



## Calpastatin-Autoantikörper

**Material** Serum, EDTA- oder Heparin-Plasma, 1 mL

**Referenzbereich** negativ (1 : < 100)

**Methode** WB

**Qualitätskontrolle** intern

**Siehe auch** ► Autoantikörper (Übersicht)

**Anforderungsschein** Download

**Auskünfte** Immunpathologie

**Analysenkosten** EBM, GOÄ

**Indikationen** ► Da nicht krankheitsspezifisch von untergeordneter diagnostischer Bedeutung.

**Immunpathologie** Calpastatin (M<sub>r</sub> 76,5 kDa; Chromosom 5q15; 708 Aminosäuren (aa)) ist ein intrazellulärer, spezifischer Inhibitor der nicht-lysosomalen calciumabhängigen Cystein-Proteasen Calpain I ( $\mu$ -Calpain) und Calpain II (m-Calpain). Die Calpaine (**calcium-dependent papain-like** proteinase; EC 3.4.22.17), sind heterodimere, calciumabhangige, neutrale Endopeptidasen, die im Zytoplasma aller Körperzellen in unterschiedlicher Menge zusammen mit ihrem Inhibitor Calpastatin exprimiert werden. Neben den drei gut charakterisierten Proteinen  $\mu$ -Calpain, m-Calpain und Calpastatin umfasst die Familie der Calpain-Proteasen noch über ein Dutzend verwandter Proteine, die bisher meist nur als cDNA identifiziert wurden (Übersicht: Goll et al. 2003).

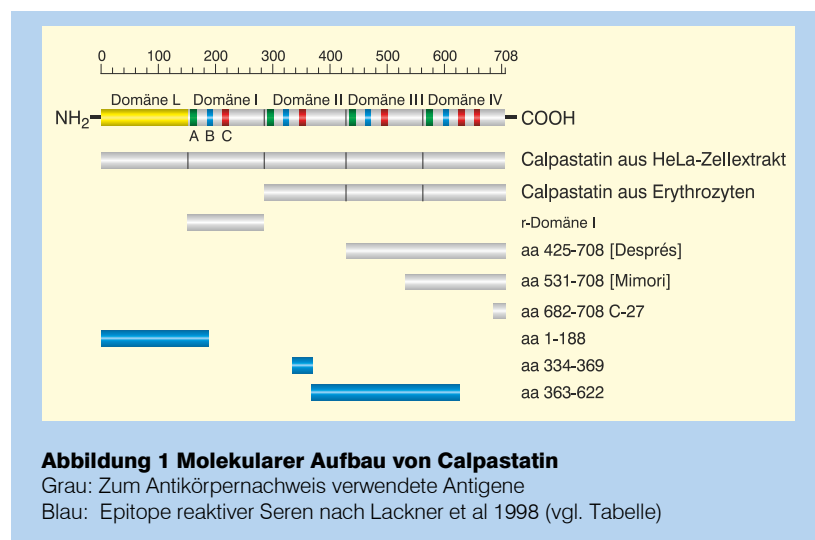
**Calpaine** Das heterodimere  $\mu$ -Calpain ( $\mu$  = mikromolare Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen zur Stimulierung notwendig; Calpain I) besteht aus einer großen Untereinheit (M<sub>r</sub> 81,89 kDa; 714 aa; Chromosom 11q13) und einer kleinen Untereinheit von etwa 28 kDa. Das ebenfalls heterodimere m-Calpain (m = millimolare Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen zur Stimulierung notwendig; Calpain II) ist ebenfalls aus einer großen Untereinheit (M<sub>r</sub> 79,88 kDa; 699 aa; Chromosom 1q41) und einer kleinen Untereinheit aufgebaut. Die regulatorischen kleinen Untereinheiten von Calpain I und II sind identisch (M<sub>r</sub> 28,31 kDa; 268 aa; Chromosom 19q13.12). Die 80 kDa-Untereinheiten enthalten vier (I - IV), die kleinen Untereinheiten zwei Domänen (V und VI). Das auf Domäne II der großen Untereinheiten gelegene enzymatisch aktive Proteasezentrum katalysiert die limitierte Proteolyse zahlreicher zellulärer Proteine (über 100 *in vitro* hydrolysierbare Substrate sind bekannt). Auf diese Weise aktivieren Calpaine zahlreiche Enzyme, wie z. B. die für die Signaltransduktion bei der Zellproliferation- und Differenzierung verantwortliche Proteinkinase C, verändern die Affinitäten von Membranrezeptoren für ihre Liganden, steuern die Interaktionen von Zytoskelettproteinen und beeinflussen dadurch die Motilität, Signaltransduktion, den Vesikeltransport und die strukturelle Integrität in und von Zellen oder beteiligen sich an der Regulierung von Phasenübergängen (G1/S/G2/Mitose) im Zellzyklus (Schollmeyer et al. 1988; Janossy et al. 2004). Man kann davon ausgehen, dass ein derartig funktionell vielfältiges System auch in zahlreiche pathophysiologische Reaktionen von Zellen und Geweben verstrickt ist. Mutationen im *Calpain 10*-Gen sind bei bestimmten Populationen mit einem erhöheten Risiko für einen Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert, Störungen der Calciumhomostase können eine unphysiologische Aktivierung von Calpainen auslösen, die zur pathologischen Hydrolyse von Strukturproteinen führen kann (Katarakt). Entzündungsreaktionen, wie z. B. die experimentelle kollageninduzierte Arthritis lassen sich durch Calpain-Inhibitoren deutlich abschwächen (Cuzzocrea et al. 2000).

