

Bestimmung und Bedeutung antiendothelialer Antikörper
beim Menschen:

Entwicklung verschiedener Testverfahren zur Quantifizierung
antiendothelialer Antikörper und Anwendung dieser Tests bei
einem Normalkollektiv und bei Patienten.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Mirja Glotzbach
aus Fulda

Gießen, 2004

Aus der Abteilung
Hämostaseologie und Transfusionsmedizin
Kerckhoff-Klinik
Bad Nauheim
Direktor: Prof. Dr. med. G. Müller-Berghaus

Betreuer: Dr. med. K. Madlener und Prof. Dr. med. G. Müller-Berghaus

Gutachter: Prof. Dr. med. G. Müller-Berghaus

Gutachter: Prof. Dr. med. R. Voss

Tag der Disputation: 09.11.2004

Für meine Eltern
Waltraut Nilges und Wolfgang Glotzbach

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Endothelfunktion und Hämostase	5
1.2	Vaskulitis	6
1.3	Lupus antikoagulans und Antiphospholipid-Syndrom.....	8
1.4	AECA und ihre pathogenetische Bedeutung	9
1.5	Endotheliale Autoantigene	10
1.6	Fragestellung	12
2	Materialien	13
2.1	Reagenzien	13
2.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.3	Geräte.....	14
3	Methoden	15
3.1	Zellkultur	15
3.1.1	Blutgruppenbestimmung	15
3.1.2	Isolierung humaner umbilikal-venöser Endothelzellen	15
3.1.3	Kultur und Passage der Endothelzellen.....	16
3.1.4	Zellzählung.....	17
3.1.5	Herstellung des HUVE-Zell-Lysats	17
3.2	Immunologische Methoden	18
3.2.1	Prinzip des Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	18
3.2.2	Zellulärer HUVE-Zell-ELISA zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern der Klasse IgM aus humanem Citratplasma (cHUVEC-IgM)	21
3.2.3	Zellulärer HUVE-Zell-ELISA zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern der Klasse IgG aus humanem Citratplasma (cHUVEC-IgG).....	23
3.2.4	HUVE-Zell-Lysat-ELISA zum Nachweis von antiendothelialen Anti-körpern der Klasse IgM aus humanem Citratplasma (HUVEC-Lysat-IgM)	23
3.2.5	HUVE-Zell-Lysat-ELISA zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern der Klasse IgG aus humanem Citratplasma (HUVEC-Lysat-IgG).....	25
3.2.6	Antikörper-Sandwich-ELISA zum Nachweis von IgM aus humanem Citratplasma (IgM-ELISA) ..	25
3.2.7	IgG-Konzentrationsbestimmung	26
3.2.8	Bestimmung von Antiphospholipid-Antikörpern	26
3.2.9	Bestimmung von Anticardiolipin-Antikörpern	28
3.2.10	Bestimmung von Autoantikörpern gegen Granulozyten-Cytoplasma (ANCA).....	29
3.3	Funktionelle Gerinnungstests	31
3.3.1	Kaolin Clotting Time-Index	31
3.3.2	Russell Viper Venom-Test (RVV-Test).....	31
3.4	Statistische Auswertung	32
3.4.1	Intra- und Interassayvarianz	32
3.4.2	Deskriptive und analytische Auswertung	32

4	Ergebnisse	33
4.1	Test-Entwicklung	33
4.1.1	Entwicklung eines HUVE-Zell-Lysat-ELISA zur Quantifizierung anti-endothelialer Antikörper der Klasse IgG (Lysat-IgG)	33
4.1.2	Entwicklung eines zellulären HUVE-Zell-ELISA zur Quantifizierung antiendothelialer Antikörper der Klasse IgG (HUVEC-IgG)	37
4.1.3	Entwicklung eines HUVE-Zell-Lysat-ELISA zur Quantifizierung anti-endothelialer Antikörper der Klasse IgM (Lysat-IgM)	39
4.1.4	Entwicklung eines zellulären HUVE-Zellen-ELISA zur Quantifizierung antiendothelialer Antikörper der Klasse IgM (HUVEC-IgM)	41
4.1.5	Entwicklung eines ELISA zur Quantifizierung der Gesamtkonzentration von IgM in humanem Plasma (IgM-ELISA)	42
4.2	Normalwerte	45
4.2.1	Korrelation zwischen AECA-Titer und Geschlecht	45
4.2.2	Korrelation zwischen AECA-Titer und Alter	46
4.2.3	Korrelation zwischen AECA-Titer und IgG-Plasmakonzentration	47
4.2.4	Korrelation zwischen AECA-Titer und IgM-Plasmakonzentration	50
4.2.5	AECA-Quotientenbildung und Überprüfung der Normalverteilung	51
4.2.6	Transformation der AECA-Quotienten und Überprüfung der Normalverteilung	52
4.2.7	Definition der Normalbereiche	55
4.3	Patientenproben	55
4.3.1	Auswertung der AECA-Quotienten	56
4.3.2	Korrelation zwischen Antikörper-Bindung an fixierte HUVE-Zellen und HUVE-Zell-Lysat	59
4.3.3	Vergleich mit weiteren immunologischen Nachweisverfahren und funktionellen Gerinnungstests	61
5	Diskussion	67
5.1	Testentwicklung	67
5.2	Erstellung von Normwerten für AECA	73
5.3	Bestimmung der AECA bei Patienten mit Verdacht auf Vaskulitis	75
5.4	Bestimmung der AECA bei Patienten mit Verdacht auf Lupus antikoagulans	76
5.5	Bestimmung der AECA bei Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung	77
5.6	Bestimmung der AECA bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses	78
5.7	Vergleich der AECA mit Antikörpern gegen humane neutrophile Granulozyten	78
5.8	Perspektiven	78
6	Zusammenfassung	81
7	Summary	83
8	Anhang	85
9	Literaturverzeichnis	103

Abkürzungen

ABTS	2.2'-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolinsulfonat (6)]
ACA	Anticardiolipin-Antikörper
AECA	Antiendotheliale Antikörper
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANCA	Antikörpern gegen humane neutrophile Granulozyten
APC	Aktiviertes Protein C
APLA	Antiphospholipid-Antikörper
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
bFGF	human recombinant basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
β_2 -GP-I	β_2 -Glykoprotein-I
cHUVEC-ELISA	ELISA auf der Basis fixierter HUVE-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzelle(n)
ECM	Endothelzellmembran(en)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	foetales Kälberserum
HBS	Hepes-buffered Saline
hEGF	rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor
HEPLA	human endothelial associated putative Lupus autoantigens
HUVE-Zellen	humane umbilikal-venöse Endothelzellen
HUVEC	humane umbilikal-venöse Endothelzellen
HUVEC-Lysat-ELISA	ELISA auf der Basis sonifizierter HUVE-Zellen
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KCT	Koalin Clotting Time
LA	Lupus antikoagulans
LW	Leerwert
NP	Normalplasma
OD	Optische Dichte
OPD	ortho-Phenylendiamin

PBS	Phosphate-buffered Saline
p.a.	Reinheitsgrad „pro analysi“
POD	Peroxidase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
r	Korrelationskoeffizient
R ²	Bestimmtheitsmaß
RA	Rheumatoide Arthritis
RVV-Test	Russell Viper Venom-Test
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TMB	Tetramethyl-Benzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
TxCAD	koronare Transplantatvaskulopathie
U	Einheiten
VK	Variationskoeffizient
vWF	von Willebrand-Faktor

Maßeinheiten

g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
h, min., sec.	Stunde, Minute, Sekunde
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM	Molar, Millimolar
mm, µm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
g	Erdbeschleunigung
v/v	Verhältnis zweier Flüssigkeiten (Volumen/Volumen)
w/v	Konzentration eines gelösten Stoffes in einer Flüssigkeit (Gewicht/Volumen)

1 Einleitung

1.1 Endothelfunktion und Hämostase

Das Endothel ist ein hoch spezialisiertes Organ mit komplexen Funktionen. Mit einer Oberfläche von rund 350 m² und einem Gewicht von 120 g macht es nur etwa 0,2% der menschlichen Körpermasse aus¹. Neben seiner rein physikalischen Eigenschaft als Schranke zwischen Blutstrom und extrazellulärer Matrix spielt es eine zentrale Rolle in der Balance der Hämostase^{2, 3}. Das Endothel besitzt pro- und antikoagulatorische sowie fibrinolytische Aktivität. Dazwischen herrscht ein dynamisches Gleichgewicht. Es nimmt auch Einfluß auf die Thrombozytenaktivierung und reguliert die Rekrutierung von immunologisch aktiven Zellen.

Über die Heparin-ähnliche Wirkung der Glycosaminoglycane der Oberfläche der Endothelzellen wird die Inaktivierung koagulatorisch wirksamer Proteasen wie Thrombin und Faktor Xa katalysiert^{4, 5}. Über die Expression von Thrombomodulin entfaltet das Endothel ebenfalls antithrombotische Eigenschaften⁶. Thrombomodulin aktiviert in Verbindung mit Thrombin Protein C, das wiederum mit dem Kofaktor Protein S die Faktoren Va und VIIIa inaktiviert (siehe Abbildung 1)⁷.

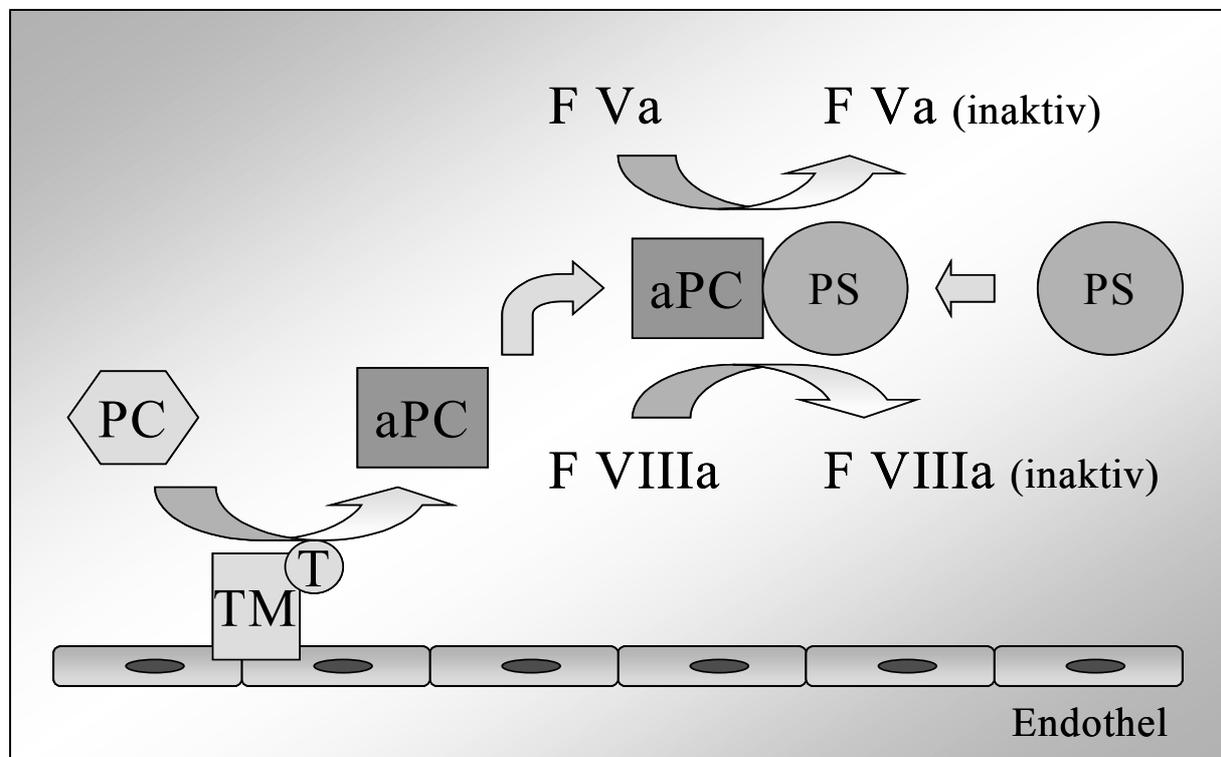


Abbildung 1: Gerinnungshemmende Aktivität des Endothels. Das an Thrombomodulin (TM) gebundene Thrombin (T) aktiviert Protein C (PC), das wiederum mit dem Kofaktor Protein S (PS) die Faktoren Va und VIIIa inaktiviert.

Auch auf Seiten der Fibrinolyse kommt dem Endothel eine bedeutende Rolle zu. Gewebesplasminogenaktivator (t-PA), Urokinase (u-PA) und Plasminogen binden an die Endothelzelloberfläche^{8, 9}. Die Bindung stimuliert die Konversion von Plasminogen zu Plasmin und verhindert die Inhibition von Plasmin durch α_2 -Antiplasmin.

Neben der lokalen Kontrolle von plasmatischer Gerinnung und Fibrinolyse nimmt das Endothel auch Einfluß auf die Thrombozytenaktivität. Über die endotheliale Synthese von NO wird die Thrombozytenaggregation gehemmt^{10, 11}. Das Endothel kann der Thrombozytenvermittelten Thrombusbildung via ADP entgegenwirken, indem es ADP inaktiviert. Das endotheliale Oberflächenprotein EctoADPase spaltet ADP und verhindert so eine weitere Thrombozytenaktivierung^{12, 13, 14}. Darüber hinaus hemmen Endothelzellen durch die Synthese von Prostazyklin die Thrombozytenaktivierung direkt.

Syntheseprodukte der Endothels tragen auch zur Blutstillung bei Verletzung der Gefäßwand bei. Der von Endothelzellen synthetisierte von Willebrand-Faktor (vWF) ermöglicht die Adhäsion von Thrombozyten an das freiliegende subendotheliale Gewebe, während die von den Endothelzellen produzierten extrazellulären Matrixproteine eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnung bewirken^{15, 16}.

Eine entscheidende Funktion kommt dem Endothel auch bei inflammatorischen Prozessen zu. Eine Reihe von Zytokinen, einschließlich Interferonen (α , β und γ), Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 und Interleukin-6, sind in der Lage, Endothelzellen zu aktivieren, d.h. Veränderungen in ihrer Struktur und Funktion zu induzieren^{17, 18}. Auf diese Weise werden komplexe Zell-Zell-Interaktionen, wie z.B. die Leukozytenadhäsion und -extravasation, eingeleitet. Die Auswanderung von Leukozyten aus der Blutstrombahn beginnt mit der Bindung von Kohlehydratketten der Leukozytenmembran an Selektine, die vornehmlich vom Endothel exprimiert werden. Dieser Vorgang wird als „rolling“ bezeichnet. Die so vermittelte, relativ lose Zell-Zell-Verbindung wird in eine feste Adhäsion überführt. Die anschließende Extravasation der Leukozyten wird durch eine Reihe von Molekülen gefördert, die auch schon bei der Adhäsion mitwirken, sowie von anderen teils intrazellulären Adhäsionsmolekülen¹⁹.

1.2 Vaskulitis

Der Begriff „Vaskulitis“ bezeichnet eine entzündliche Erkrankung der Venen und Arterien, die zu einer Obliteration und Zerstörung der befallenen Gefäße führt. Das Krankheitsbild der Vaskulitiden ist eine sehr heterogene Gruppe. Prinzipiell unterscheidet man die primären oder idiopathischen Vaskulitiden von den sekundär im Rahmen einer infektiösen oder nicht-

infektiösen Grunderkrankung auftretenden Vaskulitiden. Über diese grobe Gliederung hinaus existiert keine einheitlich verwendete Einteilung²⁰. Versuche, die Entitäten zu unterteilen, richten sich zum Teil nach dem prädominierenden Befallsmuster der Gefäße, zum Teil nach ihrer Pathogenese, Histologie und klinischen Symptomen²¹. Neuere Klassifikationen richten sich zunächst nach der Größe der befallenen Gefäße und unterteilen weiter nach pathogenetischen, klinischen und histologischen Kriterien (siehe Tabelle 1). Häufig sind die Symptome einer Erkrankung klinisch jedoch nicht eindeutig zuzuordnen und zeigen auch histologisch Mischformen nekrotisierender und granulomatöser Entzündungen. Diese Mischformen werden auch als Overlap-Syndrom bezeichnet.

Tabelle 1: Klassifikation der Vaskulitiden in Anlehnung an die Chapel Hill Consensus Conference on the Nomenclature of Systemic Vasculitis

<i>Primäre Vaskulitiden</i>
<ul style="list-style-type: none"> • mit bevorzugtem Befall großer Gefäße: Takayasu-Arteriitis Riesenzellarteriitis (Arteriitis temporalis) • mit bevorzugtem Befall mittelgroßer Gefäße: Panarteriitis nodosa Kawasaki-Syndrom • mit bevorzugtem Befall kleiner Gefäße: Wegenersche Granulomatose mikroskopische Polyangiitis Purpura Schoenlein Henoch/leukozytoklastische Vaskulitis • Sonstige: Thrombangiitis obliterans Morbus Behçet
<i>Sekundäre Vaskulitiden</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Vaskulitis bei Autoimmunerkrankungen: Rheumatoide Arthritis, Kollagenosen, Antiphospholipid-Syndrom etc. • Vaskulitis bei Infektionskrankheiten: Rheumatisches Fieber, Lues, Lyme-Borreliose, Hepatitis etc. • Toxische und Medikamenten-induzierte Vaskulitis: Antibiotika, Gold, D-Penicillamin, Zytostatika etc. • Vaskulitis bei Malignomen: Leukämien, Lymphome, solide Tumoren

Zahlreiche Pathomechanismen werden für die Entstehung vaskulitischer Erkrankungen diskutiert. Konsens besteht allgemein über die immunologische Genese der Vaskulitiden. Im Zentrum vieler Ansätze steht das Endothel als Demarkationslinie zwischen Blutstrom und Gefäßwand. Häufig genannte Immunmechanismen der Endothelzellschädigung sind²²:

- Ablagerung von Immunkomplexen
- Antikörper gegen an das Endothel adhärierende Antigene, sogenannte „planted antigens“
- Endotheliale Schädigung durch Phagozytose

- T-Zell-vermittelte Gefäßschädigung
- Fehlregulation antiinflammatorischer Mechanismen auf endothelialer Ebene
- Antiendotheliale Antikörper

1.3 Lupus antikoagulans und Antiphospholipid-Syndrom

Der Ausdruck Antiphospholipid-Syndrom (APS) bezeichnet die klinische Assoziation von Antiphospholipid-Antikörpern (APLA) und Hyperkoagulabilität^{23, 24, 25}. Man unterscheidet heute das primäre APS ohne klinische Hinweise auf das Vorliegen einer anderen Autoimmunerkrankung von dem sekundären APS, das in Assoziation mit einem Autoimmungeschehen oder einer anderen Erkrankung auftritt²⁶.

APLA sind eine heterogene Gruppe von Antikörpern, die sich gegen unterschiedliche Kombinationen aus Phospholipiden und/oder Phospholipid-Bindeproteinen richten^{27, 28, 29}. Das Lupus antikoagulans stellt neben Anticardiolipin- (ACL) und anti- β_2 -Glykoprotein-I -Antikörpern die am häufigsten nachgewiesene Subpopulation der APLA dar. Die Einteilung dieser Antikörperpopulationen basiert hauptsächlich auf der Methode ihres Nachweises: ACL und anti- β_2 -Glykoprotein-Antikörper werden durch ihre Spezifität gegenüber Phospholipiden bzw. Phospholipidbindeproteinen immunologisch nachgewiesen, während LA-Antikörper unabhängig von ihrem immunologischen Zielantigen über ihren Einfluß auf funktionelle Gerinnungstests definiert sind³⁰.

Die Bezeichnung Lupus antikoagulans impliziert eine Assoziation zur Blutungsneigung. Tatsächlich besitzt das LA unter den APLA aber die stärkste Korrelation zu thrombembolischen Ereignissen³¹.

Bis heute ist der genaue Pathomechanismus über den APLA zu Thrombembolien führt jedoch nicht genau bekannt. Verschiedenen Theorien hierzu werden aktuell diskutiert:

- Die Bindung von APLA an das Endothel induziert die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen, fördert die Zytokinsekretion und beeinflusst den Prostazyklinmetabolismus³².
- Anticardiolipin-Antikörper werden auch in Zusammenhang mit der Arteriosklerose gebracht³³. Durch oxidierte *low density* Lipoproteine (LDL), einem Hauptrisikofaktor der Arteriosklerose, erfolgt eine Makrophagenaktivierung mit darauffolgender Endothelzellschädigung. Autoantikörper gegen oxidiertes LDL sind mit ACL assoziiert und einige ACL kreuzreagieren mit oxidierten LDL³⁴.

- Die Beeinflussung der gerinnungsregulierenden Funktion von Prothrombin, Protein C (erworbene APC-Resistenz), Annexin V, β_2 -GP-I und Tissue factor führt zu einer prokoagulatorischen Disposition^{35, 36, 37, 38, 39, 40, 41}.
- Einige Studien belegen eine immunologische Thrombozytenaktivierung ähnlich der Heparin induzierten Thrombozytopenie Typ II, die über die Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen mit Prothrombin oder β_2 -GP-I zu einer Thrombozytenaktivierung durch Bindung an den Fc-Rezeptor führt^{42, 43, 44}.

1.4 AECA und ihre pathogenetische Bedeutung

Antiendotheliale Antikörper (AECA) wurden erstmals von Lindquist und Osterland im Jahre 1971 und unabhängig davon im folgenden Jahr von Tan und Pearson im Zusammenhang mit rheumatischen Erkrankungen nachgewiesen^{45, 46}. Seither wurden AECA intensiv mit unterschiedlichen Methoden erforscht. Ob der Einfluß der AECA auf das Endothel tatsächlich von ursächlicher Bedeutung ist, oder ob sie ein „Epiphänomen“ darstellen, ist noch immer nicht endgültig geklärt⁴⁷.

Einerseits ist der spezifisch diagnostische Wert dieser Autoantikörper eingeschränkt, da sie in Zusammenhang mit vielen verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen werden können, denen als gemeinsames Merkmal jedoch meist ein unterschiedlicher Grad an Gefäßschädigung zugrunde liegt. Andererseits häufen sich die Indizien für die pathogenetische Rolle der AECA im vaskulären Entzündungsgeschehen.

Meroni et al. konnten nachweisen, dass die Zielantigene der AECA auf der Endothelzelloberfläche gelegen und so für zirkulierende Antikörper zugänglich sind⁴⁸.

Der Anstieg ihrer Serumkonzentration in der akuten Erkrankungsphase sowie ihr Abfall in Phasen der Remission z.B. des akuten Systemischen Lupus erythematosus (SLE) und Vasculitiden deuten auf ihr Mitwirken in der Pathogenese des endothelialen Entzündungsgeschehens hin^{49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58}. In einigen Fällen geht ein Titeranstieg der AECAs sogar einer vaskulitischen Episode voraus⁵⁹.

Belegt ist auch, dass AECA-positive Seren zu Komplement-vermittelter oder Antikörper-vermittelter zytotoxischer Immunantwort führen können^{60, 61}.

An das Endothel angelagerte AECAs führten *in vitro* zu einer Aktivierung der Endothels im Sinne einer gesteigerten Zytokin- und Chemokinsekretion sowie zu vermehrter Expression von Adhäsionsmolekülen an der Endothelzelloberfläche (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin)^{62, 63, 64, 65, 66, 67}. Auch *in situ* konnte die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und/oder E-Selektin

demonstriert werden⁶⁸. Die Aktivierung des Endothels fördert die Leukozytenrekrutierung und -adhäsion an die endotheliale Oberfläche und kann damit zur Entstehung von vaskulitischen und granulomatösen Läsionen beitragen⁶⁹. Mit einem ideotypischen Tiermodell legten Damjanovich et al. das pathogenetische Potential der AECA ebenfalls in vivo dar⁷⁰.

Die endotheliale Aktivierung durch AECA stellt auch ein Modell zur Erklärung der thrombembolischen Ereignisse im Rahmen des APS dar^{71, 72, 73, 74, 75}.

1.5 Endotheliale Autoantigene

Die Zielantigene der antiendothelialen Antikörper werden seit mehr als zwei Jahrzehnten mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Verschiedene Antigene werden zum Teil kontrovers diskutiert. Prinzipiell kann zwischen konstitutiv exprimierten, kryptischen, d. h. verborgenen, und adhärierenden Antigenen unterschieden werden, wobei die Übergänge zum Teil fließend sind.

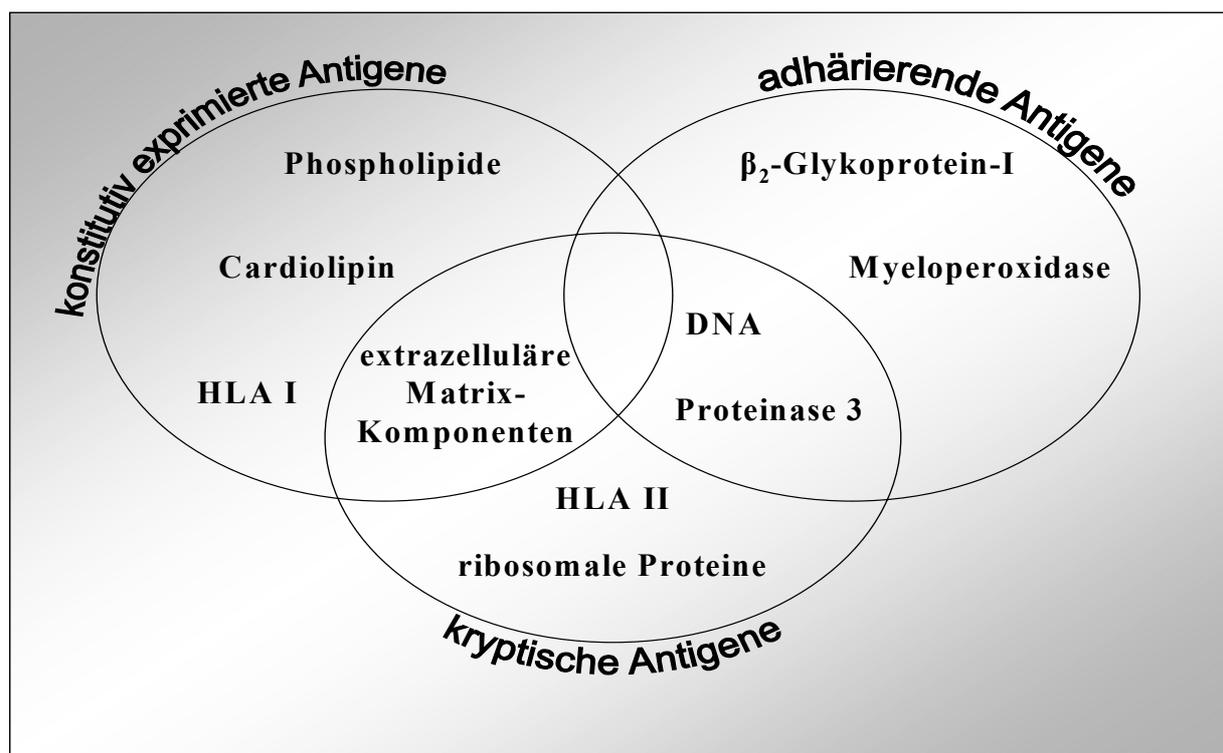


Abbildung 2: Endotheliale Autoantigene. Verschiedene endotheliale Antigene werden als mögliche Zielstrukturen der antiendothelialen Antikörper diskutiert. Dabei kann zwischen konstitutiv exprimierten, adhärierenden und kryptischen, d.h. verborgenen Antigenen unterschieden werden, wobei die Übergänge zum Teil fließend sind. Desoxyribonukleinsäure=DNA, Humanes Leukozyten-Antigen der Klasse I/II= HLA I/II.

Das humane Leukozyten-Antigen der Klasse I (HLA I), das auf allen zellkernhaltigen Körperzellen und auf Thrombozyten exprimiert wird, wurde bei einer kleinen Patientengruppe

mit IgA-Nephropathie (n=6) als mögliches endotheliales Autoantigen von Yap et al. identifiziert⁷⁶. Ein signifikanter Aktivitätsverlust konnte jedoch bei Adsorption der AECA mit anderen HLA I-exprimierenden Zellen nicht nachgewiesen werden. Anhand von Zytotoxizitätsstudien mit Proben von Patienten mit primärer Vaskulitis konnten Ferraro et al. hingegen zeigen, dass diese AECA-positive Proben keine anti-HLA I Aktivität aufweisen.

Für Anticardiolipin- und Antiphospholipid-Antikörper konnte eine enge Assoziation zu den AECA gezeigt werden^{77, 71, 78, 79}. Die Adsorption mit Cardiolipin-Liposomen reduzierte einerseits die Bindung an das Endothel von 10% bis zu 50%^{78, 79}, andererseits konnte auch gezeigt werden, dass gereinigte Anticardiolipin-Antikörper mit HUVE-Zellen reagieren.

Extrazelluläre Matrixkomponenten, die von Endothelzellen sezerniert werden, können sowohl konstitutiv exprimierte als auch kryptische Antigene darstellen, welche erst aufgrund eines vaskulären Schadens zugänglich werden. Hier werden verschiedene endotheliale Autoantigene diskutiert, darunter Kollagen Typ I, IV, VII, Laminin und Fibronectin^{80, 81, 82, 83}.

Verschiedene Autoren konnten eine verstärkte Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Bindung an das Endothel zeigen, wenn dieses zuvor durch Zytokine stimuliert wurde, so daß DNA sowohl als kryptisches, als auch als ädhärierendes Antigen für AECA fungieren kann^{80, 84}. Die Bindung antiendothelialer Antikörper korreliert in einigen Fällen mit anti-DNS-Antikörpern^{80, 85}. Frampton et al. konnten zeigen, dass die AECA-Bindung an das Endothel durch DNA-Zellulose inhibierbar ist. Auch die Vorinkubation AECA-positiver SLE-Proben reduzierte die Intensität einiger Banden im Immunblot, die durch AECA detektiert werden, und kann so als Hinweis auf die mögliche Rolle von DNS als endotheliales Antigen gedeutet werden.

Einige Arbeiten weisen darauf hin, dass HLA II auf aktivierten Endothelzellen Zielantigene der AECA darstellen können^{86, 87}. Nach Noris sind HLA II jedoch nicht das Zielantigen der AECA, sondern werden durch diese induziert und vermitteln dann die T-Zell-Aktivierung in der Pathogenese der Takayasu-Arteritis⁸⁸.

Auch Proteinase 3 und Myeloperoxidase können auf Endothelzellen als kryptische bzw. adhärierende Antigene identifiziert werden^{89, 90}. Sie werden durch spezifische Autoantikörper (ANCA) auf Endothelzellen erkannt^{90, 91}. Verschiedene Gruppen haben jedoch die Assoziation von ANCA und AECA studiert, ohne eine signifikante Korrelation zu finden^{53, 70, 53}.

Als Serumbestandteil kann β_2 -Glykoprotein-I ebenfalls an das Endothel adhären. Del Papa et al. konnten eine dosisabhängige Steigerung der Bindung der AECA durch Inkubation mit β_2 -Glykoprotein-I nachweisen.

In einem neuartigen Ansatz kombinierte Ationu die üblichen immunologischen Verfahren mit gentechnischen Möglichkeiten. Anhand einer cDNA-Expressions-Bibliothek auf der Ba-

sis einer immortalisierten endothelialen Zelllinie (EAhy 926) stieß er auf CD36 und ein Kera-
tin-ähnliches Protein als Zielantigene der AECA im Rahmen der koronaren Transplanat-
vaskulopathie (TxCAD)⁹². Frampton et al. gelang es mit der selben Methode, allerdings an-
hand von HUVE-Zellen, bisher diskutierte, sogenannte klassische endotheliale Autoantigene
des Systemischen Lupus auch auf molekularer Ebene zu bestätigen. Unter anderem identifi-
zierten sie das ribosomale P Protein P0 und das ribosomale Protein L6, sowie zwei weitere
bisher unbekannte sogenannte „human endothelial associated putative lupus autoantigens“
(HEPLA). Interessanterweise stießen Linke et al. bei der Untersuchung von TxCAD-Patienten
anhand derselben Methode ein Jahr später ebenfalls auf zwei ribosomale Proteine⁹³.

1.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, ein Testverfahren zum Nachweis antiendothelialer Antikörper
zu entwickeln. Dies sollte auf der Grundlage eines zellulären HUVEC-ELISAs geschehen und
darüber hinaus um ein Nachweisverfahren auf der Basis von sonifizierten HUVE-Zellen er-
gänzt werden, das möglicherweise die routinemäßige Anwendung eines AECA-Scening
vereinfachen könnte.

Zur Einordnung hinsichtlich ihres regelrechten Vorkommens sollten Normalwerte für
AECA festgelegt werden. In diesem Rahmen sollte der Einfluß von Alter, Geschlecht und
Immunglobulin-Gesamtkonzentration auf die AECA-Titer ermittelt werden.

Um die Relevanz der antiendothelialen Antikörper (AECA) bei Vaskulitiden und throm-
bembolischen Geschehen bei Antiphospholipidsyndroms (APS) besser einschätzen zu können,
sollte hier die Prävalenz der AECA stichprobenartig anhand der entwickelten Testverfahren
erhoben werden. Dazu wurden die Proben von vier verschiedenen Patientenkollektiven un-
tersucht.

Um über ein pathologisches Vorkommen hinaus auch die Spezifität der AECA näher ein-
zugrenzen, sollten Korrelationen zu anderen Autoantikörpern untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wiesen p. a. Qualität auf.

American Diagnostica GmbH, Pfungstadt: RVV-Test, RVV-Konfirm-Test

Biochrome, Berlin: Ultra-Pure Water (steril)

Bio-Rad, München: Bio-Rad Reagenz zur Proteinbestimmung nach Bradford

Braun Melsungen, Melsungen: Isotone Kochsalzlösung 0,9% (steril)

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: 2.2'-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolinsulfonat (6)] ($C_{18}H_{16}N_4O_6S_4$, ABTS)

Dade Behring, Marburg: Immun-Testserum Anti-A, Anti-B

Dako, Dänemark: Human IgM

Difco, Detroit Michigan USA: Maltose

Dianova GmbH, Hamburg: Kaninchen anti-human IgM, Peroxidase-konjugiert

Maus anti-human IgM; Ziege anti-human IgM Fc 5μ , Peroxidase-konjugiert; Ziege anti-human IgG Fc, Peroxidase-konjugiert

Fluka Chemie AG, Neu Ulm: Skim Milk Powder, Natriumsulfat (Na_2O_4S)

GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe: Foetales Kälberserum (FCS) Myoclone plus; Kollagenase; Penicillin/Streptomycin; recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF); recombinant human epidermal growth factor (hEGF); Trypsin-EDTA; Minimal Essential Medium mit Earle's Salt; Fungitone (Amphotericin B); L-Glutamin; Nicht-essentielle Aminösäuren; Vitaminlösung; Hank's Salzlösung

Merck, Darmstadt: Citronensäure-monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$); Natrium-acetat (NH_3COONa); Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30%; Glucose-monohydrat

Merz, Frankfurt: Mucocit® F2000

PromoCell, Heidelberg: Endothelial Cell Basal Medium

Roth, Karlsruhe: Albumin Bovin Fraktion V; Natriumchlorid ($NaCl$); Kaliumchlorid (KCl); Natriumcarbonat ($NaCO_3$); di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ($NaHPO_4 \cdot 2H_2O$); Glycin ($C_2H_5NO_2$); Schwefelsäure H_2SO_4)

Sandoz AG, Nürnberg: Sandoglobulin

Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg: Gelatine; Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$); Gentamicin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen: HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$); 17-Hydroxycorticosteron ($C_{21}H_{30}O_5$); ortho-Phenylendiamin (OPD); Maltose ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$); Phenylmethylsulfonylfluorid ($C_7H_7FO_2S$); Polyethylene-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20); Polyethylene-Sorbitan-Monooleate (Tween 80); t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100); Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris); Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris-HCl)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Becton Dickinson, Braunschweig: Sterile Einmalspritzen 50 ml

Braun, Melsungen: Sterile Dreiwege-Hähne Discifix®

Costar, Cambridge: Sterile 96-well-strip-Platten für die Zellkultur;

Eppendorf GmbH, Hamburg: Combitips 2,5 ml und 5ml; Reaktionsgefäße; Modell Save-Lock 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml

Feather Safety Razor Co., Ltd Medical Division, über MAGV Rabenau-Lohndorf: Einmal-skalpelle

Greiner Labortechnik, Frickenhausen: Pipettenspitzen 0,1-10 µl; 1-200 µl; 100-1000 µl, sterile Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml; Zellkultur Petrischalen mit 60 mm und 90 mm Durchmesser

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt: Pasteurpipetten 2 ml Ø 7 mm

Johnson & Johnson, Norderstedt: Sterile Kompressen Topper 12

Laboratory Designer, Schweden: Bio-Plates zur Blutgruppenbestimmung

Limca Verbindungstechnik, über MAGV Rabenau-Lohndorf: Kabelbinder 135x2,5 mm

Nalge Nunc International, New York: 75mm Bottle Top Filter (0,2 µm) 500 ml; Mikrotiterstipes und -plates Modelle Maxisorb und Polysorb; Rahmen für Mikrotiterstripes (12 x 8); 25 cm² Kulturgefäße aus Polystyrene, steril

R. Demhartner GmbH & Co. KG: Krankenunterlagen 40x60 cm

Unigloves GmbH, Troisdorf: Einmalhandschuhe

2.3 Geräte

A & D Company, USA: Digitalwaage Modell FX-2000

Assistent: Taumel-Rollmischer MR5

Bühler, über Kühn und Bayer, Gießen: Schüttler KS 10

C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Bonn: Magnetrührwerk Modell MAG-K

Cole-Parmer Instrument Co., Illinois: Easy Load® Masterflex® Modell 7518-00

Eppendorf GmbH, Hamburg: Diverse Kolbenhubpipetten (2-1000 µl); Multipette® 4780

Flow Laboratories, Meckenheim b. Bonn: Sterile Arbeitsbank

Gilson, Villiers le bel (Frankreich): Pipetman® P 50-200 µl

Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelkheim: Magnetrührwerk MR 2000; Schüttelgerät REAX 2000

Heraeus Christ GmbH, Osterode: Begasungsbrutschrank; Digifuge^{GL}

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt: Pipetus®-akku

Köttermann GmbH & Co. KG, Hänigsen: Wasserbad Typ 3044

Melag: Sterilisier-Autoklav Typ 23

Mettler, Schweiz: Digitalwaage Modell AE 163

Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo: Invert-Mikroskop CK2

Organon Teknika, Barcelona, Spanien: Thrombolyzer

Schärfe System, Reutlingen: Zellzählgerät Casy 1

SLT-Labinstruments Deutschland, Crailsheim: ELISA-Photometer Modell Spectra

WTW, Weiheim: pH-Meter Modell 523

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Blutgruppenbestimmung

Zur Bestimmung der Blutgruppenantigene wurden zwei Tropfen Blut mit zwei Tropfen NaCl (0,9%) und je zwei Tropfen der Testseren Anti-A und Anti-B auf dafür vorgesehene Träger aufgebracht und vorsichtig vermischt. Nach drei Minuten war die Blutgruppe des jeweiligen Nabelschnurblutes eindeutig durch die Agglutination mit den Testseren bzw. das Ausbleiben der Agglutination zu bestimmen.

3.1.2 Isolierung humaner umbilikal-venöser Endothelzellen

Puffer und Lösungen:

HBS :	137	mM	NaCl
	4	mM	KCl
	11	mM	Glucose
	10	mM	Hepes
			in ultra sterile water
			pH 7,4
Kollagenase-Lsg.:	100	mg	Kollagenase, lyophilisiert
	50	mM	MgCl
	150	mM	CaCl
	in 500	ml	HBS
Kulturmedium:	500	ml	Endothelial Basal Cell Medium
	100		Einheiten Penicillin/ml
	100	µg	Streptomycin/ml
	0,1	%	Hydrocortison
	0,0001	%	bFGF
	0,001	%	hEGF
	10	%	FCS
Fibronektin-Lsg.:	25	µg/ml	Fibronektin
	in 0,9	%	NaCl
Gelatine-Lsg.:	0,2	%	Gelatine
	in 0,9	%	NaCl

Trypsin-Lsg.:	10	ml	Trypsin-EDTA 10 x
	10	ml	Hepes
	80	ml	0,9% NaCl

Vorgehen:

Die Isolierung humaner umbilikal-venöser Endothelzellen (HUVE-Zellen) erfolgte nach der von Jaffe et al. (1973) beschriebenen Methode unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank⁹⁴. Die verwendeten Nabelschnüre wurden nach der Entbindung in sterilen Bechern verschlossen und bei 4°C bis zur Bearbeitung gelagert. Es wurden nur Nabelschnüre verwertet, die höchstens 36 Stunden alt und mindestens 10 cm lang waren.

Zu Beginn der Präparation wurde jede einzelne Nabelschnur mit einer sterilen Kompresse gesäubert. An jedem Ende wurde 1 cm mit einem sterilen Skalpell entfernt, um Kontaminationen zu vermeiden. Es wurde eine sterile Knopfkanüle an einem Ende in die Vene eingeführt und mit einem Nylonstrip befestigt. Über die Kanüle wurde die Nabelschnur mit HBS gespült. Am anderen Ende wurde ebenfalls ein steriler Schlauch in die Vene eingeführt, mit einem Nylonstrip befestigt und mit einer Gefäßklemme verschlossen. Ein Drei-Wege-Hahn wurde an die Knopfkanüle angeschlossen, über den die Nabelschnur mit 0,025%iger Kollagenaselösung gefüllt und verschlossen wurde. Es folgte ein 20minütiger intraluminaler Verdau bei 37°C im Brutschrank.

Im Anschluß an die Inkubation im Brutschrank wurde die Nabelschnur vorsichtig massiert, um die Endothelzellen von der Basalmembran zu lösen. Ihr Inhalt wurde in ein steriles 50 ml Röhrchen abgelassen und die Vene mit HBS nachgespült. Zum Stop des enzymatischen Verdau durch die Kollagenase wurde je 1 ml FCS in jedes Röhrchen vorgelegt. Die Endothelzellen wurden 5 Minuten bei 260 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium aufgenommen.

3.1.3 Kultur und Passage der Endothelzellen

Die primären HUVE-Zellen wurden auf die zuvor für zwei Stunden bei 4°C mit Fibronektin beschichteten sterilen 60 mm Kulturschalen ausgesät und für 3 bis 5 Tage bei 37°C und unter 5% CO₂-Begasung in Brutschrank vermehrt. War der Zellrasen nach 3 Tagen nicht konfluent, wurde das Medium gewechselt.

