

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
mit den Schwerpunkten
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh

**Vorkommen von Progranulin-Autoantikörpern
bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Homburg/Saar
2017

vorgelegt von
Elisabeth Stöger,
geboren am 13.07.1986 in Füssen

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Struktur und Funktion von Progranulin	3
2.2	Autoantikörper gegen PGRN.....	6
2.3	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	8
2.3.1	Epidemiologie	9
2.3.2	Klinisches Erscheinungsbild.....	10
2.3.3	Diagnostik	13
2.3.4	Therapie.....	15
2.4	Pathophysiologie	17
2.4.1	Barrierestörung und verminderte bakterielle Clearance.....	17
2.4.2	Dysregulation der Immunantwort	20
2.4.3	TNF- α als zentraler Entzündungsmediator	23
2.5	Fragestellung	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Laborgeräte.....	25
3.2	Verbrauchsmaterialien	25
3.2.1	Immunologische und proteinchemische Materialien	25
3.2.2	Lösungen und Medien	27
3.3	Methoden	29
3.3.1	Studienteilnehmer	29
3.3.2	Herstellung von rekombinantem PGRN im HEK293-Expressionssystem und anti-PGRN-Fabs	29
3.3.3	Progranulin-Antikörper-ELISA.....	30
3.3.4	Bestimmung der Progranulin-Antikörpertiter	31
3.3.5	Bestimmung der Immunglobulinklassen und Immunglobulinsubklassen.....	31
3.3.6	Progranulin-ELISA	32
3.3.7	Proliferationsassay.....	32
3.3.8	Auswirkung von PGRN und PGRN-Antikörpern auf die FOXP3-Expression CD4+CD25 ^{hi} regulatorischer T-Zellen.....	34
3.3.9	Antikörperstatus und NOD2-Genvarianten.....	36

3.3.10	Statistik	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Charakteristika der untersuchten Patienten	37
4.2	Screening der Patientenseren auf PGRN-Antikörper, Titerbestimmung und Bestimmung der Immunglobulinklassen.....	40
4.3	Auftreten der PGRN-Antikörper im Vergleich mit dem Auftreten von ANCA und ASCA	43
4.4	Progranulin-ELISA.....	45
4.5	Proliferationsassay	46
4.6	Auswirkung von PGRN und PGRN-Antikörpern auf die FOXP3-Expression CD4 ⁺ CD25 ^{hi} regulatorischer T-Zellen.....	50
5	Diskussion.....	52
5.1	PGRN-Antikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	52
5.2	Klinische Bedeutung der PGRN-Antikörper.....	53
5.3	PGRN als endogener TNF- α -Blocker und Wirkung der PGRN-Antikörper.....	55
5.4	Bedeutung der PGRN-Antikörper in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	57
5.5	Perspektiven	61
6	Literaturverzeichnis	62
7	Publikationen	75
8	Curriculum Vitae.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vorkommen von PGRN-Antikörpern bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
Abbildung 2	Titerbestimmung der PGRN-Antikörper bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa
Abbildung 3	Immunglobulinklassen und IgG-Subklassen der PGRN-Antikörper
Abbildung 4	Vorkommen von PGRN-AK und ANCA bei Colitis ulcerosa
Abbildung 5	Relativer PGRN-Plasmaspiegel
Abbildung 6	Einfluss des PGRN-Antikörperstatus von Colitis ulcerosa Seren auf die Zellproliferation von HT-29-Zellen im TNF- α -Assay
Abbildung 7	Einfluss des PGRN-Antikörperstatus von Morbus Crohn Seren auf die Zellproliferation von HT-29-Zellen im TNF- α -Assay
Abbildung 8	Einfluss von rekombinatem PGRN und anti-PGRN-Fabs auf die HT-29-Zellproliferation
Abbildung 9	Anti-inflammatorische Wirkung von kommerziellem und nicht kommerziellen rekombinatem PGRN
Abbildung 10	Bestimmung der FOXP3-Expression von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs im Western Blot

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Montreal-Klassifikation des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa (2005).
Tabelle 2	Montreal-Klassifikation – Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa.
Tabelle 3	ECCO-Konsensuspapier – Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn.
Tabelle 4	Klinische Charakteristika der Morbus Crohn Patienten.
Tabelle 5	Klinische Charakteristika der Colitis ulcerosa Patienten.
Tabelle 6	Antikörperstatus bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
a.dest.	destilliertes Wasser
ANCA	anti-Neutrophilen-zytoplasmatische Antikörper
ASCA	anti-Saccharomyces-cerevisiae Antikörper
Atsttrin	Antagonist of TNF/TNFR signaling via targeting to TNF receptors
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
cANCA	cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster der ANCA, Zielantigen: Proteinase 3
CD1d	Cluster of differentiation 1d
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
cDNA	complementary DNA
CED	Chronische entzündliche Darmerkrankung
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CMV	Cytomegalievirus
CRD	cysteinreiche Domäne
CRP	C-reaktives Protein
DSS	Dextran sodium sulfate (dt.: Dextransulfat)
CXCL	Chemokine (CXC-motif) ligand
DR3	Death receptor 3, syn.: TNFRSF25, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 25
ECL	enhanced chemiluminescence
ECCO	European Crohn's and Colitis Organisation
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fab	Antigen bindendes Fragment eines Antikörpers
Fc	konstanter Bereich eines Antikörpers
FOXP3	Forkhead box P3
FTD	Frontotemporale Demenz
HEK-Zellen	Human embryonic kidney-Zellen
HRP	Horseradish peroxidase (dt.: Meerrettichperoxidase)
hTM5	humanes Tropomyosin Isoform 5
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IPAA	ileale J-Pouch-Anal-Anastomose
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OPD	o-Phenylendiamin
pANCA	perinukleäres Fluoreszenzmuster der ANCA, Zielantigen: Myeloperoxidase
Paratarg-7	Paraprotein target 7
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PGRN	Progranulin
POX	Peroxidase
PR3	Proteinase 3
PRR	Pattern Recognition Receptor
PsA	Psoriasis-Arthritis
PsC	Psoriasis ohne Gelenkbeteiligung
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RZPD	Ressourcenzentrum Primärdatenbank
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEREX	serological identification of antigens by recombinant expression cloning
SerpinB1	syn.: Leukocyte elastase inhibitor
SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	Single-nucleotide polymorphism (dt.: Einzelnukleotid-Polymorphismus)
TACE	TNF-α-converting enzyme
TBS	Tris buffered saline
TDP-43	Transactive response DNA binding protein 43 kDa
TGF-β	Transforming growth factor beta
TL1A	TNF-like ligand 1A, TNFSF15

TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Treg	regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Zusammenfassung

Progranulin ist ein Precursor-Glykoprotein, das vornehmlich von epitheliale Gewebe sowie myeloischen und lymphatischen Zellreihen exprimiert wird. Progranulin bindet mit hoher Affinität an die TNF-Rezeptoren 1 und 2 (TNFR1 und 2) und Death receptor 3 (DR3), einem weiteren Apoptose induzierenden Rezeptor der TNF-Rezeptor-Superfamilie. Progranulin inhibiert TNFR1 und DR3 direkt und wirkt damit als endogener Antagonist der TNF-Rezeptor-Liganden TNF- α und TNF-like ligand 1A (TL1A) (Tang et al. 2011; Liu et al. 2014).

Neutralisierende Autoantikörper gegen Progranulin konnten kürzlich bei allen primären Vaskulitiden, dem systemischen Lupus erythematoses, rheumatoider Arthritis und Psoriasis mit Gelenkbeteiligung nachgewiesen werden (Turner, Preuss, et al. 2013; Turner, Zaks, et al. 2013). Das Auftreten von Progranulin-Antikörpern bei Patienten mit Enteropathie-assoziierten Arthropathien veranlasste uns, Vorkommen und pathogenetische Bedeutung von Progranulin-Antikörpern bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa als eigenen Krankheitsentitäten unabhängig von muskuloskeletalen Manifestationen zu untersuchen. Das Screening der Patientenseren durch einen Enzym-gekoppelten Immunoassay ergab für Progranulin-Antikörper eine Häufigkeit von 16,3 % (23/141) bei Morbus Crohn und 21,1 % (15/71) bei Colitis ulcerosa. Damit kommen Progranulin-Antikörper bei Colitis ulcerosa häufiger vor als ANCA ($p = 0,266$). Die Analyse der Immunglobulinklassen ergab eine Dominanz von IgG, aber auch erstmals und im Unterschied zu anderen Autoimmunerkrankungen das Vorkommen von IgA. Dies spricht für eine Beteiligung von B-Zellen des MALT an der Entstehung der Progranulin-Antikörper bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Die neutralisierende Wirkung der Progranulin-Antikörper wurde durch verminderte Progranulin-Plasmaspiegel bei seropositiven Patienten belegt. In einem Proliferationsassay mit TNF- α sensitiven HT-29-Zellen konnte sowohl der TNF- α antagonisierende Effekt von Progranulin bestätigt wie auch die neutralisierende und damit proinflammatorische Wirkung der Progranulin-Antikörper nachgewiesen werden. Es zeigten sich keine signifikanten Assoziationen zwischen klinischen Merkmalen beider Erkrankungen und dem Progranulin-Antikörperstatus. Progranulin-Antikörper sind somit eher nicht als Biomarker für spezifische klinische Fragestellungen einer Erkrankung geeignet. Sie sind vielmehr Indiz eines Autoimmungeschehens.

Summary

Progranulin is a secreted precursor glycoprotein and expressed particularly in epithelial tissues as well as in cells of myeloid and lymphatic origin. Progranulin binds with high affinity to TNF receptors 1 and 2 (TNFR1 and 2) and death receptor 3 (DR3), directly inhibits TNFR1 and DR3 and acts as a physiologic antagonist of TNF- α and TL1A (Tang et al. 2011; Liu et al. 2014). Recently, autoantibodies against progranulin were identified in all kinds of primary vasculitides, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis (Thurner, Preuss, et al. 2013; Thurner, Zaks, et al. 2013). Inflammatory bowel diseases are often associated with rheumatic diseases, mainly axial arthropathy and peripheral arthritis. Some patients' axial arthropathy or peripheral arthritis was associated with inflammatory bowel disease, what led us to investigate whether antibodies against progranulin also occur in Crohn's disease or ulcerative colitis without any articular extraintestinal manifestation. Sera of patients were screened by an enzyme-linked immunosorbent assay and progranulin-antibodies were detected in 23 of 141 (16,3 %) patients with Crohn's disease and in 15 of 71 (21,1 %) patients with ulcerative colitis. Progranulin antibodies occurred more frequently than ANCA (p = 0,266), the only established antibody associated with ulcerative colitis. Analysis of immunoglobulin classes of progranulin-antibodies revealed predominant IgG, but also for the first time IgA, which had not been observed in any other autoimmune disease and indicates B lymphocytes of the MALT as the origin of progranulin antibodies in patients with inflammatory bowel disease. Progranulin plasma levels were significantly decreased in seropositive patients compared to seronegative patients confirming the neutralizing effect of progranulin antibodies. A proliferation assay with TNF- α sensitive HT-29 cells demonstrated the proinflammatory effect of progranulin antibodies caused by reduced progranulin levels in administered sera of seropositive patients.

Neither in Crohn's disease nor in ulcerative colitis significant associations between the progranulin antibody serostatus and clinical characteristics were observed. Therefore, progranulin antibodies are not useful as a specific diagnostic or disease activity marker, but are an important piece of evidence for an ongoing autoimmune process.

2 Einleitung

2.1 Struktur und Funktion von Progranulin

Progranulin (PGRN, Synonyme: Proepithelin, Acrogranin, GP88, PCDGF) ist das 88 kDa schwere sezernierte Precursor-Glykoprotein bestehend aus einer N-terminalen Signalsequenz (P, Paragranulin) und den Granulinen A, B, C, D, E, F und G (Synonym: Epitheline) mit jeweils Cystein-reichen Motiven (Granulinmotive) in der Anordnung P-G-F-B-A-C-D-E. Die Granulinmotive bestehen jeweils aus einem Peptidrückgrat mit 12 Cysteinen, einem Tandem-Repeat aus einem α -Exon das für die Aminosäuresequenz $CX_{5-6}CX_5CCX_8CCX_4$ kodiert und einem β -Exon das für die Aminosäuresequenz $X_2CCX_5CCX_5CX_{5-6}C$ kodiert.

PGRN wird durch die Serinproteasen Proteinase 3 und die neutrophile Elastase (Kessenbrock et al. 2008) sowie durch die Metalloproteasen ADAMTS-7, MMP-9 und MMP-14 nach einem bestimmten Muster in Teilfragmente gespalten (Bai et al. 2009; Xu et al. 2008). Sowohl Progranulin als auch die einzelnen Granuline sind biologisch aktiv, ihre Funktionen sind teilweise gegensätzlich und noch nicht abschließend geklärt (Shoyab et al. 1990; Zhu et al. 2002). Schutz vor der proteolytischen Degradation bieten die Serinproteaseinhibitoren (Serpine) SLPI und SerpinB1 sowie Apolipoprotein A1 durch Bindung an PGRN (Tang et al. 2011).

GRN, das für PGRN kodierende Gen, ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q21.32) lokalisiert. Daniel et al. untersuchten die Expression von PGRN in verschiedenen Geweben. Dabei wurde gezeigt, dass PGRN vor allem in epithelialen Geweben sowie in myeloischen und lymphatischen Zellreihen exprimiert wird, jedoch weniger in mesenchyalem Gewebe. Im Gehirn zeigen nur Neurone bestimmter Bereiche eine hohe Expression von PGRN wie z.B. Purkinjezellen des Cerebellums und Pyramiden- und Körnerzellen des Hippocampus (Daniel et al. 2000). PGRN wirkt hier neurotroph und neuroprotektiv (van Damme et al. 2008). Loss of function Mutationen im GRN-Gen wurden als eine Ursache für die autosomal dominant vererbte frontotemporale Demenz (FTD) beschrieben. Diese ist histologisch charakterisiert durch unlösliche ubiquitinylierte neuronale Ablagerungen von phosphoryliertem TDP-43, gehört damit zu den TDP-43-Proteinopathien und wird ab einer um ca. 50 % reduzierten Expression von PGRN verursacht (Baker et al. 2006).

Außerhalb des zentralen Nervensystems zeigt sich, dass vor allem stark proliferierende, wenig differenzierte Zellen PGRN exprimieren. So wurde beispielsweise in den Enterozyten des Dünndarms, bzw. den Colonozyten des Dickdarms, eine hohe Expressionsrate durch Nachweis von PGRN mRNA gezeigt (Daniel et al. 2000). Besonders ausgeprägt ist die Expression in den noch undifferenzierten Zellen der Krypten von Dünn- und Dickdarm. Je weiter die Zellen luminal entlang der Zotten wandern, und damit die Differenzierung zu Enterozyten, Becherzellen oder endokrinen Zellen voranschreitet, desto geringer war die PGRN-Expression (Daniel et al. 2000).

PGRN wurde zunächst in mehreren Arbeiten als Wachstumsfaktor in verschiedenen gutartigen Zelllinien und Tumorzelllinien beschrieben (Shoyab et al. 1990; Zhou et al. 1993; He & Bateman 1999; Zanocco-Marani et al. 1999). He et al. untersuchten die schon in früheren Arbeiten angenommene Funktion von PGRN bei der Wundheilung genauer. Die lokale PGRN-Expression in verletzter Haut stieg signifikant an und blieb auch noch Tage nach vollständigem Abheilen der Wunde erhöht. PGRN wirkte bei Hautläsionen initial inflammatorisch und fördert die Einwanderung von Fibroblasten sowie die Angiogenese (He et al. 2003). Für PGRN konnte ferner eine Rolle bei der Embryogenese gezeigt werden (Daniel et al. 2003). Eine vermehrte Expression von PGRN ist zudem assoziiert mit einer gesteigerten Proliferation verschiedener solider Tumoren (Toh et al. 2011).

Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die Rolle, die PGRN im Immunsystem spielt. So wurde in der Arbeit von Daniel et al. eine hohe Expression in Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe von Darm und Lunge nachgewiesen, die unabhängig von der Proliferation der Immunzellen ist. Zhu et al. und später Kessenbrock et al. beschrieben die anti-inflammatorische Wirkung von PGRN durch Hemmung des TNF- α -abhängigen oxidativen Burst mit Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies neutrophiler Granulozyten (Zhu et al. 2002; Kessenbrock et al. 2011). Wurden bisher zahlreiche Funktionen von PGRN nachgewiesen, so fehlte die Klärung der Mechanismen, über die PGRN seine anti-inflammatorische Wirkung vermittelt. Tang et al. konnten erstmals mithilfe eines yeast-two-hybrid Screenings die hochaffine Bindung von PGRN an TNFR1 und TNFR2 nachweisen und mit Ko-Immunopräzipitation bestätigen. PGRN konkurriert mit TNF- α um die Bindung an TNFR1 und TNFR2 und inhibiert direkt TNFR1. Hingegen scheint PGRN TNFR2 zu aktivieren, welcher über noch nicht vollständig geklärte Signalwege eher

anti-inflammatorisch wirkt (Li et al. 2014). Es wurde gezeigt, dass rekombinantes humanes PGRN dosisabhängig an TNFR1 und TNFR2 bindet und auch die Bindung von TNF- α an beiden Rezeptoren inhibiert; damit kam PGRN als endogener Antagonist von TNF- α in Betracht. Bei der Untersuchung der Bindungsdomäne von PGRN entwickelte die Arbeitsgruppe um Tang Atsttrin (antagonist of TNF/TNFR signaling via targeting to TNF receptors), ein Trimer aus jeweils der Hälfte der Granulinmotive F, A und C und Verbindungsdomänen. Die Rolle von PGRN als endogenem Antagonisten von TNF- α wurde in vivo in einer Reihe von Mausmodellen bestätigt (Zhu et al. 2002; Guo et al. 2012; Zhao et al. 2013; Egashira et al. 2013; Kawase et al. 2013).

Tang et al. untersuchten die Wirkung von PGRN und Atsttrin bei der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), die der humanen rheumatoiden Arthritis (RA) immunologisch und klinisch sehr ähnlich ist und daher ein geeignetes Modell für die RA darstellt. Die Gruppe der PGRN-defizienten Mäuse zeigte eine höhere Inzidenz der CIA, kürzere Latenz bis zum Krankheitsbeginn und klinisch signifikant vermehrte Entzündungszeichen als die Kontrollgruppe. Röntgenologisch und histologisch fielen vermehrte Gelenkdestruktionen durch floride Synovialitis und Pannusbildung auf. Nach Zugabe von rekombinantem humanem PGRN an die PGRN-defizienten Mäuse wurde eine vollständige Remission induziert, Gelenkdestruktionen verhindert, und die klinischen Anzeichen der Arthritis gingen vollständig zurück. Atsttrin konnte wie PGRN und Etanercept das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten und verhinderte am effektivsten den Ausbruch der Krankheit (Tang et al. 2011).

Tang et al. wiesen nach, dass rekombinantes humanes PGRN und Atsttrin den NF- κ B- und MAPK-Signalweg hemmen. Diese Ergebnisse veranlassten Liu et al. weitere TNF-Rezeptoren auf eine mögliche Bindung mit PGRN und Atsttrin zu untersuchen. Sie untersuchten alle TNF-Rezeptoren mit extrazellulären cysteinreichen Domänen (CRD) und zeigten, dass PGRN und Atsttrin direkt an DR3 (syn.: TNFRSF25) binden und damit die proinflammatorische Wirkung von TL1A inhibieren (Liu et al. 2014). Die Bindung von TL1A an DR3 und die nachgewiesene Inhibierung durch PGRN/Atsttrin sind für diese Arbeit vor allem interessant, da Mutationen in TL1A mit erhöhter T-Zell-Aktivität und vermehrter Expression proinflammatorischer Zytokine in intestinaler Mukosa sowie mit Entzündungen des Dünndarms assoziiert sind (Meylan et al. 2011). PGRN ist ferner ein Cofaktor von

TLR9 zum einen bei der Erkennung von fremder CpG DNA und zum anderen bei deren Eliminierung durch Makrophagen (Park et al. 2011).

2.2 Autoantikörper gegen PGRN

Autoimmunerkrankungen sind gekennzeichnet durch die Aufhebung der Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Strukturen. Die genauen Mechanismen, die den Verlust der Selbsttoleranz bedingen, sind nicht abschließend geklärt und Gegenstand zahlreicher andauernder Forschung.

Um möglichst früh autoreaktive Lymphozyten zu eliminieren, durchlaufen T-Zellen zu Beginn ihrer Reifung die positive und negative Selektion im Thymus. Die Eliminierung autoreaktiver B-Zellen ist keinem bestimmten Organ zugeordnet, da durch die zufällige Rekombination verschiedener V(D)J-Gensegmente im Knochenmark und der somatischen Hypermutation in späteren Entwicklungsstadien in den peripheren lymphatischen Organen ständig autoreaktive B-Zellen entstehen. Wardemann et al. fanden heraus, dass ein Großteil humaner prä-B-Zellen autoreaktiv ist (Wardemann et al. 2003). Die Reifung zur immunkompetenten B-Zelle geht unter anderem mit einem Verlust dieser autoreaktiven B-Zell-Rezeptoren vornehmlich durch drei Mechanismen einher: *Rezeptor-Editing*, *klonale Deletion* und *Anergie*.

Beim *Rezeptor-Editing* kommt es in unreifen autoreaktiven B-Zellen zum Rearrangement der Gene, die für die leichten Ketten kodieren. Das trägt zur Veränderung des B-Zell-Rezeptors bei und damit auch zur Chance auf verringerte Autoreaktivität (Gay et al. 1993; Tiegs et al. 1993).

Dieser Mechanismus findet wahrscheinlich vorrangig im Knochenmark statt und stellt einen ersten wichtigen Kontrollpunkt in der Reifung der B-Zelle dar (Wardemann et al. 2003; Dörner & Lipsky 2005). Zeigt der veränderte B-Zell-Rezeptor weiterhin Affinität zu Autoantigenen, kann die B-Zelle noch früh in der Reifung in Apoptose gehen (*klonale Deletion*, Nemazee & Burki 1989).

Anergie beschreibt die fehlende Stimulierbarkeit einer autoreaktiven B-Zelle durch das Ziel-Autoantigen. Dieser Mechanismus ist einerseits potentiell reversibel, andererseits führt er zu einer erhöhten Apoptoserate der B-Zelle (Goodnow et al. 1988). In welchem Ausmaß klonale Deletion und Anergie zur Beseitigung autoreaktiver B-Zellen beitragen, ist noch unklar. Anergische B-Zellen können jedoch durch Ko-Stimuli neben dem Autoantigen, beispielsweise im Rahmen einer Infektion, reaktiviert werden und

bergen so ein schwer einzuschätzendes Potential für Autoimmunerkrankungen (Merrell et al. 2006; Gauld et al. 2005).

Welche Autoantigene die B-Zelle erkennt, hängt zum einen mit dem Stimulus zusammen, z.B. durch molekulares Mimikry oder einem Antigen, das der B-Zelle durch Segregation normalerweise nicht zugänglich ist. Dazu kann es vorübergehend bei massivem Zellzerfall oder fehlerhafter Apoptose kommen; bis zur Beseitigung und Wiederherstellung der Integrität des Gewebes treten dann Autoimmunphänomene auf. Zum anderen können körpereigene Proteine durch somatische Mutationen oder durch ungewöhnliche posttranslationale Modifizierungen in veränderter Form exprimiert werden. Hierdurch werden sie vom Immunsystem häufig als fremd erkannt und werden dann als Neoantigen bezeichnet. Bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen besteht aber auch Reaktivität gegen Antigene, die die B-Zelle physiologischerweise permanent umgeben, und damit die Grundlage für ein chronisch entzündliches Geschehen liefern. Die Kenntnis von Autoantigenen ist ein wichtiger Schritt, um die Pathomechanismen von Autoimmunerkrankungen zu verstehen und daraus neue Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

So sind beispielsweise anti-Neutrophilen-zytoplasmatische Antikörper (ANCA) charakteristisch für die Subgruppe der ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitiden und definieren Krankheitsentitäten, die ähnliche Symptomatik hervorrufen und nahezu identisch behandelt werden.