**Calpastatin** Calpastatin, der spezifische endogene Calpain-Inhibitor (Takano und Maki 1999) wird als sog. Muskeltyp (M<sub>r</sub> 110 kDa) und in Form eines kürzeren erythrozytären Calpastatin (M<sub>r</sub> 70 kDa) exprimiert (siehe Abbildung 1). Das 110 kDa-Calpastatin besitzt vier homologe repetitive Domänen (I-IV) und eine nicht homologe N-terminale L-Domäne (Emori et al. 1987). Die L-Domäne



## Calpastatin-Autoantikörper

reguliert L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Hao et al. 2000). Jede der Domänen I-IV ist enzymatisch aktiv und zur Inhibition eines Calpain-Moleküls befähigt (Maki et al. 1987; Emori et al. 1988). Sie enthalten drei kurze, konservierte Segmente (Subdomänen A, B, C), die in erster Linie für die Inhibition der Calpaine verantwortlich sind. Die Subdomäne B bindet an die enzymatisch aktive Seite des Calpain (Ma et al. 1993; Takano et al. 1995), die Subdomänen A und C verstärken diese Bindung, indem sie das Calpastatin  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig an dem Calpain verankern. Während dieses Bindungsprozesses vollziehen sich in dem in nativer Form nur wenig strukturierten Calpastatin Umlagerungen mit Ausbildung von  $\alpha$ -Helices, die, da reversibel, die Rückkehr in den Nativzustand ermöglichen und dadurch die Inhibition beenden (Mucsi et al. 2003).



### Autoantikörper

Erste Hinweise auf die Autoantigenität von Calpastatin ergaben sich bei Untersuchungen humaner Testis-Genbibliotheken mit Seren infertiler Frauen. Da hierbei reaktive cDNA-Klone mit Calpastatin-Sequenzmotiven gefunden wurden (Liang et al. 1994; Wang et al. 1994), mussten die untersuchten Seren Antikörper gegen humanes Calpastatin enthalten.

Mit analogen Untersuchungen wurden Calpastatin-Autoantikörper auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis entdeckt (Després et al. 1995; Mimori et al. 1995). Die anfänglich beschriebene hohe Antikörperprävalenz von 57 % (Mimori et al. 1995) und 45,5 % (Després et al. 1995) ließ sich in der Folgezeit (Lackner et al. 1998; Vittecoq et al. 2001) meist nicht mehr bestätigen (siehe Tabelle 1). Mitverantwortlich für die diskrepanten Resultate sind uneinheitliche und nicht standardisierte Testmethoden, bei denen nicht nur verschiedene Nachweisverfahren (Elisa, Westernblot) sondern auch sehr unterschiedliche Antigene wie HeLa-Zellextrakte, Erythrozyten-Calpastatin, rekombinante Calpastatin-Fragmente verschiedener Größen mit unterschiedlichen Fusionsproteinanteilen oder synthetische Peptide eingesetzt wurden. Es zeigte sich ferner, dass auch gesunde Personen in hohem Prozentsatz Antikörper gegen bestimmte Fragmente des Calpastatin-Moleküls besaßen.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, fanden sich bei Gesunden nahezu ebenso häufig wie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis Autoantikörper gegen den N-Terminus (Domäne L, siehe Abbildung 1) und den mittleren Molekülbereich von Calpastatin (Lackner et al. 1998). Ein für die rheumatoide Arthritis spezifisches immundominantes Calpastatin-Epitop ließ sich bisher nicht identifizieren. Mit dem als relativ spezifisch angesehenen (Vittecoq et al. 2001) 27 Aminosäuren großen C-terminalen Fragment (C-27) reagierten Seren von Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen, systemischem Lupus erythematodes oder Sjögren-Syndrom ebenso häufig wie die Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Lackner et al. 1998; Schlosser et al. 1997).



