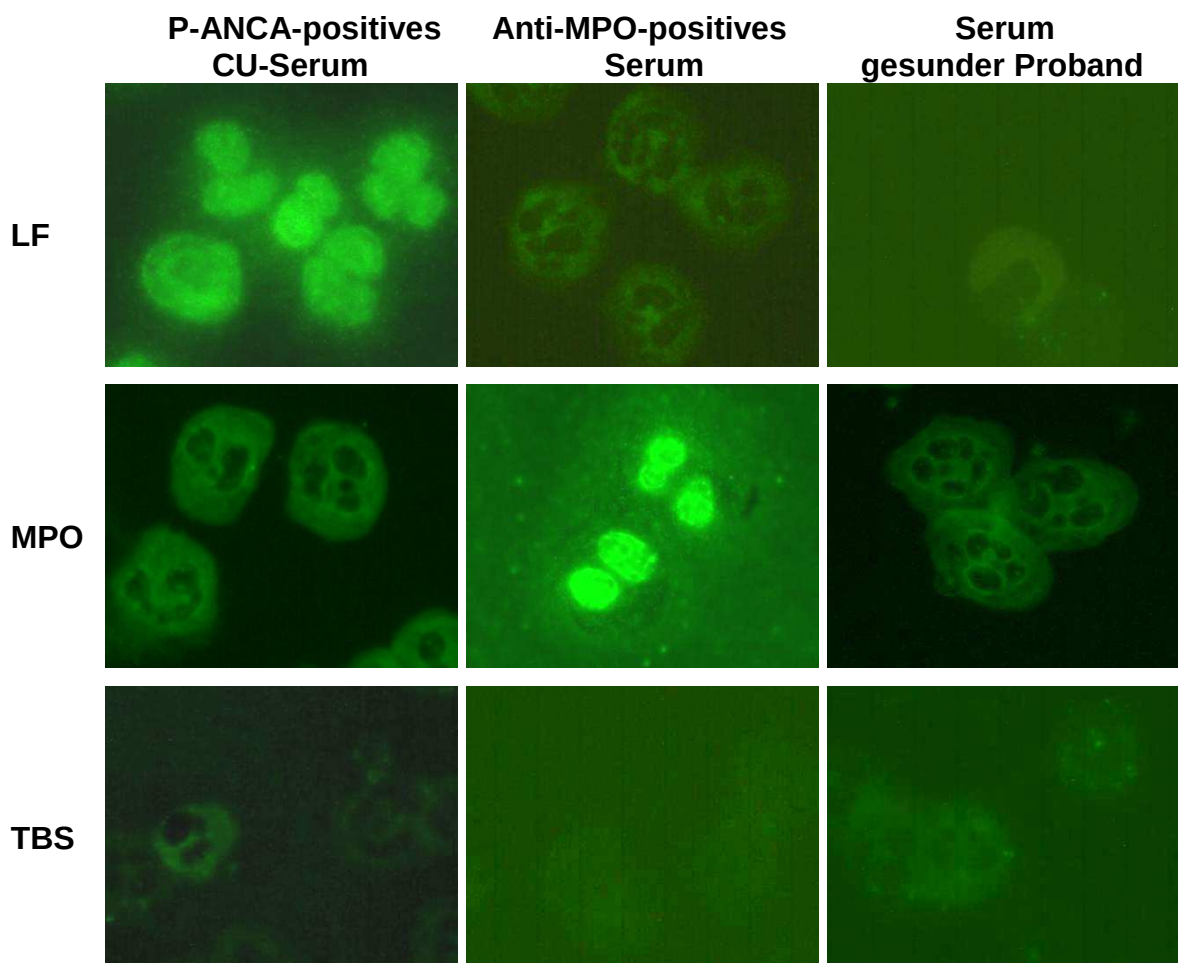


Abbildung 23: **Rekonstitution depletierter Granulocyten mit Laktoferrin und MPO**

Depletierte Ethanol-fixierte Granulocyten (1 M MgSO_4), neu beladen mit Laktoferrin, $250\text{ }\mu\text{g/ml}$ oder MPO, $26\text{ }\mu\text{g/ml}$. Zur Kontrolle TBS ohne Antigenezusatz. IIFT, 1. Schritt humane Seren (Verdünnung jeweils 1:10), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Human-IgG (gebrauchsfertig). Vergrößerung 400 x.

Mit den **MPO-rekonstituierten** zuvor depletierter Granulocyten reagierten ausschließlich die 3 Anti-MPO-positiven Referenzseren. Der als Positivkontrolle eingesetzte Kaninchen-Anti-MPO-Antikörper bewirkte allerdings keine Anfärbung

der Zellkerne. Vermutlich war dieser Antikörper nur gegen die Vorstufe des MPO bzw. gegen denaturiertes MPO und nicht gegen das native, vollständig prozessierte Protein gerichtet. Das ist daraus zu schließen, dass dieser Antikörper mit dem Standardsubstrat der ANCA-IIFT „Ethanol-fixierte Granulocyten“ kein perinukleäres Muster, sondern ausschließlich eine Reaktion im Cytoplasma hervorrief. Die MPO-Vorstufen können nicht aus den Granula diffundieren

Keines der 5 eingesetzten P-ANCA-negativen Referenzseren gesunder Probanden zeigte mit den untersuchten Substrat-Varianten eine Zellkern-Reaktion, ebenso wenig verursachte TBS ohne Extrakt- oder Antigenzusatz einen Rekonstitutionseffekt.

Zusammenfassend haben die Rekonstitutionsversuche gezeigt, dass DNA-gebundenes Laktoferrin ein maßgebliches Zielantigen der CU-assoziierten P-ANCA darstellt.

Nach der Identifizierung von Laktoferrin als einem der Hauptinhaltsstoffe der Granulocyten-Extrakte und maßgeblichem Reaktionspartner für die CU-assoziierten P-ANCA wurden depletierte Granulocyten (1 M MgSO_4) mit **Laktoferrin unterschiedlicher Quellen** rekonstituiert und anschließend mit 3 P-ANCA-positiven CU-Referenzseren inkubiert. Dabei zeigte sich, dass es zwischen dem Laktoferrin aus humaner Milch und dem humanen rekombinant in Reis hergestellten Laktoferrin keine Unterschiede in der Reaktion mit den CU-Seren gab. Alle 3 Seren reagierten selektiv mit den Laktoferrin-beladenen Granulocyten und nicht mit den depletierten. Die Seren gesunder Probanden ergaben dagegen keine Reaktion.

In weiteren Rekonstitutionsversuchen mit rekombinantem Laktoferrin aus Reis zeigten sich wiederholt Reaktionen mit einer größeren Anzahl von Seren gesunder Probanden, die allerdings nicht bei der Verwendung von humanem Laktoferrin aus Milch auftraten. Bei allen weiterführenden Untersuchungen wurde daraufhin ausschließlich Laktoferrin aus humaner Milch zur Rekonstitution depletierter Granulocyten eingesetzt.

	n	Laktoferrin		
		Human (Milch)	Human (rekombinant in Reis)	Bovin (Milch)
Colitis ulcerosa	3	3	3	0
Gesunde Probanden	2	0	0	0
Anti-Laktoferrin	1	1	1	0

Tabelle 6: **Rekonstitutionswirkung von Laktoferrin unterschiedlicher Quellen**

Reaktivität humaner Referenzseren und eines polyklonalen Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörpers mit depletierten und anschließend mit Laktoferrin rekonstituierten Granulocyten.

Wurden depletierte Granulocyten mit **bovinem Laktoferrin** rekonstituiert, reagierten weder die humanen CU-Seren noch der Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper, auch nicht bei hohen Laktoferrin-Konzentrationen. Im Westernblot konnte jedoch eindeutig die Funktionstüchtigkeit des bovinen Laktoferrins sowohl in der nicht reduzierten Form als auch in der reduzierten Form mit dem polyklonalen Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper nachgewiesen werden.

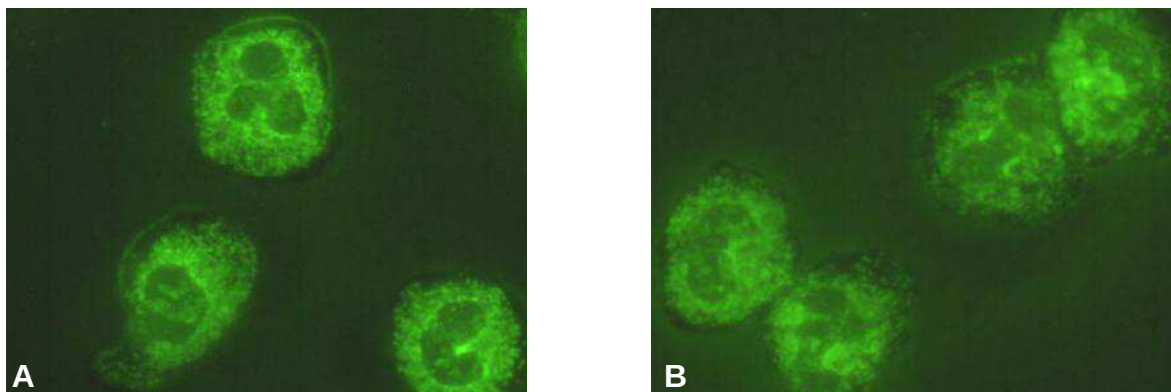


Abbildung 24: **Rekonstitution depletierter Granulocyten mit bovinem Laktoferrin aus Milch**

Depletierte Ethanol-fixierte Granulocyten (1 M MgSO_4) neu beladen mit A: bovinem Laktoferrin, 250 $\mu\text{g/ml}$. B: Zur Kontrolle TBS ohne Antigenzusatz. IIFT, 1. Schritt mit Kaninchen-Anti-Human-Laktoferrin (1:200), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG (1:200). Vergrößerung 400 x.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen Laktoferrin aus Mensch und Rind ergibt mit 68% eine gewisse Homologie (Schanbacher, 1993). In den ersten 50 N-terminalen Aminosäuren ist die Homologie aber am geringsten. Für humanes

Laktotferrin wurde dagegen gefunden, dass der N-Terminus 4 aufeinanderfolgende Arginin-Bausteine (Arg²-Arg³-Arg⁴-Arg⁵) aufweist, die eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Heparin, DNA, Lipid A und humanem Lysozym spielen (van Berkel et al., 1997). Diese Sequenz stellt wahrscheinlich nach der Komplexbildung mit DNA das Zielantigen der CU-assoziierten P-ANCA dar. Fehlt sie, wie etwa beim bovinen Laktotferrin, können die Autoantikörper nicht reagieren.

Wie die Rekonstitutionsversuche gezeigt haben, reagierten P-ANCA-positive CU-Seren spezifisch mit DNA-komplexiertem Laktotferrin, Vaskulitis-Seren dagegen mit MPO - sowohl in DNA-komplexierter, wie auch nicht komplexierter Form. Allerdings gab es bei einigen CU-Patienten auch P-ANCA-Reaktionen, die sich nicht auf DNA-komplexiertes Laktotferrin zurückführen ließen. Es kamen somit noch andere Zielkandidaten für das CU-assoziierte P-ANCA in Frage. Mit **Azurocidin**, einem weiteren in dieser Arbeit identifizierten Bestandteil der rekonstituierenden Granulocyten-Extrakte, wurden analoge Rekonstitutionsversuche durchgeführt.

Mit den Zellkernen der Azurocidin-rekonstituierten Granulocyten reagierten ausschließlich die Kaninchen-Anti-Azurocidin- und Maus-Anti-His-Tag-Antikörper, nicht aber der Kaninchen-Anti-Laktotferrin-Antikörper. 2 der 5 untersuchten P-ANCA-positiven CU-Seren zeigten im Vorversuch mit den Azurocidin-rekonstituierten Granulocyten eine positive Reaktion, aber keines der 10 Referenzseren gesunder Probanden.

Wurden die Granulocyten erst mit Benzonase behandelt und anschließend mit Azurocidin rekonstituiert sowie mit den Antikörpern inkubiert, ergab sich analog zu Laktotferrin ein vollständiger Reaktionsverlust. Infolgedessen war davon auszugehen, dass auch Azurocidin in Verbindung mit DNA ein Zielantigen der CU-assoziierten P-ANCA darstellt.

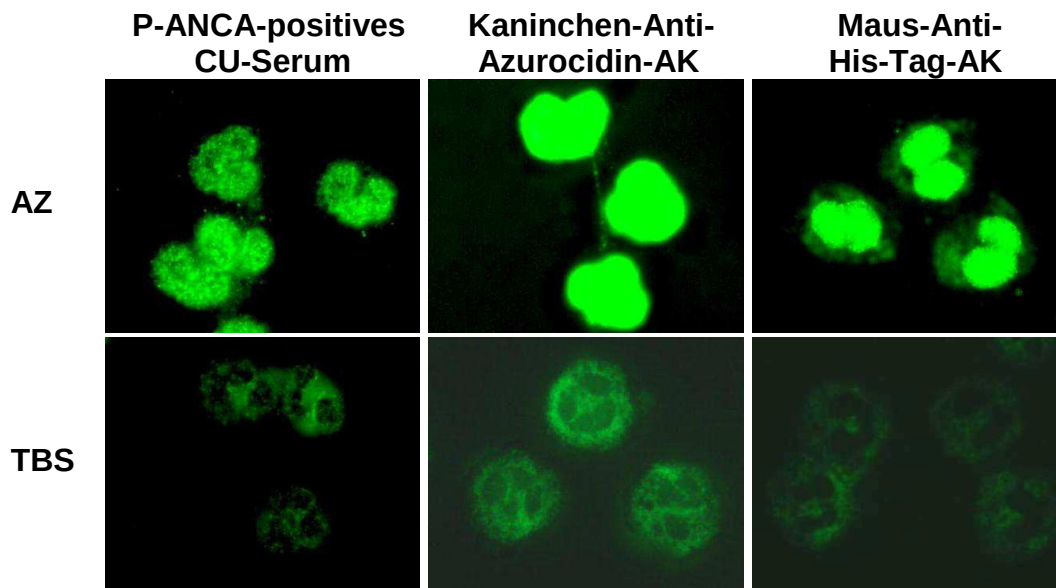


Abbildung 25: Rekonstitution depletierter Granulocyten mit Azurocidin

Depletierte Ethanol-fixierte Granulocyten (1 M MgSO_4) neu beladen mit rekombinantem Azurocidin, $20\text{ }\mu\text{g/ml}$. Zur Kontrolle TBS ohne Antigenzusatz. IIFT: 1. Schritt humanes Serum (1:10), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Human-IgG (gebrauchsfertig) bzw. 1. Schritt Kaninchen-Anti-Human-Azurocidin-Antikörper (1:200), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG (1:200) bzw. 1. Schritt Maus-Anti-His-Tag-Antikörper (1:200), 2. Schritt Cy2-markiertes Anti-Maus-IgG (1:200). Vergrößerung 400 x.

4.3.2 Alternative IFT-Substrate für die Laktoferrin-Applikation

Dass Laktoferrin zur Ausbildung eines funktionstüchtigen P-ANCA-Zielantigens einer Co-Expression mit DNA bedarf, wurde durch einen weiteren Hinweis untermauert: Werden kultivierte humane Epithelzellen (HEp-2) oder Gefrierschnitte der Affenleber mit Laktoferrin beladen, reagieren auch sie mit CU-assoziierten P-ANCA.

Dafür wurden beide Substrate, analog zu den depletierten Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten, mit 1 M MgSO_4 behandelt und dann mit Laktoferrin beladen. Anschließend wurde ein IIFT mit 5 P-ANCA-positiven CU-Seren und einem Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper durchgeführt: Nach Laktoferrin-Beladung riefen sowohl die humanen P-ANCA-positiven Referenzseren als auch der Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper eine komplette homogene Anfärbung der HEp-2-Zellkerne und der Leberzellkerne hervor. Die humanen Seren zeigten

allerdings deutlich schwächere Reaktionen als mit den Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten.

