

Technical Information

Monitoring Komplementaktivierung SC5b-9, C5a und CH50

Traditionell wird die Komplementaktivierung indirekt mit Hämolyse-Assays gemessen. Diese Tests sind zeitintensiv, beruhen auf nicht standardisierten Reagenzien und sind anfällig für anwenderbedingte Schwankungen. Hochspezifische Enzymimmunoassays wurden daher zur Erfassung von Komplement aktivierungsprodukten entwickelt. Diese Tests sind in hohem Maße reproduzierbar und schneller durchzuführen als Hämolyse-Assays. Sie haben außerdem den Vorteil, dass die Aktivierung eines spezifischen Komplementwegs separat untersucht werden kann.

CH50 und CH50 Eq EIA

Die herkömmliche Methode zur Messung der gesamthämolytischen Aktivität des klassischen Komplementwegs im Serum ist der CH50 Test¹. Bei diesem Test handelt es sich um ein lytisches Verfahren, bei dem der klassische Komplementweg durch Antikörper-sensibilisierte Schaferythrozyten (EA) aktiviert wird. Die Serumkonzentration, die für eine 50 %Lyse erforderlich ist, wird mit Hilfe einer Serumverdünnungsreihe ermittelt. Die prozentuale Hämolyse wird spektrophotometrisch bestimmt. Der CH50 Test stellt eine indirekte Messung des TCC (Total Complement Complex) dar, der direkt die Hämolyse induziert.

Eine bereits bestehende in-vivo Aktivierung des Komplementsystems oder ein Mangel an Komplementproteinen führt zu einer geringeren in-vitro Komplementaktivierung im Test und einer entsprechend geringen Hämolyse. Da die Methode darauf basiert 1. den klassischen Komplementweg in Anwesenheit von sensibilisierten Schaferythrozyten zu aktivieren und 2.den Membranangriffskomplex (MAC) zu bilden, reflektiert sie die verfügbare Menge aller assoziierten Komplementproteine (C1-C9).

Als Screening-Test ist daher der CH50 Test zur Erkennung von klinisch relevantem Komplementmangel gut geeignet. Die fehlende Spezifität für einzelne Komplementproteine bedeutet jedoch, dass die Defizienz oder Insuffizienz eines bestimmten Proteins nicht erfasst wird. Dies schränkt den Einsatz im experimentellen Umfeld, beispielsweise zur Kontrolle der Wirkungsweise oder Wirksamkeit eines Medikaments, stark ein.

Der **QUIDEL CH50 Eq Enzymimmunoassay** ist wie auch die traditionelle Methode zur Bestimmung der Komplement-Gesamtaktivität bei der Fragestellung „Komplementmangel“ geeignet.

Im Unterschied zum Hämolyse-Assay misst der Quidel CH50 Eq EIA die Gesamtaktivität des klassischen Komplementwegs direkt im Serum durch Quantifizierung des unter Standardbedingungen gebildeten TCC. Zur Detektion wird ein monoklonaler Antikörper gegen ein Neopepitop des TCC verwendet.

Da der CH50 Eq EIA sowie der CH50 Test auf der Bildung von TCC beruhen und korrelieren, werden die Testergebnisse des CH50 Eq EIA in Äquivalenten von CH50-Einheiten pro Milliliter angegeben.

Es entfällt die Aufbereitung standardisierter sensibilisierter Erythrozyten (EA), deren Lagerfähigkeit begrenzt ist und deren Leistungsfähigkeit von Charge zu Charge variabel sein kann, ebenso das Herstellen von Verdünnungsreihen.

Im Gegensatz zum traditionellen CH50 Test detektiert der CH50 Eq Enzym-Assay jedoch die vorhandene Gesamtkonzentration von TCC in der Probe. Hohe, in-vivo generierte Konzentrationen an TCC führen zusammen mit den in-vitro generierten TCCs zu einem positiven CH50-Wert. Für ein Screening auf Komplementmangel ist dies insofern aussagekräftiger als für eine in-vivo Komplementaktivierung hinreichend Komplement verfügbar sein musste.

Ungeachtet des angewandten Analyseverfahrens (hämolysch, EIA, usw.) sind die CH50-Methoden Screeningmethoden generell nicht für das **Monitoring** der Komplementaktivierung geeignet, da alle Methoden auf der Gesamtkomplementaktivierung beruhen. Für das Monitoring der Komplementaktivierung stehen präzise Methoden zur Bestimmung von spezifischen Komplementproteinen bzw. Aktivierungsprodukten zur Verfügung.

Der terminale Komplementweg¹⁻⁴

Unter normalen Bedingungen führt die Komplementaktivierung über den klassischen, alternativen oder Lektin-Weg zu der Spaltung von C3 in C3b und C3a. Neben anderen wichtigen Immunfunktionen übernimmt C3b eine entscheidende Rolle in der weiteren Komplementaktivierung als wichtige Komponente des C5-Konvertaseenzym. Die C5-Konvertase spaltet C5 in C5a und C5b. C5a, ein wirksames Anaphylatoxin, wird rasch von Zellrezeptoren gebunden (Halbwertszeit unter einer Minute *in vivo*).

