

Susanne Beyer  
Dr. med.

## **Elastase-Antikörper bei Patienten mit primär systemischen Vaskulitiden**

Geboren am 24.06.1967 in Weinheim  
Reifeprüfung am 05.06.1986 in Hemsbach  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1986/87 bis WS 1993/94  
Physikum am 17.08.1988 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in St. Gallen und in Mannheim  
Staatsexamen am 11.11.1993 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. K. Andrassy

Als Zielantigen der antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA) wurden bisher Proteinase 3 und Myeloperoxidase beschrieben. Ob Elastase (EL) ein Zielantigen der ANCA bei Patienten mit systemischen Vaskulitiden, insbesondere ANCA-assoziierten Vaskulitiden (AAV) und Autoimmunerkrankungen darstellt, wurde kontrovers diskutiert. Dies war hauptsächlich durch die bislang inadäquaten Nachweismethoden für EL-ANCA bedingt.

(1) Wir haben einen sensitiven und hochspezifischen Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von EL-ANCA entwickelt. Der ELISA basierte auf der direkten Beschichtung der Mikrotiterplatte mit gereinigter Elastase aus Leukozyten. Es war notwendig, die Autokatalyse der Elastase durch Zugabe eines Proteaseinhibitors (Phenylmethylsulfonylfluorid) zu verhindern. Unspezifischen, das heißt Elastase-unabhängigen Bindungen wurde durch gleichzeitige Testung der Seren gegen nicht mit Antigen beschichtete Testvertiefungen der Mikrotiterplatte Rechnung getragen. Wodurch die unspezifischen Bindungen ausgelöst wurden, konnte nicht geklärt werden. Rheumafaktoren und andere hohe Autoantikörpertiter konnten als Ursache ausgeschlossen werden.

(2) Die Spezifität des ELISA wurde durch Absorptionsversuche und im Westernblot bestätigt.

(3) Zur Standardisierung der Nachweismethode wurde ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen EL eingesetzt. Der monoklonale Antikörper gegen EL dient gleichzeitig als Kontrolle der Antigenbeschichtung der Platte, als interner Standard und als Standard zur Auswertung der Testergebnisse. Die Reproduzierbarkeit wurde durch die Innertags- und Tag zu Tag- Variabilität sowie die Berechnung des Variabilitätskoeffizienten überprüft.

(4) Normwerte wurden durch Testung von 133 Seren gesunder Spender ermittelt. Die Normwerte waren nicht normalverteilt. Somit gilt das über alle Normalpersonen ermittelte 95% Konfidenzintervall als Normwert.

(5) Wir konnten nachweisen, dass Elastase in der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) ein schwaches Antigen darstellt. In der IIF zeigten EL-ANCA ein Mischbild zwischen cANCA und pANCA. Im Gegensatz zu Proteinase 3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO) zeigte sich für EL-ANCA eine höhere Sensitivität im ELISA im Vergleich zur IIF. Die in der Literatur aufgestellte Behauptung, dass die IIF das sensitivere Testverfahren sei, konnte für EL-ANCA widerlegt werden.

(6) Seren von Patienten mit AAV wurden mit dem oben beschriebenen ELISA zum Nachweis von EL-ANCA getestet. EL-ANCA konnten in einem höheren Prozentsatz bei Patienten mit Wegener'scher Granulomatose (bei 8 von 108) und mikroskopischer Polyangiitis (15 von 78) nachgewiesen werden, als bisher in der Literatur beschrieben. Dennoch stellt Elastase ein, im Vergleich zu PR3 und MPO, deutlich selteneres Zielantigen der ANCA dar. Häufig waren gleichzeitig EL- und MPO-ANCA in den Proben nachweisbar. In wenigen Proben konnten gleichzeitig ANCA gegen alle 3 Zielantigene nachgewiesen werden. Bei keinem der untersuchten Patienten bestand der Verdacht auf eine Medikamenten induzierte Vaskulitis (z.B. durch Polythiouracil). Daher konnten wir die Hypothese, dass das Auftreten mehrere ANCA-Spezifitäten ein Marker für eine medikamentös-induzierte Vaskulitis darstellt, widerlegen. Bei Patienten mit Wegener'scher Granulomatose oder Mikroskopischer Polyangiitis konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von EL-ANCA und der Schwere der Nierenbeteiligung, gekennzeichnet durch eine häufigeres Auftreten eines dialysepflichtigen Nierenversagens, aufzeigen. Des Weiteren konnte ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Infekten und EL-ANCA aufgedeckt werden. Als Erreger waren in den meisten Fällen Staphylokokken nachweisbar. Dies untermauert die bereits in der Literatur vorhandenen Hinweise auf eine Schlüsselrolle sowohl der ANCA als auch der Staphylokokken in der Pathogenese der AAV.

(7) Wir konnten den Krankheitsverlauf bei zwei Patienten über mehrere Monate beobachten. Bei einem Patienten mit rezidivierenden (systemischen) Staphylokokkeninfektionen war ausschließlich EL als Zielantigen der ANCA nachweisbar. Eine Korrelation der Titer zum Krankheitsverlauf konnte gezeigt werden. Bemerkenswert war, dass stets sehr hohe Konzentrationen an EL-ANCA nachweisbar waren. Wir interpretierten die EL-ANCA als Ausdruck der persistierenden bakteriellen Infektion. In Serumproben des zweiten Patienten waren sowohl MPO- als auch EL-ANCA nachweisbar. Die Antikörperkonzentrationen zeigten einen parallelen Verlauf zueinander und zum Krankheitsverlauf.

(8) Außer bei Patienten mit AAV konnten EL-ANCA auch bei Patienten mit SLE, Sklerodermie, Rheumatoider Arthritis, IgA-Nephropathie, Sepsis und in Seren von Patienten mit chronischer Hämodialysebehandlung nachgewiesen werden. EL-ANCA sind somit nicht, wie in der Literatur postuliert, spezifisch für eine Vaskulitis. Im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen konnten wir EL-ANCA weniger häufig bei Patienten mit SLE (9 von 64) nachweisen. Auffallend war jedoch die hohe Zahl an Seren von Patienten mit SLE, die unspezifische Bindungen zeigten.