Mit dem Ziel, neue Autoantigene bzw. Autoantikörper bei Vaskulitiden zu finden, wurden in Vorarbeiten Seren von Patienten mit Vaskulitiden mittels Macroproteinarrays gescreent (Turner, Preuss, et al. 2013). Verwendet wurden Proteinarrays der humanen cDNA Expressionsbanken Unipex1, Unipex2 und hEX1, welche ursprünglich vom deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) hergestellt wurden. Die in *E. coli* TG1 rekombinant exprimierten Proteine der cDNA-Bibliotheken sind auf den Arrays nach einem festgelegten Muster angeordnet. Diese werden dann mit verdünnten und mit *E. coli* präadsorbierten Patientenseren inkubiert und anschließend durch ein ECL-System (enhanced chemiluminescence) ausgewertet. Das Prinzip der Chemolumineszenz beruht auf der Bindung eines mit Meerrettichperoxidase (horseradish, HRP) konjugierten Sekundärantikörpers an Autoantikörper der Patientenseren und die folgende Reaktion mit Wasserstoffperoxid und Luminol. Die durch die Peroxidase katalysierte Reduktion von Wasserstoffperoxid bewirkt den Übergang von Luminol in das angeregte Dianion. Beim Übergang dieses

instabilen Intermediats in den Grundzustand wird Licht emittiert, welches mit einem Film gemessen wird. Aufgrund der hohen Sensitivität können auf diese Weise schon geringe Mengen an Autoantikörpern in den untersuchten Patientenseren nachgewiesen werden (Thorpe & Kricka 1986). Untersucht wurden Seren von Patienten mit ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitiden, Vaskulitiden der mittleren und großen Gefäße, außerdem Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) und rheumatoider Arthritis.

Insgesamt wurden sechs Autoantigene identifiziert, wobei davon allein PGRN-Antikörper in allen Vaskulitisentitäten, bei SLE und RA mit großer Häufigkeit nachgewiesen werden konnten. Die neu identifizierten PGRN-Autoantikörper waren ausschließlich Antikörper vom Typ IgG (IgG1 und IgG2) deren Paratop sich gegen die Aminosäuren 12-112 des N-Terminus von PGRN richteten, was die Signalsequenz, eine Verbindungsdomäne und nahezu vollständig das erste Granulinmotiv G umfasst. Eine neutralisierende Wirkung der PGRN-Antikörper bei den untersuchten Vaskulitiden, SLE und RA wurde durch signifikant verminderte PGRN-Plasmaspiegel aller PGRN-Antikörper positiven Patienten nachgewiesen.

In einer folgenden Arbeit wurde das Vorkommen von PGRN-Antikörpern bei der Psoriasis-Arthritis (PsA) untersucht, einem Krankheitsbild der seronegativen Spondylarthritiden (Thurner et al. 2013). PGRN-Antikörper traten bei Patienten mit PsA, nicht jedoch bei kutaner PsC (Psoriasis ohne Gelenkmanifestation) auf. Die PGRN-Plasmaspiegel waren auch hier bei PGRN-Antikörper positiven Patienten signifikant vermindert. PGRN-Antikörper sind somit keiner spezifischen Autoimmunerkrankung zuzuordnen, sondern stellen sich bisher als allgemeiner proinflammatorischer Autoantikörper dar.

2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Der Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) umfasst eine Gruppe nicht-infektiöser entzündlicher Erkrankungen des Verdauungstraktes unterschiedlicher Charakteristika.

Unterschieden werden die makroskopischen Kolitiden mit den Hauptformen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, von den mikroskopischen Kolitiden. Diese lassen sich in die kollagene und die lymphozytäre Kolitis unterteilen. Die wesentlichen

Unterschiede der beiden Hauptgruppen liegen im klinischen und morphologischen Erscheinungsbild.

Während Durchfälle bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Blutbeimengungen enthalten können und die Diagnose endoskopisch in der Regel durch charakteristische Schleimhautveränderungen gestellt werden kann, findet man bei den mikroskopischen Kolitiden charakteristischerweise wässrige, nicht-blutige Durchfälle. Die Darmschleimhaut ist endoskopisch unauffällig, weist hingegen histologisch charakteristische Läsionen auf.

Die schon beschriebenen Enteropathie-assoziierten Arthritiden sind nur bei den makroskopischen Formen bekannt, damit sind ausschließlich Colitis ulcerosa und Morbus Crohn Gegenstand der folgenden Untersuchungen.

2.3.1 Epidemiologie

Die Epidemiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist komplex und geprägt von geographischen Unterschieden mit erheblichen Schwankungen.

So bestehen bei Inzidenz und Prävalenz ein Nord-Süd-, ein Ost-West- und ein urban-rural-Gefälle, wobei Europa, dicht gefolgt von Nordamerika, die höchste Inzidenzrate mit bis zu 24,3 pro 100.000 für Colitis ulcerosa und bis zu 12,7 für Morbus Crohn und die höchste Prävalenzrate von bis zu 505 pro 100.000 für Colitis ulcerosa und 322 für Morbus Crohn aufweist (Molodecky et al. 2012). Im Vergleich dazu weisen Teile Asiens, des mittleren Ostens und Südafrika ein deutlich geringeres Krankheitsaufkommen auf. Insgesamt steigen die Inzidenz- und Prävalenzzahlen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen mit dem Industrialisierungsgrad eines Landes, was auf relevante Umwelteinflüsse verweist.

Deutschland weist für Colitis ulcerosa eine Inzidenz von 3,10–4,97 und eine Prävalenz von 44,4–100,9 auf. Morbus Crohn ist mit einer Inzidenz von 3,77–6,38 und einer Prävalenz von 48,1–135,6 die häufigere Erkrankung verglichen mit Colitis ulcerosa. Weltweit nimmt die Inzidenz seit rund 30 Jahren stetig zu (Molodecky et al. 2012). Zu bedenken ist dabei jedoch die verbesserte Zugänglichkeit und Zunahme diagnostischer Möglichkeiten der letzten Jahrzehnte, was eine Verzerrung der Daten in unbekanntem Ausmaß bedeutet.

Inwiefern weitere Größen wie Entwicklung eines Landes, Umweltfaktoren, Lebensumstände, Zugehörigkeit zu bestimmten Bevölkerungsgruppen zum Ausbruch einer CED beitragen, ist in steter epidemiologischer Untersuchung.

Der Altersgipfel für die Erstdiagnose chronisch entzündlicher Darmerkrankungen liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, speziell die Colitis ulcerosa zeigt einen zweiten kleineren Gipfel ab der 5. Dekade. Die Geschlechterverteilung ist ausgewogen (Molodecky et al. 2012; Ordás et al. 2012).

2.3.2 Klinisches Erscheinungsbild

Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine kontinuierliche Entzündung und Ulzeration der oberflächlichen Schleimhautschichten (Mukosa bis oberflächliche Anteile der Submukosa) des Kolons. Die Ausbreitung beginnt immer im supraanalen Rektum und kann sich kontinuierlich unterschiedlich weit nach oral bis zur Ileozökalklappe („Pancolitis ulcerosa“) erstrecken. Eine kurzstreckige Mitbeteiligung des terminalen Ileum kann vorkommen (sogenannte „backwash ileitis“), ist aber insgesamt selten und kann die Abgrenzung zum Morbus Crohn erschweren. Leitsymptom sind blutige Durchfälle mit Schleim Beimengungen, außerdem bestehen Abdominalschmerzen und Tenesmen vor der Defäkation, Fieber kann bei ausgeprägten Befunden auftreten. Eine wichtige Komplikation der Colitis ulcerosa ist das erhöhte Risiko kolorektaler Karzinome welches mit dem Ausmaß der Kolonbeteiligung und der Dauer der Erkrankung korreliert.

Der Morbus Crohn ist gekennzeichnet durch eine diskontinuierlich segmental auftretende transmurale Entzündung des gesamten Gastrointestinaltraktes. In der Mehrzahl liegen jedoch ein Befall des Kolon (Colitis Crohn), des Ileum (Ileitis Crohn) oder Mischformen (Ileocolitis Crohn) vor. Pathognomonisch sind das Auftreten von Fisteln zu benachbarten Strukturen und insbesondere perianale Abszesse wie auch Strikturen entlang des Darmtraktes. Abdominalschmerzen, Gewichtsabnahme und meist nicht-blutige Durchfälle sind Leitsymptome, begleitet von Flatulenz und möglicher geringgradiger Temperaturerhöhung. Die Schmerzen sind je nach Befallsmuster überwiegend im rechten Unterbauch lokalisiert und von kolikartiger Qualität. Durch die ödematös und fibrotisch verdickte Darmwand können bei der klinischen Untersuchung druckschmerzhaft Resistenzen tastbar sein. Die Ausprägung und das Befallsmuster beider Erkrankungen kann durch die Montreal-Klassifikation von 2005 (siehe Tabelle 1) beurteilt und operationalisiert werden und ist bedeutsam für Prognose und Therapieentscheidungen.

Dabei ist bei Morbus Crohn wichtig, welche Strukturen des Gastrointestinaltraktes in welcher Ausprägung betroffen sind; bei der Colitis ulcerosa ist besonders die Ausbreitung der Entzündung nach oral von Interesse (Silverberg et al. 2005).

Tabelle 1. Montreal-Klassifikation des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa (2005).

Morbus Crohn		Colitis ulcerosa	
A1	<16 Jahre bei Diagnose	E1	Proktitis
A2	17-40 Jahre	E2	Linksseitenkolitis
A3	>40 Jahre	E3	Pankolitis
L1	terminales Ileum		
L2	Kolon		
L3	Ileokolon		
L4	oberer GI-Trakt		
L4+	unterer GI-Trakt und distale Erkrankung		
B1	nicht strikturierend, nicht penetrierend		
B2	strikturierend		
B3	intern penetrierend		
B3p	perianal penetrierend		

Die Einschätzung der Krankheitsaktivität ist initial bedeutsam für die Wahl des Therapieregimes und im Verlauf ein wichtiges Instrument zur Überwachung des Therapieerfolges.

Zur Bewertung der Aktivität einer Colitis ulcerosa gibt es eine Vielzahl an Einteilungen wie etwa die modifizierten Truelove und Witts-Kriterien (Truelove & Witts 1955), die sich für den klinischen Alltag eignen, den Mayo-Score (Schroeder et al. 1987), der in klinischen Studien Anwendung findet oder die Einteilung, die im Rahmen der Montreal-Klassifikation erarbeitet wurde (Silverberg et al. 2005) und die der Datenerhebung dieser Arbeit zugrunde liegt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2. Montreal-Klassifikation – Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa.

	S0 Remission	S1 mild	S2 moderat	S3 schwer
Stuhlgänge pro Tag	asymptomatisch	≤ 4	> 4	≥ 6 <i>und</i>
Blut im Stuhl	nein	möglich	vorhanden	vorhanden
Puls	- *	- *	keine oder minimale Zeichen systemischer Beteiligung	> 90/min <i>oder</i>
Körpertemperatur				> 37,5 °C <i>oder</i>
Hämoglobin				< 10,5 g/dl <i>oder</i>
BSG				> 30 mm/h

Abkürzungen: BSG - Blutsenkungsgeschwindigkeit, * keine Zeichen einer systemischen Beteiligung

Für die Beurteilung der Krankheitsaktivität des Morbus Crohn stehen der Crohn's Disease Activity Index (CDAI) (Best et al. 1976) und der vereinfachte Harvey-Bradshaw-Index zur Verfügung (Harvey & Bradshaw 1980). Der CDAI ist ein ausführlicher Aktivitätsindex, der vor allem Anwendung in prospektiven Studien findet, und weniger für den klinischen Alltag geeignet ist. Da diese Arbeit retrospektive Daten verwendet, wurde die vereinfachte Einteilung des Konsensuspapiers der European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) von 2010 angewandt, um die Patienten nach den in Tabelle 3 aufgeführten Merkmalen zu charakterisieren (van Assche et al. 2010).

Tabelle 3. ECCO-Konsensuspapier – Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn.

mild	moderat	schwer
Äquivalent CDAI 150-220	Äquivalent CDAI 220-450	Äquivalent CDAI > 450
z.B. ambulante Behandlung, essen und trinken möglich, < 10 % Gewichtsverlust, keine Zeichen von Obstruktion, Fieber, Exsikkose, abdominaler Resistenzen oder Druckdolenz. CRP kann hoch normal oder leicht erhöht sein.	z.B. wiederholtes Erbrechen oder > 10 % Gewichtsverlust. Behandlung der milden Erkrankung ineffektiv oder abdominale Resistenzen, keine offenkundige Obstruktion. CRP erhöht.	z.B. Kachexie (BMI < 18 kgm ⁻²) oder Nachweis von Obstruktionen oder Abszessen, fortdauernde Symptome trotz intensiver Therapie. CRP deutlich erhöht.

Oft ist die Symptomatik von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nicht auf den Verdauungstrakt begrenzt, extraintestinale Manifestationen können unabhängig vom Schweregrad und Verlauf der Erkrankung auftreten. Dermatologische Manifestationen wie Aphthen oder Pyoderma gangraenosum, okuläre Manifestationen wie Uveitis, muskuloskeletale Manifestationen wie periphere Arthritis und axiale

Spondylarthropathien kommen gehäuft insbesondere bei Morbus Crohn vor. Hingegen sind Manifestationen des hepatobiliären Systems wie die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) meist mit einer Colitis ulcerosa assoziiert (Uko et al. 2012). Davon abzugrenzen sind eine Vielzahl assoziierter Autoimmunerkrankungen, die gehäuft zusammen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auftreten, dazu gehören beispielsweise Asthma bronchiale, Psoriasis oder Multiple Sklerose (Baumgart 2009).

Akute Schübe oder ausgeprägte Verläufe beider Formen mit anhaltenden Durchfällen und fehlendem Appetit gehen mit Mangelerscheinungen und Gewichtsverlust bis hin zur Kachexie einher. Enteraler Blutverlust, Mangel an Vitamin B₁₂ und Folsäure, wie auch die chronische Entzündung selbst, sind mögliche Ursachen einer Anämie im Rahmen der CED.

2.3.3 Diagnostik

Erst durch die Zusammenschau klinischer, mikrobiologischer sowie bildgebender und histologischer Untersuchungsbefunde kann die Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zuverlässig gestellt werden und die Differenzierung zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn erfolgen. Da dies oftmals schwierig ist, liegt bei der Suche nach neuen Markern und Methoden besonderes Augenmerk auf der Eignung, beide Entitäten sicher zu unterscheiden.

Neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung mit speziellem Augenmerk auf extraintestinale Manifestationen müssen infektiöse, toxische, vaskuläre und maligne Ätiologien der Magen-Darm-Symptomatik ausgeschlossen werden.

Die Ileokoloskopie mit Stufenbiopsien ist die Standarduntersuchung, um die Diagnose stellen zu können; für beide Erkrankungen existieren außerdem endoskopische Indices zur Beurteilung der Krankheitsaktivität (Dignass, Eliakim, et al. 2012; van Assche et al. 2010).

Bei Verdacht auf Morbus Crohn muss darüber hinaus der gesamte Verdauungstrakt nach Läsionen abgesucht werden. Der derzeitige Standard zur Untersuchung des Dünndarms ist die Magnetresonanztomographie unter gleichzeitiger Verwendung von intravenöser und oraler Kontrastmittelapplikation, der sog. MR-Sellink. Die MRT ist das sensitivste Verfahren zum Screening bei Verdacht auf schwere Verläufe und extraluminale Komplikationen wie Fisteln, Abszesse und Strikturen, sie wird jedoch nicht als primäres Diagnostikum empfohlen (van Assche et al. 2010). Die

radiologischen Befunde können ein Bestandteil der Einschätzung der Krankheitsaktivität sein.

Für chronisch entzündliche Darmerkrankungen gibt es neben den etablierten Entzündungsparametern wie CRP und BSG verschiedene Biomarker, die zum einen zur Differentialdiagnose und zum anderen zur Einschätzung der Krankheitsaktivität herangezogen werden können.

Anti-Neutrophilen-zytoplasmatische Antikörper wurden auch bei CED nachgewiesen (Saxon et al. 1990) und zusammen mit anti-Saccharomyces-cerevisiae Antikörpern (ASCA) sind sie Anhaltspunkte für die Differentialdiagnosen Colitis ulcerosa, mit gehäuftem Vorkommen von ANCA, und Morbus Crohn mit charakteristischen ASCA. Fehlende standardisierte Nachweisverfahren der Antikörper führen allerdings zu großer Variabilität in den Angaben zum Vorkommen. Prideaux et al. zeigen dies in einer systematischen Übersichtsarbeit mit einer Prävalenz von 29–69 % der ASCA beim Morbus Crohn und 0-29 % bei der Colitis ulcerosa. pANCA kommen mit einer Häufigkeit von 6–38 % beim Morbus Crohn und 41–73 % bei der Colitis ulcerosa vor (Prideaux et al. 2012).

Beide Antikörper haben damit eine zu geringe Sensitivität, um als Screening zu dienen, daher spricht die ECCO in ihrem Konsensuspapier keine Empfehlung für die Erhebung des Antikörperstatus als Routinediagnostik aus. Der Nachweis von Antikörpern zur Diagnosestellung kann in der klinischen Praxis aber als Zusatzdiagnostik bei erschwert zu klassifizierenden Koliden („Colitis indeterminata“) erfolgen (Dignass, Eliakim, et al. 2012; van Assche et al. 2010).

Der momentan sensitivste Parameter zur Aktivitätsbeurteilung einer intestinalen Entzündung ist der Nachweis von Calprotectin (S100A8/S100A9-Heterotetramer) im Stuhl. Calprotectin-Konzentrationen korrelieren mit der endoskopisch erhobenen Entzündungsaktivität und lassen so Rückschlüsse auf den Abheilungsgrad der Mukosa und damit das Ansprechen auf die Therapie zu. Eine Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist allerdings nicht möglich (Smith & Gaya 2012).

Weitere fäkale Marker wie Lactoferrin, Neopterin, S100A12 u.a. zeigen in Studien vielversprechende Ergebnisse als Aktivitätsmarker und Instrument zur Einschätzung des Therapieerfolgs. Allerdings sind diese Marker ebenso wie weitere serologische Marker gegen Bakterienantigene derzeit Gegenstand der Forschung und nicht zur

Anwendung im klinischen Alltag empfohlen, oder sie konnten sich bisher noch nicht etablieren (Prideaux et al. 2012).

Ebenfalls als Zusatzdiagnostik kann die genetische Untersuchung auf prädisponierende Varianten im NOD2-Gen bei Morbus Crohn erfolgen. Es handelt sich dabei um die drei Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) c.3020insC ($p < 0,001$; OR 4,09 [95 % KI 3,23-5,18]), p.G908R ($p = 0,001$; OR 2,99 [95 % KI 2,38-3,74]) und p.R702W ($p < 0,001$; OR 2,20 [95 % KI 1,84-2,62]) im NOD2-Gen, deren Auftreten mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit an Morbus Crohn zu erkranken einhergeht (Ogura et al. 2001; Hugot et al. 2001; Cuthbert et al. 2002; Economou et al. 2004).

In genomweiten Assoziationsstudien konnten zudem zahlreiche weitere Suszeptibilitätsgene für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachgewiesen werden (Barrett et al. 2009).

Den Empfehlungen der ECCO zufolge ist von einer Genotypisierung im klinischen Alltag abzusehen (Dignass, Eliakim, et al. 2012; van Assche et al. 2010).

2.3.4 Therapie

Das mittelfristige Therapieziel beider Erkrankungen ist die steroidfreie Remissionserhaltung, um Krankheits- und Therapiekomplicationen zu vermeiden. Es stehen mit Glukokortikoiden, Antiphlogistika und Immunsuppressiva drei Wirkstoffklassen zur Verfügung, die nach Stufenschemata eingesetzt werden. Die Stufenschemata richten sich nach Schwere und Krankheitsverlauf und werden unterschieden in Induktions- und Erhaltungstherapie. Zur Induktion einer Remission kommen systemische oder topische Glukokortikoide oder 5-Aminosalicylate (5-ASA) bei der Colitis ulcerosa in Betracht. Immunsuppressiva schließen sich oft der akuten Behandlung zur Remissionserhaltung an, die möglichst frei von Glukokortikoiden sein sollte, um bekannte Langzeitschäden zu vermeiden (Baumgart 2009).

In der Behandlung des Morbus Crohn muss zwischen der Lokalisation und der Schwere eines akuten Schubs unterschieden werden. Leichte bis mittelschwere Ausprägungen mit ileozökaler Begrenzung können als Induktionstherapie mit topischen Glukokortikoiden wie Budesonid behandelt werden, ausgedehntere Entzündungen mit oral oder intravenös applizierten systemischen Glukokortikoiden.

Aus der 5-ASA-Gruppe konnte eine Wirksamkeit von Mesalazin nicht eindeutig nachgewiesen werden, die Anwendung von Sulfasalazin kann in der Induktionstherapie des leichten bis mittelschweren ileozökalen Befalls erwogen

werden. Bei einer Ileocolitis Crohn erfolgt die Induktionstherapie mit systemischen Glukokortikoiden. Parallel dazu sollte die Erhaltungstherapie mit Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder Methotrexat aufgrund der Wirklatenz erwogen werden.

Für Mycophenolatmofetil, Tacrolimus und Ciclosporin liegt keine gesicherte Wirkung in der Erhaltungstherapie vor. Allein Ciclosporin kann zur Remissionsinduktion eingesetzt werden, für Mycophenolatmofetil und Tacrolimus ist die Studienlage nicht ausreichend, um eine Empfehlung aussprechen zu können (Dignass et al. 2010).

Bei Versagen dieser immunsuppressiven Therapie kann der Einsatz von TNF- α -Blockern in Erwägung gezogen werden, wobei die Tendenz dahin geht, die sehr wirksamen TNF- α -Blocker insbesondere bei Morbus Crohn mit negativen klinischen Prädiktoren wie Fisteln oder Strikturen frühzeitig einzusetzen, um Spätkomplikationen zu vermeiden (Baumgart 2009; Dignass et al. 2010). Zur TNF- α -Blockade eignen sich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die monoklonalen Antikörper Infliximab und Adalimumab sowie das pegylierte Fab-Fragment Certolizumabpegol, letzteres ist jedoch in der Europäischen Union nicht zugelassen (Dignass et al. 2010). Etanercept, ein Fusionsprotein aus dem löslichen TNFR2 und dem Fc-Teil von IgG1, ist aufgrund mangelnder Wirkung nicht als Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen indiziert (Sandborn et al. 2001).

Die Therapie der Colitis ulcerosa weist einige grundsätzliche Unterschiede zu der des Morbus Crohn auf. Patienten mit leichter bis mittelschwerer Proktitis oder Linksseitenkolitis erhalten als Standardpräparat zur Remissionsinduktion Aminosalicylate topisch oder bei unzureichender Wirkung systemisch und dann auch in möglicher Kombination mit Glukokortikoiden, die Erhaltungstherapie kann ebenfalls mit 5-Aminosalicylaten geführt werden.