Sobald mikroskopisch keine freie Substratoberfläche zwischen den Endothelzellen mehr zu erkennen war, d. h. wenn sie „konfluent“ waren, wurden die HUVE-Zellen geerntet. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 5 ml HBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank für ca. 3 Minuten inkubiert. Die so vom Untergrund gelösten Zellen

wurden in 1 ml FCS aufgenommen, das die Kollagenase inaktivierte und die Zellen so vor weiterem Verdau schützte. Die HUVE-Zellen wurden 5 Minuten bei 260 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut in Kulturmedium aufgenommen.

Zur weiteren Verwendung im zellulären ELISA wurden 7.500 HUVE-Zellen in 200 µl Kulturmedium pro Vertiefung in ELISA-Streifen ausgesät. Die ELISA-Streifen wurden zuvor für 2 Stunden mit 100 µl 0,2% Gelatine pro Vertiefung beschichtet und der Überstand mit sterilen Pasteurpipetten abgesaugt.

Sollte aus den Zellen Lysat gewonnen werden, wurden die HUVE-Zellen im Verhältnis 1:3 geteilt und auf Fibronectin beschichtete 90 mm Kulturschalen passagiert. Die weitere Kultur erfolgte in beiden Fällen wieder bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im Brutschrank.

3.1.4 Zellzählung

Die mit Trypsin-EDTA gelösten und abzentrifugierten primären HUVE-Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert. Vom Zellsuspendat wurden 50 µl in 5 ml NaCl (0,9%) aufgenommen und im Cell-Analyser-System Casy 1 über eine Lichtschranke automatisch gezählt.

Um nur die Anzahl lebender Zellen (n) pro ml zu erfassen, wurden nur Zellen mit einem Durchmesser von mehr als 10 µm gewertet.

Die Gesamtzahl der Zellen in der Lösung (N) wurde wie folgt errechnet:

$$N = \frac{N \times 5 \text{ ml} \times 10 \text{ ml}}{0,05 \text{ ml}}$$

3.1.5 Herstellung des HUVE-Zell-Lysats

Puffer und Lösungen:

EC-Extraktionspuffer:	0,25	M	Sucrose
	3	mM	CaCl ₂
	3	mM	Tris-HCl pH 8
	50	mM	Na ₂ O ₄ S
	1	mM	PMSF
	1	%	Triton X-100

Vorgehen:

Die konfluenten Zellen der 1. Passage wurden wie oben beschrieben mit 5 ml Trypsin-EDTA gelöst, abzentrifugiert und es wurden 9 Millionen HUVE-Zellen in 1 ml EC-Extraktionspuffer aufgenommen. Mittels Ultraschall wurden die auf Eis gekühlten Zellen 30 Sekunden lang

lysiert. Hierzu wurden folgende Einstellungen am Branson Sonifier vorgenommen: Output-controll 7, Duty Cycle 50%, pulsed.

Bis zur Verwendung wurde das Lysat bei -20°C gelagert. Zur Herstellung eines Lysat-Pools wurden bei Erreichen einer größeren Menge die einzelnen Fraktionen einmalig wieder aufgetaut, portioniert und erneut bei -20°C eingefroren.

3.2 Immunologische Methoden

3.2.1 Prinzip des Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Seit ihrer Erstbeschreibung in 1971 durch Engvall und Perlman haben sich ELISAs weltweit als Methode der Wahl zum Nachweis löslicher Antigene und Antikörper durchgesetzt^{95, 96}. Zu ihrem Erfolg haben ihre hohe Sensitivität, die lange Aufbewahrbarkeit der Reagenzien, fehlende Gefahr durch Radioaktivität, die einfache Durchführbarkeit sowie die Variabilität der einsetzbaren ELISA-Formate beigetragen.

3.2.1.1 Indirekter ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper

Durch Beschichtung der Vertiefungen einer ELISA-Platte mit einem Antigen, z.B. mit Zelllysate, und Inkubation der Platten mit einer Testlösung, binden die löslichen Antikörper spezifisch an das beschichtete Antigen. Ungebundene Antikörper werden abgewaschen. Eine Lösung mit Enzym-konjugierten Antikörpern, gerichtet gegen die spezifischen Antikörper, wird auf die Platte aufgetragen. Nach Inkubation werden ungebundene Antikörper abgewaschen und eine Substratlösung wird hinzugefügt. Die Menge des hydrolysierten Substrates kann photometrisch erfaßt werden. Die gemessene Menge umgesetzten Substrats ist proportional der in der Testlösung enthaltenen spezifischen Antikörper⁹⁷.

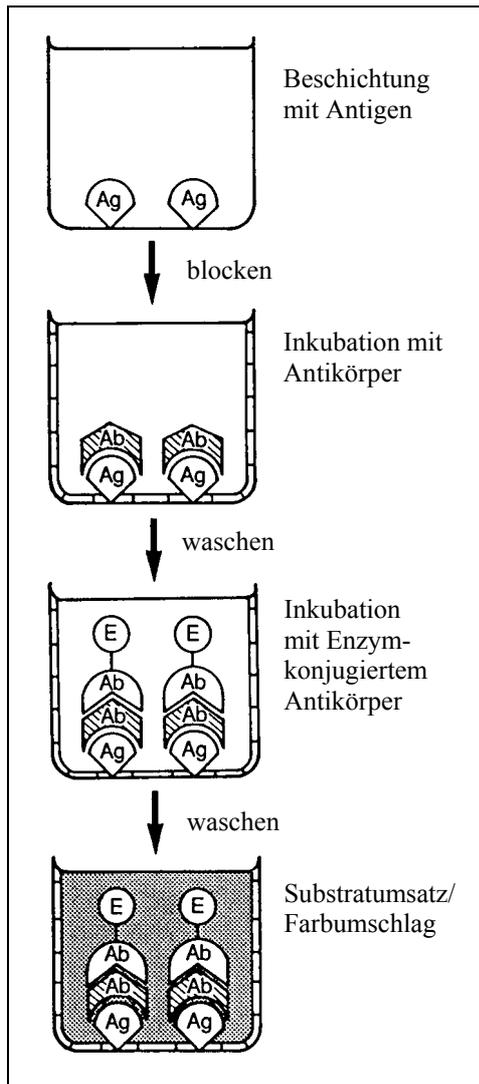


Abbildung 3: Prinzip des indirekten ELISA (modifiziert nach Current Protocols in Molecular Biology). Ag= Antigen, Ab= Antikörper, E= Enzym-konjugierter Sekundärantikörper. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte werden mit einem löslichen Antigen beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen werden mit einer geeigneten Lösung blockiert (z.B. mit Milchpulver). Bei der darauffolgenden Inkubation mit einer Testlösung erfolgt die spezifische Bindung der enthaltenen Antikörper an das Antigen. In einem weiteren Inkubationsschritt mit einem Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgt die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an den nachzuweisenden Antikörper der Testlösung. Überschüssige Antikörper-Konjugat-Lösung wird durch Waschen entfernt. Der Umsatz eines angebotenen Substrates durch das Enzym ist proportional zur Menge der Antikörper in der Testlösung und photometrisch messbar.

3.2.1.2 Antikörper-Sandwich-ELISA

Zum Nachweis eines in Lösung vorliegenden Antigens werden die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit einem spezifischen (Fänger-)Antikörper beschichtet und im Folgenden mit der Testlösung, die das nachzuweisende Antigen enthält, inkubiert. Ungebundene Antigene werden abgewaschen. Eine Lösung mit Enzym-konjugierten Antikörpern, gerichtet gegen das Antigen, wird auf die Platte aufgetragen. Das weitere Verfahren entspricht dem des indirekten ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper. Die gemessene Menge umgesetzten Substrats ist proportional der in der Testlösung enthaltenen Menge Antigen.

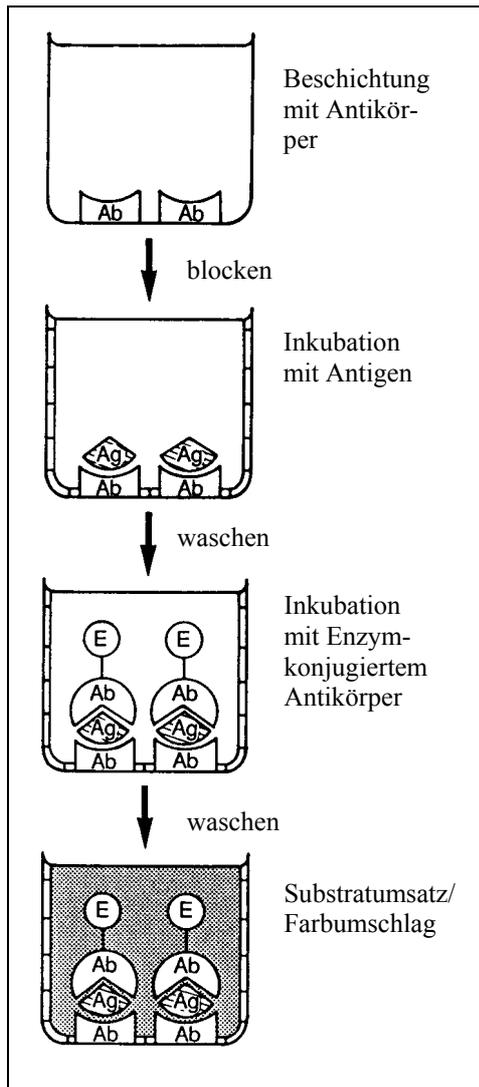


Abbildung 4: Prinzip des Antikörper-Sandwich-ELISA (modifiziert nach Current Protocols in Molecular Biology). Ag= Antigen, Ab= Antikörper, E= enzymmarkierter Sekundärantikörper. Die Vertiefungen einer ELISA-Platte werden mit einem löslichen Antikörper beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen werden mit einer geeigneten Lösung blockiert (z.B. mit Milchpulver). Bei der darauf folgenden Inkubation mit einer Testlösung erfolgt die spezifische Bindung des enthaltenen Antigens an den Antikörper. In einem weiteren Inkubationsschritt mit einem Enzym-konjugierten Sekundärantikörper erfolgt die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an das nachzuweisende Antigen der Testlösung. Überschüssige Antikörper-Konjugat-Lösung wird durch Waschen entfernt. Der Umsatz eines angebotenen Substrates durch das Enzym ist proportional zur Menge des Antigens in der Testlösung und photometrisch messbar.

3.2.1.3 Indirekter zellulärer ELISA

Spezifische Antikörper, gerichtet gegen antigene Determinanten von Zelloberflächen, werden nachgewiesen, indem auf der ELISA-Platte immobilisierte Zellen mit einer Testlösung inkubiert werden. Lösliche Antikörper binden spezifisch an die fixierten Zellen. Das weitere Verfahren entspricht dem des indirekten ELISA zum Nachweis spezifischer Antikörper.

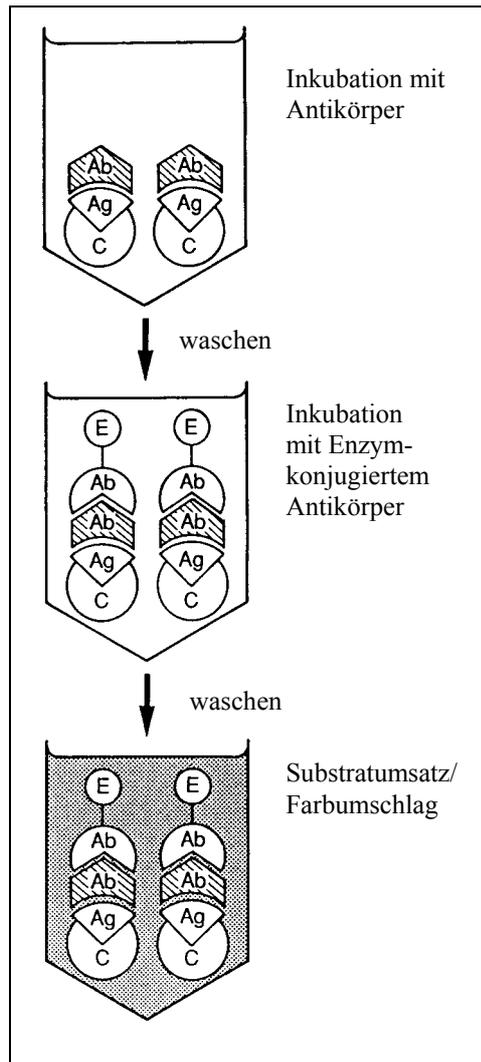


Abbildung 5: Prinzip des zellulären ELISA (modifiziert nach Current Protocols in Molecular Biology). Ag= Antigen, Ab= Antikörper, E= enzymmarkierter Sekundärantikörper, C=Zelle. Immobilisierte Zellen in den Vertiefungen einer ELISA-Platte werden mit einem löslichen (Primär-) Antikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an Antigene der Zelloberfläche. In einem weiteren Inkubationsschritt mit einem Enzymkonjugierten Sekundärantikörper erfolgt die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an den (Primär-) Antikörper. Überschüssige Antikörper-Konjugat-Lösung wird durch Waschen entfernt. Der Umsatz eines angebotenen Substrates durch das Enzym ist proportional zur Menge des Primärantikörpers und photometrisch messbar.

3.2.2 Zellulärer HUVE-Zell-ELISA zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern der Klasse IgM aus humanem Citratplasma (cHUVEC-IgM)

Puffer und Lösungen:

Fixierlösung:	1	Teil	Aceton
	1	Teil	Methanol
Waschpuffer:	0,01	%	Tween 20 in PBS
Blockpuffer:	0,01	%	Tween 20
	2	%	Milchpulver in PBS
Verdünnungspuffer:	0,01	%	Tween 20
	0,1	%	Milchpulver
	10	%	Maltose

			in PBS
Substratpuffer:	9	Teile	0,11 M di-Natriumhydrogencarbonat
	1	Teil	0,5 M Citronensäure-Monohydrat
Substratlösung:	4	mg	OPD-Tablette
	100	µl	30 % H ₂ O ₂
	in 10	ml	Substatpuffer
Stopplösung:	3	M	Schwefelsäure

Vorgehen:

Um die HUVE-Zellen auf der Mikrotiterplatte zu immobilisieren, wurden sie nach drei Tagen in Kultur mit der Aceton-Methanol-Lösung fixiert. Hierzu wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt und dann 100 µl der Fixierlösung in jede Vertiefung pipettiert. Nach 5 Minuten wurde die Lösung abgekippt und die Vertiefungen dreimal mit je 150 µl Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, wurden die Zellantigene für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 150 µl Blocklösung pro Vertiefung inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift.

Zur weiteren Standardisierung wurde eine Kalibriergrade anhand von hoch pathologischem Plasma eines Spenders mit einem histologisch gesicherten Morbus Takayasu erstellt. Es wurde willkürlich festgelegt, dass ein Milliliter des Kalibrierplasmas 5.000 Einheiten (U) antiendothelialer Antikörper enthält. Das Kalibrierplasma wurde in den Konzentrationen 50/ 25/ 10/ 5/ 2,5/ 1/ 0,5 U/ml in Verdünnungspuffer aufgenommen. Die zu untersuchenden Proben wurden ebenfalls in Verdünnungspuffer aufgenommen. Sie wurden aufgrund ihres sehr unterschiedlichen Gehalts an AECAs in vier verschiedenen Verdünnungen, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1.000 im ELISA eingesetzt. Es wurden je 100 µl Kalibrierplasma bzw. Probe in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und als Doppelwerte aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden ungebundene Antigene durch einen weiteren Waschschrift entfernt.

Zum Nachweis der spezifisch gebundenen AECAs wurde ein Peroxidase-konjugierter Detektionsantikörper von der Ziege verwendet, der spezifisch an das Fc 5µ-Fragment von humanem IgM bindet. Er wurde in der Verdünnung 1:1.000 eingesetzt, mit 100 µl pro Vertiefung aufgetragen und unter Lichtschutz bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde nach einer Stunde durch einen erneuten Waschschrift entfernt.

In der folgenden Phase wurden die gebildeten Antikörper-Sandwich-Komplexe durch Zugabe von 100 µl pro Vertiefung der chromogenen Substratlösung angefärbt. Dabei setzte die gebundene Merrettichperoxidase das Substrat in ein gelbes Produkt um. Nach 30 Minuten

schlug die Farbe durch Stoppen der Enzymreaktion mit 50 µl Stopplösung pro Vertiefung in Braun um. Die gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492 nm war der Konzentration an antiendothelialen Antikörpern direkt proportional.

3.2.3 Zellulärer HUVE-Zell-ELISA zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern der Klasse IgG aus humanem Citratplasma (cHUVEC-IgG)

Puffer und Lösungen:

Die verwendeten Puffer und Lösungen entsprechen denen des cHUVEC-IgM. Ausnahmen werden im Folgenden angeführt:

Verdünnungspuffer:	0,01	%	Tween 20
	0,1	%	Milchpulver in PBS

Vorgehen:

Hier wurde genau wie beim cHUVEC-IgM verfahren. Die Kalibriergerade wurde auch hier anhand von Plasma des Spenders mit Morbus Takayasu erstellt. Per definitionem enthält ein Milliliter des Kalibrierplasmas 5.000 Einheiten (U) antiendothelialer Antikörper. Das Kalibrierplasma wurde in den Konzentrationen 50/ 25/ 10/ 5/ 2,5/ 1/ 0,5 U/ml in Verdünnungspuffer aufgenommen und in Doppelwerten mit 100 µl/Vertiefung aufgetragen. Plasmaproben wurden in den Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1.000 im gleichen Puffer wie der Standard im ELISA eingesetzt. Detektiert wurde mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper aus der Ziege, der spezifisch gegen das Fc-Fragment von humanem IgG gerichtet war. Er wurde im Verhältnis 1:500 in Verdünnungspuffer aufgenommen und so mit je 100 µl/Vertiefung aufgetragen.

Die Entwicklung mit Substratlösung erfolgte für 5 Minuten.

3.2.4 HUVE-Zell-Lysat-ELISA zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern der Klasse IgM aus humanem Citratplasma (HUVEC-Lysat-IgM)

Puffer und Lösungen:

Beschichtungspuffer:	200	mM	NaHCO ₃
	30	mM	Na ₂ CO ₃ in Aqua bidest. pH 9,0
Waschpuffer:	0,1	%	Tween 20 in PBS

Blockpuffer:	0,1	%	Tween 20
	2	%	Milchpulver in PBS
Verdünnungspuffer:	0,1	%	Tween 20
	0,1	%	Milchpulver in PBS
Substratpuffer:	9	Teile	0,11 M di-Natriumhydrogencarbonat
	1	Teil	0,5 M Citronensäure-Monohydrat
Substratlösung:	4	mg	OPD-Tablette
	100	µl	30 % H ₂ O ₂
	in 10	ml	Substratpuffer
Stopplösung:	3	M	Schwefelsäure

Vorgehen:

Das HUVE-Zell-Lysat wurde im Verhältnis 1: 75 in Beschichtungspuffer aufgenommen und an Maxisorp-Mikrotiterplatten gekoppelt. Hierzu wurden je 100 µl/Vertiefung des Ansatzes aufgetragen und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösungen abgekippt und die Vertiefungen dreimal mit je 150 µl Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 150 µl Blockpuffer pro Vertiefung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geblockt. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift.

Die Kalibriergerade wurde auch hier anhand von Plasma des Spenders mit Morbus Takayasu erstellt. Per definitionem enthält ein Milliliter des Kalibrierplasmas 5.000 Einheiten (U) antiendothelialer Antikörper. Für den Einsatz im ELISA wurde das Kalibrierplasma in Verdünnungspuffer in den Konzentrationen 100/ 50/ 25/ 10/ 5/ 2,5/ 1 U/ml aufgenommen. Die Proben wurden im Verhältnis 1:100, 1:500, 1:1.000 und 1:5.000 in Verdünnungspuffer aufgenommen. Es wurden je 100 µl des Kalibrierplasma bzw. der Probe in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und als Doppelwerte aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden ungebundene Antigene durch einen weiteren Waschschrift entfernt.

Der Nachweis der an das Zellysat gebundenen AECAs erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper von der Ziege, der spezifisch gegen die 5µ-Untereinheit von humanem IgM gerichtet war. Er wurde in der Verdünnung 1:500 eingesetzt, mit 100 µl pro Vertiefung aufgetragen und unter Lichtschutz auf dem Schüttler inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde nach einer Stunde durch einen erneuten Waschschrift entfernt.

In der folgenden Phase wurden die gebildeten Antikörper-Sandwich-Komplexe durch Zusatz von 100 µl pro Vertiefung der chromogenen Substratlösung angefärbt. Dabei setzte die gebundene Merrettichperoxidase das Substrat in ein gelbes Produkt um. Nach 10 Minuten schlug die Farbe durch Stoppen der Enzymreaktion mit 50 µl Stopplösung pro Vertiefung in Braun um. Die gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492 nm war der Konzentration an antiendothelialen Antikörpern direkt proportional.

3.2.5 HUVE-Zell-Lysat-ELISA zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern der Klasse IgG aus humanem Citratplasma (HUVEC-Lysat-IgG)

Puffer und Lösungen entsprechen denen des HUVEC-Lysat-IgM.

Vorgehen:

Es wurde im Prinzip vorgegangen wie beim HUVEC-Lysat-IgM.

Das gleiche Kalibrierplasma wurde im ELISA in den Konzentrationen 500/ 250/ 100/ 50/ 25/ 10/ 5 U/ml eingesetzt. Proben wurden in der Verdünnungsstufen 1:50, 1:500, 1:1.000 und 1:5.000 aufgetragen.

Der Peroxidase-konjugierte Detektionsantikörper der Ziege, der gegen das humane IgG Fc-Fragment gerichtet ist, wurde in der Verdünnung 1:1.000 verwendet.

Die Entwicklung erfolgte mit OPD-Substrat für 20 Minuten.

3.2.6 Antikörper-Sandwich-ELISA zum Nachweis von IgM aus humanem Citratplasma (IgM-ELISA)

Puffer und Lösungen:

Entsprechen denen des HUVEC-Lysat-IgM, Ausnahmen werden aufgeführt.

Verdünnungspuffer:	0,1	%	Tween 20
	0,1	%	Milchpulver
	5	%	Maltose
			in PBS

Vorgehen:

Es wurde ein Antikörper von der Maus, der gegen humanes IgM gerichtet ist, in Verhältnis 1:500 in Beschichtungspuffer aufgenommen und im Brutschrank bei 37°C an Maxisorp-Mikrotiterplatten gekoppelt. Hierzu wurden 100 µl des Ansatzes pro Vertiefung aufgetragen. Nach einer Stunde wurde die Lösung abgekippt und die Vertiefungen dreimal mit je 150 µl Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 150 µl Blockpuffer pro

Vertiefung eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert und abgeblockt. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift.

Als Kalibriergerade diente gereinigtes IgM, das in den Konzentrationen 3/ 1,5/ 0,6/ 0,3/ 0,15/ 0,06 µg/ml in Verdünnungspuffer aufgenommen wurde. Die Proben wurden im Verhältnis 1:2.000 im gleichen Verdünnungspuffer aufgenommen. Es wurden je 100 µl Kalibrierlösung bzw. Probe in die jeweiligen Vertiefung pipettiert und als Doppelwerte aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden ungebundene Antigene durch einen weiteren Waschschrift entfernt.

Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper von dem Kaninchen, der gegen humanes IgM gerichtet ist. Er wurde in der Verdünnung 1:1.000 eingesetzt, mit 100 µl pro Vertiefung aufgetragen und unter Lichtschutz auf dem Schüttler inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde nach einer Stunde durch einen erneuten Waschschrift entfernt.

In der folgenden Phase wurden die gebildeten Antikörper-Sandwich-Komplexe durch Zusatz von 100 µl pro Vertiefung der chromogenen Substratlösung angefärbt. Dabei setzte die gebundene Merrettichperoxidase das Substrat in ein gelbes Produkt um. Nach 10 Minuten schlug die Farbe durch Stoppen der Enzymreaktion mit 50 µl Stopplösung pro Vertiefung in Braun um. Die gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492 nm war der IgM-Konzentration direkt proportional.

3.2.7 IgG-Konzentrationsbestimmung

Vorgehen:

Der Gesamtgehalt an IgG der Proben wurde im Zentrallabor der Kerckhoff-Klinik nach Standardprotokoll vollautomatisch am HITACHI 917 automatic analyser nephelometrisch ermittelt.

3.2.8 Bestimmung von Antiphospholipid-Antikörpern

Neben den funktionellen Gerinnungstests ist der Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern (APLA) ein ergänzendes immunologisches Verfahren zur Bestätigung der Diagnose eines Lupus antikoagulans⁹⁸. APLA können zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs herangezogen werden^{99, 100, 101}.

Das Prinzip der Bestimmung der Antiphospholipid-Antikörper ist ein indirekter nicht kompetitiver Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. Es wurde ein kommerzieller Test verwendet, bei dem ein Gemisch aus Cardiolipin, Phosphatidyl-Serin, Phosphatidyl-Inositol,

Phosphatidsäure und humanem β_2 -Glycoprotein bereits an die Vertiefungen der Platte gekoppelt sind.

Puffer und Lösungen:

Standards:	kombinierte Standardreihe mit IgG und IgM-Phospholipid-Antikörpern, jeweils 1 ml, gebrauchsfertig mit den Konzentrationen: 0/ 6,3/ 12,5/ 25/ 50/ 100 U/ml
Positivkontrolle:	1,5 ml, gebrauchsfertig
Negativkontrolle:	1,5 ml, gebrauchsfertig
Waschpuffer:	20 ml Konzentrat, aufzufüllen mit Aqua bidest. auf 1000 ml Endvolumen
Probenpuffer:	20 ml Konzentrat, aufzufüllen mit Aqua bidest. auf 100 ml Endvolumen
Konjugat:	15 ml, anti-human IgG, Peroxidase-konjugiert, 15 ml, anti-human IgM, Peroxidase-konjugiert
Enzymsubstrat:	Tetramethyl-Benzidin (TMB), 15 ml, gebrauchsfertig
Stopplösung:	1 M HCL, 15 ml, gebrauchsfertig
Streifen:	12 Streifen mit Vertiefungen, vorbeschichtet mit Phospholipid

Vorgehen:

Zu Beginn wurden Standards, Kontrollen und die auf 1:101 mit Probenpuffer vorverdünnten Proben zu je 100 μ l in die Vertiefungen pipettiert. In den Proben vorhandene Phospholipid-Antikörper banden während 30minütiger Inkubationszeit an das immobilisierte Antigen. Danach wurde die Lösung abgekippt und die überschüssigen Serumkomponenten wurden mit dreimal 300 μ l Waschpuffer entfernt.

In der folgenden Phase wurden je 100 μ l der Peroxidase-konjugierten anti-IgG- bzw. anti-IgM-Antikörper in die Vertiefungen pipettiert. Die an das immobilisierte Antigen gebundenen Phospholipid-Antikörper wurden durch die zugegebenen Peroxidase-konjugierten anti-IgG-Antikörper bzw. anti-IgM-Antikörper spezifisch erkannt. Überschüssiges Konjugat wurde durch einen weiteren Waschschrift entfernt.

Daraufhin wurden die gebildeten Antikörper-Sandwich-Komplexe durch Zugabe von 100 μ l pro Vertiefung der chromogenen TMB-Substratlösung angefärbt. Dabei setzte die gebundene Merrettichperoxidase das Substrat in ein blaues Produkt um. Nach 15 Minuten schlug die Farbe durch Stoppen der Enzymreaktion mit 100 μ l Stopplösung pro Vertiefung in Gelb um.

Die gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm ist der Konzentration der Anti-Phospholipid-Antikörper in den Proben direkt proportional.

3.2.9 Bestimmung von Anticardiolipin-Antikörpern

Wie die Antiphospholipid-Antikörper gehören auch die Anticardiolipin-Antikörper zur kompletten Diagnostik des Lupus antikoagulans. Ihr Titer kann ebenfalls zur Verlaufskontrolle der Erkrankung herangezogen werden^{102, 103}.

Das Prinzip der Bestimmung der Anticardiolipin-Antikörper ist ein indirekter nicht kompetitiver Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. Auch hier stand ein kommerzieller Test zur Verfügung, bei dem Cardiolipin an die Vertiefungen der Platte gekoppelt ist.

3.2.9.1 Bestimmung von Cardiolipin-Antikörpern der Klasse IgM

Puffer und Lösungen:

Standards: Cardiolipin IgM-Antikörper Standardlösungen, je 1 ml, gebrauchsfertig, in den Konzentrationen 0/ 4/ 8/ 20/ 50 /100 U/ml

Positivkontrolle: 1 ml, gebrauchsfertig

Negativkontrolle: 1 ml, gebrauchsfertig

Waschpuffer: 50 ml Konzentrat, aufzufüllen mit Aqua bidest. auf 1000 ml Endvolumen

Probenpuffer: 20 ml Konzentrat, aufzufüllen mit Aqua bidest. auf 100 ml Endvolumen

Konjugat: 15 ml, anti-human IgM, Peroxidase-konjugiert,

Enzymsubstrat: Tetramethyl-Benzidin (TMB), 15 ml, gebrauchsfertig

Stopplösung: 0,5 M H₂SO₄, 10 ml, gebrauchsfertig

Streifen: 12 Streifen mit Vertiefungen, vorbeschichtet mit Rinder-Cardiolipin

Vorgehen:

Zu Beginn wurden Standards, Kontrollen und die auf 1:101 mit Probenpuffer vorverdünnten Proben zu je 100 µl in die Vertiefungen pipettiert. In den Proben vorhandene Cardiolipin-Antikörper banden während der 30minütigen Inkubationszeit an das immobilisierte Antigen. Danach wurde die Lösung abgekippt und die überschüssigen Serumkomponenten wurden mit dreimal 300 µl Waschpuffer entfernt.

In der folgenden Phase wurden je 100 µl der anti-IgM-Enzymkonjugatlösung in die Vertiefungen pipettiert. Die an das immobilisierte Antigen gebundenen Cardiolipin-Antikörper

wurden durch die zugegebenen anti-IgM-Antikörper spezifisch erkannt. Überschüssiges Konjugat wurde durch einen weiteren Waschschrift entfernt.

Daraufhin wurden die gebildeten Antikörper-Sandwich-Komplexe durch Zugabe von 100 µl pro Vertiefung der chromogenen TMB-Substratlösung angefärbt. Dabei setzte die gebundene Merrettichperoxidase das Substrat in ein blaues Produkt um. Nach 10 Minuten schlug die Farbe durch Stoppen der Enzymreaktion mit 50 µl Stopplösung pro Vertiefung in Gelb um. Die gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm ist der Konzentration der Cardiolipin-Antikörper in den Proben direkt proportional.

3.2.9.2 Bestimmung von Cardiolipin-Antikörpern der Klasse IgG

Puffer und Lösungen:

Standards: Cardiolipin IgG-Antikörper Standardlösungen, je 1 ml, gebrauchsfertig, in den Konzentrationen 0/ 4/ 8/ 20/ 50 /100 U/ml

Positivkontrolle: 1 ml, gebrauchsfertig

Negativkontrolle: 1 ml, gebrauchsfertig

Waschpuffer: 50 ml Konzentrat, aufzufüllen mit Aqua bidest. auf 1000 ml Endvolumen

Probenpuffer: 20 ml Konzentrat, aufzufüllen mit Aqua bidest. auf 100 ml Endvolumen

Konjugat: 15 ml, anti-human IgG, Peroxidase-konjugiert,

Enzymsubstrat: Tetramethyl-Benzidin (TMB), 15 ml, gebrauchsfertig

Stopplösung: 0,5 M H₂SO₄, 10 ml, gebrauchsfertig

Streifen: 12 Streifen mit Vertiefungen vorbeschichteten mit Rinder-Cardiolipin

Vorgehen:

Arbeitsschritte und Konzentrationen entsprachen denen der Bestimmung der Anticardiolipin-Antikörper der Klasse IgM.

3.2.10 Bestimmung von Autoantikörpern gegen Granulozyten-Cytoplasma (ANCA)

Zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen Granulozyten-Cytoplasma wurde ein kommerzieller indirekter Immunfluoreszenztest verwendet.

Puffer und Lösungen:

Extran MA 01

Sekusept, 3%ig in Aqua dest.

Reagenzglasrager

Phosphatpuffer

Positivkontrolle

Negativkontrolle

Fluorescein (FITC)-konjugiertes anti-human IgG

Verdünnungspuffer: 0,1% Tween 20 in PBS

Evans-Blau

Deckglas

Eindeckmedium

Vorgehen:

Die Serumproben wurden 1:10 vorverdünnt und unverdünnt mit je 25 μ l je Reaktionsfeld des Reagenztragers pipettiert. Positive und negative Kontrollen wurden mitgeführt. Nach Auftrag des gesamten Testansatzes wurde der Objektträger in die Aussparungen des Reaktionstragers gelegt. Dabei tauchten die Reagenzglasrager in die Tropfen ein und die Inkubation wurde gestartet. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Objektträger ausgiebig mit Phosphatpuffer abgespült und anschließend für eine Minute in eine mit Phosphatpuffer gefüllte Küvette gestellt.

Für die folgenden Schritte wurde der bereits gereinigte Reagenzglasrager mit 20 μ l FITC-konjugiertem Antiserum, verdünnt in Verdünnungspuffer, pro Reaktionsfeld bestückt. Der Objektträger wurde aus der Küvette genommen, um jeweils 5 sec. Rückseite und Unterkante mit einem Papiertuch zu trocknen, und wieder so in die Aussparungen des Reagenzglasragers gelegt, daß die Gläser eintauchten. Die Inkubation erfolgte für 30 min. unter Lichtschutz. Anschließend wurde der Objektträger mit Phosphatpuffer gespült und 1 min. in eine Küvette mit frischem Phosphatpuffer gelegt. Zur Gegenfärbung wurden 10 Tropfen Evans-Blau auf 150 μ l Phosphatpuffer gegeben.

Zuletzt wurden 10 μ l Eindeckmedium je Feld auf ein Deckglas pipettiert. Der Objektträger wurde an der Rückseite und an allen vier Kanten mit einem Papiertuch getrocknet und mit den Reagenzglasragern nach unten auf das Deckglas gegeben. Die Fluoreszenz wurde unter dem Mikroskop beurteilt.

3.3 Funktionelle Gerinnungstests

3.3.1 Kaolin Clotting Time-Index

Zum Nachweis eines funktionell aktiven Lupus antikoagulans (LA) ist unter anderem der Kaolin Clotting Time (KCT) geeignet^{104, 105, 106}. Durch Kontakt der Plasmaprobe mit Kaolin wird die intrinsische Gerinnung aktiviert.

Der KCT-Index stellt eine Modifikation dieses Tests dar, bei dem durch Zugabe von Normalplasma ein evtl. zugrundeliegender Faktorenmangel ausgeschlossen werden kann.

Der KCT-Index stellt ein geeignetes Testverfahren zum Nachweis eines LA mit hoher Sensitivität und Spezifität dar.

Puffer und Lösungen:

Kaolin-Lösung:	0,2	g	Kaolin
	10	ml	Deäthylbarbiturat-Acetat-Pufferlösung
CaCl-Lösung:	0,025	m/mol	Calciumchlorid-Lösung

Vorgehen:

Jeweils 100 µl Normalplasma (NP), Patientenplasma und eine 1:2-Mischung aus beiden wurden für 3 min. mit 100 µl der Kaolin-Lösung im KC 10 bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden 100 µl der CaCl-Lösung zugegeben und die Gerinnungszeit automatisch gemessen.

Die Ermittlung der KCT-Index erfolgte nach der Formel:

$$\frac{KCT (1 : 2 \text{ Mischung}) - KCT (NP)}{KCT (Patientenplasma)} * 100$$

Anhand von 100 Proben gesunder Blutspender wurde der 2S-Bereich ermittelt. Proben mit einem Index von über 21 galten als pathologisch.

3.3.2 Russell Viper Venom-Test (RVV-Test)

Auch der RVV-Test ist ein gängiges funktionelles Nachweisverfahren in der Diagnostik des Lupus antikoagulans⁷. Durch das Gift der Schlange „Vipera russelli“ wird der Faktor X direkt aktiviert. In Anwesenheit von Lupus antikoagulans-Antikörpern wird die folgende Phospholipid-abhängige Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin gehemmt. Es resultiert eine verlängerte Gerinnungszeit.

In einem Bestätigungstest wird die verlängerte Gerinnungszeit durch Zugabe von Phospholipiden zu dem Testansatz wieder aufgehoben.

Puffer und Lösungen:

RVV-Test der Firma American Diagnostica

RVV-Konfirm-Test der Firma American Diagnostica

Normalplasma

Pathologische Kontrolle

Aqua dest.

Vorgehen:

Das RVV-Reagenz wurde in zwei Ansätzen mit 0,2 und 0,5 ml Aqua dest. gelöst und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Als Untersuchungsmaterial wurde tiefgefrorenes plättchenarmes Citratplasma verwendet, das nicht länger als zwei Wochen bei -20°C tiefgefrorenes wurde. Tiefgefrorenes Plasma wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und nach dem Auftauen sofort verwendet.

Der Thrombolyzer wurde laut Gerätebedienung mit den Lösungen und Proben in Doppelwerten bestückt und die Messung automatisch vorgenommen.

Die Bestimmung des RVV-Confirm erfolgte, wenn der RVV-Test größer als 36 sec. war. Dieser Grenzwert basiert auf dem anhand von 100 gesunden Blutspendern ermittelten 2S-Bereich. Die Auswertung erfolgte dann über die Ratio: $\text{Ratio} = \text{RVV (sec.)} / \text{RVV-Confirm (sec.)}$. Bei einer Ratio größer als 1,2 mußte der Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans gestellt werden.

3.4 Statistische Auswertung

3.4.1 Intra- und Interassayvarianz

Um die Güte der entwickelten ELISAs zu überprüfen, wurden die Variationskoeffizienten von Intra- und Interassayvarianz bestimmt. Für die Ermittlung der Interassayvarianz wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen Plasmaproben mit unterschiedlich hohen Antikörpertitern unter möglichst gleichen Bedingungen getestet. Zur Überprüfung der Intraassayvarianz wurde eine Probe in mehrfachen Doppelwerten auf einer ELISA-Platte aufgetragen.

3.4.2 Deskriptive und analytische Auswertung

Die deskriptive und analytische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte computergestützt mit dem Programm SPSS 10.1 für Windows, das hierzu freundlicherweise vom Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Test-Entwicklung

4.1.1 Entwicklung eines HUVE-Zell-Lysat-ELISA zur Quantifizierung anti-endothelialer Antikörper der Klasse IgG (Lysat-IgG)

4.1.1.1 Lysat-Gewinnung

Um die Lysat-Gewinnung aus humanen umbilikal venösen endothelialen Zellen (HUVE-Zellen) zu optimieren, wurden drei unterschiedlich erstellte Lysate im ELISA auf endothelspezifische Bestandteile überprüft. Hierzu wurden zwei 90er Kulturschalen mit HUVE-Zellen der 1. Passage nach dem Lösen vom Substrat und Abzentrifugieren resuspendiert und in 2 ml Extraktionspuffer aufgenommen, schockgefroren und anschließend bei 37°C 10 Minuten aufgetaut, dann weitere 10 Minuten bei 4°C und 180 g abzentrifugiert. Der Überstand (Lysat 1) wurde im Verhältnis 1:2 mit Beschichtungspuffer verdünnt, mit 100 µl pro Vertiefung auf eine ELISA-Platte aufgetragen und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Alternativ wurden zwei 90er Kulturschalen mit HUVE-Zellen der 1. Passage (Lysat 2) und 12 90er Kulturschalen mit HUVE-Zellen der 1. Passage (Lysat 3) in 2 ml Extraktionspuffer aufgenommen und das Suspendat sonifiziert. Die sonifizierten Extrakte wurden ebenfalls im Verhältnis 1:2 mit Beschichtungspuffer verdünnt, mit 100 µl pro Vertiefung auf eine ELISA-Platte aufgetragen und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um den Nachweis von Endothelzellbestandteilen im Lysat zu erbringen, wurden Antikörper, die gegen charakteristische bzw. spezifische Endothelzell-Antigene gerichtet sind, auf das Lysat aufgetragen. Hierzu wurden vierfach die Vertiefungen einer ELISA-Platte mit je einem murinen Antikörper, gegen *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), von Willebrand-Faktor (vWF) und Vimentin, in den Verdünnungen 1:100 inkubiert¹⁰⁷.

Zum Nachweis der drei genannten Antikörper murinen Ursprungs wurde ein Peroxidase-konjugierter Detektionsantikörper von der Ziege verwendet, der spezifisch an das Mausantigen bindet. Er wurde in der Verdünnung 1:1.000 eingesetzt, mit 100 µl pro Vertiefung aufgetragen und unter Lichtschutz bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Überschüssiges Konjugat wurde nach einer Stunde durch einen erneuten Waschschrift entfernt.

In der folgenden Phase wurden die gebildeten Antikörper-Sandwich-Komplexe durch Zugabe von 100 µl pro Vertiefung der chromogenen Substratlösung angefärbt. Dabei setzte die gebundene Merrettichperoxidase das Substrat in ein gelbes Produkt um. Nach 15 Minuten schlug die Farbe durch Stoppen der Enzymreaktion mit 50 µl Stopplösung pro Vertiefung in

Braun um. Die gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 492 nm war der Konzentration der drei eingesetzten Endothelzell-typischen Primärantikörper direkt proportional.

In den Lysaten 1 und 2 ließen sich die genannten Endothelzellbestandteile nachweisen, in Lysat 3 jedoch, gemessen an der optischen Dichte, in relativ höherer Konzentration (siehe Abbildung 6). Der Herstellungsgang des Lysats 3 wurde für alle weiteren Versuche übernommen.

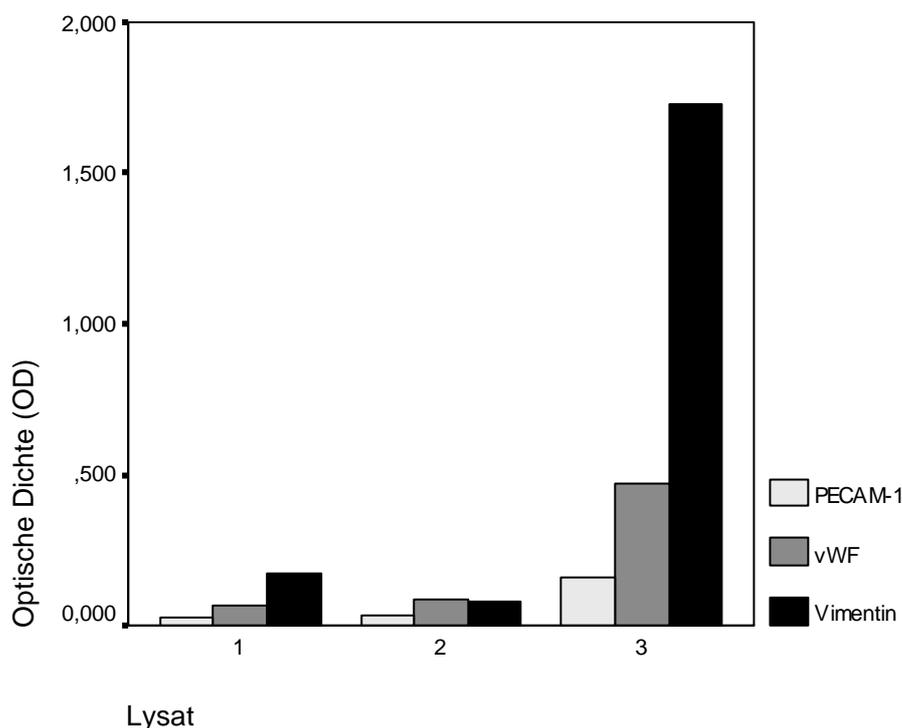


Abbildung 6: Nachweis von spezifischen und charakteristischen Antigenen des Endothel. Um den Nachweis von Endothelzellbestandteilen in den Lysaten 1, 2 und 3 zu erbringen, wurden diese an eine ELISA-Platte gekoppelt und mit murinen Antikörpern gegen *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), von Willebrand-Faktor (vWF) und Vimentin inkubiert. Die anschließende Detektion der Antikörper erfolgte mit einem Peroxidase-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörper. Der Substratumsatz wurde photometrisch nach 15 min. im ELISA-Reader gemessen.

