Der Einfluss von IgG-Fraktionen von Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes und Systemischer Sklerodermie auf humane zerebrale mikroendotheliale Zellen in vitro

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Magdalena Maria Fürst
aus Passau

Gießen, 2010

Aus dem Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie
Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Blaes

Gutachter: Prof. Dr. Goebeler

Tag der Disputation: 01. 12. 2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Summary

1. Einleitung 1
1.1 Kollagenosen und Autoimmunität 1
1.1.1 Systemischer Lupus erythematodes 4
1.1.2 Sklerodermie 9
1.2 Primäre Vaskulitiden 14
1.3 Neurologische Aspekte bei Kollagenosen und Vaskulitiden 16
1.4 Pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern 20
1.4.1 Pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern beim Systemischen Lupus erythematodes 21
1.4.2 Pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern bei Systemischer Sklerodermie 22
1.4.3 Pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern bei primären Vaskulitiden der kleinen Gefäße 23
1.5 Endotheliale Veränderungen 25
1.5.1 Endotheliale Veränderungen bei Systemischem Lupus erythematodes 25
1.5.2 Endotheliale Veränderungen bei Systemischer Sklerodermie 27
1.5.3 Endotheliale Veränderungen bei primären Vaskulitiden 28
1.6 Zerebrales Endothel 29
1.7 Fragestellung 30

2. Patienten und Methoden 31
2.1 Patienten 31
2.2 Zellkultur 33
2.3 IgG-Isolierung 33
2.4 Autoantikörperdiagnostik 34
2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz 34
2.4.2 Western Blot 34
2.5 Nachweis von Antikörpern gegen endotheliale Oberflächenproteine 35
2.6 Expressionsänderung immunologisch relevanter Proteine 36

3. Statistik 38

4. Resultate 39
4.1 Klinische Befunde 39
4.1.1 Klinische Befunde der Patientengruppe mit Systemischem Lupus erythematodes 39
4.1.2 Klinische Befunde der Patientengruppe mit Systemischer Sklerodermie 42
4.2 Autoantikörperbefunde 45
4.2.1 Antinukleäre Antikörper (ANA) 45
4.2.2 Anti-Zerebrale-Mikroendotheliale Antikörper (anti-hCMEC/D3) 45
4.2.3 Antikörper gegen humane Fibroblasten (anti-HEK293) 48
4.3 Expressionsänderung immunologisch relevanter Proteine 49

5. Diskussion 53
5.1 Die Heterogenität des Endothels 53
5.2 Autoantikörper gegen humane zerebrale mikroendotheliale Zellen (anti-hCMEC/D3) bei Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes, Systemischer Sklerodermie und primären Vaskulitiden 54
5.3 Zerebrales mikrovaskuläres Endothel und Hämostase bei Kollagenosen ... 56
5.4 Endothel und die Expression von MHC-Klasse I Antigen und MHC-Klasse II Antigen bei Kollagenosen 60
5.5 Zerebrales Endothel und die Expressionsänderung der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 bei Kollagenosen 61
5.6 Zerebrales Endothel und die Expressionsänderung der Zell-Oberflächenmoleküle P-Selectin und E-Selectin bei Kollagenosen 63

6. Literaturverzeichnis 65

7. Anhang 78

Zusammenfassung

Einleitung: Patienten mit einem Systemischen Lupus erythematodes (SLE) oder einer Systemischen Sklerodermie (SSc) präsentieren klinisch eine Vielzahl von zentralnervösen Symptomen. Beide Erkrankungen sind gekennzeichnet durch das Auftreten von zahlreichen Autoantikörpern, darunter anti-Endotheliale Antikörper (AECA) und von mikroendothelialer Gefäßschädigung. 10-40% aller Patienten mit einem SLE leiden an einer Lupus-Vaskulopathie. Bei SSc-Patienten gehört die vaskuläre Dysfunktion zu den frühen pathologischen Veränderungen. Intensive Forschung innerhalb der letzten Jahre lieferte Hinweise, dass AECA eine bedeutende Rolle innerhalb der vaskulären Pathogenese bei SLE und SSc zukommt. Bislang gibt es zur Fragestellung, ob bei SLE und SSc vorhandene anti-Endotheliale Antikörper an mikrovaskuläre zerebrale Endothelzellen (hCMEC/D3) binden, keine Untersuchungen. Es ist auch nicht bekannt, ob AECA funktionelle Effekte auf mikrovaskuläre zerebrale Endothelzellen (hCMEC/D3) ausüben.

Methoden: Zur Autoantikörperdiagnostik wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt. Es wurden Seren von 26 Patienten mit einem SLE und 29 Patienten mit einer SSc auf das Vorkommen von Autoantikörpern gegen die mikrovaskuläre humane zerebrale Endothelzelllinie hCMEC/D3 getestet.

Zur Feststellung von in-vitro Effekten durch anti-hCMEC/D3-Antikörper auf die Endothelzellen wurde die Expressionsänderung von ICAM-1, VCAM-1, MHC Klasse I und II, tissue factor, von-Willebrand-Faktor, E-Selectin, P-Selectin, Thrombomodulin, CD73 und t-PA bestimmt. Die Messung erfolgte jeweils vor und nach Inkubation für drei bzw. 24 Stunden mit IgG-Fraktionen aus SLE-Seren (n=12), SSc-Seren (n=13) und gesunden Kontrollen (HC, n=13).

Resultate: Autoantikörper gegen hCMEC/D3 waren in 21/26 (80.8%) Patienten mit einem SLE und in 19/29 (65.5 %) Patienten mit einer SSc nachweisbar ($p > 0.05$).

Nach Inkubation der Zellen mit IgG-Fraktionen zeigte sich eine erhöhte Expression von tissue factor (TF) nach Inkubation mit SSc-IgG (6.68% ± 5.23%) im Vergleich zu HC-IgG (1.08% ± 2.84%, $p < 0.01$) und SLE-IgG (1.55% ± 3.94%, $p < 0.05$).

Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen der Expressionsänderung der Oberflächenproteine und dem Nachweis von Antinukleären Antikörpern (ANA) oder Antikörpern gegen hCMEC/D3 (p jeweils > 0.05).

Schlussfolgerung: Patienten mit einem SLE sowie Patienten mit einer SSc besitzen Autoantikörper gegen zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen. IgG von Patienten mit einer SSc, aber nicht von Patienten mit einem SLE, führen zu einer erhöhten Oberflächenexpression von TF. Dies ist möglicherweise ein Hinweis einer direkten pathogenen Wirkung der AECA auf zerebrales mikrovaskuläres Endothel.

Summary

Introduction: Patients suffering from systemic lupus erythematosus (SLE) or systemic scleroderma (SSc) show a wide spectrum of central nervous symptoms. Both, SLE and SSc, are characterised by different autoantibodies and endothelial vascular damage, especially in microvessels. 10-40% of patients with SLE suffer from lupus vasculopathy. Vascular dysfunction is one of the earliest pathological changes in SSc. Anti-endothelial autoantibodies (AECA) appear in SLE as well as in SSc and other connective tissue diseases (CTD). Research within the last years revealed that AECA play a critical role within the vascular pathogenesis of SLE and SSc. So far there is no evidence that AECA bind to human cerebral microvascular endothelial cells (hCMEC/D3) and it is not clear whether they have an effect on this special endothelial class.

Methods: Flow cytometry was used for analysis of autoantibodies against hCMEC/D3. 26 SLE patients' sera and 29 SSc patients' sera were tested for presence of autoantibodies against hCMEC/D3. To analyse in vitro effects on microendothelial cells we measured changes in the expression of the following surface proteins: ICAM-1, VCAM-1, MHC class I and II, tissue factor, von-Willebrand-Factor, E-Selectin, P-Selectin, Thrombomodulin, CD73 and t-PA, each before and after three and 24 hours incubation with IgG-fractions. IgG fractions of 12 SLE patients, 13 SSc patients and 13 healthy control persons (HC) were tested.

Results: Autoantibodies against hCMEC/D3 were found in 21/26 of patients with SLE (80.8%) and in 19/29 patients with SSc (65.5%) ($p > 0.05$). After three hours incubation of hCMEC/D3 IgG-fractions, an upregulation of tissue factor by SSc-IgG (6.68% ± 5.23%) compared to HC-IgG (1.08% ± 2.84%, $p < 0.01$) and to SLE-IgG (1.55% ± 3.94%, $p < 0.05$), was detectable.

There was no significant correlation between changes in surface protein expression and detection of ANA or of anti-hCMEC/D3 antibodies ($p > 0.05$).

Conclusion: Both, patients with SLE and patients with SSc have autoantibodies against human cerebral microendothelial cells. IgG fractions of patients with SSc, but not with SLE, induce an upregulation of tissue factor on the cell surface of hCMEC/D3. This could be an indicator for a direct pathogenic effect of AECA on cerebral microendothelial cells.

1. Einleitung

1.1 Kollagenosen und Autoimmunität

Der Begriff der „Kollagenose“ ist nicht klar definiert: Er umfasst verschiedenste Krankheitsbilder und wurde ursprünglich geprägt, um Krankheiten zu umfassen, die nicht organspezifisch waren und mehrere Organe gleichzeitig betrafen. Auch wenn die heute gängigere Bezeichnung „Autoimmunerkrankung des Bindegewebes“ (autoimmune connective tissue disease) keine klarere Definition bringt, so haben die Erkrankungen dieser heterogenen Gruppe eine Gemeinsamkeit: Sie alle unterliegen einer Autoimmunpathogenese und sind gekennzeichnet durch das Auftreten von unzähligen Autoantikörpern. Alle Kollagenosen führen zu chronisch-entzündlichen Prozessen, die sich vor allem am Bindegewebe und den Blutgefäßen abspielen.

Autoimmunität bezeichnet den Zusammenbruch der „Selbsttoleranz“ des Immunsystems und führt zum Angriff gegen körpereigene Strukturen. Wir unterscheiden organspezifische Autoimmunerkrankungen, wie den Diabetes mellitus Typ I oder Thyreoditiden, von organunspezifischen Autoimmunerkrankungen. Dazu zählen u.a. Kollagenosen wie der Systemische Lupus erythematodes (SLE) oder die Systemische Sklerodermie (SSc). Kriterien zur Klassifikation einer Erkrankung als autoimmun wurden erstmals 1957 von Witebsky[1] definiert und 1993 von Rose und Bona[2] modifiziert. Nach diesen Kriterien gilt eine Erkrankung sicher als autoimmun, wenn sich Autoantikörper oder autoreaktive T-Zellen im Patientenblut nachweisen lassen und im Tiermodell eine Erkrankung durch Übertragung von Antikörpern bzw. T-Lymphozyten induzierbar ist. So konnten etwa die für die Sklerodermie typischen Gefäßschäden und Hauterscheinungen durch die Übertragung von aufgereinigten Antikörpern in UCD 200-Hühnern und tight skinned (Tsk+/-) Mäusen ausgelöst werden.[3]

Es gibt zahlreiche Hypothesen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen, von denen aber keine eine hinreichende Erklärung zur genauen Pathogenese liefern kann: Vielmehr handelt es sich um ein „mosaic of autoimmunity“[4], das ein Zusammenspiel und Aufeinandertreffen von genetischen Faktoren (Assoziation mit bestimmten HLA-Typen), hormonellen Faktoren (erhöhtes Risiko für

Autoimmunerkrankungen bei Frauen und z.B. Verschlimmerung eines SLE während der Schwangerschaft und durch exogene Östrogengabe) und immunologischen Faktoren (z.B. hereditäre Komplementdefizienz: C1q-Mangel) sowie von Umweltfaktoren (z.B. Infektionen, UV-Licht) voraussetzt.

Derzeit finden sich folgende Theorien der Autoimmunpathogenese des SLE:

1. Gestörte B-Zell Aktivität: Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen in SLE-Patienten empfänglicher für polyklonale Aktivierung durch Antigene, Zytokine und andere Stimuli sind. Hierbei tritt auch das Phänomen des „epitope spreading“ auf: Die Immunisierung von Mäusen mit einem anti-DNA-Idiotypen führte nicht nur zur Bildung von anti-DNA Antikörpern, sondern auch zur Bildung von anti-Einzelstrang-DNA Antikörpern (anti-ssDNA), anti-Extrahierbares-Nukleäres-Sjögren-Syndrom-assoziiertes-Antigen Antikörpern (anti-SS-A = anti-Ro = anti-Robert-Antigen) und anti-Extrahierbares-Nukleäres-Antigen-Sm Antikörpern (anti-Sm = anti-Smith-Antigen)[5,6]
2. Gestörte T-Zell Aktivität: Die T-Zell-B-Zell-Interaktion spielt eine Schlüsselrolle in der Antikörperproduktion. Es konnte gezeigt werden, dass beim SLE vor allem die frühe T-Zell-abhängige B-Zell Aktivierung gestört ist.[7] Die Hyperaktivität von T-Zellen gegenüber den B-Zellen führt zu einer überschießenden Antikörperproduktion.[8]
3. Apoptose führt im Gesunden zur geordneten Zerstörung von Zellen und verhindert, dass intrazelluläre Bestandteile in den Extrazellularraum gelangen, wo sie zu inflammatorischen Prozessen führen würden. Dieser komplexe Prozess, in den zahlreiche Membranproteine sowie zytoplasmatische und nukleäre Signalmoleküle involviert sind, ist beim SLE gestört: Apoptotische Vorgänge und ein zusätzlicher Defekt in der Clearance von Apoptoseprodukten führen zur Freisetzung intrazellulärer Antigene (z.B. dsDNA) und zur Synthese der entsprechenden Autoantikörper.[9]
4. Auch eine Dysbalance im Zytokinnetzwerk wird als Ursache autoimmuner Vorgänge diskutiert: Das Überwiegen proinflammatorischer Zytokine, wie Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) beim SLE, führt zur Induktion autoreaktiver Vorgänge.[10]

Folgende Theorien zur Autoimmungenese der Sklerodermie werden diskutiert:

1. Gestörte B-Zell-Aktivität: Hinweise für eine erhöhte B-Zell-Aktivität sind das Auftreten einer Hypergammaglobulinämie bei SSc-Patienten, ein erhöhter Anteil naiver B-Zellen, bei gleichzeitig erniedrigtem B-Gedächtniszell-Anteil, die Produktion von Autoantikörpern und die Überexpression von CD-19.
   CD-19 ist ein Teil des B-Zell-Korezeptorkomplexes und stellt einen zentralen Regulator der B-Zellaktivierung dar. In Mäusen führte die transgene Überexpression von CD-19 zur spontanen Produktion verschiedener Autoantikörper.[11]
2. Gestörte T-Zell Aktivität: Sowohl in der Haut als auch im Blutstrom finden sich veränderte Zahlen an T-Zellen: Während sich erhöhte Werte von $CD4^+$-T Zellen finden[12], sind die NK-T-Zellen (natürliche-Killer-T-Zellen) und die γδ-T-Zellen vermindert.[13] Desweiteren zeigt sich ein abweichendes Sekretionsmuster inflammatorischer Zytokine der zirkulierenden T-Zellen in SSc im Vergleich zu T-Zellen gesunder Kontrollen.[14] In der Haut zeigen sich früh im Krankheitsprozess Zellinfiltrate, die vor allem aus T-Zellen und Makrophagen bestehen.[15] Hinweise auf eine oligoklonale Expansion von T-Zellen in Hautläsionen von SSc-Patienten legen den Verdacht nahe, dass die Aktivierung und Expansion der T-Zellen antigenbedingt erfolgt.[16]
3. Veränderter Fibroblasten-Phänotyp bei SSc: Fibroblasten von SSc-Patienten produzieren pathologisch große Mengen an Kollagen. Außerdem weisen sie eine erhöhte Antwortbereitschaft auf Zytokine/Chemokine auf und produzieren diese auch vermehrt. Über die autokrine Synthese von Faktoren wie z.B. TGF (transforming-growth-factor) oder IL-1 (Interleukin-1) kann diese Zellart die Produktion des veränderten Fibroblasten-Phänotyps selbst aufrechterhalten, unabhängig von exogenen Stimuli.[17]
4. Gestörtes Zytokinnetzwerk: Vergleichbar dem SLE, wird auch bei der SSc eine Dysbalance des Zytokinnetzwerkes als Ursache autoimmuner Vorgänge diskutiert: Bei SSc-Patienten bestehen erhöhte Plasmalevel von TNF-α, Interleukin-6 (IL-6) und Interferon-γ (IFN-γ). Interleukin 17 (IL-17) und Interleukin-23 (IL-23) sind erniedrigt. Desweiteren unterscheiden sich die Plasma-Zytokin Level in SSc-Patienten, wobei eine Assoziation mit der Präsenz von SSc-assoziierten Autoantikörpern vorliegt. Dies legt einen

Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern und der Zytokinproduktion bei SSc nahe.[18]

1.1.1 Systemischer Lupus erythematodes

Der Systemische Lupus erythematodes (SLE) ist der Prototyp einer Autoimmunerkrankung. Der SLE ist gekennzeichnet durch einen schubweisen Verlauf sowie durch die Beteiligung des Organsystems Haut und des Gefäßbindegewebes zahlreicher Organe. In seinem Verlauf kommt es zu einer Vaskulitis bzw. Perivaskulitis der kleinen Arterien und Arteriolen, verbunden mit Ablagerungen von Immunkomplexen, die aus DNA, anti-DNA-Antikörpern, Komplement und Fibrin bestehen.[19] Ein weiteres wichtiges Charakteristikum ist das Auftreten von Autoantikörpern gegen Komponenten des Zellkerns, die z.T. schon Jahre vor der Diagnose eines SLE auftreten können.[20]
Die genaue Ätiologie und Pathogenese des SLE sind ungeklärt. Vermutlich führt aber die Kombination aus entsprechender genetischer Disposition und bestimmten Umweltfaktoren, z.B. Hormone, UV-Licht, Infektionen, Medikamente, zum Ausbruch der Krankheit.[21] In Familien- und Zwillingsstudien konnte die genetische Prädisposition als Grundlage des SLE bestätigt werden: Eineiige Zwillinge sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 24% beide von der Erkrankung betroffen, verglichen mit einer 2%igen Wahrscheinlichkeit bei zweieiigen Zwillingen. Ebenso besteht für Geschwister und Verwandte ersten Grades von SLE-Patienten ein erhöhtes Risiko einen SLE zu entwickeln. In 10% der Fälle finden sich weitschichtigere Verwandte, die ebenfalls erkrankt sind.[22] Der SLE ist mit einem Verhältnis von 10:1 vor allem eine Erkrankung der Frau im reproduktiven Alter.[23] Bei Jugendlichen findet sich noch ein Überwiegen des weiblichen Geschlechts mit 4-5:1, während bei Kindern unter 10 Jahren das Verhältnis mit 4:3 nahezu ausgeglichen ist.[24] Die Prävalenz wird mit 50/100.000, die Inzidenz mit 5-10/100.000/Jahr angegeben.[19] Klinisch präsentiert sich der SLE sehr variabel: 95% der Patienten weisen Allgemeinbeschwerden wie Fieber, Schwäche oder Gewichtsverlust auf. Es können Muskel- und Gelenkbeschwerden bestehen. In > 70% der Fälle manifestieren sich Hautveränderungen. Typisch hierbei ist das Schmetterlingserythem.
Die schwerwiegendsten Organmanifestationen betreffen

1. Kardiopulmonale Veränderungen (60-70%) (z.B. Myokarditis, Libman-Sacks-Endokarditis, Pleuritis u./o. Perikarditis mit Ergüssen, pulmonale Infiltrationen, Lupus-Pneumonitis, pulmonale Hypertonie)
2. Nierenveränderungen (60-70%) (z.B. Lupusnephritis, Proteinurie > 0.5 g Eiweiß / 24h, Nachweis von Harnzylindern)
3. Neuropsychiatrische Veränderungen (60%) (z.B. Vigilanzdefizite, Depressionen, Psychosen, epileptische Anfälle).[25]

Der SLE ist durch 11 Kriterien des American College of Rheumatology (ACR)[26,27] charakterisiert. Von diesen müssen 4 Kriterien erfüllt sein, um die Diagnose eines SLE stellen zu können (Tabelle 1).

Ca. 90% der Patienten sind positiv für den Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA). ANA sind zwar sensibel auf SLE, weisen aber nur eine geringe Spezifität auf. Sie können z.B. auch im Serum von Patienten mit Sklerodermie, Polymyositis und anderen chronischen Erkrankungen vorkommen. Daher sollten alle Patienten mit positivem ANA-Titer zusätzlich auch auf ENA (Extrahierbare Nukleäre Antigene) getestet werden, die häufig mit verschiedenen Manifestationsformen des SLE assoziiert sind.[28] Der Begriff ENAs umfasst eine Untergruppe bestimmter ANAs. Eine Übersicht über die am häufigsten vorkommenden Autoantikörper und deren klinischer Assoziation bei SLE gibt Tabelle 2.