Schwere Verläufe einer Linksseitenkolitis oder Pankolitis müssen stationär mit systemischen Medikamenten behandelt werden. Zur Remissionsinduktion kann hier neben systemischen Glukokortikoiden beispielsweise Infliximab eingesetzt werden. Patienten mit schwerer Colitis ulcerosa, die eine intravenöse Monotherapie mit Glukokortikoiden nicht vertragen, können alternativ Calcineurininhibitoren wie Ciclosporin oder Tacrolimus oder Infliximab erhalten.

Patienten mit steroidrefraktärem oder -abhängigem Verlauf sollen zur Erhaltungstherapie auf Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder Infliximab eingestellt werden (Baumgart 2009; Dignass, Eliakim, et al. 2012).

Die Pharmakotherapie muss bei schweren Krankheitsverläufen gegebenenfalls um chirurgische Maßnahmen erweitert werden. Dazu gehören Notoperationen bei lebensbedrohlichen Komplikationen wie Perforation, refraktären Darmblutungen oder toxischem Megakolon. Indikationen zur elektiven chirurgischen Intervention sind bei Morbus Crohn zurückhaltend zu stellen, da der gesamte Gastrointestinaltrakt diskontinuierlich befallen sein kann und chirurgisch keine Heilung erzielt wird. Bei obstruierenden Strikturen und komplexen internen Fisteln soll möglichst darmerhaltend und im entzündungsfreien Intervall operiert werden, um Komplikationen wie Kurzdarmsyndrom, Anastomoseninsuffizienzen und Infektionen zu vermeiden (Dignass et al. 2010).

Anders verhält es sich bei der Colitis ulcerosa, die durch die Proktokolektomie chirurgisch geheilt werden kann; da hierbei eine vollständige Proktokolektomie erfolgen muss ist jedoch von einer Defektheilung zu sprechen. Das am häufigsten angewandte Verfahren ist eine ein- oder mehrzeitige ilealanale Pouchanlage (IPAA), die ebenfalls als elektive Operation erfolgen sollte, da die Operationsletalität bei Notoperationen deutlich steigt.

Die Therapie sollte bei refraktären Verläufen bei Colitis ulcerosa zügig eskaliert werden, auch im Hinblick auf das Entartungsrisiko bei kontinuierlicher Entzündungsaktivität. Diesbezüglich sind regelmäßige Kontrollendoskopien indiziert bei Risikopatienten mit subtotaler und totaler Colitis ulcerosa, die seit acht Jahren besteht oder mit Linksseitenkolitis, die seit 15 Jahren besteht (Hoffmann et al. 2004).

2.4 Pathophysiologie

Obwohl die Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht abschließend geklärt ist, wurden in den letzten Jahren zunehmend grundlegende Mechanismen entdeckt, die Teile der Krankheitsentstehung und den Verlauf als chronische Autoimmunerkrankung erklären. Zu diesen Pathomechanismen gehören die Störung der intestinalen Barriere, veränderte Antigenerkennung und Keimbeseitigung sowie eine dysregulierte Immunantwort.

2.4.1 Barrierestörung und verminderte bakterielle Clearance

Die wichtigste Aufgabe des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) ist die Unterscheidung zwischen der vielfältigen physiologischen Bakterienflora und

pathogenen Keimen, was eine besondere Form der Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd, beziehungsweise zwischen nicht gefährlich und gefährlich darstellt.

Dies wird zunächst gewährleistet durch die Sekretion von Muzinen, die dem Epithel aufliegend eine zähe Schleimschicht mit einem Gradienten von luminal hoher zu epithelial geringer Keimbesiedelung bilden, um die Exposition exogener Nahrungsmittelantigene und bakterieller Antigene zu reduzieren.

Zusätzlich sezernieren intestinale Epithelzellen, vor allem Paneth-Zellen des terminalen Ileums, zahlreiche antimikrobielle Enzyme und Peptide in die Schleimschicht, von B-Zellen produziertes sekretorisches IgA bewirkt luminal die Vernetzung von Antigenen und verhindert damit das Vordringen von Mikroorganismen. Diese erste mechanische Barriere ist bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa durch veränderte Expressionsmuster der Gene, die für Muzine (MUC) codieren, und veränderte posttranslationale Modifikation gestört. Es wurde nachgewiesen, dass Muzine in ihrer Qualität und Anzahl vermindert sind, sodass die Schleimschicht insuffizient wird und durchlässig für Keime (Buisine et al. 2007; van Klinken et al. 1999). Bei Morbus Crohn konnte zudem eine gesteigerte Permeabilität der Tight Junctions der ilealen Mukosa auch im entzündungsfreien Intervall nachgewiesen werden (Söderholm et al. 2002).

Epithelien, dendritische Zellen und Makrophagen sind weiterhin mit den stark konservierten Pattern Recognition Receptors (PRRs) des angeborenen Immunsystems ausgestattet und können beispielsweise durch Toll-like Rezeptoren (TLR) extrazelluläre und durch Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLR) intrazytosolische Antigene erkennen. Die aktive Aufnahme von Antigenen findet außerdem in solitären wie aggregierten Lymphfollikeln statt.

Das Follikel-assoziierte Epithel ist von M-Zellen durchsetzt, die stetig luminale Antigene durch Transzytose in die Lamina propria bringen, wo sie prozessiert und entweder toleriert werden oder eine Abwehrreaktion einleiten.

Zusätzlich können dendritische Zellen der Lamina propria direkt durch Zellfortsätze luminale Antigene binden. Sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa konnte beobachtet werden, dass die Anzahl dendritischer Zellen während entzündlichen Schüben deutlich erhöht ist und vermehrt TLR2 und besonders bei Colitis ulcerosa TLR4 signifikant stärker exprimiert wird (Ordás et al. 2012).

Die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren bewirkt durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, vermittelt durch den NF- κ B- und

MAP-Kinase-Signalweg, die Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen wie auch eine gesteigerte Immigration neutrophiler Granulozyten, unreifer dendritischer Zellen und von NK-Zellen durch Chemotaxis.

Eine erste genetische Komponente in der Pathogenese des Morbus Crohn konnte mit der Beschreibung der drei assoziierten Einzelnukleotid-Polymorphismen c.3020insC, p.G908R und p.R702W im NOD2-Gen nachgewiesen werden. Rund 30 % der Patienten tragen eine der drei Varianten (Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001). NOD-Proteine erkennen Teile von Peptidoglykanen, speziell NOD2 erkennt Muramyl-Dipeptide, die Bestandteile der meisten bakteriellen Zellwände sind, und wirkt damit als zellulärer Sensor für bakterielle Peptide.

Die Aktivierung von NOD2 und TLR bewirkt über den NF- κ B-Signalweg in Paneth-Zellen eine gesteigerte Sekretion antimikrobieller Peptide und in dendritischen Zellen sowie in Makrophagen die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α . Es konnte gezeigt werden, dass krankheitsassoziierte NOD2-Genvarianten in Epithelzellen zu einer erhöhten Anfälligkeit für intrazelluläre Bakterien und einer gesteigerten bakteriellen Translokationsrate führen. Im Mausmodell ging eine mangelnde NOD2-Expression mit einer gesteigerten Anfälligkeit für die Entwicklung intestinaler Entzündungen (Kobayashi et al. 2005), sowie einem Anstieg der Peyerschen Plaques einher, die zudem in ihrer Architektur verändert waren (Barreau et al. 2007).

Lange Zeit war nicht klar, ob die beschriebenen Barrierestörungen primäre Pathomechanismen sind oder doch sekundär durch entzündliche Prozesse verursacht werden. Durch genomweite Assoziationsstudien konnten inzwischen neben NOD2-SNPs weitere Suszeptibilitätsgene für Morbus Crohn wie die Autophagie-Gene ATG16L1 ($p < 0,001$; OR 1,28) und IRGM ($p < 0,001$; OR 1,33) identifiziert werden, deren Einzelnukleotid-Polymorphismen ebenfalls (Targan & Shih 2009; Barrett et al. 2009) mit einer verminderten, bzw. gestörten Eliminierung von Keimen in Zusammenhang stehen.

Das liefert Hinweise dafür, dass sowohl eine erhöhte Permeabilität, eine verminderte bakterielle Clearance und damit eine gestörte Integrität des intestinalen Epithels zu den grundlegenden Pathomechanismen gehören. Diese führen zu einer unphysiologischen und anhaltenden Antigenexposition gegenüber den Zellen des Immunsystems in der Lamina propria, die in genetisch suszeptiblen Personen eine chronische Entzündung etablieren und lokale Toleranzmechanismen beeinträchtigen.

2.4.2 Dysregulation der Immunantwort

Ein wichtiger Bestandteil der immunologischen Homöostase des gesunden Gastrointestinaltraktes ist das Zusammenwirken von Epithelzellen und dendritischen Zellen (Fritz et al. 2008). Dendritische Zellen stehen in engem Kontakt mit dem Follikel-assoziierten Epithel, und es gibt Hinweise darauf, dass dieser Kontakt die dendritische Zelle im gesunden Darm in einem Ruhezustand gegenüber den physiologischen Antigenen hält. Das bedeutet unter anderem, dass ruhende dendritische Zellen IL-10 sezernieren und so einer Aktivierung von T-Zellen durch die Präsentation luminaler Antigene entgegenwirken (Fritz et al. 2008).

Für die Aktivierung naiver T-Zellen, die deren Differenzierung bewirkt, sind wahrscheinlich Signale gleichermaßen von Toll-like Rezeptoren und NOD-like Rezeptoren notwendig (Fritz et al. 2008). Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen diesen Ruhezustand durch den massiven Einstrom kommensaler Keime nicht aufrechterhalten können. Sie leiten infolgedessen die T-Zell-Differenzierung ein und sezernieren eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-12, IL-18 und IL-23 was zu einer ausgeprägten Immunantwort führt (Baumgart & Sandborn 2012). Darunter fällt auch die rasante Rekrutierung und andauernde Präsenz von Leukozyten in der Lamina propria; bei Colitis ulcerosa ist beispielweise die Expression des Chemokins CXCL8 (IL-8) hochreguliert (Matsuda et al. 2009).

Um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern, sind regulatorische T-Zellen (Treg) und ihre Sekretion von IL-10 und TGF- β von zentraler Bedeutung.

Tregs der Mukosa sind in großer Mehrheit FOXP3⁺ und sowohl Zielzelle von IL-10, als auch Produzenten dieses stark anti-inflammatorischen Zytokins. Die Deletion von IL-10 im Mausmodell geht mit chronischer Enterocolitis einher. Obwohl eine Assoziation von Einzelnukleotid-Polymorphismen im IL-10-Gen mit Morbus Crohn nachgewiesen wurde, konnten bisher keine weiteren Defekte in der Funktion von FOXP3⁺ Treg ausgemacht werden, die die mangelhafte Fähigkeit zur Suppression der Effektor-T-Zellen erklären könnten (Neurath 2014; Wei, Zhang, Jian, et al. 2014).

Bezüglich der Aktivierung der dendritischen Zelle liegen beiden Erkrankungen ähnliche pathogenetische Mechanismen zugrunde. Im weiteren Verlauf jedoch ist eine TH1- und TH17-Zellen betonte Immunantwort mit granulomatösem Charakter pathognomonisch für Morbus Crohn, für Colitis ulcerosa dagegen die Dominanz von TH2-Zellen und NKT-Zellen.

Bei Morbus Crohn entscheidet das Zytokinprofil der dendritischen Zelle über die Differenzierung der naiven T-Zelle. Eine gesteigerte Sekretion von IFN- γ und IL-12 führt zur TH1-Zell-Reifung, IL-6 und TGF- β zur TH17-Zell-Reifung. Durch die pathologische Antigenexposition in der Lamina propria einerseits und einer mangelhaften Kontrolle durch regulatorische T-Zellen und anti-inflammatorische Zytokine andererseits kommt es zu einem zunächst lokalen massiven Anstieg von TH1- und TH17-Zellen. TH1-Zellen aktivieren durch Sekretion von IFN- γ und Lymphotoxin- α in hohem Maße Makrophagen und tragen damit zur Entstehung von Granulomen vom Sarkoidose-Typ bei, einem Epithelzellgranulom ohne zentrale Nekrose, und verursachen so die charakteristischen transmuralen Gewebeläsionen. IL-17 und IL-23 sind zwei weitere wesentliche Zytokine in der inflammatorischen Kaskade nicht nur intestinaler Entzündungen. IL-17 ist ein charakteristisches Zytokin bei schweren Entzündungen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose, Psoriasis und rheumatoiden Arthritis (Matusevicius et al. 1999; Yamaguchi et al. 2007; Kagami et al. 2010). Es wird beim Eindringen von Pathogenen oder Gewebeschäden zügig von inerten Immunzellen sezerniert, die Hauptquelle von IL-17 sind jedoch TH17-Zellen (Cua & Tato 2010). IL-17 fördert die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und ist zusammen mit TNF- α ein starker Induktor des NF- κ B-Signalwegs, was eine verstärkte und länger anhaltende Entzündungsreaktion begünstigt, die dann auch Gewebeschäden verursacht (Gu et al. 2013). Nicht nur IL-17, sondern auch die TH17-Zellzahl in der intestinalen Mukosa sind signifikant erhöht bei Morbus Crohn, und Hinweise häufen sich, dass dieser Pathomechanismus ebenso bei Colitis ulcerosa eine Rolle spielt (Gu et al. 2013; Kobayashi et al. 2008). IL-23 greift nun mit ein in diese Entzündungskaskade, indem es die Sekretion von IL-17 durch TH17-Zellen, aber auch TNF- α , IL-6 und IFN- γ steigert. Sezerniert von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen vermittelt IL-23 diese Wirkung über IL-23-Rezeptoren auf aktivierten myeloischen Zellen und T-Zellen, vor allem aber über den durch TGF- β und IL-6 induzierten IL23-Rezeptor auf TH17-Zellen. Zudem bewirkt IL-23 die Expansion und Erhaltung von TH17-Zellen und gleichzeitig die Suppression von regulatorischen T-Zellen (Kobayashi et al. 2008; Neurath 2014).

Die beschriebenen Mechanismen zeigen ein nur grobes Bild der Pathogenese und sind nicht vollständig. Zahlreiche weitere Signalwege sind involviert, jedoch lässt sich mit dem heutigen Wissensstand sagen, dass hauptsächlich die beschriebenen Pathomechanismen dem Morbus Crohn zugrunde liegen.

In der Mukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa herrscht ein Ungleichgewicht der Effektor-T-Zellen hin zu TH2-Zellen (Ordás et al. 2012). Die Signale, die vom inerten Immunsystem notwendig sind, um eine Differenzierung der naiven T-Zelle zur TH2-Zelle zu induzieren, sind noch nicht ausreichend geklärt.

Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Colitis ulcerosa spielen NKT-Zellen, eine Subpopulation der T-Zellen mit einem CD1d-Rezeptor zur Erkennung spezifischer bakterieller Glykolipide. Ihre Aktivierung beruht auf der beschriebenen pathologischen Antigenexposition im Rahmen der Barrierestörung und es folgt eine rasante Sekretion großer Mengen IL-4 und IFN- γ , womit sie die Differenzierung einer atypisch responsiven TH2-Zelle bewirken. TH2-Zellen exprimieren hier nur geringe Mengen an IL-4, was vermuten lässt, dass sie ihr charakteristisches, eher anti-inflammatorisch geprägtes Zytokinprofil wahrscheinlich nicht in wirksamem Ausmaß sezernieren (Neurath 2014).

Der wesentliche Entzündungsmechanismus wird von NKT-Zellen getragen, indem die Sekretion von IL-4 zügig ersetzt wird durch die Sekretion von IL-13. Intestinal wirkt IL-13 vor allem auf Epithelzellen stark proinflammatorisch, es kann Apoptose induzieren und die Proteinzusammensetzung von Tight Junctions verändern, was wiederum zum Verlust der epithelialen Integrität führt (Ordás et al. 2012; Heller et al. 2002; Heller et al. 2005).

Zusätzlich wirken NKT-Zellen selbst zytotoxisch auf Epithelien, und unter dieser Last bricht die epitheliale Barriere zusammen, der vermehrte Einstrom von Mikroorganismen erhält die Entzündung und führt so zu ausgedehnten Läsionen und Ulzerationen. Im Gegensatz zu Morbus Crohn sind diese Läsionen kontinuierlich, meist beginnend im Rektum, wo die größte Bakterienlast mit bis zu 10^{12} Organismen/g Stuhl herrscht (Wilson 2005). Dort aktivierte NKT-Zellen sorgen dann für einen Gewebeschaden, der sich kontinuierlich, und durch die Konzentration auf die Epithelien, oberflächlich ausbreitet (Heller et al. 2002).

Auch hier gilt, dass die Darstellung nicht vollständig ist und nur die grundlegenden Mechanismen der Pathogenese der Colitis ulcerosa beschrieben werden. Über das Zytokinprofil der lokalen Immunzellen entscheidet im physiologischen Zustand die Art des Erregers mit dem die Zellen in Kontakt kommen. Faktoren, in welche Richtung dieses Zytokinprofil im Krankheitsfall verschoben wird, sind gegenwärtig in Erforschung und können heute teilweise durch die Barrierestörung in einem genetisch vulnerablen Patienten erklärt werden.

Über die Rolle der B-Zelle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde bisher vergleichsweise wenig berichtet. Jedoch konnte gezeigt werden, dass sich zwar vermehrt B-Zellen im betroffenen Gewebe befinden, die lokale IgA-Fraktion aber vermindert ist und anstatt IgA2, welches resistenter gegen bakterielle Proteolyse ist, vermehrt IgA1 produziert wird. Weiterhin findet ein Klassenwechsel zu IgG statt, sodass in der Mukosa viel mehr Antikörper der Klasse IgG gebildet werden. Dies könnte ein Anzeichen für eine gesteigerte Beteiligung der B-Zellen in der Auseinandersetzung mit der pathologischen Antigenexposition in der Lamina propria sein (Brandtzaeg et al. 2006).

Im Serum nachweisbare Antikörper wie beispielsweise ASCA gehören sowohl der Klasse IgA wie IgG an. Sie richten sich vor allem gegen bakterielle Bestandteile und sind im klassischen Sinne keine Autoantikörper, da sie nicht gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind. Lediglich für Colitis ulcerosa ist mit den pANCA und Tropomyosin-Antikörpern das Vorkommen zweier klassischer Autoantikörper beschrieben (Saxon et al. 1990; Geng et al. 1998). Nur selten kommen ANCA bei Morbus Crohn vor.

2.4.3 TNF- α als zentraler Entzündungsmediator

TNF- α nimmt durch sein ubiquitäres Vorkommen in proinflammatorischen Signalkaskaden eine zentrale Rolle als Entzündungsmediator ein. TNF- α entsteht unter anderem am Ende der NF- κ B-Signalkaskade und bewirkt als Induktor von NF- κ B ein positives Feedback, wodurch es in großen Mengen von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet wird. Weiterhin wird TNF- α von T-Zellen, vor allem TH1-Zellen, Adipozyten und Fibroblasten gebildet und induziert in Epithel- und Paneth-Zellen Nekroptose und Barrierschäden, wirkt proliferierend auf Endothelzellen mit folgender Hypervaskularisation und ist Überlebenssignal für Effektor-T-Zellen (Neurath 2014).

Die Schlüsselrolle von TNF- α als Entzündungsmediator wurde auch mit dem therapeutischen Durchbruch der gezielten TNF- α -Blockade gezeigt. Therapieversuche mit anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10, IL-11 oder IFN- β verliefen ebenso frustan wie die Blockade proinflammatorischer Mediatoren wie IFN- γ oder IL-17A, welches paradoxerweise die Entzündung bei Morbus Crohn verschlimmerte. TNF- α wird als transmembranes Protein exprimiert und kann nach Spaltung durch die Metalloproteinase TNF- α -converting enzyme (TACE) sezerniert werden.

TNF- α -Blocker wie Infliximab oder Adalimumab, die sowohl gegen membrangebundenen wie löslichen TNF- α gerichtet sind, erzielen nicht nur eine klinische Besserung, sondern auch erstmalig ein endoskopisch nachweisbares Abheilen der entzündeten Mukosa. Etanercept, welches gegen den löslichen TNF- α gerichtet ist, zeigt keine Wirkung.

2.5 Fragestellung

Mit dem Nachweis von PGRN-Antikörpern bei Patienten mit Enteropathie-assoziiertespondylarthritis stellte sich die Frage, ob diese Antikörper in Assoziation mit der artikulären Beteiligung auftreten, oder ob mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa neben Vaskulitiden, systemischem Lupus erythematodes und der Psoriasis-Arthritis bei zwei weiteren Autoimmunerkrankungen Antikörper gegen Progranulin auftreten.

Periphere Arthritiden sowie axiale Arthropathien mit Sakroiliitis und Enthesitis zählen zu den extraintestinalen Manifestationen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, zudem ist die Psoriasis eine assoziierte Autoimmunerkrankung. Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von PGRN-Antikörpern und einen möglicherweise durch sie hervorgerufenen pathogenetischen Effekt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen. Dabei war neben Häufigkeit der PGRN-Antikörper und Bestimmung der Immunglobulinklasse wichtig, ob es Assoziationen zu klinischen Merkmalen wie Schwere und Verlauf der Erkrankung, Alter bei Erstdiagnose, Geschlecht, bestimmten medikamentösen Therapien oder dem Auftreten anderer Antikörper wie ANCA oder ASCA gibt. Eine weitere Frage war, ob durch den Nachweis von PGRN-Antikörpern der Einsatz der Pharmakotherapie optimiert werden kann oder PGRN-Antikörper als Verlaufsparemeter oder prognostische Marker verwendet werden könnten. Zudem wurde untersucht ob sich PGRN-Antikörper als serologischer Marker bei der zuweilen schwierigen Unterscheidung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eignen.

Neben diesen klinischen Fragestellungen sollte weiterhin untersucht werden, auf welche Weise PGRN-Antikörper proinflammatorisch wirken und welche pathogenetische Rolle sie damit bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen.