## Calpastatin-Autoantikörper

**Tabelle 1** Autoantikörper gegen Calpastatin. Häufigkeiten und Krankheitsassoziationen unter Berücksichtigung der für den Nachweis verwendeten Antigene.

Autoren	Antigene	Methode	Krankheit	[%]
Takada (1998)	HeLa-Zellextrakt	<u>WB</u>	RA SLE SSC PM/DM	46,0 20,0 11,0 13,0
Iwaki-Egawa (2004)	Erythrozyt.-Calpastatin	<u>Elisa</u>	RA SLE OC	82,0 5,6 8,3
Sato (1998)	rec-Domäne I	<u>Elisa</u>	SSC	24,0
Saulot et al. (2002)	rec-Domäne I	<u>Elisa</u>	RA SLE SS Ko	10,0 9,0 0,0 1,0
Matsushita (2005)	rec-Domäne I	<u>Elisa</u>	Ps	20,0
Després (1995)	aa 425 - 708 Fp	<u>WB</u>	RA Ko Ge	45,5 4,7 0,0
Goldbach-M. (2000)	aa 425 - 708 Fp	<u>Elisa</u>	RA+ RA+ Ko	33,0 28,0 37,0
Mimori (1995)	aa 531 - 708 Fp * <sup>1</sup>	<u>WB</u>	RA SLE SSC PM/DM ÜS	57,0 27,0 38,0 24,0 29,0
Lackner (1998)	aa 1 - 188 Fp	<u>WB</u>	RA Ge	42,0 30,0
	aa 334 - 369 Fp	<u>WB</u>	RA Ge	33,3 35,0
	aa 363 - 622 Fp	<u>WB</u>	RA Ge	4,4 3,8
	aa 682 - 708 [C-27]	<u>WB</u>	RA Ge	6,7 3,8
	aa 682 - 708 [C-27]	<u>Elisa</u>	RA Ge	8,9 3,4
Vittecoq (2001)	aa 682 - 708 [C-27] * <sup>2</sup>	<u>Elisa</u>	RA jRA SLE SS MB Ge	19,5 10,3 15,5 18,5 5,7 5,5
Salle (2004)	aa 682 - 708 [C-27]	<u>Elisa</u>	SLE	13,0
Schlosser (1997)	aa 682 - 708 [C-27]	<u>Elisa</u>	Thr Ge	11,3 3,2

(\*<sup>1</sup>) 40 % der anti-Calpastatin-positiven Seren (N = 15) reagierten mit Epitopen im Bereich aa 495 - 571, 67 % mit Epitopen im Bereich aa 647-673 (Yasuoka et al. 1997). (\*<sup>2</sup>) alle mit C-27 reaktiven Seren reagierten im Elisa auch mit humanem erythrozytärem Calpastatin. aa, Aminosäure; Ge, Gesunde; jRA, juvenile rheumatoide Arthritis; Ko, Kontrollen; MB, Morbus Bechterew; OC, Osteochondritis; PM/DM, Poly / Dermatomyositis; Ps, Psoriasis; RA, rheumatoide Arthritis; RA+/-, Rheumafaktor- positive/negative rheumatoide Arthritis; SLE, systemischer Lupus erythematoses; SS, Sjögren Syndrom; SSC, Systemische Sklerose; Thr, ; US, Überlappungssyndrom.



## Calpastatin-Autoantikörper

### Isotypen

Unabhängig von der Grunderkrankung gehören Calpastatin-Autoantikörper überwiegend dem Isotyp IgG an. Teilweise sind sie mit IgM-Isotypen vergesellschaftet (< 40 %), IgA-Isotypen sind sehr selten (Takada et al. 1998). Die von Patienten mit rheumatoider Arthritis stammenden Antikörper gegen das C-27-Peptid zeigten den komplementaktivierenden Isotyp IgG<sub>3</sub> und trugen ausschließlich Leichtketten vom Typ  $\lambda$  (Vittecoq et al. 2001), was auf eine antigenstimulierte Antikörpersynthese mit selektiver Vermehrung der diese Antikörper bildenden B-Zellen hinweist.

