

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

# **Progranulin-Antikörper und hyperphosphoryliertes Progranulin in Vaskulitiden, Kollagenosen und Myositiden**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
Homburg/Saar  
2018

vorgelegt von:  
Philipp Christof Moritz Klemm,  
geboren am 31.07.1987 in Düsseldorf

Erster Berichterstatter (Doktorvater): Herr Prof. Dr. med. Gunter Aßmann

*Für Klara*

---

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung und Fragestellung</b>	<b>3</b>
2.1    Mechanismen der Autoimmunität: Autoantikörper	3
2.2    Vaskulitiden	6
2.2.1    Großgefäßvaskulitiden	6
2.2.1.1    Riesenzellarteriitis	7
2.2.1.2    Polymyalgia rheumatica	8
2.2.1.3    Takayasu Arteriitis	9
2.2.2    Vaskulitiden mittelgroßer Gefäße: Klassische Polyarteriitis nodosa	11
2.2.3    Kleingefäßvaskulitiden	12
2.2.3.1    ANCA assoziierte Vaskulitiden	13
2.2.3.2    Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)	14
2.2.3.3    Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA)	14
2.2.3.4    Mikroskopische Polyangiitis (MPA)	15
2.2.4    Variable Gefäßvaskulitis: Morbus Behcet	15
2.3    Kollagenosen	17
2.3.1    Systemischer Lupus erythematoses	17
2.3.2    Antiphospholipidsyndrom	18
2.3.3    Sjögren Syndrom	19
2.3.4    Systemische Sklerose	21
2.3.5    CREST-Syndrom	23
2.3.6    Mixed Connective Tissue Disease	23
2.4    Polymyositis und Dermatomyositis	25
2.5    Progranulin	26
2.5.1    Aufbau/Struktur	26
2.5.2    Vorkommen und Wirkung	27
2.5.3    Verarbeitung, Konversion, Spaltung	30
2.5.4    Bindung an Rezeptoren, Enzyme und Proteine	31
2.6    Fragestellung	34
<b>3. Material und Methode</b>	<b>36</b>

---

3.1	Laborgeräte	36
3.2	Verbrauchsmaterialien	36
3.2.1	Molekularbiologische und proteinbiochemische Materialien	36
3.2.2	Materialien der Zellkultur und der Expressionssysteme	37
3.2.3	Immunologische Materialien	37
3.2.4	Lösungen und Medien	37
3.3	Methodik	39
3.3.1	SEREX	39
3.3.2	Patienten	39
3.3.3	Immunologische und proteinbiochemische Methodik	40
3.3.3.1	Gelelektrophorese	40
3.3.3.1.1	Isoelektrische Fokussierung	41
3.3.3.1.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	42
3.3.3.1.3	2D Gelelektrophorese	43
3.3.3.2	Western-Blot	43
3.3.3.3	Verdau mit alkalischer Phosphatase	45
3.3.3.4	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	45
3.3.3.3	Ortsspezifische Mutagenese	47
3.3.4	Statistik	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
4.1	Identifizierung von PGRN als Autoantigen bei Patienten mit Vaskulitis	49
4.2	Nachweis von PGRN-AK und Häufigkeits- sowie Subklassen Bestimmung	49
4.2.1	Probenherkunft, Probenanzahl und untersuchte Erkrankungen	49
4.2.2	Beschreibung des Patientenkollektives	50
4.2.3	Häufigkeit von PGRN-Antikörpern	50
4.2.4	Progranulin-Antikörper Subklassen	53
4.3	Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und PGRN-Ak Status in Patienten mit Kleingefäßvaskulitiden	54
4.4	Zusammenhang zwischen PGRN-Ak Status und Anzahl untersuchter Seren pro Patient	55
4.5	Entdeckung einer zweiten PGRN-Isoform in PGRN-Ak-positiven Patienten	56
4.6	Nachweis einer Hyperphosphorylierung der zusätzlichen PGRN Isoform	57
4.7	Identifikation der Phosphorylierungsstelle	58
4.8	Mutagenisierung der wahrscheinlichsten P-Stellen	59

---

4.9	Unterschiedliche Spaltung des hyperphosphorylierten PGRN	60
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
5.1	Hyperphosphoryliertes PGRN	64
5.2	Limitationen	65
5.3	Pathogenetische Bedeutung von PGRN	66
5.4	Perspektiven	67
5.5	Konklusion und Ausblick	69
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>92</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl der mittels ELISA untersuchten Patienten und des ermittelten PGRN-Ak Status

Abbildung 2: PGRN-Ak-Status bei Patienten mit TA, GCA/PMR, cPAN und MB

Abbildung 3: PGRN-Ak-Status bei Patienten mit AAV ohne weitere Zuordnung, GPA, EGPA und MPA

Abbildung 4: PGRN-Ak-Status bei Patienten mit MCTD, Sjögren/Sicca, CREST, SSc, SLE und APLS

Abbildung 5: PGRN-Ak-Status bei Patienten mit DM/PM

Abbildung 6: PGRN-Ak-Status in der immunologischen Kontrollgruppe (IKG) und der nicht-immunologischen Kontrollgruppe (NIKG)

Abbildung 7: Immunglobulinsubklassen der PGRN-Ak

Abbildung 8: IEF von zwei Patienten mit SLE (V8 und V27) und einer gesunden Kontrolle

Abbildung 9: IEF von Vollblutlysaten (p1-9) und Kontrollen (+/-)

Abbildung 10: IEF von zwei PGRN-Ak positiven Patienten (V8 und ED2) vor und nach Behandlung mit AP

Abbildung 11: IEF von LCL-Lysaten zweier Patienten, welche PGRN-Ak positiv (V8) und negativ (G7) waren

Abbildung 12: NetPhos Analyse mit Nachweis von Ser38 und Ser81 als wahrscheinlichste Phosphorylierungsstelle

Abbildung 13: IEF der LCL-Lysate mit den punktmutierten PGRN-Sequenzen (Ser38Ala und Ser81Ala)

Abbildung 14: Unterschiedliche Konversionsmuster von PGRN in GRN erkannt durch einen PGRN-Ak gegen den C-Terminus

Abbildung 15: Unterschiedliche Konversionsmuster von PGRN in GRN erkannt durch einen nicht-phosphorylierungsspezifischen PGRN-Ak gegen den N-Terminus

Abbildung 16: Unterschiedliche Konversionsmuster von PGRN in GRN erkannt durch Fab, der spezifisch für die nicht-phosphorylierte PGRN-Isoform ist, und einen phospho-spezifischen Ser81-PGRN-Fab gegen den N-Terminus

Abbildung 17: Unterschiedliche Konversionsmuster von PGRN (17a) und pSer81-PGRN (17b)

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ACR-Klassifikationskriterien der GCA

Tabelle 2: ACR/EULAR-Kriterien zur Diagnosestellung der PMR

Tabelle 3: ACR-Klassifikationskriterien der TA

Tabelle 4: ACR-Klassifikationskriterien der cPAN von 1990

Tabelle 5: ACR-Klassifikationskriterien der GPA

Tabelle 6: ACR-Klassifikationskriterien der EGPA

Tabelle 7: Symptomkonstellation bei MPA

Tabelle 8: Klassifikationskriterien der ISBD (International Study Group for Behet's Disease 1990)

Tabelle 9: ACR-Klassifikationskriterien des SLE

Tabelle 10: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien des SjS

Tabelle 11: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der SSc

Tabelle 12: Diagnosekriterien des MCTD

Tabelle 13: Anzahl und Herkunft der eingeschlossenen Patienten

Tabelle 14: Chi-Quadrat Test zwischen der Krankheitsaktivität in AAV und PGRN-Ak Status

Tabelle 15: Übersicht der Anzahl longitudinal gesammelter Seren pro Patient mit einer Kollagenose

Tabelle 16: Patientencharakteristika

Tabelle 17: Chi-Quadrat Test zwischen der Anzahl an zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelter Seren und des PGRN-Ak Status von Patienten mit Kollagenose

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	ANCA assoziierte Vaskulitiden
ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Peptide
ACR	American College of Rheumatology
ADAMTS	Disintegrin und Metalloproteinase mit Thrombospondin Motiv
Ak	Antikörper
ANCA	Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
aPL	Antiphospholipid-Antikörper
APLS	Antiphospholipidsyndrom
Apo A-I	Apolipoprotein A-I
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin

---

BZR	B-Zell-Antigenrezeptor
bzw.	beziehungsweise
COMP	Oligometrische Knorpelmatrixprotein
cPAN	klassische Polyarteriitis nodosa
CpG-ODN	C prind G-Oligodesoxynukleotid
CREST	Symptomkomplex aus Kalzinose, Raynaud-Syndrom, ösophagealer Dysmotilität, Sklerodaktylie und Teleangieektasien
CTD	Carboxy-terminale Domäne
DCs	dendritische Zellen
dcSSc	diffus kutane systemische Sklerose
DM	Dermatomyositis
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR2	Death-rezeptor 2
DR3	Death-rezeptor 3
dsDNA	Doppelstrang DNA (s. Anti-dsDNA-Antikörper)
EGF	epidermale Wachstumsfaktor
EGPA	eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	extrazellulär regulierter Kinaseweg
EULAR	European League Against Rheumatism
FAK	integrinassozierte fokale Adhensionskinase
FTLD	Frontotemporale Demenz
GCA	Riesenzellarteriitis
GEP	Granulin-epithelin Precursor
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
GRN	Granuline
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	Horse radish Peroxidase
IBM	Einschlusskörperchen-Myositis
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEF-PAGE	isoelektrische Fokussierung mit einem Polyacrylamidgel
IFN	Interferon

---

IKG	immunologische Kontrollgruppe
IL	Interleukin
IL-1 $\beta$	Interleukin1 Beta
IL-23	Interleukin 23
IL-6	Interleukin 6
LCL	lymphoblastoide Zelllinien
lcSSc	limitiert kutane systemische Sklerose
LVV	Vaskulitiden großer Gefäße
MB	Morbus Behcet
MCTD	Mixed Connective Tissue Disease
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex
MICA	Major Histocompatibility Class I Chain-Related A
mind.	mindestens
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MPA	mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
MPO-ANCA	antineutrophile zytoplasmatische Antikörper spezifisch gegen Myeloperoxidase
MVV	Vaskulitiden mittelgroßer Gefäße
NIKG	nicht-immunologischen Kontrollgruppe
NK	natürliche Killerzellen
OPD	O-Phenyl-Diamin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PGRN	Progranulin
PGRN-Ak	Progranulin-Antikörper
pI	isoelektrische Punkt
PM	Polymyositis
PMR	Polymyalgia rheumatica
PR3	Proteinase 3
PR3-ANCA	antineutrophile zytoplasmatische Antikörper spezifisch gegen Proteinase 3
P-TEFb	TranskriptionselongationsFaktors b
PVDF	P-Polyvinyliden Difluorid
RF	Rheumafaktor

---

RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEREX	serological identification of antigens by recombinant expression cloning
SERPINB1	Serin Protein Inhibitor, Clade B, Member 1
Shc	Src Homologie und Kollagen
SjS	Sjögren Syndrom
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SLPI	sezernierter Leukozytenproteaseinhibitor
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen
SORT1	transmembranöses multiliganden Protein Sortilin
SSc	systemische Sklerose
SVV	Vaskulitiden kleiner Gefäße
TA	Takayasu Arteriitis
Tat	Transaktivator der Transkription
TL1A	TNF-ähnliches Molekül 1A
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TNFRSF	Tumornekrosefaktorrezeptorsuperfamilie
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
Topo-I	DNA-Topoisomerase I
Treg	T regulatorische Zelle
TTP	thrombotisch-thrombozytopenie Purpura
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Zusammenfassung

Autoantikörper spielen eine große Rolle in der Diagnostik und Pathogenese von Vaskulitiden und Kollagenosen. So haben antineutrophile zytoplasmatische Antikörper (ANCA) nicht nur eine Rolle in der Diagnostik der ANCA-assoziierten Vaskulitiden, sondern besitzen auch einen besonderen pathogenetischen Stellenwert. Etablierte Autoantikörper wurden oftmals per Zufall entdeckt; eine systematische Suche nach Autoantikörpern erfolgte bei Vaskulitiden bisher nicht.

Unserer Arbeitsgruppe gelang es mittels Proteinarray-basierter Screeninguntersuchungen Autoantikörper gegen Progranulin (PGRN) in Seren von Patienten mit Granulomatose mit Polyangiitis, eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis, Panarteriitis nodosa und Riesenzellarteriitis zu entdecken. Progranulin ist ein natürlicher Antagonist des Tumornekrosefaktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Es wirkt durch hochaffine Bindung an den Tumornekrosefaktorrezeptor-1 und -2 und Death-rezeptor 3. An den beiden ersten antagonisiert Progranulin TNF $\alpha$ , am letztgenannten TNF-ähnliches Molekül 1A. Aufgrund der mutmaßlich proinflammatorischen Wirkung der Progranulin-Antikörper (PGRN-Ak) wurden weitere Seren von Patienten mit rheumatologisch-autoimmunen Erkrankungen untersucht. Mittels ELISA konnten wir das Vorkommen von PGRN-Ak in Seren von Patienten mit jeweils verschiedenen Vaskulitisformen, Kollagenosen und Myositiden untersuchen: Riesenzellarteriitis/Polymyalgia rheumatica (14/65), Takayasu Arteriitis (4/13), klassischer Panarteriitis nodosa (4/10), Granulomatose mit Polyangiitis (31/75), eosinophiler Granulomatose mit Polyangiitis (7/23), mikroskopischer Polyangiitis (7/19), ANCA-assoziierten Vaskulitiden (3/6), Morbus Behcet (2/8), undifferenzierte Kollagenose (5/17), Sjögren Syndrom/Sicca Syndrom (9/19), CREST (2/8), systemischer Sklerose (10/31), systemischem Lupus erythematoses (39/91), Antiphospholipidsyndrom (6/15), Dermatomyositis/Polymyositis (4/33). Zusätzlich wurden zwei Kontrollgruppen (immunologische Kontrollgruppe (6/31), nicht-immunologische Kontrollgruppe (1/30)) untersucht.

Es gelang der erstmalige Nachweis von PGRN-Ak in den untersuchten Erkrankungen und die Beschreibung einer vorläufigen Prävalenz. Es konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von PGRN-Ak und einer aktiven Erkrankung im Bereich der klein- und mittelkalibrigen Gefäßvaskulitiden besteht. Des Weiteren lieferte diese Arbeit erste Ergebnisse in der Fragestellung des molekularen Mechanismus der Entstehung von PGRN-Ak. Durch die Untersuchung mittels isoelektrischer Fokussierung zeigte sich, dass PGRN ausschließlich bei PGRN-Ak positiven Patienten in einer zusätzlichen Isoform zu finden ist. Hier konnte nachgewiesen werden, dass es sich um eine an Serin 81 hyperphosphorylierte PGRN Isoform

handelt. Je nach Phosphorylierungsstatus des PGRN zeigten sich überdies unterschiedliche Spaltmuster von PGRN in Granuline.

## Summary

Autoantibodies play a crucial role in the diagnostic and pathogenesis of vasculitis and connective tissue disorders. Antineutrophilic cytoplasmic antibodies (ANCA) for example are not only used diagnostically but constitute a pathogenetic role. Today's established antibodies were often discovered by chance rather than by research. A systematic search for antibodies in vasculitis has not happened so far.

We found antibodies directed against Progranulin (PGRN) by screening of sera of patients with granulomatosis with polyangiitis, eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, panarteriitis nodosa and giant cell arteritis on protein microarrays. PGRN is a physiologic antagonist to TNF $\alpha$  and TL1a. It inflicts its role by binding to TNFR-1, -2 and DR3. We screened sera of patients with different rheumatic diseases because of the presumed antiinflammatory role of PGRN-antibodies (PGRN-abs). By using ELISA we were able to identify PGRN-abs in sera of patients with vasculitis (Giant cell arteriitis/Polymyalgia rheumatica (14/65), Takayasu Arteriitis (4/13), classic Panarteriitis nodosa (4/10), granulomatosis with polyangiitis (31/75), eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (7/23), mikroskopische polyangiitis (7/19), ANCA-assoziierte vaskulitis (3/6), Morbus Behcet (2/8)), connective tissue disorders (undifferentiated connective tissue disorder (5/17), Sjögrens syndrom/sicca syndrom (9/19), CREST (2/8), systemic sclerosis (10/31), systemischer Lupus erythematosus (39/91), antiphospholipidsyndrom (6/15)), und Myositis (Dermatomyositis/Polymyositis (4/33)). Additionally, two control groups were tested (autoimmune control (6/31), non-autoimmune control (1/30)). Not only were PGRN-abs firstly described in these diseases, but a first prevalence was established. Furthermore, we found a significant correlation between disease activity in middle and small vessel vasculitis and PGRN-abs incidence. Also, this thesis contributed to the solution of why PGRN-abs appear. By isoelectric focusing we discovered that PGRN appears in a second isoform exclusively in PGRN-ab positive patients. This second isoform could be characterized as PGRN hyperphosphorylated at serine 81. Furthermore, we were able to show different cleavage patterns for PGRN into mature GRN based on the phosphorylation status of PGRN.

## 2. Einleitung und Fragestellung

### 2.1 Mechanismen der Autoimmunität: Autoantikörper

Autoimmunität beschreibt die Antwort des adaptiven Immunsystems gegen ein körpereigenes Antigen. Diese Immunantwort beinhaltet normalerweise sowohl B- als auch T-Zellreaktionen gegen das Autoantigen. Autoimmunität ist eine Folge multipler, zum Teil unabhängiger Faktoren, welche ein Versagen oder Zusammenbruch der Selbsttoleranz bedingen. Folgende Faktoren und Mechanismen spielen bei dem Verlust der Selbsttoleranz und der Entwicklung von Autoimmunität eine Rolle:

#### *Genetische Faktoren:*

Eine gewisse Suszeptibilität für eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen scheint vererbt zu werden. Für einzelne Autoimmunerkrankungen konnten jeweils Assoziationen zu bestimmten Hauptgewebeverträglichkeitskomplexen (MHC) nachgewiesen werden (Janeway 2001). So konnte für den systemischen Lupus erythematodes eine Assoziation mit humanem Leukozytenantigen (HLA) -Death-rezeptor 3 und -2 (DR3, DR2) beschrieben werden. Die MHC-Assoziation scheint zudem mit Krankheitsverläufen und distinkter Autoantikörperbildung einherzugehen: HLA-DR3-Haplotypen sind mit Hautbeteiligung und Anti-Ro-Antikörpern und HLA-DR2-Haplotypen mit Nierenbeteiligung und Anti-ds-DNS-Antikörpern assoziiert (Smolen et al. 1985; Olsen et al. 1993; Mills 1994). Neben den vererbbaeren MHC konnten Studien auch die Wichtigkeit von vererbbaeren nicht MHC gebundenen Loci bzgl. der Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen zeigen. Z. B. wird in ANCA-assoziierten Vaskulitiden Suszeptibilität sowohl MHC-assoziiert, am wichtigsten der Locus HLA DPB1\*0401, wie auch nicht-MHC assoziiert über Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) vererbt. Hervorzuheben ist hier vor allem rs7151526 im SERPINA1–SERPINA11 Locus auf 14q32 (Lyons et al. 2012). SNP sind vererbbaere Variationen eines einzelnen Basenpaares in einem DNA-Strang. Interessanterweise konnte in derselben Studie in der Familie der ANCA-assoziierten Vaskulitiden gezeigt werden, dass sich die Granulomatose mit Polyangiitis und die mikroskopische Polyangiitis in der genetischen Assoziation nicht nur in den MHC-, sondern auch in den SERPIN-Loci unterscheiden (Lyons et al. 2012).

#### *Störung von Toleranzmechanismen:*

Traditionell unterscheidet man die Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz zur Sicherstellung der Selbsttoleranz. Die Mechanismen der zentralen Toleranz stellen sicher, dass unter den in den zentral lymphatischen Organen differenzierenden Lymphozyten keine autoreaktiven Klone vorhanden sind. Die Prüfung der zentralen Toleranz im Thymus beruht auf einer aktiven Deletion von T-Zellen, negative Selektion genannt, mit sehr hoher oder sehr niedriger

Affinität des T-Zellrezeptors für körpereigene Antigen präsentierende MHC-Proteinkomplexe des Thymus. Nur Lymphozyten mit mittlerer Bindungsaffinität zu den MHC-Proteinkomplexen werden selektioniert, positive Selektion genannt, d.h. passieren die Prüfung der zentralen Toleranz (reviewed in Kamradt & Mitchison 2001). Diese positiv selektionierten Lymphozyten können jedoch potentiell autoreaktiv sein, da nicht alle körpereigenen Antigene im Thymus vorkommen und präsentiert werden. Die Mechanismen der peripheren Toleranz stellen daher sicher, dass autoreaktive Lymphozyten auch in der Peripherie inaktiviert werden können und die Selbsttoleranz somit erhalten bleibt. Zu diesen Sicherheitsmechanismen zählt man Deletion, Anergie und Suppression. Störungen in diesen Mechanismen der zentralen und/oder der peripheren Toleranz können zur Selektion von autoaggressiven T-Lymphozyten und zur Entstehung von Autoimmunität führen (reviewed in Webb et al. 1990; Ludewig et al. 1999; Sakaguchi 2000).

### *Infektiöse Faktoren:*

Beim molekularen Mimikry führen mikrobielle Antigene aufgrund einer großen Ähnlichkeit zu körpereigenen Antigenen zu einer Umkehr der Immunantwort gegen das infektiöse Agens in eine Immunantwort gegen körpereigene Antigene.

Bei der „Bystander-Aktivierung“ können autoreaktive T-Zellen, welche primär nicht an der Auseinandersetzung mit dem infektiösen Agens beteiligt waren, durch die Entzündung und den Gewebeschaden durch nun freiliegende zytoplasmatische Autoantigene aktiviert werden.

Superantigene können durch antigenunabhängige Bindung der T-Zell und MHC-Rezeptoren zur Aktivierung von Lymphozyten unterschiedlicher Reaktivität führen. Diese von Pathogenen produzierten Peptide werden nicht durch antigenpräsentierende Zellen prozessiert und sind nicht von spezifischer T-Zell-Erkennung abhängig. Somit können Superantigene potenziell autoreaktive Zellen aktivieren.

### *Veränderte Proteine:*

Veränderte Proteine können Auslöser von Autoimmunität sein. Nicht immunogene Proteine können, wenn alteriert, autoimmune Antworten auslösen. Körpereigene Proteine unterliegen verschiedenen Möglichkeiten einer solchen Alteration. Durch Mutation und veränderte Expression können „Selbst-Antigene“ entstehen, welche wiederum Autoimmunität auslösen. Z. B. sind Mutationen der Antigen-Rezeptor-Signalweg-Regulatoren Lyn und Fyn mit autoimmunem Phänotypen assoziiert. Mutationen von Lyn lösen eine Lupus-ähnliche Autoimmunerkrankung aus. Mutationen in Fyn können Autoimmunität durch Lyn Defizienz verstärken (Yu et al. 2003). Mutation im kodierenden Teil des humanen mannosebindenden Lectin erhöhen nicht nur das Infektionsrisiko, sondern auch das Risiko für Autoimmunität (Larsen et al. 2004). Ein weiteres

Beispiel sind Autoimmunphänomene gegen Neoantigene im Rahmen von malignen Grunderkrankungen (Camisa & Helm 1993; Sahin et al. 1995).

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen können neben funktionellen Effekten die Erkennung durch das Immunsystem stark beeinflussen und somit einen Bruch der Selbsttoleranz hervorrufen. So spielen die Citrullinierung der Guanidinium-Nebenkette von Arginin in Proteinen durch die Peptidyl-Arginin-Deaminase (Yamada et al. 2005) und Glykosylierung von Lysin-1-Aminogruppen des humanen Kollagen Typ II (Van Den Steen et al. 2004) in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis eine Rolle. Auch Prozesse wie die kovalente Modifikation, denaturierte oder missgefaltete Proteine oder die Exposition von intrazellulären Proteinen, z.B. durch Apoptose können autoimmune Prozesse auslösen oder verstärken (reviewed in Atassi et al. 2008).

### *Medikamentöse Faktoren:*

Geringe Änderungen in der bekannten Struktur eines Antigens können zu einem Toleranzverlust führen. Medikamente können durch Bindung an autologe Polypeptide zur Konformationsänderung führen. Diese Neoantigene können zur Immunreaktion führen. Zusätzlich kann das Medikament eine normale Antigenverarbeitung verhindern und dadurch die Präsentation eines normalerweise nicht-präsentierten Peptides bedingen. Gegen dieses besteht keine Toleranz mit der Folge der Autoimmunität. Beispiele sind medikamentös induzierte bullöse Pemphigoide oder der medikamentös induzierte systemische Lupus erythematodes (Ruocco & Sacerdoti 1991).

### *Andere Faktoren:*

Aus Fallberichten und Erfahrungen mit einzelnen Erkrankungen weiß man, dass UV-Licht und Hormone Autoimmunität mitbedingen können (Golan et al. 1992; Sanchez-Guerrero et al. 2005).

Im Rahmen von Autoimmunität kann es zur Entwicklung von Autoantikörpern, d.h. Antikörper, welche gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, kommen. Man unterscheidet krankheitsunspezifische von krankheitsspezifischen Autoantikörper und pathogenetisch relevante Autoantikörper gegen solche, welche als Epiphänomen auftreten. Autoantikörper können in mehrfacher Weise pathogenetisch relevant sein.

Zu allererst können durch die Bindung des Antigens pathogenetische Vorgänge ausgelöst werden. Der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex aktiviert das Komplementsystem und führt zuerst zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Dies liegt der Purpura-Schönlein-Henoch, einer IgA-vermittelten Vaskulitis der kleinen Gefäße, zugrunde (reviewed in Kraft et al. 1998). Falls

das Antigen ein Rezeptor ist, sind durch Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes Aktivierungen oder Blockierungen von Signalwegen denkbar. Autoantikörper können zudem auch einen deutlichen zytopathischen Effekt haben. Neben der Komplementaktivierung kommt es zur Immunkomplexbildung, welche eine Degranulation an Mastzellen, Basophilen und selten Eosinophilen hervorruft. Dieser Mechanismus spielt in der Pathogenese der Serumkrankheit und von Vaskulitiden und Alveolitiden eine Rolle. Durch die Bindung des Antigens an den Autoantikörper kommt es zu einer Erniedrigung des freien Antigens, welches zum Beispiel ein Enzym oder ein sezernierter Mediator sein kann. Man spricht von einem neutralisierenden Effekt. Solche neutralisierenden Antikörper gibt es zum Beispiel gegen Interferon  $\gamma$ . Durch den neutralisierenden Effekt werden opportunistische Infektionen begünstigt und es entsteht eine Immunschwäche (Browne et al. 2012). Ein anderes Beispiel ist die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), in welcher Autoantikörper gegen ADAMTS-13 die physiologische Spaltung des von-Willebrand-Faktors (vWF) verhindern. Der vWF initiiert die Thrombozytenadhäsion und schützt den Faktor VIII vor Proteolyse (reviewed in Murrin & Murray 2006).

## 2.2 Vaskulitiden

Vaskulitiden werden in primäre und sekundäre Vaskulitiden unterteilt. Ihnen gemeinsam ist, dass sie in einem Stadium der Erkrankung zu einer Entzündung der Gefäßwand führen. Primäre Vaskulitiden sind eigenständige Erkrankungen. Ihr genauer Pathomechanismus ist oftmals nicht ausreichend geklärt. Man nimmt ein multifaktorielles Geschehen mit Einflussfaktoren wie Ethnizität, Genetik, Geschlecht und Umweltfaktoren wie Infektionen, Toxine, Allergien, Rauchen und Medikamente an. Demgegenüber treten sekundäre Vaskulitiden im Rahmen anderer Erkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis oder paraneoplastisch auf.

Im Rahmen der Chapel Hill Konsensus Konferenz wurde festgelegt, primäre systemische Vaskulitiden nach der Größe der betroffenen Gefäße einzuteilen. Die betroffenen Gefäße unterscheiden sich nicht nur in Größe, sondern auch in Form und Funktion (Jennette et al. 2012).

Im Zuge dieser Arbeit wurden ausgewählte primäre systemische Vaskulitiden untersucht, welche nun genauer vorgestellt werden.

### 2.2.1 Großgefäßvaskulitiden

Vaskulitiden großer Gefäße (LVV) befallen große Arterien häufiger als alle anderen Vaskulitiden. Jedoch kann im Laufe der Erkrankung größenunabhängig jede Arterie entzündlich betroffen werden. Unter großen Arterien versteht man die Aorta und abgehende Hauptgefäße. Zu den LVV zählt man die Riesenzellerarteriitis und die Takayasu Arteriitis (Jennette et al. 2012).

### 2.2.1.1 Riesenzellerteriitis

Die Riesenzellerteriitis (GCA) ist gekennzeichnet durch eine granulomatöse Arteriitis mit Riesenzellen betreffend die Aorta und ihre abgehenden großen, vor allem extrakraniellen Gefäße. Oft sind die Karotiden und die Vertebralarterien mit abgehenden Ästen, wie z.B. die Temporalarterien, betroffen (Jennette et al. 2012). Die Riesenzellerteriitis ist die häufigste Vaskulitis in Europa (Abdul-Rahman et al. 2011). Die Erkrankung tritt fast ausschließlich in den Lebensjahren über 50 auf, mit der höchsten Inzidenz zwischen dem 70. bis 85. Lebensjahr. Es sind mehr Frauen als Männer betroffen (Hunder 2002). Oftmals ist die GCA mit dem Auftreten einer Polymyalgia rheumatica (PMR) assoziiert. Durch die Beteiligung der Aorta ist das Risiko eines Aortenaneurysmas um den Faktor 15 erhöht (Salvarani et al. 2001). Im Zuge der Erkrankung kommt es zu einer Zerstörung der Lamina elastica interna, einer Intimaproliferation bis hin zu einer luminalen Verengung und Vasookklusion der betroffenen Gefäße mit Ischämie der nachfolgenden Organe (Salvarani et al. 2001). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die ACR-Klassifikationskriterien der GCA. Nach diesen spricht das Vorliegen von drei oder mehr Punkten für eine GCA. Die dargestellten Kriterien haben gegenüber anderen Vaskulitiden eine Sensitivität von 93,5% und eine Spezifität von 91,2% (Hunder et al. 1990). Auf die Einschränkungen von Klassifikationskriterien, welche eine möglichst homogene Patientengruppe für klinische Studien rekrutieren sollen, sei hiermit hingewiesen (Aggarwal et al. 2015).

**Tabelle 1: ACR-Klassifikationskriterien der GCA**

<b>Kriterium</b>	<b>Punkte</b>
Alter bei Erstmanifestation $\geq$ 50 Jahre	1
Neu aufgetretene Kopfschmerzen	1
Temporalarterienanomalie (Verdickung, abgeschwächte Pulsation oder Druckschmerz)	1
Erhöhte BSG $>$ 50 mm nach Westergren in der 1. Stunde	1
Pathologisch veränderte Arterienbiopsie	1

Histopathologisch handelt es sich bei der GCA um eine Panarteriitis, welche durch entzündliche mononukleäre Infiltrate und Riesenzellen in der Gefäßwand imponiert. Die Intimaproliferation

sowie das Vorkommen aktivierter Makrophagen und die Zerstörung der Muscularis sind charakteristische Zeichen der Erkrankung.

