

**Analyse von Anti-Endothelzell-Antikörpern (AECA)
sowie vitronektin- und fibronektinhaltiger Immunkomplexe
bei den primären systemischen Vaskulitiden
Wegener-Granulomatose und Churg-Strauss-Syndrom**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Karen Mähnß
Kiel 2000

Berichte aus der Medizin

Karen Mähnß

**Analyse von Anti-Endothelzell-Antikörpern sowie
vitronektin- und fibronektinhaltiger Immunkomplexe
bei den primären systemischen Vaskulitiden
Wegener-Granulomatose und
Churg-Strauss-Syndrom**

Shaker Verlag
Aachen 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Mähnß, Karen:

Analyse von Anti-Endothelzell-Antikörpern sowie vitronektin- und fibronektinhaltiger Immunkomplexe bei den primären systemischen Vaskulitiden Wegener Granulomatose und Churg-Strauss-Syndrom/Karen Mähnß.

Aachen : Shaker, 2000

(Berichte aus der Medizin)

Zugl.: Kiel, Univ., Diss., 2000

ISBN 3-8265-7754-X

Copyright Shaker Verlag 2000

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-7754-X

ISSN 0945-0890

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Lemke für die Betreuung, immerwährende Gesprächsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit. Er ließ mir viele Freiheiten bei der Organisation meiner Arbeit sowie des Denkens.

Herrn Prof. Dr. Havsteen danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Krupinska für die Übernahme des Hauptreferates dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wünnenberg für die Begleitung durch mein Studium der Zoologie.

Herrn Dr. Schmitt, Rheumatologie Mannheim, danke ich für eine sehr kooperative Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Gross und Frau Dr. Csernok, Rheumaklinik Bad Bramstedt, danke ich für die Initiierung und Unterstützung des BMBF-Projektes 01 VM 9307, von dem ich ein Teilstück bearbeiten konnte.

Den Mitarbeitern des Forschungslabors der medizinischen Krankenhausabteilung in der Rheumaklinik Bad Bramstedt danke ich für Bereitstellung vieler Informationen, Seren und Reagenzien, besonders möchte ich Frau Monika Backes für die Durchführung der AECA- und ANCA-Testung danken.

Dem Bundesministerium für Forschung und Technologie danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Großer Dank gilt meinen Kollegen, die meine Arbeit mit einem schönen Arbeitsklima, Gedankenaustausch und zahlreichen Anregungen unterstützt haben: Kristine Pisot, Dr. Hinrich Hansen, Dr. Hermann-Josef Thierse, Stephen Wohlert, Thilo Mokros, Dagmar Böltes, Sebastian Dietrich, Andreas Recke, Sergey Jazynin, Paul Suchan, Berit Kiesch, Isabelle Linden, Marcus Otto, Iris Klaehn, Dr. Jörg Kobarg, Olli Annaker, Dr. Christian Rees und Werner Meinert, außerdem allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Schauer, Prof. Dr. Gieselmann, Prof. Dr. Busse und Prof. Dr. Mentlein.

Weiterhin möchte ich Frau Jenny Brackel für die Durchführung einiger Western Blots danken.

Herrn Pokojski, Herrn Wendt und Herrn Rathje danke ich für Hilfestellung bei technischen Problemen und Reparaturarbeiten.

Frau Stimm, Frau Stolzenberg, Frau Schiemens und Frau Lehrke habe ich für organisatorische Angelegenheiten herzlich zu danken.

Den Korrekturlesern Ullvi Bluhm, Marcus Otto, Andreas Recke und Birgit Mähnß danke ich für die Eliminierung vieler Fehler.

Stefan danke ich für seine Bestärkungen und unendliche Geduld.

Mein letzter, besonders großer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Fürsorge mir dies nicht möglich gewesen wäre.

