

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Antiepitheliale Antikörper der Klasse D bei Patienten mit
Autoimmunerkrankungen oder bakteriellen und viralen Infektionen**

Constanze Storr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Lersch
2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt

Die Dissertation wurde am 25.09.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.02.2004 angenommen.

Meinem Sohn Leopold gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	7
1.1.	Einleitung	7
1.2.	Fragestellung	7
2.	Patienten, Material und Methode	9
2.1.1.	Patienten	9
2.1.2.	Gesunde Vergleichsgruppe	10
2.1.3.	Zellkultur: Colon-Ca SW-480	11
2.2.	Verwendete Substanzen und Geräte	11
2.3.	Materialgewinnung	12
2.4.	Materialverarbeitung	12
2.5.	Versuchsaufbau, indirekter Immunfluoreszenztest	13
2.6.	Versuchsablauf	15
2.7.	Auswertung	17
3.	Statistische Auswertung	20
4.	Ergebnisse	22
4.1.1.	Gesunde Vergleichsgruppe	22
4.1.2.	Morbus Crohn	23
4.1.3.	Colitis ulcerosa	26
4.1.4.	Rheumatoide Arthritis	28
4.1.5.	Systemischer Lupus erythematoses	30
4.1.6.	Glomerulonephritis	32
4.1.7.	Chronische Hepatitis C	34
4.1.8.	Systemische bakterielle Infektionen	36
4.1.9.	Sensitivität, Spezifität, prädiktive Werte der Immunfluoreszenz- untersuchungen	
4.2.	Colon-Ca-SW-480	39
4.3.	Vergleich mit der bakteriellen Vergleichsgruppe	39
4.4.	Vergleich mit der viralen Vergleichsgruppe	39
4.5.	Korrelationen	39
4.6.	Kreuzreaktionen	42

5.	Diskussion	43
5.1.	Allgemeine Diskussion	43
5.1.1.	Struktur und Funktion von IgD	43
5.1.1.1.	Der Aufbau des IgD-Moleküls	43
5.1.1.2.	IgD-Gen und Synthese	44
5.1.1.3.	Die Funktionen von IgD	45
5.1.1.4.	Der IgD-Rezeptor	48
5.1.1.5.	Vorkommen von IgD bei verschiedenen Erkrankungen	49
5.2.	Spezielle Diskussion	51
5.2.1.	Diskussion der Methode	51
5.2.2.	Diskussion des IgD-Antikörpernachweises bei Autoimmun- Erkrankungen	54
5.2.3.	Morbus Crohn	55
5.2.4.	Colitis ulcerosa	56
5.2.5.	Rheumatoide Arthritis	58
5.2.6.	Systemischer Lupus erythematodes	59
5.2.7.	Glomerulonephritis	60
5.2.8.	Chronische Hepatitis C	61
5.2.9.	Colon Carcinom-Zelllinie SW 480	62
6.	Zusammenfassung und Ausblicke	63
7.	Literaturverzeichnis	65
8.	Abbildungsverzeichnis	79
9.	Tabellenverzeichnis	81
10.	Danksagung	82
11.	Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

\hat{i}_{pos} = prädiktiver Wert des positiven Ergebnisses
 \hat{i}_{neg} = prädiktiver Wert des negativen Ergebnisses
CD = Cluster of differentiation
ANA = Antinukleäre Antikörper
5-ASA = 5-Aminosalicylsäure
RA = Rheumatoide Arthritis
MCTD = mixed connective tissue disease
SLE = Systemischer Lupus erythematodes
HIGM = Hyperimmunglobulinämie M
GN = Glomerulonephritis
BCR = B-Zell-Rezeptor
CRP = C reaktives Protein
HIV = Human Immunodeficiency Virus
GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase
AIDS = Aquired Immunodeficiency Syndrome
CDAI = Crohn's disease Activity Index
HBcAG = Hepatitis B core Antigen
WHO = World Health Organisation
AMA = Antimitochondriale Antikörper
IgA/D/E/G/M = Immunglobulin A/D/E/G/M
Gm-Haplotyp = Gammaketten-Marker-Haplotyp
Fab = Fragment Antigen bindend
Fc = Fragment crystalline
SMA = Smooth muscle Antigen
S = Sedimentationskoeffizient
IL = Interleukin
Da = Dalton
mRNA = messenger ribonuclein acid
HLA = Human Leucocyte Antigen
CA = Carcinom
FITC = Fluoresceinisothiocyanat
PBS = Phosphat Buffered Saline
UV = Ultraviolett
NaCl = Natriumchlorid
M = Median
K-a-H-IgD = Kaninchen anti human IgD
Z-a-K = Ziegen anti Kaninchen
SPSS = Sigmaplot Sigmastat
PC = Personal Computer
 H_0 = Nullhypothese
 Δf = Differenz der Fluoreszenzraten des Serum- und Kontrollansatzes

Q1 = 25%-Perzentile

Q3 = 75%-Perzentile

LKM1-Ak = Liver kidney microsome Antikörper

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

IgD wurde 1965 von Rowe und Fahey im Serum eines Myelompatienten entdeckt (145,S.171). In den siebziger Jahren fanden van Boxel et al., 1972, Rowe et al., 1973 and Finkelman et al. 1976 (47,S.1173; 146,S.155; 185,S.648), heraus, daß IgD nicht nur in sehr geringer Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) im Serum vorkommt, sondern auch auf B-Lymphozyten exprimiert wird. Seit dieser Beschreibung wird IgD in secretory IgD und membrane IgD unterschieden. Außerdem wird diskutiert, ob es zwei verschiedene Subklassen des IgDs gibt, die durch zwei verschiedene Absorptionsmaxima unterschieden werden können (60,S.393; 61,S.310). IgD kommt nicht in allen Spezies vor. Beschrieben wurde IgD bei Primaten, Hunden, Mäusen, Ratten, Hasen, Meerschweinchen, Rindern, Schweinen, Schafen und Xenopus (27,S.43; 33,S.2580; 47,S.1173; 48,S.1253; 97,S.320; 111,S.409; 112,S.349; 147,S.1025). 1997 und 1999 identifizierten Wilson et al. und Hordvik et al. erstmals IgD in einer anderen Spezies als Säugetieren, nämlich in Fischen. Der Nachweis in Knorpel- und in Knochenfischen läßt eine wesentliche Bedeutung des IgDs innerhalb des Immunsystems vermuten und IgD mehr als nur eine redundante Immunglobulin-Klasse in Säugetieren erscheinen (59,S.202; 195,S.4593).

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß schon bei verschiedenen systemischen Autoimmunerkrankungen eine Autoantikörperreaktivität des IgDs beschrieben wurde (90,S.212; 194,S.19).

Trotz der nun schon fast 40jährigen Erforschung des IgDs, gibt es immer noch keine befriedigende Ergebnisse über die Funktion und die Rolle dieses Antikörpers. Ziel der gegenwärtigen Untersuchung war, eine mögliche Rolle des IgDs bei Erkrankungen des Immunsystems, insbesondere des Gastrointestinaltrakts, der mit einer Oberfläche von 300-400 m^2 die größte Angriffsfläche des Körpers für pathogene Erreger darstellt, zu beleuchten.

1.2. Fragestellung: Untersuchung von antiepithelialen Autoantikörpern

Die experimentellen Untersuchungen waren zur Beantwortung folgender Fragestellungen konzipiert:

1. Sind IgD-Antikörper gegen antigene Determinanten der Epithelzellmembranen der oralen Mucosa im Patienten-Serum vorhanden?
2. Welche Häufigkeitsverteilung antiepithelialer IgD-Antikörper im Serum

ergibt sich für Normalpersonen im Vergleich zu Patienten mit

- Morbus Crohn
 - Colitis ulcerosa
 - Rheumatoider Arthritis
 - Systemischem Lupus erythematodes
 - Glomerulonephritis (Morbus Berger)
 - Chronische Hepatitis C
 - bakteriellen Infektionen
 - Alle Diagnosegruppen im Vergleich zu Patienten mit bakteriellen Infektionen
3. Welche Sensitivität und Spezifität ergibt sich für den Immunfluoreszenztests zum Nachweis von IgD auf Epithelien des Gastrointestinaltrakts für die Diagnose der genannten Erkrankungen, und ist ein klinischer Einsatz dieses Tests sinnvoll?
 4. Korrelieren die Fluoreszenzraten der einzelnen Diagnosegruppen mit diversen Aktivitätsindices der verschiedenen Erkrankungen?
 5. Existiert eine Kreuzreaktion zwischen Epithelien von Normalpersonen und IgD-positivem Serum erkrankter Personen, gibt es eine HLA-abhängige Determinante?
 6. Zeigen Zellkulturen, wie z.B. eine menschlichen Colon-CA-Zelllinie (SW 480), ebenfalls antigene Determinanten auf ihrer Oberfläche?

2. Patienten, Material und Methode

2.1.1. Patienten

Das Patientenkollektiv setzte sich aus sieben verschiedenen Untergruppen zusammen. Wir untersuchten erstens Patienten, die an Morbus Crohn litten. Vorwiegend waren diese stationär in der II. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München aufgenommen, oder es handelte sich um Patienten, die sich in ambulanter Behandlung in der Spezialsprechstunde der Poliklinik befanden. Insgesamt untersuchten wir 20 Morbus Crohn-Patienten, davon 7 weibliche in einem Durchschnittsalter von 40 Jahren (25-59 Jahre) und 13 männliche Probanden im Durchschnittsalter von 39 Jahren (22-72 Jahre).

Bei der zweiten Gruppe handelte es sich um 11 Colitis ulcerosa-Patienten, die ebenfalls stationär oder ambulant im Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität behandelt wurden. Davon waren 5 weiblich im mittleren Alter von 32 Jahren (21-43 Jahre) und sechs männlich, im Durchschnittsalter von 45 Jahren (29-66 Jahre).

Bei allen Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen war die Diagnose bereits bioptisch gesichert worden.

Bei der dritten Gruppe handelte es sich um Patienten mit seropositiver oder seronegativer rheumatoider Arthritis. Einerseits waren diese Patienten stationär im städtischen Krankenhaus Bogenhausen/Abteilung Innere Medizin, andererseits in der Spezialklinik für Rheumatologie in Oberammergau. Insgesamt untersuchten wir 36 Patienten, davon 28 weibliche im Durchschnittsalter von 63 Jahren (31-84 Jahre) und 8 männliche im mittleren Alter von 74 Jahren (66-83 Jahre).

Die vierte Untergruppe umfaßte 9 Patienten mit systemischem Lupus erythematodes. Diese Patienten stammten sowohl aus dem städtischen Krankenhaus Bogenhausen, als auch aus den Spezialsprechstunden der dermatologischen Kliniken des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München und des Innenstadt-Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität, München. Alle Patienten waren weiblich und hatten ein mittleres Alter von 45 Jahren (31-61 Jahre).

Bei der fünften Gruppe handelte es um Patienten mit Glomerulonephritis (IgA-Nephritis/Morbus Berger). Insgesamt untersuchten wir 7 Patienten, davon eine weiblich im Alter von 86 Jahren und 6 männliche Patienten im Durchschnittsalter von 57 Jahren (29-71 Jahre). Alle Patienten wurden aus der Ambulanz für Nierenerkrankungen der II. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar rekrutiert.

Insgesamt setzte sich die sechste Gruppe aus 24 Patienten mit chronischer Hepatitis C zusammen, davon 12 weibliche im mittleren Alter von 49 Jahren (32-

66 Jahre) und 12 männliche im Durchschnittsalter von 47 Jahren (21-69 Jahre). Alle Patienten waren in ambulanter Behandlung in der Spezialsprechstunde für Lebererkrankungen der Poliklinik der II. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar.

Die Gruppe mit verschiedenen bakteriellen Infektionen umfaßte 21 Patienten (hauptsächlich Infektionen mit koagulase negativen Staphylokokken, aber auch mit Enterokokken, Pseudomonas aeruginosa und Klebsiellen). Davon waren 6 weiblich im mittleren Alter von 46 Jahren (23-74 Jahre), und 15 männlich im Durchschnittsalter von 61 Jahren (41-85 Jahre). Der größte Teil dieser Patienten war in stationärer Behandlung in der Abteilung für septische Chirurgie, die restlichen in der II. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar, sowie in der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgischen Abteilung des Klinikums Rechts der Isar. Alle bakteriellen Infektionen waren durch eine mikrobiologische Untersuchung gesichert.

Die experimentelle Teil der Arbeit fand im Zeitraum von August 1998 bis Dezember 1999 statt.

Tabelle 1: Diagnosen, Anzahl, Geschlecht. Durchschnitts-, minimales und maximales Alter der Patienten, bei denen IgD-Antikörper gesucht wurden.

<i>Diagnose</i>	<i>Anzahl n</i>	<i>Geschlechts-Verhältnis m:w</i>	<i>Durschnitts-Alter A</i>	<i>Minimales Alter A_{min}</i>	<i>Maximales Alter A_{max}</i>
Morbus Crohn	19	13:6	40	22	72
Colitis ulcerosa	11	6:5	39	21	66
Rheumatoide Arthritis	36	8:28	64	31	84
Systemischer Lupus erythematodes	9	0:9	45	31	61
Glomerulonephritis (IgA)	7	6:1	72	29	86
Chronische Hepatitis C	24	12:12	47	21	74
Bakterielle Infektionen	21	15: 6	54	21	85
Gesunde Vergleichsgruppe	71	31:40	47	21	86

2.1.2. Gesunde Vergleichsgruppe

Wir legten besonderen Wert darauf eine möglichst große Vergleichsgruppe zu untersuchen, testeten daher insgesamt 71 Personen, davon waren 40 weiblich im mittleren Alter von 45 Jahren (21-86 Jahre) und 31 männlich im mittleren Alter von 48 Jahren (23-85 Jahre). Die Gruppe setzte sich aus Pflegepersonal des Klinikums rechts der Isar, Ärztinnen, Ärzten und Verwaltungsangestellten zusammen. Die Schwierigkeit bestand darin, eine möglichst homogen verteilte Altersstruktur der Gruppe zu erhalten. So mußten wir einen Kompromiß schließen, um auch ältere Menschen in die Gruppe einbeziehen zu können. Wir entschieden uns für Patienten der Augenklinik des Klinikums Rechts der Isar, die dort wegen eines Glaukoms in Behandlung waren. Zusätzliche Erkrankungen

wurden durch eine ausführliche Anamnese ausgeschlossen. Damit war unsere älteste Patientin, der älteste Patient und die Personen der Vergleichsgruppe gleich alt.

2.1.3. Zellkultur: Colon-Carcinom-SW-480

Der zweite Teil der Arbeit bestand darin nicht nur Material von Patienten und Gesunden zu untersuchen, sondern auch Zellen einer Kultur zu testen, da dies den Vorteil bringt erstens nur Zellen eines Typs zu untersuchen und zweitens Verunreinigungen möglichst gering zu halten. Zu diesem Zweck züchteten wir eine Kultur der Zelllinie Colon-Carcinom-SW-480, Firma BRAIN GmbH, 64673 Zwingenberg, D, und verarbeiteten sie auf dieselbe Art und Weise wie das Material der anderen Gruppen. Der Anlaß hierfür war, zu sehen ob spezifische Rezeptoren für Serum-IgD auf der Zellmembran von dieser Zelllinie vorhanden sind.

2.2. Material und Geräte

Folgende Materialien und Geräte pro Patient wurden verwendet:

- Ein bis zwei Serumröhrchen, Firma Sarstedt, 51582 Nürmbrecht, D, mit Serum, abzentrifugiert aus Vollblut
- Physiologische Kochsalzlösung (0,9%ig), Firma Braun AG, 34209 Melsungen, D
- Zwei verschließbare Reagenzgläser mit 10ml physiologischer Kochsalzlösung für die buccalen Abstriche, Firma Eppendorf, 22331 Hamburg, D
- Zwei große Wattestäbchen, Firma Lohmann und Rauscher, 56567 Neuwied, D, um die Epithelien zu gewinnen
- Eine Zentrifuge mit 3000 Umdrehungen/min, GFT Trenntechnik Werner Pütz GmbH, 41747 Viersen, D
- Jeweils drei Eppendorfszentrifugengläser, Firma Eppendorf, 22331 Hamburg, D
- 0,01 molarer Phosphatpuffer (H_2PO_4^-), Apotheke des Klinikums rechts der Isar, 81675 München, D
- Ein Kühlschrank, Bosch GmbH, 70839 Gerlingen, D, mit der Temperatur von 4°C zur Inkubation der Testansätze
- Eine Zentrifuge für die Eppendorfsreagenzgläser mit 1000 Umdrehungen/min, GFT Trenntechnik Werner Pütz GmbH, 41747 Viersen
- Pipetten verschiedenen Fassungsvermögens (1000 µl, 100µl, 20µl), Firma Eppendorf, 22331 Hamburg, D
- Zelllinie Colon-Ca-SW-480, Firma BRAIN GmbH, 64673 Zwingenberg, D
- Kaninchen-anti-Human-IgD-Antikörperlösung, Dakocytomation Norden AB, 12521 Älvsjö, S, Rabbit-anti-human-IgD, delta-chain, code no A293,

Gebrauchsverdünnung 1:100

- Verdünnung für die Antikörper, PBS-Medium aus der Apotheke des Klinikums rechts der Isar, 81675 München, D
- Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper, FITC-markiert, der Firma Behringwerke, 35035 Marburg, Ziegen-anti-Kaninchen-IgG, gamma-chain, code no OTKF, Gebrauchsverdünnung 1:50
- Zwei Objekträger, Laboroptik GmbH, 61381 Friedrichsdorf, D
- Zwei Deckgläschen, Laboroptik GmbH, 61381 Friedrichsdorf, D
- Zwei Zytospins, Hettich Zentrifugen GmbH und CoKG, 78503 Tuttlingen, D
- Filterpapier mit ausgestanztem Loch, Melitta Unternehmensgruppe Bentz KG, 32425 Minden, D
- Ein Zeiss Photomikroskop III für Durchlicht sowie Auflicht in einem abdunkelbaren Raum (Vergrößerung 1:100), Firma Zeiss, 07743 Jena, D
- Zwei Handzähler

2.3. Materialgewinnung

Die Materialgewinnung bestand aus zwei Schritten. Zum einen benötigten wir einen buccalen Abstrich jeder Person, um Mundschleimhautepithelien zu lösen. Dazu verwendeten wir einen sterilen Wattetupfer der Firma Lohmann und Rauscher, 56567 Neuwied, Deutschland, der auf jeder Seite etwa unter leichtem Druck zwanzigmal gedreht wurde. Für die rechte und linke Seite benutzten wir jeweils einen neuen Tupfer. Je fester und länger man drehte, desto mehr Zellen ließen sich von der Schleimhaut ablösen, so dass es nicht nötig war eine Biopsie-Zange zu verwenden, um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten.

Zum anderen benötigten wir von derselben Person das Antikörper enthaltende Serum. Zum Teil vor dem buccalen Abstrich, zum Teil kurz danach entnahmen wir bei den Patienten perivenös Blut. Die Menge variierte durch die Mitarbeit zwischen den einzelnen Probanden, so daß wir mindestens 10ml und maximal 20ml Blut entnahmen. Dazu verwendeten wir zwei verschiedene Systeme: einerseits Butterflies mit Adapter und andererseits das normale Nadelsystem, beide Systeme von der Firma Sarstedt, 51582, Nürmbrecht, Deutschland.

2.4. Materialverarbeitung

Buccale Abstriche

Die beiden Tupfer mit den buccalen Abstrichen wurden in getrennte Zentrifugenröhrchen mit einer Lösung aus isotonischem Kochsalz getaucht und dort noch einmal gedreht, um die Zellen der Mundschleimhaut abzulösen. So entstand eine Suspension der Zellen, die wir nach möglichst kurzer Zeit in einer Zytocentrifuge bei 3000U/min zehn Minuten abzentrifugierten. Der Überstand wurde bis auf einen Milliliter abpipettiert und der Rest verworfen. Das

Zentrifugat wurde nochmals mit einer Pipette in der restlichen isotonischen Kochsalzlösung in Suspension gebracht und in ein Eppendorf-Reagenzröhrchen, Firma Eppendorf, 22331 Hamburg, Deutschland, zur weiteren Verarbeitung umgefüllt. Dasselbe geschah mit der zweiten Suspension, wobei das Zentrifugat in das gleiche Eppendorf-Reagenzröhrchen wie das erste umgefüllt wurde, um möglichst viele Zellen in dieser Suspension zu erhalten.

Seren

Das Blut wurde in Serumröhrchen abgefüllt und wie die buccalen Abstriche umgehend weiterverarbeitet. Die Röhrchen wurden in die Zentrifuge gestellt, austariert und zehn Minuten bei 3000 Umdrehungen/ Minute zentrifugiert. So wurde das antikörperhaltige Serum im Überstand gewonnen, das wir in unserem Versuch verwendeten. Der Blutkuchen wurde verworfen.

2.5. Versuchsaufbau

Indirekte Immunfluoreszenzmethode ("Sandwichassay")

In der gesamten Studie wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewandt; sie erlaubt den Nachweis einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion (16, S.1).

Zunächst inkubierten wir 2 Stunden Epithelzellen aus den buccalen Abstrichen mit unmarkiertem Patientenserum. Während dieser Inkubationszeit sollen sich homologe Antikörper, in unserem Fall Immunglobuline der Klasse IgD, an ihre Antigen determinanten auf den Epithelzellen binden.

Die Antikörper aus dem Patientenserum sind wiederum Antigene für weitere Antikörper (16,S.1). Da wir in unserem Versuch freies IgD im Serum nachweisen wollten, verwendeten wir im nächsten Schritt Kaninchen-anti-Human-IgD-Antikörper.

Im dritten Versuchsschritt wurde ein Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiertes Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörperkonjugat zugefügt, das mit den - falls vorhandenen - epithelständigen Immunkomplexen spezifisch binden soll. Fluoreszeinisothiocyanat wird über Thiocarbamid an Proteine gebunden und hat den Gipfel seines eigenen Emissionsspektrums im Grünbereich (also bei einer Wellenlänge von 492 nm) (16,S.1).

Alle Schritte sind in Abbildung 1 noch einmal dargestellt.

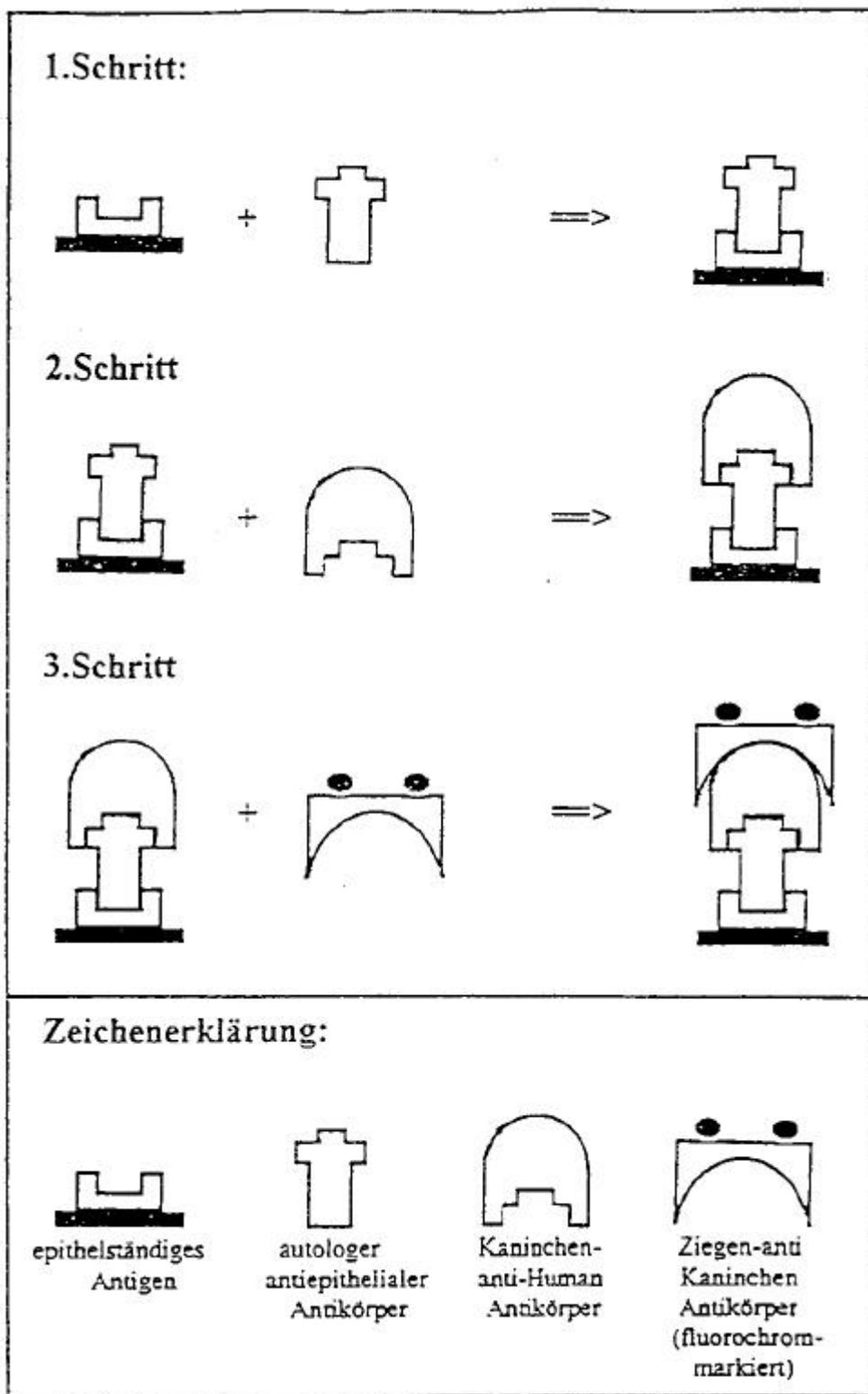


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Prinzips der indirekten Immunfluoreszenzmethode zum Nachweis anti-epithelialer Antikörper der Immunglobulinfraktion IgD

2.6. Versuchsablauf

Auf die Gewinnung des zu untersuchenden Materials (Blut, Epithelien) wurde im Kapitel 2.2. schon genau eingegangen. Nach der Gewinnung lagerten die zu untersuchenden Materialien bis zur Verarbeitung im Kühlschrank bei 4°C, um die Lebensfähigkeit der Zellen und damit die Reaktionsfähigkeit der Oberflächenantigene zu erhalten. Wichtig war es aber möglichst zügig (mit maximal 1 Stunde Verzögerung) zu arbeiten, um die verschiedenen Störgrößen, wie z.B. die Temperatur oder den Lichteinfall möglichst gering zu halten.

Die Wattestäbchen wurden unmittelbar nach der Gewinnung der Epithelien in den Reagenzgläsern mit den 5ml 0,9%iger Kochsalzlösung sorgfältig ausgeschüttelt. Danach wurden die Reagenzgläser mit den Epithelien und die Serumröhrchen gemeinsam in die Zentrifuge gestellt, austariert und zehn Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand der Reagenzgläser mit Epithelzellen bis auf einen Milliliter verworfen. Um sicher zu gehen, daß genügend Material gewonnen wurde, pipettierten wir die vorher nach Seiten getrennten und abzentrifugierten Epithelien in ein gemeinsames Eppendorfreagenzglas und brachten die Zellen wieder in Suspension. Das gewonnene Serum des Blutes wurde in mehrere kleine Eppendorfreagenzgläser abpipetiert. Eines davon diente dem Versuch, die anderen wurden für die spätere Kreuzprobe oder einen nochmaligen Ansatz bei -70°C eingefroren.