4.1.1.2 Beschichtungskonzentration

Um die optimale Beschichtungskonzentration festzulegen, wurden unterschiedliche Konzentrationen des HUVE-Zell-Lysats und jeweils eine Pufferkontrolle (Leerwert) in die Vertiefungen einer ELISA-Platte pipettiert. Nach Inkubation mit dem Maus-anti-vWF (1:100) wurde wieder mit dem Peroxidase-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1:1.000) detektiert. Aufgrund der erreichten Extinktionen (siehe Abbildung 7) und in Anbetracht der aufwendigen Materialgewinnung wurde die Beschichtungskonzentration von 1:100 für alle folgenden Versuche gewählt.

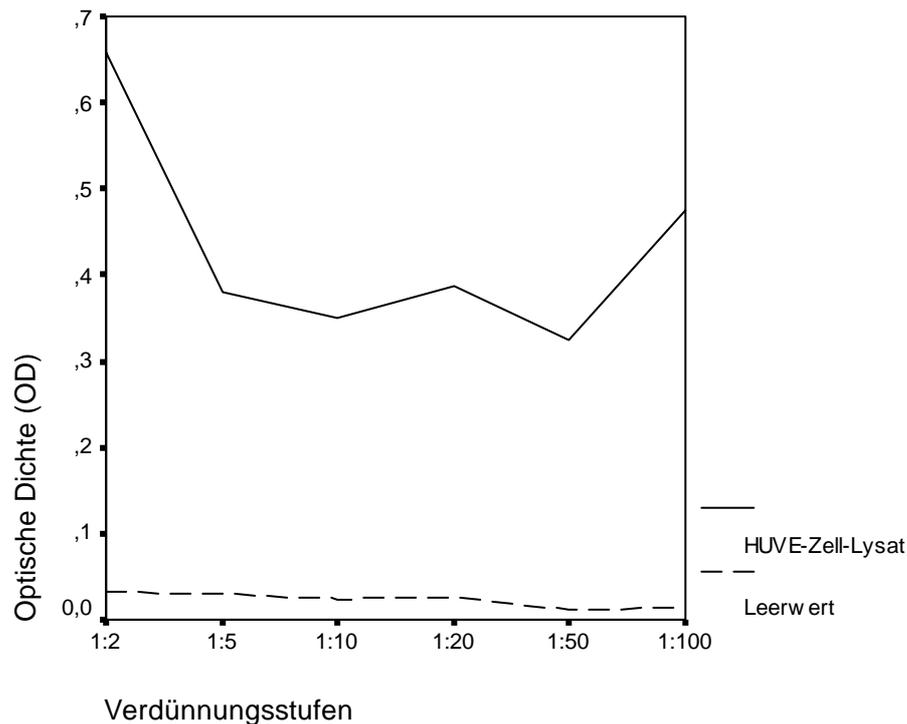


Abbildung 7: Vergleich verschiedener Beschichtungskonzentrationen mit HUVE-Zell-Lysat. Zur Ermittlung einer geeigneten Beschichtungskonzentration des Lysats wurde dieses in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:2 bis 1:100) an die Vertiefungen einer ELISA-Platte gekoppelt und mit einem murinen anti-vWF-Antikörper inkubiert. Mit einem Peroxidase-konjugierten anti-Maus-Antikörper von der Ziege wurde der Primärantikörper nachgewiesen. Anschließend wurde der Substratumsatz optisch gemessen.

4.1.1.3 Überprüfung auf DNA-Rückstände im HUVE-Zell-Lysat

Für die Fragestellung der Arbeit war es wichtig auszuschließen, daß die Bindung von Antikörpern aus Patientenplasmen nicht auf einer Bindung an DNA-Bestandteile im HUVE-Zell-Lysat beruht, sondern endothelzellspezifisch erfolgt. Aus diesem Grund wurde eine ELISA-Platte mit HUVE-Zell-Lysat beschichtet und mit Milchpulver geblockt. Es wurden zwei Ansätze eines human anti-human Einzel (ss)- und Doppelstrang (ds)-DNA-Antikörpers zur Inkubation mit dem HUVE-Zell-Lysat vorbereitet. Ein Ansatz wurde in der Vorstellung, daß spezifische Bindungsstellen des Antikörpers so blockiert würden, mit humaner dsDNA präinkubiert. Dabei wurde die DNA im Überschuß zur Konzentration des human-anti-human Einzel (ss)- und Doppelstrang (ds)-DNA-Antikörper eine Stunde vor dem Auftragen des Ansatzes im ELISA hinzugegeben. Der zweite Ansatz enthielt die gleiche Antikörperkonzentration und wurde zur gleichen Zeit angesetzt. Es wurde jedoch keine dsDNA hinzugegeben. Nach Ablauf einer Stunde wurden beide Ansätze in absteigenden Antikörper-Konzentrationen aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation der ELISA-Platte wurde der human-anti-human Einzel (ss)- und Doppelstrang (ds)-DNA-Antikörper mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human IgG-Antikörper (1:1.000) detektiert. Die Entwicklung erfolgte mit OPD-

Substrat für 15 Minuten. Da die gemessene Extinktion des zuvor mit dsDNA geblockten Antikörpers mit der des ungeblockten nahezu identisch ist, muß eine unspezifische Bindung des human anti-human Einzel (ss)- und Doppelstrang (ds)-DNA-Antikörpers an das HUVE-Zell-Lysat stattgefunden haben (siehe Abbildung 8). Folglich ist das Lysat frei von DNA-Bestandteilen.

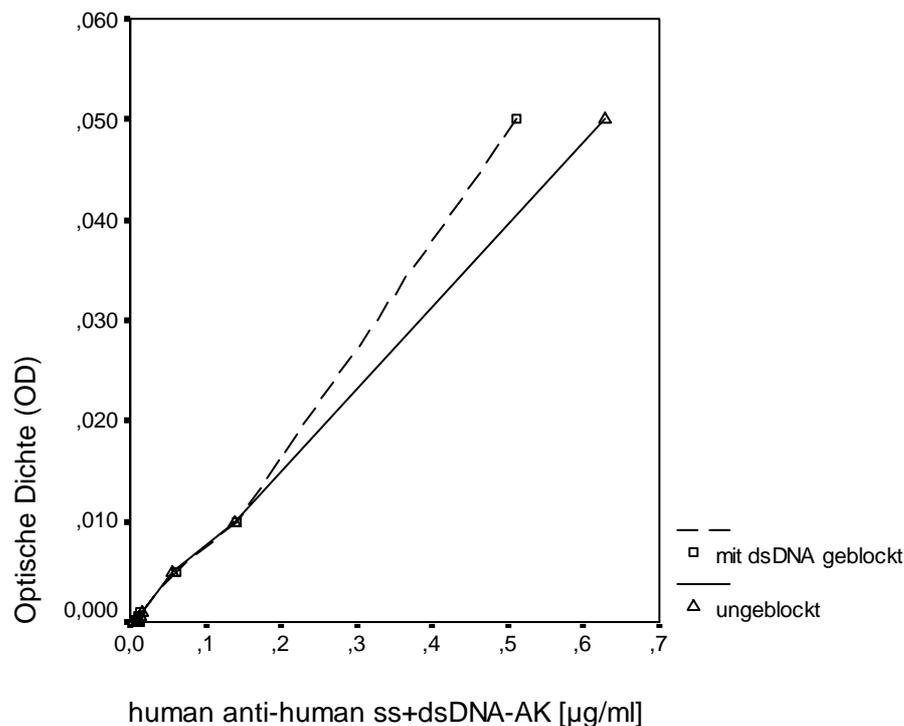


Abbildung 8: ELISA zum Nachweis von DNA-Bestandteilen im HUVE-Zell-Lysat. Zur Überprüfung des Lysats auf DNA-Bestandteile wurde ein Lysat-beschichteter ELISA mit einem human-anti-human Doppelstrang (ds) und Einzelstrang (ss)-DNA-Antikörper inkubiert. Dabei wurde eine Antikörperlösung zuvor mit humaner dsDNS präinkubiert. Beide Ansätze wurden mit einem Ziege anti-human-IgG-Antikörper detektiert. Der Substratumsatz wurde photometrisch gemessen. Beide Testansätze zeigen fast identische optische Dichten.

4.1.1.4 Kalibriergerade und Plasmaverdünnungen

Um die im ELISA gemessenen Extinktionen quantifizieren zu können, wurde Plasma von einem Patienten mit einer bioptisch gesicherten Vaskulitis vom Typ Morbus Takayasu als Kalibrierplasma verwendet. Es wurde festgelegt, dass ein Milliliter des Plasmas 5.000 Einheiten (U) antiendothelialer Antikörper enthält. Das Kalibrierplasma wurde in den Konzentrationen 500/ 250/ 100/ 50/ 25/ 10/ 5 U/ml in jedem Test mitgeführt. Normalplasmen wurden in der Verdünnung 1:10 im ELISA eingesetzt. Die Verdünnung der pathologischen Plasmen wurde in vier Stufen (1:50, 1:100, 1:500 und 1:1.000) so gewählt, daß eine Erfassung innerhalb der Kalibriergerade gewährleistet war. Die Extinktionen der getesteten Plasmen wurden anhand der Kalibriergeraden, die in jedem Test mitgeführt wurde, ausgewertet.

4.1.1.5 Varianz-Bestimmung

Intra- und Interassayvarianz wurden zum Zwecke der Validierung anhand von Normalplasmen überprüft. Es ergaben sich die in Tabelle 2 aufgeführten Varianzkoeffizienten (VK) der Interassayvarianz. Für die Intraassayvarianz ergab sich beim Auftrag von acht Doppelwerten ein Variationskoeffizient von 3,6% bei einer mittleren Plasmakonzentration von 153 U/ml.

Tabelle 2: Interassayvarianzen des HUVE-Zell-Lysat-ELISAs für IgG (n=3).

Mittelwert (U/ml)	Interassayvarianz (VK in %)
109	35,5
323	27,6

4.1.2 Entwicklung eines zellulären HUVE-Zell-ELISA zur Quantifizierung antiendothelialer Antikörper der Klasse IgG (HUVEC-IgG)

4.1.2.1 Detektion

Im weiteren Verlauf sollte die optimale Verdünnung des Detektionsantikörpers ermittelt werden. Zu Beginn der Versuchsreihen zur Etablierung dieses ELISA wurden die HUVE-Zellen zu je 20.000 pro Vertiefung ausgesät, später wurde die Zellzahl modifiziert (siehe 4.1.2.3). Auf die so beschichteten ELISA-Platten wurden sechs Kalibriergeraden aufgetragen, inkubiert und mit verschiedenen Konzentrationen eines Peroxidase-konjugierten Ziege anti-human IgG Fc-Antikörper detektiert. Tabelle 3 gibt die jeweils gemessene optische Dichte wieder.

Tabelle 3: Vergleich verschiedener Detektionsansätze im Test HUVEC-IgG anhand der optischen Dichte (OD).

Detektions-Ansatz	1:50.000	1:10.000	1:5.000	1:2.000	1:1.000	1:500
OD bei 100 U/ml	0,034	0,109	0,180	0,330	0,578	0,895
OD bei 50 U/ml	0,031	0,077	0,138	0,273	0,488	0,752
OD bei 25 U/ml	0,028	0,051	0,089	0,206	0,368	0,569
OD bei 10 U/ml	0,023	0,036	0,062	0,100	0,172	0,314
OD bei 5 U/ml	0,019	0,029	0,048	0,072	0,128	0,193
OD bei 2,5 U/ml	0,018	0,028	0,041	0,055	0,101	0,141
OD bei 1 U/ml	0,230	0,028	0,038	0,043	0,077	0,116
Bestimmtheitsmaß (R²)	0,8016	0,9868	0,9592	0,8783	0,8688	0,8636

Die linearste Steigung der Kalibriergeraden, wiedergegeben durch das Bestimmtheitsmaß, war mit einer Verdünnung von 1:10.000 des eines Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human

IgG Fc-Antikörper zu erreichen (siehe Tabelle 3). Aufgrund der höheren optischen Dichten wurde jedoch die Verdünnung 1:500 für alle weiteren Versuche gewählt.

4.1.2.2 Entwicklungssubstrat

Mit dem Ziel die Linearität der Kalibriergeraden noch zu verbessern, wurde eine Verdünnungsreihe des Kalibrierplasmas doppelt auf einer ELISA-Platte auftragen. Bei den unter gleichen Bedingungen geführten Verdünnungsreihen wurde eine mit dem Substrat 2.2'-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolinsulfonat (6)] (ABTS) entwickelt und zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen, während die andere mit OPD-Substrat entwickelt und abgestoppt wurde.

Tabelle 4: Vergleich verschiedener Entwicklungsmodi im Test HUVEC-IgG anhand der optischen Dichte (OD).

Entwicklung	ABTS 50'	OPD 5'
OD bei 100 U/ml	0,724	0,895
OD bei 50 U/ml	0,619	0,752
OD bei 25 U/ml	0,430	0,569
OD bei 10 U/ml	0,282	0,314
OD bei 5 U/ml	0,203	0,193
OD bei 2,5 U/ml	0,156	0,141
OD bei 1 U/ml	0,131	0,166
Betimmtheitsmaß (R²)	0,8889	0,8636

Die ABTS-Entwicklung zeigte keine wesentliche Verbesserung der Korrelation zwischen den im Test eingesetzten Einheiten und der gemessenen optischen Dichte. Die Extinktionen waren auch nach 50minütiger Entwicklung geringer als bei 5minütiger OPD-Entwicklung (siehe Tabelle 4). Da der Nachweis über den ABTS-Substratumsatz zudem weniger spezifisch ist, wurde die OPD-Entwicklung beibehalten.

4.1.2.3 Zellzahl

Um eine Standardisierung des Tests zu erreichen, mußte die Zellzahl für den zellulären ELISA genau festgelegt sein. Es wurden verschiedene Zellzahlen primärer HUVE-Zellen pro Vertiefung einer ELISA-Platte ausgesät und nach drei Tagen fixiert und geblockt. Zu jeder Zellzahl wurde eine Kalibriergerade aufgetragen und nach Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human IgG Fc-Antikörper (1:500) detektiert (siehe Tabelle 5). Auf-

grund der nahezu linearen Steigung der Kalibriergeraden bei 7.500 HUVE-Zellen/Vertiefung wurde diese Zellzahl für zukünftige Versuche beibehalten.

Vor jeder Fixierung wurde das typische Kopfsteinpflastermuster der Konfluenz in jeder Vertiefung mikroskopisch kontrolliert.

Tabelle 5: Vergleich der Beschichtung mit verschiedenen Zellzahlen im Test HUVEC-IgG anhand der optischen Dichte (OD).

Zellzahl	20.000	15.000	10.000	7.500	5.000	2.500
OD bei 50 U/ml	0,647	0,818	0,568	0,735	0,609	0,371
OD bei 25 U/ml	0,403	0,413	0,337	0,381	0,383	0,207
OD bei 10 U/ml	0,235	0,246	0,188	0,158	0,166	0,119
OD bei 5 U/ml	0,141	0,139	0,168	0,106	0,097	0,076
OD bei 2,5 U/ml	0,122	0,166	0,099	0,091	0,072	0,045
OD bei 1 U/ml	0,076	0,071	0,066	0,056	0,041	0,026
OD bei 0 U/ml	0,052	0,046	0,041	0,029	0,019	0,010
Bestimmtheitsmaß (R²)	0,9862	0,9949	0,9822	0,9979	0,9883	0,9891

4.1.2.4 Varianz-Bestimmung

Intra- und Interassayvarianz wurden zum Zwecke der Validierung anhand von Normalplasmen überprüft. Es ergaben sich die in Tabelle 6 aufgeführten Varianzkoeffizienten (VK) der Interassayvarianz. Bei Auftrag von acht Doppelwerten ergab sich eine Intraassayvarianz von 4,7% bei einer mittleren Plasmakonzentration von 136 U/ml.

Tabelle 6: Interassayvarianzen des zellulären HUVE-Zell-ELISAs für IgG (n=3).

Mittelwert (U/ml)	Interassayvarianz (VK in %)
165	18,0
248	10,5

4.1.3 Entwicklung eines HUVE-Zell-Lysat-ELISA zur Quantifizierung anti-endothelialer Antikörper der Klasse IgM (Lysat-IgM)

4.1.3.1 Beschichtungskonzentration

Um die Durchführung der HUVE-Zell-Lysat-ELISAs auf einer Platte zu gewährleisten, wurden die Bedingungen vom HUVE-Zell-Lysat-ELISA zur Quantifizierung antiendothelialer Antikörper der Klasse IgG übernommen.

4.1.3.2 Detektion

Im Folgenden sollte die optimale Konzentration des Detektionsantikörpers ermittelt werden. Dazu wurden auf einer ELISA-Platte mehrere Kalibriergeraden aufgetragen und mit verschiedenen Konzentrationen eines Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human IgM Fc 5 μ -Antikörpers detektiert. Die Entwicklung mit OPD-Substrat war für alle Ansätze identisch. Es zeigten sich die in Tabelle 7 dargestellten optischen Dichten. Zugunsten der Steilheit der Kalibriergeraden wurde trotz der etwas geringeren Korrelation (r) eine Verdünnung des Detektionsantikörpers von 1:500 gewählt.

Tabelle 7: Vergleich verschiedener Detektionsansätze für den Test Lysat-IgM.

Detektions-Ansatz	1:500	1:1.000	1:2.000
OD bei 50 U/ml	0,851	0,668	0,458
OD bei 25 U/ml	0,589	0,429	0,286
OD bei 10 U/ml	0,280	0,208	0,139
OD bei 5 U/ml	0,172	0,118	0,080
OD bei 2,5 U/ml	0,099	0,068	0,047
OD bei 1 U/ml	0,056	0,038	0,025
OD bei 0 U/ml	0,020	0,011	0,007
Bestimmtheitsmaß (R²)	0,9686	0,9819	0,9862

4.1.3.3 Varianz-Bestimmung

Intra- und Interassayvarianz wurden zum Zwecke der Validierung anhand von Normalplasmen überprüft. Es ergaben sich die in Tabelle 8 aufgeführten Varianzkoeffizienten (VK) der Interassayvarianz. Bei Auftrag von acht Doppelwerten ergab sich eine Intraassayvarianz von 2,2% bei einer mittleren Plasmakonzentration von 167 U/ml.

Tabelle 8: Interassayvarianzen des HUVE-Zell-Lyast-ELISAs für IgM (n=3).

Mittelwert (U/ml)	Interassayvarianz (VK in %)
148	18,7
257	14,5

4.1.4 Entwicklung eines zellulären HUVE-Zellen-ELISA zur Quantifizierung antiendothelialer Antikörper der Klasse IgM (HUVEC-IgM)

4.1.4.1 Zellzahl

Um die Durchführbarkeit der Tests auf einer ELISA-Platte zu gewährleisten, wurde die Zellzahl vom zellulären HUVE-Zellen-ELISA zur Quantifizierung antiendothelialer Antikörper der Klasse IgG übernommen.

4.1.4.2 Detektion

Um die optimale Antikörperkonzentration für die Detektion zu ermitteln, wurden mehrere Kalibriergeraden auf eine ELISA-Platte aufgetragen und mit verschiedenen Ansätzen des Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human IgM Fc 5 μ -Antikörpers inkubiert (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich verschiedener Detektionsansätze im Test HUVEC-IgM.

Detektions-Ansatz	1:1.000	1:2.000	1:5.000	1:10.000
OD bei 100 U/ml	1,034	0,781	0,373	0,238
OD bei 50 U/ml	0,752	0,570	0,305	0,177
OD bei 25 U/ml	0,490	0,390	0,212	0,135
OD bei 10 U/ml	0,305	0,239	0,127	0,084
OD bei 5 U/ml	0,190	0,166	0,094	0,060
OD bei 2,5 U/ml	0,115	0,105	0,072	0,053
OD bei 1 U/ml	0,066	0,055	0,043	0,040
Bestimmtheitsmaß (R²)	0,9406	0,9356	0,9004	0,9366

Da bei einer Detektion mit der Verdünnung 1:1.000 des verwendeten Antikörpers die Kalibriergerade mit der größten Korrelation (r) und Steilheit erreicht wurde, wurde diese Verdünnung vorerst beibehalten. Eine spätere Änderung wird im folgenden Abschnitt erläutert.

4.1.4.3 Verdünnungspuffer

Da es möglich erschien, ein Bestimmtheitsmaß von 0,9406 noch zu verbessern, wurde versucht, eventuelle Antikörper-Agglutinationen durch Zusatz von Maltose zu verringern. Hierzu wurde das Kalibrierplasma mit Puffern verschiedener Maltose-Konzentrationen verdünnt und auf eine Platte aufgetragen. Auch der Detektionsantikörper wurde mit den entsprechenden Maltose-haltigen Puffern 1:1.000 verdünnt. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, wurde mit einem Zusatz von 10% Maltose eine bessere Korrelation als zuvor erzielt.

Tabelle 10: Vergleich verschiedener Maltose-haltiger Verdünnungspuffer im HUVEC-IgM.

Maltosezusatz	5%	10%	20%
OD bei 100 U/ml	0,765	0,549	0,317
OD bei 50 U/ml	0,497	0,313	0,207
OD bei 25 U/ml	0,361	0,220	0,135
OD bei 10 U/ml	0,198	0,152	0,074
OD bei 5 U/ml	0,121	0,082	0,046
Bestimmtheitsmaß (R²)	0,9704	0,9888	0,9787

Leider wurde durch den Zusatz von Maltose die optische Dichte jedoch so drastisch verringert, daß es nötig erschien, eine stärkere Konzentration des Detektionsantikörpers zu wählen. So war mit der Verdünnung 1:500 des Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-human IgM Fc 5 μ -Antikörpers unter Zusatz von 10% Maltose eine optische Dichte von 0,854 bei 50 U/ml und ein Bestimmtheitsmaß von 0,9774 zu erreichen. Dieser Modus wurde für weitere Bestimmungen beibehalten.

4.1.4.4 Varianz-Bestimmung

Intra- und Interassayvarianz wurden zum Zwecke der Validierung anhand von Normalplasmen überprüft. Es ergaben sich die in Tabelle 11 aufgeführten Varianzkoeffizienten (VK) der Interassayvarianz. Bei Auftrag von neun Doppelwerten ergab sich eine Intraassayvarianz von 5,1% bei einer mittleren Plasmakonzentration von 116 U/ml.

Tabelle 11: Interassayvarianzen des zellulären HUVE-Zell-ELISAs für IgM (n=3).

Mittelwert (U/ml)	Interassayvarianz (VK in %)
145	20,2
1107	27,5

4.1.5 Entwicklung eines ELISA zur Quantifizierung der Gesamtkonzentration von IgM in humanem Plasma (IgM-ELISA)

4.1.5.1 Plattenbeschichtung und Detektion

Zunächst wurden die optimalen Konzentrationen für Fänger- und Detektionsantikörper, bei denen die spezifische Reaktion möglichst hoch und die unspezifische möglichst gering sein sollte, durch Schachbrettiteration ermittelt. Hierzu wurde eine Maxisorb-ELISA-Platte mit verschiedenen Konzentrationen eines Maus-anti-human IgM-Antikörpers sowie mit einer Pufferkontrolle beschichtet. Inkubiert wurde mit humanem Normalplasma (NP) in einer Ver-

dünnung von 1:50. Zur Erkennung unspezifischer Kreuzreaktionen der eingesetzten Antikörper untereinander wurde jeweils parallel Verdünnungspuffer als Leerwert (LW) aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen eines Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-human IgM Fc 5 μ -Antikörpers. Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, ergab sich hierbei die größte relative Differenz zwischen Normalplasma und Leerwert bei den Konzentrationen 1:500 für den Beschichtungsantikörper und 1:1.000 für den Detektionsantikörper.

Tabelle 12: Schachbrett Titration zur Entwicklung eines IgM-ELISA.

		Beschichtung					
Detektion	Probenauftrag	1:500	1:1.000	1:2.000	1:5.000	1:10.000	Puffer
1:500	Plasma	1,454	1,186	1,045	0,624	0,432	0,284
	Puffer	0,036	0,035	0,030	0,029	0,031	0,026
1:1.000	Plasma	1,324	0,842	0,681	0,375	0,265	0,190
	Puffer	0,016	0,009	0,011	0,012	0,010	0,013
1:2.000	Plasma	0,928	0,531	0,454	0,235	0,167	0,112
	Puffer	0,008	0,007	0,007	0,007	0,007	0,016
1:5.000	Plasma	0,501	0,280	0,231	0,124	0,084	0,063
	Puffer	0,008	0,045	0,007	0,006	0,007	0,009

4.1.5.2 Kalibriergerade und Verdünnungspuffer

Zur Festlegung einer Kalibriergeraden mußten diejenigen Konzentrationen an IgM ermittelt werden, bei denen die Extinktion linear zur eingesetzten Menge an IgM ansteigt. Dies geschah durch Verdünnung eines kommerziellen Standards mit bekannter IgM-Konzentration. Um Antikörperagglutinationen zu verringern, wurden dem Verdünnungspuffer (0,1% Tween 20/ 0,1% Milchpulver/ PBS 1x) verschiedene Konzentrationen Maltose zugesetzt und diejenige mit der günstigsten Auswirkung auf die Kalibriergerade unter ihnen ermittelt.

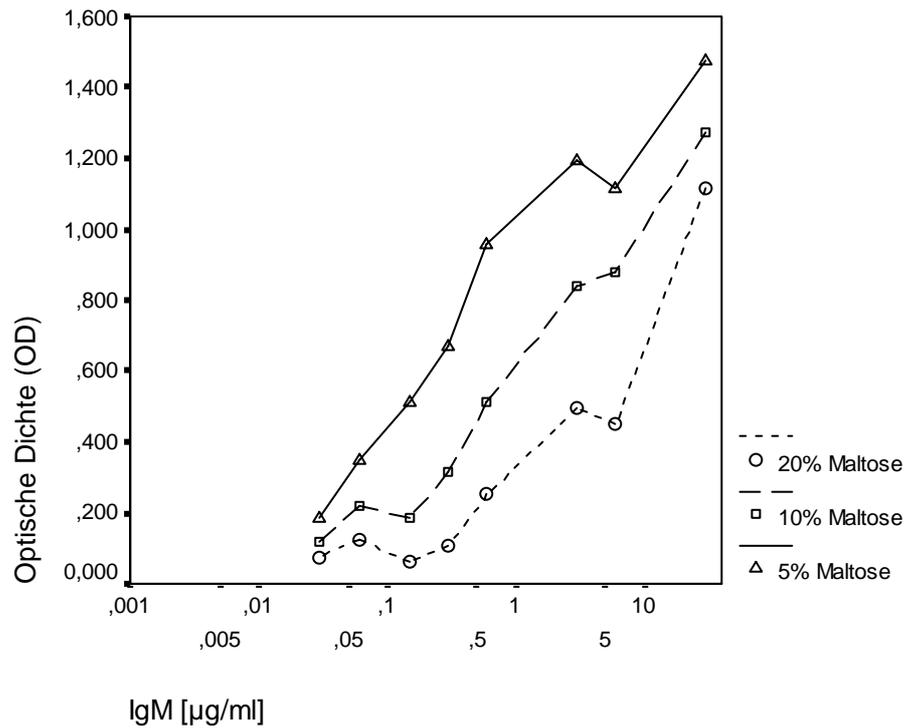


Abbildung 9: IgM-Kalibriergeraden mit verschiedenen Maltose-haltigen Verdünnungspuffern. Um eine optimale Steigung der Kalibriergeraden zu ermitteln wurden den Verdünnungspuffern des Kalibrierplasmas jeweils 5%, 10% und 20% Maltose zugesetzt. Die Kalibriergeraden wurden auf eine ELISA-Platte aufgetragen und den gleichen Arbeitsschritten unterzogen. Es unterschied sich lediglich der Maltosegehalt der eingesetzten Puffer.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, liegt der gesuchte lineare Kurvenabschnitt der Kalibriergeraden zwischen 0,03 und 3 µg IgM/ml bei Zusatz von 5% Maltose zum Verdünnungspuffer.

Nach Einsatz von gepooltem Normalplasma unter den zuvor genannten Bedingungen, wurde eine Verdünnungsstufe von 1:2.000 für alle einzusetzenden Plasmaproben ermittelt.

4.1.5.3 Varianz-Bestimmung

Intra- und Interassayvarianz wurden zum Zwecke der Validierung anhand von Normalplasmen überprüft. Es ergaben sich die in Tabelle 13 aufgeführten Varianzkoeffizienten (VK) der Interassayvarianz. Bei Auftrag von acht Doppelwerten ergab sich eine Intraassayvarianz von 7,7% bei einer mittleren Plasmakonzentration von 7,931 mg/ml.

Tabelle 13: Interassayvarianz des IgM-ELISA (n=3).

Mittelwert (mg/ml)	Interassayvarianz (VK in %)
0,123	5,9
0,829	13,2

4.2 Normalwerte

Anhand von gesunden Blutspendern der Kerckhoff-Klinik wurden nun Normalwerte für die entwickelten ELISAs zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern (AECA) erstellt. Hierzu wurden 56 Plasmaproben von 43 Männern und 13 Frauen im Alter zwischen 19 und 66 Jahren (mittleres Alter 39 Jahre) getestet. Zusätzlich wurden der IgM- und IgG-Gehalt der Proben bestimmt.

4.2.1 Korrelation zwischen AECA-Titer und Geschlecht

Häufig gibt es bei biologischen Parametern geschlechtsspezifische Unterschiede. Um einen solchen Unterschied in der Menge an HUVE-Zellen bindenden Antikörpern (AECA) zwischen Männern und Frauen aufzudecken, wurde der *U*-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney angewendet. Tabelle 14 gibt die Irrtumswahrscheinlichkeiten (*p*) für die Annahme der Nullhypothese (H_0 =: es gibt keinen Unterschied der AECA-Bindung zwischen Männern und Frauen) in den einzelnen Testverfahren wieder.

Tabelle 14: Verteilung der AECA-Titer nach Geschlecht (n=56; m=männlich, w=weiblich).

			Mittelwert	Standardabw.	Irrtumswahrs.
cHUVEC-IgM [U/ml]	n=43 (m)		96,62	53,80	p=0,1429
	n=13 (w)		119,29	53,39	
cHUVEC-IgG [U/ml]	n=43 (m)		241,65	156,70	p=0,3416
	n=13 (w)		275,89	129,41	
HUVEC-Lysat-IgM [U/ml]	n=43 (m)		70,63	41,51	p=0,3516
	n=13 (w)		85,08	49,86	
HUVEC-Lysat-IgG [U/ml]	n=43 (m)		286,71	416,10	p=0,3271
	n=13 (w)		355,14	796,46	

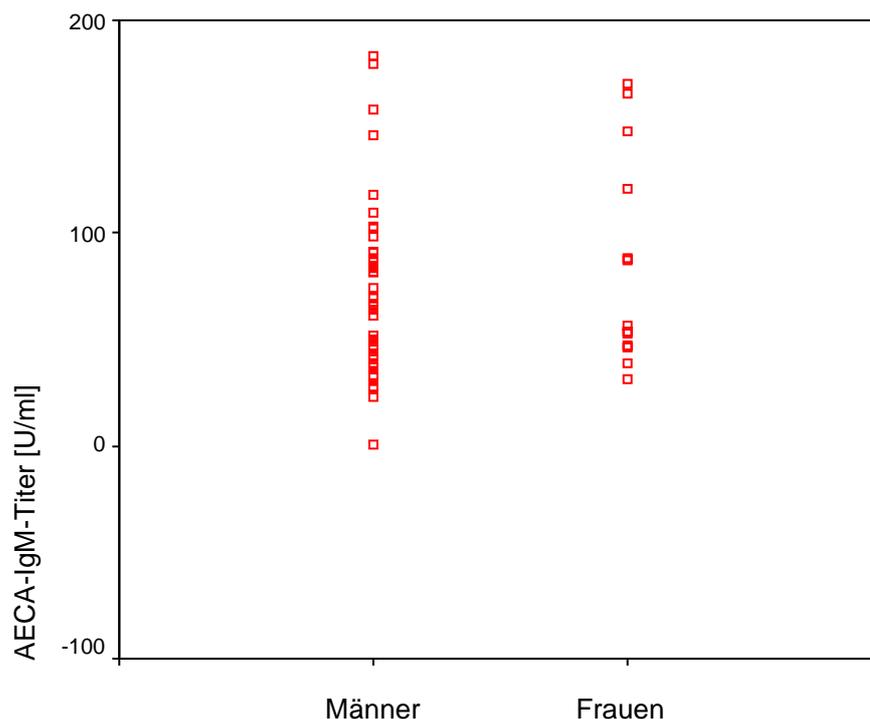


Abbildung 10: Verteilung der AECA-IgM-Titer bei den Geschlechtern im HUVEC-Lysat-IgM. Die AECA-IgM-Titer von 43 männlichen und 13 weiblichen gesunden Blutspendern wurden im HUVE-Zell-Lysat-ELISA bestimmt. Der *U*-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney ergab hier unter den verschiedenen Testverfahren die größte Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme der Nullhypothese mit $p=0,3516$.

Nennenswerte geschlechtsspezifische Unterschiede der AECA-Titer sind nicht wahrscheinlich, wie Abbildung 10 noch verdeutlichen soll. Die kompletten Abbildungen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden sind im Anhang zu finden (Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32).

4.2.2 Korrelation zwischen AECA-Titer und Alter

Es sollte auch ein Zusammenhang zwischen Alter und AECA-Titer anhand des Spearman Korrelationskoeffizienten überprüft werden. Tabelle 15 gibt die gefundenen Korrelationen mit Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) für die Annahme der Nullhypothese (H_0 : es besteht kein Zusammenhang zwischen Alter und AECA-Titer) wieder:

Tabelle 15: Korrelation zwischen AECA-Titer und Alter nach Spearman.

		cHUVEC-IgM	cHUVEC-IgG	HUVEC-Lysat-IgM	HUVEC-Lysat-IgG
Alter	Koeffizient	-0,2619	0,0424	-0,3087	-0,1409
	p	0,051	0,757	0,021	0,300
	N	56	56	56	56

Die einzige signifikante Korrelation, wies auf mit dem Alter abnehmende AECA-Titer gemessen im HUVE-Zell-Lysat-IgM hin. Dieser Zusammenhang ist jedoch sehr schwach, wie auch die zugehörige Abbildung 11 zeigt. Es erscheint nicht notwendig, altersspezifische AECA-Titer zu erheben.

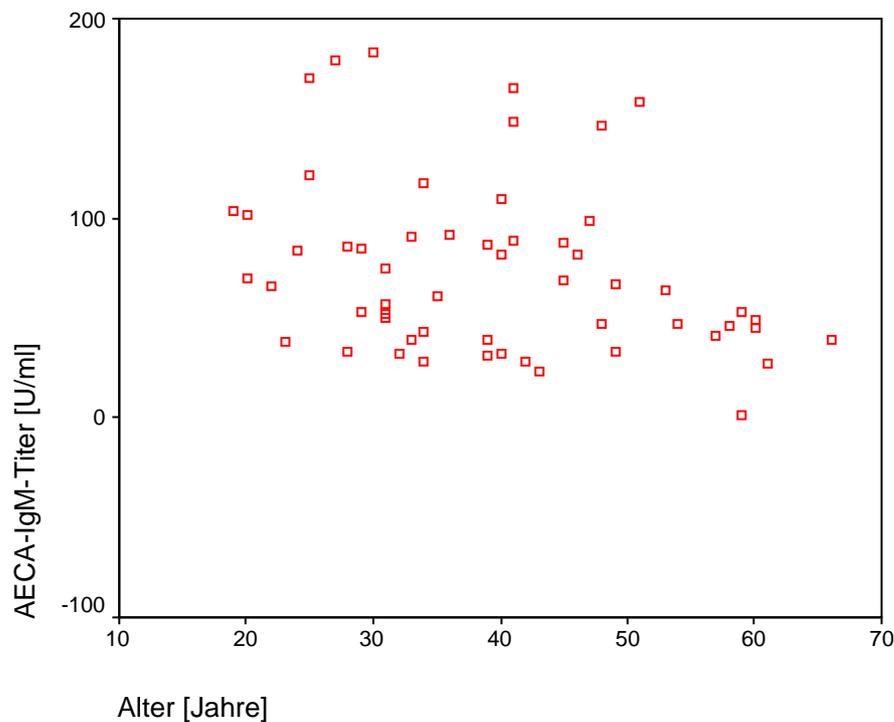


Abbildung 11: Korrelation zwischen Alter und AECA-IgM-Titer gemessen im HUVEC-Lysat-IgM. Die AECA-Titer von 56 gesunden Blutspendern im Alter zwischen 19 und 66 Jahren (mittleres Alter 39 Jahre) wurden bestimmt und ihre Korrelation zum Alter nach Spearman überprüft. Hierbei ergab sich die größte Korrelation mit $r=-0,3087$ der Titer zum Alter im HUVEC-Lysat-ELISA zum Nachweis von AECA-IgM ($p=0,021$).

Weitere Abbildungen zur Abhängigkeit der AECA-Bindung zum Alter finden sich im Anhang (Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35).

4.2.3 Korrelation zwischen AECA-Titer und IgG-Plasmakonzentration

Korrelationen zwischen den AECA-IgG-Titern und der IgG-Plasmakonzentration sollten überprüft werden. Dazu wurden die ermittelten Titer der Normalplasmen statistischen Tests unterzogen. In der Auswertung nach Pearson zeigte sich weder eine Korrelation der Gesamtkonzentration an IgG mit den AECA-Titern im HUVEC-Lysat-IgG ($p=0,526$) noch im cHUVEC-IgG ($p=0,166$). Auch die Auswertung nach Spearman zeigte keine Korrelation zwischen der Gesamtkonzentration an IgG zu den ermittelten AECA-Titern im HUVEC-Lysat-IgG ($p=0,232$), jedoch zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen AECA-Titer und IgG-

Gesamtkonzentration im cHUVEC-IgG ($p=0,048$) (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13). Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse in der Übersicht.

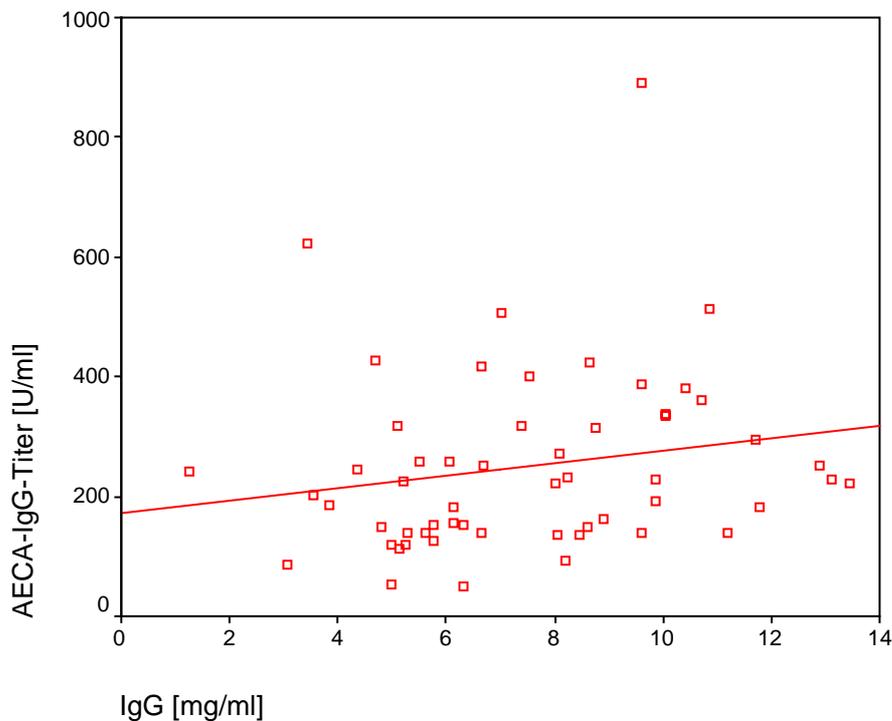


Abbildung 12: Korrelation zwischen AECA-IgG-Titer gemessen im cHUVEC-IgG und IgG-Plasmakonzentration. Die AECA-IgG-Titer von 56 gesunden Blutspendern wurden im HUVE-Zell-ELISA bestimmt und ihre Korrelation zur IgG-Plasmakonzentration statistisch nach Pearson ($r=0,188$, $p=0,166$) und nach Spearman ($r=0,266$, $p=0,048$) überprüft.