Wurden HEP-2-Zellen und Leberschnitte jedoch direkt mit Laktoferrin beladen, ohne dass man sie vorher mit 1 M MgSO_4 behandelte, reagierten sie genauso stark wie die Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten. Die Seren 5 gesunder Probanden zeigten mit den Laktoferrin-beladenen HEP-2-Zellen und Leberschnitten keinen Unterschied gegenüber den Substraten ohne Laktoferrin-Beladung.

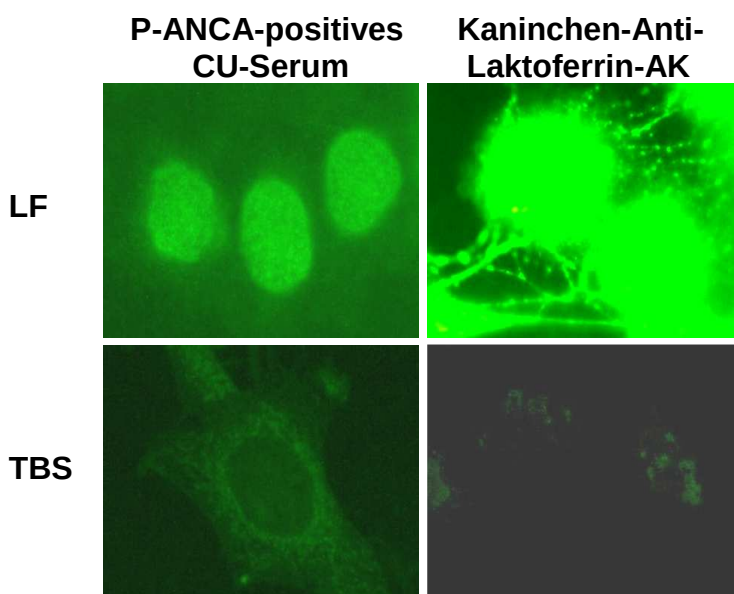


Abbildung 26: Laktoferrin-Beladung von HEP-2-Zellen

HEP-2-Zellen beladen mit Laktoferrin, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Zur Kontrolle TBS ohne Antigenzusatz. IIFT: 1. Schritt humanes Serum (1:10), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Human-IgG (gebrauchsfertig) bzw. 1. Schritt Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper (1:200), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG (1:200). Vergrößerung 400 x.

Aus der spezifischen Reaktion der P-ANCA-positiven CU-Seren mit Laktoferrin-rekonstituierten HEP-2-Zellen und den Zellkernen der Affenleber ließ sich eindeutig folgern, dass Laktoferrin keinen granulocytenspezifischen Co-Faktor benötigt. Das Vorhandensein intakter DNA war für Laktoferrin als Bindungspartner ausreichend und erforderlich. Wurden die HEP-2-Zellen und die Gefrierschnitte der Affenleber erst mit Benzonase behandelt und anschließend mit den P-ANCA-positiven CU-Seren oder dem Kaninchen-Anti-Laktoferrin-Antikörper inkubiert, ergaben sich dagegen keine Reaktionen der Zellkerne.

4.3.3 Arretierung des Laktoferrins durch Formaldehyd

P-ANCA zeigen nach Inkubation mit Ethanol-fixierten Granulocyten als IFT-Substrat ein typisches perinukleäre Fluoreszenzmuster. Antikörper gegen MPO reagieren aber auch zusätzlich mit Formaldehyd-fixierten Granulocyten. Die Myeloperoxidase ist dann aber in den azurophilen Granula arretiert und es entsteht ein cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster. Im Unterschied dazu reagieren durch andere Zielantigene verursachte P-ANCA nicht mit Formaldehyd-fixierten Granulocyten. Folglich ging man bisher davon aus, dass durch die Formaldehyd-Fixierung die entsprechenden Zielantigene zerstört werden und sich die Antikörper nicht mehr binden können.

Es wurde experimentell gezeigt, dass diese Hypothese nicht zutrifft: Granulocyten-Substrate wurden entweder direkt mit 1% Formaldehyd fixiert oder alternativ zuerst mit physiologischem Puffer inkubiert und anschließend mit Formaldehyd behandelt. Der Einfluss auf die jeweilige P-ANCA-Reaktion wurde im IIFT mit 5 P-ANCA-positiven CU-Seren und 5 Anti-MPO-Seren überprüft. Wie erwartet, führte die Behandlung der Granulocyten mit 1% Formaldehyd dazu, dass alle P-ANCA-positiven CU-Seren ihre P-ANCA-Reaktion verloren, dagegen konvertierte das P-ANCA der Anti-MPO-Referenzseren zu einem C-ANCA-Muster.

Wurden die Granulocyten aber zuerst mit einem physiologischen Puffer inkubiert und danach mit Formaldehyd fixiert, blieb überraschenderweise das typische P-ANCA-Reaktionsmuster sowohl für alle eingesetzten CU-Seren als auch die Anti-MPO-positiven Referenzseren erhalten.

1. Inkubationsschritt:	Formaldehyd	PBS-Tween
2. Inkubationsschritt:	PBS-Tween	Formaldehyd

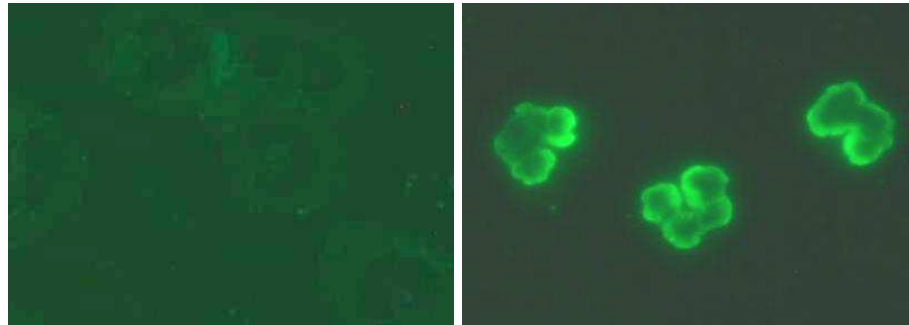


Abbildung 27: **Einfluss der Formaldehyd-Fixierung auf CU-assoziierte P-ANCA**
 Abhängigkeit der Reaktion eines P-ANCA-positiven CU-Serums mit Granulocyten vom Zeitpunkt der Formaldehyd-Fixierung. IIFT: 1. Schritt humanes Serum (1:10), 2. Schritt FITC-markiertes Anti-Human-IgG (gebrauchsfertig). Vergrößerung 400 x.

Also zerstört Formaldehyd nicht, wie bisher angenommen, die Epitope der CU-assoziierten P-ANCA. Vermutlich bildet sich der entsprechende Antigenkomplex aus Laktoferrin und DNA während des ersten Inkubationsschrittes des IFT. Durch eine vorherige Fixierung mit Formaldehyd wird die Umverteilung des Laktoferrins aus den cytoplasmatisch lokalisierten Granula an die negativ geladenen Zellkernbestandteile (DNA) unterbunden (Formaldehyd vernetzt basische Aminosäuren).

4.4 Autoantikörper-Prävalenzen

Im Rahmen einer Studie mit Serumkollektiven von Patienten mit Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Primär-sklerosierender Cholangiitis und ANCA-assoziiierter Vaskulitis sowie gesunder Probanden wurden die Prävalenzen und die Spezifität des Nachweises von Antikörpern gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin und DNA-komplexiertes Azurocidin mit verschiedenen Methoden ermittelt.

4.4.1 Prävalenz DNA-ANCA bei CED und PSC

Es wurden nur Seren von CED-Patienten verwendet, bei denen sowohl klinisch als auch endoskopisch und histologisch eindeutig zwischen CU und MC differenziert werden konnte. Das CED-Kollektiv bestand aus 39 CU- und 96 MC-Patienten. Des

Weiteren wurden 62 PSC-Seren und 70 Seren als Kontrollen eingesetzt (20 AAV und 50 gesunde Probanden).

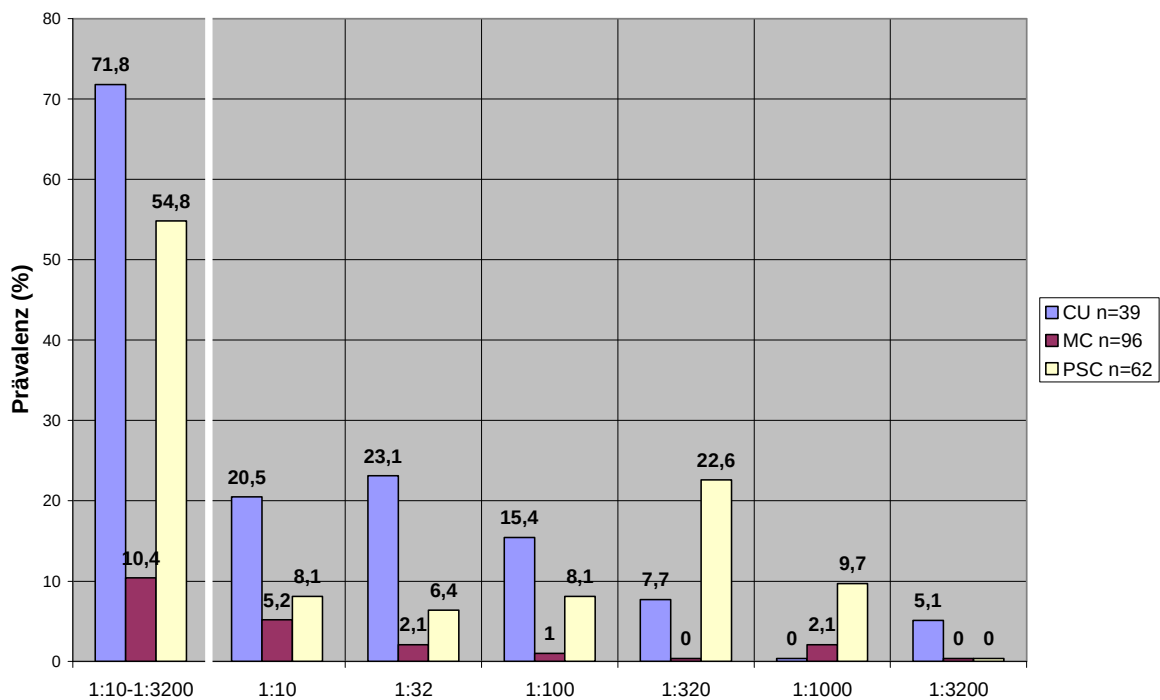


Abbildung 28: Prävalenz P-ANCA (IgG)

P-ANCA-Prävalenz bei Patienten mit CU (n=39), MC (n=96) und PSC (n=62) verteilt nach Höhe der Titer.

In allen verwendeten Seren wurden durch indirekte Immunfluoreszenz Autoantikörper gegen neutrophile Granulocyten mit Ethanol- und Formaldehyd-fixierten Granulocyten untersucht. Bei den **CU-Patienten** konnten in 28 Fällen (71,8%) mit den Ethanol-fixierten Granulocyten P-ANCA der Immunglobulinklasse IgG ermittelt werden. Die Titer variierten zwischen 1:10 und 1:3.200. 4 dieser Seren reagierten zusätzlich - etwas schwächer - mit den Formaldehyd-fixierten Granulocyten. Bei 1 Serum war diese Reaktion auf gleichzeitig vorliegende Anti-MPO-Antikörper zurückzuführen und bei den 3 anderen Seren auf zusätzliche Antikörper gegen Proteinase 3. Ein Serum zeigte ausschließlich ein schwaches durch Anti-Proteinase 3-Antikörper verursachtes C-ANCA-Muster. Bei 11 der 39 CU-Seren lagen zusätzlich auch P-ANCA der Immunglobulinklasse IgA vor. Isolierte IgA-Antikörper wurden in keinem der CU-Seren nachgewiesen. Bei 10 der 96 (10,4%) **MC-Seren** wurden P-ANCA der Klasse IgG (Titer 1:10 bis 1:1.000) und bei einem Serum P-ANCA der Klasse IgA gefunden, die alle ausschließlich

mit den Ethanol-fixierten Granulocyten reagierten, nicht mit den Formaldehyd-fixierten.

Bei 34 der 62 PSC-Seren (54,8%) lagen P-ANCA der Klasse IgG vor. 7 dieser Seren reagierten auch mit den Formaldehyd-fixierten Granulocyten. Die jeweils für P-ANCA ermittelten Prävalenzen (71,8% CU, 10,4% MC und 54,8% PSC) decken sich mit der Literatur, wonach die Angaben bei CU zwischen 60 und 80%, bei MC zwischen 10 und 20% (Saxon et al., 1990, Rump et al., 1990, Stöcker et al., 1992) und bei PSC zwischen 67 und 88% (Duerr et al., 1991, Bansi et al., 1996, Roozendaal et al., 1998a, Terjung und Worman, 2001) schwanken.

Alle 20 Seren der Patienten mit AAV (Titer $\geq 1:32$) reagierten nicht nur mit den Ethanol-fixierten, sondern auch mit den Formaldehyd-fixierten Granulocyten. Die 10 Anti-MPO-positiven Seren zeigten typischerweise mit den Ethanol-fixierten Granulocyten eine perinukleäre Fluoreszenz und mit den Formaldehyd-fixierten Granulocyten eine ausschließlich cytoplasmatische granuläre Reaktion. Alle 10 Anti-PR3-positiven Proben ergaben mit beiden Granulocytensubstraten ein C-ANCA-Muster.

	n	P-ANCA „formalinsensibel“	P-ANCA formalinresistent	C-ANCA
Colitis ulcerosa	39	28 (71,8%)	1 (3,9%)	4 (10,2%)
Morbus Crohn	96	10 (10,4%)	0 (0%)	0 (0%)
PSC	62	34 (54,8%)	7 (11,3%)	0 (0%)
ANCA- assoziierte	20	0 (0%)	10 (50,0%)	10 (50,0%)
Gesunde Probanden	50	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 7: **ANCA-Prävalenz in klinisch charakterisierten Seren**

Prävalenz P- und C-ANCA bei Patienten mit CU, MC, PSC und AAV sowie gesunden Probanden, untersucht mit Ethanol- und Formaldehyd-fixierten Granulocyten. *Das AAV-Kollektiv setzt sich aus 10 Anti-MPO- und 10 Anti-PR3-positiven Proben zusammen, die gemäß ihrer ELISA-Reaktivität ausgewählt wurden.

Zur Bestimmung der P-ANCA-Spezifität wurden alle CU-Seren mit einem ANCA-Profil-ELISA untersucht. 28 Seren (71,8%) reagierten mit keinem der im ANCA-Profil-ELISA enthaltenen Antigene (PR3, MPO, Elastase, Cathepsin G, BPI, Laktoferrin). In 6 der 28 P-ANCA-positiven und 2 der P-ANCA-negativen Seren wurden Antikörper gegen Proteinase 3 gemessen. Allerdings zeigten nur 3 bzw. 1 dieser Seren in der IIF ein dafür typisches C-ANCA-Muster mit grenzwertigen Titern. Bei der Mehrzahl dieser Seren lagen die im ELISA ermittelten Werte auch im Grenzwertbereich. Die Literaturangaben zum Vorkommen von Anti-Proteinase 3-Antikörpern bei CU-Patienten schwanken sehr. In den meisten Studien wurden dazu keine Aussagen gemacht, da diese Antikörper mit einem C-ANCA-Muster reagieren und die Fokussierung bei CED auf die dort mit einer sehr hohen Prävalenz vorliegenden P-ANCA und die dafür relevanten Zielantigene stattfand. Einige Studien legten nahe, dass Anti-Proteinase 3-Antikörper nicht bei CU-Patienten auftreten (Yang et al., 1996, Roozendaal und Kallenberg, 1999), andere Autoren wiesen bei 8 bis 12% der CU-Patienten Antikörper gegen Proteinase 3 nach (Elzouki et al., 1999, Xu et al., 2008). Es wurde vermutet, dass sie bei einem speziellen Subtyp einer therapierefraktären CU auftreten (Suzuki et al., 2008).

