

6 Zusammenfassung

Für die Diagnose von Autoaggressionserkrankungen wird bei Mensch und Hund der Nachweis antinukleärer Antikörper (ANAs) herangezogen. Um die differentialdiagnostische und pathogenetische Bedeutung caniner ANAs besser erfassen zu können, sollten in dieser Arbeit anhand anamnestischer Angaben klinische Parameter, die beim Hund mit der Bildung von ANAs assoziiert sein können, identifiziert werden. Neben der Charakterisierung von Antigengruppen, die canine ANAs erkennen, sollte zudem geprüft werden, ob und welche caninen Immunglobulinisotypen unter den ANAs vorherrschen.

Die retrospektive Analyse von 1204 diagnostischen Einsendungen in die Arbeitsgruppe Immunologie und das Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover ergab weder eine signifikante Alters-, Geschlechts- oder Rassendisposition für das Auftreten von ANAs beim Hund. Für schwere Hunde (anhand der Rassenangabe) lag die Inzidenz ANA-positiver Patienten allerdings signifikant höher als für leichte Tiere. Nach Gliederung anamnestischer Angaben ergaben sich im wesentlichen 2 Gruppen von Patienten: Tiere mit Bewegungsstörungen wiesen mit 15,3% einen signifikant höheren Anteil ANA-positiver Patienten auf als Tiere mit dermatologischer Symptomatik (6,0%).

Mittels indirekter Immunfluoreszenz auf zellulären Substraten unterschiedlicher Herkunft wurde im Fluoreszenz-ANA-Test (FANA) die Reaktivität caniner Patientenserum untersucht. Der Vergleich der Reaktivität zwischen einer humanen epithelialen Karzinomzelle (HEp-2) und einer caninen Zelllinie (MICK) ergab keine Hinweise darauf, daß canine ANAs speziesspezifische Antigene erkennen. Die von HEp-2 exprimierten Kernantigene stellen eine Art 'Obermenge' aller hier geprüften Zellen caninen, equinen, felines und bovinen Ursprungs dar. Die individuelle Reaktivität einzelner Patientenserum auf den verschiedenen zellulären Substraten ergab dabei erste Hinweise auf die unterschiedliche Zusammensetzung der ANAs bezüglich der erkannten Zielstrukturen im Kern.

Durch chemische und / oder enzymatische Modifikation von HEp-2-Zellen mittels DNase, RNase und HCl konnte der Anteil ANA-positiver Serum ermittelt werden, die ausschließlich Antikörper gegen DNA (22,5%), säurelabile Proteine (12,5%) oder säureempfindliche Proteine (17,5%) enthalten. Den größten Anteil (47,5%) bildeten Serum, deren antinukleäre Antikörper mehrere dieser Molekülgruppen im Zellkern erkennen. RNA scheint als Zielstruktur für canine ANAs keine wesentliche Rolle zu spielen.

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper (mAK) gegen canine Immunglobulinisotypen wurde im FANA untersucht, welche Isotypen unter antinukleären Antikörpern vorkommen. Der Anteil an FANA-

positiven Seren mit antinukleären Antikörpern des Isotyps 'IgA' lag mit 6,7% am niedrigsten, gefolgt von 'IgG4' (16,7%). ANAs der Immunglobulinisotypen 'IgG2' und 'IgG3' fanden sich in jeweils 43,3% und 'IgM' in 63,6% der analysierten caninen Seren. Im überwiegenden Maß (43,3%) dominieren Seren, die antinukleäre Antikörper verschiedener Isotypen enthalten. Bei Seren (13 von 37), deren antinukleäre Antikörper selektiv durch einen einzelnen Immunglobulin-Isotyp repräsentiert werden, überwogen solche mit dem Isotyp 'IgG1' (n=8), gefolgt von 'IgM' (n=3) und 'IgG2' (n=2).

Die bisherigen Untersuchungen haben somit gezeigt, daß die Diagnostik caniner ANAs unter Einbezug qualitativer und quantitativer Analysen, differenziertere Aussagen über Art und Spezifität dieser Antikörper liefert. Damit kann die differentialdiagnostische Aussagekraft des ANA-Nachweises an Bedeutung gewinnen. Durch den Nachweis unterschiedlicher Immunglobulinisotypen unter den ANAs dürfte sich auch zuverlässiger deren Bedeutung für Pathogenese und Verlauf von Autoimmunerkrankungen des Hundes beurteilen lassen. Aufgrund dieser Untersuchung ist eine weiterführende Analyse der im Zellkern erkannten Antigenmoleküle und der mit ihnen reagierenden Immunglobulinisotypen unumgänglich geworden.

7 Summary

Heike Großjung: Antinuclear antibodies: Occurrence, specificity and isotype distribution

Diagnosis of autoimmune disorders is aided by the determination of antinuclear antibodies (ANAs) in humans and dogs. In order to clarify the meaning of canine ANAs for differential diagnosis and pathogenesis of these diseases this work was intended to identify clinical parameters possibly associated with the development of ANAs in dogs. Antigen groups detected by canine ANAs should be characterized in addition to the examination of immunoglobulin isotypes among ANAs.

The retrospective analysis of 1204 diagnostic samples revealed neither an age, sex nor any breed disposition for the occurrence of ANAs in dogs. However, heavy dogs had significantly higher percentages of ANA-positive patients compared to light-weighted ones. Animals with movement disorders according to anamnestic statements had a significantly higher proportion of ANA-positive patients (15.3%) compared to dogs with dermatologic symptoms (6.0%).

By means of indirect immunofluorescence on cellular substrates of different origin the reactivity of canine sera was tested in the fluorescence ANA-test (FANA). The comparison between the human epithelial carcinoma cell line HEp-2 and the canine cell line MIXK gave no indication for species specific antigens detected by canine ANAs. Obviously, nuclear antigens expressed by HEp-2 cover all those expressed by other tested cells of canine, equine, feline and bovine origin. However, the reactivity of individual patient sera on the different cellular substrates proved to be indicative for the different composition of ANAs regarding detected nuclear target molecules.

After chemical and / or enzymatic modification of HEp-2 cells with HCl, DNase and RNase it could be shown that part of the sera contained antibodies selectively reactive with DNA (22.5%), acidlabile proteins (12.5%) or acidstable proteins (17.5%), whereas the majority of ANA-positive sera (47.5%) contained ANAs against a mixture of these nuclear molecular groups. RNA seemed to play no important role as a target structure for canine ANAs.

The use of monoclonal antibodies with specificity for canine immunoglobulin isotypes in the FANA revealed that 6.7% of the sera contained 'IgA'-ANAs. The percentage of sera with 'IgG4'-ANAs was 16.7%, followed by sera with 'IgG2' (43.3%), 'IgG3' (43.3%) and 'IgM' (63.6%). Mostly, sera contained ANAs of more than one isotype (43.3%). In sera with ANAs of a single isotype (13 of 37), 'IgG1' was predominating (n=8), followed by 'IgM' (n=3) and 'IgG2' (n=2).

These investigations demonstrate that diagnosis of antinuclear antibodies including quantitative and qualitative analyses allows for more differentiated statements regarding the nature and specificity of such antibodies and therefore may improve the evidence of ANA diagnostic for differential diagnosis. The determination of different immunoglobulin isotypes among ANAs may also allow for a more reliable investigation of their importance for pathogenesis and course of autoimmune disorders in dogs. Based on this work it seems demanding to analyze further the target antigens in the nucleus together with the immunoglobulin isotypes reacting with them.