

Aus der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Funktionelle Charakterisierung der mit
altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) assoziierten
Komplementfaktor-H-Variante Y402H

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Florian Börncke

aus

Lübeck

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. B. Schwappach

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2012

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Börncke F, Pollok-Kopp B, Sonntag G, Oppermann M (2006): Die Bedeutung von Komplementfaktor H in der Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) – Funktionelle Charakterisierung der polymorphen Faktor-H-Variante Y402H. Jahrestagung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, 150

Börncke F, Pollok-Kopp B, Tzetkov MV, Oppermann M (2007): Defective binding to C-reactive protein and impaired cofactor activity of the allotypic Y402H variant of complement factor H. 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, 42, 107

Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, Fritsche LG, Chong NV, Fimmers R, Wienker T, Holz FG, Weber BH, Oppermann M (2008): Systemic complement activation in age-related macular degeneration. PLoS One [3\(7\)](#), e2593

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	V
II.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	X
II.1	Abbildungsverzeichnis.....	X
II.2	Tabellenverzeichnis.....	XI
1.	Einleitung	1
1.1	Aktivierungswege des Komplementsystems und seine Regulatoren.....	1
1.2	Faktor H - der wichtigste Inhibitor der Komplement- aktivierung über den alternativen Weg.....	6
1.3	Der FH-Polymorphismus Y402H und die altersabhängige Makuladegeneration (AMD).....	9
1.4	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	12
2.	Materialien	13
2.1	Geräte und Zubehör.....	13
2.2	Labormaterialien.....	14
2.3	Chemikalien, Kits und sonstige Materialien.....	15
2.4	Lösungen und Puffer.....	18
2.5	Proteine und Enzyme	23
2.6	Monoklonale Antikörper.....	23
2.7	Polyklonale Antikörper und Antikörper-Konjugate.....	24
2.8	Eukaryote Zelllinien.....	24
2.9	Zellkulturmedien.....	25
2.10	Primer.....	26
3.	Methoden	27
3.1	Genotypisierung von Blutspendern.....	27
3.1.1	Aufreinigung von DNA aus Vollblut.....	27
3.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
3.1.3	Restriktionsspaltung von DNA.....	29
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
3.1.5	DNA-Sequenzierung.....	30
3.2	Affinitätschromatographische Verfahren.....	31
3.2.1	Kopplung des monoklonalen Antikörpers L20/3 an Ultralink Biosupport.....	31
3.2.2	Herstellung von reinen Faktor-H-Präparaten aus Plasma mittels Immunaффinitätschromatographie.....	33

3.2.3	Herstellung eines Faktor-H-depletierten Serums.....	34
3.2.4	Aufreinigung monoklonaler Antikörper mit Protein-G-Affinitätschromatographie.....	34
3.3	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35
3.4	Konjugierung von Faktor H mit EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin.....	35
3.5	Herstellung monoklonaler, epitopspezifischer Antikörper.....	37
3.5.1	Allgemeines zum Verfahren.....	37
3.5.2	KLH-Konjugierung der Immunisierungspeptide.....	37
3.5.3	Immunisierung der Mäuse.....	38
3.5.4	Präparation von Maus-Peritoneal-Makrophagen.....	39
3.5.5	Zellfusion und selektive Aufzucht von Hybridomen.....	39
3.5.6	Identifikation von Hybridomen mit der gewünschten Spezifität.....	40
3.5.7	Subklonierung der positiven Klone.....	41
3.5.8	Antikörper-Massenproduktion im MiniPerm-Bioreaktor.....	41
3.6	ELISA-Verfahren.....	42
3.6.1	Vorbereitungen für den Ba-ELISA: Depletion von Faktor B.....	43
3.6.1.1	Kopplung des monoklonalen Antikörpers M13/12 an biomagnetische Partikel.....	43
3.6.1.2	Depletion von Faktor B.....	45
3.6.2	Vorbereitungen für den C3a-ELISA: C3-Präzipitation.....	45
3.6.3	ELISA zum Antikörper-Screening und zur Bestimmung der Antigenspezifität monoklonaler Antikörper.....	46
3.6.4	ELISA zur Immunglobulin-Subklassifizierung.....	46
3.6.5	Modifizierter ELISA zur Quantifizierung der Bindung von Faktor H an C3b / iC3b.....	47
3.6.6	Modifizierter ELISA zur Quantifizierung der Bindung von Faktor H an Heparin.....	47
3.6.7	Modifizierter ELISA zur Quantifizierung der Bindung von Faktor H an CRP.....	47
3.7	Auftrennung und Nachweis von Proteinen.....	48
3.7.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
3.7.1.1	Gießen eines Polyacrylamidgels.....	48
3.7.1.2	Probenvorbereitung und Elektrophorese.....	49
3.7.2	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung.....	50
3.7.3	Immunoblot.....	50
3.8	Zellkultur.....	51
3.8.1	Kultivierung der Zellen.....	51
3.8.2	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	52
3.8.3	Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen.....	52

3.9	Durchflusszytometrie (FACS)	53
3.9.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie.....	53
3.9.2	Nachweis von C3-Spaltprodukten auf Zelloberflächen.....	53
3.9.3	Bindung von biotinyliertem Faktor H auf Zellen.....	54
3.9.4	Bindung von nativem Faktor H auf Zellen.....	54
3.10	Methoden zur Charakterisierung der Cofaktor-Aktivität von Faktor H	55
3.10.1	Cofaktor-Aktivität in der flüssigen Phase.....	55
3.10.2	Cofaktor-Aktivität auf Zelloberflächen.....	55
3.11	Komplementaktivierung in Serum	56
4.	Ergebnisse	58
4.1	Genotypisierung der FH-Spender	58
4.1.1	Bestimmung des FH-Y402H-Genotyps.....	58
4.1.2	Bestimmung des I62V- und des D936E-Genotyps.....	59
4.2	Aufreinigung und Weiterverarbeitung von Faktor H	61
4.2.1	Herstellung reiner FH-Präparate aus dem Plasma genotypisierter Spender.....	61
4.2.2	Biotinylierung von Faktor H.....	62
4.3	Charakterisierung der monoklonalen anti-FH402Y/H Antikörper	63
4.3.1	Überprüfung des Immunisierungserfolges.....	63
4.3.2	Bestimmung der Antigenspezifität mittels Immunoblot.....	63
4.3.3	Bestimmung der Antigenspezifität im ELISA.....	64
4.3.4	Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse.....	66
4.4	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf Bindungseigenschaften von Faktor H	66
4.4.1	Bindung von FH-402Y und FH-402H an C3b und iC3b.....	66
4.4.2	Bindung von FH-402Y und FH-402H an Heparin.....	68
4.4.3	Bindung von FH-402Y und FH-402H an C-reaktives Protein (CRP).....	70
4.4.4	Bindung von biotinyliertem FH-402Y und FH-402H an Zelloberflächen.....	72
4.4.5	Bindung von unmodifiziertem FH-402Y und FH-402H an RPE-Zellen.....	74
4.5	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die schnelle Komplementregulation durch Faktor H	75
4.5.1	Herstellung eines Δ FH-Serums.....	77
4.5.2	Kinetik der spontanen Ba-Generierung in Serum.....	77
4.5.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Zymosan-induzierte Komplementaktivierung in Serum.....	78

4.5.4	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Faktor-H-vermittelte Regulation der Komplementaktivierung.....	80
4.5.5	Beeinflussung der komplementinhibitorischen Aktivität von Faktor H durch monoklonale Antikörper.....	82
4.6	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Cofaktor-Aktivität von Faktor H in der flüssigen Phase.....	83
4.6.1	Kinetik der Faktor H-abhängigen C3b-Prozessierung.....	83
4.6.2	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die FH-abhängige iC3b-Generierung in der flüssigen Phase.....	86
4.6.3	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die FH-abhängige C3dg-Generierung in der flüssigen Phase.....	87
4.6.4	Einfluss der Blockade des FH-402Y-Epitops mit monoklonalen Antikörpern auf die Cofaktor-Aktivität.....	90
4.7	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die C3dg-Bildung in Serum.....	91
4.7.1	Abhängigkeit der C3dg-Generierung in Serum von der FH-Konzentration.....	91
4.7.2	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die C3dg-Generierung in Serum.....	92
4.7.3	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die C3dg-Generierung in unmodifizierten Seren von Einzelspendern.....	94
4.8	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Cofaktor-Aktivität auf Zelloberflächen.....	95
4.8.1	Beladung von RBL-Zellen mit C3b.....	96
4.8.2	Kinetik der C3dg-Generierung auf Zelloberflächen in Anwesenheit von FH-402Y oder FH-402H.....	97
4.8.3	C3dg-Generierung auf Zelloberflächen in Abhängigkeit von der FH-Konzentration.....	99
4.9	Bestimmung von Komplement-Aktivierungsprodukten in den Plasmen gesunder Probanden und AMD-Patienten.....	100
4.9.1	Einfluss des Krankheitsstatus auf die Konzentration der Komplement-Aktivierungsprodukte.....	100
4.9.2	Einfluss des FH-Genotyps auf die Konzentration der Komplement-Aktivierungsprodukte.....	101
5.	Diskussion	105
6.	Zusammenfassung	121
7.	Literaturverzeichnis	123

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin / Alanin
α	anti
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz
Akt. / akt.	Aktivität / aktiviert
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
Asp	Aspartat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
biot.	biotinyliert
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cFA	Komplettes Freund-Adjuvans
CFH	Komplementfaktor H = Faktor H
cm	Zentimeter
CNV	choroidale Neovaskularisation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR1	Komplementrezeptor 1
CRP	C-reaktives Protein
D	Aspartat
Da	Dalton
DAF	<i>Decay-Accelerating-Factor</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
Δ FH	Faktor-H-depletiert
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	et alii
F	Phenylalanin
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
FD	Faktor D
FH	Faktor H
FHL-1	Faktor H- <i>like</i> Protein 1
FHR	Faktor H <i>related</i> Protein
FI	Faktor I
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	Guanin / Glycin
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitation
GA	Geographische Atrophie
Glu	Glutamat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde(n)
H	Histidin
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HBSS	<i>Hanks's Buffered Salt Solution</i>
Hep	Heparin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
<i>HF1</i>	<i>H-Factor Gene 1</i>
His	Histidin
hitzeinakt.	hitzeinaktiviert
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HUS	Hämolytisch-Urämisches Syndrom
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
I	Isoleucin
iFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans

Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
Int	Intensität
IVS	Inversion
K	Lysin
Kan.	Kaninchen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KG	Kommanditgesellschaft
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
Kontr.	Kontrolle(n)
konj.	konjugiert
L	Leucin
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
M	Mol(ar) / Molekulargewichtsmarker
mA	Milliampere
mAk	Monoklonale(r) Antikörper
MAK	Membranangriffskomplex
MASP	MBL-aktivierende Serinprotease
max.	Maximal(wert)
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	Membran-Cofaktor-Protein
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MgCl_2	Magnesiumchlorid
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
MPGNII	Membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II
Ms	Maus
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
N	normal / Asparagin

N-	Amino-
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
ng	Nanogramm
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OH-	Hydroxyl-
p	Signifikanz
P	Puffer / Prolin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNH	Paroxysmal nächtliche Hämoglobinurie
Prof.	Professor
Q	Glutamin
R	Arginin
RBL	Ratten-basophile Leukämie Zellen
RCA	<i>Regulator of Complement Activation</i>
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RPE	retinales Pigmentepithel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s.	siehe
SAVP	Streptavidin-gekoppelte Peroxidase
SCR	<i>Short-Consensus-Repeat</i> -Domäne
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde(n)
SH-Gruppe	Thiolgruppe
SMCC	Succinimidyl- <i>trans</i> -4-(<i>N</i> -maleimidylmethyl)cyclohexan-1-carboxylat
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
sog.	sogennannt(e/er)

SSC	<i>Side Scatter</i>
St.	Sankt
T	Thymin / Threonin
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA
TBS	<i>TRIS Buffered Saline</i>
TCC	<i>Terminal Complement Complex</i>
TED	Thioester-Domäne
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor Alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliches
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
V	Valin
v.a.	vor allem
Val	Valin
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

II.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Die zentrale Komplementkomponente C3 und seine weitere Prozessierung	S. 2
Abb. 1.2	Der alternative Weg des Komplementsystems	S. 4
Abb. 1.3	Strukturelle Organisation und Bindungsstellen von Faktor H	S. 7
Abb. 3.1	Kopplung eines Proteins an UltraLink Biosupport	S. 32
Abb. 3.2	Struktur des EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin	S. 36
Abb. 4.1	PCR-Strategie zur Amplifizierung von Exon 9 des HF1-Gens	S. 58
Abb. 4.2	Bestimmung des Y402H-Genotyps mit Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus	S. 59
Abb. 4.3	DNA-Sequenzierung zur Bestimmung des I62V- und des D936E-Genotyps	S. 60
Abb. 4.4	Aufreinigung von FH-402Y und FH-402H aus Plasma	S. 62
Abb. 4.5	Charakterisierung FH-Varianten-spezifischer monoklonaler Antikörper mittels Immunoblot	S. 64
Abb. 4.6	Charakterisierung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für FH-402Y bzw. FH-402H mittels ELISA	S. 65
Abb. 4.7	Bindung von FH-402Y und FH-402H an C3b und iC3b	S. 67
Abb. 4.8	Bindung von FH-402Y und FH-402H an Heparin	S. 69
Abb. 4.9	Bindung von FH-402Y und FH-402H an CRP	S. 71
Abb. 4.10	Bindung von biotinyliertem FH-402Y und biotinyliertem FH-402H an HUVECs	S. 73
Abb. 4.11	Bindung von biotinyliertem FH-402Y und biotinyliertem FH-402H an RPE-Zellen	S. 74
Abb. 4.12	Bindung von FH-402Y und FH-402H an RPE-Zellen	S. 76
Abb. 4.13	Erfolg der immunaffinitätschromatographischen Depletion von Faktor H aus Serum	S. 77
Abb. 4.14	Spontane Generierung des Ba-Fragments in Δ FH-Serum	S. 78
Abb. 4.15	Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Zymosan-induzierte Komplementaktivierung in Serum	S. 79
Abb. 4.16	Inhibition der Ba-Generierung in Serum durch FH-402Y und FH-402H	S. 81
Abb. 4.17	Ba-Generierung in Serum nach Präinkubation von FH-402Y und FH-402H mit anti-FH-mAk	S. 83
Abb. 4.18	Faktor-I-vermittelte Spaltung von C3b in Anwesenheit von Faktor H	S. 85
Abb. 4.19	Einfluss von pH und Salzkonzentration auf die FH-abhängige C3dg-Generierung	S. 86

Abb. 4.20	Cofaktor-Aktivität von FH-402Y und FH-402H für die Generierung von iC3b	S. 87
Abb. 4.21	Cofaktor-Aktivität von FH-402Y und FH-402H für die Generierung von C3dg	S. 89
Abb. 4.22	Cofaktor-Aktivität (C3dg-Generierung) von FH-402Y und FH-402H von Einzelspendern	S. 90
Abb. 4.23	Inhibition der Cofaktor-Aktivität von Faktor H durch Präinkubation mit anti-FH-mAk	S. 91
Abb. 4.24	Einfluss der FH-Konzentration auf die C3dg-Generierung in Serum	S. 92
Abb. 4.25	Generierung von C3dg in Serum in Anwesenheit von FH-402Y oder FH-402H	S. 93
Abb. 4.26	C3-Prozessierung in unmodifizierten Seren von Einzelspendern	S. 94
Abb. 4.27	Nachweisprinzip von C3dg auf RBL-Zellen	S. 95
Abb. 4.28	Beladung von RBL-Zellen mit C3b	S. 96
Abb. 4.29	Zeitabhängige C3dg-Generierung auf RBL-Zellen in Anwesenheit von FH-402Y und FH-402H	S. 98
Abb. 4.30	Nachweis von C3- β -Kette im Überstand von C3b-beladenen RBL-Zellen nach Inkubation mit FI und FH-402Y / FH-402H	S. 98
Abb. 4.31	Konzentrationsabhängige C3dg-Generierung auf RBL-Zellen in Anwesenheit von FH-402Y und FH-402H	S. 99
Abb. 4.32	Faktor H- und Faktor D-Konzentrationen in Plasmen von AMD-Patienten	S. 101
Abb. 4.33	Plasmakonzentrationen von Komplementsubstraten und Aktivierungsprodukten bei AMD-Patienten	S. 102
Abb. 5.1	Funktionelle Charakterisierung von FH-Epitopen und Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf FH-Funktionen	S.115
Abb. 5.2	Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die C3b-Prozessierung (Hypothese)	S.118

II.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Monoklonale anti-Faktor-H-Antikörper	S. 24
Tab. 3.1	Zusammensetzung des PCR-Mastermix	S. 28
Tab. 3.2	Reaktionsbedingungen für die erste PCR	S. 28
Tab. 3.3	Reaktionsbedingungen für die Nested-PCR	S. 28
Tab. 3.4	Zusammensetzung des Restriktionsansatzes	S. 29
Tab. 3.5	Zusammensetzung des Mastermix für die Sequenzier-PCR	S. 31
Tab. 3.6	Reaktionsbedingungen für die Sequenzier-PCR	S. 31
Tab. 3.7	Immunisierungsschema zur Herstellung monoklonaler Antikörper	S. 39

Tab. 3.8	Ablauf eines <i>Sandwich</i> -ELISAs	S. 44
Tab. 3.9	Verwendete <i>Sandwich</i> -ELISAs	S. 44
Tab. 3.10	Zusammensetzung eines Laemmli-Gels	S. 49
Tab. 3.11	Zusammensetzung eines Gradientengels	S. 49
Tab. 3.12	Nachweis von C3-Spaltprodukten auf Zelloberflächen	S. 54
Tab. 4.1	Genotypen-Verteilung der FH-Spender	S. 61
Tab. 4.2	Immunglobulin-Subklassen der variantenspezifischen anti-FH (SCR7) mAk	S. 65
Tab. 4.3	Zusammenstellung der Studienpopulation	S. 100
Tab. 4.4	Einfluss des Y402H-Genotyps auf Plasmakonzentrationen von Komplementregulatoren, -substraten und –aktivierungsprodukten bei gesunden Probanden	S. 103
Tab. 4.5	FH-Polymorphismen sowie Risiko- und protektive FH-Haplotypen innerhalb der Studienpopulation	S. 104
Tab. 4.6	Abhängigkeit der Konzentrationen einzelner Komplementregulatoren und –aktivierungsprodukte vom FH-Haplotyp bei Kontrollen und AMD-Patienten	S. 104

1. Einleitung

1.1 Aktivierungswege des Komplementsystems und seine Regulatoren

Das Komplementsystem ist ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Zu seinen physiologischen Funktionen zählt neben der Generierung proinflammatorischer Mediatoren und der Elimination mikrobieller Erreger das Entfernen von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen aus dem Gewebe und der Zirkulation (Walport 2001, Zipfel und Skerka 2009). Ebenso spielt das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der Regulation der spezifischen Immunität (Carroll 2004). Das Komplementsystem besteht aus über 20 sich kaskadenförmig aktivierenden (Pro-)Enzymen im Blutplasma. Zentrale Komplement-Komponente ist das 190 kDa große Protein C3. Mit bis zu 1600 µg/ml weist C3 die höchste Serumkonzentration aller Komplementproteine auf und macht einen nennenswerten Anteil des Gesamtserumproteins aus (Müller-Eberhard 1975 und 1988). C3 besteht aus einer ca. 125 kDa großen α -Kette und einer 75 kDa großen β -Kette, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verknüpft sind (Davis und Harrison 1982, Davis et al. 1984, Janatova 1986, Müller-Eberhard 1988, s. Abb. 1.1). Eine weitere Disulfid-Brücke befindet sich innerhalb der α -Kette (Janatova 1986, s. Abb. 1.1). Durch Abspalten des 9 kDa großen Anaphylatoxins C3a vom N-Terminus der α -Kette wird C3 zu C3b aktiviert (Müller-Eberhard 1988, s. Abb. 1.1). Diese Reaktion wird durch heterodimere Enzymkomplexe, die C3-Konvertasen, katalysiert. Kristallographische Daten zeigen, dass die Aktivierung von C3 zu C3b komplexe Konformationsänderungen innerhalb des Moleküls zur Folge hat (Janssen et al. 2006, Abdul Ajees et al. 2006, Janssen und Gros 2007). Dabei kommt es vor allem zu einer starken Translokation und Aktivierung der sog. Thioester-Domäne (TED) (Janssen et al. 2006, Abdul Ajees et al. 2006, Janssen und Gros 2007). Über den reaktiven internen Thioester, der dieser Domäne ihren Namen gibt, bindet C3b kovalent an Hydroxylgruppen auf verschiedenen Oberflächen (Law et al. 1979a, Law et al. 1979b, s. Abb. 1.1). Dadurch werden zum Beispiel Bakterien für den Abbau durch Phagozyten opsonisiert. C3b kann mit der C3-Konvertase einen trimeren Proteinkomplex bilden, der C5 in C5a und C5b spaltet und demzufolge als C5-Konvertase bezeichnet wird (Müller-Eberhard 1988, s. Abb. 1.2). Mit dieser Reaktion wird die lytische Endstrecke der Komplementkaskade eingeleitet, welche die Zusammenlagerung von C5b, C6, C7, C8 und sechs Molekülen C9 zum Membran-Angriffs-Komplex (MAK, C5b-9) umfasst (Müller-Eberhard 1975, s. Abb. 1.2).

Die Komplementkaskade kann über drei verschiedene Wege initiiert werden: den klassischen, den Mannose-bindenden Lektin-Weg und den alternativen Weg (Walport 2001). Alle drei Wege münden in der Aktivierung von C3 und C5, wobei sich die dafür

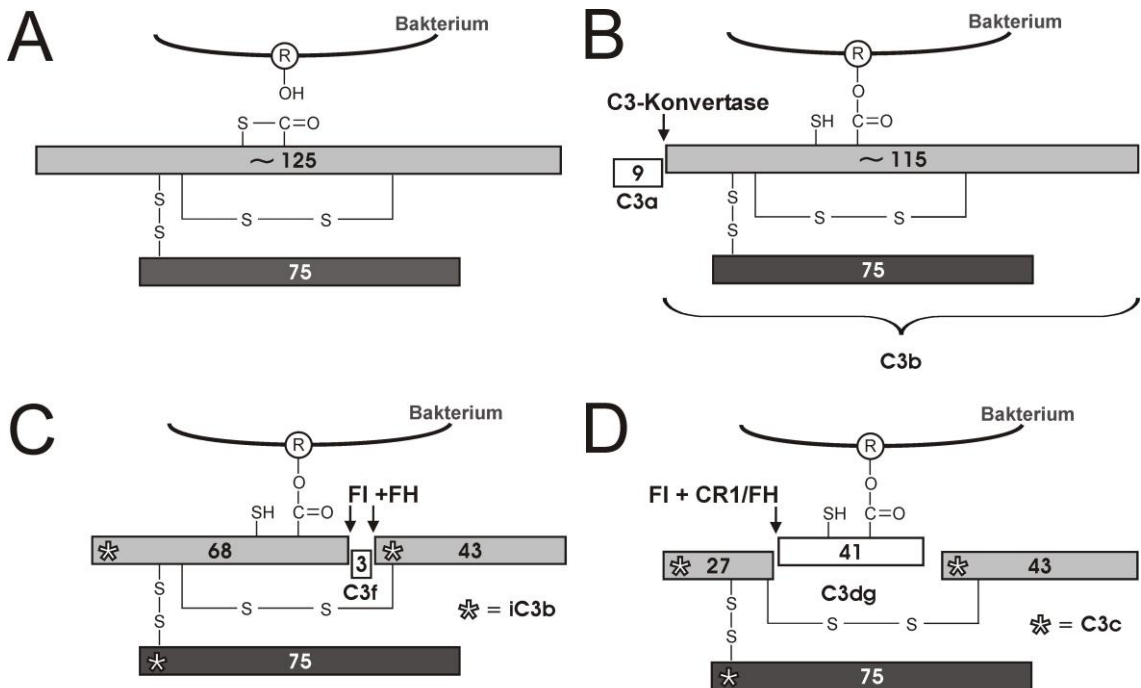


Abb. 1.1 Die zentrale Komplementkomponente C3 und ihre weitere Prozessierung. **A** C3 (ca. 190 kDa) besteht aus einer α -Kette (hellgrau) und einer β -Kette (dunkelgrau). Die Zahlen in der Abbildung geben die Größe des jeweiligen Fragments in kDa an. Eine Disulfidbrücke (S-S) verbindet beide Ketten miteinander, eine weitere Disulfidbrücke befindet sich innerhalb der α -Kette. Die α -Kette trägt einen reaktiven internen Thioester. **B** Die C3-Konvertase spaltet vom N-Terminus der α -Kette C3a (weiß) ab, wodurch C3 zu C3b aktiviert wird. Dadurch wird der interne Thioester der α -Kette aktiviert, über den C3b unter Ausbildung eines Esters an Hydroxyl-Gruppen (OH) (**A**) auf Oberflächen (z.B. eines Bakteriums) bindet. **C** Faktor I (FI) spaltet die α -Kette von C3b an zwei Stellen (\downarrow). Dabei wird C3f frei (weiß). Die Gesamtheit aus den beiden α -Ketten-Fragmenten (hellgrau) und der β -Kette (dunkelgrau) wird als iC3b (*) bezeichnet und bleibt kovalent auf der aktivierenden Oberfläche gebunden. Wichtigster Cofaktor von FI für diesen Schritt der C3b-Inaktivierung ist Faktor H. **D** FI kann eines der α -Ketten-Fragmente von iC3b ein weiteres Mal spalten (\downarrow). C3dg (weiß) bleibt an der aktivierenden Oberflächen gebunden. Die α -Ketten-Fragmente (hellgrau) und die β -Kette (dunkelgrau) bilden zusammen C3c (*), welches bei der Reaktion frei wird. Der wichtigste Cofaktor für diese Reaktion ist der C3b-Rezeptor CR1. (Müller-Eberhard 1975, Pangburn et al. 1977, Law et al. 1979a, Law et al. 1979b, Harrison und Lachmann 1980, Davis und Harrison 1982, Ross et al. 1982, Davis et al. 1984, Lachmann und Hughes-Jones 1984, Janatova 1986, Müller-Eberhard 1988)

verantwortlichen C3- bzw. C5-Konvertasen je nach Aktivierungsweg aus unterschiedlichen Komponenten zusammensetzen. Der klassische Weg der Komplementaktivierung benötigt neben den oben genannten Proteinen die Komponenten C1, C2 und C4 und wird durch Calcium-abhängige Interaktion von C1 mit Antigen-gebundenem Immunglobulin (Ig) G oder IgM in Gang gesetzt (Lachmann und Hughes-Jones 1984). Die Komplementaktivierung über den Mannose-bindenden Lektin-Weg erfolgt in analoger Art und Weise. Mannose-bindendes Lektin (MBL) bindet an endständige Mannose-Gruppen auf verschiedenen Bakterien und aktiviert Komplement, indem es mit der C4- und C2-spaltenden Serin-Protease MASP2 interagiert (Walport 2001).

Der alternative Weg der Komplementaktivierung benötigt neben C3 und den Proteinen der lytischen Endstrecke die Faktoren B und D sowie diverse regulatorische Proteine (Pangburn und Müller-Eberhard 1984). Die Formation der C3-Konvertase des alternativen Weges wird dadurch eingeleitet, dass Faktor B an bereits gebildetes C3b bindet (Lachmann und Hughes-Jones 1984, s. Abb. 1.2). Der C3b,B-Komplex wird durch Faktor D aktiviert, eine 24 kDa große Serinprotease, die im Plasma in aktiver Form vorliegt (Müller-Eberhard 1988). Faktor D spaltet Faktor B (90 kDa) in Ba (30 kDa) und das katalytisch aktive Bb (60 kDa) (Pangburn und Müller-Eberhard 1984, Müller-Eberhard 1988, s. Abb. 1.2). Diese Reaktion findet nur statt, wenn Faktor B im Komplex mit C3b vorliegt (Pangburn und Müller-Eberhard 1984). Ba dissoziiert nach der Spaltung von diesem Komplex. C3b und Bb bilden gemeinsam die C3-Konvertase des alternativen Weges (Pangburn und Müller-Eberhard 1984, s. Abb. 1.2). Die Interaktion von C3b mit B und Bb ist im Wesentlichen abhängig von der Anwesenheit von Magnesiumionen (Pangburn und Müller-Eberhard 1984). Andererseits benötigt der alternative Weg der Komplementaktivierung kein Calcium, da er unabhängig von C1 ist. Daher kann der alternative Weg im Serum selektiv durch Zugabe von Magnesium-EGTA untersucht werden, einem Chelator, der zwar Calcium-, aber nicht Magnesiumionen bindet (Lachmann und Hughes-Jones 1984).

Weil die Bildung der C3-Konvertase des alternativen Weges präformiertes C3b benötigt, besitzt dieser Weg neben seiner Fähigkeit, Komplement eigenständig zu aktivieren, zugleich die Funktion einer Verstärkerschleife für andere Aktivierungswege (Lachmann und Hughes-Jones 1984, s. Abb. 1.2). Im Vergleich zu den anderen Aktivierungswegen ist zur Initiierung des alternativen Weges keine spezifische Erkennung von Fremdoberflächen durch Antikörper oder MBL notwendig. Vielmehr stammt das zur Bildung der C3-Konvertase benötigte C3b aus einem kontinuierlichen Umsatz des Systems. Dieser Mechanismus wird als „*tick-over*“ bezeichnet (Lachmann und Hughes-Jones 1984, Bexborn et al. 2008). In einer nichtenzymatischen Reaktion wird kontinuierlich bei einem geringen Anteil des Plasma-C3 der interne Thioester hydrolysiert (Pangburn und Müller-Eberhard 1984, s. Abb. 1.2). Das gebildete C3(H₂O) weist ähnliche Eigenschaften auf wie C3b und kann Faktor B binden (Pangburn und Müller-Eberhard 1984). In Anwesenheit von Magnesiumionen und Faktor D wird der Komplex C3(H₂O),B zu einer speziellen C3-Konvertase der flüssigen Phase (C3(H₂O),Bb) aktiviert (Pangburn und Müller-Eberhard 1984, s. Abb. 1.2). C3(H₂O),Bb besitzt nur eine kurze Halbwertszeit, ist aber relativ resistent gegenüber der Inaktivierung durch verschiedene Regulatoren und katalysiert die Bildung von C3b, welches an Oberflächen bindet und dort zur Formation weiterer C3-Konvertasen zur Verfügung steht (Pangburn und Müller-Eberhard 1984, Bexborn et al. 2008, s. Abb. 1.2).

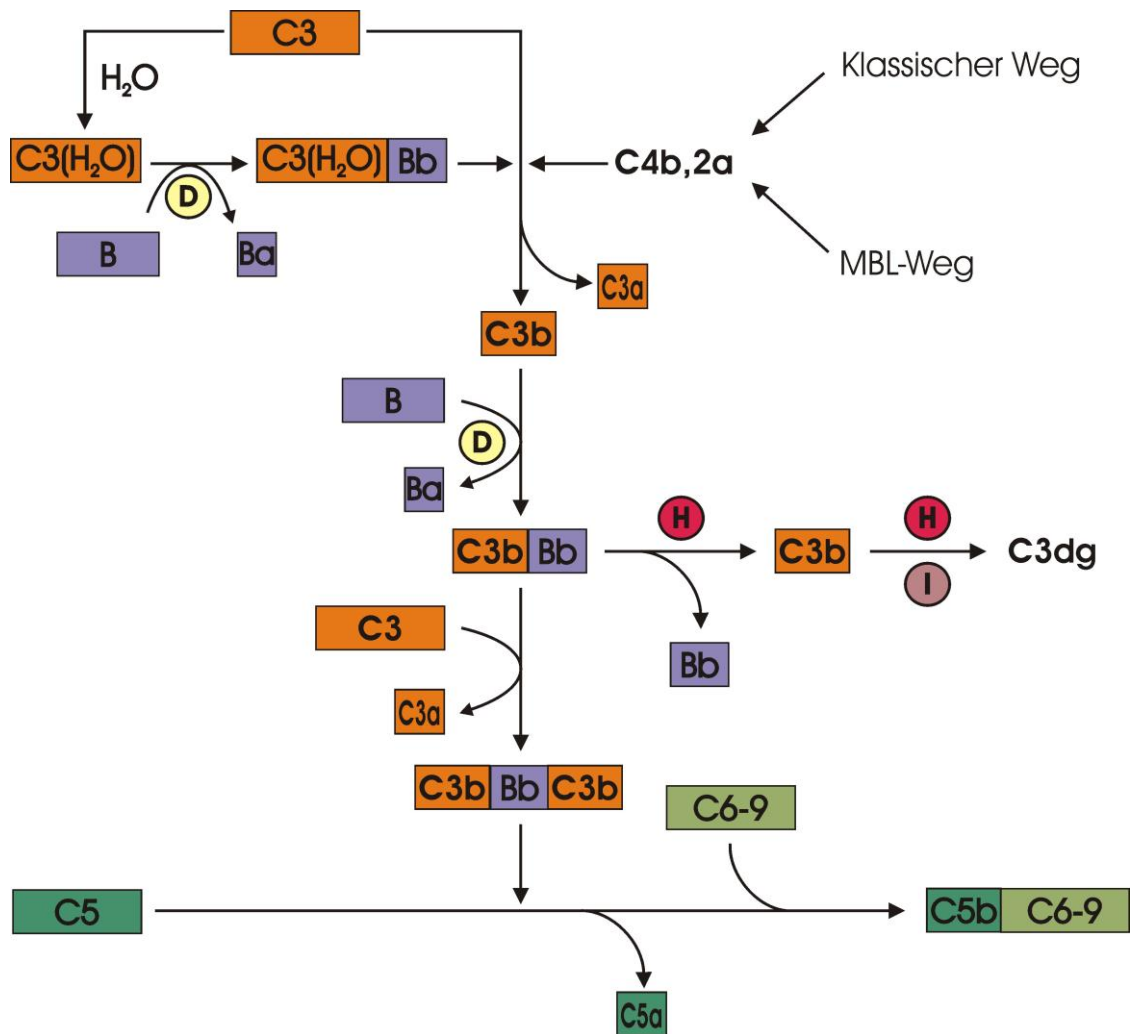


Abb. 1.2 Der alternative Weg des Komplementsystems. C3 kann nichtenzymatisch zu C3(H₂O) hydrolysiert werden. C3(H₂O) kann B binden, welches daraufhin von der Protease D in Bb und Ba gespalten wird. C3(H₂O) und Bb bilden eine C3-Konvertase der flüssigen Phase, die C3 in C3a und C3b spaltet. Die Bildung von C3b initiiert den alternativen Weg des Komplementsystems als solchen. Im Sinne einer Verstärkerschleife kann C3b auch von der Reaktion der C3-Konvertase C4b,2a aus dem klassischen Weg und dem Mannose-bindenden Lektin(MBL)-Weg stammen. Unterstützt durch die Protease D bildet C3b mit Bb die C3-Konvertase des alternativen Weges (C3b,Bb), die C3 in C3a und C3b spaltet. C3b kann sich an C3b,Bb anlagern und somit die C3-Konvertase in die C5-Konvertase C3b,Bb,C3b umwandeln. Durch Spaltung von C5 in C5a und C5b initiiert dieses Enzym die Bildung des Membranangriffskomplexes C5b-9. Das regulatorische Protein Faktor H (H) inaktiviert die C3-Konvertase, indem es deren Zerfall beschleunigt (*Decay-Accelerating-Aktivität*). Faktor H ist weiterhin Cofaktor für die Protease I, die den Abbau von C3b zu C3dg katalysiert (Lachmann und Hughes-Jones 1984, Pangburn und Müller-Eberhard 1984, Müller-Eberhard 1988, Rodríguez de Córdoba et al. 2004).

Da die Komplementaktivierung über den alternativen Weg keines spezifischen Stimulus bedarf, ist eine zuverlässige Regulation des Systems notwendig. Diese Regulation muss gewährleisten, dass Komplement spezifisch und effizient auf fremden Oberflächen aktiviert wird, während körpereigene Strukturen vor komplementvermittelter Schädigung geschützt werden. Auf diese Weise wird auch ein unnötiger Verbrauch der Komplementproteine verhindert. In der Tat sind viele

Komplementkomponenten regulatorische Proteine, die die Aktivität des Systems modulieren und so körpereigenes Gewebe schützen. Der Schutz körpereigener Zellen vor komplementvermittelter Schädigung wird einerseits durch membranständige Regulator-Proteine vermittelt. Zu diesen zählen *Decay-Accelerating-Faktor* (DAF, CD55), Membran-Cofaktor-Protein (MCP, CD46) und der Komplementrezeptor CR1 (CD35) (Kim und Song 2006). Meist regulieren diese Proteine die Bildung von C3b. So beschleunigen beispielsweise DAF und CR1 den Zerfall der C3-Konvertase (Lublin und Atkinson 1989, Kim und Song 2006). Eine andere regulatorische Strategie ist der Abbau von C3b durch lösliche Kontrollproteine. Die typische Protease für den C3b-Abbau ist Faktor I (FI), eine aktive Protease, die im Serum mit einer Konzentration von ca. 35 µg/ml vorkommt (Pangburn et al. 1977). Damit FI C3b spalten kann, müssen gleichzeitig bestimmte komplementregulatorische Proteine als Cofaktoren vorliegen (Müller-Eberhard 1988). Solche Cofaktoren sind u.a. MCP und CR1 (Liszewski et al. 1991, Kim und Song 2006).

Der Abbau von C3b erfolgt in zwei Schritten. Zuerst spaltet FI die α -Kette von C3b an zwei Stellen, wobei C3f (3 kDa) frei wird (Davis und Harrison 1982, s. Abb. 1.3). Resultat dieser Spaltung ist das inaktivierte C3b (iC3b), welches keine C3-Konvertasen mehr ausbilden kann (Law et al. 1979a, Lachmann und Hughes-Jones 1984, Müller-Eberhard 1988, s. Abb. 1.3). iC3b setzt sich aus zwei α -Ketten-Fragmenten (43 und 68 kDa) und der über Disulfid-Brücken gebundenen β -Kette zusammen (Harrison und Lachmann 1980, s. Abb. 1.3). Das 68 kDa große α -Ketten-Fragment von iC3b kann ein weiteres Mal gespalten werden (Ross et al. 1982). Dabei wird das über Disulfid-Brücken zusammengehaltene C3c (15 kDa) frei, welches aus zwei α -Ketten-Fragmenten und der β -Kette besteht (Ross et al. 1982, s. Abb. 1.3). Ein 41 kDa großes α -Ketten-Fragment, welches als C3dg bezeichnet wird, bleibt kovalent auf der aktivierenden Oberfläche gebunden (Law et al. 1979a, Ross et al. 1982, Davis et al. 1984, s. Abb. 1.3). Die Inaktivierungsprodukte iC3b und C3dg können mit verschiedenen Rezeptoren interagieren. Beispielsweise ist iC3b ein Ligand für die Integrine CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18), welche als Rezeptoren auf Leukozyten Zelladhäsion und Phagozytose vermitteln (Gasque 2004, Gahmberg et al. 1998, Luo et al. 2007). C3dg ist der natürliche Ligand für CR2 (CD21), einem Teil des B-Zell-Co-Rezeptor-Komplexes (Schreiber 1984, Carroll 2004). Die Interaktion von C3dg mit CR2 vermittelt costimulatorische Signale für die B-Zell-Aktivierung (Carroll 2004).

Der Ausfall komplementregulatorischer Proteine kann zu speziellen Erkrankungen führen. Somatische Mutationen im PIG-A-Gen in hämatopoetischen Stammzellen haben beispielsweise einen Defekt der Membranverankerung von DAF zur Folge und führen bei den betroffenen Personen zum Krankheitsbild der paroxysmal nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) (Kim und Song 2006). PNH-Patienten leiden u.a. an einer komplementvermittelten intravaskulären Hämolyse (Kim und Song 2006). Dieses

Beispiel verdeutlicht, dass der Ausfall einzelner Komplementregulatoren nur bedingt kompensiert werden kann und pathogenetische Relevanz besitzt.

1.2 Faktor H - der wichtigste Inhibitor der Komplementaktivierung über den alternativen Weg

Neben den membrangebundenen Komplementregulatoren existieren auch Proteine mit ähnlicher Funktion in gelöster Form. Faktor H (FH), ein ca. 150 kDa großes Serumprotein mit einer Konzentration von 110-615 µg/ml, ist der wichtigste Inhibitor der Komplementaktivierung über den alternativen Weg in der flüssigen Phase (Sim und DiScipio 1982, Rodríguez de Córdoba et al. 2004). Erstmals wurde der früher als Beta1H bezeichnete FH 1965 als Kontaminante im Rahmen der Isolation von C5 beschrieben (Nilsson und Müller-Eberhard 1965). Seine Bedeutung als komplementregulatorischer Faktor wurde erst später erkannt (Whaley und Ruddy 1976a, Whaley und Ruddy 1976b, Weiler et al. 1976). FH kann auf Zelloberflächen binden, beschleunigt den Zerfall der C3-Konvertase C3bBb (*Decay-Accelerating-Aktivität*) und ist Cofaktor für den Abbau von C3b durch Faktor I (Rodríguez de Córdoba et al. 2004).

Aus Strukturanalysen geht hervor, dass sich das 150 kDa große Glycoprotein aus 20 unabhängig voneinander gefalteten *Short-Consensus-Repeat*-Domänen (SCRs) zusammensetzt, die eine flexible Kette bilden (Kristensen et al. 1986, DiScipio 1992). Diese SCRs, die auch Strukturmerkmal anderer komplementregulatorischer Proteine sind, bestehen aus jeweils ca. 60 Aminosäuren und beinhalten stets ein Gerüst hoch konservierter Reste (Ripoche et al. 1988, Rodríguez de Córdoba et al. 2004). Vier Cysteine sind für die Struktur des Proteins von Bedeutung, weil sie Disulfidbrücken in einem I-III- und II-IV-Muster ausbilden (Janatova et al. 1989). Durch die Charakterisierung rekombinant hergestellter FH-Fragmente und durch den Einsatz epitop-spezifischer monoklonaler Antikörper konnten verschiedene Funktionen von FH bestimmten SCRs zugeordnet werden (s. Abb 1.4). Über drei Bindungsstellen, welche sich über die Domänen SCR1-4, SCR12-14 und SCR19-20 erstrecken, interagiert FH mit C3b (Jokiranta et al. 2000, s. Abb. 1.4). Als Lokalisation der mittleren Bindungsstelle wird statt SCR12-14 auch SCR6-10 diskutiert (Sharma und Pangburn 1996). Jede C3b-Bindungsregion von FH interagiert mit einem anderen Abschnitt der C3- α -Kette (Jokiranta et al. 2000), wobei FH mit Faktor B bzw. Bb um die Bindung an C3b konkurriert (Becherer et al. 1992, Lambris et al. 1996, Oran und Isenman 1999). FH verdrängt Bb aus der Bindung an C3b und beschleunigt deshalb den Zerfall der C3-Konvertase C3bBb (*Decay-Accelerating-Aktivität*) (Weiler et al. 1976).

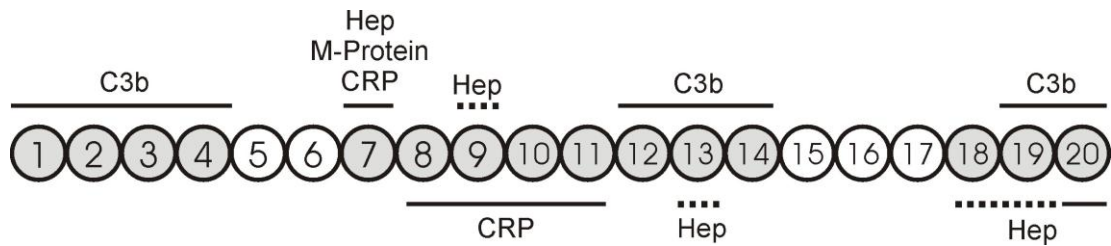


Abb. 1.3 Strukturelle Organisation und Bindungsstellen von Faktor H. Faktor H (FH, 150 kDa) besteht aus 20 sog. *Short-Consensus-Repeat*-Domänen (SCRs), welche in der Abbildung durchnummeriert sind. In allen grau unterlegten SCR's konnten Bindungsstellen für Liganden von FH nachgewiesen werden. FH verfügt über drei Bindungsstellen für C3b in den Bereichen SCR1-4, SCR12-14 und SCR19-20. Bindungsstellen für Polyanionen bzw. Heparin (Hep) sind in SCR7 und SCR9, SCR13 und SCR18-20 lokalisiert. Dabei sind nicht eindeutig nachgewiesene Bindungsstellen durch eine gepunktete Linie gekennzeichnet. Über SCR 7 und SCR8-11 interagiert FH mit C-reaktivem Protein (CRP). SCR7 beherbergt zudem eine Bindungsstelle für das M-Protein von Streptokokken (Pangburn et al. 1991, Blackmore et al. 1996, Sharma und Pangburn 1996, Jarva et al. 1999, Jokiranta et al. 2000, Rodríguez de Córdoba et al. 2004, Ormsby et al., 2006).

Für die Funktion als Cofaktor für die Faktor-I-vermittelte Inaktivierung von C3b scheint die Interaktion der Domänen SCR1-4 mit den Aminosäuren 727-768 der C3- α -Kette essentiell zu sein (Gordon et al. 1995, Kühn et al. 1995, Lambris et al. 1996). Dabei dient FH v.a. als Cofaktor für den ersten Schritt des C3b-Abbaus, der Inaktivierung zu iC3b (Ross et al. 1982). Nur in geringerem Maße und unter Bedingungen niedriger Ionenstärke ist FH auch als Cofaktor für den weiteren Abbau zu C3dg beschrieben worden (Ross et al. 1982). Für diesen Schritt benötigt Faktor I v.a. den C3b-Rezeptor CR1 als Cofaktor (Medof et al. 1982, Ross et al. 1982, Medicus et al. 1983).

FH reguliert die Aktivität des Komplementsystems sowohl in der flüssigen Phase als auch auf Zelloberflächen. Ob FH auf einer Oberfläche C3-Konvertasen und C3b inaktiviert, ist dabei im Wesentlichen abhängig von der Zusammensetzung der Oberfläche selbst (Rodríguez de Córdoba et al. 2004). Als erster beschrieb Fearon 1978 die hemmende Wirkung von membranassoziierter Sialinsäure auf die komplementvermittelte Lyse von Schafserythrozyten (Fearon 1978). Die Sialinsäure erhöht die Affinität von Faktor H für membranständiges C3b im Vergleich zu Faktor B um das 10-Fache und begünstigt so den Zerfall der C3-Konvertase C3bBb (Kazatchkine et al. 1979). Neben Sialinsäure können auch andere Polyanionen wie Heparin eine Zelle als körpereigen markieren und die Bindung von FH an deren Oberfläche vermitteln (Pangburn 2000). Heparin- bzw. Polyanionen-Bindungsstellen sind in den Domänen SCR7 (Blackmore et al. 1996) und SCR18-20 (Blackmore et al. 1998) lokalisiert (s. Abb. 1.4). Eine weitere Bindungsstelle befindet sich vermutlich in SCR9 (Ormsby et al. 2006) oder SCR 13 (Pangburn et al. 1991, s. Abb. 1.4). Die Abwesenheit von „Selbst“-Markern wie Polyanionen erlaubt somit eine Alternativweg-Aktivierung auf der jeweiligen (z.B. mikrobiellen) Oberfläche. Somit stellt die Regulation des alternativen Komplementaktivierungsweges ein weiteres Beispiel für „Mustererkennungs“-Verfahren dar, die innerhalb der angeborenen Immunität große

Bedeutung besitzen. Jedoch haben einige pathogene Erreger Rezeptoren für FH entwickelt, um der Erkennung durch diesen Teil der angeborenen Immunität zu entgehen (Pangburn 2000). Ein Beispiel dafür ist das Streptokokken-Protein M, das an die FH-Domäne SCR7 binden kann (Kotarsky et al. 1998, Rodríguez de Córdoba et al. 2004, s. Abb. 1.4).

Neben Bindungsstellen für C3b, Polyanionen und diverse bakterielle Proteine besitzt FH auch Bindungsstellen für C-reaktives Protein (CRP) (Jarva et al. 1999). Diese sind in SCR7 sowie in SCR8-11 lokalisiert (Jarva et al. 1999, s. Abb. 1.4). CRP gehört zur Familie der Pentraxine, die im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6) vermehrt in der Leber synthetisiert werden (Gewurz et al. 1995). CRP bindet an Membran- und Kernbestandteile beschädigter Zellen und moduliert am Ort des Entzündungsgeschehens die Komplementaktivität (Mold et al. 1999). Durch Interaktion mit der Komponente C1 aktiviert CRP selektiv den klassischen Weg der Komplementkaskade und inhibiert andererseits durch Bindung von FH den alternativen Weg (Jiang et al. 1991, Mold et al. 1999). Somit fördert die Bindung von CRP an eine Oberfläche deren Opsonierung und reduziert die komplementvermittelte Lyse (Mold et al. 1999).

Wie bei allen komplementregulatorischen Proteinen befindet sich das Gen, das für FH kodiert, auf Chromosom 1q32 innerhalb des Gen-Clusters „*Regulator of Complement Activation*“ (RCA) (Rodríguez de Córdoba et al. 1999). Andere Gene innerhalb dieses Clusters sind vermutlich durch Duplikation des FH-Gens (*HF1*) entstanden (Rodríguez de Córdoba et al. 2004). Diese Gene kodieren für FH-verwandte Proteine (*FH related Proteins*, FHRs), die abschnittsweise bis zu 97% mit *HF1* identisch sind (Zipfel et al. 1999, Rodríguez de Córdoba et al. 2004). Aus diesem Grund sind für die Amplifikation von *HF1* komplexe PCR-Strategien notwendig. *HF1* selbst besteht aus 23 Exons und ist 94 kB groß (Male et al. 2000). Jedes Exon codiert für einen SCR. Nur SCR2 wird von den beiden Exons 3 und 4 kodiert (Male et al. 2000). Exon 10 wird nicht für das FH-Transkript abgelesen, sondern kodiert für die 4 N-terminalen Aminosäuren eines alternativen Spliceproduktes von FH (Estaller et al. 1991). Dieses FH-ähnliche Protein (*FH like Protein 1*, FHL-1), das mit einer Konzentration von 10-50 $\mu\text{g/ml}$ im Plasma vorkommt, entspricht den SCRs 1-7 von FH und ist 42 kDa groß (Zipfel und Skerka 1999). Wie FH besitzt FHL-1 *Decay-Accelerating-* und *Cofaktor-Aktivität*. Mit SCR7 verfügt es über eine Polyanionen-Bindungsstelle (Zipfel und Skerka 1999).