3 Material und Methoden

3.1 Laborgeräte

ELISA Lesegerät Victor ² 1420 Multilabel Counter	Wallac, Freiburg
Gefrierschrank -30 °C, -18 °C	Liebherr GmbH, Biberach an der Riß
Gefrierschrank -70 °C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Kühlschrank	Bosch GmbH, Stuttgart
MACS [®] Zellseparator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
PIPETMAN Pipette P2 und P10	Gilson [®] S.A.S., Villiers-le-Bel
Pipette Eppendorf Research 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Reference 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips Typ 100 µl und 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Schüttler MS 1 Minishaker	IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Waage BP 3100 S	Sartorius AG, Göttingen
Wasseraufbereitungssystem Millipore RiOs [™]	Merck Millipore, Darmstadt
Western-Blot Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Western-Blot Semi-Dry Transfer cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau

3.2 Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Immunologische und proteinchemische Materialien

96-Well ELISA-Platten, MaxiSorb	Nunc [™] , Langensebold
96-Well Platten, F-Form Tissue Culture	Nunc [™] , Langensebold

CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (human)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
EZ4U Cell Proliferation Assay	Biomedica, Wien
Progranulin ELISA Kit (human)	AdipoGen [®] , Schweiz
PVDF-Membran	Merck Millipore, Darmstadt
Kaninchen-anti-human-Actin IgG	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Kaninchen-anti-Schaf-IgG Biotin-konjugiert	The Binding Site, Birmingham
Kaninchen-anti-Ziege-IgG Biotin-konjugiert	Dianova GmbH, Hamburg
Maus-anti-human-FOXP3 IgG	EXBIO, Prag
Schaf-anti-human-IgG1 IgG	The Binding Site, Birmingham
Schaf-anti-human-IgG2 IgG	The Binding Site, Birmingham
Schaf-anti-human-IgG3 IgG	The Binding Site, Birmingham
Schaf-anti-human-IgG4 IgG	The Binding Site, Birmingham
Ziege-anti-human-IgG Biotin-konjugiert	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege-anti-human-IgG-Fc IgG	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege-anti-IgA-Fc IgG	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege-anti-IgM-5 μ IgG	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ziege-anti-Maus-IgG, HRP-konjugiert	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Maus-anti-Flag-IgG1, M2 monoklonal	Sigma-Aldrich [®] , München
Progranulin, rekombinant human	José Carreras Zentrum, Homburg AdipoGen [®] , Schweiz
Paratarg-7, rekombinant human	José Carreras Zentrum, Homburg
TNF- α , rekombinant human	PeproTech [®] , Hamburg
HT-29-Zelllinie	José Carreras Zentrum, Homburg (ATCC-Nr. HTB-38 [™])
WEHI-S-Zelllinie	José Carreras Zentrum, Homburg (DSMZ-Nr. ACC 25)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich [®] , Steinheim
Dinatriumphosphat	Merck KGaA, Darmstadt

ECL Reagenz	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt a.M.
Gelatine 1,5 %	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol 100 %	Sigma-Aldrich®, Steinhei
Glycin	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Histopaque®-1077	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Hydrogenchlorid 37 %	VWR® International GmbH, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Natriumbikarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumkarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich®, Steinheim
o-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich®, Steinheim
Streptavidin-Peroxidase	Roche, Deutschland
Tris	Merck KGaA, Darmstadt
Tris HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 %	Otto Fischar® GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Zitronensäure	Sigma-Aldrich®, Steinheim

3.2.2 Lösungen und Medien

Coating-Puffer

A 2,12 g Na₂CO₃ ad 100 ml a. dest
 B 1,68 g NaHCO₃ ad 100 ml a. dest
 → 1,7 ml A + 0,8 ml B + 7,5 ml a. dest

TRIS Buffered Saline (TBS)

Verdünnungs- und Waschpuffer für ELISA und Western Blot

8,78 g NaCl
 6,05 g Tris HCl
 1,4 g Tris
 ad 1 l a. dest

POX-OPD-Entwickler

A 0,2 M Dinatriumphosphat · 2 H₂O

B 0,1 M Zitronensäure · 1 H₂O

10 ml Entwickler: 2,5 ml A + 2,5 ml B + 5 ml a. dest + 1 Tabl. OPD + 5 µl H₂O₂ 30 %

SDS-Probenpuffer 5x (Ladepuffer)

0,6 ml 1 M Tris pH 6,8

2,5 ml 100 % Glycerol

2 ml 10 % SDS

0,5 ml 2 % Bromphenolblau

3,9 ml a. dest

Lämmli-Puffer 5x

144 g Glycin

30,34 g Tris

10 g SDS

ad 2 l a. dest

Transferpuffer für Western Blot

0,3 g Tris

1,44 g Glycin

20 ml Methanol

ad 100 ml a. dest

3.3 Methoden

3.3.1 Studienteilnehmer

Blutproben von 71 Patienten mit Colitis ulcerosa und 141 Patienten mit Morbus Crohn wurden in der gastroenterologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg/Saar im Rahmen der Routinediagnostik entnommen und mit schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten aufbewahrt. Von insgesamt 19 Patienten wurden im zeitlichen Verlauf mehrere Proben gesammelt. Patienten wurden als positiv für PGRN-Autoantikörper betrachtet, wenn in mindestens einer Probe Autoantikörper nachweisbar waren. Blutproben gesunder Kontrollpersonen wurden mit ebenfalls schriftlicher Einverständniserklärung in der Universitätsklinik des Saarlandes/Homburg entnommen. Sämtliche Blutproben wurden bis zu ihrer Analyse bei -80 °C gelagert. Aus den Patientenakten wurden retrospektiv jene klinischen Daten erhoben, die für eine Einteilung gemäß der Montreal-Klassifikation für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa von 2005 relevant waren. Die Abschätzung der Krankheitsaktivität erfolgte für Colitis ulcerosa durch die Montreal-Klassifikation von 2005 (Silverberg et al. 2005), für Morbus Crohn anhand der Empfehlungen des zweiten Konsensuspapiers der ECCO zu Diagnose und Management des Morbus Crohn von 2010 (van Assche et al. 2010; Dignass, Lindsay, et al. 2012).

Der Antikörperstatus der anti-Neutrophilen-zytoplasmatischen Autoantikörper und zusätzlich der anti-Saccharomyces-cerevisiae Antikörper bei Morbus Crohn wurde erhoben. Zudem war bei 22 Patienten mit Morbus Crohn das NOD2-Gen auf die drei Crohn-assoziierten Einzelnukleotid-Polymorphismen untersucht worden (Appenrodt et al. 2010; Zimmer et al. 2010).

Die durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Antrag N242/11) bewilligt und gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

3.3.2 Herstellung von rekombinantem PGRN im HEK293-Expressionssystem und anti-PGRN-Fabs

In Vorarbeiten wurden das mittels Protein-Macroarray bei Vaskulitiden identifizierte Antigen Progranulin und das als Zielantigen von Paraproteinen von Plasmazell-Erkrankungen identifizierte Paratarg-7 in einem eukaryoten

HEK293-Expressionssystem rekombinant hergestellt (Preuss et al. 2009; Thurner, Preuss, et al. 2013).

Die aus einer cDNA-Bank stammenden Expressionsklone der kodierenden Genabschnitte von PGRN und Paratarg-7 wurden käuflich erworben und mit einem C-terminalen FLAG-tag versehen in einen pSFI-Vektor mit CMV-Promoter umkloniert. Hiermit wurden dann HEK293-Zellen transfiziert. Für die folgenden Immunoassays wurde das ungereinigte Zelllysate verwendet, für den Proliferationsassay und die Untersuchung der FOXP3-Expression gereinigtes, rekombinantes FLAG-getaggtes Progranulin. Die Reinigung erfolgte chromatographisch an einer anti-FLAG-Affinitätsmatrix. Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation geklärt und 2 ml davon zusammen mit 50 µl anti-FLAG Gelsuspension für 30 min bei 4 °C inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl FLAG-Peptid Lösung in einer Konzentration von 0,1 mg/ml wurde das FLAG-getaggtete Progranulin anschließend eluiert. Die Konzentration der erhaltenen PGRN-Lösung lag bei 90 µg/ml.

Um anti-PGRN-Fabs mit spezifischer Reaktivität gegen den N-Terminus von Progranulin zu erhalten, wurde eine nicht immunisierte, halbsynthetische Phagen-Bibliothek mit theoretisch $3,7 \times 10^{10}$ Fabs mit einem N-terminal biotinyliertem PGRN Peptid, das von Aminosäure 70 bis Aminosäure 91 reicht, gescreent (Haard et al. 1999).

3.3.3 Progranulin-Antikörper-ELISA

Zum Screening der Patientenseren auf PGRN-Antikörper wird ein Sandwich-ELISA als quantitativer Immunoassay eingesetzt. Dabei wird ein muriner anti-FLAG Coatingantikörper an die feste Phase gebunden. An den Antikörper bindet rekombinant hergestelltes C-terminal FLAG-getaggtetes PGRN. Nach Zugabe der Patientenseren und zwischenzeitlichen Waschschritten kann der gesuchte PGRN-Autoantikörper binden und anschließend durch einen Sekundärantikörper und die chromogene enzymatische Umsetzung von o-Phenylendiamin photometrisch detektiert werden.

Das Prinzip des Enzym-gekoppelten Immunoassays wurde 1971 parallel von zwei Arbeitsgruppen in Frankreich (Avrameas & Guilbert 1971) und Schweden (Engvall & Perlmann 1971) entwickelt und löste den bis dahin etablierten Radioimmunassay (Berson et al. 1956) weitgehend ab. Verschiedene Assaykonzepte haben sich seitdem

entwickelt, für den Nachweis der PGRN-Antikörper wurde der Sandwich-ELISA aufgrund seiner hohen Sensitivität gewählt.

Zunächst wurde als feste Phase eine hochadsorbierende 96-Well Mikrotiterplatte gewählt und mit murinen anti-FLAG-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:2500 und 50 µl je Kavität gecoatet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um in den folgenden Schritten unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden mit 100 µl 1,5 %iger Gelatine für eine Stunde bei Raumtemperatur freie Proteinbindungsstellen geblockt.

Nach einem Waschschrift mit dreimal TBS wurden 50 µl des C-terminal FLAG-getaggten Progranulins in einer Konzentration von 10 µg/ml zupipettiert und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert, anschließend folgte wieder ein Waschschrift. Die Patientenseren wurden dann in einer Verdünnung von 1:100 zu je 50 µl den Kavitäten zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, der Waschschrift wurde wiederholt.

Um eine Signalverstärkung zu erreichen, wurde als Sekundärantikörper ein biotinylierter Ziege-anti-human-IgG Antikörper in der Verdünnung 1:2500 und 50 µl je Well eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation und einem Waschschrift erfolgte die Zugabe von 50 µl des mit Peroxidase konjugierten Streptavidins in einer Verdünnung von 1:50000 für 10 min. Nach einem letzten Waschschrift wurden 100 µl des Substrats o-Phenylendiamin (POX-OPD-Entwickler) hinzu pipettiert und die Enzymreaktion nach 5–10 min mit HCl abgestoppt.

Die Messung der Absorption erfolgte photometrisch bei 490 nm mit einem Wallac Victor² ELISA-Lesegerät. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Ein Absorptionswert größer als der Mittelwert der Negativkontrollen plus der dreifachen Standardabweichung galt als positiv.

3.3.4 Bestimmung der Progranulin-Antikörpertiter

Der Titer der PGRN-Antikörper wurde bei drei Patienten mit Morbus Crohn und bei zwei Patienten mit Colitis ulcerosa bestimmt. Dazu wurden die Seren ES41, ES174, ES191 (Morbus Crohn) und ES120, ES264 (Colitis ulcerosa) jeweils in Verdünnungen von 1:100, 1:200, 1:400 bis 1:12800 mit oben beschriebenem Sandwich-ELISA untersucht.

3.3.5 Bestimmung der Immunglobulinklassen und Immunglobulinsubklassen

Alle positiv für PGRN-Antikörper getesteten Seren wurden zur Bestimmung der Immunglobulinklassen und IgG-Subklassen erneut mit oben beschriebenem

Sandwich-ELISA untersucht. Es wurden jeweils spezifische sekundäre Antikörper gegen den Fc-Teil humaner Immunglobuline und der IgG-Subklassen IgG1 bis IgG4 eingesetzt.

Zur Bestimmung der Immunglobulinklassen wurde zum Nachweis der Antikörperklasse IgG als Sekundärantikörper biotinyliertes Ziege-anti-human-IgG-Fc IgG in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Für den Nachweis der Immunglobulinklassen IgA und IgM wurden unkonjugierte Ziege-anti-IgA-Fc IgG und Ziege-anti-IgM in einer Verdünnung von 1:2500 verwendet. Dieser Assay benötigte das Biotin-konjugierte Kaninchen-anti-Ziege-IgG als zusätzlichen Tertiärantikörper. Für die Charakterisierung der IgG-Subklassen dienten als Sekundärantikörper Schaf-anti-human-IgG1 bis IgG4 Antikörper und als Tertiärantikörper biotinylierte Kaninchen-anti-Schaf-IgG jeweils in einer Verdünnung von 1:5000.

Alle Ansätze wurden anschließend entwickelt durch die Zugabe von Streptavidin-POX 1:50000 und des POX-OPD-Entwicklers. Die Absorption wurde bei 490 nm gemessen.

3.3.6 Progranulin-ELISA

Um den Effekt von PGRN-Antikörpern auf den PGRN-Plasmaspiegel zu untersuchen, wurde dieser durch einen direkten quantitativen ELISA bestimmt (ELISA Kit AdipoGen®).

Der ELISA wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Getestet wurden Seren von sieben gesunden Kontrollpersonen (BA1, BA2, BA3, BA76, BA77, BA78, BA79), sieben Patienten ohne PGRN-Antikörper (ED1, ED3, ED5, ED6, ED10, ED28) und sieben Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa und PGRN-Antikörpern (ED2, ED14, ED19, ED30, ED34, ED47, ED80). Die Patienten wurden entsprechend ihrem Geschlecht, Alter, Krankheitscharakteristika und Therapieschema gematcht, um Strukturgleichheit in den Gruppen zu erreichen. Der PGRN-Plasmaspiegel von Patienten mit und ohne PGRN-Antikörper wurde in Relation zum Median der gesunden Kontrollgruppe, der als 100 % definiert ist, angegeben.

3.3.7 Proliferationsassay

Um den protektiven Effekt von PGRN auf TNF- α induzierte Zellschädigung wie auch die neutralisierende Wirkung von PGRN-Antikörpern in Seren von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in vitro zu untersuchen und zu vergleichen, wurde

ein TNF- α sensibler Proliferationsassay durchgeführt. Um mögliche Einflüsse der Seren auf die Viabilität der Zellen neben Progranulin oder PGRN-Antikörpern auszuschließen, wurde der Proliferationsassay ohne Zugabe von Serum mit rekombinantem Progranulin, rekombinantem Paratarg-7 und rekombinanten anti-human-PGRN-Fabs wiederholt. Der Proliferationsassay wurde ein weiteres Mal durchgeführt um zu prüfen, ob das im Labor des José Carreras Zentrums hergestellte rekombinante Progranulin vergleichbare TNF- α antagonisierende Effekte zeigt wie kommerziell verfügbares.

Der Proliferationsassay EZ4U basiert auf der Reduktion von Tetrazoliumsalzen zu farbigen Formazanderivaten durch Dehydrogenasen, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Da diese Reaktion vorrangig NAD(P)H-abhängig ist, weist sie über das Redoxpotential indirekt die Glykolyserate metabolisch aktiver Zellen nach. Zu einem geringen Anteil werden Tetrazoliumsalze in Mitochondrien auch durch Succinat reduziert. Es wurde jedoch gezeigt, dass dieser Reaktionsweg vernachlässigt werden kann und keinen Einfluss auf das Testergebnis hat. Damit ist die Reduktion von Tetrazoliumsalzen ein Indikator für die Zellproliferation und nicht wie bis dahin angenommen für die Zellatmung (Berridge et al. 1996). Der hier verwendete Proliferationsassay wurde mit einer HT-29-Zelllinie durchgeführt. Diese epitheliale Zelllinie entstammt einem humanen kolorektalen Adenokarzinom, und Untersuchungen zeigten, dass in diesen Zellen durch TNF- α die Sekretion von IL-8, vor allem aber auch Apoptose induziert werden kann (Abreu-Martin et al. 1995), weshalb sie sich für den hier verwendeten Assay eignen.

4×10^4 HT-29-Zellen wurden in 96-Well-Zellkulturplatten mit 200 μ l pro Well bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Es folgte die Zugabe des Serums eines PGRN-Antikörper negativen (ES452) und PGRN-Antikörper positiven (ES15) Patienten mit Colitis ulcerosa und ebenso Serum eines PGRN-Antikörper negativen (ES421) und PGRN-Antikörper positiven (ES41) Patienten mit Morbus Crohn sowie jeweils das Serum einer gesunden Kontrollperson (BA20).

Die Seren wurden in einer Verdünnungsreihe von 1:4 bis 1:512 hinzugegeben, parallel dazu wurde allen Ansätzen TNF- α in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugefügt. HT-29-Zellen ohne Zugabe von Serum oder TNF- α sowie mit alleiniger Zugabe von TNF- α in einer Konzentration von 10 μ g/ml dienten als Kontrollen.

Die Patienten wurden nach den Kriterien Geschlecht, Alter, Antikörperstatus pANCA/cANCA und medikamentöser Therapie ausgewählt, um Strukturgleichheit zu erzeugen. Ausschlusskriterium war eine Therapie mit TNF- α -Blockern oder anderen Biologika. Der Einfluss von vorhandenem, bzw. endogenem TNF- α in den Patientenseren konnte aufgrund der kurzen Halbwertszeit von 20 min (Chapman et al. 1987) gegenüber der Halbwertszeit von 40 h von Progranulin (Tang et al. 2011) vernachlässigt werden.

Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurden 20 μ l des chromogenen Substrats zu jeder Kavität pipettiert. Dieses chromogene Substrat kann nur von vitalen Zellen mit intakten Mitochondrien umgesetzt werden. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm. Zum Ausschluss möglicher sonstiger Einflüsse der Seren neben Progranulin und PGNR-Antikörpern auf die Viabilität der Zellen wurde der Proliferationsassay mit rekombinantem Progranulin und rekombinantem Paratarg-7 aus dem HEK293-Expressionssystem jeweils mit einer Konzentration von 250 ng/ml sowie mit rekombinanten anti-human-PGRN-Fabs gegen den N-Terminus von Progranulin (Held et al. 2007; Preuss et al. 2011) mit einer Startkonzentration von 2 μ g/ml in einer Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:128 wiederholt. Allen Ansätzen wurde wieder TNF- α in einer Konzentration von 10 μ g/ml zugegeben.

Um das im Labor des José Carreras Zentrums rekombinant hergestellte Progranulin mit dem eines kommerziellen Anbieters (AdipoGen[®]) in seiner TNF- α antagonisierenden Wirksamkeit vergleichen zu können, wurden WEHI-S-Zellen für den Proliferationsassay verwendet. Diese murine Fibroblasten-Zelllinie ist hochsensitiv für TNF- α vermittelte Zytotoxizität (Espevik & Nissen-Meyer 1986). Das rekombinante Progranulin entstammte in beiden Fällen einem HEK293-Expressionssystem.

4 x 10⁴ WEHI-S-Zellen/ml wurden mit TNF- α in einer Konzentration von 100 pg/ml und dem jeweiligen rekombinanten Progranulin in einer Konzentration von 250 ng/ml für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO inkubiert. Nach der Inkubation wurden 20 μ l des chromogenen Substrats zugefügt und die Adsorption bei 450 nm gemessen.

3.3.8 Auswirkung von PGRN und PGRN-Antikörpern auf die FOXP3-Expression CD4⁺CD25^{hi} regulatorischer T-Zellen

Das von CD4⁺CD25⁺ Tregs exprimierte FOXP3 ist ein spezifischer Marker für diese T-Zell-Subpopulation und zeigt deren Aktivierung und Fähigkeit zur Suppression von CD4⁺ T-Effektorzellen an. In diesem Experiment wird die Wirkung von PGRN und

PGRN-Antikörpern über den TNF-Signalweg auf CD4⁺CD25⁺ Tregs anhand ihrer FOXP3-Expression untersucht.

Zunächst wurden Blutproben von gesunden Kontrollpersonen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert, um die monozytären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) zu erhalten. Dazu wurde mit EDTA antikoaguliertes Vollblut in einem Verhältnis von 1:2 mit PBS verdünnt. Die Ficoll-Hypaque-Fertiglösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml wurde in gleicher Menge wie das verdünnte Blut vorgelegt, mit der Blutprobe vorsichtig überschichtet und mit 400 g ohne Bremse für 30 min zentrifugiert.

CD4⁺CD25^{hi} Tregs wurden mittels eines humanen Isolationskits (Miltenyi Biotec) aus der abpipettierten PBMC-Fraktion isoliert und in 96-Well Zellkulturplatten in einer Konzentration von 5×10^4 /ml kultiviert. Es folgte die Zugabe von Etanercept in einer Konzentration von 1 µg/ml, von rekombinatem PGRN und rekombinatem Paratarg-7 jeweils in einer Konzentration von 250 ng/ml. Rekombinantes PGRN und rekombinante PGRN-Antikörper, rekombinantes Paratarg-7 und rekombinante PGRN-Antikörper sowie rekombinantes PGRN und rekombinante Paratarg-7-Antikörper (Preuss et al. 2011) wurden für 30 min bei 4 °C vorinkubiert und dann den Zellen zugefügt.

PGRN und Paratarg-7 wurden in der oben genannten Konzentration verwendet, die Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml. Nach Zugabe der Proteine oder Immunkomplexe wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Jedem dieser Ansätze wurde anschließend TNF-α in einer Konzentration von 50 ng/ml zugefügt und über Nacht abermals bei 37 °C inkubiert. Eine Kavität wurde alleine mit CD4⁺CD25^{hi} Tregs ohne Zugabe anderer Substanzen bestückt.

Um die Expression von FOXP3 zu quantifizieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. W. Neil Burnett beschrieb 1982 erstmals, wie ein elektrophoretisch aufgetrenntes Proteingemisch von einem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen werden kann und darauf einzelne Proteine des Gemisches identifiziert und auch quantifiziert werden können (Burnette 1981). Die Bezeichnung des Verfahrens als Western Blot erfolgte in Anlehnung an den von Edwin Southern 1975 entwickelten Southern Blot (Towbin et al. 1979), bei dem nicht ein Proteingemisch, sondern DNA aufgetrennt und übertragen wird.

CD4⁺CD25^{hi} Tregs wurden lysiert, die Lysate mit Ladepuffer versetzt, auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel geladen und durch Elektrophorese aufgetrennt. Es

erfolgte der elektrophoretische Proteintransfer auf eine PVDF-Membran durch einen Semi-Dry-Blot. Nach dem Blocken der Membran mit 10 % Milch wurde diese mit Maus-anti-human-FOXP3-IgG in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden HRP-konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG verwendet.

Der parallele Nachweis von Aktin diente der Ladungsprobe, als Primärantikörper wurden Kaninchen-anti-human-Aktin-IgG in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, als Sekundärantikörper wieder HRP-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-IgG in einer Verdünnung von 1:3000. Die Entwicklung erfolgte durch die Zugabe eines ECL Reagenz.

3.3.9 Antikörperstatus und NOD2-Genvarianten

Im Rahmen der Routinediagnostik wurden perinukleäre und zytoplasmatische anti-Neutrophilen-zytoplasmatische Antikörper (pANCA/cANCA) durch indirekte Immunfluoreszenz im Rheumatologischen Diagnostiklabor der Inneren Medizin I der Universitätsklinik des Saarlandes nachgewiesen. Bei positiven oder nicht eindeutigen Ergebnissen wurde zusätzlich ein ELISA zum Nachweis von MPO-ANCA und Pr3-ANCA nach Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet (Varelisa™ PR3 ANCA, Varelisa™ MPO ANCA).

Bei 33 Patienten mit Morbus Crohn wurde zusätzlich das Vorkommen von anti-Saccharomyces-cerevisiae Antikörper (ASCA) im MVZ Prof. Seelig in Karlsruhe untersucht. Bei 22 Patienten mit Morbus Crohn wurde das NOD2-Gen auf die drei Crohn-assoziierten Genvarianten p.R702W, p.G908R und c.3020insC untersucht (Appenrodt et al. 2010; Zimmer et al. 2010).

3.3.10 Statistik

Alle statistischen Auswertungen erfolgten unter Verwendung von SPSS Version 19.0 für Windows. Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von PGRN-Antikörpern und klinischen Charakteristika, medikamentöser Therapie, Antikörper- und NOD2-Status wurde der χ^2 -Test oder der exakte Test nach Fisher benutzt. Der Vergleich zwischen den PGRN-Plasmaspiegeln PGRN-Antikörper positiver Patienten, PGRN-Antikörper negativer Patienten und gesunder Kontrollen erfolgte durch den Mann-Whitney-U Test. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert < 0,05 angenommen. Die Abbildungen 1–9 wurden mit R Version 3.3.1 erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der untersuchten Patienten

Alle Daten und klinischen Charakteristika wurden retrospektiv erhoben, Tabellen 4 und 5 zeigen diese im Detail. Das Geschlechterverhältnis beider Gruppen war nahezu ausgeglichen, das mediane Alter lag jeweils bei 41 Jahren. Schwere und Aktivität der Erkrankung wurden bei Morbus Crohn durch die Montreal-Klassifikation von 2005 und das zweite Konsensuspapier der ECCO von 2010 eingeschätzt, bei der Colitis ulcerosa durch die Montreal-Klassifikation von 2005 (van Assche et al. 2010; Silverberg et al. 2005).