Auch wenn innerhalb des letzten Jahrzehnts Fortschritte in der Behandlung des SLE zu verzeichnen sind, so birgt der SLE immer noch ein signifikant erhöhtes Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko: Die 10-Jahresüberlebensrate insgesamt wird mit 92%, bei Patienten mit einer Lupus-Nephropathie mit 88% angegeben.[29] Derzeit sind neue Therapieansätze mit „biologicals“ in Erprobung: Diese zielen auf spezifische Zellen und Moleküle des krankhaften Immunsystems ab. Rituximab ist ein monoklonaler anti-CD-20 Antikörper, der ursprünglich für die Therapie des B-Zell-Lymphoms entwickelt worden war. Er ist gegen Strukturen gerichtet, die sich auf Pre-B-Lymphozyten und B-Lymphozyten finden, nicht jedoch auf Plasmazellen oder Pro-B-Zellen. Daher bewirkt er eine isolierte Depletion der B-Lymphozyten ohne die Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems oder die Plasmazellen zu zerstören.[22] Bei sehr schwerem Krankheitsverlauf und nach Ausschöpfung der konventionellen, immunsupprimierenden Medikamente wird Rituximab inzwischen bei SLE erfolgreich eingesetzt.[30,31]

Tabelle 1: American College of Rheumatology (ACR)-Diagnosekriterien des Systemischen Lupus erythematodes, überarbeitet 1982.[26] Die Kriterien kombinieren klinische Symptome und Auffälligkeiten von Laborwerten. 1997 wurden die Kriterien erneut revidiert. Hierbei wurde insbesondere den anti-Phospholipid Antikörpern eine höhere Wertigkeit eingeräumt.[27] Die Diagnose eines SLE kann gestellt werden, wenn ein Patient 4 der 11 genannten Kriterien gleichzeitig oder in Folge aufweist.[22]

Abkürzungen: Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorptions-Test (FTAabs), Treponema pallidum-Immobilisationstest (TPI)

	Kriterien	**Definition/Beispiele**
1.	Schmetterlingserythem	Fixes Erythem, flach oder erhaben, über den Backenknochen, die Nasolabialfalte aussparend
2.	Diskoides Exanthem	Erythematöse, erhabene Flecken mit adhärenter, keratotischer Schuppung und follikulärer Verzahnung, atrophe Vernarbung
3.	Fotosensibilität	Hautausschlag als Folge einer ungewöhnlichen Reaktion auf Sonnenlicht, anamnestisch oder durch einen Arzt beobachtet
4.	Orale/nasale Schleimhautulzera	Orale oder nasopharyngeale Ulzera, gewöhnlich schmerzlos, durch einen Arzt beobachtet
5.	Arthritis	Nichterosive Arthritis von ≥ 2 Gelenken, charakterisiert durch Druck- oder Bewegungsschmerz, Schwellung oder Erguss
6.	Serositis	Pleuritis mit typischer Schmerzanamnese oder Pleurareiben oder Pleuraerguss; Perikarditis, diagnostiziert durch Echokardiographie oder typisches Reibegeräusch
7.	Nephropathie	Persistierende Proteinurie > 0.5 g/Tag oder > 3+ im Teststreifen oder Nachweis von Harnzylinder (Erythrozyten, Hämoglobin, granulär, tubulär, gemischt)
8.	ZNS-Beteiligung	Anfallsleiden bei Fehlen von auslösenden

		Medikamenten und metabolischen Störungen (Urämie, Elektrolytentgleisungen, Ketoazidose) oder Psychosen bei Fehlen von auslösenden Medikamenten und metabolischen Störungen
9.	Hämatologische Veränderungen	Hämolytische Anämie; Leukopenie (< 4000/µl bei ≥ 2 Bestimmungen); Lymphopenie (< 1500/µl bei ≥ 2 Bestimmungen); Thrombozytopenie (< 100000 bei Fehlen von auslösenden Medikamenten)
10.	Immunologische Veränderungen	anti-dsDNA Antikörper; anti-Sm Antikörper; anti-Phospholipid Antikörper (anti-Kardiolipin IgG oder IgM, falsch positiver Test für Syphilis für > 6 Monate, nachgewiesen mittels FTAabs oder TPI)
11.	Antinukleäre Antikörper	Erhöhter ANA-Titer in der Immunfluoreszenz oder einem äquivalenten Assay zu jedem Zeitpunkt bei Ausschluss von Medikamenten, die ein „drug-induced-Lupus Syndrom“ auslösen können

Tabelle 2: Auswahl der bei SLE vorkommenden Autoantikörper und deren häufigste klinische Assoziation

Abkürzungen: Systemischer Lupus erythematodes (SLE), subakuter kutaner Lupus erythematodes (SCLE)

Autoantikörper	**Häufigkeit bei Patienten mit SLE**	**Häufigste klinische Manifestation**
ANA	90%	
AECA	bis 80%	• Lupusnephritis
anti-dsDNA Antikörper	60-90%, hohe Spezifität	• renale Beteiligung • nicht bei medikamentös induziertem Lupus vorkommend
anti-Phospholipid Antikörper	35%	• anti-Phospholipid Syndrom
Histon-Antikörper	90%	• bei medikamentös induziertem Lupus
ENA-Antikörper		
anti-Sm Antikörper	25%	• renale Beteiligung
anti-Ro (SS-A)	60%	• SCLE • sekundäres Sjögren Syndrom • kongenitaler Herzblock
anti-La (SS-B)	20%	• SCLE • Sicca Syndrom
anti-U1-RNP Antikörper	10%	• sekundäres Raynaud Syndrom

1.1.2 Sklerodermie

Synonyme für das Krankheitsbild Sklerodermie sind die Bezeichnungen Systemische Sklerodermie oder Systemische Sklerose. Diese ist, wie der SLE, eine „klassische“ Kollagenose. Im Verlauf dieser nichtorganspezifischen, multisystemischen Autoimmunerkrankung des Bindegewebes kommt es neben pathologischen Veränderungen der Blutgefäße (vor allem der kleinen Arterien und Kapillaren) und Veränderungen des Organsystems Haut zu Pathologien der inneren Organe. Auch wenn Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung im Einzelnen noch ungeklärt sind, so kann doch festgehalten werden, dass die Pathogenese der Erkrankung in ihrer frühen Phase durch zwei parallel ablaufende Prozesse gekennzeichnet ist:

1. eine frühe Immunaktivierung mit perivaskulären Entzündungsinfiltraten
2. eine Vaskulopathie mit funktionellem Endothelzellschaden und progredientem strukturellem Verlust kleiner Gefäße

Nach Rückgang des perivaskulären entzündlichen Infiltrats kommt es zu einer anhaltenden, unkontrollierten Expression profibrotischer Zytokine, z.B. transforming-growth-factor-β (TGF-β), 5-HT (Serotonin), Interleukin-4 (IL-4), IL-13 und Endothelin-1 (ET-1)[32], durch Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen. Durch u.a. autokrine Mechanismen werden Fibroblasten stimuliert und differenzieren sich zu aktivierten Myofibroblasten. Dies führt zu einer erhöhten Syntheserate und Ablagerung von Kollagen und anderen extrazellulären Matrixkomponenten wie Glukosaminoglykanen und Proteoglykanen.[33] Parallel dazu laufen Abbauprozesse der extrazellulären Matrix ab, die zum fibrotischen Gewebsumbau führen. Insbesondere davon betroffen sind die Lunge und der Magen-Darm-Trakt, seltener die Nieren und das Herz. Zu den Gefäßmanifestationen gehören Fingerkuppenulzera, die pulmonalarterielle Hypertonie und die akute Nierenkrise.

Die Störung des Immunsystems manifestiert sich u.a. in der Bildung von Autoantikörpern. Etwa 90% der Patienten mit SSc weisen einen der typischen SSc-Antikörper auf. Bei ca. 95% der Patienten sind Antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisbar.[34] Eine Übersicht über die vorkommenden Antikörper und deren häufigster klinischer Manifestation bei SSc gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Auswahl der bei SSc vorkommender Autoantikörper und deren häufigste klinische Assoziation (klinische Assoziation nach Steen[35]).
Abkürzungen: diffus kutane Systemische Sklerodermie (dcSSc), limitiert kutane Systemische Sklerodermie (lcSSc), pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), Mischkollagenose (MCTD)

Autoantikörper	**Häufige klinische Assoziation**
anti-Topoisomerase I (Scl70)	• dcSSc • Lungenfibrose früh im Krankeitsverlauf
anti-Zentromer Antikörper (ACA)	• lcSSc • Calcinosis cutis • Fingerkuppenulzera • erhöhtes Risiko für PAH • seltener: Lungenfibrose, kardiale Beteiligung, Nierenbeteiligung
anti-RNA-Polymerase-III (anti-RNAP-III)	• dcSSc mit schwerer Hautbeteiligung • hohes Risiko für die Entwicklung einer renalen Krise • erniedrigtes Risiko für eine pulmonale Beteiligung
anti-Th/To Antikörper	• lcSSc • hohes Risiko für eine schwere Organbeteiligung: Lungenfibrose, PAH, renale Krise
anti-PM-Scl Antikörper	• Überlappung von Sklerodermie/Polymyositis
anti-U3/Fibrillarin Antikörper	• dcSSc • erhöhtes Risiko für das Auftreten einer schweren Lungenfibrose und einer PAH (ähnlich Th/To) • schwere periphere Neuropathien
anti-U1-RNP Antikörper	• MCTD (Überlappung von SLE und SSc) • Raynaud Syndrom • positiver Indikator für Ansprechen auf Steroide • Sprunggelenksbeteiligung
AECA	• dcSSc[36]

Aufgrund der pathogenetischen Heterogenität zeigt sich sowohl im Krankheitsverlauf als auch im klinischen Erscheinungsbild eine große Variabilität. Dabei unterscheidet man folgende klinische Manifestationsformen:

1. Lokalisierte Sklerodermie (Morphea)

Nach Peterson et al.[37] wird die Morphea in 5 Subgruppen unterteilt: Plaque Morphea, Generalisierte Morphea, Bullöse Morphea, Lineare Morphea und Tiefe Morphea. Die Ätiologie und Pathogenese der Morphea ist ungeklärt, jedoch werden auch hier im Krankheitsprozess eine Immunaktivierung, ein Endothelschaden und eine Dysregulation des Bindegewebes postuliert,[38] die zu einer umschriebenen bindegewebigen Verhärtung und Verdickung der Haut führen.

Frauen erkranken im Verhältnis 2.6:1 häufiger an einer lokalisierten Sklerodermie als Männer bei einer Inzidenz von 2.7/100.000/Jahr und einer Prävalenz von 50-200/100.000. Die am häufigsten auftretende Form ist die Plaque Morphea. Das mittlere Alter bei Diagnose liegt bei 33 Jahren.[39] Bei 20-50% der Patienten lassen sich ANA nachweisen, bis zu 40% der Patienten sind Rheumafaktor positiv.[40]

Auch wenn die Behandlung der lokalisierten Sklerodermie bis dato schwierig und uneffektiv ist, bleibt festzuhalten, dass die Erkrankten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung keine eingeschränkte Lebenserwartung aufweisen.[41]

2. Systemische Sklerodermie (SSc):

Das klinische Erscheinungsbild der SSc ist äußerst variabel und reicht von klinisch nicht detektierbaren Hautveränderungen bis zum Befall von großen Anteilen des Integuments. Die heute am häufigsten gebrauchte deskriptive Einteilung stammt von LeRoy et al.[42] Sie unterscheidet zwischen einer limitiert kutanen Systemischen Sklerose (lcSSc) und einer diffusen kutanen Systemischen Sklerose (dcSSc). Das Hauptkriterium hierbei ist, ob eine Hautfibrose distal des Ellbogens (lcSSc) oder auch proximal des Ellbogens vorliegt (dcSSc) (Tabelle 4).

Das Akronym CREST (Calcinosis cutis, Raynaud Syndrom, Ösophagusbeteiligung, Sklerodaktylie, Teleangiektasien), erstmals beschrieben von Langaard[43] und Winterbauer[44], wird heute international nicht mehr gebraucht. Es wird der lcSSc zugeordnet und unterscheidet sich darin weder klinisch, noch serologisch oder prognostisch.

Die derzeit gültigen Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR) zeichnen sich zwar durch eine hohe Spezifität von 98%, eine aber nur mäßige Sensitivität von 97% aus. Dies hat zur Folge, dass vor allem Patienten mit

fortgeschrittener Krankheit erfasst werden, Frühformen und mildere Verlaufsformen aber leicht übersehen werden. Aus diesem Grund werden derzeit neue Klassifikationskriterium vom ACR erarbeitet.[32] Besonderes Augenmerk bei der Diagnostik ist auf das Raynaud Syndrom zu legen: Es ist die häufigste Erstmanifestation der Erkrankung und tritt bei 95% der Patienten auf. Hier muss zwischen einem primären und sekundären Raynaud Phänomen, welches mit der SSc assoziiert ist, differenziert werden.[45] Das Risiko für Raynaud-Patienten später eine SSc zu entwickeln, ist mit dem Nachweis von spezifischen Autoantikörpern (Tabelle 3) und dem Nachweis einer typischen Mikroangiopathie in der Kapillarmikroskopie verbunden.[46]

Typisch für die dcSSc ist der Nachweis von Scl-70 Autoantikörpern (Topoisomerase I-Autoantikörper), das Auftreten von Antizentromer-Autoantikörpern (ACA) ist mit der lcSSc assoziiert.[45] Mit einer Inzidenz von 1.9/100.000/Jahr und einer Prävalenz von 0.4-29/100.000 kommt die Systemische Sklerodermie seltener vor als die lokalisierte Form. Das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten liegt bei 5:1 bei einem Durchschnittsalter von 49 Jahren bei Diagnosestellung.[41,39]

Patienten mit lcSSc und dcSSc unterscheiden sich hinsichtlich der Organbeteiligung sowie der Mortalität. Auch Patienten mit lcSSc entwickeln Organbeteiligungen, bei der dcSSc tritt diese aber häufiger auf und ist mit einer erhöhten Mortalität verbunden.[47] Steen et al. untersuchten in einer single-centre-Studie an der Universität Pittsburgh Veränderungen der Todesursache bei Sklerodermiepatienten von 1972-2002. Die 10-Jahresüberlebensrate hatte sich innerhalb dieses Zeitraums von 54% auf 66% gesteigert, wobei die Haupttodesursache nicht mehr in der renalen Krise besteht, sondern vor allem infolge pulmonalarterieller Hypertonie und pulmonaler Fibrose bedingt ist.[48]

Therapeutisch haben sich die Optionen in den letzten Jahren sicher verbessert, dennoch bleibt die Therapie schwierig: Neben Vasodilatatoren bei Raynaud Syndrom, Steroiden und Immunsuppressiva, zielen neuere Therapieansätze auf profibrotische Schlüsselmoleküle ab: Beispielhaft seien der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib genannt, welcher über die Hemmung des PDG-FR (Platelet-Derived-Growth-Factor-Receptor) und c/abl-TGF-β (c/abl-transforming-growth-factor-β) Signalweg antifibrotische Effekte entfaltet.[49]

Tabelle 4: Deskriptive Einteilung der SSc: Definition der limitiert kutanen Systemischen Sklerose und der diffus kutanen Systemischen Sklerose nach LeRoy et al.[42] Das Hauptkriterium zur Differenzierung der beiden Erkrankungsformen besteht darin, ob eine Hautfibrose distal des Ellbogens oder auch proximal des Ellbogens vorliegt.
Aus Distler et al.[32]

Limitiert kutane Systemische Sklerose
• **Hauptkriterium**: Typische sklerodermieforme Hautveränderungen distal des Ellenbogens und/oder der Knie. Das Gesicht und der Nacken dürfen befallen sein.
• Hautveränderungen oft Monate bis Jahre nach Beginn des Raynaud-Syndroms • Späterer und seltenerer Organbefall • Spätere, aber häufigere Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie • Assoziation mit anti-Zentromer Antikörpern (ACA) • Relativ gute Prognose mit einem Überleben > 70% nach 10 Jahren
Diffus kutane Systemische Sklerose
• **Hauptkriterium:** Typische sklerodermieforme Hautveränderungen proximal des Ellenbogens und/oder der Knie
• Schnelle Krankheitsentwicklung oft zugleich mit Beginn des Raynaud-Syndroms • Häufige und frühe Organbeteiligung: Lunge, Herz, Gastrointestinaltrakt, Niere • Keine Assoziation mit anti-Zentomer Antikörpern (ACA), oft anti-Scl-70 Antikörper positiv • Variable Prognose mit gehäuft fatalen Verläufen, Überleben 40-60% nach 10 Jahren

1.2 Primäre Vaskulitiden

Vaskulitiden stellen eine heterogene Krankheitsgruppe dar. Sie sind definiert als immunreaktiv ausgelöste Entzündung der Gefäßwand mit oder ohne Gefäßwandnekrose und einhergehender Schädigung der betroffenen Organe. Das Spektrum der klinischen Symptome hängt vom Ausmaß und der Lokalisation der befallenen Gefäße und Organe ab. Es werden sekundäre Vaskulitiden von primären Vaskulitiden unterschieden: Sekundäre Formen können im Rahmen von Systemerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Kollagenosen und anderer Autoimmunerkrankungen auftreten, sie können auch auf Infektionserkrankungen wie einer HIV-Infektion oder durch die Einnahme bestimmter Medikamente zurückzuführen sein.[50]

Auf der internationalen Chapel Hill Consensus Conference (1992) zur Nomenklatur der Systemischen Vaskulitiden erfolgte eine Einteilung der Vaskulitiden. Diese basiert neben dem Vorkommen von ANCA (anti-Neutrophile-Zytoplasmatische Antikörper) darauf, welcher Gefäßtypus überwiegend betroffen ist.[51] Eine Übersicht hierzu gibt Tabelle 5. Den Vaskulitiden der kleinen Gefäße ist gemeinsam, dass sie vor allem Arteriolen, Kapillaren und Venolen, also alle Gefäße, die kleiner als Arterien sind, befallen. Zu den nicht klassifizierten Vaskulitiden zählen der M. Behçet, die Endangiitis obliterans und die isolierte Vaskulitis des ZNS.

Tabelle 5: Klassifikation der primären Vaskulitiden nach der Chapel Hill Consensus Conference zur Nomenklatur der Systemischen Vaskulitiden von 1992.[51] Die Einteilung der Vaskulitiden basiert zum Einen auf dem Nachweis von anti-Neutrophilen-Zytoplasmatischen Antikörpern (ANCA), zum Anderen auf dem betroffenen Gefäßtyp.

<table>
<tr><td colspan="2">I. Vaskulitis kleiner Gefäße</td></tr>
<tr><td>a) ANCA-assoziierte Vaskulitiden
Wegener Granulomatose
Churg-Strauss Syndrom
Mikroskopische Panarteriitis</td><td>b) Nicht-ANCA-assoziierte Vaskulitiden
Schönlein-Henoch Purpura
Vaskulitis mit essentieller Kryoglobulinämie
Kutane leukozytoklastische Angiitis</td></tr>
<tr><td colspan="2">II. Vaskulitis mittelgroßer Gefäße</td></tr>
<tr><td colspan="2">Klassische Panarteriitis
M. Kawasaki</td></tr>
<tr><td colspan="2">III. Vaskulitis großer Gefäße</td></tr>
<tr><td colspan="2">Riesenzell-(Temporal-)Arteriitis
Takayasu-Arteriitis</td></tr>
</table>

1.3 Neurologische Aspekte bei Kollagenosen und Vaskulitiden

Es gibt eine Reihe wichtiger Berührungspunkte zwischen Rheumatologie und Neurologie. Viele rheumatologische und neurologische Autoimmunerkrankungen basieren auf einer ähnlichen Pathophysiologie, und viele systemisch rheumatologische Erkrankungen beziehen das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) in das Krankheitsgeschehen mit ein. Insofern sind bei unklaren neurologischen Erkrankungen des ZNS und PNS immer rheumatische Systemerkrankungen differentialdiagnostisch in Erwägung zu ziehen. Im Vordergrund der neurologischen Manifestation rheumatologischer Erkrankungen stehen folgende Symptomkomplexe:

1. Zerebrale Durchblutungsstörungen;
2. Polyneuropathien;
3. Myositiden;

Die Beteiligung des ZNS beim SLE gehört zu seinen typischen Manifestationen und stellt eines der 11 ACR-Kriterien zur Lupus-Diagnostik dar. Die Prävalenz von ZNS Beteiligungen wird mit 20-60% angegeben.[52] Neben dem renalen Befall sind die neurologischen Veränderungen prognosebestimmend beim SLE. Das klinische Bild der neurologischen Symptome stellt sich, wie der SLE an sich, heterogen dar: Es umfasst sowohl zentrale fokal neurologische Defizite als auch das PNS als auch neuropsychiatrische Symptome. Das American College of Rheumatology (ACR) hat hierzu 1999 insgesamt 19 SLE-bezogene neurologische Symptome beschrieben[53] (Tabelle 6). Pathophysiologisch beruht die Vielfalt der Symptome auf verschiedenen Mechanismen:

1. Vaskulitische Veränderungen (direkt antikörperassoziiert oder entzündlich)
2. Vaskuläre Veränderungen aufgrund SLE-assoziierter Risikofaktoren (z.B. progrediente Atherosklerose bei renaler Hypertonie bei Lupusnephritis)
3. Ischämische Prozesse.