Polymorphe Variationen im FH-Gen sind häufig mit Nierenerkrankungen assoziiert. Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) ist charakterisiert durch hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akutes Nierenversagen (Remuzzi und Ruggenti 1998). Bei Patienten mit der atypischen Form des hämolytisch-urämischen Syndroms, das nicht in Verbindung mit Verotoxin-produzierendem *E. coli* steht, finden sich häufig

Polymorphismen in den Exons von *HF1*, die für die C-terminalen Domänen SCR19 und SCR20 codieren (Pickering und Cook 2008). Die Mutationen im C-Terminus führen zu einer herabgesetzten Bindung des Proteins an Heparin und C3b, aber nicht zu einer Einschränkung der komplementregulatorischen Aktivität von FH (Sánchez-Corral et al. 2002, Manuelian et al. 2003). Folge ist eine reduzierte Fähigkeit von FH, körpereigene Zellen vor komplementvermittelter Schädigung zu schützen. Die Beobachtung der pathogenetischen Relevanz des C-Terminus für HUS und der gezielte Einsatz epitopspezifischer anti-FH-Antikörper führte zu der Erkenntnis, dass besonders der C-Terminus essentiell für diese Schutzfunktion ist, da er vermutlich die initiale Bindung von FH an Zellen vermittelt (Oppermann et al. 2006, Józsi et al. 2007).

Neben HUS ist auch die Membranproliferative Glomerulonephritis Typ II (MPGNII) mit diversen FH-Polymorphismen assoziiert (Dragon-Durey et al. 2003). Während die mit HUS assoziierten Polymorphismen v.a. zu einer reduzierten Erkennung körpereigener Oberflächen durch FH führen, haben die mit MPGNII assoziierten FH-Polymorphismen meist eine eingeschränkte komplementregulatorische Aktivität oder sogar eine FH-Defizienz zur Folge (Levy et al. 1986, Dragon-Durey et al. 2003). Zum Beispiel kann FH nicht in die Zirkulation sezerniert werden, wenn sich durch den Austausch der hochkonservierten Cysteinreste die strukturell relevanten Disulfidbrücken nicht ausbilden können (Ault et al. 1997, Schmidt et al. 1999). Das Fehlen von FH im Plasma verursacht eine unkontrollierte Komplementaktivierung in der flüssigen Phase und in Folge dessen einen signifikanten Verbrauch von Komplementproteinen (Thompson und Winterborn 1981). Am Tiermodell konnte gezeigt werden, dass diese unkontrollierte Komplementaktivierung essentiell für die Entwicklung einer MPGNII ist (Pickering et al. 2002). An den Beispielen HUS und MPGNII wird deutlich, dass unterschiedliche genetisch bedingte Funktionseinschränkungen innerhalb des FH-Proteins mit verschiedenen klinischen Phänotypen assoziiert sind.

1.3 Der FH-Polymorphismus Y402H und die altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Im Jahr 2005 konnte ein zunächst vollkommen unerwarteter Zusammenhang zwischen dem Komplementsystem (hier insbesondere FH) und einer weiteren Erkrankung hergestellt werden. Es handelt sich um die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) - eine Augenerkrankung, die als häufigste Erblindungsursache älterer Personen (> 55 Jahre) in den Industrienationen gilt und der daher eine enorme sozioökonomische Bedeutung zukommt (Age-Related Eye Disease Study Research Group 2000, Seddon und Chen 2004). Mehrere Arbeitsgruppen deckten nahezu zeitgleich den FH-Polymorphismus Y402H als wesentlichen AMD-Risikofaktor auf, die unabhängig voneinander durchgeführten Studien wurden hochrangig publiziert (Edwards et al. 2005, Hageman et al. 2005, Haines et al. 2005, Klein et al. 2005, Zarepari et al. 2005).

Die Gruppe um Robert J. Klein führte als erste Arbeitsgruppe überhaupt eine von Erfolg gekrönte genomweite Haplotypen-Analyse basierend auf den Daten des *HapMap*-Projekts durch, was dieser Arbeit eine besondere Bedeutung verleiht (Klein et al. 2005). Das *HapMap*-Projekt kann als Fortsetzung des humanen Genomprojektes angesehen werden. Durch den Genom-Vergleich verschiedener Individuen sollten chromosomale Regionen identifiziert werden, in denen Variationen der Basenfolge (*Single Nucleotide Polymorphisms*, *SNPs*) lokalisiert sind, die möglicherweise das Risiko für verschiedene Erkrankungen modulieren (The International HapMap Consortium 2003). Im Rahmen des *HapMap*-Projektes gelang es, über eine Millionen *SNPs* von vier Populationen zu genotypisieren und diese in Form einer öffentlich zugänglichen Haplotypen-Karte zusammenzufassen (The International HapMap Consortium 2005). Als Haplotypen werden feste Kombinationen von Allelen benachbarter Basen-Polymorphismen bezeichnet, die nicht durch genetische Rekombination durchbrochen werden (The International HapMap Consortium 2003). Die Analyse einzelner Marker-Polymorphismen gestattet deshalb die Bestimmung eines ganzen Haplotyps, was sich u.a. Klein et al. zu Nutze machten (The International HapMap Consortium 2003).

Der Y402H-Polymorphismus wurde bereits bei der Aufdeckung der Aminosäuresequenz von Faktor H erstmals beschrieben (Ripoche et al. 1988). Eine Thymin-zu- Cytosin-Substitution in Exon 9 von *HF1* hat den Austausch eines Tyrosins gegen Histidin an Aminosäureposition 402 (SCR7) zur Folge (Ripoche et al. 1988, Edwards et al. 2005, Hageman et al. 2005, Haines et al. 2005, Klein et al. 2005, Zarepari et al. 2005). Homozygote Träger der Histidin-Variante (ca. 10% der mitteleuropäischen Bevölkerung) weisen ein bis zu 7-fach erhöhtes Risiko auf, im Verlauf ihres Lebens an AMD zu erkranken (Klein et al. 2005). Aber auch bereits der Heterozygotenstatus geht mit einem 2,7-fach erhöhten Risiko für AMD einher und kann für bis zu 50% des Erkrankungsrisikos verantwortlich gemacht werden (Edwards et al. 2005).

AMD ist eine Erkrankung der Netzhaut. Betroffen sind fast ausschließlich Menschen jenseits des 50. Lebensjahres (Jager et al. 2008). Neben dem Alter sind Rauchen und fettreiche Ernährung wesentliche Risikofaktoren (Age-Related Eye Disease Study Research Group 2000, Seddon und Chen 2004). AMD führt bei den Betroffenen zu einem progressiven Verlust des zentralen Sehens, womit diese als blind gelten (Nowak 2006). Bei der AMD geht selektiv die Makula lutea zugrunde. Dieser Bereich der Netzhaut weist die höchste Dichte an Photorezeptoren auf und ist für das hochauflösende zentrale Sehen verantwortlich (Jager et al. 2008). Die degenerativen Veränderungen bei der AMD bleiben nicht auf die Netzhaut als solche beschränkt. In den Prozess sind auch angrenzende Strukturen wie das retinale Pigmentepithel (RPE), die Bruch'sche Membran und die Choroidea involviert (Spraul et al. 1999). Nach dem fundoskopischen Befund lassen sich zwei AMD-Formen, die trockene und die feuchte AMD, voneinander differenzieren. 85% aller AMD-Patienten leiden an der trockenen

Form, die durch sog. Drusen und eine Degeneration des RPEs (geographische Atrophie) gekennzeichnet ist (Nowak 2006, Lotery und Trimp 2007, Jager et al. 2008). Drusen sind Ablagerungen zwischen der basalen Fläche des RPEs und der Bruch'schen Membran, die einen Durchmesser von ca. 100 µm aufweisen (Mullins et al. 2000, Anderson et al. 2002, Jager et al. 2008). Diese stellen auch einen Risikofaktor für den Übergang in die feuchte Form dar, die 15% aller AMD-Fälle ausmacht (Bressler et al. 1990, Lotery und Trimp 2007). Die feuchte Form ist charakterisiert durch choroidale Neovaskularisationen (CNV) (Nowak 2006). Leckagen in diesen Gefäßen können Blutungen und einen plötzlichen Sehverlust verursachen (Nowak 2006). Pathogenetisch ist bei der CNV der Botenstoff *Vascular Endothelial Growth Factor* von Bedeutung, der auch Angriffspunkt einiger kostenintensiver Therapieoptionen darstellt (Gragoudas et al. 2004, Rosenfeld et al. 2006, Shams und Ianchulev 2006).

Die Tatsache, dass Komplementproteine wie C3, C5 und deren Aktivierungsprodukte sowie C5b-9 in Drusen nachgewiesen werden konnten, führte bereits frühzeitig zu der Theorie, dass entzündliche Vorgänge eine wesentliche Rolle bei der AMD spielen könnten (Mullins et al. 2000, Anderson et al. 2002). Untersuchungen am Mausmodell zeigten, dass verschiedene Komplementkomponenten auch essentiell für die Ausbildung einer CNV sind (Bora NS et al. 2006). Für eine bedeutende Rolle des Komplementsystems bei AMD spricht weiterhin, dass genetische Varianten von C2, Faktor B und C3 das AMD-Erkrankungsrisiko ebenfalls modulieren (Gold et al. 2006, Yates et al. 2007, Anderson et al. 2010). Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, können Fehlregulationen des Komplementsystems durch FH-Defekte verursacht werden und zu Krankheiten wie HUS oder MPGNII führen (Thurman und Holers 2006). Interessanterweise finden sich bei MPGNII-Patienten mit FH-Defekten ebenfalls Ablagerungen in der Netzhaut, ähnlich den Drusen bei AMD-Patienten (Huang et al. 2003). Zudem sind die glomerulären Ablagerungen bei MPGNII in ihrer biochemischen Zusammensetzung den Drusen bei AMD sehr ähnlich (Mullins et al. 2000). FH-defiziente Mäuse entwickeln zudem retinale Läsionen, die denen der AMD beim Menschen sehr ähnlich sind (Coffey et al. 2007). Einen weiteren indirekten Hinweis auf die besondere Bedeutung von FH bei AMD liefert die Beobachtung, dass die wesentlichen AMD-Risikofaktoren, nämlich Alter und Rauchen, die FH-Plasma-Spiegel beeinflussen (Esparza-Gordillo et al. 2004).

Der mit AMD assoziierte Aminosäureaustausch Y402H ist in der Domäne SCR7 lokalisiert, welche Bindungsstellen für Heparin und CRP enthält (Giannakis et al. 2001). Es wird diskutiert, dass das Vorliegen von Histidin anstatt Tyrosin in Position 402 die Bindung von FH an diese Liganden beeinflussen könnte (Edwards et al. 2005, Hageman et al. 2005, Haines et al. 2005, Klein et al. 2005, Zarepari et al. 2005). An dieser Stelle ist es erwähnenswert, dass in Plasmen von AMD-Patienten signifikant höhere CRP-Spiegel gemessen (Vine et al. 2005) und diese sogar als unabhängiger Risikofaktor für AMD gedeutet wurden (Seddon et al. 2004). Die Datenlage bezüglich

erhöhter CRP-Spiegel bei AMD-Patienten ist allerdings nicht eindeutig (McGwin et al. 2005). CRP konnte auch in Drusen nachgewiesen werden (Mullins et al. 2000).

Neben dem Y402H-Polymorphismus wurden weitere genetische FH-Varianten identifiziert, die Einfluss auf das AMD-Risiko haben. Einige dieser Polymorphismen sind nicht-kodierend, weisen aber eine noch höhere Assoziation mit AMD auf als der Y402H-Polymorphismus (Li et al. 2006). Andere Gen-Varianten wiederum reduzieren das AMD-Risiko. Ein protektiver FH-Haplotyp geht mit einer Defizienz für FHR1 und FHR3 einher (Hughes et al. 2006). Ein weiterer protektiver Haplotyp zeichnet sich durch Vorliegen eines Isoleucins anstelle eines Valins in Position 62 (I62V) in SCR2 aus (Hageman et al. 2005). Der mittlerweile vielfach dokumentierte Einfluss verschiedener kodierender FH-Polymorphismen auf das AMD-Erkrankungsrisiko stützt die Hypothese, dass diesem komplementregulatorischen Protein eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der AMD zukommt.

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass der Y402H-Polymorphismus einen partiellen Defekt der FH-Funktion zur Folge hat. Ein solcher Defekt könnte die komplementregulatorische Aktivität von FH beeinflussen und möglicherweise zu einer systemischen oder lokalen Komplementaktivierung führen. Dies wiederum könnte das Entstehen entzündlicher Erkrankungen (z.B. der AMD) begünstigen. Um diese Hypothese zu prüfen, sollten in der vorliegenden Arbeit die beiden polymorphen FH-Varianten in nativer Form aus dem Plasma gesunder Blutspender aufgereinigt werden. FH-Funktionen (Bindung an C3b und seine Spaltprodukte, CRP, Heparin und Zelloberflächen sowie *Decay-Accelerating*-Aktivität und die Funktion als Cofaktor für den FI-vermittelten C3b-Abbau) der beiden FH-Varianten sollten vergleichend untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des polymorphen FH-Epitops 402 unter Verwendung variantenspezifischer anti-FH-Antikörper, die selektiv nur FH-402Y oder FH-402H binden. Zu diesem Zweck sollten geeignete monoklonale Antikörper nach Immunisierung von Mäusen mittels synthetischer FH-Peptide generiert und in nachfolgenden funktionellen Testverfahren eingesetzt werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Plasmen von AMD-Patienten erhöhte Konzentrationen an Komplementspaltprodukten als Hinweis auf das Vorliegen einer systemischen Aktivierung des Komplementsystems aufweisen und ob ein Zusammenhang mit den jeweiligen FH-Genotypen nachweisbar ist. Erhöhte Konzentrationen an Aktivierungsparametern bei AMD-Patienten mit dem FH-Risiko-Genotyp könnten für eine verminderte Komplementkontrolle durch FH-402H sprechen.

2. Materialien

2.1 Geräte und Zubehör

Agarosegel-Elektrophoresekammer , Typ ComPhor Maxi	Biozym Scientific (Hess. Oldendorf)
Autoklav , Typ FNR4119E	Tecnomara (Fernwald)
Automatische Pipettierhilfe , Typ accu-jet	Brand (Wertheim)
Automatische Pipettierhilfe , Typ Pipetboy accu	Integra Biosciences (Fernwald)
Automatische Pipettierhilfe , Typ Pipetman (10, 20, 200, 1000 µl)	Abimed (Langenfeld)
Automatische Pipettierhilfe , Typ Reference (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Automatischer DNA-Aufreiniger , Typ BioRobot EZ1 Workstation	QIAGEN (Hilden)
Brutschrank , Typ B5061 FC-CO ₂ , T6060	Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer , Typ BD FACS Calibur	BD Bioscience (San Diego, USA)
Elektroblot-Gerät , Typ Multiphor II	Pharmacia LKB (Freiburg)
Feinwaage , Typ 1205, 1264 MP, 1265 MP, KB BA	Sartorius (Göttingen)
Fluor-S Multimager	Bio-Rad (München)
Gasbrenner , Typ Flammy S	Schütt (Göttingen)
Gradientenmischer für Polyacrylamid- Gele	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Hamiltonspritze	Hamilton (Darmstadt)
H₂O-Bidestgerät , Typ Arium 611	Sartorius (Göttingen)
Immunoblot-Imager , Typ ChemiLux 2005	Intas (Göttingen)
Inkubationsschüttler , Typ Köttermann 4060	Medaphot & Riemenschneider (Göttingen)
Kühlschrank , Typ Liebherr Premium Kombi	Liebherrhausgeräte (Ochsenhausen)
Kühltruhe (-80°C) , Typ GFL	Krannich (Göttingen)
Magnetplatte , Typ BioMag Separator	Bio Clone (San Diego, USA)
Magnetrührer , Typ PC-351-Corning	Medaphot & Riemenschneider (Göttingen)
Mehrkanal-Kapillarsequenzierer , Typ 3730 Analyzer	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Mikroskop , Typ IM 15, Televal 31	Zeiss (Oberkochen)
Mikrowelle , Typ 501 AKB279/PH	Philips (Hamburg)
miniPerm Bioreaktor	In Vitro Systems & Services (Göttingen)

Multikanalpipette , Typ Titertek	Krannich (Göttingen)
pH-Meter , Typ PHM 63 Digital pH Meter	Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Photometer , Typ BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Plattenphotometer , Typ Thermo-max microplate reader	Molecular Devices (Menlo Park, USA)
Plattenzentrifuge , Typ Centrifuge 5430	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenkassette	Kodak (Stuttgart)
Rotatorscheibe , Typ test-tube-rotator 34528	Schütt Labortechnik (Göttingen)
Schüttelinkubator , Typ Shaker-Incubator	Dynatech (Denkendorf)
Schwenkplatte , Typ WT 12	Biometra (Göttingen)
SDS-Gel-Elektrophoresekammer , Typ SE600	Hoefer Scientific Instruments(San Francisco, USA)
Spannungsgerät , Typ Electrophoresis- Constant-Power-Supply 2000/300	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Sterilbank , Typ Clean Air DLF B554, DLF B556, DLF Bss6	Med. Tech. Laborgeräte J.H. Schrader (Göttingen)
Thermocycler , Typ Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschall-Sonifikator , Typ Labsonic 1510	Braun (Melsungen)
Vortex-Mixer , Typ Vortex-Genie 2TM	Bender & Hobein (Zürich, Schweiz)
Waage , Typ GS	Karg Industrietechnik (Krailling)
Wasserbad , Typ Tecam	Bodo Schmidt (Göttingen)
Zählkammer , Typ Neubauer Improved	Krannich (Göttingen)
Zentrifugalfilter , Typ Centriprep Ultracel YM-50	Millipore (Billerica, USA)
Zentrifuge , Typ 5415D, 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge , Typ Biofuge A, Varifuge RF	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge , Typ EBA 21	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge , Typ Sigma 2-5	Krannich (Göttingen)
Zentrifuge , Typ Sorvall RC-3B Refrigerated Centrifuge	Dupont (Bad Nauheim)

2.2 Labormaterialien

Blotting-Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Dialyseschläuche Spectra/Por CE Float- A-Lyzer	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA)

Einwegpasteurpipetten	Brandt (Wertheim)
Eppendorf-Cups (0,2 / 1,5 / 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Falconröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One (Solingen)
Falconröhrchen 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Klebefolie	Herma (Filderstadt)
Kryokonservierungsröhrchen	Costar (Cambridge Massachusetts, USA)
Küvetten (Uvette 220-160 nm)	Eppendorf (Hamburg)
6- und 24-Lochplatten für Zellkulturen	Nunc (Wiesbaden)
96-Loch-Mikrotiterplatte mit Flachboden	Sarstedt (Nümbrecht)
96-Loch-Mikrotiterplatte mit Rundboden	Sarstedt (Nümbrecht)
96-Loch-Mikrotiterplatte mit Spitzboden	Sarstedt (Nümbrecht)
MAHV-N45 Filterplatte	Millipore (Billerica, USA)
MultiScreen Column Loader	Millipore (Billerica, USA)
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Nunc Maxisorp 96-Loch-ELISA-Platten	Nunc (Wiesbaden)
Parafilm	Alcan Packaging (Neenah, USA)
PD10-Säule inklusive Zubehör	GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Schweden)
Petrischalen 4 cm	Nunc (Wiesbaden)
Petrischalen 10 cm	Sarstedt (Nümbrecht)
Petrischalen 14 cm	Greiner Bio-One (Solingen)
pH-Indikatorpapier	Merck (Darmstadt)
Pipettenspitzen (10 – 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Röntgenfilm Hyperfilm™-ECL	Amersham Biosciences (Freiburg)
Sterilfilter (Porengröße 0,45 / 0,22 µm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Thermo-Fast 96er Platten	Abgene (Epsom, England)
Zellkulturflaschen (50 ml/250 ml/500 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

2.3 Chemikalien, Kits und sonstige Materialien

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose Ultra Pure	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad (München)
Antibiotika/Antimykotika	Gibco (Karlsruhe)
BigDye® Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Borsäure 100%	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Bromphenolblau-Na-Salz	Carl Roth (Karlsruhe)

Butanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Calciumchlorid (CaCl₂)	Carl Roth (Karlsruhe)
Carboxy-terminated BioMag	Bio Clone (San Diego, USA)
Coomassie Brilliant Blau R-250	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)	Merck (Darmstadt)
Dimethylformamid (DMF)	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dinatriumcarbonat (Na₂CO₃)	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄ x 12H₂O)	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DMEM/Ham's F-12 Flüssigmedium	Biochrom (Berlin)
dNTP Set	ABgene (Epsom, England)
ECL-Westernblot-Kit RPN 2108	Amersham Biosciences (Braunschweig)
EDTA	Serva (Heidelberg)
EGTA	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Entwickler und Fixierer	Kodak (Stuttgart)
Ethanolamin	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid 1% in H₂O	Merck (Darmstadt)
EZ1 DNA Blood 350 µl Kit	QIAGEN (Hilden)
EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin	Pierce (Rockford, USA)
Ficoll-Biocoil Separation Solution	Biochrom (Berlin)
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom (Berlin)
Freund'sches Adjuvans (komplett / inkomplett)	Difco (Augsburg)
Gelatine	Difco (Augsburg)
Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	Carl Roth (Karlsruhe)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Merck (Darmstadt)
Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT)	Flow (Meckenheim)
Instantmedium RPMI 1640	SERO-Med (Wien, Österreich)
Instantmedium 199 Earle	SERO-Med (Wien, Österreich)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Merck (Darmstadt)

Längenstandard für SDS-PAGE (Prestained Protein Molecular Weight Marker)	MBI Fermentas (St.-Leon-Rot)
L-Glutamin	SERO-Med (Wien, Österreich)
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck (Darmstadt)
Magermilchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Mouse MonoAb ID Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Natriumacetat (Na-Acetat x 3 H₂O)	Merck (Darmstadt)
Natriumazid (NaN₃)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumcitrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄ x H₂O)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	Merck (Darmstadt)
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco (Karlsruhe)
N-Ethylmaleimid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N,N-Methylen-Bisacrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
Phenolrot	Merck (Darmstadt)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Polyethylenglykol PEG4000	Merck (Darmstadt)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare Bio-Science (Uppsala, Schweden)
SDS (Dodecylsulfat Natrium-Salz)	Serva (Heidelberg)
Sephadex G50 superfine	Amersham Biosciences (Freiburg)
SMCC (Succinimidyl- <i>trans</i> -4-(N-maleimidylmethyl)cyclohexan-1-carboxylat)	Merck (Darmstadt)
Taq PCR Core Kit inklusive Taq-Polymerase, dNTPs und 10x PCR-Puffer	QIAGEN (Hilden)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Tween	Serva (Heidelberg)
Ultralink Biosupport	Pierce (Rockford, USA)
Wasserstoffperoxid (H₂O₂)	Carl Roth (Karlsruhe)
Zymosan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.4 Lösungen und Puffer

ABTS-Lösung (P1)

Na-Acetat x 3 H ₂ O	0,1 M
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,05 M
ABTS	2 M
pH (titriert mit Acetat)	4,2

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30%) für Laemmli-Gel (P2)

Acrylamid	58,4 g
N,N-Methylen-Bisacrylamid	1,6 g
in 200 ml dH ₂ O	

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40%) für Gradientengel (P3)

Acrylamid	38,9 g
N,N-Methylen-Bisacrylamid	1,1 g
in 100 ml dH ₂ O	

Biomag-Kopplungspuffer (P4)

K ₂ HPO ₄	0,01 M
NaCl	0,15 M
pH	5,5

Biomag-Waschpuffer (P5)

NaCl	0,15 M
Tris	0,1 M
EDTA	1 mM
BSA	0,1 %
NaN ₃	0,1 %
pH	7,4

Coating-Puffer (P6)

Na ₂ CO ₃ (0,2 M)	85 ml
NaHCO ₃ (0,2 M)	40 ml
ad 500 ml H ₂ O	
pH	10,6

Coomassie-Blau-Lösung (P7)

Coomassie Brilliant Blau R-250	750 mg
gelöst in 1 l Methanol	
Trichloressigsäure	150 ml
gelöst in 1,5 l H ₂ O	

Entfärber-Lösung (P8)

Essigsäure	5 % (v/v)
Methanol	30 % (v/v)
gelöst in H ₂ O	

FACS-Puffer (P9)

FCS	1,5 %
NaN ₃	0,1 %
in PBS	

Fällungsreagenz für C3 Präzipitation (P10)

PEG 4000	30 %
Glycin	0,1 M
pH	2,0

Gelatine-Blockpuffer (P11)

Gelatine	1,0 %
in PBS	

HBSS (*Hanks's Buffered Salt Solution*, P12)

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
Glukose	1,0 g
KH ₂ PO ₄	60,0 mg
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	47,5 mg
ad 1 l dH ₂ O	
pH	7,3

HBSS⁺⁺ (P13)

CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	1 mM
in HBSS	

HBSS/EDTA (P14)

EDTA (0,2 M)	25 ml
HBSS ⁺⁺	25 ml

HEPES-Puffer (P15)

HEPES	50 mM
NaCl	100 mM
CaCl ₂	2 mM
pH	7,4

Kathodenpuffer für Gradientengele (P16)

SDS 1 mg/ml
in Anodenpuffer

Kopplungspuffer für Biotinylierung (P17)

NaHCO₃ 100 mM
NaCl 150 mM
pH 7,2

Laufpuffer für Laemmli-Gele (P18)

Glycin 72 g
SDS 5 g
Tris 12 g
in 5l dH₂O

Laufpuffer / Anodenpuffer für Gradientengele (P19)

Tris 4,8 g/l
Glycin 3 g/l
in dH₂O

Magermilchpuffer (P20)

Magermilchpulver 4 % (w/v)
in TBS/Tween

Mg-EGTA (P21)

MgCl₂ 25 mM
EGTA 25 mM
pH pH 8,5

Neutralisationspuffer für C3-Präzipitation (P22)

Tris 0,21 M
Tween 0,05 % (w/v)
pH 7,7

PBS (*Phosphate Buffered Saline*, 9 mM Phosphatpuffer mit physiologischem Salzgehalt, P23)

Na₂HPO₄ x 12H₂O (0,5 M) 130 ml
NaH₂PO₄ x H₂O (0,5M) 50 ml
NaCl 72 g
ad 10 l H₂O
pH 7,4

Für die Herstellung von 0,5 x PBS wurde der Puffer 1:2 in dH₂O verdünnt

PBS/Tween (P24)

Tween 0,05 %
in PBS

PBS/Tween/EDTA (P25)

EDTA 0,02 M
in PBS/Tween

Phosphatpuffer für Cofaktor-Assay (20mM, P26)

Na₂HPO₄ 2,84 g
NaH₂PO₄ 8,02 g
gelöst in 1 l H₂O
pH 6,0

Phosphatpuffer für Protein G-Affinitätschromatographie und KLH-Kopplung (50mM,P27)

Na₂HPO₄ 76,3 g
NaH₂PO₄ 5,1 g
gelöst in 5 l H₂O
pH 7,5

Für einige Schritte der KLH-Kopplung wurde der pH mit HCl auf 6,8 eingestellt

Probenpuffer für Agarosegel-Elektrophorese (P28)

Bromphenolblau 0,25 %(v/v)
Ficoll-Biocol Separation Solution 10 %(v/v)
in 1 % TBE (P34)

Probenpuffer für SDS-PAGE (Gradienten-Gel, P29)

SDS 20 mg
Phenolrot 10 µg
in 1 ml Harnstoff 10 M
+/- 2-Mercaptoethanol 10% (v/v)

Probenpuffer für SDS-PAGE (Laemmli-Gel, P30)

Bromphenolblau 0,1 %
Glycerol 20 %
SDS 4 %
Tris 125 mM
PH 6,8
+/- 2-Mercaptoethanol 10% (v/v)

Regenerationspuffer für Protein G-Affinitätschromatographie (P31)

Harnstoff	2 M
LiCl	1 M
Glycin	0,1 M
pH 2,5	

Säulenpuffer für Affinitätschromatographie (P32)

NaCl	0,15 M
Tris	50 mM
EDTA	5 mM
pH	7,5

Semidry-Puffer (P33)

Glycin	58 g
SDS	740 mg
Tris	11,6 g
Methanol	400 ml
ad 4 l dH ₂ O	

TBE-Puffer (P34)

Tris	100 mM
Borsäure	100 mM
EDTA	3 mM
pH	8,3

TBS (10 x, P35)

NaCl	80 g
Tris	24 g
ad 2 l dH ₂ O	
pH 7,6	

TBS/Tween (P36)

TBS (10 x)	100 ml
Tween	0,05 %
ad 1 l dH ₂ O	

UltraLink-Kopplungspuffer (P37)

NaCitrat	0,5 M
NaHCO ₃	0,1 M
pH	8,5

UltraLink-Waschpuffer (P38)

Phosphat	0,1 M
NaCl	0,15 M
pH	7,2

Verdünnungspuffer für C3a-ELISA (P39)

Tris	0,21 M
Tween	0,05 %
pH	7,4

2.5 Proteine und Enzyme

C3b	Merck (Darmstadt)
C-reaktives Protein (CRP), rekombinant	Merck (Darmstadt)
Faktor I	Merck (Darmstadt)
Heparin (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
iC3b	Merck (Darmstadt)
Interleukin-6 (IL-6), rekombinant	Roche (Mannheim)
KLH	Serva (Heidelberg)
NLalll inklusive NEBuffer 4	New England Biolabs (Ipswich Massachusetts, USA)
Synthetische Peptide für Immunisierung	Jerini (Berlin)
Trypsin	Serva (Heidelberg)

2.6 Monoklonale Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper (mAk) wurden zuvor in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universität Göttingen generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die verwendeten anti-FH-Antikörper (Oppermann et al. 2006). Literaturverweise zu mAk, die im Rahmen von ELISAs verwendet wurden, sind an entsprechender Stelle angegeben.

Antikörper	Epitop	Ig-Subklasse
C18/3	SCR20	IgG1
E14/8	SCR20	IgA
E22/11	SCR3	IgG1
L20/3	SCR19	IgG1

Tab. 2.1 Monoklonale anti-Faktor-H-Antikörper (Oppermann et al. 2006)

2.7 Polyklonale Antikörper und Antikörper-Konjugate

Esel-anti-Ziege-IgG-Peroxidase	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, Großbritannien)
Esel-anti-Ziege-IgG-FITC	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, Großbritannien)
Kaninchen-anti-Bb biotinyliert	Abteilung Immunologie (Göttingen)
Kaninchen-anti-C3d-Peroxidase	Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark)
Kaninchen-anti Maus-IgG	Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark)
Kaninchen-anti-Maus-IgG-Peroxidase	Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark)
Ziege-anti-C6 biotinyliert	Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark)
Ziege-anti-Faktor-H	Merck (Darmstadt)
Ziege-anti-Maus-IgG-FITC	Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark)

2.8 Eukaryote Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen. Die jeweilige ATCC-Katalognummer ist mit angegeben.

ARPE-19 (RPE-Zellen); ATCC-Nr. CRL-2302™

ARPE-19 ist eine humane retinale Pigmentepithel-Zelllinie, die 1986 aus dem Auge eines 19-jährigen Mannes gewonnen wurde, der bei einem Motorradunfall ums Leben kam (Dunn et al. 1996). Die RPE-Zellen sind diploid und wachsen adhärent. Sie wurden in DMEM/Ham's F-12 Medium + 10% FCS propagiert und im Verhältnis 1:3 – 1:5 subkultiviert. Mit den RPE-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung von FH an Zelloberflächen untersucht.

HUVEC-CS; ATCC-Nr. CRL-2873™

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärent wachsende humane Umbilikalvenen-Endothelzellen. Ihre Verdopplungszeit beträgt ungefähr 36 h. Sie wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) + 20% FCS propagiert und im Verhältnis 1:3 – 1:4

subkultiviert. Mit HUVECs wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung von FH an Zelloberflächen untersucht.

RBL-2H3 (RBL-Zellen); ATCC-Nr. CRL-2256™

Es handelt sich um eine stark adhären wachsende basophile Leukämie-Zelllinie aus dem Organismus *Rattus norvegicus* (Eccleston et al. 1973). RBL-Zellen wurden in 80/20-10-Medium propagiert und alle 3-4 Tage in einem Verhältnis von 1:4 – 1:8 subkultiviert. Sie wurden in dieser Arbeit zur Untersuchung der Cofaktor-Aktivität von FH auf Zelloberflächen verwendet.

X63AG8.653 (Ag8-Zellen); ATCC-Nr. CRL-1580™

Es handelt sich um eine Myelomzelllinie aus der BALB/c-Maus. Die nicht adhären wachsenden Ag8-Zellen produzieren keine Immunglobuline und sind HAT-sensitiv (Kearney et al. 1979). Sie wurden in dieser Arbeit zur Generierung Antikörperproduzierender Hybridome durch Fusion mit Maus-Lymphozyten verwendet. Bis zur Fusion wurden die Ag8-Zellen in 80/20-10-Medium propagiert.

2.9 Zellkulturmedien

80/20-Medium (RPMI-1640/199-Medium)

Instantmedium Earle 199	9,8 g
Instantmedium RPMI 1640	41,6 g
Antibiotika/Antimykotika	50 ml
L-Glutamin	50 ml
NaHCO ₃	10 g
Natriumpyruvat	50 ml
Nicht essentielle Aminosäuren	50 ml
dH ₂ O	4500 ml

Der pH wurde durch CO₂-Begasung auf 6,9 eingestellt und das Medium im Anschluss sterilfiltriert.

80/20-10-Medium

80/20-Medium + 10% FCS (zuvor bei 56°C für 1 h hitzeinaktiviert und für 15 min bei 1600 UpM abzentrifugiert)

HAT-Medium

HAT	10 ml
80/20-10-Medium	500 ml
+/- IL-6	50 U/ml

2.10 Primer

Alle Primer sind in 5'-3'-Richtung angegeben und wurden von der Firma IBA (Göttingen) hergestellt.

Primer für die erste PCR der Y402H-Genotypisierung:

CFH_Vor_f: 5'-GACCTAGAAACCCTAATGGAATGTG-3'

CFH_Vor_r: 5'-CTAAACTCACTCCTTGTGTGTGTCC-3'

Primer für die Nested-PCR der Y402H-Genotypisierung

CFH_f1: 5'-TGAGCAAATTTATGTTTCTCATTACTTT-3'

CFH_r1: 5'-TGTAAGTGTGGTCTGCGCTTTT-3'

Primer für DNA-Sequenzierung

CFH_I62V: 5'-CCTGTGACTGTCTAGGCATTTT-3'

CFH_D936E: 5'-GGTACCACTTACACTTTGAATGAAGA-3'

3. Methoden

3.1 Genotypisierung von Blutspendern

3.1.1 Aufreinigung von DNA aus Vollblut

Die Aufarbeitung menschlicher DNA aus Vollblut und deren Analyse, sowie die Benutzung humaner Plasmen genotypisierter Spender für weitere Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (Antragsnummer 2/12/05). Alle Probanden wurden vor der Blutentnahme über die DNA-Analyse und die Ziele der vorliegenden Arbeit aufgeklärt und mussten eine entsprechende Einwilligung unterzeichnen, auf der alle wichtigen Informationen laienverständlich zusammengefasst waren. Entsprechendes gilt für die DNA und Plasmen der AMD- und Kontrollkollektive, welche durch die Universitätsaugenklinik Bonn (Direktor: Prof. Holtz) rekrutiert wurden (Scholl et al. 2008). Alle Proben und Daten wurden ausschließlich in anonymisierter Form bearbeitet.

Die Aufreinigung von DNA aus Vollblut erfolgte automatisch durch eine magnetische Festphase-Extraktion mit dem BioRobot EZ 1. Nach dem Lysieren der zellulären Blutbestandteile wurde die DNA an Magnetpartikel gebunden und durch mehrere Waschschrte von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Für jede DNA-Präparation wurden 350 µl Vollblut eingesetzt, aus denen der BioRobot EZ 1 200 µl DNA-Wasser-Lösung herstellte. Hierfür wurde der *EZ 1 DNA Blood 350 µl KIT* gemäß Herstelleranleitung verwendet. Um DNase-Spaltungen, sowie Bakterien- oder Pilzbefall zu verhindern, wurden die aufgereinigten DNA-Proben bei -20°C gelagert.

3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Polymerasekettenreaktion) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation eines Abschnitts genomischer DNA. Ausgangspunkte für die Herstellung von DNA-Kopien sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sog. *Primer*. Die Primersequenz bestimmt, welcher DNA-Abschnitt amplifiziert wird und die Länge des Amplifikats. Eine DNA-Polymerase katalysiert die Synthese der DNA-Kopien. Als Bausteine dienen dem Enzym Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), die bei der Reaktion im Überschuss vorliegen. Bei einer PCR werden zyklisch verschiedene Temperaturstufen durchlaufen. Eine initiale Erhitzung dient der Trennung der beiden DNA-Stränge (Denaturierung). Es folgt eine Abkühlung zur Primeranlagerung an die komplementäre Matrizen-DNA (*Annealing*). Anschließend wird auf die optimale Aktivitätstemperatur der DNA-Polymerase erhitzt, welche die Primer in 3'-Richtung komplementär zur Matrizen-DNA verlängert (Elongation).

Die PCR des *HF1*-Gens unterteilte sich in 2 Schritte. Auf eine erste PCR folgte eine sogenannte *Nested-PCR*. Beide Reaktionen erfolgten in einem Endvolumen von 22 µl.

Dabei wurden für die erste PCR zu jeweils 20 µl eines mit den Komponenten des *Taq PCR Core Kits* frisch angesetzten PCR-Mastermixes (Zusammensetzung siehe Tab. 3.1 / verwendete Primer: CFH_Vor_f/r) 2 µl aufgereinigte genomische DNA gegeben. Der Reaktionsansatz für die Nested-PCR bestand aus jeweils 20 µl Mastermix (verwendete Primer: CFH_f1/r1) und 2 µl des Produktes der ersten PCR. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Ansätze im Thermocycler inkubiert. Die Reaktionsbedingungen beider PCRs sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 zusammengefasst.

Komponente	Volumen/ Reaktion [µl]	Volumen/ 100 Reaktionen [µl]
DdH ₂ O	16,86	1686
10x PCR Puffer	2,2	220
dNTPs (10 mM)	0,44	44
Vorwärts-Primer (100 µM)	0,22	22
Rückwärts-Primer (100 µM)	0,22	22
Taq Polymerase	0,06	6
PCR Master Mix	20	2000

Tab. 3.1: Zusammensetzung des PCR-Mastermix

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	30 sek
3. Annealing + Elongation	66°C	1:30 min
4. Finale Elongation	66°C	10 min
5. Lagerung	8°C	

Tab. 3.2: Reaktionsbedingungen für die erste PCR. Die Schritte 2.-3. wurden 35mal wiederholt.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	30 sek
3. Annealing	58°C	30 sek
4. Elongation	66°C	1:30 min
5. Finale Elongation	66°C	10 min
6. Lagerung	8°C	

Tab. 3.3: Reaktionsbedingungen für die Nested-PCR. Die Schritte 2.-4. wurden 35mal wiederholt.

3.1.3 Restriktionsspaltung von DNA

Eine Restriktionsendonuklease erkennt spezifische Abfolgen von Nukleotiden und katalysiert das Setzen eines Doppelstrangbruches an dieser Stelle. Bei diesen Schnittstellen handelt es sich in der Regel um kurze palindromische Sequenzen. Ist ein solches Palindrom von einer Punktmutation betroffen, erkennt das Enzym die Sequenz nicht mehr, es kommt zu keinem Strangbruch. Andererseits kann eine Schnittstelle auch erst durch einen Polymorphismus erzeugt werden. Die DNA-Spaltprodukte können dann durch Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach dargestellt werden. Je nachdem, ob ein Polymorphismus in heterozygoter oder in homozygoter Form vorliegt, ergibt sich dabei ein spezifisches Bandenmuster. Daher rührt die Bezeichnung Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) für diese Art der Detektion von Punktmutationen.

Zu je 10 µl Restriktionsmastermix (Tab. 3.4) wurden 5 µl des *Nested-PCR*-Produktes (siehe oben) gegeben. Dieser Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und anschließend bei 37°C über Nacht (12 h) inkubiert. Die Analyse des Restriktionsverdaus erfolgte mittels Elektrophorese mit einem 3%igen Agarosegel.

	Volumen/ Reaktion [µl]	Volumen/ 100 Reaktion [µl]
ddH ₂ O	7,35	735
10x NEBuffer 4	1,5	150
100xBSA	0,15	15
NLaIII	1	100
Restriktions-Master Mix	10	1000

Tab. 3.4 Zusammensetzung des Restriktionsansatzes

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Wegen ihrer negativ geladenen Phosphatreste im Rückgrat wandert DNA im elektrischen Feld zur Anode. Wird die DNA dabei durch die Matrix eines Agarose-Gels gezogen, können verschiedene Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und durch Vergleich mit einem Längenstandard identifiziert werden. Dabei bewegen sich kleine DNA-Fragmente schneller durch das Netz des Agarose-Gels als Fragmente mit einem höheren Molekulargewicht. Die Konzentration des Agarosegels ist dabei entscheidend für die Auftrennung der DNA-Partikel. So eignet sich ein höherprozentiges Gel gut zur Auftrennung kleinerer Moleküle und umgekehrt. Die angelegte Spannung bestimmt weitestgehend die absolute Laufzeit der Elektrophorese. Setzt man einem Agarosegel die interkalierende Substanz Ethidiumbromid zu, können die DNA-Banden im Gel durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden 1%ige und 3%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung eines 1%igen Gels wurden 4 g Agarose, zur Herstellung eines 3%igen Gels 12 g Agarose mit jeweils 400 ml TBE-Puffer (P34) verrührt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Unter Rühren wurde das Gel auf 60°C abgekühlt und dann mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml versetzt. Das Gel wurde in eine ComPhor Mtl Maxi-Gelkammer gegossen. Zur Bildung von Taschen für die Probenauftragung wurden Kämmen eingesetzt. Nach Erstarren des Gels wurden die Kämmen wieder entfernt und das Gel vollständig mit TBE-Puffer (P34) bedeckt. Vor dem Auftragen in die Taschen wurde den Proben von je 15 µl Volumen 3 µl Probenpuffer (P28) zugesetzt. Die angelegte Spannung bei der Elektrophorese betrug 120 V. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Fluor-S™ Multimager und der Software Quantity One® S Version 4.3.1.

3.1.5 DNA-Sequenzierung

Weitere FH-Polymorphismen wurden mit der Didesoxymethode nach Sanger sequenziert (Sanger und Coulson 1975). Hierbei werden zuerst in einer modifizierten PCR zufällige Kettenabbrüche provoziert. In dieser PCR wird nur ein Primer eingesetzt, da ansonsten eine eindeutige Bestimmung der Basenabfolge unmöglich wäre. Zum anderen werden dem Reaktionsansatz - zusätzlich zu den vier herkömmlichen Nukleotiden - Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) in geringer Konzentration zugefügt. Da den ddNTPs die 3'-OH-Gruppe fehlt, verhindert ihr Einbau in die DNA eine weitere Verlängerung des Stranges. Es entstehen folglich DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden können. Da die vier eingesetzten ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, lässt sich mit Hilfe eines Detektors nachvollziehen, welche Base am Ende eines Fragments bestimmter Länge zum Kettenabbruch geführt hat. Die Sortierung der Farbsignale nach der Länge der Fragmente liefert ein Chromatogramm, dessen Farbfolge die Sequenz des amplifizierten DNA-Stranges abbildet.

Für die Sequenzierung wurde der Mehrkanal-Kapillarsequenzierer und das dazugehörige Sequenzier-Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Jeweils 2 µl genomische DNA wurden zu 20 µl des PCR-Mastermixes (Tab. 3.5) gegeben. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst. Das Produkt der Sequenzier-PCR wurde über Sephadex G50 superfine (Amersham) gereinigt. Dazu wurde das Sephadex-Pulver mit einer Lochplatte (MultiScreen Column Loader) portioniert und in MAHV-N45 Filterplatten gegeben. Nach Zugabe von 300 µl ddH₂O und Quellung über 3 h, wurde bei 650 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zugabe von weiteren 150 µl ddH₂O und nochmaliger Zentrifugation wurden dem Sequenzier-PCR-Produkt 30 µl ddH₂O zugesetzt und die Lösung auf die gequollene Säule pipettiert. Durch Zentrifugation in eine neue Mikrotiterplatte unter oben angegebenen

Zentrifugationsbedingungen wurde das PCR-Produkt gereinigt und anschließend im Kapillarsequenzierer sequenziert.

Die Auswertung der Sequenzdateien erfolgte mit der PC-Software *Sequencing Analysis* (Applied Biosystems), *Staden Package* (SourceForge.net) und Klonmanager (SECentral). Vergleiche mit den Sequenzdatenbanken EMBL und Genbank wurden mit Hilfe des Blast-Programms über den *Webserver* www.ncbi.nlm.nih am NIH (USA) vorgenommen.

Komponente	Volumen/ Reaktion [µl]
DMSO	0,5
Primer (10 µM)	1
BigDye®	1,8
ddH ₂ O	5,7
DANN	1

Tab. 3.5: Zusammensetzung des Mastermix für die Sequenzier-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	4 min
2. Denaturierung	95°C	20 sek
3. Annealing	61°C	30 sek
4. Elongation	66°C	1 min
5. Finale Elongation	66°C	7 min
6. Lagerung	8°C	

Tab. 3.6: Reaktionsbedingungen für die Sequenzier-PCR. Die Schritte 2.-4. wurden 35mal wiederholt.

3.2 Affinitätschromatographische Verfahren

3.2.1 Kopplung des monoklonalen Antikörpers L20/3 an Ultralink Biosupport

Die Affinitätschromatographie dient der Isolierung einer bestimmten Substanz aus einem heterogenen Gemisch. Bei der Immunaффinitätschromatographie erfolgt die Isolierung unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch das interessierende Protein binden. Hierzu wird der Antikörper an eine feste Phase, z.B. ein Agarosegel, in kovalenter Form gebunden. Nach Zugabe des Ausgangsmaterials bindet das Protein über den gekoppelten Antikörper an die Gelmatrix. Nach einem Waschschrift kann das Protein durch Absenkung des pH-Werts eluiert werden. Ist der verwendete Antikörper genügend affin, kann z.B. Plasma oder Serum nahezu vollständig von einem Protein depletiert werden.

Die Immunaффinitätschromatographie wurde in dieser Arbeit zur Aufreinigung von Faktor H aus Plasma und zur Herstellung eines FH-depletierten (Δ FH) Serums verwendet. Hierzu wurde der monoklonale Maus-anti-FH-Antikörper L20/3 an UltraLink Biosupport Säulenmatrix gekoppelt. Bei dem Material handelt es sich um ein voraktiviertes Acrylamid/Azlacton-Copolymer. Durch eine Öffnung des Azlacton-Ringes werden nucleophile Moleküle über ihre Aminogruppen unter Ausbildung einer Amidbindung kovalent an die Acrylamid-Matrix gekoppelt (Abb. 3.1). Für die Kopplung von Antikörpern wird vom Hersteller eine Effizienz von >90% angegeben. Besonderen Einfluss auf den Kopplungserfolg haben eine hohe Proteinkonzentration in einem geringen Volumen Kopplungspuffer sowie eine hohe Salzkonzentration des Kopplungspuffers. Dabei darf der Kopplungspuffer keine primären Amine enthalten, die mit den Aminogruppen des Antikörpers um Bindungsstellen an dem Säulenmaterial konkurrieren könnten.

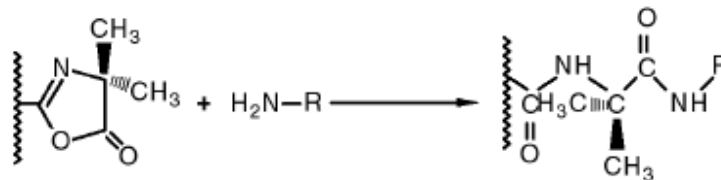


Abb. 3.1 Kopplung eines Proteins an UltraLink Biosupport. Durch eine Ringöffnungsreaktion bilden sich zwischen den Azlacton-Resten am Acrylamid und den Aminogruppen der Proteine Amidbindungen aus (aus dem Produktinformationsblatt zu UltraLink Biosupport, Pierce Biotechnology).

Insgesamt sollten 100 mg L20/3 an 10 ml (Trockengewicht 1,25 g) UltraLink Biosupport Matrix gekoppelt werden. Zunächst wurde der in PBS befindliche Antikörper über Nacht in einem Dialyseschlauch gegen UltraLink-Kopplungspuffer (P37) bei 4°C dialysiert. Das Dialysat wurde in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt und mit Kopplungspuffer auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Die Konzentration des Antikörpers lag somit bei 4 mg/ml. Zur Kopplung wurde das trockene Säulenmaterial direkt auf die Antikörperlösung gegeben und mittels Vortex in Suspension gebracht. Das Röhrchen wurde nun fest verschlossen und eine Stunde bei Raumtemperatur langsam auf der Rotatorenscheibe gedreht. Eine anschließende Zentrifugation bei 500 g für 10 min pelletierte das Säulenmaterial, der Überstand wurde abgenommen und zur Überprüfung der Kopplungseffizienz aufgehoben. Zur Blockade nicht besetzter Bindungsstellen auf dem Acrylamid folgte die Inkubation mit 1 M Ethanolamin pH 9,0 für 2,5 Stunden auf der Rotatorenscheibe. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt, das Säulenmaterial in phosphathaltigen UltraLink-Waschpuffer (P38) resuspendiert und erneut rotiert. Die Inkubationszeit für diesen Waschschrift betrug 15 Minuten. Um nichtgebundenes Protein von dem Acrylamid zu entfernen, schloss sich nun das Waschen des Materials mit 1 M NaCl pH 7,4 für 15 Minuten an. Hiernach wurde das Material noch zwei weitere Male für 15 Minuten mit UltraLink-

Waschpuffer (P38) gewaschen, um dann letztlich in Säulenpuffer (P32) aufgenommen zu werden.