Bei beiden Erkrankungen wurde die Häufigkeit extraintestinaler Manifestationen und assoziierter Autoimmunerkrankungen untersucht. Extraintestinale Manifestationen kamen bei Morbus Crohn mit 18,2 % etwas häufiger vor als bei der Colitis ulcerosa mit 14,7 %. Dabei waren axiale Arthropathien und periphere Arthritiden die häufigsten extraintestinalen Manifestationen bei Patienten mit Morbus Crohn. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa war am häufigsten das hepatobiliäre System in Form einer PSC mitbetroffen. Assoziationen zu anderen Autoimmunerkrankungen konnten häufiger bei Patienten mit Colitis ulcerosa beobachtet werden. Hier trat in 7 % Asthma bronchiale auf. In der Gruppe der Morbus Crohn Patienten traten bei insgesamt 4,4 % assoziierte Autoimmunerkrankungen (Multiple Sklerose, Psoriasis, Diabetes Typ I und Asthma bronchiale) auf.

Zusätzlich wurde die spezifische Pharmakotherapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zum Zeitpunkt der Probenentnahme untersucht. Verordnungen aufgrund von Komorbiditäten wurden nicht berücksichtigt. Es befanden sich 91,5 % der Morbus Crohn Patienten und 88,7 % der Colitis ulcerosa in medikamentöser Therapie.

Tabelle 4. Klinische Charakteristika der Morbus Crohn Patienten.

Merkmal	Anzahl [n] (gültige Prozente [%])	fehlende Daten [n]
Patienten	141	
Patienten mit Verlaufspalten	12; 8,5 %	
Alter Median (Min; Max)	41 (12; 70)	0
Alter bei Erstdiagnose Mittelwert (Min; Max)	25 (7; 70)	25
Geschlecht	männlich: 61 (43,3 %) weiblich: 80 (56,7 %)	0
Montreal-Klassifikation von 2005		
Alter bei Erstdiagnose		23
• A1	20 (16,4 %)	
• A2	87 (71,3 %)	
• A3	15 (12,3 %)	
Lokalisation		12
• L1	32 (24,8 %)	
• L2	27 (20,9 %)	
• L3	62 (48,1 %)	
• L4	1 (0,8 %)	
• L4+	7 (5,4 %)	
Ausprägung (Behaviour)		5
• B1	38 (27,9 %)	
• B2	76 (55,9 %)	
• B3	36 (26,5 %)	
• B3p	28 (20,6 %)	
Abschätzung der Krankheitsaktivität nach ECCO 2010		
• Remission	29 (32,6 %)	52
• mild	30 (33,7 %)	
• mittel	9 (10,1 %)	
• schwer	21 (23,6 %)	
Resektion	75 (54,7 %)	4
extraintestinale Manifestation		4
• axiale Arthropathie	4 (2,9 %)	
• periphere Arthritis	13 (9,5 %)	
• Pyoderma gangraenosum	3 (2,2 %)	
• Erythema nodosum	5 (3,6 %)	
• PSC	2 (1,5 %)	
• cholangioläre Manifestation	1 (0,7 %)	
assoziierte Autoimmunerkrankungen		6
• Multiple Sklerose	1 (0,7 %)	
• Psoriasis	1 (0,7 %)	
• Asthma bronchiale	3 (2,1 %)	
• Diabetes mellitus Typ I	1 (0,7 %)	
medikamentöse Therapie		
• Aminosalicylate	50 (38,2 %)	10
• topische Steroide	41 (31,3 %)	10
• systemische Steroide	33 (25,2 %)	10
• Immunsuppressiva	55 (41,7 %)	9
• TNF- α -Blocker	35 (26,1 %)	7
NOD2-Mutationsstatus		121
• Wildtyp homozygot	10 (50 %)	
• 3020insC	4 (20 %)	
• pG908R	3 (15 %)	
• pR702W	3 (15 %)	

Tabelle 5. Klinische Charakteristika der Colitis ulcerosa Patienten.

Merkmal	Anzahl [N] gültige Prozente [%]	fehlende Daten [N]
Patienten	71	
Patienten mit Verlaufspuben	7; 9,9 %	
Alter Mittelwert (Min; Max)	41 (18; 80)	
Alter bei Erstdiagnose Mittelwert (Min; Max)	30 (10; 70)	5
Geschlecht	männlich: 37 (52,1 %) weiblich: 34 (47,9 %)	
Montreal-Klassifikation von 2005		
Ausdehnung (Extent)		
• E1	9 (15,3 %)	12
• E2	15 (25,4 %)	
• E3	35 (59,3 %)	
Schweregrad		
• Remission	36 (63,2 %)	15
• S1	2 (3,5 %)	
• S2	8 (14,0 %)	
• S3	11 (19,3 %)	
Resektion	6 (9,0 %)	4
extraintestinale Manifestation		
• axiale Arthropathie	2 (2,9 %)	3
• periphere Arthritis	2 (2,9 %)	
• Pyoderma gangraenosum und Erythema nodosum	1 (1,4 %)	
• PSC	6 (8,4 %)	
assoziierte Autoimmunerkrankungen		
• Asthma bronchiale	5 (7 %)	3
medikamentöse Therapie		
• Aminosalicylate	45 (68,2 %)	5
• topische Steroide	14 (20,6 %)	3
• systemische Steroide	21 (30,9 %)	3
• Immunsuppressiva	16 (23,5 %)	3
• TNF- α -Blocker	17 (10,3 %)	3

4.2 Screening der Patientenserum auf PGRN-Antikörper, Titerbestimmung und Bestimmung der Immunglobulinklassen

Es wurden insgesamt 234 Seren auf das Vorkommen von PGRN-Antikörpern untersucht, davon 154 von Patienten mit Morbus Crohn und 80 von Patienten mit Colitis ulcerosa. In 23 Seren von Patienten mit Morbus Crohn und in 15 Seren von Patienten mit Colitis ulcerosa konnten PGRN-Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abbildung 1). PGRN-Antikörper kamen sowohl bei Morbus Crohn ($p < 0,001$) als auch bei Colitis ulcerosa ($p < 0,001$) signifikant häufiger vor als bei gesunden Kontrollen. Dagegen zeigte sich kein signifikant häufigeres Auftreten von PGRN-Antikörpern bei Morbus Crohn gegenüber Colitis ulcerosa ($p = 0,388$). Als statistisch signifikant wurde ein p -Wert von $< 0,05$ angenommen. Von insgesamt 19 Patienten waren Verlaufsproben vorhanden, diese Patienten wurden als positiv für PGRN-Antikörper gewertet, wenn in mindestens einer Probe Antikörper nachweisbar waren.

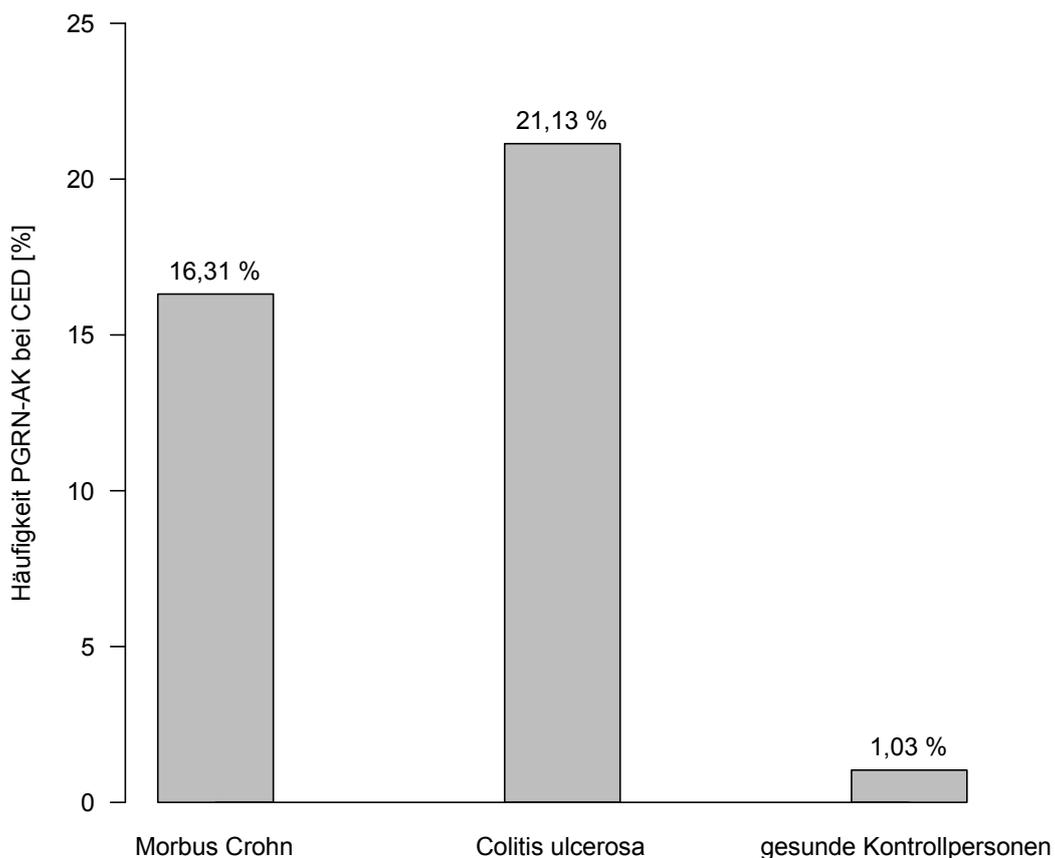


Abbildung 1. Vorkommen von PGRN-Antikörpern bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Das Balkendiagramm zeigt das Vorkommen von PGRN-AK bei 141 Patienten mit Morbus Crohn und 71 Patienten mit Colitis ulcerosa im Verlauf der Erkrankung. Es wurden 97 gesunde Kontrollpersonen auf das Vorkommen von PGRN-AK getestet.

Mit dem χ^2 -Test, bzw. dem exakten Test nach Fisher, wurden Assoziationen zwischen allen klinischen Charakteristika und dem Auftreten von PGRN-Antikörpern untersucht. Es konnten für beide Erkrankungen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Alter bei Erstdiagnose, Lokalisation und Ausbreitung, der Krankheitsaktivität und strikturierendem oder fistulierendem Verlauf speziell bei Morbus Crohn und dem Auftreten von PGRN-Antikörpern nachgewiesen werden. Es konnten weiterhin keine Assoziationen zwischen medikamentöser oder chirurgischer Therapie oder dem NOD2-Status belegt werden.

Bei beiden Erkrankungen wurden bei Patienten mit Verlaufspuren häufiger PGRN-Antikörper nachgewiesen. So zeigten bei Patienten mit Morbus Crohn 6 von 12 Patienten mit Verlaufspuren eine Serokonversion, hingegen waren nur 17 von 129 Patienten mit einer Einzelprobe seropositiv für PGRN-Antikörper [6/12 (50 %) versus 17/129 (13,2 %); $p = 0,005$]. Ähnliche Ergebnisse zeigten die 7 Verlaufspuren der Patienten mit Colitis ulcerosa von denen 3 im Verlauf seropositiv waren im Gegensatz zu 12 seropositiven Proben von 64 Einzelproben [3/7 (42,9 %) versus 12/64 (18,6 %); $p = 0,158$].

Für die Titerbestimmung wurden PGRN-Antikörper positive Seren von zwei Patienten mit Colitis ulcerosa (ES120 und ES264) und drei Patienten mit Morbus Crohn (ES41, ES174 und ES191) zufällig ausgewählt. Die Titer lagen zwischen 1:800 bis 1:3200, siehe dazu Abbildung 2.

Die Bestimmung der Immunglobulinklassen und IgG-Subklassen ergab eine Häufigkeit von 71,1 % für IgG1, 2,6 % für IgG2 und 26,3 % für IgA. Das Vorkommen von PGRN-Antikörpern der Klasse IgA war bei Morbus Crohn mit 26,1 % und mit 26,7 % bei Colitis ulcerosa annähernd identisch (siehe Abbildung 3).

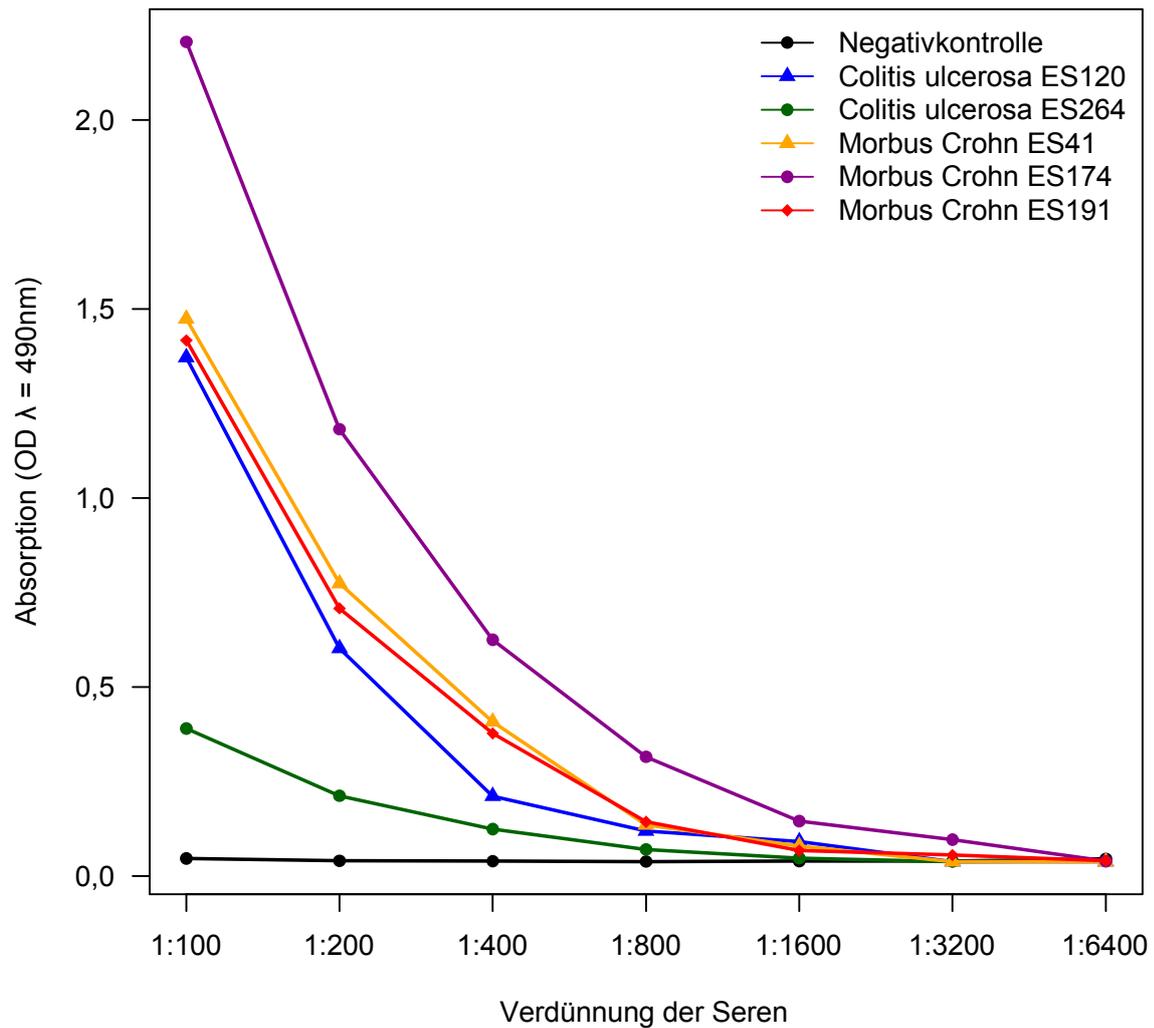


Abbildung 2. Titerbestimmung der PGRN-Antikörper bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Das Diagramm zeigt die Absorption bei $\lambda = 450$ nm der sieben Seren jeweils in der gegebenen Verdünnungsreihe. PGRN-AK waren hier bis zu einer Verdünnung von 1:3200 nachweisbar.

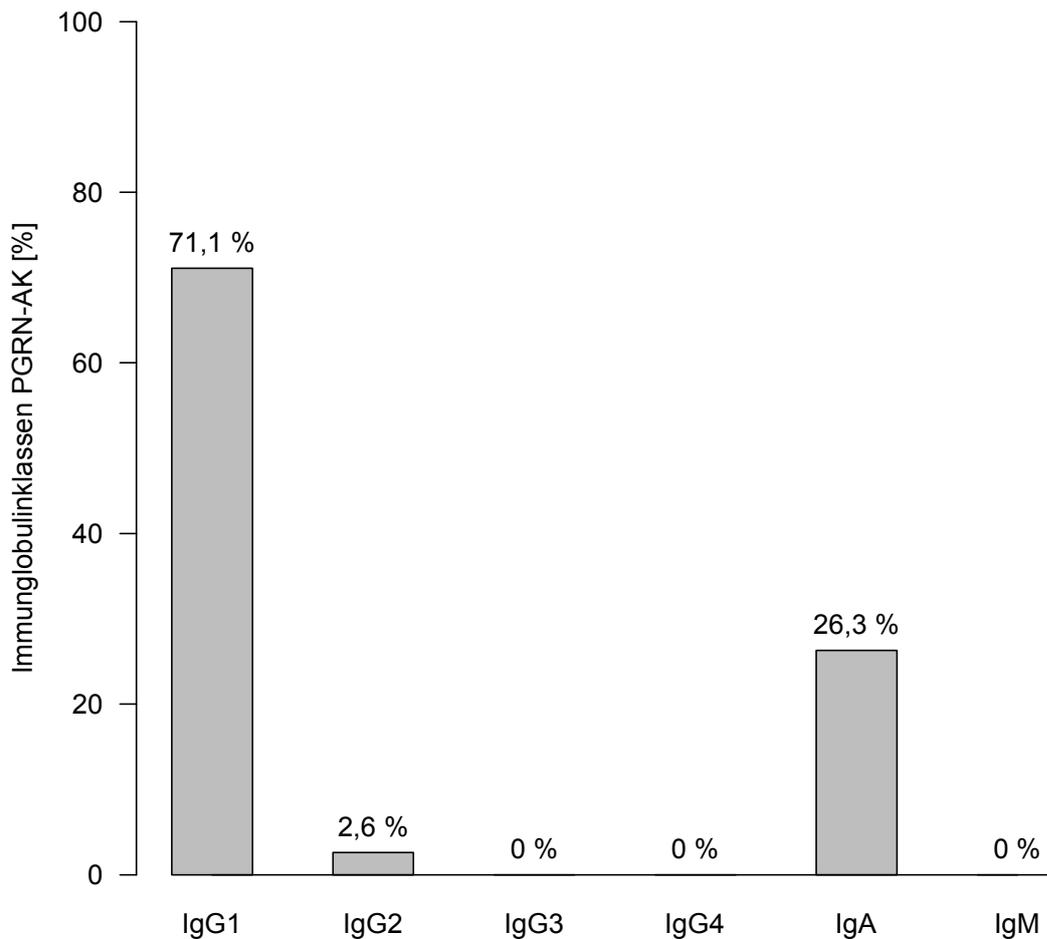


Abbildung 3. Immunglobulinklassen und IgG-Subklassen der PGRN-Antikörper. Alle auf PGRN-AK positiv getesteten Seren wurden hier erneut untersucht, die Balken zeigen die Häufigkeit der Immunglobulinsubklassen von IgG und der Immunglobulinklassen IgA und IgM. PGRN-AK sind meist Antikörper der Klasse IgG1.

4.3 Auftreten der PGRN-Antikörper im Vergleich mit dem Auftreten von ANCA und ASCA

Von 127 Patienten mit Morbus Crohn und 65 Patienten mit Colitis ulcerosa wurde der Antikörperstatus mit pANCA und cANCA erhoben (siehe Tabelle 6). 4 Patienten mit Colitis ulcerosa waren positiv für pANCA und 7 Patienten für cANCA.

PGRN-Antikörper kamen bei Colitis ulcerosa jeweils häufiger vor als pANCA [4/65 (6,2 %); $p = 0,0135$] und cANCA [7/65 (9,9 %); $p = 0,0101$] und auch häufiger als pANCA und/oder cANCA [9/65 (13,8 %), $p = 0,266$]. Das Auftreten von ANCA ist bei Morbus Crohn seltener als bei Colitis ulcerosa (siehe Abbildung 4). Mit nur einer positiven Probe für pANCA kommen PGRN-Antikörper signifikant häufiger vor (pANCA: 1/127 (0,8 %); $p < 0,001$; cANCA: 0/127 (0 %); $p < 0,001$).

29 Seren von Patienten mit Morbus Crohn wurden auf das Vorkommen von ASCA untersucht, dabei waren 14 Proben positiv. ASCA treten damit häufiger auf als PGRN-Antikörper (14/29; $p < 0,001$), ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten beider Antikörper konnte nicht beobachtet werden. PGRN-Antikörper traten nicht in signifikanter Häufung mit ASCA bei Morbus Crohn oder ANCA bei Colitis ulcerosa auf.

Tabelle 6. Antikörperstatus bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

	Anzahl [n] (gültige Prozente [%])	fehlende Daten [n]
Morbus Crohn		
cANCA	negativ: 127 (100 %); positiv: 0 (0 %)	14
pANCA	negativ: 126 (99,2 %); positiv: 1 (0,8 %)	14
ASCA	negativ: 15 (51,7 %); positiv: 14 (48,3 %)	112
Colitis ulcerosa		
cANCA	negativ: 58 (81,7 %); positiv: 7 (9,9 %)	6
pANCA	negativ: 61 (93,8 %); positiv: 4 (6,2 %)	6
cANCA und/oder pANCA	negativ: 56 (86,2 %); positiv: 9 (13,8 %)	6

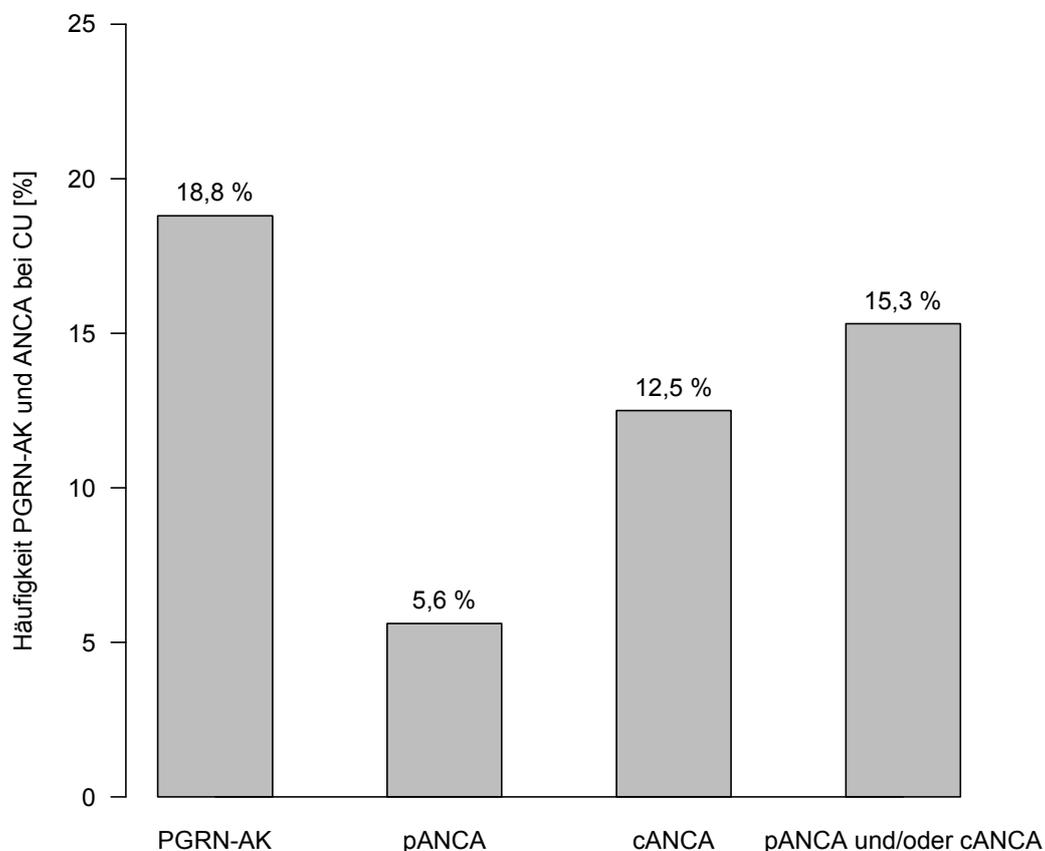


Abbildung 4. Vorkommen von PGRN-Antikörpern und ANCA bei Colitis ulcerosa. Das Balkendiagramm zeigt die Häufigkeit von PGRN-AK und ANCA im Verlauf der Erkrankung.