Eine Folge der C5b-Bildung ist, nach sequenzieller Interaktion mit vier anderen Proteinen, die Bildung des **Membranangriffskomplexes (Membrane Attack Complex, MAC)** an Zellmembranen und die Zerstörung von Zielzellen.

Bei Testproben *in vitro* und in hohem Grad auch *in vivo* führt ein Großteil des gebildeten C5b nicht zu der Formation von MAC, sondern wird von Kontrollproteinen (S-Protein) umgeleitet, um einen löslichen, lytisch inerten Komplex, das sogenannte SC5b-9, zu bilden. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Clusterin (auch bekannt als Apo J und SP40,40) C5b67 bindet und die Bildung von MAC in der gleichen Weise verhindert wie das S-Protein.

C5b-9 in jeder Form wird allgemein als terminaler Komplementkomplex (Terminal Complement Complex oder TCC) bezeichnet.

Da C5 auf den terminalen Komplementweg beschränkt ist, ist der Nachweis von C5-Aktivierungsprodukten (C5b-9 oder C5a) in einer Testprobe ein absoluter Beweis für die Aktivierung des terminalen Komplementwegs in der Probe.

C5a und C5b-9 als Komplementmarker

Sowohl C5a als auch C5b-9 (TCC) beruhen auf C5-Spaltung und lassen auf eine Aktivierung des **terminalen** Komplementwegs schließen. Für jedes nachgewiesene Gramm-Molekül TCC wird auch ein Gramm-Molekül C5a gebildet. Nach der Bildung wird C5a aktiv an Rezeptoren gebunden und löst *in vivo* eine Vielzahl von Reaktionen aus.

C5a ist ein kleines Molekül mit adhäsiven Eigenschaften und sehr kurzer Halbwertszeit *-in vivo* weniger als eine Minute, das von Zellen mit C5a-Rezeptoren rasch gebunden wird. Ungebundenes C5a wird schnell von Carboxypeptidase gespalten und zirkuliert als C5a des-Arg, mit bedeutend geringerer *in vivo* -Aktivität.

SC5b-9 ist ein vergleichsweise stabiler, löslicher, makromolekularer Komplex⁵ und kann gleichfalls legitim als ein Marker für die C5-Spaltung verwendet werden.

Mehrere Studien haben die Bildung von TCC mit der von C5a verglichen, um die Aktivierung des terminalen Komplementwegs zu beurteilen.⁷⁻¹⁴ Konzentrationen von C5a und SC5b-9 werden mit dem Aktivierungsgrad des terminalen Komplementwegs verbunden und spiegeln dies *in vitro* wider. Erhöhungen bei einem oder beiden Analyten korrelierten eng mit einer **Verminderung** von CH50.⁹

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse von Mollnes et al., dass bei einem Vergleich von Komplement-spezifischen Analyten, darunter auch C5a, nur SC5b-9 mit Lupus-Schüben korrelierte.¹⁰ Da C5a parallel zu TCC gebildet wird, lässt dies darauf schließen, dass die Bindung von C5a an Rezeptoren *in-vivo* möglicherweise seine diagnostische Relevanz bei bestimmten Krankheitszuständen einschränkt.

Weitere Studien, von Bengtsson und Kollegen, zeigten, dass C5b-9 schneller anstieg und dass diese Zunahme im Vergleich zu C5a anhaltend war.¹¹ Plasmakonzentrationen von C5b-9 erhöhten sich um mehr als das 10fache innerhalb des 2-Stunden-Zeitpunkts und wurden über 24 Stunden aufrechterhalten. Die Mittelwerte von C5a stiegen im Vergleich nur um etwas mehr als das Zweifache während desselben Zeitrahmens und erhöhten sich um das Zehnfache der Hintergrundkonzentration erst nach vier Stunden. Die Konzentrationen fielen dann innerhalb von acht Stunden rasch unterhalb die der Hintergrundkonzentration, trotz des Nachweises einer anhaltenden C3-Spaltung. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Konzentrationen von C5b-9 gut mit dem Grad der C3-Spaltung korrelierten, was darauf hindeutet, dass C5b-9 genauer der *in-vivo*-Situation entsprach und dass die Bindung von C5a *in vivo* den tatsächlichen Grad der Komplementaktivierung verdeckte.

Bei anderen Krankheitszuständen spiegeln die Konzentrationen von C5a des-Arg exakt die SC5b-9-Konzentrationen wider und zeigen einen engeren Bezug zur Pathogenese.

Studien von Scholl zeigten 2008 eine Erhöhung der C5a-Konzentrationen in EDTA-Plasma in direktem Zusammenhang mit altersbedingter Makuladegeneration auf.

In einer neueren Studie von Taylor et al. stiegen C5a und die Anaphylatoxine C3a und C4a als Reaktion auf Malariainfektion dramatisch an.

