

Petra Ganschow

Dr. med.

Charakterisierung Pankreas-spezifischer Autoantikörper bei Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Geboren am 22.09.1978 in Münster

Staatsexamen am 09.06.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. M. Volkmann

Unter dem Oberbegriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen werden als Hauptvertreter der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa zusammengefasst. Auch wenn klare klinische Unterscheidungsmerkmale zwischen diesen beiden Krankheitsbildern existieren, ist die Unterscheidung in der Praxis jedoch nicht immer möglich. Die sichere Diagnosestellung ist jedoch von enormer Wichtigkeit, unterscheidet sich das therapeutische Vorgehen doch gerade bei schwierigen Verlaufsformen deutlich.

Als diagnostisches Hilfsmittel wurden in der Vergangenheit bereits spezifische Verteilungsmuster von Antikörpern und Autoantikörpern verwendet. Bisher wurden vor allem p-ANCA präzise charakterisiert und mehrere Antigene identifiziert. Sie kommen weitaus häufiger bei Patienten mit Colitis ulcerosa (C.U.) als bei Patienten mit Morbus Crohn (M.C.) vor. Genau umgekehrt ist die Häufigkeitsverteilung bei ASCA. Hierbei handelt es sich um Antikörper gegen ein 200 kDa Glycoprotein des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae*, die häufiger bei M.C. als bei C.U. vorkommen. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren weitere Antikörper, ebenfalls p-ANCA, gegen das äußere Membranporin C von *Escherichia coli* beschrieben. Sie sind bei ca. 24% der M.C. Patienten, dagegen nur bei 11% der C.U. Patienten nachweisbar. Aufgrund der typischen Häufigkeitsverteilungen der einzelnen Antikörper stellt ihr Nachweis ein diagnostisches Hilfsmittel dar, das insbesondere in der Kombination verschiedener Antikörpernachweise aussagekräftig ist. Zur Erweiterung des charakteristischen Antikörper-Musters bei M.C. und C.U. ist die Identifikation zusätzlicher Antikörper mit typischen Häufigkeitsverteilungen von besonderer Bedeutung. Hierzu gehören Autoantikörper gegen exokrines Pankreasgewebe, die häufiger bei Morbus Crohn als bei

Colitis ulcerosa in der indirekten Immunfluoreszenz dargestellt werden können. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, ein Ziel-Antigen zu diesen Autoantikörpern zu isolieren, was bisher den Aufbau sensitiverer und vor allem spezifischerer Testsysteme verhindert hat.

Die Ansätze zur Identifikation des Zielantigens der PAb stützten sich bisher auf die Gewinnung desselben aus Pankreasgewebe. Dies ist jedoch aufgrund der hohen autolytischen Aktivität der dort vorhandenen Enzyme problematisch. Selbst durch Enzymblockade gelingt zumeist keine vollständige Aufhebung der Autolyse bzw. sie gelingt nur mit einer gewissen Latenz, wodurch sich zahlreiche experimentelle Unwägbarkeiten ergeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher unter Verwendung einer Phagen-Expressionsbibliothek Pankreasproteine in Form rekombinanter Polypeptide exprimiert. PAb-positive Seren von Morbus Crohn Patienten wurden verwendet, um mögliche antigene Polypeptide zu identifizieren. Detektierte reaktive Klone wurden isoliert, die DNA gewonnen und mit bekannten, für Proteine kodierenden Sequenzen verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Abgleich der Sequenzen untereinander.

Insgesamt konnten mit dem verwendeten Verfahren 24 reaktive Klone isoliert und weiter untersucht werden. Hierunter befanden sich insgesamt 8 Sequenzen mit Homologien zu Proteinen aus dem exokrinen Pankreas. Zusätzlich zeigten sich mehrere Übereinstimmungen in diesen Sequenzen untereinander. Des Weiteren wurden 8 Sequenzen detektiert, die keine Übereinstimmungen mit bekannten Gen-Sequenzen zeigten. Auch hier zeigten sich unter den Sequenzen mehrere homologe Bereiche. Ebenso gab es Gemeinsamkeiten zwischen 2 Sequenzen mit Analogien zu Proteinen der ribosomalen 40s- und 60s-Untereinheit und einer Sequenz mit Homologien zu einem Proteasom. Die verbleibenden 5 Sequenzen zeigten Analogien zu einem 1-alpha Vorläufer Protein aus Inselzellen, einem Serin-Protease-Inhibitor, dem „Proline-rich Protein der Subfamilie BstNI“, mit der „Isoform 1 eines hypothetischen Proteins, von dem Ähnlichkeit mit dem neuronale Pheromon Rezeptor V2R2“ angenommen wird und mit dem „Signal Sequenz Rezeptor delta“. Bis auf 4 Proben lagen die Übereinstimmungen jeweils deutlich über 90%, sodass eine Identität der Polypeptide mit diesen anzunehmen ist.

Aufgrund der aktuellen Literatur erscheint es wahrscheinlich, dass es sich bei dem Ziel-Antigen zu PAb um ein Protein bzw. um eine Epitop von Proteinen aus dem exokrinen Pankreas handelt. Ebenso erscheint es möglich, dass es nicht nur ein, sondern mehrere Ziel-Antigene zu PAb geben kann. Die hier gefundenen Polypeptide sollten daher durch gezielte

Proteinexpression weiter auf ihre klinische Relevanz an einer größeren Anzahl von Seren, sowie im zweiten Schritt durch synthetische Peptidsynthese der homologen Bereiche reaktiver Polypeptide untersucht werden, um potentiell übergeordnete Epitope zu identifizieren und den Aufbau neuer, sensitiver und spezifischer Testsysteme zu ermöglichen.