



## Doctoral Thesis

# Human F(ab')<sub>2</sub>-containing immune complexes together with immunoglobulin hinge region-specific natural antibodies stimulate complement amplification in vitro and in vivo

**Author(s):**

Fumia, Sandra

**Publication Date:**

2008

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005560205> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 17582

**Human F(ab')<sub>2</sub>-containing immune complexes together  
with immunoglobulin hinge region-specific natural  
antibodies stimulate complement amplification  
*in vitro* and *in vivo***

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

SANDRA FUMIA

Dipl. Natw. ETH Zürich  
born 18.10.1979  
citizen of Rorschach SG

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Manfred Kopf, examiner  
Dr. Hans Ulrich Lutz, co-examiner  
Prof. Dr. Matthias Peter, co-examiner

2008

## Summary

In 1971 Reid showed that immune complexes (IC) consisting of antigens and  $F(ab')_2$  fragments from rabbit IgG antibodies ( $F(ab')_2$ -IC) stimulate complement amplification, when added to guinea pig  $Mg^{2+}$ -EGTA plasma, a system that allows exclusively complement amplification (Reid 1971). Interestingly, the extent of C3 consumption in such assays reached a maximum that appeared to be limited by an unidentified plasma factor that on interaction with  $F(ab')_2$ -IC stimulated complement amplification. We repeated the experiments from Reid, but as close as possible to physiology with human plasma and with  $F(ab')_2$ -IC generated from human IgG naturally occurring antibodies (NABs). We show that absorption of plasma on  $F(ab')_2$  from whole human IgG removed this factor and fully prevented  $F(ab')_2$ -IC from stimulating complement amplification *in vitro*. This factor was then purified from pooled whole human IgG (IVIG) as those NABs that bind to the hinge region accessible on  $F(ab')_2$ , but not on intact human IgG. These "anti-hinge NABs" restored complement amplification by  $F(ab')_2$ -IC in absorbed 20%  $Mg^{2+}$ -EGTA plasma at 12.5  $\mu$ g/ml. Thus, we have shown that anti-hinge NABs are the missing plasma factor that Reid mentioned 36 years ago. Anti-hinge NABs must have formed secondary, rigidified immune complexes from  $F(ab')_2$ -IC, whereby they captured nascent C3bs in dimeric form, as verified by 2D SDS-PAGE and a hydroxylamine treatment inbetween the dimensions.  $C3b_2$ - $F(ab')_2$ -immune complexes are potent C3 convertase precursors in analogy to  $C3b_2$ -IgG complexes (Lutz and Jelezarova 2006). The latter ones form rarely and exclusively on IgG NABs, that have an affinity for C3 within the framework, while  $C3b_2$ - $F(ab')_2$ -IC form readily on  $F(ab')_2$ -IC from antibodies with various specificities and even, as shown here, on  $F(ab')_2$ -IC from human IgG anti-spectrin that does not have an affinity for C3 (Lutz et al. 1993). These findings suggest that any  $F(ab')_2$  fragments forming immune complexes may be able to stimulate complement amplification together with anti-hinge NABs. We therefore studied whether this type of stimulation of complement amplification may also occur at the onset of a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in

sepsis. The onset of SIRS is marked by the release of elastase from activated neutrophils and by uncontrolled complement amplification, but it has remained unclear how complement amplification is stimulated. It was known that neutrophilic elastase can cleave IgG to  $F(ab')_2$  (Baici et al. 1980) and that elastase, though complexed to inhibitors in plasma, may be transiently active *in vivo*. Indeed, plasma taken from nine septic patients at the onset of SIRS contained  $F(ab')_2$  fragments. The concentrations of  $F(ab')_2$  and of factor Bb, a measure of complement amplification, correlated linearly with that of released elastase. Moreover, the  $F(ab')_2$  fragments from plasma of all patients migrated as ICs with MW of up to 750kDa, also containing anti-hinge NAbs. These findings not only provide for the first time a plausible mechanism of how  $F(ab')_2$ -IC stimulate complement amplification together with anti-hinge NAbs, but also suggest a novel mechanism of how SIRS can develop from body-owned substances.