3.2.2 Herstellung von reinen Faktor-H-Präparaten aus Plasma mittels Immunaффinitätschromatographie

Für die meisten Versuche war das Arbeiten mit reinen FH-Präparaten notwendig. Diese wurden mittels Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt. Als Ausgangsmaterial diente EDTA-Plasma. Die Plasmaspender wurden zuvor bezüglich des Y402H-Polymorphismus genotypisiert. Es wurden ausschließlich Plasmen von homozygoten Spendern verwendet. Die Präparate enthielten somit nur FH-402Y oder FH-402H, nie aber eine Mischung beider Varianten. Der aufgereinigte FH wurde mit Centriprep Ultracel YM-50 konzentriert. Mit diesem Verfahren werden durch Zentrifugalkraft Moleküle bis zu einer Größe von 50 kDa durch einen Filter gepresst. Proteine, deren Molekulargewicht über 50 kDa liegt, können den Filter nicht passieren und werden dadurch konzentriert.

Fünf Milliliter des mit L20/3 gekoppelten Säulenmaterials wurden in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt. Nachdem sich das Säulenmaterial abgesetzt hatte, wurde der Überstand entfernt. EDTA-Plasma von genotypisierten Blutspendern wurde 1:4 in Säulenpuffer (P32) verdünnt. Je 40 ml des verdünnten Plasmas wurden mit 80 µl des Proteaseinhibitors PMSF (Endkonzentration: 0,1 mM) versetzt und zu den 5 ml Säulenmaterial gegeben. Daraufhin wurde das Falconröhrchen fest verschlossen, mit Parafilm abgedichtet und an einer Rotatorscheibe befestigt. Über Nacht und bei 4°C erfolgte die Bindung von FH an den Antikörper im *Batch*verfahren. Anschließend wurde das Säulenmaterial durch Überführen der Suspension in eine PD10-Säule geschichtet. Das durchfließende Plasma wurde zur Kontrolle der Depletionseffizienz aufgefangen. Die UltraLink-Säule wurde solange mit Säulenpuffer (P32) gewaschen, bis sich im Durchfluss mittels photometrischer Bestimmung kein Protein mehr nachweisen ließ. Auf die 5 ml Säulenmaterial wurden zur Elution 10 ml 0,1 M NaCitrat pH 2,0 gegeben und das Eluat als Aliquot von 1 ml in 1,5-ml-Eppendorf-Cups aufgefangen. Parallel wurde der pH-Umschlag im Durchfluss mit pH-Indikatorpapier verfolgt. Die einzelnen Eluatfraktionen (1 ml) wurden sofort mit je 175 µl 2 M Tris pH 8,0 zur Neutralisation versetzt. Das Säulenmaterial wurde mit weiteren 10 ml 0,1 M NaCitrat pH 2,0 regeneriert und anschließend unter pH-Kontrolle mit Säulenpuffer (P32) neutralisiert. Der Proteingehalt der einzelnen Eluatfraktionen wurde photometrisch überprüft. Fraktionen mit einer $OD_{280} < 0,1$ wurden verworfen. Die Fraktionen mit ausreichenden Mengen FH wurden vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Das beschriebene Verfahren wurde jeweils viermal wiederholt, um genügend Material für eine Einzelpräparation zu erhalten. Das dialysierte Protein aus den vier Präparaten wurde vereinigt und mit Centriprep Zentrifugenfiltern gemäß Herstelleranleitung bei 3000 g für jeweils 15 Minuten konzentriert. Dieser Vorgang wurde so häufig wiederholt,

bis der aufgereinigte FH aus 40 ml Ausgangsmaterial (Plasma) auf ein Volumen von ungefähr 1 ml konzentriert war.

Für einige Fragestellungen wurden aufgereinigte FH-Präparate mehrerer Einzelspender zu einem Proteinpool vereinigt. Ein FH-Pool setzte sich aus jeweils 6 Einzelpräparaten einer Variante zusammen. Vor der Vereinigung der Proben wurde die benötigte Absolutmenge Protein in µg kalkuliert. Jede Einzelpräparation steuerte in gleichem Maße (gewichtsbezogen) zur Bildung des Pools bei. Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Photometer bestimmt.

3.2.3 Herstellung eines Faktor-H-depletierten Serums

Damit eine Komplementaktivierung in Serum (siehe 3.11) bei verschiedenen und definierten FH-Konzentrationen erfolgen konnten, musste FH-depletiertes (Δ FH) Serum hergestellt werden. Aufgereinigter FH-402Y oder FH-402H konnten dem Δ FH-Serum dann in gewünschter Konzentration wieder zugefügt werden.

Da in Abwesenheit von FH Komplement durch spontanen Umsatz gänzlich durchaktiviert würde, mussten dem Serum vor der Depletion die für die Komplementaktivierung notwendigen zweiwertigen Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} durch Zugabe von 2 mM EDTA zunächst entzogen werden. Die Depletion erfolgte durch Immunitätschromatographie mit dem L20/3-gekoppelten Säulenmaterial bei 4°C. Auf 5 ml L20/3-UltraLink in einer PD10-Säule wurden 5 ml des EDTA-Serums gegeben. Die ersten 2 ml des noch Säulenpuffer-haltigen Durchflusses wurden verworfen, der darauf folgende Durchfluss in einem separaten, auf Eis stehenden 15-ml-Röhrchen aufgefangen. Kam der Säulenfluss zum Erliegen, wurden nochmals 2-3 ml EDTA-Serum auf die Säule gegeben, um mindestens 5 ml Durchfluss zu gewinnen. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml Säulenpuffer (P32) gewaschen, mit 15 ml 0,1 M NaCitrat pH 2,0 regeneriert und mit Säulenpuffer wieder neutralisiert.

3.2.4 Aufreinigung monoklonaler Antikörper mit Protein-G-Affinitätschromatographie

Protein G ist ein Oberflächenprotein aus Streptokokken. Es besitzt Bindungsstellen für den Fc-Teil von murinen Immunglobulinen der Subklassen IgG1-4 und eignet sich somit für die affinitätschromatographische Aufreinigung von IgG aus Hybridom-Kulturen. Aufgrund der hohen Affinität von Protein G zu IgG ist eine Elution nur im stark sauren Milieu möglich.

Die in Medium befindlichen Antikörper wurden über Nacht gegen Phosphatpuffer (P27) bei 4°C dialysiert und steril filtriert (Porengöße 1,2 µm). Im Maus-Immunglobulin ELISA (3.6.1) wurde anschließend die Antikörperkonzentration bestimmt. Für die Aufreinigung wurden jeweils 25 mg Immunglobulin im Ausgangsmaterial bei 4°C mit 1 ml Protein-G-Säulenmaterial eingesetzt. Nachdem das Medium durch die Säule gelaufen war, wurde

dieselbe mit ca. 50 ml 50 mM Phosphatpuffer (P27) gespült. Die Elution erfolgte mit 0,1 M Glycin pH 2,7. Dabei wurde der Antikörper in 10-ml-Fractionen aufgefangen und mit jeweils 0,5 ml 1 M Tris pH 9 neutralisiert. Die Regeneration der Säule erfolgte mit 100 ml Regenerationspuffer pH 2,5 (P31), die anschließende Neutralisation mit Phosphatpuffer pH 7,5 (P27). Der Immunglobulingehalt der einzelnen Eluatfraktionen wurde durch photometrische Bestimmung der OD_{280} (3.3) gemessen. Anschließend wurde der Antikörper über Nacht bei 4°C gegen PBS (P23) dialysiert.

3.3 Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Monochromatisches Licht wird beim Durchgang durch absorbierende Substanzen abgeschwächt. Das Ausmaß der Abschwächung ist abhängig von der Konzentration der absorbierenden Substanz und von der Strecke, die das Licht in dieser Substanz zurücklegt. Das Lambert-Beersche Gesetz formuliert diese Zusammenhänge:

$$E_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

Dabei ist E_{λ} die Extinktion oder Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge λ , ε_{λ} der molare Extinktionskoeffizient [$l/mol \times cm$], c die Konzentration der absorbierenden Substanz [mol/l], und d die Schichtdicke der Meßküvette [cm]. Der Extinktionskoeffizient ist substanzspezifisch und abhängig von der Wellenlänge. Aromatische Aminosäuren in Proteinen absorbieren ultraviolettes Licht bei 280 nm. Der Extinktionskoeffizient eines Proteins ist somit im Wesentlichen von der Molekülgröße und der Anzahl und Art jener aromatischen Aminosäuren abhängig. Sind Küvettendicke und Extinktionskoeffizient bekannt, so lässt sich nach photometrischer Messung der Extinktion die Konzentration des Proteins in einer homogenen Lösung errechnen. Für die Extinktionsmessung wurde das BioPhotometer der Firma Eppendorf verwendet. Die Küvettendicke betrug stets 1 cm. Der Extinktionskoeffizient für FH beträgt 1,3, der Koeffizient für Maus-Immunglobulin beträgt 1,2.

3.4 Konjugierung von Faktor H mit EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin

Das natürlich vorkommende Vitamin Biotin weist eine hohe Affinität zu Avidin auf. Man macht sich diesen Umstand zur Signalverstärkung in verschiedenen Nachweisverfahren zunutze, indem man Proteine mit Biotin konjugiert. Die Konjugation erfolgt unter Ausbildung von Peptidbindungen mit den Aminogruppen von Lysinresten des Proteins. Da Biotin mit einem Molekulargewicht von etwa 300 Da relativ klein ist, beeinträchtigt es die biologische Aktivität des konjugierten Proteins kaum. Entscheidend bei der Verwendung biotinylierter Proteine in Nachweisverfahren ist die korrekte Ermittlung der Konjugationseffizienz mit Biotin. EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin enthält ein

Chromophor, das von der eigentlichen Biotingruppe durch einen PEG-Arm getrennt ist (Abb. 3.2). Die Lichtabsorption durch das Chromophor kann bei 354 nm im Photometer bestimmt werden und erlaubt unmittelbar eine Quantifizierung der Biotinylierungseffizienz.

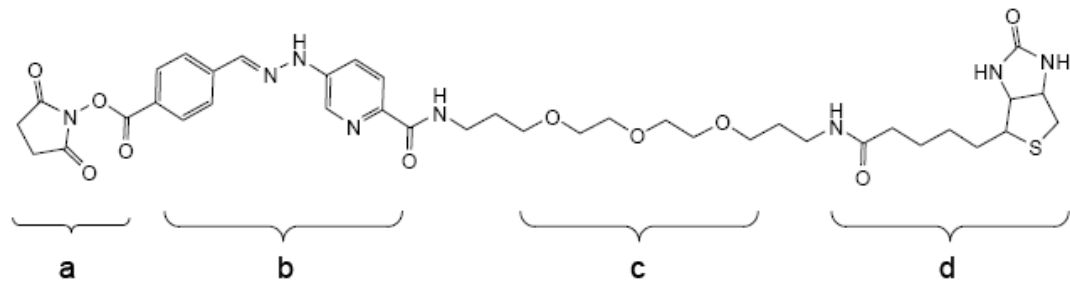


Abb. 3.2 Struktur des EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin. Die Biotingruppe (d) ist über einen PEG-Arm (c) mit der chromogenen Gruppe (b) gekoppelt. Die Konjugation mit dem Protein erfolgt über den NHS-Ester (a) (aus dem Produktinformationsblatt zu NHS-Chromogenic Biotin, Pierce Biotechnology).

Um zellgebundenen FH über die Steptavidinmethode durchflusszytometrisch nachweisen zu können, sollte das Protein mit NHS-Link Chromogenic Biotin konjugiert werden. Hierzu wurden die vereinigten FH-Präparate über Nacht bei 4°C gegen Kopplungspuffer (P17) dialysiert und anschließend in Kopplungspuffer auf ca. 1 mg/ml verdünnt. Das Biotin wurde zu 3 mg/ml in Dimethylformamid gelöst. In einem 15-fachen molaren Überschuss wurde das Biotin zu den FH-Präparaten gegeben. Die Konjugierung erfolgte im Thermomixer bei 37°C für 30 Minuten. Die Reaktion wurde mit Glycin in einer Endkonzentration von 0,1 M abgestoppt. Nicht konjugiertes Biotin konnte durch Dialysieren gegen PBS (P23) über Nacht bei 4°C entfernt werden. Anschließend wurde der Biotinylierungsgrad ermittelt. Hierzu wurde im Photometer zum einen die Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm (s. 3.3) und zum anderen die Konzentration des konjugierten Chromogenic-Biotins bei einer Wellenlänge von 354 nm gemessen. Die Biotinkonzentration errechnete sich mittels:

$$\frac{OD_{354nm}}{29,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} \times \frac{10^6 \mu\text{M}}{\text{M}} \quad [\mu\text{M Biotin}]$$

29,000 ist der Molare Extinktionskoeffizient der chromogenen Gruppe, 1 cm beträgt die Dicke der benutzten Küvette. Mit folgender Formel errechnete sich das molare Verhältnis von Biotin zu Protein und damit der Biotinylierungsgrad:

$$\text{Biotinylierungsgrad} = \frac{\mu\text{M Biotin}}{\mu\text{M Protein}}$$

3.5 Herstellung monoklonaler, epitopspezifischer Antikörper

3.5.1 Allgemeines zum Verfahren

Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern erkennen monoklonale Antikörper auf ihren Antigenen ein einzelnes Epitop. Sie sind deshalb hochspezifisch und zeigen wenig Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen. Monoklonale Antikörper bieten darüber hinaus den Vorteil, unbegrenzt und in gleichbleibender Qualität hergestellt werden zu können. Indem man B-Lymphozyten aus der Milz einer immunisierten Maus mit Myelomzellen fusioniert, erhält man sich unbegrenzt teilende und Antikörper-produzierende Hybridome. Durch Kultivierung in einem Selektivmedium gelingt die Elimination funktionsunfähiger Fusionsprodukte. Nur ein geringer Teil der Hybridome produziert allerdings Antikörper mit der gewünschten Antigenspezifität. Diese Zellklone müssen identifiziert und durch Subklonierung in eine reine Form gebracht werden. In einem speziellen Kultivierungssystem erfolgt die Massenproduktion der Antikörper durch das Hybridom. Die hergestellten monoklonalen Antikörper sollten zur funktionellen Charakterisierung des 402-Epitops beider FH-Varianten eingesetzt werden. Für die Immunisierung der Mäuse wurden deshalb zwei verschiedene synthetische Peptide eingesetzt, die an besagter Position jeweils entweder Histidin oder Tyrosin aufwiesen.

3.5.2 KLH-Konjugierung der Immunisierungspeptide

Zur Steigerung der Immunogenität eines kleinen Peptids (Hapten) kann es mit einem Trägerprotein wie dem Napfschnecken-Hämocyanin (KLH = *keyhole limpet hemocyanin*) konjugiert werden. Die Kopplung von Peptid und KLH erfolgt dabei über den Quervernetzer Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl-4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexan-1-carboxylat). Sulfo-SMCC ist ein bifunktionaler Linker, der zunächst im leicht alkalischen Milieu über einen *N*-Hydroxysuccinimid-(NHS)-Ester mit primären Aminogruppen auf KLH und nach Überführung ins saure Milieu über seine Maleimid-Anteile das aktivierte KLH mit den SH-Gruppen eines Cysteins auf dem Immunisierungspeptid verbindet. Zur Blockade freier SH-Gruppen am KLH wurden 20 mg KLH in 2 ml dH₂O gelöst und Ethylmaleimid in einem molaren Verhältnis von 600:1 zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine Dialyse gegen 50 mM Phosphatpuffer (P27). Zur SMCC-Kopplung des KLHs wurden zunächst 5 mg SMCC in 2 ml Phosphatpuffer (P27) gelöst. 1 ml dieser SMCC-Lösung wurde zu den 2 ml KLH-Lösung nach der Dialyse gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur auf der Rotatorenscheibe inkubiert. Zum Entfernen freier SMCC-Moleküle wurde der Ansatz anschließend über eine PD10-Säule gegeben. Die Elution erfolgte in 0,5-ml-Fractionen mit 50 mM Phosphatpuffer pH 6,8 (P27). Die KLH/SMCC-haltigen Fractionen wurden photometrisch identifiziert und vereinigt. Im nächsten Schritt wurde das jeweilige Immunisierungspeptid an das KLH-SMCC-Konjugat gekoppelt.

Hierzu war es notwendig, das Peptid (Sequenz: LENGYNQNYGRKFVQG bzw. LENGYNQNHGRKFVQG) mit einem zusätzlichen C-terminalen Cystein zu versehen, welches über den Abstandhalter Epsilon-Aminohexansäure (Ahx) mit der eigentlichen Peptidsequenz verbunden war. Die eigentliche Sequenz der Immunisierungspeptide lautete also C-Ahx-LENGYNQNYGRKFVQG bzw. C-Ahx-LENGYNQNHGRKFVQG. Zur Kopplung des jeweiligen Peptids wurden 5 mg entweder der 402Y- oder der 402H-Peptidvariante in 0,5 ml des pH 6,8 Phosphatpuffers (P27) gelöst und in 100 µl-Portionen zum KLH-SMCC-Konjugat gegeben. Nach Inkubation (2,5 h) auf der Rotatorscheibe bei Raumtemperatur erfolgte eine Dialyse gegen PBS (P23) zum Entfernen von nicht konjugiertem Peptid.

3.5.3 Immunisierung der Mäuse

Die für die Fusion aus der Maus gewonnenen Lymphoblasten haben zwei Kriterien zu erfüllen: zum einen sollen die von ihnen produzierten Antikörper eine hohe Affinität zum Antigen aufweisen, zum anderen müssen zur Fusion solche Lymphoblasten in ausreichender Menge vorhanden sein. Beides kann durch eine sachgerechte Immunisierung der Maus erreicht werden. Durch Vorimmunisierungen über einen Zeitraum von 6 Monaten kann eine höhere Affinität der vorwiegend zur IgG-Klasse zählenden Antikörper herbeigeführt werden. Der Zusatz von Adjuvans bei der Vorimmunisierung erhöht durch Stimulation von Toll-like-Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden Zellen die Immunogenität des Antigens (Lim 2003). Die Auffrischungsimmunisierung (*Boost*) erfolgt durch tägliche intraperitoneale Gabe des Antigens ohne Adjuvans an drei aufeinander folgenden Tagen und bewirkt eine maximale Proliferation Antigen-spezifischer Lymphoblasten zum Zeitpunkt der Fusion.

Aus dem in PBS gelösten KLH-Peptid-Konjugat und Freund-Adjuvans wurde zunächst eine Wasser-in-Öl-Emulsion hergestellt. Dabei betrug das Verhältnis Antigenlösung:Adjuvans 1:2. Die Emulgierung erfolgte mit Ultraschall in 5 Intervallen zu je 12 Sek. Dauer. Für die erste Immunisierung wurde komplettes Freund-Adjuvans (cFA) verwendet, für die folgenden Vorimmunisierungen inkomplettes Freund-Adjuvans (iFA), das im Gegensatz zu cFA keine inaktivierten Mykobakterien enthält. Durch intraperitoneale Injektion wurden der Maus bei jeder Vorimmunisierung 75 µg Antigen in einem Volumen von je 500 µl appliziert. Der Vorgang wurde über 6 Monate alle vier Wochen wiederholt. Fünf Tage unmittelbar vor der Fusion wurde die Boosterung an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Dazu wurde das KLH-Peptid-Konjugat nur in PBS (P23) verdünnt und der Maus in einem Volumen von je 300 µl appliziert. Die Absolutmenge an Antigen betrug bei der ersten Boosterung 50 µg, bei beiden darauffolgenden je 100 µg. Tabelle 3.7 beschreibt das Immunisierungsschema.

Tag	Schritt	KLH-Peptid [μg]	Volumen [μl]
1	<i>Priming</i>	75	500 (cFA)
30	Auffrischung	75	500 (iFA)
60	Auffrischung	75	500 (iFA)
90	Auffrischung	75	500 (iFA)
120	1. <i>Boost</i>	50	300 (PBS)
121	2. <i>Boost</i>	100	300 (PBS)
122	3. <i>Boost</i>	100	300 (PBS)
124	F U S I O N		

Tab. 3.7 Immunisierungsschema zur Herstellung monoklonaler Antikörper

3.5.4 Präparation von Maus-Peritoneal-Makrophagen

Eine Woche vor der Zellfusion wurden die Zellkultur-Platten mit adhärent wachsenden Maus-Peritoneal-Makrophagen beschichtet. Diese auch als Feederzellen bezeichneten Makrophagen begünstigen das Wachstum der Hybridome, indem sie anfallende Zelltrümmer beseitigen und Cytokine (IL-6) und Wachstumsfaktoren (GM-CSF) produzieren.

Eine Balb/c-Maus wurde durch CO₂-Begasung getötet und in Rückenlage auf einer Styroporplatte fixiert. Nach Desinfektion mit 70%igem Ethanol, Entfernen des Fells und erneuter Desinfektion konnte der Bauchraum eröffnet werden. Unter Verwendung der Pasteurpipette wurde die Peritonealhöhle mehrfach mit 1-2 ml kaltem PBS (P23) ausgespült (Endvolumen ca. 10 ml). Die Zellsuspension wurde in 400 ml 80/20-10-Medium gegeben, in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit Flachboden ausplattiert (200 μl pro Napf) und bei 37°C in 5%-CO₂-Atmosphäre bis zum Tag der Fusion inkubiert.

3.5.5 Zellfusion und selektive Aufzucht von Hybridomen

Aus der Mäusemilz gewonnene Lymphozyten sind in Kultur nicht überlebensfähig. Die Fusion von B-Lymphozyten mit einer Myelom-Permanent-Zelllinie, die selbst keine Immunglobuline synthetisiert, führt zu überlebensfähigen Antikörper-produzierenden Zellhybriden, sog. Hybridomen. Die Fusion erfolgt durch Zugabe von Polyethylenglykol (PEG). Da der Vorgang ungezielt erfolgt, entstehen auch Fusionsprodukte jeweils nur aus Milz – oder Myelomzellen. Die Myelomzellen mit ihrer hohen Teilungsrate würden die produktiven Zellhybride rasch überwuchern. Deshalb müssen sie nach der Fusion eliminiert werden. Zu diesem Zweck tragen die Myelom-Zellen gezielte Enzymdefekte der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase. Die Zellen können somit den Reserveweg der Nukleinsäuresynthese nicht bestreiten. Bei zusätzlicher Vergiftung des Hauptstoffwechselweges mit Aminopterin sterben die Myelomzellen ab. In den Lymphozyten-Myelom-Hybridomen werden die Reservewegsdefekte durch die Dominanz der normalen Lymphozytengene allerdings kompensiert. Bietet man diesen Hybridomen

die für den Reserveweg benötigten Substrate Hypoxanthin und Thymidin an, sind diese trotz Aminopterinbehandlung überlebensfähig. Die Kultivierung der Fusionsprodukte in HAT-Medium (*Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin*) ermöglicht auf dieser Grundlage das selektive Anwachsen von Lymphozyten-Myelom-Hybriden.

Eine immunisierte Balb/c-Maus (s. 3.3.1) wurde durch CO₂-Narkose getötet und die Bauchhöhle wie in 3.3.2 beschrieben eröffnet. Zusätzlich wurde der Thorax eröffnet, um aus dem Herzen Blut zur Bestimmung des Antikörpertiters entnehmen zu können. Die Milz wurde entfernt und in eine Petrischale mit ca. 10 ml 80/20-10-Medium überführt. Das Organ wurde nun vom Bindegewebe befreit und die Kapsel mehrmals mit einer Spritze perforiert. Das Parenchym konnte dann durch wiederholte Medium-Injektion in die Milz aus der Kapsel herausgespült werden. Das nun mit Milzzellen angereicherte Medium wurde in ein 15-ml-Falconröhrchen überführt. Nach Stehenlassen der Suspension für einige Minuten setzten sich die Bindewebspartikel ab. Das überstehende Medium mit der Zellsuspension wurde abgenommen und in ein weiteres Röhrchen überführt. Die Ag8-Myelomzellen wurden in einem 50 ml Falconröhrchen auf eine Absolutzahl von 1×10^8 in 2 ml 80/20-10-Medium eingestellt. Die Myelomzellen und die Milzzellsuspension wurden vermischt und anschließend für 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes und dem Homogenisieren des Pellets erfolgte die Zellfusion. Hierzu wurden 1,5 ml vorgewärmtes PEG gleichmäßig innerhalb von einer Minute unter leichtem Schütteln auf die Zellsuspension getropft. Es folgte die Zugabe von insgesamt 20 ml warmem PBS (P23) ebenfalls als Tropfen und unter leichtem Schütteln. Dabei wurden in den ersten 30 Sekunden 1 ml, in den nächsten 30 Sekunden weitere 3 ml und in der darauffolgenden Minute die restlichen 16 ml PBS auf die Zellen gegeben. Die Suspension wurde noch einmal mit der Pipette vorsichtig gemischt, bevor sie bei $300 \times g$ für 5 Minuten in die Zentrifuge gestellt wurde. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten stehen gelassen. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in einem geringen Volumen HAT-Medium suspendiert und dann in eine Flasche mit 500 ml HAT-Medium überführt. Diese Zellsuspension wurde auf insgesamt 25 mit Feederzellen beschichteten 96-Loch-Platten verteilt.

3.5.6 Identifikation von Hybridomen mit der gewünschten Spezifität

Die funktionsfähigen Hybridome aus Mäuselymphozyten und Ag8-Zellen sezernieren Immunglobuline in das Zellmedium. Nur wenige Hybridome produzieren allerdings Antikörper mit der gewünschten Antigen-spezifität. Das Überprüfen der Kulturüberstände mit dem in 3.6.7 beschriebenen ELISA erlaubt es, die Näpfe einer Zellkulturplatte zu identifizieren, die Klone mit der gewünschten Spezifität enthalten. Das Screening erfolgte mindestens eine Woche nach der Zellfusion. Initial wurden die Kulturüberstände auf Antikörper gegen das Immunisierungspeptid getestet. 50 µl Medium aus jedem Napf wurden vorsichtig in einen entsprechenden Napf einer mit dem

Immunisierungspeptid beschichteten ELISA-Platte überführt. Zeigte ein Kulturüberstand eine positive Reaktion gegen das Peptid, wurde geprüft, ob die Antikörper auch das intakte FH-Protein erkennen und ob sie Kreuzreaktivität mit dem Peptid/Protein der jeweils anderen FH-Variante aufweisen. Hierfür wurden 25 µl Überstand aus den Peptid-positiven Nöpfen in je einen Napf einer ELISA-Platte überführt, die mit Peptid und Protein beider FH-Varianten beschichtet worden war. Folglich wurden nur die Klone aus jenen Nöpfen isoliert, die sowohl das entsprechende Peptid als auch das Protein erkannten und zudem nicht mit dem Protein / Peptid der anderen FH-Variante reagierten. Mit einer auf 50 µl eingestellten Pipette konnten die einzelnen Kolonien unter Sicht gepickt und in separate Nöpfe einer anderen Mikrotiterplatte transferiert und dort propagiert werden.

3.5.7 Subklonierung der positiven Klone

Die gepickten Kolonien enthalten mit einer gewissen statistischen Wahrscheinlichkeit noch Zellkontaminanten. Als monoklonal wird ein Klon daher erst nach mindestens einer Subklonierung bezeichnet. Der Subklonierung liegt das Prinzip der Grenzverdünnung zu Grunde (Würzner et al. 1990). Dabei wird angestrebt, statistisch weniger als eine Zelle in einen Napf zu überführen. Da für das Wachstum der Zellen aber häufig eine Mindestzelldichte nicht unterschritten werden darf, ohne dass die Zellen eingehen, werden die Zellen einer Kolonie in verschiedenen Verdünnungen ausgesät. Der Napf mit der geringsten Zelldichte wird anschließend propagiert. Sobald die gepickten Klone den Boden eines Napfes bedeckten, wurden sie in Suspension gebracht und in 6 ml HAT-Medium + IL-6 verdünnt. Diese Zellsuspension wurde dann in einer sechsstufigen 1:3-Verdünnungsreihe auf 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Die einzeln hochwachsenden Klone aus den Nöpfen mit der geringsten Zelldichte wurden erneut gepickt und anschließend auf Antigenspezifität geprüft. Zeigten die Klone dabei ein positives Signal, wurden sie über eine 24-Loch-Platte und Zellkulturflaschen unter Verwendung von 80/20-10-Medium expandiert. Der Überstand aus den Zellkulturflaschen konnte dann zusätzlich im Immunoblot auf epitopspezifische Antikörper getestet werden.

3.5.8 Antikörper-Massenproduktion im MiniPerm-Bioreaktor

Durch die Kultivierung der Hybridome in einem rollenden Bioreaktor lassen sich sehr hohe Zelldichten und somit hohe Antikörperkonzentrationen erreichen. Der Bioreaktor miniPerm besteht aus zwei durch eine semipermeable Membran getrennte Kompartimente: einem Produktionsmodul und einem Versorgungsmodul. Die Zellen proliferieren im Produktionsmodul, wobei die semipermeable Membran den wechselseitigen Durchtritt von Nährstoffen bzw. von toxischen Stoffwechselmetaboliten erlaubt. Die Antikörper reichern sich im Produktionsmodul an, da sie die Membran nicht passieren können (Ausschlussgrenze 20 kDa).

Das Versorgungsmodul des miniPerm-Bioreaktors wurde mit 350 ml 80/20-10-Medium gefüllt. Insgesamt 4×10^7 Zellen in 40 ml 80/20-10-Medium mit IL-6 wurden in das Produktionsmodul überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 5 Umdrehungen/min, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Alle 3-4 Tage wurde das gesamte Medium aus dem Versorgungsmodul gewechselt. Gleichzeitig wurden die Zellen aus dem Produktionsmodul gezählt, um sie nachfolgend wieder auf die Ausgangsmenge von 4×10^7 zu verdünnen. Die überschüssige Zellsuspension wurde als Ernte entnommen und bei 200 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der antikörperhaltige Überstand wurde geerntet und bei -20°C eingefroren.

3.6 ELISA-Verfahren

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein quantitatives immunologisches Nachweisverfahren, das auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an ein Antigen basiert. Der Nachweis des Antigens erfolgt über eine Farbreaktion, die von einem meist Antikörper-konjugierten Enzym katalysiert wird. Die meisten in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Verfahren sind sogenannte *Sandwich-ELISAs*. Bei dieser Art von ELISA kommen jeweils zwei Antikörper zum Einsatz, die zwei verschiedene, möglichst weit voneinander entfernte Epitope auf demselben Antigen erkennen. Dabei wird eine Mikrotiterplatte mit einem Immunglobulin beschichtet. Dieser an die feste Phase gekoppelte Fangantikörper isoliert zunächst den Analyten aus einem Stoffgemisch. Nach einer variablen Anzahl von Waschschrritten erfolgt die Detektion des gebundenen Antigens mit dem zweiten Antikörper. Dieser Nachweisantikörper ist entweder direkt mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert oder liegt in biotinylierter Form vor. Im letztgenannten Fall ist ein weiterer Inkubationsschritt mit Steptavidin-gekoppelter Peroxidase (SAVP) nötig, wobei das Streptavidin eine hohe Affinität zu Biotin am Nachweis-Antikörper aufweist. Unter Verwendung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Oxidationsmittel katalysiert die Peroxidase die Spaltung von 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) in ein grün gefärbtes Produkt. Dieser Farbumschlag ist bei 405 nm im Photometer detektierbar.

Alle ELISAs wurden in Nunc MaxiSorb 96-Lochplatten durchgeführt. Die Beschichtung der Platten mit dem jeweiligen Fangantikörper erfolgte im alkalischen Milieu (pH 10,6) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Hierzu wurde der Antikörper in Coating-Puffer (P6) auf die entsprechende Konzentration verdünnt und in jeden Napf 100 µl pipettiert. Nicht besetzte Bindungsstellen in der Platte wurden durch 45-minütige Inkubation jedes Napfes mit 200 µl Gelatine-Blockpuffer (P11) blockiert. Danach wurde die ELISA-Platte zweimal gewaschen. Das Waschen der Platten erfolgte mit 200 µl PBS/Tween (P24) pro Napf. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten in einem

Endvolumen von 100 µl/Napf bei Raumtemperatur. Die eingesetzten Proben und Antikörper wurden dazu in PBS/Tween/EDTA (P25) verdünnt. Die Inkubationszeiten betragen in der Regel eine Stunde. Alle Proben wurden jeweils in Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen. Das Auftragen eines Standards diente der Erstellung einer Kalibrationskurve. Die Standards wurden als Verdünnungsreihe ebenfalls in Doppelbestimmung aufgetragen. Zum Farbnachweis wurden zu je 10 ml ABTS-Lösung (P1) 40 µl 3,5%iges Wasserstoffperoxid gegeben und davon 100 µl in jeden Napf pipettiert. Der Farbumschlag wurde mit dem Plattenphotometer bei 405 nm detektiert. Die Auswertung sowie die Erstellung der Kalibrationskurven erfolgte mit der Software SoftMax®. Die Tabelle 3.8 stellt den Ablauf eines ELISAs in exemplarischer Weise dar. Tabelle 3.9 fasst alle eingesetzten Sandwich-ELISAs zusammen.

3.6.1 Vorbereitungen für den Ba-ELISA: Depletion von Faktor B

Die zur Detektion des Ba-Fragmentes eingesetzten Antikörper erkennen gleichermaßen Ba und das native Vorläufer-Protein Faktor B. Daher muss vor dem Nachweis des Ba-Fragments im ELISA Faktor B effizient aus der zu analysierenden Probe entfernt werden. Der Antikörper M13/12 bindet spezifisch Faktor B sowie dessen Spaltprodukt Bb (Oppermann et al. 1990). Man erreicht eine Depletion von Faktor B, indem man diesen Antikörper an eine feste Phase koppelt und die Proben damit vor dem eigentlichen ELISA inkubiert.

3.6.1.1 Kopplung des monoklonalen Antikörpers M13/12 an biomagnetische Partikel

Bei *Carboxyl-terminated Biomag* handelt es sich um paramagnetische Eisen-Oxid-Partikel. Durch eine Silan-Beschichtung sind die Partikel mit Carboxyl-Gruppen bestückt. Nach Aktivierung der Carboxyl-Gruppen mit einem Carbodiimid können z.B. Antikörper über ihre Aminogruppen kovalent an *Biomag* gebunden werden. Ein von dem gekoppelten Antikörper erkanntes Protein kann über die Partikel gebunden und im Magnetfeld aus einem Gemisch isoliert werden. Auf diese Weise kann mit dem monoklonalen Antikörper M13/12 das Komplementprotein B vor dem eigentlichen Ba-ELISA aus den Proben entfernt werden.

Zu diesem Zweck wurden 10 mg M13/12 an die *Biomag*-Partikel gekoppelt. Vor der Kopplung wurde der Antikörper über Nacht gegen Kopplungspuffer (P4) dialysiert. Alle Schritte erfolgten in einer 50-ml-Zellkulturflasche auf einer Schwenkplatte bei Raumtemperatur. Die in 10 ml Wassersuspension befindlichen Partikel wurden zunächst für 5 Minuten in 40 ml Kopplungspuffer (P4) gewaschen. Anschließend wurden die Partikel mit der Magnetplatte pelletiert und der Überstand abgesaugt. Nach 3 weiteren Waschschritten mit 50 ml Kopplungspuffer (P4) wurden die *Biomag*-Teilchen

1. Beschichtung	Fangantikörper verdünnt in Coatingpuffer, 100 µl/Napf, über Nacht, 4°C
2. Platte ausschlagen	
3. Blockade	200 µl Blockadepuffer pro Napf, 1 h
4. Waschen	zweimal mit PBS/Tween
5. Inkubation mit Proben / Standard	verdünnt in PBS/Tween/EDTA, 100 µl/Napf, 2 h, Raumtemperatur
6. Waschen	zweimal mit PBS/Tween
7. Nachweis-Antikörper	verdünnt in PBS/Tween/EDTA, 100 µl/Napf, 1 h, Raumtemperatur
<i>Bei Peroxidase-konjugiertem Nachweisantikörper direkt zu 10. ; bei Biotin-konjugiertem Nachweisantikörper zusätzlich 8.+9.:</i>	
8. Waschen	dreimal mit PBS/Tween
9. Konjugat	SAVP, in PBS/Tween 1:5000 verdünnt, 100 µl/Napf, 45min, Raumtemperatur
10. Waschen	viermal mit PBS/Tween
11. ABTS+H ₂ O ₂	100 µl/Napf, Warten auf Grünfärbung
12. Computergestützte Auswertung	

Tabelle 3.8 Ablauf eines Sandwich-ELISAs.

ELISA	Fang-AK	Standard	Proben	Nachweis-AK	Konjugat
Akt. C3	I3/15 # [5 µg/ml]	C3b [5 µg/ml- 19,5 ng/ml]	1:50 - 1:200	Kan. α C3d-Perox. 1:200	-
B	# P21/15 [10 µg/ml]	B [2000 ng/ml – 2ng/ml]	1:500	Kan. α Bb-biot. [5 µg/ml]	SAVP 1:4000
Ba	# P21/15 [10 µg/ml]	Ba [20 ng/ml – 0,078ng/ml]	1:1000 - 1:5000	M20/6-biot. [1 µg/ml]	SAVP 1:4000
C3	B3/6 [10µg/ml]	C3-Serum-Std. [1000 ng/ml – 3,9 ng/ml]	1:2000 - 1:20000	K13/16-biot. [1 µg/ml]	SAVP 1:4000
C3a	\$ K13/6 [40 µg/ml]	C3a [10 ng/ml – 0,039 ng/ml]	1:10 - 1:20	D17/1-biot. [2,5 µg/ml]	SAVP 1:4000
C5a	* C17/5 [40 µg/ml]	C5a [5 ng/ml – 20 pg/ml]	1:2 - 1:4	G25/2-biot. [1 µg/ml]	SAVP 1:4000
D	# D10/4 [10 µg/ml]	D [40 ng/ml – 0,156 ng/ml]	1:2000	I8/1-biot. [1 µg/ml]	SAVP 1:4000
FH	# C18/3 [40 µg/ml]	Faktor H [500 ng/ml – 1,95 ng/ml]	1:5000 - 1:20000	L20/3-biot. [2 µg/ml]	SAVP 1:4000
iC3b	I3/15 [5 µg/ml]	Zymosan akt. Serum [1:100 – 1:25.600]	1:200- 1:400	B3/6-biot. [1 µg/ml]	SAVP 1:4000
Maus-Ig	Kan α Ms Ig [1:500]	Ms-IgG Verdünnungsreihe [500 ng/ml – 1,95 ng/ml]	1:200 – 1:3200	Kan. α Ms Perox [1:1000]	-
TCC (C5b-9)	§ Wu13/15 [15 µg/ml]	TCC-Serum-Std [5000ng/ml – 19,53ng/ml]	1:2	Ziege α C6 biot. [5 µg/ml]	SAVP 1:4000

Tab 3.9 Verwendete Sandwich-ELISAs. Alle verwendeten mAk / ELISAs wurden in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie Göttingen zuvor hergestellt / etabliert. Referenzen: # Oppermann et al. 1990, \$ Oppermann et al. 1988, * Oppermann et al. 1991b, § Würzner et al. 1991

in 10 ml Kopplungspuffer (P4) resuspendiert. Unter Schwenken wurden 4 ml EDAC (20 mg gelöst in 35 ml dH₂O) hinzugefügt, um die Carboxylgruppen auf dem *Biomag* zu aktivieren. Nach 2 Minuten Aktivierungszeit wurde der in 5 ml Kopplungspuffer gelöste Antikörper [2 mg/ml] zu den Partikeln gegeben. Durch Zugabe von 0,1 N HCl (ca 600 µl) wurde der pH des Reaktionsansatzes auf einen Wert zwischen 4,5 und 6,0 eingestellt. Die Kopplung erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Schwenkplatte. Das anschließende Hinzufügen von 950 µl 1 M Ethanolamin pH 8,0 für eine Stunde diente der Blockade nicht besetzter Bindungsstellen und damit dem Abstoppen der Reaktion. Daraufhin wurden die Partikel erneut mit dem Magneten pelletiert, der Überstand abgenommen und zur Testung der Kopplungseffizienz aufgehoben. Es schlossen sich vier Waschschriffe mit je 50 ml Waschpuffer (P5) an. Die Antikörper-konjugierten Partikel wurden in 10 ml Waschpuffer bei 4°C gelagert.

3.6.1.2 Depletion von Faktor B

Die B-Depletion der ELISA-Proben erfolgte in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Flachboden. Die M13/12-konjugierten *Biomag*-Partikel wurden zweimal in PBS (P23) gewaschen und anschließend in PBS 1:10 verdünnt. 75-µl-Aliquots der *Biomag*-Suspension wurden dann auf die Näpfe der Platte verteilt. Die Proben wurden in PBS/Tween (P24) auf die doppelte der im Ba-ELISA eingesetzten Konzentration vorverdünnt. Je 75 µl der verdünnten Proben wurden zu den 75 µl *Biomag* gegeben. Die Endverdünnung des *Biomag* betrug somit 1:20 in einem Volumen von 150 µl. Die 96-Loch-Platte wurde mit Klebefolie versiegelt und anschließend bei Raumtemperatur für 45 Minuten in den Inkubationsschüttler gestellt. Danach wurde die Mikrotiterplatte auf der Magnetplatte fixiert, wodurch die *Biomag*-Partikel mit dem gebundenen B-Protein pelletiert wurden. Je 100 µl des klaren Überstandes konnten direkt im Ba-ELISA eingesetzt werden.

3.6.2 Vorbereitungen für den C3a-ELISA: C3-Präzipitation

Der im C3a-ELISA eingesetzte Fangantikörper erkennt neben C3a ebenso das Vorläuferprotein C3. Durch eine Fällungsreaktion im sauren Milieu wird C3 daher vor dem eigentlichen ELISA aus den Proben entfernt. Da unspezifisch ebenfalls Komplementinhibitoren präzipitiert werden, muss zur Vermeidung einer C3a-Generierung während der Fällung eine Komplementaktivierung durch EDTA unterdrückt werden.

Vor der C3-Fällung wurden alle eingesetzten Plasmen auf 20 mM EDTA eingestellt. 100 µl des Plasma wurden in einer Spitzboden-Mikrotiterplatte mit jeweils 100 µl Fällungsreagenz (P10) gut durchgemischt. Die C3-Fällung erfolgte bei 4°C über Nacht. Das Präzipitat konnte darauffolgend durch Zentrifugieren für 12 Minuten bei 3000 x *g* pelletiert werden. 100 µl des stark sauren Überstandes wurden abgenommen und mit 400 µl Neutralisationspuffer (P22) versetzt. Die Proben waren nach dieser Prozedur

folglich 1:10 vorverdünnt. Für den C3a-ELISA wurden die Ansätze nicht in PBS-Tween, sondern in Tris-haltigem Verdünnungspuffer (P39) auf die entsprechende Konzentration eingestellt.

3.6.3 ELISA zum Antikörper-Screening und zur Bestimmung der Antigen-spezifität monoklonaler Antikörper

Antikörper aus Hybridomüberständen können mittels ELISA nachgewiesen werden. Bei diesem modifizierten *Sandwich*-ELISA wird die ELISA-Platte nicht mit einem Antikörper, sondern direkt mit Antigen beschichtet. Nur Antikörper mit Spezifität für dieses Antigen bleiben an die feste Phase gebunden und sind dem weiteren Nachweis zugänglich. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörper sollten spezifisch das FH-Epitop 402H oder 402Y erkennen. Details zum Vorgehen beim Screening werden in Kapitel 3.5.5 beschrieben.

Das Protokoll entspricht weitgehend dem in Tabelle 3.8 beschriebenen Vorgehen. Die Platten wurden mit dem jeweiligen Immunisierungspeptid in einer Konzentration von 200 ng/ml oder mit dem nativen Protein in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtet. Nach Blockade der Platten und einem Waschschrift wurde das Antigen mit unterschiedlichen Volumina Hybridom-Kulturüberstand für eine Stunde inkubiert. Der Sekundärnachweis erfolgte mit jeweils 100 µl eines Kaninchen-anti-Maus-Ig-Peroxidase-Konjugats in einer Verdünnung von 1:1000. Für alle weiteren Schritte siehe Tabelle 3.8.

3.6.4 ELISA zur Immunglobulin-Subklassifizierung

Für die Subklassifizierung der aus den Hybridomkulturen gewonnenen Antikörper wurde das *Mouse MonoAb ID Kit* von Zymed eingesetzt. Das Kit enthält verschiedene vorverdünnte Kaninchen-Antikörper. Eine Antikörper-Lösung ist jeweils gegen eine Subklasse der schweren oder der leichten Kette gerichtet. Es wurde eine ELISA-Platte wie in 3.6.3 beschrieben mit dem Immunisierungspeptid in einer Konzentration von 200 ng/ml beschichtet und anschließend blockiert. Die beschichteten Näpfe wurden mit jeweils 100 µl Hybridom-Kulturüberstand für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Tween (P24) wurden in jeden Napf 50 µl einer der Kaninchen-Antikörper-Lösungen gegeben. Nach einstündiger Inkubation und zwei weiteren Waschschriften erfolgte der Sekundärnachweis mit jeweils 50 µl eines Ziege-anti-Kaninchen-Ig-Peroxidase-Konjugats in einer Verdünnung von 1:50. Die Inkubation erfolgte erneut über 1 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die in Tabelle 3.8 beschriebenen Schritte 8.-12. durchgeführt.

3.6.5 Modifizierter ELISA zur Quantifizierung der Bindung von Faktor H an C3b / iC3b

Die Bindung von FH an die Proteine C3b und iC3b kann in einem modifizierten ELISA quantifiziert werden. Dabei dient an die ELISA-Platte gebundenes C3b bzw. iC3b der Fixierung von FH an die feste Phase. Der Nachweis von gebundenem FH erfolgt mit einem spezifischen Antiserum. Für alle Inkubationsschritte wurden jeweils 100 µl pro Napf eingesetzt, für alle Blockade- und Waschschriffe 200 µl pro Napf. Als Waschpuffer und zum Verdünnen der Proben wurde 0,1 % BSA in PBS benutzt. Nunc Maxisorp Platten wurden mit C3b / iC3b in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtet. Das Protein wurde zu diesem Zweck in PBS (P23) verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf der Platte mit 3 % BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, die Platte nachfolgend ausgeschlagen und einmal gewaschen. Es folgte die Inkubation mit FH in Konzentrationen von 0,039 µg/ml bis 20 µg/ml für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen. Als erster Antikörper wurde Ziegen-anti-FH-Antiserum in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde wurde die Platte ausgeschlagen und erneut dreimal gewaschen. Der Sekundärnachweis erfolgte mit Peroxidase-konjugiertem Esel-anti-Ziegen-IgG-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen und Ausschlagen der Platte wurden in jeden Napf 100 µl ABTS-Lösung (P1) pipettiert. Nachdem eine deutliche Grünfärbung in den Nöpfen zu verzeichnen war, wurde die Platte im ELISA-Messgerät eingelesen.

3.6.6 Modifizierter ELISA zur Quantifizierung der Bindung von Faktor H an Heparin

Die Bindung von FH an Heparin erfolgte analog zu dem in 3.6.5 beschriebenen Protokoll. Die ELISA-Platten wurden mit Heparin in einer Konzentration von 1 mg/ml über Nacht bei 4°C in feuchtem Milieu beschichtet. Zur Beschichtung wurde PBS (P23) als Puffer benutzt.

3.6.7 Modifizierter ELISA zur Quantifizierung der Bindung von Faktor H an CRP

Die Bindung von FH an CRP erfolgte in Anlehnung an das in 3.6.5 beschriebene Protokoll. Die ELISA-Platten wurden mit rekombinantem CRP in einer Konzentration von 10 µg/ml über Nacht bei 4°C in feuchter Umgebung beschichtet. Die Beschichtung erfolgte in 75 mM Na₂CO₃ pH 9,6. FH und die Nachweisantikörper wurden für diesen ELISA in HEPES-Puffer (P15) verdünnt.

3.7 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

3.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld (Laemmli 1970). Als Trenngel dient ein Polymerisationsprodukt aus Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid. Das Bisacrylamid bewirkt die Quervernetzung des Acrylamids und bestimmt somit die Dichte des Gels. Proteine mit hohem Molekulargewicht bewegen sich wegen ihres großen Durchmessers langsamer durch die Maschen dieser Matrix. Allerdings sind Proteine durch ihre verschiedenen Aminosäurereste heterogen geladene Moleküle. Damit diese Eigenladungen keinen Einfluss auf das Wanderungsverhalten im elektrischen Feld gewinnen, müssen sie vor der Elektrophorese überdeckt werden. Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) ummantelt das Protein mit negativen Ladungen und unterstützt zugleich dessen Denaturierung. Der Zusatz eines reduzierenden Reagens wie 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) bewirkt die Spaltung von Disulfidbrücken. Erhitzen verstärkt den denaturierenden Effekt. Das so vorbehandelte Protein wandert im elektrischen Feld zur Anode und die Laufgeschwindigkeit ist allein vom Molekulargewicht abhängig.

Verschiedene SDS-PAGE-Verfahren unterscheiden sich vor allem in den verwendeten Polyacrylamidgelen. Für die Auftrennung von Proteinen mit großen Unterschieden im Molekulargewicht eignet sich die Verwendung eines sog. Gradientengels, in dem die Acrylamidkonzentration linear von 3% bis 20% in Laufrichtung ansteigt. Im Gegensatz dazu weist das Trenngel in dem von Laemmli beschriebenen Verfahren einen konstanten Acrylamidgehalt auf. Ein separates Sammelgel mit niedriger Acrylamidkonzentration dient hierbei der Konzentrierung der Proben vor dem Eintritt in das Trenngel. Die SDS-Page nach Laemmli kommt vor allen Dingen dann zur Anwendung, wenn die aufzutrennenden Eiweiße sich nur gering in ihrer Größe unterscheiden.