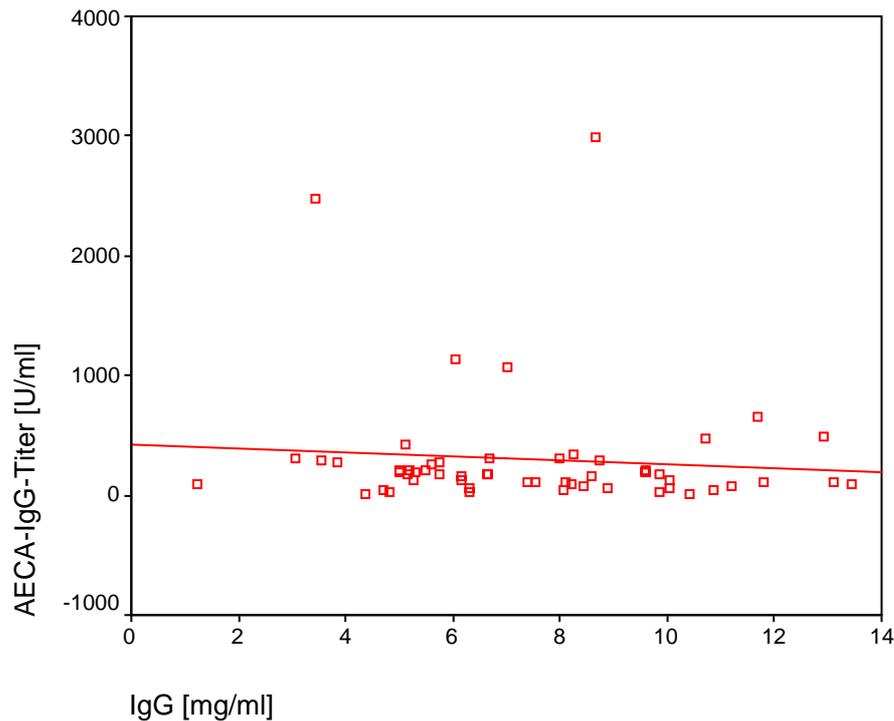


Abbildung 13: Korrelation von AECA-IgG-Titer gemessen im HUVEC-Lysat-IgG und IgG-Plasmakonzentration. Die AECA-IgG-Titer von 56 gesunden Blutspendern wurden im HUVEC-Lysat-ELISA bestimmt und ihre Korrelation zur IgG-Plasmakonzentration statistisch nach Pearson ($r=-0,087$, $p=0,526$) und nach Spearman ($r=-0,162$, $p=0,232$) überprüft.

Tabelle 16: Korrelation zwischen AECA-Titer und IgG-Plasmakonzentration (n=56).

			IgG
Pearson	HUVEC-Lysat-IgG	Korrelationskoeffizient	-0,087
		Sig.	0,526
	cHUVEC-IgG	Korrelationskoeffizient	0,188
		Sig.	0,166
Spearman	HUVEC-Lysat-IgG	Korrelationskoeffizient	-0,162
		Sig.	0,232
	cHUVEC-IgG	Korrelationskoeffizient	0,266
		Sig.	0,048

Experimentell konnten deutlich höhere AECA-Titer in beiden Testverfahren nach Zugabe von kommerziellem humanem IgG zu dem Normalplasma gefunden werden. Bei Zugabe von 0,15 mg Sandoglobulin/Vertiefung ergab sich im Vergleich zum Normalplasma im cHUVEC-IgG ein mittlerer Titeranstieg um 297%, im HUVEC-Lysat-IgG um 583%.

4.2.4 Korrelation zwischen AECA-Titer und IgM-Plasmakonzentration

Auch hier wurden Korrelationen zwischen Gesamtplasmagehalt an IgM und den ermittelten AECA-Titern der Normalplasmen im HUVEC-Lysat-IgM und im cHUVEC-IgM statistisch überprüft. Die Auswertungen nach Pearson und nach Spearman zeigten hoch signifikante Korrelationen für den HUVEC-Lysat-IgM und höchst signifikante Korrelationen für den cHUVEC-IgM (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse in der Übersicht.

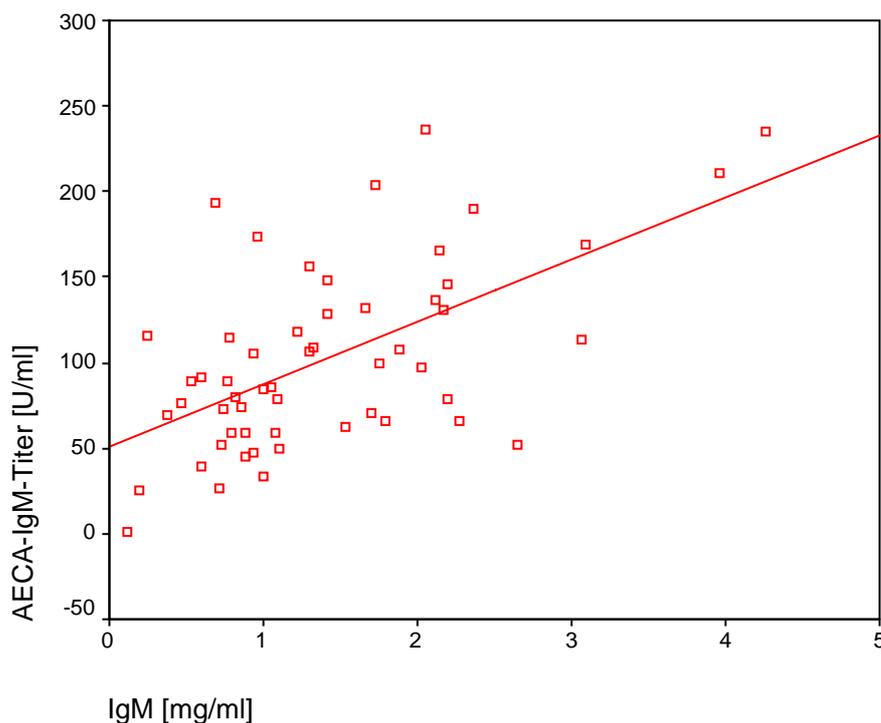


Abbildung 14: Korrelation von AECA-IgM-Titer im cHUVEC-IgM und IgM-Plasmakonzentration. Die AECA-IgM-Titer von 56 gesunden Blutspendern wurden im HUVE-Zell-ELISA bestimmt und ihre Korrelation zur IgM-Plasmakonzentration statistisch nach Pearson ($r=0,593$, $p<0,001$) und nach Spearman ($r=0,497$, $p<0,001$) überprüft.

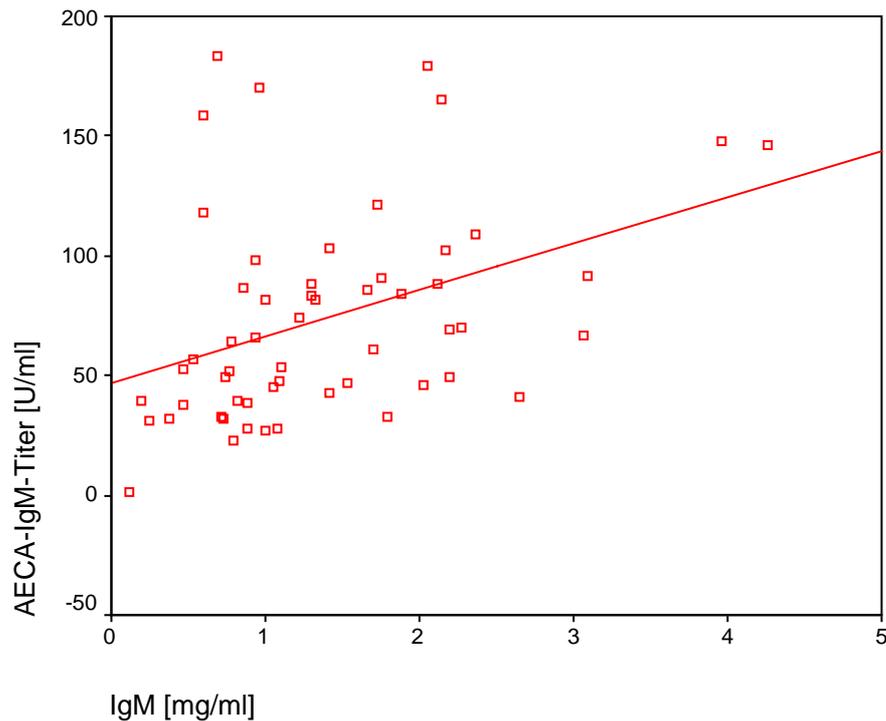


Abbildung 15: Korrelation von AECA-IgM-Titer im HUVEC-Lysat-IgM und IgM-Plasmakonzentration. Die AECA-IgM-Titer von 56 gesunden Blutspendern wurden im HUVEC-Lysat-ELISA bestimmt und ihre Korrelation zur IgM-Plasmakonzentration statistisch nach Pearson ($r=0,392$, $p=0,003$) und nach Spearman ($r=0,421$, $p=0,001$) überprüft.

Tabelle 17: Korrelation zwischen AECA-Titer und IgM-Plasmakonzentration (n=56).

			IgM
Pearson	HUVEC-Lysat-IgM	Korrelationskoeffizient	0,392
		Sig.	0,003
	cHUVEC-IgM	Korrelationskoeffizient	0,593
		Sig.	<0,001
Spearman	HUVEC-Lysat-IgM	Korrelationskoeffizient	0,421
		Sig.	0,001
	cHUVEC-IgM	Korrelationskoeffizient	0,497
		Sig.	<0,001

4.2.5 AECA-Quotientenbildung und Überprüfung der Normalverteilung

Da erhöhte Immunglobulin-Gesamtkonzentrationen nicht zwangsläufig auf krankheitsspezifische Antikörperbildung zurückzuführen sind, können sie den Nachweis von AECA in den entwickelten Testverfahren, wie unter 4.2.3 und 4.2.4 gezeigt wurde, verfälschen. Durch die

Bildung des Quotienten AECA-Titer/Plasmakonzentration an IgG bzw. IgM soll dies verhindert werden.

Um die Normalverteilung der gebildeten AECA-Quotienten zu überprüfen, wurde das Testverfahren nach Kolmogorov-Smirnov und nach Shapiro-Wilk angewandt. Dabei ergaben sich folgende Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Nullhypothese (H_0 : die Quotienten sind normalverteilt) (siehe Tabelle 18). Demnach liegen keine Normalverteilungen vor.

Tabelle 18: Überprüfung der Normalverteilung der Quotienten.

	Kolmogorov-Smirnov	Shapiro-Wilk
	p	p
cHUVEC-IgG/IgG	<0,001	<0,001
HUVEC-Lysat-IgG/IgG	<0,001	<0,001
cHUVEC-IgM/IgM	<0,001	<0,001
HUVEC-Lysat-IgM/IgM	<0,001	<0,001

4.2.6 Transformation der AECA-Quotienten und Überprüfung der Normalverteilung

Da sich das 95%-Konfidenzintervall nur aus normalverteilten, d.h. symmetrischen Verteilungen der Daten ableiten läßt, wurden die Ursprungswerte in dekadische Logarithmen transformiert, um eine Symmetrie zu erreichen (siehe Abbildung 16 bis Abbildung 19).

Die Überprüfung der logarithmierten AECA-Quotienten nach Kolmogorov-Smirnov ergab eine Normalverteilung an der unteren Grenze der echten Signifikanz. Auch nach Shapiro-Wilk lässt sich auf eine Normalverteilung schließen. In Tabelle 19 sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Annahme der Nullhypothese (H_0 : die logarithmierten AECA-Quotienten sind normalverteilt) aufgeführt.

Tabelle 19: Überprüfung der Normalverteilung der logarithmierten AECA-Quotienten.

	Kolmogorov-Smirnov	Shapiro-Wilk
	p	p
log (cHUVEC-IgG/IgG)	0,200	0,225
log (HUVEC-Lysat-IgG/IgG)	0,200	0,475
log (cHUVEC-IgM/IgM)	0,200	0,762
log (HUVEC-Lysat-IgM/IgM)	0,200	0,598

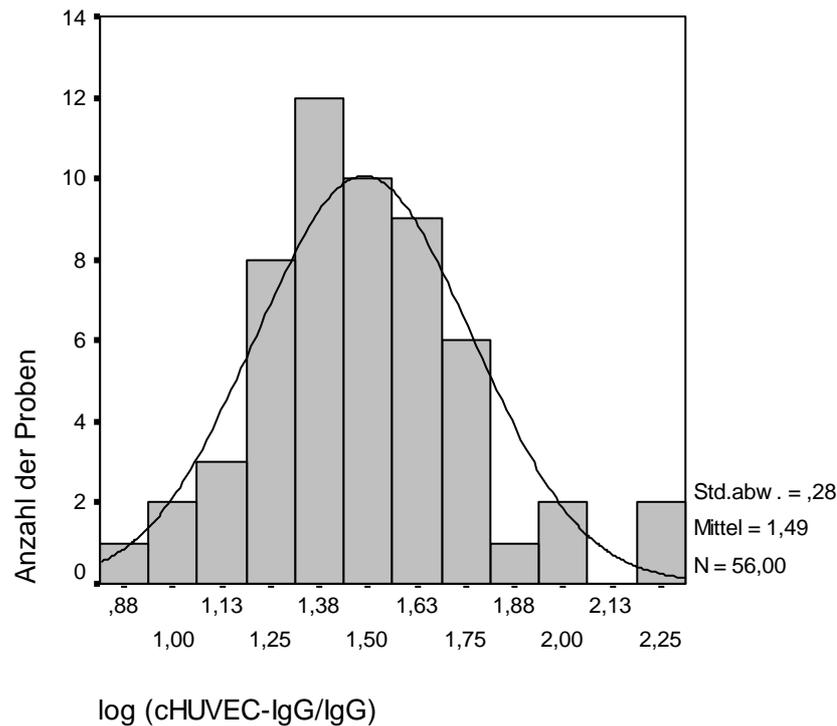


Abbildung 16: Normalverteilung der logarithmierten Quotienten cHUVEC-IgG/IgG. Die Abbildung gibt die Verteilung der ermittelten logarithmierten Quotienten aus AECA-IgG-Titer, gemessen im HUVE-Zell-ELISA, und der IgG-Gesamtkonzentration von je 56 Proben gesunder Blutspender wieder.

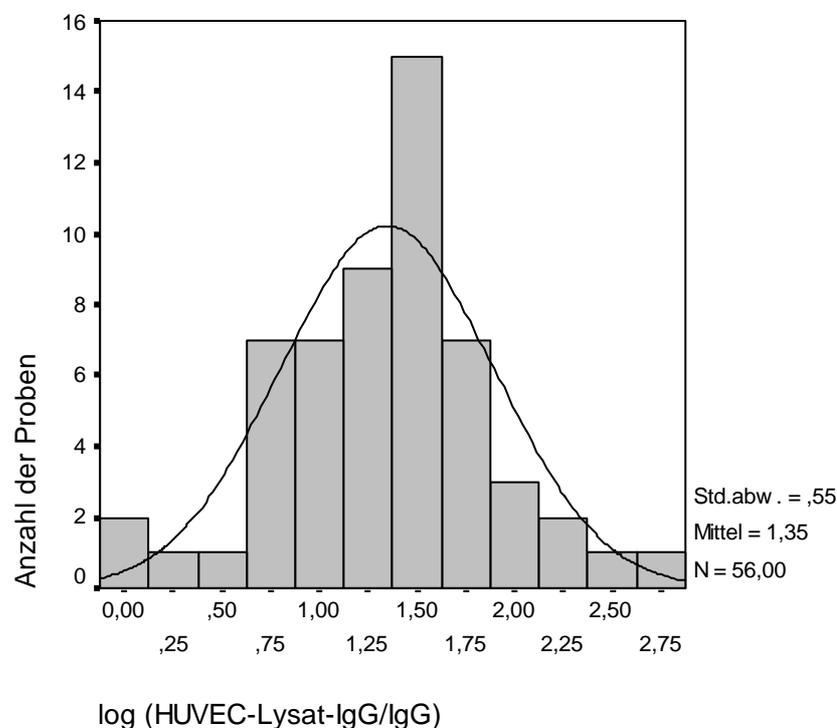


Abbildung 17: Normalverteilung der logarithmierten Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG. Die Abbildung gibt die Verteilung der ermittelten logarithmierten Quotienten aus AECA-IgG-Titer, gemessen im HUVEC-Lysat-ELISA, und der IgG-Gesamtkonzentration von je 56 Proben gesunder Blutspender wieder.

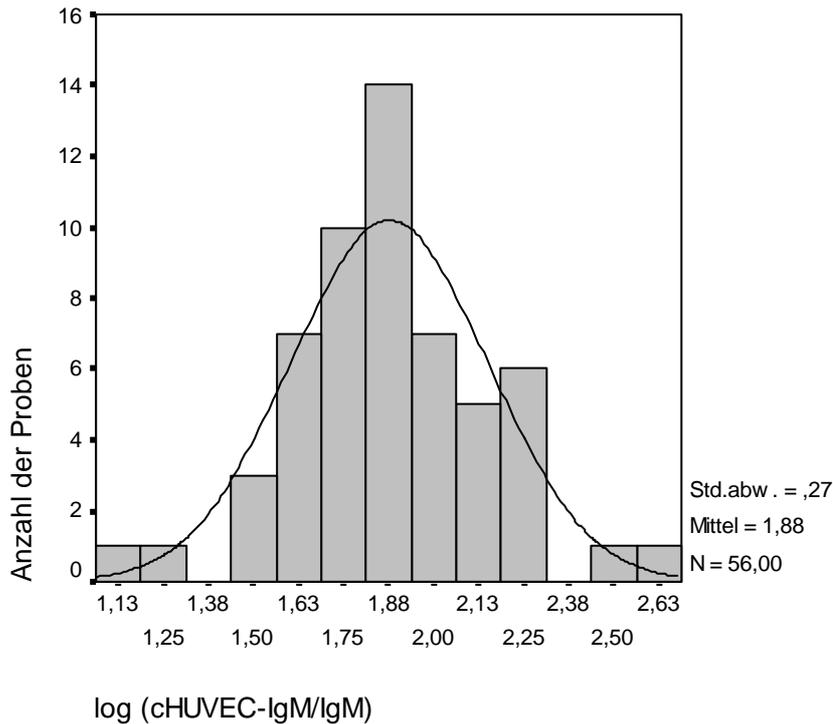


Abbildung 18: Normalverteilung der logarithmierten Quotienten cHUVEC-IgM/IgM. Die Abbildung gibt die Verteilung der ermittelten logarithmierten Quotienten aus AECA-IgM-Titer, gemessen im HUVE-Zell-ELISA, und der IgM-Gesamtkonzentration von je 56 Proben gesunder Blutspender wieder.

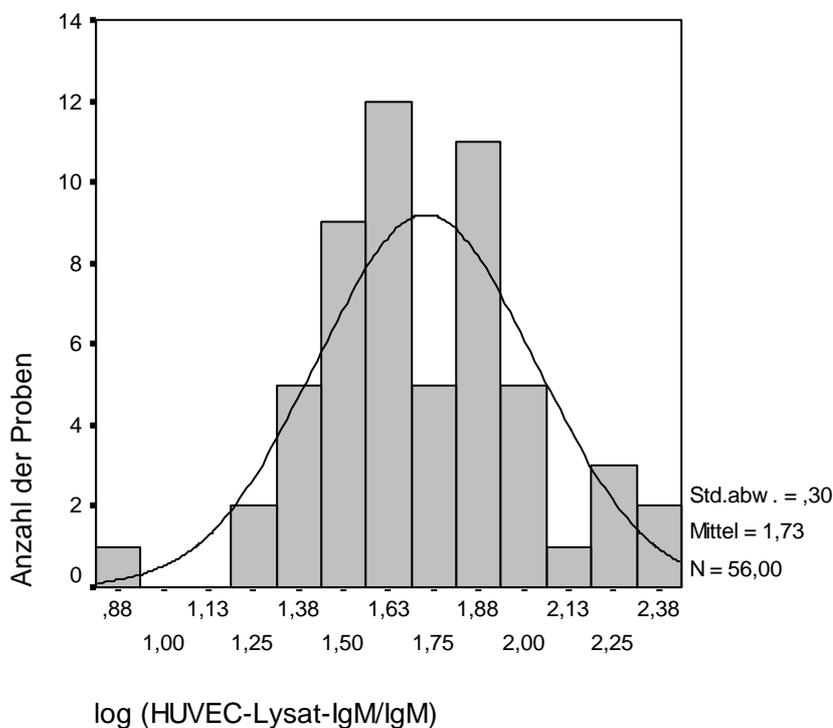


Abbildung 19: Normalverteilung der logarithmierten Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM. Die Abbildung gibt die Verteilung der ermittelten logarithmierten Quotienten aus AECA-IgM-Titer, gemessen im HUVEC-Lysat-ELISA, und der IgM-Gesamtkonzentration von je 56 Proben gesunder Blutspender wieder.

4.2.7 Definition der Normalbereiche

Aus Mittelwert und Standardabweichung der logarithmierten AECA-Quotienten wurde durch Entlogarithmieren der Normbereich für die einzelnen Testverfahren festgelegt (Lognormalverteilungen). Für einen klinisch relevanten Normbereich wurde die obere Grenze des errechneten 95%-Konfidenzintervalls gewählt (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: 95%-Toleranzbereiche der Lognormalverteilungen und Normbereich.

	95%-Konfidenzintervall	Normbereich
cHUVEC-IgG/IgG [U/mg]	8,71 - 109,16	< 109,17
HUVEC-Lysat-IgG/IgG [U/mg]	1,84 - 268,38	< 268,39
cHUVEC-IgM/IgM [U/mg]	21,58 - 262,27	< 262,28
HUVEC-Lysat-IgM/IgM [U/mg]	13,41 - 213,43	< 213,44

Auch unter den gesunden Blutspendern gab es sechs klinisch unauffällige Individuen mit teilweise pathologisch erhöhten AECA-Quotienten. Insgesamt befanden sich innerhalb des Normkollektivs zu jedem Testverfahren 2 von 56 (3,6 %) Proben mit pathologischen AECA-Titern.

4.3 Patientenproben

Zur Bestimmung von AECA-Titern bei Patienten standen 203 Proben zur Verfügung. Hiervon stammten 37 Proben von Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Vaskulitis (Gruppe 1) bestand, 54 Proben wurden mit der Fragestellung eines Lupus antikoagulans (Gruppe 2) eingesandt, weitere 108 Proben stammten von Patienten mit nicht näher definierter rheumatischer Erkrankung (Gruppe 3), bei vier Proben war bekannt, dass die Patienten an einem systemischen Lupus erythematosus (SLE) erkrankt sind (Gruppe 4).

Anhand der 95%-Vertrauensbereiche in den verschiedenen Testverfahren wurden die ermittelten AECA-Quotienten der Patientenkollektive ausgewertet. Die Einzelwerte sind im Anhang als Tabelle 24 wiedergegeben.

Es wurde statistisch überprüft, ob die untersuchten Patientengruppen hinsichtlich ihrer AECA-Quotienten signifikant von der Referenzgruppe (Gruppe 5) abweichen. Die Anwendbarkeit der hierfür gewählten statistischen Methode (Mittelwertvergleiche nach Dunnet-T, bzw. bei inhomogenen Varianzen Dunnet-T3) erfordert eine Normalverteilung der Daten. Wie die Quotienten der Gruppe 5 waren auch die Quotienten der Gruppen 1 bis 4 nicht normal verteilt. Analog wurde durch Bildung des natürlichen Logarithmus die Bedingung der Nor-

malverteilung erfüllt. Signifikante Unterschiede der transformierten Daten lassen den Rückschluß zu, dass diese Unterschiede bereits in den Ursprungsdaten vorlagen.

4.3.1 Auswertung der AECA-Quotienten

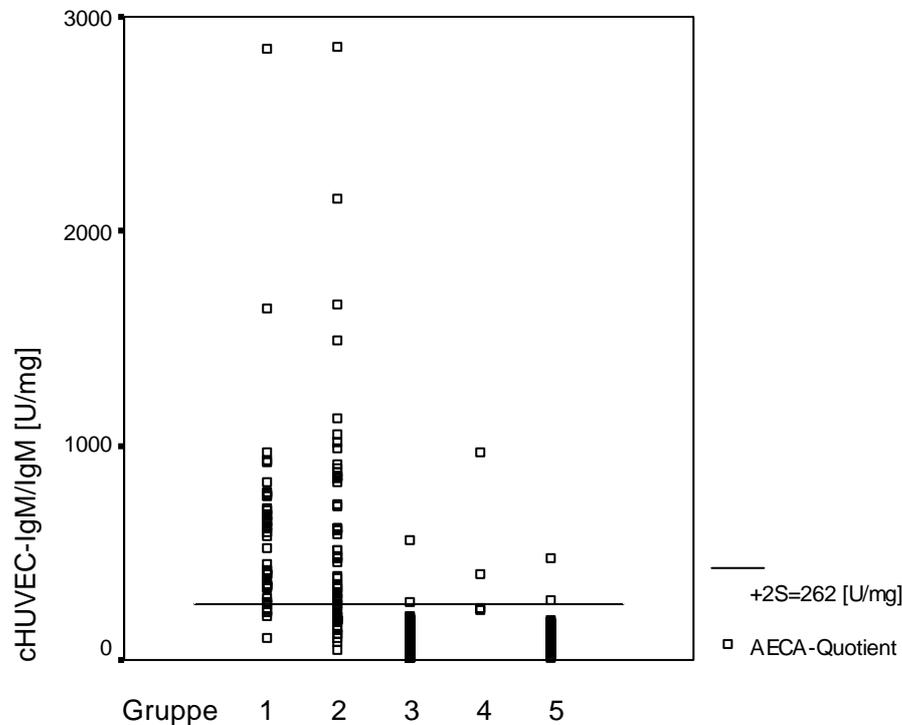


Abbildung 20: AECA-IgM-Quotienten des zellulären ELISA. Die AECA-IgM-Quotienten von vier Patientenkollektiven (Gruppe 1-4) wurden ermittelt und denen der gesunden Blutspender (Gruppe 5, n=56) gegenübergestellt. Der 2S-Bereich für den Quotienten cHUVEC-IgM/IgM wurde anhand der Lognormalverteilung der gesunden Blutspender festgelegt. Gruppe 1=Patienten mit V.a. Vaskulitis (n=37), Gruppe 2=Patienten mit V.a. Lupus antikoagulans (n=54), Gruppe 3=Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung (n=108), Gruppe 4=Systemischer Lupus erythematoses (SLE) (n=4), Gruppe 5=gesunde Blutspender.

Der AECA-Quotient cHUVEC-IgM/IgM war bei Patienten mit V.a. Vaskulitis in 33 von 37 Fällen pathologisch (89,2%) ($p < 0,001$ nach Dunnet-T), bei Patienten mit V.a. Lupus antikoagulans in 37 von 54 Fällen (68,5%) ($p < 0,001$ nach Dunnet-T), in 2 von 108 Fällen bei Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung (1,9%) ($p = 0,086$ nach Dunnet-T) und 2 von 4 Fällen bei Patienten mit einem SLE (50%) ($p < 0,001$ nach Dunnet-T). Abbildung 20 zeigt die graphische Darstellung der AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM.

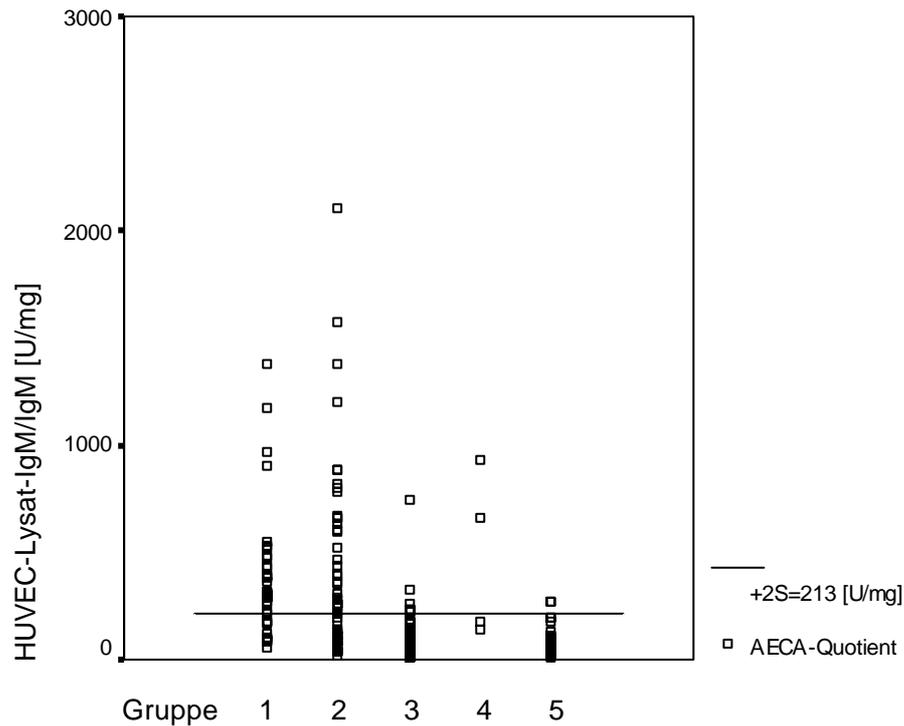


Abbildung 21: AECA-IgM-Quotienten des Lysat-ELISA. Die AECA-IgM-Quotienten von vier Patientenkollektiven (Gruppe 1-4) wurden ermittelt und denen der gesunden Blutspender (Gruppe 5) gegenübergestellt. Der 2S-Bereich für den Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM wurde anhand der Lognormalverteilung der gesunden Blutspender festgelegt. Gruppe 1=Patienten mit V.a. Vaskulitis (n=37), Gruppe 2=Patienten mit V.a. Lupus antikoagulans (n=54), Gruppe 3=Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung (n=108), Gruppe 4=Systemischer Lupus erythematoses (SLE) (n=4), Gruppe 5=gesunde Blutspender (n=56).

Der AECA-Quotient HUVEC-Lysat-IgM/IgM war bei Patienten mit V.a. Vaskulitis in 28 von 37 Fällen pathologisch (75,7%) ($p=1,281$ nach Dunnett-T3), bei Patienten mit V.a. Lupus antikoagulans in 32 von 54 Fällen (59,3%) ($p=0,979$ nach Dunnett-T3), in 8 von 108 Fällen bei Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung (7,4%) ($p=0,785$ nach Dunnett-T3) und 2 von 4 Fällen bei Patienten mit einem SLE (50%) ($p=0,766$ nach Dunnett-T3). Abbildung 21 zeigt die graphische Darstellung der AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM.

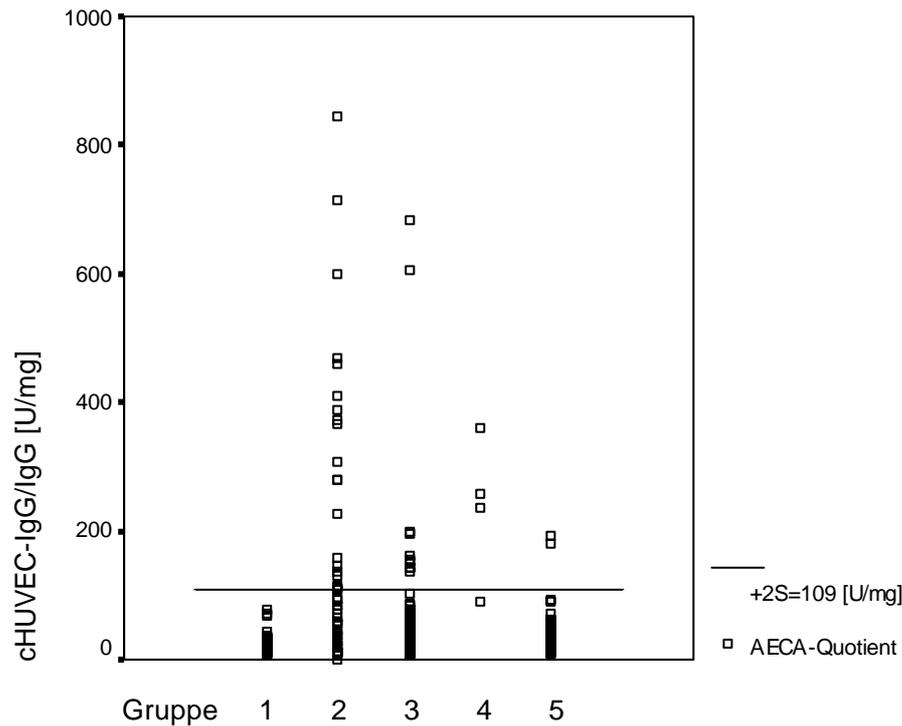


Abbildung 22: AECA-IgG-Quotienten des zellulären ELISA. Die AECA-IgG-Quotienten von vier Patientenkollektiven (Gruppe 1-4) wurden ermittelt und denen der gesunden Blutspender (Gruppe 5) gegenübergestellt. Der 2S-Bereich für den Quotienten cHUVEC-IgG/IgG wurde anhand der Lognormalverteilung der gesunden Blutspender festgelegt. Gruppe 1=Patienten mit V.a. Vaskulitis (n=33), Gruppe 2=Patienten mit V.a. Lupus antikoagulans (n=52), Gruppe 3=Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung (n=108), Gruppe 4=Systemischer Lupus erythematosus (SLE) (n=4), Gruppe 5=gesunde Blutspender (n=56).

Der AECA-Quotient cHUVEC-IgG/IgG war bei Patienten mit V.a. Vaskulitis in 0 von 33 Fällen pathologisch (0%) ($p=0,025$ nach Dunnet-T), bei Patienten mit V.a. Lupus antikoagulans in 21 von 52 Fällen (40,4%) ($p<0,001$ nach Dunnet-T), in 10 von 108 Fällen bei Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung (9,3%) ($p=0,335$ nach Dunnet-T) und 3 von 4 Fällen bei Patienten mit einem SLE (75%) ($p=0,123$ nach Dunnet-T). Abbildung 22 zeigt die graphische Darstellung der AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG.

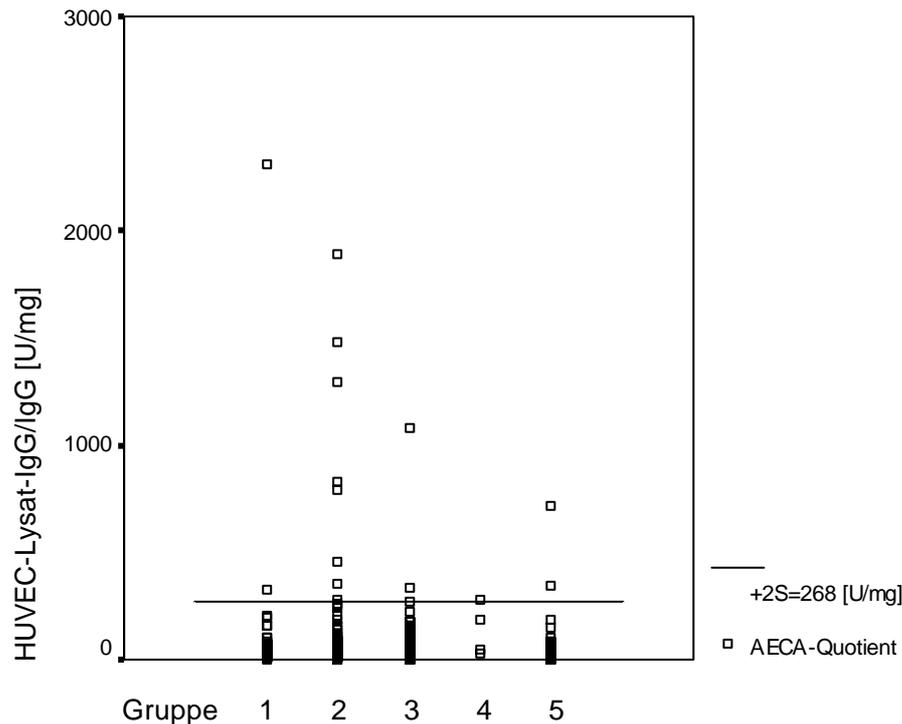


Abbildung 23: AECA-IgG-Quotienten des Lysat-ELISA. Die AECA-IgG-Quotienten von vier Patientenkollektiven (Gruppe 1-4) wurden ermittelt und denen der gesunden Blutspender (Gruppe 5) gegenübergestellt. Der 2S-Bereich für den Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG wurde anhand der Lognormalverteilung der gesunden Blutspender festgelegt. Gruppe 1=Patienten mit V.a. Vaskulitis (n=33), Gruppe 2=Patienten mit V.a. Lupus antikoagulans (n=53), Gruppe 3=Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung (n=107), Gruppe 4=Systemischer Lupus erythematoses (SLE) (n=4), Gruppe 5=gesunde Blutspender (n=56).

Pathologische AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG wurden in 2 von 33 Proben mit V.a. Vaskulitis gefunden (6,1%) ($p=0,333$ nach Dunnett-T3), in 8 von 53 Proben mit V.a. Lupus antikoagulans (15,1%) ($p<0,001$ nach Dunnett-T3) und in 3 von 107 Proben von Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung (2,8%) ($p=0,158$ nach Dunnett-T3) und 1 von 4 Fällen von Patienten mit einem SLE (25%) ($p<0,029$ nach Dunnett-T3). Abbildung 23 zeigt die graphische Darstellung der AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG.

4.3.2 Korrelation zwischen Antikörper-Bindung an fixierte HUVE-Zellen und HUVE-Zell-Lysat

Um einen möglichen Einsatz der entwickelten Nachweisverfahren für AECAs in der Routinediagnostik zu vereinfachen, wäre die Übereinstimmung von zellulärem und Lysat-ELISA von Bedeutung. Größere Mengen an HUVE-Zell-Lysat herzustellen, zu poolen und bei -20°C zu lagern, würde im Vergleich zur Prozedur der Herstellung einer mit Zellen beschichteten ELISA-Platte eine sofortige Verfügbarkeit und überdies eine höhere Homogenität gewährleisten.

Anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten zeigten sich höchst signifikante Korrelationen der beiden Testverfahren untereinander in beiden Klassen IgM ($r=0,626$, $p<0,001$, $n=259$) und IgG ($r=0,529$, $p<0,001$, $n=258$). Ein Austausch des zellulären ELISA durch den Lysat-ELISA ist anhand des nachgewiesenen Zusammenhangs durchaus vertretbar, wie die folgenden Streudiagramme veranschaulichen sollen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25).

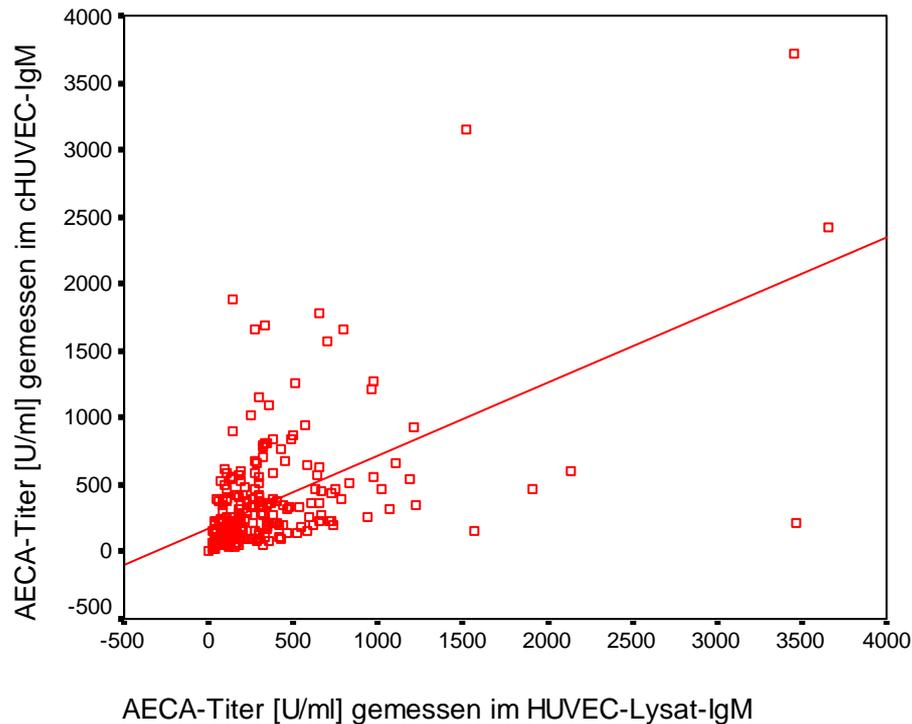


Abbildung 24: Korrelation zwischen Antikörper-Bindung der Klasse IgM an fixierte HUVE-Zellen und an HUVE-Zell-Lysat. Die AECA-IgM-Titer von 259 Proben wurden im zellulären HUVEC-ELISA und im HUVEC-Lysat-ELISA bestimmt. Nach Spearman zeigte sich eine höchst signifikante Korrelation der beiden Testverfahren miteinander ($r=0,626$, $p<0,001$).

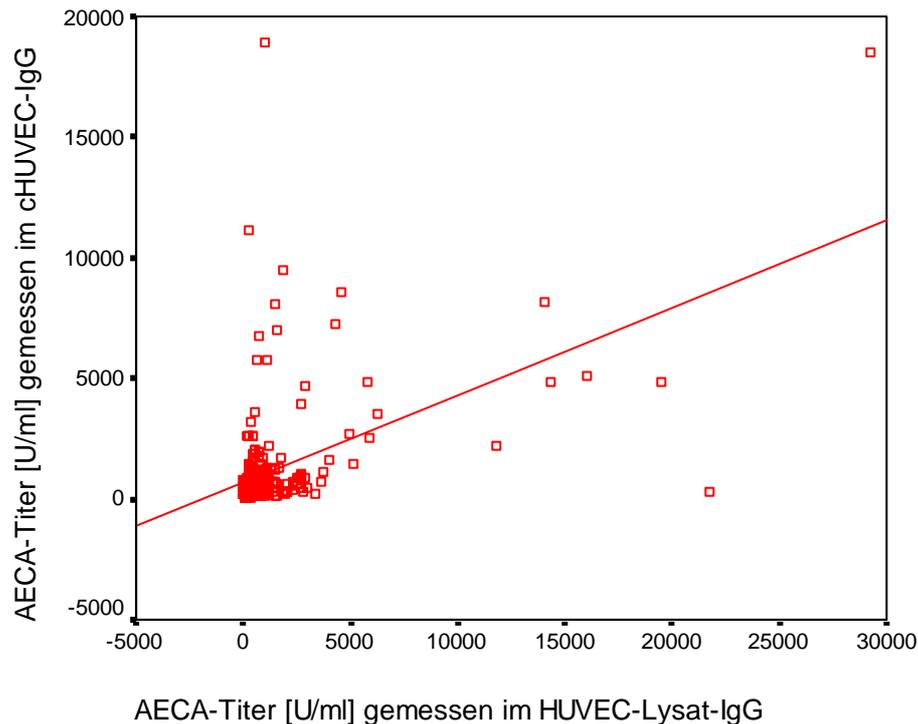


Abbildung 25: Korrelation zwischen Antikörper-Bindung der Klasse IgG an fixierte HUVE-Zellen und an HUVE-Zell-Lysat. Die AECA-IgG-Titer von 258 Proben wurden im zellulären HUVEC-ELISA und im HUVEC-Lysat-ELISA bestimmt. Nach Spearman zeigte sich eine höchst signifikante Korrelation der beiden Testverfahren miteinander ($r=0,529$, $p<0,001$).

4.3.3 Vergleich mit weiteren immunologischen Nachweisverfahren und funktionellen Gerinnungstests

4.3.3.1 Korrelation zwischen AECAs und ANCAs

Von Plasmaproben mit Verdacht auf Vaskulitis und rheumatischer Grunderkrankung lagen zusätzlich Bestimmungen von Antikörpern gegen humane neutrophile Granulozyten (ANCA) vor (siehe Tabelle 26). Anhand des „exakten Tests“ nach R. A. Fisher sollte die Nullhypothese H_0 : AECA=ANCA überprüft werden. Dabei zeigten sich keine signifikanten Übereinstimmungen.