In je 1 der Anti-PR3-positiven Proben wurden zusätzlich auch Antikörper gegen BPI und gegen Laktoferrin gefunden. Des Weiteren wurden in je 1 Serum isoliert Antikörper gegen Laktoferrin, MPO, Cathepsin G und BPI nachgewiesen. Somit konnten in 19 der 28 P-ANCA-positiven Seren mit dem ANCA-Profil-ELISA keine Antikörper bestimmt werden. Die hohe P-ANCA-Prävalenz von 71,8% bei CU konnte keiner einzelnen Entität zugeordnet werden.

Zur Bestimmung der Prävalenz von Antikörpern gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin wurden die Seren durch indirekte Immunfluoreszenz mit depletierten (1M MgSO_4) und nachfolgend mit Laktoferrin rekonstituierten Ethanol-fixierten Granulocyten untersucht. Es reagierten 28 von 39 CU-Seren, von denen 23 auch mit Ethanol-fixierten Granulocyten P-ANCA-positiv, 5 aber P-ANCA-negativ waren. Nur 2 der 96 MC-Seren, aber 31 von 62 PSC-Seren zeigten eine Reaktion mit den Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten. Weder die 10 AAV-Seren mit Antikörpern gegen MPO noch die 50 Seren gesunder Probanden waren mit den Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten reaktiv. Bei den 10 AAV-Seren mit

Antikörpern gegen Proteinase 3 blieb im Vergleich zu unbehandelten Ethanol-fixierten Granulocyten die C-ANCA-Reaktivität nahezu erhalten und es wurde durch die Laktoferrin-Beladung keine zusätzliche Reaktion mit den Zellkernen hervorgerufen.

	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn	PSC	AAV		Gesunde Probanden
				MPO	PR3	
n	39	96	62	10	10	50
DNA-ANCA	71,8%	10,4%	54,8%	0,0%	0,0%	0,0%
DNA-Laktoferrin pos./ P-ANCA pos.	59,0%	2,1%	35,5%	0,0%	0,0%	0,0%
DNA-Laktoferrin pos./ P-ANCA neg.	12,8%	0,0%	14,5%	0,0%	0,0%	0,0%
DNA-freier Anti-Laktoferrin ELISA	5,1%	0,0%	3,2%	0,0%	0,0%	0,0%
DNA-ANCA und/ oder DNA-Laktoferrin	84,6%	10,4%	69,3%	0,0%	0,0%	0,0%

Tabelle 8: **Prävalenz DNA-ANCA und Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper**

in klinisch charakterisierten Serumkollektiven

Eine Laktoferrin-spezifische Reaktion ergab sich somit bei 71,8% der CU-Patientenseren (50% PSC, 2,1% MC, 0% AAV, 0% gesunde Probanden). Eine so hohe Prävalenz eines CU-assoziierten P-ANCA-Zielantigens konnte bisher in keiner anderen Studie ermittelt werden.

Durch den parallelen Einsatz Ethanol-fixierter und selektiv Laktoferrin-rekonstituierter Granulocyten konnte die Prävalenz für den Nachweis von granulocytenspezifischen Antikörpern bei CU auf 84,6% und bei PSC auf 69,3% erhöht werden.

Damit zeigte sich aber auch, dass 5 der P-ANCA-positiven CU-Seren (17,8%) nicht mit den Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten reagierten. Es ist daher anzunehmen, dass in einigen wenigen Fällen noch andere Zielantigene auftreten können. Das hat uns darauf gebracht, auch mit Azurocidin diese Untersuchungen durchzuführen, wo wir auch fündig geworden sind (4.4.4).

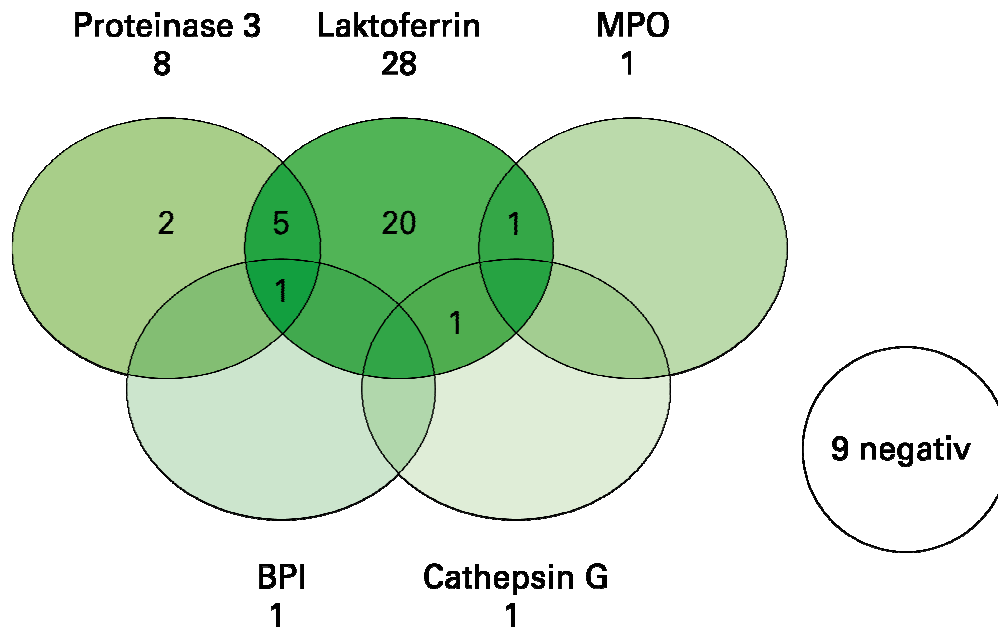


Abbildung 29: **ANCA-Spezifität bei Colitis ulcerosa**

Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper bei CU (n=39) unter Verwendung Laktoferrin-rekonstituierter Granulocyten. Die Antikörper gegen Proteinase 3, MPO, BPI und Cathepsin G wurden mit einem ELISA bestimmt.

Für eine kommerzielle Nutzung war die schrittweise Depletion und Rekonstitution der Ethanol-fixierten Granulocyten mit Laktoferrin und einem darauffolgenden IIFT der zu untersuchenden Seren nicht geeignet. Deshalb sollte der Prozess der Depletion mit 1 M MgSO_4 und die anschließende Rekonstitution mit Laktoferrin bereits vor der Seruminkubation abgeschlossen sein, um einem Anwender ein **fertig konfektioniertes standardisiertes Produkt** zur Verfügung zu stellen.

Zu diesem Zweck wurden Tests mit verschiedenen Laktoferrin-Konzentrationen vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass bereits 50 $\mu\text{g/ml}$ für den spezifischen Nachweis der Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper ausreichen (gegenüber 250 $\mu\text{g/ml}$ bei den frisch rekonstituierten Granulocyten).

Alle CU- und MC-Seren sowie 50 Seren gesunder Probanden wurden zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität der fertig konfektionierten Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen der direkten (in einem durchgängigen Arbeitsprozess durchgeführten) Laktoferrin-Rekonstitution verglichen.

	„frisch“ Laktoterrin-rekonstituierte Granulocyten	Gebrauchsfertige Laktoterrin-rekonstituierte Granulocyten
Colitis ulcerosa n=39	28	28
Morbus Crohn n= 96	2	7
Gesunde Probanden n=50	0	2

Tabelle 9: **Vergleich Zeitpunkt der Laktoterrin-Rekonstituierung**

Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen DNA-komplexiertes Laktoterrin mit frisch Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten im Vergleich zu gebrauchsfertigen Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten bei Patienten mit CU, MC und gesunden Probanden.

Mit beiden Rekonstitutions-Methoden waren jeweils 28 von 39 CU-Seren positiv. Bei 6 der Seren wichen die Resultate beider Methoden jedoch voneinander ab. 3 waren ausschließlich bei der frischen Direkt-Rekonstitution und 3 nur mit den gebrauchsfertigen Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten positiv. Die Prävalenz von 71,8% blieb aber netto gleich. Die Ergebnisse mit den gebrauchsfertigen Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten stimmten sehr gut mit denen des Anti-DNA/Laktoterrin-ELISA (4.4.3) überein. Die ausschließlich mit den unmittelbar frisch Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten positiven Proben reagierten dagegen nicht im ELISA.

Allerdings zeigten sich sowohl bei 7 von 96 (7,3%) MC-Seren als auch bei 2 von 50 Seren gesunder Probanden mit den gebrauchsfertigen Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten positive Reaktionen. Die Spezifität für Anti-DNA-Laktoterrin-Antikörper untersucht mit den standardisierten gebrauchsfertigen Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten betrug 96% und entsprach damit nahezu der P-ANCA-Spezifität von 99% mit Ethanol-fixierten Granulocyten.

Folglich stand mit den standardisierten Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten ein Produkt mit gleichbleibender Sensitivität, aber leicht verringerter Spezifität zur Verfügung.

4.4.2 IgG-Subklassen Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper

Die gebrauchsfertigen Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten wurden für die Bestimmung der IgG-Subklassen in den Seren der CU-Patienten eingesetzt. In der empfohlenen Gebrauchsverdünnung waren die Sekundärantikörper zu insensitiv. Deshalb wurden sie in einer höheren Konzentration (Verdünnung 1:20) eingesetzt.

In 25 CU-Seren konnten die Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin subtypisiert werden. Es zeigte sich eine starke Fokussierung auf die Subklassen IgG1 und IgG3, die jeweils in 19 bzw. 15 Seren vorlagen. In 4 Seren wurden auch Antikörper der Subklasse IgG2 nachgewiesen, welche aber immer zusammen mit Subklasse IgG1 oder IgG3 auftraten.

Colitis ulcerosa n=39	IgG gesamt	IgG1 gesamt	IgG2 gesamt	IgG3 gesamt	IgG4 gesamt	IgG1 und IgG2	IgG1 und IgG3	IgG2 und IgG3	IgG1 und IgG2 und IgG3
	28	19	4	15	0	2	8	1	1

Tabelle 10: **IgG-Subklassen der Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper**

Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin untersucht in CU-Seren (n=39) verteilt nach Gesamt-IgG sowie den Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4.

Die hier gefundene Verteilung der IgG-Subklassen für CU-assoziierte P-ANCA entsprach den Angaben der Literatur (Ellerbroek et al., 1994, Bansil et al., 1996). Damit unterschieden sie sich von den ANCA bei Vaskulitis, welche überwiegend den Subklassen IgG1 und IgG4 angehörten (Brouwer et al., 1991).

4.4.3 Reaktivität Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper im ELISA

In einem konventionellen **Anti-Laktoferrin-ELISA**, bei dem Mikrotiterplatten direkt mit Laktoferrin beschichtet wurden, haben lediglich 2 der 39 CU-Seren, 2 der 62 PSC-Seren und keines der 96 MC-Seren positiv reagiert. Die Diskrepanz des Nachweises der Antikörper gegen Laktoferrin zwischen der zellbasierten Methode in einem IIFT und dem Anti-Laktoferrin-ELISA konnte in dieser Arbeit bereits geklärt werden. Im IIFT konnten nur Granulocyten mit intakter DNA das Laktoferrin

binden und beide zusammen den Zielantigenkomplex für die P-ANCA bilden. Dem ELISA-Testsystem fehlte bisher DNA als Bindungspartner.

Aus diesem Grund wurde mit einem Panel an P-ANCA-positiven CU-Referenzseren im Vergleich zu Seren gesunder Probanden ein neues Testsystem optimiert, welches sowohl humanes Laktoferrin als auch DNA enthielt. Aus dem Mittelwert plus der 2fachen Standardabweichung der Seren gesunder Probanden wurde die Nachweisgrenze (Cut-off) bestimmt und bei einer Extinktion von 0,8 festgelegt. Dieser neu konzipierte **Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA** wurde zur Bestimmung von Antikörpern gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin in den Serumkollektiven der CU-, MC- und PSC-Patienten sowie der gesunden Probanden eingesetzt.

In 23 von 39 CU-Seren wurden Extinktionen gemessen, die oberhalb des Cut-offs lagen, woraus eine Prävalenz von 59% resultierte. Für PSC ergab sich mit diesem Test eine Prävalenz von 50% (31 von 62 Seren) und für MC von 5,2% (5 von 96). Bei keinem der 50 Seren gesunder Probanden wurden über dem Cut-off liegende Werte erzielt.

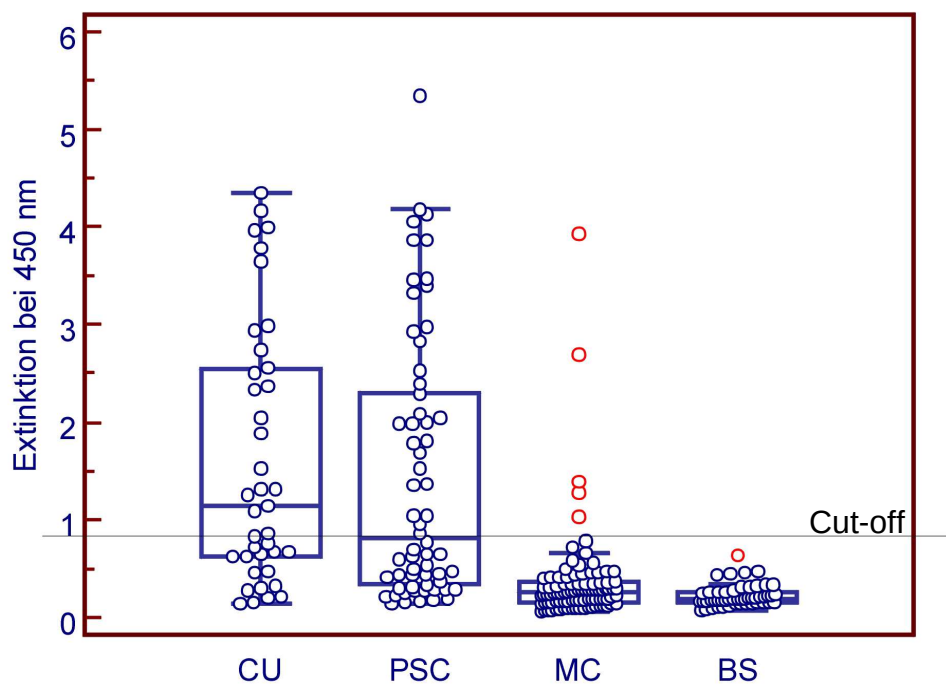


Abbildung 30 : **Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper im Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA**

Darstellung der im Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA für Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin gemessenen Extinktionen in den klinisch charakterisierten Serumkollektiven.

Bezogen auf die CU-Seren wurde im Vergleich zur IIF mit Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten für 30 von 39 Seren ein übereinstimmendes Ergebnis ermittelt. Bei den Seren, die nur in der IIF reagierten, handelte es sich vornehmlich um schwach positive mit einem Titer von 1:10.

Colitis ulcerosa n=39		Anti-DNA/Laktoferrin (IIFT)	
		positiv	negativ
Anti-DNA/Laktoferrin (ELISA)	positiv	21	2
	negativ	7	9

Tabelle 11: Methodenvergleich IIFT gegen ELISA

Gegenüberstellung der Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper in den CU-Seren untersucht in einem IIFT mit Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten im Vergleich zum Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA.

Der AUC-Wert (Area Under Curve) einer ROC-Kurve (Receiver Operating Characteristic) dient als Maß für eine Testcharakterisierung und gibt an, wie gut zwischen dem richtig positiven Kollektiv und dem richtig negativen Kollektiv diskriminiert werden kann. Ein AUC von 1,0 entspricht einem Test mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. Für CU und PSC konnte mit dem Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA im Vergleich zu den Proben der MC-Patienten und gesunden Probanden ein AUC von 0,859 ermittelt werden.