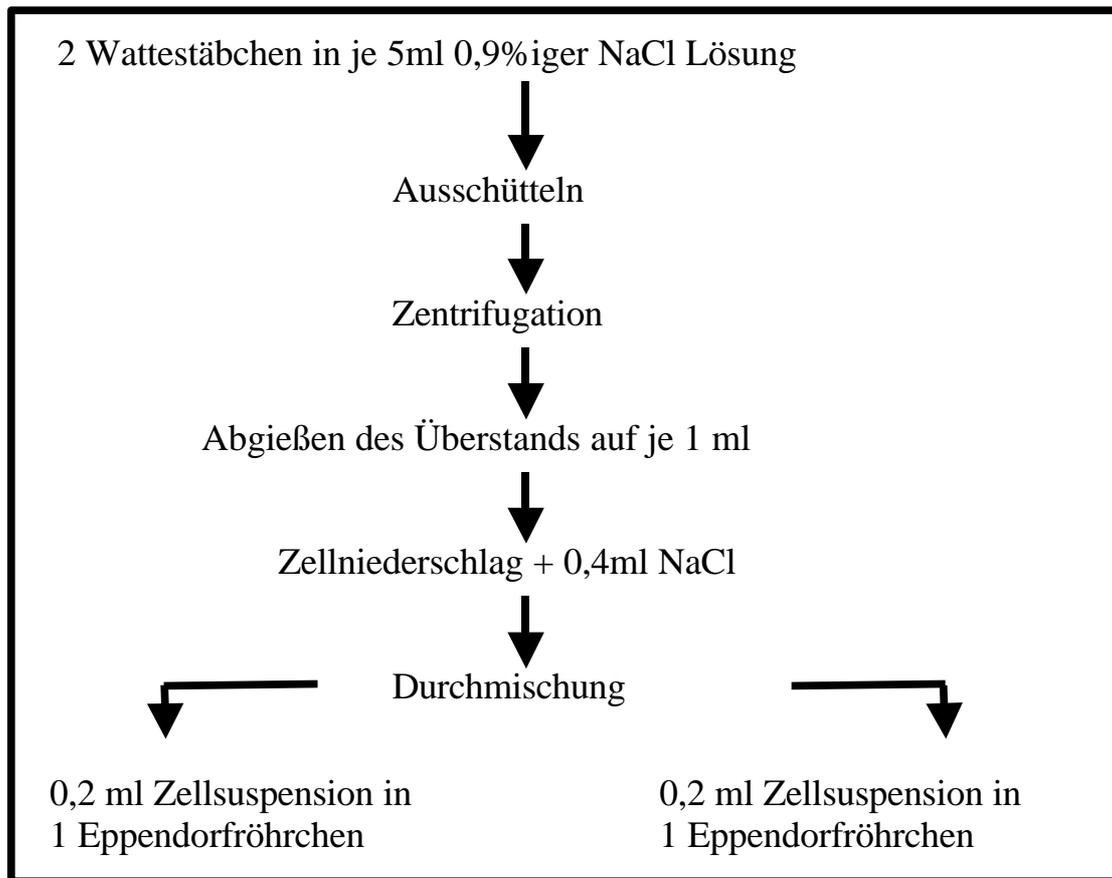
Aus dem Eppendorfbehälter, der nun die konzentrierte Epithelzellsuspension enthielt, wurden jeweils 200µl in zwei separat bereitgestellte Eppendorfbehälter abpipetiert und beschriftet. Das eine wurde mit Serumansatz, das andere mit Konjugatkontrolle beschriftet.

In das Serumansatzgläschen wurden anschließend 20µl des Serums hinzugefügt und in die Konjugatkontrolle 20µl 0,01M Phosphatpuffer. Um eine gleichmäßige Verteilung des Serums und des Puffers zu erhalten, wurde mit der Pipette im Eppendorfbehälter mehrmals durchgemischt. Anschließend wurden beide Versuchsansätze der Epithelzellen für zwei Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit schloß sich, wie auch nach jedem weiteren Inkubationsschritt, zweimal ein gründliches Auswaschen der nicht gebundenen Antikörper mit je 1ml 0,01 M Phosphatpuffer an. Dabei wurde ebenfalls jeweils 1 Minute zentrifugiert und der Überstand abpipetiert. Nach dem Waschgang pipettierten wir dann 100µl eines 1 M Phosphatpuffers in beide Ansätze und spülten die Zellen. Anschließend wurden in beide Ansätze 20µl des Kaninchen-anti-human-IgD-Antikörpers (1:100 mit PBS-Medium verdünnt) zugefügt und mit der Pipette gut durchgemischt. Im Anschluß erfolgte eine weitere Inkubationszeit von zwei Stunden bei 4°C im Kühlschrank. Nach der Inkubation erfolgte ein erneutes Auswaschen, wie oben erläutert.

Nun folgte der letzte Schritt: Die Inkubation mit FITC-markiertem Ziegen-anti-

Kaninchen-Antikörpern. Jeweils 100 μ l der mit PBS-Medium 1:10 verdünnten Lösung wurde den beiden Ansätzen zugefügt, durchmischt und in den Kühlschrank zur letzten Inkubation für weitere 2 Stunden gegeben. Danach erfolgte wieder das oben beschriebene Auswaschen mit 1M Phosphatpuffer. Zur Verdeutlichung soll das folgende Schema der Arbeitsschritte dienen.

Präparation :



Reaktion:

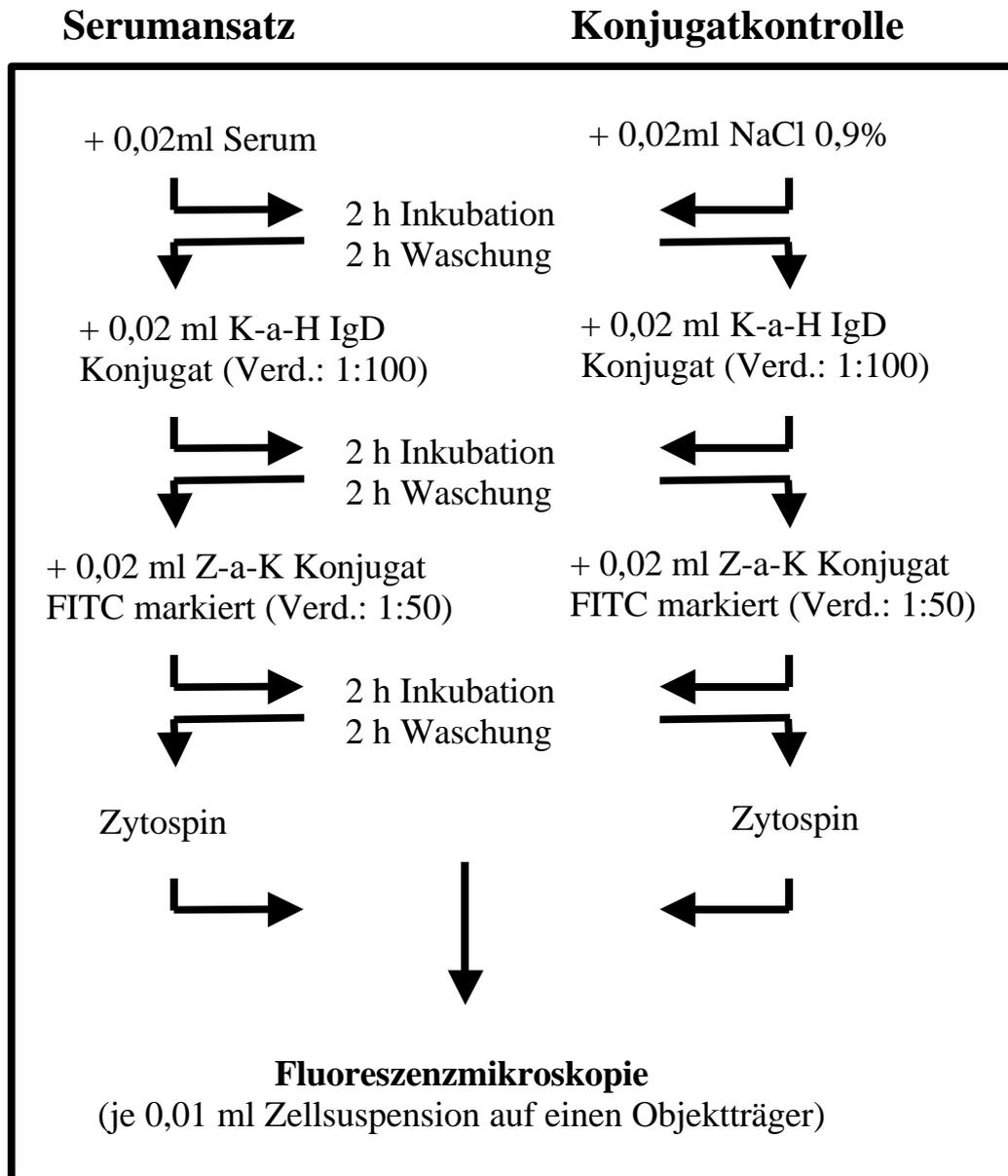


Abbildung 2a und 2b: Algorithmus des Immunfluoreszenztests zum Nachweis von antiepithelialen Antikörpern der Klasse IgD (K-a-H = Kaninchen-anti-Human IgD Antikörper, Z-a-K = Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper)

2. 7. Auswertung

Um eine Unvoreingenommenheit beim Mikroskopieren und der Auswertung zu

erreichen, wurden im dritten Arbeitsgang kleine Pappkartonrohre über die Eppendorfbehälter gesteckt und damit ihre Beschriftung abgedeckt.

Damit die Zellen möglichst auf einen Punkt auf dem Objektträger fokussiert wurden, zentrifugierten wir die Objektträger mit einem Zytospin. Die Zellen wurden nach dem dritten Waschgang mit 200µl Phosphatpuffer in Suspension gebracht und mit der Pipette in den dafür vorgesehenen Trichter des Zytospins pipettiert. Dies funktionierte bei den ersten Versuchen nicht, sondern erst als wir ein gelochtes (Durchmesser des Lochs ca. 0,5cm), und mit der Schere genau an den Objektträger angepasstes Filterpapier, zwischen Objektträger und Trichter auflegten. Erst dann wurde die Zellsuspension in den Trichter eingebracht. Es folgte ein Zentrifugieren der Zytospin-Schaukeln mit 3000 Umdrehungen/min für 5min. Anschließend wurden die Objektträger aus den Zytospin-Schaukeln entfernt, der Trichter abgenommen und das Filterpapier vorsichtig vom Objektträger abgezogen. Nun hatten sich die Zellen in dem vorgestanztem Loch des Filterpapiers sehr gut fokussiert, und wir hatten genügend Material, um beim Mikroskopieren ein schnelles und repräsentatives Ergebnis zu erzielen. Zum Schluß wurde noch ein 24X24 mm großes Deckgläschen auf den Objektträger aufgebracht, um ein zu schnelles Austrocknen des Präperates zu verhindern.

Fluoreszenzmikroskopische Beurteilung und Dokumentation

Zur Auswertung der Zellen diente uns ein Zeiss Photomikroskop III für Durchlicht mit einem Auflichtzusatz zum Auszählen der fluoreszierenden Zellen. Zusätzlich war das Mikroskop mit einem 35mm Kamerasystem ausgestattet, um bei den verschiedenen Ansätzen die Ergebnisse durch Photographien dokumentieren zu können. Die Fluoreszenzanregung erfolgte durch eine lichtstarke Quecksilber-Höchstdrucklampe, sowie durch einen Fluoreszenzauflichtkondensator III RS (199, S.22). Zur Auszählung verwendeten wir ein Plan-Neoflar-Objektiv, Maßstab 1:100, numerische Apertur 1,25, auch geeignet für Ölimmersionen. Um die Fluoreszenz des FITC sichtbar machen zu können, kam ein spezieller Filter zum Einsatz. Hierbei handelte es sich um einen Hochleistungs-Breitbandfilter (Interferenzfilter), der bei einer Wellenlänge 450 bis 490 nm sein Wirkmaximum erreicht. Der Filtersatz bestand aus einem Erregerfilter (450 – 490 nm), einem Farbteiler (bei 510nm) und einem Sperrfilter (520 nm) (199,S.22). So konnten im Wechsel von Durchlicht- und Auflichtmethode die Präparate schnell und zuverlässig ausgewertet werden (167, S.268).

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte unter standardisierten Bedingungen.

Vor der Auszählung der Zellen wurde der Raum durch lichtundurchlässige Jalousien verdunkelt. Das Mikroskop mußte zehn Minuten vor Beginn eingeschaltet werden, da die Quecksilber-Höchstdrucklampe erst nach 10 Minuten gleichmäßiges Licht abgab. Natürlich mußten sich auch die Augen des Untersuchers erst an die Dunkelheit gewöhnen. Nach der Adaptation des Systems

konnte auch leichter die Entscheidung getroffen werden, ob die Zelle im Dunkelfeld fluoresziert oder nicht.

Zunächst erfolgte die Auszählung der Zellen pro Gesichtsfeld in der Auflichtmikroskopie. Danach wurde ein Filter eingeschaltet, um so die fluoreszierenden Zellen im Dunkelfeld deutlich sichtbar zu machen. Da es sich bei dem Untersucher stets um die gleiche Person handelte, wurde der Störfaktor nicht vergleichbarer Ergebnisse reduziert. Zeitweise wurden die gleichen Präparate unter den gleichen Bedingungen von einem unabhängigen Untersucher nochmals ausgezählt, um eine Kontrolle über die richtige Methodik zu bekommen. Die Auswertung erfolgte durch eine subjektive und durch eine Erfahrung geprägte Entscheidung, da durch Untergrundfluoreszenz, Autofluoreszenz, und bei längeren Beleuchtungszeiten durch Ausbleichen der fluoreszenzmarkierten Zellen Grenzfälle in der Bewertung auftraten.

Der zweite Untersucher arbeitete unter den gleichen Arbeitsbedingungen. Um auch die gleichen Entscheidungskriterien bei der Fluoreszenzbeurteilung zu gewährleisten, wurde der zweite Untersucher gewissenhaft angeleitet und durch vergleichende Probezählungen kontrolliert.

Die oben schon erwähnte Blindauswertung spielte ebenfalls eine wichtige Rolle. Dadurch war gewährleistet, daß der Untersucher nicht wußte, ob er den Serumansatz oder die Konjugatkontrolle auswertete. Die Identifikation erfolgte erst nach Bearbeitung sämtlicher Proben eines Arbeitstages.

Ausgezählt wurden die Zellen, indem wir das Gesichtsfeld meanderförmig mit dem Schlitten abfuhren. Das garantierte, daß keine Zelle zweimal gezählt wurde. Gebiete mit Zellüberlagerungen und Zellen am Rande des Deckglases wurden ausgenommen, da hier durch Quetschungen oder Austrocknung eine Veränderung der Immunfluoreszenz nicht ausgeschlossen werden konnte. Insgesamt wurden je Präparat immer 200 Zellen ausgezählt, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen. Das Zählen der Zellen wurde durch zwei verschiedene Handzähler vereinfacht. Mit der rechten Hand zählten wir die gesamten Zellen, mit der linken Hand die Zellen, die fluoreszierten.

Die photographische Dokumentation der Ergebnisse erfolgte durch die in das Mikroskop integrierte, vollautomatische 35mm Kamera. Dabei wurde ein hochempfindlicher Diafilm verwendet, bei dem die Belichtungszeit meist über der automatisch eingestellten, lag. Trotz der Empfindlichkeit des Filmes waren die Aufnahmen zu Beginn nicht genug aussagekräftig. Das lösten wir mit der forcierten Filmentwicklung. Dabei wird der Film eine Blende empfindlicher entwickelt als eigentlich vorgesehen. So konnten wir nach einigen Versuchen befriedigende Aufnahmen der fluoreszierenden Zellen machen.

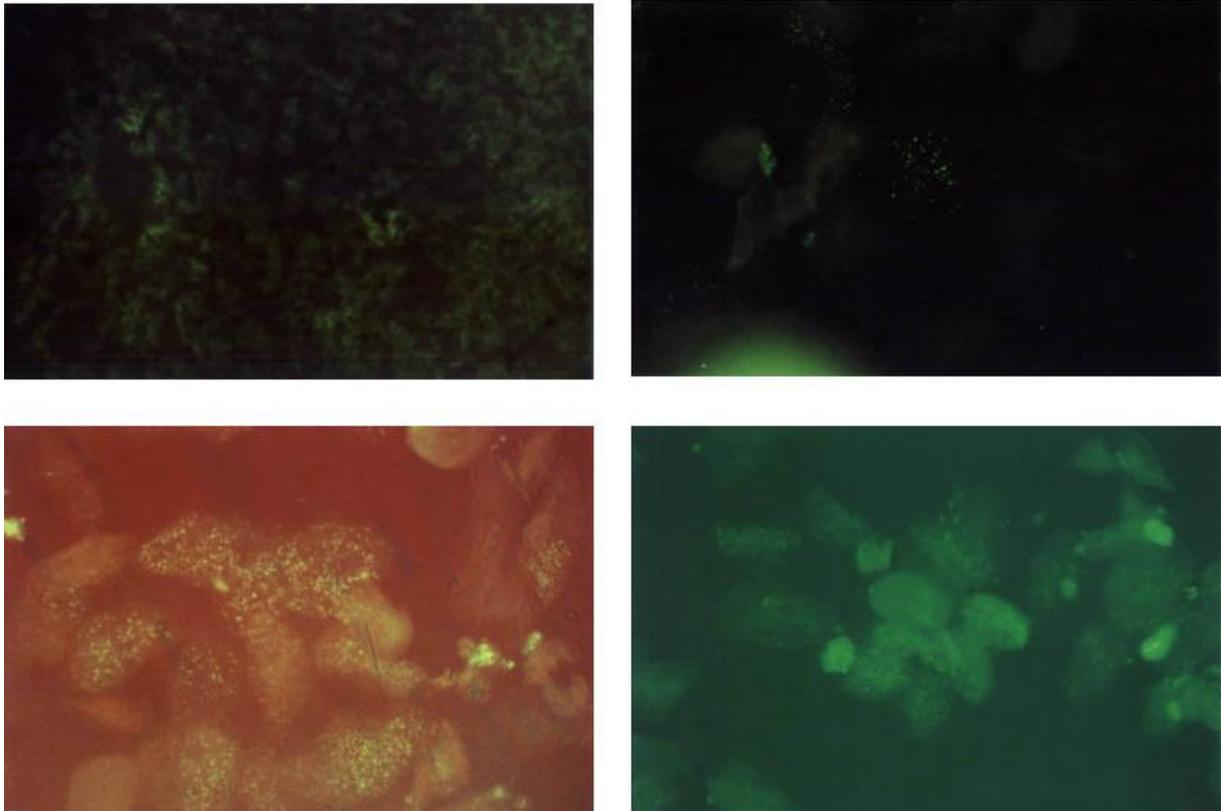


Abbildung 3: Verschiedene Epithelzellen/Verbände der Mundschleimhaut mit typischer Fluoreszenz nach Markierung (Auflicht, 320fache Vergrößerung), rechts oben negative Kontrolle.

3. Statistische Auswertung

Um eine korrekte und genaue Auswertung der vorhandenen Daten zu erreichen, erfolgte die Aufbereitung mittels PC unter Zuhilfenahme der Programme Excel und SPSS 9.0, sowie fachlicher Unterstützung durch Mitarbeiter der Abteilung für Statistik und Epidemiologie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München. Aufgrund der teilweise geringen Zahl von Stichproben scheidet eine Anwendung von parametrischen Verfahren aus (159, S.7). Folglich wurde die Auswertung der Daten durch nicht parametrische Testverfahren vorgenommen, wobei die erfassten Daten zwar dem Maßniveau einer Intervallskala entsprechen müssen, jedoch die Stichproben aus unterschiedlichen Beobachtungspopulationen stammen können (159,S.7). Zum besseren Verständnis der Untersuchungsergebnisse werden die verwendeten statistischen Tests kurz erörtert.

Wilcoxon-Test

Der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen diente dem Vergleich zweier abhängiger Stichproben, das heißt von Stichproben desselben Meßwertträgers, wobei Differenzen zusammengehöriger Meßwertpaare nicht aus einer normal verteilten Grundgesamtheit stammen müssen (159,S.7). In unseren Untersuchungen ließ sich der Test auf die prozentuale Fluoreszenzratendifferenz der abhängigen Stichproben „Serumansatz“ und „Konjugatkontrolle“ desselben Meßwertträgers anwenden. Dabei galt als Nullhypothese H_0 , was einem postulierten Effekt mit dem Betrag Null entspricht, d.h. daß der beobachtete Effekt in der Grundgesamtheit nicht existiert. Das Ergebnis der Stichprobe ist auf die zufallsbedingte Streuung der Meßwerte zurückzuführen (56, S.65).

Die Nullhypothese H_0 lautete folglich:

Fluoreszenzraten der Serumansätze = Fluoreszenzraten der Konjugatkontrollen

Der Wilcoxon-Test zeigte nun diejenige Wahrscheinlichkeit auf, mit der die richtige Nullhypothese H_0 fälschlicherweise zurückgewiesen wird, also die Irrtumswahrscheinlichkeit p (159,S.7). Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit p von kleiner 0,05 konnte man von einem einfach signifikanten Unterschied zwischen Fluoreszenzraten der Serumansätze und der Konjugatkontrollen ausgehen, dabei konnte aber keine Entscheidung getroffen werden, ob es sich um eine Erhöhung oder Erniedrigung der Fluoreszenzraten handelte, da es sich bei allen Tests um zweiseitige handelte. Um das zu entscheiden mußte man die Mediane per Hand vergleichen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit p von kleiner 0,01 erlaubte sogar die Annahme eines hochsignifikanten Unterschiedes der Fluoreszenzraten, da nur bei einem Prozent der ausgewerteten Proben irrtümlich die Nullhypothese verworfen worden war.

Mann-Whitney-Test

„Der U-Test von Mann und Whitney dient dem Vergleich zweier unabhängiger Stichproben, die nicht die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllen müssen“ (159,S.7). Um die Fluoreszenzraten (jeweils berechnet aus der Differenz zwischen Serumansätzen und Konjugatkontrollen) von Diagnosegruppen und Gesunden vergleichen zu können, wandten wir den U-Test an, da die Meßwerte von voneinander unabhängigen Meßwertträgern stammten. Anhand des Testes sollte beurteilt werden, ob eine Abhängigkeit der Fluoreszenzraten der Diagnosegruppen und der Gesunden nachzuweisen war.

So lautete die Nullhypothese hier H_0 :

Fluoreszenzraten der Diagnosegruppen = Fluoreszenzraten der Gesunden

Auch hier errechnete sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit p . War sie kleiner als 0,05 sprach man von einem einfach signifikanten Ergebnis, war sie kleiner als 0,01 konnte man sogar von einem hochsignifikanten Ergebnis sprechen. Auch dieser Test war zweiseitig.

Spezifität und Sensivität

Um Aussagen über die Eignung der Immunfluoreszenztests als diagnostische Methode machen zu können, untersuchten wir die Spezifität und Sensitivität, sowie den prädiktiven Wert des positiven und negativen Testes der Immunfluoreszenzmethode in Abhängigkeit von der Diagnose.

Die Sensitivität eines diagnostischen Tests gibt Aufschluß über die Eignung eines Tests, Personen mit der fraglichen Krankheit so vollständig wie möglich herauszufiltern, wohingegen die Spezifität das Maß der Eignung eines Tests bezeichnet, ausschließlich Personen mit einer fraglichen Krankheit zu erfassen. Der prädiktive Wert des positiven Tests wird definiert als die Wahrscheinlichkeit μ_{pos} , mit der eine Krankheit tatsächlich vorliegt, wenn das Testergebnis positiv ausfällt. Der prädiktive Wert des negativen Tests ist analog dazu die Wahrscheinlichkeit μ_{neg} mit der bei einem negativ ausgefallenen Test die Krankheit nicht vorliegt.

Sowohl „Test positiv/negativ“ als auch „krank/nicht krank“ sind binäre Aussagen. Daher erhält man eine Ergebnismatrix in Form einer Vierfeldertafel. In unserer Testreihe wurde zur Normierung der Ergebnisse die Fluoreszenzerhöhung Δf , die sich als geeigneter Parameter zeigte, herangezogen.

4. ERGEBNISSE

Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenz bei Patienten und Gesunden

4.1.1. Gesunde Vergleichsgruppe

Aus dem Verhältnis der fluoreszierenden Epithelzellen zu der Gesamtepithelzellzahl ($n=200$), in einem Präperat ergab sich die Fluoreszenzrate in Prozent. In der folgenden Tabelle sind die Mediane M , das Minimum und das Maximum, sowie die 25% (Q_1)- und 75% (Q_3)- Perzentile der ermittelten Fluoreszenzraten für den Nachweis von IgD in Serumansätzen und Konjugatkontrollen aufgeführt.

Tabelle 3: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der gesunden Vergleichsgruppe (n=71)

	Serumansatz	Konjugatkontrolle
Median M	0,0	0,0
25%-Perzentile Q1	0,0	0,0
75%-Perzentile Q3	4,7	0,0
Minimum	0,0	0,0
Maximum	15,0	7,0

Wie oben aufgeführt errechneten wir zur Normierung der Testergebnisse eine Differenz Δf wie folgt:

$$\Delta f = \text{Fluoreszenzrate des Serumansatzes} - \text{Fluoreszenzrate der Konjugatkontrolle}$$

Um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen wählten wir eine große Anzahl an gesunden Personen. Sämtliche Diagnosegruppen wurden anschließend mit der gesunden Gruppe verglichen, um zu zeigen, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Fluoreszenzraten besteht. Für die Zahlen IgD-positiver Epithelzellen (Fluoreszenzraten in Prozent) in den Serumansätzen der Gesunden (n=72) ergab sich ein Median M=0,00, Q1=0,00 und Q3=4,70. In den Konjugatansätzen betrug der Median ebenfalls 0,00, Q1 und Q3 zeigten denselben Betrag 0,00. Für Δf erhielten wir den Medianwert = 0,00 (Q1 = 0,00 und Q3 = 4,70). Da $p < 0,01$ war, zeigten statistischen Vergleich Serumansätze und Konjugatkontrollen folglich einen hoch signifikanten Unterschied.

4.1.2. Morbus Crohn

Die Immunfluoreszenztests zeigten für Epithelzellen der Morbus Crohn-Patienten einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen Serumansätzen (M = 14,30; Q1 = 10,50; Q3 = 20,00) und Konjugatkontrollen (M = 0,00; Q1 = 0,00; Q3 = 0,00). Δf wies einen Median M = 14,30, Q1 = 10,50 und Q3 = 19,00 auf. Wir verglichen die Zahl der IgD-positiven Epithelzellen der gesunden Gruppe mit der von Morbus Crohn-Patienten (n = 20). Um einen Unterschied in der spezifischen Reaktion von IgD-Autoantikörpern im Serum mit normalen und erkrankten Epithelien feststellen zu können, wurde die absolute Fluoreszenzerhöhung oder Erniedrigung Δf der Crohn-Patienten in Vergleich zu Δf der gesunden Gruppe gesetzt. Hierbei gelang es uns einen hoch signifikanten ($p < 0,01$) Unterschied der Fluoreszenzraten nachzuweisen.