Pathophysiologisch betrachtet kommt es zum Zusammenbruch der immunologischen Selbsttoleranz. Durch ein bis jetzt unbekanntes Agens kommt es zur Aktivierung von dendritischen Zellen in der Wand von mittleren und großen Gefäßen und zum darauffolgenden vaskulären Entzündungsprozess. Initial wird die granulomatöse Entzündung in der Adventitia durch ortsansässige dendritische Zellen (DCs) angeregt. Die Aktivierung der DCs geschieht vorwiegend über Toll-like Rezeptoren (TLR). In situ konnte man mit Lipopolysacchariden den TLR4 der DCs stimulieren und die DCs somit gezielt aktivieren (Ma-Krupa et al. 2004; reviewed in Beutler 2009). Die DCs in unterschiedlichen Gefäßabschnitten exprimieren unterschiedliche Kombinationen von TLR, die jeweils für die bestimmte Gefäßregion charakteristisch sind und dieser Region sozusagen eine immunologische Identität und Suszeptibilität bzw. Vulnerabilität verleihen (Pryshchep et al. 2008). Ebenso wichtig ist das auslösende Agens. Z. B. lösen TLR4 Liganden eine transmurale Panarteriitis aus, TLR5 Liganden im Gegensatz eine Perivaskulitis der Adventitia. Der zugrundeliegende Mechanismus hierbei ist die selektive Aktivierung verschiedener T-Zell Gruppen (Deng et al. 2009). Im Folgeschritt rekrutieren und aktivieren die DCs CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Diese unterhalten dann die folgende Entzündung über Mediatoren wie Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), welches als potentes Schlüsselzytokin Makrophagen aktiviert und in ihrer Funktion unterstützt. Die Makrophagen sezernieren ihrerseits proinflammatorische Zytokine wie Interleukin1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin 6 (IL-6), welche die Entzündung unterhalten und als T Zell Stimulus fungieren. Das Zytokin TNF $\alpha$  wirkt vermittelnd im Entzündungsgeschehen. Darüber hinaus sezernieren die Makrophagen Metalloproteinasen, welche lokal zerstörend wirken. Andere Matrix-Metalloproteinasen dagegen beteiligen sich an Reparaturarbeiten an der Arterienwand (Pryshchep et al. 2008; reviewed in Weyand & Goronzy 2003; reviewed in Ly et al. 2010).

### 2.2.1.2 Polymyalgia rheumatica

Die Polymyalgia rheumatica ist eine entzündliche Erkrankung charakterisiert durch Schmerzen in der Muskulatur und den Gelenken des Schulter- und des Beckengürtels. Die Erkrankung geht mit ausgeprägten Entzündungszeichen im Blut einher. Patienten mit PMR entwickeln übermäßig oft eine Arteriitis temporalis im Sinne einer gleichzeitigen GCA. Auch die PMR betrifft vor allem Menschen über dem 50. Lebensjahr. Frauen sind zwei- bis dreimal so häufig betroffen wie Männer (Salvarani et al. 2001). Die Diagnose einer PMR wird anhand in Tabelle 2 aufgeführter klinischer, laborchemischer und bildmorphologischer Kriterien gestellt. Diese sind

anwendbar bei Patienten über 50 Jahren mit bilateralem Schulterschmerz und erhöhtem C reaktivem Protein und/oder Erythrozytensedimentationsrate. Ein Punktwert ab vier Punkten ohne Anwendung von Ultraschall und ein Punktwert ab fünf Punkten mit Anwendung von Ultraschall ist vereinbar mit der Diagnose einer PMR mit einer Sensitivität von 68% bzw. 66% und einer Spezifität von 78% bzw. 81% (Dasgupta et al. 2012).

**Tabelle 2: ACR/EULAR-Kriterien zur Diagnosestellung der PMR**

Kriterium	Punkte ohne Ultraschall	Punkte mit Ultraschall
Morgensteifigkeit > 45 Minuten	2	2
Hüftschmerz oder eingeschränkte Beweglichkeit	1	1
Negativer RF oder ACPA	2	2
Fehlender Schmerz in anderen Gelenken	1	1
Nachweis von Bursitis subdeltoidea und/oder Bizeps Tenosynovitis und/oder glenohumeraler Synovitis an mind. einer Schulter und Nachweis von Synovitis und/oder Bursitis trochanterica an mind. einer Hüfte	-	1
Nachweis von Bursitis subdeltoidea und/oder Bizeps Tenosynovitis und/oder glenohumeraler Synovitis an beiden Schultern	-	1

Die Ätiologie der PMR ist weiterhin unbekannt. Studien deuten darauf hin, dass genetische Suszeptibilität und Umweltfaktoren eine Rolle in der Entstehung der Erkrankung spielen.

Histopathologische Befunde sind bei der PMR weniger stark ausgeprägt wie bei der GCA. Eine milde Synovitis mit einer Mehrzahl an Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen lässt sich in Biopsien von betroffenen Schultern und anderen Gelenken finden (Meliconi et al. 1996). Zudem spielen erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen in betroffenen Muskeln eine Rolle. Es scheint, dass diese Zytokine vor Ort ausgeschüttet werden (Kreiner et al. 2010).

### 2.2.1.3 Takayasu Arteriitis

Die Takayasu Arteriitis (TA) ist gekennzeichnet durch eine Entzündung der Aorta und der abgehenden großen Gefäße. Die Krankheit ist in Europa selten und betrifft vor allem junge Menschen unter dem 40. Lebensjahr. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (reviewed in Johnston et al. 2002).

Klinisch fallen typischerweise verringerte oder fehlende Pulse, Blutdruckdifferenzen und Claudicatio vor allem der oberen Extremitäten auf. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die

Klassifikationskriterien der TA, welche wesentliche klinische Befunde aufzeigen und die Diagnosestellung stützen können. Ab drei von sechs Diagnosepunkten ist das Vorliegen einer TA wahrscheinlich. Es besteht eine Sensitivität von 90,5% und eine Spezifität von 97,8% in der Abgrenzung zu anderen Vaskulitiden (Arend et al. 1990).

**Tabelle 3: ACR-Klassifikationskriterien der TA**

Kriterium	Punkte
Alter bei Erstmanifestation $\leq 40$ Jahre	1
Claudicatio intermittens der Extremitäten (vor allem der oberen Extremität)	1
Abgeschwächte Pulsation der A. radialis und/oder A. ulnaris	1
Differenz systolischer Blutdruck zwischen beiden Armen $> 10$ mmHg	1
Auskultierbares Gefäßgeräusch über der A. subclavia oder über der A. abdominalis	1
Arteriographische Verengung der Aorta, ihrer Hauptäste oder großer Arterien der oberen und unteren Extremität ohne sonstige Ursache	1

Makroskopisch fällt die Aorta durch eine lumeneinengende Fibrose aller Wandschichten auf. Es kann zu Aneurysmen kommen, falls die Krankheit schnell fortschreitet.

Mikroskopisch kann man die TA in eine akute florid-entzündliche und eine chronische Phase unterteilen. In der akuten Phase kommt es zur Infiltration der Media mit Lymphozyten und gelegentlich Riesenzellen sowie einer Verdickung der Intima.

In der chronischen Phase bestimmt die Fibrose das Bild der Erkrankung. Die TA ist sehr ähnlich der GCA, sodass mitunter anhand der Biopsie keine Unterscheidung zwischen den beiden Erkrankungen getroffen werden kann (reviewed in Johnston et al. 2002; Jennette et al. 2012; reviewed in Arnaud et al. 2011).

Aus immunologisch-pathophysiologischer Sicht wird angenommen, dass ein unbekannter Stimulus zur Expression des 65kDA Heat-shock Proteins in der aortalen Wand führt (Seko et al. 1994). Dieses Protein wiederum führt zur Expression des Major Histocompatibility Class I Chain-Related A (MICA) auf den Endothelzellen. MICA wird von  $\gamma\delta$  T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK) mit dem NKD2D Rezeptor erkannt, woraufhin diese Perforin sezernieren (Seko et al. 1994; Bauer et al. 1999; Seko et al. 2004). Perforin führt zu einer akuten vaskulären Entzündung. Proinflammatorische Zytokine unterstützen den Entzündungsprozess und locken infiltrative Makrophagen und T-Zellen an. Über den TLR bieten DCs den T-Zellen ein oder

mehrere Antigene an. Th1-Zellen treiben den Entzündungsprozess durch Produktion von IFN $\gamma$  an und aktivieren weitere Makrophagen. Es kommt zur Ausschüttung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), was zur Neovaskularisation, Intimaproliferation und Einsproßung glatter Muskulatur führt. Th17-Zellen, angezogen durch das (IL-23) Mikromilieu in der Entzündung, tragen durch die Aktivierung neutrophiler Makrophagen zur Entzündung bei (reviewed in Arnaud et al. 2011). Es wird vermutet, dass DCs ebenfalls B-Zellen aktivieren und zur Produktion von Anti-Endothelzell-Antikörpern beisteuern. Diese Antikörper führen dann über den Komplementweg zur Zytotoxizität gegen Endothelzellen (Tripathy et al. 2001). Insgesamt kommt es zu einer Störung der B-Zell Homöostase, welche sich durch einen erhöhten Anteil an antikörpersezierenden Plasmablasten bei Patienten mit aktiver Takayasu Arteriitis zeigt (Hoyer et al. 2012).

### 2.2.2 Vaskulitiden mittelgroßer Gefäße: Klassische Polyarteriitis nodosa

Vaskulitiden mittelgroßer Gefäße (MVV) befallen vor allem mittelgroße Gefäße. Dies sind primär die Viszeralarterien und ihre Abzweigungen. Die Polyarteriitis nodosa und das Kawasaki Syndrom sind die wichtigsten Varianten der MVV. Die Entzündung in MVV ist nekrotisierend und ausgeprägter verglichen mit der Gefäßentzündung durch LVV (Jennette et al. 2012).

Die klassische Polyarteriitis nodosa (cPAN), auch Panarteriitis nodosa genannt, ist eine nekrotisierende Vaskulitis an vor allem mittleren und auch kleineren Arterien ohne Glomerulonephritis (Jennette et al. 2012). Am häufigsten sind das Nervensystem versorgende Arterien sowie Nieren- und Mesenterialgefäße betroffen. Die cPAN ist eine seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von ca. 4-10 Fällen pro eine Million Einwohner. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr (Watts et al. 2001). Man unterscheidet die idiopathische cPAN, Hepatitis B Virus (HBV) assoziierte PAN, kutan lokalisierte PAN und die mikroskopische PAN. Im Zuge dieser Arbeit wurden nur Seren von Patienten mit idiopathischer cPAN untersucht. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Klassifikationskriterien der cPAN, welche wesentliche klinische Befunde aufzeigen und die Diagnosestellung stützen können. Das Vorhandensein von drei oder mehr der zehn Kriterien macht das Vorliegen einer cPAN wahrscheinlich (Sensitivität 82,2%, Spezifität 86,6%) (Lightfoot et al. 1990).

**Tabelle 4: ACR-Klassifikationskriterien der cPAN von 1990**

Kriterium	Punkte
Gewichtsverlust $\geq 4$ kg	1
Livedo reticularis an den Extremitäten oder Rumpf	1
Testikulärer Schmerz oder Empfindlichkeit	1
Myalgien und Schwäche der Beinmuskulatur	1
Mono- oder Polyneuropathie	1
Diastolischer Blutdruck $> 90$ mmHg	1
Erhöhung des Serum-Kreatinins ( $>1,5$ mg/dl) oder des Serum-Harnstoffs ( $>40$ mg/dl)	1
HBV-Carrier Status (HBs-Antigen oder Anti-HBc-IgG)	1
Pathologische arteriographische Befunde, die nicht zurückzuführen sind auf Arteriosklerose, fibromuskuläre Dysplasie oder andere nicht entzündliche Ursachen	1
Typische Histologie von kleinen oder mittleren Arterien mit gefäßwandinfiltrierenden polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten oder mononukleären Leukozyten	1

Histologisch ist die cPAN gekennzeichnet durch eine Entzündung aller Wandschichten des betroffenen Gefäßes und durch noduläre Verdickungen in der Wand von mittleren und kleinen Arterien. Man findet segmentale Läsionen, welche die Zellwand zerstören. Dies führt zur Bildung von Aneurysmen und Entstehung von Thrombosen (Ferrerias et al. 2013).

Die immunopathogenetischen Mechanismen der cPAN sind ungeklärt. Man nimmt heterogene Mechanismen an. Bei der HBV-assoziierten PAN wird angenommen, dass Immunkomplexablagerungen zu einer Komplement- und Neutrophilenaktivierung und folgender Schädigung der Gefäßwand führen (Trepo & Guillevin 2001).

### 2.2.3 Kleingefäßvaskulitiden

Vaskulitiden kleiner Gefäße (SVV) sind Vaskulitiden, welche vor allem kleine Gefäße betreffen. Dies beinhaltet alle intraparenchymalen Gefäße.

SVV werden in zwei Kategorien unterteilt. Die erste Kategorie zeichnet sich durch das Fehlen von Immunkomplexen (Pauciimmunität) aus, die andere durch Immunkomplexablagerungen an der Gefäßwand und in betroffenen Geweben (Jennette et al. 2012).

### 2.2.3.1 ANCA assoziierte Vaskulitiden

ANCA assoziierte Vaskulitiden (AAV) sind nekrotisierende Vaskulitiden und zählen zu der Gruppe der SVV. In AAV kommt es nicht zu nachweisbaren Immunkomplexablagerungen, daher werden sie auch als pauciimmune Vaskulitiden bezeichnet. Das Auftreten von ANCA spezifisch gegen Myeloperoxidase (MPO) und Proteinase 3 (PR3) ist pathognomonisch für diese Gruppe von Vaskulitiden. Zu den AAV zählen die mikroskopische Polyangiitis (MPA), die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA), ehemals Morbus Wegener, und die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA), ehemals Churg-Strauss-Syndrom (Jennette et al. 2012).

Die Inzidenz der AAV nimmt mit zunehmendem Alter zu und erreicht ein Maximum im Alter von 65 bis 74 Jahren. Es sind generell mehr Männer betroffen als Frauen (Watts et al. 2001).

Die Pathogenese der AAV ist nicht geklärt. Jedoch nimmt man eine komplexe Immunreaktion zwischen genetischer Prädisposition und Auslösern aus der Umwelt an. So können Infektionen oder auch molekulares Mimikry Auslöser sein (Willcocks et al. 2010). Endstrecke all dieser möglichen Auslöser ist die Entstehung und die damit verbundene Pathogenität von MPO-ANCA und PR3-ANCA (Bansal & Tobin 2004; Schlieben et al. 2005; Xiao et al. 2002). MPO und PR3, an sich intrazelluläre Enzyme, werden auf aktivierten neutrophilen Makrophagen exprimiert und sind so extrazellulär zugänglich, z.B. für die Interaktion mit Antikörpern. Zirkulierende MPO- und PR3-ANCA erkennen ihre Zielantigene auf den Neutrophilen und führen zu einer Aktivierung, oxidativem Burst und Degranulation der Neutrophilen.  $TNF\alpha$ , welches unter anderem im Rahmen der Immunreaktion ausgeschüttet wird, führt im Sinne eines Zytokinprimings zu einer stärkeren Expression von MPO und PR3 auf der Oberfläche von Neutrophilen, sodass die Interaktionsrate zwischen ANCA und Neutrophilen zunimmt und es zu einer überschießenden entzündlichen Immunreaktion mit Gefäß- und Gewebeverletzung kommt (Falk et al. 1990; Porges et al. 1994).

Pathogenetisch scheint auch eine zelluläre Immunität durch T-Zellen eine Rolle zu spielen. Man nimmt an, dass das Homing von T-Zellen in entzündete Areale die Interaktion zwischen den ortsansässigen und eingewanderten Zellen fördert und so die Entzündungsreaktion zusätzlich unterstützt und anfacht (Berden et al. 2009). Das Komplementsystem wird ebenfalls aktiviert und fördert den Entzündungsprozess. Durch die Aktivierung der neutrophilen Makrophagen durch ANCA kommt es zur Ausschüttung von Faktoren, welche auf dem alternativen Weg das Komplementsystem aktivieren. Dies führt zu einem entzündungsfördernden Kreis, welcher vor allem die Nieren betrifft und die pauciimmune nekrotisierende Glomerulonephritis mit erklärt (Xiao et al. 2007; Xing et al. 2009).

### 2.2.3.2 Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)

Die GPA, ehemals Morbus Wegener, ist eine nekrotisierende, granulomatöse Entzündung des oberen und unteren Respirationstraktes sowie eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen und mittleren Gefäße. Im Laufe der Erkrankung kann es zur nekrotisierender Glomerulonephritis, organzerstörender Vaskulitis und pulmonaler Hämorrhagie kommen (Jennette et al. 2012). Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Klassifikationskriterien der GPA, welche wesentliche klinische Befunde aufzeigen und die Diagnosestellung stützen können. Das Vorhandensein von mindestens zwei dieser vier Kriterien macht eine GPA wahrscheinlich (Sensitivität 88,2%, Spezifität 92%) (Falk et al. 2011).

**Tabelle 5: ACR-Klassifikationskriterien der GPA**

<b>Kriterium</b>	<b>Kommentar</b>
Nasale oder orale Entzündung	schmerzhafte oder schmerzlose orale Ulzerationen oder eitriger oder blutiger nasaler Ausfluss
Pathologisches Röntgenbild des Thorax	Noduläre Veränderungen oder konstante pulmonale Infiltrationen mit Kavernenbildung
Urinsediment	Mikrohämaturie oder Erythrozytenzylinder
Biopsie	Granulomatöse Entzündung der Arterienwand, peri- oder extravaskulär

### 2.2.3.3 Eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA)

EGPA, ehemals Churg-Strauss Syndrom, ist eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen bis mittleren Gefäße. Es kommt zu einer nekrotisierenden, eosinophilen-reichen Entzündung des Respirationstraktes. Asthma oder eine andere atopische Erkrankung gehen oft einer EGPA voraus bzw. mit einer EGPA einher. Eine Glomerulonephritis kann auftreten (Jennette et al. 2012). Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Klassifikationskriterien der EGPA, welche wesentliche klinische Befunde aufzeigen und die Diagnosestellung stützen können. Das Vorliegen mindestens vier dieser sechs Kriterien macht die Diagnose einer EGPA wahrscheinlich (Sensitivität 85%, Spezifität 99,7%) (Masi et al. 1990).

**Tabelle 6: ACR-Klassifikationskriterien der EGPA**

Kriterium	Punkte
Asthmaanamnese	1
Eosinophilie von über 10% im Differenzialblutbild	1
Polyneuropathie oder Mononeuritis multiplex	1
Flüchtige pulmonale Infiltrate	1
Akute oder chronische Nasennebenhöhlenaffektionen	1
Biopischer Nachweis einer Vaskulitis mit Eosinophilen im extravaskulären Gewebe	1

#### 2.2.3.4 Mikroskopische Polyangiitis (MPA)

Die MPA ist eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen bis mittleren Gefäße. Im Verlauf tritt oft eine nekrotisierende Glomerulonephritis auf. Die Entzündung manifestiert sich nur an Gefäßen (Jennette et al. 2012). Klassifikationskriterien der MPA gibt es nicht. Bei Vorliegen folgender, in Tabelle 7 dargestellter, Symptomkonstellation sollte man an die Diagnose einer MPA denken (Zashin et al. 1990).

**Tabelle 7: Symptomkonstellation bei MPA**

<b>Symptom:</b>
Fieber, Unwohlsein, Gewichtsverlust
Arthritis, Myalgien
Pulmonale Infiltrate mit häufig fataler Hämorrhagie
Rapid-progressive Glomerulonephritis
Hautzeichen (nekrotisierende Vaskulitis der kleinen Gefäße)
HNO-Symptome
Mono- oder Polyneuropathie
Serologie: MPO-ANCA

#### 2.2.4 Variable Gefäßvaskulitis: Morbus Behcet

Morbus Behcet (MB) ist eine Vaskulitis, welche Arterien und Venen betreffen kann. Die Erkrankung ist charakterisiert durch das Auftreten von wiederkehrenden oralen und/oder rektalen

aphtösen Ulzerationen begleitet von kutanen, okulären, artikulären, gastrointestinalen und/oder nervalen entzündlichen Läsionen. Es kann zu einer SVV, arteriellen Aneurysmen und venös-arterieller Thrombangiitis mit Thrombose kommen (Jennette et al. 2012). Der MB ist eine seltene Erkrankung und tritt vor allem in Ländern der ehemaligen „Seidenstraße“ auf, d.h. in Mittelmeerländern wie der Türkei oder Griechenland, in arabischen Ländern und in Japan (Zouboulis et al. 1997). Die Erkrankung kann in jedem Alter auftreten, jedoch ist der Ausbruch vor der Pubertät oder nach der 6. Lebensdekade selten. Normalerweise tritt die Erkrankung in der 3. Lebensdekade auf. In Deutschland tritt die Erkrankung in beiden Geschlechtern gleich häufig auf, in der türkischen Bevölkerung erkranken jedoch Männer dreimal häufiger als Frauen (Zouboulis et al. 1997). Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Klassifikationskriterien des MB, welche wesentliche klinische Befunde aufzeigen und die Diagnosestellung stützen können. Das Hauptkriterium (rezidivierende orale Ulzerationen) plus zwei der Nebenkriterien müssen zur Klassifikation erfüllt sein. Die Untersuchungsbefunde sind nur anwendbar, wenn keine andere klinische Erklärung vorhanden ist.

**Tabelle 8: Klassifikationskriterien der ISBD** (International Study Group for Behet’s Disease 1990)

<b>Hauptkriterium:</b>
Rezidivierende orale Ulzerationen
<b>Plus 2 der folgenden Kriterien:</b>
Rezidivierende genitale Ulzerationen
Läsionen der Augen
Läsionen der Haut
Positiver Pathergie-Test („Katzenellenbogen-Test“)

Die genaue Pathogenese ist bislang unklar. In Genomanalysen wurde eine genetische Disposition betreffend HLA-B51 bestätigt, jedoch auch andere Loci wie zum Beispiel Interleukin-10 und IL23R-IL12RB2 gefunden (Mizuki et al. 2010). HLA-B51 ist bei 50-80% der Patienten nachweisbar, bei Gesunden wurde es mit einer Häufigkeit von nur 6% bei Deutschen und 16% bei Türken festgestellt. Im Wesentlichen entspricht die regionale Häufigkeitsverteilung des MB derjenigen von HLA-B51 (Verity et al. 1999). Dem MB scheinen die Eigenschaften autoimmuner Erkrankungen zu fehlen, jedoch ist es auch keine typische autoinflammatorische Erkrankung. Sowohl das angeborene wie auch das erworbene Immunsystem scheinen beim MB

pathogenetisch relevant und aktiv im Erkrankungsprozess. In einer „targeted resequencing“-Studie von MB-Patienten konnten Varianten von IL-23R, IL-1R1 und NOD2 bei japanischen und IL-23R, TLR4, MEVG (M694V) und NOD2 bei türkischen Patienten gefunden werden (Mizuki et al. 2010). Dies deutet auf autoinflammatorische Aspekte in der Pathogenese hin. Bezüglich des erworbenen Immunsystems scheinen T-Zellen eine Rolle zu spielen. So konnte z.B. die Beteiligung eines IL-21 gesteuerten Th17-Signalweges gefunden werden (Mizuki et al. 2010).

### **2.3 Kollagenosen**

#### **2.3.1 Systemischer Lupus erythematoses**

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) zählt zu den systemisch verlaufenden Autoimmunerkrankungen aus der Familie der Kollagenosen. Durch pathogene Antikörper und/oder Immunkomplexe kann es im Verlauf der Erkrankung zu einer Vielzahl pathologischer Veränderungen und Beeinträchtigungen an fast allen Geweben und Organen kommen. Es zeigt sich eine Prävalenz von 50 zu 100000 Einwohnern. Die Inzidenz wird auf 1-10 (2-8) pro 100000/Jahr geschätzt. Es sind überwiegend Frauen in einem Alter von 25 bis 35 Jahren betroffen (Geschlechtsverteilung 10:1) (Uramoto et al. 1999; McCarty et al. 1995). Tabelle 9 gibt einen Überblick über die Klassifikationskriterien des SLE, welche wesentliche klinische Befunde aufzeigen und die Diagnosestellung stützen können. Die Erkrankung gilt als gesichert, wenn zu irgendeinem Zeitpunkt im Verlauf der Krankheit vier oder mehr Kriterien erfüllt sind (Spezifität 98%, Sensitivität 97%) (Tan et al. 1982; Hochberg 1997).

**Tabelle 9: ACR-Klassifikationskriterien des SLE**

<b>Kriterium</b>
Schmetterlingserythem
Diskoider Hautlupus
Photosensitivität
Schleimhautulzeration in Mund oder Nase
Arthritis (nicht erosiv)
Nephritis (Zylinder oder Proteinurie > 500 mg/Tag)
Enzephalopathie (Zerebrale Krampfanfälle oder Psychose)
Pleuritis oder Perikarditis
Anämie, Leukopenie oder Thrombopenie
Nachweis antinukleärer Antikörper
Nachweis von Antikörpern gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA) oder gegen Sm

Ätiologisch wird ein Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren wie genetischer Faktoren (Cui et al. 2013), epigenetischer Effekte (Javierre et al. 2010; Ballestar et al. 2006), exogener Auslöser wie UV-Licht (Simard et al. 2009) oder Medikamente und hormoneller Faktoren (Sanchez-Guerrero et al. 2005) diskutiert, welche in der Entstehung des SLE beteiligt sind. Die genaue Pathogenese ist derzeit jedoch unklar.

Die humorale Immunantwort gegen nukleäre Antigene ist charakteristisch für den SLE. Autoantigene aus apoptotischen Zellen werden über DCs T-Zellen präsentiert und führen zu deren Aktivierung. Die aktivierten T-Zellen aktivieren wiederum B-Zellen. Die aktivierten B-Zellen produzieren die für diese Erkrankung pathognomonischen Autoantikörper. Gerade Anti-dsDNA-Antikörper sind hochspezifisch für die Erkrankung. Daneben kommt es auch zu T-Zell unabhängiger B-Zell-Aktivierung über den B-Zell-Antigenrezeptor (BCR) und den TLR-Signalweg (reviewed in George C. Tsokos 2011; reviewed in Bertias et al. 2010).

### 2.3.2 Antiphospholipidsyndrom

Das Antiphospholipidsyndrom (APLS) ist eine systemische Autoimmunerkrankung charakterisiert durch arterielle und/oder venöse Thrombosen und/oder Aborte assoziiert mit einer spezifischen Antikörper-Familie, den Antiphospholipid-Antikörpern (aPL) (Miyakis et al. 2006).

Das APLS wurde initial bei Patienten mit SLE beschrieben. Es entwickelten aber auch Patienten ohne SLE ein APLS, sodass es mittlerweile als eigenständige Erkrankung anerkannt wurde. Eine europäische Studie mit 1000 Patienten zeigte das APLS zu 36% mit SLE assoziiert ist (Cervera et al. 2009). Aufgrund der Assoziation zum SLE und der Manifestation mit/durch Aborte wird das APLS gemeinhin als Erkrankung junger Frauen definiert, jedoch können auch Männer betroffen sein. Es wird geschätzt, dass in 9,5% der Patienten mit unklarer venöser Thrombose und in 13,5% der Patienten mit unklarem Schlaganfall aPL gefunden werden können (Andreoli et al. 2013). aPL können jedoch nicht nur bei Patienten mit APLS, sondern auch bei Patienten mit anderen systemischen Autoimmunerkrankungen, Infektionen, Krebserkrankungen und sogar bei Gesunden nachgewiesen werden.

aPL sind pathogenetisch relevant. In vitro und in vivo Studien konnten nachweisen, dass aPL Mediatoren des thrombotischen Geschehens und von Aborten sind. aPL aktivieren verschiedene pathogenetische Mechanismen und Signalwege, welche zur Entzündung und zur Störung der Thrombostase führen (reviewed in Giannakopoulos & Krilis 2013). aPL gehören einer Immunglobulinklasse (IgG, IgM, IgA) an oder sind eine Kombination dieser Antikörperklassen. Initial wurde gedacht, dass aPL anionische Phospholipide, vor allem Cardiolipin, erkennen (reviewed in Giannakopoulos & Krilis 2013). Heutzutage weiß man, dass aPL hauptsächlich phospholipidbindende Proteine erkennen, wie zum Beispiel  $\beta$ 2-Glycoprotein I oder Prothrombin.

### 2.3.3 Sjögren Syndrom

Das Sjögren Syndrom (SjS) ist eine systemisch verlaufende Autoimmunerkrankung bei der es zu lymphozytären Infiltraten der Speichel- und Tränendrüsen mit resultierender oraler und okulärer Trockenheit und Autoantikörperproduktion kommt. Man unterscheidet ein primäres SjS von einem sekundären SjS im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis, SLE, inflammatorischer Myositis oder systemischer Sklerose. Wir untersuchten ausschließlich Patienten mit primärem SjS, sodass sich folgende Beschreibung alleinig auf das primäre SjS bezieht.

Das SjS betrifft 0,1-0,6% der adulten Bevölkerung. Das SjS ist die zweithäufigste systemische Autoimmunerkrankung nach der rheumatoiden Arthritis und betrifft vor allem Frauen (Geschlechtsverteilung 9:1) und tritt dann vor allem postmenopausal nach dem 50. Lebensjahr auf (Mavragani & Moutsopoulos 2010).

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Klassifikationskriterien des SjS, welche wesentliche klinische Befunde aufzeigen und die Diagnosestellung stützen können. Die Diagnose kann ab

einem Punktwert größer/gleich vier getroffen werden (Sensitivität 96%, Spezifität 95%) (Shiboski et al. 2017).