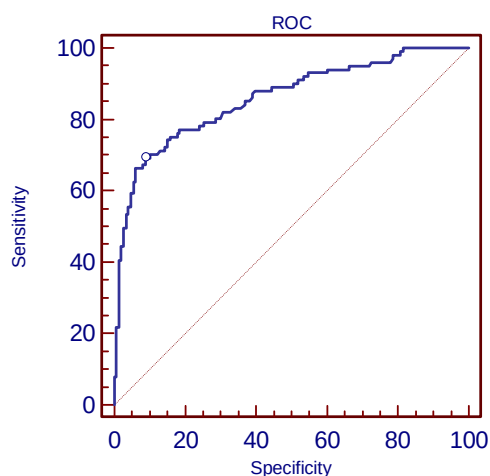


Abbildung 31: ROC-Kurve des Anti-DNA/Laktoferrin-ELISA

Dieser neu entwickelte ELISA, bei dem Laktoferrin in einem Komplex mit DNA vorliegt, bestätigte mit einer weiteren Methode eindeutig die Notwendigkeit eines nukleären Bindungspartners für Laktoferrin zur korrekten Ausbildung des Zielepitops der CU-assoziierten P-ANCA. Dieser wurde in Form der im Chromatin enthaltenen intakten DNA dem Laktoferrin zur Verfügung gestellt.

Ein Capture-ELISA, in dem selbst hergestellte monoklonale Antikörper zur Bindung des Laktoferrins an die Festphase eingesetzt wurden, hat nicht funktioniert, da keine DNA als Bindungspartner zur Verfügung stand.

4.4.4 Vorkommen von Anti-DNA-Azurocidin-Antikörpern bei CED

Nachdem bei den Vortestungen 2 von 5 der P-ANCA-positiven CU-Seren spezifisch mit Azurocidin-rekonstituierten Granulocyten reagierten, wurde in dem CED-Studienkollektiv und 50 Seren gesunder Probanden auch die Prävalenz von Antikörpern gegen DNA-komplexiertes Azurocidin ermittelt. Bei 7 Seren der CU-Patienten wurden Anti-DNA-Azurocidin-Antikörper gefunden (Prävalenz 17,9%). Allerdings lagen bei allen 7 Seren gleichzeitig sowohl Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin als auch P-ANCA vor. Im Unterschied zu den Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörpern wurden auch bei 7 von 96 der MC-Seren (7,3%) Antikörper gegen DNA-komplexiertes Azurocidin nachgewiesen, wobei aber nur in 2 Fällen gleichzeitig P-ANCA und Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin vorlagen. Leider standen nur noch 41 der ursprünglich 62 PSC-Seren für die Bestimmung der Anti-DNA-Azurocidin-Antikörper zur Verfügung. Bei 8 von diesen 41 PSC-Seren (19,5%) konnten Anti-DNA-Azurocidin-Antikörper nachgewiesen werden. Nur 2 dieser Seren hatten gleichzeitig sowohl P-ANCA als auch Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin und 1 Serum wies isoliert Anti-DNA-Azurocidin-Antikörper auf. Lediglich bei einem Serum der gesunden Probanden (2%) fanden sich auch Anti-DNA-Azurocidin-Antikörper.

	Colitis ulcerosa n=39	Morbus Crohn n=96	PSC n=41	Gesunde Probanden n=50
DNA-Azurocidin	17,9%	7,3%	19,5%	2%
DNA-Laktoferrin	71,8%	2,1%	48,8%	0%
DNA-Azurocidin und DNA-Laktoferrin	17,9%	2,1%	12,2%	0%

Tabelle 12: Prävalenz der Antikörper gegen DNA-komplexiertes Azurocidin bei CED-Patienten

Prävalenz der Antikörper gegen DNA-komplexiertes Azurocidin, ermittelt mit depletierten Ethanol-fixierten, dann mit Azurocidin-rekonstituierten Granulocyten, im Vergleich zu Antikörpern gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin untersucht mit Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten.

Damit hat sich DNA-komplexiertes Azurocidin als ein weiteres Zielantigen der CU- und PSC-assoziierten P-ANCA erwiesen. Gegenüber den Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörpern (CU 71,8% und PSC 48,8%) wies es aber eine deutlich geringere Prävalenz auf. Bei den MC-Seren scheinen Anti-DNA-Azurocidin-Antikörper eine größere Rolle zu spielen (7,3%), da sie hier gegenüber den Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörpern etwas häufiger zu finden sind (2,1%).

5 Diskussion

Das Haupt-Zielantigen der Colitis-ulcerosa-assoziierten P-ANCA wurde als ein Komplex aus Laktoferrin und DNA identifiziert und charakterisiert, als ein zweites das DNA-komplexierte Azurocidin. Die jeweiligen Antikörper-Prävalenzen wurden mit Seren von Patienten mit Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Primär-sklerosierender Cholangiitis, ANCA-assoziiierter Vaskulitis sowie von gesunden Probanden untersucht.

5.1 Identifikation der Zielantigene CU-assoziiierter P-ANCA

Die Bestimmung von Autoantikörpern kann bei ca. 80% der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zur Diagnose beitragen. Für MC sind Autoantikörper gegen das exokrine Pankreas (PAk) sowie *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) sichere serologische Erkennungsmerkmale. Bei CU treten Autoantikörper gegen intestinale Becherzellen (BAk) und neutrophile Granulocyten (P-ANCA) auf. P-ANCA, die ausschließlich mit den Ethanol-fixierten Granulocyten reagieren, kommen bei der CU mit 67% (Stöcker et al., 1992), bei der PSC zwischen 67 und 88% (Duerr et al., 1991, Bansi et al., 1996, Roozendaal et al., 1998a, Terjung und Worman, 2001), aber bei nur 7% der MC-Patienten und 0 bis 1% gesunder Probanden vor (Stöcker et al., 1992). Diese hohe Prävalenz der P-ANCA bei CU und PSC machte eine Identifizierung der relevanten Zielstrukturen außerordentlich interessant und es wurden deshalb bereits eine Vielzahl von Untersuchungen vorwiegend unter Einsatz von Westernblot- oder ELISA-Techniken durchgeführt. Zu den bisher als Zielantigen ins Spiel gebrachten Kandidaten der CU-assoziierten P-ANCA gehörten vorwiegend Enzyme der Granulocyten wie Cathepsin G (Halbwachs-Mecarelli et al., 1992), Laktoferrin (Peen et al., 1993), Elastase, BPI (Zhao et al., 1995) und Azurocidin (Zhao und Lockwood, 1996), aber auch Proteine ohne Granulocyten-Spezifität wie Histon H1 (Eggena et al., 2000), die High-Mobility-Group-Proteine HMG1 und HMG2 (Sobajima et al., 1997) sowie Beta-Tubulin Isotyp 5 (Terjung und Spengler, 2008). Die Ergebnisse waren aber widersprüchlich und ein endgültiger Beweis für die CU-Assoziation der entsprechenden Antikörper stand bisher noch aus.

Von besonderem Interesse waren die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Vidrich et al. (Vidrich et al., 1995): Nach Behandlung der Granulocyten mit DNase zeigte sich eine Veränderung der P-ANCA-Reaktion von Patientenseren mit CU, PSC und Autoimmunhepatitis Typ 1. Während bei den meisten CU-Seren die Antigenerkennung komplett verloren ging, reagierte die Mehrheit der PSC- und AIH-1-Seren mit einem cytoplasmatischen Muster. Dieses Nachweisverfahren zur Bestimmung der DNase-Sensitivität der P-ANCA wurde zum Patent angemeldet und wird zurzeit ausschließlich von den Prometheus Laboratories eingesetzt. Prometheus empfiehlt den Nachweis im Rahmen des IBD 7-Tests zusammen mit ASCA der Klassen IgA und IgG, Anti-OmpC IgA, Anti-CBir1 IgA sowie einem ANCA-Screen-ELISA und einem IFT zur Bestimmung der herkömmlichen P-ANCA. Die Aussagekraft der DNase-Sensitivitäts-Bestimmung wird allerdings kontrovers diskutiert. Der Test ist nicht von der US Food and Drug Administration zugelassen und es gibt keine externen Studien, die die dort ermittelten Ergebnisse belegen. In einer internationalen Konsensus-Erklärung zur ANCA-Untersuchung und -Befunderstellung wurde, übereinstimmend mit den Ergebnissen in dieser Arbeit, auf das Vorkommen inkonsistenter Ergebnisse hingewiesen und von einem Einsatz in der allgemeinen Diagnostik abgeraten (Savige et al., 2003). Jaskowski et al. haben 2006 eine CED-Studie vorgelegt, in der bei 197 Patientenseren die klassische P-ANCA-Differenzierung mit Formaldehyd-fixierten Granulocyten und die DNase-I-Verdaumethode (bestimmt bei Prometheus Laboratories) verglichen wurden (Jaskowski et al., 2006). Die Ergebnisse stimmten nur zu 87,7% überein. Bei einer Nachtestung der diskrepanten nur im DNase-I-Verdau positiven Seren wurden für 50% falsch positive Reaktionen nachgewiesen. Diese waren durch Antinukleäre Antikörper (ANA) verursacht, die zum Teil schwer von P-ANCA abgegrenzt werden können. Durch die Inkubation der Granulocyten mit DNase-I geht auch die ANA-Reaktivität verloren und Ergebnisse werden falsch als CU-assoziiertes P-ANCA interpretiert.

Prometheus Laboratories bewertet das Verschwinden der P-ANCA-Reaktion nach DNase-Behandlung der Granulocyten als Beweis für die Zellkern-Lokalisation des Zielantigens der CU-assoziierten P-ANCA. In der entsprechenden Arbeitsanleitung wird die Vermutung geäußert, dass es sich bei dem Zielantigen um das Histon H1 handeln könnte. Demnach sollen Zellkern-Autoantikörper für den Nachweis der

CU spezifischer als cytoplasmatisch lokalisierte Antikörper sein und die patentrechtlich geschützte DNase-Behandlung die Lokalisation des Zielantigens im Zellkern aufzeigen. In der ursprünglichen Arbeit von Vidrich et al. wurde dieses Phänomen aber anders interpretiert: Entweder ist das Epitop, welches durch die CU-assoziierten P-ANCA erkannt wird, ein Protein-DNA-Komplex oder intakte DNA ist für die Aufrechterhaltung der Integrität des Epitops notwendig. Das eigentliche Zielantigen konnte von dieser Arbeitsgruppe allerdings nicht identifiziert werden.

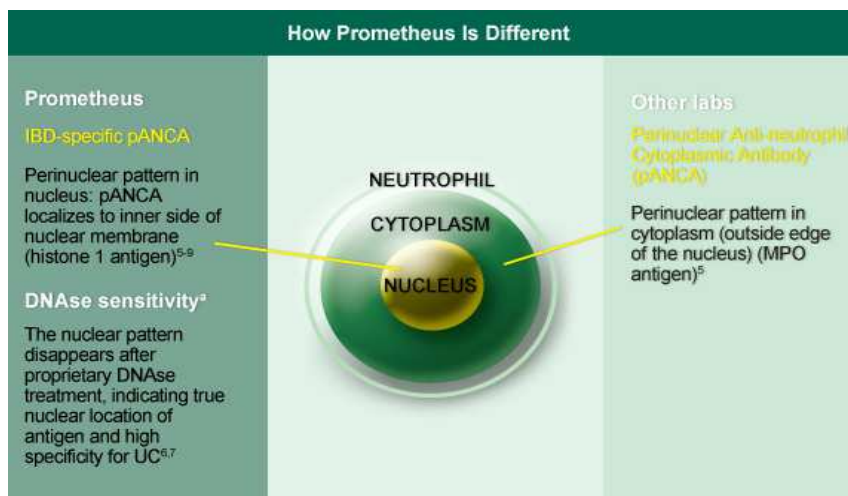


Abbildung 32: Irrtümliche Darstellung der Prometheus Laboratories: Lokalisation CU-assoziiierter P-ANCA-Zielantigene im Zellkern der neutrophilen Granulocyten

<http://www.ibdtest.com/hcp/diagnostic-indications.aspx>

Die vorliegende Arbeit befasste sich erneut mit der Suche nach den CU-relevanten Zielantigenen der P-ANCA und konnte als **Hauptzielantigen** das Enzym Laktoferrin identifizieren - gebunden an DNA als **DNA-komplexiertes Laktoferrin**. Als weiteres Zielantigen bei CED konnte **DNA-komplexiertes Azurocidin** ermittelt werden. Mit Salzlösungen hoher Ionenstärke vorbehandelte Ethanol-fixierte Granulocyten verloren ihre P-ANCA-Reaktivität. Wurden die in diesem Prozess extrahierten Antigene den depletierten Granulocyten erneut zugeführt, reagierten die CU-Seren wieder mit dem typischen perinukleären Fluoreszenzmuster. Als Hauptbestandteile der Granulocyten-Extrakte wurden Laktoferrin und MPO sowie in geringeren Anteilen Azurocidin durch MALDI-ToF und Westernblot identifiziert. Depletierte Granulocyten wurden mit diesen aufgereinigten Proteinen rekonstituiert und nachfolgend mit ausgewählten Seren

inkubiert. Dabei zeigten sich je nach Krankheitsspezifität unterschiedliche Ergebnisse. Seren von CU-Patienten reagierten selektiv mit Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten, die von Vaskulitis-Patienten dagegen mit den MPO-rekonstituierten Granulocyten. Sowohl die erneute Bindung der Granulocyten-Extrakt-Antigene, als auch die der aufgereinigten Proteine bedarf einer intakten DNA der Granulocytenkerne. Nach Verdau der DNA mit Nukleasen konnte die Rekonstitution der Proteine keine Wiederherstellung der P-ANCA-Reaktion hervorrufen. Es wurde eindeutig gezeigt, dass sich Laktoferrin und Azurocidin nur an Granulocyten-Zellkerne mit intakter DNA binden können. Die CU-assoziierten P-ANCA reagierten spezifisch mit den jeweils daraus resultierenden Protein-DNA-Komplexen. Damit konnte die Aussage der Prometheus Laboratories, wonach das Zielantigen der CU-assoziierten P-ANCA ausschließlich im Zellkern der neutrophilen Granulocyten lokalisiert ist, widerlegt werden.

5.2 Physiologische Bedeutung Laktoferrin und Azurocidin

Laktotransferrin wird vor allem in älteren Veröffentlichungen auch als Laktotransferrin bezeichnet. Entdeckt wurde es 1939 von Sorensen und Sorensen (Sorensen und Sorensen, 1939) und 1960 als wichtiger Bestandteil humaner und boviner Milch identifiziert (Groves, 1960). Es handelt sich um ein Fe^{3+} -bindendes Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 78 kDa. In der humanen Milch weist Laktoferrin die zweithöchste Proteinkonzentration auf. Es wird ebenfalls von neutrophilen Granulocyten sowie in geringen Mengen von der Tränendrüse, der Nasenschleimhaut, Speicheldrüsen und dem Darmepithel sezerniert. Eine geringe Blutplasmakonzentration ($<1 \mu\text{g/ml}$) resultiert aus der Degranulation neutrophiler Granulocyten. Laktoferrin gehört zusammen mit Transferrin (Siderophilin) und Ovotransferrin zur Gen-Familie der Transferrine, welche alle die Fähigkeit haben, reversibel Eisen zu binden. Transferrin ist das Transportprotein für Eisen im Blut. Allerdings hat Laktoferrin im Vergleich zum Transferrin eine 300-mal stärkere Affinität, Eisen zu binden. Laktoferrin besteht aus einem Polypeptid-Strang mit 708 Aminosäuren, der zu zwei Schleifen, der N- und der C-Domäne gefaltet ist, die eine Sequenzhomologie von ca. 40% aufweisen (Crichton, 1990). Jede Domäne ist in zwei Sub-Domänen unterteilt, zwischen denen sich jeweils die Bindungsstelle für ein dreiwertiges Eisen-Ion (Fe^{3+}) befindet. In Anwesenheit eines Bicarbonat- oder eines Carbonat-Ions kann sich jeweils ein Fe^{3+} -Ion

reversibel binden (Brock, 2002). Das gesättigte Laktoferrin-Molekül trägt zwei Eisen-Ionen. Die hohe Eisen-Affinität des Laktoferrins bleibt bis zu einem pH-Wert von 4 erhalten, während Transferrin diese bereits bei einem pH-Wert von 6 verliert.