Tabelle 4: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Morbus Crohn-Patienten (n=19)

	Serumansatz	Konjugatkontrolle
Median M	14,3	0,0
25%-Perzentile Q1	10,5	0,0
75%-Perzentile Q3	20,0	19,0
Minimum	0,0	0,0
Maximum	44,0	5,8

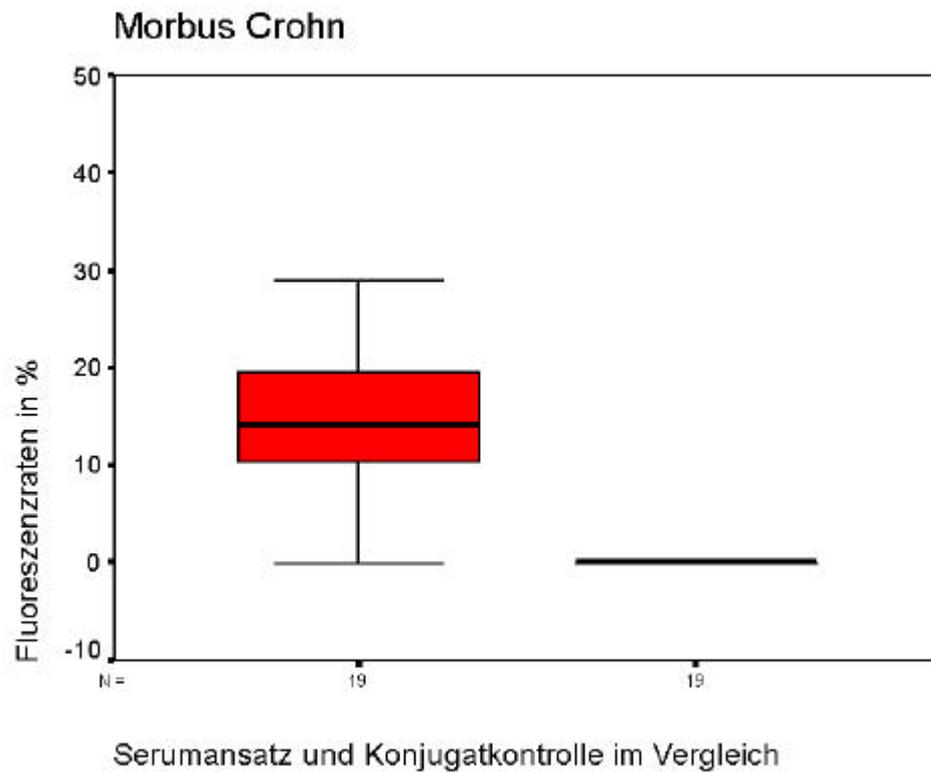


Abbildung 4: Morbus Crohn: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots ($p < 0,01$).

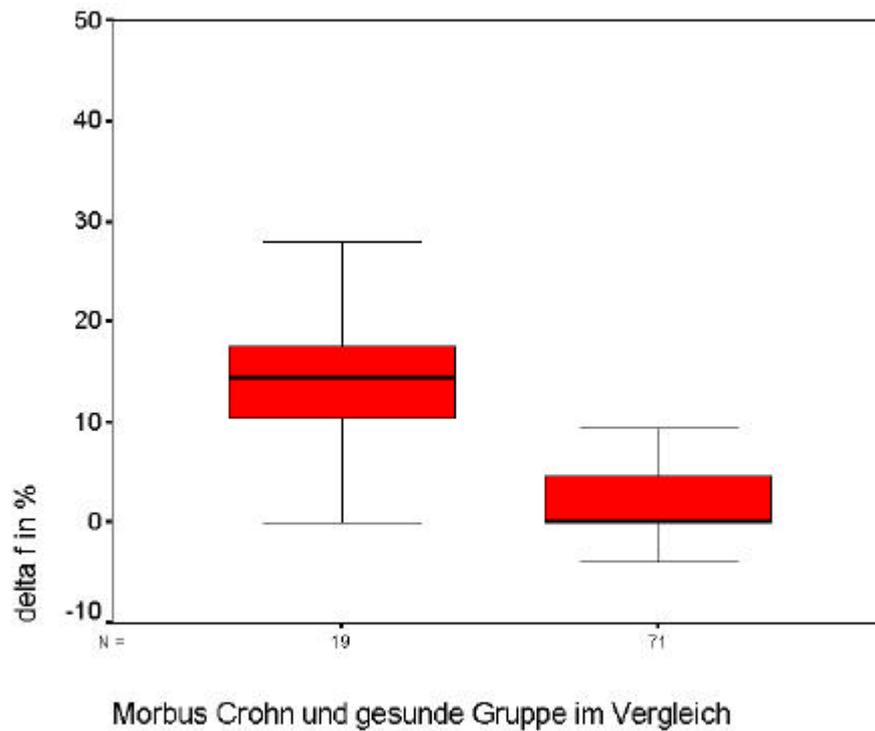


Abbildung 5: Darstellung des Δf (in %) von Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots ($p < 0,01$).

4.1.3. Colitis ulcerosa

Die Zahl der IgD-positiven Epithelzellen lag bei den Serumansätzen der Colitis ulcerosa-Patienten deutlich höher ($M = 5,70$; $Q1 = 0,00$; $Q3 = 8,00$) als bei den Konjugatkontrollen ($M = 0,00$; $Q1 = 0,00$; $Q3 = 0,00$). Dadurch ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den beiden Ansätzen. Als Median für Δf errechnete sich $M = 5,70$ ($Q1 = 0,00$; $Q3 = 8,00$). Vergleich man nun den Nachweis IgD-positiver Epithelzellen in der gesunden Gruppe mit den der Colitis ulcerosa-Patienten so bestand ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den Fluoreszenzraten.

Tabelle 5: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Colitis ulcerosa-Patienten (n=11)

	Serumansatz	Konjugatkontrolle
Median M	14,3	0,0
25%-Perzentile Q1	10,5	0,0
75%-Perzentile Q3	20,0	0,0
Minimum	0,0	0,0
Maximum	44,0	5,8

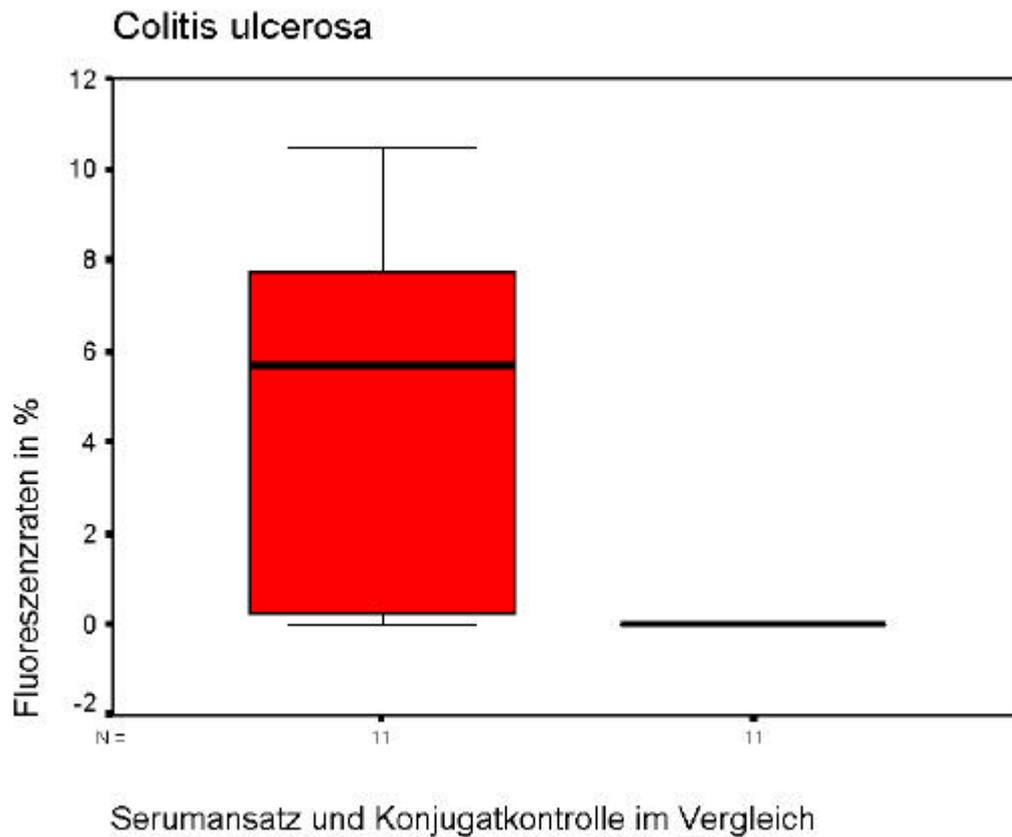


Abbildung 6: Colitis ulcerosa: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots ($p < 0,01$).

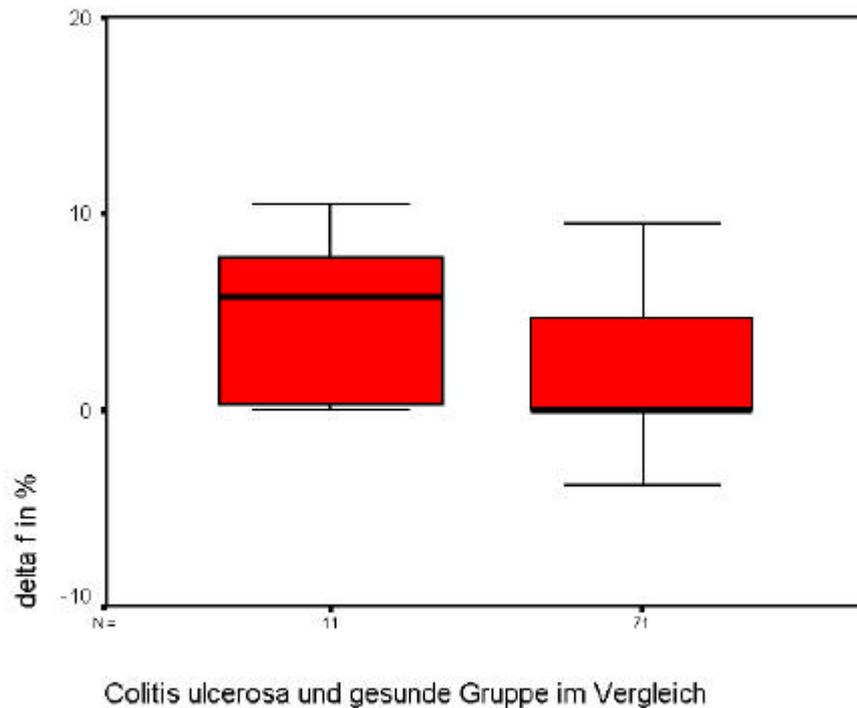


Abbildung 7: Darstellung des Δf (in %) von Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots ($p < 0,05$).

4.1.4. Rheumatoide Arthritis

Die Auswertung der Fluoreszenzraten der Epithelien der Rheumatoide Arthritis-Patienten ergab nur einen geringen Unterschied zwischen Serumansätzen und Konjugatkontrollen. Der Median belief sich bei beiden auf 0,00, die 25%-Perzentile ebenfalls auf 0,00. Nur bei der 75%-Perzentile errechnete sich beim Serumansatz ein Wert von 7,23, während die Konjugatkontrolle wieder einen Wert von 0,00 aufwies. Für die Differenz der Fluoreszenzraten Δf errechneten sich ein Median $M = 0,00$, $Q1 = 0,00$ und $Q3 = 7,23$. Es ließen sich mehr IgD-positive Epithelzellen in den Serumansätzen als in den Konjugatkontrollen nachweisen, was zu einem hoch signifikanten ($p < 0,01$) Ergebnis führte. Vergleich man nun die Fluoreszenzratendifferenzen der gesunde Gruppe mit den der Rheumatoide Arthritis-Patienten, konnte keine Signifikanz ($p > 0,05$) festgestellt werden.

Tabelle 6: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Patienten mit Rheumatoider Arthritis (n=36)

	Serumansatz	Konjugatkontrolle
Median M	0,0	0,0
25%-Perzentile Q1	0,0	0,0
75%-Perzentile Q3	7,2	0,0
Minimum	0,0	0,0
Maximum	31,0	1,0

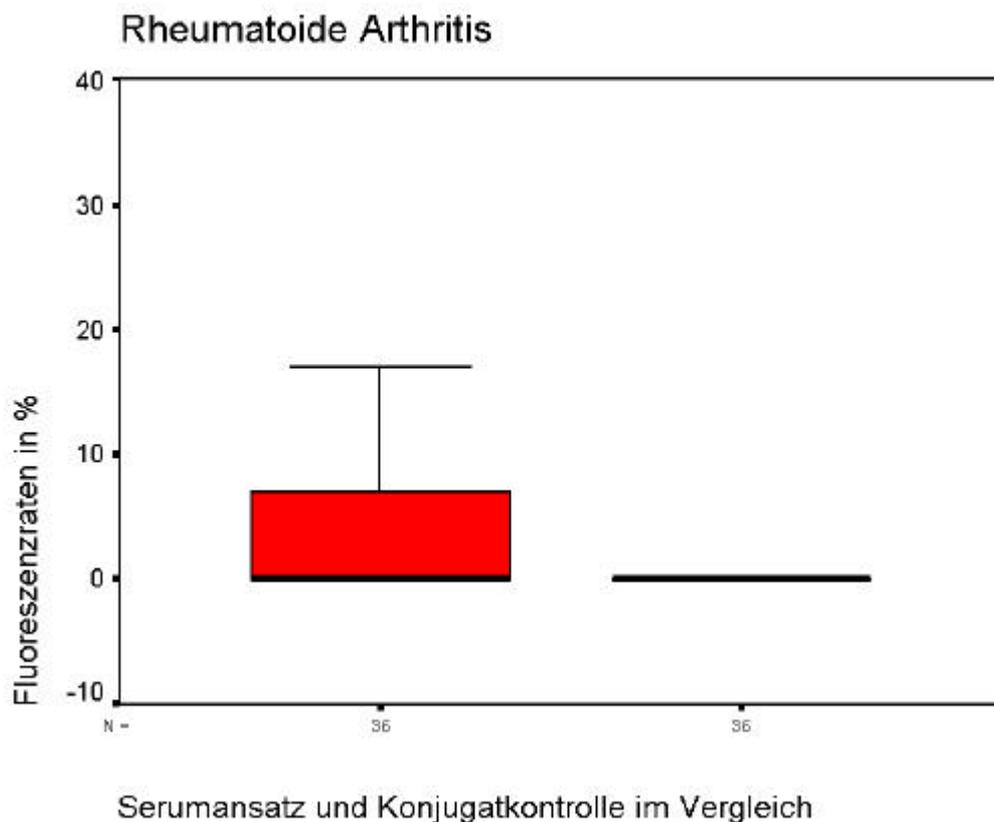


Abbildung 8: Rheumatoide Arthritis: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots ($p < 0,01$).

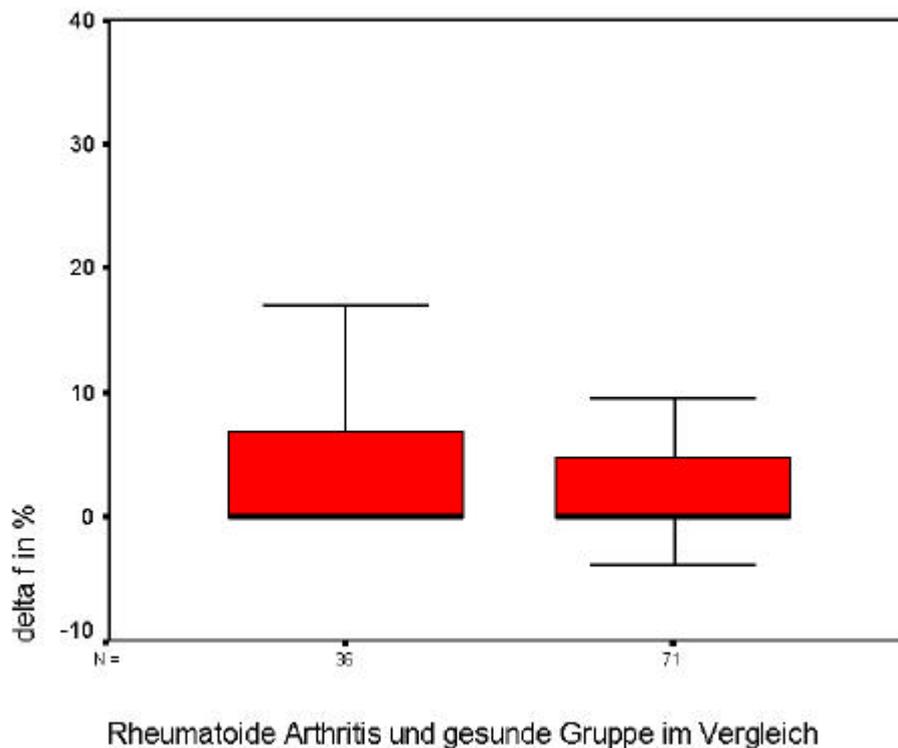


Abbildung 9: Darstellung des Δf (in %) von Rheumatoide Arthritis-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots ($p > 0,05$).

4.1.5. Systemischer Lupus erythematoses

Die Immunfluoreszenztests zeigten für Epithelzellen der Lupus erythematoses-Patienten einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen Serumansätzen ($M = 10,50$; $Q1 = 6,00$; $Q3 = 17,50$) und Konjugatkontrollen ($M = 0,00$; $Q1 = 0,00$; $Q3 = 0,00$). Δf wies einen Median $M = 10,50$, $Q1 = 6,00$ und $Q3 = 16,75$ auf. Wir verglichen die Zahl der IgD-positiven Epithelzellen der gesunden Gruppe und der Lupus erythematoses-Patienten ($n = 9$), um einen Unterschied der spezifischen Reaktion von IgD-Autoantikörpern im Serum mit normalen und erkrankten Epithelien feststellen zu können, indem die absolute Fluoreszenzerhöhung oder Erniedrigung Δf der Lupus erythematoses-Patienten in Vergleich zu Δf der gesunden Gruppe gesetzt wurde. Hierbei gelang es uns einen hoch signifikanten ($p < 0,01$) Unterschied der Fluoreszenzraten nachzuweisen.

Tabelle 7: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (n=9)

	Serumansatz	Konjugatkontrolle
Median M	10,5	0,0
25%-Perzentile Q1	6,0	0,0
75%-Perzentile Q3	17,5	0,0
Minimum	2,5	0,0
Maximum	28,0	1,5

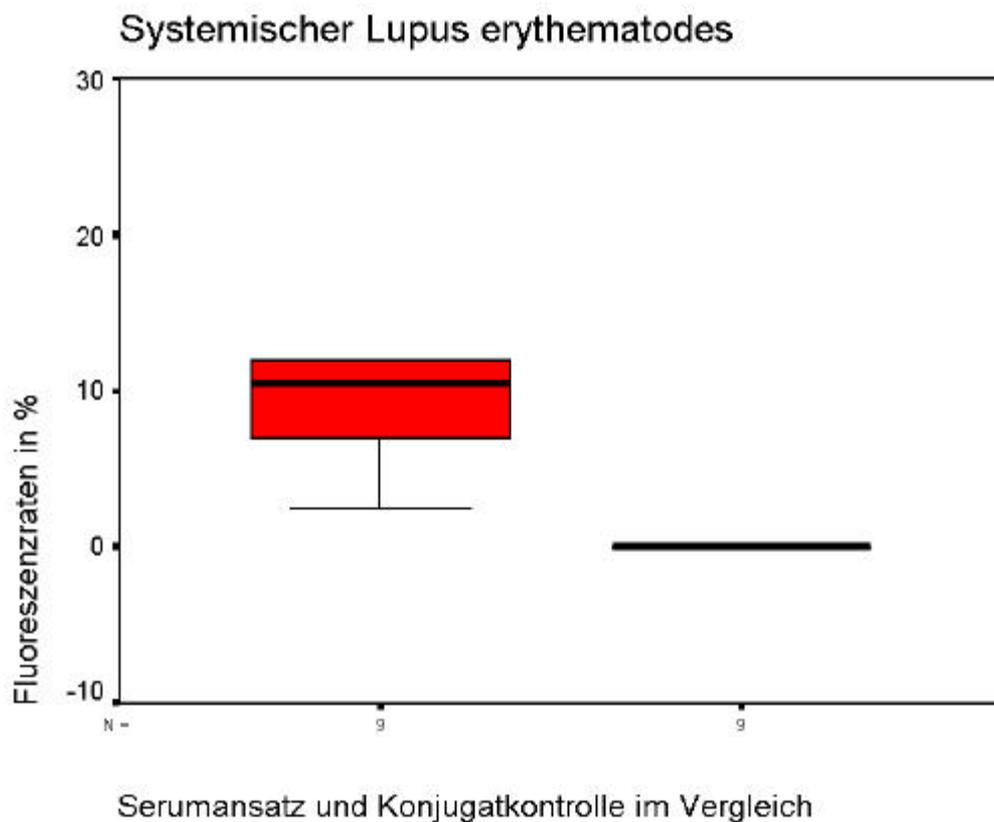


Abbildung 10: Systemischer Lupus erythematoses: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots ($p < 0,01$).

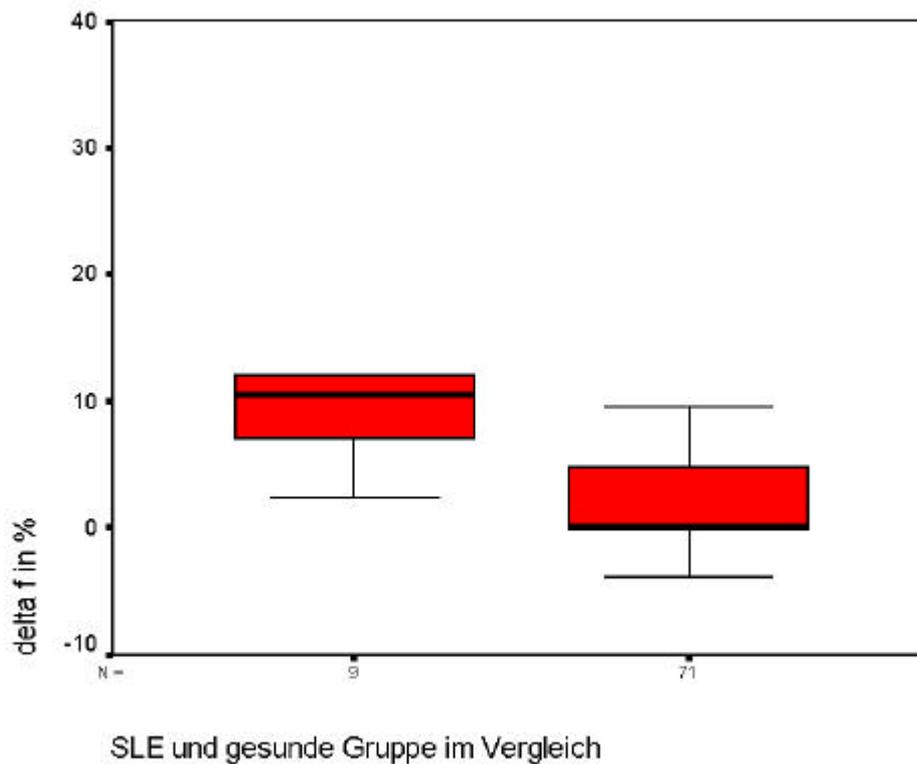


Abbildung 11: Darstellung des Δf (in %) von Systemischer Lupus erythematoses-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots ($p < 0,01$).

4.1.6. Glomerulonephritis

Die Auswertung der Fluoreszenzraten der Epithelien der Glomerulonephritis-Patienten ergab keinen Unterschied zwischen den Serumansätzen ($M = 0,00$; $Q1 = 0,00$; $Q3 = 0,00$) und den Konjugatkontrollen ($M = 0,00$; $Q1 = 0,00$; $Q3 = 0,00$). Für die Differenz der Fluoreszenzraten Δf errechnete sich damit ein Median von ebenfalls 0,00. Die 25%- und 75%-Perzentile kamen auf denselben Wert von 0,00. Somit errechnete sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p > 0,05$. Die Fluoreszenzraten des Serumansatzes und der Konjugatkontrolle waren folglich nicht signifikant verschieden. Zwischen den IgD-positiven Epithelzellen der gesunden Gruppe und den der Glomerulonephritis-Patienten konnte ebenfalls keine Signifikanz ($p > 0,05$) festgestellt werden.

Tabelle 8: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Glomerulonephritis-Patienten (n=7)

	Serumansatz	Konjugatkontrolle
Median M	0,0	0,0
25%-Perzentile Q1	0,0	0,0
75%-Perzentile Q3	0,0	0,0
Minimum	0,0	0,0
Maximum	14,5	0,0

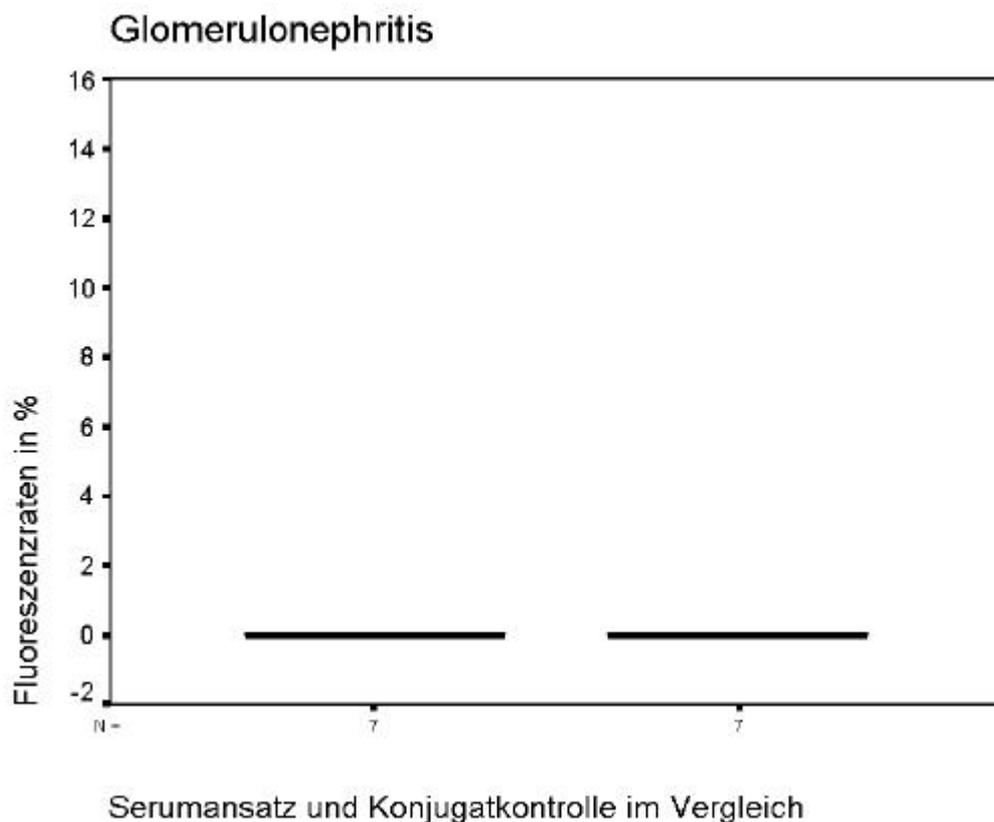


Abbildung 12: Glomerulonephritis: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots ($p > 0,05$).

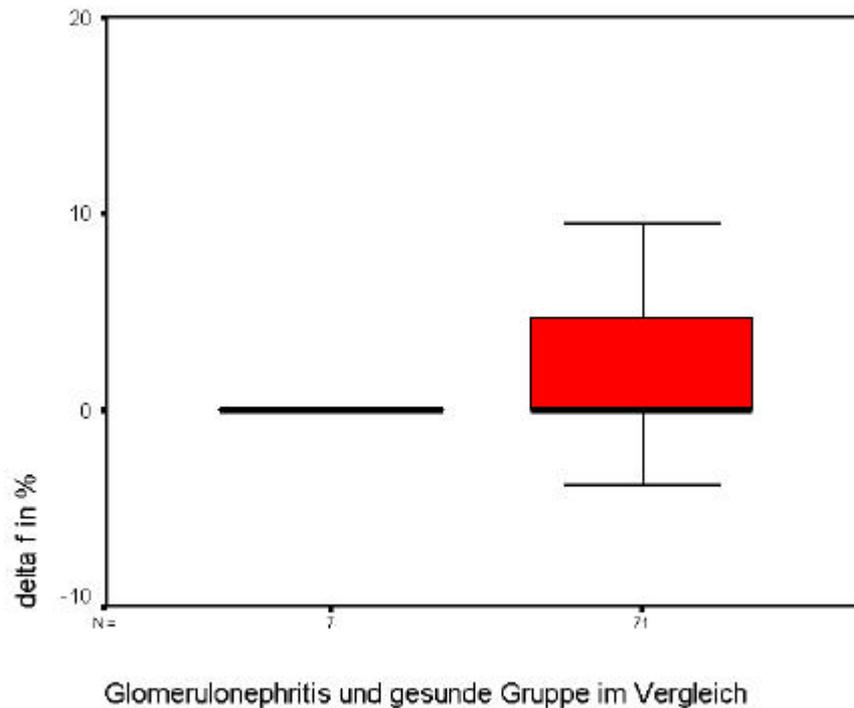


Abbildung 13: Darstellung des Δf (in %) von Glomerulonephritis-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots ($p > 0,05$).