**Tabelle 10: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien des SjS**

Kriterium	Punkte
Biopsie labialer Speicheldrüse mit Nachweis einer fokalen lymphozytären Sialadenitis und einem Fokusscore $\geq 1$ Foki/4mm <sup>2</sup>	3
Anti-SSA/SSB positiv	3
Keratokonjunktivitis mit einem okulärem Färbungsscore $\geq 5$ an mind. 1 Auge	1
Schirmer Test $\leq 5$ mm/5 Minuten an mind. 1 Auge	1
Nichtstimulierter Speichelfluss $\leq 0,1$ ml/Minute	1

Familiäre Fälle des SjS sind selten, jedoch findet man eine familiäre Häufung anderer Autoimmunerkrankungen. Verschiedene HLA-Gene sind verbunden mit dem Auftreten bestimmter Autoantikörperkonstellationen. DR15 ist assoziiert mit anti-SSA-Ak, DR3 mit anti-SSA-Ak und anti-SSB-Ak (Gottenberg et al. 2003). Zudem sind Genpolymorphismen des interferonregulatorischen Faktor 5 (IRF5) Gens, einem Transkriptionsfaktor im Interferonsignalweg und der EBF1-, BLK- und TNFSF4-Gene, welche eine Rolle in der B-Zell-Differenzierung und – Aktivierung spielen, mit dem SjS assoziiert und mit der Anfälligkeit gegenüber des SjS verbunden (Miceli-Richard et al. 2007; Nordmark et al. 2009; Nordmark et al. 2011). Neben genetischen Faktoren, welche das Auftreten des SjS beeinflussen können, werden Umweltfaktoren wie Virusinfektionen als Auslöser gewertet. Coxsackievirus konnte in Speicheldrüsenbiopsien von SjS-Patienten nachgewiesen werden und Epstein-Barr-Virus- und Hepatitis C Virus-Infektionen werden diskutiert (Triantafyllopoulou & Moutsopoulos 2007). Hormonelle Faktoren scheinen ebenfalls eine Rolle zu spielen, da östrogendefiziente und/oder Aromatase-Knockout Mäuse eine autoimmune Exkriopathie (Shim et al. 2004) entwickeln und RbAP48, ein östrogeninduzierter Transkriptionsfaktor, in der Entwicklung von SjS-ähnlichen Symptomen in einem experimentellen Model eine Rolle spielt (Ishimaru et al. 2008).

Pathogenetisch nimmt man an, dass dem SjS eine genetisch veranlagte gesteigerte Antwort des angeborenes Immunsystem gegenüber aberrant überexprimierten endogenen oder exogenen Gefahrensignalen zugrunde liegt. Durch transiente oder auch permanente Virusinfektionen der epithelialen Zellen kommt es bei Trägern von IRF-5 und STAT-4 Risikoallelen zur überhöhten Produktion von Typ 1 Interferonen durch rekrutierte plasmazytoide dendritische Zellen

(Miceli-Richard et al. 2007; Nordmark et al. 2011; Nordmark et al. 2009; Eisen et al. 1998; Hjelmervik et al. 2005). Dies führt zur weiteren Aktivierung von epithelialen Drüsenzellen durch die Hochregulation von MHC und Kostimulatoren sowie zur Exposition von Autoantigenen wie Ro/SSA und La/SSB durch apoptotische Zellen mit konsekutiver Bildung von krankheitsspezifischen Ak wie anti-Ro/SSA und anti-La/SSB (reviewed in Routsias & Tzioufas 2007). Diese bilden dann Immunkomplexe mit endogenen Nukleinsäuren, welche wiederum die Aktivierung von Interferon Typ 1 Signalwegen TLR-abhängig unterstützen. Diese weitere Aktivierung der Interferon Typ 1 Signalwege kann jedoch auch über plasmazytoide dendritische Zellen und andere IFN $\alpha$  produzierende Zellen erfolgen. IFN $\alpha$  unterstützt dann die weiteren autoimmunen Prozesse, welche eine Hochregulation chemotaktischer Moleküle und die Rekrutierung von Entzündungszellen, die Anreicherung und/oder Induktion von T- und B-Gedächtniszellen, die B-Zell-Aktivierung, die Autoantikörperproduktion und im Ende die Gewebeerstörung mit gleichzeitiger monoklonaler B-Zell Expansion sind.

### 2.3.4 Systemische Sklerose

Es gibt zwei Hauptformen der Sklerodermie, die lokalisierte und die systemische Sklerodermie bzw. systemische Sklerose. Die lokalisierte Sklerodermie ist nicht Bestandteil dieser Arbeit und wird nicht diskutiert. Die systemische Sklerose (SSc) ist eine systemisch verlaufende Immunerkrankung und zählt zu den Kollagenosen. Typisch ist eine Vermehrung der extrazellulären Matrix, Vaskulopathie und Fibrose der Haut und viszeraler Organe (Carwile LeRoy et al. 1988). Die SSc wird je nach Befallsmuster in drei Subgruppen unterteilt: die limitiert kutane systemische Sklerose, die diffus kutane systemische Sklerose und die systemische Sklerose ohne Sklerodermie.

Frauen sind häufiger als Männer (Geschlechtsverteilung 10:1) betroffen. Die Krankheit manifestiert sich im Erwachsenenalter zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr. Es wird von 20 Neuerkrankungen pro Jahr auf eine Million Einwohner ausgegangen. Die Inzidenz und Prävalenz schwanken jedoch in verschiedenen Populationen (Mayes 1996). Für einen genetischen Hintergrund sprechen eine leichte familiäre Häufung und eine eher schwache Assoziation mit HLA-DR3 und -DR5 (Arnett et al. 2010).

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Klassifikationskriterien der SSc, welche wesentliche klinische Befunde aufzeigen und die Diagnosestellung stützen können. Bei einem Gesamtergebnis gleich/größer neun kann die Diagnose einer SSc gestellt werden (Sensitivität 91%, Spezifität 92%) (van den Hoogen et al. 2013).

**Tabelle 11: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der SSc**

Kriterium	Subkriterium	Punkte
Hautverdickung der Finger	Geschwollene Finger	2
	Ganzer Finger, distal bis MCP	4
Läsionen der Fingerkuppe	Fingerkuppennekrosen	2
	Grübchenförmige Narben	3
Teleangiiektasie	-	2
Abnorme Nagelfalzkapillaren	-	2
Lungenbeteiligung	PAH und/oder Lungenerkrankung	2
Raynaud-Syndrom	-	3
Sklerodermie-assoziierte Antikörper	Anti-Zentromere, Anti-Topoisomerase I (anti-Scl 70) oder Anti-RNA-Polymerase III	3

Obwohl die genaue Pathogenese bislang unklar ist, zeigt die SSc drei große Pathologien: Kollagenakkumulationen, Gefäßentzündung und Autoimmunität (Yoshizaki & Sato 2015; Yoshizaki, Yanaba, Iwata, et al. 2011; Furst & Clements 1997).

Die pathologische Kollagenanreicherung endet in der Fibrose der Haut und der Lungen. Die Gefäßschäden bewirken das Auftreten des Raynaudphänomen, digitale Ulzerationen, akute Nierenversagen und pulmonale Hypertension. SSc-Patienten zeigen Autoantikörper gegen verschiedene intrazelluläre Bausteine wie DNA-Topoisomerase I (Topo-I), Zentromere, RNA-Polymerasen, U1-RNP, U3-RNP, Th/To und Histonen (Okano 1996). Das Auftreten der unterschiedlichen Antikörper korreliert eng mit der klinischen Ausprägung der SSc. Anti-Topo-I-Antikörper und anti-RNA-Polymerase-Antikörper sind mit der diffusen kutanen SSc assoziiert, Anti-Zentromer-Antikörper und anti-Th/To-Antikörper findet man bei der limitiert kutanen Form der SSc. Es konnte nachgewiesen werden, dass beschriebene Autoantikörper ebenfalls eine pathogenetische Rolle spielen. So binden Anti-Topo-I-Ak direkt an die Oberfläche von Fibroblasten (Hayakawa et al. 2004). Ebenso entwickeln mit Topo-I immunisierte Mäuse Hautsklerose und Lungenfibrose (Yoshizaki, Yanaba, Ogawa, et al. 2011). Neben der pathogenetischen Beteiligung durch die Bildung der genannten Autoantikörper spielen B-Zellen aber eine wesentliche Rolle in der Regulation der Immunantwort. Sie sind beteiligt in der Antigenpräsentation, Zytokinproduktion, Lymphknotenentwicklung, T-Zell-Entwicklung und

beeinflussen die Funktion von dendritischen Zellen und Makrophagen (Sato et al. 2004; reviewed in Lipsky 2001). Es wird davon ausgegangen, dass neben der Autoantikörperbildung die chronische B-Zell-Aktivierung, z.B. mittels einer Hochregulation von CD19, eine Rolle in der Pathogenese der SSc spielt (Yoshizaki & Sato 2015).

### 2.3.5 CREST-Syndrom

Das CREST-Syndrom ist ein Akronym für den Symptomkomplex aus Kalzinose, Raynaud-Syndrom, ösophagealer Dysmotilität, Sklerodaktylie und Teleangiiektasie. Das CREST-Syndrom ist eine Form der SSc. In der aktuellen Nomenklatur ist das CREST-Syndrom durch die Bezeichnung „limitierte kutane systemische Sklerose“ ersetzt worden. Erst nach Abschluss dieser Arbeit wurde die Nomenklatur erneuert, sodass in dieser Arbeit weiterhin der Begriff CREST-Syndrom genutzt wird.

### 2.3.6 Mixed Connective Tissue Disease

Die Mixed Connective Tissue Disease (MCTD) zählt zu den systemischen Autoimmunerkrankungen und ist immunologisch charakterisiert durch das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen U1 Ribonukleoprotein (U1-RNP) –Polypeptide. Ein Synonym für die MCTD ist das Sharp-Syndrom. Klinisch ist die MCTD charakterisiert durch eine Mischform aus SLE, SSc, inflammatorischer Myopathie und rheumatoider Arthritis. MCTD ist eine seltene Erkrankung mit einer Prävalenz von 3,8 auf 100000 Erwachsene (in Norwegen). Frauen sind dreimal häufiger betroffen als Männer (Gunnarsson et al. 2011).

Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Diagnosekriterien und wesentliche klinische Befunde des MCTD. Alle drei Kriterien müssen zur Diagnosestellung erfüllt sein (Sharp et al. 1972).

**Tabelle 12: Diagnosekriterien des MCTD**

1. Anti- ENA-Antikörper der Spezifität Anti-U1-RNP
2. Charakteristische klinische Manifestationen von mindestens 2 Systemerkrankungen: - systemischer Lupus erythematodes - systemische Sklerose - Myositis - rheumatoide Arthritis
3. Mindestens 3 der folgenden Hauptsymptome: - Raynaud-Phänomen - Sklerodermie - geschwollene Hände („puffy fingers“) - proximale Muskelschwäche (Myositis-typische Befunde) - Synovitis

Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese ist die strukturelle Modifikation des RNP Antigens. Dies ist eine Einheit des U1-RNAsnRNP Komplexes, welcher im Nukleus eukaryotischer Zellen lokalisiert ist und dessen Funktion die Konvertierung (=Splicing) von premessenger Ribonukleinsäure (RNA) in reife (messenger) RNA ist (Kramer 1996; Pettersson et al. 1984). Während der Apoptose werden jeweils die U1-RNA als auch 70kD große Polypeptide modifiziert. Es kommt zur Veränderung des Antigens, was eine Rolle bei dem Verlust der Selbsttoleranz spielt (Hof et al. 2005; Greidinger et al. 2002; Greidinger et al. 2000). Durch die beschriebenen Veränderungen kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems über den TLR 3, 7 und 8 Signalweg (Leadbetter et al. 2002; Hoffman et al. 2004; Christensen et al. 2006). Erwähnenswert ist zudem, dass anti-RNP und anti-U1-RNA Antikörpertiter mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Zusätzlich verändern sich die anti-TS1-RNA-Ak-Serumspiegel parallel zur Krankheitsaktivität (Greidinger & Hoffman 2001; Ikeda et al. 2003).

Zusammenfassend spielen B-Zellen nicht nur eine Rolle durch die Produktion beschriebener Autoantikörper und einhergehende Entstehung von Immunkomplexen, sondern initiieren zudem über Autoantigenpräsentation, welche möglicherweise als Liganden für die Internalisierung von TLR-Agonisten in das Zytoplasma der Zelle dienen, eine gewisse Krankheitsaktivität. Auch T- Zellen sind an der Pathogenese beteiligt. So sind CD4-T-Zellen beteiligt beim Immunglobulinklassenwechsel der Autoantikörper auf IgG. Zudem sezernieren sie Wachstumsfaktoren und können potentiell selbst Gewebeschäden durch Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies induzieren (Okubo et al. 1993; Holyst et al. 1997; Steiner et al. 1996; Talken et al. 1999).

## 2.4 Polymyositis und Dermatomyositis

Die chronischen, idiopathischen, inflammatorischen Myopathien, Myositiden genannt, stellen eine heterogene Gruppe verschiedener Muskelerkrankungen dar, deren gemeinsame Symptomatik eine sich langsam entwickelnde, symmetrische Muskelschwäche, verminderte Muskelbelastbarkeit und Abgeschlagenheit bzw. Fatigue ist. Pathognomonisch zeigen sich zudem mononukleäre inflammatorische Zellinfiltrate in der Muskelbiopsie. Aufgrund von klinischen und histologischen Charakteristika unterscheidet man drei Entitäten: Polymyositis (PM), Dermatomyositis (DM) und die Einschlusskörperchen-Myositis (IBM). Myositiden sind seltene Erkrankungen, epidemiologische Daten sind daher dürftig und zum Teil aufgrund zu kleiner Kohorten fragwürdig. Myositiden können Kinder und Erwachsene betreffen. Die Inzidenz ist ca. 2-8 auf eine Million Einwohner pro Jahr. PM und DM betreffen eher Frauen als Männer (3:1) mit einem Erkrankungsgipfel um das 50-60. Lebensjahr. PM und DM können jedoch in jedem Lebensalter auftreten (Gunnarsson et al. 2011; Oddis et al. 1990). Die Diagnose einer PM oder DM wird anhand klinischer, laborchemischer und histopathologischer Befunde gestellt. Die Klassifikations- oder Diagnosekriterien sind nicht einheitlich und werden daher hier nicht dargestellt.

Genetisch sieht man eine starke Assoziation zu HLA-Klasse-II Allelen. Für Kaukasier besteht die stärkste Assoziation mit HLA-DRB1\*0301 und DQA1\*0501. Eine noch stärkere Assoziation besteht zwischen Myositiden einhergehend mit Autoantikörpern wie anti-Jo-1-Antikörper und HLA DRB1\*0301 und DQA1\*0501, hinweisend auf eine PM, und zwischen anti-Mi-2-Antikörpern und DRB1\*07 und DQA\*0201, welche mit der DM verknüpft sind. Dies legt eine HLA-restringierte Immunantwort in der Pathogenese nahe. Es zeigen sich auch Assoziationen zwischen Myositiden und Einzelnukleotidpolymorphismen proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel dem -308TNFA Genotyp. Das -308TNFA Gen findet sich in einem konserviertem Haplotyp, dem „HLA 8.1 ancestral haplotype“. Dieser beinhaltet über dem HLA-DR3 und andere Gene, welche entscheidend für die Entwicklung einer chronischen Autoimmunerkrankung sein können (reviewed in Chinoy et al. 2009).

Faktoren wie Infektionen, UV-Licht, Medikation und vor allem Tumorerkrankungen scheinen Einfluss auf die Entstehung der Myositiden zu haben. PM und vor allem DM treten regelmäßig paraneoplastisch auf. Patienten mit PM haben ein relatives Risiko von 1,75 an einer Tumorerkrankung ab Diagnosestellung zu leiden bzw. eine solche zu entwickeln. Das relative Risiko bei Patienten mit DM ist mit 4,66 höher im Vergleich zu Patienten mit PM. Die normierte Inzidenzrate für ein Malignom im ersten Jahr der Diagnosestellung der DM ist 17,29 und selbst nach 5 Jahren mit 1,37 noch erhöht (Qiang et al. 2017).

PM und DM werden aufgrund der sich in der Muskelbiopsie findenden T-Zellen, der HLA-DR Assoziation und dem Auftreten von Autoantikörpern als autoimmune Erkrankungen verstanden. Die in Myositiden gefundenen Autoantikörper werden in myositisspezifische und myositissassoziierte Autoantikörper unterteilt. Myositisspezifische Autoantikörper sind anti-Aminoacyl-tRNA-Synthetase, anti-Mi-2, anti-Signal-recognition-particle, anti-p155/140, anti-p140, anti-CADM140 und anti-SAE. Diese unterschiedlichen Antikörper sind vergesellschaftet mit unterschiedlichen, spezifischen klinischen Phänotypen. Die höchste Prävalenz zeigen die anti-Aminoacyl-tRNA-Synthetase-AK, anti-Jo-1-Ak sind davon die am häufigsten vorkommenden mit 11-33% bei DM und/oder PM. Anti-Mi-2-Antikörper erkennen ein nukleäres Antigen mit Nukleosom-remodelling Aktivität. Man weiß mittlerweile, dass anti-Mi-2-Antikörper bei PM, DM und IBM vorkommen und nicht pathognomonisch für die DM sind (Gunawardena et al. 2009).

Zurzeit wird folgender Pathomechanismus diskutiert: die Muskelschädigung ist ein Resultat der durch infiltrierende T-Zellen und Makrophagen vermittelten Zytotoxizität. Die Muskelfunktion und der Muskelmetabolismus werden indirekt durch Zytokine und andere Moleküle beeinflusst. Durch eine entzündliche Beeinflussung der Mikrogefäße und damit einhergehenden gestörten Mikrozirkulation kommt es zu einer metabolischen Myopathie und dadurch zu einer gestörten Muskelfunktion (reviewed in Nagaraju & Lundberg 2011).

## 2.5 Progranulin

Progranulin (PGRN) ist eines der ältesten konservierten (extrazellulären) Regulatorproteine im Menschen und modernen Säugetieren. Der Mensch und andere Säugetiere besitzen ein Granulin (GRN) -Gen, jedoch findet man mehrere PGRN kodierende Gene bei Fischen und Invertebraten. Das Zebrafischgenom enthält vier GRN-Gene (Cadieux et al. 2005). Der Myxomyzet *Dictyostelium discoideum* besitzt wiederum nur eine Form des GRN-Gens (Eichinger et al. 2005). Pflanzen haben ebenfalls ein PGRN Motiv. Es wurde am Carboxylterminus der Cysteineproteasen der Cathepsin K Familie von verschiedensten Pflanzen gefunden. Umweltstress führt zu einer Hochregulation der Expression dieser Proteasen (Chen et al. 2006).

### 2.5.1 Aufbau/Struktur

Das humane GRN-Gen codiert für ein multifunktionales, extrazelluläres Glykoprotein. Es liegt auf Chromosom 17q21.32 und besteht aus zwölf (proteinkodierenden) Exons. Alternatives Splicing und Exon Skipping führen zu drei Isoformen (Bhandari et al. 1992; Bhandari & Bateman 1992).

Das Glykoprotein PGRN besteht aus einer Signalsequenz sowie siebeneinhalb, jeweils ca. 6 kDA großen Granulindomänen (Granulin A-G und Paragranulin), welche in der Reihenfolge P-G-F-B-A-C-D-E angeordnet sind (Hrabal et al. 1996). Die einzelnen Granuline bestehen jeweils aus hoch konservierten Tandemwiederholungen eines 12-Cysteinmotivs (CX5-6CX5CCX8CCX6CCXDX2HCCPX4CX5-6C) (Hrabal et al. 1996). GRN G stellt eine Ausnahme dar, denn es besteht nur aus zehn Cysteinmotiven (Shoyab et al. 1990). Die Cysteinmotive der Granuline formen jeweils insgesamt vier übereinanderliegend angeordnete Beta-Faltblätter, welche axial von sechs Disulfidbrücken pro GRN zusammengehalten werden (Hrabal et al. 1996). PGRN besteht aus 593 Aminosäuren und hat aufgrund von Glykosilierungen ein Molekulargewicht von 88 kDA (Songsrirote et al. 2010). PGRN besitzt viele N-Glykosilierungsstellen. So reduziert die Behandlung mit N-Glykosidase F das molekulare Gewicht von PGRN von 88 kDA auf 68 kDA (Zhou et al. 1993).

Synonyme des sezernierten Glykoproteins PGRN sind Granulin-epithelin Precursor (Zanocco-Marani et al. 1999), Proepithelin (Shoyab et al. 1990; Plowman et al. 1992), GP88/PC-cell derived growth factor (Zhou et al. 10863-69), Acrogranin (Anakwe & Gerton 1990) und Epithelial Transforming Growth Factor (Parnell et al. 1992).

### 2.5.2 Vorkommen und Wirkung

PGRN wird in unterschiedlichen Geweben situationsabhängig exprimiert und zum Teil sezerniert.

Bei Erwachsenen wird es vor allem von epithelialen- (Daniel et al. 2003) und hämatopoetischen Zellen, einschließlich Lymphozyten und DCs (Pickford et al. 2011; Elkabets et al. 2011), exprimiert. Ebenso wird PGRN in Neuronen und Mikroglia des zentralen Nervensystems (Daniel et al. 2000), in skeletalen Muskelzellen (Wang et al. 2012) und im Fettgewebe (Matsubara et al. 2012) exprimiert.

PGRN lokalisiert sich subzellulär im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat, in Lysosomen und in den sekretorischen Vesikeln und Granula (Lin et al. 2007).

#### *Embryogenese*

Während der Entwicklung des Fötus wird PGRN u.a. in der Plazenta, der Epidermis, in kleinen Gefäßen, im zentralen Nervensystem sowie im peripheren Nervensystem exprimiert (Pickford et al. 2011; Daniel et al. 2000).

#### *Wundheilung und Gewebeumbau*

Als Reaktion auf eine Hautverletzung steigt die PGRN Expression an und bleibt bis zu zehn Tage auf einem erhöhtem Niveau (Ong & Bateman 2003). Bei Mäusen, welchen artifiziell eine

Hautläsion zugefügt und darauffolgend PGRN injiziert wurde, konnten vermehrt Fibroblasten, Neutrophile und Makrophagen, jedoch keine Lymphozyten, sowie ein gesteigertes Maß an Wundkapillarisation in den ersten Stadien der Heilung nachgewiesen (He et al. 2003) werden. Die Gabe von PGRN fördert die Wundheilung in SLPI<sup>-/-</sup> Mäusen, welche aufgrund des fehlenden Schutzes vor Proteasen einen erniedrigten PGRN Spiegel zeigen (Zhu et al. 2002).

Einer der zugrundeliegenden Mechanismen über den PGRN die Wundheilung fördert, ist die Erhöhung der Zellproliferation und -migration über den Phosphatidylinositol 3-Kinase - und ERK/MAP-Signalweg. Die spezifischen Inhibitoren dieser Signalwege, Wortmannin und PD98059, reduzieren signifikant die PGRN-geförderte Zellmigration in das Wundgebiet (He et al. 2003). Ein anderer tragender Mechanismus ist die Konversion von PGRN in GRN B, welches epitheliale Zellen stimuliert IL-8 zu sezernieren. Infolgedessen kommt es zur Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen, welche die Wundheilung initiieren (Zhu et al. 2002).

### *Immunsystem*

CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Zellen exprimieren PGRN stärker als CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T-Zellen (Lazuardi et al. 2009). CD8<sup>+</sup> und CD28<sup>-</sup> T-Suppressor Zellen nehmen eine regulierende Funktion in vielen Autoimmunerkrankungen ein. PGRN fördert die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in FoxP3<sup>+</sup> Tregs (Tang et al. 2011), jedoch nicht in Th1-, Th2- oder Th17-Populationen. PGRN wird von einer Subpopulation von Neutrophilen exprimiert, welche Antikörperdiversität in B-Zellen fördern (Puga et al. 2011). Zudem schützt PGRN Tregs vor negativer Regulation durch TNF $\alpha$  (Tang et al. 2011). Zusätzlich spielt PGRN eine Rolle im Kontext der Antigenpräsentation von Makrophagen, indem es als Cofaktor von TLR 9 agiert (Park et al. 2011). TLRs spielen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem, denn sie erkennen Moleküle von Mikroben. TLR9 erkennt, falls PGRN gebunden ist, CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) – DNA (McIsaac et al. 2012). PGRN<sup>-/-</sup> Makrophagen konnten jedoch erst nach der artifiziellen PGRN Gabe CpG-ODN über TLR9 binden.

### *Entzündungsprozesse*

PGRN auf der einen Seite und GRN auf der anderen Seite wirken als Modulatoren in Entzündungsprozessen. Sie zeigen gegensätzliche Wirkungen in akuter sowie chronischer Entzündung.

Im akuten Entzündungsprozess erhöhen einige GRN die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF $\alpha$ , welche von epithelialen Zellen exprimiert werden und vermehrt Neutrophile zum Entzündungsort rekrutieren. Demgegenüber ist PGRN ein potenter Inhibitor von TNF $\alpha$  und fördert die Hochregulation von antiinflammatorischen Th2 Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-10 (Okura et al. 2010; Zhu et al. 2002; He et al. 2003; Pickford et al.

2011). Vor allem von Makrophagen sezerniertes PGRN nimmt eine Schlüsselposition im Rahmen der Entzündungsreaktion und der Wundheilung ein (He et al. 2002; Yin et al. 2009). PGRN spielt außerdem eine Rolle bei akuten neuronalen Verletzungen (Yasui et al. 2011). Sowohl PGRN als auch GRN sind signifikant erhöht nach einer Verletzung des Rückenmarks und/oder der Hinterwurzelganglien (Lim et al. 2012). Dies geschieht vor allem in ipsilateralen Neuronen des Hinter- und Vorderhorns sowie in aktivierter Mikroglia (Lim et al. 708-21). PGRN<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine gesteigerte Nozizeption sowie eine gestörte Wiederherstellung der Motorfunktionen (Lim et al. 2012; Ryan et al. 2009).

Im chronischen Entzündungsprozess wie der rheumatoiden Arthritis zeigt PGRN auf der einen Seite eine protektive, antiinflammatorische Wirkung (Tang et al. 2011), auf der anderen Seite induziert PGRN als Hauptadipokinin der high-fat induced insuline resistance die Hochregulation der IL-6 Expression (Matsubara et al. 2012) und wirkt somit regulierend auf einen der Hauptmechanismen in der Pathogenese von Diabetes und Adipositas.

### *Tumorgeschehen*

Die Korrelation von erhöhten PGRN Spiegel mit der Tumorlast und die Reduktion von Tumorformation nach PGRN Knockdown lassen auf eine essentielle Rolle des PGRN bei zellulärer Proliferation und Tumorgeschehen schließen (Zhang & Serrero 1998).

PGRN Spiegel sind erhöht bei vielen verschiedenen Tumorentitäten, z.B. beim Mammakarzinom (Serrero & Ioffe 2003), bei ovarialen Karzinomen (Diaz-Cueto et al. 2012) und beim Cholangiokarzinom (Frampton et al. 2012). Neben der Stimulation des Tumorwachstums, verstärkt PGRN ebenfalls Migration, Invasivität, Tumortransformation, Verankerungsunabhängigkeit und Chemoresistenz der Tumorzellen (He & Bateman 2003; Tangkeangsirisin et al. 2004; Monami et al. 2009; Monami et al. 2006; Cheung et al. 2004). Zusätzlich scheint die lokale PGRN Produktion ein wichtiger Mediator für die tumorfördernden Effekte von an den Tumor rekrutierten hämatopoetischen Stammzellen zu sein (Elkabets et al. 2011). PGRN stimuliert die Angiogenese in vitro und in vivo (He & Bateman 1999). Dieser Effekt scheint durch die Hochregulation von vaskulärem, endotheliale Wachstumfaktor (VEGF) erklärbar (Tangkeangsirisin & Serrero 2004). Die Expression von PGRN korreliert signifikant mit der VEGF Expression in ösophagealen Plattenzellkarzinomen (Chen et al. 2008). Weiterhin stellt die PGRN Überexpression einen weiteren Mechanismus der Immunevasion dar.

### *ZNS*

PGRN wird im zentralen Nervensystem (ZNS) des Erwachsenen exprimiert. In den post-mitotischen Zellen des Gehirns und des Rückenmarks, welche weder proliferieren noch migrieren, findet man eine starke Expression von PGRN. PGRN schützt hier die Neurone vor einem

vorzeitigen Zelltod. Verschiedene Mutationen eines einzelnen GRN Gen führen zur neuronalen Atrophie des frontalen und anterioren Temporallappens (Baker et al. 2006; Cruts et al. 2006). Klinisch wird diese Manifestation Frontotemporalappen Demenz genannt (FTLD). FTLD resultiert aus einem Rückgang der exprimierten und sezernierten PGRN Menge. Die PGRN Spiegel sind signifikant reduziert in betroffenen wie auch unbetroffenen PGRN Mutationsträgern bei der FTLD (Sleegers et al. 2009; Finch et al. 2009; Ghidoni et al. 2008). Neuronen betroffener Patienten akkumulieren zytoplasmatische und nukleäre Einschlüsse, welche sich auf Ubiquitin und phosphorylierte Fragmente eines Proteins, TAR DNA bindendes Protein 43 (TDP-43), anfärben lassen. FTLD ist erblich und die zweithäufigste Demenzform bei Menschen unter 60 Jahren. Klinisch fallen die Patienten durch Frontal- und Temporallappenatrophie bedingte Symptome auf. Der Frontal- und Temporallappen sind wesentlich beteiligt beim Verhalten, Empathie, Sozialverhalten und der Sprache.

PGRN Expression, auf der anderen Seite, ist erhöht in aktivierter Mikroglia in neurodegenerativen Erkrankungen wie Creutzfeld-Jakob Erkrankung (CJD) (Baker & Manuelidis 2003), amyotropher Lateralsklerose (ALS) (Malaspina et al. 2001) und multipler Sklerose (MS) (Vercellino et al. 2011). PGRN-Defizienz scheint überdies eine Rolle in der Alzheimer Erkrankung zu spielen (Perry et al. 2013).

### 2.5.3 Verarbeitung, Konversion, Spaltung

PGRN kann proteolytisch zwischen den einzelnen Granulindomänen gespalten werden. Dies geschieht nach bestimmten Mustern durch die Matrix Metalloproteinasen (MMP)- 9 (Xu et al. 2008), MMP-12 (Suh et al. 2012) und MMP-14 (Butler et al. 2008), ein Disintegrin und Metalloproteinase mit Thrombospondin Motiv 7 (ADAMTS7) (Bai et al. 2009) sowie durch die von Neutrophilen sezernierten Serinproteasen neutrophile Elastase und Proteinase 3 (Kessenbrock et al. 2008). Die durch die Proteolyse freigesetzten Spaltprodukte und muren Granuline sind ihrerseits ebenfalls biologisch aktiv. Oftmals haben sie eine gegensätzliche biologische Wirkungsweise als das Vaterprotein PGRN.

Die Proteolyse durch die neutrophile Elastase wird durch den sekretorischen Leukozytenproteaseinhibitor (SLPI) gehemmt (Zhu et al. 2002). Eine ähnlich schützende Wirkung gegenüber proteolytischen Enzymen bieten high density lipoprotein /apolipoprotein A-I (Apo A-I) (Okura et al. 2010), welches die Konversion von PGRN in GRN in Makrophagen verhindert, und Serin Protease Inhibitor, Clade B, Member 1 (SERPINB1) (Benarafa et al. 2007).

#### 2.5.4 Bindung an Rezeptoren, Enzyme und Proteine

PGRN interagiert mit extrazellulären, transmembranösen und intrazellulären Rezeptoren sowie mit nukleären Proteinen. Daher beeinflussen PGRN und respektiv mature GRN verschiedenste Signalkaskaden.

PGRN/ GRN scheint mit den multiplen Bindungspartnern über epidermale Wachstumsfaktor (EGF) -ähnliche oder cysteinreiche Domänen zu interagieren.