Ischämische Prozesse spielen die Hauptrolle innerhalb der neurologischen Erscheinungsbilder des SLE. Besonders zu betonen ist das in 50-60% der Fälle mit SLE-assoziierte Antiphospholipid-Antikörpersyndrom[54], welches durch die Trias arterielle und venöse Thrombosen, habituelle Aborte und Thrombozytopenie gekennzeichnet ist. Anti-Phospholipid (aPL) Antikörper können zu zerebrovaskulären

Durchblutungsstörungen und aufgrund der Thrombozytopenie zu intrakraniellen Blutungen führen.

Bei Systemischer Sklerodermie besteht bei 5-17% der Patienten eine gering ausgeprägte Begleitmyositis.[55] Das ZNS und PNS sind hier nur selten beteiligt: Am häufigsten findet sich bei der SSc eine kraniale Neuropathie mit Infiltration des V. Hirnnervs.[56]

Vaskulitiden des Nervensystems können in primäre und sekundäre Formen unterteilt werden und entweder das ZNS, das PNS oder beides betreffen. Sekundär ist eine Vaskulitis des Nervensystems dann, wenn sie im Rahmen einer bekannten Systemischen Vaskulitis, einer Kollagenose oder einer chronisch entzündlichen Erkrankung auftritt. Die primäre Angiitis des ZNS (PACNS) wird zu den primären Vaskulitiden des Nervensystems gerechnet. Sie beschreibt die isolierte Infiltration des ZNS durch eine idiopathische Vaskulitis. Die PACNS ist eine im klinischen Alltag sehr selten anzutreffende Erkrankung. Sowohl vom klinischen Erscheinungsbild als auch histopathologisch präsentiert sie sich sehr heterogen: Sie kann sowohl die kleinen als auch die mittelgroßen leptomeningealen, kortikalen oder subkortikalen Arterien befallen als auch, weniger häufig, Venen und Venolen.[57] Die klinische Bandbreite an Symptomen ist bestimmt vom Typ des befallenen Gefäßes und der Ausdehnung der Entzündung. Die Leitsymptome der PACNS sind, in variabler Kombination, Kopfschmerz, multifokale Ausfälle und Enzephalopathie ohne fokale Ausfälle. Daneben kann sich die PACNS in aphasischen Störungen, neuropsychologischen Defiziten und Krampfanfällen bemerkbar machen.

Wenngleich die Erkrankung selten ist, ist bei nicht spezifischen neurologischen Symptomen die PACNS immer differentialdiagnostisch in Erwägung zu ziehen. Sie betrifft im Verhältnis 4:3 überwiegend Männer und tritt im mittleren Lebensalter (Mittelwert 45 Jahre) auf.[58] Zur Diagnosesicherung der PACNS ist die Kombination aus klinischer, serologischer, liquordiagnostischer, neuroradiologischer und histopathologischer Diagnostik notwendig, wobei eine definitive Diagnosesicherung nur durch eine Biopsie möglich ist.[59]

Bezüglich der primären Systemischen Vaskulitiden (Tabelle 5) entwickeln mehr als ein Drittel aller Patienten eine Neuropathie.[60] Die nervale Schädigung ist dabei durch die entzündliche Veränderung der Vasa vasorum bedingt.

Einen Überblick über die Häufigkeit der vaskulitischen Neuropathie bei primären Systemischen Vaskulitiden gibt Tabelle 7.

Tabelle 6: Übersicht über die neuropsychiatrischen Symptome beim Systemischen Lupus erythematodes, welche 1999 vom American College of Rheumatology[53] beschrieben wurden.

Zentrales Nervensystem (ZNS)
• Aseptische Meningitis • Zerebrovaskuläre Erkrankungen • Demyelinisierende Syndrome • Kopfschmerzen inklusive Migräne und benigne intrakranielle Hypertonie • Bewegungsstörungen (z.B.Chorea) • Myelopathie • Anfallsleiden • Akuter Verwirrtheitszustand • Angststörung • Kognitive Störung • Störung der Stimmungslage • Psychose
Peripheres Nervensystem (PNS)
• Akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (Guillain-Barré-Syndrom) • Autonome Dysfunktion • Mononeuropathie simplex/multiplex • Myasthenia gravis • Kraniale Neuropathie • Plexopathie • Polyneuropathie

Tabelle 7: Häufigkeit der vaskulitischen Neuropathie bei primären Systemischen Vaskulitiden und weitere mögliche neurologische Manifestationen. Gegenüber den großen Gefäßen zeigt sich eine vaskulitische Neuropathie häufiger an den mittleren und kleinen Gefäßen.
Nach Heuss et al.[61]

Diagnose	**Häufigkeit der assoziierten Neuropathie**	**Weitere neurologische Manifestation**
Wegenersche Granulomatose	11-40%	Hirnnerven
Churg-Strauss-Syndrom	50-75%	
Mikroskopische Polyangiitis	10-20%	
Schönlein-Henoch-Purpura	nicht beschrieben	
Vaskulitis bei essentieller Kryoglobulinämie	7-60%	
Kutane leukozytoklastische Angiitis	nicht beschrieben	
Kawasaki-Syndrom	Ungewöhnlich	
Riesenzell-(Temporal-)Arteriitis	14%	Nervus opticus
Takayasu-Arteriits	Selten	ZNS

1.4 Pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern

Eine pathogenetische Bedeutung von Autoantikörpern ist nur bei einigen Autoimmunerkrankungen gesichert. Beispielhaft seien hier die anti-Acetylcholinrezeptor Antikörper bei Myasthenia gravis genannt, die zu einer Blockierung und Internalisierung des postsynaptischen muskulären Acetylcholin-Rezeptors führen. Resultierend daraus ist eine postsynaptische Übertragungsstörung und eine typisch im Tagesverlauf oder unter Belastung zunehmende Muskelschwäche.

Die Ursache der pernizösen Anämie ist in einer Autoantikörperbildung gegen Parietalzellen (> 90%) und intrinsic factor (ca. 70%) begründet. Dies führt zur erschwerten Absorption von Vitamin B12 im Gastrointestinaltrakt und zur atrophischen Autoimmungastritis vom Typ A mit Achlorhydrie.

Neben diesen Autoimmunerkrankungen, bei denen eine direkte Pathogenität von Autoantikörpern gegen extrazelluläre Antigene vorliegt, sind verschiedene Autoimmunerkrankungen beschrieben, die durch autoreaktive T-Zellen ausgelöst werden. Die Autoantikörper stellen bei diesen Erkrankungen ein rein diagnostisches Hilfsmittel dar.

Der Diabetes mellitus Typ I ist eine der am besten erforschten autoimmunen Erkrankungen. So ist allgemein akzeptiert, dass der direkte zytotoxische Effekt autoreaktiver T-Lymphozyten gegen B-Zellen des Pankreas eine Hauptrolle innerhalb der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ I darstellt.[62] Der Nachweis typischer Autoantikörper wie z.B. zytoplasmatische Inselzell-Antikörper (ICA), anti-GAD Antikörper (GADA, gegen Glutamatdekarboxylase gerichtet), anti-IA-2 Antikörper (gegen Tyrosinphosphatase 2) oder Insulin-Auto-Antikörper (IAA), dient diagnostischen bzw. prädiktiven Zwecken: Der Nachweis von GADA als auch IA-2-Antikörpern bei einem klinisch gesunden Menschen birgt ein Risiko von 20% innerhalb der nächsten 5 Jahre an Diabetes mellitus Typ I zu erkranken.[63]

1.4.1 Pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern beim Systemischen Lupus erythematodes

Bei Patienten mit einem SLE sind mehr als 25 Autoantikörper (z.B. anti-dsDNA, anti-Sm, anti-Ro (SS-A), anti-La (SS-B)) beschrieben, die gegen die Zelloberfläche, Bestandteile des Zytoplasmas oder gegen den Zellkern gerichtet sein können. Am charakteristischsten ist die Präsenz von Antinukleären Antikörpern (ANAs). Anti-dsDNA Antikörper und anti-Sm Antikörper sind hochspezifisch für SLE, insofern stellen sie auch ein Diagnosekriterium des ACR für den SLE dar.

Zwischen einigen klinischen Bildern des SLE und bestimmten ANAs besteht eine Assoziation: So ist das Auftreten von anti-Ro Antikörpern und anti-La Antikörpern typisch für das Sicca-Syndrom, anti-Ro typisch für den kongenitalen Herzblock. Anti-U1-RNP Antikörper (anti-U1-Ribonukleoprotein) sind mit dem Raynaud Phänomen assoziiert, der Nachweis von anti-Kardiolipin Antikörpern mit thromboembolischen Ereignissen (Tabelle 2).

Dennoch sind die Pathogenität der einzelnen Antikörper und die exakten immunologischen Mechanismen, die zum Zellschaden und zur Gewebszerstörung führen, bisher nicht bekannt. Am besten untersucht ist der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von anti-dsDNA Antikörpern und Glomerulonephritiden.[21] Im Tiermodell an SCID (severe combined immuno-deficient)-Mäusen konnten Ehrenstein et al. zeigen, dass monoklonale IgG-anti-dsDNA Antikörper an die Glomerula binden können. Dies führte zu einer Proteinurie, welche in dieser Studie als frühe Krankheitsphase einer Glomerulonephritis gedeutet wird.[64]

De Giorgio et al. konnten eine Kreuzreaktivität zwischen einer Untergruppe von anti-dsDNA Antikörpern und der Rezeptorsubgruppe NR2a und NR2b des humanen NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptors nachweisen. Die Injektion zerebrospinaler Flüssigkeit aus SLE Patienten, welche kreuzreagierende anti-DNA Antikörper enthielt, führte zu neuronalem Zelltod in Mäusegehirnen.[65]

1.4.2 Pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern bei Systemischer Sklerodermie

Bei Patienten mit einer SSc finden sich Antikörper gegen Topoisomerase (Scl-70), gegen zentromere Proteine und gegen nukleoläre Antigene. Wenn ihre Rolle innerhalb der Pathogenese weitgehend unklar ist, so besteht doch eine klare Korrelation zwischen bestimmten Antikörpern und verschiedenen Subtypen der SSc: Anti-Scl-70 Antikörper finden sich bei bis zu 70% der Patienten mit dcSSc mit einer Spezifität von fast 100%[66], anti-Zentromer Antikörper sind typisch für lcSSc.
Der Nachweis von ANA im Serum korreliert auch mit dem Risiko für die Beteiligung bestimmter Organe: Anti-Topoisomerase-I Antikörper z.B. sind häufig mit schwerer Lungenfibrose assoziiert, anti-RNA-Polymerase I/III gehen oft mit einer Nierenbeteiligung einher, anti-Zentromer Antikörper (ACA) mit pulmonalarterieller Hypertonie (PAH).[67] Aufgrund ihrer hohen Spezifität und ihrem frühen und persistierenden Nachweis im Krankheitsverlauf kommt den Antikörpern eine wichtige Bedeutung innerhalb der Diagnostik zu, auch wenn sie in den ACR-Kriterien von 1980 nicht berücksichtigt wurden. Verschiedene Studien wiesen auch einen Zusammenhang zwischen dem Antikörperspiegel und der Krankheitsaktivität nach. So konnte u. a. gezeigt werden, dass die Titer von anti-Topoisomerase-I Antikörpern positiv mit der Krankheitsschwere und mit der Krankheitsaktivität bei Patienten mit SSc korrelieren.[68] In den letzten Jahren konnten auch Antikörper nachgewiesen werden, die gegen Zytokine und Wachstumsfaktoren gerichtet sind, welche auf Fibroblasten wirken: Ein gegen den PDGF-Rezeptor gerichteter Autoantikörper induziert u.a. auch die Expression von Kollagen I und die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten.[69]
All diese Beobachtungen legen eine pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern beim SSc nahe, die Richtung der Kausalbeziehung bleibt aber auch hier dennoch unklar.

1.4.3 Pathogenetische Relevanz von Autoantikörpern bei primären Vaskulitiden der kleinen Gefäße

Die Vaskulitiden der kleinen Gefäße werden in ANCA-assoziierte Vaskulitiden und in Nicht-ANCA-assoziierte Vaskulitiden unterteilt (Tabelle 5).

ANCA (anti-Neutrophile-Zytoplasmatische Antikörper) sind spezifisch gegen Antigene in primären oder azurophilen Granula (Lysosomen) von neutrophilen Granulozyten gerichtet. Zu den ANCA-assoziierten Vaskulitiden gehören die Wegener-Granulomatose, das Churg-Strauss-Syndrom und die mikroskopische Panarteriitis (mPA). Anhand der Fluoreszenzmuster an Ethanol-fixierten Neutrophilen werden zwei Subtypen von ANCA unterschieden:

1. c-(cytoplasmic) ANCA
2. p-(perinuclear) ANCA

c-ANCA sind gegen das Enzym Proteinase 3 gerichtet und kommen v.a. bei der Wegener Granulomatose vor. 1985 stellte Van der Woude erstmals den Zusammenhang zwischen der Wegener-Granulomatose und dem Auftreten von ANCA heraus.[70]

Das Zielantigen des p-ANCA ist die Myeloperoxidase (MPO). Diese Autoantikörper kommen bei der mikroskopischen Polyangiitis (mPA) und beim Churg-Strauss-Syndrom vor, wobei grundsätzlich jeder ANCA-Subtyp bei jeder Klein-Gefäß-Vaskulitis auftreten kann. Bei ca. 10% der Patienten mit M. Wegener oder mPA sind keine ANCA nachweisbar.[71]

Die enge Korrelation zwischen ANCA-Titern und der Krankheitsaktivität legten den Verdacht nahe, dass ANCA eine pathogenetische Relevanz in der Entstehung von Vaskulitiden haben könnten. Wenngleich die Ursache der Bildung von ANCA nicht geklärt ist, so bleibt festzuhalten, dass durch den Transfer von p-ANCA auf Mäuse im Tiermodell Vaskulitiden induziert werden konnten.[72]

Neben ANCA spielen anti-Endotheliale Antikörper (AECA) eine bedeutende pathogenetische Rolle innerhalb der Vaskulitiden. AECAs stellen eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern dar, die erstmals 1971 von Lindqvist beschrieben wurden.[73] An das Endothel gebundene AECA können über Komplement-vermittelte Mechanismen oder über zytotoxische Effektorzellen ($CD8^+$, NK/K-Zellen) einen Endothelzellschaden und eine endotheliale Zelllyse bewirken.[74] Die Immunisierung von naiven Mäusen mit IgG-Fraktionen aus Seren von M. Wegener-Patienten, aus

denen zuvor ANCA entfernt worden waren, führte nach 2-6 Monaten zu Vaskulitis-ähnlichen Symptomkomplexen. Dies demonstrierte die von ANCAs unabhängige Aktivität der AECAs.[75]

Für AECA wird auch eine Antikörper-abhängige-Zytotoxizität (ADCC) und eine Komplement-abhängige-Zytotoxizität (CDC) vermutet. So konnte u.a. für AECA aus Seren von Patienten mit Takayasu-Arteriitis (TA) eine CDC gegen Endothelzellen in vitro beschrieben werden. Für diesen Nachweis wurden HUVEC mit AECA-positiven und AECA-negativen TA-Seren inkubiert und mittels colorimetrischem MTT-Assay und ^{51}Cr-Release-Assay auf ADCC und CDC untersucht. Eine ADCC war in dieser Versuchsreihe auf die HUVEC nicht nachzuweisen.[76]

1.5 Endotheliale Veränderungen

1.5.1 Endotheliale Veränderungen bei Systemischem Lupus erythematodes

Einem vaskulären Zellschaden beim Menschen kann eine entzündliche oder nicht-entzündliche Ursache zugrunde liegen. Dabei können verschiedene Faktoren zu einer Schädigung führen: Umweltfaktoren (toxische Agenzien, Medikamente, Mikroorganismen), paraneoplastische Syndrome im Rahmen einer malignen Erkrankung oder ein aktiver Prozess des Immunsystems.

Die endotheliale Schädigung beim SLE ist eines seiner typischen Symptome und wird allgemein als Lupus-Vaskulopathie bezeichnet. 10-40% aller Lupuspatienten sind davon betroffen. Pathologische Veränderungen finden sich in den Gefäßen der renalen Glomerula, der Koronarien, der Gehirngefäße, der Lungenalveolen und seltener im Gastrointestinaltrakt. Am häufigsten sind kutane Gefäße befallen: 94% der Patienten mit einer Lupus-Vaskulitis leiden an einer kutanen Lupus-Vaskulopathie.[77,78]

Endothelzellen weisen einige Eigenschaften auf, die sie zum perfekten Ziel für das Immunsystem machen:

1. Sie sind fähig, Lymphozyten Antigene zu präsentieren.[79]
2. Sie können die Lymphozyten-Migration durch die Gefäßwand regulieren.[80]
3. Sie exprimieren zahlreiche endothelspezifische Antigene auf ihrer Zelloberfläche.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass ein endothelialer Schaden bzw. eine endotheliale Aktivierung zu einer Veränderung der Zelloberfläche führt und dies wiederum zu einer aktiven Bindung von Immunkomplexen an das Endothel.[81] Die Konsequenz daraus ist die Aktivierung der Komplementkaskade und des C5b-9 Angriffskomplexes und die Zerstörung der vaskulären Basalmembran.[82]

Normalerweise stellt das vaskuläre Endothel eine nonadhäsive, nonthrombogene Oberfläche dar. Die Antworten auf proinflammatorische Stimuli oder vaskulären Scherstress sind jedoch zum Einen ein geändertes Muster der Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. Interzelluläres-Adhäsions-Molekül-1 (ICAM-1), Vaskuläres-Zell-Adhäsions-Molekül-1 (VCAM-1) oder E-Selectin. Diese Moleküle sind in die Entzündungskaskade beim SLE eingegliedert: An HUVEC (Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen) konnte die Induktion der ICAM-1 und VCAM-1

Expression durch aufgereinigtes IgG von SLE Patienten demonstriert werden.[83] Zum Anderen wird die Bildung von prokoagulanten Proteinen auf der Zelloberfläche induziert. Zentral ist hierbei die Bildung von tissue factor (TF).[84] Dies konnte auch durch die Inkubation von HUVEC mit AECA gezeigt werden.[85]

Die bereits oben erwähnten AECAs scheinen eine wichtige Rolle innerhalb der vaskulären Immunpathogenese des SLE zu haben. Sie vermitteln ihre Effekte über Komplement-abhängige Toxizität (CDC), Antikörper-abhängige Toxizität (ADCC), durch Apoptoseinduktion[86] oder über eine Endothelzellaktivierung.[87] Sie sind bei über 80% der SLE- Patienten nachweisbar.[88] Der Nachweis von AECA ist typischerweise mit dem Vorliegen einer Vaskulitis, Thrombose und Lupus-Nephritis verknüpft. Bei Patienten mit einem SLE können AECAs zu Komplementaktivierung führen, zur Induktion von Zell-Adhäsionsmolekülen und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder TNF-α sowie zur Fc-Rezeptor-vermittelten Leukozytenadhäsion.[89,90] In vitro Experimente zeigten auch eine Apoptose-induzierende Wirkung auf Endothelzellen durch AECA-IgG.[89]

Zu betonen ist, dass es Unterklassen von AECAs gibt, die große Unterschiede in ihrer Wirkung auf makrovaskuläre und mikrovaskuläre Zellen zeigen: Aus einem Patienten mit Takayasu-Arteriitis (TA) wurden monoklonale AECA (mAECA) gewonnen. Diese zeigten dieselbe Endothelzell-Epitop-Spezifität wie die IgG-AECA aus diesem TA-Patienten. Alle mAECA zeichneten sich durch eine hohe Aktivität gegen makrovaskuläres Endothel aus (anti-HUVEC Aktivität). Keine der mAECA hingegen hatte eine signifikante anti-mikrovaskuläres-Endothel Aktivität (anti-hBMEC).[91] Scheinbar AECA-negativ Seren können also reaktiv werden, vorausgesetzt, der passende Endothelzell-Subtyp wird als Target eingesetzt.[88]

1.5.2 Endotheliale Veränderungen bei Systemischer Sklerodermie

Die Vaskulopathie mit mikroendothelialem Zellschaden und vaskulären Apoptosevorgängen ist ein zentrales Ereignis innerhalb der Pathogenese der SSc, die zu Schäden in der Mikrostrombahn und schlussendlich zur Dysfunktion jedes Organsystem des Körpers führt.