4.1.7. Chronische Hepatitis C

Die Immunfluoreszenztests zeigten für Epithelzellen der Hepatitis-C-Patienten einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen Serumansätzen ($M = 9,70$; $Q1 = 7,13$; $Q3 = 11,93$) und Konjugatkontrollen ($M = 0,00$; $Q1 = 0,00$; $Q3 = 0,00$). Δf wies einen Median $M = 9,40$, $Q1 = 7,13$ und $Q3 = 11,93$ auf. Wir verglichen die Zahl der IgD-positiven Epithelzellen der gesunden Gruppe und den Hepatitis-C-Patienten ($n = 24$), um einen Unterschied der spezifischen Reaktion von IgD-Autoantikörpern im Serum mit normalen und Epithelien von erkrankten Probanden feststellen zu können, indem die absolute Fluoreszenzerhöhung oder Erniedrigung Δf der Hepatitis-C-Patienten in Vergleich zu Δf der gesunden Gruppe gesetzt wurde. Hierbei gelang es uns einen hoch signifikanten ($p < 0,01$) Unterschied der Fluoreszenzraten nachzuweisen.

Tabelle 9: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Patienten mit chronischer Hepatitis C (n=24)

	Serumansatz	Konjugatkontrolle
Median M	9,7	0,0
25%-Perzentile Q1	7,1	0,0
75%-Perzentile Q3	11,9	0,0
Minimum	0,0	0,0
Maximum	26,5	2,5

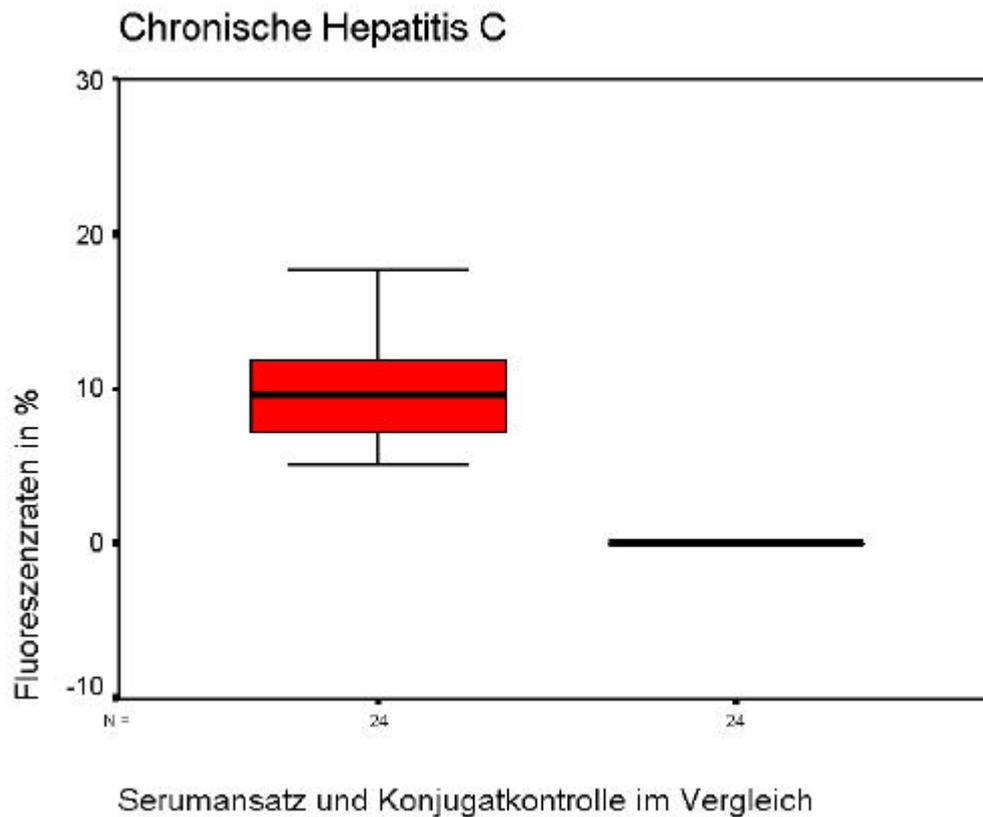


Abbildung 14: Chronische Hepatitis C: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots ($p < 0,01$).

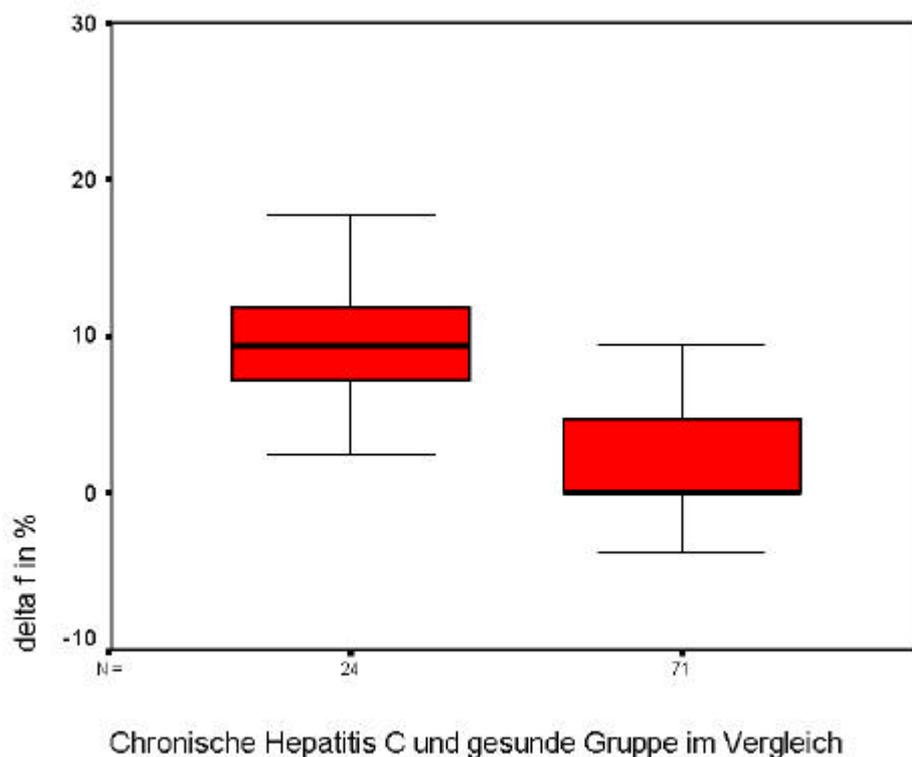


Abbildung 15: Darstellung des Df (in %) von Patienten mit Chronischer Hepatitis C im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots ($p < 0,01$).

4.1.8. Systemische bakterielle Infektionen

Auch die Differenzen der Fluoreszenzraten der Patienten mit systemischen bakteriellen Infektionen wurden mit den Raten der gesunden Gruppe verglichen, dabei zeigte sich kein signifikantes ($p > 0,05$) Ergebnis. Zwischen den Serumansätzen und den Konjugatkontrollen, fanden sich hoch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$): Serumansatz: Median = 0,00, 25%-Perzentile = 0,00, 75%-Perzentile = 9,95. Konjugatkontrolle: Median = 0,00, 25%-Perzentile = 0,00, 75%-Perzentile = 0,00. Bei dieser Gruppe untersuchten wir 21 Personen.

Tabelle 10: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Patienten mit bakteriellen Infektionen. (n=21)

	Serumansatz	Konjugatkontrolle
Median M	0,0	0,0
25%-Perzentile Q1	0,0	0,0
75%-Perzentile Q3	9,9	0,0
Minimum	0,0	0,0
Maximum	30,0	15,0

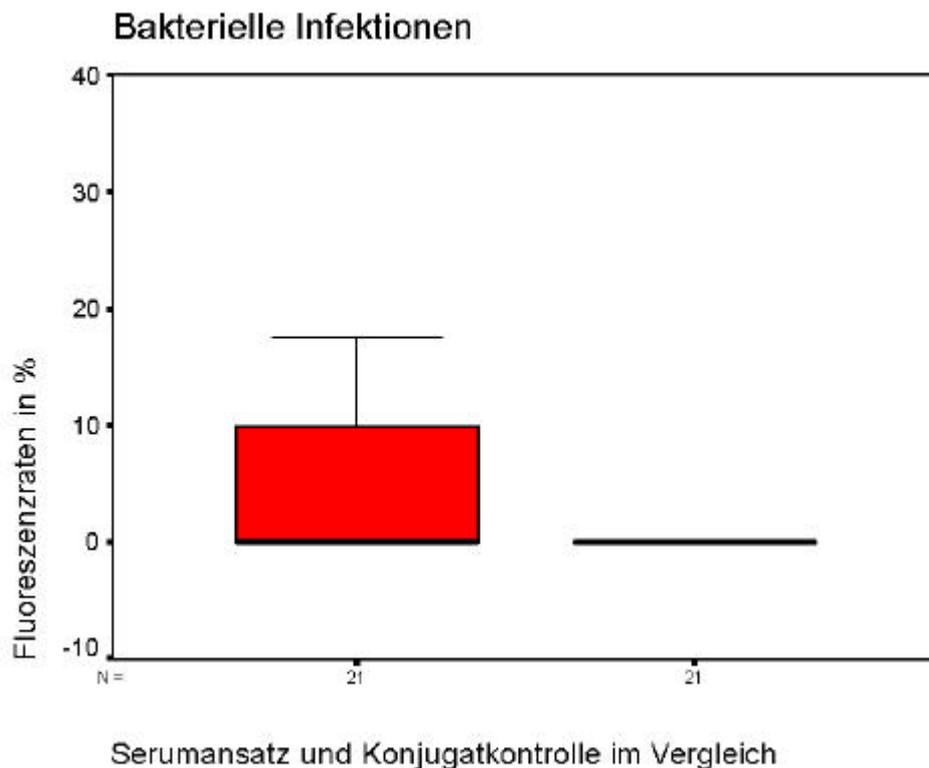


Abbildung 16: Systemische bakterielle Infektionen: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots ($p < 0,01$).

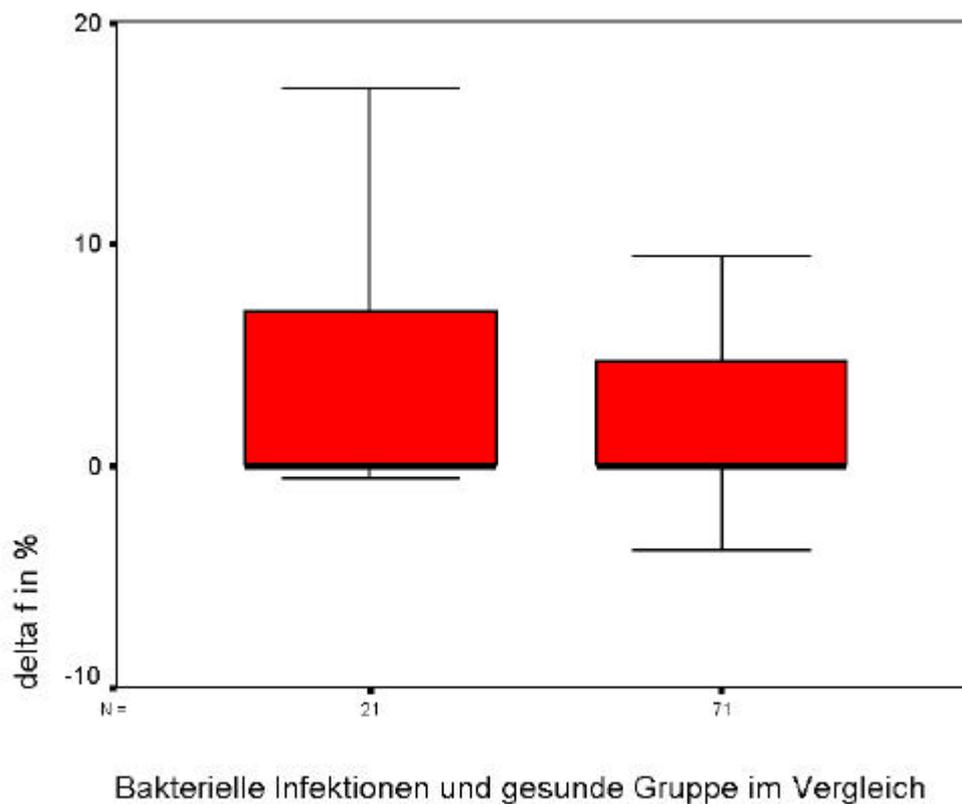


Abbildung 17: Darstellung des Δf (in %) von Patienten mit systemischen bakteriellen Infektionen im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots ($p > 0,05$)

4.1.9. Sensitivität, Spezifität, prädiktive Werte der Immunfluoreszenz-untersuchungen

Aufgrund der signifikanten Ergebnisse des Wilcoxon und Mann-Whitney- Tests für einzelne Diagnosegruppen, waren weiterführende statistische Untersuchungen, die eine Aussage über die Eignung des Immunfluoreszenztests als diagnostische Methode zulassen, angezeigt. Wir prüften die Spezifität, Sensitivität, sowie den prädiktiven Wert des positiven μ_{pos} und negativen μ_{neg} Tests. Die Abbildung zeigt eine Zusammenstellung der errechneten Spezifität, Sensitivität, μ_{pos} und μ_{neg} für die einzelnen signifikanten Diagnosegruppen.

Tabelle 11: Sensitivität, Spezifität und prädiktiver Wert des positiven und negativen Ergebnisses (\hat{i}_{pos} und \hat{i}_{neg}) des indirekten Immunfluoreszenztests für die Diagnosegruppen Morbus Crohn, Systemischer Lupus erythematodes und chronische Hepatitis C.

Diagnose	Sensitivität	Spezifität	\hat{i}_{pos}	\hat{i}_{neg}
----------	--------------	------------	------------------------	------------------------

Morbus Crohn	89%	79%	0,064%	99,9%
Colitis ulcerosa	72%	79%	0,188%	99,9%
Systemischer Lupus erythematodes	100%	79%	0,077%	100%
Chronische Hepatitis C	87,5%	79%	4,76%	99,9%

4.2. Colocarzinom-Zelllinie SW 480

Da alle Proben der Testreihe mit der Colocarzinom-Zelllinie SW 480 negativ waren und den Betrag 0 aufwiesen, errechneten sich alle Werte der deskriptiven Statistik, Median, 25%-Perzentile, 75%-Perzentile, auf denselben Wert. Ein Vergleich mit der gesunden Gruppe konnte nicht gezogen werden, da es sich bei der Zelllinie um eine Zellkultur und nicht um Patienten handelte.

4.3. Vergleich mit der bakteriellen Vergleichsgruppe

Interessant war auch der Vergleich der verschiedenen Diagnosegruppen mit der Gruppe der bakteriellen Infektionen. Auch dabei wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben zur Prüfung des Signifikanzniveaus herangezogen. Hier legten wir die Nullhypothese auf diese Weise fest, H_0 :

Df der verschiedenen Diagnosegruppen = Df der Gruppe bakterielle Infektionen

Beim Vergleich von Morbus-Crohn-Patienten mit der Gruppe der bakteriellen Infektionen ergab sich ein $p < 0,01$, folglich bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Für die Colitis-ulcerosa-Patienten errechnete sich ein $p > 0,05$. Ein signifikanter Unterschied zur bakteriellen Vergleichsgruppe konnte so ausgeschlossen werden. Auch für die rheumatoiden Arthritis-Patienten konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, $p > 0,05$.

Ebenso verhielt es sich bei den Patienten mit Glomerulonephritis, $p > 0,05$.

Ein signifikanter Unterschied konnte außerdem noch bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes ($p < 0,01$) und bei der Hepatitis-C-Gruppe ($p < 0,01$) festgestellt werden.

4.4. Vergleich mit der viralen Vergleichsgruppe

Zog man nun die Hepatitis-C-Gruppe als virale Vergleichsgruppe heran, so ergaben sich folgende Irrtumswahrscheinlichkeiten: Die Crohn-Gruppe war signifikant verschieden ($p < 0,05$), ebenso die Colitis-ulcerosa-Gruppe ($p < 0,01$), wie auch die Rheumatoide Arthritis-Gruppe ($p < 0,01$) und die Glomerulonephritis-Gruppe ($p < 0,01$). Die einzige Gruppe die nicht signifikant verschieden war, war die Gruppe der Lupus erythematodes-Patienten ($p > 0,05$).

4.5. Korrelationen

Da es sich bei unseren Datensätzen um nicht normalverteilte Daten handelte, konnten wir nicht den parametrischen Korrelationskoeffizienten nach Pearson verwenden, sondern griffen auf den nichtparametrischen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho zurück. Ein Koeffizient von +1 bedeutet eine starke positive Korrelation, d.h. man kann von y auf x schließen und umgekehrt, ein Koeffizient von -1 eine stark negative Korrelation, d.h. ein ansteigendes y hat ein abfallendes x zur Folge. Ein Koeffizient = 0 bedeutet, es ist keine Korrelation vorhanden, d.h. daß es nicht möglich ist x aus y zu berechnen oder umgekehrt. Der Betrag des Koeffizienten gibt dabei an, wie eng die Beziehung zwischen x und y ist (56,S.65-73).

Wichtig für uns war aufzuzeigen, ob eine Beziehung unserer Fluoreszenzraten, respektive Δf , mit verschiedenen Aktivitätsindices, Entzündungsparametern (z.B. CRP) und anderen Laborwerten (z.B. GOT/GPT) existierte. Auf eine Darstellung der Ergebnisse als sogenannte scatterplots wurde in den meisten Fällen verzichtet, da sich keine oder nur schwach negative oder positive Korrelationen zwischen den einzelnen Variablen ergaben.

C reaktives Protein (CRP)

Bei keiner der Diagnosegruppen konnte eine Korrelation zwischen den Fluoreszenzraten und dem CRP festgestellt werden. Bei Morbus Crohn-Patienten errechnete sich ein Koeffizient von 0,042. Bei Colitis ulcerosa-Patienten von -0,410. Die Rheumatoide Arthritis-Patienten zeigten mit 0,047 ebenfalls keine Korrelation. Lupus erythematodes-Patienten hatten eine schwach negative Korrelation mit -0,414, ebenso die Glomerulonephritis-Patienten mit einem Koeffizienten von -0,428. Bei Hepatitis-C-Patienten und Patienten mit systemischen bakteriellen Infektionen verhielt es sich genauso (-0,295 und 0,168).

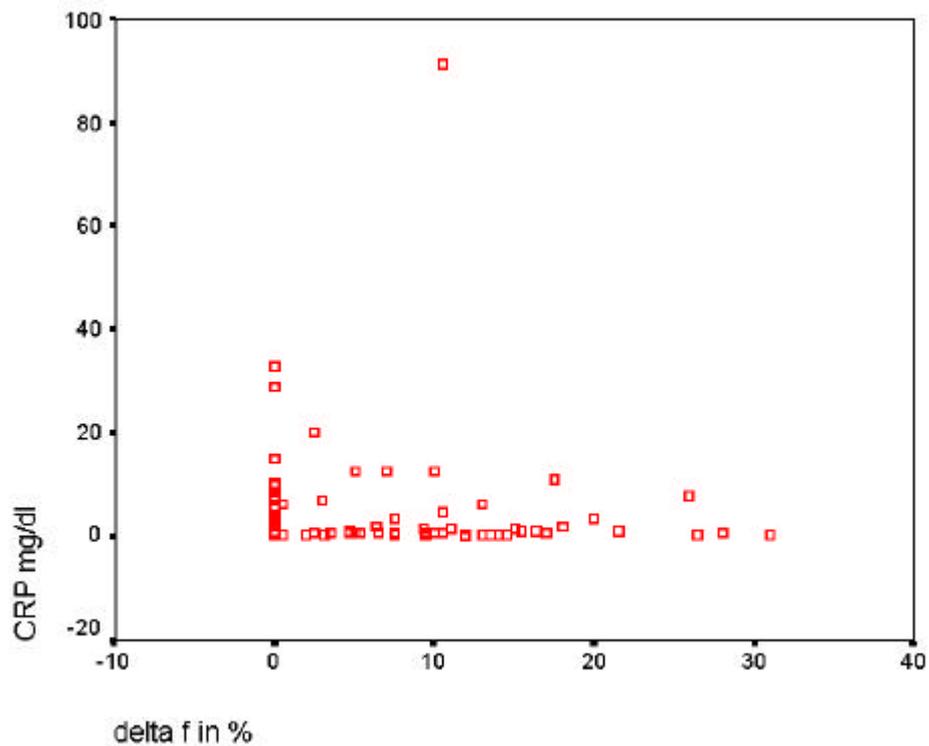


Abbildung 18: Korrelation der IgD-positiven Epithelzellen (in %) mit dem Entzündungsparameter CRP für alle Diagnosegruppen.

CDAI/Best-Index für Morbus Crohn-Patienten

Für 13 der 19 Morbus Crohn-Patienten konnte ein Aktivitätsindex nach Best erhoben werden. Hier errechnete sich ein Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho auf $-0,377$, d.h. delta f und der Aktivitätsindex zeigen eine schwach negative Beziehung.

Rachmilewitz-Index für Colitis ulcerosa-Patienten

Für 6 der 11 Colitis ulcerosa-Patienten wurde ein Aktivitätsindex nach Rachmilewitz erhoben. Hier zeigte sich eine leichte Korrelation mit einem Koeffizienten von $0,522$.

Klinische Aktivität der Rheumatoiden Arthritis

Auch hier konnte nur eine schwach negative Korrelation von $-0,196$ errechnet werden. Es wurden von allen 36 Patienten der Index für die klinische Aktivität bestimmt.

Klinische Aktivität des systemischen Lupus erythematoses

Von 8 der 9 Patienten mit SLE wurde der Aktivitätsindex berechnet. Es zeigte sich ebenfalls nur eine sehr schwach negative Korrelation von $-0,146$.

Kreatinin und Proteinurie bei Patienten mit Glomerulonephritis

Von 7 der 7 Patienten konnte ein Kreatininwert in mg/dl und die Proteinurie in mg/dl zum Zeitpunkt der Untersuchung erhoben werden, jedoch zeigte sich auch hier nur eine leicht positive Korrelation. Es konnte ein Koeffizient von $0,612$ berechnet werden. Bei der Proteinurie zeigte sich aber eine schwach negative Korrelation mit einem Koeffizienten von $-0,204$.

Transaminasen GOT und GPT bei chronischer Hepatitis C

Bei 11 der 24 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung die Transaminasen GOT in U/ml und GPT U/ml bestimmt. Für GOT ergab sich eine schwach positive Korrelation von $0,228$, bei der GPT konnte keine Korrelation festgestellt werden, der Koeffizient betrug $0,018$.

4.6. Kreuzreaktion

Ein Versuch bestand darin IgD-positives Serum von verschiedenen Patienten zusammen mit Epithelzellen einer gesunden Person zu inkubieren. Hierzu wurden 13 sicher positive Seren verwendet. Dabei ergaben sich bei den Serumansätzen ein Median $M = 10,00$, $Q1 = 0,00$ und $Q3 = 13,95$. Bei den Kontrollansätzen errechneten sich für alle Parameter ein Betrag von $0,00$, d.h. es konnte auch hier ein hoch signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zwischen Serum und Konjugat festgestellt werden. 9 der 13 Seren zeigten eine fast ähnliche Fluoreszenzrate wie bei der Inkubation mit den autologen Epithelien (Serumfluoreszenz in % von $2,5 - 20$). 4 waren komplett negativ. Da sämtliche Konjugatkontrollen negativ waren, lieferte das Δf keine weiter verwertbaren Ergebnisse.

Ein zweiter Versuch bestand darin 10 verschiedene gesunde Epithelien mit einem sicher IgD-positiven Serum zu inkubieren. Dabei errechneten sich für die Serumansätze ein Median $M = 14,25$, $Q1 = 11,63$ und $Q3 = 18,00$. Bei den Konjugatkontrollen verhielt es sich genauso wie beim vorangegangenen Versuch. Alle Parameter hatten den Betrag $0,00$, so daß von einem hoch signifikanten ($p < 0,01$) Ergebnis ausgegangen werden kann. Die Serumansätze waren alle positiv, zeigten aber z.T. geringere Fluoreszenzraten als mit dem autologen Epithel (Serumfluoreszenz in % von $5 - 20,5$).

Auch bei diesem Versuch waren sämtliche Konjugatkontrollen negativ, so daß das Δf hier ebenfalls keine neuen Informationen lieferte.

Auf eine Untersuchung der Epithelien von verschiedenen Patienten mit einem sicher IgD-negativem Serum wurde verzichtet.

5. Diskussion

5.1. Allgemeine Diskussion

5.1.1. Struktur und Funktion von IgD

5.1.1.1. Der Aufbau des IgD-Moleküls

Wie alle Immunglobulinklassen ist auch IgD aus jeweils zwei leichten und zwei schweren Ketten aufgebaut, die je eine variable und eine konstante Domäne tragen. IgD zeigt eine hohe Sensitivität gegenüber proteolytischen Enzymen (wie z.B. Protease) (53,S.4543; 80,S.6572), z.B. ist die hinge-Region (Region der Disulfidbrücken) in der Lage das Lectin Jacalin der Jackfrucht zu binden (8,S.244; 198,S.229). IgD enthält einen höheren Kohlenhydratanteil als IgG und besitzt dadurch ein höheres Molekulargewicht. Die Struktur der C δ 1- und C δ 2-Domänen (Abschnitte im Fab-Anteil) ist identisch denen der anderen Immunglobulinklassen (81,S.504).