3.7.1.1 Gießen eines Polyacrylamidgels

Zwei Glasplatten (16 x 18 cm) wurden mit Ethanol gesäubert, mit Abstandhaltern und Klemmen zu einer Gussform für das Gel zusammengebaut und anschließend in eine Gießvorrichtung eingespannt. Die Acrylamidlösungen für ein 10%iges Laemmli-Gel sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst. Zunächst wurde die Lösung für das Trenngel hergestellt, die Polymerisation durch Zugabe des Katalysators TEMED gestartet und das noch flüssige Gel rasch zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Dabei blieben die obersten 5 cm zwischen den Platten für das Sammelgel ausgespart. Der Oberrand des Trenngels wurde mit wassergesättigtem Butanol bedeckt. Nach Erhärten des Gels

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30%, P2)	10 ml	1,33 ml
1,5 M Tris pH 8,8	7,5 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	2,5 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,1 ml
Ammoniumpersulfat	5 mg	2,5 mg
dH ₂ O	12 ml	6,1 ml
TEMED	20 µl	10 µl

Tab. 3.10 Zusammensetzung eines Laemmli-Gels

Komponente	3 %	20 %
0,8 M Tris pH 8,6	2,0 ml	2,0 ml
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40%, P3)	0,75 ml	5,0 ml
Ammoniumpersulfat	5 mg	5 mg
dH ₂ O	7,25 ml	3,0 ml
TEMED	5 µl	5 µl

Tab. 3.11 Zusammensetzung eines Gradientengels

wurde die Flüssigkeit abgegossen und die Sammelgel-Lösung bis zum obersten Rand der Glasplatten auf das Trenngel pipettiert. Der Ausbildung von Taschen für den Probenauftrag diene ein Kamm.

Zur Herstellung eines Gradientengels wurden eine 3%ige sowie eine 20%ige Acrylamidlösung in jeweils 10 ml Volumen angesetzt (Tab. 3.11). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED gestartet und die beiden Lösungen dann zügig in die dafür vorgesehenen Kammern eines Gradientenmischers überführt. Nach Einschalten des Rührstabes wurde die Verbindung zwischen beiden Kammern geöffnet und das Acrylamid mit einer Pumpe in die Gussform überführt. Der Kamm wurde in diesem Fall direkt in das Trenngel eingesetzt. Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die Käme wieder entfernt, die Gele in die Halterungen für den Elektrophoreselauf eingespannt und mit dem jeweiligen Laufpuffer bedeckt.

3.7.1.2 Probenvorbereitung und Elektrophorese

Je nach Größe der Taschen wurden Volumina von 30-60 µl pro Tasche mit einer Hamiltonspritze appliziert. Die Proben wurden dafür 1:3 in Probenpuffer (P29/30) verdünnt und nachfolgend bei 99°C für 5 Minuten gekocht. Für reduzierte Ansätze wurde dem jeweiligen Probenpuffer 10% Mercaptoethanol bzw. DTT zugefügt. Als Molekulargewichtsmarker wurden stets 7 µl Längenstandard in Probenpuffer (P29/30) aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit dem jeweiligen Laufpuffer (P18/19) gefüllt. Weitere 600 ml des Laufpuffers (P18) bzw. 600 ml des Kathodenpuffers (P16) im Fall des Gradientengels wurden in den Kathodentank gegeben. Die Gele wurden in

ihrer Halterung in die Elektrophoresekammer gestellt und das System mit einem Spannungsgenerator verbunden. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 mA unter Kühlung mit einer Gegenstrompumpe. Das Phenolrot / Bromphenolblau im Probenpuffer markierte stets die vorderste Front und damit das Voranschreiten der Auftrennung. Sobald die Front den unteren Gelrand erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Für die folgenden Schritte wurden die Glasplatten vorsichtig vom Gel gelöst.

3.7.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung ist eine Methode zur Visualisierung von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel. Es werden unspezifisch alle Proteine im Gel angefärbt. Die Nachweisgrenze liegt bei ungefähr 500 ng Protein pro Bande. Der Farbstoff lagert sich in stöchiometrischer Weise an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an. Durch Zugabe einer Säure während des Färbvorgangs werden die Proteine im Gel fixiert.

Das Gel wurde ausreichend mit Coomassie-Blau-Lösung (P27) bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur auf der Schwenkplatte gefärbt. Die Hintergrund-Färbung musste anschließend mit Entfärber-Lösung (P8) aus dem Gel gewaschen werden, um die einzelnen Proteinbanden abgrenzbar zu machen. Die Entfärbung erfolgte ebenfalls unter Schwenken bei Raumtemperatur, die Lösung wurde dabei mehrmals gewechselt.

3.7.3 Immunoblot

Eine weitaus sensitivere Methode zur Detektion von Proteinen nach einer SDS-PAGE ist der Immunoblot. Grundlage des Nachweises ist die Bindung eines spezifischen Antikörpers an das interessierende Protein. Demzufolge werden bei diesem Verfahren spezifisch nur diejenigen Proteine sichtbar gemacht, die ein vom Antikörper erkanntes Epitop exprimieren. Da die Proteine im Acrylamid-Gel für den Antikörper nicht zugänglich sind, werden sie für den Nachweis zunächst auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies erfolgt durch eine senkrecht zur Laufrichtung des Gels ausgerichtete Elektrophorese. Durch hydrophobe Wechselwirkungen bleiben die Proteine auf der Nitrocellulose haften. Die Membran kann nun mit den Antikörpern inkubiert werden. Der eigentliche Nachweis basiert auf einer Chemilumineszenzreaktion. Hierfür ist entweder direkt der Primärantikörper oder aber ein Sekundärantikörper mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol. Die dabei entstehende Lumineszenz kann entweder durch CCD-Kameras oder durch das Schwärzen eines Films detektiert werden.

Der Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran erfolgte mit dem *Semidry*-System. Zwei in *Semidry*-Puffer (P33) getränkte Lagen Blotting-Papier wurden auf die Anodenplatte des Elektroblo-Geräts gelegt. Auf dem Papier wurde die ebenfalls mit

Semidry-Puffer (P33) befeuchtete Nitrocellulose-Membran platziert. Nach Äquilibration des Acrylamidgels im *Semidry*-Puffer (P33) für fünf Minuten wurde es vorsichtig auf die Nitrocellulose gelegt, wobei Blasenbildung zu vermeiden war. Es folgten zwei weitere Lagen feuchtes Blotting-Papier, bevor die Kammer mit der Kathodenplatte geschlossen wurde. Der Elektrotransfer erfolgte für eine Stunde bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$. Nach dem *Blotting* wurde die Nitrocellulose für eine Stunde bei Raumtemperatur in Magermilchpuffer (P20) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Magermilchpuffer (P20) über Nacht bei 4°C auf der Schwenkplatte. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran anschließend dreimal für 5 Minuten in TBS/Tween gewaschen. Bei Peroxidase-konjugierten Primärantikörpern konnte direkt mit der Zugabe des Substrats fortgefahren werden. Bei biotinylierten oder unkonjugierten Primärantikörpern war ein Sekundärnachweis mit Streptavidin-gekoppelter Peroxidase (SAVP) bzw. Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-IgG in einer Verdünnung von jeweils 1:2000 in Magermilchpuffer (P20) erforderlich. Dieser Inkubationsschritt erfolgte auf der Schwenkplatte bei Raumtemperatur für ein bis zwei Stunden. Nach dreimaligem Waschen in TBS/Tween erfolgte die Zugabe des Substrats. Dafür wurde die ECL-Entwicklerlösung aus den Lösungen eins und zwei des Herstellers im Verhältnis 1:1 frisch angesetzt und sofort auf die Nitrocellulose gegeben. Nach ungefähr zwei Minuten wurde die Lösung entfernt und die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt. In der Dunkelkammer und in einer Röntgenkassette wurde nun ein Röntgenfilm mit der lumineszierenden Membran exponiert. Zum Entwickeln des Films wurde dieser für jeweils 2 Minuten in ein Entwicklerbad, eine Stopplösung und eine Fixierlösung gelegt. Nach gründlichem Abspülen mit Wasser wurde der Film getrocknet. Für eine quantitative Auswertung des Immunoblots wurde die Lumineszenz computergestützt mit dem Immunoblot-Imager ChemiLux 2005 detektiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software QuantityOne.

3.8 Zellkultur

3.8.1 Kultivierung der Zellen

Das Arbeiten mit den verschiedenen Zelllinien erfolgte stets unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank. Es wurden autoklavierte Materialien und Lösungen verwendet. Mit Zellen kontaminierte Materialien und Lösungen wurden gesondert entsorgt. Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C , 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 kultiviert. Alle Medien und Lösungen zur Behandlung der Zellen wurden vor Verwendung auf 37°C erwärmt. Zellen wurde stets dann ausgedünnt, wenn das jeweilige Behältnis konfluent bewachsen war. Alle adhärent wachsenden Zellen mussten dafür vom Untergrund abgelöst werden. Nach dem Absaugen oder Dekantieren des Mediums wurden die Zellen mit 5 ml sterilem PBS vorsichtig

gewaschen, um Zelltrümmer und restliches Medium zu entfernen. Zum Ablösen wurden die Zellen je nach Behältnis mit 3-10 ml Trypsin/EDTA (0,025% Trypsin, 0,01% EDTA in PBS) bedeckt und für maximal fünf Minuten bei 37°C in den Zellkulturschrank gestellt. Das Ablösen konnte mikroskopisch anhand der typischen Abrundung der Zellen kontrolliert werden. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von mindestens der fünffachen Menge FCS-haltigem Mediums abgestoppt. Noch anhaftende Zellen wurden mit scharfem Pipettenstrahl abgespült. Bei serumfreier Inkubation der Zellen wurde die Trypsinwirkung durch zehnfaches Verdünnen entweder mit FCS-freiem Medium oder mit HBSS⁺⁺ (P13) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt und bei 1000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Ein dem Verdünnungsverhältnis entsprechender Anteil dieser Zellsuspension wurde in ein zuvor mit Medium befülltes Kulturbehältnis überführt.

3.8.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Überprüfung der Zellvitalität erfolgte mit der Trypan-Blau-Methode. Dieser Farbstoff dringt nur in tote oder stark geschädigte Zellen ein und färbt sie somit an. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:1 mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Die Zahl der vitalen Zellen wurde durch Zählen der nicht angefärbten Zellen ermittelt.

3.8.3 Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden wie in 3.8.1 beschrieben abgelöst und in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt und bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in wenig Medium resuspendiert und die Zellen anschließend gezählt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in kaltem 80/20-10-Medium + 10 % DMSO auf eine Konzentration von 3×10^6 – 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und in Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte stufenweise. Nach zweistündigem Einfrieren bei -20°C wurden die Zellen anschließend für ein bis zwei Tage bei -80°C und dann dauerhaft bei -150°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Sollten die tiefgefrorenen Zellen wieder in Kultur genommen werden, so wurden die in den Kryokonservierungsröhrchen befindlichen Zellen bei 37°C im Wasserbad rasch aufgetaut. Die Zellsuspension wurde aus dem Kryoröhrchen entnommen und in ein 50-ml-Falconröhrchen mit 20 ml kaltem Medium überführt. Um das DMSO zu entfernen, wurden die Zellen nun bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand anschließend abgesaugt. Das Pellet wurde in 20 ml Medium resuspendiert und die Zellen in 24-Lochplatten propagiert.

3.9 Durchflusszytometrie (FACS)

3.9.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der qualitativen und quantitativen Analyse einer Zellsuspension unbekannter Zusammensetzung. Die Methode basiert auf der Messung von optischen Signalen, die von einer Zelle beim Passieren eines Laserstrahls erzeugt werden. Es ist dabei essentiell, dass jede Zelle einzeln vom Laser erfasst wird. Erreicht wird dies durch hydrodynamische Fokussierung. Die Zellsuspension wird dabei durch eine Stahlkapillare in eine Flusskammer überführt und dort in den Strom einer partikelfreien Ummantelungsflüssigkeit injiziert. Die Zellen gelangen von dort in die Messküvette. Dabei nimmt der Durchmesser des Stroms kontinuierlich auf bis zu 10 µm ab, so dass bei der Passage des Laserstrahls die Zellen einzeln und hintereinander angeordnet sind. Verschiedene Sensoren detektieren das durch die Zellen erzeugte Streulicht. Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum Laserstrahl erfasste Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns). Das System kann zudem die Emission von Fluoreszenzsignalen messen. Man nutzt diese Funktion meist zur Untersuchung von Oberflächeneigenschaften der Zellen und erweitert die Methode damit zum *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS). Man inkubiert dabei die Zellen vor der eigentlichen Messung mit Antikörpern, die gegen Oberflächenantigene gerichtet sind. Diese Antikörper sind entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert oder können mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Es stehen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) deckt das grüne Spektrum ab, Phycoerythrin (PE) emittiert im roten Bereich.

3.9.2 Nachweis von C3-Spaltprodukten auf Zelloberflächen

In der vorliegenden Arbeit wurden die C3-Spaltprodukte C3b, iC3b und C3dg auf RBL-Zellen mittels FACS nachgewiesen, nachdem diese in Serum inkubiert worden waren. Der Nachweis erfolgte mit unkonjugierten monoklonalen Primärantikörpern und FITC-konjugierten Sekundärantikörpern (Tab. 3.12). Die Färbung der Zellen wurde in Rundboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zuvor in FACS-Puffer (P9) gewaschen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots von 100 µl auf der Platte verteilt. Nach Zentrifugation der Platte bei 1000 x g für zwei Minuten konnte der Überstand vorsichtig dekantiert werden. Alle Inkubationsschritte erfolgten in FACS-Puffer (P9) und einem Volumen von 100 µl pro Napf auf Eis und lichtgeschützt. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die Platte zweimal mit 200 µl FACS-Puffer (P9) pro Napf gewaschen. Nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern schlossen sich stets drei Waschschriffe an, bevor die Zellen in 200 µl

FACS-Puffer (P9) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt wurden. Zusätzlicher FACS-Puffer (P9) konnte dann zur Erhöhung des Probenvolumens addiert werden. Die Messung der Proben erfolgte mit dem Gerät BD FACS Calibur und die Auswertung mit der Software Cellquest.

Nachgewiesenes Antigen	Primärantikörper	Sekundärnachweis
C3b / iC3b / C3dg (α -Kette)	B3/6 [10 μ g/ml], 1 h	FITC-konj. Ziege anti-Maus-Ig 1:1000, 1 h
C3b / iC3b (β -Kette)	I3/15 [10 μ g/ml], 1 h	FITC-konj. Ziege anti-Maus-Ig 1:1000, 1 h

Tab. 3.12 Nachweis von C3-Spaltprodukten auf Zelloberflächen.

3.9.3 Bindung von biotinyliertem Faktor H auf Zellen

FH bindet über negativ geladene Sialinsäuren spezifisch auf Zelloberflächen. Inkubiert man Zellen mit FH im Rahmen einer FACS-Färbung, lässt sich seine Bindung an Zellen quantifizieren. Da Zellen in der Regel in FCS-haltigem Medium kultiviert werden, können beim Nachweis Kreuzreaktivitäten mit FH aus dem FCS auftreten. Dies kann durch Verwendung von biotinyliertem FH vermieden werden. Der humane FH-biot. kann dann mit Streptavidin-PE spezifisch detektiert werden.

Die Inkubation der Zellen mit FH-biot. und dessen Nachweis erfolgte weitgehend analog zu dem in 3.8.1 beschriebenen Vorgehen. So wurde der Versuch ebenfalls in einer Rundbodenplatte durchgeführt. Alle Inkubationsschritte erfolgten in FACS-Puffer (P9) und einem Volumen von 100 μ l pro Ansatz. Zunächst wurden die Zellen für eine Stunde auf Eis mit FH-biot. inkubiert. Hierzu wurde FH-biot. in FACS-Puffer (P9) auf verschiedene Konzentrationen verdünnt. Nach zweimaligem Waschen mit 200 μ l FACS-Puffer (P9) erfolgte der Nachweis mit Streptavidin-PE in einer Verdünnung von 1:1000 für 45 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Ansätze dreimal gewaschen und wie in 3.8.1 beschrieben für die Messung in FACS-Röhrchen überführt.

3.9.4 Bindung von nativem Faktor H auf Zellen

Möchte man die Bindung von nativem FH auf Zellen untersuchen, ist eine vorausgehende serumfreie Kultivierung der Zellen notwendig, um Kreuzreaktivitäten beim Nachweis zu verhindern. Das zellgebundene Protein kann dann mit einem Antikörper nachgewiesen werden. Da die FH-Bindung auf Zellen schwach ist und bevorzugt bei niedriger Salzkonzentration erfolgt, empfiehlt sich die Verwendung eines Puffers mit geringer Ionenstärke, z.B. 0,5 x PBS (P23, Manuelian et al. 2003, Jokiranta et al. 2005, Józsi et al. 2006)

Für die Inkubation mit FH wurden die Zellen wie in 3.8.1 beschrieben in eine Rundboden-Mikrotiterplatte überführt. Die Bindung erfolgte in einem Volumen von 100 µl Ansatz bei 37°C für 30 Minuten. Hierfür wurde FH in 0,5 x PBS (P23) auf eine Konzentration von 100 µg/ml eingestellt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 200 µl 0,5 x PBS (P23) pro Napf gewaschen. Die nachfolgenden Nachweisschritte sowie die Messung erfolgten wie in 3.8.1 beschrieben. Allerdings wurde bei allen Inkubations- und Waschschritten der FACS-Puffer (P9) 1:2 verdünnt in 0,5 x PBS (P23) verwendet. Für den Primärnachweis wurde Ziege-anti-FH-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Der Sekundärnachweis erfolgte mit Esel-anti-Ziegen-IgG-Antiserum in einer Verdünnung von 1:100.

3.10 Methoden zur Charakterisierung der Cofaktor-Aktivität von Faktor H

3.10.1 Cofaktor-Aktivität in der flüssigen Phase

Die C3b-Degradation wird von der Serumprotease Faktor I katalysiert. Das Enzym kann seine Funktion nur in Anwesenheit eines Cofaktors ausführen. FH ist der wichtigste Cofaktor von Faktor I in der flüssigen Phase. Das Zusammenwirken von Faktor I und FH kann durch Inkubation der beiden Proteine mit aufgereinigtem C3b untersucht werden. Die dabei gebildeten C3b-Spaltprodukte können durch Elektrophorese aufgetrennt und mittels Immunoblotting nachgewiesen werden.

Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl pro Ansatz bei 37°C im Wasserbad. Alle Reagenzien wurden hierfür in Phosphatpuffer (P26) verdünnt. Je nach Fragestellung variierte die eingesetzte FH-Konzentration. Die Endkonzentration von C3b betrug stets 150 µg/ml, die von Faktor I 5 µg/ml. Die beiden Proteine wurden dabei in doppelter Konzentration zu einem Mastermix vereinigt. Ebenfalls wurde FH in doppelter Endkonzentration separat vorverdünnt. Zu je 10 µl des Mastermixes wurden 10 µl FH gegeben und die Reaktion dadurch gestartet. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 20 µl Laemmli-Probenpuffer mit 10 % Mercaptoethanol (P30) und anschließendem fünfminütigen Kochen der Probe bei 99°C. Je 30 µl Probe wurden auf ein 10%iges Laemmliigel aufgetragen.

3.10.2 Cofaktor-Aktivität auf Zelloberflächen

Nicht humane Zellen sind gegenüber Komplement empfindlich. Somit ist eine Beladung von RBL-Zellen mit C3b durch Inkubation in humanem Serum möglich. Neben membranständigen Cofaktoren kann auch FH die Spaltung von zellgebundenem C3b unterstützen. Durch Behandlung der C3b-beladenen Zellen mit Faktor I und FH und anschließender durchflusszytometrischer Analyse kann die Cofaktor-Aktivität auf Zelloberflächen quantifiziert werden.

Wie in 3.8.1 beschrieben, wurden die RBL-Zellen abgelöst und in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS⁺⁺ (P13) wurden die Zellen auf eine Konzentration von mindestens 5×10^6 /ml in HBSS⁺⁺ (P13) eingestellt. Diese Zellsuspension wurde mit humanem Serum in einer Endverdünnung von 1:10 in HBSS⁺⁺ (P13) bei 37°C im Wasserbad für fünf Minuten inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch eine 1:3 Verdünnung der Serum/Zellsuspension mit HBSS/EDTA (P14). Nach Zentrifugation bei $1000 \times g$ für 5 min konnte der Überstand vorsichtig entfernt werden. Es schloss sich das zweimalige Waschen mit HBSS⁺⁺ (P13) an, woraufhin die Zellen im halben Volumen der Ausgangssuspension in HBSS⁺⁺ (P13) aufgenommen wurden. 200- μ l-Aliquots wurden in Eppendorf-Cups überführt und bei $1000 \times g$ für fünf Minuten zentrifugiert, um den Überstand entfernen zu können. Es folgte die Inkubation der C3b-beladenen Zellen mit Faktor I und FH in einem Endvolumen von 20 μ l bei 37°C im Thermomixer. Der Reaktionspuffer war erneut HBSS⁺⁺ (P13). Die Faktor-I-Endkonzentration betrug stets 20 μ g/ml. Die eingesetzten FH-Konzentrationen variierten. Die beiden Proteine wurden entsprechend in HBSS⁺⁺ (P13) vorverdünnt. Die Zellen wurden dann in 10 μ l des verdünnten FH resuspendiert. Das Starten der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10 μ l Faktor I. Durch vorsichtiges Aufmischen alle zehn Minuten wurden die Zellen in Suspension gehalten. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml FACS-Puffer (P9). Um C3b-Spaltprodukte im Immunoblot nachweisen zu können, wurde von einigen Ansätzen zuvor Überstand gewonnen. Nach dem Abstoppen wurden die Proben erneut bei $1000 \times g$ für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer (P9) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben wie in 3.8.1 beschrieben für die FACS-Analyse vorbereitet.

3.11 Komplementaktivierung in Serum

Zur Charakterisierung der regulatorischen Eigenschaften von FH wurde dessen Einfluss auf die Bildung von verschiedenen Komplementaktivierungsprodukten in Serum untersucht. Hierzu wurde eine Aktivierung speziell des alternativen Weges in Serum provoziert. Dabei kamen sowohl unmodifizierte Seren wie auch Δ FH-Serum zur Anwendung. Bei der Benutzung von Δ FH-Serum wurde aufgereinigter FH zuvor resubstituiert. Die Resubstitution von FH in Konzentrationen unterhalb des physiologischen Bereichs erlaubte eine Aktivierung des Serums durch spontanen Komplementumsatz. Wurden physiologische FH-Konzentrationen gewählt oder unmodifizierte Seren verwendet, so musste die Komplementkaskade durch den Aktivator Zymosan in Gang gesetzt werden. Der Verstärkungseffekt der Konvertasen ermöglicht eine Komplementaktivierung bei physiologischen FH-Konzentrationen. Der alternative Weg der Komplementaktivierung benötigt vor allem die Anwesenheit von Magnesiumionen. Befindet sich das Zymosan in einer magnesiumhaltigen Suspension,

die zusätzlich den spezifischen Ca^{2+} -Chelator EGTA enthält, erfolgt der Komplementumsatz bevorzugt über den alternativen Weg.

Die Aktivierung aller Seren erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Bei der Verwendung von Zymosan musste darauf geachtet werden, dass die Partikel sich stets in Suspension befanden. Um dies zu gewährleisten, wurde ein Mindestvolumen von 50 µl pro Ansatz gewählt und die Proben alle fünf Minuten aufgemischt. Die Aktivierung von unmodifizierten Seren erfolgte in der Anwesenheit von Zymosan. Für die Ba-Generierung wurde eine Zymosanendkonzentration von 0,5 mg/ml eingesetzt, für die C3dg-Generierung eine Konzentration von 10 mg/ml. Hierzu wurden die Zymosanpartikel zuerst in einem Vielfachen der Endkonzentration in Mg-EGTA (P21) suspendiert. Für die Ba-Generierung wurde diese Suspension dem Serum in einem Verhältnis von 1:9 (Serumverdünnung 1:1,11), für die C3dg-Generierung in einem Verhältnis von 1:3 (Serumverdünnung 1:1,33) hinzugefügt und dadurch die Komplementaktivierung gestartet.

Die Aktivierung von ΔFH -Serum erfolgte weitgehend analog. Die Verwendung eines solchen Serums machte allerdings eine vorausgehende FH-Resubstitution notwendig. Hierfür wurde FH auf ein entsprechend Vielfaches der eingesetzten Endkonzentration in PBS (P23) vorverdünnt und in einem möglichst geringen Volumen dem Serum hinzugefügt. Da das ΔFH -Serum zur FH-Depletion mit 2 mM EDTA versetzt wurde, mussten zur Aktivierung ebenso die zweiwertigen Kationen resubstituiert werden. Erfolgte die Aktivierung bei physiologischen FH-Konzentrationen, wurden deshalb der Zymosansuspension je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} zugefügt. Wurde mit subphysiologischen FH-Konzentrationen gearbeitet, fand eine Komplementaktivierung bereits ohne Zymosan statt. Zum Starten der Reaktion wurden in diesem Fall lediglich Ca^{2+} und Mg^{2+} in einem entsprechenden Volumen resubstituiert. Die durch die FH-Resubstitution verursachte Verdünnung des Serums, sowie die Verdünnung durch Zymosan- und/oder Kationenzugabe mussten bei der Bestimmung der Komplementaktivierungsprodukte berücksichtigt werden. Zum Abstoppen der Reaktion wurde jeder Ansatz weiterhin mit 0,2 M EDTA 1:2 verdünnt und auf Eis gestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Genotypisierung der FH-Spender

4.1.1 Bestimmung des FH-Y402H-Genotyps

Der Y402H-Polymorphismus ist in Exon 9 des Faktor-H-Gens (*HF1*) lokalisiert. *HF1* ist Teil eines Clusters von komplementregulatorischen Genen, die Homologieraten zwischen 85% und 97 % aufweisen. So befinden sich im Gen für *Factor-H-related-Protein-3* (*FHR-3*) nahezu identische Duplikationen der Exons 8 und 9 von *HF1* (Rodríguez de Córdoba et al. 2004). Um eine Kontamination des Amplifikats mit diesen Kopien zu vermeiden, wurde für die Untersuchung des Y402H-Polymorphismus eine *Nested-PCR*-Strategie angewandt (Abb. 4.1). Dabei wurden in einer ersten PCR die Exons 8 und 9 von *HF1* amplifiziert. Von diesem 1321 Bp umfassenden PCR-Produkt als Matrize ausgehend, erfolgte die Amplifikation eines 188 Bp großen Fragments, das die ersten 130 Bp von Exon 9 enthielt. Dieses Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym *NlaIII* gespalten. Der Y402H-Polymorphismus wird durch einen Austausch von Thymidin gegen Cytidin an Position 105 des *Nested-PCR*-Produkts hervorgerufen. Das Restriktionsenzym *NlaIII* erkennt die an Position 105 beginnende Sequenz CATG. *NlaIII* schneidet also nur, wenn das C-Allel vorliegt. Die entstehenden Fragmente sind 105 bzw. 83 Bp lang. Bei Vorliegen des T-Allels wird das 188-Bp-PCR-Amplifikat nicht von *NlaIII* gespalten.

DNA wurde wie in 3.1.1 (S. 27) beschrieben aus Vollblut gesunder Spender aufgereinigt. Anschließend wurde die in 3.1.2 (S. 27) erläuterte PCR durchgeführt. 5 µl des PCR-Produkts wurden mit dem Restriktionsenzym *NlaIII* über Nacht inkubiert (3.1.3, S. 29). Der gesamte Restriktionsansatz wurde auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen, die entstandenen Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht (3.1.4, S. 29).

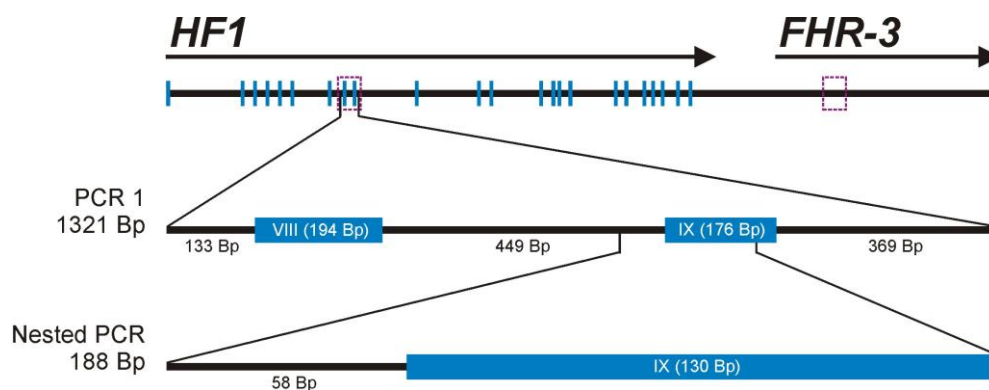


Abb. 4.1 PCR-Strategie zur Amplifizierung von Exon 9 des *HF1*-Gens. Von genomischer DNA als Matrize ausgehend wurde mit dem Primerpaar CFH_Vor_f/r in einer ersten PCR ein 1321 Bp großes Fragment amplifiziert, das die Exons 8 und 9 des *HF1*-Gens umfasste. Das Amplifikat diente wiederum als Matrize für eine zweite PCR mit den Primern CFH_f1/r1. Das PCR-Produkt war 188 Bp groß und beinhaltete 130 Bp von Exon 9.

In Abbildung 4.2 sind exemplarisch die Restriktionspaltprodukte für drei Spender unterschiedlichen Genotyps dargestellt. Beim Spender TT war *NlaIII* nicht in der Lage, das 188 Bp große PCR-Produkt zu schneiden. Folglich lag Thymidin an Position 105 des Amplifikats in homozygoter Form vor. Beim Spender CC wurde das 188-Bp-Fragment vollständig in zwei Fragmente von 105 Bp bzw. 83 Bp gespalten. Somit erkannte *NlaIII* eine Schnittstelle, welches als Hinweis auf das Vorliegen eines Cytidins in homozygoter Form gewertet werden konnte. Ein heterozygoter Spender ist in der Mitte dargestellt. Dieser Genotyp wurde durch eine inkomplette Spaltung des 188-Bp-Fragments angezeigt. Da das Codon TAT Tyrosin codiert, sind Spender mit dem Genotyp TT homozygot für FH-402Y. Das Codon CAT codiert dagegen für Histidin, somit sind die CC-Spender homozygot für FH-402H. Da FH-402Y bei gesunden Kaukasiern weit häufiger nachgewiesen wird als FH-402H, wird erster auch als „Wildtyp“-Variante bezeichnet.

4.1.2 Bestimmung des I62V- und des D936E-Genotyps

Bei denjenigen Blut-Spendern, die homozygot für FH-402Y oder FH-402H waren, wurden zusätzlich der I62V- und der D936E-Genotyp mittels DNA-Sequenzierung bestimmt (3.1.5, S. 30). Der I62V-Polymorphismus kommt durch den Austausch von Adenosin gegen Guanosin in Position 292 von *HF1* zustande. Beim D936E-Polymorphismus wird Guanosin in Position 916 durch Thymidin ersetzt. Unter Einsatz derselben Methode wurde der FH-402Y/H Genotyp für ausgewählte Spender verifiziert. Abbildung 4.3 zeigt links in exemplarischer Weise die Sequenzierungsdaten in den jeweils identischen DNA-Abschnitten im Original und rechts die Genotypen-Verteilung.

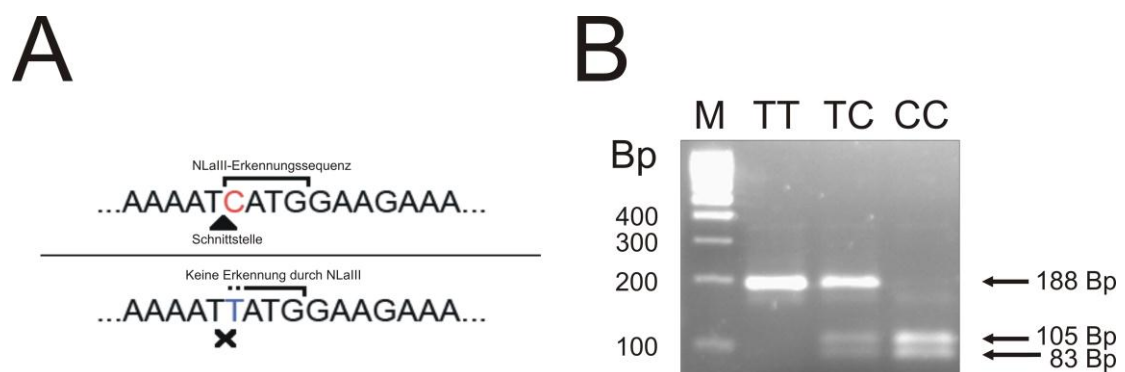


Abb. 4.2 Bestimmung des Y402H-Genotyps mit Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus. **A** *NlaIII* erkennt die Basenabfolge CATG und setzt somit nur bei Vorliegen des C-Allels einen Doppelstrangbruch. **B** Von genomischer DNA als Matrize ausgehend wurde in einer ersten PCR (Primerpaar CFH_Vor_f/r) ein 1321 Bp großes DNA-Fragment amplifiziert, das als Matrize für eine weitere PCR diente (Primerpaar CFH_f1/r1). 5 µl des 188 Bp umfassenden PCR-Produktes wurden über Nacht bei 37°C mit *NLaIII* inkubiert und der Ansatz anschließend mit Ethidiumbromid versetzt. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und unter UV-Licht detektiert. Dargestellt sind Restriktionsfragmente für drei Spender unterschiedlichen Genotyps (TT/TC/CC); M, Molekulargewichtsmarker.

Es fällt auf, dass alle FH-402H-Spender identische I62V- und D936E-Genotypen aufweisen. Sie sind alle homozygot für Valin in Position 62 und für Glutaminsäure in Position 936 des FH-Proteins. Spender, die den FH-402Y-„Wildtyp“ in homozygoter Form exprimieren, zeigen dagegen an den Positionen 62 und 936 ausgeprägte Variabilität. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Genotypen der einzelnen Spender.

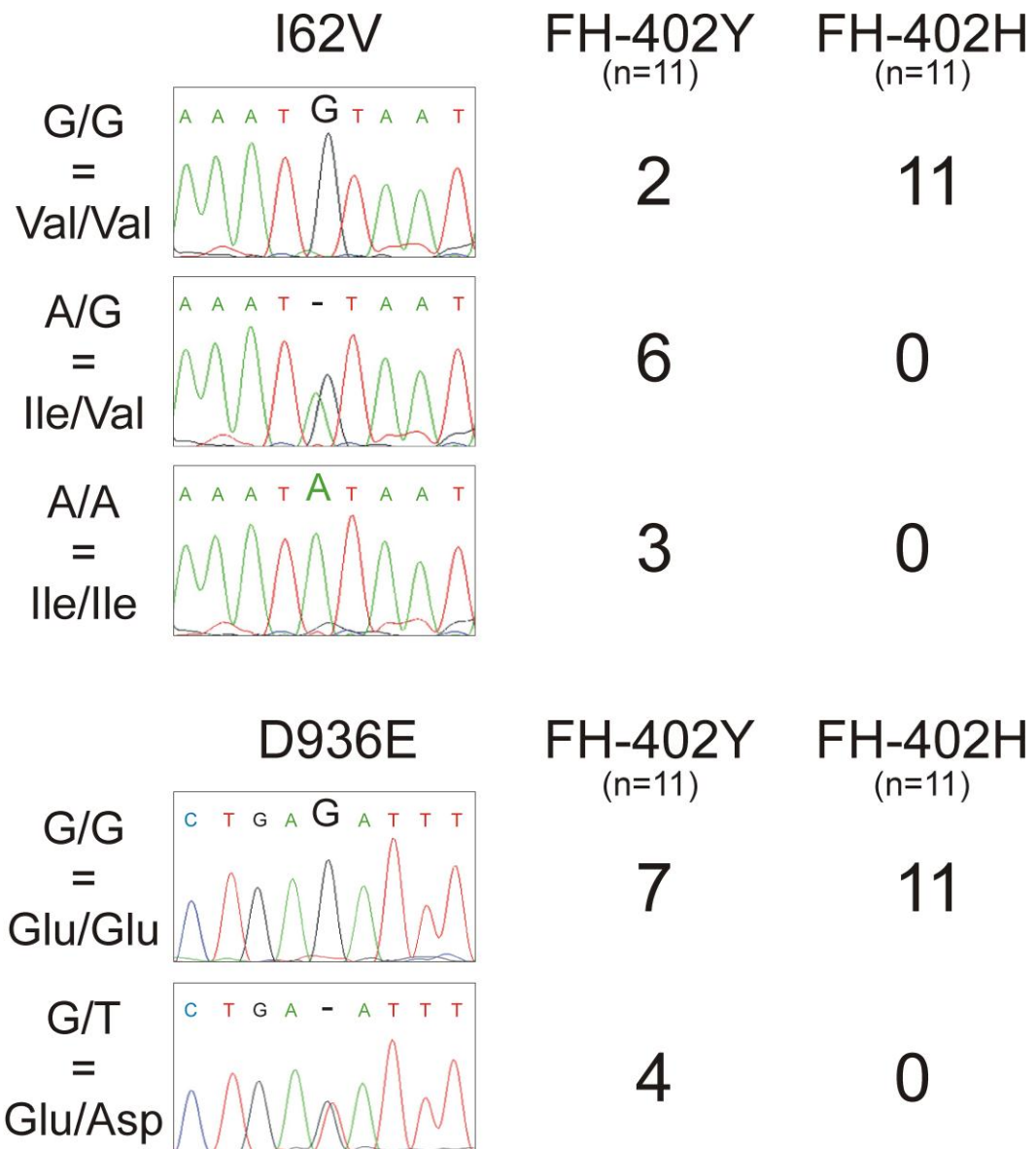


Abb. 4.3 DNA-Sequenzierung zur Bestimmung des I62V- und des D936E-Genotyps. 2 µl genomische DNA wurden in der Sequenzierungs-PCR eingesetzt. Dabei wurde zur Bestimmung des I62V-Genotyps (A) der Primer 5'-CCTGTGACTGTCTAGGCATTTT-3' und zur Bestimmung des D936E-Genotyps (B) der Primer 5'-GGTACCACTTACACTTTGAATGAAGA-3' eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde über Sephadex G50 superfine gereinigt und anschließend im Mehrkanal-*Sequencer* sequenziert. Es wurden insgesamt 11 homozygote FH-402Y und 11 FH-402H Spender genotypisiert.

Spender	Genotyp: Aminosäure (Nukleotid)		
	Val62Ile rs800292	Tyr402His rs1061170	Glu936Asp rs1065489
Y ₁	Val/Ile (G/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Glu (G/G)
Y ₂	Ile/Ile (A/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Glu (G/G)
Y ₃	Val/Ile (G/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Glu (G/G)
Y ₄	Val/Ile (G/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Asp (G/T)
Y ₅	Ile/Ile (A/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Glu (G/G)
Y ₆	Val/Val (G/G)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Asp (G/T)
Y ₇	Val/Val (G/G)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Asp (G/T)
Y ₈	Ile/Ile (A/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Glu (G/G)
Y ₉	Val/Ile (G/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Glu (G/G)
Y ₁₀	Val/Ile (G/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Asp (G/T)
Y ₁₁	Val/Ile (G/A)	Tyr/Tyr (T/T)	Glu/Glu (G/G)
H ₁	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₂	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₃	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₄	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₅	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₆	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₇	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₈	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₉	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₁₀	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)
H ₁₁	Val/Val (G/G)	His/His (C/C)	Glu/Glu (G/G)

Tab. 4.1 Genotypen-Verteilung der FH-Spender

4.2 Aufreinigung und Weiterverarbeitung von Faktor H

4.2.1 Herstellung reiner FH-Präparate aus dem Plasma genotypisierter Spender

FH wurde mittels anti-FH-Sepharose immunaffinitätschromatographisch aus dem Plasma derjenigen Blutspender aufgereinigt und konzentriert, die homozygot FH-402Y oder FH-402H waren (3.2.2, S. 35). Die Proteinkonzentration in diesen reinen FH-Präparationen wurde spektrometrisch bestimmt (3.3, S. 35) und ihre Reinheit mittels SDS-Page überprüft. 10 µg aufgereinigter FH und 1 µl Plasma des dazugehörigen Spenders wurden jeweils in eine Tasche eines SDS-Gradientengels appliziert. Zusätzlich wurden 10 µg einer FH-Referenzpräparation auf das Gel aufgetragen (3.7.1, S. 48). Nach der elektrophoretischen Auftrennung unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurden die Proteinbanden auf dem Gradientengel mit Coomassie-Blau angefärbt (3.7.2, S. 50).

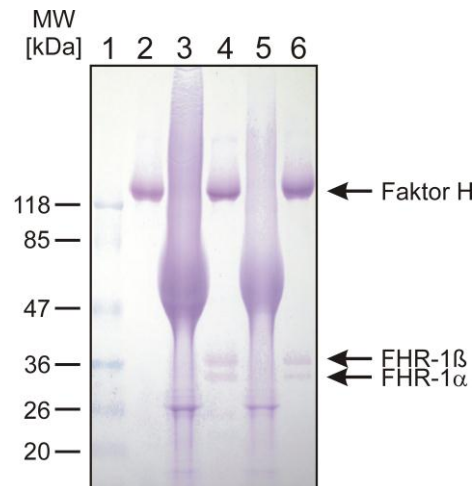


Abb. 4.4 Aufreinigung von FH-402Y und FH-402H aus Plasma. FH wurde mittels Immunaффinitätschromatographie aus dem Plasma von Blutspendern aufgereinigt, die entweder homozygot für FH-402Y oder FH-402H waren. Plasma (1 μ l) und aufgereinigter FH (10 μ g) je eines FH-402Y- und eines FH-402H-Spenders wurden auf ein SDS-Gradientengel aufgetragen, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. **1**, Molekulargewichtsmarker; **2**, FH-Standard; **3**, Plasma FH-402H; **4**, aufgereinigter FH-402H; **5**, Plasma FH-402Y; **6**, aufgereinigter FH-402Y.

In Abbildung 4.4 ist der Aufreinigungserfolg dargestellt. Im Ausgangsmaterial ist FH nicht von den anderen Plasmaproteinen abgrenzbar. Nach der erfolgten Aufreinigung lässt sich sowohl FH-402Y und FH-402H als 150-kDa-Bande in hoher Reinheit darstellen. In den immunaффinitätschromatographisch aufgereinigten Präparaten lassen sich zusätzlich zwei schwache Banden auf Höhe des 36-kDa-Markers nachweisen. Diese Kontamination ist sowohl in den FH-402Y- / als auch in den FH-402H-Präparaten in gleicher Menge enthalten. Es handelt sich um die beiden Formen des *Factor-H-related-protein-1* (FHR-1), die sich durch die Anzahl ihrer Carbohydrat-Seitenketten unterscheiden und im normalen Plasma in geringer Menge vorhanden sind. FHR-1 α (37 kD) besitzt eine, FHR-1 β (43 kD) zwei dieser Seitenketten (Zipfel et al. 2002). FHR-1 α und FHR-1 β tragen ebenso wie FH das Epitop DITSFPLSVYAP und werden deshalb von dem anti-FH-mAk L20/3 erkannt, mit dem die Immunaффinitätschromatographie erfolgte (Oppermann et al. 2006). Auf eine Abtragung dieser nur in geringen Mengen (< 10%) nachweisbaren Kontaminanten wurde verzichtet.

4.2.2 Biotinylierung von Faktor H

Wie in 3.2.2 (S. 33) beschrieben, wurden die FH-Präparate mehrerer Einzelspender zu variantenspezifischen Proteinpools vereinigt. Beide Proteinpools (FH-402Y und FH-402H) wurden mit EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin konjugiert. Anschließend wurde der Biotinylierungsgrad photometrisch ermittelt (3.4, S 35). Demnach wurde FH-402Y mit einem 2,19-fachen molaren Überschuss an Biotin konjugiert, für FH-402H betrug das molare Verhältnis 1:2,26.

4.3 Charakterisierung der monoklonalen anti-FH402Y/H-Antikörper

4.3.1 Überprüfung des Immunisierungserfolges

Jeweils drei Balb/c-Mäuse wurden entweder mit dem an das Hämocyanin der Napflohschnecke (KLH) konjugierten Peptid C-Ahx-LENGYNQNYGRKFVQG oder mit dem KLH-konjugierten Peptid C-Ahx-LENGYNQNHGRKFVQG nach dem in 3.5.2 (S. 37) beschriebenen Schema immunisiert. Zur Überprüfung des Immunisierungserfolges wurde unmittelbar vor der Fusion der spezifische Antikörper-Titer mit dem anti-Peptid-Ig-ELISA bestimmt (3.6.3, S. 46). Als Referenz wurden die Antikörper-Titer im Serum einer nicht-immunisierten Maus gemessen. Bis zu einer maximalen Verdünnung von 1:12.800 war im Serum aller immunisierten Mäuse stets ein im Vergleich zur Kontrolle signifikant höheres deutliches ELISA-Signal detektierbar.

4.3.2 Bestimmung der Antigenspezifität mittels Immunoblot

Nach der Fusion der Milzzellen der getöteten Mäuse (3.5.5, S. 39) mit der Myelomzelllinie Ag8 wurden die Hybridome eine Woche lang einer HAT-Selektion unterzogen und die Kulturüberstände anschließend auf die Anwesenheit FH-Peptid-spezifischer Immunglobuline im ELISA getestet (3.5.6, S. 40). Nach der Vereinzelnung positiver Hybridomklone (3.5.7, S. 41) wurden Zellkulturüberstände auf Antigenspezifität mittels Immunoblot analysiert. Hierzu wurden 0,4 µl Plasma und 0,25 µg aufgereinigter FH von jeweils einem FH-402Y- und einem FH-402H-Spender unter nicht reduzierenden Bedingungen auf ein SDS-Gradientengel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Trennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und über Nacht mit Hybridom-Kulturüberständen inkubiert, die ELISA-Reaktivität (FH-Peptid und Protein) für FH-402Y oder FH-402H zeigten. Gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase-konjugiertem polyklonales Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin nachgewiesen.

In Abbildung 4.5 ist das Ergebnis der Immunoblot-Analyse dargestellt, wobei 16B3 in exemplarischer Weise für einen FH-402Y-spezifischen Antikörper steht, der Antikörper 16C9 erkennt hingegen das FH-402H-Epitop. Der Immunoblot zeigt, dass die monoklonalen Antikörper in den Kulturüberständen sowohl aufgereinigten FH als auch FH aus Plasma auf der Nitrocellulose spezifisch binden konnten. Dabei detektierten Antikörper mit Spezifität für Tyr402 ausschließlich FH-Präparate von FH-402Y-Spendern, nicht aber FH-402H. Antikörper mit Spezifität für His402 banden entsprechend nur an FH-402H und zeigten keine Kreuzreaktion mit FH-402Y. Der Überstand des Klons 16C9 (anti-His) wies lediglich geringe Kreuzreaktivitäten mit anderen Plasmaproteinen auf. Insgesamt wurden zehn Hybridome mit Spezifität für FH-402Y und sieben Hybridome mit Spezifität für FH-402H generiert (Tab. 4.2).

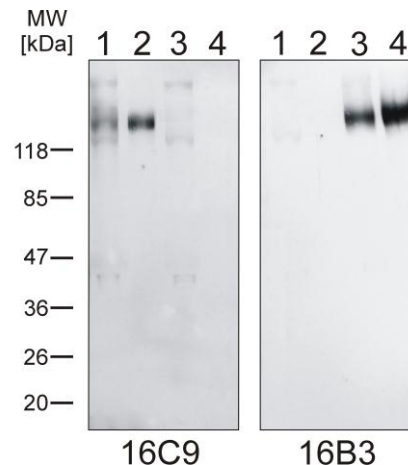


Abb. 4.5 Charakterisierung FH-Varianten-spezifischer monoklonaler Antikörper mittels Immunoblot. 1 μ l Plasma und 0,5 μ g aufgereinigter Faktor H von jeweils FH-402Y-/ FH-402H-homozygoten Spendern wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein SDS-Gradientengel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht entweder mit Kulturüberständen des Hybridomklons 16C9 (anti-FH-402H) oder des Klons 16B3 (anti-FH-402Y) inkubiert. Gebundener Antikörper wurde mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin markiert und mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. **1**, 1 μ l Plasma FH-402H; **2**, 0,5 μ g aufgereinigter FH-402H; **3**, 1 μ l Plasma FH-402Y; **4**, 0,5 μ g FH-402-Y.

4.3.3 Bestimmung der Antigen-spezifität im ELISA

Hybridome, die auch im Immunoblot eine hohe Antigen-spezifität aufwiesen, wurden weiter propagiert und schließlich zur Antikörper-Massenproduktion in den MiniPerm Bioreaktor überführt (3.5.8, S 41). Die Immunglobuline wurden über Protein-G-Affinitätschromatographie aus den Überständen des Produktionsmoduls in reiner Form isoliert (3.2.4, S. 34). Die Antigen-spezifität der aufgereinigten Antikörper wurde nochmals im direkten ELISA überprüft (3.6.3, S. 46). Dabei wurden die ELISA-Platten mit 200 ng/ml Peptid Y bzw. Peptid H, sowie mit den nativen Proteinen (FH-402Y bzw. FH-402H) beschichtet. Aufgereinigte Antikörper mit Spezifität für FH-402Y bzw. FH-402H wurden in die Näpfe in Konzentrationen von 0-20 μ g/ml titriert. Gebundene Antikörper wurden mit Peroxidase-konjugiertem polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin nachgewiesen.

Die konzentrationsabhängige Bindung der Antikörper 16B3 (anti-FH-402Y) und 16C9 (anti-FH-402H) an ihr Antigen ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass beide Antikörper ihr spezifisches Epitop sowohl auf dem Peptid als auch auf dem Protein erkannten. Dabei waren kaum Reaktionen mit der jeweils anderen Variante des Epitops zu beobachten. Lediglich der mAk 16B3 (anti-FH-402Y) zeigte eine leichte Kreuzreaktion mit Peptid H, die jedoch etwa um den Faktor 20 schwächer war als die Bindung an Peptid Y.