Die vaskuläre Dysfunktion gehört zu den frühen Veränderungen der Erkrankung. Ihr liegt eine Dysbalance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation zugrunde, die durch neuronale und endotheliale Mediatoren gesteuert wird. Sowohl eine massive Überproduktion des Vasokonstriktors Endothelin als auch eine verminderte Sekretion von Nitritoxid (NO) konnten nachgewiesen werden.[92,93] Hieraus resultiert eine vaskuläre Ischämie und oxidativer Stress des Gewebes. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten Permeabilität mit Leukozytenrekrutierung, Endothelschäden und thrombotischen Ereignissen. Durch die resultierende Freilegung subendothelialer Strukturen, kommt es zur Thrombozytenrekrutierung mit Aktivierung und Freisetzung von vielen Mediatoren wie z.B. PDGF (platelet derived growth factor). Über eine Aktivierung von Fibroblasten folgt daraus eine profibrotische Situation.[94]

Es sind verschiedene Mechanismen beschrieben, die der mikroendothelialen Apoptose zugrundeliegen: Besonders zu betonen ist die durch AECA induzierte Endothelzellzerstörung.

AECAs werden in 40-50% aller SSc-Sera nachgewiesen und sind vor allem vom Isotyp IgG 1.[95] In vitro konnte eine Antikörper-vermittelte-Toxizität (ADCC) durch AECA aus SSc-Seren auf hDMEC nachgewiesen werden. Die Apoptose wurde hierbei über den Fas-pathway vermittelt.[96] Auch in einem Tiermodell mit UCD-200-Hühnern (University of California at Davis line 200 chicken), konnten Worda et al. mittels der Tunnel-Färbung zeigen, dass AECA-positive Seren fähig sind, Apoptose in mikrovaskulären Endothelzellen (hDMEC) zu induzieren.[86]

1.5.3 Endotheliale Veränderungen bei primären Vaskulitiden

Das Endothel an sich dient aufgrund seiner anatomischen Exposition und seiner physiologischen Funktionen als Angriffspunkt bei zahlreichen vaskulitischen Prozessen. Folgen daraus können Zellnekrose, die Freilegung subendothelialer Strukturen oder eine Endothelzelldysfunktion sein. Sowohl AECA als auch ANCA können zu einer Aktivierung des Endothels führen:

Carvalho et al. konnten an HUVEC nachweisen, dass durch AECA IgG-Fraktionen von Patienten mit Systemischer Vaskulitis die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Leukozytenadhäsion an das Endothel gesteigert wurden.[97] Lee et al. untersuchten 1999 erstmals die Wirkung von IgM-AECA-positiven Seren von Patienten mit M. Behçet an humanen-dermalen-mikroendothelialen Zellen (hDMEC). Dabei zeigte sich, dass hDMECs resistent gegen Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität waren.[98]

Die Endothelzellschädigung durch ANCA erfolgt indirekt: Für Proteinase 3 konnte gezeigt werden, dass es am Endothel eine Steigerung der ICAM-1 Synthese zur Folge hat und dies wiederum die Adhäsion von Neutrophilen am Endothel nach sich zieht.[99] Eine Schädigung des Endothels durch ANCA-stimulierte Neutrophile trat bei Lee et al. allerdings nur dann auf, wenn der physiologische Widerstand des Endothels zuvor durch z.B. TNF-α herabgesetzt worden war oder die Neutrophilen exzessiv stimuliert wurden. Dies führte zu einer Lyse der kultivierten HUVEC durch die Neutrophilen.[98]

1.6 Zerebrales Endothel

Entwicklungen im Bereich der Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen sowie immunhistochemische Studien haben viel zum heutigen Verständnis der Heterogenität von humanen Endothelzellen beigetragen. Mikroendotheliale Zellen verhalten sich anders als Endothelzellen der großen Gefäße und, wie oben angedeutet, sie beantworten die gleichen exogenen oder endogenen Stimuli anders, abhängig vom Stimulationsort innerhalb des vaskulären Gefäßbaums.[100] Endothelzellen, die die mikrovaskulären Gefäße des Gehirns auskleiden, weisen signifikante morphologische und funktionelle Unterschiede zu Endothelzellen aus anderen anatomischen Bezirken auf. Sie verfügen über tight junctions, sind nicht fenestriert und weisen wenig aktive Transportmechanismen auf. Andererseits sind sie, aufgrund des hohen zerebralen Glukosebedarfs, reich an Mitrochondrien. Zusammen mit Astrozytenfortsätzen, Perizyten und der Basallamina formen sie die Blut-Hirn-Schranke.[101]

Viele der gewonnen Erkenntnisse über das Verhalten von Endothelzellen bei SLE, SSc und Vaskulitiden wurden an HUVEC gewonnen bzw. an einer humanen dermalen mikroendothelialen Zelllinie (hDMEC). So ist z.B. bekannt, dass INF-α in SLE-Seren die Expression von MHC Klasse I Molekülen auf hDMEC steigert, es ist jedoch nicht bekannt, ob dies ebenso auf auf einer humanen zerebralen mikroendothelialen Zelllinie (hBMEC) geschieht.[102] hBMECs können proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie IL-1β synthetisieren, jedoch in niedrigerer Konzentration als HUVECs.[103] Auch bezüglich der Hämostase zeigt zerebrales Endothel Unterschiede zu anderen Endothelien auf: Während eine hohe Expression von tissue factor besteht, wird tissue factor plasminogen inhibitor 1, von Willebrand Faktor und Thrombomodulin nur gering exprimiert.[104]

1.7 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob Patienten mit einer Kollagenose oder einer Vaskulitis Autoantikörper gegen humane zerebrale mikroendotheliale Zellen besitzen.

Im Einzelnen sind folgende Fragen zu beantworten:

1. Besteht ein Unterschied in der Antikörperbindung an humane zerebrale mikroendotheliale Zellen (hCMEC/D3) zwischen Seren von Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes oder Systemischer Sklerodermie oder einer Vaskulitis?
2. Führt die Inkubation von hCMEC/D3 mit aufgereinigten IgG-Fraktionen aus dem Serum von Patienten mit einem Lupus erythematodes bzw. einer Sklerodermie zu einer Expressionsänderung von immunologisch-relevanten oder vaskulär-relevanten Proteinen?
3. Besteht eine Korrelation zwischen anti-hCMEC/D3 Antikörpern und den Effekten auf die Proteinexpression durch Seren von Patienten mit einem Lupus erythematodes bzw. einer Sklerodermie?

2. Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Allen Patienten wurde nach entsprechender Aufklärung und mit deren Einverständnis Serumproben von 20 ml entnommen. Ein positives Votum der Ethikkommission des FB Medizin der Justus-Liebig-Universität zur Durchführung dieser Studie liegt vor. Aus der Datenbank der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der neurologischen Klinik konnten insgesamt 26 Patienten mit Lupus erythematodes (SLE) sowie 29 Patienten mit Systemischer Sklerodermie (SSc) identifiziert werden. Alle Patienten wurden unter klinischen Gesichtspunkten und mittels vorkommender Autoantikörper beschrieben.

Systemischer Lupus erythematodes (SLE): Patienten dieser Gruppe wurden nach den internationalen SLE-Diagnosekriterien des American College of Rheumatology (ehemals American Rheumatism Association) ausgewählt.[26] Das Alter der Patienten lag zwischen 28 und 68 Jahren (43.8 ± 11.3 Jahre). Die Geschlechterverteilung zeigte ein Überwiegen von weiblichen Patienten: 19 weiblich / 7 männlich.

Systemische Sklerose (SSc): In diese Gruppe wurden Patienten eingeschlossen, die an diffuser kutaner Systemischer Sklerose (dcSSc) oder limitierter kutaner Systemischer Sklerose (lcSSc), ehemals CREST-Syndrom, erkrankt waren. Patienten mit SSc wurden nach dem von LeRoy et al.[42] vorgeschlagenen Klassifikationssystem eingeteilt: 11 Patienten litten demnach an der limitierten kutanen Form der SSc, 15 Patienten wiesen die diffuse kutane Form der SSc auf. Drei Patienten litten an einem Sharp-Syndrom. Alle Patienten erfüllten die Diagnosekriterien des American College of Rheumatology.[105] Das Alter der Patienten lag zwischen 13 und 77 Jahren (58.9 ± 14.5 Jahre). Die Geschlechterverteilung zeigte ein Überwiegen von weiblichen Patienten: 17 weiblich / 12 männlich.

Zur Durchführung der immunologischen Funktionsassays standen nicht von allen Patienten ausreichende Mengen an Serum zur Aufreinigung der Immunglobulin G (IgG) Fraktionen zur Verfügung. Es wurden für die Untersuchung daher folgende Gruppengrößen gewählt:

SLE	12 Patienten (12 weiblich / 0 männlich)
SSc	13 Patienten (10 weiblich / 3 männlich)
Gesunde	13 Probanden (7 weiblich / 6 männlich)

Das Alter der Patienten mit einem SLE lag zwischen 28 und 68 Jahren (44.9 ± 12.0), das Alter der Patienten mit einer SSc lag zwischen 13 und 76 Jahren (57.7 ± 16.0).

Systemische Vaskulitiden: Patienten dieser Gruppe litten an einer primären Vaskulitis entsprechend den Kriterien der internationalen Chapel Hill Konsensuskonferenz zur Nomenklatur der primären Vaskulitiden.[51]
In diese Gruppe wurden 19 Patienten eingeschlossen, deren Alter zwischen 23 und 87 Jahren lag. Das Alter der Patienten lag zwischen 23 und 87 Jahren (59.3 ± 18.6 Jahre), die Geschlechterverteilung zeigte ein Überwiegen von weiblichen Patienten (12 weiblich / 7 männlich).

Gesunde Kontrollpersonen: Diese Gruppe setzt sich aus Personen zusammen, die an keiner Kollagenose erkrankt waren. Sie umfasst 13 Personen. Das Alter der Probanden lag zwischen 27 und 56 Jahren. (35.0 ± 8.0 Jahre: 7 weiblich / 6 männlich).

Die ANOVA-Analyse hinsichtlich Alter und Geschlechtsverteilung zeigte, wie zu erwarten, ein tendenziell älteres Patientenkollektiv in der Gruppe der Patienten mit einer SSc im Vergleich zu Patienten mit SLE sowie zu gesunden Probanden (SLE vs. SSc $p < 0.001$, HC vs. SSc $p < 0.05$). Ebenfalls zeigte sich in der SLE-Gruppe ein höherer Anteil an weiblichen Patienten im Vergleich zu SSc und HC ($p < 0.02$). Es konnte keine Abhängigkeit zwischen dem Nachweis von Antinukleären Antikörpern (ANA), Antikörpern gegen humane zerebrale mikroendotheliale Zellen (anti-hCMEC/D3), Antikörpern gegen humane Fibroblasten (anti-HEK293) und dem Alter der Patienten nachgewiesen werden (p jeweils > 0.05).

2.2 Zellkultur

Wir verwendeten die mikroendotheliale zerebrale Zelllinie hCMEC/D3 (human cerebral microvessel endothelial cell) und HEK293 (Human embryonic kidney, FIbroblasten), welche in unserem Labor etabliert sind. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO_2. Als Kulturmedium für hCMEC/D3 verwendeten wir Endothelial Cell Growth Media MV 2 (PromoCell, Heidelberg) mit 2.5% fetalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS, PromoCell). Als Kulturmedium für HEK293 wurde RPMI1640 (Sigma, Steinheim) mit 10% FCS sowie L-Glutamin (4mmol/L, Sigma, Steinheim) verwendet. Zur Vermeidung einer mikrobiellen Kontamination setzten wir Penicillin (20.000 I.E./l, BiochromeAG, Berlin) sowie Streptomycin (20mg/l, BiochromeAG) ein. Am 2. Tag nach Aussaat erfolgte die Erneuerung des Mediums. Am 4. Tag nach Aussaat wurden die konfluenten Zellen im Verhältnis 1:4 gesplittet. Das Splitten erfolgte nach Inkubation mit Trypsin (2.5 g/l, Gibco-Invitrogen, USA) für 3 Minuten bei 37°C.

2.3 IgG-Isolierung

Die Isolierung der IgG-Fraktionen erfolgte mittels einer 1 ml Protein G-Säule (Hi-Trap, GE Healthcare Bio-Sciences, Schweden) aus Serum oder aus Plasmapherat. Dazu wurden jeweils 3.5 ml Serum mit Glycinpuffer (0.1 mol/L, pH 9) im Verhältnis 1 : 2 verdünnt und in einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben. Anschließend erfolgte ein Waschschritt mit 5 ml Glycinpuffer (pH 9). Nun wurde das gebundene IgG mit sauerem Glycinpuffer (0.1 mol/L, pH 2.7) zu 0.5 ml-Fraktionen eluiert und die Absorption jeder Fraktionen bei 280 nm photometrisch bestimmt. Alle Proben mit einer Absorption > 1.9 wurden zusammengefasst und für 24 h gegen die 1000-fache Menge phosphatgepuffertes Kochsalz (phosphate buffered saline, PBS) dialysiert. Das Dialysat wurde in dieser Zeit viermal erneuert. Die Bestimmung des IgG-Gehaltes erfolgte nephelometrisch (Behring Nephelometer). Die Proben wurden standardisiert mit PBS auf 6 g/L verdünnt, aliquotiert und bei -24°C aufbewahrt.

2.4 Autoantikörperdiagnostik

Die Bestimmung Antinukleärer Antikörper (ANA) und Antineuronaler Antikörper erfolgte mit einer Kombination aus Immunfluoreszenztest und Western Blot.

2.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Screening von ANA / Antineuronaler Antikörper wurden kommerziell erhältliche Objektträger mit unfixierten Gefrierschnitten aus HEp2-Zellen / Primatenleber / Kleinhirn (Euroimmun, Lübeck) verwendet. Für den ersten Reaktionsschritt wurden die Gefrierschnitte für 30 Minuten mit Patientenserum (Verdünnung 1:32 in PBS / Tween 0.2%, Raumtemperatur) inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS / Tween 0.2% erfolgte die erneute Inkubation mit FITC-markiertem anti-human IgG (Verdünnung 1:75 mit PBS / Tween 0.2%, Dako, Hamburg) bei Raumtemperatur für erneut 30 Minuten. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Schnitte mit Eindeckmedium und Deckgläsern fixiert und unter einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Als Negativkontrollen dienten Schnitte, die nur mit Puffer bzw. Serum gesunder Probanden inkubiert wurden. Als Positivkontrolle diente Serum von Patienten mit definierten Antinukleären Antikörpern.

2.4.2 Western Blot

Die nachfolgende genauere Charakterisierung der nachgewiesenen Autoantikörper wurde mittels eines Western Blot mit rekombinanten Proteinen erreicht (EUROLINE: ANA-Profil 3, Euroimmun, Lübeck). Hierfür wurden die Patientenseren im Verhältnis 1:1000 in Probenverdünnungspuffer verdünnt und die Teststreifen mit 1.5 ml des verdünnten Serums für 30 Minuten inkubiert. Nach drei Waschschritten in Waschpuffer folgte die Inkubation der Teststreifen mit 1.5 ml des gebrauchsfertigen Alkalische Phosphatase (AP)-markierten anti-human IgG Konjugates für 30 Minuten. Nach erneutem dreimaligem Waschen in Waschpuffer wurden 1.5 ml des gebrauchsfertigen Substrates (Chromogen-Substratlösung) zu jedem Streifen

gegeben und für 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Spülen mit destilliertem Aqua gestoppt und die positiven Reaktivitäten durch Vergleich mit dem mitgelieferten Standard bestimmt. Mit Hilfe des Tests können Antikörper gegen nRNP/Sm, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, Zentromer-Protein B, PCNA, dsDNA, Nukleosomen, Histone, ribosomale P-Proteine sowie AMA-M2 bestimmt werden.

2.5 Nachweis von Antikörpern gegen endotheliale Oberflächenproteine

Um die Oberflächenbindung von Antikörpern aus dem Serum von SLE,- Sklerodermie,- und Vaskulitispatienten an hCMEC/D3 nachzuweisen und zu vergleichen, wurden die Seren mittels Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence-activated cell sorting) analysiert. Als nicht-endotheliale Kontroll-Zelllinie dienten hierfür HEK293 (human embryonic kidney, Fibroblasten). Nach 24 h Wachstum in 6-Well-Platten mit 10^6 Zellen / Well wurde zunächst der Überstand entfernt, 0.5 ml FACS-Puffer (phosphate-buffered saline, 0,1% NaN_3, 1.0% fetal calf serum (FCS)) in jedes Well gegeben, die Zellen mittels cell-scraper abgelöst, für vier Minuten bei 1200 Umdrehungen / Minute (rpm) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Waschschritt mit 1.5 ml FACS-Puffer erfolgte die Ausplattierung der Zellen auf 96-Well-Platten in einer Konzentration von 10^5 Zellen / Well. Die Zellen wurden nun für 30 Minuten mit den humanen Patientenseren bzw. Serumkontrollen in einer Endkonzentration von 1.5 g/L bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe eines FITC-konjugierten (Fluorescin-Iso-Thio-Cyanat) goat anti-human IgG Sekundärantikörpers (Dako, Denmark) für 20 Minuten (Verdünnung 1/75 in FACS-Puffer). Nach zwei weiteren Waschschritten mit FACS-Puffer folgte die durchflusszytometrische Analyse mittels eines FACScalibur (Becton Dickinson, Oxford). Jedes Experiment wurde zweimal wiederholt.

Die Oberflächenbindung wurde als mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) gemessen. Die MFI der Kontrollseren wurde gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Für die Analyse der Patientenseren galt eine MFI größer als der Mittelwert der Kontrollen + 2.5-fache Standardabweichung als positiv.

2.6 Expressionsänderung immunologisch relevanter Proteine

Die Expression bzw. Expressionsänderung endothelialer Differenzierungsmarker erfolgte durchflusszytometrisch auf der mikroendothelialen zerebralen Zelllinie hCMEC/D3. Hierzu wurden die Zellen (10^6 / Well) für 24 h in kollagenbeschichteten 6-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät, bis ein konfluentes Wachstum erreicht war. Nach 24 h Inkubationszeit und Austausch des Mediums gegen FCS-freies Medium, erfolgte die Zugabe der IgG-Fraktionen von Patienten und gesunden Kontrollen in einer Endkonzentration von 1.5 g/L. Um eine mögliche Zeitabhängigkeit der Expressionänderung von Proteinen nachzuweisen, wurde jedes Experiment zu 4 Zeitpunkten durchgeführt: Nach einer Inkubationszeit von jeweils 3 h, 6 h, 12 h bzw. 24h wurde der Überstand entfernt, 0.5 ml FACS-Puffer in jedes Well gegeben und die Zellen mittels cell-scraper abgelöst, zentrifugiert (vier Minuten, 1200 rpm) und der Überstand verworfen. Nach jeweils einem Waschschritt mit 1.5 ml FACS-Puffer wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^5 / Well auf eine 96-Well-Platte ausplattiert. Nun erfolgte die Zugabe eines FITC-konjugierten (Fluorescin-Iso-Thio-Cyanat) bzw. eines unkonjugierten monoklonalen Primär-Antikörpers (verwendete Konzentrationen siehe Tabelle 8) und die Inkubation für 20 Minuten bei 4°C, gefolgt von einem weiteren Waschschritt mit FACS-Puffer. Die mit einem unkonjugierten Primärantikörper behandelten Zellen wurden im Anschluss erneut für 20 Minuten bei 4°C mit einem FITC-markierten Sekundär-Antikörper (Dako, Denmark) inkubiert, gefolgt von einem erneuten Waschschritt mit FACS-Puffer. Im Anschluss wurde die Expression bzw. Expressionsänderung folgender Proteine durchflusszytometrisch analysiert: P-Selectin, Thrombomodulin, ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1), VCAM-1 (Vascular-Cell Adhesion Molecule 1), MHC (major histocompatibility complex) Klasse I und II, tissue factor, E-Selectin, vWF (von-Willebrand Faktor), CD73 und t-PA (human tissue plasminogen activator).

Die Änderung der Proteinexpression wurde zum einen im Vergleich mit unbehandelten Zellen bestimmt und zum anderen im Vergleich mit Zellen nach Inkubation mit IgG-Kontrollen. Jedes Experiment wurde nach 3 h, 6 h, 12 h und 24 h durchgeführt und jeweils zweimal wiederholt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Antikörper, der Herstellerfirma sowie der verwendeten Konzentrationen

Antikörper	Firma	Verdünnung
Mouse IgG isotyp control +ram (rabbit-anti-mouse) FITC	R & D Systems	1:50
Purified anti-human CD 62 E (E- Selectin) + ram FITC	BD Pharmingen	1:50
MHC I + ram FITC	DAKO	1:50
vWF + ram FITC	Abcam	1:100
Purified anti-human CD 73 + ram FITC	BD Pharmingen	1:50
Tissue Plasminogen Activator (t-PA) MAb + ram FITC	Fitzgerald industries int.	1:50
anti-hP-Selectin	R & D Systems	1:50
Thrombomodulin CD 141 FITC	Chemicon internat. TEMECULA	1:50
Monoclonal mouse anti-human CD 54, ICAM-1/FITC	DAKO	1:50
VCAM 1	R & D Systems	1:50
MHC II	DAKO	1:50
FITC-conjugated anti-human tissue factor	American diagnostic inc.	1:50
2nd antibody: Polyclonal rabbit-anti-mouse Immunglobulins/FITC	DAKO	1:75
FITC-conjugated anti-human IgG	DAKO	1:75
FITC-conjugated goat anti-human IgG	DAKO	1:100

3. Statistik

Zur Überprüfung ihrer Signifikanz wurden Häufigkeitsvergleiche zwischen den Gruppen mit Hilfe des Fisher‘s exact Tests, Titerunterschiede mit Hilfe des U-Tests und Vergleiche sonstiger Werte mit Hilfe des ANOVA-Tests ermittelt. Häufigkeitsvergleiche zwischen den Gruppen mit mehr als zwei Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat Test berechnet. Die Überprüfung der Altersabhängigkeit der Antikörperbildung wurde mittels Korrelationsprüfung durchgeführt.
Ein $p < 0.05$ galt als signifikant. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

4. Resultate

4.1 Klinische Befunde

4.1.1 Klinische Befunde der Patientengruppe mit Systemischem Lupus erythematodes

Ein Großteil der Patienten wies einen SLE auf (22/26) Ein Patient mit SLE wies zusätzlich ein Guillain-Barré-Syndrom auf, zwei der Patienten mit SLE hatten zusätzlich ein sekundäres Sjögren Syndrom. 4/26 Patienten hatten einen zerebralen Lupus erythematodes (zerebraler LE).