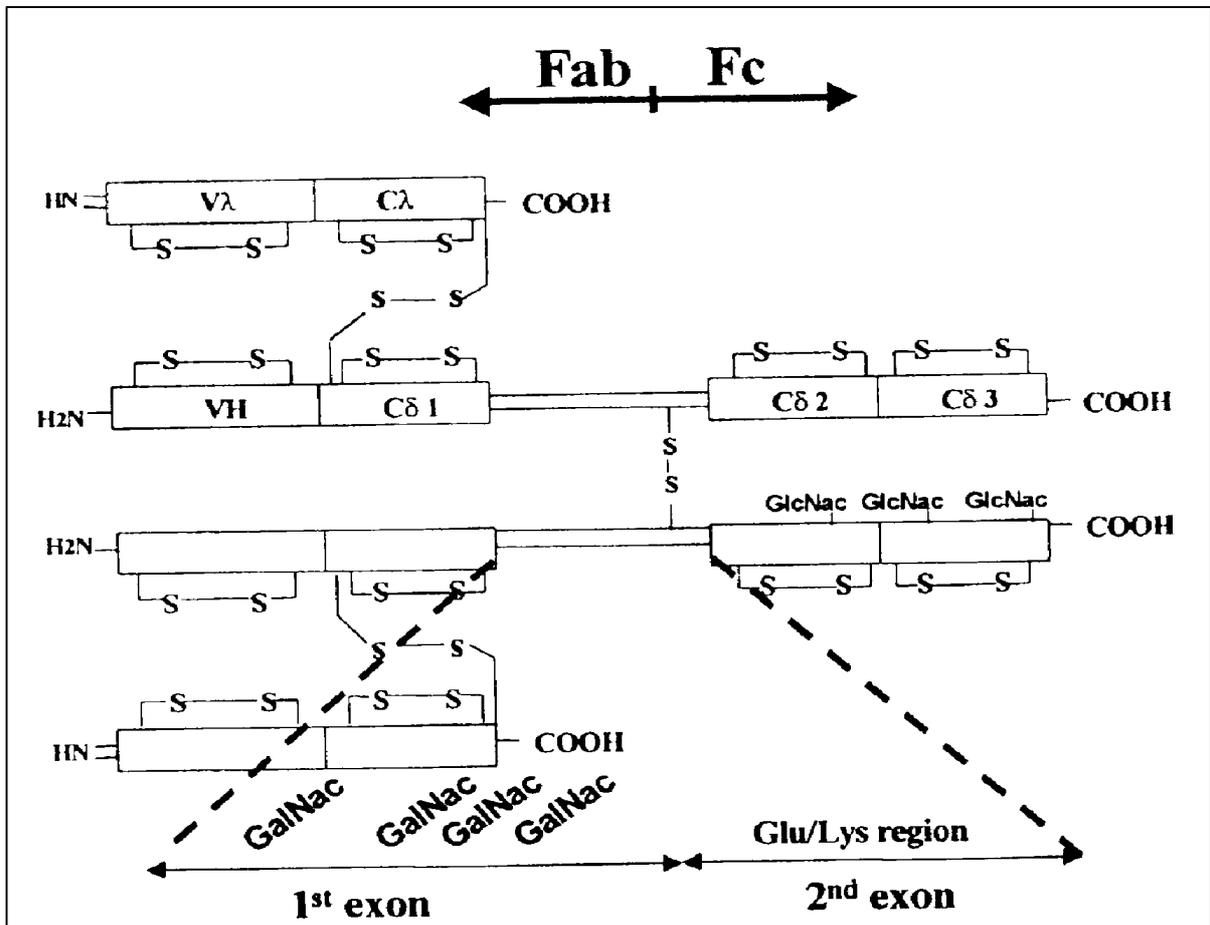


Abbildung 19: Aufbau eines IgD-Moleküls

Das membranöse IgD und das sekretorische IgD unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz am C-terminalen Ende der schweren Kette. Das C-terminale Ende ist beim secretory IgD hydrophil und beim membranösen IgD hydrophob, um eine transmembranöse und intrazytoplasmatische Bindung eingehen zu können. Der intrazytoplasmatische C-terminale Anteil ist identisch zu dem intrazytoplasmatischen Teil des membranösen IgM (132,S.871). Es gibt weiterhin noch eine kleine Form des IgDs, das an die Plasmamembran mit einem Glycosyl-Phosphatidylinositol-Anker gebunden ist. Seine Funktion ist bislang völlig unklar.

5.1.1.2. IgD Gen und Synthese

Das Gen für die Synthese des IgD-Moleküls liegt auf Chromosom 14 in Position 14q32 (93,S.13). Während der B-Zell-Ontogenese wird membranöses IgD spät exprimiert, zusammen mit membranem IgM. Beide membranösen Igs besitzen

identische leichte Ketten und eine identische V(variable)-Region. Nach der Stimulation der Immunglobuline durch ein spezifisches Antigen verlieren die Vorläufer-B-Zellen membraniges IgD und werden zu IgM-Plasmazellen. Während sich die meisten IgM-IgD-Lymphozyten zu IgM-Plasmazellen entwickeln, differenzieren sich manche IgM-IgD-Lymphozyten zu reinen IgD-Plasmazellen (128,S.191). Der Mechanismus, wie IgD gebildet wird, ist derzeit ungeklärt, ebenso wie die Differenzierung zur B-Zelle oder Plasmazelle nach Antigenstimulation (130,S.127).

Der Wandel von membranem IgD zu sekretorischem IgD wird verursacht durch eine Polyadenylierung, mit Hilfe des Faktors CstF-64 (180,S.941; 179,S.761). Unterschiedliches splicing spielt eine Rolle bei der Coexpression von membranem IgM und membranem IgD in Vorläufer-B-Zellen (94,S.353; 106,S.1481). Ein vergleichbarer Mechanismus soll auch eine Rolle bei der Synthese von membranem IgD bzw. sekretorischem IgD spielen (192,S.687).

Interessanterweise ersetzt bei knockout-Mäusen, die kein Gen für IgM besitzen, IgD das IgM, mit vergleichbarer IgD-Serumkonzentration, wie sie für IgM beschrieben sind (91,S.797).

Bemerkenswert ist auch, daß IgD nicht in B-Gedächtniszellen nachgewiesen werden kann (114,S.1105). Andererseits kann mRNA, die für membraniges IgD oder sekretorisches IgD codiert, in sämtlichen Stadien der B-Zell-Entwicklung bis zur IgM-Plasmazelle gefunden werden (66,S.3314).

Da es keine IgD-B-Gedächtniszelle gibt, stellt sich die Frage, wann und wodurch die Produktion von IgD ausgelöst wird? Die Datenlage hierzu ist nicht eindeutig. Es gibt Studien, die eine Stimulation der Produktion durch das CD40-Membranmerkmal und verschiedene Interleukine (IL4, IL10) protokollieren (7,S.1169).

Andere Studien beschrieben eine TH2-Cytokin-Abhängigkeit bei Mononukleosezellen. Diese Zellen zeigten eine hohe spontane IgD-Sekretion, die sogar noch anstieg, wenn man sie mit anti-CD40-Antikörpern und verschiedenen Interleukinen inkubierte. Interleukin2 und Interferon γ inhibierten die peripheren Mononukleosezellen, aber nicht die reinen B-Zellen (79,S.1819).

5.1.1.3. Die Funktionen von IgD

Membraniges IgD

IgD ist die Hauptkomponente des B-Zell-Rezeptors (BCR) des reifen B-Lymphozyten. Zu dieser membranösen Form des IgD gibt es zahlreiche Studien, bei denen IgD eine wichtige Rolle bei der Ontogenese und Antikörperantwort spielt (28,S.107; 29,S.168).

Auch eine Transfektion von membranem IgD und membranem IgM in nicht lymphoide Zellen bewirkt eine ähnliche Antikörperantwort (26,S.991; 25,S.1980). Dennoch haben IgD-knockout-Mäuse eine ganz normale

Entwicklung des Immunsystems und eine nahezu normale Antikörperantwort (116,S.1887; 139,S.1367; 140,S.45). Diese knock-out-Mäuse zeigen einen moderaten Anstieg der Antikörperaffinität in der Milz und in den B-Zell-Regionen der Lymphknoten, sowie eine abgeschwächte Reifung der Antikörperaffinität. Bei B-Zellen, die membraniges IgD und membraniges IgM exprimieren, erfolgt die Immunantwort früher, ausgeprägter und protrahierter, sofern das Antigen an membraniges IgD und nicht an membraniges IgM bindet (68,S.1005). Außerdem muß man anmerken, daß Mäuse, die eine erhöhte BCR-Signaltransduktion (durch Überexpression von CD19 oder knockout von CD22) haben, einen reduzierten membranigen IgM-Spiegel haben, während die Serum-IgM-Spiegel ansteigen. In diesem Zusammenhang scheint es gehäuft zu Autoimmundefekten zu kommen (40,S.497; 45,S.1727; 58,S.301; 118,S.634; 150,S.551).

Sekretorisches IgD

IgD sezernierende Plasmazellen kommen vor allem in der Nasenschleimhaut vor. Dort insbesondere im nasalen Schleim und nicht im Speichel, in den Adenoiden, den Tränendrüsen und Mandeln, speziell in entzündeten Mandeln (20,S.13; 71,S.129; 126,S.689; 173,S.382). B.M. Seidel et al. zeigten 2001, daß freies IgD bei neugeborenen Kindern am ersten Lebenstag im Speichel vorkommt, die sezernierte Menge aber nicht mit der Speichelflußrate korreliert (155,S.159). Sie erklärten dies mit der Präsenz von IgD-produzierenden Zellen in den Speicheldrüsen und mit der gesteigerten Permeabilität für diverse Proteine der frühen Schleimhautmembranen. Brandtzaeg et al. nahmen 1986 an, daß IgD bei den Neugeborenen eine „physiologische“ Platzhalterfunktion einnimmt, da IgA zu diesem Zeitpunkt noch nicht voll ausgereift ist (21,S.21).

Interessanterweise haben Erwachsene mit einem IgA-Defizit einen Anstieg der IgD produzierenden Zellen (22,S.21). Im Laufe der Reifung des mukosalen Immunsystems nimmt das im Speichel enthaltene IgD ab und IgA tritt an seine Stelle (52,S.397). Neuere Studien zeigen, daß 20% der Plasmazellen der Tonsillen der Erwachsenen IgD produzieren (7,S.1169; 87,S.603).

IgD aktiviert den alternativen Weg des Komplementsystems und nicht den klassischen (163,S.3).

Im Vergleich zum oberen Respirationstrakt gibt es im Gastrointestinaltrakt nur wenige IgD-Plasmazellen, IgD kommt nur in Spuren in den Verdauungssäften vor (18,S.667; 22,S.21; 21,S.21). Nachweisbar ist auch ein IgD-Spiegel in der Muttermilch, nicht aber im Colostrum. Der Muttermilch-IgD-Spiegel ist höher als der im Serum (65,S.122). Auch der Nachweis von IgD-Plasmazellen in den Brustdrüsen ist als beweisend für eine lokale Synthese zu werten (85,S.263).

Bei schwangeren Frauen ist die Konzentration von IgD in der Amnionflüssigkeit höher als im Serum der Mutter; in der ersten Hälfte der Schwangerschaft steigt die Konzentration an, ab Mitte der Schwangerschaft fällt sie wieder ab (30,S.220). Da es nur einen geringen bis keinen Transfer von IgD über die

Plazenta gibt, gilt es als sicher, daß das IgD in der Amnionflüssigkeit vom Feten gebildet wird (11,S.160; 31,S.825; 148,S.119; 197,S.265).

Untersuchungen über die normalen IgD-Serum-Spiegel stimmen dahingehend überein, daß die Normalwerte mit dem Alter variieren. Manche Untersuchungen beschreiben einen Anstieg des IgDs im Serum von Geburt zum Erwachsenen (78,S.350; 196,S.319; 197,S.265), andere beschreiben einen Anstieg bis zum zehnten Lebensjahr, dann einen Abfall (55,S.415). Levan-Petit beschrieb im Jahr 2000 Serum-IgD-Spiegel bei Neugeborenen, die später bei Ein- bis Zwölfmonatigen signifikant höher lagen (79,S.1819). Widersprüchliche Daten gibt es zur Geschlechtsverteilung: Bei Erwachsenen sind die IgD-Spiegel bei Männern höher als bei Frauen (170,S.323), bei Frauen höher als bei Männern (78,S.350) oder als nicht unterschiedlich beschrieben (44,S.248; 79,S.1819; 82,S.105; 196,S.319).

Neben dem Alter hängt der IgD-Spiegel auch vom Gm-Haplotypen des IgGs (44,S.248; 83,S.134) und von verschiedenen HLA-Klassen und ethnischen Zugehörigkeiten ab (82,S.105; 83,S.134).

Auch die Umweltverschmutzung scheint eine Auswirkung auf den Serum-Spiegel des IgDs zu haben. Rauchen erhöht den IgD-Spiegel (14,S.624; 92,S.898), wenn auch nicht in allen Untersuchungen (120,S.555). Das IgD im Nabelschnurblut war bei Kindern von Raucherinnen erhöht und zudem verbunden mit einem höheren kindlichen Risiko später an einer Allergie zu erkranken (92,S.898).

Die normale Serumkonzentration des IgD beim Erwachsenen wird mit ungefähr 40 µg/ml (132,S.871), andere Studien geben Werte unter 2µg/ml an. In Zusammenschau der derzeit erhältlichen Literatur werden Spiegel von 0,1-300µg/ml berichtet. 75% des gesamten IgD befinden sich intravaskulär (141,S.1467). Die Halbwertszeit von IgD beträgt 2,8 Tage was durch eine hohe enzymatische Proteolyserate und nicht durch späteren Zerfall bedingt ist (79,S.1819).

Phylogenetisch sind zum IgD einige Anmerkungen zu machen. Felsenfeld und Wolf demonstrierten 1969 sekretorisches IgD und IgD-Plasmazellen bei Pataffenen (*Erythrocebus patus*) (46,S.156). 1970 zeigte Bauer, daß das menschliche und das IgD von Gorillas Kreuzreaktivitäten aufwies (17,S.27). Auch bei anderen Primaten (77,S.191; 97,S.320; 96,S.865; 113,S.805; 125,S.807), anderen Säugetieren (113,S.805; 147,S.1025) und Hühnern (78,S.350) kommt IgD vor. Bei Mäusen konnte ebenfalls ein IgD-ähnliches Molekül nachgewiesen werden (1,S.600; 101,S.1427).

IgD scheint auch eine wichtige und spezifische Rolle in der Abwehr von viralen und bakteriellen Antigenen zu spielen. Spezifische IgD-Spiegel konnten z.B. bei folgenden Erkrankungen gefunden werden: Röteln (149,S.1), Masern und Subakute sklerosierende Panenzephalitis (IgD im Liquor erhöht)(122,S.69), Zytomegalie (107,S.234), Toxoplasmose (31,S.825), HIV (95,S.617), Choriomeningitis und Herpes (108,S.234), *Escherichia coli* (156,S.104) und auch als Antikörper gegen Tetanustoxin (85,S.263).

Wie vorhin schon berichtet, kann IgD bei IgM-knock-out-Mäusen das IgM

ersetzen und das läßt vermuten, daß es auch für andere Antigene zuständig werden kann (91,S.797). IgD zeigt Bindungsaktivitäten gegenüber Milch und Soyabohnenproteinen (50,S.69), Weizenproteinen, insbesondere bei Zöliakie (15,S.146) und bei diversen anderen Allergenen (65,S.122; 200,S.502) beschrieben.

Interessante Untersuchungen gibt es über die wiederholte Injektion von IgD bei Mäusen. Im Vergleich zu Mäusen, die keine Injektionen bekamen, nahmen die Sekundärfollikel der Lymphatischen Organe zu. Ebenfalls konnte ein Anstieg der Immunglobulinsezernierenden Plasmazellen verzeichnet werden. Es wurden alle Immunglobulinklassen gebildet, nur nicht IgD (177,S.13). Bei Mäusen, die einen Antikörper gegen IgD injiziert bekamen, kam es zu einer starken Aktivierung des Immunsystems mit einer Erhöhung auch des IgD- (109,S.2172) und des IgE-Spiegels (76,S.3594).

5.1.1.4. Der IgD-Rezeptor

1980 wurde der IgD-Rezeptor zum ersten Mal beim Menschen beschrieben (161,S.377). 1985 entdeckten Coico et al., Adachi und Ishizaka, 1986, diesen Rezeptor bei der Maus (2,S.7003; 38,S.1852). Der IgD-Rezeptor bindet sowohl sekretorisches IgD, als auch membraniges IgD, sowie IgD, das schon an ein spezifisches Antigen gebunden hat (38,S.1852). Bei beiden Spezies (Mensch und Maus) wird der Rezeptor durch oligo- oder polymerisches IgD induziert und durch monomerisches IgD inhibiert (35,S.4; 36,S.559; 37,S.3556). Andere Aktivatoren sind Cytokine, Interleukin 2 und 4 und Interferon γ (4,S.422; 174,S.405). Auch bei Impfungen kann es zu einer Induktion der IgD-Rezeptoren kommen.

Eine lösliche Form des Rezeptors wird von Zellen freigesetzt, die mit IL2, IL4 oder IgD selbst interagiert haben (3,S.9179).

Der menschliche IgD-Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 70kDa (37,S.3556); die genaue Struktur ist bis heute noch unzureichend geklärt.

Wo wird der IgD-Rezeptor exprimiert? CD4 und CD8 T-Zellen besitzen den IgD-Rezeptor, der nicht die Fc-Region, wie bei anderen Immunglobulinen, bindet, sondern auch den Fab-Teil (5,S.9242; 181,S.2050). Ca^{++} -Ionen sind nötig für die Bindung an den Rezeptor (174,S.405). Es gibt auch noch andere IgD-Rezeptor tragende Zellen, die im peripheren Blut vorkommen, aber nicht genauer klassifiziert wurden. Wie es scheint haben diese Zellen aber eine 3-10 mal höhere Affinität zu sekretorischem IgD als T-Zellen (161,S.377).

In vitro (182,S.2050) und in vivo (175,S.340; 176,S.145; 190,S.169) konnte gezeigt werden, daß die Induktion, Expression, gesteigerte Antikörperantwort und das Verschwinden des Rezeptors vom Alter abhängig sind. Eine mangelhafte Expression des IgD-Rezeptors und eine fehlerhafte Antikörperantwort konnte bei zunehmendem Alter beobachtet werden. Dazu muß jedoch angemerkt werden, daß es Untersuchungen gibt, die einen Anstieg des sekretorischen IgD im Alter festgestellt haben und gegensätzliche Arbeiten, die einen Abfall des IgD-Spiegels

im Blut beschreiben (115,S.16; 154,S.77).

5.1.1.5. Bei welchen Erkrankungen kommt IgD vor?

Schon zu Beginn der siebziger Jahre gab es mehrere Studien die membraniges IgD mit immunproliferativen Erkrankungen und Immundefekten in Zusammenhang brachten (129,S.853; 130,S.127). Zum Beispiel wurde 1974 von Pernis et al. das völlige Verschwinden des membranigen IgD auf reifen B-Zellen bei der Makroglobulinämie (Morbus Waldenström) beschrieben (124,S.776). Auch beim Di George-Syndrom, beim Wiskott-Aldrich-Syndrom und beim selektiven IgM-Mangel spielt das membranige IgD eine Rolle (131,S.481; 130,S.127). In einem Fall wurde eine sehr hohe Anzahl von IgD-Plasmazellen in der Mucosa eines Colitis ulcerosa-Patienten beschrieben (43,S.73).

Zum sekretorischen IgD gibt es nicht weniger Studien. Das IgD-Myelom macht ungefähr 1-2% der gesamten Myelome aus. Auch bei Parenchymkrankungen von Leber, Milz, Lymphknoten und der Amyloidose findet man IgD. Bei manchen Patienten wurden auch monoklonale IgD-Gammopathien beschrieben, die jedoch offensichtlich kein Myelom hatten (69,S.169).

Bei primären Immundefektsyndromen war das sekretorische IgD nicht zu identifizieren (86,S.54).

Seltener sind die IgD-Spiegel erhöht, zum Beispiel bei der Hyper IgM-Syndrom Typ1, manchmal auch bei einer autosomal-rezessiven Form (6,S.84; 72,S.539; 135,S.565). Auch beim Hyper IgE-Syndrom (62,S.417) und bei der Trisomie 21 (Down-Syndrom) (100,S.209) konnten erhöhte IgD-Spiegel gefunden werden. Bei Patienten mit einem normalen IgD-Spiegel konnte eine höhere Dichte an Plasmazellen in der Nasenschleimhaut und in den Speicheldrüsen, besonders wenn sie entzündet waren, gefunden werden. Das IgD, das dort produziert wurde, war aber nicht fähig diese Infektionen in Schach zu halten (24,S.626; 20,S.13; 173,S.382).

Desweiteren ist bei HIV-Patienten der Serum IgD-Spiegel sehr früh erhöht. IgD ist das einzige Immunglobulin, das einen Anstieg zu Beginn der Erkrankung zeigt. Seine Spitze erreicht es während des Stadiums des AIDS-related Komplex, dann fällt es wieder ab, hat aber trotzdem noch zehnmal höhere Konzentrationen im Blut, als bei gesunden Menschen (34,S.148; 105,S.5; 104,S.410; 121,S.248; 133,S.6).

Andere Infektionen zeigten ebenfalls eine Erhöhung des IgD-Spiegels im Serum: die infektiöse Mononukleose (13,S.1), die subakute sklerosierende Panenzephalitis (88,S.488), die akute virale Hepatitis der Erwachsenen (143,S.319), aber nicht die der Kinder (169,S.49; 168,S.35). In diesem Zusammenhang zeigen sich IgD-Antikörper vor allem gegen HBc.

Bei Salmonellosen (143,S.319), verschiedenen Parasiteninfektionen und bei pulmonaler Aspergillose (89,S.212) wurden in Zusammenhang mit erhöhten IgD-Spiegeln gebracht. Auch bei für Malaria endemischen Populationen wurden erhöhte IgD-Serum-Spiegel berichtet, die Malaria selbst scheint aber nicht dafür

verantwortlich zu sein (39,S.310; 99,S.51).

Bei der Purpura Schönlein-Henoch konnte nur ein unregelmäßiger Anstieg des sekretorischen IgD gefunden werden, der sich vor allem bei Nierenbeteiligung zeigte (151,S.570; 160,S.537). Tarantino et al. beschrieben 1974 ein erhöhtes IgD-Depot bei membranoproliferativer Glomerulonephritis, bei der membranösen Nephropathie und bei der fokal proliferativen Glomerulonephritis (183,S.175).

Auch konnte eine lokale Erhöhung des IgD-Spiegels im ZNS bei Multiple Sklerose Patienten festgestellt werden (119,S.289; 157,S.1076).

Bei malignen Erkrankungen wurde das sekretorischen IgD ebenfalls untersucht. Beim Morbus Hodgkin wurden sehr hohe Serum IgD-Spiegel beschrieben, die aber vom Alter, Form und Therapie abhängig waren (41,S.359; 42,S.905; 189,S.2084), wohingegen bei Non-Hodgkin-Lymphomen ein Abfall zu beobachten war. Ein vorübergehender Anstieg konnte bei Patienten beobachtet werden, die kurz nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation untersucht wurden (73,S.337). Auch bei Kindern, die in Remission nach verschiedenen Tumorerkrankungen lebten, konnte ein verlängerter Anstieg des sekretorischen IgD festgestellt werden (12,S.387).

Die Ergebnisse bei der rheumatoiden Arthritis widersprechen sich (51,S.125; 54,S.179; 67,S.211). Es wurden hohe Spiegel von anti-IgD-Autoantikörpern der IgA- und IgG-Klasse bei der rheumatoiden Arthritis, beim systemischen Lupus erythematodes und bei anderen Parenchymkrankungen beschrieben (127,S.1860). Auch bei der atopischen Dermatitis wurde ein erhöhtes sekretorisches IgD festgestellt (70,S.311).

Inwieweit IgD eine Rolle bei den anderen Immunglobulinklassen und deren Serum-Spiegeln spielt und welche Rolle es als Autoantikörper spielt, bleibt immer noch unklar.

Jedoch gibt es noch diverse andere Erkrankungen bei denen ein erhöhter IgD-Spiegel festgestellt wurde: zum Beispiel der Morbus Behçet, rezidivierende Aphten und die idiopathische Retinovaskulitis (74,S.372; 153,S.31). Auch bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen (117,S.118) und verschiedenen Hauterkrankungen wird ein erhöhter IgD-Spiegel beschrieben.

Bei Allergien ist das IgD klassisch erhöht, aber korreliert nicht mit den IgE-Spiegeln, wohl aber die anti-Allergen-Antikörper des IgD- und des IgE-Isotypen (62,S.417; 123,S.436; 166,S.11; 200,S.502).

Interessant ist auch die Tatsache, daß es beim systemischen Lupus erythematodes, bei der Rheumatoiden Arthritis und der Zirrhose Antiimmunglobulin-Antikörper gegen IgD der Klasse IgM gibt. Die Häufigkeit dieser Antikörper in gesundem Serum liegt bei 37% (102,S.157; 138,S.279).

Diese Aufzählung zeigt, daß nicht nur beim Hyper IgD-Syndrom oder beim Periodischen Fieber klassischerweise das sekretorische IgD erhöht ist. Zu diesen beiden Erkrankungen gibt es viele Untersuchungen, die aber den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

Die derzeitige Datenlage spricht dafür, daß IgD vor allem als Antikörper gegen gewebständige Antigene vorkommt, z.B. gegen permanent vorhandene Antigene,

sowie Antigene, die im weiteren Sinne mit Hypersensitivität assoziiert sind. Aber auch bei infektiösen Erkrankungen (s.o.) wird dem sekretorischen IgD eine Bedeutung zugeschrieben.

Was diese Zusammenschau insgesamt zeigen möchte, ist die Beteiligung von IgD bei zahlreichen Erkrankungen des menschlichen Organismus, selbst wenn die Physiologie und Pathophysiologie der IgD-Immunantwort derzeit noch nicht komplett aufgeklärt sind.

5.2. Spezielle Diskussion

5.2.1. Diskussion der Methode

Das Gelingen des Versuches mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode wird durch drei maßgebliche Komponenten bestimmt (16,S.1).

Die Antigenität des Antigenmaterials sollte stets erhalten bleiben. Dies erreicht man am besten mit einer schonenden Aufbereitung des Materials nach der Entnahme und einer sofortigen Verarbeitung, die einen Zeitraum von 4-6 Stunden nicht überschreiten sollte. Gelingt es nicht das Material umgehend zu verarbeiten, ist eine sachgemäße Lagerung unbedingt erforderlich (16,S.1; 193,S.313).

Natürlich sollte das Antiserum optimal reaktionsfähige Antikörper enthalten. Auch sollte darauf geachtet werden, daß die Patientenserum sofort nach der Entnahme verarbeitet werden. Zum Versuchsansatz sollte folglich kein eingefrorenes Serum verwendet werden. Natürlich sind auch verunreinigte Antiserum, zum Beispiel durch Bakterien, für den Test ungeeignet (16,S.1). Da im hochkonzentrierten Serum nicht nur die Immunglobulinfraktion enthalten ist, sondern noch viele andere Proteine, können diese das Ergebnis falsch positiv oder falsch negativ beeinflussen, indem sie unspezifisch an das Antigenmaterial binden. Trotz intensiver Waschungen können diese Proteine nicht immer vollständig entfernt werden, so daß es sich anbietet die Antiserum mindestens 1:10 zu verdünnen, um dadurch die Störungen gering zu halten (16,S.1).

Tabelle 2: Auflistung der Störfaktoren

1.	Verlust der Antigenität bei zu langer Lagerung
2.	Verlust von optimal reaktionsfähigen Antikörpern durch zu lange Lagerung
3.	Verunreinigungen der Epithelsuspension durch, z.B. Bakterien
4.	Verunreinigung der Materialien
5.	Beeinflussung des Ergebnisses durch diverse Serumproteine
6.	Unspezifische Fluoreszenzen, z.B. durch Fluorochrome
7.	Autofluoreszenz
8.	Temperatur, mit der Gefahr der Austrocknung
9.	Lichteinfall, mit der Gefahr des Ausbleichens des Präperats
10.	Ungleichmäßige Verteilung der Zellsuspension

Um nun das Konjugat, also den Antigen–Antikörper–Antikörperkomplex, sichtbar zu machen, ist es das Ziel eine spezifische Reaktion zu erreichen, die durch eine dort auftretende Fluoreszenz erkennbar wird. Neben der sogenannten spezifischen Fluoreszenz, gibt es mehrere Möglichkeiten, wie es zu unspezifischer Fluoreszenz kommen kann (16,S.1): z. B. durch die vielen anderen Proteine im Serum (z.B. Immunglobuline anderer Klassen, die unspezifisch an die Antikörper binden können). Eine weitere Ursache können freie Fluorochrome oder Ballastproteine sein, die man aber durch genügend große Verdünnung und Reinigung des Konjugats minimieren kann. Als Vergleich dient hier dann das Kontrollpräperat, das von Beginn an nur mit Kochsalzlösung und Phosphatwaschpuffer behandelt wurde. Diese Kontrolle ermöglicht auch die Prüfung auf Autofluoreszenz. Denn durch UV-Bestrahlung kann es bei manchen Gewebe- und Präperatverunreinigungen zur Autofluoreszenz kommen, ohne daß man eine vorangegangene Markierung durchgeführt hatte. So fluoreszieren zum Beispiel Mastzellen in der Submucosa des Darmes gelblich und Reste des Wattestäbchens können homogen gelb leuchten. Die Farbe der Autofluoreszenz und die der Verunreinigungen läßt sich aber gut von der des tatsächlichen Fluorochroms abtrennen (16,S.1).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Nachweis von Autoantikörpern der Gruppe IgD im Serum von Kontrollpersonen und Patienten mit verschiedenen Autoimmun-Erkrankungen der vorhin beschriebene indirekte Immunfluoreszenztest angewandt.