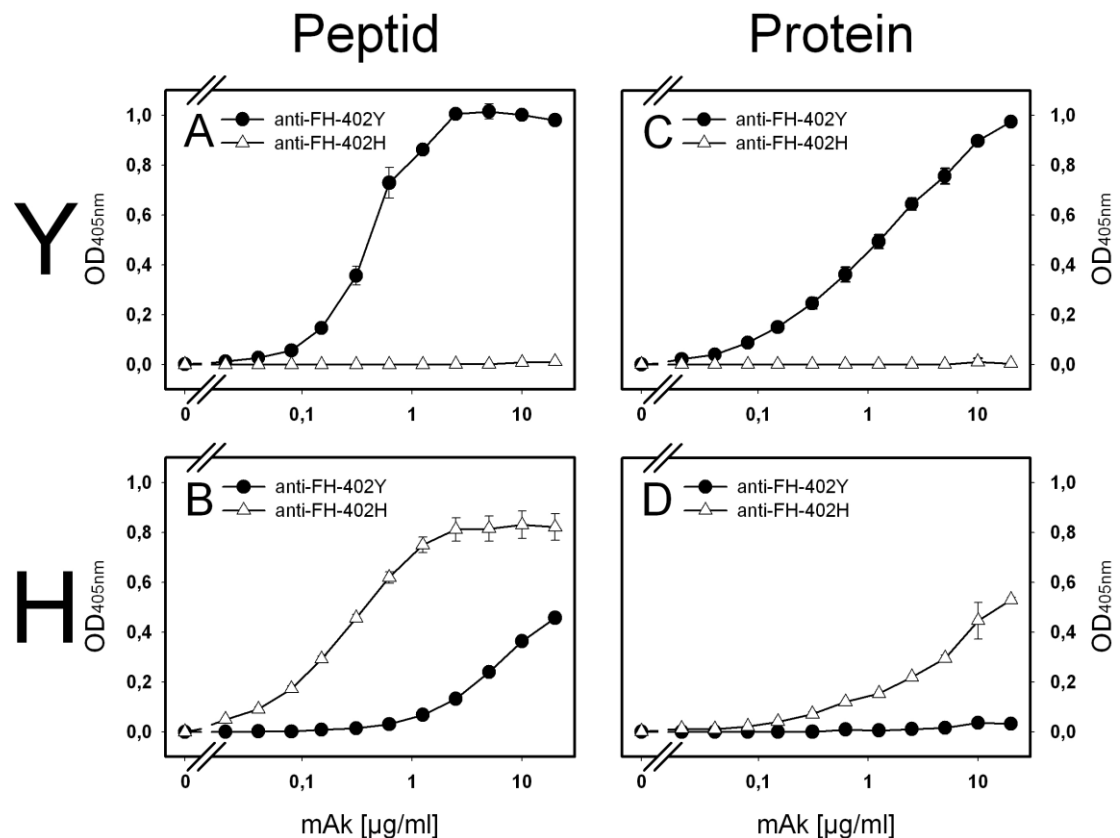


Abb. 4.6 Charakterisierung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für FH-402Y bzw. FH-402H mittels ELISA. ELISA-Platten wurden mit 200 ng/ml des Peptids LENGYNQNYGRKRVQG oder des Peptids LENGYNQNHGRKRVQG, sowie mit 10 µg/ml aufgereinigtem FH-402Y oder FH-402H beschichtet. Die beschichteten Platten wurden mit 0-20 µg/ml anti-FH-402Y (16B3) und anti-FH-402H (16C9) inkubiert. Gebundener Antikörper wurde mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin nachgewiesen. Beschichtung: **A**, 200 ng/ml Peptid LENGYNQNYGRKRVQG; **B**, 200 ng/ml Peptid LENGYNQNHGRKRVQG; **C**, 10 µg/ml FH-402Y; **D**, 10 µg/ml FH-402H. (Mittelwerte +/- S.E., n=2).

anti FH-402Y			anti FH-402H		
Klon	Schwere Kette	Leichte Kette	Klon	Schwere Kette	Leichte Kette
16B3	IgG1	Kappa	16C9	IgG1	Kappa
8E10	IgG1	Kappa	23B1	IgM	Kappa
1H10	IgG1	Kappa	23F8	IgG1	Kappa
6A10	IgG1	Kappa	2E12	IgG1	Kappa
8H12	IgG1	Kappa	16C5	IgG2a	Kappa
6A7	IgG2b	Kappa	23F8	IgG1	Kappa
19A7	IgG1	Kappa	11C11	IgG1	Kappa
20D5	IgG1	Kappa			
2A5	IgG1	Kappa			
24G3	IgG1	Kappa			

Tab. 4.2. Immunglobulin-Subklassen der Varianten-spezifischen anti-FH-(SCR7)-mAk

4.3.4 Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse

Die Ig-Subklassifizierung der neu generierten Antikörper wurde mit dem in 3.6.4 (S. 46) beschriebenen kommerziellen ELISA-Kit durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

4.4 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf Bindungseigenschaften von Faktor H

FH erfüllt seine Funktion als komplementregulatorisches Protein durch Interaktion mit einer Vielzahl von Liganden. Zu diesen zählen neben C3b und seinen Abbauprodukten das C-reaktive Protein (CRP) sowie Glycosaminoglycane in der extrazellulären Matrix und auf Zelloberflächen.

4.4.1 Bindung von FH-402Y und FH-402H an C3b und iC3b

Um den Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Bindung von FH an C3b und iC3b zu untersuchen, wurde der in 3.6.5 (S. 47) beschriebene modifizierte ELISA angewandt. Dabei wurden die Näpfe der ELISA-Platte mit 5 µg/ml C3b oder iC3b beschichtet. Diese Näpfe wurden jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur mit gepooltem FH-402Y oder FH-402H in PBS-BSA (0,1%) inkubiert. Es wurden FH-Konzentrationen zwischen 0-20 µg/ml eingesetzt. Der Nachweis von gebundenem FH erfolgte durch Ziege-anti-FH-Antiserum und einem Peroxidase-markierten Esel-anti-Ziege-Antikörperkonjugat.

Abbildung 4.7 A ist zu entnehmen, dass die Bindung von FH an C3b und iC3b konzentrationsabhängig erfolgte. Dabei ist die Affinität von FH zu iC3b geringer als zu C3b. Beide polymorphen FH-Varianten (Proteinpools) banden gleich gut entweder C3b oder iC3b. In Abbildung 4.7 B ist die Bindung von FH-Einzelspender-Präparaten an C3b dargestellt. Hierfür wurden die beschichteten ELISA-Näpfe mit 5 µg/ml aufgereinigtem FH-402Y oder FH-402H von jeweils 7 bzw. 8 Einzelspendern inkubiert. Die Inkubation erfolgte über 1 h bei Raumtemperatur, die Bindung von FH an C3b wurde wie oben beschrieben detektiert. Auch in diesem Versuch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen FH-402Y und FH-402H in der Bindung an C3b festgestellt werden. In Abbildung 4.7 B ist außerdem der I62V-Genotyp der individuellen FH-Spender angegeben (Dreiecke bzw. Kreise). Innerhalb der Gruppe der FH-402Y-Spender hat auch dieser Aminosäureaustausch keinen Einfluss auf die Bindung von FH an C3b.

In einem weiteren Experiment wurden FH-402Y und FH-402H mit einem zehnfachen molaren Überschuss an mAk präinkubiert, die an verschiedene SCR-Domänen auf FH binden. Die Präinkubation erfolgte über 30 min bei Raumtemperatur. Durch die Antikörper-Blockade sollte die mögliche Beteiligung des 402-Epitops auf SCR7 an der

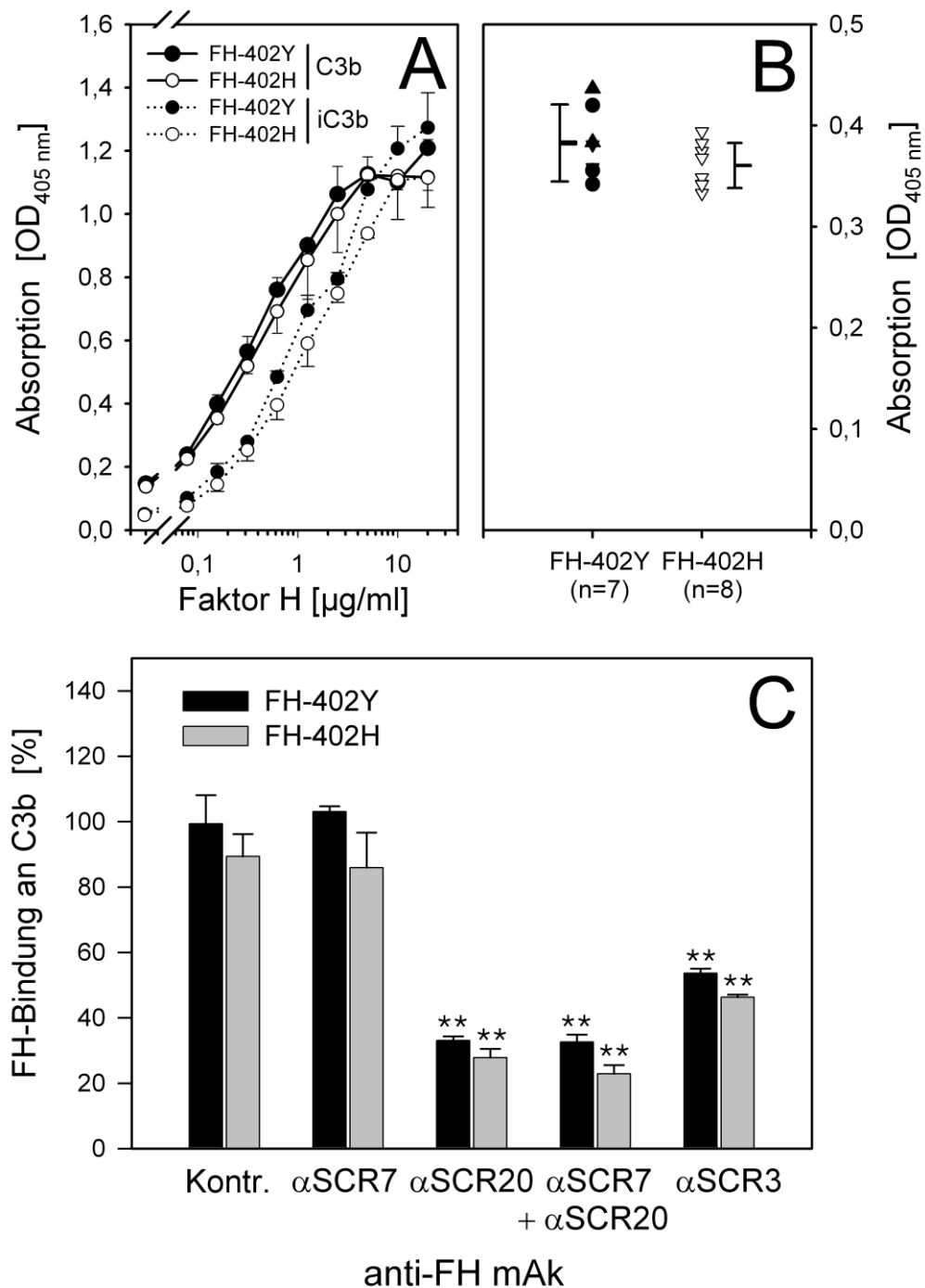


Abb. 4.7 Bindung von FH-402Y und FH-402H an C3b und iC3b. **A**, Bindung von 0-20 µg/ml gepooltem FH-402Y (●) und FH-402H (○) an ELISA-Platten, die mit 5 µg/ml C3b (—) oder iC3b (...) beschichtet wurden. Gebundener FH wurde mit Ziege-anti-FH-Antiserum und Peroxidase-markiertem Esel-anti-Ziegen-Ig nachgewiesen. Es sind die durchschnittlich ermittelten Werte ± Standardabweichung aus 3 Experimenten dargestellt. **B**, Bindung von 5 µg/ml FH von Einzelspendern an C3b. Die Spender sind homozygot für FH-402Y (schwarz) oder FH-402H (weiß). Zusätzlich ist der I62V-Genotyp der einzelnen Spender angegeben: ▲, Ile/Ile; ●, Ile/Val; ▼/▽, Val/Val. **C**, Bindung von 20 µg/ml FH-402Y (schwarze Balken) und FH-402H (graue Balken) an C3b nach Präinkubation mit einem 10fach molaren Überschuss an mAk gegen verschiedene SCR-Domänen auf FH. Kontr. = T13/9; αSCR7 = 16B3 (α402Y) / 16C9 (α402H); αSCR20 = L20/3; αSCR3 = E22/11. Die Bindung von FH an C3b ist als Prozent des für FH-402Y in Abwesenheit von mAk ermittelten Werts angegeben. **, p<0,001.

Bindung von FH an C3b untersucht werden. Für die Blockade von FH-402Y wurde der Tyrosin-spezifische mAk 16B3 benutzt, im Falle von FH-402H der Histidin-spezifische mAk 19C9. Als irrelevanter Kontrollantikörper diente der gegen Schweine-C5a gerichtete mAk T13/9 (IgGVK). Zusätzlich wurden die beiden zuvor in der Arbeitsgruppe hergestellten anti-FH-mAk L20/3 und E22/11 eingesetzt. L20/3 bindet an die C-terminale FH-Domäne SCR20, die antigene Determinante von E22/11 ist die nahe am N-Terminus lokalisierte Domäne SCR3. 20 µg/ml des präinkubierten Faktor H wurden für 1 h in die beschichtete ELISA-Platte gegeben. Der Nachweis von Faktor H erfolgte erneut mit Ziege-anti-FH-Antiserum und einem Peroxidase-markierten Esel-anti-Ziege-Antikörper.

Abbildung 4.7 C ist zu entnehmen, dass die Präinkubation mit L20/3 zu einer Reduktion der C3b-Bindung an FH-402Y / FH-402H auf $33,1 \pm 1,2 \%$ / $27,8 \pm 2,7 \%$ des Wertes in Anwesenheit des Kontrollantikörpers führte. Die Präinkubation von FH-402Y mit anti-SCR3 E22/11 bewirkte eine Reduktion der C3b-Bindung auf $53,6 \pm 1,4 \%$ und die Blockade von FH-402H mit demselben Antikörper eine Reduktion auf einen vergleichbaren Wert ($46,3 \pm 0,8 \%$). Die Blockade des 402-Epitops auf SCR7 führte dagegen zu keiner Beeinträchtigung der C3b-Bindung von FH-402Y oder FH-402H, ebenso wenig konnte sie die den durch L20/3 hervorgerufenen Effekt verstärken (anti-SCR7 + anti-SCR20). SCR7 und speziell die Aminosäure in Position 402 ist demnach nicht unmittelbar an der Interaktion zwischen FH und C3b beteiligt. Der partielle Verlust der FH-Bindung an C3b nach Präinkubation mit L20/3 und E22/11 steht im Einklang mit der zuvor berichteten Lokalisation von C3b-Bindungsstellen auf SCR1-4 und SCR19-20 (Rodríguez de Córdoba et al. 2004).

4.4.2 Bindung von FH-402Y und FH-402H an Heparin

Die Bindung von FH-402Y und FH-402H wurde mit der in 3.6.6 (S. 47) beschriebenen Methode untersucht. Die ELISA-Platten wurden dazu in jedem Versuch mit 1 mg/ml Heparin beschichtet. Um die Bindung der beiden FH-Varianten an Heparin in Abhängigkeit von der FH-Konzentration zu vergleichen, wurden die ELISA-Näpfe mit 0-20 µg/ml der gepoolten FH-402Y- oder FH-402H-Präparate für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wurden Einzelspender-Präparate eingesetzt, so wurde stets eine FH-Konzentration von 20 µg/ml gewählt. Der Nachweis von FH erfolgte mit Ziege-anti-FH-Antiserum und einem Peroxidase-markierten Esel-anti-Ziege-Antikörper. Abbildung 4.8 A zeigt die konzentrationsabhängige Bindung von gepooltem FH-402Y und FH-402H an Heparin. Beide FH-Varianten banden vergleichbar gut an Heparin. Die Bindung der FH-Präparate von homozygoten Einzelspendern an Heparin ist in Abbildung 4.8 B dargestellt. Die durchschnittlich ermittelte Absorption (OD_{405nm}) war für die FH-402Y- und FH-402H-Präparate annähernd gleich, allerdings bestand innerhalb der Spendergruppe eine ausgeprägte Variabilität. Der I62V-Genotyp hatte dabei keinen erkennbaren Einfluss auf die Heparinbindung.

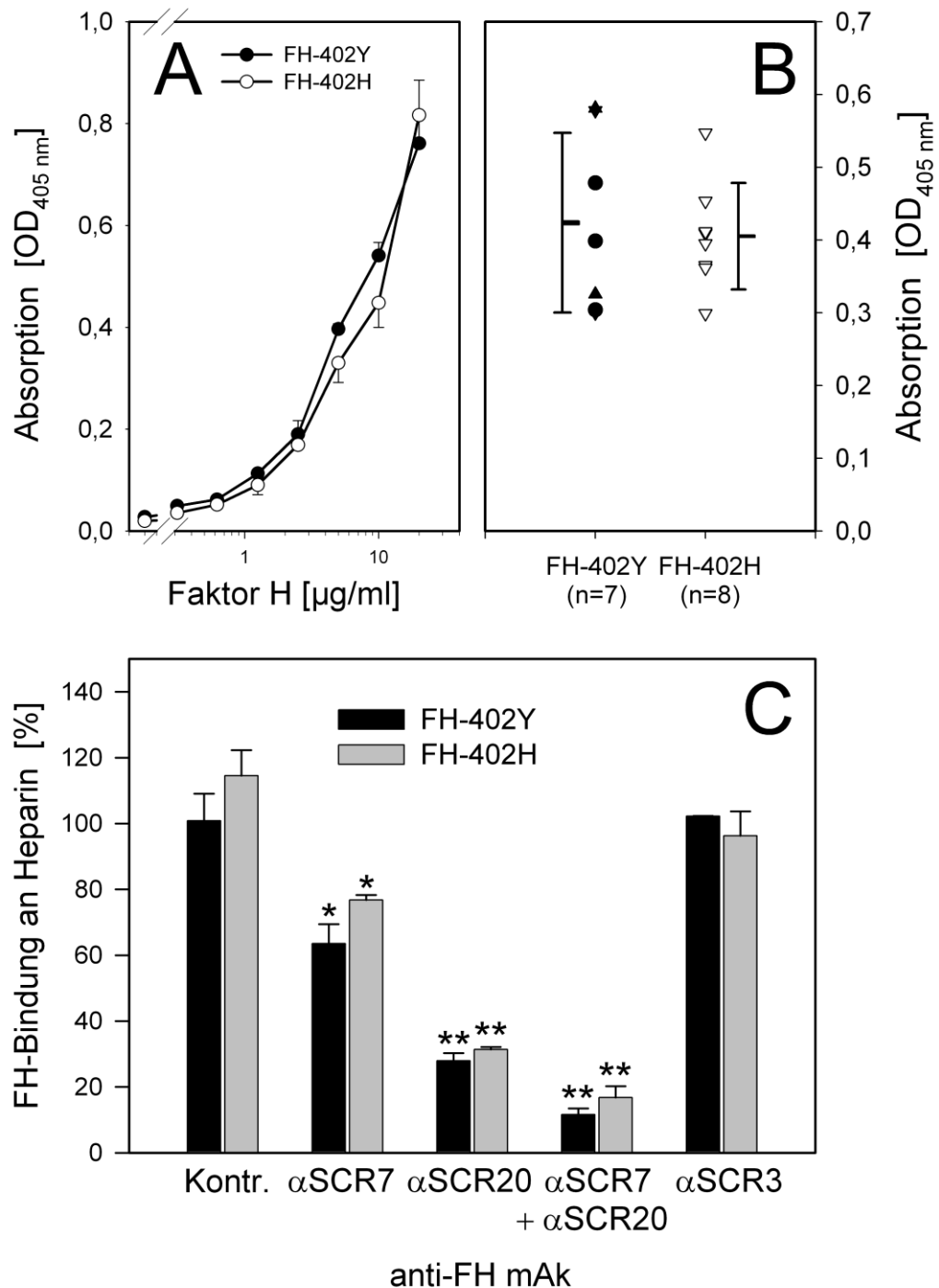


Abb. 4.8 Bindung von FH-402Y und FH-402H an Heparin. **A**, Bindung von 0-20 µg/ml gepooltem FH-402Y (●) und FH-402H (○) an ELISA-Platten, die mit 1 mg/ml Heparin beschichtet wurden. Gebundener FH wurde mit Ziege-anti-FH-Antiserum und Peroxidase-markierten Esel-anti-Ziegen-Ig nachgewiesen. Es sind die durchschnittlich ermittelten Werte ± Standardabweichung aus 3 Experimenten dargestellt. **B**, Bindung von 20 µg/ml FH von Einzelspendern an Heparin. Die Spender sind homozygot für FH-402Y (▲, ●, ▼) oder FH-402H (▽). Zusätzlich ist der I62V-Genotyp der einzelnen Spender angegeben: ▲, Ile/Ile; ●, Ile/Val; ▼/▽, Val/Val. **C**, Bindung von 20 µg/ml FH-402Y (schwarze Balken) und FH-402H (graue Balken) an Heparin nach Präinkubation mit einem 10fach molaren Überschuss anti-FH-mAk. Kontr. = T13/9; αSCR7 = 16B3 (a402Y) / 16C9 (a402H); αSCR20 = L20/3; αSCR3 = E22/11. Die Bindung von FH an Heparin ist als Prozent des für FH-402Y in Abwesenheit von mAk ermittelten Werts angegeben. *, p<0,01; **, p<0,001.

In einem weiteren Experiment wurde die mögliche Beteiligung des 402-Epitops an der Interaktion zwischen FH und Heparin mittels Präinkubation von FH mit FH-402Y/H-spezifischen Antikörpern (10facher molarer Überschuss, 30 min, RT) untersucht. Zur Blockade des 402Y-Epitops wurde der mAk 16B3 benutzt, zur Blockade des 402H-Epitops der mAk 16C9. Weitere in diesem Experiment eingesetzte anti-FH-Antikörper waren L20/3 (anti-SCR20) und E22/11 (anti-SCR3). Als Kontrollantikörper wurde erneut T13/9 (anti-Schweine-C5a) verwendet. Der präinkubierte FH wurde mit einer Konzentration von 20 µg/ml in den Heparin-ELISA (3.6.6, S. 47) eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation wurde der an Heparin gebundene FH wie oben beschrieben nachgewiesen.

In Abbildung 4.8 C ist zu erkennen, dass die Präinkubation von FH-402Y und FH-402H mit E22/11 keinen Einfluss auf die Bindung an Heparin hatte. Die SCR3-Domäne von FH ist folglich nicht an der Heparinbindung beteiligt. Bei Blockade des 402-Epitops auf SCR7 sowie bei Blockade von SCR20 wurde eine signifikante Reduktion der Bindung beider FH-Varianten an Heparin beobachtet. Dabei wirkt sich die Präinkubation von FH mit einem anti-SCR7-mAk weniger stark aus, als die Präinkubation mit dem anti-SCR20-mAk L20/3. Bei kombinierter Blockade von FH-402Y mittels 16B3 und L20/3 wird die Bindung an Heparin zusätzlich abgeschwächt. Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bei der Untersuchung der Heparinbindung von FH-402H. Heparin-Bindungsstellen wurden in den Domänen SCR7, SCR13 und SCR19-20 identifiziert (Rodríguez de Córdoba et al. 2004). Diese Literaturbefunde decken sich mit den hier erhobenen Daten, bei denen Epitop-spezifische anti-FH-Antikörper eingesetzt wurden. Danach kommt der Heparin-Bindungsstelle auf SCR20 die größte Bedeutung zu, aber auch SCR7 ist beteiligt. Diese Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass sich die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten anti-SCR7 Antikörper für eine Kartierung funktionell relevanter Epitope auf FH eignen.

4.4.3 Bindung von FH-402Y und FH-402H an C-reaktives Protein (CRP)

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von FH-402Y und FH-402H an CRP wurde der in 3.6.7 (S. 47) beschriebene ELISA verwendet. Die Näpfe der ELISA-Platten, die mit jeweils 10 µg/ml CRP beschichtet waren, wurden mit FH für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis von gebundenem FH erfolgte mit Ziege-anti-FH-Antiserum und einem Peroxidase-markierten Esel-anti-Ziege-Antikörper. In einem Experiment wurden gepoolter FH-402Y oder FH-402H auf die ELISA-Platten in aufsteigender Konzentration bis 80 µg/ml gegeben. Aus Abbildung 4.9 A geht hervor, dass die beiden polymorphen FH-Varianten hierbei unterschiedlich gut an CRP banden, wobei FH-402Y im Vergleich zu FH-402H eine stärkere CRP-Bindung aufwies. Dieser Unterschied ist signifikant für alle FH-Konzentrationen oberhalb 1 µg/ml ($p < 0,001$).

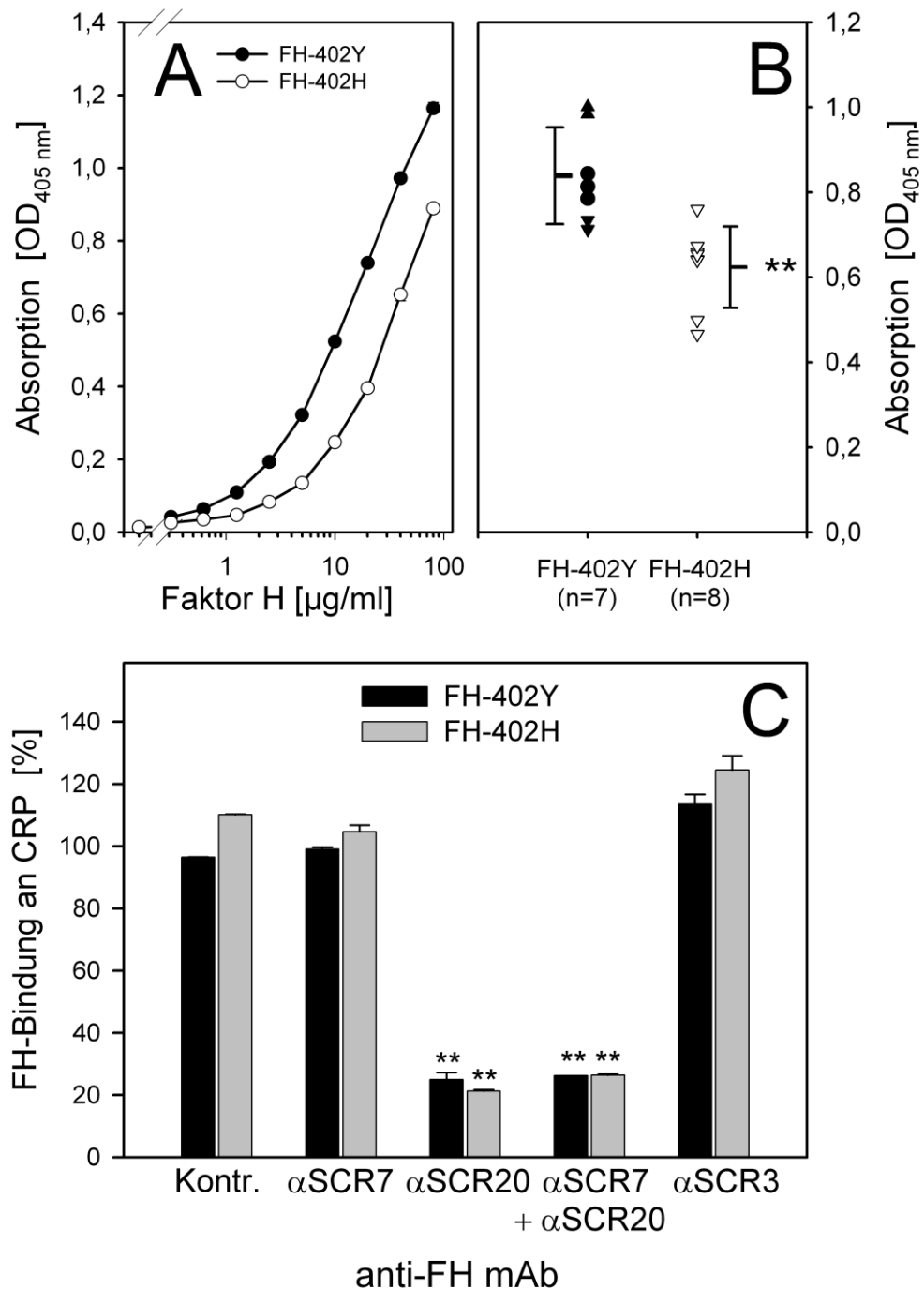


Abb. 4.9 Bindung von FH-402Y und FH-402H an CRP. **A**, Bindung von 0-40 µg/ml gepooltem FH-402Y (●) und FH-402H (○) an ELISA-Platten, die mit 10 µg/ml CRP beschichtet wurden. Gebundener FH wurde mit Ziege-anti-FH-Antiserum und Peroxidase-markiertem Esel-anti-Ziegen-Ig nachgewiesen. Es sind die durchschnittlich ermittelten Werte ± Standardabweichung aus 3 Experimenten dargestellt. **B**, Bindung von 40 µg/ml FH von Einzelspendern an CRP. Die Spender sind homozygot für FH-402Y (▲, ●, ▼) oder FH-402H (▽). Zusätzlich ist der I62V-Genotyp der einzelnen Spender angegeben: ▲, Ile/Ile; ●, Ile/Val; ▼/▽, Val/Val. **C**, Bindung von 40 µg/ml FH-402Y (schwarze Balken) und FH-402H (graue Balken) an CRP nach Präinkubation mit einem 10fachen molaren Überschuss anti-FH-mAk. Kontr. = T13/9; αSCR7 = 16B3 (α402Y) / 16C9 (α402H); αSCR20 = L20/3; αSCR3 = E22/11. Die Bindung von FH an CRP ist als Prozent des für FH-402Y in Abwesenheit von mAk ermittelten Wertes angegeben. **, p<0,001.

Der Unterschied in der CRP-Bindung war bei Verwendung von FH-Präparaten von homozygoten Einzelspendern reproduzierbar (Abb. 4.9 B). Bei diesem Versuch wurden die CRP-beschichteten ELISA-Näpfe jeweils mit 40 µg/ml FH inkubiert. Die durchschnittliche im ELISA registrierte OD_{405nm} betrug für FH-402Y $0,84 \pm 0,11$ und für FH-402H $0,62 \pm 0,09$. Dieser Unterschied erwies sich bei Durchführung des t-Tests als signifikant ($p < 0,001$). Innerhalb der Gruppe der FH-402Y-Spender konnte zudem ein Einfluss des I62V-Polymorphismus auf die Bindung an CRP festgestellt werden, der offensichtlich unabhängig von der polymorphen Variation an Position 402 ist. Dabei wiesen die FH-Präparate derjenigen FH-402Y-Spender, die zugleich homozygot für ein Isoleucin in Position 62 sind, die höchste Affinität zu CRP auf. Ein Valin an Position 62 hingegen führte zu einer relativ herabgesetzten Bindung an CRP. Bei einer nur geringen Anzahl von Spendern ($n=7$) war auch dieser Unterschied hoch signifikant ($p=0,0002$).

In Abbildung 4.9 C ist die Bindung von FH-402Y und FH-402H an CRP nach Präinkubation mit FH-spezifischen mAk dargestellt. Die Präinkubation von FH erfolgte mit einem 10fachen molaren Überschuss an mAk über 30 min bei Raumtemperatur. Zur Blockade des 402Y-Epitops wurde der mAk 16B3 benutzt, zur Blockade des 402H-Epitops der mAk 16C9. Weitere verwendete anti-FH-Antikörper waren L20/3 (anti-SCR20) und E22/11 (anti-SCR3). Der Kontrollantikörper war T13/9 (anti-Schweine-C5a). 40 µg/ml des präinkubierten Faktor H wurden im CRP-ELISA (3.6.7, S. 47) eingesetzt. Weder die Blockade des 402-Epitops auf SCR7, noch die Blockade von SCR3 hatte einen erkennbaren Einfluss auf die Bindung von FH-402Y oder FH-402H an CRP. Präinkubation mit dem anti-SCR20-Antikörper L20/3 reduzierte die CRP-Bindung von FH-402Y auf $24,98 \pm 2,27$ % und von FH-402H auf $21,3 \pm 0,44$ %. Obwohl der Austausch von Tyrosin gegen Histidin an Position 402 der SCR7-Domäne zu einer signifikanten Abnahme der Bindung von FH an CRP führte (s.o.), scheint dieses Epitop nicht unmittelbar an der Interaktion mit CRP beteiligt zu sein.

4.4.4 Bindung von biotinyliertem FH-402Y und FH-402H an Zelloberflächen

Für die in 3.9.3 (S. 54) beschriebene Versuchsreihe wurden RPE-Zellen und HUVEC-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden mit biotinyliertem FH für jeweils eine Stunde auf Eis inkubiert. Zuvor war gezeigt worden, dass beide FH-Varianten vergleichbar gut biotinyliert worden waren (4.2.2). Zum einen wurde die Bindung von FH-402Y und FH-402Y an die Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten FH-Konzentration untersucht. Dazu wurden entweder FH-402Y-biot. oder FH-402H-biot. in aufsteigenden Konzentrationen (0-200 µg/ml) auf die Zellen gegeben. In einem zweiten Versuch wurde eine fixe Konzentration von 200 µg/ml FH-402Y-biot oder FH-402H-biot in jeweils triplikaten Ansätzen verwendet. An die Zellen gebundener biotinylierter FH wurde mit PE-konjugiertem Streptavidin nachgewiesen und mittels FACS quantitativ bestimmt.

Die Ergebnisse für die Bindung an HUVEC-Zellen sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Wie Teil A der Abbildung zeigt, erfolgte die Bindung von FH an die HUVECs in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise. Bei einer insgesamt schwachen Signalstärke war die Bindung von FH-402Y-biot an HUVECs etwas stärker als die von FH-402H-biot. Dies galt für FH-Konzentrationen oberhalb von 50 $\mu\text{g/ml}$. Die Abbildungen 4.10 B und C zeigen, dass dieselbe Tendenz auch unter Verwendung einer fixen FH-Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$, die annähernd im Bereich physiologischer FH-Serumkonzentrationen lag, feststellbar war. Dieser Unterschied erwies sich allerdings als nicht signifikant ($p=0,54$).

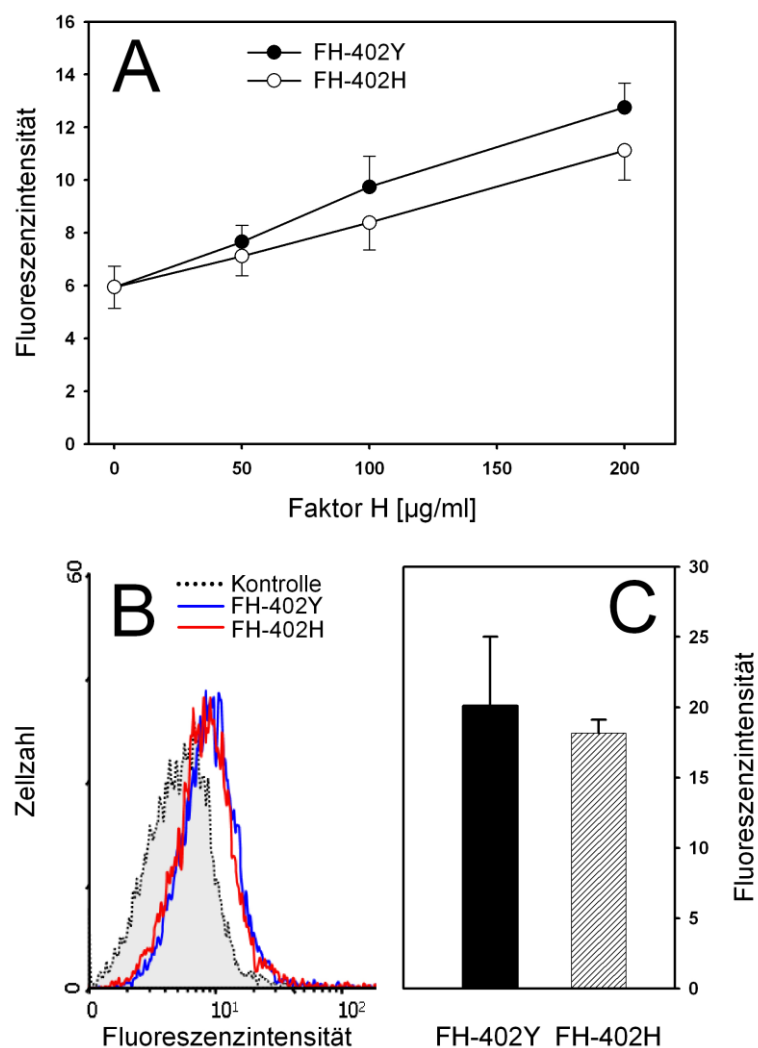


Abb. 4.10 Bindung von biotinyliertem FH-402Y und biotinyliertem FH-402H an HUVECs. HUVECs wurden entweder mit 0-200 $\mu\text{g/ml}$ gepooltem FH-402Y-biot. bzw. FH-402H-biot. (A), oder mit gepooltem FH-402Y-biot. bzw. FH-402H-biot. bei einer fixen Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert (B,C). Der gebundene biotinylierte Faktor H wurde mit Streptavidin-PE nachgewiesen und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

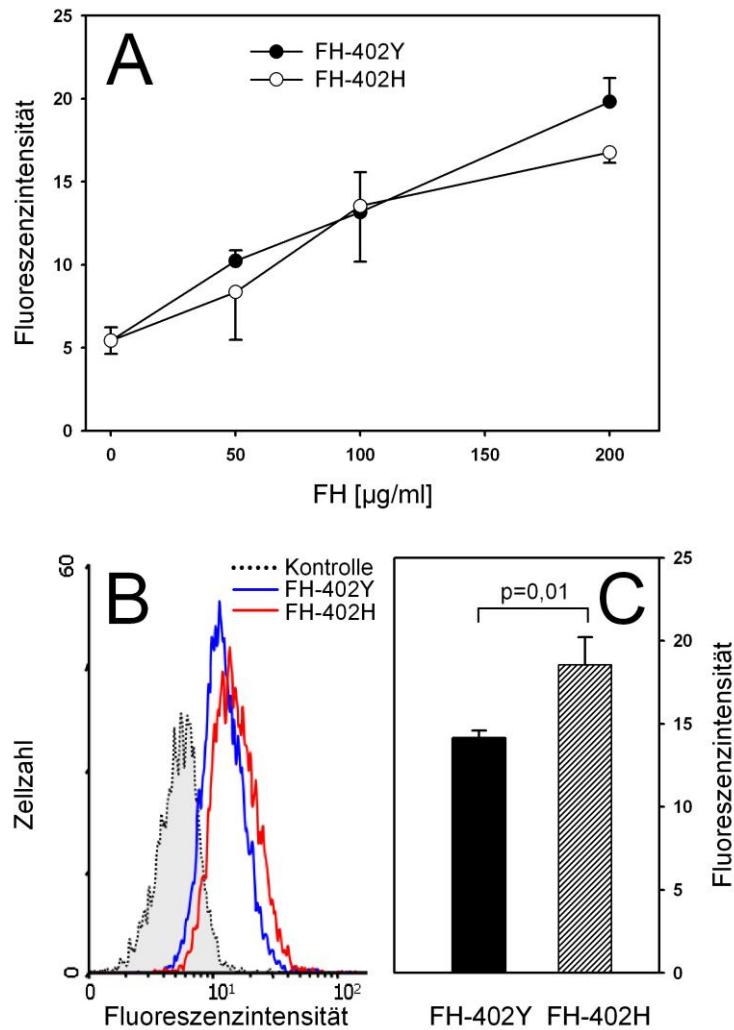


Abb. 4.11 Bindung von biotinyliertem FH-402Y und biotinyliertem FH-402H an RPE-Zellen. RPE-Zellen wurden entweder mit 0-200 µg/ml gepooltem FH-402Y-biot. bzw. FH-402H-biot. (A), oder mit gepooltem FH-402Y-biot. bzw. FH-402H-biot. bei einer fixen Konzentration von 200 µg/ml inkubiert (B,C). Der gebundene biotinylierte Faktor H wurde mit Streptavidin-PE nachgewiesen und durchflusszytometrisch gemessen.

Abbildung 4.11 zeigt die Bindung von biotinyliertem FH-402Y und FH-402H an retinale Pigmentepithel-(RPE)-Zellen. Auch hier folgte die registrierte Signalstärke der FH-Konzentration (Abb. 4.11 A). Die Mehrfachbestimmung bei einer festen FH-Konzentration von 200 µg/ml ergab eine leicht erhöhte Bindung von FH-402H an RPE-Zellen im Vergleich zu FH-402Y (Abb. 4.11 B und C). Die durchschnittlich registrierte Fluoreszenzintensität betrug für FH-402Y $14,14 \pm 0,45$ und für FH-402H $18,54 \pm 1,68$ ($p=0,01$).

4.4.5 Bindung von unmodifiziertem FH-402Y und FH-402H an RPE-Zellen

Es wurde das in 3.9.4 (S. 54) beschriebene Protokoll verwendet. Um die Bindung von unmodifiziertem FH an RPE-Zellen messen zu können, wurden die Zellen über Nacht ohne Zusatz von FCS inkubiert. Die Zellen wurden abgelöst, gezählt und anschließend in 0,5 x PBS gewaschen. Die Bindung von FH-402Y und FH-402H erfolgte stets über

30 min bei 37°C, ebenfalls in 0,5 x PBS. Zellgebundener FH wurde mit Ziege-anti-FH-Antiserum und FITC-konjugiertem Esel-anti-Ziege-Ig nachgewiesen und durchflusszytometrisch quantifiziert. Bei Verwendung von gepoolten FH-Präparaten wurden die Zellen stets mit 200 µg/ml FH-402Y oder FH-402H inkubiert. Wie aus Abbildung 4.12 A ersichtlich ist, konnte hier – anders als bei Verwendung von biotinyliertem FH (4.4.4) - kein Unterschied zwischen beiden polymorphen FH-Formen nachgewiesen werden. Nach Inkubation mit FH-402Y betrug die durchschnittlich detektierte Fluoreszenz 623 ± 94 und nach Inkubation mit FH-402H 570 ± 41 . Dieses Ergebnis ließ sich unter Verwendung von 200 µg/ml FH-402Y oder FH-402H von jeweils 5 Einzelspendern (Abbildung 4.12 B) reproduzieren. Auch in diesem Experiment zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der mittleren Fluoreszenzintensität (FH-402Y: $672,9 \pm 127,4$; FH-402H: $578,7 \pm 81,6$) als Maß für die Bindung von FH an RPE-Zellen.

Die Beteiligung des Epitops FH-402Y/H an der Interaktion von FH mit Zelloberflächen wurde durch Blockade mit sequenzspezifischen mAks untersucht werden. Hierfür wurden FH-402Y und FH-402H vor der Bindung an die Zellen mit verschiedenen mAks für 30 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Die Antikörper wurden in einem fünffachen molaren Überschuss gegenüber FH eingesetzt. Zur Blockade des 402Y-Epitops wurde der mAk 16B3 benutzt, der mAk 16C9 kam zur Inhibition des 402H Epitops zur Anwendung. Weiterhin wurde der gegen SCR20 gerichtete mAk E14/8 eingesetzt. Als Kontrollantikörper diente der gegen Schweine-C5a gerichtete T13/9. Wie Abbildung 4.12 C zu entnehmen ist, führte die Blockade des FH402Y/H-Epitops zu einer leichten Reduktion der Bindung von FH an RPE-Zellen. Die durch Präinkubation mit SCR7-spezifischen Antikörpern beobachtete Reduktion der Bindung an RPE-Zellen war bei FH-402Y stärker ausgeprägt als bei FH-402H. Am deutlichsten war die durch den SCR20-spezifischen mAk E14/8 verursachte Inhibition der Zellbindung. Ein additiver Effekt der Blockade von SCR7 und SCR20 war nicht zu verzeichnen.

4.5 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die schnelle Komplementregulation durch Faktor H

Die C3-Konvertase des alternativen Wegs der Komplementaktivierung wird durch einen Komplex aus C3b und Bb gebildet und katalysiert die Spaltung von C3 in C3a und C3b. FH bindet kompetitiv zu Bb an C3b und führt damit zu einem Zerfall und Aktivitätsverlust der C3-Konvertase (*Decay-Accelerating-Aktivität*). Die Aktivität der Konvertase beeinflusst indirekt auch die Hydrolyse des Komplementproteins B in Ba und Bb. Diese von der Protease D katalysierte Reaktion setzt nämlich die Bindung von B an C3b voraus. Dieser Zusammenhang macht das Ba-Fragment zu einem guten Indikator der unter FH-Kontrolle stehenden Aktivierung des alternativen Komplementweges in Serum.

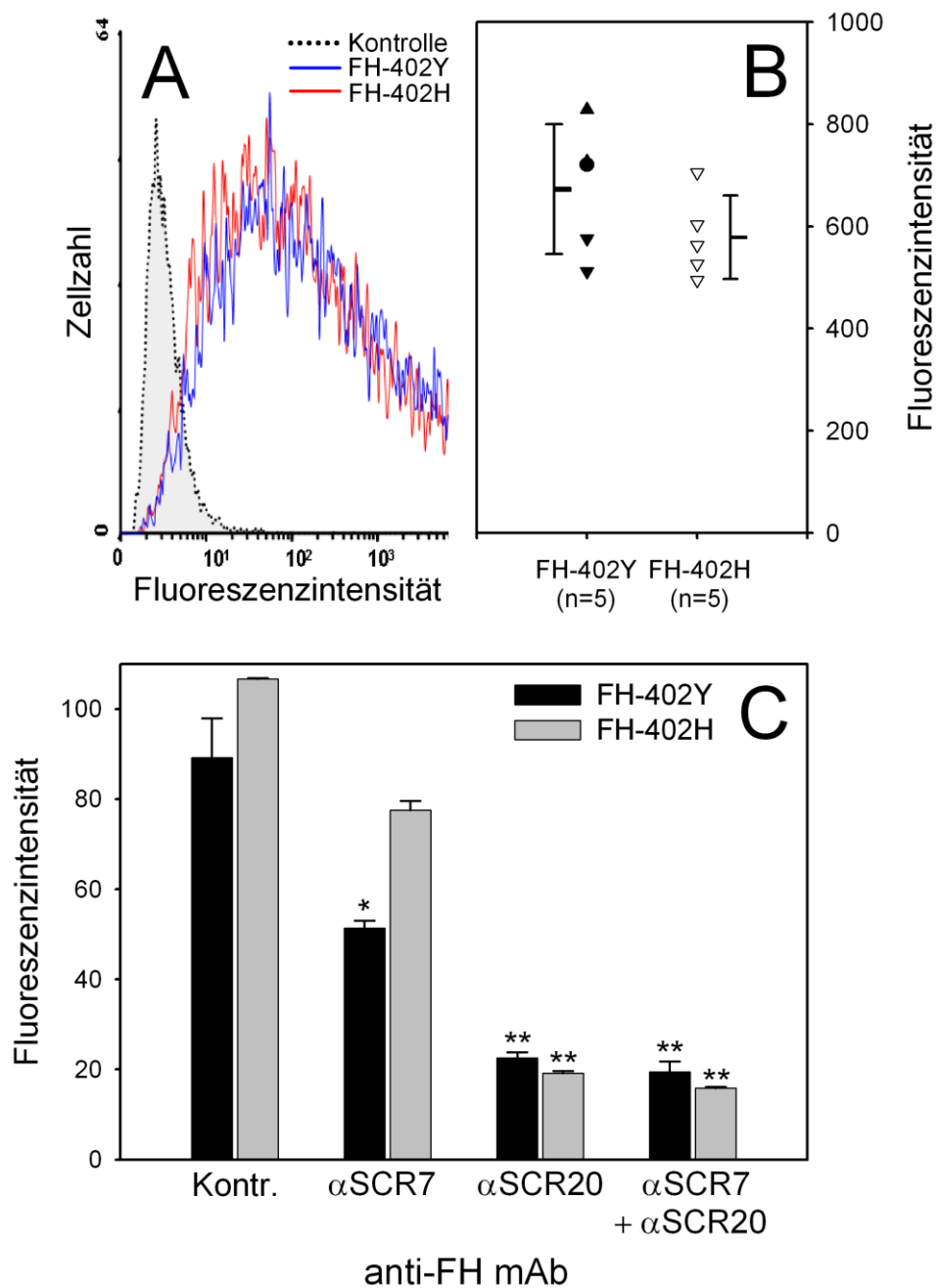


Abb. 4.12 Bindung von FH-402Y und FH-402H an RPE-Zellen. RPE-Zellen wurden über Nacht in Medium ohne FCS gehalten und daraufhin mit FH inkubiert. An die Zellen gebundener FH wurde mit Ziege-anti-FH gefolgt von FITC-konjugiertem Esel-anti-Ziege-Ig nachgewiesen und durchflusszytometrisch quantifiziert. **A**, Inkubation von RPE-Zellen mit 200 μ g/ml gepooltem FH-402 (blau) oder gepooltem FH-402H (rot). **B**, Bindung von FH-Einzelspender-Präparaten an RPE-Zellen. Die Spender sind entweder homozygot für FH-402Y (\blacktriangle , \bullet , \blacktriangledown) oder FH-402H (\triangledown). Zusätzlich ist der I62V-Genotyp der einzelnen Spender angegeben: \blacktriangle , Ile/Ile; \bullet , Ile/Val; \blacktriangledown , Val/Val. **C**, Bindung von 200 μ g/ml FH-402Y (schwarze Balken) oder FH-402H (graue Balken) an RPE-Zellen nach Präinkubation mit einem fünffach molaren Überschuss anti-FH-mAb. Kontr. = T13/9; α SCR7 = 16B3 (α 402Y) / 16C9 (α 402H); α SCR20 = E14/8. Die Bindung von FH an RPE-Zellen ist als Prozent des für FH-402Y in Abwesenheit von mAb ermittelten Werts angegeben. *, $p < 0,01$; **, $p < 0,001$.