Laktoferrin enthält viele basische Aminosäuren und sein isoelektrischer Punkt liegt mit 8,7 sehr hoch. Dadurch kann Laktoferrin mit vielen Proteinen und anderen negativ geladenen Molekülen interagieren, z. B. mit spezifischen DNA-Sequenzen (Bennett et al., 1986, He und Furmanski, 1995). Van Berkel et al. (van Berkel et al., 1997) konnten klar zeigen, dass ein N-terminaler Abschnitt mit 4 aufeinanderfolgenden Argininen ($\text{Arg}^2\text{-Arg}^3\text{-Arg}^4\text{-Arg}^5$) eine entscheidende Rolle bei der Interaktion des humanen Laktoferrins mit Heparin, Lipid A, Lysozym und DNA spielt. Diese Interaktionen sind vermutlich für viele physiologische Funktionen des Laktoferrin relevant.

Laktoferrin spielt im Unterschied zu Transferrin, vermutlich bedingt durch die deutlich geringere Konzentration im Blut, keine Rolle im normalen Eisen-metabolismus. Allerdings beeinflusst es den Eisenhaushalt bei Infektionen und Entzündungen. Für seine antibakterielle Wirkung gibt es zwei Mechanismen. Zum einen bindet Laktoferrin Eisen, welches für den mikrobiellen Stoffwechsel benötigt wird. Des Weiteren geht Laktoferrin Interaktionen mit der Bakterienmembran ein, bei denen Lipopolysaccharide freigesetzt, ihre Permeabilität verändert oder sogar die Bakterienmembranen zerstört werden (Yamauchi et al., 1993). Diese Funktionen werden ebenfalls der basischen N-terminalen Region zugeschrieben. Bei oraler Aufnahme von Laktoferrin über Milch bewirkt die gastrische Protease Pepsin die Abspaltung des Peptids Lactoferricin aus der N-terminalen Region. Bezogen auf die antibakterielle Wirkung ist Lactoferricin viel potenter als das Gesamtprotein.

Laktoferrin hat eine starke antiinflammatorische Wirkung. Der Plasmaspiegel von Laktoferrin korreliert mit den zirkulierenden neutrophilen Granulocyten. Nach deren Aktivierung wird Laktoferrin freigegeben. Bei einer Sepsis kann die Laktoferrinkonzentration auf das 100fache ansteigen (Lønnerdal und Iyer, 1995).

Andere Studien belegen, dass Laktoferrin sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von Immunzellen beeinflussen kann (Ward et al., 2002).

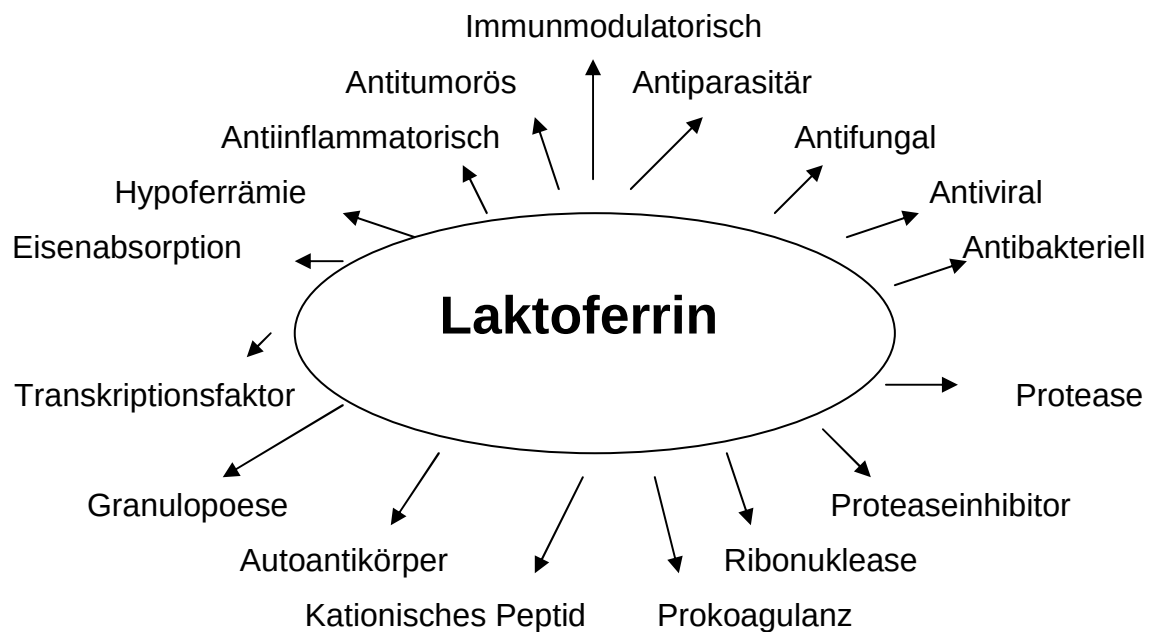


Abbildung 33: **Potentielle Funktionen von Laktoferrin** (modifiziert nach Brock)

Die vielfältigen Funktionen des Laktoferrins werden vermutlich über spezifische Rezeptoren verschiedener Zellen vermittelt. Bindungsstellen konnten auf Lymphocyten, Thrombocyten, Hepatocyten, Zellen der Brustdrüsen und Enterocyten identifiziert werden (Suzuki und Lönnerdal, 2002). Eine dieser Bindungsstellen wurde als Nucleolin identifiziert (Legrand et al., 2004). Nucleolin ist ein ubiquitäres Protein, welches für seine Shuttle-Funktion zwischen Zelloberfläche und Kern bekannt ist.

Azurocidin wird auch als kationisches antimikrobielles Protein 37 (CAP37) oder Heparin-bindendes Protein (HBP) bezeichnet und wurde 1984 identifiziert und isoliert (Shafer et al., 1984). Die Angaben zum Molekulargewicht schwanken zwischen 28 bis 37 kDa, was auf eine unterschiedliche Glykosylierung zurückgeführt wird (Watorek, 2003). In den neutrophilen Granulocyten ist Azurocidin vorwiegend in den azurophilen Granulen lokalisiert (Tapper et al., 2002). Es handelt sich um ein kationisches Glycoprotein und weist Sequenzhomologien zu den Serinproteasen Proteinase 3, Elastase und Cathepsin G, weiteren Proteinen der azurophilen Granula, auf (Campanelli et al., 1990). Im Unterschied zu diesen Enzymen ist Azurocidin allerdings durch den Austausch von zwei Aminosäuren im

katalytischen Zentrum der Serinproteasen enzymatisch inaktiv (Pereira et al., 1990b). Azurocidin besitzt dennoch eine starke antimikrobielle Aktivität gegen Gram-negative Bakterien (Spitznagel, 1990), welche zum Teil durch die starke Affinität seines basischen N-Terminus zum negativ geladenen Lipid A in der äußeren Hülle gramnegativer Bakterien bedingt wird. Zusätzlich wirkt es auch gegen Gram-positive Bakterien und *Candida albicans* (Campanelli et al., 1990) sowie einige Viren (Gordon et al., 2009). Azurocidin besitzt chemotaktische Eigenschaften und aktiviert Monocyten und Makrophagen (Pereira et al., 1990a). Es ist das einzige Granulenprotein der neutrophilen Granulocyten, welches in zwei verschiedenen Kompartimenten gelagert wird. Als Ergebnis der Lokalisation in den azurophilen Granulen und den sekretorischen Vesikeln wird Azurocidin sowohl zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Freisetzung von neutrophilen Granulocyten als auch später, beim Erreichen der Granulocyten am Entzündungsort abgegeben (Pereira, 1995, Tapper et al., 2002). Damit kann es sowohl Zellen im Blut, der Endothelien und der extravaskulären Umgebung erreichen. Endothelzellen werden durch Azurocidin aktiviert, was wiederum zur Erhöhung der Permeabilität der Blutgefäße und zur Entstehung von Ödemen führt (Soehnlein und Lindbom, 2009). Azurocidin fungiert als ein multifunktionaler Entzündungsmediator.

5.3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Kürzlich wurden sogenannte NETs (neutrophil extracellular traps) (Brinkmann et al., 2004) als zusätzlicher Mechanismus zur Eliminierung eindringender Pathogene beschrieben. Bisher waren nur die Phagozytose und die Sekretion von antimikrobiellen Substanzen bekannt. NETs sind Netzwerke extrazellulärer Fasern aus Neutrophilen, die sich unter einem Rasterelektronenmikroskop als feine Fasern darstellen. An ihnen können weitere Partikel kleben bleiben, die eine noch komplexere Struktur ermöglichen. Als hauptsächlicher Bestandteil wurde Chromatin identifiziert. Zusätzlich konnten auch Proteine sowohl aus den azurophilen (Elastase, Cathepsin G und MPO), als auch aus den sekundären (Laktoferrin) und tertiären (Gelatinase) Granula der Neutrophilen in den NETs nachgewiesen werden. Allerdings waren weder Bestandteile des Cytoplasmas oder des Cytoskeletts (z.B. F-Aktin, α -Tubulin) vorhanden.

NETs binden und töten umgebene Pathogene. Diese neu erkannte Strategie zur Vernichtung von Pathogenen unterscheidet sich von der Apoptose und der Nekrose. Ursprünglich wurde die Wirksamkeit von NETs nur bei Bakterien und Pilzen nachgewiesen. DNase-produzierende Bakterien, wie z.B. einige Streptokokken-Arten, umgehen diesen Mechanismus allerdings, indem sie DNA zersetzen und können so besonders schwere Infektionen auslösen (Buchanan et al., 2006). Es ist nicht bekannt, ob sich auch Viren an NETs binden. Kessenbrock et al. zeigten allerdings 2009 am Beispiel der autoimmunen Vaskulitis der kleinen Gefäße, dass NETs ebenfalls isoliert bei einer Autoimmunerkrankung auftreten können, ohne dass eine mikrobielle Infektion vorliegt (Kessenbrock et al., 2009). Inkubationen mit ANCA-positiven Seren lösten die Bildung von NETs aus, während dieser Effekt mit Seren gesunder Probanden nicht auftrat. Des Weiteren wurden NETs-Ablagerungen in den entzündeten Nieren und zusätzlich zirkulierende MPO-DNA-Komplexe gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung des CU-assoziierten P-ANCA zeigten sich nach der Inkubation Laktoferrin-rekonstituierter Granulocyten mit einigen CU-Seren auch diese faserartigen Gebilde an den neutrophilen Granulocyten. Insbesondere bei Seren mit hohen P-ANCA-Titern stellten sich die NETs eindeutig dar, während sie bei schwachen Titern nicht zu erkennen waren. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass auch Autoantikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin bei der Colitis ulcerosa im Zusammenhang mit der Funktion der NETs stehen.

5.4 Überwindung von Irrtümern zum fixierungsabhängigem

Verhalten von P-ANCA

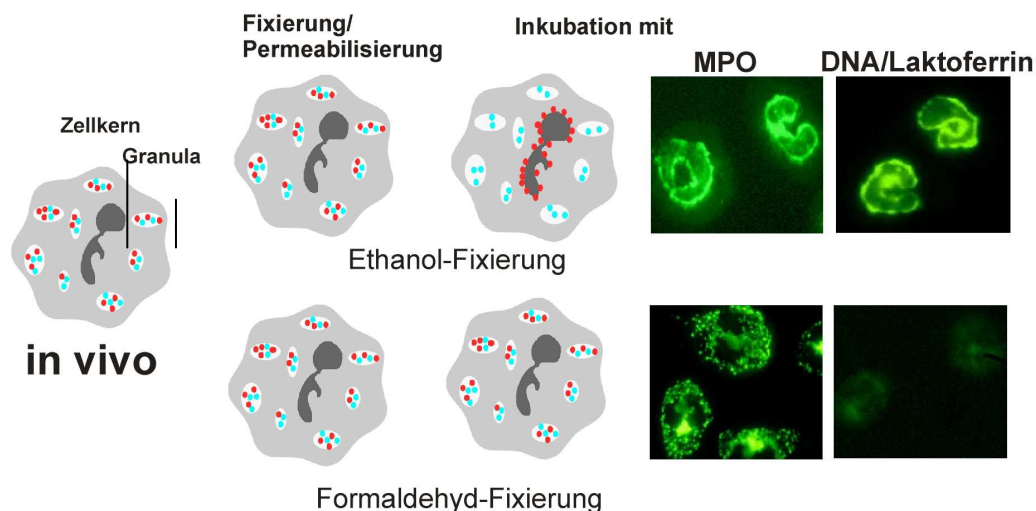
Keine Umverteilung der Granulocytenantigene während der Ethanol-Fixierung

Anti-MPO-Antikörper zeigen mit Ethanol-fixierten Granulocyten in der indirekten Immunfluoreszenz stets eine glatte perinukleäre Fluoreszenz. Mit Formaldehyd-fixierten Granulocyten reagieren sie dagegen ausschließlich im Cytoplasma und zeigen hier eine deutlich körnige Fluoreszenz. Die Fixierung mit Formaldehyd findet über quervernetzende Reaktionen benachbarter basischer Aminosäuren

statt, wodurch Konformationsänderungen hervorgerufen werden können. MPO wird durch das Formaldehyd in den Granula fixiert und kann nicht während der IFT-Inkubation zum Kern diffundieren.

Zur Entstehung des perinukleären Musters bei der Verwendung Ethanol-fixierter Granulocyten gab es bisher verschiedene Hypothesen. In den ersten Veröffentlichungen zum fixierungsabhängigen Verhalten von Anti-MPO-Antikörpern ging man davon aus, dass sich die Antigene während der Ethanol-Fixierung durch eine Permeabilisierung der Granula-Membranen aus den Granulen zum Zellkern umverteilen (Burkholder und Bainton, 1990).

Es findet in der Tat eine Migration der stark positiv geladenen Myeloperoxidase an den negativ geladenen Zellkern statt - allerdings nicht während der Ethanol-Fixierung sondern erst während des ersten Inkubationsschrittes mit den in Puffer verdünnten Serumproben. Inkubationen unfixierter Granulocyten mit P-ANCA-positiven Seren zeigten ebenfalls eine unveränderte perinukleäre Fluoreszenz. Die positive Ladung des kationischen Proteins verursacht die Anlagerung an die negativ geladenen Kernbestandteile (Kernmembran und DNA).



- **Stark kationische Proteine:** z.B. MPO, Laktoferrin
- **Schwach kationische oder neutrale Proteine:** z.B. Proteinase 3

Abbildung 34: Verteilung der Granulocytenproteine in Abhängigkeit der Ladung und resultierende Fluoreszenzmuster nach Inkubation mit Anti-MPO- bzw. Anti-DNA/Laktoferrin-Antikörpern

Zielantigene CU-assoziiierter P-ANCA sind nicht „formalinsensibel“

Die bei der CU im Vordergrund stehende Zielantigen-Komponente Laktoferrin befindet sich ursprünglich in den sekundären Granula der neutrophilen Granulocyten (Briggs et al., 1981). Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin rufen mit Ethanol-fixierten Granulocyten ebenso wie Anti-MPO-Antikörper ein perinukleäres Muster hervor. Nach einer Formaldehyd-Fixierung zeigen sie dagegen keine Reaktion. Wie lässt sich dieser Unterschied erklären?