Um den Verstärkereffekt der Antiglobulinmethode, der durch Reaktion mehrerer Antikörpermoleküle mit einem Antigenmolekül entsteht (16,S.1), für den Sensitivitätsgewinn der Methode optimal zu nützen, verlief die Fluorezenzmarkierung zum IgD-Nachweis in zwei Reaktionsschritten (sandwich-Verfahren). Dieses Verfahren wurde angewendet, da es deutliche und reproduzierbare Ergebnisse generierte.

Trotz der getroffenen Vorkehrungen und sorgfältigen Verarbeitung der Proben traten bei einigen Konjugatkontrollen geringe unspezifische Fluoreszenzen auf, d.h. es fand eine Detektion von IgD statt, obwohl diese ohne Zusatz von Serum untersucht wurden. Daher wurde in allen Fällen das Δf (Fluoreszenzrate des Serumansatzes abzüglich Fluoreszenzrate der Konjugatkontrolle) bestimmt.

Für jeden individuellen Ansatz wurde eine Probe mit Serum (Testansatz) und eine Probe ohne Serum (Konjugatkontrolle, Leeransatz) untersucht, um zum einen die Autofluoreszenz, zum anderen die unspezifische Fluoreszenz, zu überprüfen. Zahlreiche Gewebestrukturen, sowie Mastzellen und Lymphozyten zeigten eine Autofluoreszenz, die sich unschwer aufgrund des intensiv gelben Farbcharakters in Verbindung mit zytologischen Kriterien von der spezifischen Antikörper vermittelten Fluoreszenz unterscheiden ließ.

Aufgrund des hohen Aufwandes erscheint diese Methodik jedoch für den Klinikalltag inpraktikabel.

5.2.2. Diskussion des IgD-Antikörpernachweises bei Autoimmunerkrankungen

Pathogenetisch zeigt der Körper verschiedene Wege gegen sich selbst zu agieren: Einerseits kann es zur Abnahme der T-Suppressor-Aktivität mit einem relativen Überwiegen der T-Helfer-Zellen kommen, zum anderen können durch Modifikationen (z.B. Medikamenten assoziiert) körpereigene Strukturen zu einem Autoantigen wirksamen Antigen werden. Desweiteren kann es durch die Freisetzung von Proteinen, die noch keinen Kontakt mit dem Immunsystem hatten oder auch virale Infektionen eine Autoimmunerkrankung induziert werden. In diesem Zusammenhang wird eine genetische Disposition diskutiert, hinweisend darauf ist die Erkenntnis, daß viele Autoimmunerkrankungen mit bestimmten HLA-Phänotypen assoziiert sind. Auch die Freisetzung „verborgener“ Autoantigene wie Mitochondrienanteile (AMA) oder Myosin (SMA) können für Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht werden (136,S.170).

Es gibt eine kleine Form des IgD, das an die Plasmamembran gebunden ist, dessen Funktion aber noch völlig unbekannt, ist, s.o.

Eine Arbeit von Wilson et al. 1997 zeigte außerdem, daß IgD an der Reifung des Immunsystems beteiligt ist. Eine Fehlentwicklung bei der Reifung des Immunsystems mit daraus sich entwickelnder Autoimmunerkrankung wäre demnach möglich (195,S.4593).

Anzumerken ist auch, daß IgD physiologischerweise im Speichel von Neugeborenen vorkommt. Brandtzaeg et al nahmen eine physiologische Platzhalterfunktion des IgDs in dieser Lebensperiode an. Vielleicht wäre eine

selbstgerichtete Immunreaktion in einer späteren Lebensperiode gar nicht unwahrscheinlich, zeigen doch z.B. auch Erwachsene mit IgA-Defizit einen Anstieg IgD-produzierender Zellen (23,S.483). Außerdem muß man anführen, daß IgD bei IgM defizienten Mäusen die Rolle des IgM übernehmen kann, also auch für andere Antigene zuständig werden kann (91,S.797), d.h. es könnte auch für antigene Determinanten des eigenen Körpers dann ein Problem darstellen.

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch eine Studie von Boes, M. et al, die eine beschleunigte Entwicklung von IgG-Autoantikörpern bei Abwesenheit von IgM nachwies. Sie zeigten sogar unter physiologischen Bedingungen, daß IgM die Entwicklung von IgG-Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen unterdrücken kann (19,S.1184). Könnte IgD dann ebenfalls als Suppressor oder als Autoantikörper wirken?

In der Literatur werden verschiedene und stark variierende Normalwerte für IgD-Spiegel im Serum angegeben, wie wir bereits angeführt haben. Daher verzichteten wir auf eine Bestimmung der IgD-Spiegel unserer Testpersonen und wiesen das IgD nicht quantitativ nach.

Wir zeigten in unserer Studie vielmehr einen qualitativen Nachweis von Autoantikörpern der IgD-Klasse gegen noch unbekannte antigene Determinanten von Epithelzellmembranen aus der Mundschleimhaut. Ob es sich bei dieser antigenen Determinanten um einen speziellen IgD-Rezeptor oder irgendeine andere antigene Determinante handelt, konnte in unserer Studie nicht gezeigt werden. Was wir aber zeigen konnten, war, daß es sich bei diesem Antigen nicht um ein individuelles, wie z.B. den MHC, sondern um eine genetisch gering variable Struktur handelt (siehe kapitel 4.6.). Dazu wären folglich molekularbiologische Betrachtungen notwendig gewesen, was für spätere Arbeiten sicher nicht uninteressant wäre.

Da die Rolle des IgDs in der Physiologie des Menschen noch nicht vollständig aufgeklärt ist und auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen verschiedenen Erkrankungen und IgD nur z.T. bewiesen ist, s.o., wird dennoch eine Rolle bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Tumoren, chronisch entzündlichen Erkrankungen, sowie Erkrankungen des atopischen Formenkreises diskutiert (84,S.75; 144,S.477; 184, S.80; 187, S.1).

5.2.3.Morbus Crohn

Synonyme: Enteritis regionalis, Ileitis terminalis

1978 wurde von J.E.G.Walker zum ersten Mal eine Studie publiziert, die sich mit der Frage nach Autoantikörpern gegen epitheliale Antigene der Mucosa, im speziellen der Mundschleimhaut, bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beschäftigte (188,S.759). In dieser Untersuchung wurden Antikörper der Klassen IgG, IgM, IgA und der Komplementfaktor C3 mittels FITC-markierten Antikörpern detektiert. Dabei zeigten sich perinukleäre Fluoreszenzen bei Ansätzen mit sowohl homologen als auch heterologen Seren der Morbus Crohn

Patienten. Eine Kreuzreaktion der Seren von Patienten verschiedener Diagnosegruppen und verschiedener Mundschleimhäuten konnte diese Studie, im Gegensatz zu unserer Arbeit, nicht feststellen. Dies liegt möglicherweise daran, daß die Studie von Walker gerade die wichtigen IgD-Antikörper nicht untersuchte. Auch eine Korrelation der Autoantikörper zu diversen krankheitsassoziierten Aktivitätsparametern wurde bei Walker nicht nachgewiesen. Die fehlende Korrelation von Aktivitätsindices und Autoantikörpern kann von uns nun auch für IgD belegt werden. Eine fehlende Korrelation wurde 1983 auch von Auer et al. beschrieben (10,S.1242). Bei dieser Untersuchung ergab sich nur eine geringe Sensibilität und keine Spezifität für diesen Test. Er konnte zwar ebenfalls Antikörper gegen perinukleäre, in den Mucosazellen lokalisierte/s Antigen/e nachweisen, eine Verwendung der Autoantikörper zur Diagnosesicherung eines Morbus Crohn ist aufgrund der niedrigen Spezifität undenkbar. Positive Ergebnisse für Colitis ulcerosa wurden nicht gefunden.

Eine Untersuchung von D. Rемаux zeigte eine Produktion von Autoantikörpern der Klasse IgG gegen nukleäre Komponenten (diverse Histone, Peptide, Actin und Myosin) bei Morbus Crohn Patienten. Zusätzlich fand diese Gruppe einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Antikörpern gegen die nukleären Komponenten und dem CDAI heraus (134,S.349).

Beide Arbeiten beschäftigten sich jedoch nicht mit Immunglobulinen der Klasse D.

T.R.J. Stevens et al. wies bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erstmals antiendotheliale Antikörper nach. Er folgerte daraus, daß es sich pathogenetisch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen um eine mesenterische Vaskulitis handeln könnte. In vitro wirkten diese Antikörper jedoch nicht zytotoxisch auf Endothelzellen (165,S.426).

Genauere Betrachtungen über das IgD bei den eigenen Patienten ergaben:

4 der 19 untersuchten Morbus Crohn Patienten befanden sich nicht im akuten Schub ihrer Erkrankung. 8 der restlichen 15 Patienten waren zum Untersuchungszeitpunkt mit einem Steroid anbehandelt. 4 bekamen zusätzlich Mesalazin. Es ließ sich ein hoch signifikanter Unterschied der Fluoreszenzraten des Serumansatzes und der Konjugatkontrollen in unserer Testreihe nachweisen ($p < 0,01$). Auch der Vergleich mit der gesunden Gruppe ergab ein hochsignifikantes Ergebnis ($p < 0,01$). Beim Vergleich mit der bakteriellen Gruppe erhielten wir ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,01$), beim Vergleich mit der viralen Gruppe einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

Die gefundenen hochsignifikanten Unterschiede belegen, daß im Serum von Morbus Crohn-Patienten sekretorisches IgD gegen antigene Determinanten der Mucosaoberfläche nachweisbar ist.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß nicht nur IgA, IgG und IgM eine Rolle bei der Entwicklung des Morbus Crohn spielen, sondern auch IgD eine wesentliche Bedeutung zukommt. Der Unterschied zu früheren Studien besteht zum einen

darin, daß es sich bei dem hier untersuchten IgD um einen Antikörper handelt, der keine perinukleäre Fluoreszenz zeigt, sondern sich an eine antigene Determinante der Zelloberfläche der Schleimhautepithelien bindet. Zum anderen konnten wir eine hohe Sensitivität (79%) und eine noch höhere Spezifität (89%) für diesen Test errechnen. Auch in der gesunden Vergleichsgruppe kam es zu positiven Ergebnissen, die aber bei weitem nicht die Intensität der anderen signifikanten Diagnosegruppen zeigten.

Bei dem buccalen Abstrich der Epithelzellen handelt es sich um einen wenig invasiven Test, ob dieser Test als Standarduntersuchung zur Diagnose eines Morbus Crohn bei einem Teil der Patienten geeignet ist, muß noch geklärt werden, da es auch andere Diagnosegruppen gibt, die signifikante Ergebnisse zeigen.

5.2.5. Colitis Ulcerosa

1966 fanden Crabbe und Heremans in der Mucosa eines Colitis ulcerosa Patienten eine sehr hohe Anzahl von IgD-Plasmazellen. Über die Konzentration von sekretorischem IgD finden sich in der Publikation keine Aussagen (43,S.73). 1984 fanden aber Hermanowicz et al. heraus, daß sämtliche Immunglobuline (IgG, IgA, IgM, IgE und das CRP) mit der Aktivität der Erkrankung positiv korrelierten. Nur für IgD zeigte sich kein Anstieg im Serum, sondern ein Abfall der Serumspiegel (57,S.501). Belegt ist, daß B-Zellen, die IgD produzieren, physiologischerweise in der Mucosa des Intestinaltraktes die Minderheit darstellen, im Vergleich zu IgA und IgM, die den Hauptteil ausmachen. Dennoch gibt es auch in diesem Fall wieder kontroverse Studien. Soltöft et al. fanden immerhin 6,5% IgD-positive Plasmazellen in der Mucosa (162,S.535).

Desweiteren gibt es Studien, die über aufgetretene Autoantikörper gegen das exokrine Pankreas der IgA-, IgG- und in zwei Fällen der IgD-Klasse bei 39% der untersuchten Morbus Crohn-Patienten, und etwas seltener bei Colitis ulcerosa-Patienten, berichteten. Weiterhin beschrieben die Autoren dieser Publikation bei der Colitis ulcerosa Autoantikörper gegen intestinale Becherzellen. Diese Becherzellantikörper gehörten den Immunglobulinklassen IgA und/oder IgG an (171,S.1963).

Unsere Colitis ulcerosa Gruppe setzte sich aus Patienten zusammen, die sich alle in einem akuten Schub ihrer Erkrankung befanden. 6 von ihnen waren mit einem Steroid anbehandelt, 2 erhielten zusätzlich 5-ASA.

Unsere Ergebnisse waren wie folgt: Es besteht ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Serumfluoreszenzraten und den Konjugatkontrollen dieser Diagnosegruppe ($p < 0,01$). Außerdem konnten wir einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) im Vergleich mit der gesunden Vergleichsgruppe zeigen. Zur bakteriellen Vergleichsgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$), zwischen der viralen Vergleichsgruppe und den

Colitis ulcerosa Patienten bestand jedoch ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

Die gefundenen signifikanten Unterschiede belegen, daß im Serum von Colitis ulcerosa-Patienten sekretorisches IgD gegen antigene Determinanten der Mucosaoberfläche nachweisbar ist.

Dies steht lediglich scheinbar im Widerspruch zur Studie von Hermanowicz, die einen Abfall der IgD-Spiegel bei der Colitis ulcerosa aufzeigt. Da in unserer Arbeit aber nur der Autoantikörperanteil des IgDs untersucht wird, ist es durchaus denkbar, daß der gesamt IgD-Anteil im Serum reduziert ist, sich der als Autoantikörper wirksame Anteil jedoch erhöht; eine Differenzierung, die von Hermanowicz et al. nicht untersucht wurde.

Unsere Daten stehen weiterhin mit der Studie von Crabbe und Heremans im Einklang, die zeigten, daß IgD nicht nur lokal in Plasmazellen, sondern auch als sekretorisches IgD bei der Colitis ulcerosa vorkommt.

Da unsere Untersuchung einen qualitativen Nachweis des IgDs als antiepithelialer Autoantikörper darstellt, muß man davon ausgehen, daß es sich bei IgD um einen potentiellen Autoantikörper handelt. IgD wurde auch als Antikörper gegen epitheliale Zellen der Intestinalmucosa bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beschrieben, jedoch nicht als signifikant erhöht, was an der kleinen untersuchten Gruppengröße liegen könnte (164,S.1).

Aus unseren Daten können wir schließen, daß sekretorisches IgD mit Autoaktivität gegen buccale Mucosa bei Patienten mit Colitis ulcerosa regelmäßig vorkommt. Die Sensitivität des Tests lag bei 79 %, die Spezifität bei 72%. Eine Aussage über die Rolle, die Funktion oder den Mechanismus, die IgD spielen kann, ist derzeit nicht möglich.

5.2.5. Rheumatoide Arthritis, RA

Synonyme: Chronische Polyarthritits

Wie im Kapitel 5.1.1.5. schon berichtet, gibt es kontroverse Standpunkte, was das IgD bei der Rheumatoiden Arthritis angeht. Manche beschreiben erhöhte Spiegel, andere keine Erhöhung. Da die Rheumatoide Arthritis zu den klassischen Autoimmunerkrankungen zählt und eine Rolle des IgD bei der Selbsttoleranz diskutiert wird, bezogen wir diese Erkrankung in unsere Studie mit ein. Alle Patienten befanden sich in einem akuten Schub der Erkrankung und waren mit verschiedenen Medikamenten (33 der 36 mit einem Steroid, 11 davon in Kombination mit Methotrexat, 3 mit Azulfidine) anbehandelt. Im Vergleich mit der gesunden Gruppe konnte aber auch bei unserer Arbeit kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p > 0,05$), d.h. es konnte qualitativ kein oder nur selten IgD im Serum der Patienten detektiert werden. Auch die Fluoreszenzraten, bezogen auf 200 ausgezählten Zellen, zeigten keine signifikante Erhöhung gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Ein Vergleich mit der bakteriellen Gruppe zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$), im

Vergleich mit der viralen Gruppe hingegen einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,01$). Diese Ergebnisse belegen, daß im Serum von RA-Patienten sekretorisches IgD gegen antigene Determinanten der Mucosaoberfläche nicht im signifikanten Maße nachweisbar ist.

Da wir eine große Anzahl ($n=36$) an Patienten mit Rheumatoider Arthritis untersuchten, ist hier von einem relevanten Ergebnis auszugehen. Korrelierte man die leicht erhöhten Fluoreszenzraten mit dem CRP oder dem klinischen Aktivitätsindex für Polyarthritis, so konnte man keinen Zusammenhang erkennen. Pope et al., untersuchten die Autoantikörper gegen membraniges IgD (127,S.1860). Sie konnten zeigen, daß diese Autoantikörper eventuell als Modulatoren bei verschiedenen autoimmunen Erkrankungen (Rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes und multiple Weichteilerkrankungen) wirken können. Als Autoantikörper wurden Antikörper der Klasse IgA, IgM und IgG untersucht, folglich die bekanntesten Rheumafaktoren. Hier muß man hinzufügen, daß IgD öfter bei Patienten mit seropositiven Rheumafaktoren (60%), als bei seronegativen Patienten (33%) gefunden wird (67,S.211). Es ist eine der ersten Studien, die sich mit der Klassifizierung der Antikörper beschäftigte, die an das membranige IgD binden. Offen bleibt nun die Frage, ob diese Antikörper auch das sekretorische IgD binden können und wir aufgrund dessen keine Fluoreszenz bei unseren Patienten feststellen konnten. Vielleicht gehören diese Antigen-Antikörperkomplexe zu der Gruppe der Immunkomplexe, die man in 50% der Patienten findet. Inwieweit membraniges IgD eine Rolle bei der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis spielt, ist noch nicht abzusehen. Secretory IgD scheint eher eine kleine oder keine Rolle dabei zu spielen.

5.2.6. Systemischer Lupus erythematodes, SLE

Synonym: LED

Es ist schon seit 1968 bekannt, daß antinukleäre Antikörper der Klasse IgD beim Systemischen Lupus erythematodes vorhanden sind (137,S.37). Eine Korrelation zwischen diesen Antikörpern und der Aktivität eines Lupus erythematodes wird vermutet (152,S.27). Wie auch bei der Rheumatoiden Arthritis wurden anti-IgD-Autoantikörper der IgA- und IgG-Klasse beim Lupus erythematodes festgestellt (127,S.1860). In diesem Zusammenhang muß man auf eine Studie hinweisen, die eine Interferenz zwischen anti-IgD-dextran-Antikörpern und der Autoantikörperproduktion von IgM und IgG (als späteren Antikörper) zeigt und eine eventuelle Inhibition des Wechsels von IgM zu IgG-Antikörpern zur Folge hat (158,S.1889). Aufgrund dieser Ergebnisse war es für uns interessant, ob IgD nicht nur als antinukleärer Antikörper reagiert, sondern ob IgD im Serum der Patienten vorhanden ist, oder es wie bei der Rheumatoiden Arthritis ebenfalls zu Interferenzen durch anti-IgD-Antikörper kommt.

Leider war unsere Gruppe nicht sehr umfangreich ($n=9$), auch handelte es sich bei

den Patienten ausschließlich um Frauen. Alle Patientinnen befanden sich in einem akuten Schub ihrer Erkrankung und waren mit Cortison und Azathioprin (n=2) anbehandelt.

Im Unterschied zur Rheumatoiden Arthritis lieferten unsere Untersuchungen hochsignifikante Ergebnisse. Es existierte nicht nur ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Serumfluoreszenzraten und den Konjugatkontrollen ($p < 0,01$), sondern auch ein hochsignifikantes Ergebnis im Vergleich mit der gesunden Gruppe ($p < 0,01$). Im Vergleich mit der bakteriellen Gruppe zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$), zur viralen Vergleichsgruppe hingegen keinen Unterschied ($p > 0,05$). Die gefundenen hochsignifikanten Unterschiede belegen, daß im Serum von SLE-Patienten sekretorisches IgD gegen antigene Determinanten der Mucosaoberfläche nachweisbar ist.

Natürlich muß man auch hinzufügen, daß aufgrund der kleinen Gruppe ein falsch signifikantes Ergebnis möglich sein kann. Dies ist aber sehr unwahrscheinlich, da der Unterschied hochsignifikant ist und da sich bei allen Patienten im Vergleich zur gesunden Gruppe erhöhtes sekretorisches IgD nachweisen ließ.

Bei unseren SLE-Patientinnen wurde eine Sensivität von 79% und eine Spezifität von 100% für den Nachweis von Autoantikörpern der IgD-Klasse festgestellt.

Für uns bedeutet dieses Ergebnis folgendes:

- Wir konnten sekretorisches IgD gegen antigene Determinanten der Mucosaoberfläche im Serum der Patienten nachweisen.
- In unserer Studie konnten wir keine Interferenzen mit etwaigen anti-IgD-Antikörpern feststellen, da sich bei allen Patientinnen sekretorisches IgD nachweisen ließ.
- Vorhandenes IgD bindet auch an antigene Determinanten der Zellmembranen von Epithelzellen.
- Ob es sich bei diesen Antikörpern um die vorhin beschriebenen antinukleären Antikörper handelt, kann derzeit nicht definitiv ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich, obgleich wir die nukleäre Fluoreszenz nicht untersuchten.
- Eine Korrelation zwischen der Serumfluoreszenzrate und der klinischen Aktivität konnte nicht festgestellt werden ($k=-0,146$).

5.2.7. Glomerulonephritis, GN

Es gibt mehrere Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von IgD und Glomerulonephritis postulieren (63,S.951; 64,S.291; 183,S.175). Alle arbeiteten mit Nierenbiopsien und stellten das IgD z.T. mit direkter Immunfluoreszenz direkt in den Glomeruli dar. Gleichzeitig wurden bei diesen

Untersuchungen auch IgG- und IgM-Antikörper gefunden, was eine Komplexbildung mit IgD möglich erscheinen läßt. Ob das IgD dabei als Antikörper oder Antigen reagierte, bleibt unklar. Katz et al. zeigten aber keine Erhöhung des IgDs im Serum oder im Urin (64,S.291).

In diesem Zusammenhang muß man erwähnen, daß es Untersuchungen bei zwei Patienten mit Glomerulonephritis gab, bei denen Antithyreoglobulin-Antikörper gefunden wurden (63,S.951). Das ist von Interesse, da in der selben Studie gezeigt wurde, daß diese Antithyreoglobulin-Antikörper von der IgD-Klasse sind. Desweiteren wurde Thyreoglobulin bei chronischen Erkrankungen des Glomerulums in der Niere gefunden, so daß es sich bei den von Katz et al. 1974 in den Glomeruli gefundenen IgD-Antikörpern um Antithyreoglobulin-Antikörper handeln könnte (98,S.769). Beide Patienten zeigten aber kein klinisches Erscheinungsbild einer Thyreoiditis. Der genaue Pathomechanismus des Antithyreoglobulin-IgD bei Patienten mit Glomerulonephritis konnte aber bisher noch nicht geklärt werden.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß kein signifikanter Unterschied zwischen den GN-Patienten und der gesunden und bakteriellen Vergleichsgruppe besteht - siehe unten - folglich können wir diese Ergebnisse nicht bestätigen.

Anzumerken ist aber, daß unsere Gruppe 7 Patienten umfaßte und daher im Vergleich zur oben erwähnten Untersuchung durch die höhere Patientenzahl valider erscheint.

2 der 7 Patienten waren mit Mykophenolat und Ciclosporin anbehandelt, die anderen erhielten lediglich Antihypertonika. 1 Patient zeigte eine Serumfluoreszenzrate von 14,5 %, alle anderen waren negativ. Ein Signifikanzniveau zwischen den Glomerulonephritis-Patienten und der gesunden Gruppe ergab sich mit einem p-Wert $> 0,05$ folglich nicht. Ein Vergleich mit der bakteriellen Gruppe ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$), wohingegen der Vergleich mit der viralen Gruppe einen hochsignifikanten Unterschied erbrachte ($p < 0,01$). Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Serumfluoreszenzraten und den Konjugatkontrollen, der p-Wert war hier ebenfalls $> 0,05$.

Damit deckt sich unsere Untersuchung mit der von Katz et al. (64,S.291), die keine signifikante Erhöhung des freien IgDs im Serum entdecken konnte.

Davon ausgehend, daß IgD sehr wohl in den Basalmembranen der Glomeruli gefunden wurde, ist eine Nichtbeteiligung des IgD am Krankheitsbild der Glomerulonephritis aufgrund unserer Ergebnisse nicht sicher auszuschließen. Welche Rolle Thyreoglobulin und Antithyreoglobulin der IgD-Klasse in der Pathogenese von Glomerulonephritiden zukommt, wird noch zu klären sein.

5.2.8. Chronische Hepatitis C

Zunächst muß man anmerken, daß häufig Antinukleäre Antikörper (ANA) und

liver-kidney-microsome-Antikörper (LKM1-AK) der Klasse IgG bei der chronisch viralen Hepatitis C nachgewiesen werden können. Diese Autoantikörper finden sich regelmäßig auch bei Autoimmunhepatitiden. Daher scheint es rechtens Antikörper anderer Immunglobulinklassen bei der chronischen Hepatitis C zu vermuten.

Rostenberg und Penazola beschrieben 1979 eine IgD-Erhöhung bei der akuten Hepatitis B. Diese waren vor allem gegen HBc gerichtet. Diese IgD-Antikörper fanden sich bei Erwachsenen, nicht jedoch bei Kindern (143,S.319).

Bei der chronischen Hepatitis C kommen charakteristischerweise intrahepatische Lymphfollikel vor, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Im Keimzentrum dieser Lymphfollikel konnte eine Studie von Muramaki et al, (110,S.143), eine reduzierte Expression von IgD in den Follikeln, die um das Keimzentrum lokalisiert waren, zeigen. Ein gesunder Lymphknoten hat eine höhere IgD-Dichte um das Keimzentrum. Die Studie postulierte für die IgD-Expression eine Rolle als Reifezeichen der B-Zellen. Dennoch zeigen die IgD-Expressionen keine signifikanten Unterschiede.

In unserer Studie konnten wir einen hochsignifikanten Unterschied der Serumansätze und der Konjugatkontrollen ($p < 0,01$) feststellen. Auch der Vergleich zwischen dieser Gruppe und der gesunden Vergleichsgruppe ergab einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,01$). Beim Vergleich mit der bakteriellen Gruppe zeigte sich ebenfalls ein hochsignifikantes Ergebnis ($p < 0,01$), bei einer Spezifität von 87,5% und einer Sensitivität von 79%. Dies bedeutet, daß im Serum von Patienten mit chronischer Hepatitis C eine signifikant erhöhte Menge an sekretorischem IgD gegen antigene Determinanten der Mucosaoberfläche vorliegt.

Ob ein indirekt proportionaler Zusammenhang zwischen der Expressierung des IgD in intrahepatischen Lymphfollikeln und des nachweisbaren IgD in unserer Studie besteht, ist nicht auszuschließen. Auch könnte sekretorisches IgD gegen Mucosa ein weiterer Antikörper bei der Diagnose einer chronischen Hepatitis C sein. Es bleibt noch zu klären, inwieweit IgD ebenfalls bei der Autoimmunhepatitis vorkommt.