4.4 Progranulin-ELISA

Ein quantitativer PGRN-ELISA wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob PGRN-Antikörper eine Auswirkung auf den Plasmaspiegel von Progranulin haben (siehe Abbildung 5). Es konnte ein signifikant verminderter PGRN-Plasmaspiegel bei PGRN-Antikörper positiven Patienten mit CED (n = 7) im Vergleich mit PGRN-Antikörper negativen Patienten mit CED (n = 7; Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$) und gesunden Kontrollpersonen (n = 7; Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$) beobachtet werden. Hingegen gab es keinen signifikanten Unterschied des PGRN-Plasmaspiegels zwischen PGRN-Antikörper negativen Patienten und gesunden Kontrollpersonen (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,456$).

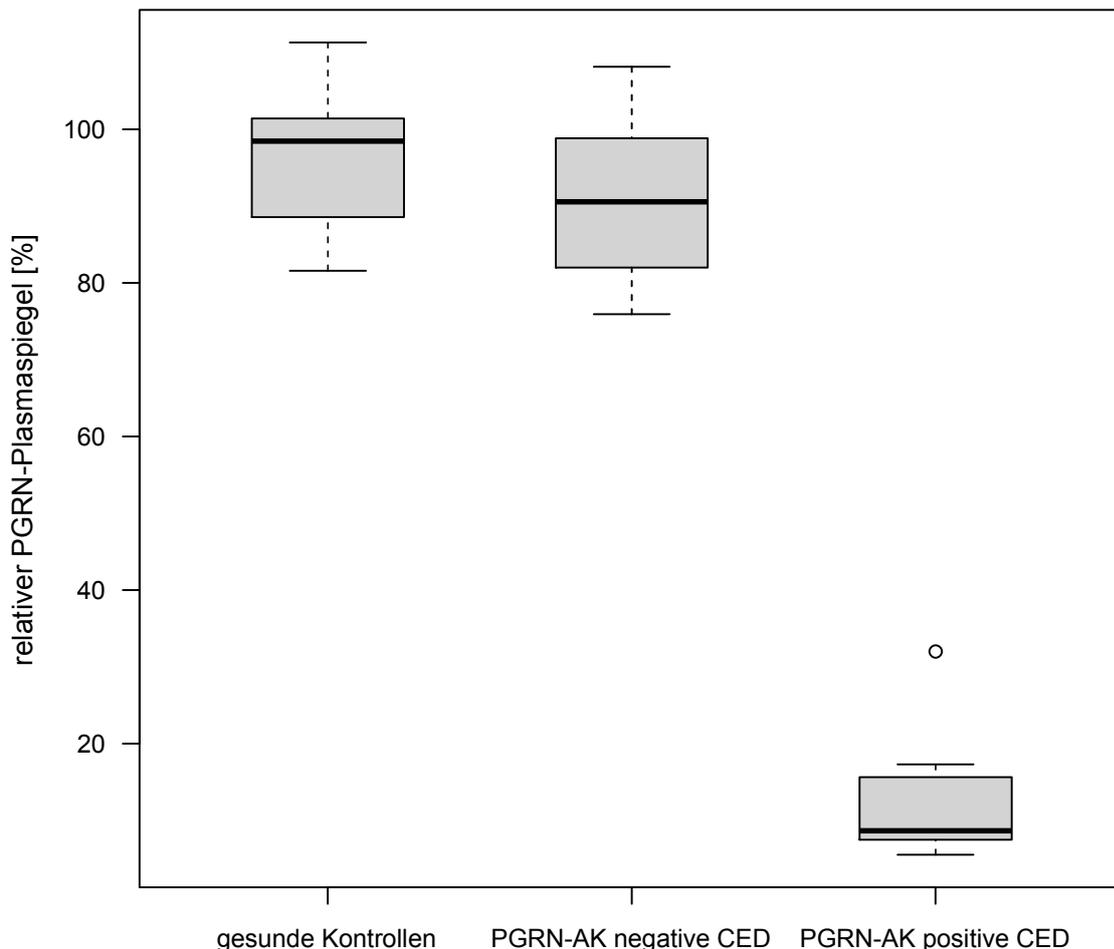


Abbildung 5. Relativer PGRN-Plasmaspiegel. Verglichen wurden der PGRN-Plasmaspiegel PGRN-AK positiver (n = 7) und negativer (n = 7) Patienten mit CED mit sieben gesunden Kontrollpersonen (n = 7).

4.5 Proliferationsassay

Um die Wirkung von Progranulin und PGRN-Antikörpern auf TNF- α vermittelte Zellschädigung zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. HT-29-Zellen konnten nach Inkubation mit TNF- α allein und mit TNF- α und Paratarg-7 als Kontrolle nur geringe Mengen des chromogenen Substrats umsetzen, was sich durch die geringere Absorption der jeweiligen Zellkulturen in der photometrischen Messung ableiten lässt. Dieses Ergebnis zeigt die proliferationshemmende Wirkung von TNF- α auf HT-29-Zellen.

Die Hinzugabe von Seren von gesunden Kontrollpersonen und von PGRN-Antikörper-negativen Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa führte zu einer klaren Abschwächung des proliferationshemmenden Effektes von TNF- α auf die HT-29-Zellen.

Diesen Effekt führten wir auf die Wirkung des PGRNs zurück. Der protektive Effekt des PGRNs war in Seren von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ähnlich stark ausgeprägt und konnte bis zu einer Verdünnung von 1:64 beobachtet werden (siehe Abbildungen 6 und 7). Dagegen war dieser Effekt durch Hinzugabe von Seren von Patienten mit neutralisierenden PGRN-Antikörpern deutlich abgeschwächt.

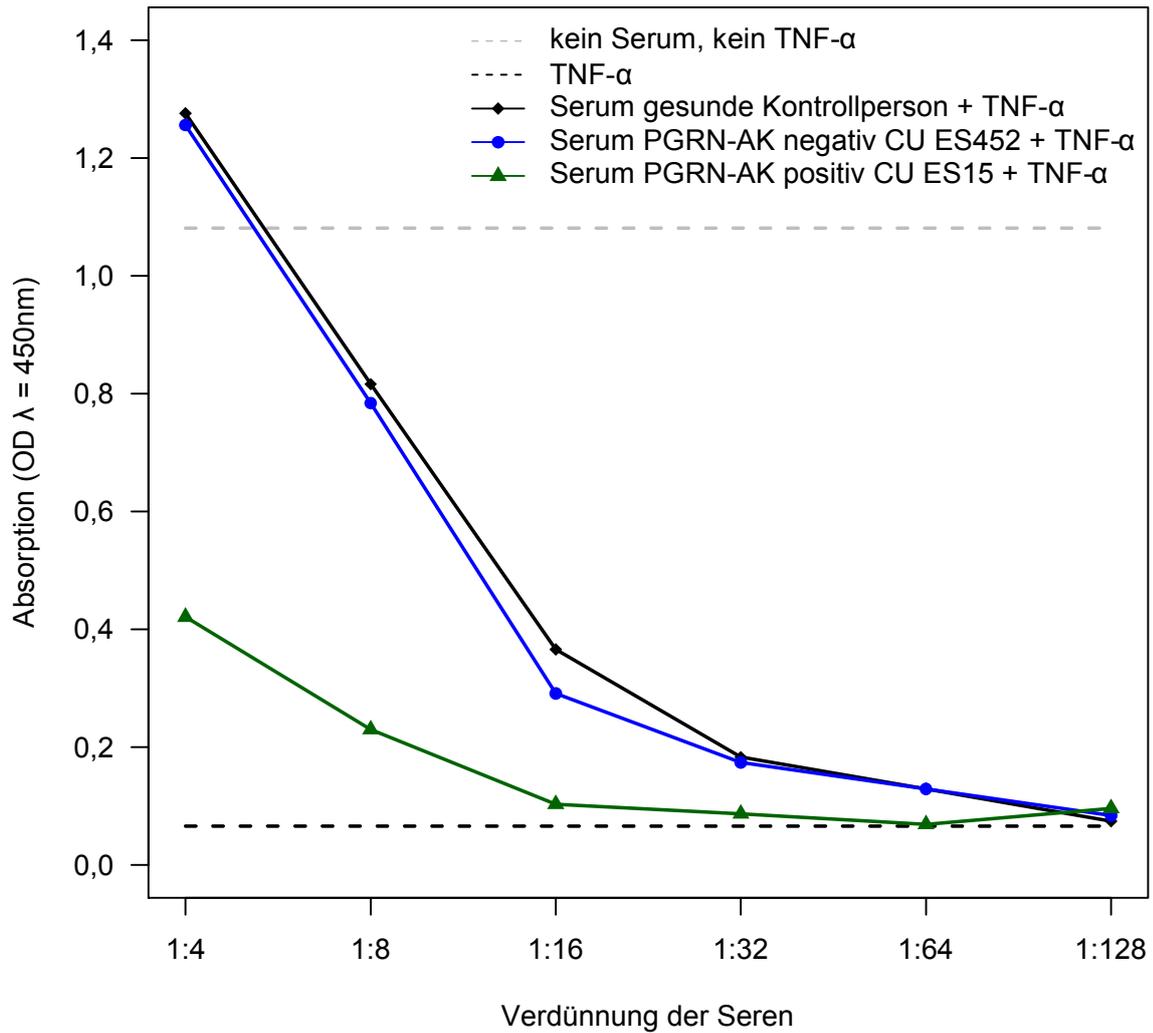


Abbildung 6. Einfluss des PGRN-Antikörperstatus von Colitis ulcerosa Seren auf die Zellproliferation von HT-29-Zellen im TNF- α -Assay. Die Abbildung zeigt die Absorption des Proliferationsassays mit HT-29-Zellen bei $\lambda = 450$ nm. Je höher der Wert der Absorption, desto höher ist die Umsetzung des chromogenen Substrates (Tetrazolium zu Formazan) durch metabolisch aktive Zellen. In diesem TNF- α induzierten Assay zeigt PGRN einen protektiven Effekt, der durch PGRN-AK bei Colitis ulcerosa neutralisiert wird.

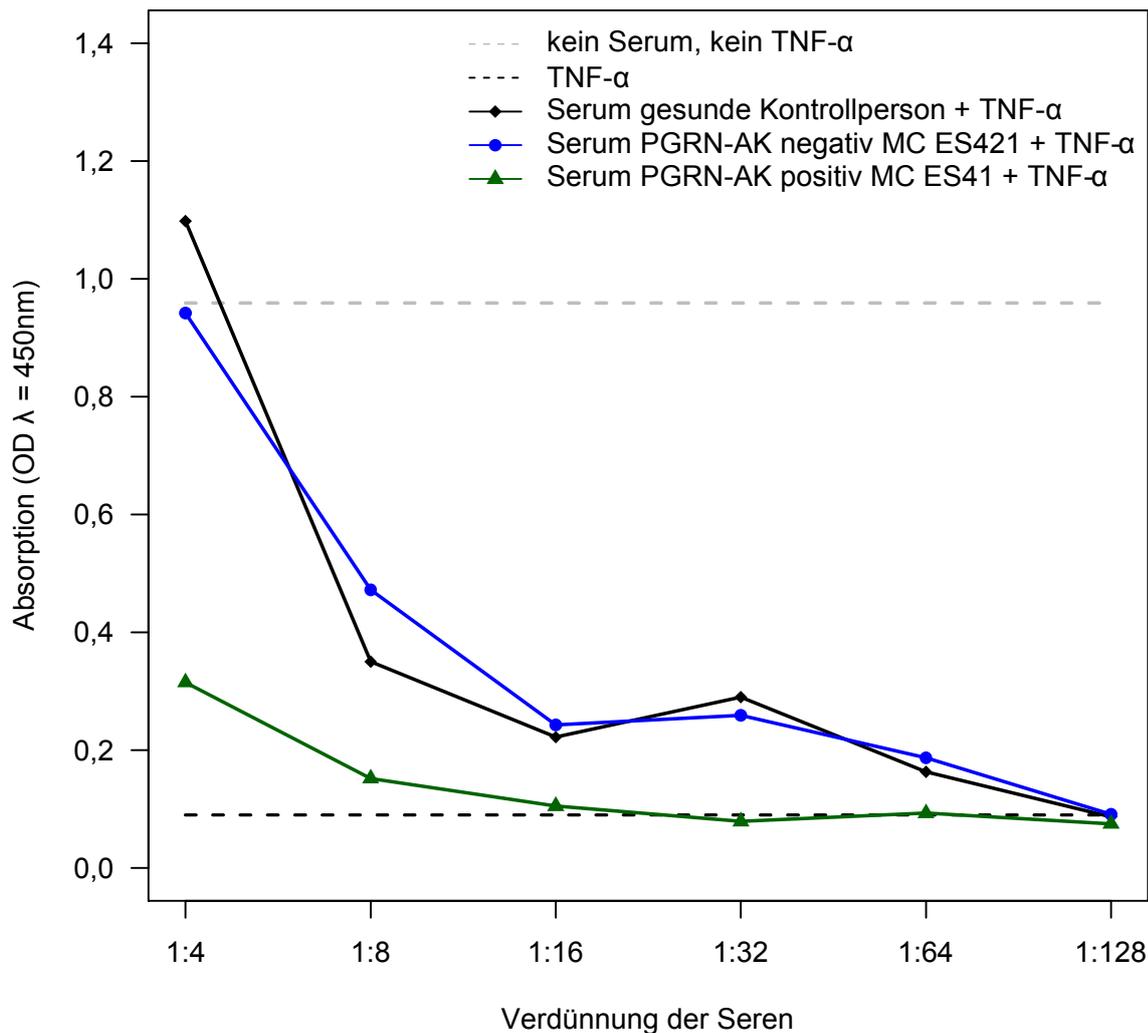


Abbildung 7. Einfluss des PGRN-Antikörperstatus von Morbus Crohn Seren auf die Zellproliferation von HT-29-Zellen im TNF- α -Assay. Die Abbildung zeigt die Absorption des Proliferationsassays mit HT-29-Zellen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$. Seren gesunder Kontrollpersonen und PGRN-AK negativer Patienten mit Morbus Crohn wirkten der TNF- α induzierten Proliferationshemmung entgegen. Dieser Effekt wird durch PGRN-AK bei Morbus Crohn neutralisiert.

Um mögliche sonstige Einflussfaktoren des Serums abgesehen von Progranulin bzw. PGRN-Antikörpern auszuschließen, wurden weiterhin Zellen mit rekombinantem PGRN, rekombinantem Paratarg-7 als Kontrolle und anti-PGRN-Fabs gegen den N-Terminus von PGRN inkubiert. Hierbei konnte die protektive, TNF- α antagonisierende Wirkung von PGRN abermals durch eine hohe Rate an metabolisch aktiven Zellen direkt belegt werden. Dieser protektive Effekt konnte durch die Zugabe rekombinanter anti-PGRN-Fabs aufgehoben werden (siehe Abbildung 8).

Im Vergleich der TNF- α antagonisierenden Wirkung waren sowohl das im Labor des José Carreras Zentrums hergestellte rekombinante PGRN wie auch kommerziell

erhältliches PGRN (AdipoGen®) wirksam, wobei das selbst hergestellte rekombinante PGRN einen stärkeren Effekt zeigte (siehe Abbildung 9).

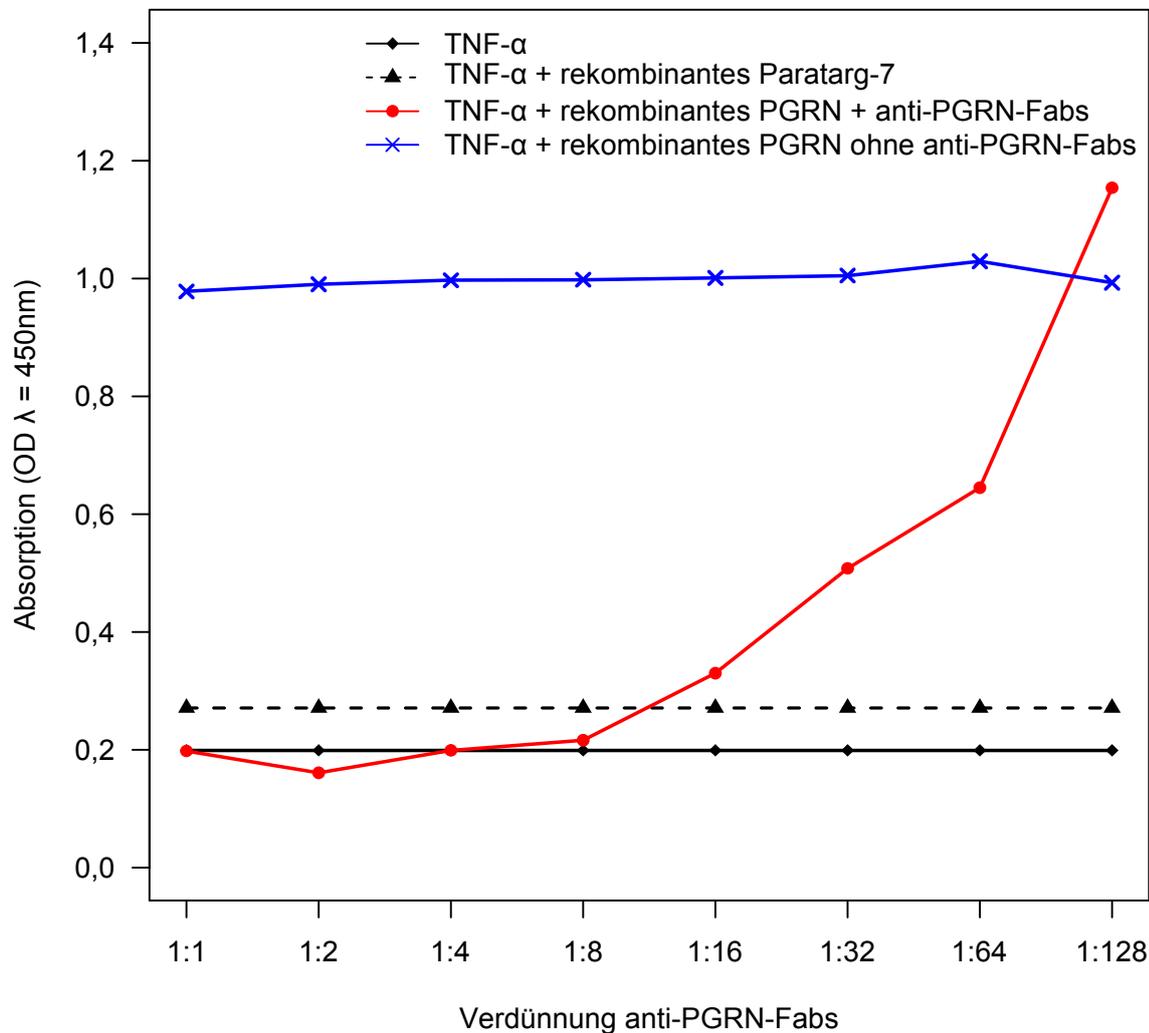


Abbildung 8. Einfluss von rekombinantem PGRN und anti-PGRN-Fabs auf die HT-29-Zellproliferation. Die Abbildung zeigt die Absorption des Proliferationsassays mit HT-29-Zellen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$. Eine geringe Absorption und damit geringe Proliferation der Zellen weisen die Ansätze mit TNF- α allein und TNF- α und Paratarg-7 als rekombinantem Kontrollprotein auf. Die Zugabe von rekombinantem PGRN zeigt im Gegensatz dazu durch den hohen Farbumschlag eine hohe Zellproliferation und damit eine protective Wirkung des PGRNs an. Diese protective und TNF- α antagonistische Wirkung des rekombinanten PGRNs kann durch die Zugabe von anti-PGRN-Fabs bis zu einer Verdünnung von 1:64 wieder aufgehoben werden.

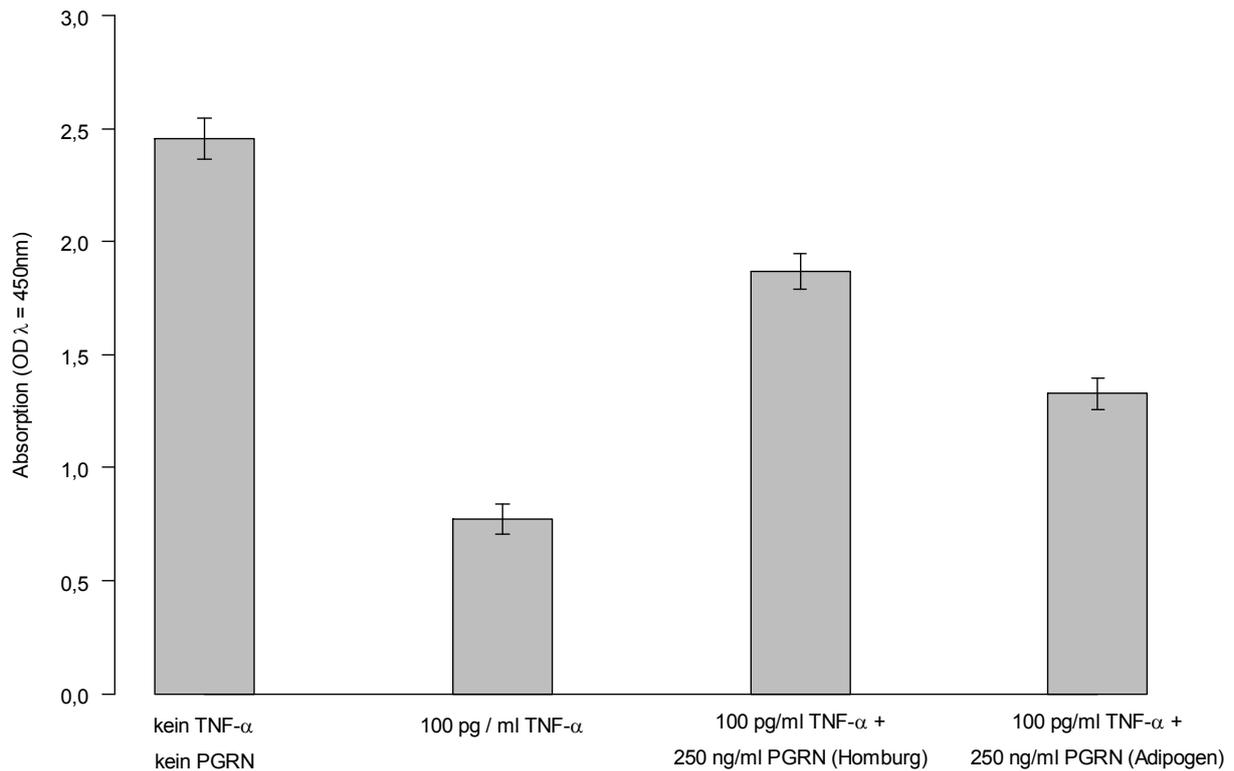


Abbildung 9. Anti-inflammatorische Wirkung von kommerziellem und nicht kommerziellem rekombinatem PGRN. Die Abbildung zeigt die Absorption des Proliferationsassays mit WEHI-S-Zellen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$. Verglichen wird hier das anti-inflammatorische Potential des im José Carreras Zentrum hergestellten rekombinanten PGRN mit dem eines kommerziell verfügbaren rekombinanten PGRN (AdipoGen®).