In der extrazellulären Matrix bindet PGRN sowohl ADAMTS7 und -12 (Guo et al. 2010; Bai et al. 2009) als auch das oligometrische Knorpelmatrixprotein (COMP) (Xu et al. 2007). Hierbei bindet die GRN-Domäne A die EGF-ähnliche Domäne vom COMP (Xu et al. 2007) und ADAMTS7 und 12 binden jeweils jede einzelne GRN Domäne über ihre C-terminalen vier Thrombospondin Domänen (Guo et al. 2010). Durch diese Bindungen verhindert PGRN den ADAMTS7 und 12 vermittelten Abbau von COMP. Im Gegenzug verstärkt COMP die PGRN-stimulierte chondrozytäre Proliferation (Xu et al. 2007).

Die ersten zwei Laminin- und EGF-ähnlichen Wiederholungsdomänen der V Domäne von Perlecan, einem Heparinsulphatproteoglycan, können mit PGRN über die Bindestellen GRN B - F interagieren. PGRN beeinflusst so die Angiogenese und potentiell das Tumorwachstum (Gonzalez et al. 2003).

PGRN interagiert mit den extrazellulären sechs EGF-ähnlichen Wiederholungen des delta-ähnlichen 1 Homolog, einem membrangebundenen Notch-Liganden (Baladrón et al. 2002). Überdies bindet PGRN an das transmembranöse multiliganden Protein Sortilin (SORT1), welches die Aufnahme von extrazellulärem PGRN über einen Endozytose-vermittelnden Komplex steuert, und somit die extrazelluläre Konzentration reguliert (Carrasquillo et al. 2010; Hu et al. 2010). Diese Bindung erfolgt über die letzten drei C-terminalen Aminosäuren von PGRN (Zheng et al. 2011). Die Behandlung mit DTT verstärkt die Bindung von PGRN an SORT1 (Jian et al. 2013). In welchem Ausmaß die biologische Aktivität von PGRN durch SORT1 beeinflusst wird, ist noch unklar.

Besonders wichtig im Kontext dieser Arbeit ist die Bindung von PGRN an Membranrezeptoren. Vor allem die Interaktion zwischen PGRN und der Tumornekrosefaktorrezeptorsuperfamilie (TNFRSF) spielt eine große Rolle in der Gewebhomeostase, indem das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Funktion von Immunzellen beeinflusst bzw. kontrolliert werden. Aus der TNFRSF haben acht Rezeptoren eine sogenannte „Todesdomäne“ (death-domain). Von diesen, binden TNFR1 und DR3 PGRN. PGRN formt mit den GRN Domänen F-A-C eine Trimerkonfiguration, wodurch es an die beiden Membranrezeptoren für TNF $\alpha$ , TNFR1 und TNFR2, bindet (Tang et al. 2011; Jian et al. 2013). PGRN bindet konkurrierend zu

TNF $\alpha$  an die extrazellulären Domänen CRD2 und CRD3 dieser TNFR1 und TNFR2 (Jian et al. 2013; Wu & Siegel 2011; Sfrikakis & Tsokos 2011). CRD3 stellt die Bindungsdomäne für PGRN dar, wobei CRD2 diese Bindung verstärkt. Die Trimerkonfiguration aus GRN F-A-C ist besonders wichtig für die Bindung an die TNFR und kann durch die Behandlung mit DTT, welches die Formation von Disulfidbrücken stört, aufgehoben werden (Jian et al. 2013). TNFR1 wird von den meisten Zellen und Primärgeweben exprimiert, wobei TNFR2 vor allem von hämatopoetischen Linien exprimiert wird (Santee & Owen-Schaub 1996). TNF $\alpha$  aktiviert über TNFR1 den Caspase-Signalweg und NF $\kappa$ B Signalweg, welche Apoptose und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen induzieren. Über TNFR2 und den AP-1 und NF $\kappa$ B Signalweg fördert TNF $\alpha$  die Zellproliferation (reviewed in Cabal-Hierro & Lazo 2012). PGRN hemmt kompetitiv die Bindung von TNF $\alpha$  an TNFR1 und -2 und blockiert somit die TNF $\alpha$ -vermittelten Signalwege (Tang et al. 2011; Jian et al. 2013). Insgesamt hat PGRN eine höhere Bindungsaffinität an TNFR2 als an TNFR1 und wirkt daher vor allem antiinflammatorisch und zellproliferativ. PGRN bindet an DR3 und verhindert dadurch eine Aktivierung durch TL1A (Liu et al. 2014). Die Blockierung des TL1A/DR3-Signalwegs reduziert die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die Bildung von Autoantikörpern und die Bildung von Osteoklasten (Bull et al. 2008; Zhang et al. 2009) Überdies bindet PGRN an TLR9 (Park et al. 2011). Somit nimmt PGRN über die Hemmung von TNFR1 und DR3, die Aktivierung von TNFR2 und als essentieller Kofaktor der Interaktion zwischen TLR9 und CpG-ODN-DNA Einfluss auf die Antigenpräsentation und B- und T-Zell Funktion.

PGRN interagiert intrazellulär mit dem N-Terminus der zytosolischen Typ 3 Hexokinase und Tropomyosin 3 (Lam et al. 2012), wobei die biologische Auswirkung noch unklar ist (Sui & Wilson 2000). PGRN bindet ebenfalls am endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Chaperone wie Calreticulin, BiP, ERp5, ERp57, GRP94 und HSP70 (Almeida et al. 2011).

Direkte Bindung an nukleäre Proteine wie Cyclin-T1 und Transaktivator der Transkription (Tat) könnten zu der biologischen Aktivität von PGRN beitragen. PGRN, GRN D-E, GRN E, aber nicht GRN D, binden die cysteinreiche Aktivierungsdomäne von Tat (Trinh et al. 1999; Shoham et al. 2003), einem Regulatorprotein des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV), und können darüber die HIV-1 Transkription stoppen (Hoque et al. 2005) PGRN bindet die Histidinregion des Cyclin-T1, ein Element des positivem TranskriptionselongationsFaktors b (P-TEFb). PGRN ist ein Substrat von P-TEFb und ist phosphoryliert an C-terminalen Serinresten. Diese Interaktion inhibiert die Funktion von P-TEFb durch die Verhinderung der Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA Polymerase II (Hoque et al. 2003). Zusätzlich resultiert die PGRN-P-TEFb Interaktion in transkriptionaler Repression von spezifischen P-

TEFb-abhängigen zellulären und viralen Promotern und führt somit zur Beeinflussung von vielen zellulären Prozessen wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Hoque et al. 2010).

Abhängig von der jeweiligen Zelle und dem jeweiligen Rezeptor werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert.

Aktiviert werden Wachstumsfaktorsignalwege, wie der extrazellulär regulierte Kinaseweg (ERK) durch die Phosphorylierung von Src Homologie/Kollagen (Shc) Proteinen und/oder der p44/42 mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) - und der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signalweg durch die Proteinkinase B /Akt und p70S6 (Zanocco-Marani et al. 1999). PGRN steigert zudem die intrinsische Aktivität des MAPK-, des PI3K- und des fokalen Adhensionskinase (FAK)-Signalswegs (He et al. 2002). Es wird die Integrin und Wachstumsfaktor gesteuerte Zellmigration signalisiert und die Formation von Paxillin/fokaler Adhensionskinase /ERK Komplexen fördert (Monami et al. 2006). Der aktivierend wirkende Rezeptor für diese Signalwege ist jedoch noch unbekannt.

## 2.6 Fragestellung

Der Nachweis von ANCA ist eines der diagnostischen Hauptkriterien zur Diagnosestellung einer ANCA-assoziierten Vaskulitis. Antikörper spielen eine wichtige Rolle nicht nur in der Diagnostik, sondern auch in der Pathogenese von autoimmunen Erkrankungen. So sind z.B. PR3-ANCA wichtig in der Diagnostik und Diagnosestellung einer Granulomatose mit Polyangiitis (Holle et al. 2010) und spielen eine pathogenetische Rolle bei der akuten Lungenschädigung in einem Rattenmodell der GPA (Hattar et al. 2010). B-Lymphozyten und Autoantikörper sind ein tragender Teil in der Pathogenese der Mehrzahl der Vaskulitiden. Selbst in nicht ANCA-assoziierten Vaskulitiden wie der GCA und der TA als Vertreter der LVV besteht eine deutliche Beteiligung der B-Zellen (Regent et al. 2011). So kann der Nachweis von hohen Titern von Antikörpern gegen die N-terminalen 27 Aminosäuren der schweren Kette von Ferritin als sehr sensitiver Marker in der Diagnostik der GCA dienen (Baerlecken et al. 2012). Ebenfalls wurden zirkulierende CD27<sup>high</sup> Plasmablasten in ähnlich hoher Anzahl bei Patienten mit TA wie bei Patienten mit SLE gefunden (Hoyer et al. 2012). Bis heute wurden die meisten Autoantikörper in Vaskulitiden eher durch Zufall als durch gezielte Suche gefunden. Zum Beispiel gelang die Entdeckung der diagnostisch wichtigen ANCA während der Untersuchung von anti-nukleären Antikörpern bei Glomerulonephritiden (Davies et al. 1982). Vorangegangene Studien mit systematischer Herangehensweise untersuchten menschliche umbilikale Endothelzellen, humanes Lungengewebe und humane Arterienwandpräparate mit Seren von Vaskulitispatienten mittels Serum 2D Immunoblotting (SERPA). Es zeigten sich Hinweise auf die Existenz von unbekanntem Autoantigenen, welche jedoch nur teilweise mittels Massenspektrometrie charakterisiert werden konnten (Guilpain et al. 2007; Chanseaud et al. 2005).

Unser Ziel war es systematisch und gezielt nach neuen Autoantikörpern in Vaskulitiden zu suchen. In Vorarbeiten gelang es mittels Serumscreening auf Proteinarrays einen neuen Autoantikörper gegen PGRN in den Seren von Patienten mit GPA, EGPA, cPAN und GCA zu entdecken. PGRN ist ein natürlicher Antagonist zu TNF $\alpha$ . Es wirkt durch kompetitive Bindung zu TNF $\alpha$  an den TNFR-1 und -2 bzw. zu TL1A an DR3. Aufgrund der vermuteten proinflammatorischen Wirkung von Progranulin-Antikörpern wurden weitere Seren von Patienten mit rheumatisch-autoimmunen Erkrankungen in dieser Arbeit untersucht. Es wurden gezielt Patienten mit Erkrankungen aus den Erkrankungsgruppen der Vaskulitiden, Kollagenosen und Myositiden ausgewählt. Ziel war eine erste Erhebung der Inzidenz und Prävalenz von PGRN-Ak in diesen Erkrankungen. Zusätzlich sollten weitere Patienten mit GPA, EGPA, cPAN und GCA untersucht werden, um auch in diesen Erkrankungen eine Einschätzung der Prävalenz von

PGRN-Ak treffen zu können. Außerdem stellte sich offensichtlich die Frage, ob das Auftreten von PGRN-Ak mit der Krankheitsaktivität in Zusammenhang stehen könnte.

Letztendlich wurde im Verlauf der Arbeit die Fragestellung um die Frage ergänzt, warum es zur Autoantikörperbildung gegen PGRN kommt.

### 3. Material und Methode

#### 3.1 Laborgeräte

Agarose-Gelkammer	Bio-Rad, München
Autoklav Homburg	Webeco, Bad Schwartau
ELISA-Lesegerät Victor <sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter	Wallac, Freiburg
Gefrierschrank -80° C	Nunc, Wiesbaden
Gefrierschrank -20° C	Liebherr, Stuttgart
Kühlschrank 4° C	Bosch, Stuttgart
Pharmacia's (enhanced chemiluminescence) system	General Electrics, Connecticut, USA
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
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
Zentrifugen 5415 R	Eppendorf, Hamburg

#### 3.2 Verbrauchsmaterialien

##### 3.2.1 Molekularbiologische und proteinbiochemische Materialien

Aqua dest.	Merck, Darmstadt
Agarose	Roth, Karlsruhe
Dinatriumphosphat	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Molkerei Hochwald
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
OPD	Sigma, St. Louis (USA)
Streptavidin Peroxidase	Roche, Mannheim
TRIS	Roth, Karlsruhe

Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trizma Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

### 3.2.2 Materialien der Zellkultur und der Expressionssysteme

FLAG-tagged-FTH1	vom Labor zur Verfügung gestellt
FLAG-tagged-PGRN	vom Labor zur Verfügung gestellt
HT 1080-Zelllinie	vom Labor zur Verfügung gestellt
WEHI-S-Zelllinie	vom Labor zur Verfügung gestellt
Proliferationssassay	EZ4U, Biomedica
Zellkulturmedium	vom Labor zur Verfügung gestellt
Zellkulturschrank	vom Labor zur Verfügung gestellt

### 3.2.3 Immunologische Materialien

96-Well ELISA-Platte	NUNC Maxisorp F, Langenseebold
Goat-anti-human-IgG Antikörper	Dianova, Hamburg
Goat-anti-human-Fab Antikörper	Dianova, Hamburg
Rabbit-anti-human-PGRN-IgG	BIOSS
Mouse-anti-FLAG Antikörper	Sigma, München
Ser81-Phospho-spezifische anti-PGRN-Fabs	vom Labor zur Verfügung gestellt
Ser81-nicht phospho-spezifische anti-PGRN-Fabs	vom Labor zur Verfügung gestellt
IEF-PAGE Novex pH 3-10	Invitrogen, Karlsruhe
Progranulin ELISA Kit (human)	AdipoGen, Schweiz
Immobilon-P-Polyvinyliden Difluorid Membran	Merck Millipore, Darmstadt
FastAP thermo-sensitive alkalische Phosphatase	Fermentas/VWR, Darmstadt
Probenpuffer IEF	Invitrogen, Karlsruhe
Whatmann-Papier	Omnilab, Mettmenstetten

### 3.2.4 Lösungen und Medien

#### POX-OPD-Entwickler (10 ml)

Lösung A: 0,2 M Dinatriumphosphat *2 H <sub>2</sub> O	3,56 g in 100 ml Aqua dest
Lösung B: 0,1 M Citronensäure * 1 H <sub>2</sub> O	2,1 g in 100 ml Aqua dest
2,5 ml Lösung A + 2,5 ml Lösung B + 5 ml Aqua dest. + 1 Tablette OPD + 5 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	

TBS (tris buffered Saline)

8,76 g NaCl

6,05 g TRIZMA Hydrochlorid

1,4 g TRIS

Ad 1 l aqua dest

TBS-Tx

TBS + 0,1% Tx 100    Zugabe von 1 ml Tx 100

Coating Puffer (5 ml)

A: 2,12 g NaCO<sub>3</sub> ad 100 ml Aqua dest

B: 1,68 g NaHCO<sub>3</sub> ad 100 ml Aqua dest

1,7 ml A + 0,8 ml B + 7,5 ml Aqua dest

Puffer für den ELISA: PBS

8,0g NaCl

0,2g KCl

1,42g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)

0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kaliumhydrogenphosphat)

ad 800ml Aqua dest., pH mit HCl auf 7,4 einstellen auf 1l Aqua dest. auffüllen

- Blockpuffer

0,75g Gelatine ad 50ml Aqua dest., bei 100°C im Wasserbad auflösen

Puffer für die isoelektrische Fokussierung: TBST (TBS-Tween)

10mmol/L TrisHCl, pH 7,5, 150mmol/L NaCl und 0,1% Tween 20

(Tween 20 wird als Detergens verwendet, um unspezifische Bindungen zu verhindern.)

- Anodenpuffer: 10mM Phosphorsäure (äußere Kammer)

- Kathodenpuffer: 20mM NaOH (innere Kammer)

- Blockpuffer: 10g Magermilchpulver in 100ml TBS-Waschpuffer

### 3.3 Methodik

#### 3.3.1 SEREX

In Vorarbeiten wurden in einem modifizierten SEREX-Verfahren (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) (Sahin et al. 1995) Seren auf high-density Protein Macroarrays mit Klonen der hEX1 und UniPex1 und 2 (Bioscience, Dublin, Irland) auf unbekannte Autoantikörper untersucht (Thurner et al. 2013b). Die verwendeten Seren wurden 1:500 verdünnt. Seren von Patienten mit der gleichen Vaskulitis wurden in insgesamt 50 ml PBS gesammelt und vermischt. Um eventuelle unspezifische Bindungen an das bakterielle Expressionssystem zu verhindern, wurden die Seren zweimalig über Nacht bei 4 °C mit 1 ml Matrixgebundenen *E. coli*-Lysaten präabsorbiert. Hierfür wurde der mit dem identischen *E. coli*-Expressionssystem hergestellte SLP2-Klon verwendet. Auf diese Weise konnte PGRN auf den beschriebenen Macroarrays als Kandidatenantigen identifiziert werden. C-terminal FLAG-getagtes PGRN wurde anschließend mittels Liposomentransfektion stabil in eine HEK 293 Zelllinie transfiziert. Daraufhin folgten Expression, Lyse und anschließend die Expressionsüberprüfung im Western Blot mittels Anti-FLAG-Antikörpern. Das Lysat konnte in einer Konzentration von 10 µg/ml für die ELISA-Untersuchungen verwendet werden und wurde vom Labor zur Verfügung gestellt.

#### 3.3.2 Patienten

Es wurden insgesamt 506 Patienten mit Vaskulitiden, Kollagenosen und Myositiden eingeschlossen und serologisch untersucht. Patienten in der Vaskulitisgruppe wurden entweder mit einer Kleingefäßvaskulitis (AAV, GPA, EGPA, MPA), Mittelgefäßvaskulitis (cPAN), Großgefäßvaskulitis (GCA/PMR, TA) oder einer Vaskulitis mit variablem Gefäßbefall (MB) diagnostiziert. Unter AAV wurden sechs Patienten subsummiert. Bei diesen sechs Patienten konnte zum Zeitpunkt des Einschlusses nicht ausreichend zwischen GPA, EGPA oder MPA differenziert werden. Diese Patienten erfüllten jedoch die diagnostischen Kriterien einer AAV und wurden dementsprechend stationär behandelt und in diese Arbeit eingeschlossen. Darüber hinaus wurden Patienten mit Kollagenosen (MCTD, Sjögren/Sicca, CREST, SSc, SLE, APLS) und Seren von Patienten mit Myositiden (DM/PM) untersucht. Zusätzlich wurden zwei Kontrollgruppen angelegt. Die eine setzte sich aus Patienten zusammen, welche eine (nicht rheumatologische) autoimmune Erkrankung, z.B. Diabetes mellitus Typ 1 oder Hashimoto-Thyreoiditis, entwickelt hatten. Diese Patienten wurden der „immunologischen Kontrollgruppe“ (IKG) zugeordnet (n=31). Die andere Kontrollgruppe setzte sich aus Patienten, welche initial mit dem Verdacht auf eine Vaskulitis, Kollagenose oder Myositis vorgestellt wurden, dann jedoch die

Diagnosekriterien der jeweiligen autoimmunen Verdachtsdiagnose nicht erfüllten, zusammen. Diese Patienten konnten entweder gesund sein oder eine nicht-autoimmune Erkrankung entwickelt haben, z.B. ein prä- oder intrarenales Nierenversagen. Diese Patienten wurden der „nicht-immunologischen Kontrollgruppe“ (NIKG) zugeordnet (n=30).

Die Seren wurden größtenteils in der rheumatologischen Ambulanz der Inneren Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes gesammelt. Die Arbeitsgruppe untersuchte zudem Seren gesammelt durch das Klinikum Bad Bramstedt, angegliedert an die Universitätsklinik Lübeck, sowie Seren aus Partnerlaboren in Freiburg im Breisgau und Strasbourg (F).

Aufgrund von Wiedervorstellungen, z.B. in der rheumatologischen Ambulanz der Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg, war es möglich von einzelnen Patienten/innen im zeitlichen Verlauf mehrere Proben in unterschiedlichen Erkrankungsstadien (aktiv bzw. inaktiv) zu sammeln. So konnten insgesamt 718 Seren von 506 unterschiedlichen Patienten gesammelt werden. Die mehrfache serologische Untersuchung eines Patienten wurde in der Gesamtstatistik zu einem untersuchten Serum zusammengefasst. Im Falle des mindestens einmaligen klaren Nachweises von PGRN-Ak in einem dieser zeitlich getrennt gesammelten Seren, wurde dieser Patient als insgesamt positiv für PGRN-Ak gewertet. Für bestimmte Subgruppenanalysen wurde diese Zusammenfassung aufgehoben und ist gesondert ausgewiesen.

Insgesamt wurden die Seren nach fachärztlich-rheumatologischer Diagnosestellung sowohl in aktiven als auch inaktiven Erkrankungsstadien im Rahmen von diagnostischen Blutabnahmen gesammelt und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Ethikantrag Nr. 242/11).

### 3.3.3 Immunologische und proteinbiochemische Methodik

#### 3.3.3.1 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Auftrennung einer Mischung aus elektrisch geladenen Molekülen. In der proteinbiochemischen Anwendung handelt es sich meist um zu trennende Proteine bzw. Peptide, in der molekularbiologischen Anwendung wird meist DNA getrennt. Die zu trennenden Moleküle wandern aufgrund eines angelegten elektrischen Feldes durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung (Elektrophoresepuffer) liegt. Negativ geladene Moleküle wandern in Richtung der Anode, positiv geladene Moleküle in Richtung Kathode. Die Geschwindigkeit dieser Bewegung ist abhängig von der Größe und der Ladung des jeweiligen Moleküls. Das Gel bildet ein dreidimensionales, engmaschiges Netzwerk,

welches die Auftrennung der zu untersuchenden Molekülmischung verlangsamt und siebähnlich größenabhängig begrenzt.

Es kommen Stärkegele, Agarosegele und Polyacrylamidgele zur Anwendung. Die Gele besitzen unterschiedliche Eigenschaften und Eignungen, z.B. die Bildung eines mehr oder weniger feinmaschigen Netzes und werden je nach zu untersuchender Molekülmischung ausgewählt. Zur weiteren Auswertung der Gelelektrophorese können die nun aufgetrennten Moleküle, welche sich in Banden bzw. Spots abbilden lassen, entweder gefärbt und densitometrisch ausgewertet werden oder mit einem Blot, z.B. Western-Blot, weiter differenziert werden.

In dieser Arbeit wurden proteinbiochemisch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und die isoelektrische Fokussierung mit einem Polyacrylamidgel (IEF-PAGE) angewendet.

### 3.3.3.1.1 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ermöglicht die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer unterschiedlichen und jeweils charakteristischen elektrischen Ladung. Aminosäuren eines Proteins tragen je nach pH des umgebenden Mediums unterschiedliche Ladungen. Die Ladungen können jeweils positiv oder negativ sein. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins beschreibt den pH-Wert, an dem sich die jeweiligen positiven und negativen Ladungen ausgleichen und somit die Summe aller Ladungen gleich null ist. Ein in einem Medium gelöstes Protein bewegt sich in einem elektrischen Feld aufgrund seiner Ladung solange bis es den isoelektrischen Punkt erreicht. Hier gleichen sich die negativen und positiven Ladungen aus und das Protein wandert nicht mehr weiter im elektrischen Feld. Die gleichen Protein-Isoformen werden sich dementsprechend auch an derselben pH-spezifischen Stelle sammeln (= Fokussierung).

In der praktischen Anwendung wird das zu differenzierende Proteingemisch auf ein Medium (=Trägergel) gebracht (meist Polyacrylamid-Gel), in welchem ein pH-Gradient etabliert ist. Der pH-Gradient wird meistens mittels im elektrischen Feld frei beweglicher Trägerampholyte oder über an den Träger gebundene (=immobilisierte) Ladungsträger etabliert. Anschließend wird an das Medium eine elektrische Spannung angelegt. Nun bewegt sich jedes Protein des zu differenzierenden Proteingemisches entlang des elektrischen Feldes bis zu dem Punkt, wo der pH des Mediums seinem eigenen isoelektrischen Punkt entspricht.

#### Durchführung der IEF

Vollblutlysate wie auch Lysate lymphoblastoider Zelllinien (LCL) von PGRN-Ak positiven und negativen Patienten sowie von gesunden Kontrollen, zum Teil mit alkalischer Phosphatase vorbehandelt, wurden mittels IEF aufgetrennt. Die Proben wurden 1:1 mit Ladungspuffer

gemischt und anschließend auf einem Fertiggel mit einem fixierten pH-Gradienten (pH 3-10) entsprechend der Herstellerinformation (Novex pH 3–10, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen. Für die IEF wurden für die erste Stunde 100 V, anschließend 200 V für eine weitere Stunde und abschließend 500 V für eine halbe Stunde angelegt.

Zur Verifizierung der Spezifität der synthetisierten Fabs gegen an Serin 81 phosphoryliertes (pSer81) PGRN und nicht-phosphoryliertes (Ser81) PGRN wurden wie oben beschrieben IEFs durchgeführt. Die phosphospezifischen bzw. wt-spezifischen Fabs wurden vom Labor selektiert und dieser Arbeit zur Verfügung gestellt (Thurner et al. 2015).

### 3.3.3.1.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Trennung von Proteingemischen anhand ihrer Molekülgröße.

Die SDS-PAGE wurde 1970 erstmals von U. Laemmli beschrieben und ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970). In diesem Verfahren wird das zu untersuchende Proteingemisch durch Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Zudem binden die negativ geladenen SDS-Moleküle an die denaturierten Proteine und überlagern die Eigenladung des Proteins. Die Länge der Proteinstränge ist ungefähr proportional zur Proteinmasse und die Bindung der negativ geladenen SDS-Moleküle ist abhängig von der Proteinelänge, sodass die SDS-PAGE die zu untersuchenden Proteingemische nach dem Molekulargewicht auftrennt (Smith 1984).

Im ersten Schritt der Probenvorbereitung wird SDS zum untersuchenden Proteingemisch hinzugefügt und das Gemisch zur weiteren Denaturierung erhitzt. Optional können Disulfidbrücken durch Thiole, z.B. Mercaptoethanol, durch Reduktion gespalten werden. Man spricht von reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Probenpuffern.

Nun erfolgt die Auftragung und die anschließende elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel. Das Gel besteht aus zwei Anteilen: einem Sammelgel und einem Trenngel. Die beiden Gele unterscheiden sich in ihrem Polyacrylamidgehalt. Insgesamt gilt, dass je höher die Konzentration an Polyacrylamid ist, desto kleiner sind die Poren im Gel und desto langsamer läuft das zu untersuchende Proteingemisch. Im Sammelgel werden die Proteine aus der Probenlösung fokussiert, also in einer Ebene konzentriert, bevor sie im Trenngel separiert werden. Das Trenngel kann auch als Gradientengel gegossen werden. Dabei steigt die Polyacrylamid-Konzentration im Gel in Stufen oder linear an. Gradientengele werden vor allem dann verwendet, wenn das zu untersuchende Proteingemisch viele Proteine sehr unterschiedlicher Größe beinhaltet.

### Durchführung des SDS-Page

Vollblutlysate von PGRN-Ak positiven und negativen Patienten sowie von einer gesunden Kontrollgruppe sowie Lysate von LCLs wurden mit SDS aufbereitet. Auf eine weitere Reduktion wurde verzichtet. Die Proben wurde mittels 10% SDS-Page und 8-15% Gradienten SDS-Page aufgetrennt.

#### 3.3.3.1.3 2D Gelelektrophorese

Die 2D Gelelektrophorese ist eine Verbindung der IEF und des SDS-PAGE zur Trennung komplexer Proteingemische. Durch die Kombination der beiden Verfahren orthogonal zueinander kann eine Trennung nach Ladung und Molekulargewicht erfolgen und damit eine besonders hochauflösende Trennung respektive Darstellung. Klose und O'Farrell entwickelten 1975 unabhängig voneinander dieses Verfahren (Klose 1975; O'Farrell 1975).

Zuerst werden die aufgetragenen Proteingemische in der ersten Dimension mittels IEF nach Ladung getrennt. In der zweiten Dimension wird das zu untersuchende Proteingemisch senkrecht zur vorherigen Aufteilung mittels SDS-PAGE anhand der Molekülmasse erneut getrennt. 2D Gelelektrophoresen wurde in dieser Arbeit nicht angewendet.

#### 3.3.3.2 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Anschließend können die übertragenen Proteine über unterschiedliche Reaktionen, z.B. Immundetektion mit spezifischen Antikörpern, nachgewiesen werden. Meist werden die Proteine vorab mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Western-Blot gliedert sich in die Schritte Proteintransfer, Blockierung freier Bindungsstellen und Proteindetektion. Der Western-Blot gehört zur Gruppe der Immunoblots.

Der Western-Blot wurde zeitgleich und unabhängig von W. Burnette in Seattle (Burnette 1981) und von G. Stark in Stanford (Renart et al. 1979) entwickelt. W. Neal Burnette prägte den Namen „Western-Blot“ in Anlehnung an „Northern-Blot“ und „Southern-Blot“. Die Veröffentlichung von W. Burnette erschien nach initialer Ablehnung erst zwei Jahre später. 1979 konnte H. Towbin das Verfahren, analog zum einfacheren Southern-Blot, auf Nitrocellulose umstellen (Towbin et al. 1979).

Die vorab elektrophoretisch separierten Proteine werden im Schritt des Proteintransfers aus dem Gel auf eine Membran transferiert. Für diesen Transfer wird meist ein senkrecht gerichtetes elektrisches Feld (=Elektrotransfer) genutzt. Der Elektrotransfer kann mit Hilfe von drei verschiedenen Systemen erfolgen: das Tank-Blot-, das Semidry-Blot- und das Dry-Blot-

System. Alternativ kann der Transfer auch durch Kapillarkwirkung in Richtung eines hydrophilen, adsorbierenden Materials (=Kapillartransfer) oder per Diffusion erfolgen. Insgesamt bleibt beim Transfer die gelelektrophoretisch erreichte Auftrennung des Proteingemisches erhalten. Nachdem Transfer können die Proteine renaturieren, indem man das möglicherweise benutzte SDS auswäscht. Die Proteine können somit teilweise ihre Sekundär- oder Tertiärstruktur wiederaufnehmen. Nach dem Transfer erfolgt die Blockung freier, unspezifischer Bindungsstellen mittels 3-5% BSA (Bovines Serum Albumin) oder Milchpulver in TBS-T oder PBS-T bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur über 2h unter Agitation. Für phosphospezifische Antikörper scheint BSA die bessere Substanz zum Blocken zu sein. Zur Analyse der transferierten Proteine wird die Membran in einem ersten Schritt mit einem Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu untersuchende Proteine gerichtet ist, über Nacht bei 4 °C in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration inkubiert. Nach Waschschritten mit TBS-T oder PBS-T folgt die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, welcher mit einem Reporterenzym (HRP) gekoppelt ist. Über dieses erfolgt nach mehreren Waschschritten die Detektion im Sinne einer Enhanced Chemilumineszenzreaktion.