5.2.9. Colon Carcinom-Zelllinie SW 480

Der Vorteil einer Zellkultur liegt darin, daß nur ein Zelltyp vorhanden ist. Zusätzlich kann man durch die Verwendung von Zellkulturen Verunreinigungen gering halten, die in einem Mundschleimhautabstrich zwangsläufig vorkommen. Nachteil ist, daß es bei hochspezialisierten Zelllinien, wie SW 480, zu einem Verlust wichtiger Oberflächenstrukturen und damit der antigenen Determinanten kommen kann.

Auer et al. beschrieb 1988 IgG-Antikörper aus dem Serum von Colitis ulcerosa-Patienten, die eine zytotoxische Reaktion gegen die Colon Carcinom-Zelllinie RPMI 4788 innerhalb von 4 Stunden auslösten (9,S.1639). Bei Morbus Crohn-

Patienten und Gesunden konnte diese Aktivität nicht gezeigt werden. Nach 18 Stunden wurde diese zytotoxische Reaktion von IgM-Antikörpern vermittelt. Das reaktive Antigen war ein 40 Kd-Protein. Chapman et al. und Fiocchi et al. beschrieben 1986 und 1989 schon Autoantikörper der Klasse IgG und IgA gegen intestinales Epithel (32,S.86; 49,S.786). Ihre Angaben für die Prävalenz dieser Antikörper differierten zwischen 20% und 70%. 1999 fanden Lee et al. bei einer anderen Colonicarcinom-Zelllinie Caco-2 heraus, daß auch hier Seren von Colitis ulcerosa-Patienten höhere Absorptionsraten im Western-blot aufwiesen, als Seren von Morbus Crohn-Patienten (75,S.196). Weder die Immunglobulin-Klasse, noch die antigene Determinante wurden in dieser Arbeit bestimmt.

In unserer Arbeit untersuchten wir daraufhin sekretorisches IgD im Serum von 18 Patienten mit besonders hohen Fluoreszenzraten (9,3% - 44%) bei der Inkubation mit Zellen der Colonicarcinom-Zelllinie SW 480. 5 Seren von Morbus-Crohn-Patienten, 2 von Colitis ulcerosa-Patienten, 3 von SLE-Patienten, 4 von Patienten mit chronischer Hepatitis C und 4 Seren von Patienten mit RA. Alle Tests waren negativ. Ein Vergleich mit der gesunden Gruppe war nicht nötig, da es sich um eine Zellkultur ohne autologes Serum handelte. Eine antigene Determinante auf dieser Colon Carcinom-Zelllinie existiert folglich nicht.

Interessant in diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen, die wir mit einem heterologen Epithel und 13 verschiedenen positiven Seren anstellten (1 Lupus erythematodes-, 4 chronische Hepatitis C-, 2 Rheumatoide Arthritis-, 5 Morbus Crohn- und 1 Colitis ulcerosa-Patienten) und 10 heterologen Epithelien und einem positiven Serum eines Morbus Crohn-Patienten. 4 Seren waren negativ, die anderen zeigten positive Fluoreszenzraten, die aber nicht so hoch waren wie die Ansätze mit den autologen Epithelien.

Ob es sich bei diesen positiven Tests um ein Epiphenomen, oder ob es sich bei der antigenen Determinanten um eine HLA-unabhängige Bindungsstelle handelt, wird noch zu klären sein.

6. Zusammenfassung

In der vorliegende Arbeit wurden Seren von 198 Patienten und Probanden auf Autoantikörper der IgD-Klasse gegen antigene Determinanten der Zellmembranen von Mundschleimhautepithelien und der Colonicarcinom-Zelllinie SW 480 untersucht. Dazu wurden die Seren der Probanden mit autologen Mundschleimhautzellen, in zusätzlichen Experimenten mit heterologen Epithelien oder Zellen der Colonicarcinom-Zelllinie SW 480 inkubiert.

Patienten mit Morbus Crohn (n=20), Colitis ulcerosa (n=11), Rheumatoider Arthritis (n=36), systemischem Lupus erythematodes (n=9), Glomerulonephritis (n=7), chronischer Hepatitis C (n=24) und diversen bakteriellen Infektionen (n=21) und zum Vergleich 71 gesunde freiwillige Probanden wurden in Studie eingeschlossen.

Ein hoch signifikantes Ergebnis konnte für die Patienten mit Morbus Crohn gezeigt werden. Mit einer Spezifität von 89% und einer Sensitivität von 79%

fanden sich hier gegen Mundschleimhaut gerichtete sekretorische IgD-Antikörper.

Ebenso ließen sich eindeutig IgD-Autoantikörperreaktionen mit einer Spezifität von 72% und einer Sensitivität von 79% für die Gruppe der Colitis ulcerosa-Patienten nachweisen.

Ein hohes Signifikanzniveau findet sich weiterhin bei den Patienten mit systemischem Lupus erythematoses mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 79%.

Bei den Patienten mit chronischer Hepatitis C bestand ebenfalls ein hochsignifikanter Unterschied zur gesunden Gruppe, mit einer Spezifität von 87,5% und einer Sensitivität von 79%.

Eine Korrelation zu verschiedenen Entzündungsparametern und Aktivitätsindices ergab sich in keinem Fall.

Bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis, Glomerulonephritis und bakteriellen Infektionen konnte nur vereinzelt sekretorisches IgD gegen Mundschleimhautepithelien nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den gesunden Testpersonen ergab sich daher kein signifikanter Unterschied, da auch bei diesen keine oder nur in Einzelfällen gering erhöhte Fluoreszenzraten festgestellt wurden.

Die Ansätze von sicher IgD-positiven Seren mit heterologen Epithelien ergaben in den meisten Fällen positive Ergebnisse. Die Fluoreszenzraten dieses Ansatzes lagen jedoch niedriger als die Fluoreszenzraten in den Ansätzen mit den autologen Epithelien.

Die Untersuchungen mit Zellen der Colon Carcinom-Zelllinie SW 480 und sicher IgD-positiven Seren waren gänzlich negativ, was darauf hinweist, daß keine antigene Determinante für sekretorisches IgD auf diesen Zellmembranen existiert. Korrelationen zwischen verschiedenen Aktivitätsindices und Entzündungsparametern und den Fluoreszenzraten bestanden nicht.

Ausblick

Die Bindungsstelle des IgD-Antikörper auf den Mundschleimhautepithelien sollte noch charakterisiert werden. Eine Beobachtung der Patienten mit erhöhten Fluoreszenzraten über einen längeren Zeitraum und im Verlauf der Therapie wäre interessant.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Abney, E.R., Parkhouse, R.M. Candidate for immunoglobulin D present on murine B lymphocytes. *Nature* 252 (1974) 600-602
- 2 Adachi, M., Ishizaka, K. IgD-binding factors from mouse T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83 (1986) 7003-7007
- 3 Amin, A.R., Coico, R.F., Finkelmann, F., Siskind, G.W., Thorbecke, G.J. Release of IgD binding factor by T cells under the influence of interleukin 2, interleukin 4, or cross-linked IgD. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85 (1988) 9179-9183
- 4 Amin, A.R., Swenson, C.D., Xue, B., Ishida, Y., Nair, B.G., Patel, T.B., Chused, T.M., Thorbecke, G.J. Regulation of IgD-receptor expression on murine T cells. II. Upregulation of IgD receptors obtained after activation of various intracellular second-messenger systems; tyrosine kinase activity is required for the effect of IgD. *Cell Immunol.* 152 (1993) 422-439
- 5 Amin, A.R., Tamma, S.L., Oppenheim, J.D., Finkelmann, F.D., Kieda, C., Coico, R.F., Thorbecke, G.J. Specificity of the murine IgD receptor on T cells is for N-linked glycans on IgD molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88 (1991) 9238-9242
- 6 Arai, J., Yasukawa, M., Takada, K., Tange, Y., Saiki, O., Horiuchi, T., Tamai, T., Fujita, S. Non X-linked hyper-IgM syndrome with systemic lupus erythematoses. *Clin.Exp.Rheumatol.* 16 (1998) 84-86
- 7 Arpin, C., de Bouteiller, O., Razanajaona, D., Fugier-Vivier, I., Briere, F., Banchereau, J., Lebecque, S., Liu, Y.J. The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated IgVH gene, Cmu-Cdelta switch, and lambda light chain expression. *J.Exp.Med.* 187 (1998) 1169-1178
- 8 Aucouturier, P., Pineau, N., Brugier, J.C., Mihaesco, E., Duarte, F., Skavril, F., Preud'homme, J.L. Jacalin: a new laboratory tool in immunochemistry and cellular immunology. *J.Clin.Lab.Anal.* 3 (1989) 244-251
- 9 Auer, I.O., Grosch, L., Hardörfer, C., Röder, A. Ulcerative colitis specific IgG-autoantibodies against colonic epithelial cancer cells. *Gut* 29 (1988) 1639-1647
- 10 Auer, I.O., Wensinck, F., Röder, A., Merwe, J.P., Schmidt, H., Schuster, S. Untersuchungen zur Frage einer Serodiagnostik des Morbus Crohn. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 108 (1983) 1242-1246
- 11 Avrech, O.M., Samra, Z., Lazarovich, Z., Caspi, E., Jacobovich, A., Somplolinsky, D. Efficacy of the placental barrier for immunoglobulins: correlations between maternal, paternal and fetal immunoglobulin levels. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 103 (1994) 160-165
- 12 Azuma, E., Masuda, S., Hanada, M., Zhou, Y.W., Zhang, S.L., Shibata, T., Komada, Y., Sakurai, M. Hyperimmunoglobulinemia D following cancer chemotherapy. *Oncology* 48 (1991) 387-391

- 13 Bahna, S.L., Heiner, D.C., Horwitz, C.A. Sequential changes of the five immunoglobulin classes and other responses in infectious mononucleosis. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol* 74 (1984) 1-8
- 14 Bahna, S.L., Heiner, D.C., Myhre, B.A. Changes in serum IgD in cigarette smokers. *Clin.Exp.Immunol.* 51 (1983) 624-630
- 15 Bahna, S.L., Tateno, K., Heiner, D.C. Elevated IgD antibodies to wheat in celiac disease. *Ann.Allergy* 44 (1980) 146-151
- 16 Baudner Wick G. and S.Herzog F. "Immunfluoreszenz", Medizin. Verlagsgesellschaft, Marburg/Lahn, 1976, 1-120
- 17 Bauer, K. The occurrence of antigenic determinants of human blood proteins in mammalian plasmas. *Humangenetik* 8 (1969) 27-32
- 18 Bjerke, K., Brandtzaeg, P., Rognum, T.O. Distribution of immunoglobulin producing cells is different in normal human appendix and colon mucosa. *Gut* 27 (1986) 667-674
- 19 Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B.C., Marshak-Rothstein, A. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *PNAS* 97 (2000) 1184-1189
- 20 Brandtzaeg, P. Overview of the mucosal immune system. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 146 (1989) 13-25
- 21 Brandtzaeg, P., Bjerke, K., Kett, K., Kvale, D., Rognum, T.O., Scott, H., Sollid, L.M., Valnes, K. Production and secretion of immunoglobulins in gastrointestinal tract. *Ann.Allergy* 59 (1987) 21-39
- 22 Brandtzaeg, P., Gjeruldsen, S.T., Korsrud, F.R., Baklien, K., Berdal, P., Ek, J. The human secretory immune system shows striking heterogeneity with regard to involvement of J-chain-positive IgD immunocytes. *Ann.Allergy* 59 (1979) 21-39
- 23 Brandtzaeg, P., Karlsson, G., Hansson, G., Petruson, B., Bjorkander, J., Hanson, L.A. Immunohistochemical study of nasal mucosa in patients with selective IgA deficiency. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol* 82 (1987) 483-484
- 24 Brandtzaeg, P., Karlsson, G., Hansson, G., Petruson, B., Bjorkander, J., Hanson, L.A. The clinical condition of IgA-deficient patients related to the porportion of IgD- and IgM-producing cells in their nasal mucosa. *Clin.Exp.Immunol.* 67 (1987) 626-636
- 25 Brink, R., Goodnow, C.C., Basten, A. IgD expression on B cells is more efficient than IgM but both receptors are functionally equivalent in up-regulation CD80/CD86 co-stimulatory molecules. *Eur.J.Immunol.* 25 (1995) 1980-1984
- 26 Brink, R., Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adams, E., Eris, J., Mason, D.Y., Hartley, S.B., Basten, A. Immunoglobuline M and D antigene receptors are both capable of mediating b lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *J.Exp.Med.* 176 (1992) 991-1005
- 27 Butler, J.E. Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals. *Rev.Sci.Techn.* 17 (1998) 43-70

- 28 Cambier, J.C., Vitetta, E.S., Kettman, J.R., Wetzel, G.M., Uhr, J.W. Effect of papain-mediated cleavage of cell surface IgD on tolerance susceptibility of murine B cells. *J.Exp.Med.* 146 (1977) 107-117
- 29 Carsetti, R., Kohler, G., Lamers, M.C. A role for immunoglobulin D: interference with tolerance induction. *Eur.J.Immunol.* 23 (1993) 168-178
- 30 Cederqvist, L.L., Ewool, L.C., Bonsnes, R.W., Litwin, S.D. Detectability and pattern of immunoglobulins in normal amniotic fluid throughout gestation. *Am.J.Obstet.Gynecol.* 130 (1978) 220-224
- 31 Cederqvist, L.L., Ewool, L.C., Litwin, S.D. IgD and the fetal immune response. *Scand.J.Immunol.* 6 (1977) 821-825
- 32 Chapman, R.W., Cottone, M., Selby, W.S.S.H.A., Sherlock, S., Jewell, D.P. Serum autoantibodies, ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 27 (1986) 86-91
- 33 Chen, C.L., Lehmyer, J.E., Cooper, M.D. Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. *J.Immunol.* 129 (1982) 2580-2585
- 34 Chess, C.L., Daniels, J., North, E., Macris, N.T. Serum immunoglobulin elevations in aquired immunodeficiency syndrome (AIDS): IgG, IgA, IgM and IgD. *Diagn.Immunol.* 2 (1984) 148-153
- 35 Coico, R.F., Berzofsky, J.A., York-Jolley, J., Ozaki, S., Siskind, G.W., Thorbecke, G.J. Physiology of IgD. VII. Induction of receptors for IgD on cloned T cells by IgD and interleukin 2. *J.Immunol.* 138 (1987) 4-6
- 36 Coico, R.F., Finkelmann, F.D., Swenson, C.D., Siskind, G.W., Thorbecke, G.J. Exposure to crosslinked IgD induces receptors for IgD on T cells in vivo and in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85 (1988) 559-563
- 37 Coico, R.F., Tamma, S.L., Bessler, M., Wei, C.F., Thorbecke, G.J. IgD-receptor positive human T lymphocytes. I. Modulation of receptor expression by oligomeric IgD and lymphokines. *J.Immunol.* 145 (1990) 3556-3561
- 38 Coico, R.F., Xue, B., Wallace, D., Siskind, G.W., Thorbecke, G.J. Physiology of IgD. VI. Transfer of the immunoenhancing effect of IgD with T delta-containing helper cell populations. *J.Exp.Med.* 162 (1985) 1852-1861
- 39 Colwell, E.J., Bernier, G.M., Fife, E.H. Serum immunoglobulin D and malaria antibodies in South Vietnamese residents. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 65 (1971) 310-314
- 40 Cornall, R.J., Cyster, J.G., Hibbs, M.L., Dunn, A.R., Otipody, K.L., Clark, E.A., Goodnow, C.C. Polygenic autoimmune traits: Lyn, CD22, and SHP-1 are limiting elements of a biochemical pathway regulating BCR signaling and selection. *Immunity* 8 (1998) 497-508
- 41 Corte, G., Ferrarini, M., Tonda, P., Bargellesi, A. Increased serum IgD concentrations in patients with Hodgkin's disease. *Clin.Exp.Immunol.* 28 (1977) 359-362
- 42 Corte, G., Ferraris, A.M., Rees, J.K., Bargellesi, A., Hayhoe, F.G. Correlation of serum IgD level with clinical and histologic parameters in

- Hodgkin disease. *Blood* 52 (1978) 905-910
- 43 Crabbe, P.A., Heremans, J.F. Presence of large numbers of plasma cells containing IgD in the rectal mucosa of a patient with ulcerative colitis. *Acta Clin.Belg.* 21 (1966) 73-83
 - 44 Dunnette, S.L., Gleich, G.J., Weinshilboum, R.M. Inheritance of low serum immunoglobulin D. *J.Clin.Invest.* 62 (1978) 248-255
 - 45 Engel, P., Zhou, L.J., Ord, D.C., Sato, S., Koller, B., Tedder, T.F. Abnormal B lymphocyte development, activation and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *J.Immunol.* 119 (1995) 1727-1731
 - 46 Felsenfeld, O., Wolf, R.H. Immunoglobulins and antibodies in *Borrelia turicatae* infections. *Acta Trop.* 26 (1969) 156-166
 - 47 Finkelmann, F.D., van Boxel, J.A., Asofsky, R., Paul, W.E. Cell membrane IgD: demonstration of IgD on human lymphocytes by enzyme-catalysed iodination and comparison with cell surface Ig of mouse, guinea pig and rabbit. *J.Immunol.* 116 (1976) 1173-1181
 - 48 Finkelmann, F.D., Woods, V.L., Berning, A., Scher, I. Demonstration of mouse serum IgD. *J.Immunol.* 123 (1979) 1253-1259
 - 49 Fiocchi, C., Roche, J.K., Michener, W.M. High prevalence of antibodies to intestinal epithelial antigens in patients with inflammatory bowel disease and their relatives. *Ann.Intern Med.* 110 (1989) 786-794
 - 50 Freier, S., Lebenthal, E., Freier, M., Shah, P.C., Park, B.H., Lee, P.C. IgE and IgD antibodies to cow milk and soy protein in duodenal fluid: effects of pancreozymin and secretin. *Immunology* 49 (1983) 69-75
 - 51 Geny, B., Griscelli, C., Mozziconacci, P. Immunoglobulin D (IgD) in childhood. II. Serum gD levels in juvenile rheumatoid arthritis. *Biomedicine* 20 (1974) 125-130
 - 52 Gleeson, M., Cripps, A.W., Clancy, R.L. Modifiers of the human mucosal immun system. *Immunol.Cell.Biol.* 73 (1995) 397-404
 - 53 Griffiths, R.W., Gleich, G.J. Proteolytic degradation of IgD and its relation to molecular conformation. *J.Bio.Chem.* 247 (1972) 4543-4548
 - 54 Gutowska-Grzegorzczak, G., Baum, J. Serum immunoglobulin and complement interrelationships in juvenile rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 4 (1977) 179-185
 - 55 Haraldsson, A., Weemaes, C.M., Jonasdottir, S., Olafson, O., Van de Wiel, G., Goertz, J., Klasen, I. Serum Immunoglobulin D in infants and children. *Scand.J.Immunol.* 51 (2000) 415-418
 - 56 Harms Volker "Biomathematik, Statistik und Dokumentation", Harms Verlag, Kiel, 1998, 65-73
 - 57 Hermanowicz, A., Sliwinski, Z., Nawarska, Z. Humoral immunsystem and ulcerative colitis activity. I. Serum immunoglobulins and C-reactive protein levels. *Arch.Immunol.Ther.Exp.* 32 (1984) 501-508
 - 58 Hibbs, M.L., Tarlinton, D.M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglitto, R., Stacker, S.A., Dunn, A.R. Multiple defects in the immun system of

- LYN-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* 83 (1995) 301-311
- 59 Hordvik, I., Thevarajan, J., Samdal, I., Bastani, N., Krossoy, B. Molecular cloning and phylogenetic analysis of the atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand.J.Immunol.* 50 (1999) 202-210
 - 60 Jefferis, R., Matthews, J.B., Bayley, P.M. Studies of human IgD myeloma proteins. Circular dichroism of intact protein and some proteolytic fragments. *Immunochemistry* 14 (1977) 393-396
 - 61 Johnson, P.M., Howard, A., Scopes, P.M. The conformation of human immunoglobulin D. *FEBS Lett* 49 (1975) 310-310
 - 62 Josephs, S.H., Buckley, R.H. Serum IgD concentrations in normal infants, children, and adults and in patients with elevated IgE. *J.Pediatr.* 96 (1980) 417-420
 - 63 Kantor, G.L., Van herle, A.J., Barnett, E.V. Autoantibodies of the IgD class. *Clin.Exp.Immunol.* 6 (1970) 951-962
 - 64 Katz, A., Pruzanski, W. IgD deposition in glomerulonephritis. An immunopathologic study. *Am.J.Clin.Pathol.* 63 (1975) 291-299
 - 65 Keller, M.A., Heiner, D.C., Myers, A.S., Reisinger, D.M. IgD in human colostrum. *Pediatr.Res.* 19 (1985) 122-126
 - 66 Kerr, W.G., Hendershot, L.M., Burrows, P.D. Regulation of IgM and IgD expression in human B-lineage cells. *J.Immunol.* 146 (1991) 3314-3321
 - 67 Kholmogorova, G.T., Stefani, D.V. Levels of IgD in patients with rheumatoid arthritis. *Allergol.Immunopathol.* 10 (1982) 211-214
 - 68 Kim, K.M., Reth, M. The B cell antigen receptor of class IgD induces a stronger and more prolonged protein tyrosine phosphorylation than that of class IgM. *J.Exp.Med.* 181 (1995) 1005-1014
 - 69 Kinoshita, T., Nagai, H., Murate, T., Saito, H., Fukatsu, T., Hotta, T. IgD monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Int.J.Hematol.* 65 (1997) 169-172
 - 70 Kohler, P.F., Farr, R.S. Quantitative comparison of immunoglobulins in atopic (reaginic) and nonatopic (nonreaginic) individuals: higher gamma-D levels in atopic sera. *J.Allergy* 39 (1967) 311-322
 - 71 Korsrud, F.R., Brandtzaeg, P. Quantitative immunohistochemistry of immunoglobulin- and J-chain-producing cells in human parotid and submandibular salivary glands. *Immunology* 39 (1980) 129-140
 - 72 Korthauer, U., Graf, D., Mages, H.W., Briere, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A.G., Notarangelo, L.D., Levinsky, R.J., Kroccek, R.A. Defective expression of T cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361 (1993) 539-541
 - 73 Korver, K., Radl, J., Schellekens, P.T., Vossen, J.M. Transient increase of serum IgD levels after allogeneic bone-marrow transplantation. *Clin.Exp.Immunol.* 72 (1988) 337-343
 - 74 Kumano, Y., Nagato, T., Kurihara, K., Kikukawa, H., Goto, M., Kawano, Y., Ohnishi, Y., Inomata, H. Hyperimmunoglobulinemia D in idiopathic

- retinal vasculitis. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 235 (1997) 372-378
- 75 Lee, J.C.W., Cevallos, A.M., Lennard-Jones, J.E., Naeem, A., Farthing, M.J.G. Detection of anti-colon antibodies in inflammatory bowel disease using human cultured colonic cells. *Gut* 44 (1999) 196-202
 - 76 Lees, A., Morris, S.C., Thyphronitis, G., Holmes, J.M., Inman, J.K., Finkelmann, F.D. Rapid stimulation of large specific antibody responses with conjugates of antigen and anti-IgD antibody. *J.Immunol.* 145 (1990) 3594-3600
 - 77 Leslie, G.A., Armen, R.C. Structure and biological functions of human IgD. 3. Phylogenetic studies of IgD. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol* 46 (1974) 191-197
 - 78 Leslie, G.A., Lopez, C.R.H., Holmes, J.N. Structure and biological functions of human IgD. IV. Ontogeny of human serum immunoglobulin D (IgD) as related to IgG, IgA, IgM. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 49 (1975) 350-357
 - 79 Levan-Petit, I., Lelievre, E., Barra, A., Limosin, A., Gombert, B., Preud'homme, J.L., Levron, J.C. Th2 cytokine dependence of IgD production by normal human B cells. *Int.Immunol.* 11 (1999) 1819-1828
 - 80 Lin, C.N., Putnam, F.W. Structural studies of human IgD: isolation by a two-step purification procedure and characterization by chemical and enzymatic fragmentation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76 (1979) 6572-6576
 - 81 Lin, C.N., Putnam, F.W. Primary structure of Fc region of human immunoglobulin D: implication for evolutionary origin and biological functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78 (1981) 504-508
 - 82 Lio, D., Candore, G., Colucci, A.T., Modica, M.A., Caruso, C. IgD serum levels are influenced by HLA-DR phenotype. *Dis.Markers* 10 (1992) 105-108
 - 83 Litwin, S.D., Tse-Eng, D., Butler, V.P., Pernis, B. Studies on human low serum IgD phenotype and Gm markers. *Clin.Genet.* 27 (1985) 134-139
 - 84 Litwin, S.D., Zehr, B.D. In vitro studies on human IgD. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 47 (1988) 75-83
 - 85 Litwin, S.D., Zehr, B.D., Insel, R.A. Selective concentration of IgD class-specific antibodies in human milk. *Clin.Exp.Immunol.* 80 (1990) 263-267
 - 86 Litzman, J., Ward, A.M., Wild, G., Znojil, V., Morgan, G. Serum IgD levels in children under investigation for and with defined immunodeficiency. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol* 114 (1997) 54-58
 - 87 Liu, Y.J., de Bouteiller, O., Arpin, C., Briere, F., Galibert, L., Ho, S., Martinez-Valdez, H., Banchereau, J., Lebecque, S. Normal human IgD+IgM-germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgD transcripts. *Immunity* 4 (1996) 603-613
 - 88 Luster, M.I., Armen, R.C., Hallum, J.V., Ahmed, A., Leslie, G.A. Immunoglobulin class distribution of measles virus antibodies in serum and spinal fluids of patients with subacute sclerosing panencephalitis.