4.6 Auswirkung von PGRN und PGRN-Antikörpern auf die FOXP3-Expression CD4⁺CD25^{hi} regulatorischer T-Zellen

Es wurde die TNF- α induzierte FOXP3-Expression von CD4⁺CD25^{hi} Tregs nach Inkubation mit Etanercept, rekombinatem PGRN, rekombinatem Paratarg-7, rekombinanten anti-PGRN-Fabs und rekombinanten anti-Paratarg-7-Fabs mittels Western Blot untersucht (siehe Abbildung 10).

Die alleinige Zugabe von TNF- α zu den Zellen zeigte eine Herabregulation der FOXP3-Expression. Rekombinantes PGRN wirkte diesem Effekt durch TNF- α in ähnlich starkem Maße wie Etanercept entgegen und eine vermehrte Expression von FOXP3 konnte beobachtet werden. Durch Zugabe von PGRN-Fabs wurde die antagonisierende Wirkung von Progranulin inhibiert, nicht jedoch durch die Zugabe von Paratarg-7-Fabs. Paratarg-7 als Kontrollprotein hatte keinen Einfluss auf die Expression von FOXP3.

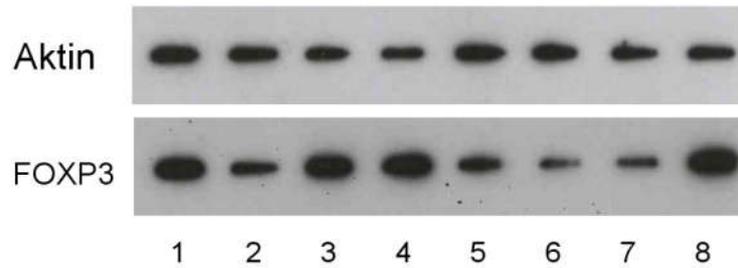


Abbildung 10. Bestimmung der FOXP3-Expression von CD4⁺CD25^{hi} Tregs im Western Blot. Untersucht wurde die Expression von FOXP3 in CD4⁺CD25^{hi} Tregs in einer Konzentration von 5×10^4 /ml nach Zugabe von **1** keiner weiteren Substanz, **2** TNF- α (50 ng/ml), **3** TNF- α und Etanercept (1 μ g/ml), **4** TNF- α und rekombinatem PGRN (250 ng/ml), **5** TNF- α und rekombinatem Paratarg-7 (250 ng/ml), **6** TNF- α , rekombinatem PGRN und rekombinanten anti-PGRN-Fab (1 μ g/ml), **7** TNF- α , rekombinatem Paratarg-7 und rekombinanten anti-PGRN-Fab, **8** TNF- α , rekombinatem PGRN und rekombinanten anti-Paratarg-7-Fab (1 μ g/ml). Der Nachweis von Aktin diente der Ladungskontrolle im Western Blot.

5 Diskussion

5.1 PGRN-Antikörper bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Mit dieser Arbeit wurde das Vorkommen von PGRN-Antikörpern bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. PGRN-Antikörper konnten bei 16,3 % der Patienten mit Morbus Crohn und bei 21,1 % der Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden. Keiner der für PGRN-Antikörper positiv getesteten Patienten mit Morbus Crohn wies bis zum Zeitpunkt der Probenahme axiale oder periphere Arthropathien auf und nur bei einem PGRN-Antikörper seropositiven Patienten mit Colitis ulcerosa lag eine axiale Arthropathie vor. Damit kommen PGRN-Antikörper neben Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises auch unabhängig von artikulärer Beteiligung bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa vor.

Von 12 Patienten mit Morbus Crohn und 7 Patienten mit Colitis ulcerosa lagen eine oder mehrere Verlaufspuren vor. Im Falle von Morbus Crohn war bei Patienten mit Verlaufspuren das Auftreten von PGRN-Antikörpern signifikant erhöht gegenüber Patienten mit einer Einzelprobe ($p = 0,005$). Unter der Annahme, dass PGRN-Antikörper vorübergehend auftreten können, wäre es in einer weiterführenden Arbeit interessant, eine größere Patientenzahl über einen längeren Zeitraum regelmäßig auf das Auftreten von PGRN-Antikörpern zu untersuchen, um mögliche Serokonversionen beobachten und deren Ursachen und gegebenenfalls klinischen Einfluss untersuchen zu können.

Ein weiterer Faktor, der die gezeigte Häufigkeit der PGRN-Antikörper in dieser Arbeit beeinflusst, ist die selektierte Gruppe von Patienten einer Hochschulambulanz mit vermehrt schweren Verläufen und einer hohen Rate an immunsuppressiver Therapie. Im Falle der Patienten mit Morbus Crohn befanden sich zum Zeitpunkt der Probenahme 91,5 % unter medikamentöser Therapie, darunter 28,7 % mit TNF- α -Blockern. Patienten mit Colitis ulcerosa befanden sich zu 88,7 % unter medikamentöser Therapie, darunter erhielten 11,1 % TNF- α -Blocker.

Der Frage nach verändertem Vorkommen verschiedener Antikörper unter immunsuppressiver Pharmakotherapie gingen Prideaux et al. in einer Metaanalyse nach (Prideaux et al. 2012). In nur wenigen Arbeiten zu diesem Thema wurde bei Morbus Crohn beobachtet, dass der ASCA-Status während einer Therapie mit Steroiden oder Mesalazin stabil bleibt (Teml et al. 2003), ebenso während und nach

einer Induktionstherapie mit Infliximab (Lonnkvist et al. 2009; Landers et al. 2002). Die Frage nach der Serokonversion bei PGRN-Antikörpern unter immunsuppressiver Therapie könnte durch eine prospektive Arbeit untersucht werden.

Die Titer der PGRN-Antikörper bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa lagen mit bis zu 1:3200 im Bereich der Vaskulitiden, des systemischen Lupus erythematodes und der rheumatoiden Arthritis (Thurner, Preuss, et al. 2013; Thurner, Zaks, et al. 2013).

Bei der Untersuchung der Immunglobulinklassen und IgG-Subklassen zeigte sich, dass PGRN-Antikörper meist Immunglobuline der IgG1-Subklasse sind. Die Dominanz der IgG-Fraktion allgemein, und speziell von IgG1, wurde auch von Kett et al. in Gewebeproben entzündlicher Darmabschnitte von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachgewiesen (Kett et al. 1987). PGRN-Antikörper, die bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises nachgewiesen wurden, waren ausschließlich vom Typ IgG1, IgG2 und IgG3 mit einer starken Prädominanz der IgG1-Subklasse (Thurner, Preuss, et al. 2013; Thurner, Zaks, et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnten wir bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehäuft PGRN-Antikörper vom Typ IgA nachweisen, was stark für eine Beteiligung der B-Zellen der intestinalen Mukosa spricht.

5.2 Klinische Bedeutung der PGRN-Antikörper

Bei der Colitis ulcerosa sind mit pANCA (Saxon et al. 1990) und Tropomyosin-Antikörpern (Geng et al. 1998) zwei klassische Autoantikörper bekannt. Seibold et al. untersuchten Kreuzreaktionen zwischen intestinalen Bakterien und humaner Myeloperoxidase, sodass pANCA im Rahmen molekularer Mimikry gebildet werden könnten (Seibold et al. 1998). Für pANCA konnten keine Assoziationen mit der Krankheitsaktivität oder dem Ausmaß der Erkrankung beobachtet werden (Saxon et al. 1990; Bansi et al. 1996).

Tropomyosin-Antikörper traten überwiegend gegen die Tropomyosin Isoform 5 (hTM5) auf und führten in vitro zur Ablagerung des Komplementfaktors C3b mit anschließender Lyse von Epithelzellen (Ebert et al. 2009). Da diese Ablagerungen ausschließlich in Dickdarmproben von Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen wurden, könnten anti-hTM5 Autoantikörper für Colitis ulcerosa pathogenetisch relevant sein.

Für Morbus Crohn konnten bisher keine klassischen Autoantikörper identifiziert werden, die eine pathogenetische Rolle spielen. ANCA wurden in nur geringer Häufigkeit und unabhängig von Aktivität und Ausmaß der Erkrankung nachgewiesen, sämtliche andere Antikörper sind gegen bakterielle Antigene gerichtet und stellen damit keine klassischen Autoantikörper dar (Prideaux et al. 2012; Bansi et al. 1996). Neben dem Nachweis von PGRN-Antikörpern als klassischem Autoantikörper bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Untersuchung von Assoziationen zwischen dem Auftreten von PGRN-Antikörpern und klinischen Charakteristika. Eine Einschränkung in der Aussagekraft der folgenden Ergebnisse ist jedoch bedingt durch die geringe Zahl der für PGRN-Antikörper positiv getesteten Patienten; für Morbus Crohn sind es 23 und für Colitis ulcerosa 15. Um belastbarere Ergebnisse zu erhalten, müssten die Untersuchungen zu Assoziationen zwischen dem Auftreten von PGRN-Antikörpern und klinischen Charakteristika in einer weiterführenden Arbeit mit einer größeren Anzahl PGRN-Antikörper positiver Patienten durchgeführt werden.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse sind PGRN-Antikörper nicht geeignet als prognostischer Marker, da kein Zusammenhang zwischen ihrem Auftreten und der Aktivität der Erkrankung, schwierigen Verläufen wie strikturierende und/oder fistulierende Verläufe bei Morbus Crohn oder notwendigen chirurgischen Interventionen beider Erkrankungen gezeigt werden konnte.

Weder für Morbus Crohn noch für Colitis ulcerosa konnte das Auftreten von PGRN-Antikörpern zudem mit der Lokalisation und dem Ausmaß der Erkrankung, sowie extraintestinalen Manifestationen und assoziierten Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Damit sind PGRN-Antikörper bis zu diesem Zeitpunkt als Verlaufsparemeter ungeeignet, wobei auch hier mehr Verlaufsparemen notwendig wären, um solidere Ergebnisse zu erhalten.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von PGRN-Antikörpern und bestimmten medikamentösen Therapien beobachtet werden. Der PGRN-Antikörperstatus könnte klinisch dennoch in Zukunft interessant werden, da die Zunahme an Biologika, deren Einsatz mit hohen Jahrestherapiekosten einhergeht, eine zielgerichtete Therapie notwendig macht und damit zukünftig die vorhergehende Bestimmung des Antikörperstatus und relevanter Genmutationen rechtfertigen würde, um eventuell eine prädiktive Aussage für den Erfolg bestimmter Therapien zu erhalten.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist dieses Vorgehen nicht empfohlen (Dignass, Eliakim, et al. 2012; van Assche et al. 2010).

Hinsichtlich der Frage, ob PGRN-Antikörper diagnostisch relevant sind, wurden Assoziationen zu ANCA und ASCA untersucht. PGRN-Antikörper kommen nicht gehäuft mit pANCA/cANCA bei Colitis ulcerosa oder ASCA bei Morbus Crohn vor, jedoch kommen PGRN-Antikörper bei Colitis ulcerosa häufiger vor als pANCA, und pANCA und cANCA zusammen. Hingegen wurden bei Morbus Crohn ASCA häufiger nachgewiesen als PGRN-Antikörper. Aufgrund des Vorkommens von PGRN-Antikörpern bei beiden Erkrankungen sowie Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises sind sie nicht als spezifischer differentialdiagnostischer Marker geeignet. Sie könnten aber durchaus bei der Differenzierung zwischen infektiöser Enteritis und chronisch entzündlicher Darmerkrankung helfen.

5.3 PGRN als endogener TNF- α -Blocker und Wirkung der PGRN-Antikörper

Die Rolle von PGRN als endogenem TNF- α -Blocker wurde inzwischen in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben. Die Klärung des Mechanismus, über den PGRN wirkt, gelang Tang et al. Die Arbeitsgruppe identifizierte PGRN als hochaffinen Liganden für TNFR1 und 2, der mit TNF- α um die Bindungsstelle konkurriert (Tang et al. 2011). Zudem wurde nachgewiesen, dass PGRN TNF- α vermittelte Signalwege inhibiert und damit in vivo stark anti-inflammatorisch bei Kollagen-induzierter und anti-Kollagen Antikörper induzierter Arthritis wirkt (Tang et al. 2011). Dieses Ergebnis wurde zunächst von Chen et al. und Etemadi et al. infrage gestellt, da sie die Interaktion von PGRN mit TNFR1 und 2 nicht bestätigen konnten (Chen et al. 2013; Etemadi et al. 2013). Die Bindung ist aufgrund der komplexen Faltung durch die Vielzahl an Disulfidbrücken des PGRNs nicht einfach nachzuweisen, konnte jedoch in den folgenden Arbeiten bestätigt werden. PGRN bindet an CRD2 und CRD3 von TNFR1 und 2 (Jian et al. 2013), diese Domänen sind auch für die Bindung von TNF- α essentiell (Sfikakis & Tsokos 2011). Die Bindung von PGRN an TNFR2 zeigte in einem weiteren Mausmodell anti-inflammatorische Effekte bei einer durch Lipopolysaccharide induzierten akuten Lungenschädigung (Guo et al. 2012) und eine verbesserte Heilungsrate von Knochendefekten (Zhao et al. 2013). Li et al. fanden heraus, dass die PGRN/TNFR2-Interaktion eine wichtige Rolle bei der Regulation der

zellulären Antwort auf ER-Stress spielt. PGRN verstärkt die Antwort auf fehlerhaft oder ungefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum durch Aktivierung des Erk1/2- und Akt-Signalwegs, verhindert jedoch die durch ER-Stress induzierte Apoptose. Diese Funktion von PGRN wird nur über die Aktivierung von TNFR2 vermittelt, nicht über TNFR1 (Li et al. 2014).

Darüber hinaus bestätigten Liu et al. die Bindung von Atsttrin an TNFR1 und 2 und konnten Atsttrin als inhibitorischen Liganden für DR3 (TNFRSF25), einem weiteren Rezeptor der TNF-Rezeptor-Superfamilie, identifizieren. Atsttrin, wie auch PGRN, inhibierte die durch TL1A vermittelten Effekte nach Bindung an DR3. Die mögliche Bedeutung der PGRN/DR3-Interaktion für die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird in 5.4 genauer diskutiert. So wird bis zu diesem Zeitpunkt angenommen, dass PGRN über die Inhibierung von TNFR1 und DR3 und die Aktivierung von TNFR2 seine TNF- α , bzw. TL1A antagonisierenden Effekte vermittelt. Die Untersuchung der Bindung von PGRN an verschiedene Rezeptoren war nicht Gegenstand dieser Arbeit, jedoch wurde die TNF- α antagonisierende Wirkung von PGRN direkt und indirekt durch Neutralisierung der Wirkung durch PGRN-Antikörper nachgewiesen.

In dem in dieser Arbeit verwendeten Proliferationsassay wurde die proliferationshemmende Wirkung von TNF- α auf murine WEHI-S-Zellen durch Zugabe von rekombinantem PGRN inhibiert. Diese, über die Hemmung von TNF- α vermittelte, anti-inflammatorische und antiapoptotische Wirkung von PGRN, konnte wiederum durch die Zugabe von rekombinanten anti-PGRN-Fabs aufgehoben werden. Anti-PGRN-Fabs neutralisierten die Wirkung von PGRN bis zu einer Verdünnung von 1:8 vollständig und wirkten damit proinflammatorisch. Der Proliferationsassay wurde mit rekombinantem PGRN, das im Labor des José Carreras Zentrums hergestellt wurde, durchgeführt und zusätzlich mit kommerziell erwerblichem rekombinanten PGRN von AdipoGen[®]. Bei der Kontroverse um die Bindung von PGRN an TNFR1 und 2 vermuteten Liu et al., dass eine korrekte Faltung des PGRN essentiell ist, um die Interaktion mit den TNF-Rezeptoren zu untersuchen und nicht alle kommerziellen Anbieter dies gewährleisten. Die Ergebnisse unseres Proliferationsassays konnten mit kommerziell verfügbarem PGRN (AdipoGen[®]) reproduziert werden.

Der Proliferationsassay wurde auch mit Seren von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa durchgeführt. Die hemmende Wirkung von TNF- α auf die Proliferation der in diesem Ansatz verwendeten HT-29-Zellen wurde durch Zugabe von Serum von

Patienten ohne PGRN-Antikörper antagonisiert. Dieser anti-inflammatorische Effekt zeigte sich deutlich verringert durch Zugabe von Serum von Patienten mit PGRN-Antikörpern. PGRN-Antikörper hatten einen ebenso proinflammatorischen Effekt wie die anti-PGRN-Fabs im Proliferationsassay.

Von Bedeutung ist hier zudem die Untersuchung des PGRN-Plasmaspiegels von Patienten mit und ohne Antikörper gegen PGRN. Die neutralisierende Wirkung von PGRN-Antikörpern konnte eindeutig belegt werden, da alle untersuchten seropositiven Patienten einen stark verminderten PGRN-Plasmaspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und Patienten ohne PGRN-Antikörper aufwiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass PGRN-Antikörper über die Verringerung des PGRN-Plasmaspiegels pathogenetisch wirksam sind.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Etanercept bei rheumatischen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt wird (Moreland 1997; Weinblatt et al. 1999), nicht aber bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Sandborn et al. 2001).

O'Toole et al. beschrieben zudem 443 Fälle einer neu aufgetretenen chronisch entzündlichen Darmerkrankung unter Therapie mit Etanercept bei einer rheumatischen Grunderkrankung (O'Toole et al. 2016). Das Fusionsprotein Etanercept besteht aus dem Fc-Teil von IgG1 und dem löslichen TNFR2. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern wie Infliximab oder Adalimumab, die spezifisch TNF- α binden, könnte an Etanercept neben TNF- α auch PGRN binden, da PGRN mit einer um ein Vielfaches höheren Affinität an TNFR2 bindet als TNF- α (Tang et al. 2011). Bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ist sowohl die Expression von TNF- α (Atreya et al. 2011), als auch die Expression von PGRN in entzündetem intestinale Gewebe gesteigert (Wei, Zhang, Jian, et al. 2014). Der vermutliche Abfall des PGRN-Spiegels verursacht durch Etanercept, ginge mit einem Überwiegen der proinflammatorischen, TNF- α vermittelten Effekte einher und könnte in genetisch prädisponierten Patienten die Entwicklung von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa beschleunigen. Diese Vermutung muss allerdings noch experimentell bestätigt werden.

5.4 Bedeutung der PGRN-Antikörper in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Die TNF- α antagonisierenden Effekte von PGRN zeigen dessen Bedeutung im Rahmen entzündlicher Prozesse und indirekt die Bedeutung von PGRN-Antikörpern

durch ihre neutralisierende Wirkung. In diesem Abschnitt wird nun diskutiert, über welche Mechanismen PGRN-Antikörper darüber hinaus die Entstehung oder die Aggravation von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa begünstigen könnte.

Liu et al. identifizierten DR3 neben TNFR1 und 2 als weiteren Rezeptor, an den PGRN bindet und die Wirkung von TL1A direkt inhibiert (Liu et al. 2014). TL1A wird vorwiegend von aktivierten Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen gebildet (Bamias et al. 2003) und bindet an DR3, der ebenfalls von aktivierten Lymphozyten exprimiert wird und bei Aktivierung Apoptose oder den NF- κ B-Signalweg induziert (Migone et al. 2002).

Eine Hochregulierung der Expression von TL1A und DR3 wurde in verschiedenen Arbeiten für rheumatoide Arthritis (Cassatella et al. 2007) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen gezeigt (Bamias et al. 2003; Bamias et al. 2006; Takedatsu et al. 2009). Dabei korrelierte in Gewebeproben unterschiedlicher Darmabschnitte von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa die Expression von TL1A und DR3 mit der Schwere der Entzündung (Bamias et al. 2003). In vitro konnte gezeigt werden, dass TL1A die Sekretion vor allem von IFN- γ und IL-17 von TH1- und TH17-Zellen steigert und damit auch die TH1- und TH17-Antwort verstärkt (Takedatsu et al. 2009) und zum Zytokinprofil des Morbus Crohn beiträgt.

IL-23, welches eine große Rolle in der Pathogenese der Colitis ulcerosa spielt, wirkt ebenfalls synergistisch mit TL1A und steigert die Produktion von IFN- γ von TH1- und TH17-Zellen (Takedatsu et al. 2009), was die Entzündung sowohl von Colitis ulcerosa als auch von Morbus Crohn unterhält. Die TL1A/DR3-Interaktion dient dabei nicht der Differenzierung von T-Zellen, sondern vielmehr deren Proliferation und Zytokinproduktion. DR3 ist damit entscheidend an der Pathogenese T-Zell vermittelter Autoimmunerkrankungen und Entzündungen beteiligt (Meylan et al. 2008; Meylan et al. 2011). Im TNBS-induzierten murinen Kolitismodell, einem Modell für vorwiegend CD4⁺ T-Zell vermittelte Kolitis (Wirtz et al. 2007), wurden durch Blockade der TL1A/DR3-Interaktion mittels anti-TL1A Antikörper signifikante anti-inflammatorische Effekte nachgewiesen (Meylan et al. 2011). Liu et al. zeigten, dass Atsttrin dosisabhängig die TL1A/DR3-Interaktion und die für TL1A charakteristische Genexpression verhindert (Liu et al. 2014).

Zudem verabreichten sie Atsttrin erstmals an Mäuse mit DSS-induzierter Kolitis und konnten eine signifikante klinische Besserung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten. PGRN wirkt wie das Derivat Atsttrin antagonistisch auf TL1A und damit

anti-inflammatorisch über die Bindung an DR3. Ist diese Gegenregulation durch einen verminderten PGRN-Spiegel bei Vorhandensein von PGRN-Antikörpern abgeschwächt, könnten proinflammatorische Effekte von TL1A überwiegen und durch entsprechende Zytokinproduktion die Polarisierung hin zu einer TH1-Antwort verursachen. Der Einsatz von Atsttrin könnte, wie Liu et al. bereits zeigten, dem abgeschwächten anti-inflammatorischen Einfluss des endogenen PGRN bei Patienten mit PGRN-Antikörpern entgegenwirken.

In einem weiteren Experiment untersuchten wir anhand der FOXP3-Expression, wie rekombinantes humanes PGRN und PGRN-Antikörper die Wirkung von TNF- α auf CD4⁺CD25^{hi} Tregs beeinflussen. FOXP3 ist unentbehrlich für die Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen (Fontenot et al. 2003) und Mutationen im FOXP3-Gen können mit dem IPEX-Syndrom, einem gravierenden Immundefekt mit X-chromosomalem Erbgang mit Polyendokrinopathie, Autoimmunenteropathie und autoimmunen Hautmanifestationen einhergehen (Bennett et al. 2001; Wildin et al. 2001).