Die Ethanol-Fixierung verursacht weder eine entscheidende Permeabilisierung der Granula-Membranen, noch ist sie stark genug, um das Antigen in den Granulen zu fixieren. Laktoferrin ist wie MPO ebenfalls ein stark kationisches Protein und wandert entsprechend der Ladung zum Zellkern. Dort entstehen bei der Komplexierung mit der DNA Neoepitope, gegen die sich CU-assoziierten P-ANCA richten. Bei einer Formaldehyd-Fixierung findet analog zum MPO eine Arretierung des Laktoferrins in den Granula statt. Das Laktoferrin kann nicht zum Zellkern wandern, es entstehen keine DNA-Laktoferrin-Komplexe: Die Serum-Antikörper reagieren nicht.

Ein Experiment hat diese Sichtweise untermauert. Wurden Granulocyten-Substrate erst mit PBS und nachfolgend mit Formaldehyd behandelt, und anschließend mit P-ANCA-positiven Seren inkubiert, blieb das P-ANCA-Muster erhalten. Die CU-assoziierten P-ANCA konnten mit ihrem Zielantigen reagieren. Formaldehyd verursachte demzufolge keine Zerstörung der Epitope CU-relevanter P-ANCA, wie es bisher die allgemeine Auffassung war, sondern unterdrückte die Wanderung des Laktoferrins zur DNA und damit die Ausbildung des in dieser Arbeit identifizierten CU-reaktiven Antigenkomplexes. Deshalb sollte in Zukunft der Begriff DNA-ANCA für Autoantikörper gegen DNA-komplexierte Granulocyten-Antigene verwendet werden. Der bisher eingesetzte Terminus „formalinsensible P-ANCA“ führt in die Irre.

5.5 Prävalenz der DNA-ANCA bei CU, MC und PSC

Für die vorliegende Studie wurden nur Seren von Patienten verwendet, bei denen sowohl klinisch als auch endoskopisch und histologisch eindeutig entweder eine

CU oder ein MC identifiziert werden konnte. Unter Verwendung Ethanol-fixierter Granulocyten wurden bei 28 von 39 CU-Patienten (Prävalenz 71,8%), 10 von 96 MC-Patienten (10,4%) und 34 von 66 Patienten mit PSC (54,8%) P-ANCA der Klasse IgG nachgewiesen. Diese Prävalenzen entsprechen den Angaben der Literatur (Duerr et al., 1991, Stöcker et al., 1992, Bansi et al., 1996, Roozendaal et al., 1998a, Terjung und Worman, 2001).

Mit depletierten (1 M MgSO₄) und anschließend Laktoferrin-rekonstituierten Ethanol-fixierten Granulocyten ergaben sich folgende Prävalenzen für Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin: 28 von 39 CU (71,8%), 2 von 96 MC (2,1%) und 33 von 66 PSC (50,0%). Bei CU entspricht die Prävalenz der Antikörper gegen **DNA-komplexiertes Laktoferrin** genau der der P-ANCA. Jedoch reagierten 5 Seren exklusiv mit den Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten und nicht mit den Ethanol-fixierten Granulocyten und 5 Seren ausschließlich mit den Ethanol-fixierten Granulocyten. Von den 96 MC-Seren haben nur 2 mit den Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten reagiert (2,1%). Die Prävalenz lag deutlich unter der P-ANCA-Prävalenz (10,4%). Damit ist es mit dem Einsatz Laktoferrin-rekonstituierter Granulocyten gelungen, die P-ANCA bei CU und MC zu unterscheiden, da bei MC nur sehr selten Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin vorkommen. Eine Vielzahl der PSC-Seren hat ebenfalls mit den Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten reagiert (50%), darunter auch 9, die mit Ethanol-fixierten Granulocyten ein negatives Ergebnis zeigten. DNA-komplexiertes Laktoferrin ist somit ein spezifisches Zielantigen der CU- und PSC-assoziierten P-ANCA.

Durch die selektive Rekonstitution zuvor depletierter Granulocyten mit Laktoferrin wurde sowohl ein sensitives Testsystem zum Nachweis CU- und PSC-relevanter P-ANCA geschaffen, als auch ein spezifisches. Keines der 20 Seren mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis und keines der 50 Seren gesunder Probanden war mit den Laktoferrin-rekonstituierten Granulocyten reaktiv.

Ohne DNA als Bindungspartner war weder ein spezifischer noch ein sensitiver Nachweis der CU-assoziierten Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper möglich. Die Bestimmung von Antikörpern gegen Laktoferrin mittels Immunblot und im IIF

Laktoterrin-transfizierten HEK-293-Zellen war sowohl dem IIFT mit Laktoterrin-rekonstituierten Granulocyten als auch dem Anti-DNA/Laktoterrin-ELISA deutlich unterlegen und stellten keine Alternative zu diesen Nachweismethoden dar. Während im Immunblot die DNA fehlte, war das rekombinante Laktoterrin anscheinend nicht in der Lage, sich an die DNA zu binden.

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoterrin als Haupt-Zielantigen CU- und PSC-assoziiierter P-ANCA identifiziert. Alle vorherigen Literaturangaben zum Vorkommen von Anti-Laktoterrin-Antikörpern bei CED beziehen sich immer auf ein inkomplettes Antigen: Laktoterrin ohne DNA-Komplexierung. Damit lassen sich auch die oft deutlich geringeren Prävalenzen erklären: 22% (Mulder et al., 1994), 4% (Broekroelofs et al., 1994), 41% (Kossa et al., 1995), 8% (Yang et al., 1996), 4% (Walmsley et al., 1997), 13% (Sobajima et al., 1998), 26% (Roozendaal et al., 1998b). Einzig die Arbeitsgruppe um Peen et al. fand mit einem nur auf Laktoterrin basierendem ELISA-Testsystem eine Prävalenz von 50% für Anti-Laktoterrin-Antikörper bei CU und PSC (Peen et al., 1993). Diese Ergebnisse decken sich weder mit denen der anderen Arbeitsgruppen, die Human-Laktoterrin-beschichtete Mikrotiterplatten einsetzten, noch mit denen in dieser Arbeit auf Basis des DNA-freien Laktoterrins (Prävalenz Anti-Laktoterrin Antikörper bei CU 5%, bei PSC 3%). Erst durch die Neuerung, Mikrotiterplatten zuerst mit einer DNA-Präparation und anschließend mit Laktoterrin zu beschichten, konnte in dieser Arbeit für die CU eine Prävalenz von 59% und für die PSC von 50% erlangt werden. Wie Peen et al. so hohe Prävalenzen erzielen konnten, lässt sich nicht erklären. Es wurde darüber hinaus im Unterschied zu anderen Studien kommerziell erhältliches bovines Laktoterrin eingesetzt, welches sich in unseren Tests mit der indirekten Immunfluoreszenz als völlig ungeeignet erwies. Die untersuchten Serumkollektive waren zudem bei Peen et al. sehr klein (CU n=24, PSC n=12). Es gibt keine Hinweise, dass auch Peen et al. DNA-komplexiertes Laktoterrin verwendet haben.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 28 von 39 CU-Seren P-ANCA mit Ethanol-fixierten Granulocyten nachgewiesen. Immerhin hatten 5 dieser P-ANCA-positiven CU-Seren (17,8%) keine Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoterrin. Es lag daher nahe, dass DNA-komplexiertes Laktoterrin nicht das einzige Zielantigen der

CU-assoziierten P-ANCA darstellt, sondern auch noch andere Proteine mit DNA-Affinität als Zielantigene der CU-assoziierten P-ANCA auftreten können.

In den Granulocyten-Extrakten, mit denen in einem Immunfluoreszenztest nach Rekonstituierung zuvor depletierte Granulocyten ihre Reaktion mit CU-assoziiierter P-ANCA wiedererlangten, wurde über die MALDI-ToF-Massenspektrometrie auch Azurocidin als zusätzlicher Bestandteil identifiziert. Es zeigte sich, dass auch Azurocidin eine Bindung an die DNA der Zellkerne benötigt, um anschließend mit den CU-assoziierten P-ANCA reagieren zu können. Mit der indirekten Immunfluoreszenz wurden für Antikörper gegen **DNA-komplexiertes Azurocidin** folgende Prävalenzen ermittelt: CU 17,9%, MC 7,4% und PSC 19,5%. Allerdings wurde bei den CU-Patienten kein zusätzlicher Fall zu den bereits vorhandenen Antikörpern gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin und P-ANCA gefunden. Diese Ergebnisse stimmten gut mit verschiedenen Studien überein, wonach Anti-Azurocidin-Antikörper häufig mit Antikörpern gegen andere ANCA-Spezifitäten vergesellschaftet sind (Zhao und Lockwood, 1996). Dagegen fanden sich nur bei 2 der 7 MC-Patienten mit Antikörpern gegen DNA-komplexiertes Azurocidin gleichzeitig P-ANCA und/oder Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper, so dass hier keine Korrelation mit ANCA vorlag. Bei 8 von 41 PSC-Seren konnten ebenfalls Antikörper gegen DNA-komplexiertes Azurocidin nachgewiesen werden. Antikörper gegen DNA-komplexiertes Azurocidin weisen somit keine ausschließliche CU-Spezifität auf und sollten bei Verdacht auf CU nur zusätzlich zu den Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörpern bestimmt werden.

Bisher wurde die Assoziation von Antikörpern gegen Azurocidin (allerdings jeweils nicht in Form eines DNA-Proteinkomplexes) mit CU bestritten (Cooper et al., 2000) oder nur in sehr wenigen Fällen gefunden (Schultz et al., 2003). Zhao et al. beschrieben 1996 Azurocidin als neues ANCA-Zielantigen (Zhao und Lockwood, 1996). Sie haben aber nicht die Notwendigkeit der DNA-Komplexierung erkannt. In einer groß angelegten Studie von Schultz et al. zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen antibiotische Proteine (BPI, Azurocidin, Calprotektin und Defensin (HBD-1 und HBD-2)) konnte weder in den Gruppen der Patienten mit systemischer Vaskulitis (n=99), mit anderen Vaskulitis-Formen und rheumatischen Erkrankungen (n=303), HIV-Infektionen (n=66) sowie anderen Infektionskrank-

heiten (n=134) Antikörper gegen Azurocidin gefunden werden (Schultz et al., 2003). Nur in der CED-Gruppe wurde bei lediglich 1 von 12 CU-Seren (8,3%) und keinem der 12 MC-Seren Anti-Azurocidin-Antikörper nachgewiesen. Indessen zeigten Cooper et al. in ihrer Studie, dass Anti-Azurocidin-Antikörper nicht typisch für CED-Patienten sind, da sie weder bei CU- (n=92), noch bei MC-Patienten (n=66) auftraten. Allerdings wurde auch jeweils das inkomplette Zielantigen ohne DNA-Bindungspartner eingesetzt, so dass diese Ergebnisse nicht erstaunlich sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass P-ANCA bei CU und PSC zum größten Teil gegen **DNA-komplexiertes Laktoferrin** gerichtet sind. Des Weiteren wurde ein IFT-Substrat zum Nachweis der Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin geschaffen: Depletierte und anschließend mit Laktoferrin-rekonstituierte Ethanol-fixierten Granulocyten. Zusätzlich wurde ein ELISA-Testsystem entwickelt, welches ebenfalls die Bestimmung von Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörpern ermöglicht. Es hat sich gezeigt, dass nicht in allen P-ANCA-positiven CU-Seren (17,8%) Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin nachgewiesen werden konnten, so dass auch andere bisher nicht identifizierte Zielantigene vorliegen können. **DNA-komplexiertes Azurocidin** stellt eines dieser weiteren Zielantigene CED-assoziiierter P-ANCA dar. Anti-DNA-Azurocidin-Antikörper traten aber nicht ausschließlich bei CU und PSC, sondern auch beim MC auf. Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper sind deutlich spezifischer für CU und PSC.

6 Zusammenfassung

Identifizierung DNA-komplexierter Granulocytenproteine als Zielantigene Colitis-ulcerosa-assoziiierter Autoantikörper

Die Diagnostik der Colitis ulcerosa (CU) und des Morbus Crohn (MC) stützt sich auf die Grundpfeiler Anamnese, klinische Untersuchung, Endoskopie und Histologie. In einigen speziellen Zentren werden darüber hinaus auch mehrere Serum-Antikörper bestimmt: Mit der CU sind Autoantikörper gegen intestinale Becherzellen (Prävalenz 28%) und gegen neutrophile Granulocyten (Fluoreszenztyp P-ANCA) assoziiert, die bei über 70% der Patienten gefunden werden (MC 7%, Gesunde <1%). Für MC sind Autoantikörper gegen das exokrine Pankreas (Prävalenz 39%) sowie Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisiae* (60%) serologische Erkennungsmerkmale. Eine wichtige Standardtechnik zum Nachweis der Autoantikörper ist die indirekte Immunfluoreszenz (IIF).

Gegen welche Bestandteile der Granulocyten die CU-assoziierten P-ANCA gerichtet sind, konnte bislang nicht geklärt werden - Katalase, α -Enolase, Bactericidal Permeability-Increasing Protein, Kathepsin G oder Laktoferrin. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass keines dieser Enzyme allein in der Lage ist, diese Antikörper zu binden – dazu bedarf es der Anwesenheit intakter DNA. Für die CU-assoziierten P-ANCA konnte das Haupt-Zielantigen eindeutig identifiziert werden: Es handelt sich um DNA-komplexiertes Laktoferrin. Daneben spielt auch DNA-komplexiertes Azurocidin eine Rolle.

Um bei den Experimenten Informationen über die Natur der Granulocyten-Autoantigene zu erhalten, wurden Ethanol-fixierte Granulocyten unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt und dann die jeweils verbliebene P-ANCA-Reaktivität durch IIF überprüft. Mit Lösungen hoher Salzkonzentration konnte ein Teil der Antigene extrahiert und die P-ANCA-Reaktivität aufgehoben werden („Depletion“). Wenn man aber den depletierten Granulocyten die extrahierten Antigene isotonisch wieder zuführte, ließ sich die P-ANCA-Reaktivität rekonstituieren.

Im Extrakt wurden durch Westernblot und Massenspektrometrie Laktoferrin, Myeloperoxidase und Azurocidin als CU-reaktive Bestandteile der Granulocyten-

Extrakte identifiziert. In nachfolgenden Untersuchungen wurden jeweils humanes Laktoferrin unterschiedlicher Quellen, MPO und Azurocidin zur Rekonstitution depletierter Granulocyten verwendet. Dabei reagierten die Seren von CU-Patienten selektiv nach Laktoferrin- und Azurocidin-Rekonstitution, die von Vaskulitis-Patienten dagegen nur nach MPO-Rekonstitution.

Nach Behandlung mit den DNA-spaltenden Enzymen Benzonase, Nuklease S7 und DNase-I war es nicht mehr möglich, die depletierten Granulocyten mit Laktoferrin- und Azurocidin rekonstituieren. Es konnte gezeigt werden, dass DNA als Bindungspartner für Laktoferrin und Azurocidin (nicht aber für MPO) zur Verfügung stehen muss, damit die entsprechende P-ANCA-Reaktion wiederhergestellt werden kann. Weil diese Voraussetzung in konventionellen ELISA-Systemen zur Bestimmung der Antikörper gegen (isoliertes) Laktoferrin nicht erfüllt war, haben sie bei der Diagnostik der CU versagt. Unter Berücksichtigung der hier gewonnenen Erkenntnisse ließ sich dagegen ein ELISA etablieren, mit dem sich CU-assoziierte P-ANCA nachweisen lassen: Als Antigen-Substrat wurde die feste Phase zunächst mit einer DNA-Präparation beschichtet und darauffolgend mit Laktoferrin. Allerdings mussten die Proben direkt im Anschluss inkubiert werden und dieses Testsystem war deshalb nicht für einen allgemeinen Einsatz standardisierbar.