Die Gruppe der 12 Patienten mit SLE bzw. zerebralem LE (8 SLE / 4 zerebraler LE), die für neuroimmunologischen Funktionstest ausgewählt wurde, unterschied sich nicht hinsichtlich Alter und Geschlechtsverteilung (Alter: 44.92 ± 12.06 Jahre: 12 weiblich / 0 männlich) oder anderer klinischer Parameter von der Gesamtgruppe:

Antinukleäre Antikörper waren in 10/12 Patienten (83.0%) nachweisbar. Der Titer lag zwischen 1/320 und 1/5120 (Median: 1/1600). In 7/12 Patienten zeigte sich in der Immunfluoreszenz ein homogenes Bindungsmuster, bei zwei Patienten ein granuläres und bei einem Patienten ein nukleoläres Bindungsmuster. In 8/12 Patienten (66.0%) fanden sich Antikörper gegen Doppelstrang DNS (dsDNA).

Die epidemiologischen und klinischen Merkmale dieser Patienten sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Klinische und immunologische Daten der Patienten mit SLE, die in die immunologischen Funktionstests eingeschlossen wurden.
ANA: Antinukleäre Antikörper, GBS: Guillain-Barré Syndrom, HEK293: humane embryonale Nierenzellen (Fibroblasten), hCMEC/D3: humane zerebrale mikroendotheliale Zellen

Patient	**Alter/ Geschlecht**	**SLE-Form**	**ANA**	**Oberflächen-bindung HEK293**	**Oberflächen-bindung hCMEC/D3**
1	50 J., w	Zerebraler SLE	Homogener ANA > 1/1280, dsDNA pos.	**+**	**-**
2	33 J., w	Zerebraler SLE	Homogener ANA > 1/1280, dsDNA pos.	**-**	**+**
3	28 J., w	Zerebraler SLE	Homogener ANA > 1/1280, dsDNA pos.	**-**	**+**
4	49 J., w	Zerebraler SLE	neg.	**-**	**-**
5	49 J., w	SLE + GBS	Homogener ANA > 1/1280, dsDNA pos.	**+**	**+**
6	45 J., w	SLE	Homogener ANA 1/320 dsDNA pos., SS-A pos., SS-B-pos.	**-**	**+**
7	37 J., w	SLE	Homogener ANA > 1/1280, dsDNA pos.	**-**	**+**

8	62 J., w	SLE	neg.	**-**	**+**
9	68 J., w	SLE	Nukleolärer ANA 1/320	**-**	**+**
10	37 J., w	SLE	Granulärer ANA 1/1280, dsDNA pos., RNP-Sm-pos.	**-**	**+**
11	48 J., w	SLE, Sjögren	Granulärer ANA 1/2560	**-**	**+**
12	32 J., w	SLE	Homogener ANA 1/5120, dsDNA pos.	**+**	**+**
n=12	**12w / 0m**		**ANA-Titer Median: 1/1600**	**3/12 + 9/12 -**	**10/12 + 2/12 -**

4.1.2 Klinische Befunde der Patientengruppe mit Systemischer Sklerodermie

Die Mehrzahl der Patienten litt an diffuser kutaner Systemischer Sklerodermie (dcSSc) (15/29), die zweitgrößte Gruppe stellten Patienten mit limitiert kutaner Systemischer Sklerodermie dar (11/29). Daneben ließ sich eine Gruppe mit Sharp-Syndrom bilden (3/29).

Die Gruppe der 13 Patienten mit dcSSc bzw. lcSSc, die für die neuroimmunologischen Funktionstests ausgewählt wurde, unterschied sich nicht hinsichtlich Alter und Geschlechtsverteilung (Alter: 57.7 ± 16.0 Jahre: 10 weiblich / 3 männlich) oder anderer klinischer Parameter von der Gesamtgruppe.

Antinukleäre Antikörper (ANA) waren bei 12/13 Patienten nachweisbar (92.3%). Die Titer lagen zwischen 1/160 und 1/2560 (Median: 1/1123).

Bei 6/12 Patienten zeigte sich in der Immunfluoreszenz ein zentromeres Bindungsmuster, bei 3/12 Patienten ein nukleoläres und bei 1/12 Patienten ein homogenes Bindungsmuster. Bei 2/12 ANA-positiven Patienten konnte ANA nicht näher klassifiziert werden.

Die epidemiologischen und klinischen Merkmale dieser Patienten sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Klinische und immunologische Daten der Patienten mit Sklerodermie, die in die neuroimmunologischen Funktionstests eingeschlossen wurden

ANA: Antinukleäre Antikörper, dcSSc: diffus kutane Systemische Sklerodermie, lcSSc: limitiert kutane Systemische Sklerodermie, PNP: Polyneuropathie, HEK293: humane embryonale Nierenzellen (Fibroblasten), hCMEC/D3: humane zerebrale mikroendotheliale Zellen

Patient	**Alter/ Geschlecht**	**Sklerodermie Form**	**ANA**	**Oberflächen-bindung HEK293**	**Oberflächen-bindung hCMEC/D3**
1	13 J., m	dcSSc	neg.	**-**	**-**
2	69 J., w	lcSSc + PNP	Zentromerer ANA 1/640	**-**	**-**
3	70 J., w	lcSSc + PNP	ANA 1/1000, SS-A schwach positiv, Zentromer ANA neg.	**+**	**-**
4	65 J., m	lcSSc + PNP	Zentromerer ANA 1/640	**-**	**-**
5	51 J., w	dcSSc	Nukleolärer ANA 1/1280, Scl-70	**-**	**+**
6	61 J., w	dcSSc	Nukleolärer ANA 1/2560, Scl-70 pos., Jo-1 pos.	**+**	**+**
7	57 J., w	dcSSc	Homogener ANA 1/640, Scl-70 pos.	**+**	**+**

8	59 J., w	lcSSc	Zentromerer ANA 1/1280,	**-**	**+**
9	65 J., w	Inkomplette lcSSc	Zentromerer ANA 1/640	**-**	**+**
10	67 J., m	lcSSc	Nukleolärer ANA 1/320	**-**	**-**
11	67 J., w	lcSSc	Zentromerer, feingesprenkelter ANA 1/3200	**-**	**+**
12	76 J., w	lcSSc	Zentromerer ANA	**-**	**-**
13	43 J., w.	dcSSc, V.a. zerebrale Beteiligung	ANA 1/160	**+**	**-**
n=13	**10w / 3m**		**ANA-Titer Median: 1/1123**	**4/13+ 9/13-**	**6/13+ 7/13-**

4.2 Autoantikörperbefunde

Alle 26 Patienten mit Lupus erythematodes und alle 29 Patienten mit Systemischer Sklerodermie wurden hinsichtlich des Auftretens von ANA und anti-hCMEC/D3 Antikörpern untersucht. In einem ersten Schritt wurden hierfür alle Seren mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf Autoantikörperbindung überprüft. Im folgenden Schritt wurden die nachgewiesenen Autoantikörper mittels Western Blot Technik genauer klassifiziert.

4.2.1 Antinukleäre Antikörper (ANA)

Antinukleäre Antikörper in der 26 Patienten umfassenden Gesamt-SLE Gruppe ließen sich bei 23/26 (88.0%) der Patienten nachweisen. Die Titerstufen reichten von 1/160 bis 1/10000.
ANA in einer relevanten Titerstufe von >1/80 in der 29 Patienten umfassenden SSc-Gruppe ließen sich bei 28/29 (96.6%) Patienten nachweisen. Die Titer lagen zwischen 1/80 und 1/10240.
In der Gesundenkontrollgruppe ließen sich keine signifikanten ANA-Titer nachweisen.

4.2.2 Anti-Zerebrale-Mikroendotheliale Antikörper (anti-hCMEC/D3)

Autoantikörper gegen hCMEC/D3 waren in 21/26 Patienten (80.8%) mit einem SLE nachweisbar. 20/23 (87.0%) ANA-positive Patienten waren zusätzlich anti-hCMEC/D3 Antikörper positiv. In zwei ANA-negativen Seren ließen sich trotzdem Antikörper gegen hCMEC/D3 nachweisen. Bei einem Patienten ließen sich keine ANA und keine anti-hCMEC/D3 nachweisen.

Aus der Gruppe von 12 SLE-Patienten für die neuroimmunologischen Tests waren 10/12 (83.3%) Patienten anti-hCMEC/D3 positiv.

Bei 19/29 (65.5%) Patienten mit SSc waren Autoantikörper gegen hCMEC/D3 nachweisbar. 18/28 (64.2%) ANA-positiven Seren wiesen zusätzlich anti-hCMEC/D3 Antikörper auf, 10/28 (35.7%) ANA-positiven Seren waren anti-hCMEC/D3-negativ.

Ein ANA-negativer Patient war auch anti-hCMEC/D3 Antikörper negativ, bei einem ANA-negativen Patienten fanden sich trotzdem Antikörper gegen hCMEC/D3.

Aus der Gruppe von 13 SSc-Patienten für die neuroimmunologischen Tests waren 6/13 (46.2%) Patienten anti-hCMEC/D3 positiv.

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Antikörperbindung an hCMEC/D3 zwischen SLE-Patienten und Sklerodermie-Patienten feststellen ($p > 0.05$, Abbildung 1). Seren von Patienten mit SLE oder SSc waren signifikant häufiger Antikörper positiv auf hCMEC/D3 als Seren von Patienten mit einer Vaskulitis (2/19, 10.5%, Abbildung 1).

In keinem der gesunden Kontrollseren (0.0%) ließen sich Antikörper gegen hCMEC/D3 nachweisen.

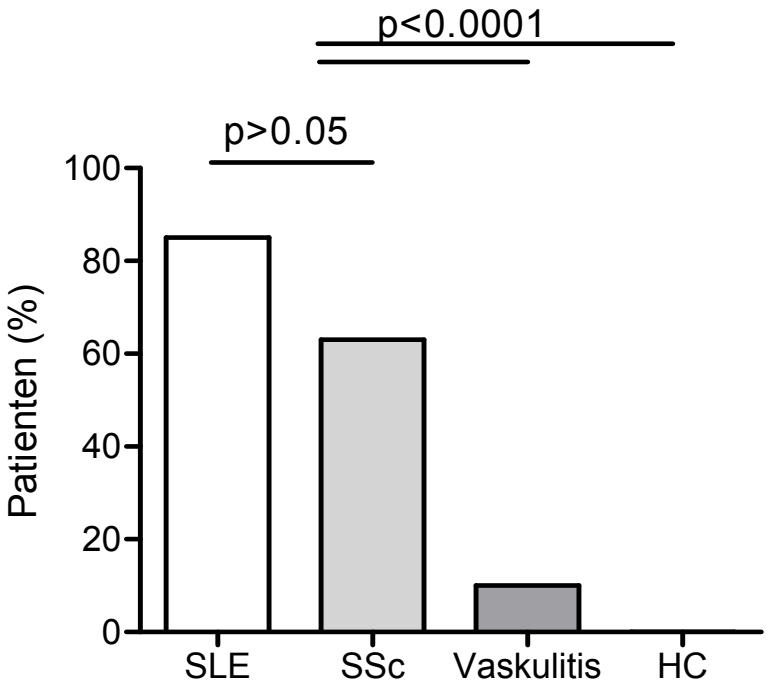

Abbildung 1: Nachweis von anti-hCMEC/D3 Antikörpern in Patienten mit SLE, SSc, primärer Vaskulitis und gesunden Kontrollen (HC): SLE und SSc Seren sind häufiger anti-hCMEC/D3 Antikörper positiv als Seren von Patienten mit primären Vaskulitiden * $p<0.0001$.
Es bestehen keine Unterschiede in der Antikörperbindung an hCMEC/D3 zwischen SLE-Seren und SSc-Seren ($p>0.05$).

4.2.3 Antikörper gegen humane Fibroblasten (anti-HEK293)

Antikörper gegen HEK293 fanden sich in 10/26 Patienten (38.5%) mit einem SLE und in 12/29 Patienten (41.4%) mit einer Sklerodermie. Von den 12 Patienten mit einem SLE und den 13 Patienten mit einer Sklerodermie, die für die neuroimmunologischen Funktionstests ausgewählt wurden, waren 3/12 Patienten mit einem SLE (25%) bzw. 4/13 Patienten mit einer Sklerodermie (30.8%) positiv für anti-HEK293 Antikörper.

Sera von Patienten mit SLE oder Sklerodermie waren ebenfalls signifikant häufiger Antikörper-positiv auf HEK293 als Sera von Patienten mit einer Vaskulitis (1/19, 5.3%, Abbildung 2).

1/13 (7.7%) Patienten der gesunden Kontrollgruppe zeigte anti-HEK293 Antikörper.

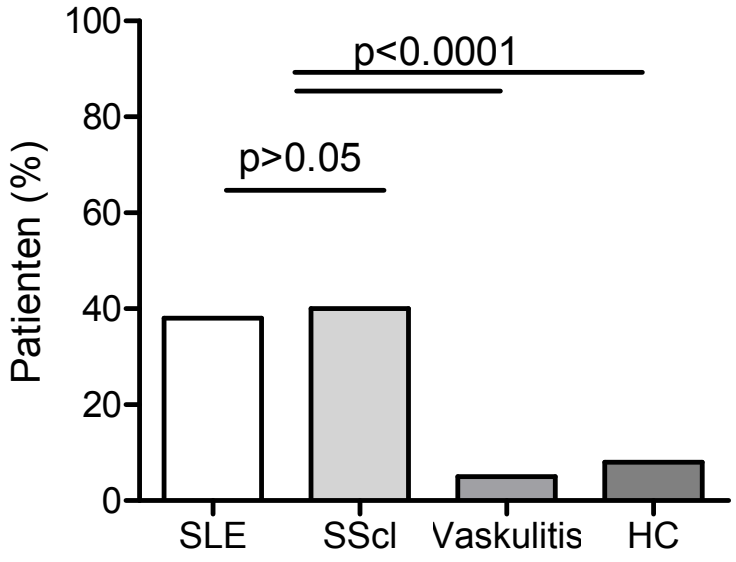

Abbildung 2: Nachweis von anti-HEK293 Antikörpern in Patienten mit SLE, SSc, primärer Vaskulitis und gesunden Kontrollen (HC): SLE und SSc Seren sind häufiger anti-HEK293 Antikörper positiv als Seren von Patienten mit primären Vaskulitiden * p<0.0001.

Es bestehen keine Unterschiede in der Antikörperbindung an HEK293 zwischen SLE-Seren und SSc-Seren (p>0.05).

4.3 Expressionsänderung immunologisch relevanter Proteine

Wir untersuchten die Expression von P-Selectin, Thrombomodulin, ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1), VCAM-1 (Vascular-Cell Adhesion Molecule 1), MHC (major histocompatibility complex) Klasse I und II, tissue factor, E-Selectin, vWF (von Willebrand Faktor), CD73 und t-PA (human tissue plasminogen activator). Gemessen wurde jeweils nach Inkubation mit aufgereinigten IgG-Fraktionen von 12 Patienten mit SLE und 13 Patienten mit SSc sowie 13 gesunden Probanden (Kontroll-Gruppe) zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 12h und 24h.

Beim Vergleich der SLE-Patienten mit den SSc-Patienten und der Kontroll-Gruppe fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression der oben genannten Proteine zu den Zeitpunkten 6h, 12h und 24h.

Nach 3h Inkubation mit den aufgereinigten IgG-Faktionen der oben genannten Gruppen zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede für die Expressionsänderung von tissue factor. Es kam zu einer Hochregulierung von tissue factor durch Sklerodermie Seren. Durch Lupus-Seren hingegen ließ sich nach Inkubation für 3h kein signifikanter Effekt auf tissue factor nachweisen (SSc-IgG: 6.68% ± 5.23%; HC-IgG: 1.08% ± 2.84%, $p < 0.01$; SLE-IgG: 1.55% ± 3.94%, $p < 0.05$, Abbildung 3). Dieser Effekt war nach 6h Inkubation mit den verschiedenen IgG-Fraktionen bereits nicht mehr nachweisbar (HC-IgG -1.70% ± 3.29%; SLE-IgG 2.43% ± 6.78%; SSc-IgG 1.51% ± 4.13%, $p > 0.05$, Abbildung 4). Die Werte sind jeweils ausgedrückt als Differenz zum Ausgangswert.

Diese Effekte zeigten keine Korrelation zum Vorhandensein von ANA oder anti-hCMEC/D3 Antikörpern (Abbildung 5).

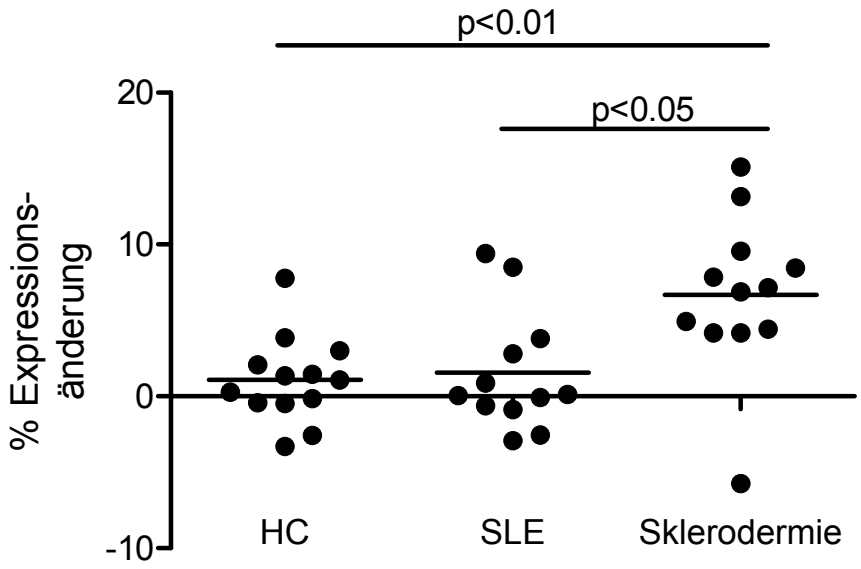

Abbildung 3: Änderung der Expression von tissue factor (TF) auf humanen zerebralen mikroendothelialen Zellen (hCMEC/D3) nach Inkubation mit IgG-Fraktionen von gesunden Kontrollpersonen (HC), Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes (SLE) und Patienten mit Systemischer Sklerodermie (SSc): Die Expression von TF wird nach 3h Inkubation mit SSc-IgG im Vergleich zu HC-IgG ($p < 0.01$) und zu SLE-IgG hochreguliert ($p < 0.05$).

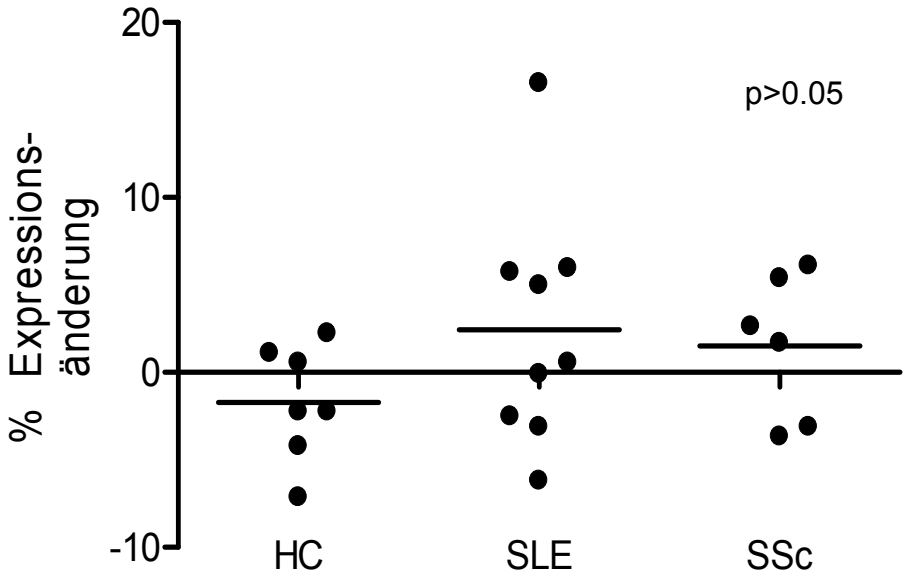

Abbildung 4: Änderung der Expression von tissue factor (TF) auf humanen zerebralen mikroendothelialen Zellen (hCMEC/D3) nach Inkubation mit IgG-Fraktionen von gesunden Kontrollpersonen (HC), Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes (SLE) und Patienten mit Systemischer Sklerodermie (SSc) für 6h: Die Expression von TF zeigt nach 6h Inkubation mit HC-IgG, SLE-IgG und SSc-IgG keine signifikante Änderung ($p > 0.05$).