4.3.3.2 Antiphospholipid-Antikörper

In der Gruppe der Patienten mit Verdacht auf Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden Übereinstimmungen der AECA-Quotienten mit dem Vorhandensein von Antiphospholipid-Antikörpern (APLA) überprüft. Signifikante Korrelationen nach Spearman zeigten sich nur zwischen dem Quotienten cHUVEC-IgG/IgG und APLA der Klasse IgG (siehe Abbildung 26). Die Tabellen 21 und 25 zeigen die Ergebnisse in der Übersicht.

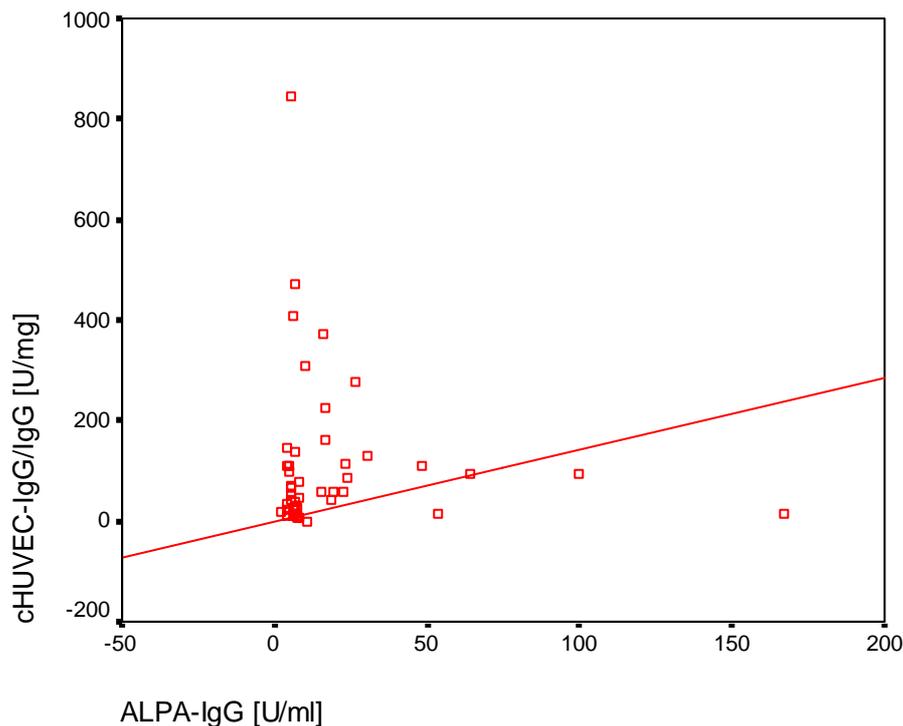


Abbildung 26: Korrelation zwischen AECA-Quotienten und Antiphospholipid-Antikörpern in der Klasse IgG. Bei 60 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG mit dem Vorliegen von Antiphospholipid-Antikörpern (APLA-IgG) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman eine signifikante Korrelation innerhalb der Klasse IgG ($r=0,261$, $p=0,044$).

Weitere Abbildungen zu diesem Thema befinden sich im Anhang (Abbildung 37, Abbildung 38 und Abbildung 39).

Tabelle 21: Korrelation nach Spearman zwischen AECA-Quotienten und Antiphospholipid-Antikörpern (APLA).

		APLA-IgG
HUVEC-Lysat-IgG/IgG	Korrelationskoeffizient	0,092
	Sig.	0,480
	N	61
cHUVEC-IgG/IgG	Korrelationskoeffizient	0,261
	Sig.	0,044
	N	60
		APLA-IgM
HUVEC-Lysat-IgM/IgM	Korrelationskoeffizient	-0,239
	Sig.	0,055
	N	65
cHUVEC-IgM/IgM	Korrelationskoeffizient	-0,113
	Sig.	0,369
	N	65

4.3.3.3 Anticardiolipin-Antikörper

Auch Gleichartigkeiten der AECA-Quotienten mit Anticardiolipin-Antikörpern (ACA) bei Patienten mit Verdacht auf Vorliegen eines Lupus antikoagulans sollten überprüft werden. Eine höchst signifikante Korrelation nach Spearman zeigte sich nur zwischen dem Quotienten cHUVEC-IgG/IgG und ACA der Klasse IgG (siehe Abbildung 27). Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse in der Übersicht.

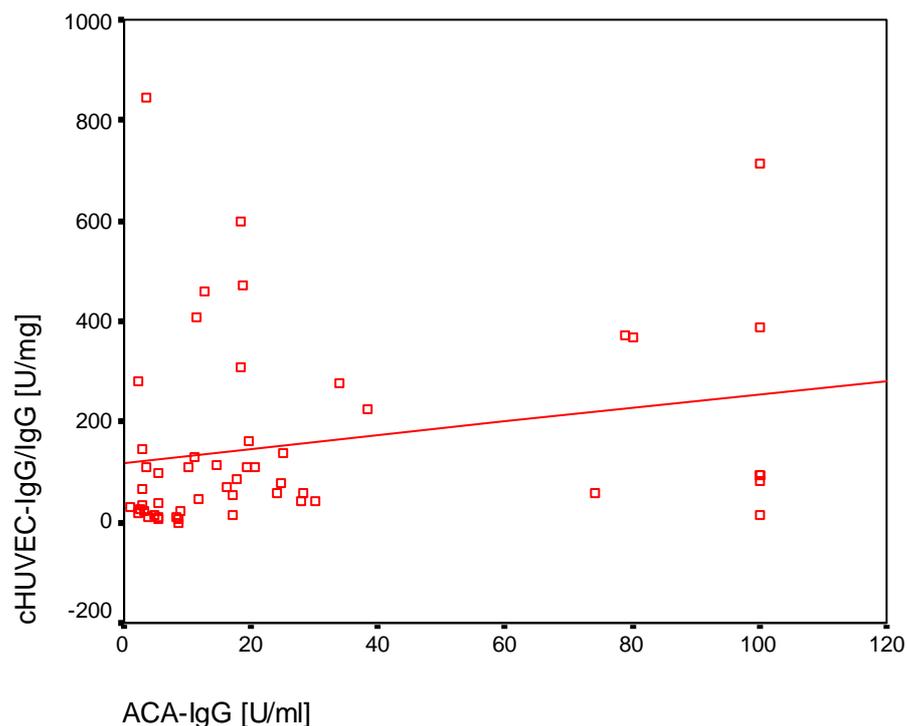


Abbildung 27: Korrelation zwischen dem AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG und Anticardiolipinantikörpern der Klasse IgG. Bei 72 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG mit dem Vorliegen von Anticardiolipin-Antikörpern (ACA-IgG) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman eine höchst signifikante Korrelation innerhalb der Klasse IgG ($r=0,423$, $p<0,001$).

Weitere Abbildungen zu diesem Thema befinden sich im Anhang (Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 41).

Tabelle 22: Korrelation nach Spearman zwischen AECA-Quotienten und IgG und Anticardiolipinantikörpern der Klasse IgG (ACA-IgG).

		ACA-IgG
HUVEC-Lysat-IgG/IgG	Korrelationskoeffizient	0,218
	Sig.	0,063
	N	73
cHUVEC-IgG/IgG	Korrelationskoeffizient	0,423
	Sig.	<0,001
	N	72
		ACA-IgM
HUVEC-Lysat-IgM/IgM	Korrelationskoeffizient	-0,192
	Sig.	0,094
	N	77
cHUVEC-IgM/IgM	Korrelationskoeffizient	0,006
	Sig.	0,960
	N	77

4.3.3.4 KCT-Index und RVV-Test

Die AECA-Quotienten von 76 Patientenproben wurden nun mit den in Tabelle 23 aufgelisteten Ergebnissen der beiden funktionellen Gerinnungstests KCT-Index und RVV-Test verglichen. Dies geschah zunächst unabhängig davon, ob sie in irgendeinem der Testverfahren positiv waren. Anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten (r) zeigte sich eine hoch signifikante Korrelation zwischen KCT-Index und cHUVEC-IgG/IgG ($r=0,404$; $n=71$; $p<0,001$) und eine signifikante Korrelation zwischen KCT-Index und HUVEC-Lysat-IgM/IgM ($r=-0,273$; $n=76$; $p<0,017$). Weitere signifikante Übereinstimmungen ließen sich nicht ermitteln.

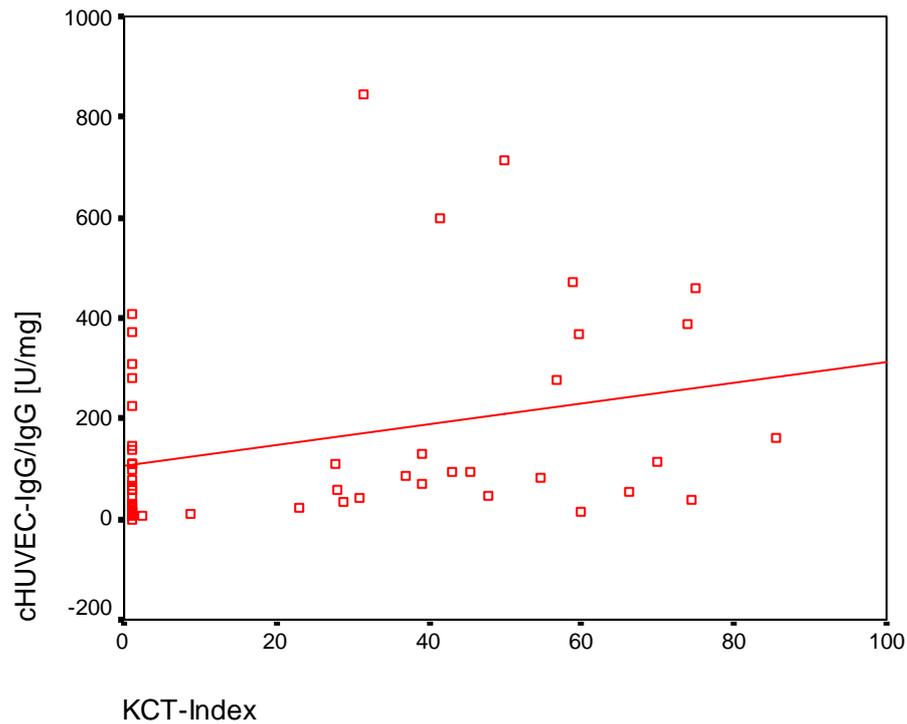


Abbildung 28: Korrelation zwischen KCT-Index und dem AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG ($r=0,404$). Bei 71 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG mit der Verlängerung der Kaolin-Klotting-Time (KCT-Index) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman eine höchst signifikante Korrelation innerhalb der Klasse IgG ($r=0,404$, $p<0,001$).

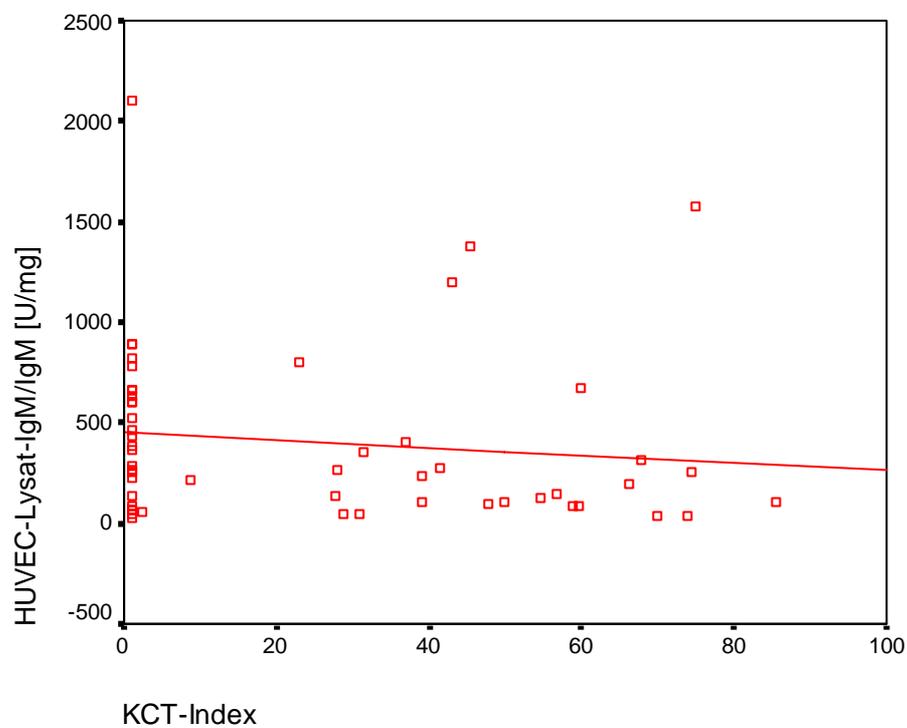


Abbildung 29: Korrelation zwischen KCT-Index und dem AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM. Bei 76 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM mit der Verlängerung der Kaolin-Klotting-Time (KCT-Index) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman eine signifikante Korrelation innerhalb der Klasse IgM ($r=-0,273$, $p=0,017$).

Weitere Abbildungen zu diesem Thema befinden sich im Anhang (Abbildung 42, Abbildung 43, Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46 und Abbildung 47).

Tabelle 23: Korrelationen nach Spearman zwischen den AECA-Quotienten und KCT-Index bzw. RVV-Test (n=76).

		KCT-Index	RVV-Test
HUVEC-Lysat-IgG/IgG	Korrelationskoeffizient	0,195	-0,113
	Sig.	0,100	0,385
	N	72	61
cHUVEC-IgG/IgG	Korrelationskoeffizient	0,404	0,117
	Sig.	<0,001	0,374
	N	71	60
HUVEC-Lysat-IgM/IgM	Korrelationskoeffizient	-0,273	-0,203
	Sig.	0,017	0,106
	N	76	65
cHUVEC-IgM/IgM	Korrelationskoeffizient	-0,093	-0,077
	Sig.	0,426	0,543
	N	75	65

Nach Reduktion der Ausgangsdaten auf zwei Gruppen, (1.) negatives Ergebnis in KCT-Index und RVV-Test und (2.) pathologisches Resultat in mindestens einer der beiden Untersuchungen, konnten mit dem exakten Test nach R. A. Fisher keine signifikanten Korrelationen zu den Quotienten mehr nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Testentwicklung

Verschiedene Nachweisverfahren wurden bisher zur Detektion von antiendothelialen Antikörpern (AECA) beschrieben: Radioimmunoassay (RIA)¹⁰⁸, Fluorescence-activated cell sorting (FACS), Immunoblots¹⁰⁹ und Immunpräzipitation¹¹⁰ sowie funktionelle Nachweisverfahren wie Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC)^{111, 112, 113, 114} und Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC)^{79, 115, 116, 117, 118}. Eine weitere sehr gebräuchliche Methode ist der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), der von Experten zum Nachweis von AECA empfohlen wird¹¹⁹. Speziell werden ELISAs auf fixierten HUVE-Zellen bevorzugt¹²⁰.

Insbesondere für AECA der Klassen IgG und IgM sind signifikante Korrelationen zur Krankheitsaktivität beschrieben^{79, 121}. Wegen der klinischen Relevanz sollte ein Testverfahren etabliert werden, das genau diese Antikörperklassen nachweist.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden indirekten ELISAs zum Nachweis von AECA der Klassen IgG und IgM aus humanem Zitratplasma basieren zum einen auf fixierten, zum anderen auf sonifizierten HUVE-Zellen.

Mögliche Substrate sind zudem renale Zellen¹²², mikrovaskuläre Endothelzellen des Fettgewebes¹²³, humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)^{124, 125} oder immortalisierte endothelial-epitheliale Hybride (EAhy926)^{77, 126}. Jede Zellart hat ihre Vor- und Nachteile: HDMEC sind schwierig in Reinkultur zu isolieren, anspruchsvoll in ihren Wachstumsbedingungen und haben nur eine kurze Lebenszeit¹²⁷. Während die relativ leicht in Kultur zu haltenden HUVE-Zellen immer wieder neu aus Nabelschnüren isoliert werden müssen, ist die EAhy926-Zelllinie eine kontinuierliche Quelle. Der Nachteil dieser Zelllinie ist es allerdings, dass ursprüngliche Zellantigene während der Immortalisierung und chromosomalen Segregation verloren gehen können¹²⁸. Auf diese Weise kann es zu falsch negativen Testergebnissen kommen. Falsch positive Ergebnisse können aus Antikörperreaktionen mit epithelialen Antigenen resultieren, lassen sich jedoch mit Präinkubation der Proben mit epithelialen Membranen reduzieren¹²⁹. Dieser zusätzliche und vermeidbare Arbeitsschritt sollte jedoch zur Etablierung eines für die Routine geeigneten ELISAs nach Möglichkeit vermieden werden. Mikrovaskuläre Endothelzellen hingegen exprimieren auf ihrer Oberfläche Antigene, die auf der HUVE-Zelloberfläche nicht nachzuweisen sind^{130, 131, 132}. Andererseits konnten George et al. signifikant höhere AECA-Titer bei Dialysepatienten mit Shunt-Thrombosen im Vergleich zu Dialysepatienten ohne diese Komplikation nur auf HUVE-Zellen, nicht jedoch auf mikrovaskulären oder EAhy929-Zellen nachweisen¹³³.

Während verschiedene Forschungsgruppen mit HUVE-Zellen aus der dritten oder höheren Passagen arbeiten, um mit einer Isolation größere und homogene Zellmengen zu kultivieren, wurden hier zugunsten der ursprünglichen Zelleigenschaften ausschließlich gesunde, unstimulierte Zellen der ersten Passage verwendet¹³⁴.

Um die Anheftung der HUVE-Zellen an Kulturschalen zu gewährleisten, wird häufig das Immunglobulinhaltige Fibronectin verwendet. Gelegentlich wird es auch in zellulären ELISAs zum Nachweis von AECA verwendet. Kreuzreaktionen der jeweiligen Detektionsantikörper in dieser Kombination sind zu erwarten, Nakagawa et al. berichten jedoch nicht über Probleme in dieser Hinsicht. Die Arbeitsgruppe verwendete Fibronectin in Kombination mit 1%iger Gelatine, die noch über die Fibronectin-beschichteten Vertiefungen aufgetragen wurde. Der Sinn dieser doppelten Beschichtung ist unklar, scheint jedoch die Ursache der fehlenden Kreuzreaktion mit den Detektionsantikörpern zu sein. Eine alleinige Verwendung von Fibronectin als Adhäsionsgrundlage im zellulären ELISA führte in Vorversuchen zum hier etablierten zellulären ELISA zu erhöhten Hintergrundextinktionen, so daß daraufhin ausschließlich mit Gelatinebeschichtung gearbeitet wurde.

Die hier etablierten ELISAs wurden im Vergleich zu anderen Publikationen mit einer relativ gering-zelligen Aussaat (7.500 HUVE-Zellen/Vertiefung) bestückt^{135, 136, 137, 138}. Hierunter ließ sich, wie in Abschnitt 4.1.2.3 gezeigt, die optimale Steigung der Kalibriergeraden nach drei Tagen Kultur erreichen. Auch die Kulturzeiten variieren in den Angaben zwischen 24 h und 96 h, wobei sich keine Abhängigkeit der Dauer der Kulturzeiten zur ausgesäten Zellzahl herauskristallisierte¹³⁹. Möglicherweise basieren diese Differenzen auf Unterschieden in den Medien und ihren Zusätzen.

Neben fixierten zellulären ELISAs existieren auch ELISA-Protokolle auf der Basis unfixierter Zellen¹⁴⁰. Der Vergleich beider Methoden fällt unterschiedlich aus^{139, 140}. Wangel et al. fanden einen Korrelationsquotienten von $r=0,87$, Heurkens et al. $r=0,69$. Westphal et al. konnten dagegen AECA nur auf fixierten Endothelzellen detektieren. Die höhere Reaktivität von Seren mit fixierten Zellen erklärt sich möglicherweise durch Antikörperadsorption an intrazelluläre Komponenten, die durch den Vorgang des Fixierens zugänglich gemacht werden. Das würde erklären, warum Triolo et al. bei Adsorption von anti-DNA- und AECA-positiven Proben an ssDNA eine nachfolgende Minderung der IgG-Bindung sowohl an fixierte HUVE-Zellen als auch an ssDNA feststellen konnten¹⁴¹.

Eine Antigenveränderung durch Fixierung scheint prinzipiell möglich¹⁴². Adler et al. schlussfolgerten jedoch aus den Ergebnissen von Heurkens, dass keine Beeinträchtigung der

Antigenität stattgefunden habe. Im Allgemeinen wird zur Quantifizierung von AECA fixierten Assays der Vorzug gegeben. Dieser Modus wurde auch hier gewählt.

Angaben zur Probenverdünnung in fixierten HUVE-Zell-ELISAs variieren von 1:10, 1:25, 1:80, 1:100 und 1:1.000¹⁴³. Diese Differenzen sind durch verschiedene Antigenkonzentrationen, Fixierungstechniken und Detektionsantikörper erklärbar. Der routinemäßige Einsatz von Verdünnungsreihen, wie sie aufgrund des unterschiedlichen AECA-Gehaltes der Proben in der vorliegenden Arbeit notwendig waren, wird selten beschrieben, allerdings räumen Rosenbaum et al. ein, dass sie hoch pathologische Proben im nachhinein 1:20.000 verdünnen mussten^{80, 144, 145}.

Antikörper-Aggregationen, die im HUVE-Zell-ELISA zum Nachweis von AECA-IgM auftraten, ließen sich durch Zusatz von 10% Maltose zum Verdünnungspuffer unterbinden. Vermutlich trugen Rosenbaum et al. die Proben aus demselben Grund mit 5 mM EDTA auf.

Revelen et al. deckten einen weiteren Störfaktor auf, der insbesondere bei zellulären ELISAs vorkommt: Heterophile Antikörper gegen tierische Proteine führen zu falsch positiven AECA-Titern, wenn fetales Kälberserum (FCS) während der Zellkultur auf der ELISA-Platte unbeabsichtigt an die Festphase gekoppelt wird¹⁴⁶. Desweiteren seien Probenleerwertsubtraktionen nicht sinnvoll, da die Gefahr bestünde, koexistierende spezifische AECA unter den Heteroantikörpern zu unterschlagen. Diese Maßnahme wurde bei den AECA-ELISAs dieser Arbeit berücksichtigt. Weiterhin sollten Proben laut Revelen et al. mit 10% FCS aufgetragen werden, um eine künstliche Minderung der Absorptionen zu vermeiden. Hier wurde stattdessen Milchpulver, ebenfalls ein tierisches Protein, zu den Puffern hinzugesetzt.

Angaben zur Expression von Blutgruppen-Antigenen auf HUVE-Zellen sind widersprüchlich^{147, 148}. Um falsch positive AECA-Ergebnisse aufgrund von ABO-Inkompatibilitäten zu verhindern, wurden hier ausschließlich Nabelschnüre der Blutgruppe 0 zur Isolation von HUVE-Zellen verwendet. Diese wurden auch zur Erstellung des Lysats benutzt.

Es ist bekannt, dass Endothelzellen auch Fc-Rezeptoren exprimieren¹⁴⁹. Durch Bindung an das Endothel über das Fc-Fragment würden ebenfalls falsch positive Ergebnisse erzielt werden. Die spezifische AECA-Bindung an das Endothel über das F(ab)₂-Fragment konnte jedoch durch Detektion mit einem Peroxidase-markierten Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des IgG gerichtet ist, belegt werden. Gleiches gilt für den AECA-IgG-ELISA auf Lysatbasis.

Es existieren verschiedene Ansätze zur Auswertung der AECA-ELISAs. Quadros et al. wählten die Absorption als qualitatives Merkmal, mussten deswegen auch einheitliche Probenverdünnungen einsetzen. Mittelwerte der Absorption in verschiedenen Krankheitsgruppen

und in einem Normalkollektiv wurden untereinander verglichen. Der Nachteil dieser Methode ist, dass besonders reaktive Proben bei gegebener Verdünnung oberhalb der maximal auswertbaren Absorption von 1,2 nicht ausreichend quantifizierbar sind bzw. ausgeschlossen werden müssen^{150, 151}.

Auch Nylander-Lundqvist et al. werteten die Proben über die Absorption aus. Als pathologisch galten Absorptionen oberhalb der 95. Perzentile einer Referenzgruppe. Diese Methode erlaubt jedoch nur eine qualitative Unterteilung in positive und negative Proben. Nylander-Lundqvist et al. begründen ihre Wahl mit der Heterogenität der AECAs und der daraus folgenden unterschiedlichen dosisabhängigen Steigung der unterschiedlichen Antigen/Antikörper-Paare. So könne eine bestimmte im ELISA gemessene Absorption nicht den absoluten AECA-Gehalt einer Probe wiedergeben. Tatsächlich zeigen die Titrationskurven individueller Proben unterschiedliche Steigungen.

Bei Rosenbaum et al. trat das Problem auf, dass Proben mit sehr hoher Affinität zu Endothelzellen in niedrigen Verdünnungen nicht erfasst werden konnten. Mehrere Proben von Patienten mit SLE mußten 1:20.000 verdünnt werden. Wahrscheinlich wurde deswegen alternativ zu alleinigen Absorptionswerten die Probenauswertung über einen Bindungsindex ($BI=100*(S-A)/(B-A)$; S=Absorption der Probe; A=Absorption einer Standardnegativkontrolle; B=Absorption einer Standardpositivkontrolle) vorgenommen. Der Abzug der Absorption von Normalproben ist jedoch, wie bereits zuvor verdeutlicht, ungünstig.

Hashemi et al. machten einen der ersten Versuche, die Auswertung über willkürlich festgelegte Einheiten eines positiven Standardserums vorzunehmen. Diese Vorgehensweise erschien nach den vorherig angestellten Betrachtungen überlegen und wurde auch in der hier vorgelegten Arbeit zur Auswertung angewandt.

Die Auswertung der Validität der zellulären HUVE-Zell-ELISAs zeigte relativ hohe Interassayvarianzen, die vermutlich in qualitativen und quantitativen Zellunterschieden aufgrund der Spendervariabilität begründet liegen. In dem Bemühen, die Qualität zu vereinheitlichen, wurden immer mehrere einzelne Isolationen vor der Passage auf die ELISA-Platte gepoolt. Eine exakt identische Zellzahl pro Vertiefung und Platte lässt sich aber trotz der unternommenen Standardisierungsmaßnahmen nicht garantieren. So ist es nicht verwunderlich, dass auch andere Arbeitsgruppen über ähnlich hohe Interassayvarianzen berichten¹⁵². Ebenso können Temperaturschwankungen eine weitere Ursache für Interassayvarianzen sein, da die AECA-Bindung für IgG und IgM temperaturabhängig ist.

Westphal et al. verbesserten die Intra- und Interassayvarianz, indem sie Proben anhand der Fläche unter der Extinktionskurve (AUC) eines Referenzserums auswerteten. Assay-

varianzen von 10%, wie sie beispielsweise Frampton et al. erzielten, beruhen möglicherweise auf der höheren Zellaussaat und damit erreichten einheitlicheren Monolayern¹⁵³. Bei nur geringen Einbußen des Bestimmtheitsmaß der Kalibriergeraden könnten nach den vorliegenden Ergebnissen zukünftig 15.000 Zellen/Vertiefung ausgesät werden, um eventuell eine Verbesserung der Interassayvarianz zu erzielen. Eine weitere Ursache für eine hohe Varianz ist die Labilität der Proben durch häufiges Auftauen¹⁵⁴. Aus diesem Grund wurden die hier verwendeten Proben maximal dreimal aufgetaut.

Endothelzellmembranen (ECM) werden vergleichsweise selten in der ELISA-Technik verwendet, obwohl sie im Gegensatz zur zellulären Beschichtung kurzfristigere Verfügbarkeit und durch Pooling eine homogenere Testgrundlage bieten.

Die verschiedenen Präparation von ECM gleichen sich in großen Teilen⁸³. Kurzgefaßt werden folgende Arbeitsschritte einheitlich vorgenommen: Gefrierung und Auftauen der Zellen, mechanische Zerstörung der Zellen nach Aufnahme in Inhibitionsmedium, Zentrifugation und Separation zytosolischer Bestandteile. Trotzdem bestehen große Unterschiede in Medien, Zusätzen, Zentrifugationsvorgängen, Zeit- und Temperaturangaben.

Falsch positive AECA-Detektion durch Antikörper-Bindung an Doppel(ds)- und Einzelstrang(ss)-DNA wurde experimentell ausgeschlossen (siehe Abschnitt 4.1.1.3). Dies war insbesondere wichtig, um falsch positive Ergebnisse aufgrund von Autoantikörper gegen dsDNA bei den Patientenproben mit systemischem Lupus erythematodes auszuschließen. Diese sind bei 60-80% der SLE-Patienten nachweisbar¹⁵⁵.

Rollino et al. setzten Plasmaverdünnungen in einem HUVEC-Lysat-ELISA von 1:5 für Normal- und pathologische Plasmen ein. Mehrere Verdünnungsstufen, wie in der vorliegenden Arbeit, wurden jedoch nicht verwendet. Diese Angaben sind jedoch aufgrund der mangelnden Angaben zur Beschichtungskonzentration nicht uneingeschränkt mit den in dieser Arbeit verwendeten Plasmaverdünnungen vergleichbar.

Die Auswertung über die Titration eines Kalibrierplasmas im Zusammenhang mit der optischen Dichte erschien auch hier, wie bereits bei den zellulären ELISAs begründet, angebracht. Eine einheitliche Auswertung aller AECA-ELISAs gewährt zudem eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Während die Intraassayvarianzen in für den Nachweis von AECA der Klassen IgG (3,6%) und IgM (2,2%) in den hier vorgestellten HUVE-Zell-Lysat-ELISAs nicht zu bemängeln sind, scheinen die Interassayvarianzen besonders im Bereich niedriger AECA-Titer verbesserungswürdig. Dies liegt zum einen an der S-förmigen Steigung der Konzentrationen im unteren Titerbereich. Zum anderen wurden offenbar trotz Pooling der Lysate und Auswahl der

Nabelschnüre unter Berücksichtigung der Blutgruppenzugehörigkeit natürliche Unterschiede in der Antigenität der HUVE-Zellen verschiedener Isolationen nicht ausreichend beglichen. Letzteres wird gerade im Hinblick auf die im Vergleich äußerst niedrigen Intraassayvarianzen wahrscheinlich. Weitere mögliche Gründe wurden bereits bei den zellulären ELISAs diskutiert. Angaben zur Assayvarianz werden weder von van der Zee et al. noch von Rollino et al. gemacht. Heurkens et al. ermittelten Interassayvarianzen von 66% in vergleichbaren Titerbereichen.

Literaturangaben zum Vergleich von ELISAs mit zellulärer und Lysat-Beschichtung zum Nachweis von AECA sind äußerst selten. Van der Zee et al. berichten über einen Korrelationskoeffizienten von $r=0.78$ ($p<0,001$) zwischen zellulärem und HUVE-Zell-Lysat-ELISA zum Nachweis von AECA-IgG basierend auf 10 Serumwerten von Patienten mit SLE. In dieser Arbeit wurde bei etwas niedriger gelegenen Korrelationskoeffizienten ($r=0,529$ für IgG; $r=0,626$ für IgM) ebenfalls ein starker Zusammenhang der gemessenen AECA-Titer in beiden Testverfahren ermittelt. Diese Korrelationen sind höchst signifikant (jeweils $p<0,001$) und aufgrund des größeren Stichprobenumfangs ($n=258$ bzw. $n=259$) unter Einschluß normaler und pathologischer Proben aussagekräftiger als die von van der Zee et al. publizierte Korrelation. Es kann geschlussfolgert werden, dass bei Optimierung der Interassayvarianz zukünftige AECA-Detektionen aus Gründen der Praktikabilität auf Lysat-Basis durchgeführt werden könnten. ELISAs auf Lysat-Basis sind zudem durch die Möglichkeit der Beschichtung mit exakten Antigenkonzentrationen und durch fehlende Adsorption von Medienzusätzen an die feste Phase weniger anfällig für Interferenzen, wie sie bei den zellulären Nachweisverfahren diskutiert wurden.

Die Entwicklung eines ELISA zum quantitativen Nachweis von humanem Immnglobulin M aus Zitratplasma wurde zunächst mit einer Kombination aus einem murinen anti-human IgM-Antikörper mit einem Peroxidase-konjugierten anti-human IgM-Antikörper von der Ziege begonnen. Kreuzreaktionen der eingesetzten Antikörper führten jedoch zu mangelnder Differenz der Absorptionen von Leerwert und Plasmaprobe. Der Ersatz des Detektionsantikörper durch einen Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-human IgM-Antikörper minimierte die Kreuzreaktionen. Der Zusatz von 5% Maltose zum Verdünnungspuffer reduzierte Antikörperagglutinationen bestmöglich im Bereich zwischen 0,03 und 3 μg IgM/ml. Um die Kalibriergerade zu linearisieren, wurden die gereinigten IgM-Konzentrationen logarithmisch auf der Abszisse aufgetragen.

Die Interassayvarianz lag zwischen 5,9% und 13,2%. Die Intraassayvarianz lag bei 7,7% bei einer mittleren Konzentration von 7,931 mg IgM/ml.

Die Etablierung eines IgG-ELISAs gelang nicht zufriedenstellend. Aufgrund inakzeptabler Assayvarianzen bei Verwendung unterschiedlicher Antikörperkombinationen und Puffervariationen wurde auf die in Routinelabors übliche nephelometrische Messung der IgG-Plasmakonzentration übergegangen.

5.2 Erstellung von Normwerten für AECA

Mit den erarbeiteten ELISAs wurden 56 Proben von gesunden Blutspendern und -spenderinnen untersucht.

Es läßt sich festhalten, dass die Bindung von Immunglobulinen an das Endothel bei allen Proben des Normalkollektiv nachweisbar war. Das bedeutet, dass AECA als natürliches Antikörperrepertoire in der gesunden Bevölkerung vorkommen. Das Vorkommen von AECAs ist demnach nicht pathognomonisch für vaskuläre Erkrankungen, auch wenn im Verlauf AECA-Alterationen zu beobachten sind. Die Arbeitsgruppe um Ronda konnte zeigen, daß die natürliche AECA-Expression durch Serumfaktoren, darunter idiotypisches IgM, reguliert wird^{156, 157}. Natürliche AECA binden nur wenige konservierte Autoantigene, die sich bei verschiedenen Individuen kaum unterscheiden. AECA aus Proben von Patienten mit SLE zeichnen sich dagegen sowohl durch höhere Titer als auch durch ein größeres Spektrum an Antigen-spezifität aus. Erstaunlicherweise fanden Orevic et al. Hinweise auf die anti-thrombotische und anti-inflammatorische Funktion natürlicher AECAs¹⁵⁸. Mendonka et al. bestätigen diese Ergebnisse, indem sie nachwiesen, dass im Vergleich zu normalen Schwangerschaften bei Lupus-Patientinnen niedrigere AECA-IgM-Titer auftraten und dass diese mit dem mütterlichen vaskulären Syndrom der Präeklampsie assoziiert waren¹⁵⁹.

Im folgenden wurde der Einfluß verschiedener biologischer Parameter wie Alter, Geschlecht und Immunglobulinesamtkonzentration auf das Vorkommen von AECAs untersucht. In Übereinstimmung mit Cervera et al. deutete die statistische Auswertung der Ergebnisse nicht auf eine Einflußnahme der Geschlechtszugehörigkeit auf die AECA-Titer hin. Da bei vielen Autoimmunerkrankungen eine deutliche Bevorzugung des weiblichen Geschlechts besteht, war der Ausschluß dieser Beziehung von großer Wichtigkeit.

Auch das Alter hatte keinen wesentlichen Einfluß auf das Bindungsverhalten der AECA. Eine schwache Tendenz zur Abnahme von AECA-IgM im Alter gab keinen Anlaß zu Erhebung altersspezifischer Referenzwerte. Auch andere Arbeiten konnten keinen Unterschied bezüglich der AECA-Titer bei Patienten verschiedener Altersstufen feststellen^{160, 161}.

Angaben zur Abhängigkeit der AECA-Titer von der Immunglobulin-Gesamtkonzentration in der Literatur sind widersprüchlich. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten keine diesbezügliche Korrelation für IgG oder IgM nachweisen^{162, 163}. Andere berichten von schwachen, aber signifikanten statistischen oder experimentellen Zusammenhängen¹⁶⁴. Nur wenige integrieren die Immunglobulin-Gesamtkonzentration in ihre Auswertung.

In der hier vorliegenden Arbeit ließ sich statistisch eine schwache Korrelation nach Spearman zwischen der IgG-Konzentration und AECA-IgG nur dann in signifikantem Ausmaß nachweisen, wenn die Detektion der AECAs auf fixierten HUVE-Zellen stattfand. Experimentell konnte diese Wechselbeziehung durch Zugabe von gereinigtem IgG zu Normalplasma in beiden Testverfahren, HUVE-Zell-ELISA und Lysat-ELISA, durch einen mittleren Titeranstieg von 297% bzw. 593% bestätigt werden. Da AECA jedoch auch bei gesunden Blutspendern nachweisbar sind, ist es nachvollziehbar, dass AECA auch in dem zugesetzten gereinigten IgG enthalten waren und so zu dem Titeranstieg geführt haben.

Die Ergebnisse der IgM-Konzentrationen und AECA-IgM zeigten bereits bei der statistischen Auswertung in beiden angewandten Prüfverfahren nach Pearson und nach Spearman hoch und höchst signifikante Korrelationen zueinander bei Bindung an Lysat und fixierte HUVE-Zellen.

Basierend auf diesen Beobachtungen sollte die Auswertung der AECA-Titer die Immunglobulin-Gesamtkonzentration miteinbeziehen. Durch die Bildung von Quotienten aus beiden Werten wurde gewährleistet, dass hohe AECA-Titer nicht auf einen generellen Anstieg der Immunglobuline der entsprechenden Klasse beruhen.

Schwierigkeiten ergab die Überprüfung auf Normalverteilung der AECA-Quotienten der Blutspender. Es lag durchweg eine linkssteile Verteilung der AECA-Quotienten vor. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der AECA-IgG-Verteilung zeigten die Abbildungen von Ferraro et al. im Normalkollektiv. Auch Nylander-Lundqvist et al. ermittelten in einem Normalkollektiv von 249 eine linkssteile Verteilung der AECA-IgM. Sie bewerteten dies als Indikator einer biphasischen Verteilung der Absorptionswerte. Ein Erklärungsmodell hierfür wären verschiedene AECA-Subpopulationen. Bei anderen Arbeitsgruppen traten keine Abweichungen von der Gauß-Verteilung auf¹⁶⁵. Möglicherweise ist diese Divergenz durch einen zu gering gewählten Stichprobenumfang dort nicht zutage getreten.

Durch Überführung der AECA-Quotienten in eine Lognormalverteilung war es möglich, einen Referenzbereich innerhalb von zwei Standardabweichungen festzulegen.

Auch unter den gesunden Blutspendern gab es Individuen mit pathologisch erhöhten AECA-Quotienten. In jedem Test befanden sich 2 von 56 Normalproben (3,6%) mit patholo-

gischen erhöhten AECA-Quotienten. Es handelte sich dabei um sechs unterschiedliche Proben.

5.3 Bestimmung der AECA bei Patienten mit Verdacht auf Vaskulitis

Das Endothel spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Vaskulitiden. Verschiedene Stimuli werden als ursächlich für die vaskuläre Schädigung betrachtet: Antikörper gegen humane neutrophile Granulozyten (ANCA), Immunkomplexablagerungen, Komplementaktivierung, infektiöse Agentien und AECA¹⁶⁴. Von vielen Autoren wird der Nachweis von AECA mit primären und sekundären Vaskulitiden in Zusammenhang gebracht¹⁶⁵. Dabei korreliert ihr Titer häufig mit der Aktivität der Erkrankung oder geht sogar klinischen Manifestationen voraus¹⁶⁵. Eine Vielzahl an Arbeiten belegt, dass AECA kein Epiphänomen darstellen, sondern aktiv zu dem Entzündungsgeschehen beitragen^{166,167}.

Einzelne Vaskulitisformen zeigen unterschiedliche AECA-Prävalenzen. Die Prävalenz ist zudem abhängig von der gewählten Untersuchungsmethode¹⁶⁸. Neuere Forschungen lassen vermuten, dass verschiedene AECA-Populationen, abhängig von dem klinisch vorrangig betroffenen Gefäßbett, auch an unterschiedlich exprimierte endotheliale Antigene auf mikro- und makrovaskulären Endothelzellen binden.

Auch bei den hier präsentierten Ergebnissen zeigten die Mittelwerte der Gruppe der Patienten mit V. a. Vaskulitis signifikante Abweichungen von der Referenzgruppe in beiden zellulären Nachweisverfahren für AECA ($p=0.025$ für IgG und $p<0,001$ für IgM). Es lag jedoch kein zellulärer AECA-IgG-Quotient oberhalb des ermittelten 2S-Bereich der Referenzgruppe. Besonders die AECA-IgM-Quotienten waren prozentual häufiger positiv als die AECA-IgG-Quotienten (89,2% vs. 0% im cHUVeC-ELISA und 75,7% vs. 6,1% im HUVeC-Lysat-ELISA). Eine ähnliche Immunglobulinverteilung wird für des Kawasaki-Syndrom berichtet^{166,167}.

5.4 Bestimmung der AECA bei Patienten mit Verdacht auf Lupus antikoagulans

Die Gruppe der Patienten mit V.a. Lupus antikoagulans unterschied sich hinsichtlich der Testquotienten deutlich vom Normalkollektiv. Die zellulären AECA-Quotienten waren in 21 von 52 Fällen (40,4%) für IgG und in 37 von 54 Fällen (68,5%) für IgM positiv. Die Testung

derselben Plasmen auf Lysat ergab weniger häufig positive AECA-Quotienten. 32 von 54 Proben (59,3%) waren positiv für AECA-IgM und nur 8 von 53 (8,1%) Proben für AECA-IgG. Bis auf die Unterschiede der Quotienten HUVEC-Lysat IgM/IgM zum Normalkollektiv waren die Ergebnisse höchst signifikant ($p < 0,001$, Dunnet-T3 anhand der logarithmierten Ursprungsquotienten).