### Durchführung des Western-Blots

Nach dem jeweiligen SDS-PAGE oder der jeweiligen IEF wurden die Proteine durch semidry Blotting auf eine Polyvinyliden Difluorid Membran (PVDF) für weitere Immunoblot-Analysen übertragen. Die PVDF-Membran wurde mit 100% Methanol vorbehandelt und anschließend fünf Minuten mit Transferpuffer versetzt. Im Semidry-Blot-System erfolgte eine Schichtung aus zuunterst drei Whatmann-Papieren, der PVDF-Membran, dem PAGE und abschließend erneut drei Whatmann-Papieren. Die Transferzeit betrug 1 h bei 23 V und 450 mA.

Die Membranen wurde über Nacht bei 4 °C in TBST/ Milchpuffer (10% Milchpulver in 10mmol/L TrisHCl, pH 7,5, 150 mmol/L NaCl und 0,1% Tween 20) geblockt und dann gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur entweder mit Patientenplasma (PGRN-Ak-positiv, Ak gerichtet gegen die N-terminalen 112 Aminosäuren), mit HRP-markierten rabbit-anti-human-PGRN-IgG, welche gegen den C-Terminus von PGRN gerichtet sind, oder mit den selektionierten phospho-Ser81-spezifischen bzw. non-phospho-Ser81-spezifischen anti-PGRN Fabs, um die spezifischen Konversionsfragmente des hyperphosphorylierten und normalen PGRN Isoformen von der N- und C-terminalen Perspektive zu untersuchen. Das Patientenplasma und die HRP-markierten rabbit-anti-human-PGRN-IgG wurden 1:1 000 in TBS verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen, welche mit Patientenplasma inkubiert waren, für 1 h bei Raumtemperatur mit POX-markierten goat-anti-human-IgG, verdünnt auf 1:5 000 mit TBS, inkubiert. Die Membranen mit phospho-

spezifischen anti-PGRN Fabs wurden mit TBST gewaschen und mit HRP-markierten goat-anti-human-Fab-Ak, verdünnt auf 1:5 000 mit TBS, inkubiert. Die Membranen wurden dann in TBS-T gewaschen und anschließend mit Pharmacia's enhanced chemiluminescence System detektiert.

### 3.3.3.3 Verdau mit alkalischer Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (AP) ist eine Enzymgruppe, welche Phosphorsäureester hydrolysiert. Die AP wird zur Dephosphorylierung von z.B. Proteinen, Nukleotiden und Alkaloiden eingesetzt.

#### Durchführung des Verdaus mit AP

Die Vollblut- oder LCL-Lysate wurden zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse mit 10 mmol/L TrisHCl pH 8 für 30 min bei 4°C. Schrittweise wurde die Konzentration von TrisHCl bis 100 mmol/L erhöht und dann die AP (FastAP thermo-sensitive alkaline phosphatase (Fermentas/VWR, Darmstadt) hinzugegeben (1 U/μL auf je 500 μL Lysat) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die AP wurde durch Aufwärmen auf 80 °C für 10 min inaktiviert. Lysat und „loading-puffer“ wurden 1:1 gemischt und die IEF wie beschrieben durchgeführt.

### 3.3.3.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches mit einer enzymatischen Farbreaktion ein bestimmtes Antigen nachweist. Der ELISA gehört zu den enzymatischen Immunadsorbtionsverfahren.

Das Verfahren beruht auf der Eigenschaft von Antikörpern nachzuweisende Stoffe (Antigene) spezifisch zu binden. Nach der Inkubation der das Antigen enthaltenden Probe in einem well (= Einkerbungen) der Mikrotiterplatte erfolgt das Blocken freier Proteinbindungsstellen mit anschließenden Waschsritten. Das zu bestimmende Antigen wird anschließend, falls vorhanden, spezifisch von einem Antikörper gebunden. Ein zweiter Enzym-gekoppelter Antikörper (Detektionsantikörper) bindet danach gegen den Primärantikörper, und weist dann über eine enzymvermittelte Farbreaktion das Antigen nach. Im Jahr 1971 publizierten zwei Arbeitsgruppen zeitgleich die Entdeckung des ELISAs (Engvall & Perlmann 1971) (Schuurs & Weemen, Van 1971), und lösten damit den Radioimmunassay (Yalow & Berson 1960) ab. Der Vorteil des ELISAs ist die nicht mehr benötigte radioaktive Markierung, was die Durchführung im Vergleich zur Radioimmunassay erleichtert.

### *Sandwich- ELISA*

Das Prinzip des Sandwich-ELISAs besteht aus der Verwendung zweier Antikörper, welche beide spezifisch an jeweils ein unterschiedliches Epitop des nachzuweisenden Antigens binden. Der Sandwich-ELISA ist in der Lage das Antigen besser zu präsentieren. Der erste Antikörper wird coating oder capture Antikörper genannt und ist an eine feste Oberfläche (z.B. 96-Loch-Mikrotiterplatte) gebunden/gecoated. Oftmals ist dieser Antikörper ein Anti-Tag-Antikörper, welcher das vorab mit einem „tag“ markierte Antigen bindet. „tag“ bezeichnet im Englischen einen Anhänger bzw. Schildchen. Der auf der Oberfläche der einzelnen wells der Mikrotiterplatte gebundene gegen den tag gerichtete Coating-Antikörper bindet spezifisch über das tag das nachzuweisende Protein. Das Antigen wird in einer flüssigen Phase in einer bestimmten Verdünnung in die wells der Mikrotiterplatte pipettiert und erhält eine bestimmte Zeit zur Bindung (Inkubationsphase). Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte mehrfach gewaschen und somit nicht gebundene Teile der Probe entfernt. Nun wird der zweite Antikörper (Detektionsantikörper) hinzugegeben, welcher ein anderes Epitop des Antigens erkennt. An diesen Detektionsantikörper ist wiederum ein Enzym gekoppelt, welches in der Regel einen Farbumschlag katalysieren kann (Reporterenzym). Durch die Bindung des Detektionsantikörpers entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex – ähnlich einem Sandwich. Erneutes Waschen entfernt ungebundenen Detektionsantikörper. Nun erfolgt die Zugabe eines passenden Substrates („Chromogen“) zum Reporterenzym. Das Reaktionsprodukt weist dann durch einen messbaren Farbumschlag das Antigen nach. Ein quantitativer Nachweis des Antigens ist so ebenfalls möglich. Erstmals wurde der Sandwich-ELISA von Uotila et al. 1981 beschrieben und stellte eine Verbesserung bzgl. der Spezifität und der Sensitivität im Vergleich zum konventionellen ELISA dar (Uotila et al. 1981).

### Durchführung des Progranulin-Antikörper- ELISA

Als coating Antikörper wurden in jedem well der 96-Mikrotiterplatte 50 µl mit 1:2500 (v/v) in Coating Puffer verdünnter muriner anti-FLAG-Ak (Sigma, München) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem Wachschrift mit TBS-Tx Puffer erfolgte das Blocken freier Proteinbindungsstellen mit jeweils 100 µl 1,5% (w/v) Gelatine in TBS für 1 h bei Raumtemperatur. Nachdem 50 µl C-terminal FLAG-getaggtetes rekombinantes humanes Progranulin (10 µg/ml) als Antigen hinzugegeben und bei Raumtemperatur 1 h inkubiert worden waren, erfolgte die dreifache Waschung der Mikrotiterplatte mit TBS-Tx Puffer. Die Seren der Patienten wurden 1:100 in TBS verdünnt und davon 50 µl pro well auf die Platte pipettiert. Für jede Serumprobe wurden zwei benachbarte wells für eine Doppelbestimmung gewählt. Nach 1 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut mit TBS-Tx (TBS, 0,1% (v/v) Tx100) gewaschen. Anschließend

wurde biotinylierter Ziegen anti-human-IgG (heavy and light chain) -Antikörper (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:2 500 als Detektionsantikörper hinzupipettiert und nach 1 h erfolgten weitere Waschschrte mit TBS-Tx (TBS, 0,1% (v/v) Tx100). An Streptavidin gekoppelte Peroxidase in einer Verdünnung von 1:50 000 diente als Reporterenzym. Die hoch-affine Streptavidin-Biotin Bindung vermittelt die Bindung dieses Reporterenzym an den Detektionsantikörper. Nach zehnminütiger Inkubation in Raumtemperatur wurde das Streptavidin-POX verworfen und die wells mit TBS-Tx erneut dreifach gewaschen. Anschließend wurden in jedes well 100 µl O-Phenyl-Diamin (OPD) pipettiert. OPD ist ein Substrat der Peroxidase und wird durch diese in 2,3-Diaminophenazine umgewandelt, was einen Farbumschlag von transparent auf gelb hervorruft. Die Farbreaktion wurde jeweils mit 20 µl 3M HCL pro well gestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte photometrisch im ELISA-Lesegerät (Victor<sup>2</sup>, Wallac, Freiburg i.B., Deutschland) bei 490 nm. Wir werteten eine Probe als positiv bei dreifach erhöhtem Messwert im Vergleich zur Standardabweichung der Negativproben.

### Durchführung des pSer81 Progranulin-ELISA

Als coating-Antikörper wurde ein kommerziell erworbener Kaninchen-anti-human-PGRN-Antikörper, welcher gegen den C-Terminus von PGRN gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:2 500 (v/v; LsBio, Seattle, WA, USA) verwendet. Geblockt wurde mit 1,5% (w/v) Gelatine in TBS. Die Waschschrte wurden mit TBS-Tx (TBS, 0,1% (v/v) Tx100) durchgeführt. Die Seren wurden in einer jeweiligen Verdünnung von 1:2 hinzupipettiert. Um hyperphosphoryliertes PGRN zu detektieren, wurden phospho-Ser81 spezifische Fabs in einer Konzentration von 10 µg/l benutzt. In Vorarbeiten konnten diese Fabs hergestellt werden und wurden vom Labor zur Verfügung gestellt (Turner et al. 2015). Anschließend wurden biotinylierte Sekundärantikörper gegen humane Fab-Fragmente und nachfolgend Streptavidin-POX 1:50 000 (Roche) eingesetzt. Der ELISA wurde insgesamt wie oben beschrieben durchgeführt.

### 3.3.3.3 Ortsspezifische Mutagenese

Mithilfe einer Analyse des Phosphorylierungsstatus verschiedener rek. PGRN-Fragmente sollte zunächst die Lokalisation der Hyperphosphorylierungsstelle der zusätzlichen PGRN-Isoform eingegrenzt werden. Anschließend wurden für das hyperphosphorylierte PGRN-Fragment die wahrscheinlichsten Phosphorylierungsstellen mithilfe einer öffentlich zugänglichen Vorhersage-Software berechnet ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)). Diese wurden dann mithilfe des QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, La Jolla, California, US) punktmutagenisiert. Im Einzelnen wurden zwei Mutanten des C-terminal FLAG getaggen PGRN DNA Fragmentes der Aminosäuren 1-112 erzeugt. Diese beiden Mutanten basierten auf

den beiden als am wahrscheinlichsten vorhergesagten Phosphorylierungsstellen Ser38 und Ser81. Für beide wurde jeweils Serin in Alanin punktmutagenisiert, d.h. Ser38Ala und Ser81Ala. Die beiden FLAG-markierten Fragmente wurden anschließend mittels dem pRTS-Vektor (Bornkamm et al. 2005) in LCLs von Patienten und Kontrollen transfiziert und exprimiert (Turner et al. 2015).

### 3.3.4 Statistik

Der Chi-Quadrat-Test wurde zur Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen der Prävalenz von PGRN-Ak und der Erkrankungsaktivität bei GPA-, EGPA- und MPA-Patienten sowie zwischen der Prävalenz von PGRN-Ak und der Anzahl an zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelten Seren pro Patient genutzt. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet. Alle statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm SPSS für Windows (Vers.19.0, IBM Armonk, NY, USA).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung von PGRN als Autoantigen bei Patienten mit Vaskulitis

In Vorarbeiten konnte PGRN als häufiges Zielantigen von Autoantikörpern in Patienten mit unterschiedlichen Vaskulitiden gefunden werden. Die PGRN-Autoantikörper konnten im Screening von Protein Macroarrays nach unbekanntem Autoantikörpern in neun gepoolten Seren von Patienten mit EGPA, zehn gepoolten Seren von Patienten mit GPA, zehn gepoolten Seren von Patienten mit cPAN und zehn gepoolten Seren von Patienten mit GCA beschrieben werden (Turner et al. 2013b).

### 4.2 Nachweis von PGRN-AK und Häufigkeits- sowie Subklassen Bestimmung

#### 4.2.1 Probenherkunft, Probenanzahl und untersuchte Erkrankungen

Es wurden wie vorangehend beschrieben Seren von Patienten mit Vaskulitiden, Kollagenosen und Myositiden untersucht. Größtenteils konnten die Patientenserum in der Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg/Saar, gesammelt werden. Die Arbeitsgruppe erhielt zudem Seren von Partnerlaboren. Eine Auflistung über Anzahl und Herkunft der für die jeweilige Erkrankung eingeschlossenen Patienten kann in Tabelle 13 eingesehen werden.

**Tabelle 13: Anzahl und Herkunft der eingeschlossenen Patienten**

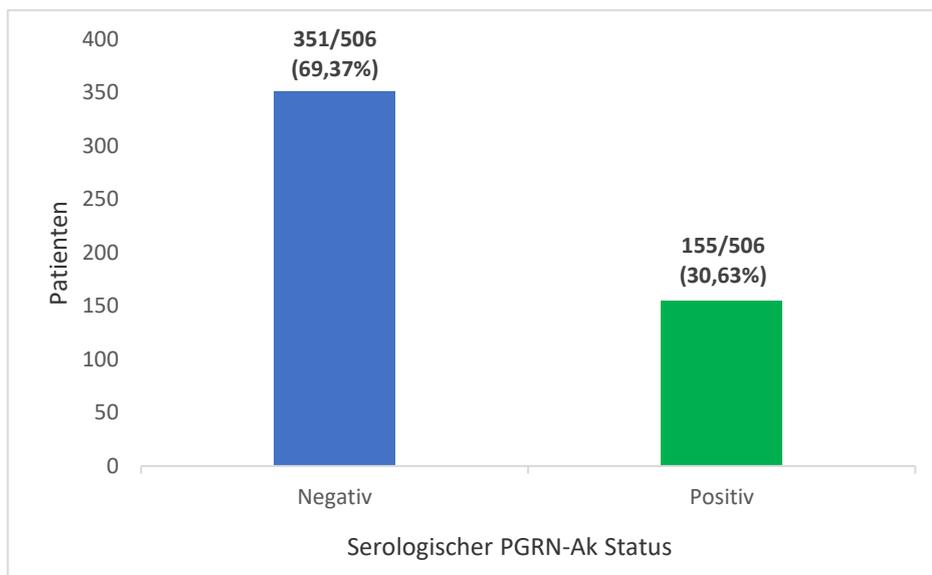
Diagnose	Herkunft der Patienten				
	Homburg	Bad Bramstedt	Freiburg i. Br.	Strasbourg	Gesamt
	Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl	
cPAN	0	10	0	0	10
TA	13	0	0	0	13
GCA/PMR	40	10	15	0	65
AAV	6	0	0	0	6
EGPA	5	18	0	0	23
MPA	9	10	0	0	19
GPA	36	39	0	0	75
MB	4	0	0	4	8
DM/PM	27	0	0	6	33
MCTD	17	0	0	0	17
SLE	80	0	0	11	91
APLS	1	0	0	14	15
Sjögren/Sicca	22	0	0	9	31
CREST	8	0	0	0	8
SSc	26	0	0	5	31
NIKG	30	0	0	0	30
IKG	31	0	0	0	31
<b>Gesamt</b>	<b>355</b>	<b>87</b>	<b>15</b>	<b>49</b>	<b>506</b>

#### 4.2.2 Beschreibung des Patientenkollektives

Das durchschnittliche Alter der 506 eingeschlossenen Patienten betrug 55,21 Jahre. Von den 506 eingeschlossenen Patienten waren 70% (355) weiblich, 30% (151) männlich.

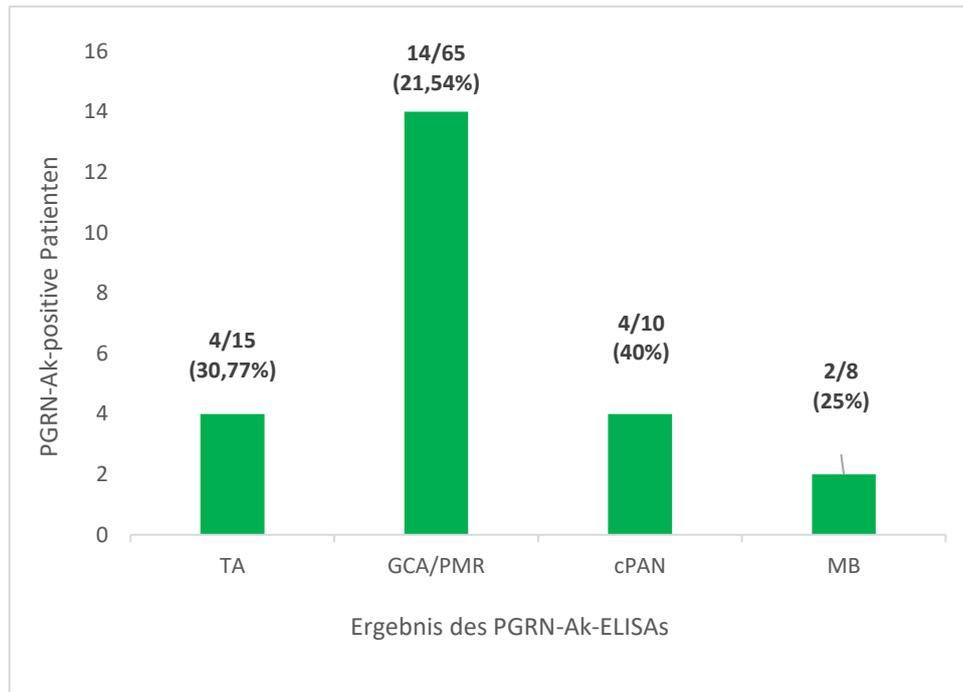
#### 4.2.3 Häufigkeit von PGRN-Antikörpern

Insgesamt konnte über alle eingeschlossenen Erkrankungen hinweg bei 155 von 506 Patienten (30,63%) serologisch PGRN-Ak nachgewiesen werden (Abbildung 1).



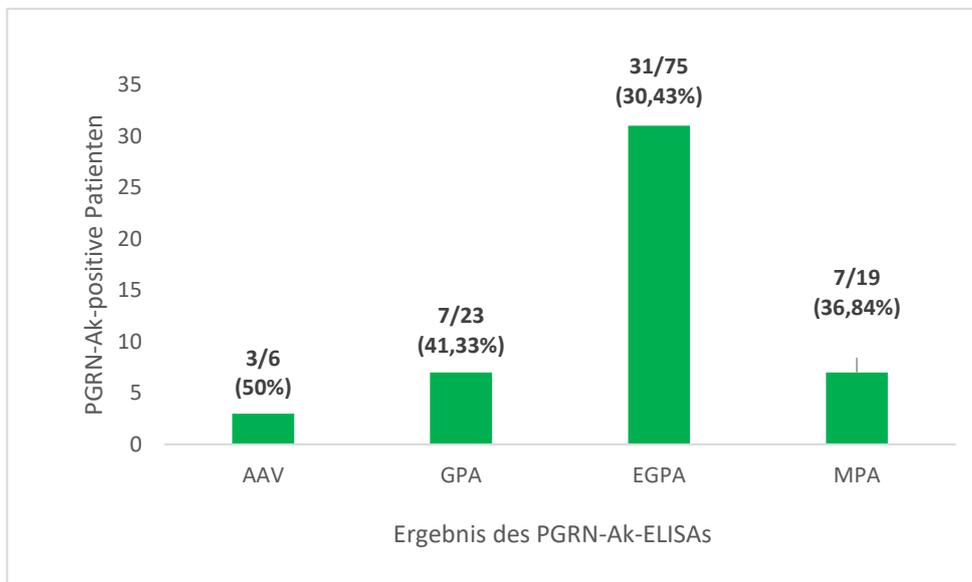
**Abbildung 1: Anzahl der mittels ELISA untersuchten Patienten und des ermittelten PGRN-Ak Status.**

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse bei Patienten mit Vaskulitiden. In der Gruppe der Großgefäßvaskulitiden waren 4 von 13 (21,05%) Patienten mit TA, und 14 von 65 (21,54%) Patienten mit GCA/PMR seropositiv für PGRN-Ak. In der Gruppe der Mittelgefäßvaskulitiden waren 4 von 10 (40%) -Patienten mit cPAN positiv für PGRN-Ak. In der Gruppe der Gefäßvaskulitis mit variablen Gefäßbefall konnten bei 2 von 8 (25%) Patienten mit MB PGRN-Ak nachgewiesen werden.



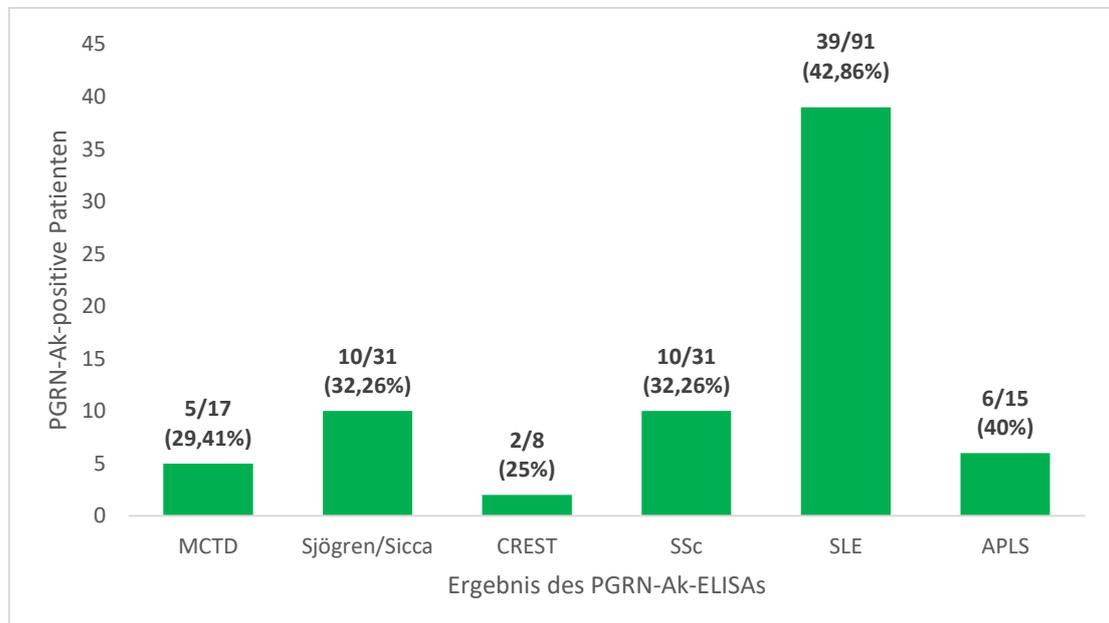
**Abbildung 2: PGRN-Ak-Status bei Patienten mit TA, GCA/PMR, cPAN und MB.**

In der Gruppe der Kleingefäßvaskulitiden (Abbildung 3) konnten bei 3 von 6 (50%) Patienten mit AAV ohne weiterer Zuordnung, bei 31 von 75 (41,3%) Patienten mit GPA, bei 7 von 23 (30,43%) Patienten mit EGPA und bei 7 von 19 (36,84%) Patienten mit MPA PGRN-Ak nachgewiesen werden.



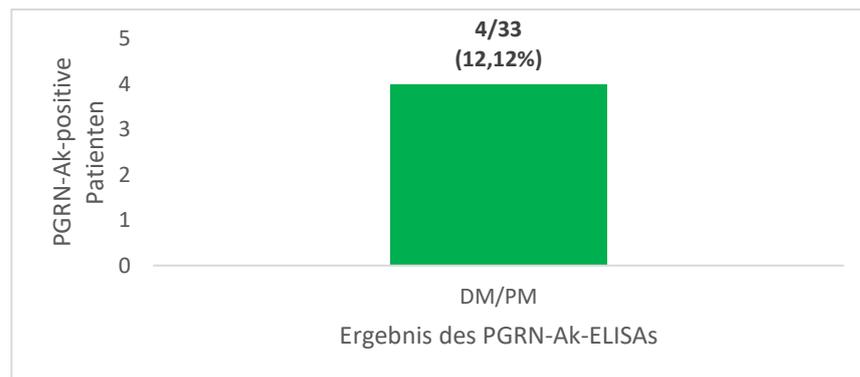
**Abbildung 3: PGRN-Ak-Status bei Patienten mit AAV ohne weitere Zuordnung, GPA, EGPA und MPA.**

Bei Patienten mit einer Kollagenose konnten bei 5 von 17 (29,41%) Patienten mit UCTD, bei 10 der 31 (32,26%) Patienten mit Sjögren Syndrom, bei 2 von 8 (25%) Patienten mit CREST-Syndrom, bei 10 von 31 (32,26%) Patienten mit SSc-, bei 39 von 91 (42,86%) Patienten mit SLE und bei 6 von 15 (40%) Patienten mit APLS PGRN-Ak nachgewiesen werden (Abbildung 4).



**Abbildung 4: PGRN-Ak-Status bei Patienten mit MCTD, Sjögren/Sicca, CREST, SSc, SLE und APLS.**

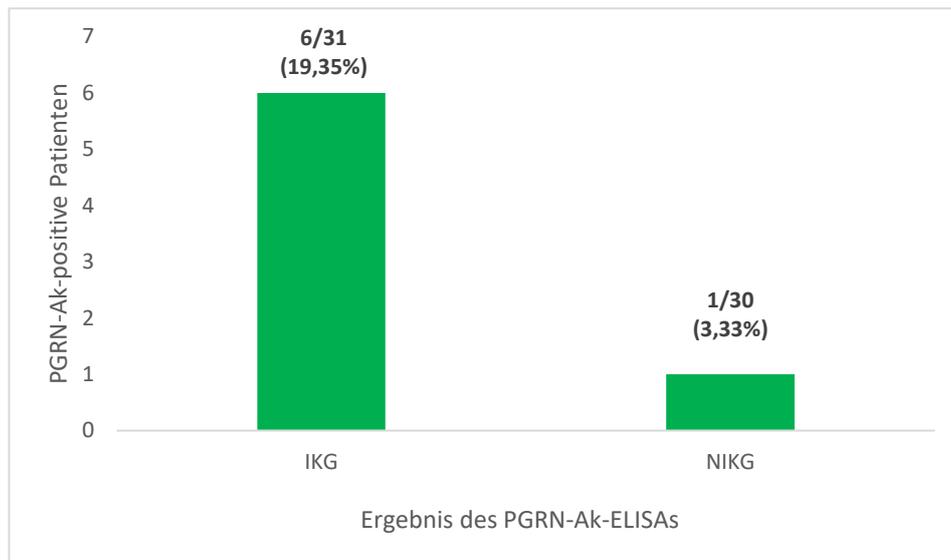
Abbildung 5 zeigt Patienten mit Myositiden (DM/PM). Hier konnten in 4 der 33 Fälle (12,12%) PGRN-Ak nachgewiesen werden.



**Abbildung 5: PGRN-Ak-Status bei Patienten mit DM/PM.**

Bei Patienten in den angelegten Kontrollgruppen (Abbildung 6) konnten PGRN-Ak bei 6 von 31 (19, 35%) Patienten der immunologischen Kontrollgruppe (IKG) und bei 1 von 30 Patienten der nicht-immunologischen Kontrollgruppe (NIKG) nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe

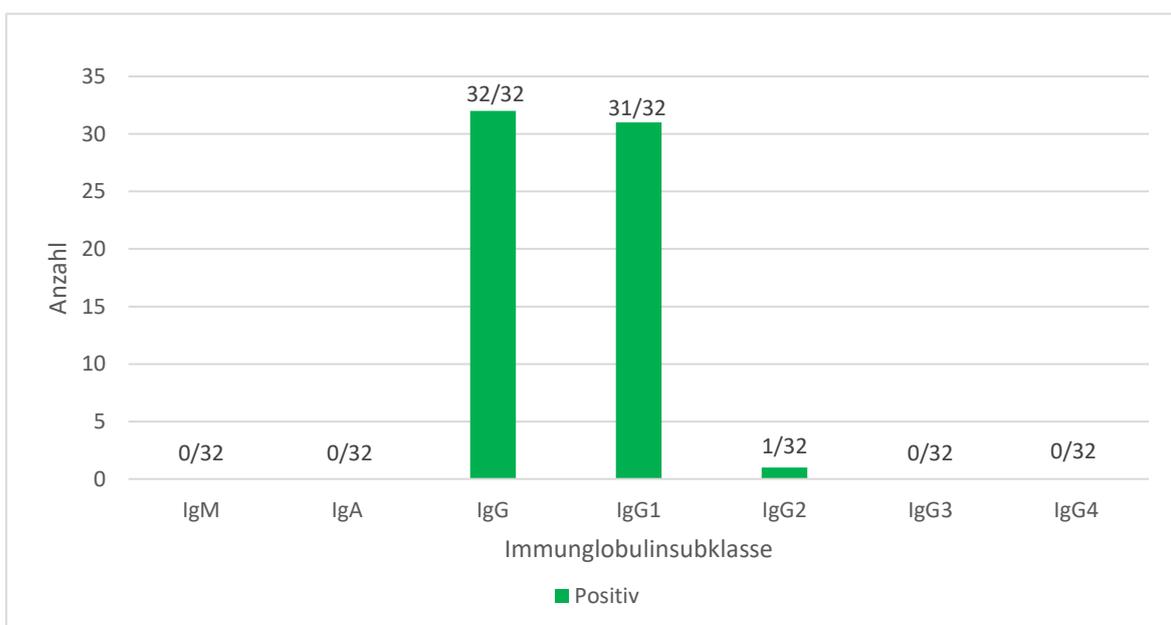
untersuchte zudem im Sinne von Kontrollgruppen gesunde Kontrollen, Altersheimbewohner und Übergewichtige (Thurner et al. 2013b).



**Abbildung 6: PGRN-Ak-Status in der immunologischen Kontrollgruppe (IKG) und der nicht-immunologischen Kontrollgruppe (NIKG).**

#### 4.2.4 Progranulin-Antikörper Subklassen

Die große Mehrheit (31 von 32, entsprechend 96,9%) der PGRN-AK in ANCA assoziierten Vaskulitiden (Abbildung 7) gehörten der IgG1 Subklasse an. In einem Fall gehörte der PGRN-Ak der IgG2 Subklasse an (Thurner et al. 2013b).



**Abbildung 7: Immunglobulinsubklassen der PGRN-Ak.**

### 4.3 Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und PGRN-Ak Status in Patienten mit Kleingefäßvaskulitiden

Von einigen Patienten konnten mehrere zeitlich getrennte Proben in unterschiedlich aktiven Stadien (aktiv/inaktiv) gesammelt werden.