Zur Untersuchung des Einflusses des Y402H-Polymorphismus auf die *Decay-Accelerating*-Aktivität von FH wurde eine Komplementaktivierung in Serum induziert und anschließend die Ba-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Hierbei wurde ein FH-depletiertes (Δ FH) Serum verwendet, dem aufgereinigter FH in definierten Konzentrationen zugesetzt werden konnte.

4.5.1 Herstellung eines Δ FH-Serums

Serum wurde mit 2 mM EDTA versetzt und wie in 3.2.3 (S. 34) beschrieben mittels Immunaffinitätschromatographie von Faktor H befreit. Anschließend wurden die einzelnen Depletionsdurchläufe zu einem Pool vereinigt. Zur Überprüfung der Depletionseffizienz wurde die FH-Konzentration im Serum vor und nach der Depletion mittels FH-ELISA (Tab. 3.9, S. 44) bestimmt. Im Ausgangsmaterial wurde eine FH-Konzentration von $264 \pm 3,6 \mu\text{g/ml}$ gemessen, im depletierten Serum waren noch $0,5 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ nachweisbar. Somit wurden 99,8% des ursprünglich vorhandenen FH aus dem Serum entfernt (Abb. 4.13)

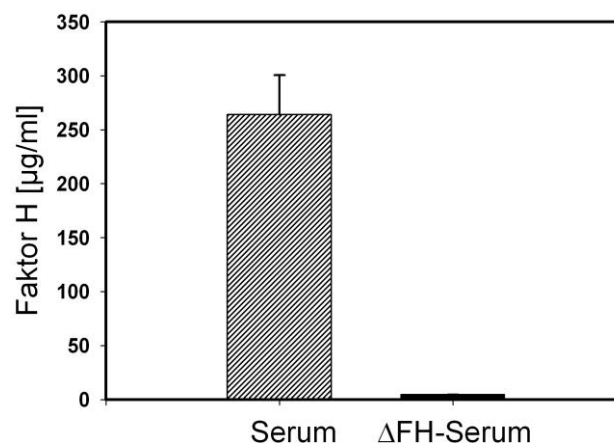


Abb. 4.13 Erfolg der immunaffinitätschromatographischen Depletion von Faktor H aus Serum. Gepooltes Serum wurde mit 2 mM EDTA versetzt. Je 5 ml EDTA-Serum wurden mit 5 ml anti-FH (L20/3) Ultralink von FH befreit. Die einzelnen Fraktionen wurden erneut zu einem Pool vereinigt. Die FH-Konzentration im Ausgangsmaterial (Serum) und depletierten Serum (Δ FH-Serum) wurde im FH-ELISA bestimmt.

4.5.2 Kinetik der spontanen Ba-Generierung in Serum

Durch spontane Hydrolyse findet im Serum sogar in Abwesenheit spezifischer Aktivatoren stets ein geringer Umsatz von Komplement statt, der in Anwesenheit inhibitorischer Komplementregulatoren effizient unterdrückt wird. Um die Rolle von FH als Regulator in diesem System zu untersuchen, wurde Δ FH-Serum aufgereinigter FH-402Y in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ zugefügt. In einem zweiten Ansatz wurde nicht rekonstituiertes Δ FH-Serum verwendet. Wie in 3.11 (S. 56) beschrieben wurde die Reaktion durch Zugabe von je 10 mM CaCl_2 und 10 mM MgCl_2 gestartet und bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mit EDTA

versetzt, um die Reaktion abzustoppen. Die Konzentration des Ba-Fragments wurde im ELISA ermittelt (3.6.1, S. 43; Tab. 3.9, S. 44).

Wie Abbildung 4.14 zu entnehmen ist, sind niedrig-physiologische FH-Konzentrationen (200 µg/ml) ausreichend, um eine Komplementaktivierung über spontane Hydrolyse vollkommen zu unterdrücken. Andererseits führt der Spontanumsatz (d.h. in Abwesenheit jeglicher exogener Komplementaktivatoren) in Abwesenheit von Faktor H zu einer Überführung von Faktor B (Serumkonzentration 200 µg/mlm, 93 kDa) in das niedermolekulare Ba-Fragment (33 kDa) innerhalb von 20 Minuten.

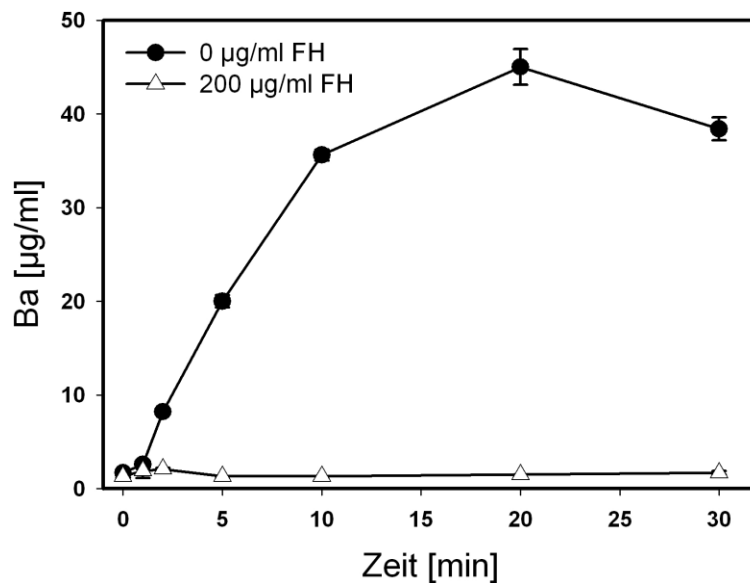


Abb. 4.14 Spontane Generierung des Ba-Fragments in Δ FH-Serum. Δ FH-Serum wurde entweder 200 µg/ml aufgereinigter FH-402Y oder ein entsprechendes Volumen PBS zugefügt. Die Seren wurden mit je 10 mM Mg^{2+}/Ca^{2+} versetzt und bei 37°C inkubiert. Aliquots der Seren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit EDTA versetzt und die Konzentration des neu generierten Ba-Fragments für jedes Aliquot mittels ELISA bestimmt (n=2).

4.5.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Zymosan-induzierte Komplementaktivierung in Serum

Eine spontane Komplementaktivierung in Serum wird in Gegenwart physiologischer FH-Konzentrationen wirksam unterdrückt. Um die *Decay-Accelerating*-Aktivität von FH in diesem Konzentrationsbereich untersuchen zu können, wurde die Komplementaktivierung durch Zusatz aktivierender Fremdoberflächen in Form von Zymosanpartikeln verstärkt.

Es sollte zuerst eine Zymosankonzentration ermittelt werden, die zu einer deutlichen und zugleich zeitlich gut kontrollierbaren Aktivierung des alternativen Komplementwegs führt. Dem Δ FH-Serum wurde aufgereinigter FH-402Y in einer Konzentration von 200 µg/ml zugefügt. Nach Resubstitution von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ (jeweils 10 mM) wurde das Serum in Anwesenheit von Zymosan in Konzentrationen von 0-1 mg/ml bei 37°C

für 30 min inkubiert. Nach Entfernung des Zymosans wurden die Ba-Konzentrationen im Überstand mittels ELISA gemessen. Abbildung 4.15 verdeutlicht, dass sich unter den gewählten Bedingungen die Ba-Konzentrationen als Parameter der Alternativweg-Aktivierung bei einer Zymosankonzentration von 1 mg/ml bereits in der Sättigung befinden. Für die weiteren Versuche wurde eine Zymosankonzentration von 0,5 mg/ml gewählt.

Zur Bestimmung der optimalen Reaktionsdauer wurde als nächstes eine Zeit-Wirkungskurve der Ba-Generierung bei einer Zymosankonzentration von 0,5 mg/ml erstellt. Erneut wurden das Δ FH-Serum mit 200 μ g/ml FH-402Y in Gegenwart von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ versetzt. Nach 2,5 min, 5 min, 10 min, 20 min und 40 min wurde jeweils ein Aliquot aus dem Reaktionsansatz entnommen und die Reaktion mit EDTA gestoppt. Durch Zentrifugation wurde das Zymosan vom Serum getrennt und die Proben im Ba-ELISA eingesetzt. Zusätzlich wurde die Ba-Konzentration des Ausgangsmaterials bestimmt. Abbildung 4.15 B stellt die Ergebnisse des Versuchs dar. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen befindet sich der Ba-Wert nach 20 min bereits nahezu im Bereich der Sättigung. In der Vorstellung, dass sich eventuelle Aktivitätsunterschiede zwischen beiden FH-Varianten unter nicht sättigenden Bedingungen besonders sensitiv nachweisen lassen, wurde für die weiteren Versuche Serum in Gegenwart von 0,5 mg Zymosan/ml für 20 min aktiviert.

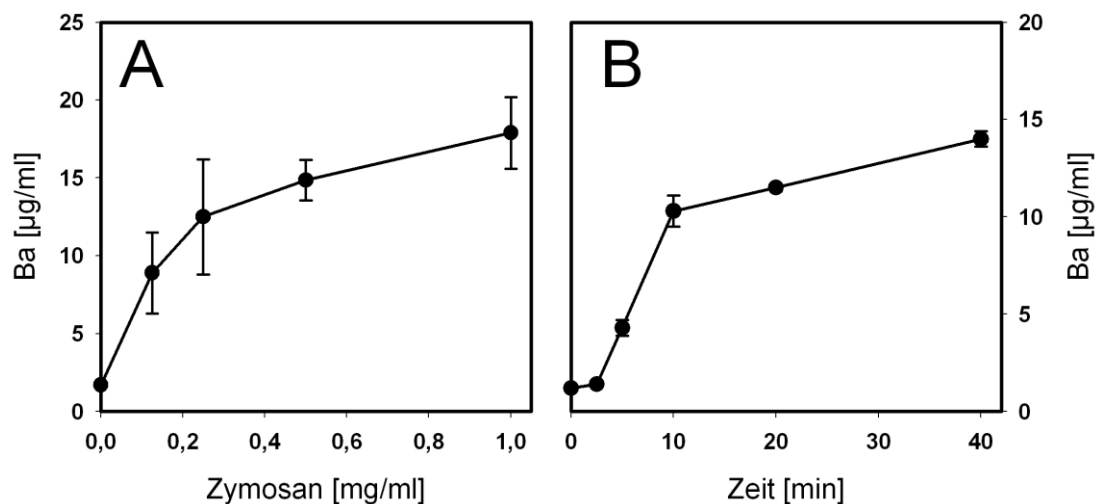


Abb. 4.15 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Zymosan-induzierte Komplementaktivierung in Serum. **A**, Generierung des Ba-Fragments in Abhängigkeit von der Zymosan-Konzentration. Δ FH-Serum wurden 200 μ g/ml aufgereinigter FH-402Y, sowie je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} resubstituiert. Zusätzlich wurde das Serum mit unterschiedlichen Konzentrationen Zymosan versetzt und über 30 min bei 37°C inkubiert. Die Ba-Konzentration wurde im ELISA bestimmt. **B**, Generierung des Ba-Fragments in Anwesenheit von Zymosan in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer. Δ FH-Serum wurden 200 μ g/ml aufgereinigter FH-402Y, sowie je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} resubstituiert. Das Serum wurde mit 0,5 mg/ml Zymosan versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Komplementaktivierung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit EDTA gestoppt und die Ba-Konzentration mittels ELISA gemessen.

4.5.4 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Faktor-H-vermittelte Regulation der Komplementaktivierung

Zunächst wurde untersucht, ob sich beide FH-Varianten in ihrer schnellen Komplement-inhibitorischen Aktivität konzentrationsabhängig voneinander unterscheiden. Hierzu wurden gepoolter FH-402Y oder FH-402H in aufsteigenden Konzentrationen von 0 - 500 µg/ml in Δ FH-Serum gegeben. Um den Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Regulation des spontanen Komplementumsatzes zu untersuchen, wurde die Serumaktivierung durch Zugabe von 10 mM CaCl₂ und MgCl₂ initiiert. In einem weiteren Experiment wurde die Komplementaktivierung zusätzlich durch Zugabe von 0,5 mg Zymosan/ml verstärkt. Nach 20minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Komplementaktivierung mit EDTA abgestoppt. Zur Bestimmung eines Ba-Maximalwerts wurde ein Δ FH-Serum ohne Zusatz von Faktor H unter ansonsten identischen Bedingungen aktiviert. Nach Entfernen des Zymosans wurden die Ba-Konzentrationen im Überstand mittels ELISA bestimmt.

Die Abbildung 4.16 A und C illustrieren die konzentrationsabhängige Inhibition der Ba-Generierung durch FH. In Abwesenheit von Zymosan supprimierten sowohl FH-402Y ($6,2 \pm 0,6$ % des Maximalwerts von $30,6 \pm 4,7$ µg Ba/ml) als auch FH-402H ($7,1 \pm 0,9$ %) sehr effizient die Ba-Generierung. Bei 500 µg/ml FH-402Y bzw. FH-402H wurden noch $3,2 \pm 0,5$ % bzw. $3,7 \pm 0,1$ % der maximalen Ba-Konzentration gemessen (Abb 4.16 A). In Abb. 4.16 C sind die Ergebnisse für denselben Versuch in Gegenwart von Zymosan dargestellt. In Anwesenheit von 500 µg/ml FH-402Y sank die Ba-Konzentration auf $48,9 \pm 10,9$ %, bei 500 µg/ml FH-402H auf $51,9 \pm 8,3$ % des Maximalwerts in Abwesenheit von FH ($35,5 \pm 1,6$ µg/ml). Der Vergleich beider Experimente verdeutlicht die Komplement-aktivierende Wirkung des Zymosans. Der spontane Komplementumsatz in Serum wird durch FH in physiologischen Konzentrationen (100-650 µg FH/ml) effektiv unterdrückt. Bei zusätzlicher Stimulation durch Fremdoberflächen, wie z.B. Zymosan, entzieht sich die Komplementaktivierung teilweise dieser Kontrolle. Insgesamt verläuft die Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Gegenwart von Zymosan flacher als in Abwesenheit eines Aktivators. Weder in Anwesenheit (Abb. 4.16 C) noch in Abwesenheit (Abb. 4.16 A) von Zymosan unterschied sich die komplementregulatorische Aktivität beider FH-Varianten voneinander.

Die Abbildungen 4.16 B und D zeigen die Ergebnisse eines weiteren Experiments, in dem keine FH-Pools, sondern FH-Präparate beider Varianten von Einzelspendern (402Y: n=5; 402H: n=8) eingesetzt wurden. Für die Komplementaktivierung ohne Zymosan wurden 50 µg FH/ml, für die Aktivierung in Anwesenheit von 0,5 mg/ml Zymosan 250µg FH/ml eingesetzt. Zur Bestimmung eines Ba-

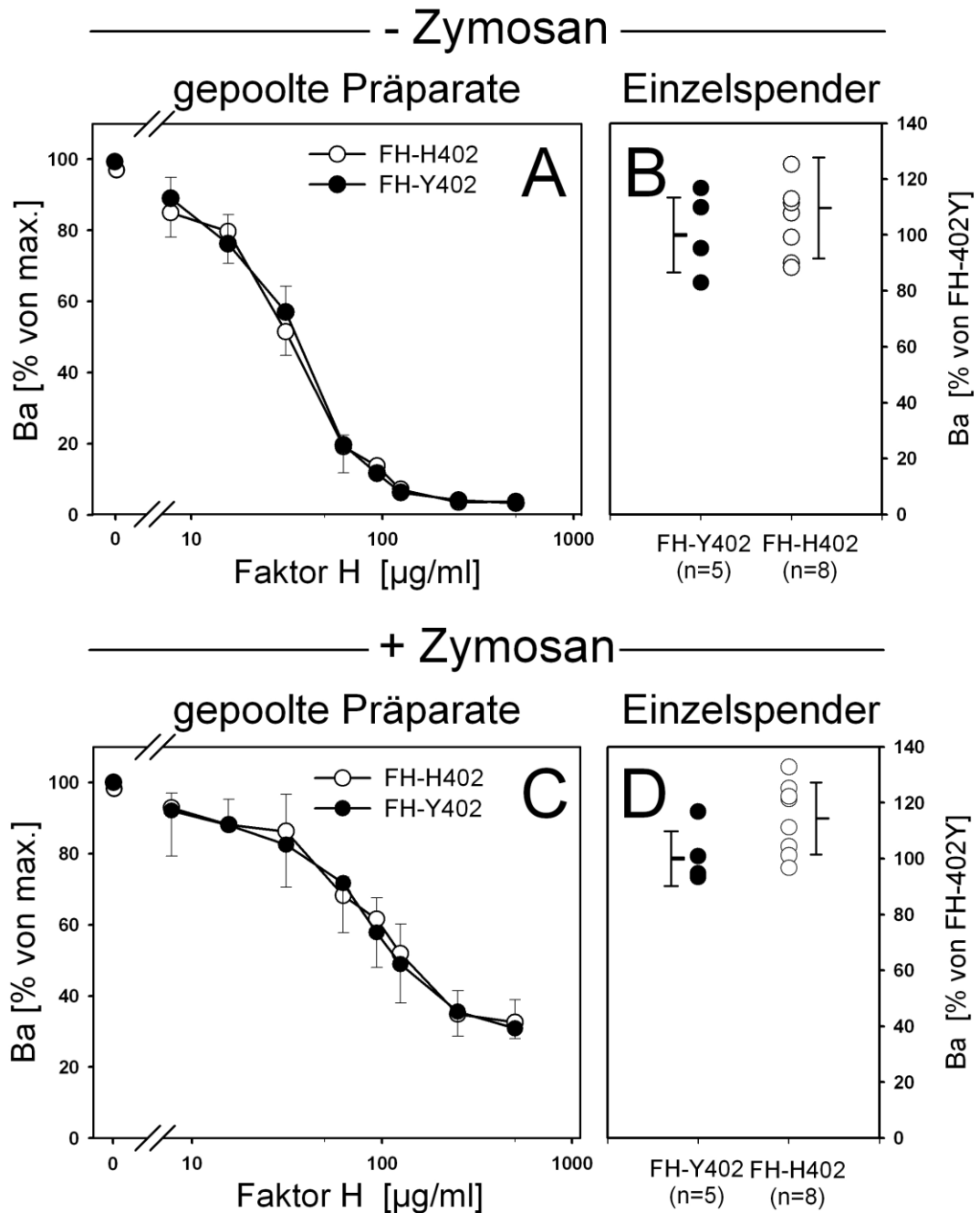


Abb. 4.16 Inhibition der Ba-Generierung in Serum durch FH-402Y und FH-402H. Δ FH-Serum wurde mit gepooltem FH-402Y bzw. FH-402H in unterschiedlichen Konzentrationen (**A,C**) oder mit aufgereinigtem FH-402Y bzw. FH-402H von Einzel Spendern in einer fixen Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (**B**) bzw. 250 $\mu\text{g/ml}$ (**D**) versetzt. Das Komplementsystem wurde entweder nur durch Resubstitution von je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} (**A,B**) oder zusätzlich mit 0,5 mg/ml Zymosan (**C,D**) aktiviert. Die Seren wurden 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit EDTA versetzt. Die Ba-Konzentrationen wurde mittels ELISA gemessen. Es sind die Ergebnisse (Mittelwert \pm Standardfehler) aus jeweils 3 Versuchen dargestellt. Die Daten wurden entweder auf den durchschnittlichen Ba-Wert normalisiert, der in Abwesenheit von FH gemessen wurde (**A,C**), oder wurden als Prozent der durchschnittlich ermittelten Ba-Konzentration bei Verwendung von FH-402Y angegeben (**B,D**).

Maximalwerts wurde ein Δ FH-Serum ohne Zusatz von FH unter ansonsten identischen Bedingungen aktiviert. Die Komplementaktivierung und Ba-Messung erfolgte wie oben beschrieben. Alle Werte wurden auf die durchschnittlich gemessene Ba-Konzentration unter Verwendung von FH-402Y (-Zymosan: $11,5 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$; +Zymosan: $12,6 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$) normalisiert. Bei Verwendung der FH-402H-Präparate wurden ohne Zymosan $110 \pm 18,1 \%$ (Abb. 4.16 B; $p=0,33$) und in Gegenwart von Zymosan $114 \pm 12,9 \%$ (Abb. 4.16 D; $p=0,06$) dieser durchschnittlichen Ba-Konzentration nachgewiesen. Somit bestand kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen beiden FH-Varianten.

4.5.5 Beeinflussung der komplementinhibitorischen Aktivität von Faktor H durch monoklonale Antikörper

Die Beteiligung des FH-402-Epitops an der komplementregulatorischen Aktivität des gesamten Proteins sollte durch Blockierung mit Epitop-spezifischen monoklonalen Antikörpern untersucht werden. Aufgereinigter FH-402Y oder FH-402H wurde über 30 min bei Raumtemperatur mit einem fünffachen molaren Überschuss anti-FH-mAK präinkubiert und anschließend in Δ FH-Serum gegeben. Das Serum wurde entweder in Gegenwart von $0,5 \text{ mg/ml}$ Zymosan oder ohne Zymosan für 20 min inkubiert. Im Fall der Zymosan-induzierten Komplementaktivierung wurden $250 \mu\text{g/ml}$ FH eingesetzt, in Abwesenheit von Zymosan betrug die FH-Konzentration $50 \mu\text{g/ml}$. Zur Bestimmung eines Ba-Maximalwerts wurde ein Δ FH-Serum ohne Zusatz von FH unter ansonsten identischen Bedingungen aktiviert. Das Serum wurde vom Zymosan getrennt und anschließend die Ba-Konzentration im Überstand mittels ELISA gemessen.

Wie aus Abbildung 4.17 ersichtlich ist, wurden FH-402Y und FH-402H mit jeweils vier unterschiedlichen mAK präinkubiert. 16B3 (anti-FH-402Y) und 16C9 (anti-FH-402H) sind gegen das 402-Epitop in der SCR7-Domäne von FH gerichtet. Als Kontrollantikörper wurde der gegen Schweine-C5a gerichtete mAK T13/9 eingesetzt. Der anti-SCR20-mAk E14/9 diente als Positivkontrolle. Sowohl in Gegenwart (Abb.4.17 B) als auch in Abwesenheit (Abb.4.17 A) von Zymosan führte die Präinkubation beider FH-Varianten mit dem anti-SCR20-mAk E14/9 zu einer deutlichen Inhibition der Komplement-regulatorischen Aktivität und folglich zu einer verstärkten Generierung des Ba-Fragments. So führte die durch E14/9 vermittelte Blockade von FH-402Y / FH-402H in Gegenwart von Zymosan zu einem Anstieg der Ba-Konzentration von $19,1 \pm 1,2 \%$ / $28,8 \pm 4,1 \%$ (Kontrolle) auf $65,8 \pm 0,8 \%$ / $78,3 \pm 5,4 \%$ des in Abwesenheit von FH gemessenen Maximalwertes von $30,2 \pm 2,2 \mu\text{g Ba/ml}$. Erfolgte eine Komplementaktivierung ohne Zymosan, so stiegen die Ba-Konzentrationen im Serum unter E14/9-Blockade von FH-402Y von $14,6 \pm 6,5 \%$ auf $70,9 \pm 1,1 \%$ und bei Blockade von FH-402H von $17,5 \pm 2,7 \%$ auf $89,0 \pm 9,4 \%$ des Maximalwerts von $29,8 \pm 2,4 \mu\text{g Ba/ml}$. Die Präinkubation beider FH-Varianten mit den anti-SCR7-mAK 16B3 oder 16C9 hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Ba-Generierung.

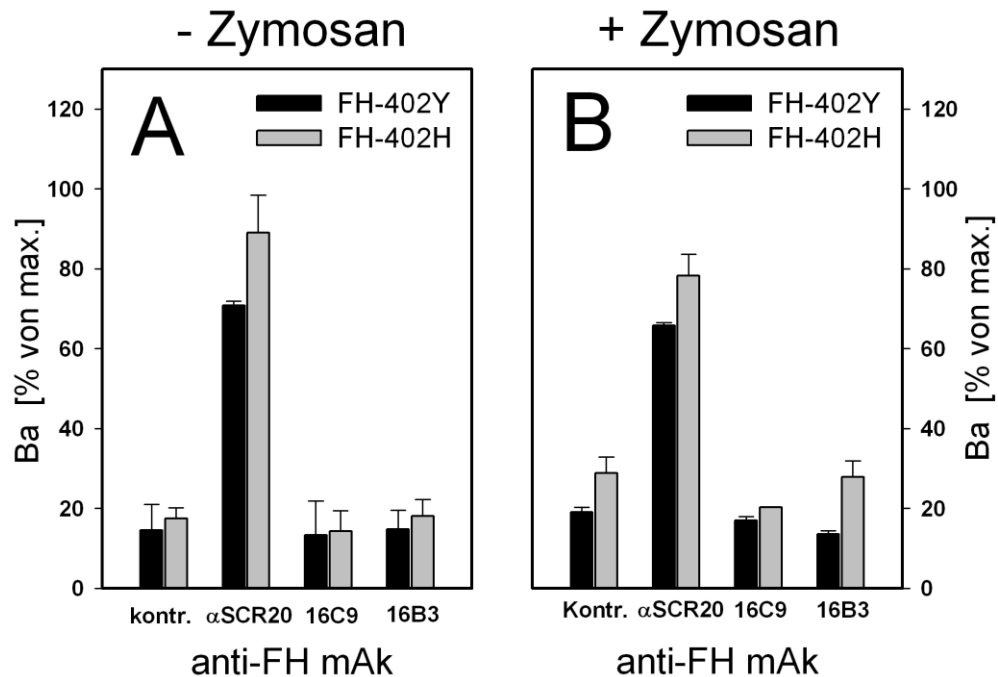


Abb. 4.17 Ba-Generierung in Serum nach Präinkubation von FH-402Y und FH-402H mit anti-FH-mAk. Aufgereinigter FH-402Y und FH-402H wurden mit einem fünffachen molaren Überschuss anti-FH-mAk für 30 min inkubiert. 50 µg/ml (A) bzw. 250 µg/ml (B) des präinkubierten Faktor H wurden zu Δ FH-Serum gegeben. Zur Initiation der Komplementaktivierung wurde das Serum entweder nur mit je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} (A) oder zusätzlich mit 0,5 mg/ml Zymosan (B) versetzt. Nach 20 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA abgestoppt. Die Konzentration des Ba-Fragments in den Seren wurde anschließend mittels ELISA bestimmt. Es sind die Daten aus einem repräsentativen Experiment dargestellt. (Kontr. = T13/9; α SCR20 = E14/9)

4.6 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Cofaktor-Aktivität von Faktor H in der flüssigen Phase

Die schnelle Komplementregulation durch FH beruht auf dessen *Decay-Accelerating*-Aktivität. Zusätzlich umfasst die Inhibition des Komplementsystems durch FH auch eine langsame Komponente. Diese wird durch dessen Cofaktor-Aktivität vermittelt. FH dient hierbei als einer von mehreren bekannten Cofaktoren für die Serumprotease Faktor I. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von C3b in seine verschiedenen niedermolekularen Fragmente. Im Folgenden sollte der mögliche Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Cofaktor-Aktivität von FH untersucht werden. Hierfür wurde der in Kap. 3.10.1 (S. 55) beschriebene Versuch zur Charakterisierung der Cofaktor-Aktivität von FH in der flüssigen Phase durchgeführt.

4.6.1 Kinetik der Faktor-H-abhängigen C3b-Prozessierung

Es wurde zunächst die Kinetik der C3b-Prozessierung bei Inkubation aufgereinigter Komponenten untersucht. Dazu wurden 150 µg/ml C3b mit 5 µg/ml Faktor I und 50 µg/ml aufgereinigtem FH-402Y eines Einzelspenders bei 37°C im Wasserbad

inkubiert. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0 - 60 min) mit SDS-PAGE-Probenpuffer abgestoppt. In einem Kontrollansatz wurde C3b mit Faktor I in Abwesenheit von FH für 60 min inkubiert. Gleiche Teile des Gesamtansatzes (äquivalent zu 2,25 µg C3b) wurden in je eine Tasche eines 10-%igen Laemmli-Gels appliziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen wurden die C3b-Fragmente mittels Immunoblot mit den beiden monoklonalen Antikörpern I3/15 (anti-C3 α' / α'_{68} /dg) und B3/6 (anti-C3 β) und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig nachgewiesen. Die Intensität der Banden wurde nach ECL-Exposition densitometrisch gemessen.

Der im unteren Teil der Abbildung 4.18 gezeigte Graph gibt eine quantitative Auswertung mittels Densitometrie des darüber abgebildeten Immunoblots wieder. Die im Immunoblot bei 75 kDa detektierte Bande entspricht der β -Kette des C3-Moleküls. Es ist zu erkennen, dass sich die Intensität 75 kDa-Bande mit voranschreitender Reaktionsdauer nicht verändert. Da die C3- β -Kette im Rahmen der C3b-Prozessierung nicht gespalten wird, dient diese Proteinbande in diesem Experiment als Beladungskontrolle. Anders verhält es sich mit den verschiedenen Fragmenten der α -Kette, welche mehrere Schnittstellen für die Protease Faktor I tragen. Bei 104 kDa läuft das α' -Fragment, das der α -Kette von C3 abzüglich des niedermolekularen C3a-Fragments entspricht. Das bei 68 kDa detektierte α'_{68} -Fragment zeigt die Konversion von C3b in iC3b an. Aus dem α'_{68} -Fragment geht C3dg hervor, welches sich im Immunoblot als Bande bei 37 kDa darstellt. Aus Immunoblot und Graphen ist die zeitliche Abfolge der C3-Prozessierung ersichtlich. Bereits sehr früh wird C3b von Faktor I und FH in iC3b umgewandelt, erkennbar an der Abnahme der Intensität des α' -Fragments und dem parallelen Anstiegs der Intensität des α'_{68} -Fragments. Nach 3 Minuten wurden 80 % des im Versuch eingesetzten C3b in iC3b konvertiert. Auf den schnellen Abbau von C3b zu iC3b folgt die sehr viel langsamere Prozessierung von iC3b zu C3dg, die an der Abnahme des Signals bei 68 kDa und dem parallelen Anstieg der Intensität der 37 kDa-Bande zu erkennen ist. Auch an dieser Reaktion ist FH als Cofaktor beteiligt. Die Bildung von C3dg setzte bei den gewählten Reaktionsbedingungen nach 10 min ein. Nach 60 min waren 40 % C3b in C3dg überführt. Der iC3b-Anteil am Gesamt-C3b nahm dementsprechend nach einer Stunde wieder auf 60% ab.

Da vorbeschrieben ist, dass die Eigenschaften des jeweiligen Puffers besonderen Einfluss auf die FH-abhängige C3dg-Generierung haben (Ross et al. 1982), wurde speziell dieser Schritt der C3-Prozessierung bei verschiedenen pH-Werten und Ionenstärken untersucht. 150 µg/ml iC3b wurden mit 5 µg/ml Faktor I und 50 µg/ml aufgereinigtem FH-402Y eines Einzelspenders in verschiedenen Phosphatpuffern (pH 6,0 - 7,5; 0 – 150 mM NaCl) bei 37°C für 15 – 30 min inkubiert. In einem Kontrollansatz wurde iC3b mit Faktor I und ohne FH für 30 min inkubiert. Gleiche Teile des

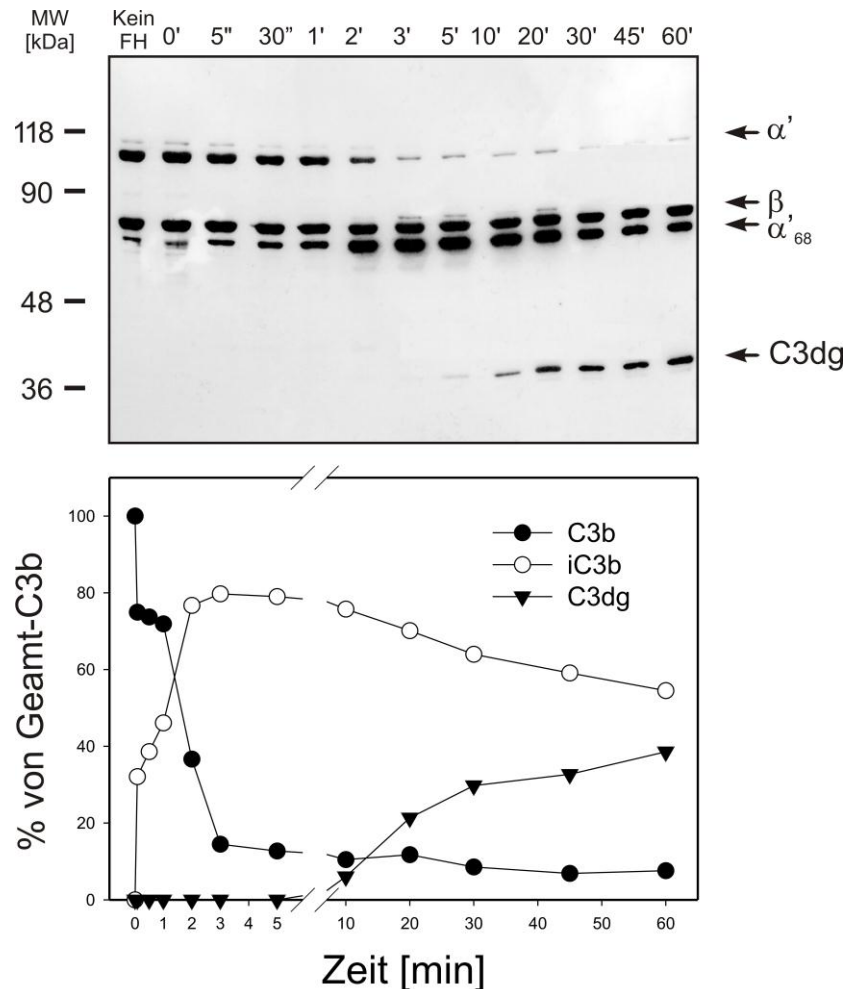


Abb. 4.18 Faktor-I-vermittelte Spaltung von C3b in Anwesenheit von Faktor H. C3b (150 $\mu\text{g/ml}$) wurde mit Faktor I (5 $\mu\text{g/ml}$) und FH-402Y (50 $\mu\text{g/ml}$) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit SDS-Probenpuffer / Mercaptoethanol zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Die C3b-Fragmente wurden in einem 10%igen Laemmli-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (anti-C3- β -Kette) nachgewiesen, gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch gemessen. Die C3-Spaltprodukte sind als Prozent der Intensitätssumme von α' , α'_{68} und C3dg angegeben ($(\text{Int}_{\text{Fragment}} / (\text{Int}_{\alpha'} + \text{Int}_{\alpha'_{68}} + \text{Int}_{\text{C3dg}})) \times 100$). Zusätzlich wurden die Ergebnisse durch Bestimmung der Intensität der β -Ketten-Bande korrigiert.

Gesamtansatzes (äquivalent zu 2,25 μg iC3b) wurden in je eine Tasche eines 10-%iges Laemmli-Gel appliziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen erfolgte der Nachweis der C3-Fragmente wie oben beschrieben durch die mAk I3/15 und B3/6 mittels Immunoblot. Aus Abbildung 4.19 geht hervor, dass die C3dg-Generierung in Anwesenheit von FH am effektivsten im sauren pH-Bereich bei niedrigen Salzkonzentrationen erfolgt. Steigende NaCl-Konzentrationen und steigender pH reduzieren die iC3b-Spaltung zunehmend, so dass bereits bei physiologischen pH-Werten und Salzkonzentrationen praktisch keine C3dg-Generierung mehr nachzuweisen ist.

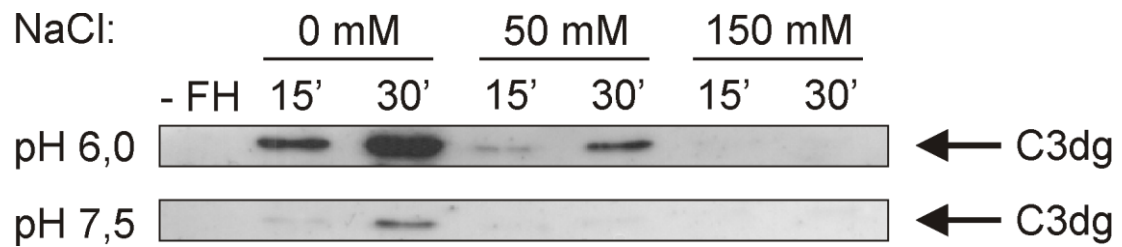


Abb. 4.19 Einfluss von pH und Salzkonzentration auf die FH-abhängige C3dg-Generierung. iC3b (150 µg/ml) wurde mit Faktor I (5 µg/ml) und FH-402Y (50 µg/ml) bei pH 6,0 und pH 7,5, sowie bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0-150 mM) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit SDS-Probenpuffer / Mercaptoethanol nach 15 bzw. 30 min abgestoppt. Die C3b-Fragmente wurden in einem 10%igen Laemmli-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (anti-C3-β-Kette) nachgewiesen, gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper.

4.6.2 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die FH-abhängige iC3b-Generierung in der flüssigen Phase

Wie in 4.6.1 dargestellt, erfolgt die FH-abhängige Konversion von C3b in iC3b sehr schnell (in weniger als 5 min). Daher ist die Untersuchung möglicher funktioneller Unterschiede zwischen den beiden polymorphen FH-Formen bezüglich der iC3b-Generierung mittels kinetischer Analyse nicht praktikabel. Es wurde deshalb eine vergleichende Dosis-Wirkungskurve für die iC3b-Bildung angefertigt. In dem in Kap. 3.10.1 (S. 55) beschriebenen Versuch wurden 150 µg/ml C3b und 5 µg/ml FI für 2 min und bei 37°C mit gepooltem FH-402Y oder FH-402H inkubiert. Dabei wurden jeweils aufsteigende FH-Konzentrationen von 0-25 µg/ml eingesetzt. Die Reaktion wurde mit Mercaptoethanol-haltigem SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt. 2,25 µg C3b wurden auf je eine Bahn eines 10-%igen Laemmli-Gels aufgetragen. Die C3b-Fragmente wurden unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Immunoblot mit den beiden monoklonalen Antikörpern I3/15 und B3/6 nachgewiesen und die Banden-Intensität anschließend densitometrisch gemessen.

Im oberen Teil der Abb. 4.20 wird der dosisabhängige Anstieg der Intensität des α'_{68} -Fragments im Immunoblot vergleichend für beide FH-Varianten gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung wird dieser Zusammenhang als prozentualer Anteil des in iC3b überführten C3b am Gesamt-C3b dargestellt. Unter Verwendung beider polymorphen FH-Varianten befand sich die iC3b-Generierung ab einer FH-Konzentration von 12,5 µg/ml in der Sättigung. FH-402Y und FH-402H zeigten keinen Unterschied in ihrer Cofaktor-Aktivität für die Spaltung von C3b in iC3b.

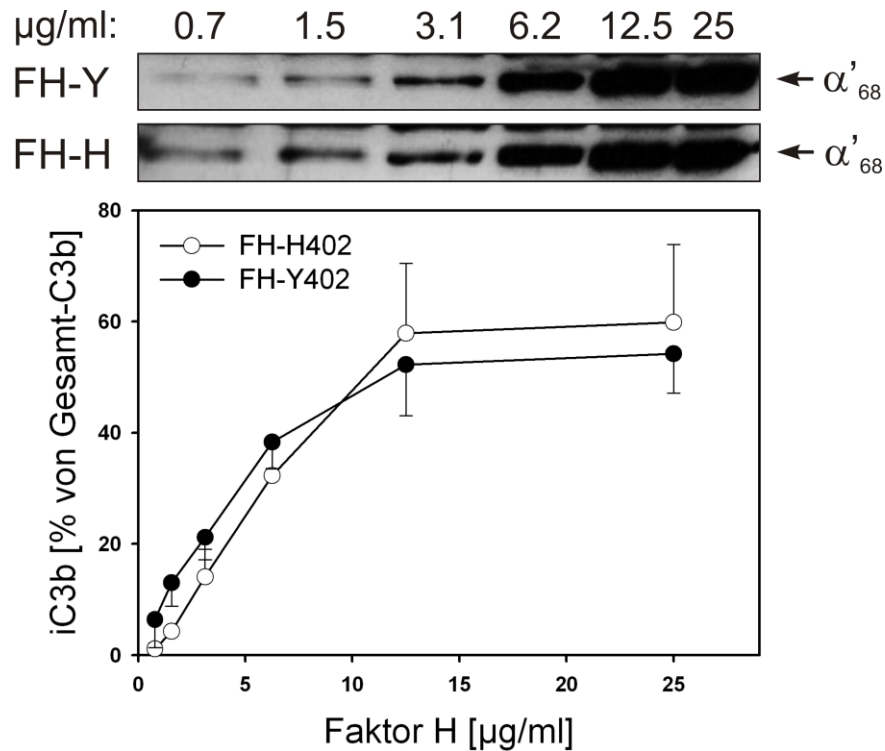


Abb. 4.20 Cofaktor-Aktivität von FH-402Y und FH-402H für die Generierung von iC3b. C3b (150 µg/ml) wurde mit Faktor I (5 µg/ml) und entweder gepooltem FH-402Y oder FH-402H (0-25 µg/ml) bei 37°C für 2 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit SDS-Probenpuffer und Mercaptoethanol gestoppt. Die C3b-Fragmente wurden in einem 10%igen Laemmli-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (anti-C3-β-Kette) nachgewiesen, gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper. Die Banden-Intensität wurde densitometrisch gemessen. Die C3-Spaltprodukte sind als Prozent der Summe von α' , α'_{68} und C3dg angegeben. Zusätzlich wurden die Ergebnisse durch Bestimmung der Intensität der β -Ketten-Bande korrigiert. Die Symbole stehen für die ermittelten Durchschnittswerte \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten.

4.6.3 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die FH-abhängige C3dg-Generierung in der flüssigen Phase

Zur Untersuchung des möglichen Einflusses des Y402H-Polymorphismus auf die Prozessierung von iC3b zu C3dg wurde die C3dg-Bildung in Anwesenheit von FH-402Y oder FH-402H in Abhängigkeit von der FH-Konzentration und von der Zeit dokumentiert. Zum Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden 150 µg/ml C3b mit 5 µg/ml FI und aufsteigenden Konzentrationen (0-500 µg/ml) gepooltem FH-402Y oder FH-402H bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 5 min mit Mercaptoethanol-haltigem SDS-PAGE-Probenpuffer abgestoppt. Zum Anfertigen der Kinetik wurden 150 µg/ml C3b mit 5 µg/ml FI und 50 µg/ml gepooltem FH-402Y oder FH-402H bei 37°C inkubiert und die Reaktion nach 1 min, 5 min, 7,5 min, 10 min, 20 min oder 30 min durch Zugabe von Mercaptoethanol-haltigem SDS-PAGE-Probenpuffer abgebrochen. Pro Bahn wurden 2,25 µg C3b auf ein 10-%iges Laemmli-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen wurden die C3b-Fragmente mittels Immunoblot mit den beiden monoklonalen Antikörpern I3/15 und

B3/6 und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig nachgewiesen. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch bestimmt.

Die Ergebnisse sind Abbildung 4.21 zu entnehmen. Es ist jeweils oben die C3dg-Bildung im Immunoblot und darunter die dazugehörige densitometrische Auswertung zu sehen. In Abbildung 4.21 A ist die C3dg-Generierung in Abhängigkeit von der FH-Konzentration dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in Anwesenheit von FH-402H weniger C3dg gebildet wurde als in Anwesenheit von FH-402Y. Dieser Unterschied ist im Bereich der physiologischen FH-Konzentration (125 µg/ml – 500µg/ml) am stärksten ausgeprägt. 500 µg/ml FH-402Y führten zu einer Überführung von 25,5 % des eingesetzten C3b in C3dg. Unter Verwendung von 500 µg/ml FH-402H wurden dagegen nur 7,7 % C3b in C3dg umgewandelt. Diese eingeschränkte Aktivität der polymorphen Variante FH-402H lässt sich auch anhand der in Abb. 4.21 B gezeigten kinetischen Analyse nachweisen. Nach 20 min befanden sich die C3dg-Spiegel in Anwesenheit von FH-402Y mit $19,9 \pm 4,5$ % umgewandeltem C3b in der Sättigung. Nach derselben Zeit wurden mit FH-402H als Cofaktor nur $3,19 \pm 0,6$ % C3b in C3dg umgewandelt.

Der in Abb 4.22 abgebildete Immunoblot zeigt die FI-vermittelte Generierung von C3dg unter Verwendung von FH-Präparaten, die nicht gepoolt wurden, sondern von Einzelspendern stammten. Für den Versuch wurden zu 150 µg/ml C3b und 5 µg/ml FI 200 µg/ml FH-402Y oder FH-402H von Einzelspendern gegeben. Die Reaktion erfolgte für 5 min bei 37°C. Die C3-Fragmente wurden wie oben beschrieben mittels Immunoblot nachgewiesen. Wie beim Vergleich der Intensität der Banden bei 37 kDa zu erkennen ist, wurde mit FH-402H (weiße Symbole) als Cofaktor deutlich weniger C3dg gebildet als mit FH-402Y (schwarze Symbole). Der bereits oben für die gepoolten Präparate beschriebene Befund ist also mit allen Einzelspender-Präparaten individuell reproduzierbar. Es stellte sich zusätzlich die Frage, ob die Unterschiede in der FH-abhängigen C3dg-Generierung allein auf den Polymorphismus an Position 402 zurückzuführen sind, oder möglicherweise auch durch den Aminosäureaustausch I62V hervorgerufen werden.

Der I62V-Genotyp der jeweiligen Spenders ist in Abb. 4.22 in Gestalt unterschiedlicher Symbole zusätzlich angegeben. Die FH-402Y-Präparate der Spender, die heterozygot oder homozygot für Isoleucin bzw. für Valin an Position 62 sind, waren alle gleichermaßen imstande, iC3b in C3dg zu überführen. Somit verursacht allein der Austausch von Tyrosin gegen Histidin an Position 402 des FH-Moleküls die herabgesetzte Cofaktor-Aktivität für die FI-vermittelte Prozessierung von iC3b in C3dg.

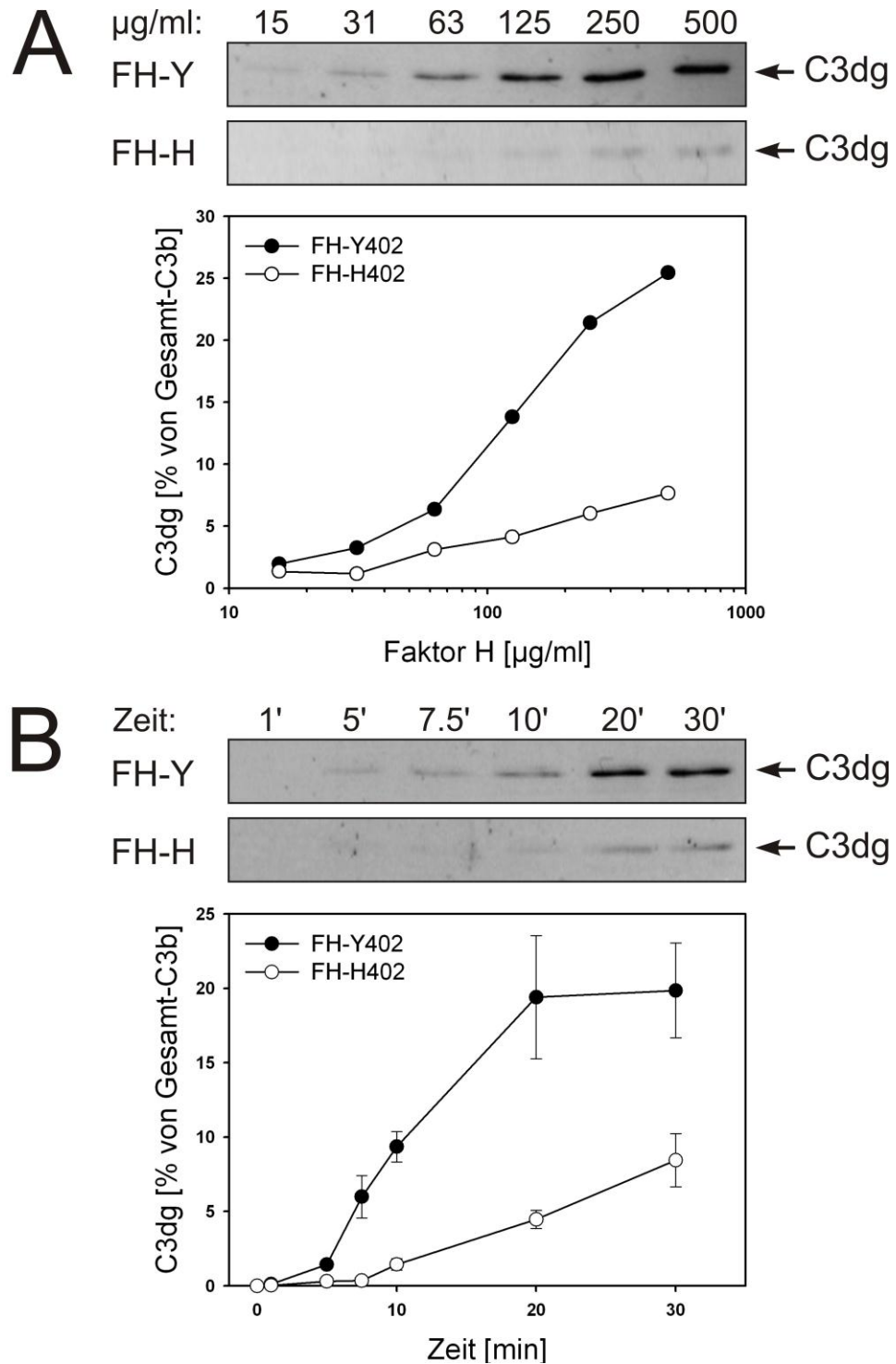


Abb. 4.21 Cofaktor-Aktivität von FH-402Y und FH-402H für die Generierung von C3dg. C3b (150 µg/ml) wurde mit Faktor I (5 µg/ml) und entweder gepooltem FH-402Y oder FH-402H (**A**, 0-500µg/ml; **B**, 50 µg/ml) bei 37°C für 5 min (**A**) oder für 0-30 min (**B**) inkubiert. Die Reaktion wurde mit SDS-Probenpuffer und Mercaptoethanol gestoppt. Die C3b-Fragmente wurden in einem 10%igen Laemmli-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (anti-C3-β -Kette) nachgewiesen, gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper. Die Banden-Intensität wurde densitometrisch gemessen. Die C3-Spaltprodukte sind als Prozent der Summe von α', α'68 und C3dg angegeben. Zusätzlich wurden die Ergebnisse durch Bestimmung der Intensität der β-Ketten-Bande korrigiert. Die Symbole stehen für die ermittelten Durchschnittswerte ± Standardabweichung aus 3 Experimenten.