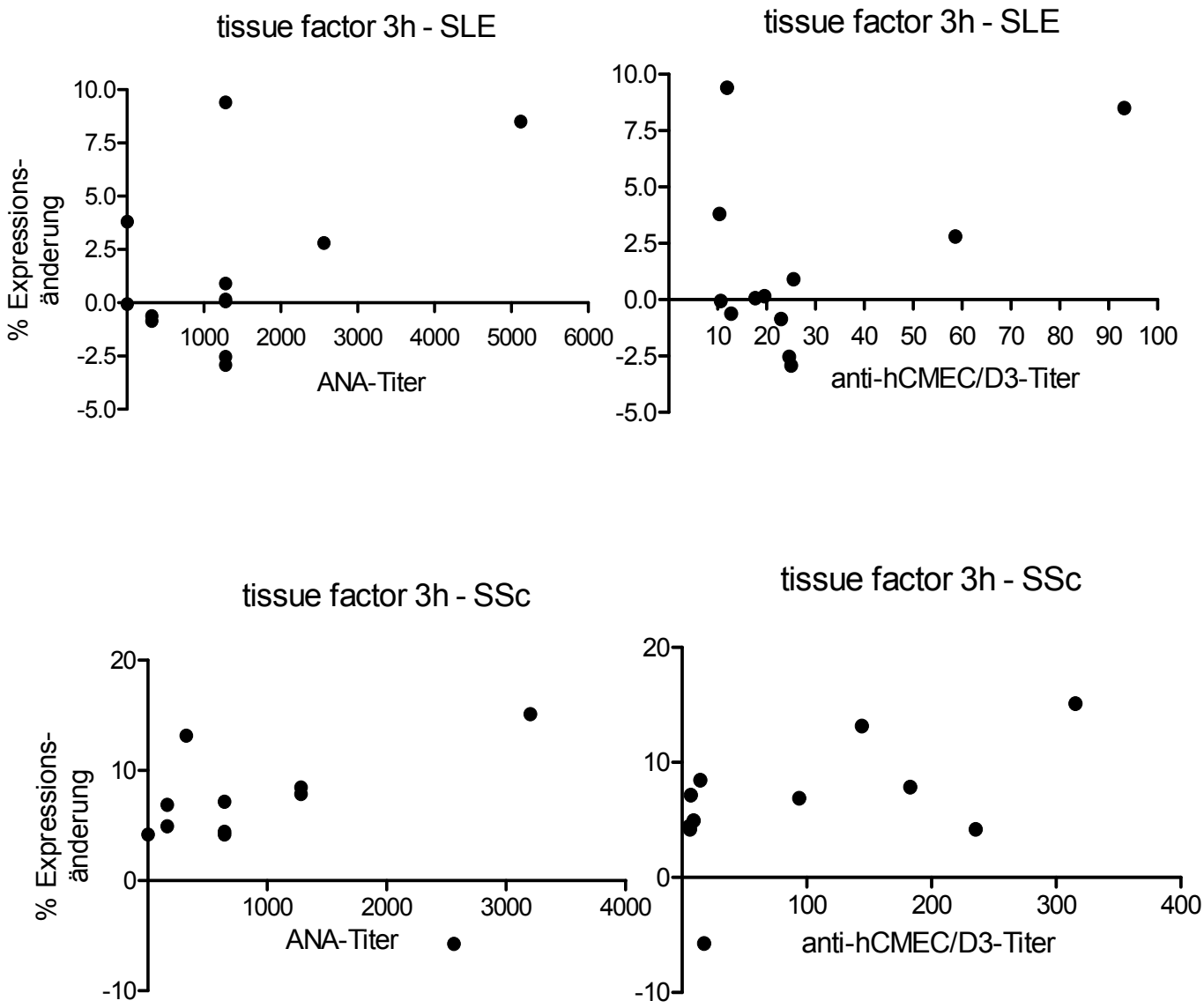

Abbildung 5: Es besteht keine Korrelation zwischen den Effekten durch SSc-IgG und SLE-IgG und dem Nachweis von Antinukleären Antikörpern (ANA) und Antikörpern gegen hCMEC/D3 (p jeweils > 0.05).

5. Diskussion

5.1 Die Heterogenität des Endothels

Es ist inzwischen vielfach belegt, dass zwischen Endothelzellen der großen Gefäße und der mikrovaskulären Strombahn grundlegende Unterschiede bestehen. Sie zeigen unterschiedliche Anforderungen an das Wachstum in vitro.[106] Es bestehen Unterschiede in der Prostaglandinsynthese: Während Prostaglandin I_2 (PGI_2) das Hauptprodukt des Arachidonsäurestoffwechsels in makrovaskulärem Endothel darstellt, zeigten Charo et al., dass PGI_2 im Arachidonsäurestoffwechsel von humanen mikroendothelialen Vorhautzellen eine untergeordnete Rolle spielt.[107]
Ein weiterer Unterschied liegt in der Fähigkeit röhrenförmige, gefäßähnliche Gebilde in vitro zu bilden.[106] Kubota et al. zeigten, dass HUVEC unter Entzug von Wachstumsfaktoren nach 6-12 Wochen begannen, röhrenförmige Strukturen auszubilden. Bei hDMEC dauerte dieser Prozess nur eine Woche. Mikrovaskuläre Zellen weisen einen zu makrovaskulärem Endothel unterschiedlichen immunologischen Phänotyp auf. Swerlick et al. untersuchten hierzu das Vorkommen von CD36 auf HUVEC und auf hDMEC. Während sich bei HUVEC kein Nachweis von CD36 erbringen lies, zeigte sich an hDMEC in der indirekten Immunfluoreszenz und in der Durchflusszytometrie eine Oberflächenexpression von CD36.[108] Desweiteren bestehen Unterschiede in der Expression von Adhäsionsmolekülen. U.a. seien hier die konstitutiv niedrigere ICAM-1 Expression auf der Zelloberfläche von HUVEC im Vergleich zu hCMEC/D3 genannt. [109,110]
Es finden sich zahlreiche Studien, die das Verhalten von HUVEC als Vertreter von Endothel der großen Gefäße und hDMEC als exemplarische Zelllinie des mikrovaskulären Endothels vergleichen. So setzen Swerlick et al. z.B. die Expression von VCAM-1 auf hDMEC in Beziehung zur Expression von VCAM-1 auf HUVEC.[111]
Es bestehen auch klare Hinweise, dass es Unterschiede innerhalb des mikrovaskulären Endothels aus verschiedenen Stromgebieten gibt. So ist z.B. bekannt, dass IFN-α auf hDMEC zu einer Hochregulierung von MHC-Klasse I führt. Es ist aber noch nicht geklärt, ob IFN-α vergleichbar an hBMEC wirkt.[102]

Die Mehrzahl der Studien vergleicht zudem die Zelllinien in Bezug auf ihr Verhalten unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie IFN-α, IFN-γ, TNF-α oder IL-1. Die Auswirkungen von IgG-Fraktionen aus SLE-Seren und SSc-Seren an einer zerebralen mikroendothelialen Zelllinie wurden bisher noch nicht untersucht.

In meinen Versuchen wurde daher erstmals die immortalisierte humane zerebrale mikroendotheliale Zelllinie hCMEC/D3 verwendet, mit dem Ziel,

1. spezifische Autoantikörper gegen Oberflächenproteine von hCMEC/D3 im Serum von Patienten mit SLE und SSc nachzuweisen,
2. die Regulierung der Expression verschiedener Oberflächenproteine durch IgG-Fraktionen aus Seren von Patienten mit SLE oder SSc an dieser speziellen Endothelform genauer zu charakterisieren und zu vergleichen.

5.2 Autoantikörper gegen humane zerebrale mikroendotheliale Zellen (anti-hCMEC/D3) bei Patienten mit Systemischem Lupus erythematodes, Systemischer Sklerodermie und primären Vaskulitiden

Seit ihrer Erstbeschreibung vor rund 30 Jahren sind anti-Endotheliale Autoantikörper (AECA) Gegenstand zahlreicher Studien. AECA sind eine heterogene Gruppe von Antikörpern, die spezifisch Proteine und Moleküle von Endothelzellen erkennen. Sie kommen bei verschiedensten Krankheiten vor, die eine Gefäßbeteiligung aufweisen wie z. B. Kollagenosen, Vaskulitiden und Atherosklerose.

Trotz intensiver Studien ist ihre genaue Rolle innerhalb der Pathogenese der einzelnen Krankheitsbilder noch immer nicht im Detail verstanden. Es ist unklar, ob AECA im Krankheitsgeschehen lediglich ein Epiphänomen darstellen oder ob sie direkte Induktoren der endothelialen Dysfunktion und des endothelialen Schadens sind. Dennoch gibt es einige Hinweise, über welche Mechanismen AECA mit dem Endothel interagieren. Im Einzelnen sind dies Endothelzellaktivierung, Antikörper-vermittelte Zelltoxizität, Komplement-abhängige Zelltoxizität und Apoptoseinduktion.

Beim Nachweis von AECA bestehen grundlegende Probleme, die zur Folge haben, dass eine breite Streuung bezüglich der Prävalenzangaben von AECA bei SLE, SSc

und Vaskulitiden in der Literatur besteht: Es besteht keine standardisierte Nachweismethode von AECA. Die am weitesten verbreitete Methode zum Nachweis von AECA stellt der ELISA dar, daneben werden aber auch Immunoblotting-Verfahren, der Radioimmunoassay und die Durchflusszytometrie, wie in meiner Studie, angewendet. Die Angaben der Prävalenz von AECA bei SLE reicht von 15%-88%[112], bei SSc von 22%-86%[113] und bei Patienten mit ANCA-assoziierten Systemischen Vaskulitiden von 0%-100%.[114]

Youinou et al. plädierten deshalb dafür, für Forschungszwecke eine Kombination aus komplementären Verfahren (ELISA, FACS, Western-Blot) einzusetzten, während für die klinische Diagnostik ein standardisiertes ELISA-Verfahren entwickelt werden müsse.[115]

Wie Renaudineau et al. zeigten, ist die AECA-Prävalenz abhängig vom eingesetzten Substrat: Mikroendotheliale Zellen weisen ein von makroendothelialen Zellen abweichendes Muster an Oberflächenproteinen auf. Ein negativer Nachweis von AECA kann somit auf das Nichtvorhandensein von bestimmten Zielantigenen auf dem verwendeten Substrat zurückzuführen sein. Renaudineau et al. schlagen deshalb vor, verschiedene Endotheltypen simultan zum Autoantikörpernachweis zu verwenden, um so falsch-negative Ergebnisse zu eliminieren.[116]

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist, ob für die Versuche fixierte oder unfixierte Endothelzellen verwendet werden. Der Fixationsprozess führt zur Permeabilisierung der Endothelzell-Membran und damit zum Austreten intrazellulärer Zellkomponenten. Ein Teil der gemessenen AECA-Aktivität könnte auf diesen Prozess zurückzuführen sein. Einige Gruppen plädieren daher dafür, ELISA nur mit unfixierten Zellen durchzuführen.[117]

Zur Prävalenz von AECA gegen humane zerebrale mikroendothelialen Zellen gibt es bisher keine Studien. In meinen Versuchen fanden sich Autoantikörper gegen hCMEC/D3 bei 80.8% der Patienten mit SLE und bei 65.5% der Patienten mit SSc. Zwischen diesen beiden Krankheitsgruppen ließ sich kein Unterschied der Antikörperbindung an hCMEC/D3 festmachen. Auffällig abweichend hingegen zeigte sich die Reaktivität von AECA aus Vaskulitis-Patienten gegen hCMEC/D3. Nur bei 10.5% der Patienten mit einer Systemischen Vaskulitis war eine Antikörperbindung an hCMEC/D3 festzustellen. 0.0% der gesunden Kontrollen zeigten anti-hCMEC/D3 Antikörper.

5.3 Zerebrales mikrovaskuläres Endothel und Hämostase bei Kollagenosen

Das vaskuläre Endothel stellt eine dynamische Oberfläche dar, die im gesunden Zustand nonadhäsiv und nonthrombogen gegenüber dem Blutstrom und den Blutkomponenten wirkt. Die Bildung von Adhäsionsmolekülen bzw. die Synthese prokoagulativer Proteine an der Endothelzelloberfläche als Antwort auf inflammatorische Stimuli durch Zytokine oder durch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) bzw. als Folge von Scheerstress, ist bekannt.[84] Eine zentrale Bedeutung innerhalb dieser prokoagulativen Situation hat hierbei die Bildung von tissue factor (TF). Dieser spielt sowohl eine Schlüsselrolle in der direkten Aktivierung des extrinsischen Weges der Gerinnungskaskade als auch indirekt, innerhalb des intrinsischen Weges der Gerinnungskaskade, über die Faktor VII-abhängige Aktivierung von Faktor IX.

TF ist ein transmembranes Glykoprotein, das der Zytokin-Rezeptor-Klasse-II-Familie angehört. Die extrazelluläre Domäne des TF dient als Rezeptor für Faktor VII (VIIa).[118] Unter normalen, physiologischen Umständen wird Faktor VII nicht gegenüber TF exponiert. Wird allerdings die Endothelzelloberfläche verletzt und somit subendotheliale Strukturen freiliegend oder wird das Endothel zur Bildung von TF auf der Zelloberfläche angeregt, so kommt es zur Interaktion von TF mit Faktor VIIa und damit zur Initiation der Gerinnungskaskade: Der TF:FVIIa-Komplex initiiert dabei die Konversion von Faktor IX und Faktor X zu den aktivierten Faktoren IXa und Xa. Diese Faktoren führen zur Bildung von Thrombin, zur Fibrin-Ablagerung und zur Plättchen-Aktivierung.

TF kommt auf der Oberfläche zahlreicher Zelltypen vor, darunter glatte Muskelzellen, Monozyten und der tunica media des Endothels.[119] In vivo ist TF auf Endothelzellen normalerweise nicht detektierbar. Osterud und Bjorklid konnten zeigen, dass inflammatorische Zytokine und angiogenetische Faktoren, wie vascular endothelial growth factor (VEGF), zur Expression von TF-mRNA führen oder TF an der Endothelzelloberfläche induzieren können und so zu einer prokoagulativen Gerinnungssituation führen.[120]

Des Weiteren ist bekannt, dass akute und chronische Infektionen, sowie neoplastische Erkrankungen und septische Zustände zur TF Expression in vivo führen.[84]

Die TF Expression ist gewebespezifisch: So bestehen im Herzmuskel eine hohe TF-Expression durch Kardiomyozyten bzw. im Gehirn durch Astrozyten. Dadurch scheint ein zusätzlicher hämostatischer Schutz dieser Gewebe gewährleistet zu werden. In der Sklelettmuskulatur hingegen werden nur geringe TF-Levels erreicht.[121]

Zwar wurden die meisten Erkenntnisse über die TF Expression in vivo an mikrovaskulären Zellen gewonnen[122,123], dennoch wurde die Mehrheit der in vitro Experimente an endothelialen Zellen im Zusammenhang mit TF an makrovaskulärem Endothel durchgeführt.[124,125,126,127,128,129,130] Demgegenüber gibt es vergleichsweise wenige in vitro Studien zur Regulierung von TF an humanen mikroendothelialen Zellen.[131,132,119] Hierfür wurden human microvascular endothelial cells (HMVECs), human vascular smooth muscle cells (human vascular SMC) und human dermal microendothelial cells (hDMECs) eingesetzt. Im Zusammenhang mit hDMECs konnte der Einfluss von TNF-α auf die Expression von TF nachgewiesen werden, wobei sich nach 6h Inkubationszeit ein Maximum der TF-Expression zeigte.[119]

In der vorliegenden Arbeit konnten nun Erkenntnisse über die Regulierung von TF an hCMEC/D3s im Zusammenhang mit Kollagenosen gewonnen werden.

SLE ist eine Autoimmunerkrankung, die mit einem erhöhten Risiko für Thrombosen sowohl in venösen als auch in arteriellen Gefäßabschnitten assoziiert ist. Die Mechanismen im Einzelnen sind nicht geklärt, als mögliche Ursachen werden die Inhibition von Protein C[133], Veränderungen innerhalb der Kaskade der Fibrinolyse[134], eine veränderte Thrombozytenfunktion[135], eine Hyperhomozysteinämie[136] und die Induktion von TF auf Endothelzellen diskutiert.[85,137]

Tannenbaum et al. inkubierten 1986 HUVEC mit Hitze-aggregiertem IgG (HA-IgG) aus SLE-Serum und konnten dabei einen dosisabhängigen Zusammenhang für die prokoagulative Aktivität der HUVEC feststellen. In diesem Experiment trat eine prokoagulative Aktivität 2h nach Inkubation von HA-IgG mit HUVEC auf, nach 6h zeigte diese ihre höchste Aktivität. Nach längeren Inkubationszeitpunkten war ein kontinuierliches Absinken der prokoagulativen Aktivität zu verzeichnen, nach 24h HA-IgG Inkubation war wieder das basale Aktivitätslevel erreicht. Die prokoagulatorische Aktivität wurde hierbei durch einen einstufigen Clotting-Assay ermittelt.[85]

Kornberg et al. untersuchten, ob eine Assoziation zwischen anti-β2-glycoprotein-I Antikörpern bzw. AECAs aus einem Patienten mit Takayasu-Arteriitis und der TF-Expression in Endothelzellen (HUVEC) besteht. Dabei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit und eine Zeitabhängigkeit für die TF-Aktivität, die TF-Antigen-Produktion und die TF-mRNA-Produktion. Auch in diesen Versuchen erreichte die TF-Aktivität nach 8h Inkubationszeit ein Maximum, um nach 24h auf einen Aktivitätslevel vergleichbar zum Zeitpunkt vor der Inkubation zurückzufallen. Die Aktivität wurde hierbei mittels einer modifizierten Prothrombinzeit beschrieben.[138]
Hasselaar et al. gelang es in vitro zu zeigen, dass IgG aus AECA-positiven SLE-Seren eine TF-Expression in HUVEC induzieren konnte. Allerdings war dies nur unter Vorinkubation der HUVEC mit TNF-α möglich.[139] Für AECA-positive Seren bei SSc konnte dieser Effekt bisher nicht nachgewiesen werden.
In meinen Versuchen mit hCMEC/D3 war zu keinem der gemessenen Zeitpunkte ein Einfluss der IgG-Fraktionen der SLE- Seren auf die TF-Expression nachzuweisen.
Dies kann verschiedene Ursachen haben: Die Protein-Expression wurde nach 3, 6, 12 und 24 Stunden bestimmt, eine sehr frühe oder zwischen 12 und 24 Stunden auftretende Expressionsänderung wäre damit nicht zu erfassen. Allerdings wurde in den o.g. Studien eine veränderte Proteinexpression bereits zwischen 2 und 6 Stunden festgestellt, also zu Zeitpunkten, die in meiner Studie auch berücksichtigt wurden. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass die TF-Expression nicht auf mRNA-Ebene, sondern nur auf Protein-Ebene gemessen wurde. So könnten Veränderungen auf mRNA-Level nicht erfasst werden. Jedoch wird mit Veränderungen der Expression auf Protein-Ebene, an der Zelloberfläche, eine mögliche Einflussnahme auf koagulatorische Prozesse sicherlich besser dargestellt.
Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass in den oben beschriebenen Studien HUVEC, also makrovaskuläres Endothel, als Zielzellen verwendet wurden. In der hier vorliegenden Studie wurde hCMEC/D3 als mikrovaskuläres zerebrales Endothel verwendet, das wahrscheinlich anders als makrovaskuläres Endothel reagiert.
Auch die Systemische Sklerodermie hat Auswirkungen auf das balancierte System von Fibrinolyse und Koagulation. Wie oben ausführlich beschrieben, besteht bei Sklerodermiepatienten eine Dysregulation des vaskulären Remodellings: es kommt zu einer Hochregulierung von vasokonstriktorischen, mitogenen, thrombogenen und proinflammatorischen Faktoren bei gleichzeitiger Herabregulierung vasodilatatorischer Faktoren, anti-thrombogener Faktoren und anti-mitotischer

Faktoren. Die unmittelbaren Folgen dieser Vaskulopathie sind Vasokonstriktion, Proliferation der Intima und Adventitia, Inflammation, Thrombose und Gewebeischämie.[140] Ames et al. untersuchten 1997 in 26 SSc Patienten das Vorkommen einer Reihe von Hämostase-relevanten Faktoren und Fibrinolyse-relevanten Faktoren:[141] Wie in vorangehenden Studien zeigten sich auch hier erhöhte Werte von vWF und Fibrinogen.[142,143] Eine erhöhte vWF-Expression konnte in meinen Versuchen nicht reproduziert werden. Bezüglich der fibrinolytischen Veränderungen zeigen sich in verschiedenen Studien kontroverse Ergebnisse: Ames et al. wiesen eine supprimierte fibrinolytische Aktivität in den untersuchten SSc-Seren nach, gemessen an einer defizienten t-PA Sezernierung und erhöhten plasma activator inhibitor (PAI) Levels. Andere Studien dagegen zeigten eine erhöhte Aktivität der Fibrinolyse[144], bzw. eine normale Fibrinolyse in vivo[145] und in vitro.[146]
In meinen Versuchen konnte zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine Veränderung der t-PA Expression festgestellt werden. Auch für Thrombomodulin, ein weiteres untersuchtes fibrinolytisches Protein, konnte hierbei keine signifikante Veränderung zu den 4 Messzeitpunkten festgestellt werden.
Es ist sicherlich in Frage zu stellen, inwieweit die angewandten Techniken, etwa die Messung der fibrinolytischen Aktivität in dermalen Gefäßen nach Histamininjektion bei SSc-Patienten bei Matucci-Cerinic et al. mit der in meiner Studie angewandten Messtechnik auf Proteinebene vergleichbar sind. Aus den o.g. Studien geht hervor, wie konträr die Ergebnisse bezüglich der fibrinolytischen Veränderungen bei SSc sind. Ein Erklärungsansatz für meine Ergebnisse könnte sein, dass sich hCMEC/D3 unter dem Einfluss von SSc-IgG abweichend von dermalen Gefäßzellen verhalten und unter dem Stimulus von SSc-IgG eher eine prothrombotische Tendenz zeigen.
In der Literatur finden sich bis dato keine Ergebnisse in Bezug auf TF und die Wirkung von IgG-Fraktionen aus SSc-Seren auf seine Expression an hCMEC/D3.
In der vorliegenden Studie konnte erstmals dargestellt werden, dass sich nach 3h Inkubation mit SSc-IgG, in Kontrast zur Inkubation mit SLE-IgG und Kontroll-IgG, eine erhöhte TF-Expression an hCMEC/D3 zeigte. Es liegt somit ein Hinweis auf eine prokoagulatorische Wirkung auf mikrovaskuläres zerebrales Endothel durch IgG-Faktionen von Patienten mit einer SSc vor. Die erhöhte Expression von TF durch SSc-IgG ist ein mögliches Zeichen einer direkten pathogenen Wirkung der Autoantikörper auf zerebrales mikrovaskuläres Endothel, unabhängig von synergistischen Effekten z.B. durch inflammatorische Zytokine wie TNF-α.