Herkömmlich Formaldehyd-fixierte Granulocyten reagieren nicht mit CU-Seren. Es hat sich daher eingebürgert, die Zielantigene der CU-assoziierten P-ANCA als „formalinsensibel“ zu bezeichnen – ein Irrtum, wie die vorliegende Arbeit zeigt. Formaldehyd-fixierte Granulocyten reagieren nur deswegen nicht mit CU-assoziierten P-ANCA, weil das in den Granula lokalisierte Laktoferrin nach der Fixierung nicht mehr in der Lage ist, während des ersten Inkubationsschrittes der IIF zum Kern zu migrieren und dort einen Komplex mit DNA zu bilden. Lässt man das Laktoferrin zunächst zum Kern migrieren und fixiert es erst danach mit Formaldehyd, bekommt man eine perfekte perinukläre Fluoreszenz. Es wird daher vorgeschlagen, fortan den Begriff „DNA-ANCA“ einzusetzen: „Autoantikörper gegen DNA-komplexierte Granulocyten-Antigene“.

Die Prävalenz der DNA-ANCA wurde bei CU, MC, PSC und gesunden Probanden bestimmt. Unter Verwendung Ethanol-fixierter Granulocyten als Substrat für den IIFT fand sich bei Colitis ulcerosa eine P-ANCA-Prävalenz von 71,8% (Primär-sklerosierende Cholangiitis 54,8%, Morbus Crohn 10,4%, gesunde Probanden 0,0%). Mit den Laktoferrin-optimierten Granulocyten (Ethanol-fixierte Granulocyten; 1M MgSO_4 -depletiert und Laktoferrin-rekonstituiert) reagierten ebenfalls 71,8% der CU-Seren, aber nur 2,1% der MC-Seren (PSC 50,0%). Additiv ergaben sich bei dem parallelen Einsatz beider IIF-Substrate folgende Prävalenzen: Colitis ulcerosa 84,6%, PSC 69,3%, Gesunde (0,0%).

DNA-komplexiertes Azurocidin ist das zweitwichtigste Zielantigen der CU-assoziierten P-ANCA (Prävalenz der Anti-DNA-Azurocidin-Antikörper 17,9%). Es trägt allerdings nicht zur Identifikation zusätzlicher CU-Fälle bei, da sämtliche Anti-DNA-Azurocidin-positiven CU-Seren auch gleichzeitig Anti-DNA-Laktoferrin-Antikörper aufwiesen. Antikörper gegen DNA-komplexiertes Azurocidin traten zudem auch bei 7 von 96 der MC-Seren (7,3%) auf, deutlich mehr als Antikörper gegen DNA-komplexiertes Laktoferrin – letztere erweisen sich daher als ein weiteres serologisches Instrument zur Differentialdiagnose zwischen CU und MC.

7 Literaturverzeichnis

Reference List

Andersson E, Hellman L, Gullberg U, Ollson I: The Role of the Propeptide for Processing and Sorting of Human myeloperoxidase. *J Biol Chem* 273: 4747-4753; 1998

Bansi DS, Fleming KA, Chapman RW: Importance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: prevalences, titre, and IgG subclass. *Gut* 38: 384-389; 1996

Bennett RM, Merritt MM, Gabor G: Lactoferrin binds to neutrophilic membrane DNA. *Br J Haematol* 63: 105-117; 1986 May

Bentley E, Jenkins D, Campell F, Warren B: How could pathologists improve the initial diagnosis of colitis? Evidence from an international workshop. *J Clin Pathol* 55: 955-960; 2002

Billing P, Tahir S, Calfin B, Gagne G, Cobb L, Targan S, Vidrich A: Nuclear localization of the antigen detected by ulcerative colitis-associated perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Pathol* 147: 979-987; 1995 Oct

Bossuyt X: Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 52: 171-181; 2006 Feb

Briggs RC, Glass WF, Montiel MM, Hnilica LS: Lactoferrin: nuclear localization in the human neutrophilic granulocyte? *J Histochem Cytochem* 29: 1128-1136; 1981 Oct

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535; 2004 Mar 5

Broberger O, Perlmann P: Autoantibodies in human ulcerative colitis. *J Exp Med* 110: 657-674; 1959 Nov 1

Brock JH: The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 80: 1-6; 2002

Broekroelofs J, Mulder AH, Nelis GF, Westerveld BD, Tervaert JW, Kallenberg CG: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in sera from patients with inflammatory bowel disease (IBD). Relation to disease pattern and disease activity. *Dig Dis Sci* 39: 545-549; 1994 Mar

Brouwer E, Tervaert JW, Horst G, Huitema MG, van der Giessen M, Limburg PC, Kallenberg CG: Predominance of IgG1 and IgG4 subclasses of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in patients with Wegener's granulomatosis and clinically related disorders. *Clin Exp Immunol* 83: 379-386; 1991 Mar

Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, Nizet V: DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16: 396-400; 2006

Burkholder L, Bainton DF: Auto-antigens in Wegener's granulomatosis. *Blood* 75: 1588-1589; 1990 Apr 1

Campanelli D, Detmers PA, Nathan CF, Gabay JE: Azurocidin and a homologous serine protease from neutrophils; differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest* 85: 904-915; 1990

Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, Misra R, Wei B, Eggena ME, Targan SR, Braun J: Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect Immun* 68: 1542-1548; 2000 Mar

Cooper T, Savige JA, Nassis L, Paspaliaris B, Neeson P, Neil J, Knight KR, Daskalakis M, Doery JC: Clinical associations and characterisation of antineutrophil cytoplasmic antibodies directed against bactericidal/permeability-increasing protein and azurocidin. *Rheumatol Int* 19: 129-136; 2000

Crichton RR: Proteins of iron storage and transport. *Adv Prot Chem* 40: 281-363; 1990

Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD: Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *Mt Sinai J Med* 67: 1323-1329; 1932

Damoiseaux J, Bouten B, Linders A, Austen J, Roozendaal C, Russel M, Forget P-P, Tervaert JW: Diagnostic Value of Anti-Saccharomyces cerevisiae and Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies for Inflammatory Bowel Disease: High Prevalence in Patient with Celiac Disease. *J Clin Immunol* 22: 281-288; 2002

Desplat-Jego S, Johanet C, Escande A, Goetz J, Fabien N, Olsson N, Ballot E, Sarles J, Baudon JJ, Grimaud JC, Veyrac M, Chamouard P, Humbel RL: Update on Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies, anti-nuclear associated anti-neutrophil antibodies and antibodies to exocrine pancreas detected by indirect immunofluorescence as biomarkers in chronic inflammatory bowel diseases: Results of a multicenter study. *World J Gastroenterol* 13: 2312-2318; 2007

Duerr RH, Targan SR, LaRusso NF, Lindsay KL, Wiesner RH: Neutrophil cytoplasmic antibodies: a link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 100: 1385-1391; 1991

Eckbom A, Helmick C, Zack M: Ulcerative colitis and colorectal cancer. *N Engl J Med* 323: 1228-1233; 1990

Eggena M, Cohavy O, Parseghian MH, Hamkalo BA, Clemens D, Targan SR, Gordon LK, Braun J: Identification of histone H1 as a cognate antigen of the ulcerative colitis-associated marker antibody pANCA. *J Autoimmun* 14: 83-97; 2000 Feb

Ellerbroek PM, Oudkerk PM, Ridwan BU, Dolman KM, von Blomberg BM, dem Borne AE, Meuwissen SG, Goldschmeding R: Neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 47: 257-262; 1994 Mar

Elzouki AN, Eriksson S, Löffberg R, Nässberger L, Wieslander J, Lindgren S: The prevalence and clinical significance of alpha1-Antitrypsin deficiency (PiZ) and

ANCA specificities (Proteinase 3, BPI) in Patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 5: 246-252; 1999

Falk RJ, Jennette JC: Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* 318: 1651-1657; 1988 Jun 23

Fischer SA, Tremmel M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott MJ, Nimmo ER, Massey D, Berzuini C, Johnson C, Barrett JC, Cummings FR, Drummond H, Lees CW, Onnie CM, Hanson CE, Blaszczyk K, Inouye M, Ewels P, Ravindrarajah R, Keniry A, Hunt S, Carter M, Watkins N, Ouwehand W, Lewis CM, Cardon L, Wellcome Trust Case Control Consortium, Lobo A, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Mansfield JC, Deloukas P, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J: Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet* 40(6): 710-712; 2008

Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, Schuldt D, Nikolaus S, Rosenstiel P, Krawczak M, Schreiber S: Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet* 40: 713-715; 2008 Jun

Gordon YJ, Romanowski EG, Shanks RMQ, Yates KA, Pereira HA: CAP37-derived antimicrobial peptides have *in vitro* antiviral activity against adenovirus and herpes simplex virus type 1. *Curr Eye Res* 34: 241-249; 2009

Groves ML: The isolation of a protein from milk. *J Am Chem Soc* 83: 402-410; 1960

Halbwachs-Mecarelli L, Nusbaum P, Noel LH, Reumaux D, Erlinger S, Grunfeld JP, Lesavre P: Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis. *Clin Exp Immunol* 90: 79-84; 1992 Oct

Hampe G, Cuthbert A, Croucher P, Mirza M, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeier A, MacPherson A, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Folsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew C: Association between insertion mutation in gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357(9272): 1925-1928; 2001

Hauschild S, Schmitt WH, Csernok E, Flesch BK, Rautmann A, Gross WL: ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel diseases. *Adv Exp Med Biol* 245-251; 1993

He J, Furmanski P: Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature* 373: 721-724; 1995 Feb 23

Heukeshoven J, Dernick R: Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-32; 1988

Hoffmann JC, Preiß JC, Autschbach F, Buhr HJ, Häuser W: Clinical Practice Guideline on Diagnosis and Treatment of Crohn's Disease;

Results of a German Evidence-based Consensus Conference. *Z Gastroenterol* 46: 1094-1146; 2008

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

Hugot J, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard G, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassul MA, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837): 599-603; 2001

Hugot J, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson G, Lee G, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie I, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G: Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379(6568): 772-773; 1996

Hurst AF: Ulcerative Colitis. *BMJ* 1: 693-694; 1931

Inoue N, Tamura K, Kinouchi J, Fukuda Y, Takahashi F, Ogura Y, Inohara N, Nunez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T: Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with crohn's disease. *Gastroenterology* 123: 86-91; 2002

Jaskowski TD, Litwin CM, Hill HR: Analysis of serum antibodies in patients suspected of having inflammatory bowel disease. *Clin Vaccine Immunol* 13: 655-660; 2006 Jun

Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Grone HJ, Brinkmann V, Jenne DE: Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15: 623-625; 2009 Jun

King AE, Critchley HOD, Kelly RW: Innate immune defences in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 2003

Komorowski, L., Mindorf S, Teegen, B., Torkler, S., Stöcker, W.: Diagnosis of goblet cell antibodies in ulcerative colitis by using the cell line HT29-18 N2 as antigenic substrate; 2004

Kossa K, Coulhart A, Ives CT, Pusey CD, Hodgson HJ: Antigen specificity of circulating antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7: 783-789; 1995

Lashner BA. Inflammatory Bowel Disease. 2010.

- Legrand D, Vigie K, Said EA, Ellass E, Masson M, Slomianny MC, Carpentier M, Briand JP, Mazurier J, Hovanessian AG: Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur J Biochem* 271: 303-317; 2004
- Lönnerdal B, Iyer S: Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Ann Rev Nutr* 15: 93-110; 1995
- Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MA, Robson D, Pennington CR, Parratt D: Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 297: 1105-1106; 1998
- Mantel C, Miyazawa K, Broxmeyer HE: Physical characteristics and polymerization during iron saturation of lactoferrin, a myelopoietic regulatory molecule with suppressor activity. *Adv Exp Med Biol* 357: 121-132; 1994
- Mulder AH, Broekroelofs J, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in inflammatory bowel disease: characterization and clinical correlates. *Clin Exp Immunol* 94: 490-497; 1994
- Mulder AH, Broekroelofs J, Horst G, Limburg PC, Nelis GF, Kallenberg CG: Antineutrophil antibodies in inflammatory bowel disease recognize different antigens. *Adv Exp Med Biol* 336: 519-522; 1993
- Murao S, Stevens FJ, Ito A, Huberman E: Myeloperoxidase: a myeloid cell nuclear antigen with DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1232-1236; 1988 Feb
- Muratori L, Muratori P, Zauli D, Grassi A, Pappas G, Rodrigo L, Cassani F, Lenzi M, Bianchi FB: Antilactoferrin antibodies in autoimmune liver disease. *Clin Exp Immunol* 124: 470-473; 2001
- Nässberger L, Ljung A, Schumacher G, Kollberg B: β -Glucuronidase antibodies in ulcerative colitis. *Lancet* 340: 734-735; 1992
- Nauseef WM: Myeloperoxidase Biosynthesis by a Human Promyelocytic Leukemia Cell Line: Insight Into Myeloperoxidase Deficiency. *Blood* 67: 865-872; 1986
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837): 603-606; 2001
- Ohana M, Okazaki K, Hajiro K, Uchida K: Antilactoferrin Antibodies in Autoimmune Liver Diseases. *Am J Gastroenterol* 93: 1334-1338; 1998
- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen O: Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324 (2): 84-88; 1991
- Oudkerk PM, Ellerbroek PM, Ridwan BU, Goldschmeding R, von Blomberg BM, Pena AS, Dolman KM, Bril H, Dekker W, Nauta JJ: Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly associated with ulcerative colitis. A correlation study between perinuclear antineutrophil

cytoplasmic autoantibodies and clinical parameters, medical, and surgical treatment. *Gut* 34: 46-50; 1993 Jan

Peen E, Almer S, Bodemar G, Ryden BO, Sjolín C, Tejle K, Skogh T: Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis, and Crohn's disease. *Gut* 34: 56-62; 1993 Jan

Pereira HA: CAP37, a neutrophil-derived multifunctional inflammatory mediator. *J Leukoc Biol* 57: 805-812; 1995

Pereira HA, Shafer WM, Pohl J, Martin LE, Spitznagel JK: CAP37, a human neutrophil-derived chemotactic factor with monocyte specific activity. *J Clin Invest* 85: 1468-1476; 1990a

Pereira HA, Spitznagel JK, Pohl J, Wilson DE, Morgan J: CAP37, a 37kD human neutrophil granule cationic protein shares homology with inflammatory proteinases. *Life Sci* 46: 189-196; 1990b

Podolsky D: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347: 147-427; 2002

Price AB: Overlap in the spectrum of nonspecific inflammatory bowel disease 'colitis indeterminate'. *J Clin Pathol* 31: 561-577; 1978

Raj V, Lichtenstein D: Hepatobiliary manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 28(2): 491-513; 1999

Rath H, Herfahrt H, Ikeda J, Grenther WB, Hamm TE, Balish E, Taurog JD, Hammer RE, Wilson KH, Sartor RB: Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human β 2 microglobulin transgenic mice. *J Clin Invest* 98: 945-953; 1996

Reinshagen M, Fölsch U: Extraintestinal manifestations in ulcerative colitis. *Z Gastroenterol* 42: 1033-1037; 2004

Reumaux D, Colombel JF, Masy E, Duclos B, Heresbach D, Belaiche J, Cortot A, Duthilleul P: Anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in ulcerative colitis (UC): No relationship with disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 6: 270-274; 2000

Roozendaal C, Kallenberg CG: Are anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) clinically useful in inflammatory bowel disease (IBD)? *Clin Exp Immunol* 116: 206-213; 1999

Roozendaal C, van Milligen de Wit AW, Haagsma EB, Horst G, Schwarze C, Peter HH, Kleibeuker JH, Tervaert JW, Limburg PC, Kallenberg CG: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in primary sclerosing cholangitis: defined specificities may be associated with distinct clinical features. *Am J Med* 105: 393-399; 1998a