TNF- α inhibiert über TNFR2 die regulatorische Funktion von CD4⁺CD25^{hi} Tregs, was mit einer Herunterregulierung von FOXP3 assoziiert ist (Valencia et al. 2006).

Eine Kokultur von CD4⁺CD25^{hi} Tregs mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Anwesenheit von TNF- α zeigte in den ersten 48 Stunden durch die Proliferation der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen eine Aufhebung der Suppression durch Tregs an (Valencia et al. 2006) und Fontenot et al. wiesen nach, dass das Level der FOXP3-Expression mit der supprimierenden Wirkung von Tregs auf T-Effektorzellen, vor allem CD4⁺CD25⁻ und CD8⁺ T-Zellen, korreliert (Fontenot et al. 2003).

Nach Inkubation der humanen CD4⁺CD25^{hi} T-Zellen mit rekombinatem PGRN und TNF- α konnten wir eine gesteigerte Expression von FOXP3 und damit eine anti-inflammatorische Wirkung durch die Antagonisierung von TNF- α durch PGRN nachweisen. Eine ebenso deutliche Verminderung der FOXP3-Expression wie unter TNF- α allein war nach der Zugabe rekombinanter anti-PGRN-Fabs zu rekombinatem PGRN und TNF- α zu beobachten. Das Vorhandensein rekombinanter anti-PGRN-Fabs ging mit einer verminderten Expression von FOXP3 einher und wirkt sich damit höchstwahrscheinlich auf die regulatorische Funktion der CD4⁺CD25^{hi} T-Zellen aus.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Wei et al. indem sie zeigten, dass PGRN-defiziente CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im Vergleich mit Wildtyp-Tregs signifikant

weniger CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in ihrer Proliferation hemmen (Wei, Zhang, Zhao, et al. 2014). Zudem wiesen sie in einem murinen Kollagen-induzierten Arthritismodell nach, dass in einer entzündlichen Umgebung das Fehlen von PGRN die Anzahl der Tregs verringert. Eine Verminderung von Tregs geht allgemein mit einer erhöhten Suszeptibilität für verschiedene Autoimmunerkrankungen einher, was in einer Reihe von Mausmodellen und durch Untersuchungen an Patienten belegt wurde (Asano et al. 1996; Sullivan et al. 2002; Fontenot et al. 2003).

Neutralisierende PGRN-Antikörper, die einen verminderten PGRN-Spiegel verursachen, könnten somit zum einen über die Herabsetzung der regulatorischen Funktion der CD4⁺CD25^{hi} T-Zellen, zum anderen über die Verminderung der Anzahl von Tregs proinflammatorisch wirken.

Ein weiteres Charakteristikum CD4⁺CD25⁺ Tregs ist die Sekretion von IL-10, einem wichtigen anti-inflammatorischen Zytokin chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. IL-10 hemmt die Aktivierung von Makrophagen und deren Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α und IFN- γ (Fiorentino et al. 1991a; Fiorentino et al. 1991b) und damit auch die von Makrophagen vermittelte Differenzierung zu TH1-Zellen (Hsieh et al. 0992, 0993). IL-10 Knockout-Mäuse entwickeln spontan chronische Enterokolitiden mit Wachstumsretardierung und Anämie (Kühn et al. 1993; Berg et al. 1996). IL-10-Rezeptor Knockout-Mäuse zeigen ebenfalls spontane Enterokolitiden und mit erhöhten Spiegeln an IFN- γ , IL-12 und IL-6 ein Zytokinprofil, das jenem des Morbus Crohn ähnelt (Shouval et al. 2014).

In diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Wei et al. interessant, die die Rolle von PGRN in der Entwicklung und Erhaltung von Kolitiden untersucht (Wei, Zhang, Jian, et al. 2014). Im PGRN^{-/-} Mausmodell wurde gezeigt, dass das Fehlen von PGRN zwar zu keiner spontanen Kolitis führt, eine DSS-induzierte Kolitis aber verstärkt wird und zu einem schwereren Verlauf führt als in der Kontrollgruppe. PGRN-defiziente Mäuse zeigten signifikant mehr Gewichtsverlust, verringerte Stuhlkonsistenz und häufigere Blutungen bei insgesamt deutlich erhöhter Mortalität. Die Applikation von rekombinantem PGRN bewirkte wie schon bei der Kollagen-induzierten Arthritis im Mausmodell (Tang et al. 2011) eine signifikante klinische und histologische Besserung. Wei et al. zeigten, dass die Symptombesserung durch rekombinantes PGRN durch den IL-10-Signalweg vermittelt wird. Bei der Applikation von rekombinantem PGRN und anti-IL-10-Rezeptor Antikörper an Wildtyp-Mäuse mit TNBS-induzierter Kolitis und der Applikation von rekombinantem PGRN an IL-10 Knockout-Mäuse waren die

anti-inflammatorischen Effekte des PGRN aufgehoben. Gewichtsverlust, Ulzerationen und veränderte Kryptenarchitektur des Kolons konnten in beiden Gruppen nachgewiesen werden (Wei, Zhang, Jian, et al. 2014). Die Verabreichung von rekombinantem PGRN und Atsttrin an Wildtyp-Mäuse mit CIA- und DSS-induzierter Kolitis führte jeweils zu einer signifikanten Hochregulierung von IL-10 (Tang et al. 2011; Wei, Zhang, Jian, et al. 2014). Ein verringerter IL-10-Spiegel, wie er bei PGRN-Defizienz nachgewiesen wurde (Wei, Zhang, Jian, et al. 2014), könnte somit ein weiterer proinflammatorischer Mechanismus von PGRN-Antikörpern sein.

Ein verminderter IL-10-Spiegel wirkt sich nicht nur proinflammatorisch auf Makrophagen aus, sondern beeinträchtigt zudem Tregs in ihrer supprimierenden Funktion, da unter anderem IL-10 zur Aufrechterhaltung der FOXP3-Expression benötigt wird (Shouval et al. 2014). PGRN-Antikörper könnten sich so abermals auf die Funktion von Tregs auswirken.

5.5 Perspektiven

Die beschriebenen Mechanismen, über die PGRN-Antikörper proinflammatorisch wirken könnten, leiten sich daraus ab, dass PGRN-Autoantikörper neutralisierend auf den PGRN-Plasmaspiegel wirken und dadurch anti-inflammatorische Effekte des endogenen PGRNs mehr oder weniger stark abgeschwächt werden. So könnten PGRN-Antikörper zu einem proinflammatorischen Milieu und zur Chronifizierung eines entzündlichen Geschehens beitragen. Welche Auswirkungen genau PGRN-Antikörper auf die TL1A/DR3-Interaktion, die Funktion der CD4⁺CD25^{hi} Tregs oder die IL-10-Homöostase haben, muss detaillierter in weiteren in vivo Experimenten untersucht werden. Die Behandlungsergebnisse des PGRN-Derivats Atsttrin in verschiedenen murinen Modellen waren bisher vielversprechend, sodass die Erforschung von PGRN und PGRN-Antikörpern auf zukünftig neue therapeutische Ansätze hoffen lässt.

6 Literaturverzeichnis

1. Abreu-Martin MT, Vidrich A, Lynch DH et al. (1995) Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen. *Journal of immunology* 155:4147–4154.
2. Appenrodt B, Grünhage F, Gentemann M et al. (2010) Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology* 51(4):1327–1333.
3. Asano M, Toda M, Sakaguchi N et al. (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of experimental medicine* 184(2):387–396.
4. Atreya R, Zimmer M, Bartsch B et al. (2011) Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14 + macrophages. *Gastroenterology* 141(6):2026–2038.
5. Avrameas S, Guilbert B (1971) A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *European journal of immunology* 1(5):394–396.
6. Bai XH, Wang D, Kong L et al. (2009) ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Molecular and cellular biology* 29(15):4201–4219.
7. Baker M, Mackenzie I, Pickering-Brown S et al. (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 442(7105):916–919.
8. Bamias G, Martin C, Marini M et al. (2003) Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease. *Journal of immunology* 171(9):4868–4874.
9. Bamias G, Mishina M, Nyce M et al. (2006) Role of TL1A and its receptor DR3 in two models of chronic murine ileitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(22):8441–8446.

10. Bansi DS, Chapman RW, Fleming KA (1996) Prevalence and diagnostic role of antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 8:881–885.
11. Barreau F, Meinzer U, Chareyre F et al. (2007) CARD15/NOD2 is required for Peyer's Patches homeostasis in mice. *PLoS ONE*, 2(6):e523.
12. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL et al. (2009) Genome-wide association defines more than thirty distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics* 40(8):955–962.
13. Baumgart DC (2009) Diagnostik und Therapie von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. *Deutsches Ärzteblatt international* 106(8):123–133.
14. Baumgart DC, Sandborn WJ (2012) Crohn's disease. *Lancet* 6736(12):1–16.
15. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. (2001) The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27(1):20–21.
16. Berg DJ, Davidson N, Kühn R et al. (1996) Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4+ Th1-like responses. *Journal of Clinical Investigation* 98(4):1010–1020.
17. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD et al. (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4:4–9.
18. Berson SA, Yalow RA, Baumann A et al. (1956) Insulin-I131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *The Journal of clinical investigation* 35(2):170–190.
19. Best WR, Beckett JM, Singleton JW et al. (1976) Development of a Crohn's disease activity index. National cooperative Crohn's disease study. *Gastroenterology* 70(3):439–444.
20. Brandtzaeg P, Carlsen HS, Halstensen TS (2006) The B-cell system in inflammatory bowel disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 579:149–167.

21. Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V et al. (2007) Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 5(1):24–32.
22. Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* 112(2):195–203.
23. Cassatella MA, da Silva GP, Tinazzi I et al. (2007) Soluble TNF-like cytokine (TL1A) production by immune complexes stimulated monocytes in rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology* 178:7325–7333.
24. Chapman PB, Lester TJ, Casper ES et al. (1987) Clinical pharmacology of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 5(12):1942–1951.
25. Chen X, Chang J, Deng Q et al. (2013) Progranulin does not bind tumor necrosis factor (TNF) receptors and is not a direct regulator of TNF-dependent signaling or bioactivity in immune or neuronal cells. *The Journal of neuroscience* 33(21):9202–9213.
26. Cua DJ, Tato CM (2010) Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews. Immunology* 10(7):479–489.
27. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM et al. (2002) The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122(4):867–874.
28. Daniel R, He ZH, Carmichael KP et al. (2000) Cellular localization of gene expression for progranulin. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* 48(7):999–1009.
29. Daniel R, Daniels E, He Z et al. (2003) Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development. *Developmental Dynamics* 227(4):593–599.
30. De Haard HJ, Van Neer N, Hufton SE (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(26):18218–18230.

31. Dignass A, Eliakim R, Magro F et al. (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* 6(10):965–990.
32. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A et al. (2012) Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 2: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* 6(10):991–1030.
33. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO et al. (2010) The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* 4(1):28–62.
34. Dörner T, Lipsky PE (2005) Molecular basis of immunoglobulin variable region gene usage in systemic autoimmunity. *Clinical and experimental medicine* 4(4):159–69.
35. Ebert EC, Geng X, Bajpai M et al. (2009) Antibody to tropomyosin isoform 5 and complement induce the lysis of colonocytes in ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* 104(12):2996–3003.
36. Economou M, Trikalinos TA, Loizuo KT et al. (2004) Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: A metaanalysis. *American Journal of Gastroenterology* 99(12):2393–2404.
37. Egashira Y, Suzuki Y, Azuma Y et al. (2013) The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment. *Journal of neuroinflammation* 10(1):105.
38. Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9):871–874.
39. Espevik T, Nissen-Meyer J (1986) A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *Journal of Immunological Methods* 95(1):99–105.
40. Etemadi N, Webb A, Bankovacki A et al. (2013) Progranulin does not inhibit TNF and lymphotoxin- α signalling through TNF receptor 1. *Immunology and cell biology* 91(10):661–664.
41. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P et al. (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of Immunology* 146(10):3444–3451.

42. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR et al. (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of immunology* 147(11):3815–3822.
43. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology* 4(4):330–336.
44. Fritz J, Le Bourhis, Magalhaes JG et al. (2008) Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. *Trends in immunology* 29(1):41–49.
45. Gauld SB, Benschopp RJ, Merrell KT et al. (2005) Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nature immunology* 6(11):1160–1167.
46. Gay D, Saunders T, Camper S et al. (1993) Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *The Journal of experimental medicine* 177(4):999–1008.
47. Geng X, Biancone L, Hui Hui Dai et al. (1998) Tropomyosin isoforms in intestinal mucosa: Production of autoantibodies to tropomyosin isoforms in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 114(5):912-922.
48. Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S et al. (1988) Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334(6184):676–682.
49. Gu C, Wu L, Li X (2013) IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 64(2):477–485.
50. Guo Z, Li Q, Han Y et al. (2012) Prevention of lps-induced acute lung injury in mice by progranulin. *Mediators of Inflammation* 2012:540794.
51. Harvey RF, Bradshaw JM (1980) A simple index of Crohn's disease activity. *The Lancet* 315(8167):514.
52. He Z, Ong CHP, Halper J et al. (2003) Progranulin is a mediator of the wound response. *Nature medicine* 9(2):225–229.
53. Held G, Wadle A, Dauth N et al. (2007) MHC-peptide-specific antibodies reveal inefficient presentation of an HLA-A*0201-restricted, Melan-A derived

peptide after active intracellular processing. *European Journal of Immunology* 37(7):2008–2017.

54. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE et al. (2002) Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 17(5):629–638.
55. Heller F, Florian P, Bojarski C et al. (2005) Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129(2):550–564.
56. Hoffmann JC, Zeitz M, Bischoff SC et al. (2004) Diagnostik und Therapie der Colitis Ulcerosa: Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen zusammen mit dem Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 42(9):979–983.
57. Hrabal R, Chen Z, James S et al. (1996) The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. *Nature structural biology* 3(9):747–752.
58. Hugo JP, Chamaillard M, Zouali H et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):599–603.
59. Jian J, Zhao S, Tian Q et al. (2013) Progranulin directly binds to the CRD2 and CRD3 of TNFR extracellular domains. *FEBS Letters* 587(21):3428–3436.
60. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ et al. (2010) Circulating Th17, Th22 and Th1 cells are increased in psoriasis. *The Journal of investigative Dermatology* 130(5):1373–1383.
61. Kawase R, Ohama T, Matsuyama A et al. (2013) Deletion of progranulin exacerbates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Cardiovascular Research* 100(1):125–133.
62. Kessenbrock K, Fröhlich L, Sixt M et al. (2008) Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *Journal of Clinical Investigation* 118(7):2438–2447.

63. Kessenbrock K, Dau T, Jenne DE (2011) Tailor-made inflammation: How neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response. *Journal of Molecular Medicine* 89(1):23–28.
64. Kett K, Rognum TO, Brandtzaeg P (1987) Mucosal subclass distribution of immunoglobulin G-producing cells is different in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Gastroenterology* 93(5):919–924.
65. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y et al. (2005) Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307(5710):731–734.
66. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T et al. (2008) IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57:1682–1689.
67. Kühn R, Löhler J, Rennick D et al. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75(2):263–274.
68. Landers CJ, Cohavy O, Misra M et al. (2002) Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 123(3):689–699.
69. Li M, Liu Y, Xia F et al. (2014) Progranulin is required for proper ER stress response and inhibits ER stress-mediated apoptosis through TNFR2. *Cellular Signalling* 26(7):1539–1548.
70. Liu C, Li XX, Gao W et al. (2014) Progranulin-derived Atsttrin directly binds to TNFRSF25 (DR3) and inhibits TNF-like ligand 1A (TL1A) activity. *PLoS ONE* 9(3):e92743.
71. Lonnkvist MH, Befrits R, Lundberg J et al. (2009) Infliximab in clinical routine: experience with Crohn's disease and biomarkers of inflammation over 5 years. *European journal of gastroenterology & hepatology* 21(10):1168–1176.
72. Matsuda R, Koide T, Tokoro C et al. (2009) Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 15(3):328–334.

73. Matusevicius D, Kivisäkk P, He B et al. (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 5(2):101–104.
74. Merrell KT, Benschop RJ, Gauld SB et al. (2006) Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* 25(6):953–962.
75. Meylan F, Davidson TS, Kahle E et al. (2008) The Tumor Necrosis Factor-Family Receptor DR3 is essential for diverse T-cell mediated inflammatory diseases. *Immunity* 29(1):79–89.
76. Meylan F, Song YJ, Fuss I et al. (2011) The TNF-family cytokine TL1A drives IL-13-dependent small intestinal inflammation. *Mucosal immunology* 4(2):172–185.
77. Migone TS, Zhang J, Luo X et al. (2002) TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator. *Immunity* 16(3):479–492.
78. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM et al. (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 142(1):46–54.
79. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH et al. (1997) Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)–Fc fusion protein. *The New England Journal of Medicine* 337:141–147.
80. Nemazee DA, Burki K, (1989) Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* 337(6207):562–566.
81. Neurath MF (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 14:329–342.
82. O’Toole A, Lucci M, Korzenik J, (2016) Inflammatory bowel disease provoked by Etanercept: Report of 443 possible cases combined from an IBD referral center and the FDA. *Digestive Diseases and Sciences* 61(6):1772–1774.
83. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411(6837):603–606.

84. Ordás I, Eckmann L, Talamini M et al. (2012) Ulcerative colitis. *Lancet* 380(9853):1606–1619.
85. Park B, Buti L, Lee S et al. (2011) Granulin is a soluble cofactor for Toll-like Receptor 9 signaling. *Immunity* 34(4):505–513.
86. Preuss KD, Pfreundschuh M, Ahlgrimm M et al. (2009) A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *International Journal of Cancer* 125(3):656–661.
87. Preuss KD, Pfreundschuh M, Fadle N et al. (2011) Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A. *Blood* 118(12):3340–3346.
88. Prideaux L, De Cruz P, Ng SC et al. (2012) Serological antibodies in inflammatory bowel disease: A systematic review. *Inflammatory Bowel Diseases* 18(7):1340–1355.
89. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S et al. (2001) Etanercept for active Crohn's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 121(5):1088–1094.
90. Saxon A, Shanahan F, Landers C et al. (1990) A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 86:202–210.
91. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM (1987) Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis: A randomized study. *The New England Journal of Medicine* 317:1625–1629.
92. Seibold F, Brandwein S, Simpson S et al. (1998) pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens. *Journal of Clinical Immunology* 18(2):153–160.
93. Sfrikakis PP, Tsokos GC (2011) Towards the next generation of anti-TNF drugs. *Clinical Immunology* 141(3):231–235.
94. Shouval DS, Biswas A, Goettel JA et al. (2014) Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity* 40(5):706–719.
95. Shoyab M, McDonald VL, Byles c et al. (1990) Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87(20):7912–7916.

96. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T et al. (2005) Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology* 19(Suppl A):5A–36A.
97. Smith LA, Gaya DR (2012) Utility of faecal calprotectin analysis in adult inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 18(46):6782–6789.
98. Söderholm JD, Olaison G, Peterson KH et al. (2002) Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 50(3):307–313.
99. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH (2002) CD4+ CD25+ T-Cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9(5):1129–1131.
100. Takedatsu H, Michelsen KS, Wei B et al. (2009) TL1A (TNFSF15) regulates the development of chronic colitis by modulating both T helper 1 and TH17 activation. *Gastroenterology* 135(2):552–567.
101. Tang W, Lu Y, Tian QY et al. (2011) The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science* 332(6028):478–484.
102. Targan SR, Shih DQ (2009) Insights into IBD pathogenesis. *Current Gastroenterology Reports* 11(6):473–480.
103. Teml A, Kratzer V, Schneider B et al. (2003) Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies: A stable marker for Crohn's disease during steroid and 5-aminosalicylic acid treatment. *American Journal of Gastroenterology* 98(10):2226–2231.
104. Thorpe GHG, Kricka L (1986) Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods in Enzymology* 133:331–353.
105. Thurner L, Marina Z, Preuss KD et al. (2013) Progranulin antibodies entertain a proinflammatory environment in a subgroup of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis research & therapy* 15(6):R211.

106. Thurner L, Preuss KD, Fadle N et al. (2013) Progranulin antibodies in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity* 42:29–38.
107. Tiegs SL, Russel DM, Nemazee D (1993) Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *The Journal of experimental medicine* 177(4):1009–1020.
108. Toh H, Chitramuthu BP, Bennett HPJ et al. (2011) Structure, function, and mechanism of progranulin; The brain and beyond. *Journal of Molecular Neuroscience* 45(3):538–548.
109. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9):4350–4354.
110. Truelove SC, Witts LJ (1955) Cortisone in ulcerative colitis: final report on a therapeutic trial. *British medical journal* 2(4947):1041–1048.
111. Uko V, Thangada S, Radhakrishnan K, (2012) Liver disorders in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Research and Practice* 2012(Cd).
112. Valencia X, Stephens G, Goldbach-mansky R et al. (2006) TNF downmodulates the function of human CD4+ CD25 hi T-regulatory cells. *Immunobiology* 108(1):253–261.
113. Van Assche G, Dignass A, Panes J et al. (2010) The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease : Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* 4(1):7–27.
114. Van Assche G, Dignass A, Reinisch W et al. (2010) The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *Journal of Crohn's and Colitis* 4(1):63–101.
115. Van Damme P, Van Hoecke A, Lambrechts D et al. (2008) Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *Journal of Cell Biology* 181(1):37–41.
116. Van Klinken BJ, Van der Wal JW, Einerhand AW et al. (1999) Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut* 44(3):387–393.

117. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A et al. (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301(5638):1374–1377.
118. Wei F, Zhang Y, Jian J et al. (2014) PGRN protects against colitis progression in mice in an IL-10 and TNFR2 dependent manner. *Scientific reports* 4:7023.
119. Wei F, Zhang Y, Zhao W et al. (2014) Progranulin facilitates conversion and function of regulatory T cells under inflammatory conditions. *PLoS ONE*, 9(11):e112110.
120. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD et al. (1999) A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *The New England Journal of Medicine* 340(4):253–259.
121. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J et al. (2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics* 27(1):18–20.
122. Wilson M (2005) *Microbial inhabitants of humans. Their ecology and role in health and disease.* 1. Aufl. Cambridge: Cambridge University Press
123. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B et al. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature protocols* 2(3):541–546.
124. Xu D, Suenaga N, Edelmann MJ et al. (2008) Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 7(11):2215–2228.
125. Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H et al. (2007) IL-17B and IL-17C are associated with TNF- α production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *Journal of immunology* 179(10):7128–7136.
126. Zhao YP, Tian QY, Frenkel S et al. (2013) The promotion of bone healing by progranulin, a downstream molecule of BMP-2, through interacting with TNF/TNFR signaling. *Biomaterials* 34(27):6412–6421.
127. Zhu J, Nathan C, Jin W et al. (2002) Conversion of proepithelin to epithelins: Roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 111(6):867–878.

128. Zimmer V, Widmann T, Müller M et al. (2010) Genotypic interaction and gender specificity of common genetic variants in the p53/mdm2 network in Crohn's disease. *Digestion* 81(4):246–251.

7 Publikationen

Thurner L, Stöger E, Fadle N, Klemm P, Regitz E, Kemele M, Bette B, Held G, Dauer M, Lammert F, Preus KD, Zimmer V, Pfreundschuh M (2014) Proinflammatory progranulin antibodies in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences* 59(8):1733–1742.

Thurner L, Fadle N, Regitz E, Kemele M, Klemm P, Zaks M, Stöger E, Bette B, Carbon G, Zimmer V, Assmann G, Murawski N, Kubuschok B, Held G, Preuss KD, Pfreundschuh M (2015) The molecular basis for development of proinflammatory autoantibodies to progranulin. *Journal of autoimmunity* 61:17–28.

8 Curriculum Vitae