*Freude und Wissen sind die einzigen Güter,
die sich durch Teilen vermehren.*

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Vaskulitis	1
1.2 Autoimmun bedingte Vaskulitiden	2
1.2.1 Wegener-Granulomatose	3
1.2.2 Churg-Strauss-Syndrom	6
1.3 Anti-Endothelzell-Antikörper (AECA)	6
1.4 Vorarbeiten zur Identifizierung von endothelialen Autoantigenen	8
1.5. Fragestellung der Arbeit	10
1.5.1 Untersuchungen von vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexen	10
1.5.2 Untersuchungen zu den Eigenschaften der AECA und Identifizierung von AECA-Antigenen	11
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Pufferzusammensetzungen	13
2.2 Serum	13
2.3 Untersuchungen von vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexen	14
2.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Fibronektin	14
2.3.1.1 Immunisierung	14
2.3.1.2 Zellkultur	14
2.3.1.3 Testen der Kulturüberstände	18
2.3.1.4 Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper	18
2.3.1.5 Reinigung von monoklonalen Antikörpern	19
2.3.1.6 Bestimmung von Antikörperkonzentrationen	19
2.3.1.7 Kopplung und Markierung von Antikörpern	20
2.3.2 Kooperativer Bindungstest: Nachweis von vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexen in Humanseren	22
2.3.2.1 Subklassenbestimmung der in Immunkomplexen gebundenen Antikörper	25
2.3.3 Bindung von humanen Antikörpern an Vitronektin und Fibronektin	26
2.3.4 Kompetitionstest von fibronektinhaltigen Immunkomplexen durch lösliches Fibronektin oder Heparin	26
2.3.5 Adsorption von Immunkomplexen	27
2.3.5.1 Adsorption fibronektinhaltiger Immunkomplexe	27
2.3.5.2 Adsorption von Immunkomplexen an Endothelzellen / Bestimmung von AECA im Zell-ELISA	27
2.3.6 Überprüfung des Vorkommens von Vitronektin in fibronektinhaltigen Immunkomplexen	28
2.3.7 Bindung von Immunkomplexen an Heparin/BSA	28
2.3.8 Bestimmung der Konzentration von Fibronektin im Serum	28
2.3.9 Bestimmung der Konzentration von Vitronektin im Serum	29
2.3.10 Trennung der Immunkomplexe von den übrigen Serumkomponenten mittels Gelfiltration / FPLC (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)	30
2.4 Untersuchungen zu den Eigenschaften der AECA und Identifizierung von AECA-Antigenen	31
2.4.1 Untersuchung von AECA-Antigenen mittels <i>Western Blot</i>	31

2.4.1.1 Zelllinien	31
2.4.1.2 Gewinnung von HUVEC	31
2.4.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) / <i>Western Blot</i>	32
2.4.2 Untersuchung von AECA-Antigenen mittels einer Phagen-Expressions cDNA-Bibliothek	36
2.4.2.1 Herstellung der cDNA-Bibliothek	36
2.4.2.2 Klonierung in T7-Phagen	39
2.4.2.3 Anreicherung gesuchter Phagen (<i>Biopanning</i>) / Plaque-Test	41
2.4.2.4 Sequenzierung positiver Phagenklone	43
2.5 Statistik	44

3 ERGEBNISSE	45
3.1 Untersuchungen von vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexen	45
3.1.1 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Fibronektin	45
3.1.2 Serummarker von Patienten und Gesunden	45
3.1.2.1 Kooperativer Bindungstest: Messung von vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexen	45
3.1.2.2 Subklassenbestimmung der in den Immunkomplexen gebundenen Antikörper	52
3.1.2.3 Bindung von humanen Antikörpern an Vitronektin und Fibronektin	54
3.1.2.4 Verdrängung fibronektinhaltiger Immunkomplexe durch lösliches Fibronektin	55
3.1.2.5 Adsorption von Immunkomplexen durch Immunpräzipitation oder durch Wechselwirkung mit Endothelzellen	56
3.1.2.6 Überprüfung des Vorkommens von Vitronektin in fibronektinhaltigen Immunkomplexen zeigt gemeinsames Auftreten der Immunkomplexe	58
3.1.2.7 Bindung von Immunkomplexen an Heparin / Verdrängung von Immunkomplexen durch Heparin	59
3.1.2.8 Trennung der Immunkomplexe von den übrigen Serumkomponenten	60
3.1.2.9 Zusammensetzung der Immunkomplexe	62
3.1.2.10 Konzentration von Fibronektin und Vitronektin im Serum	65
3.1.2.11 Zusammenfassung der Ergebnisse zu den vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexen	66
3.2 Untersuchungen zu den Eigenschaften der AECA und Identifizierung von AECA-Antigenen	68
3.2.1 Untersuchung von AECA-Autoantigenen mittels <i>Western Blot</i>	68
3.2.1.1 Zusammenfassung der Analyse von AECA-Antigenen im <i>Western Blot</i>	71
3.2.2 Untersuchung von AECA-Autoantigenen mittels einer Phagen-Expressions cDNA-Bibliothek	72
3.2.2.1 Überprüfung der Qualität der Phagen-Bibliothek	73
3.2.2.2 Positivkontrollversuch: Anreicherung von Phagen, die den von Willebrand Faktor oder Teile davon in ihrer Hülle tragen	74
3.2.2.3 Anreicherung von Phagen, die durch Antikörper aus Patientenserum erkannt werden	75
3.2.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Analyse von AECA-Antigenen durch eine Phagen-Expressions cDNA-Bibliothek	77