Roozendaal C, Zhao MH, Horst G, Lockwood CM, Kleibeuker JH, Limburg PC, Nelis GF, Kallenberg CG: Catalase and alpha-enolase: two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 112: 10-16; 1998 Aprb

- Rump JA, Scholmerich J, Gross V, Roth M, Helfesrieder R, Rautmann A, Ludemann J, Gross WL, Peter HH: A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Immunobiology* 181: 406-413; 1990 Nov
- Savige JA, Dimech W, Fritzler MJ, Goeken J, Hagen EC, Jennette JC, McEvoy R, Pusey C.D., Pollock W, Trevisin M, Wiik A, Wong R: Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Pathol* 120: 312-318; 2003
- Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S: A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 86: 202-210; 1990 Aug
- Schanbacher FL: Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J Dairy Sci* 76: 3812-3831; 1993
- Schmitt WH, Csernok E, Flesch BK, Hauschild S, Gross WL: Autoantibodies directed against lysozyme: a new target antigen for antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Adv Exp Med Biol* 336: 367-372; 1993
- Schultz H, Csernok E, Herlyn K, Reichel PH, Moosig F, Cornely OA, Fagerhol MK, Gross WL: ANCA against bactericidal/permeability-increasing protein, azurocidin, calprotectin and defensins in rheumatic and infectious diseases: prevalence and clinical associations. *Clin Exp Rheumatol* 21: 117-120; 2003 Nov
- Seibold F, Brandwein S, Simpson S, Terhorst C, Elson CO: pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens. *J Clin Immunol* 18: 153-160; 1998 Mar
- Shafer WM, Martin LE, Spitznagel JK: Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate. *Infect Immun* 45: 29-35; 1984
- Shanahan F: Inflammatory Bowel Disease: Immunodiagnostics, Immunotherapeutics, and Ecotherapeutics. *Gastroenterology* 120(3): 622-635; 2001
- Sobajima J, Ozaki S, Osakada F, Uesugi H, Shirakawa H, Yoshida M, Nakao K: Novel autoantigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 and HMG2. *Clin Exp Immunol* 107: 135-140; 1997 Jan
- Sobajima J, Ozaki S, Uesugi H, Osakada F, Shirakawa H, Yoshida M, Nakao K: Prevalence and characterization of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (P-ANCA) directed against HMG1 and HMG2 in ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Immunol* 111: 402-407; 1998 Feb
- Soehnlein O, Lindbom L: Neutrophil-derived azurocidins alarms the immune system. *J Leukoc Biol* 85: 344-351; 2009

Sorensen M, Sorensen SPL: The proteins in whey. *Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg* 23: 55-99; 1939

Spitznagel JK: Antibiotic proteins of human neutrophils. *J Clin Invest* 86: 1381-1386; 1990

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

Stöcker, W, Glocker, MO, Probst, C, Teegen, B, Friedrich, A, Sokolowski, S, Komorowski, L: Identification of two different proeoglycans from exocrine pancreas as the long sought after autoantigens in Crohn's disease: CUZD1 and GP2; 2008

Stöcker W, Olbrich S, Schlumberger W, Brühmann A, Müller-Kunert E, Scriba PC: Autoantibodies to granulocytes in chronic inflammatory bowel disease are not correlated with antibodies to intestinal goblet cells in ulcerative colitis and to pancreatic juice in Crohn's disease. *Immunobiology* 186: 96; 1992

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

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

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

Stöcker W, Schlumberger W. *Springer Lexikon Klinische Chemie. Medizinische Labordiagnostik von A-Z.* 2007.

Suer W, Dahnrich C, Schlumberger W, Stocker W: Autoantibodies in SLE but not in scleroderma react with protein-stripped nucleosomes. *J Autoimmun* 22: 325-334; 2004 Jun

Sugi K, Saitoh O, Hirata I, Katsu K: Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. *Am J Gastroenterol* 91: 927-934; 1996 May

Suzuki K, Nakao S, Suzuki A, Inamori M, Iida H, Endo H, Akiyama T, Yoneda K, Fujita K, Takahashi H, Yoneda M, Abe J, Kobayashi N, Kubota K, Saito S, Nakajima A: Ulcerative Colitis with Positivity for Proteinase 3-Antineutrophil Cytoplasmic Antibody. *Digestion* 77: 157-158; 2008

Suzuki YA, Lönnerdal B: Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 80: 75-80; 2002

- Tapper H, Karlsson A, Morgelin M, Flodgaard H, Herwald H: Secretion of heparin-binding protein from human neutrophils is determined by its localization in azurophilic granules and secretory vesicles. *Blood* 99: 1785-1793; 2002
- Teegen, B, Müller-Kunert, E, Zerbe, B, Dähnrich, C, Groeury, M, Humbel, RL, Schlumberger, W, Stöcker, W: Prevalence of Antibodies against *Saccharomyces Cerevisiae* in the Diagnosis of Chronic Inflammatory Bowel Disease; 2000
- Terjung, B, Gottwein, J, Muennich, M, Gottwein, J, Sauerbruch, T, Spengler, U: Identifizierung des Zielantigens atypischer p-ANCA bei autoimmunen Lebererkrankungen als Protein der Tubulin-beta Genfamilie; 2005
- Terjung B, Herzog V, Worman HJ, Gestmann I, Bauer C, Sauerbruch T, Spengler U: Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins. *Hepatology* 28: 332-340; 1998 Aug
- Terjung B, Spengler U: Atypical p-ANCA in PSC and AIH: A Hint Toward a "leaky gut"? *Clin Rev Allergy Immunol* 36: 40-51; 2008 Jul 15
- Terjung B, Spengler U, Sauerbruch T, Worman HJ: "Atypical p-ANCA" in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 119: 310-322; 2000 Aug
- Terjung B, Worman H: Antineutrophil antibodies in primary sclerosing cholangitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15: 629-642; 2001
- Thompson N, Driscoll R, Pounder R, Wakefield A: Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: result of a British Twin study. *BMJ* 312: 95-96; 1996
- Timmer A: Epidemiologie der CED. In: Hoffmann JC, Kroesen AJ, Klump B, editors: *Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen*. 8-21, Thieme, Stuttgart, 2004
- Truelove SC, Witts LJ: Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 2: 1041-1048; 1955
- van Berkel PH, Geerts ME, van Veen HA, Mericskay M, de Boer HA, Nuijens JH: N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem J* 328 (Pt 1): 145-151; 1997 Nov 15
- van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 425-429; 1985
- Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, Rotter JI, Vidrich A, Targan SR: Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 110: 1810-1819; 1996

Vermeulen N, Arijis I, Joossens S, Vermeire S, Clerens S, Van den Bergh K, Michiels G, Arckens L, Schuit F, Van Lommel L, Rutgeerts P, Bossuyt X: Anti-alpha-enolase antibodies in patients with inflammatory Bowel disease. *Clin Chem* 54: 534-541; 2008 Mar

Vidrich A, Lee J, James E, Cobb L, Targan S: Segregation of pANCA antigenic recognition by DNase treatment of neutrophils: ulcerative colitis, type 1 autoimmune hepatitis, and primary sclerosing cholangitis. *J Clin Immunol* 15: 293-299; 1995 Nov

von Herbay A: Histopathologische Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. *Pathologie* 20: 276-287; 1999

Walmsley RS, Zhao MH, Hamilton MI, Brownlee A, Chapman P, Pounder RE, Wakefield AJ, Lockwood CM: Antineutrophil cytoplasm autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in inflammatory bowel disease. *Gut* 40: 105-109; 1997 Jan

Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely DT: Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol* 80: 95-102; 2002

Watorek W: Azurocidin - inaktive serine protease homolog acting as a multifunctional inflammatory sensor. *Acta Biochimica Polonia* 50: 743-752; 2003

Wiik A: Neutrophil-specific autoantibodies in chronic inflammatory bowel diseases. *Autoimmun Rev* 1: 67-72; 2002

Wilks S: Morbid appearances in the intestine of Miss Bankes. *Lond Med Gaz* 2: 264-265; 1859

Wittekind C, Rogler G: Histopathologische Diagnostik. *Z Gastroenterol* 42: 994-996; 2004

Xu J, Yang CH, Chen XY, Li XH, Dai M, Xiao SD: A subset of ulcerative colitis with positive proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *World J Gastroenterol* 14: 7012-7015; 2008

Yamauchi K, Tomita M, Giehl TJ, Ellison RT: Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infect Immun* 61: 719-728; 1993

Yang H, Rotter JI, Toyoda H, Tyran D, McElree CK, Targan SR: Ulcerative Colitis: A Genetically Heterogeneous Disorder Defined by Genetic (HLA Class II) and Subclinical (Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies) Markers. *J Clin Invest* 92: 1080-1084; 1993

Yang P, Bohr J, Tysk C, Danielsson D, Järnerot G: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease and collagenous colitis: no association with lactoferrin, β -glucuronidase, myeloperoxidase, or proteinase-3. *Inflamm Bowel Dis* 2: 173-177; 1996

Zhao MH, Jones SJ, Lockwood CM: Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis. *Clin Exp Immunol* 99: 49-56; 1995 Jan

Zhao MH, Lockwood CM: Azurocidin is a novel antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in systemic vasculitis. Clin Exp Immunol 103: 397-402; 1996 Mar

Abkürzungsverzeichnis

°C - Grad Celsius, A. dest - Aqua destillata, AAV - ANCA-assoziierte Vaskulitis, AIH - Autoimmunhepatitis, ANA - Antinukleäre Antikörper, AP - Alkalische Phosphatase, AUC - „Area under the Curve“, BS – Blutspender, CaCl₂ – Calciumchlorid, CED - chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, cm² – Quadrat-zentimeter, CU - Colitis ulcerosa, dsDNA - Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure, DTT - Dithiothreitol, EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure, ELISA - enzyme linked immunosorbent assay, EOH - Ethanol, FITC - Fluoresceinisothiocyanat, FKS - Fetales Kälberserum, g - Gramm, g - Erdbeschleunigung, h - Stunde, HEK - human embryonic kidney, H₂O₂ - Wasserstoffperoxid, HCl - Salzsäure, HCHO - Formaldehyd, HLA - Histokompatibilitätskomplex, IE - Internationale Einheiten, Ig - Immunglobulin, IIF - Indirekte Immunfluoreszenz, IIFT - Indirekter Immunfluoreszenz-Test, kDa - Kilodalton, KHCO₃ - Kaliumhydrogencarbonat, LB-Medium - Luria-Bertani-Medium, M - molar, ma - Milliampere, min - Minuten, ml - Milliliter, mm - Millimeter, mM - millimolar, MALDI-ToF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of flight, MC - Morbus Crohn, MgSO₄ - Magnesiumsulfat, MPO - Myeloperoxidase, n - Anzahl, NaCl - Natriumchlorid, Na₂HPO₄ - Dinatriumhydrogenphosphat, NaH₂PO₄ - Natriumdihydrogenphosphat, NBT/BCIP - Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, ng - Nanogramm, NH₄Cl - Ammonium-chlorid, NH₄HCO₃ - Ammoniumhydrogencarbonat, PBS - phosphate buffered saline, PCR - polymerase chain reaction, pH - pH-Wert, POD - Peroxidase, PR3 - Proteinase 3, PSC - primär-sklerosierende Cholangiitis, ROC - Receiver Operating Characteristic, RR – Relatives Risiko, s - Sekunde, SDS - Natriumdodecylsulfat, ssDNA - Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure, TAE - Tris-Acetat-EDTA, Tris - Trishydroxymethylaminomethan, TBS - Tris buffered saline, TMB - Tetramethylbenzidin, µl - Mikroliter, V - Volt, v/v - volume/volume, w/v - weight/volume

Publikationen

Teegen B, Niemann S, Probst C, Schlumberger W, Stöcker W, Komorowski L. DNA-bound lactoferrin is the major target for Antineutrophil perinuclear cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173: 161-165 (2009).

Wissenschaftliche Präsentation

Teegen B, DNA-bound lactoferrin is the major pANCA target in ulcerative colitis. 6th International Congress on Autoimmunity in Porto, Portugal (2008).

Poster

Teegen B, Niemann S, Stöcker W, Bogdanos DP, Komorowski L. High prevalence of P-ANCA in ulcerative colitis and primary sclerosing Cholangiitis. Results of analyses with Lactoferrin-repleted granulocytes. 4th Congress of ECCO, Hamburg (2009).

Komorowski L, Teegen B, Probst C, Schlumberger W, Stöcker W. ELISA for the detection of DNA-bound Lactoferrin in ulcerative colitis. 9. Dresdner Symposium on Autoantibodies, Dresden (2009).

Teegen B, Stöcker W, Bogdanos DP, Komorowski L. High frequency of autoantibodies against lactoferrin-repleted granulocytes in ulcerative colitis and primary sclerosing cholangiitis. 4th Asian Congress on Autoimmunity, Singapur (2009).

Teegen B, Stöcker W, Bogdanos DP, Komorowski L. High prevalence of P-ANCA in ulcerative colitis and primary sclerosing Cholangiitis. Results of analyses with Lactoferrin-repleted granulocytes. 6. Jahrestagung der DGKL, Leipzig (2009).

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die umfängliche Beratung bei der Konzeption und der Strukturierung der Arbeit danke ich Prof. Dr. med. W. Stöcker. Er hat mir großes Vertrauen entgegengebracht und mich mit seinem anhaltenden Optimismus ermutigt und unterstützt.

Weiterhin danke ich

den Mitarbeitern des Bereichs Gastroenterologie der Medizinischen Klinik I (Universität zu Lübeck) für die kritische Bewertung der Ergebnisse dieser Dissertation,

meiner Kollegin K. Aulinger-Stöcker für die Überlassung der klinisch charakterisierten Seren,

Dr. rer. nat. L. Komorowski (Abteilung Immunbiochemische Forschung, Euroimmun) für die wissenschaftliche Betreuung, seine ideenreichen Anregungen und die permanente Diskussionsbereitschaft sowie Dr. rer. nat. C. Probst (Abteilung Molekularbiologie, Euroimmun) für viele wertvolle und richtungsweisende Ratschläge - ihre Tür stand mir stets offen,

allen Kollegen dieser Abteilungen für eine gute Zusammenarbeit in freundlicher Atmosphäre und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft – namentlich Stephanie Niemann, Beatrice Ziegler, Jacqueline Fleury und Antje Friedrich,

Annekathrin Staub für die Hilfe bei der Textkorrektur und

meiner Familie und meinen Freunden, die mich in allen Phasen dieses großen Projektes unterstützt haben.

Lebenslauf



Persönliche Daten

Name: Bianca Teegen, geb. Splitt
Geburtsdatum: 14.01.1971
Geburtsort: Schwerin
Familienstand: verheiratet , 2 Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1977-1987: POS „Hans-Beimler“ Schlagsdorf
1987-1989: EOS „Dr. Richard Sorge“ Gadebusch

Studium

1989-1994: Studium der Biopharmakologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (Diplomstudiengang)
SS 1991: Vordiplom
10/1993-09/1994: Diplomarbeit zum Thema: „Zu Wirkungsmechanismen ätherischer Öle, untersucht am Beispiel der Wirkung des Melissenöls auf Nervenzellen des Blutegels“, angefertigt am Institut für Pharmazeutische Biologie in Greifswald, in der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrike Lindequist
09/1994: Abschluss mit dem akademischen Grad einer Diplom-Biopharmakologin (Note: 1,6)

Beruflicher Werdegang

Seit 11/1994: wissenschaftliche Mitarbeiterin der EUROIMMUN AG
1994-2003: Leiterin Klin.-Immunologisches Labor Prof. Stöcker
Seit 2003: EUROIMMUN AG/ Institut für Experimentelle Immunologie; Schwerpunkt Identifizierung von Autoantikörpern bei CED

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

Lübeck, den 4. September 2012

Bianca Teegen