Inwieweit eine Kreuzreaktivität der AECA mit den Antikörpern gegen Phospholipide und Anticardiolipin besteht, die zur Diagnosesicherung des LA üblicherweise auch bestimmt werden, sollte anhand des Spearman-Korrelationskoeffizienten überprüft werden. Es zeigten sich jedoch nur Übereinstimmungen in der Klasse IgG. Der zelluläre AECA-Quotient korrelierte sowohl mit den Antiphospholipid-Antikörpern (APLA) ($r=0,261$, $p=0,044$, $n=60$) als auch mit den Anticardiolipin-Antikörpern (ACA) ($r=0,423$, $p < 0,001$, $n=72$). Eine partielle Überlapung von AECA und APLA bzw. ACA scheint damit wahrscheinlich. Damit bestätigen die vorliegenden Befunde ähnliche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die eine signifikante Korrelation der AECA zu Antiphospholipid- oder Anticardiolipin-Antikörpern feststellten^{168, 169}. Weitere andere Gruppen bestätigen dies nicht^{79, 170, 171}. Eine denkbare Erklärung für die Assoziation von APLA mit AECA liefern Bordron et al.: AECA haben die Fähigkeit, die Expression negativ geladener Phospholipide auf Endothelzellen dosisabhängig zu steigern¹⁷². Möglicherweise wird so die Bildung von APLA induziert.

Pathologische Testquotienten korrelierten teilweise mit den Ergebnissen der funktionellen Diagnostik des Lupus antikoagulans: der KCT-Index zeigte sowohl Übereinstimmung mit dem Quotienten cHUVEC-IgG/IgG ($r=0,404$; $n=71$; $p < 0,001$) als auch mit dem Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM ($r=-0,273$; $n=76$; $p < 0,017$). Mackworth-Young et al. konnten keine Korrelation der AECA zur LA-Aktivität feststellen.

Die hohe Prävalenz von AECA bei primärem Antiphospholipid-Syndrom läßt ein Mitwirken der AECA in der Pathophysiologie des thrombembolischen Geschehen des LA vermuten. Zumindest kann geschlossen werden, dass AECA sich nur partiell mit den Antiphospholipid-, Anticardiolipin- und Lupus antikoagulans-Antikörpern überlappen. Ein oder mehrere weitere endotheliale Antigene könnten als Zielantigen für die AECA dienen und zur Entwicklung des Krankheitsbildes beitragen.

5.5 Bestimmung der AECA bei Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung

In der Literatur werden unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit von AECA bei Rheumatoider Arthritis (RA) von 0% bis 87% gemacht^{78, 80, 173, 174}. Im Rahmen von RA-assoziiierter Vaskulitis werden AECA häufiger nachgewiesen als bei RA-Patienten ohne vaskulitische Komplikationen⁸⁰. Antikörpertiter spiegeln die klinische Aktivität der vaskulären Beteiligung wider.

Die hier untersuchten Proben stammten aus dem Routinelabor der Abteilung für Rheumatologie der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim. Es erfolgte keine strenge Sondierung der Proben nach den diagnostischen Kriterien der American Rheumatism Association bzw. des American College of Rheumatology, nach Hinweisen auf sekundäre vaskulitische Beteiligung oder therapeutischen Interventionen. Pathologisch erhöhte AECA-Quotienten kamen in beiden untersuchten Immunglobulinklassen vor, wobei AECA-IgG tendenziell häufiger waren. Ein signifikanter Unterschied zum Normalkollektiv ließ sich entgegen der Erwartungen nicht ermitteln.

Die untersuchte Gruppe beinhaltet Proben eines heterogenen Patientenkollektivs. Möglicherweise liegt hierin der Grund für die relativ niedrige Häufigkeit AECA-positiver Proben innerhalb der Gruppe mit rheumatischer Grunderkrankung. Eine andere Erklärung hierfür liefern verschiedene Autoren, die behaupten, dass hauptsächlich antiendotheliale Antikörper der Klasse IgA bei Rheumatoider Arthritis gebildet werden⁷⁹. Auch eine immunmodulatorische, antiinflammative Medikation kann dazu führen, dass die AECA-Titer unter der Therapie abfallen.

Durch strengere Charakterisierung der zu untersuchenden Proben könnte auf der Basis der entwickelten ELISAs eine genauere Aussage über die relative Häufigkeit von AECAs bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen gemacht werden.

5.6 Bestimmung der AECA bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes

Erste Erwägungen zu dieser Gruppe legten nahe, die Proben zusammen mit denen der Lupus antikoagulansgruppe auszuwerten, da bei SLE-Patienten häufig auch Lupus antikoagulans- und/oder Anticardiolipin-Antikörper vorliegen⁸¹. Durch die eigenständige Entität dieser Auto-

immunerkrankung könnten die Ergebnisse der LA-Gruppe jedoch verfälscht werden. Aus diesem Grund sollen die Proben eigenständig betrachtet werden.

Die Erstbeschreibung der AECA erfolgt aufgrund ihrer Beobachtung bei Patienten mit einem SLE. Ihre Prävalenz der AECA-IgG bei dieser Erkrankung schwankt von 15-89%⁷⁹, bzw. 0-58% AECA-IgM^{79, 175}. Häufig korrelierte die Aktivität der Krankheit und das vaskuläre Entzündungsgeschehen mit dem AECA-Titer. Insbesondere wurde ihr diagnostischer Wert für eine gefürchtete Komplikation des SLE, die Lupusnephritis, dargelegt. AECA dienen hier als einzig prädikativer Marker für Nephritis-Episoden, wobei andere serologische Parameter unverändert blieben.

Zwar konnten signifikante Abweichungen der AECA-Quotienten der SLE-Patienten vom Normalkollektiv mit beiden zellulären Nachweisverfahren für AECA ermittelt werden. Die Fallzahl ist jedoch zu klein, um hieraus weiterreichende Schlußfolgerungen zu ziehen.

5.7 Vergleich der AECA mit Antikörpern gegen humane neutrophile Granulozyten

Neben AECAs werden auch Antikörper gegen humane neutrophile Granulozyten (ANCA) gehäuft bei Autoimmunerkrankungen beobachtet^{176, 177}. Die Zielantigene von AECAs und ANCAs sollen jedoch verschiedene pathogenetische Gruppen von Autoantikörpern darstellen⁸⁰. Unterstrichen wird diese Aussage durch die hier ermittelte fehlende Korrelation von AECAs zu ANCAs.

5.8 Perspektiven

Aufgrund der praktischeren Durchführbarkeit und der geringeren Störanfälligkeit wurde zunächst der Lysat-ELISA gegenüber dem zellulären ELISA zum Nachweis von AECA favorisiert. In der Anwendung beider Tests an verschiedenen Patientenkollektiven zeigte sich jedoch, dass statistisch signifikante Abweichungen vom Normalkollektiv bzw. Korrelationen mit anderen serologischen Markern häufiger anhand von zellulären ELISAs belegbar sind. Die hier etablierten zellulären ELISAs stellen damit ein wertvolles diagnostisches Testverfahren für AECA dar. Ausgehend von den Beobachtungen von Gobel et al. und Chan et al. wird es dadurch möglich, bei bekannter Grunderkrankung noch vor dem Auftreten klinischer Komplikationen immunsuppressiv einzugreifen.

Dem von Blank et al. postulierten Ansatz der ungleichen Antigenverteilung auf Endothelzellen verschiedenen Ursprungs und der daraus resultierenden charakteristischen AECA-Bindung diverser vaskulitischer Erkrankungen könnte anhand der zellulären ELISAs nachgegangen werden. Mit wenig zusätzlichem Aufwand ließen sich die hier vorgestellten zellulären ELISAs auf Endothelzellen dermalen, pulmonalen, renalen, aortalen etc. Ursprungs umstellen.

Das Vermögen der AECA, das Endothel *in vitro* zu aktivieren, ist bereits erwiesen [10]. Auch *in vivo* Modelle untermauern das pathogenetische Potential der AECA [11].

AECA-Zielantigene unterschiedlichen Molekulargewichts wurden mittels Immunpräzipitation und Immunblot-Technik isoliert. Einige davon wurden bereits identifiziert. AECA von SLE-Patienten binden beispielweise an ribosomale Proteine, Elongationsfaktoren, Fibronectin und β_2 -Glykoprotein.

Weiterführende Arbeiten in der Abteilung für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim haben basierend auf den hier vorgestellten ELISAs AECA-positive Proben identifiziert, die keine Kreuzreaktivität mit anderen bekannten Autoantikörperpopulationen aufwiesen. Auf der Basis von HUVEC-Primärkulturen wurde eine endotheliale cDNA-Expressions-Bibliothek erstellt. *E.coli* wurden mit den cDNA-beladenen Phagen transfiziert und kultiviert. Durch Induktion der Expression der rekombinanten Proteine und Immunscreening mittels der AECA-positiven Proben wurden reaktive Klone identifiziert. Diese wurden weiter kultiviert und die in ihnen enthaltenen cDNA mittels Helferphagen isoliert. Die weitere Analyse der cDNA erfolgte computergestützt anhand vorbestehender Genbanken. So wurden zwei weitere, bisher unbeschriebene AECA-Zielantigene identifiziert.

Es sind jedoch bei weitem noch nicht alle Zielantigene aufgeklärt. Hier besteht weiterhin Forschungsbedarf. Die Kenntnis von Struktur und Funktion der Zielantigene könnte einen zielgenaueren therapeutischen Ansatz liefern als die heute angewandten relativ breit wirksamen Immunsuppressiva- und -modulatoren.

Bisherige Bemühungen konzentrieren sich hauptsächlich auf das destruktive Potential der AECA, doch auch die Charakterisierung natürlicher, protektiver AECA erscheint vielversprechend [12].

6 Zusammenfassung

Antiendotheliale Antikörper (AECA) wurden erstmals von Lundquist und Osterland im Jahre 1971 im Zusammenhang mit Systemischem Lupus erythematoses nachgewiesen. Seither wurden AECA intensiv mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Sie werden heute ursächlich bei verschiedenen vaskulären Autoimmunerkrankungen diskutiert und könnten von diagnostischem Wert sein.

Zu Beginn dieser Arbeit sollte ein Testverfahren zum Nachweis von antiendothelialen Antikörpern entwickelt werden. Auf der Basis von humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVE-Zellen) und sonifizierten HUVE-Zellen (HUVEC-Lysat) wurden ELISAs zum Nachweis von AECA-IgG und -IgM etabliert. Damit stand eine hoch sensitive Methode zum semi-quantitativen Nachweis dieser Autoantikörper zur Verfügung. Mit diesen Testverfahren folgten Untersuchungen an gesunden Blutspendern und verschiedenen Patientengruppen. Es zeigte sich, dass AECA-Titer unabhängig von Alter und Geschlecht des Blutspenders waren. Es bestand allerdings eine signifikante Korrelation der AECA-Titer mit der Immunglobulin-Gesamtkonzentration einer Antikörperklasse. Deshalb wurden Quotienten der AECA-Titer zur Immunglobulin-Gesamtkonzentration errechnet und die AECA-Konzentration im Plasma als Quotient von AECA-IgG-Titer/IgG-Konzentration bzw. AECA-IgM-Titer/IgM-Konzentration angegeben. Damit wurde eine zuverlässige Auswertung gewährleistet.

Es konnte gezeigt werden, dass AECA Bestandteile des natürlichen Antikörperrepertoires der gesunden Bevölkerung sind. Unter den hier untersuchten gesunden Blutspendern fanden sich sechs Individuen mit als pathologisch definierten Werten ohne klinische Beeinträchtigung.

Nach Etablierung der Testverfahren und Festlegung der Normalwerte wurden AECA-Konzentrationen bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen bestimmt.

Die Gruppe der Patienten mit Verdacht auf Vaskulitis (n=37) zeigte in den zellulären AECA-ELISAs signifikante Abweichungen der Mittelwerte von der Referenzgruppe. Hier waren die AECA-IgM-Quotienten prozentual häufiger positiv als AECA-IgG-Quotienten.

Die Gruppe der Patienten mit Verdacht auf ein Lupus antikoagulans (n=54) unterschied sich sehr deutlich von der Referenzgruppe. Mit Ausnahme der AECA-IgM-Quotienten auf Lysat-Basis zeigten alle Mittelwerte höchst signifikante Ergebnisse.

Bei der Gruppe der Patienten mit nicht näher definierter rheumatischer Grunderkrankung (n=108) zeigten sich keine signifikanten Abweichungen der Mittelwerte der AECA-Quotienten von der Referenzgruppe. Mögliche Gründe hierfür sind eine unzureichende Cha-

rakterisierung des Kollektivs, Vorherrschen von AECA-IgA, die hier nicht erfasst wurden, oder künstlich niedrige AECA-Quotienten aufgrund von nicht bekannten therapeutischen Interventionen.

In der relativ kleinen Gruppe der Patienten mit systemischem Lupus erythemathodes (n=4) wichen die Mittelwerte der Quotienten der zellulären AECA-ELISAs zwar signifikant von der Referenzgruppe ab, eine Schlußfolgerung kann wegen der geringen Patientenzahl jedoch nicht gezogen werden.

Das hier ermittelte vermehrte Vorkommen von AECA bei Vaskulitiden, Lupus antikoagulans und SLE stützt die Theorie, dass Endothelzellen an dem Entzündungsgeschehen dieser Erkrankungen beteiligt sind.

Vergleiche von zellulären mit Zell-Lysat-ELISAs sind in der Literatur extrem selten. In der vorliegenden Arbeit konnte ein weiterer Beleg für die Korrelation beider Verfahren erbracht werden. Aufgrund der ermittelten Korrelation, der geringeren Anfälligkeit der Antigenkoppelung an die feste Phase und der besseren praktischen Durchführbarkeit bietet der Lysat-ELISA eine Alternative für die Routinediagnostik der AECA. Die Anwendung der Testverfahren an verschiedenen Patientenkollektiven erbachte jedoch häufiger signifikante Ergebnisse auf der Basis zellulärer ELISAs.

AECA scheinen eine heterogene Gruppe von Autoantikörpern zu sein. Dies zeigte sich in dieser Arbeit an verschiedenen Stellen. Erstes Indiz liefern die durchweg linkssteilen Verteilungen der AECA-Quotienten in allen untersuchten Gruppen. Die partiellen Korrelationen mit Anticardiolipin-, Antiphospholipid- und Lupus antikoagulans-Antikörpern charakterisieren mögliche AECA-Subpopulationen genauer. Hingegen konnte gezeigt werden, dass AECA nicht identisch sind mit anderen ursächlichen Autoantikörpern in der Pathogenese der Vaskulitiden, den Antikörpern gegen humane neutrophile Granulozyten.

7 Summary

Antiendothelial antibodies (AECA) were described for the first time by Lindquist and Osterland in association with Lupus erythematosus in 1971. From that day on AECA were thoroughly investigated with different methods. Today AECA are discussed as cause of vascular autoimmune disorders and can be of diagnostic value.

At the beginning of this thesis a method for the detection of AECA had to be developed. Based on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and sonicated HUVE-cells (HUVEC-lysate) an ELISA was established which was able to detect AECA-IgG and -IgM. The assays provide a highly sensitive method for the semi-quantitative detection of these autoantibodies. This tool was used to investigate healthy blood donors as well as patients with different autoimmune diseases. The investigations revealed that AECA-titers are independent of the donor's age and gender. However, a significant correlation of AECA-titers and total immunoglobulin concentration in each class was determined. Therefore the quotient of AECA-titers and immunoglobulin-concentration was built and the plasmaconcentration of AECA was described as $\text{AECA-IgG-titer/IgG-concentration}$ or $\text{AECA-IgM-titer/IgM-concentration}$. Thus, a reliable evaluation was achieved.

It was shown that AECA are part of the physiological human antibody repertoire. Among the tested healthy blood donors six individuals with AECA-titers defined as pathologic, were detected without clinical relevance.

After establishing the assays and defining reference values AECA-concentrations in patients with different diseases were determined.

In the cellular assay patients with suspected vasculitis (n=37) showed a significant deviation in mean AECA-quotients compared to the reference group. In this case the percentage of positive AECA-IgM-quotients was higher than of AECA-IgG-quotients.

The group of patients suspected to be suffering from Lupus anticoagulans (n=54) differed clearly from the reference group. Except of AECA-IgM-quotients on lysate basis all mean values showed highly significant results.

Patients with undefined rheumatic disease (n=108) did not show a significant deviation with regards to the mean AECA-quotient values compared to the reference group. Possible reasons are the missing characterisation of the collective, a predominance of AECA-IgA, which were not included in this investigation, or artificially low AECA-quotients due to unknown therapeutic interventions.

In the relatively small group of patients suffering from systemic lupus erythematosus (SLE) the mean AECA-ELISA-quotients in the cellular assays differed significantly from those of the reference group. Nevertheless, conclusions can not be drawn because of the small amount of patients included.

This investigation supports the thesis of the endothelium being part of the inflammation seen in vasculitides, lupus anticoagulans and SLE.

Comparisons of cellular and cell-lysate-ELISAs are extremely rare in literature. This investigation added another clue towards the correlation of both methods. Together with the lower susceptibility of antigen-coupling to the solid phase and the increased practicability this makes the lysate-ELISA a good alternative to the cellular ELISA in routine diagnostics. However, application of both assays in different patient groups more often showed significant results using the cellular ELISAs.

This investigation indicates that AECA are a heterogenic group of antibodies, as indicated by the leftsided shape of the distribution of AECA-quotients in all examined patient groups. The partial correlation with anticardiolipin-, antiphospholipid- and lupus anticoagulans-antibodies might characterize possible AECA subpopulations. However, it was shown that AECA are not identical with anti-neutrophil-cytoplasmatic antibodies (ANCA), another etiologic autoantibody in the pathogenesis of vasculitides.

8 Anhang

Tabelle 24: Testergebnisse zu den Bestimmungen von antiendothelialen Antikörpern, IgM- und IgG-Plasmakonzentrationen. Gruppe 1=V.a. Vaskulitis; Gruppe 2=V.a. Lupus antikoagulans; Gruppe 3=Patienten mit rheumatischer Grunderkrankung; Gruppe 4=Systemischer Lupus erythematoses (SLE); Gruppe 5=gesunde Blutspender.

Nummer	Gruppe	cHUVEC/ IgM [U/ml]	cHUVEC/ IgG [U/ml]	HUVEC- Lysat/IgM [U/ml]	HUVEC- Lysat/IgG [U/ml]	IgM [mg/ml]	IgG [mg/ml]
1	1	646,88	618,21	575,45	370,46	1,080	14,20
2	1	768,50	390,36	427,87	691,34	0,990	13,60
3	1	374,12	280,33	294,82	556,02	0,540	15,90
4	1	1660,50	1200,38	793,89	1511,47	2,590	15,40
5	1	1157,68	304,33	292,46	858,80	2,820	17,15
6	1	659,79	412,05	287,39	1180,90	1,270	13,65
7	1	162,67	261,14	189,39	2819,22	0,700	14,20
8	1	405,23	192,89	182,31	712,83	0,620	11,30
9	1	437,73	496,29	718,41	436,73	1,530	18,15
10	1	480,18	139,48	207,77	133,27	1,160	6,45
18	1	250,35	156,56	69,81	1549,65	0,270	7,40
22	1	426,44	141,37	165,6	970,76	0,550	15,20
26	1	781,70	251,55	320,59	1947,24	0,840	12,60
29	1	473,11	433,97	274,93	2671,98	0,760	16,75
33	1	793,01	92,58	322,69	1469,43	1,040	13,75
40	1	374,80	453,69	52,75	749,72	0,450	13,25
42	1	1880,66	339,79	142,83	8,43	0,660	11,40
43	1	393,92	375,73	106,97	475,61	1,100	
44	1	807,15	267,66	345,23	219,34	2,030	11,70
45	1	843,92	256,97	374,78	348,13	4,090	12,35
46	1	347,25	443,63	339,40	468,31	0,770	11,75
47	1	835,24	542,40	483,71	847,57	1,250	15,65
48	1	162,67	150,27	21,39	82,35	0,410	6,25
49	1	331,69	109,81	243,15	811,28	0,470	13,95
50	1	263,81	245,52	145,59	3366,01	0,460	10,35
62	1	328,87	254,26	308,19	418,66	0,340	8,60
67	1	1685,51	1124,89	326,80	467,50	1,030	15,85
68	1	469,92	198,80	1020,18	338,39	2,090	11,30
69	1	45,36	158,32	120,50	406,22	0,420	9,70
71	1	104,69	168,13	413,47	162,67	0,300	19,65
72	1	196,90	317,29	339,57	21758,81	0,290	9,40
81	1	87,38	222,25	46,93	183,62	0,260	
83	1	371,93	142,03	398,41	254,73	1,400	
85	1	98,74	113,95	256,49	157,29	0,260	
87	1	102,33	318,31	113,64	324,64	0,380	4,60
88	1	570,45	244,62	643,38	1140,99	1,640	18,30
91	1	227,56	494,07	31,47	104,96	0,370	16,60
11	2	561,30	1897,68	143,98	488,08	1,090	17,25
12	2	511,73	8104,06	292,36	1514,45	1,060	13,55

Nummer	Gruppe	cHUVEC/ IgM [U/ml]	cHUVEC/ IgG [U/ml]	HUVEC- Lysat/IgM [U/ml]	HUVEC- Lysat-IgG [U/ml]	IgM [mg/ml]	IgG [mg/ml]
13	2	306,55	6997,46	80,77	1549,04	0,800	9,80
14	2	1091,72	5775,28	349,43	1102,33	4,150	15,70
15	2	545,20	8180,77	1182,96	14081,57	0,750	17,80
16	2	392,40	4721,58	78,58	2906,56	2,150	12,20
17	2	351,03	4842,60	78,31	14284,29	0,580	17,25
19	2	673,33	943,46	453,52	742,94	3,650	11,45
20	2	547,81	4842,60	126,96	19482,27	1,540	10,30
21	2	330,88	3540,67	255,96	6280,82	2,320	22,15
23	2	578,85	333,05	177,13	117,11	0,570	
24	2	581,55	2568,06	103,25	5866,63	2,860	22,20
25	2	187,15	1034,46	128,05	818,88	0,540	14,65
27	2	191,55	1195,99	120,99	864,04	0,620	21,35
28	2	463,50	1327,94	741,15	1263,82	0,540	14,30
30	2	401,33	1638,22	41,79	450,72	0,650	17,00
31	2	607,10	323,86	185,22	2005,59	4,120	9,80
32	2	456,13	1188,02	659,98	1083,11	0,550	12,60
34	2	257,87	11159,83	106,88	227,94	0,300	13,20
35	2	901,59	9462,31	144,89	1895,53	1,030	33,95
36	2	594,23	208,28	275,61	142,13	2,960	4,60
37	2	348,89	350,12	266,74	781,97	1,030	9,20
38	2	81,21	358,53	28,63	8,56	0,690	8,70
39	2	581,56	1282,44	384,02	1669,81	1,470	22,70
41	2	1208,24	168,12	964,70	594,34	1,430	12,05
51	2	429,27	308,35	157,79	1869,14	0,600	15,80
52	2	1657,22	1075,59	267,54	2659,54	0,580	25,35
53	2	1776,02	952,67	647,62	888,16	1,070	16,20
54	2	818,47	1228,98	336,65	1007,24	0,380	15,75
55	2	296,34	149,52	224,86	82,14	0,620	14,30
56	2	354,36	1323,14	1219,98	1128,90	0,580	12,20
57	2	177,06	5069,38	141,53	16013,33	0,180	12,40
58	2	1273,51	368,52	970,79	154,62	1,210	17,30
59	2	1569,07	5792,88	694,37	651,29	1,050	15,55
60	2	339,01	2599,84	470,79	403,13	1,850	17,75
61	2	124,31	1713,94	298,03	1798,07	0,680	15,35
63	2	863,57	984,14	495,18	2715,82	0,950	16,95
64	2	394,15	3620,30	106,97	549,04	1,670	16,05
65	2	171,89	2583,54	36,44	188,27	1,690	38,75
66	2	324,33	7259,97	1064,29	4290,19	1,690	23,60
70	2	407,26	2685,29	296,69	4950,30	0,360	19,45
73	2	86,16	117,29	287,02	161,19	0,480	9,30
74	2	79,65	118,57	54,22	281,61	0,250	10,75
75	2	225,09	106,28	78,51	71,91	1,890	12,50
76	2	25,38	899,19	24,27	2868,40	0,290	8,05
77	2	113,30	234,59	70,60	1123,43	0,390	20,40
78	2	23,25	76,12	29,19	39,74	0,500	11,25

Nummer	Gruppe	cHUVEC/ IgM [U/ml]	cHUVEC/ IgG [U/ml]	HUVEC- Lysat/IgM [U/ml]	HUVEC- Lysat-IgG [U/ml]	IgM [mg/ml]	IgG [mg/ml]
79	2	461,33	1920,15	106,77	753,57	0,980	14,75
80	2	2421,87		3661,34	36447,41	4,120	24,60
82	2	214,51	130,22	190,96	379,09	0,840	9,85
84	2	224,55	284,83	125,98	1171,66	0,440	13,25
86	2	709,43	2196,47	316,89	11804,58	0,790	25,85
89	2	122,25	276,70	290,16	1382,89	0,440	10,15
90	2	176,93	389,13	151,28	658,14	0,390	13,35
92	3	161,36	717,84	582,46	3611,30	3,520	13,40
93	3	515,26	424,03	828,67	65,18	2,570	13,30
94	3	169,02	242,19	346,12	160,57	7,250	15,90
95	3	170,04	129,25	204,11	634,04	2,880	13,80
96	3	293,86	160,04	173,72	139,95	2,210	9,00
97	3	425,73	102,74	291,75	722,99	8,730	15,35
98	3	76,98	157,49	97,52	134,79	1,050	11,25
99	3	85,49	625,64	43,53	1590,57	1,950	9,90
100	3	138,40	898,38	136,51	2470,51	5,840	16,40
101	3	178,03	266,06	88,02	330,74	2,320	12,80
102	3	557,79	2032,00	976,65	570,88	7,170	14,35
103	3	344,29	231,36	187,93	93,54	6,150	8,95
104	3	1016,92	198,71	248,24	496,11	8,460	11,05
105	3	464,22	818,68	627,94	1189,66	5,030	17,95
106	3	139,76	1103,37	167,16	227,61	2,780	16,05
107	3	260,18	620,84	185,95	36,82	7,690	16,85
108	3	205,08	1211,46	735,72	503,84	2,860	14,15
109	3	522,06	18486,67	185,95	29235,29	1,920	27,10
110	3	201,99	2177,58	439,08	1234,78	1,920	11,05
111	3	1259,62	332,39	514,23	2064,97	19,400	11,50
112	3	367,25	721,68	343,17	908,63	5,450	16,80
113	3	222,30	191,29	345,15	183,78	1,960	14,90
114	3	239,26	2575,16	217,52	245,50	5,930	15,95
115	3	259,05	366,07	593,61	383,10	5,010	13,75
116	3	91,54	565,14	187,31	666,40	2,730	12,15
117	3	90,46	1984,33	300,58	695,54	1,840	14,00
118	3	213,41	293,98	380,20	325,55	2,170	8,80
119	3	215,57	490,23	3459,97	562,80	4,670	19,10
120	3	3154,91	494,07	1520,80	496,42	35,700	11,95
121	3	227,27	279,84	657,63	270,51	4,670	16,45
122	3	276,15	676,58	322,74	293,17	5,130	14,60
123	3	194,33	1673,29	36,36	946,46	1,020	20,10
124	3	272,69	431,18	665,02	800,77	4,660	20,00
125	3	605,53	514,42	2133,12	758,68	9,17	27,15
126	3	924,10	2017,06	1207,57	541,75	10,421	
127	3	358,05	1195,47	364,60	335,27	9,750	15,65
128	3	214,49	18888,26	130,89	987,90	2,030	31,15
129	3	143,76	473,34	137,46	711,17	3,190	7,60

Nummer	Gruppe	cHUVEC/ IgM [U/ml]	cHUVEC/ IgG [U/ml]	HUVEC- Lysat/IgM [U/ml]	HUVEC- Lysat-IgG [U/ml]	IgM [mg/ml]	IgG [mg/ml]
130	3	213,41	675,50	265,29	2334,71	3,000	19,70
131	3	396,74	871,16	259,45	462,43	4,900	17,50
132	3	105,42	1628,97	70,50	4046,95	2,160	12,00
133	3	37,18	995,48	157,16	383,10	1,180	17,35
134	3	329,98	239,71	537,79	1064,64	4,910	19,05
135	3	561,93	733,87	294,02	1195,77	8,510	27,60
136	3	116,47	319,08	105,86	299,02	6,570	17,30
137	3	132,17	279,42	126,80	5,91	3,960	10,25
138	3	179,64	731,50	339,69	777,38	5,890	21,45
139	3	50,13	1485,10	176,81	5107,54	2,430	28,30
140	3	67,19	627,16	109,74	902,86	2,380	15,85
141	3	553,81	703,38	140,09	348,68	5,630	20,75
142	3	144,99	780,88	161,04	372,21	3,120	17,80
143	3	237,02	898,34	727,51	215,03	18,510	21,35
144	3	271,31	849,60	172,90	2578,63	5,550	19,20
145	3	49,05	212,87	29,15	416,73	2,190	21,75
146	3	60,60	459,36	162,63	2,47	1,730	12,55
147	3	142,64	360,63	457,55	825,24	3,730	15,60
148	3	673,84	569,05	266,97	1183,65	9,060	13,60
149	3	533,95	1108,30	71,52	743,79	12,530	18,95
150	3	357,05	800,86	598,50	277,09	8,600	17,75
151	3	98,78	568,11	219,40	2365,92	4,410	10,65
152	3	315,54	294,39	467,11	262,03	5,550	13,75
153	3	215,53	263,48	30,11	1844,07	1,300	13,80
154	3	428,59	258,80	200,82	77,13	5,840	10,25
155	3	213,45	731,81	53,63	1515,22	2,970	16,40
156	3	376,96	279,40	106,89	184,00	2,420	14,85
157	3	614,10	1155,17	90,17	3719,88	3,110	26,55
158	3	370,51	523,84	654,04	785,68	6,190	11,40
159	3	102,40	623,74	57,17	2007,52	0,580	11,35
160	3	132,42	546,47	83,47	334,18	0,720	11,50
161	3	943,03	372,67	564,49	351,56	7,170	17,65
162	3	3717,86	733,80	3450,04	1416,38	45,880	16,10
163	3	290,90	307,25	228,04	571,56	3,860	11,55
164	3	316,72	1393,42	173,58	359,78	4,040	20,35
165	3	185,78	372,67	540,71	2322,94	5,320	14,75
166	3	95,01	148,71	69,48	196,87	0,650	16,35
167	3	48,73	781,11	51,57	2720,46	4,150	15,65
168	3	157,86	519,85	273,09	679,10	2,120	11,50
169	3	633,42	3923,95	652,41	2667,90	8,867	25,55
170	3	156,61	1454,48	1566,91	279,05	6,972	18,80
171	3	117,73	326,99	326,36	220,2	2,373	16,70
172	3	475,14	1782,16	1905,92	712,84	11,412	32,75
173	3	342,29	511,68	440,56	512,99	1,916	10,85
174	3	104,46	481,89	178,89	313,13	2,194	11,85

Nummer	Gruppe	cHUVEC/ IgM [U/ml]	cHUVEC/ IgG [U/ml]	HUVEC- Lysat/IgM [U/ml]	HUVEC- Lysat-IgG [U/ml]	IgM [mg/ml]	IgG [mg/ml]
175	3	79,44	401,46	118,29	215,29	3,076	15,00
176	3	398,54	389,55	780,39	190,77	7,968	25,55
177	3	115,18	1405,33	151,98	286,41	0,834	20,30
178	3	494,92	775,31	99,11	942,12	0,883	17,05
179	3	45,99	453,59	114,05	53,45	0,975	5,90
180	3	104,20	852,76	87,57	383,02	2,991	12,05
181	3	207,67	735,09	611,31	613,53	4,291	17,45
182	3	203,84	682,96	415,98	33,83	4,306	12,05
183	3	89,39	784,24	253,68	14,22	2,287	10,35
184	3	46,50	577,21	324,24	477,43	5,111	12,55
185	3	74,33	1152,13	352,42	387,12	3,702	11,10
186	3	144,03	717,22	525,28	414,90	3,760	15,45
187	3	158,07	995,74	268,51	349,92	3,171	16,50
188	3	95,52	3176,26	427,21	318,04	5,709	16,00
189	3	278,46	367,57	379,12	333,98	3,204	14,55
190	3	266,53	537,04	942,27	413,67	6,150	26,05
191	3	77,28	1133,78	81,59	992,86	0,774	25,50
192	3	187,15	348,75	127,22	506,26	5,280	17,30
193	3	228,04	485,17	716,76	541,25	3,152	11,20
194	3	81,49	421,67	58,12	493,10	0,749	19,85
195	3	89,92	1170,75	85,67	991,92	0,702	21,45
196	3	189,68	143,66	128,03	432,83	5,160	18,00
197	3	295,04	432,55	309,56	307,65	5,121	8,75
198	3	144,78	2633,57	301,01	433,86	4,119	17,10
199	3	214,76	491,94	404,95	484,79	3,550	12,00
200	4	663,69	8604,86	1101,38	4551,76	1,670	23,90
201	4	382,24	1480,22	227,45	803,55	1,640	16,40
202	4	243,46	4830,35	180,02	5753,57	1,010	20,60
203	4	387,40	6775,15	374,08	752,13	0,400	26,30
204	5	91,19	233,32	158,45	338,00	0,591	8,25
205	5	39,21	140,48	118,04	264,09	0,591	5,60
206	5	62,15	150,38	46,86	28,43	1,534	4,80
207	5	47,63	317,69	98,29	419,74	0,931	5,10
208	5	131,56	315,33	85,89	289,30	1,666	8,75
209	5	114,14	426,09	63,85	45,83	0,774	4,70
210	5	235,61	184,31	146,05	267,57	4,258	3,85
211	5	1,45	51,40	0,94	199,74	0,111	5,00
212	5	45,60	139,54	28,03	176,26	0,889	6,65
213	5	58,96	226,26	22,98	211,91	0,798	5,20
214	5	109,20	135,77	81,76	80,61	1,328	8,45
215	5	156,54	252,43	88,65	304,96	1,301	6,70
216	5	70,86	118,33	61,10	126,70	1,695	5,25
217	5	52,57	153,20	32,16	57,32	0,727	6,30
218	5	112,98	245,58	67,07	4,96	3,061	4,35
219	5	189,94	256,89	109,31	1134,35	2,370	6,05

Nummer	Gruppe	cHUVEC/ IgM [U/ml]	cHUVEC/ IgG [U/ml]	HUVEC- Lysat/IgM [U/ml]	HUVEC- Lysat-IgG [U/ml]	IgM [mg/ml]	IgG [mg/ml]
220	5	169,61	361,05	91,40	476,26	3,094	10,70
221	5	128,95	182,43	103,34	127,57	1,420	6,15
222	5	75,80	623,01	38,13	2474,90	0,474	3,45
223	5	106,01	415,72	83,60	181,48	1,305	6,65
224	5	69,12	112,20	32,16	180,61	0,372	5,15
225	5	65,64	92,41	32,62	88,43	1,786	8,20
226	5	130,69	294,12	101,97	658,96	2,171	11,70
227	5	211,14	138,59	147,89	185,83	3,955	5,30
228	5	58,96	242,28	28,03	89,30	1,075	1,25
229	5	148,41	139,54	42,73	190,17	1,418	9,60
230	5	25,27	87,69	39,05	315,39	0,196	3,05
231	5	26,72	49,05	33,08	32,78	0,712	6,30
232	5	89,16	162,16	51,91	63,22	0,769	8,90
233	5	73,19	134,35	49,62	50,17	0,742	8,05
234	5	96,71	149,91	45,94	152,78	2,024	8,60
235	5	118,49	221,28	74,41	87,57	1,227	13,45
236	5	146,38	388,85	69,36	198,87	2,190	9,60
237	5	33,69	151,32	27,11	173,65	0,994	5,75
238	5	79,87	399,69	39,05	113,65	0,816	7,55
239	5	105,72	154,62	65,69	162,35	0,935	6,15
240	5	78,71	318,63	49,16	108,43	2,198	7,40
241	5	236,70	256,89	179,57	212,78	2,054	5,50
242	5	51,99	506,68	40,89	1069,67	2,655	7,00
243	5	59,25	181,01	38,59	106,52	0,887	11,80
244	5	73,77	382,26	86,81	10,17	0,860	10,40
245	5	84,80	203,63	81,30	298,00	0,995	3,55
246	5	99,91	228,61	90,95	18,87	1,756	9,85
247	5	65,64	119,74	69,82	209,30	2,267	5,00
248	5	85,39	892,01	45,48	204,09	1,058	9,60
249	5	78,12	514,14	47,32	41,48	1,095	10,85
250	5	50,24	125,87	53,29	268,42	1,102	5,75
251	5	192,85	252,65	183,25	485,83	0,690	12,90
252	5	108,04	271,81	84,52	113,65	1,883	8,10
253	5	136,79	336,54	88,19	62,35	2,119	10,05
254	5	165,26	228,61	165,34	114,52	2,138	13,10
255	5	89,45	138,12	56,50	75,39	0,533	11,20
256	5	203,59	193,27	121,25	172,78	1,727	9,85
257	5	76,67	425,27	52,83	2991,26	0,465	8,65
258	5	173,39	221,07	170,39	301,48	0,958	8,00
259	5	115,70	333,24	31,25	126,70	0,242	10,05

Tabelle 25: Testergebnisse der funktionellen Gerinnungstests und immunologischen Tests. KCT-Index; RVV-Test; Antikardiolipin-Antikörper (ACA) und Antiphospholipidantikörper (APLA) der Immunglobulin-Klassen M und G (IgM, IgG).

Nummer	KCT-Index	RVV-Test	ACA/IgG	ACA/IgM	APLA/IgG	APLA/IgM
1	1,0		7,0	1,0		
4	50,0		10,3	9,3		
5	1,0		5,9	3,7		
9	1,0		4,3	9,3		
11	27,8		19,4	38,6		
12	41,5		18,3	15,7		
13	49,8		100,0	100,0		
14	59,6		80,0	100,0		
15	75,0		12,6	1,0		
16	73,8		100,0	100,0		
17	1,0		2,1	6,3		
19	54,7	58,0	100,0	23,1		
20	58,9	50,5	18,6	3,1	6,7	5,6
21	85,5	83,3	19,7	100,0	16,3	76,5
22	1,0	33,5	4,2	1,0	7,3	5,3
23	67,9	47,5	18,7	22,0	6,4	21,1
24	70,0	67,4	14,5	100,0	23,1	122,0
25	39,0	53,4	16,3	1,0	5,4	4,3
27	66,3	59,6	17,2	3,1	5,3	4,7
28	45,5	48,3	100,0	12,5	64,2	16,6
30	1,0	38,1	5,5	7,2	4,7	5,3
31	28,7	38,0	2,7	3,5	4,2	7,9
32	43,1	46,9	100,0	10,6	99,9	13,0
33	1,0	30,2	32,3	4,4	6,9	4,2
34	31,4	35,2	3,6	4,6	5,6	5,2
35	56,7	58,4	34,0	55,0	26,4	36,3
36	47,8	42,1	11,6	23,6	7,9	20,5
37	74,5	39,6	5,4	1,8	6,6	5,1
38	31,0	63,0	30,1	1,0	18,9	4,8
39	28,0	34,0	28,2	14,8	19,1	15,8
40	1,0	24,0	17,1	1,0	3,7	4,6
41	60,0	120,0	100,0	8,7	167,0	21,0
42	1,0	39,0	1,5	1,0	2,8	4,2
43	1,0	38,0	6,0	9,3	5,3	5,5
44	6,9	34,0	2,2	4,0	4,9	5,3
45	1,0	30,0	5,6	1,0	8,0	5,4
46	1,0	36,0	4,0	1,0	4,8	4,6
47	1,0	43,0	100,0	10,2	162,8	6,9
49	1,0	41,0	2,6	1,8	4,7	4,1
50	1,0	24,0	3,5	9,3	2,7	4,1
51	1,0	27,0	2,2	1,5	2,4	4,3
52	1,0	34,0	28,0	1,0	5,3	4,2
53	1,0	30,0	74,0	10,0	22,5	31,8

Nummer	KCT- Index	RVV- Test	ACA/Ig G	ACA/Ig M	APLA/Ig G	APLA/Ig M
54	1,0	30,0	24,7	0,8	8,1	3,8
55	1,0	36,0	5,3	2,8	4,2	3,9
56	1,0	37,0	20,5	8,7	48,0	9,0
57	1,0	27,0	11,5	3,2	6,0	4,0
58	23,0	38,0	8,8	13,6	6,0	4,0
59	1,0	29,0	78,8	40,4	16,2	10,8
60	1,0	30,0	2,8	1,1	4,2	5,9
61	1,0	34,0	10,2	0,5	4,4	4,1
62	1,0	28,0	8,6	4,3	7,7	4,0
63	1,0	35,0	24,0	12,0	15,1	13,2
64	1,0	26,0	38,3	23,7	16,5	48,3
65	1,0	34,0	3,0	6,5	5,2	4,4
66	1,0	32,0	18,3	29,9	10,3	10,0
67	4,6	39,0	85,6	2,2	104,3	4,9
68	1,0	30,0	3,4	4,2	4,4	4,1
69	1,0	34,0	2,7	3,9	3,6	4,5
70	1,0	29,0	25,0	5,6	6,4	4,6
71	1,0	41,0	2,6	1,5	4,0	4,6
73	1,0	32,0	4,9	2,1	6,9	4,1
74	8,6	39,0	8,2	5,2	7,2	5,6
75	1,0	32,0	8,7	2,4	7,7	6,6
76	1,0	30,0	3,5	6,3	4,5	6,8
77			3,8	5,5	6,3	9,8
78	2,4	37,0	5,4	6,9	7,8	7,7
79	39,0	63,0	11,2	19,8	30,5	31,3
80	1,0	26,0	8,7	7,3	10,6	7,2
82	1,0	37,0	17,2	4,8	53,3	8,5
83	19,6	39,0	4,6	4,8	6,2	5,8
84	1,0	24,0	3,2	3,8	3,9	6,8
85	1,0	38,0	3,3	2,4	3,6	4,4
86	37,0	70,0	17,6	53,0	24,0	63,8
87	17,0	38,0	1,0	1,0	4,9	5,2
89	1,0	28,0	2,4	0,9	7,1	5,5
90	1,0	36,0	1,1	0,7	6,9	5,5

Tabelle 26: Testergebnisse zum Nachweis von Antikörpern gegen humane neutrophile Granulozyten (ANCA). 1= negativ; 2=positiv.