4 DISKUSSION	79
4.1 Untersuchung von vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexen	79
4.1.2 Assoziation vitronektin- und fibronektinhaltiger Immunkomplexe mit verschiedenen Erkrankungen	79
4.1.2.1 Eigenschaften des Vitro- und Fibronektins	81
4.1.3 Eigenschaften der vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexe	84
4.1.4 Zusammensetzung der vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexe	86
4.1.5 Wechselwirkungen der vitronektin- und fibronektinhaltigen Immunkomplexe mit dem Endothel	89
4.2 Untersuchungen zu den Eigenschaften der AECA und Identifizierung von AECA-Antigenen	90
4.2.1 Untersuchung von AECA-Antigenen mittels <i>Western Blot</i>	90
4.2.2 Untersuchung von AECA-Antigenen mittels einer Phagen-Expressions cDNA-Bibliothek	92
5 ZUSAMMENFASSUNG	95
6 LITERATUR	97

Abkürzungsverzeichnis

α	anti	hIg	human Immunglobulin
A	Adenosin	HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
APLA	anti-Phospholipid-Antikörper	IC	Immunkomplex
<i>Aqua dem.</i>	demineralisiertes Wasser	Ig	Immunglobulin
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenz-thiazolinsulfonat (6)]	IP	Immunpräzipitation
AECA	Anti-Endothelzell-Antikörper	IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Ak	Antikörper	LBA	<i>Luria Broth</i> / Ampicillin
ANCA	Anti-Neutrophilzell-Antikörper	LW	Leerwert
AP	Alkalische Phosphatase	M	Molekulargewichtsstandard/ Molarität
ATIII	Antithrombin III	mAk	monoklonale(r) Antikörper
BSS	<i>Balanced Salt Solution</i>	mIg	Maus Immunglobulin
C	Cytosin	mRNA	Boten (<i>messenger</i>)-RNA
C1q	Komplementfaktor C1q	MW	Meßwert
C3	Komplementfaktor C3	NAk	Nachweisantikörper
cDNA	komplementäre DNA	NS	Normalserum
CR1	Komplementrezeptor für C3b	P	statistischer Wert, signifikante Unterschiede bei $P < 0,05$
CSS	Churg-Strauss-Syndrom	P:C:I	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat	PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
dGTP	Desoxy-Guanidintriphosphat	PCR	Polymerasekettenreaktion
dm ⁵ CTP	methyliertes dCTP	pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	POD	Peroxidase
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat	PVDF	Polyvinylidendifluorid
DTT	Dithiothreitol	RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat	rIg	Kaninchen Immunglobulin
E	Extinktion / Absorption	RNA	Ribonukleinsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	RNase	Ribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>	SLE	systemischer <i>Lupus erythematoses</i>
FAk	Fangantikörper	T	Thymin
Fbn	Fibrinogen	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Fc γ R	IgG-Rezeptor	TC	<i>Tissue Culture</i>
FCS	Fötales Kälberserum	TEMED	Tetramethylethylendiamin
FN	Fibronektin	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>	UPAR	Urokinaserezeptor (CD87)
G	Guanin	VN	Vitronektin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	vWF	von Willebrand Faktor
HAT	Hypoxanthin - Aminopterin - Thymin	WG	Wegener-Granulomatose
HG	Testhintergrundreaktion		