5.4 Endothel und die Expression von MHC-Klasse I Antigen und MHC-Klasse II Antigen bei Kollagenosen

Die Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel, insbesondere innerhalb des mikrovaskulären Endothels, spielt eine wichtige Rolle in der Initiierung und der Regulierung inflammatorischer Prozesse.

Damit das Immunsystem infizierte, entartete Zellen von „gesunden“ Zellen differenzieren kann, präsentieren nahezu alle kernhaltigen Zellen des Organismus über den MHC-Klasse-I Proteinkomplex körpereigene und fremde Proteine auf ihrer Oberfläche. Ist eine Zelle infiziert oder mutiert und exprimiert die Zelle körperfremde Peptide als Teil des MHC I Proteinkomplexes, so werden zytotoxische T-Lymphozyten ($CD8^+$) aktiviert und die betroffene Zelle eliminiert.

Über den MHC-Klasse II Weg können T-Helferzellen ($CD4^+$) die Produktion spezifischer Antikörper induzieren und Phagozyten stimulieren. MHC-Klasse-II Proteine werden auf der Oberfläche spezieller Zellen des Immunsystems, sogenannter Antigen-Präsentierender Zellen (APCs) dargeboten.

Van Dorp et al. stellten 1989 fest, dass es nach einer Cytomegalievirus (CMV)-Infektion zu einer Expressionssteigerung des MHC-Klasse I Proteins auf HUVEC kommt und konnte dies klar auf IFNα zurückführen. Ein Anstieg der MHC-Klasse II Proteine war dabei nicht zu verzeichnen.[147]

Nguyen at al. konnten diese Beobachtung 2001 auch an hDMEC machen:[102] Es zeigte sich eine dosisabhängige und zeitabhängige Expressionssteigerung für MHC Klasse I. Der Effekt durch IFN-α war am deutlichsten nach 48h Inkubation. Ähnliche Ergebnisse wurden für IFN-γ auf MHC Klasse I beobachtet. Während TNF-α und IFN-α keinerlei Effekte auf MHC Klasse II erzielten, konnte IFN-γ die MHC Klasse II Expression an hDMEC deutlich steigern. Innerhalb dieser Studie wurde die These aufgestellt, dass INF-α die Ursache für den vaskulären Schaden, vor allem auf mikroendothelialer Ebene bei SLE sei, indem es die MHC-Klasse I-Expression hochreguliere.

In der hier vorliegenden Studie war zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine Veränderung der Expression von MHC-Klasse I oder Klasse II an hCMEC/D3 nachzuvollziehen. Dafür sind mehrere Erklärungsansätze möglich: Zum Einen könnte dies an der Wahl meiner Messzeitpunkte nach 3h, 6h, 12h und 24 h liegen. In den

o.g. Studien zeigten sich Veränderungen der MHC Klasse I Expression erst ab 24h Inkubation mit IFN-α und erreichten ein Maximum nach 48 h. Ein möglicher Einfluss von SSc-IgG oder SLE-IgG wäre somit nicht mehr erfasst worden.
Die Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen ist sicher nicht direkt vergleichbar mit der Inkubation mit IgG-Fraktionen aus SLE oder SSc. Bisher ist nicht untersucht, ob IFN-α ähnliche Wirkung an hCMEC/D3 wie an hDMEC zeigt. Interessant zu untersuchen wäre deshalb erstens, zu welchen Ergebnissen die Inkubation von hCMEC/D3 mit Zytokinen wie IFN-α führt und zweitens, ob die Inkubation von hCMEC/D3 mit proinflammatorischen Zytokinen vor der Inkubation mit SSc-IgG oder SLE-IgG einen Einfluss auf die MHC Expression hat.
Eine weitere Erklärung für das Expressionsmuster von MHC könnte wiederum in einem abweichenden Verhalten von mikroendothelialem zerebralem Endothel im Vergleich zu dermalem mikroendothelialem Endothel oder makrovaskulärem Endothel liegen.

5.5 Zerebrales Endothel und die Expressionsänderung der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 bei Kollagenosen

VCAM-1 (vaskuläres-endotheliales-Zell-Adhäsionsmolekül-1) wird unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf Endothelzellen exprimiert. Es vermittelt die Bindung von Lymphozyten und Tumorzellen an das Endothel und reguliert die Migration von Leukozyten aus dem intravasalen Raum in das extravasale Bindegewebe.
ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) ist ein transmembranes Protein, das ebenfalls die Endothelzell-Leukozyten Interaktion vermittelt und zur T-Zell Aktivierung fähig ist.[148] Gewebeuntersuchungen von Skelettmuskulatur von Patienten mit SLE haben erhöhte Level dieser Endothelzell Adhäsionsmoleküle gezeigt.[149] Auch die Hochregulierung dieser Leukozyten-Integrine bei Patienten mit schweren Verläufen

bei SLE[150] legt den Verdacht nahe, dass diesen eine wichtige Rolle innerhalb der SLE-Pathogenese zukommt.

Norman et al. wiesen 2008 in einer in vivo Studie mit MRL/fas^{lpr} Mäusen die Zusammenhänge der Leukozytenrekrutierung mit ICAM-1 und VCAM-1 in dermalen und zerebralen mikroendothelialen Zellen der postkapillären Venolen auf.[151]

MRL/fas^{lpr} Mäuse leiden an einer Autoimmunerkrankung, die viele Ähnlichkeiten mit SLE aufweist. Mittels intravitaler Mikroskopie wurde das Leukozyten-Rolling und die Leukozytenadhäsion in Wildtyp MRL/fas^{lpr} Mäusen (ICAM-1$^{+/+}$) und in ICAM-1 defizienten MRL/fas^{lpr} Mäusen (ICAM-1$^{-/-}$) dargestellt. Dabei zeigte sich die tragende Rolle von ICAM-1 für die Leukozytenadhäsion in dermalem Endothel. In zerebralem Endothel spielt ICAM-1 hierbei keine Rolle. Das Leukozyten-Rolling und die Leukozytenadhäsion wird in zerebralem Endothel über VCAM-1 durch den α-4-Integrin/VCAM-1 Pfad vermittelt.

Aus dieser Studie geht auch hervor, dass die Grund-Expression von VCAM-1 in Gehirngefäßen gegenüber dermalen Gefäßen erhöht ist. Dies gilt für sowohl für entzündlich verändertes Gewebe als auch für gesundes Gewebe. Die Ursachen dieser regionalen Expressionsunterschiede sind nicht klar.

Swerlick et al. beschreiben die Regulation von VCAM-1 auf hDMEC und HUVEC unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine.[111] Auf keinem der beiden Zelltypen war im unstimulierten Zustand eine VCAM-1 Expression nachzuweisen. Eine Hochregulierung von VCAM-1 auf HUVEC war durch die Zytokine TNF-α, LPS, IL-1α und IL-4 zu verzeichnen. Auf hDMEC erfolgte diese nur durch TNF-α und LPS. IL-1α zeigte sich dabei auch als Induktor der ICAM-1 Hochregulierung auf hDMEC.

In meiner Arbeit konnte ich keinen statistisch signifikanten Effekt auf die ICAM-1 und VCAM-1 Expression durch die IgG-Fraktionen aus SLE-Seren und SSc-Seren nachweisen. Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass ICAM-1 und VCAM-1 nur durch Vorinkubation mit Zytokinen auf hCMEC/D3 induzierbar sind. Dies wäre weiter zu untersuchen.

5.6 Zerebrales Endothel und die Expressionsänderung der Zell-Oberflächenmoleküle P-Selectin und E-Selectin bei Kollagenosen

Die Leukozyten-Rekrutierung aus dem Blutstrom zum Ort einer Entzündung ist ein mehrstufiger Prozess, der der Regulierung vieler Zell-Adhäsionsmoleküle unterliegt. Bevor die Leukozyten definitiv ans Endothel gebunden werden, werden sie zuerst locker daran gebunden und rollen auf der vaskulären Endothelzell-Oberfläche. Dieser Bindevorgang und Rollprozess wird über Selectine vermittelt.[152] P-Selectin wird auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen und auf aktivierten Thrombozyten exprimiert, E-Selectin wird nur auf vaskulärem Endothel exprimiert. Während die Expression von P-Selectin unter dem Einfluss von Zytokinen sehr rasch erfolgt, nimmt dieser Vorgang bei E-Selectin mehrere Stunden in Anspruch.[153] Die proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1, IFN-γ und LPS agieren als Induktoren der E-Selectin Expression auf HUVEC.[154]

Ihn et al. konnten in einer Studie mit 80 SSc-Patienten erhöhte Level von sE-Selectin (gelöstes E-Selectin) nachweisen und eine Korrelation zwischen den sE-Selectin-Serumspiegeln und dem Auftreten einer pulmonalen Fibrose bei SSc darstellen.[155]

Der P-Selectin Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) stellt einen hochaffinen Liganden für P-Selectin dar und wirkt in seiner gelösten Form (sPSGL-1) als Antagonist für P-Selectin. Yanaba et al. zeigten 2004, dass erhöhte Serum-Level von sPSGL-1 bei SSc mit vermindertem Vorkommen und milderem Verlauf einer Lungenfibrose korrelieren.[156]

Carvalho et al. konnten beobachten, dass durch IgG-AECA-Fraktionen aus SSc-Patienten die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin auf HUVEC induziert wurde.[157]

Ein interessanter Aspekt ist, dass den Selectinen nicht in allen Gefäßabschnitten die gleichen Rollen zukommen. Norman et al. konnten innerhalb der bereits oben erwähnten Studie mit MRL/fas^{lpr} Mäusen zeigen, dass E-Selectin und P-Selectin eine wichtige Rolle für die Leukozyten-Endothel-Interaktion in dermalen postkapillären Venolen zukommt. In postkapillären Venolen des Gehirns hingegen spielen die Selectine für die Leukozytenrekrutierung keine Rolle.[151]

Auch in meinen Versuchen war zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine Veränderung der E-Selectin-Expression und P-Selectin-Expression auf hCMEC/D3

unter dem Einfluss von IgG-Fraktionen aus SLE und SSc Patienten zu beobachten, was möglicherweise die geringere Bedeutung von E-Selectin und P-Selectin für inflammatorische / koagulatorische Prozesse im zerebralem Endothel stützt.

Zusammengefasst wird aus der hier vorgelegten Arbeit deutlich, dass humane zerebrale mikroendotheliale Zellen eine eigene Entität innerhalb des mikrovaskulären Gefäßbettes darstellen. Sie sind fähig, Autoantikörper zu binden und weisen unter dem Einfluss von anti-hCMEC/D3 Antikörpern abweichende Reaktionsmuster von anderen mikroendothelialen Zellen auf. Des Weiteren zeigt die Untersuchung, dass IgG gegen hCMEC/D3 von SSc-Patienten über eine prokoagulative Wirkung verfügen, anders als IgG aus SLE-Patienten.
Die Tatsache, dass Autoantikörper gegen die Zelloberfläche von zerebralem mikrovaskulärem Endothel von Patienten mit SSc, aber nicht von Patienten mit SLE, zu einer Hochregulierung von tissue factor auf hCMEC/D3 führt, lässt möglicherweise auf einen Subtyp von Autoantikörpern bei SSc schließen, der über eine direkt pathogene, prokoagulative Wirkung verfügt.

6. Literaturverzeichnis

[1] Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Criteria for autoimmune diseases. J Am Med Assoc **1957**; 164: 1439-1447

[2] Rose NC, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases. Immunol Today. **1993**; 14: 426-430

[3] Sgonc R. The vascular perspective of systemic sclerosis: of chickens, mice and men. Int Arch Allergy Immunol. **1999**; 120: 169–176

[4] Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G, Stojanovich L, et al.. The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases. Israel Med Assoc J. **2008**; 10: 8–12

[5] Blank M, Krup M, Mendlovic S, Fricke H, Mozes E, Talal N, Coates AR, Shoenfeld Y. The importance of the pathogenic 16/6 idiotype in the induction of SLE in naïve mice. Scand J Immunol. **1990**; 31:45-52

[6] Monneaux F, Muller S. Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: identification of triggering peptide sequences. Arthritis Rheum. **2002**; 46: 1430–1438

[7] Fernández-Gutiérrez B, de Miguel S, Morado C, Hernández-García C, Bañares A, Jover JA. Defective early T and T-dependent B cell activation in systemic lupus erythematosus. Lupus. **1998**; 7(5): 314-322

[8] Linker-Israeli M, Quismorio FP Jr, Horwitz DA. CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. Arthritis Rheum. **1990**; 33: 1216–1225

[9] Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum **1998**; 41: 1241–1250

[10] Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine induced dendritic cell activation. Immunity. **2004**; 20: 539-550

[11] Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. J Immunol. **2000**; 165: 6635-6643

[12] Gustafsson R, Totterman TH, Klareskog L, Hallgren R. Increase in activated T cells and reduction in suppressor inducer T cells in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. **1990**; 49: 40–45

[13] Riccieri V, Parisi G, Spadaro A, Scrivo R, Barone F, et al. Reduced circulating natural killer T cells and gamma/delta T cells in patients with systemic sclerosis. J Rheumatol. **2005**; 32: 283–286

[14] Fujii H, Hasegawa M, Takehara K, Mukaida N, Sato S. Abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes frompatients with systemic sclerosis. Clin Exp Immunol. **2002**; 130: 548–556

[15] Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, Settas L, Zafiriou E, Sakkas L. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. **2005** Aug; 64(8): 1233-1235

[16] Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. J Immunol. **2002**; 168: 3649–3659

[17] Gu YS, Kong J, Cheema GS, Keen CL, Wick G, Gershwin ME. The immunobiology of systemic sclerosis. Semin Arthritis Rheum. **2008** Oct; 38(2): 132-160

[18] Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, Mayes MD, Reveille JD, Agarwal SK. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. Arthritis Res Ther. **2009**; 11(5): R147

[19] Herold G. Innere Medizin. **2007**; 589

[20] Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. N Engl J Med. **2003**; 349: 1526-1533

[21] Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Clin Pathol. **2003** Jul; 56(7): 481-490

[22] Sallmann S, Fiebig B, Hedrich CM, Heubner G, Gahr M. Systemic lupus erythematosus in children and adolescents. Z Rheumatol. **2006** Nov; 65(7): 576-578, 580-582, 584-585

[23] Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The

European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Medicine (Baltimore). **1993**; 72: 113–124

[24] Lehman TJ, McCurdy DK, Bernstein BH et al. Systemic lupus erythematosus in the first decade of life. Pediatrics. **1989**; 83: 235–239

[25] Herold, G. Innere Medizin. **2007**; 589-599

[26] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. ArthritisRheum. **1982**; 25: 1271-1277

[27] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. **1997**; 40:1725

[28] Manson JJ, Rahman A. Systemic lupus erythematosus. Orphanet J Rare Dis. **2006** (3); 1: 6

[29] Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Mejía JC, Aydintug AO, Chwalinska-Sadowska H, de Ramón E, Fernández-Nebro A, Galeazzi M, Valen M, Mathieu A, Houssiau F, Caro N, Alba P, Ramos-Casals M, Ingelmo M, Hughes GR. European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. Medicine (Baltimore). **2003** Sep; 82(5): 299-308

[30] Leandro MJ, Edwards JC, Cambridge G, Ehrenstein MR, Isenberg DA. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. **2002**; 46: 2673-2677

[31] Isenberg DA. B cell targeted therapies in autoimmune diseases. J Rheumatol. **2006**; 33 Suppl 77: 24–28

[32] Distler O, Gay S. Scleroderma. Internist (Berl). **2010** Jan; 51(1): 30-38

[33] LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. J Clin Invest. **1974**; 54: 880–889

[34] Genth E, Krieg T. Systemic sclerosis - diagnosis and classification. Z Rheumatol. **2006** Jul; 65(4): 268-274

[35] Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. Sem Arthritis Rheum. **2005**; 35: 35–42

[36] Salojin KV, le Tonqueze M, Saraux A, Nassonov EL, Dueymes M, Piette JC, et al. Antiendothelial cell antibodies: useful markers of systemic sclerosis. Am J Med. **1997**;102: 178–185

[37] Peterson LS, Nelson AM, Su WP. Classification of morphea (localized scleroderma). Mayo Clin Proc. **1995** Nov; 70(11): 1068-1076

[38] Vierra E, Cunningham BB. Morphea and localized scleroderma in children. Semin Cutan Med Surg. **1999** Sep; 18(3): 210-225

[39] Peterson LS, Nelson AM, Su WP, Mason T, O'Fallon WM, Gabriel SE. The epidemiology of morphea (localized scleroderma) in Olmsted County 1960-1993. J Rheumatol. **1997** Jan; 24(1): 73-80

[40] Tuffanelli DL. Localized scleroderma. Semin Cutan Med Surg. **1998** Mar; 17(1): 27-33

[41] Mayes MD. Classification and epidemiology of scleroderma. Semin Cutan Med Surg. **1998** Mar; 17(1): 22-26

[42] LeRoy EC, Krieg T, Black C, Medger TA Jr, Fleischmajer R, Rowell N, Jablonska S, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets, and pathogenesis. J Rheumatol. **1988**; 15: 202–205

[43] Langaard H. Dysphagia, Raynaud's disease, calcinosis cutis: a nosological entity as expression of scleroderma. Ugeskr Laeger. **1959**; 121: 210–213

[44] Winterbauer RH.: Multiple telangiectasia, Raynaud's phenomenon, sclerodactyly, and subcutaneous calcinosis: a syndrome mimicking hereditary hemorrhagic telangiectasia. Bull Johns Hopkins Hosp. **1964**; 114: 361–383

[45] Walker UA, Tyndall A, Czirjak L, et al. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials And Research group database. Ann Rheum Dis. **2007** Jun; 66(6): 754-763

[46] Koenig M, Joyal F, Fritzler MJ, Roussin A, Abrahamowicz M, Boire G, Goulet JR, Rich E, Grodzicky T, Raymond Y, Senécal JL. Autoantibodies and microvascular damage are independent predictive factors for the progression of Raynaud's phenomenon to systemic sclerosis: a twenty-year prospective study of 586 patients, with validation of proposed criteria for early systemic sclerosis. Arthritis Rheum. **2008** Dec; 58(12): 3902-3912

[47] Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, et al. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. **2008** Aug; 47(8): 1185-1192