## Zusammenfassung

1971 zeigte Reid, dass Immunkomplexe, bestehend aus Antigenen und  $F(ab')_2$  Fragmenten von IgG Antikörpern von Hasen, in  $Mg^{2+}$ EGTA-Plasma von Meerschweinchen Komplement-Amplifizierung stimulieren (Reid 1971).  $Mg^{2+}$ EGTA-Plasma erlaubte ausschliesslich die Stimulierung der Komplement-Amplifizierung. Interessanterweise erreichte der C3 Verbrauch in Reids Versuchen ein Maximum, das von einem unbekanntem Plasmafaktor limitiert zu sein schien, der infolge seiner Interaktion mit  $F(ab')_2$ -Immunkomplexen Komplement-Amplifizierung stimulierte. Wir wiederholten die Experimente von Reid, aber unter möglichst physiologischen Bedingungen mit menschlichem Plasma und mit  $F(ab')_2$ -Immunkomplexen, die aus menschlichen, natürlicherweise vorkommenden IgG Antikörpern (NAb) hergestellt worden waren. Wir zeigen, dass Adsorption von Plasma an  $F(ab')_2$  von menschlichem Gesamt-IgG diesen Faktor entfernt und die von  $F(ab')_2$ -Immunkomplexen ausgelöste Komplement-Aktivierung vollständig hemmt. Dieser Faktor wurde anschliessend aus humanem gepoolten Gesamt-IgG (IVIG) als NAb aufgereinigt, der an die Hinge-Region von  $F(ab')_2$ , aber nicht an intaktes IgG bindet. Dieser "Anti-Hinge NAb" stellte die Komplement-Amplifizierung von  $F(ab')_2$ -Immunkomplexen in adsorbiertem 20%  $Mg^{2+}$ EGTA-Plasma bei 12.5  $\mu$ g/ml wieder her. Auf diese Weise haben wir gezeigt, dass Anti-Hinge NAb der fehlende Plasmafaktor ist, den Reid vor 36 Jahren erwähnt hat. Anti-Hinge NAb muss mit  $F(ab')_2$ -Immunkomplexen sekundäre, starre Immunkomplexe gebildet haben, wodurch diese naszierende C3bs in dimerer Form gebunden haben, wie wir mittels 2D SDS-PAGE und einer Hydroxylamin-Behandlung zwischen den Dimensionen bestätigt haben.  $C3b_2$ - $F(ab')_2$ -Immunkomplexe sind potente C3 Konvertase Vorläufer in Analogie zu  $C3b_2$ -IgG Komplexen (Lutz and Jelezarova 2006). Die Letzteren werden selten und einzig an IgG NAb gebildet, die eine Affinität zu C3 in ihrem Framework besitzen. Demgegenüber bilden  $F(ab')_2$ -Immunkomplexe aus Antikörpern mit verschiedenen Spezifitäten  $C3b_2$ - $F(ab')_2$ -Immunkomplexe und sogar, wie hier ersichtlich aus menschlichen IgG Anti-Spektrin NAbs, die keine Affinität für C3 besitzen (Lutz et al. 1993). Diese Befunde zeigen auf, dass beliebige  $F(ab')_2$  Fragmente, welche

Immunkomplexe bilden, in der Lage sein sollten zusammen mit Anti-Hinge NAb Komplement-Amplifizierung zu stimulieren. Wir haben folglich untersucht, ob diese Art der Stimulierung von Komplement-Amplifizierung auch zu Beginn eines systemischen inflammatorischen Response-Syndromes (SIRS) in Sepsis auftreten kann. Der Beginn eines SIRS ist gekennzeichnet durch die Freisetzung von Elastasen aus aktivierten weissen Zellen und durch eine unkontrollierte Stimulation der Komplement-Aktivierung, aber es ist ungeklärt geblieben, wie die Komplement-Amplifizierung stimuliert wird. Es war bekannt, dass Elastase von Neutrophilen IgG Moleküle in  $F(ab')_2$  Fragmente zerlegen kann (Baici et al. 1980), und dass Elastase, obwohl sie in Plasma mit Inhibitoren komplexiert ist, transient *in vivo* aktiv ist. In der Tat enthielt Plasma von septischen Patienten zu Beginn eines SIRS  $F(ab')_2$  Fragmente. Die Konzentration von  $F(ab')_2$  Fragmenten und von Faktor Bb, ein Mass für Komplement-Amplifizierung, korrelierten linear mit der von freigesetzter Elastase. Darüber hinaus wanderten die  $F(ab')_2$  Fragmente von allen neun Sepsis-Patienten als Immunkomplexe mit MW von bis zu 750 kDa, die auch Anti-Hinge NAb enthielten. Diese Ergebnisse bieten zum ersten Mal nicht nur einen plausiblen Mechanismus an, wie  $F(ab')_2$ -Komplexe zusammen mit Anti-Hinge NAb Komplement-Amplifizierung stimulieren, sondern weisen auch auf einen neuen Mechanismus hin, wie sich ein SIRS aus körpereigenen Substanzen entwickeln kann.