Die Ursachen der Autoantikörper-Bildung sind unbekannt. Calpastatin kann im Verlaufe von Entzündungsprozessen durch Zellschädigung und Apoptose, möglicherweise auch unter physiologischen Bedingungen, in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und dort bei genetisch entsprechend veranlagten Personen die Synthese der Autoantikörper in Gang bringen. Da Calpastatin-Autoantikörper nicht nur bei der rheumatoiden Arthritis sondern auch bei anderen entzündlichen rheumatischen Erkrankungen, bei entzündlichen Dermatosen und Thrombosen auftreten, sind sie vermutlich eine Folge bestimmter Entzündungsprozesse, die sie durch eine Beeinflussung des Calpain-Calpastatin-Systems möglicherweise auch verstärken und unterhalten.

### Vorkommen

Außer bei der rheumatoiden Arthritis (6,7 - 82 %) lassen sich Calpastatin-Autoantikörper auch bei systemischer Sklerose (11 - 38 %), systemischem Lupus erythematoses (5,6 - 27 %), Polymyositis/ Dermatomyositis (24 %), Sjögren Syndrom (0 - 18 %) Überlappungssyndromen (29 %), Osteochondritis (8,3 %), Morbus Bechterew (5,7 %), Psoriasis (23 %; Psoriasis vulgaris 24 %, Psoriasis-Arthritis 25 %, generalisierter pustulöser Psoriasis 17 %) und Gesunden (0 - 35 %) nachweisen. Die Antikörper wurden erstmals bei Frauen mit Fertilitätsstörungen beschrieben.

Eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von Calpastatin-Autoantikörpern und dem Krankheitsverlauf bestand weder bei der rheumatoiden Arthritis noch bei den anderen Krankheitsbildern. Bei antikörperpositiven SLE-Patienten wurde in einer Studie häufiger ein sekundäres Sjögren-Syndrom beobachtet (Salle et al. 2004), in einer anderen Studie fanden sich vermehrt Vaskulitiden bei hohen Antikörperkonzentrationen (Vittecoq et al. 2001). Calpastatin-Autoantikörper ließen sich auch bei Rheumafaktor-negativen Patienten nachweisen (Vittecoq et al. 2001).

### Pathogenese

Über die pathologische Bedeutung der Calpastatin-Autoantikörper lassen sich derzeit nur Vermutungen anstellen. Calpaine sind in vielfältiger Weise in Entzündungsprozesse involviert. Sie aktivieren neutrophile Granulozyten, fördern die Exozytose enzymhaltiger Granula, die Produktion von Superoxidanionen (Pontremoli et al. 1988) und setzen aus inaktiven Vorstufen aktives Interleukin-1 $\alpha$  (Kobayashi et al. 1990) oder den NF- $\kappa$ B frei (Groves et al. 1995), der aus dem Proteasom in den Zellkern verlagert wird und dort als Transkriptionsfaktor die Synthese proinflammatorischer Zytokine und die Expression von Adhäsionsmolekülen induzieren kann (Wang und Yuen 1994; Cuzzocrea et al. 2000). Nach Stimulierung mit TNF $\alpha$  synthetisieren kultivierte Chondrozyten Calpain und setzen es in die extrazelluläre Matrix frei. Calpain besitzt Eigenschaften einer Matrixprotease und ist damit in der Lage, Knorpel-Proteoglycane abzubauen und an der Knorpeldestruktion bei der rheumathoiden Arthritis mitzuwirken. Bei der kollageninduzierten Arthritis korreliert die Calpaininduktion mit der Manifestation der Arthritis und der Knorpeldestruktion. Calpaininhibitoren können den Entzündungsprozess deutlich mildern. Bei der menschlichen rheumatoiden Arthritis ist die Konzentration der Calpaine in der Synovialflüssigkeit erhöht (Fukui et al. 1989; Suzuki et al. 1992; Szomor al. 1995, 1999; Fujimori et al. 1994; Cuzzocrea et al. 2000; Fushimi et al. 2004). Auch in psoriatischen Hautläsionen wird die Calpain II-mRNA vermehrt exprimiert, nicht aber die des Inhibitors Calpastatin (Matsushita et al. 2005). Es wird daher spekuliert, ob nicht auch eine Neutralisierung von Calpastatin durch Autoantikörper zu einer relativen Steigerung der Aktivität von Calpainen führt, welche dann Ent-



## Calpastatin-Autoantikörper

zündungsreaktionen und die Proteoglycanase-bedingte Knorpeldestruktionen begünstigen. *In vitro* ließ sich die Inhibitorfunktion von Calpastatin durch menschliche Autoantikörper hemmen (Mimori et al. 1995; Matsushita et al. 2005).

### Nachweis

Standardisierte Testverfahren zum Nachweis der Autoantikörper liegen nicht vor, kommerzielle Testkits sind nicht verfügbar.