So konnten 68 zeitlich getrennte Proben von 34 GPA-Patienten in einem aktiven und inaktiven Erkrankungsstadium gesammelt werden (Tabelle 14). Von den 31 Proben aus einem aktiven Erkrankungsstadium zeigten sich 12 positiv für PGRN-Ak. Von den 37 Proben aus einem inaktiven Krankheitsstadium (Remission) waren vier positiv auf PGRN-Ak. Statistisch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen positiven PGRN-Ak Status und der Erkrankungsaktivität bei Patienten mit GPA ( $\chi^2$ -Test:  $p=0,008$ ). Von 18 Patienten mit EGPA konnte jeweils eine Probe in einem aktiven und inaktiven Erkrankungsstadium ( $n=36$ ) gesammelt werden. Es zeigte sich kein statistischer Zusammenhang zwischen dem PGRN-Ak Status und der Erkrankungsaktivität (aktiv bzw. in Remission) ( $\chi^2$ -Test: 0,519). Bei 10 zeitlich getrennt entnommenen Proben von 5 MPA-Patienten in einem jeweils aktiven und inaktiven Erkrankungsstadium zeigte sich kein statistischer Zusammenhang zwischen dem PGRN-Ak Status und der Erkrankungsaktivität (aktiv bzw. in Remission) ( $\chi^2$ -Test: 0,500). Insgesamt zeigte sich bei diesen 57 Patienten mit einer ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitis ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem PGRN-Ak Status und der Erkrankungsaktivität (aktiv bzw. in Remission) ( $\chi^2$ -Test: 0,033) (Turner et al. 2013b).

**Tabelle 14: Chi-Quadrat Test zwischen der Krankheitsaktivität in AAV und PGRN-Ak Status**

Erkrankung			Krankheitsaktivität		Gesamt	p-Wert ( $\chi^2$ )
			Aktiv	In Remission		
GPA	PGRN-Ak-Status	neg.	19	33	52	0,008
		pos.	12	4	16	
	Gesamt		31	37	68	
EGPA	PGRN-Ak-Status	neg.	12	14	26	0,519
		pos.	4	6	10	
	Gesamt		16	20	36	
MPA	PGRN-Ak-Status	neg.	3	4	7	0,500
		pos.	2	1	3	
	Gesamt		5	5	10	
Alle AAV	PGRN-Ak-Status	neg.	34	51	85	0,033
		pos.	18	11	29	
	Gesamt		52	62	114	

#### 4.4 Zusammenhang zwischen PGRN-Ak Status und Anzahl untersuchter Seren pro Patient

Um die Frage zu beantworten, ob eine höhere Anzahl longitudinal gesammelter Proben pro Patient zu einem höheren Nachweis von PGRN-Ak führt, wurden longitudinal gesammelte Proben von Patienten mit Kollagenosen untersucht. So konnten bei 34 von insgesamt 89 Kollagenose Patienten mit MCTD, APLS, Sjögren/Sicca, SSc oder DM, welche in der Uniklinik des Saarlandes/Homburg eingeschlossen wurden, zwei oder mehr Seren zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt werden (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Übersicht der Anzahl longitudinal gesammelter Seren pro Patient mit einer Kollagenose**

Gesammelte Seren pro Patient	Anzahl an Patienten und proz. Anteil [%]
1	55 (61,8)
2	20 (22,46)
3	10 (11,24)
4	4 (4,5)
Gesamt	89 (100)

Diese Patienten wiesen die in Tabelle 16 aufgeführten Charakteristiken auf.

**Tabelle 16: Patientencharakteristika**

	APS	SSc	DM/PM	SjS	dSSc	MCTD
<b>Anzahl [N]</b>	1	8	27	13	26	14
<b>Geschlecht</b>						
männlich	0	0	9	0	9	2
weiblich	1	8	18	13	17	12
<b>Altersmedian [Jahre]</b>	55.0	70.0	62.0	51.0	63.50	47.0
<b>PRGN-Ak</b>						
Ja	1	2	3	5	9	3
Nein	0	6	24	8	17	11
<b>Etablierte Auto-Ak</b>	Anti-CL, Anti-b-2GPI	Anti-CentromerB	Anti-Jo-1	Anti-Ro (SSA), Anti-La (SSB)	Anti-Sc170	Anti-U1, Anti-dsDNA, Anti-Sm, Anti-Ro, Anti-La, Anti-Jo1
Ja	1	6	3	10	11	7
Nein	0	2	24	3	15	7
<b>Immunsuppressive Therapie</b>						
Ja	1	5	22	6	14	7
Nein	0	3	5	7	12	7

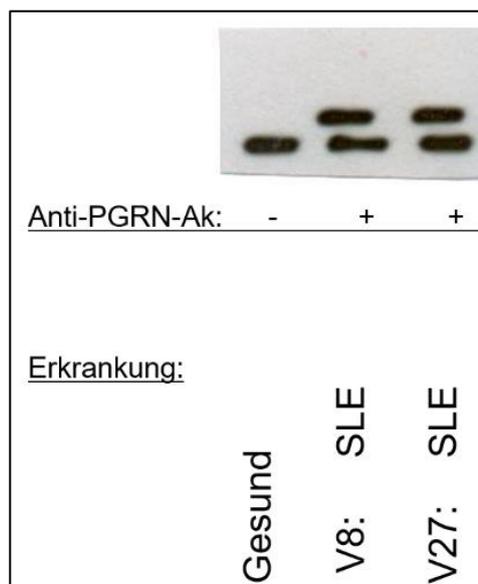
Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem positiven PGRN-Ak-Status und mehreren untersuchten Seren pro Patient, wenn die Seren zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt wurden ( $\chi^2$ -Test:  $p=0,036$ ), siehe Tabelle 17.

**Tabelle 17: Chi-Quadrat Test zwischen der Anzahl an zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelter Seren und des PGRN-Ak Status von Patienten mit Kollagenose**

Anzahl an zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelter Seren	PGRN-Ak Status		Gesamt	p-Wert ( $\chi^2$ )
	negativ	positiv		
1 Serum	45	10	55	
Mehrere Seren	21	13	34	
Gesamt	66	23	89	0.036

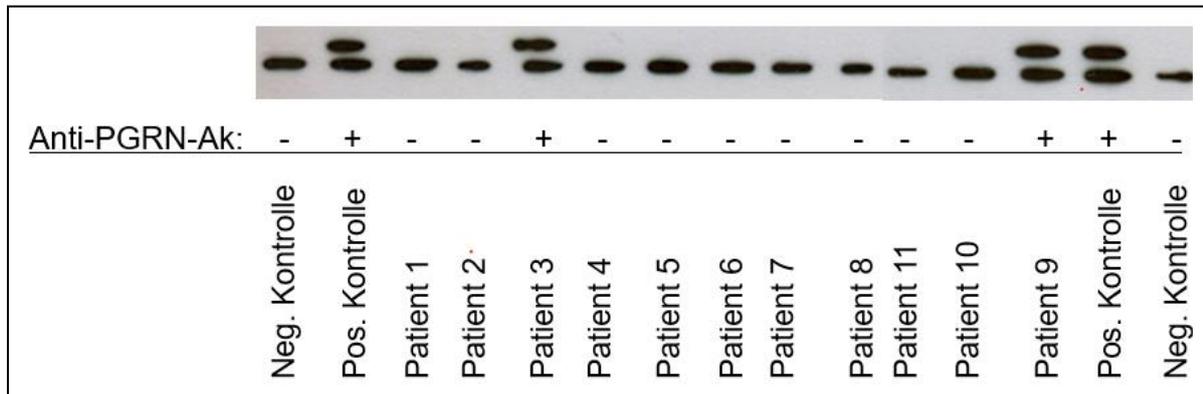
#### 4.5 Entdeckung einer zweiten PGRN-Isoform in PGRN-Ak-positiven Patienten

Um die Entstehung von PGRN-Ak zu untersuchen, wurde zunächst die kodierenden Sequenzen für PGRN von PGRN-Ak positiven und – negativen Patienten auf Mutationen untersucht. Hier zeigten sich keine Unterschiede. Auch im Western Blot von PGRN fanden sich keine erkennbaren Unterschiede im Molekulargewicht zwischen Ak-positiven und -negativen Patienten (Turner et al. 2015). Daraufhin wurde PGRN von Gesunden, PGRN-Ak-negativen und -positiven Patienten auf proteomischer Ebene weiter untersucht. In der IEF von Vollblutlysaten zeigten sich Doppelbanden bei allen untersuchten PGRN-Ak positiven Patienten (p3, p9, V8 und V27) im Sinne einer zusätzlich stärker negativ geladenen Isoform des PGRNs (Abbildung 8).



**Abbildung 8: IEF von zwei Patienten mit SLE (V8 und V27) und einer gesunden Kontrolle.** Beide SLE-Patienten sind PGRN-Ak positiv und zeigen im IEF Doppelbanden im Vergleich zur gesunden, PGRN-Ak negativen Kontrolle mit einfacher Bande.

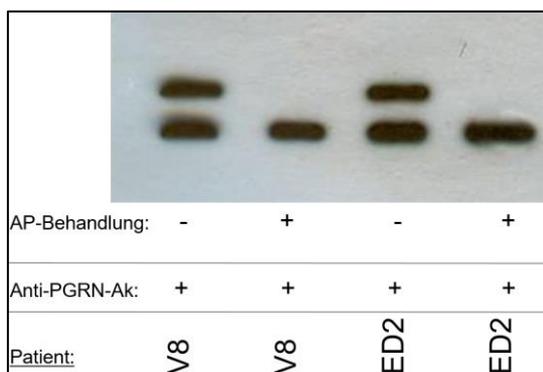
Patienten, welche im untersuchten Serum negativ auf PGRN-Ak waren, zeigten diese Doppelbanden nicht. Diese Patienten besaßen jedoch PGRN-Ak-positive Seren vor dem aktuell untersuchten PGRN-Ak negativem Serum (Abbildung 9). Dieses Ergebnis legte eine transiente posttranslationale Modifikation des PGRN nahe, die stark mit dem Vorkommen der entsprechenden Ak assoziiert war.



**Abbildung 9: IEF von Vollblutlysaten (p1-9) und Kontrollen (+/-).** Zwei PGRN-Ak positive Patienten (p3 und p9) zeigen eine Doppelbande im Sinne einer zusätzlichen zweiten PGRN-Isoform. Neun PGRN-Ak negative Patienten zeigen keine Doppelbanden und somit keine zweite PGRN-Isoform. Diese neun aktuell seronegativen Patienten mit nur einer PGRN-Isoform, waren aber zuvor bereits einmal serologisch PGRN-Ak positiv gewesen. Dies deutet auf ein transientes Vorkommen der PGRN-Antikörper und auch der zusätzlichen, zweiten PGRN-Isoform hin.

#### 4.6 Nachweis einer Hyperphosphorylierung der zusätzlichen PGRN Isoform

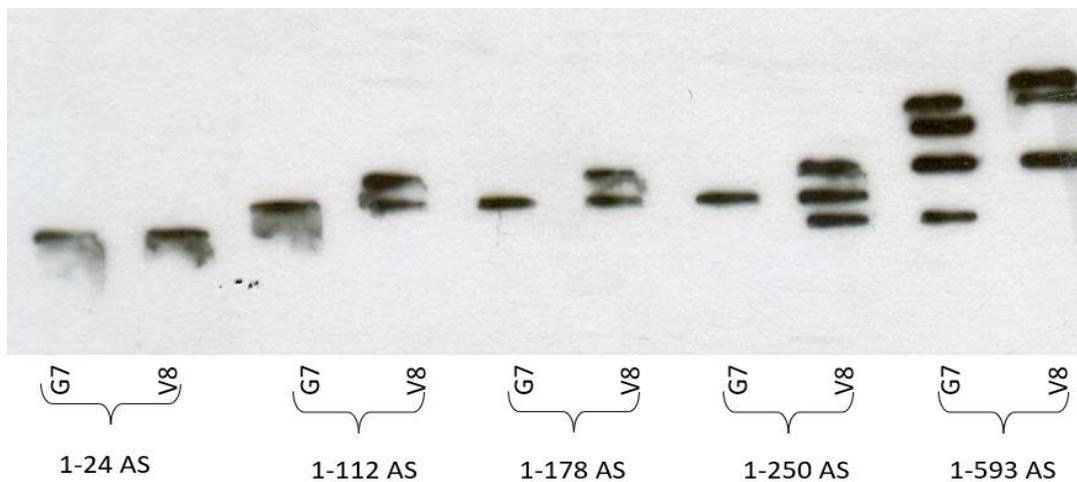
Da keine sichtbaren Unterschiede im Molekulargewicht beider PGRN-Isoformen mittels Western Blot detektierbar waren und die Isoformen in der IEF eine unterschiedliche Ladung zeigten, wurden die PGRN-Isoformen auf Unterschiede der Phosphorylierung untersucht. Die Vorbehandlung der untersuchten Seren mit alkalischer Phosphatase führte zu einem Verschwinden der zusätzlichen zweiten Bande in der anschließend durchgeführten IEF. Somit konnte durch die Vorbehandlung und den Verdau durch alkalische Phosphatase die Hyperphosphorylierung der zusätzlichen Isoform, welche nur bei PGRN-Ak positiven Patienten zu finden war, bewiesen werden (Abbildung 10).



**Abbildung 10: IEF von zwei PGRN-Ak positiven Patienten (V8 und ED2) vor und nach Behandlung mit AP.** Durch die AP-Behandlung verschwindet die zweite, stärker negativ geladene PGRN-Isoform.

#### 4.7 Identifikation der Phosphorylierungsstelle

Um die Lokalisation der Phosphorylierungsstelle zu identifizieren, mussten zunächst die Anzahl und Lage der möglichen Phosphorylierungsstellen eingegrenzt werden. Hierzu wurden C-terminal FLAG getaggte PGRN-Fragmente über einen pRTS Vektor in LCLs von PGRN-Ak-positiven und -negativen Patienten exprimiert. Dann wurden die Lysate der LCLs mittels IEF aufgetrennt und anschließend unter Verwendung von Anti-FLAG Primärantikörpern detektiert. Hiermit konnte die Lokalisation der Phosphorylierungsstelle auf die Aminosäuren (AS) 24-112 eingegrenzt werden. Dieses Fragment beinhaltet ebenfalls die Epitopregion der PGRN-Ak (Turner et al. 2013b). Die zusätzlich auftretenden Isoformen bei Fragmenten >250 AS sind durch GRN-Spaltprodukte zu erklären (Abbildung 11).



**Abbildung 11: IEF von LCL-Lysaten zweier Patienten, welche PGRN-Ak positiv (V8) und negativ (G7) waren.** Es wurden C-terminal FLAG getaggte PGRN-Fragmente über einen pRTS Vektor in LCLs dieser Patienten exprimiert. Die zweite Isoform tritt im Bereich zwischen 24-112 AS auf. Die zusätzlichen Banden beim Vollständigeprotein (1-593 AS) entstehen durch Konversionsprodukte.

Zur weiteren Identifikation der zusätzlich phosphorylierten AS innerhalb dieses Fragments/Proteinabschnitts (AS 24-112) benutzen wir NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>). NetPhos ist ein Prädiktionssystem basierend auf einem neuronalen Netzwerk (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). Es ermöglicht die Schätzung von Serin, Threonin und Tyrosin Phosphorylierungsstellen von eukaryoten Proteinen. Es berechnete Ser38 und vor allem Ser81 als wahrscheinlichste Phosphorylierungsstellen in diesem Fragment von PGRN (Abbildung 12).

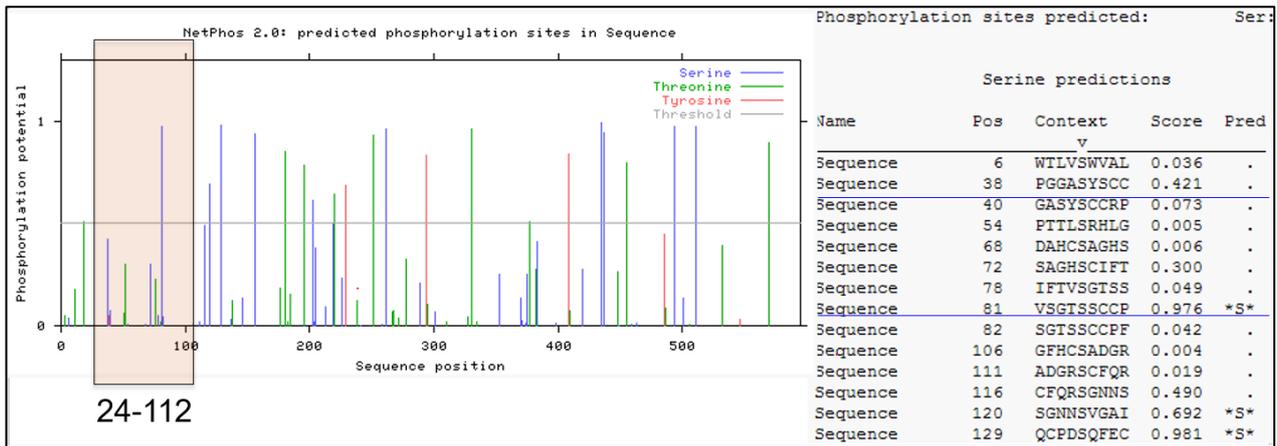


Abbildung 12: NetPhos Analyse mit Nachweis von Ser38 und Ser81 als wahrscheinlichste Phosphorylierungsstelle.

#### 4.8 Mutagenisierung der wahrscheinlichsten P-Stellen

Zur Überprüfung dieser Vorhersage und zur Klärung, ob es sich um eine oder mehrere Hyperphosphorylierungsstellen handelt, erfolgten entsprechende Punktmutagenisierungen Ser38Ala und Ser81Ala innerhalb des C-terminal FLAG-getaggten PGRN-Fragmentes. Anschließend führten wir erneut IEFs der lysierten LCLs mit den punktmutierten FLAG-getaggten PGRN durch. Die hyperphosphorylierte PGRN Isoform konnte in der IEF der Ser38Ala-PGRN-Isoform nachgewiesen werden. Die Ser81Ala-PGRN-Isoform zeigte jedoch keine Doppelbande, d.h. keine zweite PGRN-Isoform mehr (Abbildung 13). Somit wiesen wir Ser81 als Hyperphosphorylierungsstelle nach.

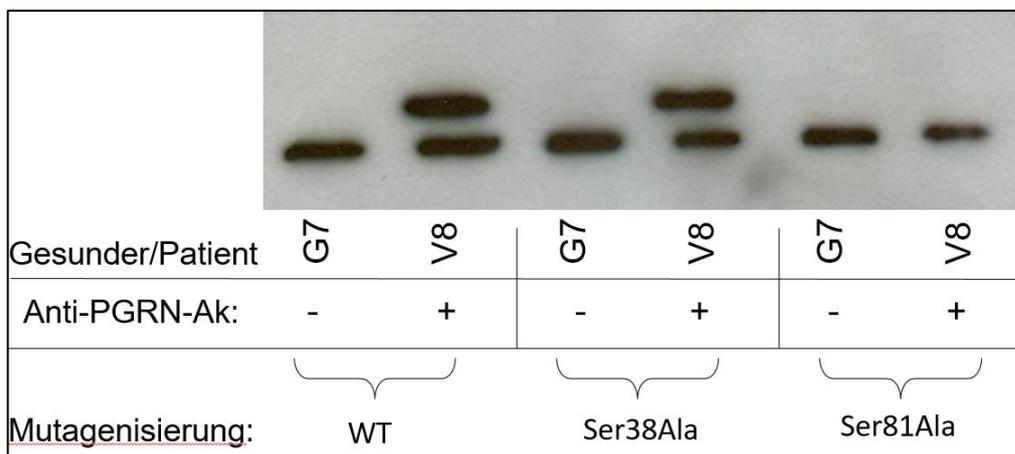
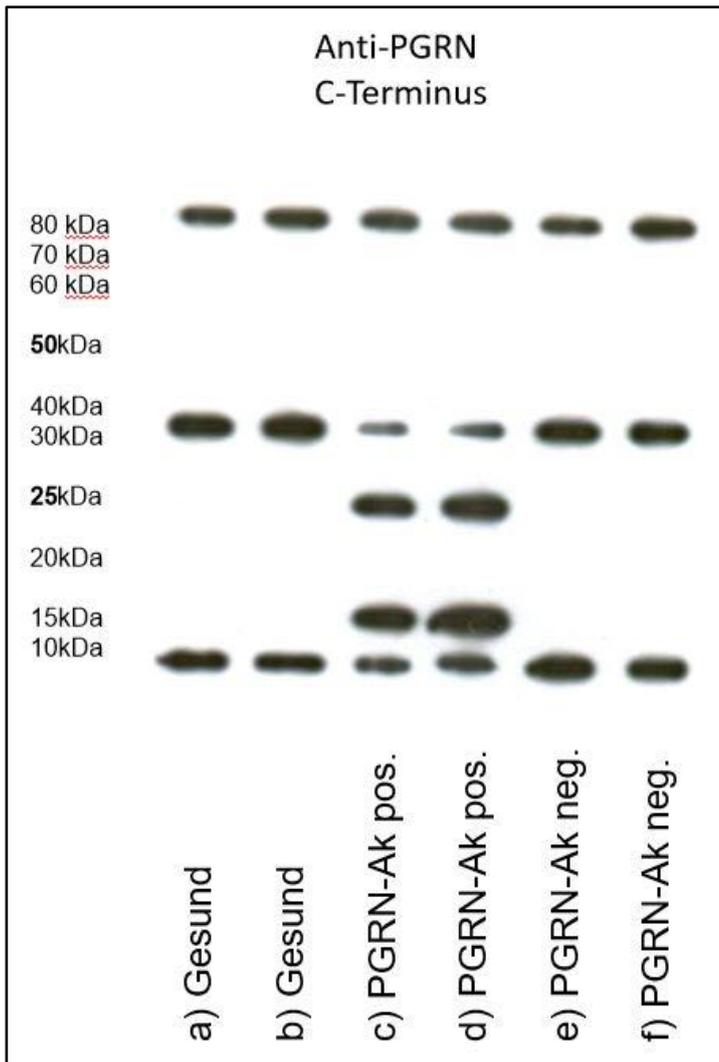


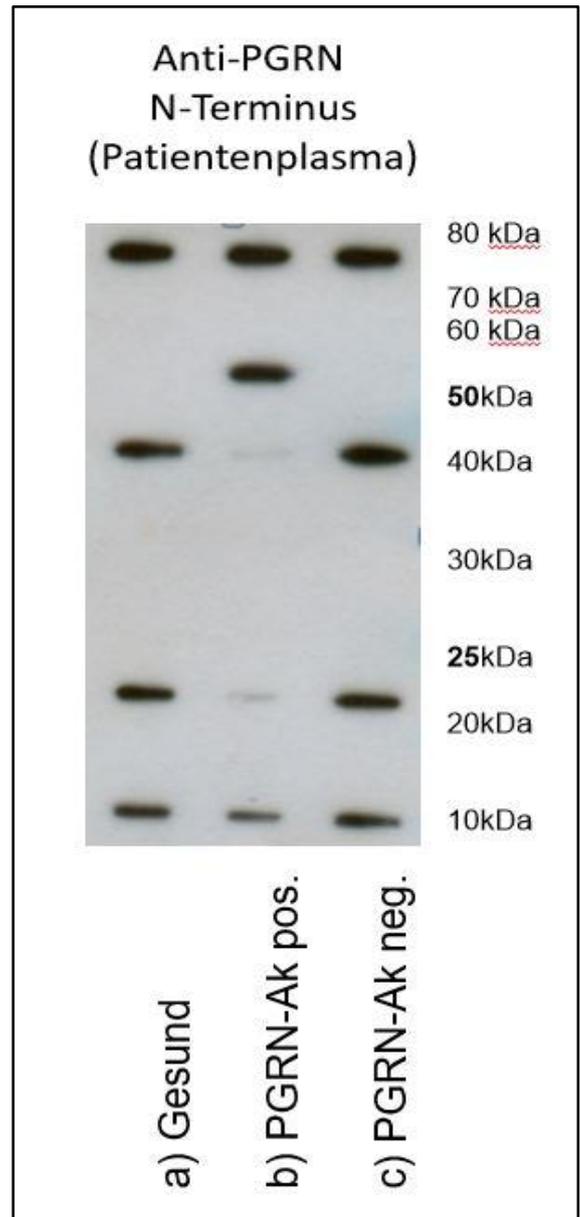
Abbildung 13: IEF der LCL-Lysate mit den punktmutierten PGRN-Sequenzen (Ser38Ala und Ser81Ala). Das Ser81Ala mutierte PGRN-Fragment weist keine Doppelbanden im Sinne einer Hyperphosphorylierung auf.

#### 4.9 Unterschiedliche Spaltung des hyperphosphorylierten PGRN

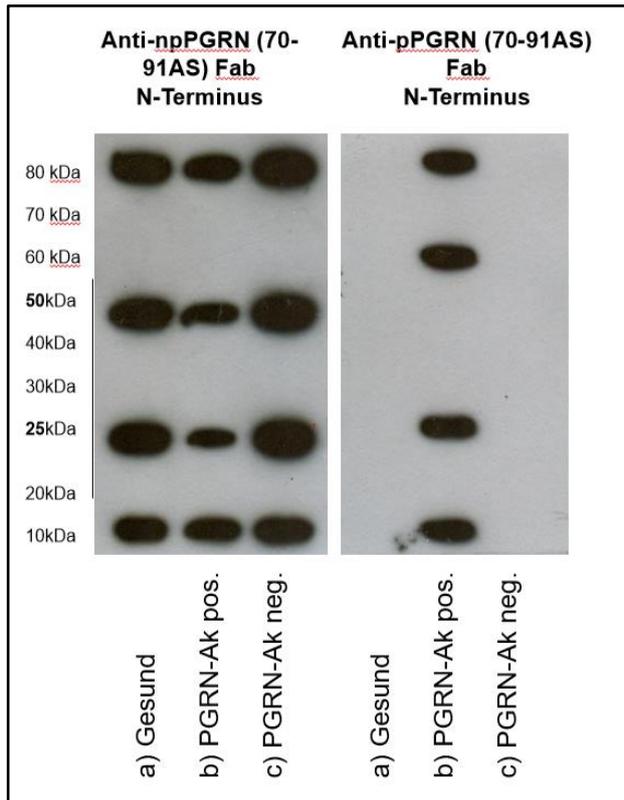
Vollblutlysate zeigten im Western Blot und anschließendem Gradienten-SDS-PAGE im Vergleich insgesamt ein anderes Spaltungsmuster von PGRN in mature GRN bei PGRN-Ak positiven Patienten und bei PGRN-Ak negativen Patienten oder Gesunden (Abbildung 17). Es zeigte sich ein längeres N-terminales Fragment mit 55 kDa anstatt des normalerweise/physiologisch vorkommenden 45 kDa großen Fragmentes. PGRN-Ak positive Patienten zeigten beide Fragmente, wobei die Bande des 55 kDa großen Fragmentes deutlich stärker war (Abbildung 15). Zudem zeigten sich bei PGRN-Ak-positiven Patienten zusätzliche kürzere C-terminale Fragmente mit 25 kDa und 15 kDa Größe. Das normalerweise initial auftretende C-terminale Spaltfragment besitzt eine Größe von 35 kDa. In PGRN-Ak positiven Patienten konnten ebenfalls beide C-terminalen Fragmente (normal und kleinere) nachgewiesen werden, das Normale jedoch schwächer als die kleineren (Abbildung 14). Durch Western Blots des N-terminalen Konversionsfragmentes mit spezifischen Fabs gegen den N-Terminus des phosphorylierten Ser81 PGRN und des nicht-phosphorylierten Ser81 PGRN konnten wir nachweisen, dass die an Ser81 phosphorylierte PGRN-Isoform spezifisch alternativ gespalten wird (Abbildung 16). Dies weist auf eine Änderung der initialen Spaltung in Richtung C-Terminus von der Linkerregion GRN A - GRN C zur Linkerregion GRN C -GRN D hin. Dieses geänderte Spaltungs-/Konversionsmuster des phosphorylierten Ser81 PGRN konnten wir ebenfalls in LCLs von PGRN-Ak-positiven Patienten nachweisen. In LCLs von PGRN-Ak-negativen Patienten und in gesunden Kontrollen zeigte sich dagegen das bekannte physiologische Spaltungsmuster.



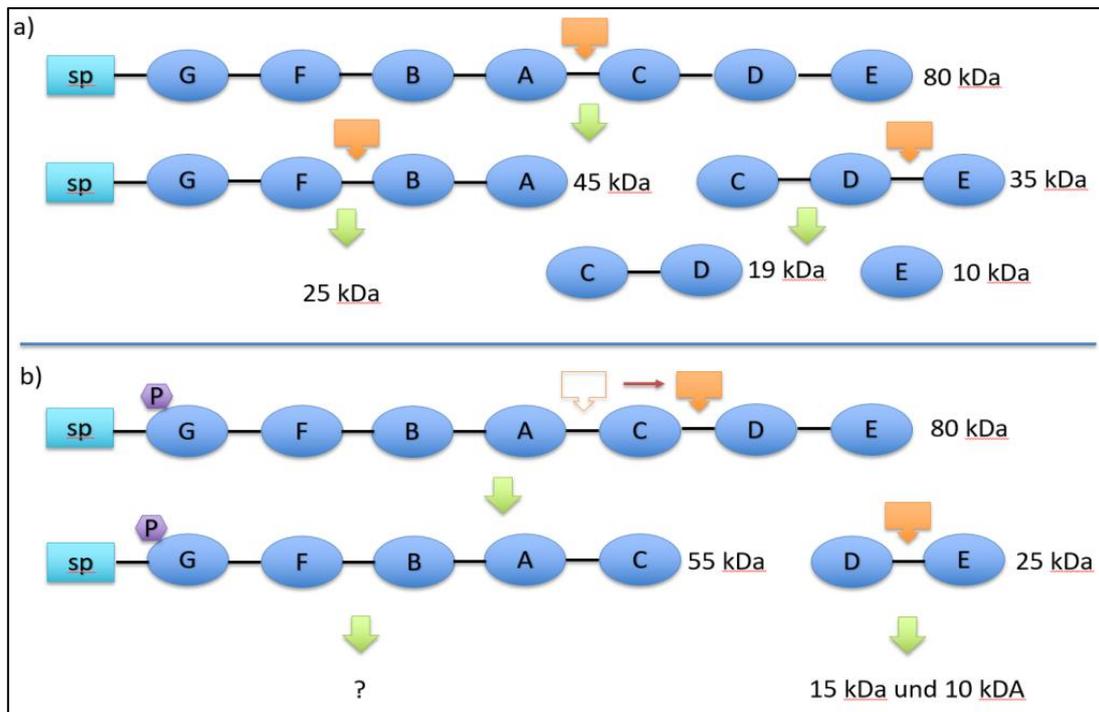
**Abbildung 14: Unterschiedliche Konversionsmuster von PGRN in GRN erkannt durch einen PGRN-Ak gegen den C-Terminus.** Western-Blot mit einem PGRN-Ak gegen den C-Terminus von Vollblutlysaten zweier gesunden Kontrolle, zweier PGRN-Ak positiven und zweier PGRN-Ak negativen Patienten



**Abbildung 15: Unterschiedliche Konversionsmuster von PGRN in GRN erkannt durch einen nicht-phosphorylierungsspezifischen PGRN-Ak gegen den N-Terminus.** Western-Blot mit einem nicht-phosphospezifischen PGRN-Ak von Vollblutlysaten einer gesunden Kontrolle, eines PGRN-Ak positiven und eines PGRN-Ak negativen Patienten.