- Int.Arch.Allergy Appl.Immunol 56 (1978) 488-492
- 89 Luster, M.I., Leslie, G.A., Bardana, E.J. Structure and biological functions of human IgD. VI. Serum IgD in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol* 50 (1976) 212-219
- 90 Luster, M.I., Leslie, G.A., Bardana, E.J. Structure and biological functions of human IgD. VII. IgD antinuclear antibodies in sera of patients with autoimmune disorders. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol* 52 (1976) 212-218
- 91 Lutz, C., Ledermann, B., Kosco-Vilbois, M.-H., Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., Kohler, G., Brombacher, F. IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature* 393 (1998) 797-801
- 92 Magnusson, C.G. Maternal smoking influences cord serum IgE and IgD levels and increases the risk for subsequent infant allergy. *J.Allergy Clin.Immunol.* 78 (1986) 898-904
- 93 Magor, B.G., Ross, D.A., Pilstrom, L., Warr, G.W. Transcriptional enhancers and the evolution of the IgH locus. *Immunol.Today* 20 (1999) 13-17
- 94 Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W., Tonegawa, S. The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 24 (1981) 353-365
- 95 Mann, D.L., Hamlin-Green, G., Willoughby, A., Landesmann, S.H. Immunoglobulin class and subclass antibodies to HIV proteins in maternal serum: association with perinatal transmission. *J.Acquir.Immune Defic.Sydr.* 7 (1994) 617-622
- 96 Martin, L.N., Leslie, G.A. Lymphocyte surface IgD and IgM in Macaca monkeys: ontogeny, tissue distribution and occurrence on individual lymphocytes. *Immunology* 33 (1977) 865-872
- 97 Martin, L.N., Leslie, G.A., Hindes, R. Lymphocyte surface IgD and IgM in non-human primates. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol* 51 (1976) 320-329
- 98 McCluskey, R.T. Evidence for immunologic mechanisms in several forms of human glomerular diseases. *Bull.N.Y.Acad.Med.* 46 (1970) 769-788
- 99 McGregor, I.A., Rowe, D.S., Wilson, M., Billewicz, W.Z. Plasma immunoglobulin concentrations in an African (Gambian) community in relation to season, malaria and other infection and pregnancy. *Clin.Exp.Immunol.* 7 (1970) 51-74
- 100 McMillan, B.C., Hanson, R.P., Golubjatnikov, G., Sinha, S.K. The effect of institutionalisation on elevated IgD and IgG levels in patients with Down syndrome. *J.Ment.Defic.Res.* 19 (1975) 209-223
- 101 Melcher, U., Vitetta, E.S., McWilliams, M., Lamm, M.E., Phillips-Quagliata, J.M., Uhr, J.W. Cell surface immunoglobulin. X. Identification of an IgD-like molecule on the surface of murine splenocytes. *J.Exp.Med.* 140 (1974) 1427-1431
- 102 Mellbye, O.J., Lindstorm, F.D., Eberle, B.J., Williams, R.C.j. Reactivity o

- RA and SLE lymphocytes stimulated by anti-Ig antibodies.
Clin.Exp.Immunol. 15 (1973) 157-168
- 103 Merz, H., von Kleist, S., Feller, C.A. Immunreaktionen. In: "Pathologie",
 Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (Hrsg.), Urban und Schwarzenberg,
 München; Wien; Baltimore, 1997, 136-138
- 104 Mizuma, H., Litwin, S.D., Zolla-Pazner, S. B-cell activation in HIV
 infection: relationship of spontaneous immunoglobulin secretion to various
 immunological parameters. *Clin.Exp.Immunol.* 71 (1988) 410-416
- 105 Mizuma, H., Zolla-Pazner, S., Litwin, S.D., el-Sdr, W., Sharpe, S., Zehr,
 B.D., Weiss, S., Saxinger, W.C., Marmor, M. Serum IgD elevation is an
 early marker of B cell activation during infection with human
 immunodeficiency viruses. *Clin.Exp.Immunol.* 68 (1987) 5-14
- 106 Moore, K.W., Rogers, J., Hunkappiler, T., Early, P., Nottenburg, C.,
 Weissmann, I., Bazin, H., Wall, R., Hood, L.E. Expression of IgD may
 use both of DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Nucleic
 Acids Res.* 21 (1981) 1481-1488
- 107 Mortensen, J., Nielsen, S.L., Sorensen, I., Andersen, H.K. Specific serum
 immunoglobulin D, detected by antibody capture enzyme-linked
 immunoabsorbant assay (ELISA), in cytomegalovirus infection.
Clin.Exp.Immunol. 75 (1989) 234-238
- 108 Moskophidis, D., Moskophidis, M., Lohler, J. Virus-specific IgD in acute
 viral infection of mice. *Clin.Exp.Immunol.* 75 (1997) 234-238
- 109 Mountz, J.D., Smith, J., Snapper, C.M., Mushinski, J.F., Finkelmann, F.D.
 Polyclonal activation of the murine immune system by an antibody to IgD.
 VIII. Stimulation of IgD secretion. *J.Immunol.* 139 (1987) 2172-2178
- 110 Muramaki, J., Shimizu, Y., Kashii, Y., Kato, T., Minemura, M., Okada, K.,
 Nambu, S., Takahra, T., Higuchi, K., Maeda, Y., Kumada, T., Watanabe,
 Y. Functional B cell response in intrahepatic lymphoid follicle in chronic
 hepatitis C. *Hepatology* 30 (1999) 143-150
- 111 Mussmann, R., Wilson, M., Marcuz, A., Courtet, M., Du Pasquier, L.
 Membrane exon sequences of the three *Xenopus* Ig-classes explain the
 evolutionary origin of mammalian isotypes. *Eur.J.Immunol.* 26 (1996)
 409-414
- 112 Naessens, J. Surface Ig on B lymphocytes from cattle and sheep.
Int.Immunol. 9 (1997) 349-354
- 113 Neoh, S.H., Jahoda, D.M., Rowe, D.S., Voller, A. Immunoglobulin classes
 in mammalian species identified by cross-reactivity with antisera to human
 immunoglobulin. *Immunochemistry* 10 (1973) 805-813
- 114 Nicholson, I.C., Brisco, M.J., Zola, H. Memory B lymphocytes in human
 tonsil do not express surface IgD. *J.Immunol.* 154 (1995) 1105-1113
- 115 Nishida, Y., Sano, Y., Akaoka, I., Maruki, M., Suzuki, T., Maruki, K.
 Abnormal serum immunoglobulin levels in Down's syndrome patients.
Am.J.Ment.Defic. 83 (1978) 16-20
- 116 Nitschke, L., Kosco, M.H., Kohler, G., Lamers, M.C. Immunoglobuline D-

- deficient mice can mount normal immun responses to thymus independent and dependent antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90 (1993) 1887-1891
- 117 Offord, K.P., Gleich, G.J., Barbee, R.A., Dunette, S.L., Miller, R.D. Serum IgD in subjects with or without chronic obstructive pulmonary disease: a previous finding restudies. *Am.Rev.Respir.Dis.* 126 (1982) 118-120
- 118 Otipody, K.L., Andersson, K.B., Draves, K.E., Klaus, S.J., Farr, A.G., Perlmutter, R.M., Law, C.A., Clark, E.A. CD22 regulates the thymus independent responses and the lifespan of B cells. *Nature* 384 (1998) 634-637
- 119 Out, T.A., Hische, E.A., van Waalbeck, H.K., van der Helm, H.J. Immunglobulin D in cerebrospinal fluid. *Clin.Chim.Acta* 165 (1987) 289-293
- 120 Ownby, D.R., Johnson, C.C., Peterson, E.L. Maternal smoking does not influence cord serum IgE or IgD concentrations. *J.Allergy Clin.Immunol.* 88 (1991) 555-560
- 121 Papadopoulos, N.M., Frieri, M. The presence of immunglobulin D in endocrine disorders and diseases of immunoregulation, including the aquired immunodeficiency syndrome. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 32 (1984) 248-252
- 122 Patrick, B.A., Mehta, P.D., Sobczyk, W., Kulczycki, J. Measels virus-specific immunglobulin D antibody in cerebrospinal fluid and serum from patients with subacute sclerosing panenzephalitis and multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* 26 (1990) 69-74
- 123 Peng, Z., Fisher, R., Adkinson, N.F. Total serum IgD is increased in atopic subjects. *Allergy* 46 (1991) 436-444
- 124 Pernis, B., Brouet, J.C., Seligmann, M. IgD and IgM on the membrane of lymphoid cells in macroglobulinemia. Evidence for identity of membrane IgD and IgM antibody activity in a case with anti-IgG receptors. *Eur.J.Immunol.* 4 (1974) 776-778
- 125 Pernis, B., Forni, I. IgD receptors of lymphoid cells. *Immunol.Commun.* 5 (1976) 807-826
- 126 Plebani, A., Mira, E., Mevio, E., Monafo, V., Notarangelo, L.D., Avanzini, A., Ugazio, A.G. IgM and IgD concentrations in the serum and secretions of children with selective IgA deficiency. *Clin.Exp.Immunol.* 53 (1983) 689-696
- 127 Pope, R.M., Keightley, R., McDuffy, S. Circulating autoantibodies to IgD in rheumatic diseases. *J.Immunol.* 128 (1982) 1860-1863
- 128 Preud'homme, J.L. Loss of surface IgD by human B lymphocytes during polyclonal activation. *Eur.J.Immunol.* 7 (1977) 191-193
- 129 Preud'homme, J.L., Brouet, J.C., Clauvel, J.P., Seligmann, M. Surface IgD in immunoproliferative disorders. *Scand.J.Immunol.* 3 (1974) 853-858
- 130 Preud'homme, J.L., Brouet, J.C., Seligmann, M. Membrane bound IgD on human lymphoid cells, with special reference to immunodeficiency and immunoproliferative diseases. *Immunol.Rev.* 34 (1977) 127-151

- 131 Preud'homme, J.L., Clauvel, J.P., Seligmann, M. Immunglobulin D bearing lymphocytes in primary immunodeficiencies. *J.Immunol.* 114 (1975) 481-485
- 132 Preud'homme, J.L., Petit, I., Barra, A., Morel, F., Lecron, J.-C., Lelievre, E. Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol.Immunol.* 37 (2000) 871-887
- 133 Raiteri, R., Albonico, M., Deiana, R., Marietti, G., Sinicco, A. Serum IgD behaviour in HIV-1 infected patients. *Allergol.Immunopathol.* 19 (1991) 6-10
- 134 Reumaux, D., Meziere, C., Colombel, J.F., Duthilleul, P., Muller, S. Distinct Production of autoantibodies to nuclear components in ulcerative Colitis and in Crohn's disease. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 77 (1995) 349-357
- 135 Revy, P., Muto, T., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-labelouse, R., gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., Durandy, A. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome. *Cell* 102 (2000) 565-575
- 136 Riede, U.N., Wehner, H. Störungen der Individualitätswahrung. In: "Allgemeine und spezielle Pathologie", Riede, U.N., Schaefer, H.E., Wehner, H. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1989, 170-196
- 137 Ritchie, R.F. Two new antinuclear antibodies: their relationship to the homogeneous immunofluorescent pattern. *Arthritis Rheum.* 11 (1968) 37-43
- 138 Rivat, L., Rivat, C., Ropartz, C. Human anti-immunglobulins. Presence of anti IgD and anti IgA in human sera. *Rev.Fr.Transfus.* 16 (1973) 279-287
- 139 Roes, J., Rajewsky, K. Cell autonomous expression of IgD is not essential for the maturation of conventional B cells. *Int.Immunol.* 3 (1991) 1367-1371
- 140 Roes, J., Rajewsky, K. Immunglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. *J.Exp.Med.* 177 (1993) 45-55
- 141 Rogentine, G.N.J., Rowe, D.S., Bradley, J., Waldmann, T.A., Fahey, J.L. Metabolism of human immunglobulin D (IgD). *J.Clin.Invest.* 45 (1966) 1467-1478
- 142 Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D.K. "Kurzes Lehrbuch der Immunologie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 1991, 54-60
- 143 Rostenberg, I., Penazola, R. Serum IgG and ID levels in some infectious and non-infectious diseases. *Clin.Chim.Acta* 85 (1978) 319-321
- 144 Rowe, D.S., Crabbe, P.A., Turner, M.W. Immunglobulin D in serum, body fluids and lymphoid tissue. *Immunology* 3 (1968) 477-490
- 145 Rowe, D.S., Fahey, J.L. A new class of human immunoglobulins. *J.Exp.Med.* 121 (1965) 171-199

- 146 Rowe, D.S., Hug, K., Faulk, W.P., McCormick, J.N., Garber, H. IgD on the surface of peripheral blood lymphocytes of human newborn. *Nature New.Biol.* 242 (1973) 155-157
- 147 Ruddick, J.H., Leslie, G.A. Structure and biologic functions of human IgD. XI. Identification and ontogeny of a rat lymphocyte immunoglobulin having antigenic cross-reactivity with human IgD. *J.Immunol.* 118 (1977) 1025-1031
- 148 Salimonu, L.S., Ladipo, O.A., Adeniran, S.O., Osukoya, B.O. Serum immunoglobulin levels in normal, premature and postmature newborns and their mothers. *Int.J.Gynaecol.Obstet.* 16 (1978) 119-123
- 149 Salonen, E.M., Hovi, T., Meurmann, O., Veskari, T., Vaheri, A. Kinetics of specific IgA, IgD, IgE, IgG and IgM antibody responses in rubella. *J.Med.Virol.* 16 (1985) 1-9
- 150 Sato, S., Miller, A.S., Inaoki, M., Bock, C.B., Jansen, P.J., Tang, M.L.K., Tedder, T.F. CD22 is both a positive and negative regulator of B lymphocyte antigen receptor signal transduction: altered signalling in CD22-deficient mice. *Immunity* 5 (1996) 551-562
- 151 Saulsbury, F.T. Increased serum IgD concentrations in children with Henoch-Schonlein purpura. *Br.J.Rheumatol.* 37 (1998) 570-572
- 152 Savitri, K., Sehgal, S., Datta, B.N., Chugh, K.S. Class specific antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. *Indian J.Med.Res.* 98 (1993) 27-29
- 153 Scully, C., Yap, P.L., Boyle, P. IgE and IgD concentrations in patients with recurrent aphthous stomatitis. *Arch.Dermatol.* 119 (1983) 31-34
- 154 Seger, R., Buchinger, G., Stroder, J. On the influence of age on the immunity in Down syndrome. *Eur.J.Pediatr.* 124 (1977) 77-87
- 155 Seidel, B.M., Schubert, S., Schulze, B., Borte, M. Secretory IgA, free secretory component and IgD in saliva of newborn infants. *Early Human Develop.* 62 (2001) 159-164
- 156 Sewell, H.F., Chambers, L., Maxwell, V., Matthews, J.B., Jefferis, R. The natural antibody response to E.coli includes antibodies of the IgD class. *Clin.Exp.Immunol.* 31 (1978) 104-110
- 157 Sharief, M.K., Hentges, R. Importance of intrathecal synthesis of IgD in multiple sclerosis. A combined clinical, immunologic, and magnetic resonance imaging study. *Arch.Neurol.* 48 (1991) 1076-1079
- 158 Shirai, A., Aoki, I., Otani, M., Mond, J.J., Klinman, D.M. Treatment with dextran-conjugated anti-IgD delays the development of autoimmunity in MRL-lpr/lpr mice. *J.Immunol.* 15 (1994) 1889-1894
- 159 Siegel, S. "Nichtparametrische statistische Methoden", Fachbuchhandlung für Psychologie, Verlagsabteilung, Frankfurt am Main, 1976, 7-33
- 160 Simil, S., Kouvalainen, K., Lanning, M. Serum immunoglobulin levels in the course of anaphylactoid purpura in children. *Acta Paediatr.Scand* 66 (1977) 537-540
- 161 Sjöberg, O. Presence of Receptors for IgD on Human T and Non-T

- Lymphocytes. *Scand.J.Immunol.* 11 (1980) 377-382
- 162 Soltöft, J., Söeberg, B. Immunglobulin containing cells in the small intestine during acute enteritis. *Gut* 13 (1972) 535-538
- 163 Spiegelberd, H.L. Structure and biology of human IgD. *Immunol.Rev.* 37 (1977) 3-24
- 164 Steibl, B. 1995. Antiepithele Autoantikörper und Klasse II-Antigenexpression bei Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes. 1-86. II. Medizinische Klinik und Poliklinik der TU München, Klinikum rechts der Isar. (GENERIC)
Ref Type: Thesis/Dissertation
- 165 Stevens, T.R.J., Harley, S.L., Groom, J.S., Cambridge, G., Leaker, B., Blake, D.R., Rampton, D.S. Anti endothelial Cell antibodies in inflammatory bowel disease. *Dig.Dis.Sci.* 38 (1993) 426-432
- 166 Stevens, W.J., De Backer, W., Vermeire, P.A. Serum IgA, IgM and IgD in allergic (type 1) and non allergic respiratory diseases. *Clin.Allergy* 13 (1983) 11-19
- 167 Stiles, Stobo, Wells "Basic and clinical Immunology", Appleton und Lange Verlag, London, 1987, 268-269
- 168 Stoica, G., Angelescu, M., Michiu, V., Stoica, R.C., Marta, R. Concentration of serum immunglobulins in acute and chronic hepatitis diseases. I. Serum levels of IgG, IgA, IgM and IgD in young patients with viral hepatitis. *Med.Interne* 17 (1979) 35-47
- 169 Stoica, G., Angelescu, M., Miron, C., Michiu, V., Stoica, R.C. Concentration of serum immunglobulins in acute and chronic hepatic diseases. II. Viral hepatitis; time-dependent changes in immunoglobulin concentration. *Med.Interne* 17 (1979) 49-57
- 170 Stoica, G., Macarie, E., Michiu, V., Stoica, R.C. Biologic variation of human immunglobulin concentration. I. Sex-age specific effects on serum levels of IgD, IgA, IgM and IgD. *Med.Interne* 18 (1980) 323-332
- 171 Stöcker, W., Otte, M., Ulrich, S., Normann, D., Stöcker, K., Jantschek, G. Autoantikörper gegen exokrines Pankreas und gegen intestinale Becherzellen in der Diagnostik des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 109 (1984) 1963-1969
- 172 Stryer Lubert "Biochemie", Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin; Oxford; 1996, 381-410
- 173 Surjan, L., Brandtzaeg, P., Berdal, P. Immunglobulin systems of human tonsils. II. Patients with chronic tonsillitis or tonsillar hyperplasia: quantification of Ig-producing cells, tonsillar morphometry and serum Ig concentrations. *Clin.Exp.Immunol.* 31 (1978) 382-390
- 174 Swenson, C.D., Amin, A.R., Xue, B., Thorbecke, G.J. Regulation of IgD receptor expression on murine T cells. I. Characterization and metabolic requirements of the process leading to their expression. *Cell Immunol.* 152 (1993) 405-421
- 175 Swenson, C.D., Cherniak, E.P., Russo, C., Thorbecke, G.J. IgD-receptor

- upregulation on human peripheral blood T cells in response to IgD in vitro or antigen in vivo correlates with the antibody response to influenza vaccination. *Eur.J.Immunol.* 26 (1996) 340-344
- 176 Swenson, C.D., Thorbecke, G.J. The effect of aging on IgD receptor expression by T cells and its functional implications. *Immunol.Rev.* 160 (1997) 145-157
- 177 Swenson, C.D., Van Vollenhoven, R.F., Xue, B., Siskind, G.W., Thorbecke, G.J., Coico, R.F. Physiology of IgD. IX. Effect of IgD on immunoglobulin production in young and old mice. *Eur.J.Immunol.* 18 (1988) 13-20
- 178 Tadashi Kawai "Clinical Aspects of The Plasma Proteins", Igaku Shoin LTD., Tokyo, 1973, 56
- 179 Takagaki, Y., Manley, J.L. Levels of polyadenylation factor CstF-64 control IgM heavy chain mRNA accumulation and other events associated with B-cell differentiation. *Mol.Cell.* 2 (1998) 761-771
- 180 Takagaki, Y., Seipelt, R.L., Peterson, M.L., Manley, J.L. The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation. *Cell* 87 (1996) 941-952
- 181 Tamma, S.L., Amin, A.R., Finkelmann, F.D., Chen, Y.W., Thorbecke, G.J., Coico, R.F. IgD receptors on murine T-helper cells bind to Fd and Fc regions of immunoglobulin D. *J.Immunol.* 148 (1991) 2050-2057
- 182 Tamma, S.L., Coico, R.F. IgD receptor positive human T lymphocytes. II. Identification and partial characterization of human IgD binding factor. *J.Immunol.* 148 (1992) 2050-2057
- 183 Tarantino, A., Imbasciati, E., Limido, D., Pietrogrande, M., Ponticelli, C. Deposits of IgD in renal disease. Immunohistological study of 180 renal biopsies. *Eur.J.Clin.Invest.* 4 (1974) 175-180
- 184 Tizard, I.R. "Immunology - an introduction", Saunders College Publishing. (Hrsg.) The Dryden Press, Philadelphia, 1985, 80-103
- 185 van Boxel, J.A., Paul, W.E., Terry, W.D., Green, I. IgD-bearing human lymphocytes. *J.Immunol.* 109 (1972) 648-651
- 186 Voigtländer, V. Allergische Krankheiten. In: "Dermatologie", Bob, A., Bob, K. (Hrsg.), Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1991, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage, 49-84
- 187 Vorlaender, K.O. "Immunologie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 1983, 1-764
- 188 Walker, J.E.G. Possible diagnostic Test for Crohn's disease by use of buccal mucosa. *Lancet* 1978) 759-760
- 189 Walzer, P.D., Armstrong, D., Weisman, P., Tan, C. Serum immunoglobulin levels in childhood Hodgkin's disease. Effect of splenectomy and long-term follow-up. *Cancer* 45 (1980) 2084-2089
- 190 Wei, C.F., Lakshmi Tamma, S., Coico, R.F., Swenson, C.D., Secord, E.A., Amin, A.R., Thorbecke, G.J. The IgD receptor positive human T lymphocytes II: total absence of any IgD-receptor expression in a large

- percentage of healthy aged individuals. *Aging Immunol.Infect.Dis.* 4 (1993) 169-185
- 191 Weiss, Ch., Jelkmann, W. Funktionen des Blutes. In: "Physiologie des Menschen", Schmidt, R.F., Thews, G. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1995, 26.Auflage, 435-444
- 192 Weiss, E.A., Tucker, P.W., Finkelmann, F.D., Yuan, D. Analysis of immunoglobulin heavy chain delta transcription termination in the production of delta S or delta M mRNA. *Mol.Immunol.* 28 (1991) 687-695
- 193 Wheatley, S.P., Wang, Y. Indirect Immunofluorescence Microscopy in Cultured Cells. *Methods in Cell Biology* 57 (1998) 313-332
- 194 Wiik, A., Permin, H. The prevalence and possible significance of IgD granulocyte-specific antinuclear antibodies in neutropenic and non-neutropenic cases of rheumatoid arthritis. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 86 (1978) 19-22
- 195 Wilson, M., Bengten, E., Miller, N.W., Clem, L.W., Du Pasquier, L., Warr, G.W. Receptor revision of immunoglobulin heavy chain variable region genes in normal human B lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94 (1997) 4593-4597
- 196 Zegers, B.J., Stoop, J.W., Reerink-Brongers, E.E., Sander, P.C., Aalberse, R.C., Ballieux, R.E. Serum Immunoglobulins in healthy children and adults. Levels of five classes, expressed in international units per millilitre. *Clin.Chim.Acta* 65 (1975) 319-329
- 197 Zegers, B.J., van der Giessen, M., Reerink-Brongers, E.E., Stoop, J.W. The serum IgG subclass levels in healthy infants of 13-62 weeks of age. *Clin.Chim.Acta* 101 (1980) 265-269
- 198 Zehr, B.D., Litwin, S.D. Human IgD and IgA1 compete for D-galactose-related binding sites on lectin jacalin. *Scand.J.Immunol.* 26 (1987) 229-236
- 199 Zeiss C. "Photomikroskop III für Durch- und Auflicht; Gebrauchsanleitung", Oberkochen, 1983, 22-25
- 200 Zhang, M., Niehus, J., Brunnee, T., Klein-Tebbe, J., O'Connor, A., Kundel, G. Measurement of allergen-specific IgD and correlation with allergen-specific IgE. *Scand.J.Immunol.* 40 (1994) 502-508

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Prinzips der indirekten Immunfluoreszenzmethode zum Nachweis antiepithelialer Antikörper der Immunglobulinfraktion IgD

Abbildung 2a und 2b: Algorithmus des Immunfluoreszenztests zum Nachweis von antiepithelialen Antikörpern der Klasse IgD

Abbildung 3: Verschiedene Epithelzellen/Verbände der Mundschleimhaut mit typischer Fluoreszenz nach Markierung (Auflicht, 320fache Vergrößerung), rechts oben negative Kontrolle.

Abbildung 4: Morbus Crohn: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots (n=19).

Abbildung 5: Darstellung des Δf (in %) von Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots.

Abbildung 6: Colitis ulcerosa: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots (n=11).

Abbildung 7: Darstellung des Δf (in %) von Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots.

Abbildung 8: Rheumatoide Arthritis: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots (n=36).

Abbildung 9: Darstellung des Δf (in %) von Rheumatoide Arthritis-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots.

Abbildung 10: Systemischer Lupus erythematoses: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots (n=9).

Abbildung 11: Darstellung des Δf (in %) von Systemischer Lupus erythematoses-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots.

Abbildung 12: Glomerulonephritis: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle)

inkubiert worden waren, als Boxplots (n=7).

Abbildung 13: Darstellung des Δf (in %) von Glomerulonephritis-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots.

Abbildung 14: Chronische Hepatitis C: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots (n=24).

Abbildung 15: Darstellung des Δf (in %) von Chronische Hepatitis C-Patienten im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots.

Abbildung 16: Systemische bakterielle Infektionen: Darstellung der IgD-positiven Epithelzellen (in %), die je mit Serum (Serumansatz) und ohne Serum (Konjugatkontrolle) inkubiert worden waren, als Boxplots (n=21).

Abbildung 17: Darstellung des Δf (in %) von Patienten mit systemischen bakteriellen Infektionen im Vergleich zur gesunden Vergleichsgruppe als Boxplots.

Abbildung 18: Korrelation der IgD-positiven Epithelzellen (in %) mit dem Entzündungsparameter CRP für alle Diagnosegruppen.

Abbildung 19: Aufbau eines IgD-Moleküls.

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosen, Anzahl, Geschlecht. Durchschnitts-, minimales und maximales Alter der Patienten, bei denen IgD-Antikörper gesucht wurden.

Tabelle 2: Aulistung der Störfaktoren

Tabelle 3: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der gesunden Vergleichsgruppe.

Tabelle 4: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Morbus Crohn-Patienten.

Tabelle 5: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Colitis ulcerosa-Patienten.

Tabelle 6: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Patienten mit Rheumatoider Arthritis.

Tabelle 7: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Patienten mit systemischem Lupus erythematoses.

Tabelle 8: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Glomerulonephritis-Patienten

Tabelle 9: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Patienten mit chronischer Hepatitis C.

Tabelle 10: Median M, sowie die 25%- und 75%-Perzentile (Q1 und Q3), Minimum und Maximum der IgD-positiven Epithelzellen (in %) der Patienten mit bakteriellen Infektionen.

Tabelle 11: Sensitivität, Spezifität und prädiktiver Wert des positiven und negativen Ergebnisses (\hat{i}_{pos} und \hat{i}_{neg}) des indirekten Immunfluoreszenztests für die Diagnosegruppen Morbus Crohn, Systemischer Lupus erythematoses und chronische Hepatitis C.

10. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ch. Lersch, danke ich für die Überlassung des Themas, sowie für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion und Unterstützung der Arbeit. Als jederzeit bereiter Ansprechpartner hat er mir mit Geduld und großer Hilfsbereitschaft die Grundlagen wissenschaftlicher Arbeit vermittelt.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen akademischen Lehrern, Herrn Prof. Dr. med. M. Classen, Herrn Prof. Dr. med. R. M. Schmid und Herrn Prof. Dr. med. V. Schusdziarra für die freundliche Aufnahme an Ihrer Klinik und die Bereitstellung der technischen Einrichtungen.

Dank sage ich weiterhin Herrn Dr. med. B. Marstaller für Anleitung und wissenschaftliche Betreuung.

Auch Herrn Dr. M. Hennig möchte ich für Beratung und Anleitung der statistischen Auswertung danken.

Vor allem möchte ich aber meinem Ehemann, meinen Eltern und Schwiegereltern danken, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Storr, geb. Maier
Vorname: Constanze
Eltern: Horst Maier, Dipl. Betriebswirt
Ingeborg Maier, Industriekauffrau
Geburtsdatum: 10.10.1975
Geburtsort: Landsberg/Lech
Anschrift: Franz-Senn-Str. 9
81377 München
Familienstand: verheiratet mit Dr. Martin Storr
Kinder: Leopold Storr, 3 Jahre

Schulbildung:

1982-1986 Grundschule, Buchloe
1986-1988 Joseph-Bernhart-Gymnasium, Türkheim
1988-1995 Luitpold-Gymnasium, Wasserburg am Inn
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

Studiengang Humanmedizin

1995-2002 Technische Universität München
1998 Ärztliche Vorprüfung
1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

Oktober `01- Februar `02 Urologie, Klinikum rechts der Isar
Februar `02 - Juni `02 Chirurgie, Klinikum rechts der Isar
Juni `02 – September `02 Innere Medizin, Klinikum rechts der Isar

ÄiP:

Seit 1. Dezember 2002 in der internistischen Gemeinschaftspraxis Drs. Koemm, Thelen, Lautenschütz, Schiessel, Germering