Nummer	ANCA	Nummer	ANCA	Nummer	ANCA
92	1	153	1	124	2
93	1	154	1	126	2
94	1	155	1	128	2
95	1	156	1	133	2
97	1	157	1	135	2
98	1	158	1	139	2
99	1	160	1	142	2
100	1	161	1	146	2
101	1	163	1	149	2
102	1	164	1	152	2
103	1	165	1	159	2
104	1	166	1	162	2
105	1	167	1	169	2
107	1	168	1	176	2
109	1	170	1	177	2
111	1	171	1	179	2
112	1	172	1	182	2
113	1	173	1	198	2
114	1	174	1	135	2
115	1	175	1		
117	1	178	1		
118	1	180	1		
119	1	181	1		
120	1	183	1		
121	1	184	1		
122	1	185	1		
125	1	186	1		
127	1	187	1		
129	1	188	1		
130	1	189	1		
131	1	190	1		
132	1	191	1		
134	1	192	1		
136	1	193	1		
137	1	194	1		
138	1	195	1		
140	1	196	1		
141	1	197	1		
143	1	199	1		
144	1	96	2		
145	1	106	2		
147	1	108	2		
148	1	110	2		
150	1	116	2		
151	1	123	2		

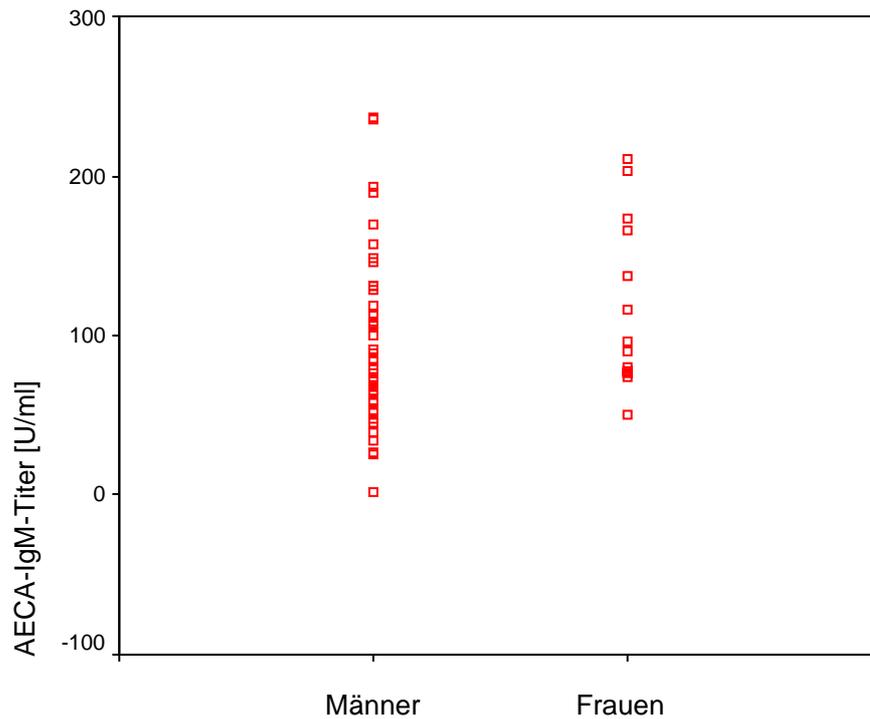


Abbildung 30: AECA-IgM-Titer bei den Geschlechtern gemessen im cHUVEC-IgM. Die AECA-IgM-Titer von 43 männlichen und 13 weiblichen gesunden Blutspendern wurden im zellulären HUVEC-ELISA bestimmt. Der *U*-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme der Nullhypothese von $p=0,1429$.

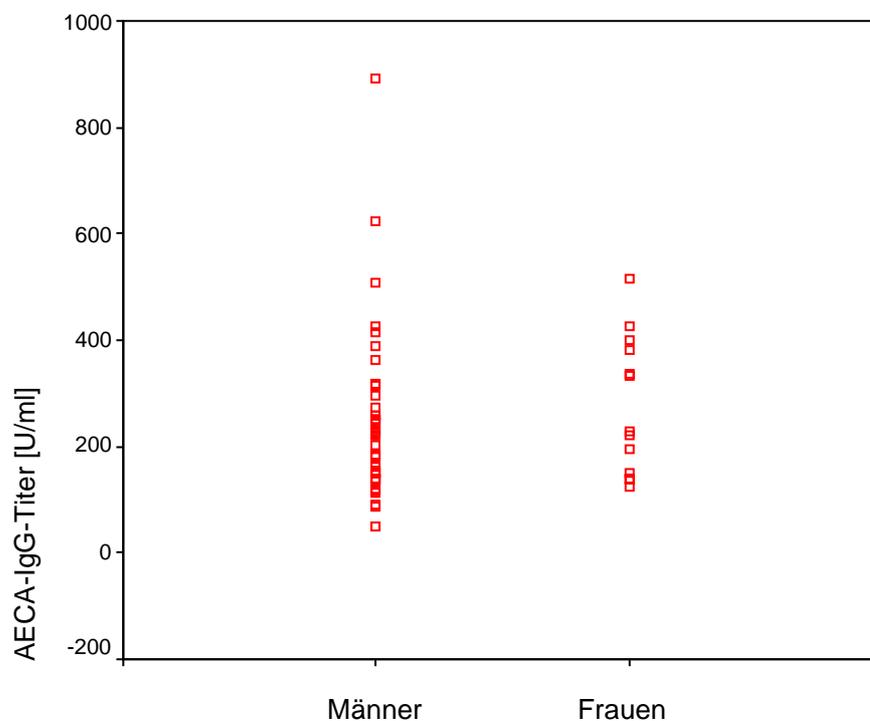


Abbildung 31: AECA-IgG-Titer bei den Geschlechtern gemessen im cHUVEC-IgG. Die AECA-IgG-Titer von 43 männlichen und 13 weiblichen gesunden Blutspendern wurden im zellulären HUVEC-ELISA bestimmt. Der *U*-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme der Nullhypothese von $p=0,3416$.

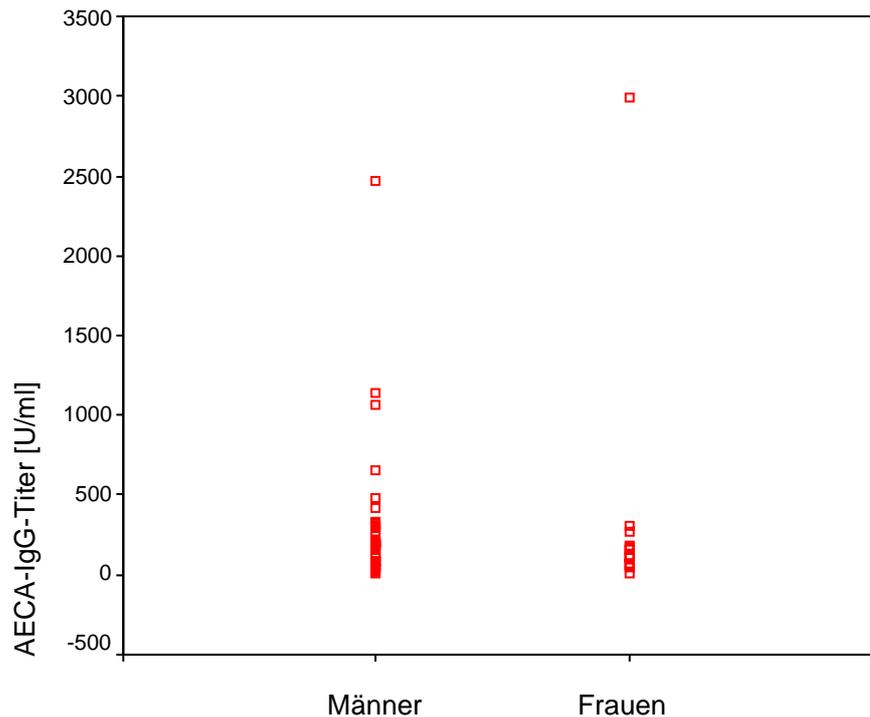


Abbildung 32: AECA-IgG-Titer bei den Geschlechtern gemessen im HUVEC-Lysat-IgG. Die AECA-IgG-Titer von 43 männlichen und 13 weiblichen gesunden Blutspendern wurden im HUVEC-Lysat-ELISA bestimmt. Der *U*-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney ergab eine Irrtumswahrscheinlichkeit für die Annahme der Nullhypothese von $p=0,3271$.

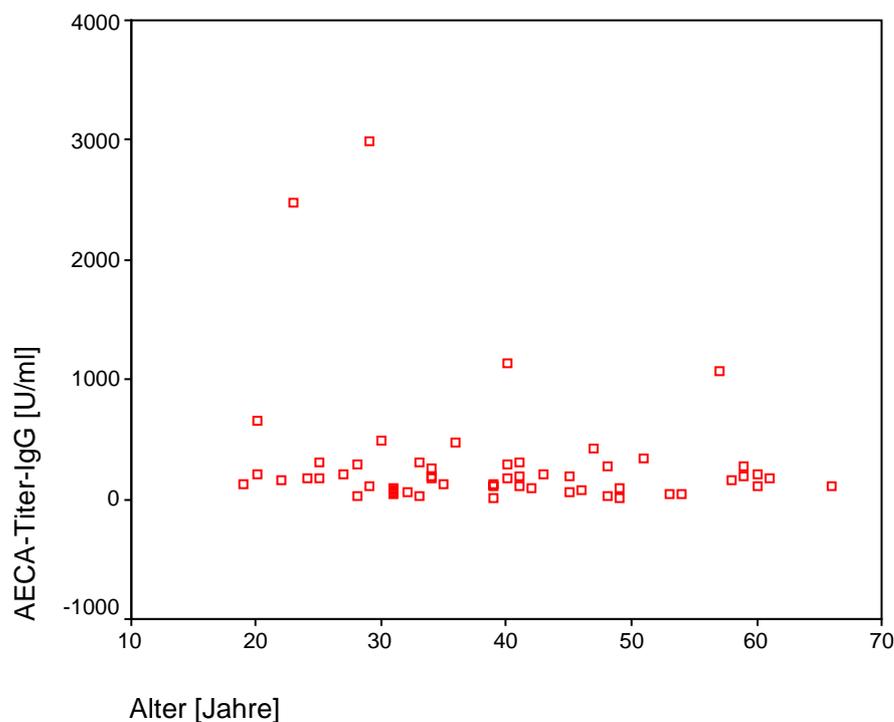


Abbildung 33: Korrelation zwischen Alter und AECA-IgG-Titer gemessen im HUVEC-Lysat-IgG. Die AECA-Titer von 56 gesunden Blutspendern im Alter zwischen 19 und 66 Jahren (mittleres Alter 39 Jahre) wurden bestimmt und ihre Korrelation zum Alter nach Spearman überprüft. Hierbei ergab sich für den HUVEC-Lysat-ELISA eine Korrelation zwischen AECA-IgG-Titer und dem Alter von $r=-0,1409$ ($p=0,300$).

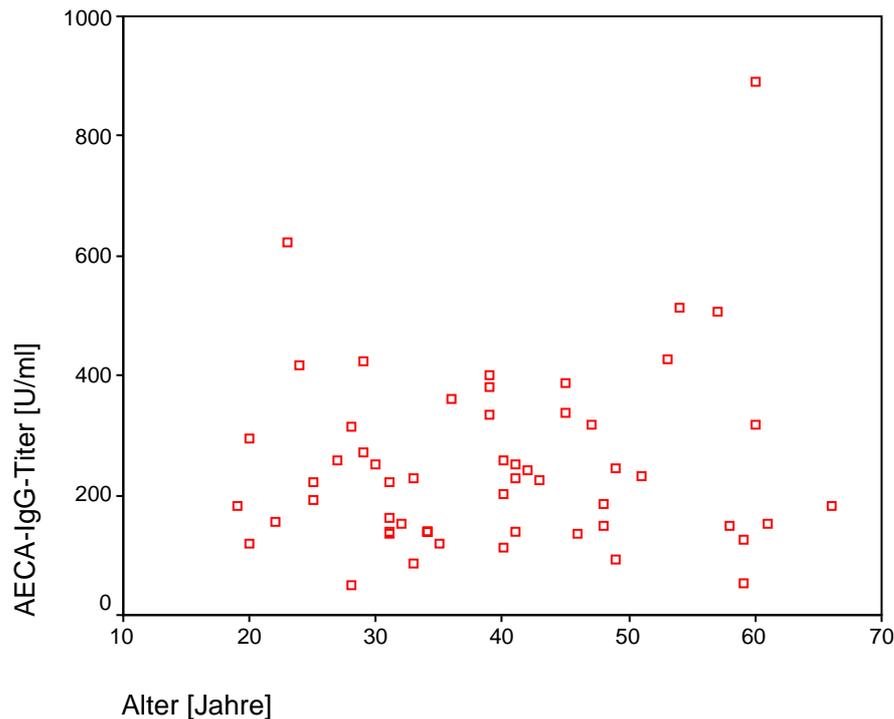


Abbildung 34: Korrelation zwischen Alter und AECA-IgG-Titer gemessen im cHUVeC-IgG. Die AECA-Titer von 56 gesunden Blutspendern im Alter zwischen 19 und 66 Jahren (mittleres Alter 39 Jahre) wurden bestimmt und ihre Korrelation zum Alter nach Spearman überprüft. Hierbei ergab sich für den zellulären HUVEC-ELISA eine Korrelation zwischen AECA-IgG-Titer und dem Alter von $r=0,0424$ ($p=0,757$).

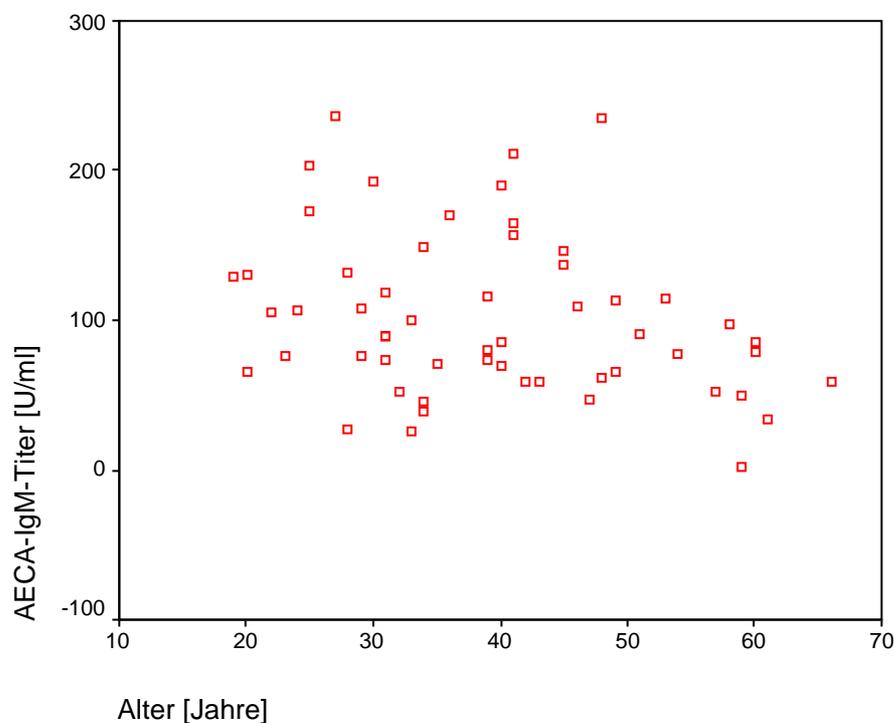


Abbildung 35: Korrelation zwischen Alter und AECA-IgM-Titer gemessen im cHUVeC-IgM. Die AECA-Titer von 56 gesunden Blutspendern im Alter zwischen 19 und 66 Jahren (mittleres Alter 39 Jahre) wurden bestimmt und ihre Korrelation zum Alter nach Spearman überprüft. Hierbei ergab sich für den zellulären HUVEC-ELISA eine Korrelation zwischen AECA-IgM-Titer und dem Alter von $r=-0,2619$ ($p=0,051$).

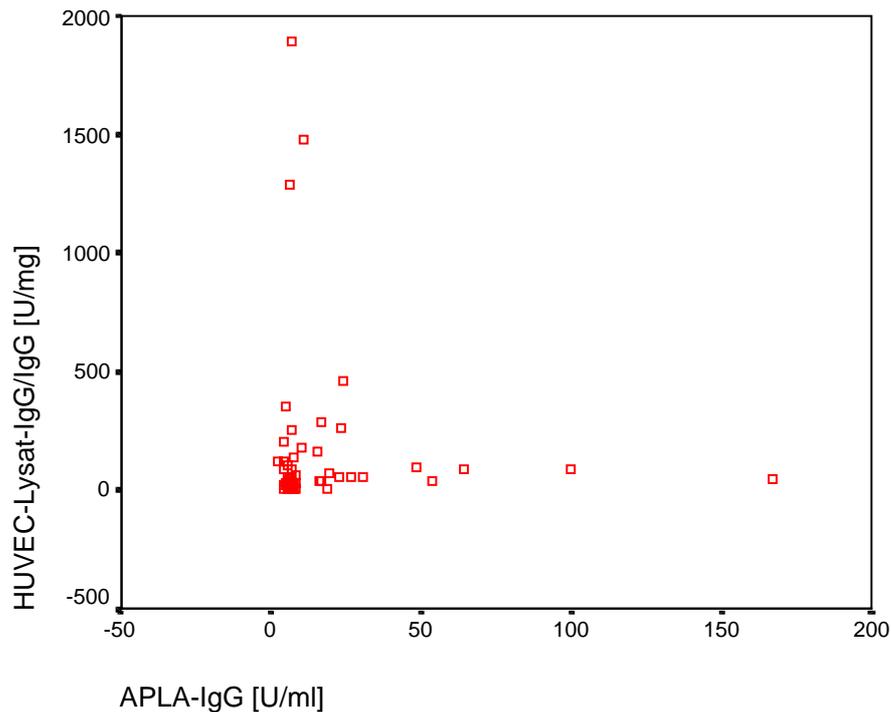


Abbildung 36: Korrelation zwischen Antiphospholipid-Antikörpern der Klasse IgG (APLA-IgG) und dem AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG. Bei 61 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG mit dem Vorliegen von Antiphospholipid-Antikörpern (APLA-IgG) verglichen. Nach Spearman zeigte sich hier keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgG und APLA-IgG ($r=0,092$, $p=0,480$).

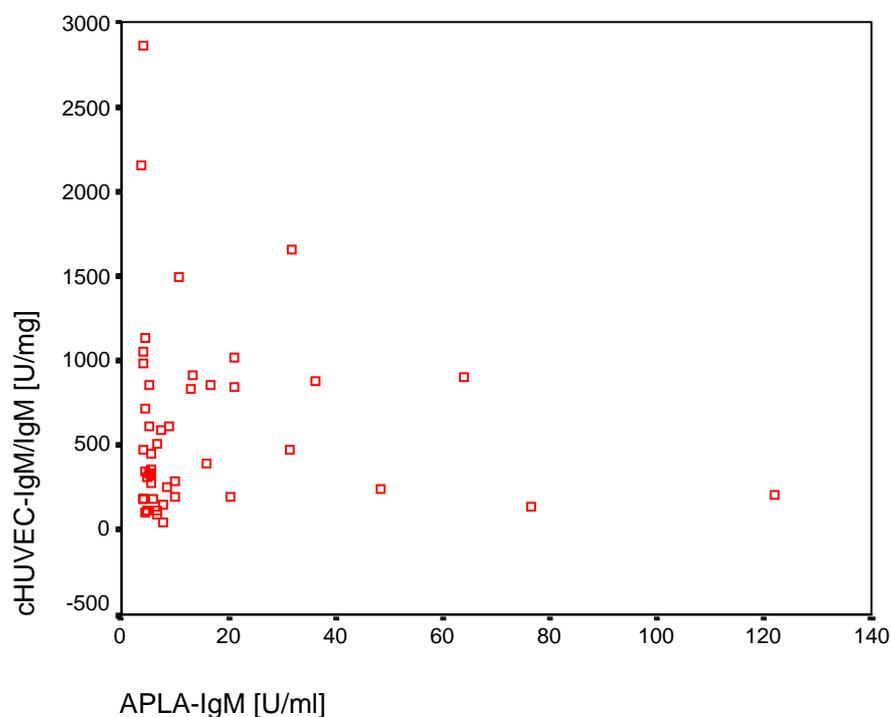


Abbildung 37: Korrelation zwischen Antiphospholipid-Antikörpern der Klasse IgM (APLA-IgM) und dem AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM. Bei 65 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM mit dem Vorliegen von Antiphospholipid-Antikörpern (APLA-IgM) verglichen. Nach Spearman zeigte sich hier eine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgM und APLA-IgM ($r=0,055$, $p=-0,239$).

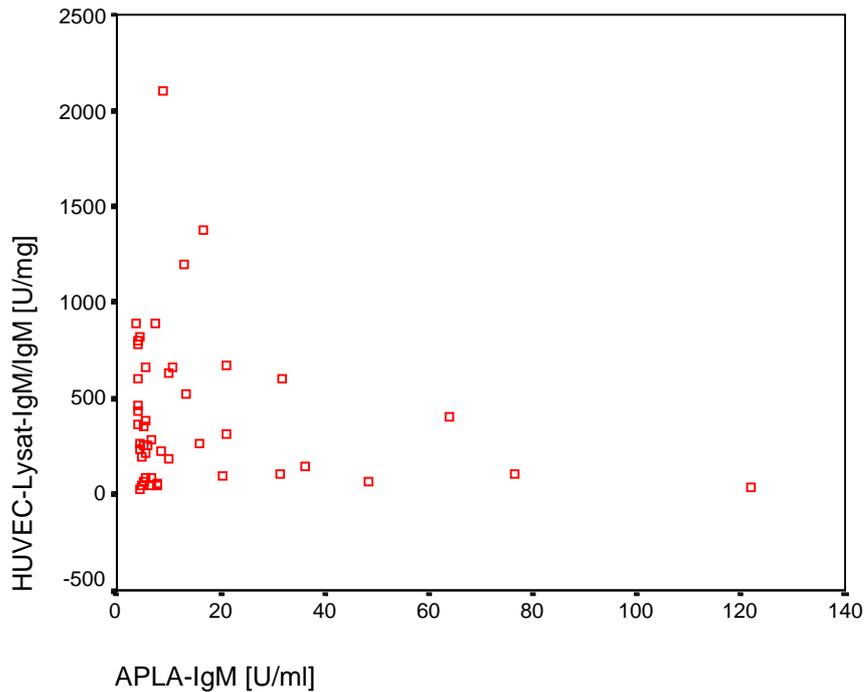


Abbildung 38: Korrelation zwischen Antiphospholipid-Antikörpern der Klasse IgM (APLA-IgM) und dem AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM. Bei 65 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM mit dem Vorliegen von Antiphospholipid-Antikörpern (APLA-IgM) verglichen. Nach Spearman zeigte sich hier keine signifikante Korrelation AECA-IgM und APLA-IgM ($r=-0,113$, $p=0,369$).

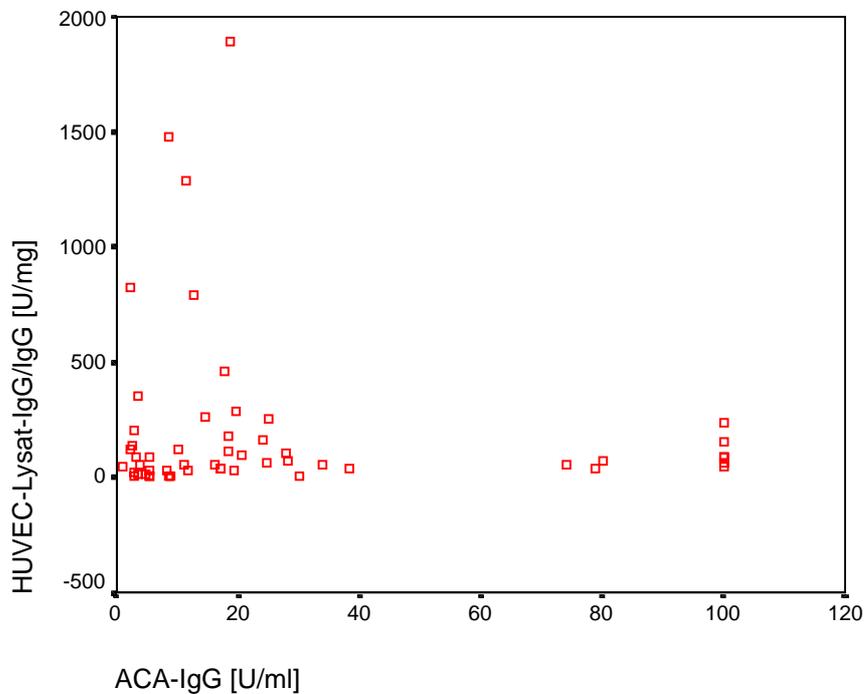


Abbildung 39: Korrelation zwischen Anticardiolipin-Antikörpern der Klasse IgG (ACA-IgG) und dem AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG. Bei 73 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG mit dem Vorliegen von Anticardiolipin-Antikörpern (ACA-IgG) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgG und ACA-IgG ($r=0,218$, $p=0,063$).

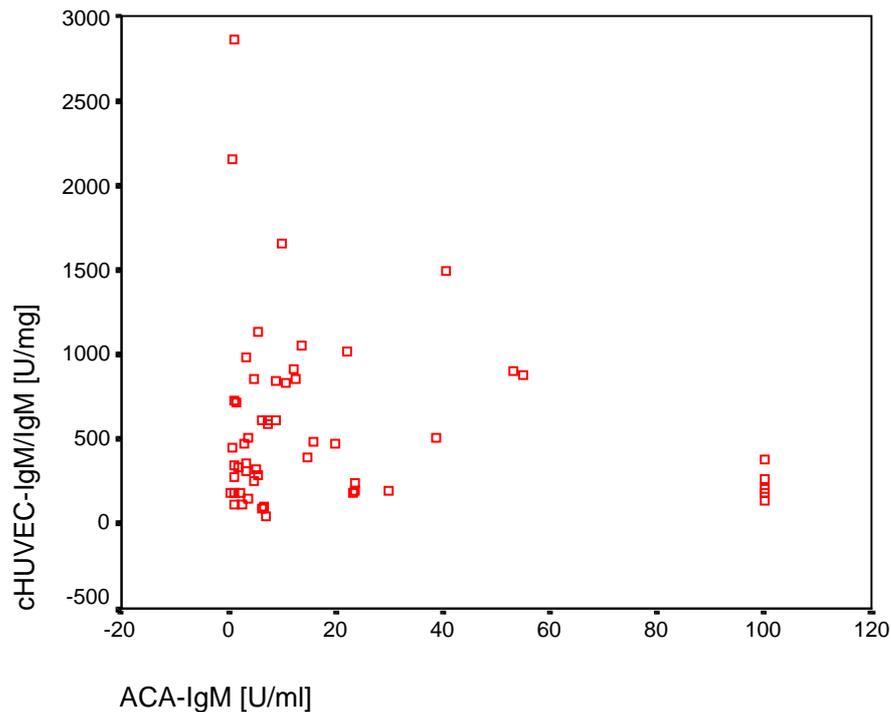


Abbildung 40: Korrelation zwischen Anticardiolipin-Antikörpern der Klasse IgM und dem AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM. Bei 77 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM mit dem Vorliegen von Anticardiolipin-Antikörpern (ACA-IgM) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgM und ACA-IgM ($r=0,006$, $p=0,960$).

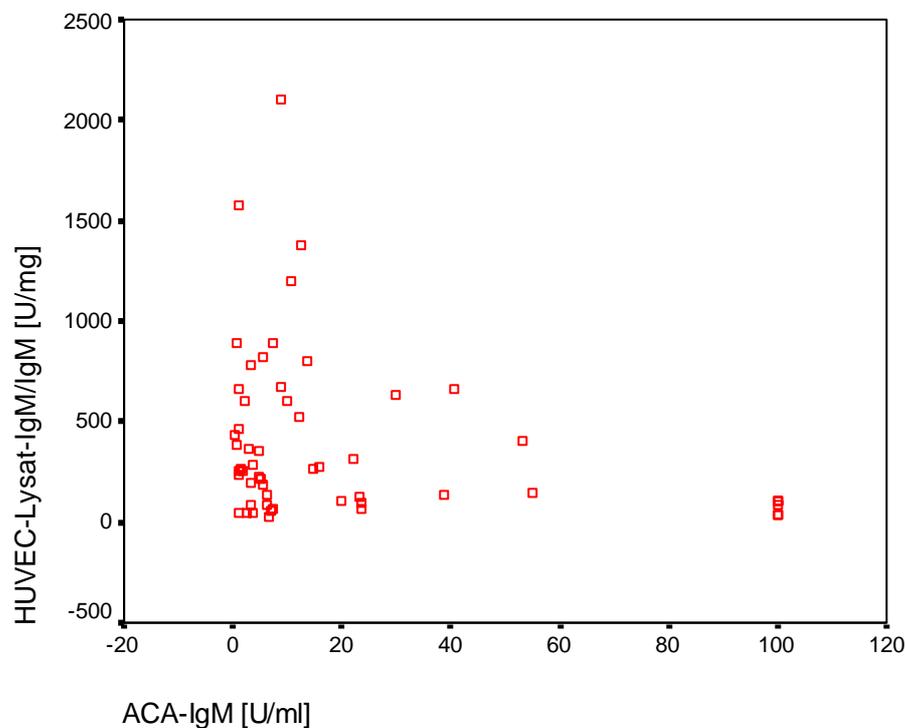


Abbildung 41: Korrelation zwischen Anticardiolipin-Antikörpern der Klasse IgM (ACA-IgM) und dem AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM. Bei 77 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM mit dem Vorliegen von Anticardiolipin-Antikörpern (ACA-IgM) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgM und ACA-IgM ($r=-0,192$, $p=0,094$).

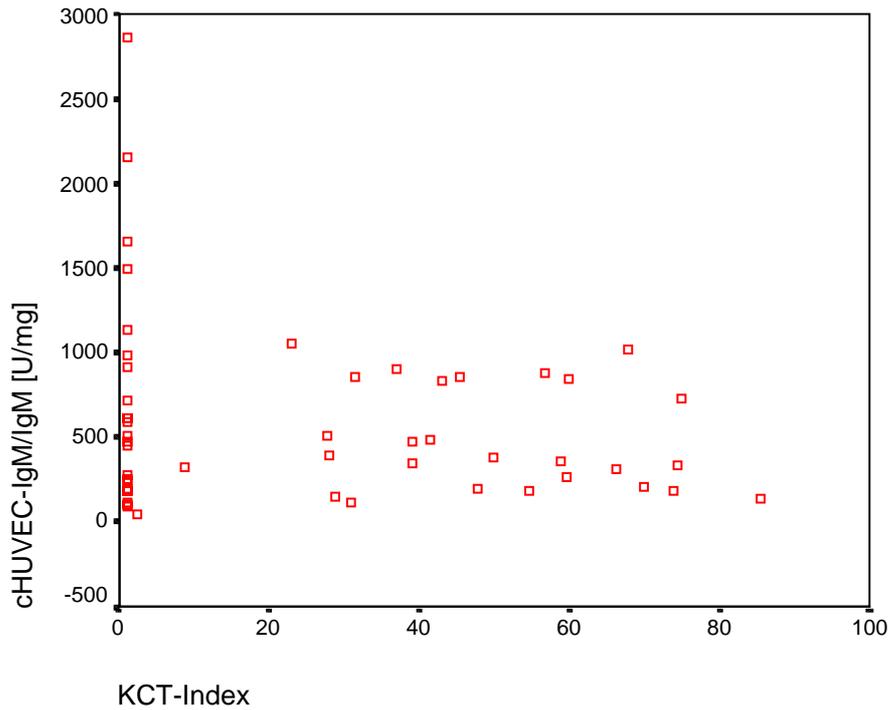


Abbildung 42: Korrelation zwischen KCT-Index und dem AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM. Bei 77 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM mit dem Vorliegen von Anticardiolipin-Antikörpern (ACA-IgM) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgM und ACA-IgM ($r=0,006$, $p=0,960$).

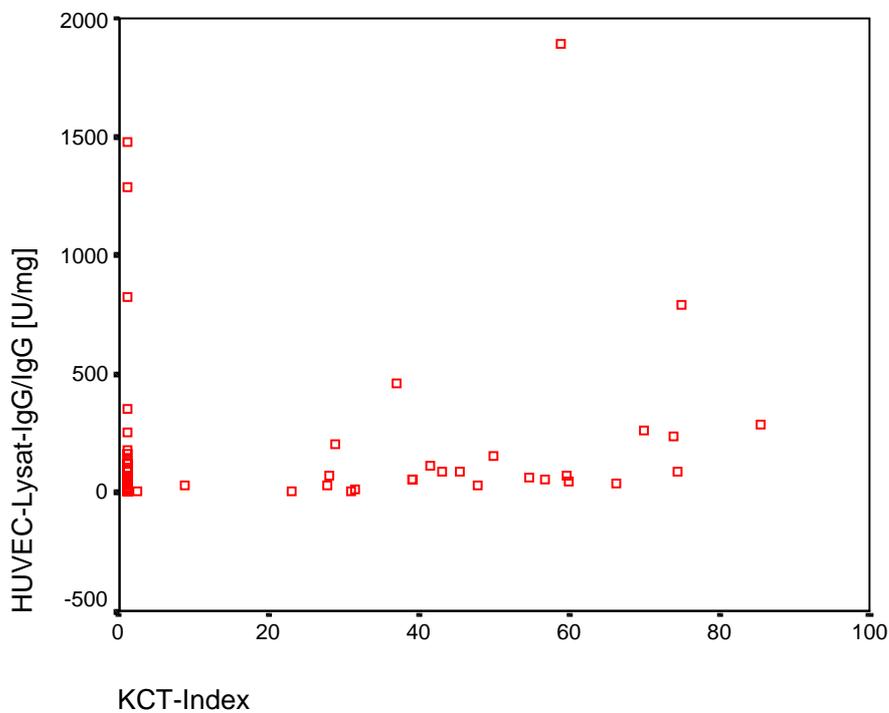


Abbildung 43: Korrelation zwischen KCT-Index und dem AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG. Bei 71 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG mit der Verlängerung der Kaolin-Klotting-Time (KCT-Index) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgG und dem KCT-Index ($r=0,195$, $p=0,100$).

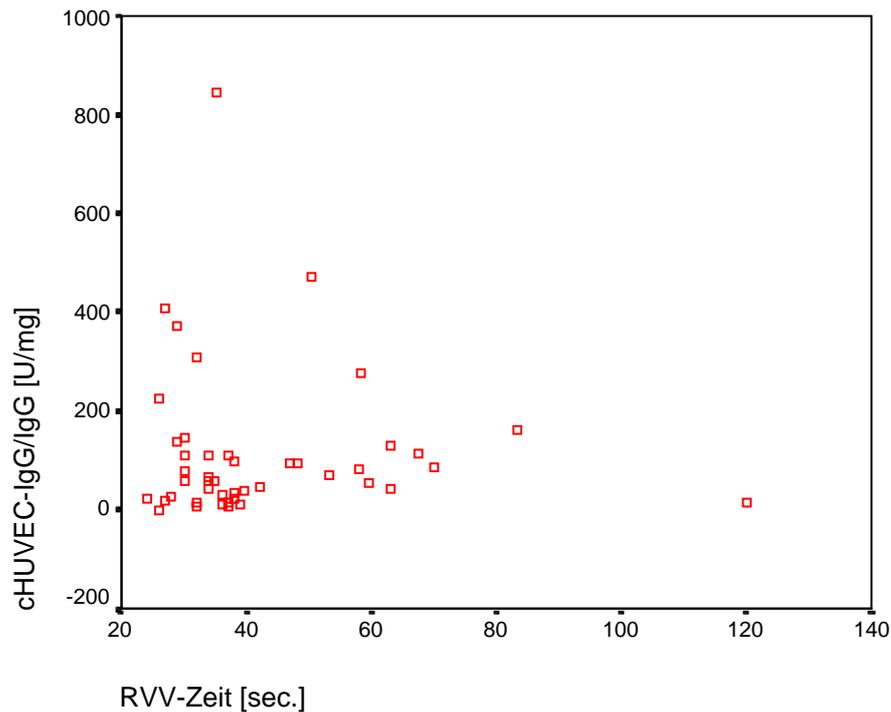


Abbildung 44: Korrelation zwischen RVV-Test und dem AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG. Bei 60 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgG/IgG mit den ermittelten Zeiten im Russel Viper Venom Test (RVV-Test) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgG und der RVV-Zeit ($r=0,117$, $p=0,374$).

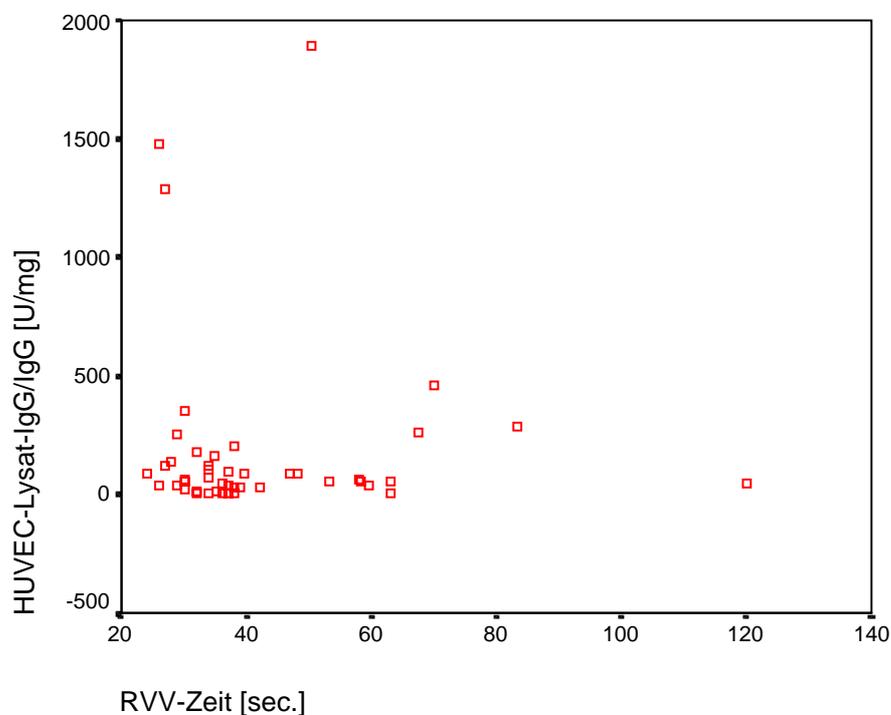


Abbildung 45: Korrelation zwischen RVV-Test und dem AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG. Bei 61 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgG/IgG mit den ermittelten Zeiten im Russel Viper Venom Test (RVV-Test) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgG und der RVV-Zeit ($r=-0,113$, $p=0,385$).

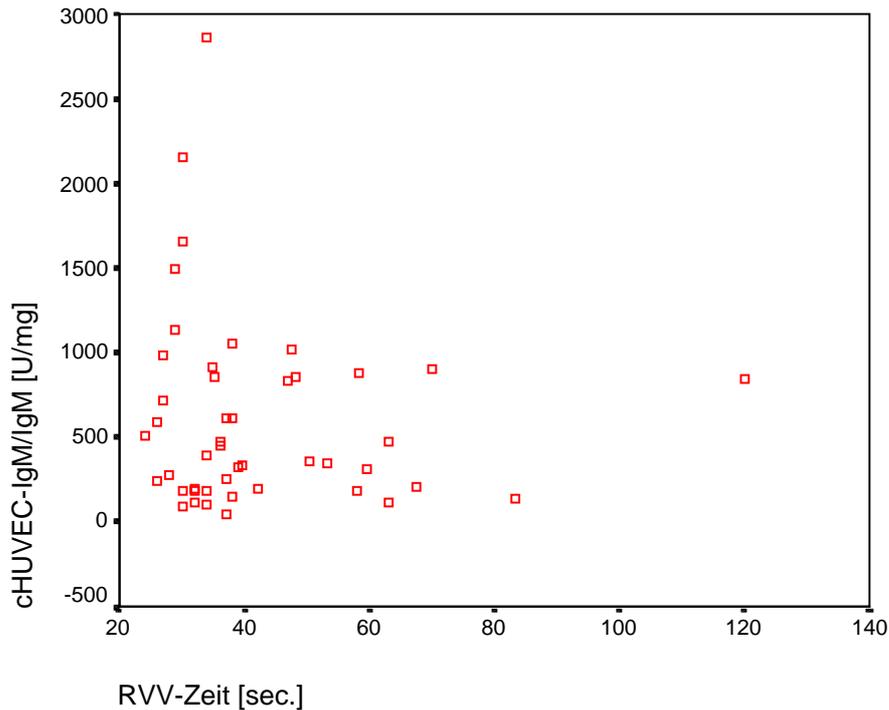


Abbildung 46: Korrelation zwischen RVV-Test und dem AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM. Bei 65 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten cHUVEC-IgM/IgM mit den ermittelten Zeiten im Russel Viper Venom Test (RVV-Test) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgM und der RVV-Zeit ($r=-0,077$, $p=0,543$).

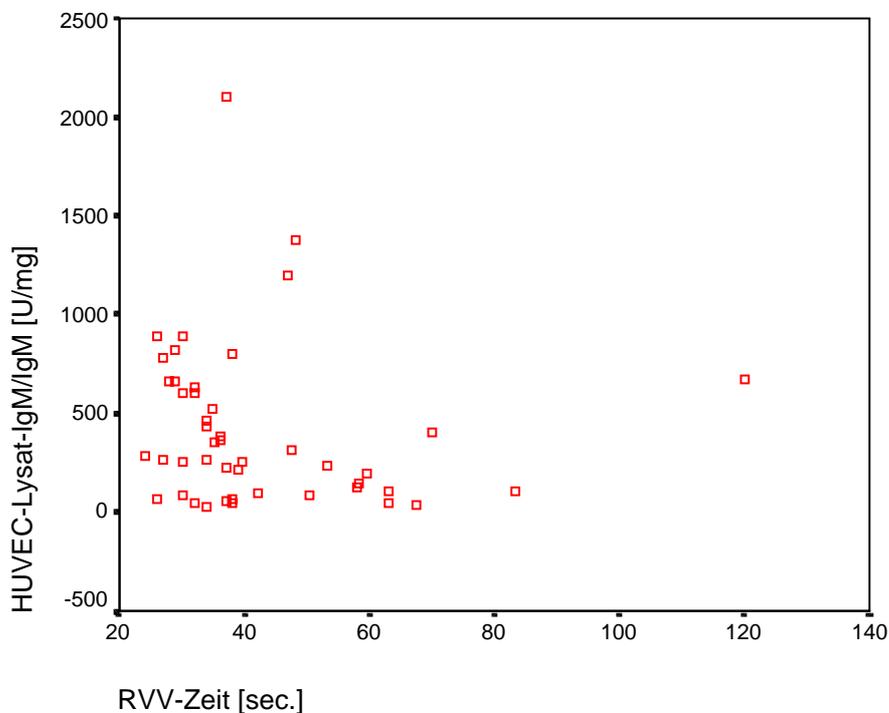


Abbildung 47: Korrelation zwischen RVV-Test und dem AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM. Bei 65 Patienten mit dem Verdacht auf das Vorliegen eines Lupus antikoagulans wurden die AECA-Quotienten HUVEC-Lysat-IgM/IgM mit den ermittelten Zeiten im Russel Viper Venom Test (RVV-Test) verglichen. Dabei zeigte sich nach Spearman keine signifikante Korrelation zwischen AECA-IgM und RVV-Zeit ($r=-0,203$, $p=0,106$).