**Abbildung 16: Unterschiedliche Konversionsmuster von PGRN in GRN erkannt durch Fab, der spezifisch für die nicht-phosphorylierte PGRN-Isoform ist, und einen phosphospezifischen Ser81-PGRN-Fab gegen den N-Terminus.** Im ersten Western Blot wurde ein Ser81-PGRN-Fab gegen den N-Terminus von Vollblutlysaten einer gesunden Kontrolle, einem PGRN-Ak positiven und einem PGRN-Ak negativen Patienten benutzt. Dieser Fab bindet spezifisch die an Ser81 nicht-phosphorylierte PGRN-Isoform. Im zweiten Western Blot wurde ein spezifisch an die Ser81-phosphorylierte PGRN-Isoform bindender Fab gegen den N-Terminus von Vollblutlysaten einer gesunden Kontrolle, einem PGRN-Ak positiven und einem PGRN-Ak negativen Patienten benutzt. Dieser Blot zeigt das alleinig pSer81 PGRN alternativ gespalten wird.



**Abbildung 17: Unterschiedliche Koverionsmuster von PGRN (17a) und pSer81-PGRN (17b).** Bei pSer81-PGRN kommt es zu einer Verlagerung der ersten Spaltung von der GRN-Region A-C auf die GRN-Region C-D mit folgender Veränderung der Spaltungsmuster und -produkte.

## 5. Diskussion

Primäres Ziel der Arbeitsgruppe war es neue, pathologisch relevante Autoantikörper in Seren von Patienten mit systemischen Vaskulitiden zu identifizieren. Die Diagnostik als auch das pathogenetische Verständnis dieser Erkrankungen sollte verbessert werden. Mittels Proteinarray-Screening gelang in Seren von Patienten mit GPA, EGPA, MPA, GCA und cPAN der Nachweis von IgG-Autoantikörpern gegen PGRN (Turner et al. 2013b).

In dieser Arbeit konnten erstmalig mittels ELISA PGRN-Ak in Vaskulitiden, Kollagenosen und Myositiden nachgewiesen werden. Es gelang die Etablierung einer ersten Prävalenz von PGRN-Ak in diesen Erkrankungen. Insgesamt waren von 506 untersuchten Patienten 30,63% (155) positiv auf PGRN-Ak. Die gefundenen Antikörper kommen in relevanten Titern vor, gehören überwiegend der IgG1-Subklasse an und senken die Plasma-PGRN Spiegel (Turner et al. 2013b). Die Arbeitsgruppe konnte überdies PGRN-Ak in rheumatoider Arthritis, Psoriasisarthritis und entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen (Turner et al. 2013b; Turner et al. 2013a; Turner et al. 2014). Daraus lässt sich auf ein erkrankungsunspezifisches Auftreten von PGRN-AK in weiten Teilen des Spektrums autoreaktiver Erkrankungen schließen.

Am häufigsten konnten PGRN-AK bei Patienten mit AAV und SLE nachgewiesen werden. Vergleichend scheint es, dass PGRN-Ak häufiger bei AAV und MVV als bei LVV und Vaskulitiden mit variablem Gefäßbefall vorkommen. Wenig überraschend spielen autoreaktive B-Lymphozyten, Autoantikörper und ektopymphoide Strukturen mit B-Zell Clustern in diesen Erkrankungen eine große Rolle (Xiao et al. 2002; Bansal & Tobin 2004; Schlieben et al. 2005; reviewed in Bertias et al. 2010; reviewed in George C. Tsokos 2011). Interessanterweise konnten PGRN-Ak selbst in autoimmunen Erkrankungen mit einer nach aktuellem Erkenntnisstand weniger stark ausgeprägten pathogenetischen Rolle der B-Zelle wie zum Beispiel cPAN, GCA oder TA nachgewiesen werden. Wie in der Einleitung dargestellt, deuten neuere Studien hier auf eine größere pathogenetische Relevanz der B-Zellen hin (Regent et al. 2011; Hoyer et al. 2012).

Diese Arbeit untersuchte zusätzlich zwei Kontrollgruppen. Die eine setzte sich aus Patienten zusammen, welche eine Autoimmunerkrankung, z.B. Hashimoto-Thyreoiditis, entwickelt hatten. Die andere Kontrollgruppe fasste Patienten zusammen, welche nicht autoimmun erkrankt waren, z.B. bei einem akuten, prärenalen Nierenversagen. Interessanterweise konnten PGRN-Ak in der Kontrollgruppe der autoimmunen Erkrankten in 19,35% nachgewiesen werden. Dagegen gelang der Nachweis von PGRN-AK in der Kontrollgruppe der nicht autoimmun Erkrankten in nur 3,33%. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass PGRN-AK keine pathognomonische Relevanz besitzen, jedoch sehr wohl ein autoimmunes Geschehen anzeigen.

Ähnliche Ergebnisse zeigte Thurner et al., welcher 97 Gesunde, 40 Patienten mit Adipositas, 48 Altenheimbewohner und 22 Sepsis-Erkrankte im Sinne von Kontrollgruppen untersuchte. Jeweils einer von 97 Gesunden und einer von 48 Altenheimbewohner hatte PGRN-Ak (Thurner et al. 2013b). PGRN spielt eine Rolle in der Karziogenese (u.a. Zhang & Serrero 1998; He & Bateman 2003) und in der Adipositas (Matsubara et al. 2012). Das Vorkommen von Autoantikörpern ist bei Menschen mit höherem Lebensalter wahrscheinlicher. So nimmt zum Beispiel das Vorkommen des Rheumafaktor, ein Autoantikörper gegen den Fc-Teil des menschlichen IgG, mit höherem Lebensalter zu (Ball & Lawrence et al. 1961; Valkenburg et al. 1966; Egeland & Munthe 1983; van Schaardenburg et al. 1993). Trotz der pathogenetischen Rolle von PGRN in der Karziogenese und Adipositas und der höheren Wahrscheinlichkeit von Autoantikörpern bei Menschen im hohen Alter konnten PGRN-Ak bei diesen Kontrollen kaum nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite gelang Thurner et al. der Nachweis von PGRN-Ak bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Thurner et al. 2014), zwei autoimmun bedingten Darmerkrankungen.

Schlussfolgernd scheinen PGRN-Ak zwar nicht krankheitsspezifisch, jedoch vor allem im Verlauf von autoimmunen Erkrankungen zu entstehen. PGRN-Ak könnten so klinisch differentialdiagnostisch genutzt werden.

### **5.1 Hyperphosphoryliertes PGRN**

Zusätzlich entdeckten wir im Rahmen dieser Arbeit eine zweite, a.e. immunogene PGRN-Isoform. Diese Isoform ist am Serin in Position 81 hyperphosphoryliert (pSer81 PGRN). Weiterhin zeigten wir, dass pSer81 PGRN ausschließlich in Seren von Patienten mit PGRN-Ak zu finden ist (Thurner et al. 2015). Wir nehmen an, dass pSer81 PGRN eine wesentliche Ursache des Verlustes der Selbsttoleranz gegenüber PGRN darstellt. Posttranslationale Modifizierungen können ein Protein so verändern, dass es für das Immunsystem fremd und zum Neoantigen wird. So führt zum Beispiel die Citrullinierung von Proteinen über Änderung der Molekülladung mit sekundärer Strukturveränderungen zur Antikörperbildung gegen diese citrullinierten Proteine (ACPA) (van Venrooij & Pruijn 2000). Die ACPA spielen eine Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis und werden diagnostisch wie auch prognostisch genutzt (Feist et al. 2007). So kann der Nachweis von Antikörpern gegen citrulliniertes Fibrin für die Diagnostik der frühen rheumatoiden Arthritis genutzt werden (Vander Cruyssen et al. 2006) oder der Nachweis von Antikörpern gegen citrulliniertes Vimentin für Prognose und Diagnostik der Frühformen der rheumatoiden Arthritis genutzt werden (Syversen et al. 2010).

In dieser Arbeit konnte überdies gezeigt werden, dass es bei pSer81-PGRN zu einer Verlagerung der ersten Spaltung von der GRN-Region A-C auf die GRN-Region C-D mit folgender Veränderung der Spaltungsmuster und -produkte kommt. Hervorzuheben ist, dass die einzelnen maturen GRN ebenfalls biologisch aktiv sind. Im Wundheilungsprozess z.B. stimuliert GRN B epitheliale Zellen IL-8 zu sezernieren. Infolgedessen kommt es zur Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen, welche die Wundheilung initiieren (Zhu et al. 2002). Im akuten Entzündungsprozess dagegen erhöhen einige GRN die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-8 und TNF $\alpha$ , welche von epithelialen Zellen exprimiert werden und vermehrt Neutrophile zum Entzündungsort rekrutieren. Demgegenüber ist PGRN ein potenter Inhibitor von TNF $\alpha$  und fördert die Hochregulation von antiinflammatorischen Th2 Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-10 (Zhu et al. 2002; He & Bateman 2003; Okura et al. 2010; Pickford et al. 2011). Durch das veränderte Spaltmuster ist eine Änderung der jeweiligen GRN Plasmalevel mit Auswirkungen auf die funktionelle Ebene anzunehmen. In weiteren Studien sollte daher die Auswirkung des veränderten Spaltmusters auf die jeweiligen GRN-Konzentrationen im Gewebe und Plasma sowie die möglichen Auswirkungen auf die funktionelle Ebene untersucht werden.

## 5.2 Limitationen

Limitierend wirken sich die Charakteristika des retrospektiven Studiendesigns und die geringe Fallzahl aus. Die erhobene Prävalenz sollte in einem prospektiven Studiendesign mit entsprechender Fallzahl überprüft werden. Das gegebene multizentrische Studiendesign sollte beibehalten werden.

Eine weitere Limitation ergibt sich aus der Tatsache, dass PGRN-Ak transient vorkommen zu scheinen. Dieser Arbeit war es möglich von einigen Patienten im Rahmen von Folgevorstellungen mehrere, zeitlich getrennte Seren zu sammeln. So konnte der PGRN-Ak-Status eines Patienten im zeitlichen Verlauf und zu unterschiedlich aktiven Erkrankungsstadien untersucht werden. Es fiel auf, dass Patienten Serokonversionen bezüglich des PGRN-Ak-Status aufwiesen. Selbst repetitive Serokonversionen z.B. von negativ auf positiv auf negativ konnten beobachtet werden. Aufgrund dieses transienten PGRN-Ak Nachweises wurde für die Berechnung der Prävalenz der einmalige Nachweis von PGRN-Ak in einem Serum verlangt. Bei Patienten mit mehreren, zeitlich getrennten Seren wurde bei einem einmaligen Nachweis von PGRN-Ak der Patient insgesamt als positiv auf PGRN-Ak gewertet. Dies ist gängige diagnostische Praxis auch für den Nachweis von ANCA bei AAV. Bei den meisten Patienten konnte nur eine Probe gesammelt werden. Es ist möglich, dass untersuchte Patienten zu einem früheren oder einem

späteren Zeitpunkt PGRN-Ak entwickelten bzw. entwickeln werden. Daher ist die erhobene Prävalenz in dieser Arbeit am ehesten als zu gering zu bewerten.

Hervorzuheben ist in diesem Sinne zudem der statistisch signifikante Zusammenhang im Chi-Quadrat-Test ( $p=0,036$ ) zwischen einem positiven PGRN-Ak-Status und einer aktiven Erkrankung bei GPA. In dieser Arbeit wurden vor allem retrospektiv Patienten in Remission aus einer ambulant rheumatologischer Vorstellung eingeschlossen. Es ist anzunehmen, dass sich durch die Rekrutierung und Auswertung von Patienten in aktiven Erkrankungsstadien die Prävalenz höher darstellt. Diese Überlegungen sollten bei der Erstellung der notwendigen weiteren Studien beachtet werden.

### 5.3 Pathogenetische Bedeutung von PGRN

Hervorzuheben im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist die Struktur und Wirkung von PGRN. PGRN ist ein multifunktionales Glykoprotein (Toh et al. 2011; Songsrirote et al. 2010). PGRN besteht aus einer Signalsequenz sowie siebeneinhalb Granulindomänen (Granulin A-G und Paragranulin), welche in der Reihenfolge P-G-F-B-A-C-D-E angeordnet sind (Hrabal et al. 1996). Wie in der Einleitung dargestellt, wird PGRN in verschiedenen Situationen mit unterschiedlicher pathogenetischer Wirkung ausgeschüttet (Daniel et al. 2003; Pickford et al. 2011; Elkabets et al. 2011). Von besonderer Bedeutung ist die Rolle von PGRN im Entzündungsprozess. Interaktionen zwischen Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) und den entsprechenden Liganden spielen eine große Rolle in der Gewebhomeostase, indem das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Funktion von Immunzellen beeinflusst bzw. kontrolliert werden. Aus der TNFRSF haben 8 Rezeptoren eine sogenannte intrazelluläre „death-domain“ (=Todesdomäne). Von diesen binden die extrazellulären Rezeptoren TNFR1 und DR3 PGRN. PGRN bindet überdies an TNFR2. PGRN hat eine höhere Bindungsaffinität an TNFR2, welcher vor allem antiinflammatorisch und osteoprotektiv wirkt. TNFR1 hingegen weist vor allem eine proinflammatorische Wirkung vor und wirkt osteodegenerativ (Tang et al. 2011; Jian et al. 2013). PGRN und TNF $\alpha$  konkurrieren um die gleichen, cystein-reichen-Bindungsregionen (CRD) 2 und 3 des TNFR (Jian et al. 2013). PGRN bindet mit ca. 600 mal höherer Affinität an TNFR2 als TNF $\alpha$  (Tang et al. 2011). So wirkt PGRN als Antagonist zu TNF $\alpha$ , indem es kompetitiv die Bindung von TNF $\alpha$  an die TNFR-1 und -2 verhindert. Zusätzlich wirkt es durch die Bindung an und Aktivierung von TNFR2 antiinflammatorisch. In mehreren Arthritis-Mausmodellen (Collagen Induced Arthritis (CIA) (Feldmann & Maini 2003; Deng et al. 2005) und Collagen Antibody Induced Arthritis (CAIA) entwickelten PGRN<sup>-/-</sup>-Mäuse einen höheren Grad an Arthritis verglichen zum Wildtyp. Zudem wirkte die

Gabe von PGRN therapeutisch (Tang et al. 2011; Liu & Bosch 2012; Liu 2011). DR3 und sein Ligand, TNF-ähnliches Molekül 1A (TL1A), spielen eine Rolle in rheumatischen und autoimmunen Erkrankungen (reviewed in Siakavellas et al. 2015), zum Beispiel beim Morbus Crohn (Bamias et al. 2006) und SSc (Yamada et al. 2012), in der Knochenhomöostase sowie in der Arthritis (reviewed in Williams et al. 2016). PGRN bindet an DR3 und verhindert dadurch eine Aktivierung durch TL1A (Liu et al. 2014). Die Blockierung des TL1A/DR3-Signalwegs reduziert die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die Bildung von Autoantikörpern und die Bildung von Osteoklasten (Bull et al. 2008; Zhang et al. 2009). T-regulatorische (Treg)-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Prävention von Autoimmunität und anderen pathologisch verstärkten adaptiven Immunantworten. PGRN hat einen Einfluss auf die Differenzierung von Treg-Zellen und deren Funktion. So schützt es Treg-Zellen über den TNFR2 vor TNF $\alpha$ -Wirkung (Wei, Zhang, Jian, et al. 2014; Wei, Zhang, Zhao, et al. 2014). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Antikörper gegen PGRN zu einer Zunahme der TNF $\alpha$ -vermittelten Suppression der FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg-Zellen führen (Thurner et al. 2014). Zusätzlich zeigte sich eine signifikant geringere Zellzahl von Th17-Zellen in der Milz von Mäusen, welche mit PGRN behandelt worden waren. Gemessene Interleukin-17 (IL-17) Spiegel waren in diesen Mäusen ebenfalls erniedrigt. Sowohl der TNFR1- und der DR3-Signalweg waren an der Suppression der IL-17 produzierenden Zellen beteiligt (Wei, Zhang, Jian, et al. 2014; Wei, Zhang, Zhao, et al. 2014).

#### 5.4 Perspektiven

Rekombinantes humanes PGRN und Atsttrin, ein rekombinantes PGRN-Derivat aus 3 neu kombinierten GRN-Domänen (F, A und C) und begleitenden Linkerregionen (Tang et al. 2011), werden als „next-generation“ TNF-Blocker diskutiert (Liu 2011; Sfikakis & Tsokos 2011). Atsttrin bindet direkt an den TNFR und nicht an TNF $\alpha$ , wie die aktuellen, sich auf dem Markt befindlichen Anti-TNF $\alpha$ -Ak Adalimumab, Infliximab, Certolizumab und Golimumab sowie Etanercept, ein Fusionsprotein des TNFR2/p75 und der Fc-Untereinheit des IgG1-Antikörpers ([https://www.pfizermed.de/fileadmin/produkt Datenbank/pdf/002423\\_freigabe.pdf](https://www.pfizermed.de/fileadmin/produkt Datenbank/pdf/002423_freigabe.pdf)). Die antagonistischen Atsttrin bzw. PGRN-vermittelten Effekte auf TNF $\alpha$  sind mindestens vergleichbar zur Wirkung marktüblicher TNF $\alpha$ -Inhibitoren, zum Beispiel Etanercept oder Adalimumab, einzuschätzen (Tang et al. 2011). Hervorzuheben ist, dass Atsttrin im CIA-Mausmodell sogar eine noch höhere antiinflammatorische Wirkung als PGRN zeigte (Tang et al. 2011). Zudem zeigte Atsttrin eine bessere Wirkung im Mausmodell als Etanercept (Tang et al. 2011). PGRN und Atsttrin üben ihre antiinflammatorische Wirkung wie dargestellt über die Aktivierung von

PGRN/TNFR2-Signalwegen und über die Inhibierung von TNF $\alpha$ /TNFR1- und TL1A/DR3-Signalwegen aus. Die inhibierende Wirkung auf den TL1A/DR3-Signalweg sowie die Aktivierung des TNFR2-Signalweges durch PGRN und Atsttrin sind bisher einzigartige Merkmale und könnten im klinischen Alltag einen zusätzlichen Vorteil über die marktüblichen TNF-Blocker darstellen, vor allem im Hinblick auf therapierefraktäre oder remittierende Arthritis.

Ein möglicher Nachteil könnte sein, dass PGRN und Atsttrin nicht wie anti-TNF $\alpha$ -Ak die Apoptose von proinflammatorischen T-Lymphozyten durch die Bindung an den membranösen TNF $\alpha$ -Rezeptor induzieren. Dieser Effekt spielt eine wichtige Rolle in der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen, nicht jedoch bei der Behandlung von Arthritis (Van den Brande et al. 2003). Zu möglichen iatrogenen Nebenwirkungen von Atsttrin oder rek. PGRN wie eine gesteigerte Rate an opportunistischen Infekten, viralen Hepatitiden wie sie bei TNF $\alpha$ -Blockern bekannt sind (Keane et al. 2001) oder gar erhöhten Auftreten von Neoplasien liegen bisher keine Daten vor.

Die Entdeckung von PGRN-Ak scheint in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Gerade im Zusammenhang der u.a. in dieser Arbeit nachgewiesenen hohen Prävalenz von PGRN-Ak in Autoimmunerkrankungen scheint es wichtig zu sein, eine mögliche Bindung von PGRN-Ak an rek. PGRN und/oder Atsttrin zu beachten. Hervorzuheben ist, dass wir die N-terminale 112 AS Region, entsprechend Granulin G, von PGRN mittels Epitopzuordnung als Ziel der PGRN-Ak identifizieren konnten. Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit der sieben Granuline, wurde nur Granulin G von PGRN-Ak gebunden (Thurner et al. 2013b). Im Hinblick auf Atsttrin konnten bisher keine Auto-Ak gegen die Atsttrin bildenden Granuline F, A und C und die Linkerregionen entdeckt werden (Tang et al. 2011; Thurner et al. 2013b). Spezifisch wurde bisher jedoch nicht eine mögliche Bindung von PGRN-Ak an Atsttrin untersucht. Dies sollte unbedingt vor klinischen Zulassungsstudien getestet werden. In diesen Studien sollte in diesem Zusammenhang auf Epitopspreading und Immunogenität geachtet werden.

Klinisch könnten PGRN-AK als Möglichkeit der Eingrenzung der Differentialdiagnosen genutzt werden. Zum Beispiel könnte ein intrarenales Nierenversagen im Rahmen einer SVV oder SLE durch den Nachweis von PGRN-Ak gegen ein intrarenales Nierenversagen anderer Ursachen, zum Beispiel medikamententoxisch oder viraler Genese durch zum Beispiel Hantaviren, abgrenzt werden.

Monoklonale Antikörper gegen PGRN wurden bereits als ein mögliches Behandlungskonzept für hepatozelluläre Karzinome diskutiert. Hepatozelluläre-Karzinom-Zellen zeigten in einer

Studie erhöhte PGRN Expression in einem xenogenen Model von humanen HCC-Zellen, welche in SCID-Mäuse transplantiert wurden. Die Gabe von PGRN-Antikörpern führte in dieser Studie zu einem vermindertem Zellwachstum bzw. -teilung (Ho et al. 2008). Informationen über Zeichen von Autoimmunität nach der Applikation von den monoklonalen PGRN-Ak wurden nicht genannt, wobei autoimmune Phänomene in SCID-Mäusen unwahrscheinlich sind. In dieser Arbeit wurden die Vorerkrankungen der eingeschlossenen Patienten nicht erhoben. In prospektiven Folgestudien sollte auf einen möglichen Zusammenhang vor allem bei PGRN-AK positiven Patienten hinsichtlich Malignome, z.B. von hepatozellulären Karzinomen, geachtet werden.

### **5.5 Konklusion und Ausblick**

Es gelang die Erstbeschreibung von PGRN-Ak in Vaskulitiden, Kollagenosen und Myositiden und die Erstellung einer ersten Prävalenz. Als möglichen Entstehungsgrund der PGRN-Ak gelang die Identifizierung einer zweiten, an Serin 81 hyperphosphorylierten PGRN-Isoform.

Von besonderem Interesse sind hier zum einen weitere funktionelle Alterationen neben der geänderten Konversion in mature Granuline, die durch die Hyperphosphorylierung verursacht werden könnten. Zum anderen sind die Ursachen der Entstehung der hyperphosphorylierten PGRN-Isoform in zukünftigen Studien weiter zu klären.

Zusammenfassend scheinen PGRN-Ak ein autoreaktives Geschehen anzuzeigen und dieses proinflammatorisch zu beeinflussen. Sie könnten klinisch diagnostisch genutzt werden. Auch im Kontext derzeitiger pharmakologischer Entwicklungen von therapeutisch nutzbarem rekombinanten PGRN scheint die Entdeckung von PGRN-Ak von besonderer Bedeutung.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abdul-Rahman, A.M., Molteno, A.C.B. & Bevin, T.H., 2011. The epidemiology of giant cell arteritis in Otago, New Zealand: A 9-year analysis. *New Zealand Medical Journal*, 124(1329), pp.44–52.
- Aggarwal, R. et al., 2015. Distinctions Between Diagnostic and Classification Criteria? *Arthritis Care & Research*, 67(7), pp.891–897.
- Almeida, S., Zhou, L. & Gao, F.B., 2011. Progranulin, a glycoprotein deficient in frontotemporal dementia, is a novel substrate of several protein disulfide isomerase family proteins. *PLoS ONE*, 6(10), p.e26454-.
- Anakwe, O.O. & Gerton, G.L., 1990. Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biology of reproduction*, 42(2), pp.317–328.
- Andreoli, L. et al., 2013. Estimated frequency of antiphospholipid antibodies in patients with pregnancy morbidity, stroke, myocardial infarction, and deep vein thrombosis: A critical review of the literature. *Arthritis Care and Research*, 65(11), pp.1869–1873.
- Arnaud, L. et al., 2011. Pathogenesis of Takayasu's arteritis: A 2011 update. *Autoimmunity Reviews*, 11(1), pp.61–67.
- Arnett, F.C. et al., 2010. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis*, 69(5), pp.822–827.
- Atassi, M.Z. & Casali, P., 2008. Molecular mechanisms of autoimmunity. *Autoimmunity*, 41(2), pp.123–132.
- Baerlecken, N.T. et al., 2012. Association of ferritin autoantibodies with giant cell arteritis/polymyalgia rheumatica. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(6), pp.943–947.
- Bai, X.-H. 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), pp.4201–4219.
- Baker, C.A. & Manuelidis, L., 2003. Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 100(2), pp.675–9.
- Baker, M. et al., 2006. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature*, 442(7105), pp.916–919.
- Baladrón, V. et al., 2002. The EGF-like homeotic protein dlk affects cell growth and interacts with growth-modulating molecules in the yeast two-hybrid system. *Biochemical and biophysical research communications*, 291(2), pp.193–204.
- Ball, J. & Lawrence, J.S., 1961. Epidemiology of the sheep cell agglutination test. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 20(3), pp.235–243.
- Ballestar, E., Esteller, M. & Richardson, B.C., 2006. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(12), pp.7143–7147.
- Bamias, G. 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), pp.8441–8446.
- Bansal, P.J. & Tobin, M.C., 2004. Neonatal microscopic polyangiitis secondary to transfer of maternal myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody resulting in neonatal pulmonary hemorrhage and renal involvement. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 93(4), pp.398–401.
- Bauer, S. et al., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), pp.727–729.
- Benarafa, C., Priebe, G.P. & Remold-O'Donnell, E., 2007. The neutrophil serine protease inhibitor serpinb1 preserves lung defense functions in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *The Journal of experimental medicine*, 204(8), pp.1901–1909.
- Berden, A.E. et al., 2009. Cellular immunity in Wegener's granulomatosis: Characterizing T lymphocytes. *Arthritis and Rheumatism*, 60(6), pp.1578–1587.
- Bertsias, G.K., Salmon, J.E. & Boumpas, D.T., 2010. Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade. *Ann Rheum Dis*, 69(9), pp.1603–1611.
- Beutler, B.A., 2009. TLRs and innate immunity. *Blood*, 113(7), pp.1399–1407.
- Bhandari, V. & Bateman, A., 1992. Structure and chromosomal location of the human granulin

- gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188(1), pp.57–63.
- Bhandari, V., Palfree, R.G. & Bateman, a, 1992. Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), pp.1715–1719.
- Bornkamm, G.W. et al., 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Research*, 33(16), pp.1–11.
- Van den Brande, J.M.H. et al., 2003. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 124(7), pp.1774–1785.
- Browne, S.K. et al., 2012. Adult-Onset Immunodeficiency in Thailand and Taiwan. *New England Journal of Medicine*, 367(8), pp.725–734.
- Bull, M.J. et al., 2008. The Death Receptor 3-TNF-like protein 1A pathway drives adverse bone pathology in inflammatory arthritis. *The Journal of experimental medicine*, 205(11), pp.2457–2464.
- Burnette, W.N., 1981. 'Western Blotting': Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), pp.195–203.
- Butler, G.S. et al., 2008. Pharmacoproteomics of a Metalloproteinase Hydroxamate Inhibitor in Breast Cancer Cells: Dynamics of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase-Mediated Membrane Protein Shedding. *Molecular and Cellular Biology*, 28(15), pp.4896–4914.
- Cabal-Hierro, L. & Lazo, P.S., 2012. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cellular Signalling*, 24(6), pp.1297–1305.
- Cadioux, B. et al., 2005. The zebrafish progranulin gene family and antisense transcripts. *BMC genomics*, 6, p.156.
- Camisa, C. & Helm, T.N., 1993. Paraneoplastic Pemphigus Is a Distinct Neoplasia-Induced Autoimmune Disease. *Archives of Dermatology*, 129(7), pp.883–886.
- Carrasquillo, M.M. et al., 2010. Genome-wide screen identifies rs646776 near sortilin as a regulator of progranulin levels in human plasma. *American Journal of Human Genetics*,

87(6), pp.890–897.

- Carwile LeRoy, E. et al., 1988. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *Journal of Rheumatology*, 15(2), pp.202–205.
- Cervera, R. et al., 2009. The Euro-Phospholipid project: Epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe R. Cervera & A. Tincani, eds. *Lupus*, 18(10), pp.889–893.
- Chanseaud, Y. et al., 2005. Analysis of autoantibody repertoires in small- and medium-sized vessels vasculitides. Evidence for specific perturbations in polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome and Wegener's granulomatosis. *Journal of Autoimmunity*, 24(2), pp.169–179.
- Chen, H.J. et al., 2006. Molecular cloning and characterization of a granulin-containing cysteine protease SPCP3 from sweet potato (*Ipomoea batatas*) senescent leaves. *Journal of Plant Physiology*, 163(8), pp.863–876.
- Chen, X. et al., 2008. Expression of PC cell-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma and their clinicopathologic significance. *Chinese medical journal*, 121(10), pp.881–6.
- Cheung, S.T. et al., 2004. Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(22), pp.7629–7636.
- Chinoy, H. et al., 2009. An update on the immunogenetics of idiopathic inflammatory myopathies: major histocompatibility complex and beyond. *Current opinion in rheumatology*, 21(6), pp.588–93.
- Christensen, S.R. et al., 2006. Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus. *Immunity*, 25(3), pp.417–428.
- Cruts, M. et al., 2006. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*, 442(7105), pp.920–924.
- Vander Cruyssen, B. et al., 2006. Diagnostic value of anti-human citrullinated fibrinogen ELISA and comparison with four other anti-citrullinated protein assays. *Arthritis Research and Therapy*, 8(4), p.R122.
- Cui, Y., Sheng, Y. & Zhang, X., 2013. Genetic susceptibility to SLE: Recent progress from GWAS. *Journal of Autoimmunity*, 41, pp.25–33.

- Daniel, R. et al., 2000. Cellular localization of gene expression for progranulin. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 48(7), pp.999–1009.
- Daniel, R. 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), pp.593–599.
- Davies, D.J. et al., 1982. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *British medical journal (Clinical research ed.)*, 285(6342), p.606.
- Deng, G.M. et al., 2005. Amelioration of inflammatory arthritis by targeting the pre-ligand assembly domain of tumor necrosis factor receptors. *Nature Medicine*, 11(10), pp.1066–1072.
- Deng, J. et al., 2009. Toll-like receptors 4 and 5 induce distinct types of vasculitis. *Circulation Research*, 104(4), pp.488–495.
- Diaz-Cueto, L. et al., 2012. PKC Signaling is Involved in the Regulation of Progranulin (Acrogranin/PC-Cell-Derived Growth Factor/Granulin-Epithelin Precursor) Protein Expression in Human Ovarian Cancer Cell Lines. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 22(6), pp.1–6.
- Egeland, T. & Munthe, E., 1983. The role of the laboratory in rheumatology. Rheumatoid factors. *Clinics in rheumatic diseases*, 9(1), pp.135–60.
- Eichinger, L. et al., 2005. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 435(7038), pp.43–57.
- Eisen, M.B. et al., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), pp.14863–14868.
- Elkabets, M. et al., 2011. Human tumors instigate granulin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(2), pp.784–799.
- Engvall, E. & Perlmann, P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), pp.871–874.