[48] Steen VD, Medsger TA. Changes in causes of death in systemic sclerosis, 1972-2002. Ann Rheum Dis. **2007** Jul; 66(7): 940-944

[49] Distler JH, Jüngel A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, Michel BA, Hauser T, Schett G, Gay S, Distler O. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. Arthritis Rheum. **2007** Jan; 56(1): 311-322

[50] Herold. G. Innere Medizin. **2007**; 606

[51] Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CG, et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. Arthritis Rheum. **1994** Feb; 37(2): 187-192

[52] Jennekens FGI, Kater L. The central nervous system in systemic lupus erythematosus. Part 1. Clinical syndromes: a literature investigation. Rheumatology. **2002**; 41: 605–618

[53] The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes .Arthritis Rheum. **1999** Apr; 42(4):599-608

[54] Sanna G, Bertolaccini ML, Cuadrado MJ, et al. Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: prevalence and association with antiphospholipid antibodies. J Rheumatol. **2003**; 30: 985–992

[55] Neuhaus O, Hartung HP. Neurological aspects of systemic rheumatological disorders. Z Rheumatol. **2004** Apr; 63(2): 104-112

[56] Chin RL, Latov N. Central nervous system manifestations of rheumatologic diseases. Curr Opin Rheumatol. **2004**; 17: 91–99

[57] Siva A. Vasculitis of the nervous system. J Neurol. **2001** Jun; 248(6): 451-468

[58] Lie JT. Primary (granulomatous) angiitis of the central nervous system-clinicopathologic analysis of 15 new cases and a review of the literature. Hum Pathol. **1992**; 23(2): 164–171

[59] Chu CT,Gray L, Goldstein LB, Hulette CM. Diagnosis of intracranial vasculitis: a multi-disciplinary approach. J Neuropathol Exp Neurol. **1998**; 57(1): 30–38

[60] Bouche P, Léger JM, Travers MA, Cathala HP, Castaigne P. Peripheral neuropathy in systemic vasculitis: clinical and electrophysiologic study of 22 patients. Neurology. **1986** Dec; 36(12): 1598-1602

[61] Heuss D, Schlotter-Weigel B, Sommer C. German Centers for Neuromuscular Disease: Diagnosis and therapy of vasculitic neuropathy. Consensus statement of the German Centers for Neuromuscular Disease: Fortschr Neurol Psychiatr. **2003** Apr; 71(4): 172-186

[62] Roep BO. Autoreactive T cells in endocrine/organ-specific autoimmunity: why has progress been so slow? Springer Semin Immunopathol. **2002** Dec; 24(3): 261-271

[63] Herold, G. Innere Medizin. **2007**; 636

[64] Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH. Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. Kidney Int. **1995**; 48: 705–711

[65] DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. Nat Med. 2001 Nov;7(11): 1189-1193

[66] Hietarinta M, Lassila O. Clinical significance of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. Ann Med. **1996**; 28: 283–291

[67] Grassegger A, Pohla-Gubo G, Frauscher M, Hintner H. Autoantibodies in systemic sclerosis (scleroderma): clues for clinical evaluation, prognosis and pathogenesis. Wien Med Wochenschr. **2008**; 158(1-2): 19-28

[68] Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. Arthritis Rheum. **2003**; 48: 1363–1373

[69] Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, et al. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. N Engl J Med. **2006**; 354: 2667–2676

[70] van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA, van der Giessen M, van der Hem GK, The TH. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. Lancet. **1985** Feb 23; 1(8426): 425-429

[71] Jennette JC, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. N Engl J Med. **1997** Nov 20; 337(21): 1512-1523

[72] Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y,Maeda N, Falk RJ, Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. J Clin Invest. **2002**; 110: 955–963

[73] Lindqvist KJ, Osterland CK. Human antibodies to vascular endothelium. Clin Exp Immunol. **1971** Dec; 9(6): 753-760

[74] Savage CO, Cooke SP. The role of the endothelium in systemic vasculitis. J Autoimmun. **1993** Apr; 6(2): 237-249

[75] Damianovich M, Gilburd B, George J, Del Papa N, Afek A, Goldberg I, Kopolovic Y, Roth D, Barkai G, Meroni PL, Shoenfeld Y. Pathogenic role of anti-endothelial cell antibodies in vasculitis. An idiotypic experimental model. J Immunol. **1996** Jun 15; 156(12): 4946-4951

[76] Tripathy NK, Upadhyaya S, Sinha N, Nityanand S. Complement and cell mediated cytotoxicity by antiendothelial cell antibodies in Takayasu's arteritis. J Rheumatol. **2001**; 28: 805–808

[77] Zecević RD, Vojvodić D, Ristić B, Pavlović MD, Stefanović D, Karadaglić D. Skin lesions-an indicator of disease activity in systemic lupus erythematosus? Lupus. **2001**; 10(5): 364-367

[78] Calamia KT, Balabanova M. Vasculitis in systemic lupus erythematosis. Clin Dermatol. **2004** Mar-Apr; 22(2): 148-156

[79] Hirschberg H, Hirschberg T, Jaffe E, Thornsby E. Antigen-presenting properties of human vascular endothelial cells: inhibition by anti-HLA-DR antisera. Scand J Immunol. **1981** Nov; 14(5): 545-553

[80] Stevens SK, Weissman IL, Butcher EC. Differences in the migration of B and T lymphocytes: organ-selective localization in vivo and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition. J Immunol. **1982** Feb; 128(2): 844-851

[81] Kallenberg CG, Heeringa P. Pathogenesis of vasculitis. Lupus. **1998**; 7(4): 280-284

[82] D'Cruz D. Vasculitis in systemic lupus erythematosus. Lupus. **1998**; 7(4): 270-274

[83] Lewis MJ, D'Cruz D. Adhesion molecules, mycophenolate mofetil and systemic lupus erythematosus. Lupus. **2005**; 14 Suppl 1: 17-26

[84] Semeraro N, Colucci M. Tissue factor in health and disease. Thromb Haemost. **1997** Jul; 78(1): 759-764

[85] Tannenbaum SH, Finko R, Cines DB. Antibody and immune complexes induce tissue factor production by human endothelial cells. J Immunol. **1986** Sep 1; 137(5): 1532-1537

[86] Worda M, Sgonc R, Dietrich H, Niederegger H, Sundick RS, Gershwin ME, et al. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. Arthritis Rheum. **2003**; 48: 2605-2614

[87] Belizna C, Duijvestijn A, Hamidou M, Cohen Tervaert JW. Antiendothelial cell antibodies in vasculitis and connective tissue disease. Ann Rheum Dis. **2006** Dec; 65(12): 1545-1550

[88] Praprotnik S, Blank M, Meroni PL, Rozman B, Eldor A, Shoenfeld Y. Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and macrovascular endothelial cells: the pathogenic and diagnostic implications. Arthritis Rheum. **2001** Jul; 44(7): 1484-1494

[89] Bordron A, Revelen R, D'arbonneau F, et al. Functional heterogeneity of anti-endothelial cell antibodies. Clin Exp Immunol. **2001**; 124: 492–501

[90] Del Papa ND, Raschi E, Moroni G, et al. Anti-endothelial cell IgG fractions from systemic lupus erythematosus patients bind to human endothelial cells and induce a pro-adhesive and a proinflammatory phenotype in vitro. Lupus. **1999**; 8: 423–429

[91] Blank M, Krause I, Goldkorn T, Praprotnik S, Livneh A, Langevitz P, Kaganovsky E, Morgenstern S, Cohen S, Barak V, Eldor A, Weksler B, Shoenfeld Y. Monoclonal anti-endothelial cell antibodies from a patient with Takayasu arteritis activate endothelial cells from large vessels. Arthritis Rheum. **1999** Jul; 42(7): 1421-1432

[92] Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. Arthritis Res Ther. **2007**; 9 Suppl 2: 2

[93] Sticherling M. The role of endothelin in connective tissue diseases. Rheumatology (Oxford). **2006** Oct; 45 Suppl 3: iii8-10

[94] Chizzolini C. Update on pathophysiology of scleroderma with special reference to immunoinflammatory events. Ann Med. **2007**; 39: 42–53

[95] Kahaleh B. The microvascular endothelium in scleroderma. Rheumatology (Oxford). **2008** Oct; 47 Suppl 5: v14-5

[96] Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. Arthritis Rheum. **2000**; 43: 2550–2562

[97] Carvalho D, Savage CO, Isenberg, D, Pearson JD. IgG anti-endothelial cell autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus or systemic vasculitis stimulate the release of two endothelial cell-derived mediators, which enhance adhesion molecule expression and leukocyte adhesion in an autocrine fashion. Arthritis Rheum. **1999**; 42: 631–640

[98] Lee KH, Bang D, Choi ES, Chun WH, Lee ES, Lee S. Presence of circulating antibodies to a disease-specific antigen on cultured human dermal microvascular endothelial cells in patients with Behçet's disease. Arch Dermatol Res. **1999** Jul-Aug; 291(7-8): 374-381

[99] Taekema-Roelvink ME, Kooten CV, Kooij SV, Heemskerk E, Daha MT. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1. J Am Soc Nephrol. **2001**; 12: 932–940

[100] Rosenberg RD, Aird WC. Vascular-bed specific haemostasis and hypercoagulable states. N Eng J Med. **1999**; 340: 1555–1564

[101] Meroni PL, Tincani A, Sepp N, Raschi E, Testoni C, Corsini E, Cavazzana I, Pellegrini S, Salmaggi A. Endothelium and the brain in CNS lupus. Lupus. **2003**; 12(12): 919-928

[102] Nguyen VA, Fürhaupter C, Sepp N. Upregulation of MHC class I molecules on human microvascular endothelial cells by interferon alpha. Microvasc Res. **2001**; 62: 204–207

[103] Frigerio S, Gelati M, Ciusani E, et al. Immunocompetence of human microvascular brain endothelial cells: cytokine regulation of IL-1b, MCP-1, IL-10, sICAM-1 and sVCAM-1. J Neurol. **1998**; 245: 727–730

[104] Fleck RA, Rao LVM, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal antihuman tissue factor antibody. Thromb Res. **1990**; 59: 421–437

[105] Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis Rheum. **1980**; 23: 581-590

[106] Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. J Cell Biol. **1988** Oct; 107(4): 1589-1598

[107] Charo IF, Shak S, Karasek MA, Davison PM, Goldstein IM. Prostaglandin I2 is not a major metabolite of arachidonic acid in cultured endothelial cells from human foreskin microvessels. J Clin Invest. **1984** Sep; 74(3): 914-919

[108] Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ. Human dermal microvascular endothelial cells but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. J.Immunol. **1992**; 148: 78-83

[109] Swerlick RA, Garcia-Gonzalez E, Kubota Y, Xu YL, Lawley TJ. Studies of the modulation of MHC antigen and cell adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. J Invest Dermatol. **1991**; 97(2): 190-196

[110] Lee KH, Lawley TJ, Xu YL, Swerlick RA. VCAM-1-, ELAM-1-, and ICAM-1-independent adhesion of melanoma cells to cultured human dermal microvascular endothelial cells. J Invest Dermatol. 1992 Jan; 98(1): 79-85

[111] Swerlick RA, Lee KH, Li LJ, Sepp NT, Caughman SW, Lawley TJ. Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. J Immunol. **1992**; 149(2): 698-705

[112] Adler Y, Salozhin K, Le Tonqueze M, et al. Anti-endothelial cell antibodies: a need for standardization. Lupus. **1994**; 3: 77–84

[113] Mihai C, Tervaert JW. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. **2010** Feb; 69(2): 319-324

[114] Hu N, Westra J, Huitema MG, Stegeman CA, Limburg PC, Kallenberg CG. Autoantibodies against glomerular endothelial cells in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis. Nephrology (Carlton). **2009** Feb; 14(1): 11-15

[115] Youinou P, Le Dantec C, Bendaoud B, et al. Endothelium, a target for immunemediated assault in connective tissue diseases. Autoimmun Rev. **2006**; 5: 222–228

[116] Renaudineau Y, Grunebaum E, Krause I, Praprotnik S, Revelen R, Youinou P. Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in systemic sclerosis-increased sensitivity using different endothelial cell substrates and association with other autoantibodies. Autoimmunity. **2001**; 33:171-179

[117] Belizna C, Cohen-Tervaert JW. Specificity, pathogenecity, and clinical value of antiendothelial cell antibodies. Semin Arthritis Rheum. **1997**; 27: 98-109

[118] Morrissey JH. Tissue factor. An enzyme cofactor and a true receptor.Thromb Haemost. **2001**; 86: 66-74

[119] O'Reilly FM, Casper KA, Otto KB, Sexton SA, Swerlick RA. Regulation of tissue factor in microvascular dermal endothelial cells. J Invest Dermatol. **2003** Mar; 120(3): 489-494

[120] Osterud B, Bjorklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. SeminThromb Hemost. **2001**; 27: 605-617

[121] Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. Blood Cells Mol Dis. **2006** Mar-Apr; 36(2): 104-107

[122] Contrino J, Hair GA, Schmeizl MA, Rickles FR, Kreutzer DL. In situ characterization of antigenic and functional tissue factor expression in human tumors utilizing monoclonal antibodies and recombinant factor VIIa as probes. Am J Pathol. **1994**; 145: 1315-1322

[123] Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. Nature. Med. **1996**; 2: 209-215

[124] Parry GC, Mackman N. Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **1995**; 15: 612-621

[125] Mackman N. Regulation of tissue factor gene expression in human monocytic and endothelial cells. Haemostasis. **1996**; 26(Suppl. 1): 17-19

[126] Camera M, Giesen PL, Fallon J, Auero BM, Taubman M, Tremoli E, Nemerson Y. Cooperation between VEGF and TNF-alpha is necessary for exposure of active tissue factor on the surface of human endothelial cells. ArteriosclerThromb Vasc Biol. **1999**; 19: 531-537

[127] Holzmuller H, Moll T, Hofer-Warbinek R, Mechtcheriakova D, Binder BR, Hofer E. A transcriptional repressor of the tissue factor gene in endothelial cells. Arterioscler ThrombVasc Biol. **1999**; 19: 1804-1811

[128] Mechtcheriakova D, Wlachos A, Holzmuller H, Binder BR, Hofer E. Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1. Blood. **1999**; 93: 3811-3823

[129] Mechtcheriakova D, Schabbauer G, Lucerna M, Clauss M, de Martin R, Binder BR, Hofer E. Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF-alpha signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. FASEB J. **2001**; 15: 230-242

[130] Holschermann H, Rascher C, Oelschlager C, et al. Opposite regulation of tissue factor expression by calcineurin in monocytes and endothelial cells. J Immunol. **2001**; 166: 7112-7120

[131] Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. Circulation. **2000**; 101: 2144-2148

[132] Zhang JC, Ruan Q, Paucz L, Fabry A, Binder BR, Wojta J. Stimulation of tissue factor expression in human microvascular and macrovascular endothelial cells by cultured vascular smooth muscle cells in vitro. J Vasc Res. **1999**; 36: 126-132

[133] Ehrenforth S, Radtke KP, Scharrer I. Acquired activated protein C resistance in patients with lupus anticoagulants. Thromb Haemost. **1995**; 74: 797–798

[134] Chu P, Russell NH, Powell RJ, Cater DR, Harris RJ. Abnormal fibrinolytic activity in systemic lupus erythematosus and possible mechanisms. Br J Rheumatol. **1988**; 27: 436–439

[135] Fuse I, Hattori A, Higashihara M, Takizawa S, Takeshige T, Hanano M, Nagayama R, Koike T, Takahashi H, Shibata A. A defect of platelet release reaction in a patient with SLE: impaired platelet aggregation induced by phorbol ester with a normal phosphorylation of 40K protein. Scand J Haematol. **1986**; 36: 44–54

[136] Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, Rosenberg IH. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, antiphospholipid antibodies, and thromboembolic events in systemic lupus erythematosus: a retrospective cohort study. J Rheumatol. **1998**; 25: 1737–1742

[137] Reverter JC, Tassies D, Font J, Monteagudo J, Escolar G, Ingelmo M, Ordinas A. Hypercoagulable state in patients with antiphospholipid syndrome is related to high induced tissue factor expression on monocytes and to low free protein S. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **1996**; 16: 1319–1326

[138] Kornberg A, Renaudineau Y, Blank M, Youinou P, Shoenfeld Y. Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies and anti-endothelial cell antibodies induce tissue factor in endothelial cells. Isr Med Assoc J. **2000** Jul; 2 Suppl: 27-31

[139] Hasselaar P, Derksen RHWM, Oosting WM, et al. Synergistic effect of low doses of tumor necrosis factor and sera from patients with systemic lupus erythematosus on the expression of procoagulant activity by cultured endothelial cells. Thromb Haemost. **1989**; 62: 654–660

[140] Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). **2009** Jun; 48 Suppl 3: iii3-7

[141] Ames PR, Lupoli S, Alves J, Atsumi T, Edwards C, Iannaccone L, Khamashta MA, Hughes GR, Brancaccio V. The coagulation/fibrinolysis balance in systemic sclerosis: evidence for a haematological stress syndrome. Br J Rheumatol. **1997** Oct; 36(10): 1045-1050

[142] Goodfield MJ, Orchard MA, Rowell NR. Whole blood platelet aggregation and coagulation factors in patients with systemic sclerosis. Br J Haematol. **1993**; 84: 675-680

[143] Greaves M, Malia RG, Ward MA, et al. Elevated von Willebrand factor antigen in systemic sclerosis: relation- ship to visceral disease. Br J Rheumatol. **1988**; 27: 281-285

[144] Browse NI, Gray L, Jarret PEM, et al. Blood and vein wall fibrinolytic activity in health and in vascular diseases. Br Med J. **1977**; 1:478-483

[145] Matucci-Cerinic M, Lotti T, Iombardi A, Pignone A, Iannone F, Beneforti E, et al. Cutaneous and plasma fibrinolytic activity in systemic sclerosis. Evidence of normal plasminogen activation. Int J Dermatol. **1990**; 29: 644-647

[146] Lotti T, Matucci-Cerinic M, Marmugi D, et al. Cutaneous fibrinolytic activity in scleroderma. Clin Exp Rheumatol. **1985**; 3: 248-251

[147] van Dorp WT, Jonges E, Bruggeman CA, Daha MR, van Es LA, van der Woude FJ. Direct induction of MHC class I, but not class II, expression on endothelial cells by cytomegalovirus infection. Transplantation. **1989** Sep; 48(3): 469-472

[148] Van Seventer, GA, Shimizu, Y, Horgan, K. J., Shaw, S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. J. Immunol. **1990**; 144: 4579–4586

[149] Pallis M, Robson DK, Haskard DO, Powell RJ. Distribution of cell adhesion molecules in skeletal muscle from patients with systemic lupus erythematosus. Ann. Rheum. Dis. **1993**; 52: 667–671

[150] Takeuchi T, Amano K, Sekine H, Koide J, Abe T. Upregulated expression and function of integrin adhesive receptors in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis. J. Clin. Invest. **1993**; 92: 3008-3016

[151] Norman MU, James WG, Hickey MJ. Differential roles of ICAM-1 and VCAM-1 in leukocyte-endothelial cell interactions in skin and brain of MRL/faslpr mice. J Leukoc Biol. **2008** Jul; 84(1): 68-76

[152] McEver RP. Selectins. Curr Opin Immunol. **1994**; 6: 75–84

[153] Tedder TF, Li X, Steeber DA. The selectins and their ligands: adhesion molecules of the vasculature. Adv Mol Cell Biol. **1999**; 28: 65–111

[154] Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun. **1992** Sep 16;187(2): 584-589

[155] Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Takehara K, Tamaki K. Increased serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with systemic sclerosis. Br J Rheumatol. **1998**; 37: 1188-1192

[156] Yanaba K, Takehara K, Sato S. Serum concentrations of soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 are increased in patients with systemic sclerosis: association with lower frequency of pulmonary fibrosis. Ann Rheum Dis. **2004**; 63: 583-587

[157] Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. J Clin Invest. **1996** Jan 1; 97(1): 111-119

7. Anhang

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaflicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, am 18.06.2010

Magdalena Maria Fürst

Publikationsverzeichnis

Aus Teilen der vorliegenden Dissertation wurde folgendes Abstract zur Posterpräsentation auf der Jahrestagung 2010 der Deutschen Gesellschaft für Neurologie angenommen:

„Antikörper-Effekte von Patienten mit einem Systemischen Lupus Erythematodes und einer Systemischen Sklerodermie auf humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen“

M. Fürst[1], P. Singh[1], R. Dinser[2], U. Müller-Ladner[2], M. Kaps[1], F. Blaes[1], M. Tschernatsch[1]

1 Klinik für Neurologie der Justus-Liebig-Universität, Giessen, Deutschland
2 Abteilung für Rheumatologie der Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim, Deutschland

Aus Teilen der vorliegenden Dissertation entstand ein Vortrag mit dem Thema „Antikörper-vermittelte Effekte von Patienten mit einem Systemischen Lupus und einer Systemischen Sklerose auf humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen“. Dieser wurde im Rahmen des wissenschaftlichen Symposiums mit dem Thema „B cell tolerance in lupus“ auf dem 38. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie 2010 gehalten.