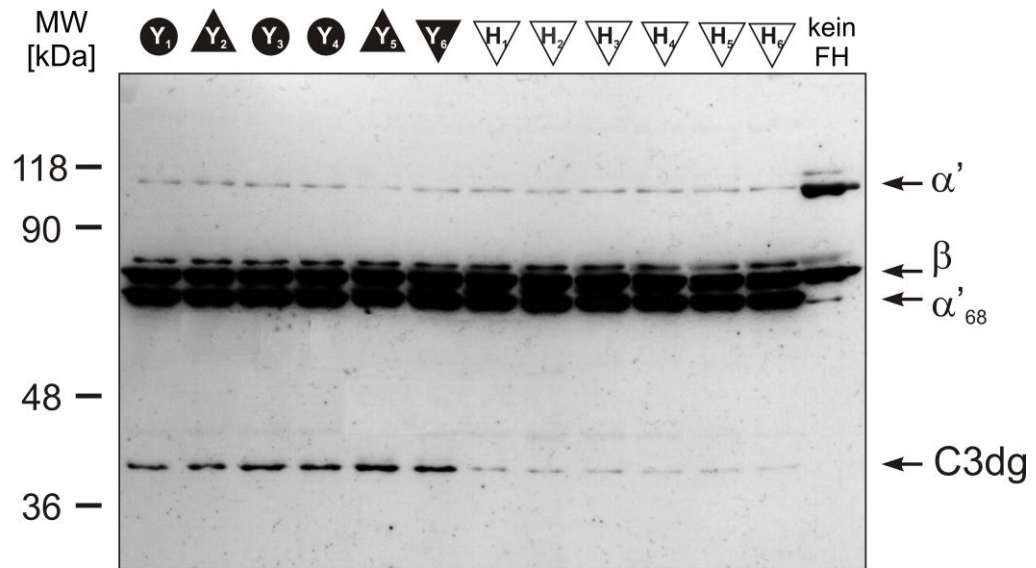


Abb. 4.22 Cofaktor-Aktivität (C3dg-Generierung) von FH-402Y und FH-402H von Einzelspendern. C3b (150 µg/ml) wurde mit Faktor I (5 µg/ml) und Faktor H (200 µg/ml) von Einzelspendern versetzt, die entweder homozygot für FH-402Y (schwarze Symbole) oder FH-402H (weiße Symbole) sind. Die Reaktion wurde nach 30 min mit SDS-Probenpuffer und Mercaptoethanol gestoppt. Die C3b-Fragmente wurden in einem 10%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (anti-C3- β -Kette) nachgewiesen, gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper. Der I62V-Genotyp ist folgendermaßen dargestellt: \blacktriangle , Ile/Ile; \bullet , Ile/Val; $\blacktriangledown/\triangledown$, Val/Val.

4.6.4 Einfluss der Blockade des FH-402Y-Epitops mit monoklonalen Antikörpern auf die Cofaktor-Aktivität

FH-402Y wurde mit einem fünffachen molaren Überschuss verschiedener FH-spezifischer mAk für 30 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Dabei wurden die mAk T13/9, C18/3 und 16B3 eingesetzt. T13/9 (anti-Schweine-C5a) diente als irrelevanter Kontrollantikörper. C18/3 erkennt ein Epitop des C-Terminus (SCR20) von FH. 16B3 bindet spezifisch an das 402Y-Epitop auf der SCR7-Domäne von FH. Der präinkubierte FH wurde zu 150 µg/ml C3b und 5 µg/ml FI gegeben. Für die Generierung von iC3b wurde dabei eine FH-Konzentration von 12,5 µg/ml eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 2 min. Sollte die C3dg-Generierung untersucht werden, so wurde eine FH-Konzentration von 100 µg/ml FH gewählt und die Reaktion nach 30 min mit Mercaptoethanol-haltigem SDS-PAGE-Probenpuffer abgestoppt. Nach der Auftrennung durch SDS-Page mit einem 10%igen Laemmli-Gel wurden die C3b-Fragmente mit dem mAk B3/6 und I3/15 und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig mittels Immunoblot nachgewiesen.

Abbildung 4.23 zeigt die angefertigten Immunoblots. In Abbildung 4.23 A sind die Resultate für die iC3b-Generierung nach Antikörper-Präinkubation von FH gezeigt. Hierbei beeinträchtigen weder die Kontrollantikörper T13/9 und C18/3, noch der für das

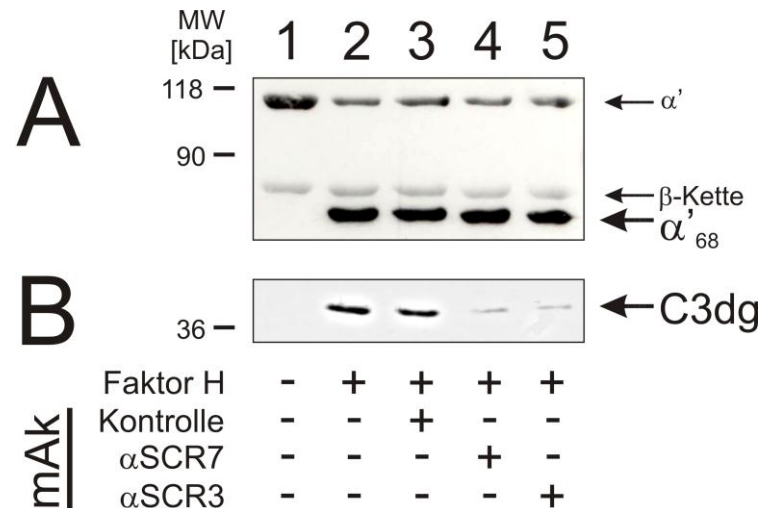


Abb. 4.23 Inhibition der Cofaktor-Aktivität von Faktor H durch Präinkubation mit anti-FH-mAk. FH-402Y wurde für 30 min bei RT mit einem fünffachen molaren Überschuss anti-FH-mAk inkubiert. C3b (150 µg/ml) wurde mit Faktor I (5 µg/ml) und 12,5 µg/ml (**A**) oder 100 µg/ml (**B**) des präinkubierten Faktor H versetzt. Die Reaktion wurde nach 2 min (**A**) oder nach 30 min (**B**) mit SDS-Probenpuffer und Mercaptoethanol gestoppt. Die C3b-Fragmente wurden mit einem 10%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (anti-C3-β-Kette) nachgewiesen, gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper. **1**, kein FH; **2**, FH ohne mAk; **3**, FH + Kontroll-mAk (T13/9); **4**, FH + αSCR7-mAk (16B3); **5**, FH + αSCR3-mAk (C18/3)

402Y-Epitop spezifische mAk 16B3 die Bildung des α'₆₈-Fragments. Abbildung 4.23 B zeigt den Einfluss der Antikörper-Blockade auf die C3dg-Generierung. Unter Verwendung des Kontrollantikörpers T13/9 ist keine Intensitätsabschwächung der Bande bei 37 kDa zu beobachten. Allerdings führte die Präinkubation von FH mit 16B3 und C18/3 zu einer deutlichen Abnahme der C3dg-Bildung.

4.7 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die C3dg-Bildung in Serum

Die Untersuchung der C3dg-Generierung in Serum kommt den biologischen Verhältnissen sehr viel näher, als in den zuvor in 4.6 beschriebenen experimentellen Bedingungen unter Verwendung aufgereinigter Proteine. Es wurde dazu das Komplementsystem im Serum mit Zymosan aktiviert und das neu gebildete C3dg mittels Immunoblot detektiert.

4.7.1 Abhängigkeit der C3dg-Generierung in Serum von der FH-Konzentration

Zu ΔFH-Serum wurde FH-402Y in aufsteigenden Konzentrationen (0-500 µg/ml) gegeben. Durch Resubstitution der divalenten Kationen in Form von CaCl₂ und MgCl₂ und Zugabe von 10 mg/ml Zymosan wurde die Komplementaktivierung im Serum gestartet. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 0,1 M EDTA

gestoppt. 1 μ l Serum wurde mit SDS-Probenpuffer vermengt, gekocht und in eine Tasche eines 10%igen Laemmli-Gels appliziert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen. C3dg wurde mittels Immunoblot mit dem mAk I3/15 und anschließend mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig nachgewiesen. Abbildung 4.24 verdeutlicht, dass auch die Generierung von C3dg in Serum strikt abhängig ist von der Anwesenheit des Cofaktors FH. Dabei führten FH-Konzentrationen unter 250 μ g/ml im Serum zu keiner nennenswerten C3dg-Generierung. Die FH-vermittelte Bildung von C3dg in Serum benötigt also die Anwesenheit von FH in hochphysiologischen Konzentrationen.

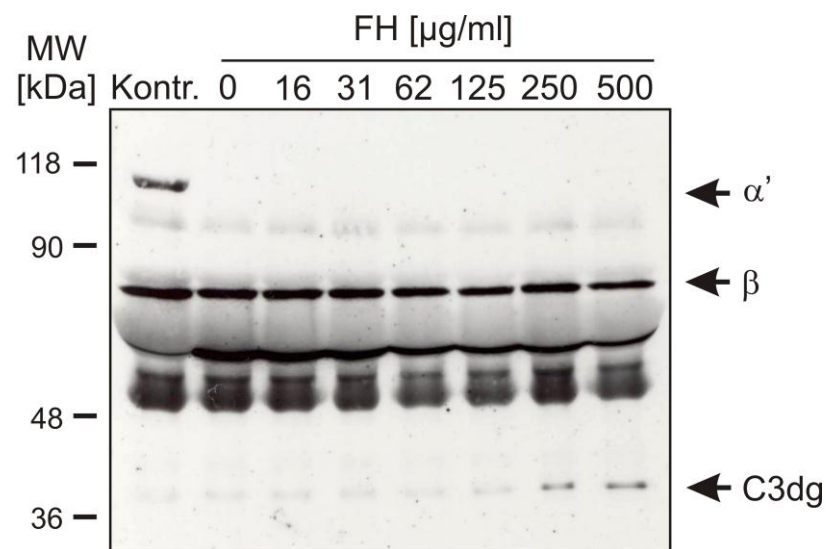


Abb. 4.24 Einfluss der FH-Konzentration auf die C3dg-Generierung in Serum. FH-402Y (0-500 μ g/ml) wurde zu Δ FH-Serum gegeben. Das Serum wurde mit je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie 10 mg/ml Zymosan versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. 1 μ l Serum wurde mit SDS-Probenpuffer vermengt. Die C3-Fragmente im Serum wurden anschließend in einem 10%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (anti-C3- β -Kette) nachgewiesen, gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper.

4.7.2 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die C3dg-Generierung in Serum

Zu Δ FH-Serum wurden entweder 250 μ g/ml gepoolter FH-402Y oder FH-402H gegeben. CaCl_2 und MgCl_2 wurden resubstituiert und durch Zugabe von 10 mg/ml Zymosan das Komplementsystem im Serum aktiviert. Das Serum wurde bei 37°C inkubiert und die Reaktion nach 1 h, 2 h und 4 h mit 0,1 M EDTA abgestoppt. 1 μ l Serum wurde mit SDS-Probenpuffer vermengt, gekocht und in eine Tasche eines 10%igen Laemmli-Gels gegeben. Die anschließende Elektrophorese erfolgte unter nicht reduzierenden Bedingungen. C3dg wurde im Immunoblot mit dem mAk I3/15 nachgewiesen. Die Intensität der C3dg-Bande im Blot wurde densitometrisch gemessen. Der Immunoblot ist in Abbildung 4.25 mit der zugehörigen densitometrischen Auswertung dargestellt. In Anwesenheit von FH-402H wurde

signifikant weniger C3dg im Serum gebildet als in Anwesenheit von FH-402Y. So betrug der nach 4 h mit FH-402H ermittelte Wert für C3dg nur $36,5 \pm 14,2$ % des für FH-402Y ermittelten Wertes. Der in 4.6.3 beschriebene Befund konnte somit in Serum reproduziert werden.

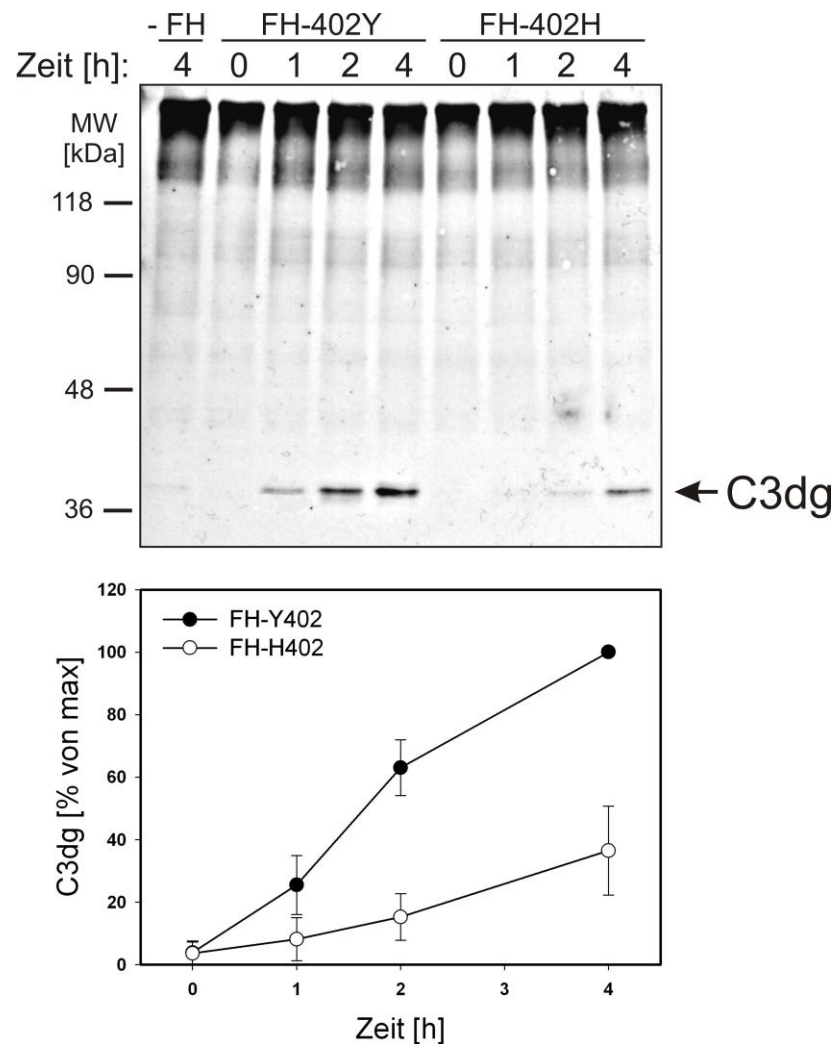


Abb. 4.25 Generierung von C3dg in Serum in Anwesenheit von FH-402Y oder FH-402H. Gepoolter FH-402Y oder FH-402H (200 $\mu\text{g/ml}$) wurden zu ΔFH -Serum gegeben. Das Serum wurde mit je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} sowie 10 mg/ml Zymosan versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit EDTA gestoppt. 1 μl Serum wurde mit SDS-Probenpuffer vermengt. Die C3-Fragmente im Serum wurden anschließend in einem 10%igen Laemmli-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblot mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (anti-C3- β -Kette) nachgewiesen, gefolgt von Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig als Sekundärantikörper. Die Intensität der C3dg-Bande wurde densitometrisch bestimmt. Die ermittelten Intensitäten wurden auf den 4 h-Wert bei Verwendung von FH-402Y normalisiert. Die Symbole im unteren Teil der Abbildung stehen für die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten.

4.7.3 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die C3dg-Generierung in unmodifizierten Seren von Einzelspendern

In einem weiteren Experiment wurden unmodifizierte Seren von einzelnen Spendern benutzt, die homozygot für eine der polymorphen FH-Varianten sind. Die Komplementkaskade wurde durch Zugabe von 10 mg Zymosan/ml in Gang gesetzt. Die Aktivierung erfolgte über 2 Stunden bei 37°C, wonach die Reaktion mit 0,1 M EDTA abgestoppt wurde. 1 µl Serum wurde mit SDS-Probenpuffer vermengt, gekocht und in eine Tasche eines 10%igen Laemmli-Gels appliziert. Die C3b-Fragmente wurden elektrophoretisch unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Das C3dg-Fragment wurde mittels Immunoblot mit dem mAk I3/15 nachgewiesen und die Intensität der Bande densitometrisch gemessen. Anhand eines ebenfalls auf das Gel aufgetragenen C3dg-Standards wurde die C3dg-Konzentration im jeweiligen Serum ermittelt. Parallel dazu wurden die Konzentrationen von FH, C3, iC3b, und weiteren Komplementaktivierungsprodukten in denselben Seren mittels ELISA gemessen. Alle ermittelten Daten sind in Abbildung 4.26 zusammengefasst. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass in den Seren derjenigen Spender, die homozygot für die Histidin-Variante sind, im Durchschnitt signifikant weniger C3dg nach Aktivierung gemessen wurde als in den Seren der für Tyrosin homozygoten Spender. Im Einklang damit stehen die in den aktivierten Seren gemessenen iC3b-Konzentrationen. Diese sind

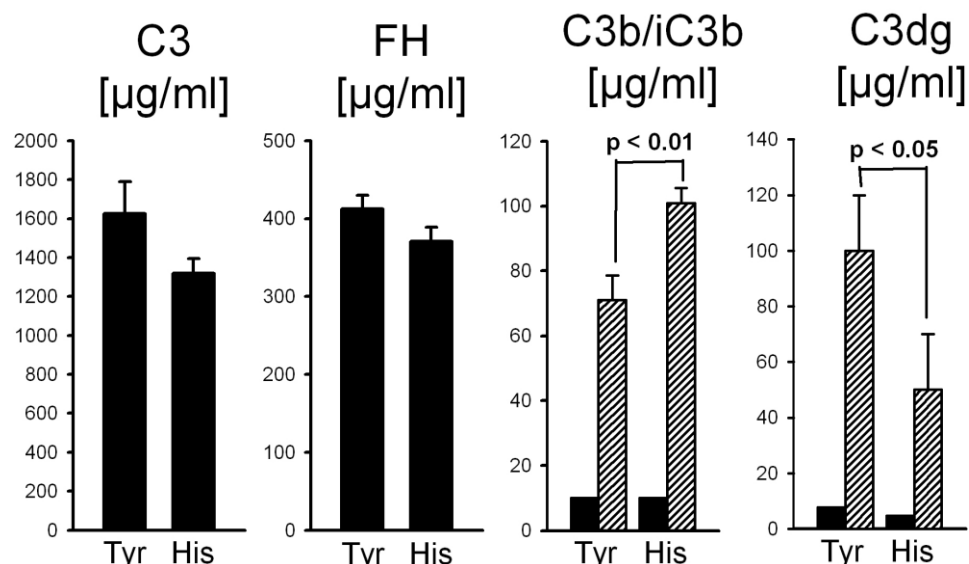


Abb. 4.26 C3-Prozessierung in unmodifizierten Seren von Einzelspendern. Seren von Einzelspendern, die entweder homozygot für FH-402Y (n=7) oder FH-402H (n=8) sind, wurden mit 10 mg/ml Zymosan versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der C3dg-Konzentration wurden 1 µl aktiviertes Serum von jedem Spender, sowie ein C3d-Standard auf ein 10%iges Laemmli-Gel aufgetragen. Die C3-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und C3dg im Immunoblot mit dem mAk I3/15 nachgewiesen. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch gemessen und anhand des C3d-Standards auf µg/ml umgerechnet. iC3b in den Zymosan-aktivierten Seren, sowie C3 und FH im Ausgangsmaterial wurden mittels ELISA gemessen. Schwarze Balken: nicht aktiviertes Serum; schraffierte Balken: Serum nach Aktivierung mit Zymosan

entsprechend niedriger in den Seren der FH-402Y-Spender als in denen der FH-402H-Spender. Beide Befunde sprechen für eine reduzierte Aktivität von FH-402H als Cofaktor für die Prozessierung von iC3b zu C3dg. Es ist allerdings zu beachten, dass in den Seren der FH-402H-Spender um ca. 20% geringere Ausgangskonzentrationen C3 gemessen wurden. Die FH-Konzentrationen sind im Durchschnitt in beiden Spendergruppen annähernd gleich. Aus diesen Untersuchungen kann zusammenfassend geschlossen werden, dass neben der FH-Konzentration der Y402H-Genotyp die Effektivität der Umwandlung von iC3b in C3dg in Serum entscheidend bestimmt.

4.8 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Cofaktor-Aktivität auf Zelloberflächen

Die Cofaktor-Aktivität von FH-402Y und FH402H auf Zelloberflächen wurde an RBL-Zellen untersucht. Diese Zellen tragen keine membranständigen Regulatoren, die mit dem humanen Komplementsystem interagieren und lassen sich daher durch Inkubation in humanem Serum mit C3b beladen. Die Prozessierung des membrangebundenen C3b wurde mittels FACS quantifiziert. Dabei wurden zwei verschiedene mAk in der FACS-Färbung eingesetzt. Der mAk B3/6 bindet die C3- β -Kette. Mit ihm konnte die Umwandlung von iC3b in C3dg durch Verlust des β -Ketten-Signals registriert werden. Der gegen C3b/iC3b/C3dg gerichtete mAk I3/15 bindet an die α -Kette und diente als Kontrollantikörper (Abb.4.27).

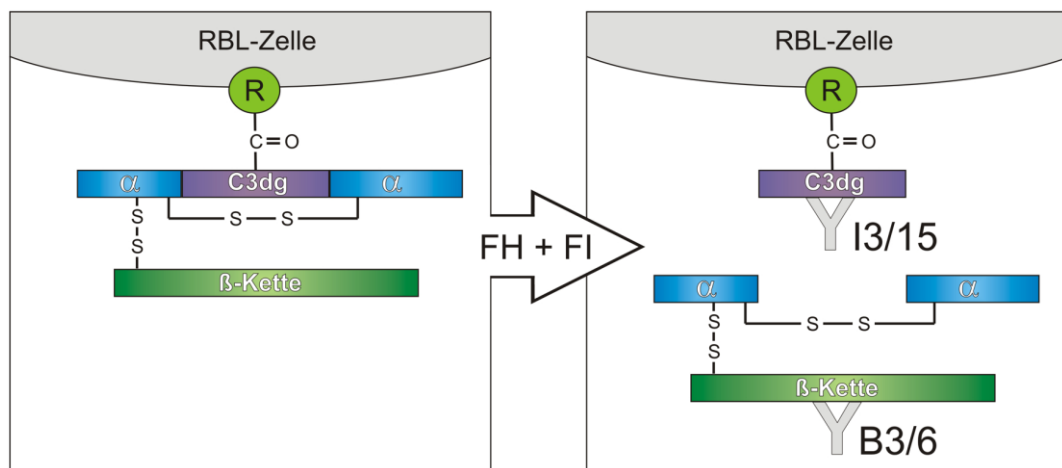


Abb. 4.27 Nachweisprinzip von C3dg auf RBL-Zellen. C3b ist über die α -Kette kovalent an Aminosäurereste (®) von Oberflächenproteinen der RBL-Zelle gebunden. Nach Inkubation der Zellen mit FH und Faktor I entstehen die finalen C3-Fragmente C3dg und C3c, welches in den Überstand freigelassen wird. C3dg bleibt an der Zelloberfläche gebunden. Die C3-Fragmente wurden mit dem mAk I3/15, der ein konvertiertes Epitop auf C3b, iC3b und C3dg erkennt, und dem anti- β -Ketten-mAk B3/6 nachgewiesen. Die Überführung von C3b/iC3b in C3dg ist somit durch die Abnahme des B3/6-Signals auf den RBL-Zellen mittels FACS festzustellen.

4.8.1 Beladung von RBL-Zellen mit C3b

Um die Prozessierung von C3b auf Zelloberflächen untersuchen zu können, mussten die Zellen zuerst mit Komplement beladen werden. Dies erfolgte durch Inkubation der Zellen in Serum. RBL-Zellen wurden mit Trypsin/EDTA vom Boden einer Zellkulturflasche gelöst, gezählt und mit HBSS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wurde Serum in einer Endverdünnung von 1:10 auf die Zellsuspension gegeben. Zur Kontrolle wurde in einem weiteren Ansatz über 1 h bei 56°C hitzeinaktiviertes Serum ebenfalls in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Nach 5 min bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von HBSS/EDTA gestoppt und die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen. C3b wurde auf den RBL-Zellen mit den mAk I3/15 (α -C3b/iC3b/C3dg) und B3/6 (α -C3b- β -Kette) nachgewiesen. Zum Sekundärnachweis wurde FITC-konjugierter Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper verwendet. C3b auf den Zellen wurde durchflusszytometrisch gemessen. Im oberen Anteil der Abbildung 4.28 sind Daten für den C3b-Nachweis mit dem mAk I3/15, im unteren Anteil die Daten für den Nachweis mit dem mAk B3/6 dargestellt. In beiden Fällen ist nach Inkubation der RBL-Zellen mit hitzeinaktiviertem Serum kein Anstieg des Signals zu detektieren. Nach Inkubation der

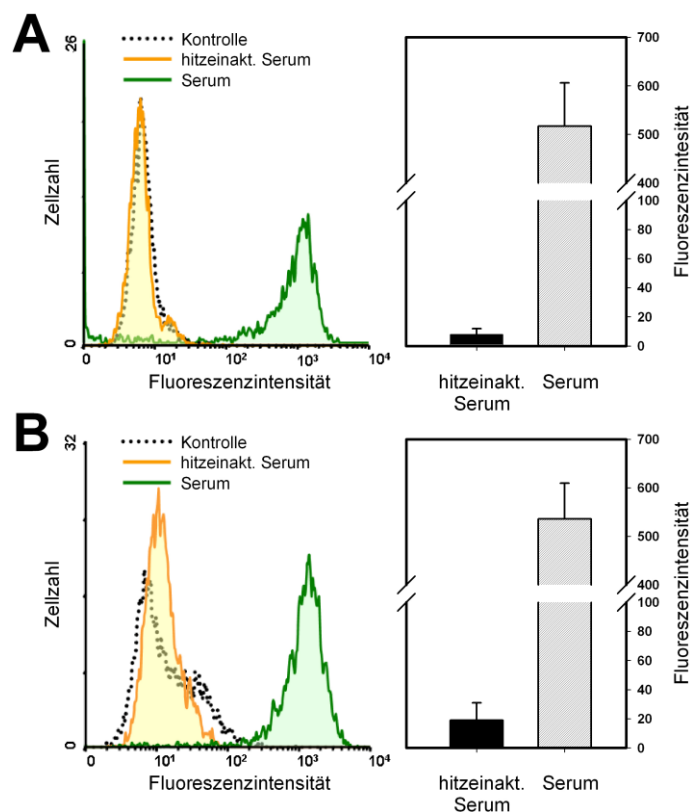


Abb. 4.28 Beladung von RBL-Zellen mit C3b. RBL-Zellen wurden entweder mit unbehandeltem oder hitzeinaktivierten Serum in einer Verdünnung von 1:10 in HBSS⁺⁺ für 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. C3b wurde entweder mit dem mAk I3/15 (α -C3b/iC3b/C3dg, **A**) oder B3/6 (α -C3b- β -Kette, **B**), gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-FITC-Konjugat auf den Zellen nachgewiesen. Die FITC-Fluoreszenzintensität wurde durchflusszytometrisch quantifiziert.

Zellen mit Serum ist eine durchschnittliche Fluoreszenz von jeweils über 600 nachweisbar. Die C3b-Beladung erfolgte demnach spezifisch durch Aktivierung des Komplementsystems. Diese unterbleibt nach wärmebedingter Zerstörung hitzelabiler C3-Konvertasen in hitzeinaktiviertem Serum.

4.8.2 Kinetik der C3dg-Generierung auf Zelloberflächen in Anwesenheit von FH-402Y oder FH-402H

C3b-beladene Zellen wurden in HBSS⁺⁺ gewaschen und mit 20 µg/ml Faktor I und 100 µg/ml FH-402Y oder FH-402H bei 37°C inkubiert. Bei einem Ansatz wurde nur Faktor I und kein FH auf die Zellen gegeben. Die Reaktion wurde nach 15 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min mit FACS-Puffer abgestoppt. Kurz vor dem Abstoppen wurden die Zellen zentrifugiert, um Überstand zu gewinnen. 20 µl dieses Überstandes wurden mit 40 µl SDS-Probenpuffer mit Mercaptoethanol vermengt, bei 99°C gekocht und schließlich auf ein 10%iges Laemmli-Gel aufgetragen. Die C3-β-Kette im Überstand wurde mit dem mAk B3/6 im Immunoblot nachgewiesen. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die C3b-Fragmente auf den Zellen mit den mAk I3/15 (anti-C3b/iC3b/C3dg) oder B3/6 (anti-C3b-β-Kette) markiert. Zum Sekundärnachweis wurde FITC-konjugierter Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper verwendet.

In Abbildung 4.29 A ist die Abnahme des Fluoreszenzsignals für die mit B3/6 nachgewiesene C3b-β-Kette dargestellt. Abbildung 4.29 C zeigt die Daten eines repräsentativen Experiments für die Zeitpunkte 15 min und 180 min. In Anwesenheit von FH-402Y oder FH-402H nimmt das B3/6-Signal deutlich stärker ab als in Abwesenheit von FH. FH war folglich imstande, als Cofaktor für die FI-vermittelte C3dg-Generierung auf Zelloberflächen zu dienen. FH-402Y und FH-402H unterscheiden sich dabei nicht in ihrer Cofaktor-Aktivität. Denselben Schluss lässt auch der in Abbildung 4.30 dargestellte Immunoblot zu. Er zeigt den Nachweis der in den Überstand freigesetzten C3-β-Kette. Erfolgte die C3dg-Generierung auf den RBL-Zellen mit FH als Cofaktor, so ließ sich im Überstand tendenziell mehr C3-β-Kette detektieren. Auch hierbei unterschieden sich FH-402Y und FH-402H nicht voneinander. Sowohl aus den FACS-Daten als auch aus dem Blot geht hervor, dass auch in Abwesenheit von FH C3-β-Kette in den Überstand freigesetzt wurde. Wurde mittels FACS C3b/iC3b/C3dg auf den RBL-Zellen mit dem mAk I3/15 nachgewiesen, so zeigte sich über die Zeit ebenfalls eine Reduktion des Signals (Abb 4.27 B,D). Dabei entspricht die Abnahme des I3/15-Signals sowohl in An- als auch in Abwesenheit von FH der Entwicklung des B3/6-Signals in Abwesenheit von FH (Abbildung 4.27 A). Dies spricht für ein unspezifisches Ablösen von C3b-Molekülen (möglicherweise auch in externalisierten Membranvesikeln) von den RBL-Zellen im Verlauf der Reaktion.

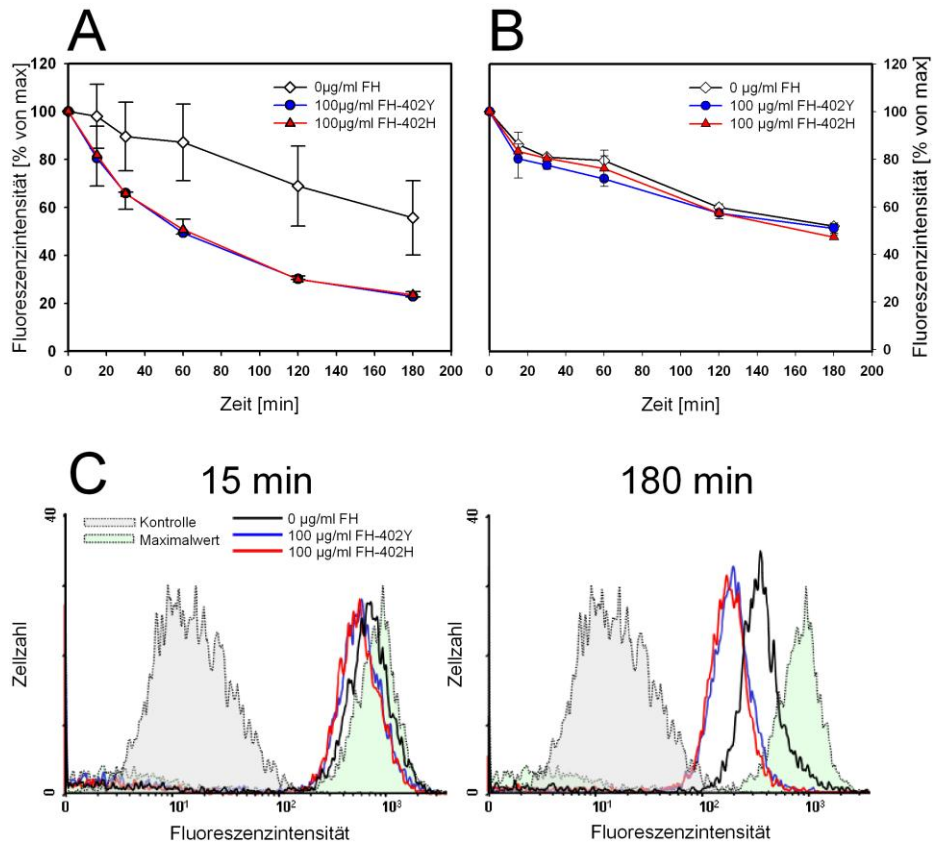


Abb. 4.29 Zeitabhängige C3dg-Generierung auf RBL-Zellen in Anwesenheit von FH-402Y und FH-402H. RBL-Zellen wurden durch Inkubation in Serum mit C3b beladen und anschließend mit Faktor I (20 µg/ml) und entweder gepooltem FH-402Y oder FH-402H (100 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit FACS-Puffer abgestoppt. Die C3b-Fragmente wurden entweder mit dem mAk B3/6 (α -C3b- β -Kette, **A,C**) oder I3/15 (α -C3b/iC3b/C3dg, **B**), gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-FITC-Konjugat auf den Zellen nachgewiesen. Die FITC-Fluoreszenzintensität wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Symbole stehen für die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten.

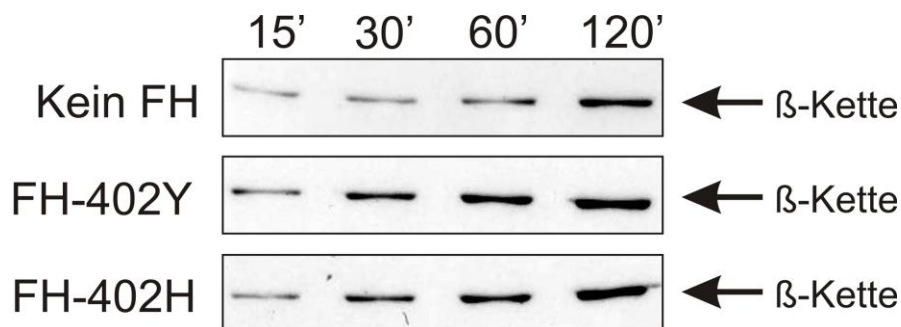


Abb. 4.30 Nachweis von C3- β -Kette im Überstand von C3b-beladenen RBL-Zellen nach Inkubation mit FI und FH-402Y / FH-402H. RBL-Zellen wurden durch Inkubation in Serum mit C3b beladen und anschließend mit Faktor I (20 µg/ml) und entweder gepooltem FH-402Y oder FH-402H (100 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Zellsuspension zentrifugiert, um Überstand zu gewinnen. 20 µl des Überstandes wurden mit SDS-Probenpuffer und Mercaptoethanol vermischt und auf ein 10%iges Laemmli-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die C3- β -Kette im Überstand wurde mit dem mAk B3/6 gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-FITC-Konjugat nachgewiesen.

4.8.3 C3dg-Generierung auf Zelloberflächen in Abhängigkeit von der FH-Konzentration

C3b-beladene Zellen wurden in HBSS⁺⁺ gewaschen und mit 20 µg/ml Faktor I und FH-402Y oder FH-402H bei 37°C für 2 h inkubiert. Dabei wurden aufsteigende FH-Konzentrationen von 0-200 µg/ml eingesetzt. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die C3b-Fragmente auf den Zellen mit den mAk B3/6 (α -C3b- β -Kette), und FITC-konjugiertem Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper als Sekundärantikörper nachgewiesen. Wie in Abbildung 4.31 dargestellt, war eine konzentrationsabhängige Freisetzung von C3- β -Kette von der Zelloberfläche festzustellen. So sank die Fluoreszenzintensität des B3/6-Signals in Anwesenheit von 200 µg/ml FH-402Y auf $56,4 \pm 1,6$ % des Ursprungswertes. Dabei scheint tendenziell FH-402H ein potenterer Cofaktor für die C3dg-Generierung zu sein als FH-402Y. Der registrierte Unterschied erweist sich allerdings nur bei einer FH-Konzentration von 100 µg/ml als signifikant ($p=0,016$). Mit I3/15 nachgewiesenes C3b/iC3b/C3dg blieb unabhängig von der FH-Konzentration konstant auf den RBL-Zellen exprimiert.

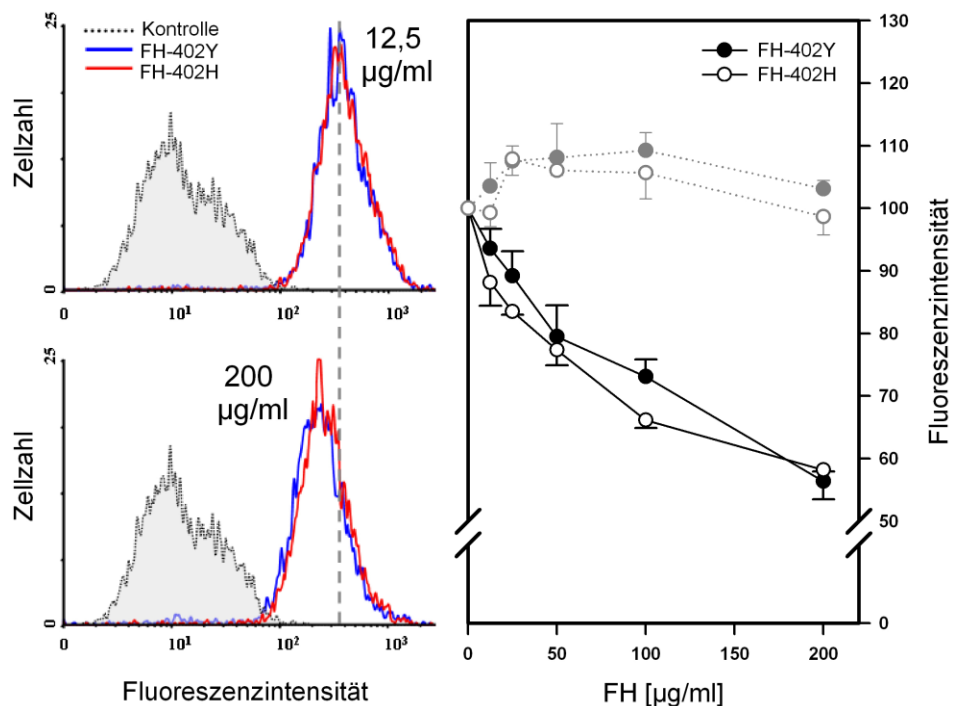


Abb. 4.31 Konzentrationsabhängige C3dg-Generierung auf RBL-Zellen in Anwesenheit von FH-402Y und FH-402H. RBL-Zellen wurden durch Inkubation in Serum mit C3b beladen und anschließend mit Faktor I (20 µg/ml) und entweder gepooltem FH-402Y oder FH-402H (0-200 µg/ml) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach 2 h mit FACS-Puffer abgestoppt. Die C3b-Fragmente wurden entweder mit dem mAk B3/6 (α -C3b- β -Kette, durchgezogene Linien und Histogramm) oder I3/15 (α -C3b/iC3b/C3dg, gepunktete Linie), gefolgt von einem Ziege-anti-Maus-Ig-FITC-Konjugat auf den Zellen nachgewiesen. Die FITC-Fluoreszenzintensität wurde im Durchflusszytometer gemessen. Die Symbole stehen für die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung aus 3 Experimenten.

4.9 Bestimmung von Komplement-Aktivierungsprodukten in den Plasmen gesunder Probanden und AMD-Patienten

In Zymosan-aktivierten Seren konnten in Abhängigkeit vom Y402H-Genotyp unterschiedliche C3dg-Konzentrationen gemessen werden (s. Abb. 4.24), welche auf unterschiedliche Cofaktor-Aktivitäten der beiden FH-Varianten zurückzuführen sind. Ebenso weist die Variante FH-402H im Vergleich zu FH-402Y eine eingeschränkte CRP-Bindung auf (s. Abb. 4.9). Um zu untersuchen, ob die zuvor beschriebenen Funktionsunterschiede von FH-402Y und FH-402H die Konzentrationen weiterer Aktivierungsparameter des alternativen Komplementweges in nicht aktivierten Plasmen gesunder Probanden beeinflussen, wurden diese mittels sensitiver ELISA-Verfahren gemessen. Da mehrere Studien auf ein lokales Entzündungsgeschehen im Auge bei AMD-Patienten hinweisen und genetische Untersuchungen eine besondere Bedeutung des alternativen Komplementweges bei AMD nahe legen, sollte in dieser Arbeit des Weiteren untersucht werden, ob sich bei AMD-Patienten auch unabhängig vom FH-Genotyp Anzeichen einer systemischen Komplementaktivierung beobachten lassen. Hierzu wurden die Konzentrationen verschiedener Aktivierungsparameter des alternativen Komplementweges in den Plasmen von AMD-Patienten und Augengesunden Probanden mittels ELISA gemessen und miteinander verglichen.

4.9.1 Einfluss des Krankheitsstatus auf die Konzentration der Komplement-Aktivierungsprodukte

Die Teilnehmer an dieser Studie wurden von der Universitätsaugenklinik Bonn (Direktor: Prof. Holz) rekrutiert und fundoskopisch untersucht. Die Studienpopulation

	Kontrollen	AMD-Patienten
Gesamt (n)	67	112
Männlich (n)	37	41
Weiblich (n)	30	71
Alter (Jahre)	70,1 ± 5,9	75,6 ± 6,6
Kreatinin [mg/dl]	0,91 ± 0,18	0,98 ± 0,37
AMD-Phänotyp		
Drusen	-	9
GA	-	25
CNV	-	78
Y402H-Genotyp		
Tyr/Tyr (T/T)	27	20
Tyr/His (T/C)	32	56
His/His (C/C)	8	36

Tab. 4.3 Zusammenstellung der Studienpopulation

umfasste 112 AMD-Patienten und 67 Augen-gesunde Kontrollen, die fundoskopisch keine AMD-Merkmale aufwiesen. Geschlechts- und Altersverteilung sowie der Raucherstatus sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Durch die zusätzliche Bestimmung der Serum-Kreatinin-Werte wurden mögliche Einschränkungen der Nierenfunktion erfasst, die einen Einfluss auf die Plasmakonzentration renal katabolisierter Proteine (Faktor D, Ba) hätten haben können. Allen Probanden wurde unter standardisierten Bedingungen EDTA-Plasma und Vollblut entnommen. Mit den in Tab. 3.4 (S. 44) beschriebenen Sandwich-ELISA-Verfahren wurden Plasmakonzentrationen von Substraten, Aktivierungsprodukten, sowie Regulatoren des alternativen Komplementweges gemessen. Die Plasma-Konzentrationen besonders derjenigen Aktivierungsprodukte, die eine chronische Komplementaktivierung anzeigen (Ba, actC3), waren bei AMD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 4.33). Des Weiteren konnten bei den AMD-Patienten (wenn auch mit geringerer Signifikanz) erhöhte Konzentrationen der Anaphylotoxine C3a und C5a gemessen werden, die schnell aus der Zirkulation eliminiert werden (Abb. 4.33). Eine Komplementaktivierung in den Plasmen der Patienten im Vergleich zu den Kontrollen kann nicht durch unterschiedliche Konzentrationen von FH oder den Substraten C3 und C4 erklärt werden (Abb. 4.32 und 4.33). Die Plasmakonzentrationen von Faktor D und Faktor B waren bei AMD-Patienten signifikant erhöht (Abb. 4.32 und 4.33).

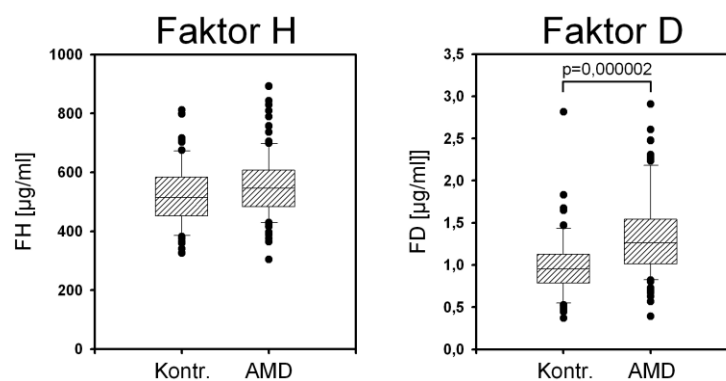


Abb. 4.32 Faktor H- und Faktor D-Konzentrationen in Plasmen von AMD-Patienten. In den Plasmen von 112 AMD-Patienten und 62 nicht an AMD erkrankten Personen wurden die FH- bzw die FD-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt.

4.9.2 Einfluss des FH-Genotyps auf die Konzentration der Komplement-Aktivierungsprodukte

Die Genotypisierung aller Probanden hinsichtlich des Y402H-Polymorphismus, sowie weiterer FH-Polymorphismen wurde freundlicherweise durch Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Weber) übernommen. Tabelle 4.4 ist zu entnehmen, dass Plasmen gesunder Spender, die entweder homozygot für FH-402Y oder FH-402H waren, annähernd gleiche FH- oder Faktor-D-Konzentrationen aufwiesen. Ebenso wenig war der Austausch von Tyrosin gegen

Histidin in Position 402 des FH-Proteins mit einer messbaren Änderung der Konzentrationen verschiedener Komplementsubstrate bzw. –aktivierungsprodukte assoziiert. Auch eine Erhöhung der iC3b-Konzentration, wie sie in Zymosan-aktivierten Seren von FH-402H-Spendern beobachtet wurde und die durch die eingeschränkte

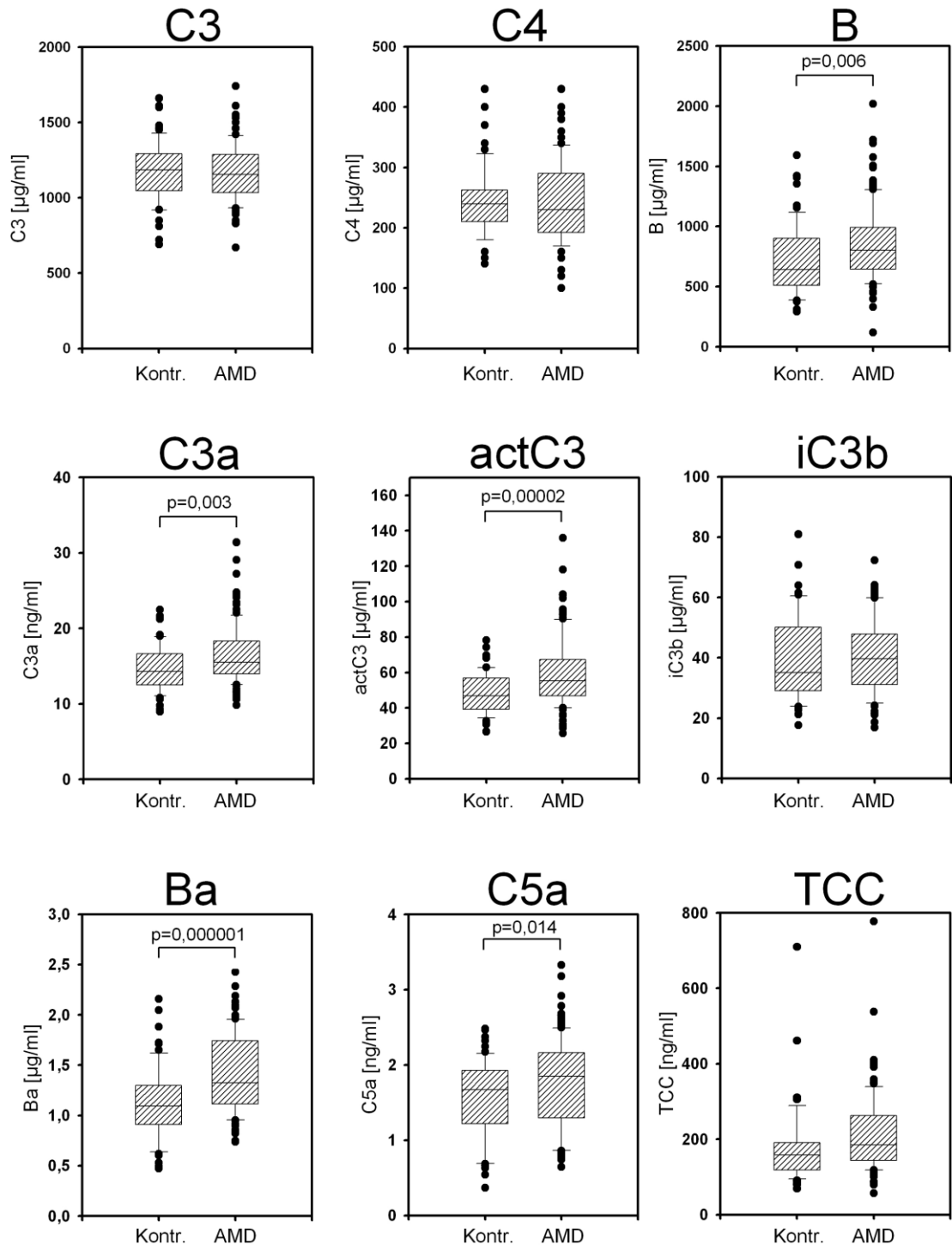


Abb. 4.33 Plasmakonzentrationen von Komplementsubstraten und Aktivierungsprodukten bei AMD-Patienten. In den Plasmen von 112 AMD-Patienten und 62 nicht an AMD erkrankten Personen wurden die Konzentrationen der Komplementsubstrate C3, C4 und B, sowie der Aktivierungsprodukte C3a, actC3, iC3b, Ba, C5a und TCC mittels ELISA bestimmt.

