

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

Zusammenfassung

Die Ursachen der primären systemischen Vaskulitiden Wegener-Granulomatose und Churg-Strauss-Syndrom sind bislang unbekannt. Es wird ein immunologischer Ursprung vermutet, da sich im Serum dieser Patienten häufig Autoantikörper finden, die gegen lysosomale Antigene aus neutrophilen Granulozyten gerichtet sind (*Anti Neutrophil Cell Antibodies*, ANCA). Die ANCA werden als diagnostisches Kriterium und zur Verlaufskontrolle besonders des Morbus Wegener eingesetzt. Ihr Beitrag zur Entstehung der generalisierten Entzündung vor allem kleinerer Blutgefäße ist jedoch immer noch unklar. So rückten Autoantikörper, die sich gegen das Endothel selbst richten (*Anti Endothelial Cell Antibodies*, AECA), in den Mittelpunkt. Diese könnten bei Bindung an die Blutgefäße Effektormechanismen aktivieren, die eine Entzündung herbeiführen. Die zellulären Strukturen, an die die AECA binden, sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei Ansätzen versucht, AECA-Autoantigene zu analysieren. Einmal wurden monoklonale Antikörper gegen Endothelzellen der humanen Nabelschnur (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) hergestellt. Diese wurden, zusammen mit käuflichen monoklonalen Antikörpern gegen Antigene der extrazellulären Matrix und bekannter endothelialer Antigene, in einem kooperativen Bindungstest eingesetzt. Dabei wurden die monoklonalen Antikörper als Fangantikörper für endotheliale Antigene genutzt. Eine Bindung von humanen Antikörpern an diese wurde durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen. Bei diesem Test führten vitronektin- und fibronektin-spezifische Antikörper zu einer erhöhten Bindung von Antikörpern aus Patientenserum im Vergleich zu Normalserum. Eine Zugabe von Solubilisat aus Endothelzellen war dabei nicht notwendig, so daß es sich um im Serum präformiert vorliegende Immunkomplexe handeln mußte. Vitronektin (VN) und Fibronektin (FN) selbst konnten als Antigene ausgeschlossen werden. Der Vergleich der Konzentrationen dieser Immunkomplexe bei verschiedenen Krankheiten zeigte, daß sie in geringerer Konzentration auch bei rheumatoider Arthritis, systemischem *Lupus erythematoses* und Sepsis auftraten. Ein Vergleich mit den Krankheitsaktivitäten der Vaskulitispatienten zum Zeitpunkt der Bestimmung erwies, daß die Immunkomplexe den Veränderungen folgten, wobei ihre Konzentrationen durch kurzfristige Verlaufsänderungen jedoch weitgehend unbeeindruckt blieben. Dies macht die Immunkomplexe möglicherweise zu einem diagnostischen Parameter, der eine längerfristige Abschätzung des Risikos eines Rezidives ermöglicht. Weitere Untersuchungen zeigten, daß

die beteiligten Immunglobuline polyklonalen Ursprungs sind und eine Kälteabilität zeigen. So sank die Konzentration der Immunkomplexe bei 37 °C auf etwa 60 % der ursprünglichen Werte. Die Größe der Immunkomplexe wurde durch Größenfraktionierung auf 650 bis 1200 kDa geschätzt. Die VN-haltigen Immunkomplexe enthalten keine Komplementfaktoren, während bei den FN-haltigen Immunkomplexen möglicherweise C3 beteiligt ist. Die Immunkomplexe können mit dem Endothel wechselwirken, denn ihre Konzentrationen konnten durch Inkubation mit HUVEC um 17 % (FN-haltige) beziehungsweise 35 % (VN-haltige) vermindert werden. Eine FN-Depletion von vier Patientenseren führte umgekehrt zu einer geringeren Bindung von AECA an HUVEC. Es liegen somit VN- und FN-haltige Immunkomplexe im Serum von Patienten mit primärer systemischer Vaskulitis vor, die in der Lage sind, an Endothelzellen zu binden, wodurch eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten und folgende Entzündungsreaktionen bewirkt werden könnten.

Der strukturellen Aufklärung von AECA-Antigenen leisteten oben beschriebene Versuche keinen Beitrag. Deshalb wurden Solubilisate von HUVEC, Epithelzellen sowie Nierenzellen einer anderen Spezies in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die Bindung humaner Antikörper aus Seren von Erkrankten und Gesunden an diese zellulären Antigene wurde durch entsprechende Sekundärantikörper untersucht. Hierbei zeigte sich, daß Normal- und Patientenseren gleichermaßen an eine Vielzahl zellulärer Antigene banden, wobei aber kein Antigen bevorzugt erkannt wurde. Alle Zellarten wurden zudem gleichermaßen erkannt, und endothelzellspezifische Bindungen konnten im *Western Blot* nicht nachgewiesen werden.

Weiter wurde eine cDNA-Bibliothek aus HUVEC hergestellt, deren Produkte im Kapsid von T7-Phagen exprimiert wurden. Durch Affinitätschromatographie wurden Phagen angereichert, die von Antikörpern aus Patientenseren gebunden wurden. Diese wurden jedoch trotz Voradsorption auch von Normalseren gebunden. Die einzige Ausnahme stellten Poly-Lysin-haltige Phagen dar. Diese Daten werden dahingehend interpretiert, daß im Serum von Erkrankten Antikörper vorliegen, die mit kationischen Proteinen wechselwirken, wie es beispielsweise das β 2-Glykoprotein I oder Proteinase 3 und Myeloperoxidase - die Hauptantigene der ANCA - sind. Kationische Proteine können an die negativ geladene Oberfläche von HUVEC binden und so eine AECA-Aktivität vortäuschen. Die Ergebnisse lassen insgesamt an der Existenz von Autoantikörpern, die spezifisch mit Endothelzellen reagieren, zweifeln.