Ghebrehiwet et al. wiesen nach, dass Thrombozyten-vermittelte Komplementaktivierung assoziiert war mit der Bildung von physiologisch relevanten Konzentrationen von C5a und anderen Anaphylatoxinen, die die Rekrutierung von Leukozyten unterstützen und die vaskuläre Permeabilität erhöhen.

Darüber hinaus wurde die Formation des terminalen C5b-9 Membranangriffskomplexes (MAC) auf der Zelloberfläche von Leukozyten beobachtet. Zudem wurde festgestellt, dass die Deposition von sublytischen Mengen von MAC auf Thrombozyten die Thrombozytenaktivierung sowie die Sekretion und Expression der pro-koagulatorischen Aktivität erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass C5a eine größere Bedeutung als Flüssigphase-Marker in diesen Studien sein kann, wohingegen SC5-9 höchstwahrscheinlich zellassoziiert ist.

Aufgrund der Literatur wird deutlich, dass TCC (C5b-9) und C5a parallel gebildet werden und bei den meisten pathogenen Situationen gleichermaßen detektiert werden können.

Beide Moleküle sind sensitive Marker der terminalen Komplementaktivierung.

Unter bestimmten Umständen, bei denen das eine oder andere Molekül an zelluläre Rezeptoren oder an die Zellmembran bindet, ist je nachdem C5a bzw. sC5b-9 vorzuziehen.

CH50 indessen ist ein klinischer Test zur Erkennung eines mit dem klassischen Komplementweg assoziierten Komplementmangels und ist im Allgemeinen für die direkte Kontrolle der Komplementaktivierung nicht relevant.

Erklärungen:

TCC = Total Complement Complex

MAC = Membran Attack Complex

TCC = Terminal Complement Complex

Literaturverweise

1. 27. Law SKA, Reid KBM. Complement. 2nd ed. Oxford: IRL Press, 1995: 1-88
2. Morgan, BP "Physiology and Pathophysiology of Complement: Progress and Trends" *Crit Rev in Clin Lab Sci* 32:3 265-298 (1995).
3. Sherman S. Collard C., "Role of Complement in Ischemic Heart Disease" *BioDrugs* 15:9 595-607 (2001) (Review)
4. Kirshfink, M "Targeting Complement in Therapy" *Immunological Reviews* 180: 177-189 (2001). (Review)
5. Kolb, W.P., Molecular analysis of the membrane attack complex of complement. *J.Exp.Med.*, 135, 549, (1972).
6. Mackay, I. Rosen, F. "Complement" *NEJM* 344:15. 1140-1144. (2001)
7. McGeer, P., Yasojima, K. et al "Human Heart Generates Complement Proteins That Are Upregulated and Activated after Myocardial Infarct" *Circ Res* 83:860-869 (1998).
8. Clark, DJ, Cleman, MW et al "Serum Complement Activation in Congestive Heart Failure" *Am Heart J* 141:1 684-690 (2001).
9. Maillet F, V. Fremeaux-Bacchi "Assessment of complement activation in clinical samples. Comparison of complement components with quantitation of activation fragments" *J Immunol Methods* 156(2) (1992).
10. Mollnes TE, HJ Haga, JG Brun "Complement in patients with systemic lupus erythematosus without nephritis" *Rheumatology* 38:933-940 (1999).
11. Bengtsson A, Redl H, Schlag G, Högasenn K, Götze O, Mollnes TE. Anti-TNF Treatment of Baboons with Sepsis Reduces TNF- α IL-6 and IL-8, but not the Degree of Complement Activation. *Scand J Immunol*;48:509-514(1998).
12. Hoenich NA, KP Katopodis "Clinical characterization of a new polymeric membrane for use in renal replacement therapy" *Biomaterials* 18:3853-3858 (2002).
13. Hecke F. T Hoehn, et al "In vitro activation of complement system by lactic acidosis in newborn and adults" *Mediators Inflamm* 10(1)27-31 (2001).
14. Rinder CS, HM Rinder, et al "Selective blockage of membrane attack complex formation during simulated extracorporeal circulation inhibits platelet but not leukocyte activation" *J Thorac Cardiovasc Surg* 118(3) 460-466 (1999).

TECOmedical AG

always your partner

Headquarters/Switzerland

TECOmedical AG
Gewerbstrasse 10
4450 Sissach
Phone +41 (0) 61 985 81 00

Fax +41 (0) 61 985 81 09

info@tecomedical.com

Germany

TECOmedical GmbH
Wasserbreite 57
32257 Bünde
Phone +49 (0) 52 23 985 99

Fax +49 (0) 52 23 985 98

info@tecomedical.com

France

TECOmedical SARL
20, rue du Bois Chaland
91090 Lisses
Phone 0800 100 437

Fax 0800 100 480

chdu@tecomedical.com

Benelux

TECOmedical NL
t Hazeveld 34
3862 XB Nijkerk
Phone +31 (0) 33 49 51 473

Fax +31 (0) 33 49 51 635

sbk@tecomedical.com

www.tecomedical.com