- Falk, R.J. et al., 1990. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(11), pp.4115–4119.
- Feist, E., Egerer, K. & Burmester, G.R., 2007. Autoantikörperprofile bei der rheumatoiden arthritis. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 66(3), pp.212–218.
- Feldmann, M. & Maini, R.N., 2003. LASKER CLINICAL MEDICAL RESEARCH AWARD TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med*, 9(10), pp.1245–1250.
- Ferreras, M.C. et al., 2013. Pathological Features of Systemic Necrotizing Vasculitis (Polyarteritis Nodosa) in Sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 149(1), pp.74–81.
- Finch, N. et al., 2009. Plasma progranulin levels predict progranulin mutation status in frontotemporal dementia patients and asymptomatic family members. *Brain*, 132(3), pp.583–591.
- Frampton, G. et al., 2012. Interleukin-6-driven progranulin expression increases cholangiocarcinoma growth by an Akt-dependent mechanism. *Gut*, 61(2), pp.268–277.
- Furst, D.E. & Clements, P.J., 1997. Hypothesis for the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Rheumatol Suppl*, 48, pp.53–7.
- George C. Tsokos, M.D., 2011. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 46(365), pp.2010–2121.
- Ghidoni, R. et al., 2008. Low plasma progranulin levels predict progranulin mutations in frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*, 71(16), pp.1235–1239.
- Golan, T.D. et al., 1992. Enhanced membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet a irradiation. *Journal of Clinical Investigation*, 90(3), pp.1067–1076.
- Gonzalez, E.M. et al., 2003. A novel interaction between perlecan protein core and progranulin. Potential effects on tumor growth. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), pp.38113–38116.
- Gottenberg, J.E. et al., 2003. In primary Sjögren's syndrome, HLA class II is associated exclusively with autoantibody production and spreading of the autoimmune response. *Arthritis and Rheumatism*, 48(8), pp.2240–2245.

- Greidinger, E.L. et al., 2002. Apoptotic U1-70 kd is antigenically distinct from the intact form of the U1-70-kd molecule. *Arthritis and Rheumatism*, 46(5), pp.1264–1269.
- Greidinger, E.L. et al., 2000. Autoantibody recognition of distinctly modified forms of the U1-70-kd antigen is associated with different clinical disease manifestations. *Arthritis and Rheumatism*, 43(4), pp.881–888.
- Greidinger, E.L. & Hoffman, R.W., 2001. The appearance of U1 RNP antibody specificities in sequential autoimmune human antisera follows a characteristic order that implicates the U1-70 kd and B220/B proteins as predominant U1 RNP immunogens. *Arthritis and Rheumatism*, 44(2), pp.368–375.
- Guilpain, P. et al., 2007. A combined SDS-PAGE and proteomics approach to identify target autoantigens in healthy individuals and patients with autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1109, pp.538–549.
- Gunawardena, H., Betteridge, Z.E. & McHugh, N.J., 2009. Myositis-specific autoantibodies: Their clinical and pathogenic significance in disease expression. *Rheumatology*, 48(6), pp.607–612.
- Gunnarsson, R. et al., 2011. The prevalence and incidence of mixed connective tissue disease: a national multicentre survey of Norwegian patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(6), pp.1047–1051.
- Guo, F. et al., 2010. Granulin-epithelin precursor binds directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage oligomeric matrix protein. *Arthritis and Rheumatism*, 62(7), pp.2023–2036.
- Hattar, K. et al., 2010. c-ANCA-induced neutrophil-mediated lung injury: a model of acute Wegener's granulomatosis. *Eur. Respir. J.*, 36(1), pp.187–95.
- Hayakawa, I. et al., 2004. Improvement of skin sclerosis after occurrence of anticentromere antibody in a patient with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Clinical rheumatology*, 23(4), pp.345–347.
- He, Z. et al., 2002. Progranulin (PC-cell-derived growth factor/acrogranin) regulates invasion and cell survival. *Cancer Research*, 62(19), pp.5590–5596.
- He, Z. et al., 2003. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nature medicine*, 9(2), pp.225–229.

- He, Z. & Bateman, a, 1999. Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. *Cancer research*, 59(13), pp.3222–3229.
- He, Z. & Bateman, A., 2003. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *Journal of Molecular Medicine*, 81(10), pp.600–612.
- Hjelmervik, T.O.R. et al., 2005. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjögren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis and Rheumatism*, 52(5), pp.1534–1544.
- Ho, J.C. et al., 2008. Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 47(5), pp.1524–1532.
- Hof, D. et al., 2005. Autoantibodies specific for apoptotic U1-70K are superior serological markers for mixed connective tissue disease. *Arthritis research & therapy*, 7(2), pp.R302–9.
- Hoffman, R.W. et al., 2004. U1 RNA induces innate immunity signaling. *Arthritis Rheum.*, 50(9), pp.2891–2896.
- Holle, J.U., Laudien, M. & Gross, W.L., 2010. Clinical Manifestations and Treatment of Wegener's Granulomatosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 36(3), pp.507–526.
- Holyst, M.M. et al., 1997. Analysis of human T cell and B cell responses against U small nuclear ribonucleoprotein 70-kd, B, and D polypeptides among patients with systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum.*, 40(8), pp.1493–1503.
- Hoque, M. et al., 2005. Granulin and granulin repeats interact with the Tat-P-TEFb complex and inhibit Tat transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), pp.13648–13657.
- Hoque, M. et al., 2003. The growth factor granulin interacts with cyclin T1 and modulates P-TEFb-dependent transcription. *Molecular and cellular biology*, 23(5), pp.1688–702.
- Hoque, M., Mathews, M.B. & Pe'ery, T., 2010. Progranulin (granulin/epithelin precursor) and its constituent granulin repeats repress transcription from cellular promoters. *Journal of Cellular Physiology*, 223(1), pp.224–233.

- Hoyer, B.F. et al., 2012. Takayasu arteritis is characterised by disturbances of B cell homeostasis and responds to B cell depletion therapy with rituximab. *Annals of the rheumatic diseases*, 71(1), pp.75–9.
- Hrabal, R. et al., 1996. The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors. *Nature structural biology*, 3(9), pp.747–752.
- Hu, F. et al., 2010. Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron*, 68(4), pp.654–667.
- Hunder, G.G., 2002. Epidemiology of giant-cell arteritis. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 69(SUPPL. 2), pp.SII79-SII82.
- Ikeda, K. et al., 2003. Clinical significance of antibodies to TS1-RNA in patients with mixed connective tissue disease. *The Journal of rheumatology*, 30(5), pp.998–1005.
- International Study Group for Behet's Disease, 1990. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. International Study Group for Behçet's Disease. *Lancet*, 335(8697), pp.1078–1080.
- Ishimaru, N. et al., 2008. Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjögren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *The Journal of experimental medicine*, 205(12), pp.2915–27.
- Janeway, C., 2001. *Immunobiology 5 : the immune system in health and disease*, Garland Pub.
- Javierre, B.M. et al., 2010. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Research*, 20(2), pp.170–179.
- Jennette, J.C. et al., 2012. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Revmatologija (Bulgaria)*, 20(4), pp.5–15.
- Jian, J. et al., 2013. Progranulin directly binds to the CRD2 and CRD3 of TNFR extracellular domains. *FEBS Letters*, 587(21), pp.3428–3436.
- Johnston, S.L., Lock, R.J. & Gompels, M.M., 2002. Takayasu arteritis: a review. *Journal of clinical pathology*, 55(7), pp.481–486.
- Keane, J. et al., 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *The New England journal of medicine*, 345(15), pp.1098–104.
- Kessenbrock, K. et al., 2008. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *Journal of Clinical Investigation*, 118(7), pp.2438–2447.

- Klose, J., 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 26(3), pp.231–243.
- Kraft, D.M., Mckee, D. & Scott, C., 1998. Henoch-Schonlein purpura: A review. *American Family Physician*, 58(2), pp.405–408.
- Kramer, A., 1996. The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 65, pp.367–409.
- Kreiner, F., Langberg, H. & Galbo, H., 2010. Increased muscle interstitial levels of inflammatory cytokines in polymyalgia rheumatica. *Arthritis and Rheumatism*, 62(12), pp.3768–3775.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.
- Lam, C.Y. et al., 2012. Identification and characterization of tropomyosin 3 associated with granulin-epithelin precursor in human hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 7(7), p.e40324-.
- Larsen, F. et al., 2004. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), pp.21302–21311.
- Lazuardi, L. et al., 2009. Microarray analysis reveals similarity between CD8+CD28- T cells from young and elderly persons, but not of CD8+CD28+ T cells. *Biogerontology*, 10(2), pp.191–202.
- Leadbetter, E.A. et al., 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 416(6881), pp.603–7.
- Lim, H.Y. et al., 2012. Progranulin contributes to endogenous mechanisms of pain defense after nerve injury in mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(4), pp.708–721.
- Lin, W.-L. et al., 2007. Progranulin is located in secretory granules and vesicles of neutrophils and macrophages by immunogold electron microscopy: 41.7. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology - J NEUROPATHOL EXP NEUROL*, 66.
- Lipsky, P.E., 2001. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature immunology*, 2(9), pp.764–6.

- Liu, C. et al., 2014. Progranulin-derived Atsttrin directly binds to TNFRSF25 (DR3) and inhibits TNF-like ligand 1A (TL1A) activity B. Ryffel, ed. *PLoS ONE*, 9(3), p.e92743.
- Liu, C., 2011. Progranulin: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis. *FEBS letters*, 585(23), pp.3675–80.
- Liu, C.J. & Bosch, X., 2012. Progranulin: A growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target. *Pharmacology and Therapeutics*, 133(1), pp.124–132.
- Ludewig, B. et al., 1999. Role of dendritic cells in the induction and maintenance of autoimmune diseases. *Immunological reviews*, 169, pp.45–54.
- Ly, K.H. et al., 2010. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmunity Reviews*, 9(10), pp.635–645.
- Lyons, P.A. et al., 2012. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *The New England journal of medicine*, 367(3), pp.214–23.
- Ma-Krupa, W. et al., 2004. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *The Journal of experimental medicine*, 199(2), pp.173–83.
- Malaspina, A., Kaushik, N. & De Belleruche, J., 2001. Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays. *Journal of Neurochemistry*, 77(1), pp.132–145.
- Matsubara, T. et al., 2012. PGRN is a key adipokine mediating high fat diet-induced insulin resistance and obesity through IL-6 in adipose tissue. *Cell Metabolism*, 15(1), pp.38–50.
- Mavragani, C.P. & Moutsopoulos, H.M., 2010. The geoepidemiology of Sjogren's syndrome. *Autoimmunity Reviews*, 9(5), pp.A305–A310.
- Mayes, M.D., 1996. Scleroderma epidemiology. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 22(4), pp.751–64.
- McCarty, D.J. et al., 1995. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis & Rheumatism*, 38(9), pp.1260–1270.
- McIsaac, S.M., Stadnyk, A.W. & Lin, T.-J., 2012. Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 92(5), pp.977–985.
- Meliconi, R. et al., 1996. Leukocyte infiltration in synovial tissue from the shoulder of patients with polymyalgia rheumatica: Quantitative analysis and influence of corticosteroid

- treatment. *Arthritis and Rheumatism*, 39(7), pp.1199–1207.
- Miceli-Richard, C. et al., 2007. Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjögren's syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, 56(12), pp.3989–3994.
- Mills, J.A., 1994. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine*, 330(26), pp.1871–1879.
- Miyakis, S. et al., 2006. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(2), pp.295–306.
- Mizuki, N. et al., 2010. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nature Genetics*, 42(8), pp.703–706.
- Monami, G. et al., 2006. Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex. *Cancer Research*, 66(14), pp.7103–7110.
- Monami, G. et al., 2009. Proepithelin regulates prostate cancer cell biology by promoting cell growth, migration, and anchorage-independent growth. *The American journal of pathology*, 174(3), pp.1037–47.
- Murrin, R.J.A. & Murray, J.A., 2006. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Aetiology, pathophysiology and treatment. *Blood Reviews*, 20(1), pp.51–60.
- Nagaraju, K. & Lundberg, I.E., 2011. Polymyositis and dermatomyositis: pathophysiology. *Rheum.Dis.Clin.North Am.*, 37(2), p.159–71, v.
- Nordmark, G. et al., 2009. Additive effects of the major risk alleles of IRF5 and STAT4 in primary Sjögren's syndrome. *Genes and immunity*, 10(1), pp.68–76.
- Nordmark, G. et al., 2011. Association of EBF1, FAM167A(C8orf13)-BLK and TNFSF4 gene variants with primary Sjögren's syndrome. *Genes and immunity*, 12(2), pp.100–109.
- O'Farrell, P.H., 1975. High Resolution of Proteins \* Electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(10), pp.4007–4021.
- Oddis, C. V et al., 1990. Incidence of polymyositis-dermatomyositis: A 20-year study of hospital diagnosed cases in Allegheny County, PA 1963-1982. *Journal of Rheumatology*, 17(10), pp.1329–1334.
- Okano, Y., 1996. Antinuclear antibody in systemic sclerosis (scleroderma). *Rheumatic Disease*

*Clinics of North America*, 22(4), pp.709–35.

- Okubo, M. et al., 1993. Detection and epitope analysis of autoantigen-reactive T cells to the U1-small nuclear ribonucleoprotein A protein in autoimmune disease patients. *J.Immunol.*, 151(2), pp.1108–1115.
- Okura, H. et al., 2010. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 17(6), pp.568–577.
- Olsen, M.L., Arnett, F.C. & Reveille, J.D., 1993. Contrasting molecular patterns of mhc class ii alleles associated with the anti-ssm and anti-rnp precipitin autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 36(1), pp.94–104.
- Ong, C.H.P. & Bateman, A., 2003. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. *Histology and Histopathology*, 18(4), pp.1275–1288.
- Park, B. et al., 2011. Granulin Is a Soluble Cofactor for Toll-like Receptor 9 Signaling. *Immunity*, 34(4), pp.505–513.
- Parnell, P.G. et al., 1992. Transforming growth factor e: amino acid analysis and partial amino acid sequence. *Growth Factors.*, 7(1), pp.65–72.
- Perry, D.C. et al., 2013. Progranulin Mutations as Risk Factors for Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 70(6), p.774.
- Pettersson, I. et al., 1984. The structure of mammalian small nuclear ribonucleoproteins. Identification of multiple protein components reactive with anti(U1)ribonucleoprotein and anti-Sm autoantibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 259(9), pp.5907–5914.
- Pickford, F. et al., 2011. Progranulin is a chemoattractant for microglia and stimulates their endocytic activity. *American Journal of Pathology*, 178(1), pp.284–295.
- Plowman, G.D. et al., 1992. The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, 267(18), pp.13073–13078.
- Porges, A.J. et al., 1994. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *J.Immunol.*, 153(3), pp.1271–1280.
- Pryshchep, O. et al., 2008. Vessel-specific toll-like receptor profiles in human medium and

- large arteries. *Circulation*, 118(12), pp.1276–1284.
- Puga, I. et al., 2011. B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature Immunology*, 13(2), pp.170–180.
- Qiang, J.K. et al., 2017. Risk of malignancy in dermatomyositis and polymyositis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 21(2), pp.131–136.
- Regent, A. et al., 2011. Identification of target antigens of anti-endothelial cell and anti-vascular smooth muscle cell antibodies in patients with giant cell arteritis: a proteomic approach. *Arthritis Res.Ther.*, 13(3), p.R107-.
- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G.R., 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), pp.3116–20.
- Rose, N.R., 1993. Tolerance and Autoimmunity I. R. Mackay & F. S. Rosen, eds. *ImmunoMethods*, 2(2), pp.137–143.
- Routsias, J.G. & Tzioufas, A.G., 2007. Sjögren’s syndrome--study of autoantigens and autoantibodies. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 32(3), pp.238–51.
- Ruocco, V. & Sacerdoti, G., 1991. Pemphigus and Bullous Pemphigoid due to Drugs. *International Journal of Dermatology*, 30(5), pp.307–312.
- Ryan, C.L. et al., 2009. Progranulin is expressed within motor neurons and promotes neuronal cell survival. *BMC neuroscience*, 10, p.130.
- Sahin, U. et al., 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), pp.11810–3.
- Sakaguchi, S., 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 101(5), pp.455–458.
- Salvarani, C. et al., 2001. Polymyalgia Rheumatica and Giant Cell Arteritis. *New England Journal of Medicine*, 347(4), pp.261–271.
- Sanchez-Guerrero, J. et al., 2005. A trial of contraceptive methods in women with systemic

- lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 353(24), pp.2539–2549.
- Santee, S.M. & Owen-Schaub, L.B., 1996. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 271(35), pp.21151–21159.
- Sato, S. et al., 2004. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Molecular Immunology*, 41(12), pp.1123–1133.
- Van Schaardenburg, D. et al., 1993. The relation between class-specific serum rheumatoid factors and age in the general population. *Rheumatology*, 32(7), pp.546–549.
- Schlieben, D.J. et al., 2005. Pulmonary-renal syndrome in a newborn with placental transmission of ANCA. *American Journal of Kidney Diseases*, 45(4), pp.758–761.
- Schuurs, A.H.W.M. & Weemen, Van, B.K., 1971. Van Weemen & Schuurs. 1971 - ELSIA Erstentdeckung. *FEBS Letters*, 15(3), pp.232–236.
- Seko, Y. et al., 2004. Expression of Costimulatory Molecules (4-1BBL and Fas) and Major Histocompatibility Class I Chain-Related A (MICA) in Aortic Tissue with Takayasu's Arteritis. *Journal of Vascular Research*, 41(1), pp.84–90.
- Seko, Y. et al., 1994. Perforin-secreting killer cell infiltration and expression of a 65-kD heat-shock protein in aortic tissue of patients with Takayasu's arteritis. *Journal of Clinical Investigation*, 93(2), pp.750–758.
- Serdar, E. & Bulun, E., 2009. Mechanisms of Disease. *N Engl J Med*, 360(11), pp.268–79.
- Serrero, G. & Ioffe, O.B., 2003. Expression of PC-Cell-Derived Growth Factor in Benign and Malignant Human Breast Epithelium. *Human Pathology*, 34(11), pp.1148–1154.
- Sfikakis, P.P. & Tsokos, G.C., 2011. Towards the next generation of anti-TNF drugs. *Clinical Immunology*, 141(3), pp.231–235.
- Shim, G.-J. et al., 2004. Aromatase-deficient mice spontaneously develop a lymphoproliferative autoimmune disease resembling Sjogren's syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), pp.12628–33.
- Shoham, N. et al., 2003. The Tat protein of the caprine arthritis encephalitis virus interacts with the Notch2 EGF-like repeats and the epithelin/granulin precursor. *Intervirology*, 46(4), pp.239–244.
- Shoyab, M. 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), pp.7912–6.
- Siakavellas, S.I., Sfikakis, P.P. & Bamias, G., 2015. The TL1A/DR3/DcR3 pathway in autoimmune rheumatic diseases. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 45(1), pp.1–8.
- Simard, J.F. et al., 2009. Exposure to maternal smoking and incident SLE in a prospective cohort study. *Lupus*, 18(5), pp.431–5.
- Slegers, K. et al., 2009. Serum biomarker for progranulin-associated frontotemporal lobar degeneration. *Annals of Neurology*, 65(5), pp.603–609.
- Smith, B.J., 1984. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In *Proteins*. New Jersey: Humana Press, pp. 41–56.
- Smolen, J.S. et al., 1985. Systemic lupus erythematosus: Delineation of subpopulations by clinical, serologic, and T cell subset analysis. *American Journal of the Medical Sciences*, 289(4), pp.139–147.
- Songsrirote, K. et al., 2010. Development and application of mass spectrometric methods for the analysis of progranulin N-glycosylation. *Journal of Proteomics*, 73(8), pp.1479–1490.
- Van Den Steen, P.E. et al., 2004. Generation of glycosylated remnant epitopes from human collagen type II by gelatinase B. *Biochemistry*, 43(33), pp.10809–10816.
- Steiner, G., Skriner, K. & Smolen, J.S., 1996. Autoantibodies to the A/B proteins of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex: novel tools for the diagnosis of rheumatic diseases. *International archives of allergy and immunology*, 111(4), pp.314–319.
- Suh, H.S. et al., 2012. Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix metalloproteinase-12 (mmp-12). *PLoS ONE*, 7(4), p.e35115-.
- Sui, D. & Wilson, J.E., 2000. Interaction of insulin-like growth factor binding protein-4, Miz-1, leptin, lipocalin-type prostaglandin D synthase, and granulin precursor with the N-terminal half of type III hexokinase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 382(2), pp.262–74.
- Syversen, S.W. et al., 2010. Prediction of radiographic progression in rheumatoid arthritis and the role of antibodies against mutated citrullinated vimentin: Results from a 10-year prospective study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(2), pp.345–351.

- Talken, B.L. et al., 1999. Analysis of T cell receptors specific for U1-70kD small nuclear ribonucleoprotein autoantigen: The alpha chain complementarity determining region three is highly conserved among connective tissue disease patients. *Human Immunology*, 60(3), pp.200–208.
- Tang, W. et al., 2011. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6028), pp.478–84.
- Tangkeangsirisin, W., Hayashi, J. & Serrero, G., 2004. PC Cell-Derived Growth Factor Mediates Tamoxifen Resistance and Promotes Tumor Growth of Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, 64(5), pp.1737–1743.
- Tangkeangsirisin, W. & Serrero, G., 2004. PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 25(9), pp.1587–1592.
- Turner, L., Zaks, M., et al., 2013a. Progranulin antibodies entertain a proinflammatory environment in a subgroup of patients with psoriatic arthritis. *Arthritis research & therapy*, 15(6), p.R211.
- Turner, L., Preuss, K.D., et al., 2013b. Progranulin antibodies in autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 42, pp.29–38.
- Turner, L. et al., 2014. Proinflammatory progranulin antibodies in inflammatory bowel diseases. *Digestive Diseases and Sciences*, 59(8), pp.1733–1742.
- Turner, L. et al., 2015. The molecular basis for development of proinflammatory autoantibodies to progranulin. *Journal of Autoimmunity*, 61, pp.17–28.
- Toh, H. et al., 2011. Structure, function, and mechanism of progranulin; The brain and beyond. *Journal of Molecular Neuroscience*, 45(3), pp.538–548.
- 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), pp.4350–4.
- Trepo, C. & Guillevin, L., 2001. Polyarteritis nodosa and extrahepatic manifestations of hbv infection: The case against autoimmune intervention in pathogenesis. In *Journal of Autoimmunity*. pp. 269–274.

- Triantafyllopoulou, A. & Moutsopoulos, H., 2007. Persistent viral infection in primary Sjogren's syndrome: review and perspectives. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 32(3), pp.210–4.
- Trinh, D.P., Brown, K.M. & Jeang, K.T., 1999. Epithelin/granulin growth factors: extracellular cofactors for HIV-1 and HIV-2 Tat proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 256(2), pp.299–306.
- Tripathy, N.K. et al., 2001. Complement and cell mediated cytotoxicity by antiendothelial cell antibodies in Takayasu's arteritis. *Journal of Rheumatology*, 28(4), pp.805–808.
- Uotila, M., Ruoslahti, E. & Engvall, E., 1981. Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *Journal of Immunological Methods*, 42(1), pp.11–15.
- Uramoto, K.M. et al., 1999. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis and rheumatism*, 42(1), pp.46–50.
- Valkenburg, H.A. et al., 1966. Rheumatoid factors in a rural population. *Annals of the rheumatic diseases*, 25(6), pp.497–508.
- van Venrooij, W.J. & Pruijn, G.J., 2000. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, 2(4), pp.249–51.
- Vercellino, M. et al., 2011. Progranulin expression in brain tissue and cerebrospinal fluid levels in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 17(10), pp.1194–201.
- Verity, D.H. et al., 1999. Behcet's disease, the Silk Road and HLA-B51: Historical and geographical perspectives. *Tissue Antigens*, 54(3), pp.213–220.
- Wang, D. et al., 2012. GEP constitutes a negative feedback loop with MyoD and acts as a novel mediator in controlling skeletal muscle differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(11), pp.1855–1873.
- Watts, R.A. et al., 2001. Epidemiology of vasculitis in Europe. *Annals of the rheumatic diseases*, 60(12), pp.1156–7.
- Webb, S., Morris, C. & Sprent, J., 1990. Extrathymic tolerance of mature T cells: Clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell*, 63(6), pp.1249–1256.
- 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, p.7023.
- Wei, F., Zhang, Y., Zhao, W., et al., 2014. Progranulin facilitates conversion and function of regulatory T cells under inflammatory conditions S. V. Kaveri, ed. *PLoS ONE*, 9(11), p.e112110.
- Weyand, C.M. & Goronzy, J.J., 2003. Medium- and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med*, 349(2), pp.160–9.
- Willcocks, L.C. et al., 2010. The contribution of genetic variation and infection to the pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *Arthritis research & therapy*, 12(1), p.202.
- Williams, A. et al., 2016. Review: Novel Insights Into Tumor Necrosis Factor Receptor, Death Receptor 3, and Progranulin Pathways in Arthritis and Bone Remodeling. *Arthritis & Rheumatology*, 68(12), pp.2845–2856.
- Wu, H. & Siegel, R.M., 2011. Medicine. Progranulin resolves inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6028), pp.427–428.
- Xiao, H. et al., 2007. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *The American journal of pathology*, 170(1), pp.52–64.
- Xiao, H. et al., 2002. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 110(7), pp.955–963.
- Xing, G.Q. et al., 2009. Complement activation is involved in renal damage in human antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated pauci-immune vasculitis. *Journal of Clinical Immunology*, 29(3), pp.282–291.
- Xu, D. et al., 2008. Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 7(11), pp.2215–2228.
- Xu, K. et al., 2007. Cartilage oligomeric matrix protein associates with Granulin-Epithelin Precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), pp.11347–11355.
- Yalow, R.S. & Berson, S.A., 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of clinical investigation*, 39, pp.1157–1175.

- Yamada, D. et al., 2012. Clinical significance of serum decoy receptor 3 levels in patients with systemic sclerosis. *doi.org*, 22(3), pp.351–357.
- Yamada, R. et al., 2005. Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 10, pp.54–64.
- Yasui, K. et al., 2011. Increased progranulin in the skin of amyotrophic lateral sclerosis: An immunohistochemical study. *Journal of the Neurological Sciences*, 309(1–2), pp.110–114.
- Yin, F. et al., 2009. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 207(1), pp.117–128.
- Yoshizaki, A., Yanaba, K., Iwata, Y., et al., 2011. Elevated serum interleukin-27 levels in patients with systemic sclerosis: association with T cell, B cell and fibroblast activation. *Annals of the rheumatic diseases*, 70(1), pp.194–200.
- Yoshizaki, A., Yanaba, K., Ogawa, A., et al., 2011. Immunization with DNA topoisomerase i and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling. *Arthritis and Rheumatism*, 63(11), pp.3575–3585.
- Yoshizaki, A. & Sato, S., 2015. Abnormal B lymphocyte activation and function in systemic sclerosis. *Annals of Dermatology*, 27(1), pp.1–9.
- Yu, C.C.K., Mamchak, A.A. & DeFranco, A.L., 2003. Signaling mutations and autoimmunity. *Current directions in autoimmunity*, 6, pp.61–88.
- Zanocco-Marani, T. et al., 1999. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Research*, 59(20), pp.5331–5340.
- Zashin, S., Fattor, R. & Fortin, D., 1990. Microscopic polyarteritis: A forgotten aetiology of haemoptysis and rapidly progressive glomerulonephritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 49(1), pp.53–56.
- Zhang, H. & Serrero, G., 1998. Inhibition of tumorigenicity of the teratoma PC cell line by transfection with antisense cDNA for PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(November), pp.14202–7.
- Zhang, J. et al., 2009. Role of TL1A in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(8), pp.5350–5357.

- Zheng, Y. et al., 2011. C-terminus of progranulin interacts with the beta-propeller region of sortilin to regulate progranulin trafficking. *PLoS ONE*, 6(6), p.e21023-.
- Zhou, J. et al., 1993. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), pp.10863–10869.
- Zhu, J. et al., 2002. Conversion of proepithelin to epithelins: Roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell*, 111(6), pp.867–878.
- Zouboulis, C.C. et al., 1997. Epidemiological Features of Adamantiades-Behçet's Disease in Germany and in Europe. *Yonsei Medical Journal*, 38(6), pp.411–422.

## 7. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Thurner L, Preuss KD, Fadle N, Regitz E, **Klemm P**, Zaks M, Kemele M, Hasenfus A, Csernok E, Gross WL, Pasquali JL, Martin T, Bohle RM, Pfreunds Schuh:

Progranulin antibodies in autoimmune diseases.

J Autoimmun. 2013 May;42:29-38

L. Thurner , K. Preuss , N. Fadle , E. Regitz , M. Kemele , **P. Klemm** , M. Zaks , E. Stöger , E. Csernok , W. Gross , V. Zimmer , M. Dauer , J. Pasquali , T. Martin , G. Assmann , M. Pfreunds Schuh

Progranulin antibodies in a wide spectrum of autoimmune diseases.

Poster: experimentelle Rheumatologie (ER) 30, DGRh-Kongress 2013

Z. Rheumatol. (2013) 72(Suppl 2): 17. <https://doi.org/10.1007/s00393-013-1255-1>

Thurner L, Stöger E, Fadle N, **Klemm P**, Regitz E, Kemele M, Bette B, Held G, Dauer M, Lammert F, Preuss KD, Zimmer V, Pfreunds Schuh M:

Proinflammatory progranulin antibodies in inflammatory bowel diseases.

Dig Dis Sci. 2014 Aug;59(8):1733-42.

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, Pfreunds Schuh M:

The molecular basis for development of proinflammatory autoantibodies to progranulin

J Autoimmun. 2015 Jul;61:17-28

## **8. Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Michael Pfreundschuh, Direktor der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und die gute Betreuung.

Nach dem plötzlichen Tod von Herrn Professor Pfreundschuh hat dankenswerterweise Herr Professor Abmann, ständiger Vertreter des Klinikdirektors und leitender Oberarzt der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes die letzte Korrektur als Doktorvater übernommen.

Größten Dank schulde ich Herrn Doktor Lorenz Thurner, Oberarzt der Klinik für Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die hervorragende Betreuung, die Geduld und Unterstützung in allen Themen der Arbeit und die Unterstützung auch neben der Arbeit.

Frau Natalie Fadle, medizinisch-technische Assistentin im Jose-Carreras-Zentrum für Immun- und Genterapie in Homburg, danke ich für die geduldige Anleitung und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt danke ich meiner Frau und meiner Familie für ihre Hilfe und Unterstützung.