9 Literaturverzeichnis

- ¹ Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P (2000)
The endothelial surface layer.
Pflugers Arch 440: 653-66.
- ² Benedict CR, Pakala R, Willerson JT (1994)
Endothelial-dependent procoagulant and anticoagulant mechanisms. Recent advances in
Understanding.
Tex Heart Inst J 21: 86-90.
- ³ Lijnen HR, Collen D (1997)
Endothelium in haemostasis and thrombosis.
Prog Cardiovasc Dis 39: 343-350.
- ⁴ Mascum JA, Rosenberg RD (1987)
Anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan and the vascular endothelium.
Semin Thromb Haemost 13: 464-474.
- ⁵ Mertens G, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Vermylen J, David G (1992)
Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core
protein characterization and antithrombin III binding properties.
J Biol Chem 267: 20435-20445.
- ⁶ Rosenberg RD, Rosenberg JS (1984)
Natural anticoagulant mechanisms.
J Clin Invest 74: 1-6.
- ⁷ Stern D, Brett J, Harris K, Nawroth P (1986)
Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the
synthesis and release of protein S.
J Cell Biol 102: 1971-1978.
- ⁸ Hajjar KA, Acharya SS (2000)
Annexin II and the regulation of cell surface fibrinolysis.
Ann N Y Acad Sci 902: 265-271.
- ⁹ Vassalli JD, Baccino D, Belin D (1985)
A cellular binding site for the M_r 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase.
J Cell Biol 100: 86-92.
- ¹⁰ Johns RA (1991)
Endothelium-derived relaxing factor: basic review and clinical implications.
J Cardiothorac Vasc Anesth 5: 69-79.
- ¹¹ Bassenge E (1991)
Antiplatelet effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide donors.
Eur Heart J 12: 12-15.

- ¹² Marcus AJ, Safier LB, Hajjar KA, Ullman HL, Islam N, Broekman MJ, Eiroa AM (1991)
Inhibition of platelet function by an aspirin-insensitive endothelial cell ADPase.
Thromboregulation by endothelial cells.
J Clin Invest 88: 1690-6.
- ¹³ Meghji P, Burnstock G (1995)
Inhibition of extracellular ATP degradation in endothelial cells.
Life Sci 57: 763-71.
- ¹⁴ Gayle RB 3rd, Maliszewski CR, Gimpel SD, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards C, Brasel K, Price V, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Broekman MJ, Marcus AJ. (1998)
Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39.
J Clin Invest 101: 1851-9.
- ¹⁵ Delvos U, Müller-Berghaus G (1985)
Die Bedeutung des Endothels der Gefäßwand für die Aufrechterhaltung der Hämostase.
Klin Wochenschr 63: 1237-1246.
- ¹⁶ Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC (1997)
Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation.
Int J Biochem Cell Biol 29: 91-105.
- ¹⁷ Munroe JM, Coran RS (1988)
The pathogenesis of atherosclerosis: arterogenesis and inflammation.
Lab Invest 58: 249-261.
- ¹⁸ Ley K (1996)
Molecular mechanisms of leucocyte recruitment in the inflammatory process.
Proc Cardiovasc Dis 39: 343-350.
- ¹⁹ Kevil CG, Bullard DC (1999)
Roles of leucocyte/endothelial cell adhesion molecules in the pathogenesis of vasculitis.
Am J Med 106: 677-687.
- ²⁰ Lie TJ (1994)
Nomenclature and classification of vasculitis: plus ça change, plus c'est la même chose.
Arthritis Rheum 37: 181-186.
- ²¹ Kallenberg CGM (2000)
Vasculitis: Clinical approach, pathophysiology and treatment.
Wien Klin Wochenschr 112/15-16: 656-659.
- ²² Breedveld FC, Daha MR (1996)
Vasculitis: Mechanisms of injury.
In: The Vasculitides.
Ansell BM, Bacon PA, Lie TJ, Yacici H (Hrsg.)
Chapman & Hall

- ²³ Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, Hughes GR (1983)
Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus.
Lancet 2: 1211-1214.
- ²⁴ Boey ML, Colaco CB, Gharavi AE, Elkon KB, Loizou S, Hughes GR (1983)
Thrombosis in SLE: striking association with the presence of "lupus anticoagulant".
Br Med J 287: 1021-1023.
- ²⁵ Hughes GRV (1983)
Thrombosis, abortions and cerebral disease and the lupus anticoagulant.
Br Med J 287: 1088-1089.
- ²⁶ Levine MD, Branch DW, Rauch J (2002)
The antiphospholipid syndrome.
N Engl J Med 346: 752-763.
- ²⁷ Mc Neil HP, Simpson RJ, Chestermann CCN, Krillis SA (1990)
Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid binding inhibitor of coagulation: β_2 Glykoprotein I (apolipoprotein H).
Proc Natl Acad Sci USA 87: 4120-4124.
- ²⁸ Galli M, Comfurius P, Maasen C, Hemker HC, De Baetes MH, van Breda-Vriesman PJC, Barbui T, Zwaal RFA, Brevers EM (1990)
Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma cofactor.
Lancet 335: 1544-1547.
- ²⁹ Matruura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T (1990)
Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease.
Lancet 336: 177-178.
- ³⁰ Lechner K, Pötzsch B (1998)
Lupus antikoagulans.
In: Hämostaseologie
Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg.)
Springer
- ³¹ Triplett DA (1995)
Antiphospholipid-protein antibodies: Laboratory detection and clinical relevance.
Thromb Res 78: 1-31.
- ³² Meroni PL, Raschi E, Camera M, et al. (2000)
Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome.
J Autoimmun 15: 237-240.
- ³³ Ames PRJ (1994)
Antiphospholipid antibodies, thrombosis and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: a unifying 'membrane stress syndrome' hypothesis.
Lupus 3: 371-377.

- ³⁴ Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuot T (1993)
Crossreaktion between oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus.
Lancet 341: 923-925.
- ³⁵ Oosting DJ, Derksen RHW, Bobbink IWG, Hackeng TM, Bouma BN, de Groot PG (1993)
Antiphospholipid antibodies directed to a combination of phospholipids with prothrombin, protein C or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism?
Blood 81: 2618-2625.
- ³⁶ Pötzsch B, Kawamura H, Preissner KT, Schmidt M, Seelig C, Müller-Berghaus G (1994)
Acquired protein C dysfunction but not decreased activity of thrombomodulin is a possible marker of thrombophilia in patients with lupus anticoagulant.
J Lab Clin Med 125: 56-65.
- ³⁷ Kandiah DA, Krilis SA (1994)
Beta2-Glycoprotein I.
Lupus 3: 207-212.
- ³⁸ Smirnov D, Triplett DA, Comp PC, Esmon CT (1995)
Role of phosphatidylethanolamine in inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies.
J Clin Invest 95: 309-316.
- ³⁹ Tincani A, Balestrieri G, Allegri F, et al. (2000)
Overview of anticardiolipin ELISA standardization.
J Autoimmun 15: 195-197.
- ⁴⁰ Roubey RAS (2000)
Tissue factor pathway and the antiphospholipid syndrome.
J Autoimmun 15: 217-220.
- ⁴¹ Rand JH, Wu XX, Andree HAM, et al. (1997)
Pregnancy loss in the antiphospholipid syndrome-a possible thrombogenic mechanism.
N Engl J Med 337: 154-160.
Erratum, N Engl J Med 337: 1327.
- ⁴² Arnaut J (1996)
The pathogenesis of antiphospholipid syndrome: a hypothesis based on parallelism with heparin-induced thrombocytopenia.
Thromb Haemost 75: 536-541.
- ⁴³ Godeau B, Piette JC, Fromont P, Intrator L, Schaeffer A, Bierling P (1997)
Specific antiplatelet glycoprotein autoantibodies are associated with the thrombocytopenia of primary antiphospholipid syndrome.
Br J Haematol 98: 873-9.

- ⁴⁴ Panzer S, Gschwandtner ME, Hütter D, Spitzauer S, Pabinger I (1997)
Specificities of platelet autoantibodies in patients with lupus anticoagulants in primary antiphospholipid syndrome.
Ann Haematol 74: 239-242.
- ⁴⁵ Lindquist KJ, Osterland CK (1971)
Human antibodies to vascular endothelium.
Clin Exp Immunol 9: 753-60.
- ⁴⁶ Tan EM, Pearson CM (1972)
Rheumatic disease sera reactive with capillaries in the mouse kidney.
Arthritis Rheum 15: 23-8.
- ⁴⁷ Savage COS (1994)
Endothelial cell antibodies: Pathogenetic or epiohenomenon?
Nephrol Dial Transplant 9: 1362-1363.
- ⁴⁸ Meroni PL, Del Papa N, Raschi E, Panzeri P, Borghi MO (1997)
Is there any pathogenetic role for anti-endothelial cell antibodies (AECA) in vasculitis.
J Biol Regul Homeost Agents 11: 127-132.
- ⁴⁹ Cines DB, Lyss AP, Reeber M, Bina M, DeHoratius RJ (1984)
Presence of complement-fixing anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus.
J Clin Invest 73: 611-625.
- ⁵⁰ Heurkens AHM, Hiemstra PS, Lafeber GJM, Daha MR, Breedveld FC (1989)
Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis.
Clin Exp Immunol 78: 7-12.
- ⁵¹ Leung DYM, Collins T, Lapierre LA, Geha RS, Pober JS (1986)
IgM antibodies present in the acute phase of Kawasaki syndrome lyse cultured vascular endothelial cells stimulated by gamma interferon.
J Clin Invest 77: 1428-1435.
- ⁵² Leung DYM, Geha RS, Newburger JW, Burns JC, Fiers W, Lapierre LA, et al. (1986)
Two monokines, Il-2 and TNF, render cultured vascular endothelial cells susceptible to lysis by antibodies circulating during Kawasaki syndrome.
J Exp Med 164: 1958-1972.
- ⁵³ Ferraro G, Meroni PL, Tincani A, Sinico A, Barcellini W, Radice A, Gregorini G, Frolidi M, Borghi MO, Balestrieri G (1990)
Anti-endothelial cell antibodies in patients with Wegener's granulomatosis and micropolyarteritis.
Clin Exp Immunol 79: 47-53.
- ⁵⁴ Pober JS, Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Reiss CS, Burakoff SJ Fiers W, et al. (1983)
Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human gamma interferon.
J Exp Med 157: 1339-1353.

- ⁵⁵ Ballieux BEPB, Zondevan KT, Kievit P, Hagen EC, van Es LA, van der Woude LA, et al. (1994)
Binding of proteinase 3 and myeloperoxidase to endothelial cells: ANCA mediated endothelial damage through ADCC?
Clin Exp Immunol 97: 52-60.
- ⁵⁶ Nylander-Lundqvist E, Back O, Nilsson TK, Rantapaa-Dahlquist S (1992)
Prevalence of anti-endothelial cell antibodies in patients with autoimmune diseases.
Clin Rheumatol 11: 248-253.
- ⁵⁷ Perry GJ, Elston T, Khouri NA, Chan TM, Cameron JS, Frampton G (1993)
Anti-endothelial cell antibodies in lupus: Correlation with renal injury and circulating markers of endothelial damage.
Q J Med 86: 727-734.
- ⁵⁸ Chan TM, Cheng IKP (1996)
A prospective study on anti-endothelial cell antibodies in patients with systemic lupus erythematosus.
Clin Immunol Immunopathol 78: 41-46.
- ⁵⁹ Gobel U, Eichorn J, Kettritz R, Briedigkeit L, Sima D, Lindhau C, et al. (1996)
Disease activity and autoantibodies to endothelial cells in patients with Wegener's granulomatosis.
Am J Kidney Dis 28: 186-194.
- ⁶⁰ Kaneko K, Savage COS, Pottinger BE, Saha V, Pearson JD, Dillon MJ (1994)
Anti-endothelial cell antibodies can be cytotoxic to endothelial cells without cytokine prestimulation and correlate with ELISA antibody measurement in Kawasaki disease.
Clin Exp Immunol 8: 264-269.
- ⁶¹ Fujieda M, Oishi N, Kurashige T (1997)
Antibodies to endothelial cells in Kawasaki disease lyse endothelial cells without pre-treatment.
Clin Exp Immunol 107: 120-126.
- ⁶² Hill MB, Phillips JL, Hughes P, Greaves M (1998)
Anti-endothelial cell antibodies in primary antiphospholipid syndrome and SLE: pattern of reactivity with membrane antigens on microvascular and umbilical venous cell membranes.
Br J Haematol 103: 416-421.
- ⁶³ Blank M, Krause I, Goldkorn T, Praprotnik S, Livnieh A, Langevitz P, Kaganovsky E, Morgenstern S, Cohen S, Barak V, Eldor A, Weksler B, Shoenfeld Y (1999)
Monoclonal anti-endothelial antibodies from patients with Takayasu arteriitis activate endothelial cells from large vessels.
Arthritis Rheum 42: 1421-1432.
- ⁶⁴ George J, Blank M, Levy Y, Meroni P, Damianovich M, Tincani A, Shoenfeld Y (1998)
Differential effects of beta2-glycoprotein I antibodies on endothelial cells and on the manifestations of experimental antiphospholipid syndrome.
Circulation 97: 900-906.

- ⁶⁵ Del Papa N, Guidali L, Sironi M, Shoenfeld Y, Mantovano A, Tincani A, Balestrieri G, Radice A, Sinico RA, Meroni PL (1996)
Anti-endothelial cell IgG antibodies from patients with Wegener's granulomatosis bind to human endothelial cells in vitro and induce adhesion molecule expression and cytokine secretion cells.
Arthritis Rheum 39: 758-766.
- ⁶⁶ Carvalho D, Savage COS, Isenberg D, Pearson J (1999)
IgG anti-endothelial cell antibodies from patients with systemic lupus erythematosus or systemic vasculitis stimulate the release of two endothelial cell derived mediators, which enhance adhesion molecule expression and leucocyte adhesion in an autocrine manner.
Arthritis Rheum 42: 631-640.
- ⁶⁷ Yaziki ZA, Raschi E, Patel A, Testoni C, Borghi MO, Graham AM, Meroni PL, Lindsey N (2001)
Human monoclonal anti-endothelial cell IgG-derived from a systemic lupus erythematosus patient binds and activates human endothelium in vitro.
Int Immunol 13: 349-357.
- ⁶⁸ Rastaldi MP, Ferrario F, Tunesi S, Yang L, D'Amico G (1996)
Intraglomerular and interstitial leukocyte infiltration, adhesion molecules, and interleukin-1 α expression in 15 cases of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated renal vasculitis.
Am J Kidney Dis 27: 48-57.
- ⁶⁹ Savage CO (1993)
Interactions between leukocytes, the vascular endothelium and autoantibodies in the development of systemic vasculitis.
Ann Med Interne 144: 353-6.
- ⁷⁰ Damianovich M, Gilburd B, George J, Del Papa N, Afek A, Goldberg I, Kopolovic Y, Roth D, Barkai G, Meroni PL, Shoenfeld Y (1996)
Pathogenetic role of antiendothelial cell antibodies (AECA) in vasculitis: an idiopathic experimental model.
J Immunol 156: 4946-4951.
- ⁷¹ Lindsey NJ, Henderson FI, Malia R, Milford-Ward A, Greaves M, Hughes P (1994)
Inhibition of prostacyclin release by endothelial binding anticardiolipin antibodies in thrombosis-prone patients with the antiphospholipid syndrome.
Br J Rheum 33: 20-26.
- ⁷² Carvalho D, Savage COS, Black CM, Pearson JD (1996)
IgG antiendothelial cell antibodies from scleroderma patients induce leucocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro.
J Clin Invest 97: 111-119.
- ⁷³ Hill MB, Phipps JL, Malia RG, Greaves M, Hughes P (1995)
Characterization and specificity of anti-endothelial cell membrane antibodies and their relationship to thrombosis in primary antiphospholipid syndrome (APS).
Clin Exp Immunol 102: 368-72.

- ⁷⁴ Matsuda J, Gotoh M, Gohchi K, Kawasugi K, Tsukamoto M, Saitoh N (1997)
Anti-endothelial cell antibodies to the endothelial hybridoma cell line (EAhy926) in systemic lupus erythematosus patients with antiphospholipid antibodies.
Br J Haematol 97: 227-32.
- ⁷⁵ Del Papa N, Guidali L, Spatola L, Bonara P, Boghi MO, Tincani A, Balistrieri G, Meroni PL (1995)
Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies III: beta 2 glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules.
Clin Exp Rheumatol 13: 179-185.
- ⁷⁶ Yap HK, Saki RS, Bahn L, Rappaport V, Woo KT, Anathuraman V, et al. (1994)
Antivascular endothelial cell antibodies in patients with IgA nephropathy: Frequency and clinical significance.
Clin Immunol Immunopathol 96: 444-449.
- ⁷⁷ Meroni PL, Khamashta MA, Youinou P, Shoenfeld Y (1995)
Review of the first workshop on anti-endothelial antibodies: Clinical and pathological significance.
Lupus 4: 95-99.
- ⁷⁸ Cines D, McCrae K (1994)
Detection of antiendothelial cell and antithromboplastin antibodies in patients with antiphospholipid antibodies.
Pathol Biol 42: 792-793.
- ⁷⁹ Vismara A, Meroni PL, Tincani A, Harris EN, Barcellini W, Brucato A, et al. (1988)
Relationship between anti-cardiolipin and anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus.
Clin Exp Immunol 74: 247-253.
- ⁸⁰ Westphal JR, Boerbooms ATH, Schalwijk CJM, Kwast H, De Weijert M, Jakob C, et al. (1994)
Anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with autoimmune diseases: Comparison between ELISA and FACS analysis.
Clin Exp Immunol 96: 444-449.
- ⁸¹ Direskeneli H, D' Cruz, Khamashta AM, Hughes RV (1991)
Autoantibodies against endothelial cells, extracellular matrix, and human collagen IV in patients with systemic vasculitis.
Clin Immunol Immunopathol 70: 206-210.
- ⁸² Gabrielli A, Montroni M, Rupoli S, Caniglia ML, De Lusto F, Danieli G (1988)
A retrospective study of antibodies against basement membrane antigens (type IV collagen and laminin) in patients with primary and secondary Raynaud's phenomenon.
Arthritis Rheum 31: 1433-1436.

- ⁸³ Frampton G, Moriya S, Pearson JD, Isenberg DA, Ward FJ, Smith TA, Panayiotou A, Stains NA, Murphy JJ (2000)
Identification of candidate endothelial cell autoantigens in systemic lupus erythematosus using a molecular cloning strategy: a role for ribosomal P protein P0 as an endothelial cell antigen.
Rheumatology 39: 1114-1120.
- ⁸⁴ Chan TM, Frampton G, Cameron JS (1992)
Different mechanisms by which anti-DNA monoclonal antibodies bind to human endothelial cells and glomerular mesangial cells.
Clin Exp Immunol 88: 68-74.
- ⁸⁵ Frampton G, Perry GJ, Chan TM, Cameron JS (1992)
Significance of anticardiolipin and antiendothelial cell antibodies in the nephritis of lupus.
Contrib Nephrol 99: 7-16.
- ⁸⁶ Collins T, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes DJ, Fiers W et al. (1984)
Interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts.
Proc Natl Acad Sci 81: 4917-4921.
- ⁸⁷ Pober JS, Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Reiss CR, Burakoff SJ, Fiers W et al. (1983)
Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and human gamma interferon.
J Exp Med: 157:1339-1353.
- ⁸⁸ Noris M (2001)
Pathogenesis of Takayasu's arteritis.
J Nephrol 14: 506-513.
- ⁸⁹ Mayet WJ, Csernok E, Szymkowiak C, Gross WL, Meyer zum Büschenfelde KH (1993)
Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis.
Blood 82: 1221-1229.
- ⁹⁰ Savage COS, Gaskin G, Pusey CD, Pearson JD (1993)
Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies can recognize vascular endothelium cell bound ANCA-associated antigens.
Exp Nephrol 1: 190-195.
- ⁹¹ Sibelius U, Hattar K, Schenkel A, Noll T, Csernok E, Gross WL, et al. (1998)
Wegener's granulomatosis: anti proteinase 3 antibodies are potent inducers of human endothelial cell signalling and leakage response.
J Exp Med 197: 497-503.
- ⁹² Ationu A (1998)
Identification of endothelial antigens relevant to transplant coronary artery disease from a human endothelial cell cDNA expression library.
Int J Mol Med 1:1007-1010.

- ⁹³ Linke AT, Marchant B, Marsh P, Frampton G, Murphy J, Rose ML (2001)
Screening of a HUVEC cDNA library with transplant-associated coronar artery disease sera identifies RPL7 as a candidate autoantigen associated with this disease.
Clin Exp Immunol 126: 173-179.
- ⁹⁴ Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973)
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins.
J Clin Invest 52: 2745-2756.
- ⁹⁵ Engvall E, Perlmann P (1971)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 8: 871-879.
- ⁹⁶ Crowther JR (1995)
ELISA: Theorie and Practice.
Methods in Molecular Biologie, Vol. 42.
Humana Press
- ⁹⁷ Smith J (1992)
Enzyme linked immunosorbent assay.
In: Current Protocols in Molecular Biology.
Ansel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA (Hrsg.)
John Wiley & Sons
- ⁹⁸ Pöttsch B, Madlener K (1995)
Lupus antikoagulans: Klinik, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie.
Haemostaseologie 15: 104-110.
- ⁹⁹ Aoki K, Hayashi Y, Hirao Y, Yagami Y (1993)
Specific antiphospholipid antibodies as a predictive in patients with current fetal loss.
Am J Reprod Immunol 29: 82-87.
- ¹⁰⁰ Ogasawara M, Sasa H, Katano K, Aoyama T, Aoki K, Suzumori K (1998)
Recurrent abortion and moderate or strong antiphospholipid antibody production.
Int J Gynecol Obstet 62: 183-188.
- ¹⁰¹ Karmochkine M, Mazoyer E, Marcelli A, Boffa MC, Piette JC (1996)
High prevalence of antiphospholipid antibodies in disseminated intravascular coagulation.
Thromb Haemost 75: 971.
- ¹⁰² Galli M, Finacci G, Norbis F, Marziali S, Marchioli R, Barbui T (1999)
The risk of thrombosis in patients with lupus anticoagulans is predicted by their specific coagulation profil.
Throm Haemost 81: 695-700.
- ¹⁰³ Harris EN, Chan JK, Asherson RA; Aber VR Gharavi AE, Hughes GR (1986)
Thrombosis current fetal loss, and Thrombozytopenia. Predictive value of the anticardiolipin antibody test.
Arch Intern Med 146: 2153-2156.

- ¹⁰⁴ Margolis J (1958)
The kaolin clotting time. A rapid one-stage method for diagnosis of coagulation defects.
J Clin Pathol 11: 406-407.
- ¹⁰⁵ Rosner E, Pauzner R, Lusky A, Modan M, Many A (1987)
Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity.
Thromb Haemost 57: 144-147.
- ¹⁰⁶ Exner T, Triplett AD, Traberner T, Machin SJ (1991)
Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants.
Thromb Haemost 65: 320-322.
- ¹⁰⁷ Bachetti T, Morbidelli L (2000)
Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions.
Pharmacol Res 42: 9-19.
- ¹⁰⁸ Heurkens AHM, Hiemstra PS, Lafeber GJM, Daha MR, Breedveld FC (1989)
Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis.
Clin Exp Immunol 78: 7-12.
- ¹⁰⁹ Ronda N, Haury M, Nobrega A, Kaveri SV, Coutinho A, Kazatchkine MD (1994)
Analysis of natural and disease associated autoantibody repertoires: Anti-endothelial cell IgG autoantibody activity in serum of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus.
Intern Immunol 6: 1651-1660.
- ¹¹⁰ Del Papa N, Conforti G, La Rosa L, Tincana A, D'Cruz, et al. (1994)
Characterization of the endothelial surface proteins recognized by anti-endothelial cell antibodies in primary and secondary autoimmune vasculitis.
Clin Exp Immunopathol 70: 211-216.
- ¹¹¹ Savage COS, Pottinger BE, Gaskin G, Lockwood CM, Pusey CD (1991)
Vascular damage in Wegener's granulomatosis and micropolyarteritis: presence of anti-endothelial cell antibodies and their relation to anti-neutrophil cytoplasm antibodies.
Clin Exp Immunol 85: 14-19.
- ¹¹² Brasile L, Kremer J, Clarke J, Cerrilli J (1987)
Identification of an autoantibody to vascular endothel cell-specific antigen in patients with systemic vasculitis.
Am J 87: 74-80.
- ¹¹³ Souillou PJ, Peyrat MA, Guenel J (1981)
Studies of pre- and postgraft antibodies against endothelial cells (umbilical cord) in kidney allografts.
Transpl Proc 13: 1551-1555.
- ¹¹⁴ Tripathy NK, Upadyaya S, Sinha N, Nitryanand S (2001)
Complement and cell mediated cytotoxicity by antiendothelial cell antibodies in Takayasu's arteriitis.
J Rheumatol 28: 805-808.

- ¹¹⁵ Holt CM, Lindsay N, Moulton J, Malia RG, Greaves M, Hume A, et al. (1989)
Antibody-dependent cellular cytotoxicity of vascular endothelium: Characterization and pathogenetic association in systemic sclerosis.
Clin Exp Immunol 78: 359-365.
- ¹¹⁶ Martinuzzo ME, Forestiero RR, Carreras LO (1995)
Anti- β_2 -glycoprotein antibodies: Detection and association with thrombosis.
Br J Haematol 89: 397-402.
- ¹¹⁷ Miltenberg AMM, Meijer-Papa ME, Weening JJ, Daha MR, van Es LA, van der Woude FJ (1989)
Induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity against endothelial cells by renal transplantation.
Transplantation 48: 681-688.
- ¹¹⁸ Penning CA, French MAH, Rowell NR, Hughes P (1985)
Antibody-dependent cellular cytotoxicity of human vascular endothelium in systemic lupus erythematosus.
Clin Lab Immunol 17: 125-130.
- ¹¹⁹ Youinou P, Meroni PL, Khamastha MA, Shoenfeld Y (1995)
A need for standardization of the anti-endothelial antibody test.
Immunol Today 16: 363-364.
- ¹²⁰ Belizna C, Tervaert JWC (1997)
Specificity, pathogenecity, and clinical value of antiendothelial cell antibodies.
Semin Arthritis Rheum 27: 98-109.
- ¹²¹ Van der Zee JM, Siegert CEH, de Vreede TA, Daha MR, Breedvelt FC (1991)
Characterization of anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus.
Clin Exp Immunol 84: 238-244.
- ¹²² Koenig DW, Barley-Melony L, Daniel TO (1993)
A western blot assay detects autoantibodies to cryptic endothelial antigens in thrombotic microangiopathies.
J Clin Immunol 13: 204-210.
- ¹²³ Cervera R, Navarro M, Lopez-Soto A, Cid MC, Front J, Esparza J, et al. (1994)
Antibodies to endothelial cells in Behcet's disease: cell binding heterogeneity and association with clinical activity.
Ann Rheum Dis 53: 265-267.
- ¹²⁴ Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G (2000)
Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95.
Arthritis Rheum 43: 2550-2562.
- ¹²⁵ Nakagawa Y, Saito K, Morioka T, Tomita Y, Takahashi K, Oite T (2002)
Serum antibody activity to glomerular endothelial cells is a prospective indicator of renal allograft rejection.
Clin Exp Nephrol 6: 111-117.

- ¹²⁶ Heurkens AHM, Gorter A, de Vreede TM, Edgell CS, Breedveld FC, Daha MR (1991)
Methods for the detection of anti-endothelial cell antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay.
J Immunol Methods 141: 33-39.
- ¹²⁷ Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ (1992)
HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line.
J Invest Dermatol 99: 683-690.
- ¹²⁸ Adler Y, Salozhin K, Le Tonqueze M, Shoenfeld Y, Youinou P (1994)
Antiendothelial cell antibodies: a need for standardization.
Lupus 3: 77-84.
- ¹²⁹ Meyer O, Kaiser P, Haim T, Edgell CJ, Pasquier C, de Bandt M, Bridey F, Sellak H, Lansaman J, Kahn MF (1995)
Anti-vascular endothelial cell antibodies (AECA): comparison of two assay methods and clinical applications.
Rev Rhum Engl Ed 62: 737-747.
- ¹³⁰ Gerritsen ME (1987)
Functional heterogeneity of vascular endothelial cells.
Biochem Pharmacol 36: 2701-2711.
- ¹³¹ Schoen FJ (1994)
Blood vessels.
In: Robbins Pathologic Basis of disease, 5th ed
Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (Hrsg.)
Saunders,
- ¹³² Kain R, Matsui K, Exner M, Binder S, Scaffner G, Sommer EM, et al. (1995)
A novel class of autoantigens of antineutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: The lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells.
J Exp Med 3: 46-55.
- ¹³³ George J, Aron A, Levy Y, Gilburd B, Ben-David A, Renaudinea Y, Zonana-Nachach A, Youinou P, Harata D, Shoenfeld (1999)
Anticariolin, anti-endothelial-cell and anti-malondialdehyde-LDL antibodies in uremic patients undergoing haemodialysis: relationship with vascular access thrombosis and thrombembolic events.
Hum Antibodies 9: 125-131.
- ¹³⁴ Rollino C, Roccatello D, Borsa S, Bellone G, Piccoli G, Emanuelli G (1996)
Antibodies directed to sonicated human endothelial cells in patients with vasculitis.
Nephron 73: 346-347.
- ¹³⁵ Hashemi S, Douglas Smith C, Izaguirre CA (1987)
Anti-endothelial cell antibodies: Detection and characterisation using a cellular enzyme-linked immunosorbent assay.
J Lab Clin Med 109: 434-440.

- ¹³⁶ Quadros NP, Roberts-Thomson PJ, Gallus AS (1990)
IgG and IgM anti-endothelial cell antibodies in patients with collagen-vascular disorders.
Rheumatol Int 10: 113-119.
- ¹³⁷ D'Cruz DP, Houssiau FA, Ramirez G, Baguley E, McCutcheon J, Vianna J, Haga HJ, Swana GT, Khamashta MA, Taylor JC, Davies DR, Hughe GRV (1991)
Antibodies to endothelial cells in systemic lupus erythematosus: a potential marker for nephritis and vasculitis.
Clin Exp Immunol 85: 254-261.
- ¹³⁸ Triolo G, Accardo-Palumbo A, Triolo G, Carbone MC, Ferrante A, Giardina E (1999)
Enhancement of endothelial cell E-selectin expression by sera from patients with active Behcet's disease: Moderate correlation with anti-endothelial cell antibodies and serum myeloperoxidase levels.
Clin Immunol 91: 330-337.
- ¹³⁹ Wangel AG, Kontianen S, Scenini T, Schlenzka A, Wangel D, Maenpaa J (1992)
Anti-endothelial cell antibodies in insulin-dependent diabetes mellitus.
Clin Exp Immunol 88: 410-413.
- ¹⁴⁰ Heurkens AHM, Gorter A, de Vreede TM, Edgell CS, Breedveld FC, Daha MR (1991)
Methods for the detection of anti-endothelial cell antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay.
J Immunol Methods 141: 33-39.
- ¹⁴¹ Triolo G, Triolo G, Accado-Palumbo A, Carbone MC, Ferrante A, Casiglia D, Giardina E (1998)
IgG anti-endothelial cell antibodies (AECA) in Type I diabetes mellitus; induction of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells.
Clin Exp Immunol 111: 491-496.
- ¹⁴² Baron D, Wernet P, Schunter F, Wigzell H (1977)
Detection and quantitation of human Ia-type antigens with iodinated protein A and specific purification of antibodies against Ia-type alloantigens.
Scand J Immunol 6: 385-91.
- ¹⁴³ Yoshio T, Masuyama JI, Sumiya M, Minota S, Kano S (1994)
Antiendothelial cell antibodies and their relationship to pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus.
J Rheumatol 21: 2048-63.
- ¹⁴⁴ Rosenbaum J, Pottinger BE, Woo P, Black CM, Loizou S, Byrns MA, Pearson JD (1988)
Measurement and characterisation of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases.
Clin Exp Immunol 72: 450-456.
- ¹⁴⁵ George J, Meroni LP, Gilburd B, Raschi E, Harats D, Shoenfeld Y (2000)
Anti-endothelial cell antibodies in patients with coronary atherosclerosis.
Immunol Lett 73: 23-27.

- ¹⁴⁶ Revelen R, Bardron A, Dueymes M, Yoinou P, Arvieux J (2000)
False positivity in cyto-ELISAs for anti-endothelial cell antibodies caused by heterophile antibodies to bovine serum proteins.
Clin Chem 46: 273-278.
- ¹⁴⁷ Lewis LJ, Hoak JC, Maca RD, Fry GF (1973)
Replication of human endothelial cells in culture.
Science 181: 453-454.
- ¹⁴⁸ O'Donnell J, Mille-Baker B, Lafan M (2000)
Human umbilical vein endothelial cells differ from other endothelial cells in failing to express ABO blood group antigens.
J Vasc Res 37: 540-547.
- ¹⁴⁹ Jaffe EA (1987)
Cell biology of endothelial cells.
Hum Pathol 18: 234-239.
- ¹⁵⁰ Heidelberger M, Kendall FE (1935)
A quantitative theory of the precipitin reaction.
J Exp Med 62: 697-720.
- ¹⁵¹ Butler J (1998)
Immunoassays in clinical biochemistry.
In: The Science of laboratory diagnosis.
Burnett D, Crocker J (Hrsg.)
Isis Medical Media Ltd.
- ¹⁵² Salojin KV, Le Tonqueze M, Saraux A, Nasonov EL, Dueymes M, Piette JC, Youinou PY (1997)
Antiendothelial cell antibodies: Useful marker for systemic sclerosis.
Am J Med 102: 178-185.
- ¹⁵³ Frampton G, Jayne DRW, Perry GJ, Lockwood CM, Cameron JS (1990)
Antibodies to endothelial cells and neutrophil cytoplasmic antigens in systemic vasculitis.
Clin Exp Immunol 82: 227-232.
- ¹⁵⁴ Tijssen P (1985)
Laboratory techniques and theory of enzyme immunoassays.
Elsevier
- ¹⁵⁵ Hahn BH (1998)
Antibodies to DNA.
N Engl J Med 338: 1359-1368.
- ¹⁵⁶ Ronda N, Haury M, Nobrega A, Kaveri SV, Coutinho A, Kazatchkine MD (1994)
Analysis of natural and disease associated autoantibody repertoires: Anti-endothelial cell IgG autoantibody activity in serum of healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus.
Intern Immunol 6: 1651-1660.

- ¹⁵⁷ Ronda N, Leonardi S, Orlandini G, Gatti R, Bellosta S, Bernini F, Borghetti A (1999)
Natural anti-endothelial cell antibodies (AECA).
J Autoimmun 13: 121-127.
- ¹⁵⁸ Oravec S, Ronda N, Carayon A, Milliez J, Kazatchkine MD, Horny A (1995)
Normal human immunoglobulin G (intravenous immunoglobulin) modulates endothelial cell function in vitro.
Nephrol Dial Transplant 10: 796-800.
- ¹⁵⁹ Mendonca LLF, Khamashta MA, Cuadrado MJ, Bertolaccini ML, Hughes GRV (2000)
Natural immune response involving anti-endothelial cell antibodies in normal and lupus pregnancy.
Arthritis Rheum 43: 1511-1515.
- ¹⁶⁰ D'Anastasio CD, Impallomeni M, Mc Pherson GAD, Clements WG, Howell LG, Brooks PA, Batchelor JR (1988)
Antibodies against monocytes and endothelial cells in the sera of patients with atherosclerotic peripheral arterial disease.
Atherosclerosis 74: 99-105.
- ¹⁶¹ Schmidt M (1993)
Entwicklung eines Testverfahrens zur Charakterisierung und quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gerichtet gegen humane vaskuläre Endothelzellen.
Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- ¹⁶² van der Zee JM, Heurkens AH, van der Voort EA, Daha MR, Breedveld FC (1991)
Characterization of anti-endothelial antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis.
Clin Exp Rheumatol 9: 589-94.
- ¹⁶³ Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Igarashi A, Yazawa N, Kubo M, Kikuchi K, Takehara K, Tamaki K (2000)
Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): Association with pulmonary fibrosis.
Clin Exp Immunol 119: 203-209.
- ¹⁶⁴ Cid MC (2002)
Endothelial cell biology, perivascular inflammation, and vasculitis.
Cleve Clin J Med 69 Suppl 2: SII45-9.
- ¹⁶⁵ Eichhorn J, Sima D, Lindschau C, Turowski A, Schmidt H, Schneider W, Haller H, Luft FC (1998)
Antiendothelial cell antibodies in thromboangiitis obliterans.
Am J Med Sci 315: 17-23.
- ¹⁶⁶ Tizard EJ, Baguley E, Hughes GR, Dillon MJ (1991)
Antiendothelial cell antibodies detected by a cellular based ELISA in Kawasaki disease.
Arch Dis Child 66: 189-192.

- ¹⁶⁷ Leung DY (1993)
Kawasaki disease.
Curr Opin Rheumatol 5: 41-50.
- ¹⁶⁸ Weiss L, You JF, Giral P, Alhenc-Gelas M, Senger D, Katzatchkine MD (1995)
Anti-cardiolipin antibodies are associated with and antiendothelial cell antibodies but not with anti-beta2-glycoprotein I antibodies in HIV infection.
Clin Immunol Immunopathol 77: 69-74.
- ¹⁶⁹ Le Roux G, Wautier MP, Guillevin L, Wautier JL (1986)
IgG binding to endothelial cells in systemic lupus erythematosus.
Thromb Haemost 56: 144-146.
- ¹⁷⁰ Yoshio T, Masuyama J, Sumiya M, Minota S, Kano S (1994)
Antiendothelial cell antibodies and their relation to pulmonary hypertension in systemic lupus erythematosus.
J Rheumatol 21: 2058-2063.
- ¹⁷¹ Mackworth-Young CG, Andreotti F, Harmer I, Loizou S, Pottinger BE, Pearson JD, Davies GJ, Maseri A, Walport MJ (1995)
Endothelium-derived haemostatic factors and the antiphospholipid-syndrome.
Br J Haematol 34: 201-206.
- ¹⁷² Bordron A, Dueymes M, Levy Y, Jamin C, Ziporen L, Piette JC, Shoenfeld Y, Youinou P (1998)
Anti-endothelial cell antibody binding makes negatively charged phospholipids accessible to antiphospholipid antibodies.
Arthritis Rheum 41: 1738-1747.
- ¹⁷³ Varaganam M, Nwosu Z, Adu D, Garner C, Taylor CM, Michael J, Thompson RA (1993)
Little evidence for anti-endothelial cell antibodies in microscopic polyarteritis and Wegener's granulomatosis.
Nephrol Dial Transplant 8: 113-7.
- ¹⁷⁴ Salih AM, Nixon NB, Dawes PT, Matthey DL (1999)
Soluble adhesion molecules and anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by peripheral neuropathy.
J Rheumatol 26: 551-555.
- ¹⁷⁵ Shingu M, Hurd ER (1981)
Sera from patients with systemic lupus erythematosus reactive with human endothelial cells.
J Rheumatol 8: 581-586.
- ¹⁷⁶ Romas E, Paspaliaris B, d'Apice AJ, Elliott PR (1992)
Autoantibodies to neutrophil cytoplasmic (ANCA) and endothelial cell surface antigens (AECA) in chronic inflammatory bowel disease.
Aust N Z J Med 22: 652-9.

- ¹⁷⁷ Healy CM, Carvalho D, Pearson JD, Thornhill MH (1996)
Raised anti-endothelial cell autoantibodies (AECA), but not anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA), in recurrent oral ulceration: modulation of AECA binding by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interferon-gamma (IFN-gamma).
Clin Exp Immunol 106: 523-8.

Danksagung

Bei allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken:

Herrn Professor Dr. G. Müller-Berghaus für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die umfangreichen materiellen und apparativen Voraussetzungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. K. Madlener für die Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung. Ihre Anregungen und Motivation bildeten die Grundlage für die Entstehung dieser Promotion.

Bettina Gissel für die Einführung in die ELISA-Technik und Zellkultur, mit der sie einen wichtigen Beitrag zu Gelingen dieser Arbeit geleistet hat.

Für ihre freundschaftliche Unterstützung und das harmonische Arbeitsklima danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Sprudelhof: Birgit Rabenau, Tanja Rehling, Christine Kendall, Jens Müller, Martin Keller, Susanne Kiefer und Birgit Weiss.

Herrn Professor Dr. G. Neeck für die Überlassung der Proben aus dem Routinelabor der Abteilung für Rheumatologie der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim.

Herrn Dr. M. Hollenhorst vom Institut für medizinische Statistik der Justus-Liebig-Universität Gießen für kompetente statistische Beratung.

Mirko Steinmüller, der mir während der ganzen Zeit liebevoll und hilfreich beigestanden hat.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, 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 Schriften 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 wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Pestalozzistr. 74
35394 Gießen
Telefon: 0641-203042

Mirja Glotzbach

Persönliche Information

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
geboren am 18.10.1975 in Fulda

Schulischer Werdegang

1982 - 1986	Grundschule: Linggschule	Bad Hersfeld
1986 - 1992	Mittelstufe: Gesamtschule Geistal	Bad Hersfeld
1992 - 1995	Oberstufe: Modellschule Obersberg	Bad Hersfeld

Studium

1995 - 1996	Biologie, Justus-Liebig-Universität	Gießen
1996 - 2002	Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität	Gießen
1998	Ärztliche Vorprüfung	
1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	
2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	
2001 - 2002	Praktisches Jahr am Lehrkrankenhaus Asklepios-Klinik in Lich in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie, Gynäkologie und Geburtshilfe	
2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	

Famulaturen

1998	Neurologie und Psychiatrie Praxis Drs. Berger/Tacke/Papke/Emrich mit Belegbetten im Klinikum Wetzlar
1998	Gynäkologie und Geburtshilfe Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld, Chefarzt Dr. med. Dr. habil. Knitza
1999	Allgemeinchirurgie Dr. Mackinnon Memorial Hospital, Highland Primary Care NHS Trust, Broadford Isle of Skye (Schottland), Consultant Surgeon Mr. Ball
2000	Hämostaseologie Abteilung Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim, Direktor Prof. Dr. med. Müller-Berghaus

Beruf

seit 01.01.2003 Ärztin im Praktikum an der Medizinischen Klinik II am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig Universität Gießen, Direktor Prof. Dr. med. Seeger.

Gießen, 2004