Cofaktor-Aktivität dieser FH-Variante erklärt werden kann, konnte in den nicht aktivierten Plasmen nicht festgestellt werden. Diese Daten stützen die Annahme einer allein durch den Y402H-Polymorphismus determinierten systemischen Komplementaktivierung nicht. Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob die Kombination mehrerer Risikopolymorphismen im FH-Gen einen nachweisbaren Effekt auf die Konzentrationen verschiedener Komplementaktivierungsparameter im Plasma haben könnte. Eine Haplotypenanalyse der Studienpopulation (freundlicherweise durchgeführt von Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Universität Regensburg), die neben dem Y402H-Polymorphismus fünf weitere FH-Polymorphismen einschloss, identifizierte einen Risikohaplotypen (GCGGGC), sowie zwei protektive Haplotypen (ATGAAC und GTGAAC; s. Tab. 4.5). Um einen direkten Zusammenhang zwischen genetischen Variationen von FH und den Aktivitätsmarkern des alternativen Komplementweges zu untersuchen, wurden Plasmakonzentrationen der einzelnen Aktivierungsprodukte zwischen Trägern des Risikohaplotyps und Trägern der protektiven Haplotypen miteinander verglichen, und zwar sowohl innerhalb des Kontroll- als auch innerhalb der Patientenkollektivs. Wie in Tabelle 4.6 zu sehen ist, wurden in beiden Kollektiven bei Trägern des Risikohaplotyps durchgehend signifikant höhere Konzentrationen der Komplement-Aktivierungsprodukte gemessen, im Vergleich zu Trägern der protektiven Haplotypen. Einzige Ausnahme ist hierbei die C5a-Konzentration, welche im Patientenkollektiv bei Trägern des Risikohaplotypen nicht erhöht war.

Parameter	Einheit	Genotyp		
		Tyr/Tyr (n=27)	Tyr/His (n=32)	His/His (n=8)
C3	mg/ml	1,14 ± 0,04	1,20 ± 0,03	1,15 ± 0,05
C4	mg/ml	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Faktor B	µg/ml	669 ± 48	791 ± 55	643 ± 92
Faktor H	µg/ml	516 ± 23	533 ± 18	517 ± 33
Factor D	µg/ml	0,89 ± 0,07	1,09 ± 0,07	1,03 ± 0,09
C3a	ng/ml	14,5 ± 0,58	14,8 ± 0,58	15,0 ± 0,94
C5a	ng/ml	1,48 ± 0,10	1,59 ± 0,09	1,67 ± 0,18
Ba	µg/ml	1,07 ± 0,07	1,15 ± 0,06	1,17 ± 0,11
actC3	µg/ml	46,2 ± 2,03	49,7 ± 1,83	47,7 ± 6,31
iC3b	µg/ml	38,5 ± 2,11	41,2 ± 2,78	32,7 ± 3,72
SC5b-9	ng/ml	322 ± 149	224 ± 34,2	148 ± 12,6

Tab. 4.4 Einfluss des Y402H-Genotyps auf Plasmakonzentrationen von Komplementregulatoren, -substraten und -aktivierungsprodukten bei gesunden Probanden.

FH-Polymorphismus	FH-Haplotypen		
	Haplotyp 1 (Risikohaplotyp)	Haplotyp 2 (protektiv)	Haplotyp 3 (protektiv)
rs800292 (I62V)	G	A	G
rs1061170 (Y402H)	C	T	T
rs1048663 (IVS 9)	G	G	G
rs2274700 (A473A)	G	A	A
rs412852 (IVS 15)	G	A	A
rs11582939 (IVS 18)	C	C	C

Verteilung			
AMD-Patienten	57%	12%	8%
Kontrollen	36%	23%	18%

Tab. 4.5 FH-Polymorphismen sowie Risiko- und protektive FH-Haplotypen innerhalb der Studienpopulation.

Parameter	Kontrollen			AMD-Patienten		
	Gesamt (n=67)	Risiko- Haplotyp (n=17)	Protekt. Haplot. (n=23)	Gesamt (n=112)	Risiko- Haplotyp (n=67)	Protekt. Haplot. (n=16)
Ba [$\mu\text{g/ml}$]	1,21 \pm 0,04	1,21 \pm 0,25	1,04 \pm 0,08	1,41 \pm 0,04	1,46 \pm 0,05	1,27 \pm 0,11
actC3 [$\mu\text{g/ml}$]	48,1 \pm 1,40	50,9 \pm 3,71	45,4 \pm 2,34	59,1 \pm 1,80	60,6 \pm 2,11	52,7 \pm 4,88
C3a [ng/ml]	14,7 \pm 0,38	15,3 \pm 0,70	14,0 \pm 0,62	16,4 \pm 0,37	16,6 \pm 0,53	15,3 \pm 0,89
C5a [ng/ml]	1,55 \pm 0,06	1,64 \pm 0,12	1,46 \pm 0,11	1,77 \pm 0,06	1,72 \pm 0,07	1,86 \pm 0,16
Fakt. D [$\mu\text{g/ml}$]	0,98 \pm 0,04	1,04 \pm 0,05	0,85 \pm 0,07	1,35 \pm 0,05	1,38 \pm 0,06	1,26 \pm 0,12

Tab. 4.6 Abhängigkeit der Konzentrationen einzelner Komplementregulatoren und -aktivierungsprodukte vom FH-Haplotyp bei Kontrollen und AMD-Patienten.

5. Diskussion

Faktor H (FH) ist der wichtigste Regulator der Komplementaktivierung über den alternativen Weg in der flüssigen Phase (Zipfel et al. 1999, Zipfel und Skerka 2009). Hierzu bindet FH an Polyanionen, Zelloberflächen, CRP und C3b und beschleunigt den Zerfall der bimolekularen C3-Konvertase C3bBb (Rodríguez de Córdoba et al. 2004). Zudem ist FH Cofaktor von Faktor I (FI), einer löslichen Protease, die den Abbau von C3b katalysiert. Assoziationsstudien des gesamten menschlichen Genoms sowie detaillierte Analysen der Region 1q32 identifizierten Polymorphismen innerhalb des FH-Gens (*HF1*), die mit einem erhöhten Risiko für die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) einhergehen (Edwards et al. 2005, Hageman et al. 2005, Haines et al. 2005, Klein et al. 2005, Zarepari et al. 2005, Li et al. 2006). Einer dieser AMD-Risikopolymorphismen führt im FH-Molekül zum Austausch von Tyrosin gegen Histidin an Position 402 (Y402H) (Edwards et al. 2005, Hageman et al. 2005, Haines et al. 2005, Klein et al. 2005, Zarepari et al. 2005). Die Aminosäure 402 ist auf der siebten von insgesamt 20 *Short-Consensus-Repeat*-Domänen (SCR) lokalisiert, welche u.a. an der Bindung von FH an Glycosaminoglycane, C-reaktives Protein (CRP) und Streptokokkenprotein M beteiligt ist (Giannakis et al. 2001).

Der Y402H-Polymorphismus in *HF1* und weitere Komplement-Polymorphismen, die das individuelle Risiko für AMD erhöhen (Gold et al. 2006, Li et al. 2006, Hughes et al. 2006, Yates et al. 2007), wurden als Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen dieser Augenerkrankung und dem alternativen Weg des Komplementsystems interpretiert. Ein Beweis für diese Annahme konnte aber bisher noch nicht erbracht werden. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass der Austausch von Tyrosin gegen Histidin an Position 402 des FH-Moleküls die Funktion von FH als Komplementregulator beeinflussen könnte. Eine mögliche Folge davon könnte eine verstärkte systemische Aktivierung des Alternativweges des Komplementsystems sein, was in Einklang mit den derzeitigen pathophysiologischen Konzepten der AMD stehen würde (Donoso et al. 2006, Kijlstra et al. 2005, Anderson et al. 2010). Der Nachweis eines derartigen biochemisch-funktionellen Effekts des Y402H-Polymorphismus könnte zu einem besseren Verständnis der Bedeutung von FH-Polymorphismen bei der AMD beitragen. Zur Prüfung der Arbeitshypothese wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen drei Ziele verfolgt:

1. Die Untersuchung des Einflusses des Y402H-Polymorphismus auf die Interaktion von FH mit seinen Liganden, sowie auf seine Komplementregulatorische Aktivität.
2. Die funktionelle Charakterisierung des polymorphen FH-Epitops 402 mittels monoklonaler Antikörper.

3. Der Nachweis einer systemischen Komplementaktivierung bei Trägern der FH-Variante FH-402H bzw. bei AMD-Patienten als Indikator einer eingeschränkten Komplementkontrolle *in vivo*.

Wesentliches Werkzeug für den experimentellen Teil dieser Arbeit waren reine FH-402Y- und FH-402H-Präparate, die mittels anti-FH-Immunaффinitätschromatographie aus den Plasmen zuvor genotypisierter gesunder Spender gewonnen wurden (4.2.1, S. 61). Die Immunaффinitätschromatographie erlaubt im Gegensatz zu anderen Verfahren wie z.B. Ionenaustauschchromatographie (Sim und DiScipio 1982) die hocheffiziente und spezifische Isolation von FH in einem einzigen Schritt. Die Wahl eines geeigneten monoklonalen anti-FH-Antikörpers, mit dem die FH-Aufreinigung erfolgen sollte, fiel auf den zuvor in der Arbeitsgruppe Oppermann etablierten mAk L20/3, da dieser zum einen an ein Epitop auf FH bindet, welches weit vom polymorphen Aminosäurerest 402 entfernt ist und zum anderen eine besonders hohe Affinität zu FH besitzt. Die hergestellten FH-402Y- und FH-402H-Präparate wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf. Als einzige Kontaminanten waren geringe Mengen der FH-verwandten Proteine FHR-1 α und FHR-1 β nachweisbar, die in allen Präparaten gleichermaßen vorhanden waren (< 10%, s. Abb. 4.4). Diese Kontamination lässt sich dadurch erklären, dass FHR-1 α und FHR-1 β wie FH das Epitop DITSFPLSVYAP tragen und deshalb ebenso von dem anti-FH-mAk L20/3 erkannt werden (Oppermann et al. 2006). Allerdings konnte diese Verunreinigung der Präparate für das weitere experimentelle Vorgehen vernachlässigt werden, da FHR-1 α und FHR-1 β keine Komplement-regulatorische Aktivität wie FH besitzen (Zipfel und Skerka 1994).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit mehrere Publikationen erschienen, in denen ebenfalls Analysen der FH-Varianten FH-402Y und FH-402H bzw. FH-62I und FH-62V vorgestellt wurden (Clark et al. 2006, Laine et al. 2007, Sjöberg et al. 2007, Skerka et al. 2007, Yu et al. 2007, Tortajada et al. 2009). Auf Übereinstimmungen und Abweichungen dieser publizierten Daten mit bzw. von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird im Einzelnen weiter unten eingegangen. An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass die konkurrierenden Arbeitsgruppen ihre Daten in den meisten Fällen unter Verwendung rekombinanter FH-Proteinfragmente erhoben haben (Clark et al. 2006, Sjöberg et al. 2007, Yu et al. 2007). Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich intakte, native FH-Proteine verwendet. Da die Konformation des FH-Proteins und seine Interaktion mit Liganden komplex ist (DiScipio 1992, Perkins et al. 2002, Oppermann et al. 2006), entsprechen die Versuchsbedingungen unter Verwendung nativer Proteine sehr viel mehr den physiologischen Gegebenheiten als unter Verwendung rekombinanter Proteine. Zugleich ist zu beachten, dass die nativen FH-Präparate zwar homogen sind bezüglich des hier interessierenden Polymorphismus Y402H, an anderen Aminosäure-Positionen (z.B. I62V) jedoch u.U. voneinander abweichen. Daher wurden neben

gepoolten FH-Präparaten stets auch Präparate von typisierten Einzelspendern für alle Untersuchungen eingesetzt.

Neben der Herstellung reiner FH-Präparate war die Generierung monoklonaler anti-FH-Antikörper ein weiterer wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Unter Zuhilfenahme dieser mAk sollte das FH-Epitop 402 funktionell charakterisiert werden. Es sollte insbesondere untersucht werden, inwieweit die Aminosäure 402 direkt an der Interaktion mit den verschiedenen FH-Liganden bzw. an den einzelnen FH-Funktionen beteiligt ist. Es wurden daher monoklonale Antikörper (mAk) generiert, die spezifisch gegen eine Peptidsequenz unter Einschluss der Aminosäure 402 gerichtet sind. Die zur Immunisierung verwendeten Peptide enthielten entweder Tyrosin oder Histidin an der varianten Position. Auf diese Weise gelang es mAk herzustellen, die nicht nur das jeweilige Peptid, sondern auch hochspezifisch entweder nativen FH-402Y oder FH-402H banden (s. Abb. 4.5, S. 64). Kreuzreaktionen mit der jeweils anderen FH-Variante waren praktisch nicht zu verzeichnen (s. Abb. 4.5, S. 64). Außerdem kamen weitere zuvor etablierte mAk zum Einsatz, die gegen andere FH-Domänen gerichtet sind. Unter der Vorstellung, dass die Präinkubation von FH mit den mAk die Interaktion bestimmter FH-Liganden mit dem jeweiligen Epitop blockiert, konnten Rückschlüsse auf deren funktionelle Bedeutung gezogen werden.

Für die Interaktion von FH mit Polyanionen bzw. Heparin sind v.a. Arginin- und Lysinreste in SCR7 verantwortlich, die sich in unmittelbarer Nähe der Aminosäureposition 402 befinden (Giannakis et al. 2003). Strukturmodelle und kristallographische Daten legen zudem nahe, dass der Aminosäurerest 402 auf der Oberfläche von SCR7 exponiert ist und somit direkt an der Bindung von Heparin beteiligt sein könnte (Clark et al. 2006, Skerka et al. 2007, Prosser et al. 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diese Annahme. Die Präinkubation von FH mit den neu hergestellten epitopspezifischen anti-FH-402-mAk reduzierte die Bindung an Heparin in Näpfen einer ELISA-Platte signifikant (s. Abb. 4.8C, S. 69). Die Antikörper-vermittelte Blockade von SCR20 hatte einen noch stärkeren Effekt (s. Abb. 4.8C). Die besondere Bedeutung des C-Terminus für die Interaktion mit Glycosaminoglycanen und Zelloberflächen ist bekannt und wird auch anhand der Pathophysiologie des Hämolytisch Urämischen Syndroms (HUS) deutlich (Jokiranta et al. 2005). HUS-assoziierte Mutationen im FH-C-Terminus reduzieren die Bindung von FH an Heparin und verursachen dadurch eine komplementvermittelte Zellschädigung (Sánchez-Corral et al. 2002, Manuelian et al. 2003, Pickering und Cook 2008, Oppermann et al. 2006). Der additive Effekt, der durch gleichzeitige Blockade von Epitopen auf SCR7 und SCR20 erzielt wurde, deutet darauf hin, dass beide Domänen unabhängig voneinander an der Heparin-Bindung von FH beteiligt sind (s. Abb. 4.8C).

In dieser Arbeit wurde zudem die Bindung von FH an Glycosaminoglycane auf Zelloberflächen untersucht. Dabei hatte die Präinkubation von FH mit anti-SCR7-mAk

oder anti-SCR20-mAk auf die Bindung an RPE-Zellen denselben Effekt wie auf die Bindung an Festphasen-gebundenem Heparin (s. Abb. 4.12C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aminosäure 402 in SCR7 direkt an der Bindung von FH an Glycosaminoglycane beteiligt sein könnte. Daraus ergibt sich die Frage, welche Auswirkungen der Austausch von Tyrosin gegen Histidin an dieser Position auf die Interaktion zwischen FH und Heparin hat. Clark et al. konnten zeigen, dass der Y402H-Polymorphismus die Interaktion mit Heparin beeinflusst, diese aber zugleich auch von den Eigenschaften des Glycosaminoglycans abhängt (Clark et al. 2006). In dieser Arbeit wurden keine intakten Proteine, sondern Konstrukte bestehend aus den Domänen SCR6-8 verwendet. Das FH-Fragment mit Histidin an Position 402 band besser an unfraktioniertes Heparin als das Tyrosin-Konstrukt, wohingegen sich für die Bindung an niedermolekulares Heparin kein Unterschied beobachten ließ (Clark et al. 2006). Ebenso hatte der Sulfatierungsgrad des Glycosaminoglycans entscheidende Bedeutung für die Bindung der Histidin-Variante, allerdings kaum für die Bindung der Tyrosin-Variante (Clark et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden unfraktioniertes Heparin sowie nativer, d.h. FH in voller Länge (SCR1-20), verwendet. Im Gegensatz zu Clark et al. konnte keine stärkere Bindung von FH-402H im Vergleich zu FH-402Y an das Glycosaminoglycan nachgewiesen werden (s. Abb. 4.8). Dieses Ergebnis deckt sich mit denen zweier anderer Arbeitsgruppen (Laine et al. 2007, Yu et al. 2007). Es ist aber durchaus vorstellbar, dass im gesamten FH-Molekül ein Effekt des Y402H-Polymorphismus, wie er für die Konstrukte aus SCR6-8 beschrieben wurde (Clark et al. 2006), durch weitere Heparin-Bindungsstellen maskiert wird. Aufgrund der Daten in der vorliegenden Arbeit ist davon auszugehen, dass der Y402H-Polymorphismus zumindest auf die Heparin-Bindung von FH in voller Länge keinen Einfluss hat. Bei Verwendung von nativem FH banden beide FH-Varianten außerdem gleichermaßen gut an RPE-Zellen (s. Abb. 4.12). Abweichend von den eigenen Ergebnissen und denen anderer Arbeitsgruppen (Clark et al. 2006, Laine et al. 2007, Yu et al. 2007) postulieren Skerka et al. eine reduzierte Bindung der Histidin-Varianten von FH und FHL-1 an Heparin und RPE-Zellen (Skerka et al. 2007). Bei FHL-1, nicht jedoch bei FH, führt dies nach Skerka et al. zu einer reduzierten Cofaktor-Aktivität auf Oberflächen von Ovarial-Zellen des Chinesischen Hamsters (Skerka et al. 2007).

Neben RPE-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit mit HUVEC-Zellen eine weitere epitheliale Zelllinie auf die Bindung von FH-402Y und FH-402H hin untersucht. Für diese Versuche wurden biotinylierte FH-Präparate verwendet. Unter diesen Bedingungen band FH-402H geringfügig besser als FH-402Y an RPE-Zellen (Abb. 4.11), nicht aber an HUVECs (Abb. 4.10). Möglicherweise ist dieser Befund durch einen unterschiedlichen Aufbau der Glycokalix beider Zellreihen erklärbar. Die Beobachtung würde dann zu der Feststellung passen, dass FH-402Y und FH-402H differenziell an verschiedene Glycosaminoglycane binden (Clark et al. 2006). Gewebe, die nur

bestimmte Glykosaminoglykane exprimieren, könnten deshalb theoretisch Prädilektionsstellen für eine lokale Komplementaktivierung darstellen. Da es sich bei RPE-Zellen um rein retinale Zellen handelt (Dunn et al. 1996), könnte dies ein möglicher Erklärungsansatz für die spezifische Manifestation der AMD im Auge sein.

Während der Y402H-Polymorphismus auf die Bindung von Festphase-gekoppeltem Heparin keinen Einfluss hat, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Austausch von Tyrosin gegen Histidin an Position 402 von FH die Bindung an CRP signifikant reduziert. Dieser Unterschied zwischen beiden FH-Varianten war außerdem mit allen FH-Präparaten der homozygoten Einzelspender reproduzierbar (s. Abb. 4.9). Andere Arbeitsgruppen kamen zu vergleichbaren Ergebnissen (Laine et al. 2007, Sjöberg et al. 2007, Skerka et al. 2007, Yu et al. 2007). Zusätzlich konnten zwei Gruppen zeigen, dass der Y402H-Polymorphismus auf die CRP-Bindung von FHL-1 (SCR1-7) einen größeren Effekt hat als auf die CRP-Bindung von FH (SCR1-20) (Skerka et al. 2007, Yu et al. 2007). Dies könnte ein Anhaltspunkt dafür sein, dass FH, anders als das sehr viel kleinere FHL-1, durch zusätzliche CRP-Bindungsstellen den Effekt des Y402H-Polymorphismus in einem gewissen Maße kompensieren kann.

Der beobachtete Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die Bindung von CRP legt die Vermutung nahe, dass die Aminosäure 402 direkt an dieser Interaktion beteiligt sein könnte. Diese in früheren Arbeiten formulierte Schlussfolgerung (Laine et al. 2007, Sjöberg et al. 2007, Skerka et al. 2007) deckt sich allerdings nicht mit den Daten der vorliegenden Arbeit. Die Blockade des 402-Epitops mit epitopspezifischen mAk reduzierte weder bei FH-402Y noch bei FH-402H die Bindung an CRP (s. Abb. 4.9 C). Zusammen deuten diese Befunde am ehesten auf eine indirekte Beteiligung der Aminosäure 402 an der CRP-Bindung von FH hin. Der Austausch der aromatischen Aminosäure Tyrosin gegen das positiv geladene Histidin könnte zu einer Konformationsänderung innerhalb der SCR7-Domäne führen und so die Interaktion mit CRP an anderer Stelle behindern. An der Bindung von CRP an SCR7 sind mehrere positiv geladene Aminosäurereste beteiligt, die sich vornehmlich in zwei Regionen der Domäne konzentrieren (Giannakis et al. 2003). Eine dieser Regionen ist in dem Verbindungsstück zwischen SCR6 und SCR7 lokalisiert (Giannakis et al. 2003). Somit wäre auch eine Änderung der räumlichen Anordnung der Domänen SCR6 und SCR7 zueinander als Ursache einer reduzierten CRP-Bindung von FH-402H vorstellbar.

Im Gegensatz zur Antikörper-vermittelten Blockade des 402-Epitops auf SCR7 reduzierte die Blockade der C-terminalen SCR20-Domäne durch mAk die Bindung von FH an CRP signifikant (s. Abb. 4.9 C). Dieser Befund legt das Vorhandensein weiterer Bindungsstellen für CRP in dieser Region nahe. Eine Beteiligung des C-Terminus an der Interaktion mit CRP konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden (Jarva et al. 1999). Allerdings ist der C-Terminus auch für die Interaktion mit anderen FH-Liganden von entscheidender Bedeutung. Er vermittelt den initialen Kontakt zwischen FH und seinen

Liganden, woraufhin eine Entfaltung des FH-Moleküls erfolgt und dadurch weitere Bindungsstellen zugänglich werden (Oppermann et al. 2006). Die hier vorgelegten Daten legen nahe, dass ein ähnlicher Mechanismus auch für die Wechselwirkung zwischen dem C-Terminus von FH und CRP verantwortlich sein könnte.

Unabhängig vom Y402H-Polymorphismus beeinflusst auch der Austausch von Isoleucin gegen die Aminosäure Valin an Position 62 von FH die CRP-Bindung. Innerhalb der Gruppe der FH-402Y-Spender zeigten FH-Präparate von Einzelspendern, die zudem homozygot für Isoleucin an Position 62 waren, eine signifikant stärkere Bindung an CRP als die FH-Präparate von homozygoten Valin62-Spendern und heterozygoten Spendern (Abb. 4.9). Die Aminosäure 62 ist in der Domäne SCR1 lokalisiert (Ripoche et al. 1988, Hageman et al. 2005). Der beschriebene Effekt des I62V-Polymorphismus ist unabhängig von der Aminosäure-Variation an Position 402 und spricht für eine weitere CRP-Bindungsstelle am N-Terminus von FH. Da sich für rekombinante Konstrukte bestehend aus SCR1-5 bzw. SCR1-6 keine Interaktion mit CRP nachweisen lässt, wurden CRP-Bindungsstellen innerhalb dieser Region des FH-Moleküls bisher ausgeschlossen (Jarva et al. 1999). In derselben Arbeit wurde allerdings gezeigt, dass die Bindung von FH an C3b in Anwesenheit von CRP beeinträchtigt ist (Jarva et al. 1999). Dieser Befund könnte als ein indirekter Hinweis auf eine N-terminal lokalisierte CRP-Bindungsstelle gewertet werden, da u.a. die Domänen SCR1-4 für die Bindung von C3b verantwortlich sind (Alsenz et al. 1984). So ist es vorstellbar, dass CRP mit C3b um Bindungsstellen in dieser Region des FH-Moleküls konkurriert. Die eigenen Ergebnisse legen nahe, dass allerdings nur die Domänen SCR1 und/oder SCR2 an einer Interaktion mit CRP beteiligt sind, weil die Präinkubation von FH mit anti-SCR3-mAk zu keiner Inhibition der CRP-Bindung führte (s. Abb. 4.9 C).

Neben dem hier beschriebenen Einfluss des I62V-Polymorphismus auf die CRP-Bindung sind auch Effekte auf die C3b-Bindung und die Cofaktor-Aktivität beschrieben worden (Tortajada et al. 2009), was in der vorliegenden Arbeit aber nicht bestätigt werden konnte. Die Assoziation von FH-62V mit erhöhten Plasmaspiegeln der Komplementaktivierungsprodukte Ba und C3d weist allerdings daraufhin, dass die polymorphe Variation an Position 62 durchaus Einfluss auf die komplementregulatorische Eigenschaft von FH haben und somit auch Erkrankungen wie AMD begünstigen könnte (Hecker et al. 2010). Des Weiteren lassen sich interessanterweise zwischen den Effekten der Aminosäurevariationen in Position 62 und 402 auf die CRP-Bindung einerseits und genetischen Suszeptibilitätsmarkern der AMD andererseits besondere Parallelen beobachten. I62V und Y402H sind Schlüssel-Polymorphismen von bestimmten FH-Haplotypen, die mit unterschiedlichen AMD-Erkrankungsrisiken einhergehen (Hageman et al. 2005). Der Haplotyp H1, der das AMD-Risiko erhöht, ist beispielsweise durch Valin in Position 62 und Histidin in Position 402 definiert (Hageman et al. 2005). Den eigenen Daten zufolge müsste dieser Risiko-

Haplotyp also eine besonders schwache CRP-Bindung aufweisen. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, dass eine reduzierte CRP-Bindung von FH im pathophysiologischen Konzept der AMD tatsächlich eine Rolle spielen könnte. Die Beobachtung, dass bei AMD-Patienten, die homozygot für FH-402H sind, höhere CRP-Spiegel in der Choroidea gemessen werden können als bei Patienten, die homozygot für FH-402Y sind, ließ bereits in der Vergangenheit einen Zusammenhang zwischen FH, CRP und AMD vermuten (Johnson et al. 2006).

Neben den Bindungseigenschaften beider FH-Varianten an verschiedene Liganden wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Komplement-regulatorischen Aktivitäten von FH-402Y und FH-402H miteinander verglichen. FH reguliert den alternativen Weg des Komplementsystems durch seine *Decay-Accelerating*- und seine Cofaktor-Aktivität. Die *Decay-Accelerating*-Aktivität von FH wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Komplementaktivierung in Serum und anschließende Messung des generierten Ba-Fragments untersucht (s. 4.5, S.75). Die physiologische Bedeutung dieser FH-Funktion wird deutlich, wenn man die Generierung von Ba in Serum in Gegenwart bzw. Abwesenheit eines Komplement-Aktivators wie Zymosan dokumentiert. Physiologische FH-Konzentrationen (100-500 µg/ml) sind in Abwesenheit von Zymosan in der Lage, die Aktivierung des Komplementsystems vollständig zu unterdrücken. Liegen allerdings aktivierende Fremdoberflächen wie Zymosan vor, so findet bei gleicher FH-Konzentration eine limitierte Komplementaktivierung statt (s. Abb. 4.16, S. 81), wie sie z.B. zur Abwehr von Bakterien notwendig ist. Fehlt FH vollkommen, so findet durch spontane Hydrolyse von C3 eine unkontrollierte Komplementaktivierung auch in Abwesenheit eines Aktivators statt (s. Abb. 4.14, S. 78). Bei Patienten mit angeborener FH-Defizienz kommt es dadurch zu einer Hypokomplementämie (Thompson und Winterborn 1981).

Vergleicht man FH-402Y und FH-402H bezüglich ihrer *Decay-Accelerating*-Aktivität, so inhibierten sie in An- und in Abwesenheit des Aktivators Zymosan gleich gut die Bildung des Faktor-B-Fragments Ba (s. Abb. 4.16, S. 81). Die Präinkubation von FH mit epitopspezifischen anti-SCR7-Antikörpern hatte keinen Einfluss auf die Ba-Generierung in Serum (s. Abb. 4.17, S. 83). Interessanterweise führte die Blockade des C-Terminus mit anti-SCR20-mAk zu einer deutlichen Zunahme der Komplementaktivierung (s. Abb. 4.17, S. 83). Dieser Effekt war zuvor beschrieben worden und verdeutlicht erneut die zentrale Bedeutung des C-Terminus für die initiale Bindung von FH-Liganden wie C3b (Oppermann et al. 2006).

Ein wesentlicher Befund der vorliegenden Arbeit ist, dass FH nicht nur für die Bildung von iC3b aus C3b sondern auch für die Generierung von C3dg aus iC3b Cofaktor-Aktivität besitzt (s. Abb. 4.18, S. 85). Die Rolle von FH als physiologischer Cofaktor für die Faktor I-vermittelte Inaktivierung von C3b zu iC3b in der flüssigen Phase ist gut belegt (Pangburn et al. 1977, Harrison und Lachmann 1980). Der darauffolgende

Schritt, die Spaltung von iC3b in C3c und C3dg in Anwesenheit von FH, wird durch niedrige Ionenstärke des Puffers begünstigt und verläuft weniger effektiv als in Anwesenheit des membranständigen Komplementregulators CR1 (Ross et al. 1982). Der Einfluss von pH und Salzgehalt des Puffers auf die C3dg-Generierung konnte auch in der vorliegenden Arbeit dokumentiert werden (s. Abb. 4.19, S. 86). Vielmehr ist der C3b-Rezeptor CR1 der physiologische Cofaktor für den Abbau von iC3b durch die Protease FI auf Zelloberflächen, wobei C3dg kovalent auf der Oberfläche gebunden bleibt (Medof et al. 1982, Medicus et al. 1983). Da C3dg aber auch als finales C3-Abbauprodukt im Serum identifiziert wurde (Lachmann et al. 1982), muss die Spaltung von iC3b ebenso in der flüssigen Phase erfolgen.

Während die Bedeutung von FH als Cofaktor für die C3dg-Generierung im Allgemeinen angezweifelt wird (Ross et al. 1982), konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Überführung von iC3b in C3dg auch in Serum, d.h. unter physiologischen Salzkonzentrationen, durch FH vermittelt wird (s. Abb. 4.22, S. 90). Möglicherweise ist bei dieser Versuchsanordnung auch eine andere Serumprotease als FI für die C3dg-Generierung verantwortlich. Dies wurde bereits zuvor von anderen Arbeitsgruppen vermutet (Pangburn et al. 1977, Harrison und Lachmann 1980, Lachmann et al. 1982). Zum Beispiel kann Plasmin *in vitro* iC3b in C3c und C3dg spalten (Lachmann et al. 1982). Des Weiteren spaltet Kallikrein die α -Kette von iC3b an einer alternativen Schnittstelle und setzt dabei C3dk frei (Meuth et al. 1983). C3dk ist ein um neun N-terminale Aminosäuren verlängertes C3dg-Analogon (Meuth et al. 1983). Da dieses lediglich 1 kDa größer ist als C3dg, ist es nicht auszuschließen, dass es sich bei dem in dieser Arbeit in Zymosan-aktivierten Serum nachgewiesenen finalen C3-Abbauprodukt auch um C3dk handeln könnte.

Beim Vergleich der Cofaktor-Aktivität von FH-402Y und FH-402H bei niedriger Ionenstärke zeigten die polymorphen FH-Varianten keine Unterschiede in der Generierung von iC3b aus C3b (s. Abb. 4.19, S. 86). Zu demselben Ergebnis kam auch eine andere Arbeitsgruppe (Yu et al. 2007). Dagegen wies in der vorliegenden Arbeit die mit AMD-assoziierte Variante FH-402H eine deutlich reduzierte Cofaktor-Aktivität für den weiteren Abbau von iC3b zu C3c und C3dg auf (s. Abb. 4.20, S. 87). Bei der Verwendung von Einzelspender-Präparaten zeigte sich, dass dieser Unterschied ausschließlich auf die Aminosäurevariation in Position 402 zurückzuführen ist. Der FH-Polymorphismus I62V hatte dagegen keinen Einfluss (s. Abb. 4.20). Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt einen Einfluss des I62V-Polymorphismus auf die iC3b-Generierung (Tortajada et al. 2009). Auch im resubstituierten und zymosanaktivierten Δ FH-Serum konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von FH-402H weniger C3dg generiert wurde, als in Anwesenheit von FH-402Y (s. Abb. 4.23). Der bei niedriger Ionenstärke erhobene Befund war also unter physiologischen Salzbedingungen reproduzierbar. Wurde die Zymosanaktivierung in vollkommen unmodifizierten Seren von Einzelspendern durchgeführt, so zeigte sich gleichfalls eine signifikant reduzierte

C3dg-Generierung in den Seren der FH-402H-homozygoten Spender (s. Abb. 4.24, S. 92). Aufgrund dieser Daten ist es vorstellbar, dass es bei Trägern der AMD-Risikovariante FH-402H zu einer Verzögerung des iC3b-Abbaus und in Folge dessen zu einer Akkumulation dieses C3-Fragments kommen könnte. Passend zu dieser Vorstellung waren die mittels ELISA gemessenen iC3b-Konzentrationen in Zymosan-aktivierten Seren von FH-402H-homozygoten Spendern höher als in den Seren von FH-402Y-homozygoten Spendern (s. Abb. 4.24, S. 92). Bei gleichzeitiger Messung der FH-Konzentrationen in den einzelnen Seren kann darauf zurückgeschlossen werden, dass der Y402H-Genotyp die Effektivität der Umwandlung von iC3b in C3dg entscheidend bestimmt und wichtiger ist als die FH-Konzentration selbst (s. Abb. 4.24, S. 92).

Die unterschiedliche Cofaktor-Aktivität der beiden polymorphen FH-Varianten für die C3dg-Generierung legt die Vermutung nahe, dass die Aminosäure 402 auf SCR 7 unmittelbar an diesem Schritt der C3-Prozessierung beteiligt sein könnte. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung reduzierte die Präinkubation von FH-402Y mit mAk, die spezifisch gegen das 402-Epitop gerichtet sind, die FI-vermittelte C3dg-Generierung, nicht jedoch die iC3b-Generierung, signifikant (s. Abb 4.21). Neben SCR7 scheint auch SCR3 Cofaktor-Aktivität für die iC3b-Spaltung zu besitzen, da die Blockade dieser Domäne mit entsprechenden mAk die C3dg-Generierung signifikant reduzierte (s. Abb 4.19). SCR3 gehört zu den vier N-terminalen Domänen, in denen die Cofaktor-Aktivität für die FI-vermittelte Prozessierung von C3b zu iC3b lokalisiert ist (Alsens et al. 1984, Gordon et al. 1995, Kühn et al. 1995). Nach Präinkubation von FH mit anti-SCR3-mAk blieb die Spaltung von C3b in iC3b aber überraschenderweise unbeeinträchtigt. Dagegen war beschrieben worden, dass die Deletion von SCR3 zu einem vollständigen Verlust der Cofaktor-Aktivität führt (Gordon et al. 1995). Das Einfügen zusätzlicher Aminosäuren zwischen die N-terminalen Domänen führte ebenfalls zu einem Verlust der Cofaktor-Aktivität, wodurch gezeigt wurde, dass der Abstand der einzelnen SCR-Domänen zueinander für eine intakte Komplementregulation wesentlich ist (Kühn et al. 1995). Die eigenen Daten sind mit der Vorstellung vereinbar, dass SCR3 nicht direkt an der Prozessierung von C3b zu iC3b beteiligt ist, wohl aber für die korrekte sterische Anordnung der komplementregulatorischen Domänen zueinander benötigt werden könnte.

Der hier postulierten Bedeutung von FH für die Prozessierung von iC3b in der flüssigen Phase steht die Beobachtung entgegen, dass FH auf Erythrozytenoberflächen keinen Einfluss auf die CR1/FI-vermittelte Prozessierung von iC3b hat (Medicus et al. 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, welche Bedeutung FH für die FI-vermittelte Spaltung von iC3b auf der Oberfläche von RBL-Zellen besitzt, die kein CR1 exprimieren (Andrásfalvy et al. 2002). Durch Messung der bei der C3dg-Generierung freiwerdenden C3- β -Kette mittels FACS und Immunoblot konnte nachgewiesen werden, dass FH auch auf Zelloberflächen Cofaktor für die FI-vermittelte Spaltung von iC3b ist (s. Abb 4.27, 4.28, 4.29). Allerdings unterschieden sich - anders als in der flüssigen

Phase – die beiden polymorphen FH-Varianten nicht in Hinblick auf das Ausmaß der C3dg-Generierung (s. Abb. 4.27 / 4.28 / 4.29, S. 95 / 96 / 98). Möglicherweise exprimieren RBL-Zellen andere Komplement-Regulatoren als CR1, die den Unterschied zwischen den beiden FH-Varianten maskieren. Eine weitere mögliche Erklärung ergibt sich aus der Vermutung, dass SCR7 an der C3dg-Generierung direkt beteiligt sein könnte (s. Abb. 4.23, S. 91). Die Interaktion von SCR7 mit Glycosaminoglycanen auf Zelloberflächen könnte die Cofaktor-Funktion dieser Domäne möglicherweise blockieren. So inhibiert die Bindung von Heparin an SCR7 aufgrund überlappender Bindungsstellen ebenso die Interaktion dieser Domäne mit CRP und M-Protein (Giannakis et al. 2001).

Letztlich stellt sich die Frage, über welchen molekularen Mechanismus der Y402H-Polymorphismus selektiv zu einem Defekt der Cofaktor-Aktivität für die Spaltung von iC3b führt ohne dabei die Cofaktor-Aktivität für die C3b-Spaltung zu beeinträchtigen. Eine Möglichkeit bestünde in einer selektiv reduzierten Bindung von FH-402H für iC3b bei einer unveränderten Interaktion mit C3b. In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass FH-402Y und FH-402H sowohl C3b wie auch iC3b mit gleicher Stärke binden (s. Abb. 4.7). Im Gegensatz zu Tortajada et al., welche eine stärkere Bindung von FH-62I an C3b beschreiben (Tortajada et al. 2009), konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Einfluss des I62V-Polymorphismus auf die C3b-Bindung nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit zuvor beschrieben C3b-Bindungstellen im FH-Molekül reduzierte die Antikörper-vermittelte Blockade von SCR3 und SCR20, nicht aber die von SCR7 die C3b-Bindung (s. Abb. 4.7 C). Neben der Interaktion von FH und dem jeweiligen C3-Fragment kommt es auch zu einer direkten Bindung von FH an Faktor I (Soames und Sim 1997). Es ist also durchaus möglich, dass die defekte Cofaktor-Aktivität von FH-402H Folge einer gestörten Interaktion mit der Protease ist.

Die wesentlichen bisher diskutierten Ergebnisse lassen sich an dieser Stelle folgendermaßen zusammenfassen (Abb. 5.1):

1. Die funktionelle Charakterisierung des polymorphen FH-402-Epitops mittels FH-Präinkubation mit Epitop-spezifischen anti-FH-mAk ergab, dass der Aminosäurerest 402 direkt an der Bindung von FH an Glycosaminoglycane sowie an der Cofaktor-Funktion für die Prozessierung von iC3b zu C3dg beteiligt sein könnte.
2. Der Austausch von Tyrosin gegen Histidin an dieser Position reduziert die CRP-Bindung von FH und führt zu einem verzögerten iC3b-Abbau. Die Bindung an Glycosaminoglycane wird hingegen nicht beeinflusst.

In einem weiteren Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die *in vitro* nachgewiesenen biochemischen Effekte des Y402H-Polymorphismus

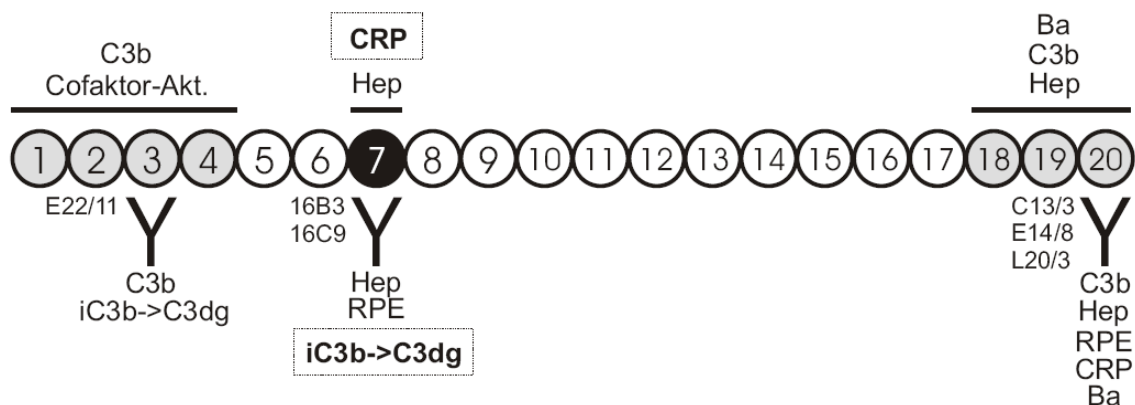


Abb. 5.1 Funktionelle Charakterisierung von FH-Epitopen und Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf FH-Funktionen. Dargestellt sind mAk (Y, Klonbezeichnung links daneben) und ihre Bindungsstellen am FH-Molekül. Darunter sind die FH-Funktionen / Interaktionen mit FH-Liganden aufgeführt, die durch Präinkubation mit dem jeweiligen mAk blockiert wurden. Oberhalb des FH-Moleküls sind vorbeschriebene Funktionen aufgeführt, die in den Regionen lokalisiert sind, an die die mAk binden. Die den Y402H-Polymorphismus tragende Domäne SCR7 ist schwarz hervorgehoben. Vom Y402H-Polymorphismus beeinflusste FH-Funktionen sind durch einen Rahmen hervorgehoben. Hep = Bindung an Heparin, RPE = Bindung an RPE-Zellen, Ba = Inhibition der Ba-Generierung in Serum, iC3b->C3dg = Cofaktor-Aktivität für die Umwandlung von iC3b in C3dg.

entsprechend der Arbeitshypothese zu einer messbaren Komplement-Dysregulation *in vivo* führen. Zu diesem Zweck wurden in den Plasmen genotypisierter AMD-Patienten und Augen-gesunder Probanden des gleichen Alters die Konzentrationen verschiedener Parameter für eine systemische Komplementaktivierung bestimmt. Es zeigte sich, dass der Y402H-Polymorphismus alleine bei den gesunden Probanden zu keiner systemischen Komplementaktivierung führt (s. Tab. 4.4). Die Beobachtung, dass verschiedene FH-Polymorphismen additive Effekte auf die FH-Funktion haben (beispielsweise die Effekte von I62V und Y402H auf die CRP-Bindung), gab Anlass zu der Frage, ob die Kombination mehrerer FH-Polymorphismen möglicherweise auch zu einer messbaren systemischen Komplementaktivierung führt. Durch Genotypisierung aller Plasma-Spender für weitere FH-Polymorphismen konnten ein Risiko-Haplotyp und zwei protektive FH-Haplotypen identifiziert werden (freundlicherweise durchgeführt vom Institut für Humangenetik der Universität Regensburg, Direktor: Prof. Weber). Die Träger des Risiko-Haplotyps wiesen signifikant höhere Konzentrationen der meisten Komplement-Aktivierungsprodukte im Plasma auf, als die Träger der protektiven Haplotypen (s. Tab. 4.6). Diese Daten sind am ehesten dahingehend zu interpretieren, dass erst die Summe einzelner FH-Polymorphismen („Risiko-Haplotyp“) zu einer messbaren systemischen Komplementaktivierung führt. Die Retina und speziell die Makula könnte dabei eine gesteigerte Sensibilität gegenüber einer solchen Komplementaktivierung aufweisen. Passend dazu entwickeln auch Patienten mit Membranoproliferativer Glomerulonephritis Typ 2 (MPGNII) und systemischem Komplementumsatz Drusen in der Retina (Huang et al. 2003). Andererseits ist es auch vorstellbar, dass bei einer besonderen Sensibilität der Retina gegenüber einer

Komplementdysregulation bereits einzelne FH-Polymorphismen wie Y402H zu einer lokalen Komplement-vermittelten Schädigung führen, ohne dabei eine systemisch messbare Alternativweg-Aktivierung zu verursachen.

Eine Folgestudie zu der hier vorgestellten Untersuchung zeigt, dass neben FH-Haplotypen auch genetische Variationen von Faktor B, C2 und C3 die Plasmakonzentrationen von Alternativweg-Aktivierungsprodukten beeinflussen (Hecker et al. 2010). Dabei scheinen interessanterweise einzelne Haplotypen mit Konzentrationsveränderungen von jeweils bestimmten Komplementparametern im Plasma assoziiert zu sein (Hecker et al. 2010). Genetik und Plasmaspiegel bestimmter Komplementfaktoren erlauben in Kombination Rückschlüsse auf den AMD-Krankheitsstatus mit einer Treffsicherheit von bis zu 70% (Scholl et al. 2008, Hecker et al. 2010). Auch das Alter hat Einfluss auf den Komplementumsatz (Hecker et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus untersucht, ob es neben den bisher beschriebenen Indizien für eine lokale Aktivierung des Komplementsystems im Auge (Mullins et al. 2000) auch Anhalt für eine systemische Komplementaktivierung bei AMD-Patienten unabhängig vom FH-Genotyp gibt. Da auch genetische Assoziationsstudien bereits auf eine besondere Rolle des alternativen Aktivierungsweges bei der AMD hingedeutet haben (Gold et al. 2006, Yates et al. 2007), lag das Augenmerk vornehmlich auf dem Nachweis von Spaltprodukten von C3 und Faktor B im Plasma. Die beiden Fragmente Ba und actC3, welches auch C3d mit erfasst, eignen sich dabei in besonderem Maße als Indikatoren für eine chronische Komplementaktivierung, weil sie im Gegensatz zu Fragmenten wie C5a oder C3a für mehrere Stunden und nicht nur wenige Minuten stabil im Plasma nachweisbar sind (Mollnes et al. 2007, Oppermann et al. 1992).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Plasmakonzentrationen verschiedener Komplementaktivierungsprodukte, v.a. solcher, die eine Alternativweg-Aktivierung anzeigen, bei AMD-Patienten im Vergleich zur Kontrollpopulation erhöht sind (Scholl et al. 2008, s. Abb. 4.33). Diese zentrale Aussage konnte mittlerweile in zwei unabhängigen Studien (Reynolds et al. 2009, Hecker et al. 2010) bestätigt werden. Besonders signifikante Unterschiede zwischen AMD-Patienten und Kontrollen fanden sich für die Konzentrationen der Parameter für eine chronische Komplementaktivierung, Ba und aktC3 (s. Abb. 4.33). Diese Beobachtung unterstreicht die Hypothese, dass die AMD mit einer schleichenden chronischen Komplementaktivierung einhergeht. Bei AMD-Patienten ließen sich im Vergleich zu den Kontrollen um den Faktor 1,2 – 1,3 erhöhte Ba- und aktC3-Spiegel nachweisen. Auch bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, einer Erkrankung mit nachweislich signifikanter Beteiligung des Komplementsystems, sind die C3d-Konzentrationen im Plasma um einen Faktor in der selben Größenordnung erhöht (Bourke et al. 1982).

Dagegen sind die C3d-Spiegel, die lokal in der Gelenkflüssigkeit solcher Patienten gemessen werden können, im Vergleich zu den Konzentrationen im Plasma um ein Vielfaches gesteigert (Mollnes et al. 1986). Ähnlich könnte es bei AMD-Patienten lokal an der Blut-Retina-Schranke zu einem gesteigerten Komplementumsatz kommen, der sich aber systemisch nur als dezente Erhöhung von Komplementaktivierungsparametern im Plasma bemerkbar macht. Selbstverständlich sagen die präsentierten Daten nichts darüber aus, ob eine Komplementaktivierung bei AMD-Patienten Ursache oder Folge der Erkrankung ist.

Die bei AMD-Patienten erhöhten Ba- und aktC3-Spiegel sind nicht auf unterschiedliche Konzentrationen der Substrate C3 und C4 zurückzuführen (s. Abb 4.32). Allerdings fielen bei den AMD-Patienten signifikant erhöhte Konzentrationen des Substrats Faktor B und des positiven Regulators Faktor D auf (s. Abb 4.32, 4.33). Dies könnte theoretisch eine Aktivierung des Alternativwegs bei AMD-Patienten begünstigen, die alleinige Konzentrationserhöhung dieser Faktoren kann aber keine Erklärung für den verstärkten Komplementumsatz sein, da sich die Konzentrationen im Bereich der Substratsättigung befinden (Oppermann et al. 1991a). Mögliche Ursachen für die bei AMD-Patienten beobachtete Erhöhung der Faktor D-Spiegel erschließen sich nicht unmittelbar (s. Abb. 4.32). Erhöhte Serum-Konzentrationen dieser Protease werden häufig bei Niereninsuffizienz beobachtet (Volanakis et al. 1985). Eine renale Ursache konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings weitgehend ausgeschlossen werden, da sich der Nierenfunktionsparameter Kreatinin zwischen beiden Kohorten nicht unterscheidet (s. Tab. 4.3).

Wie zuvor ausgeführt konnten in der vorliegenden Arbeit zunächst biochemische Effekte des Y402H-Polymorphismus auf molekular-funktioneller Ebene *in vitro* (reduzierte CRP-Bindung, verzögerter Abbau von iC3b) und darüber hinaus messbare Einflüsse von FH-Polymorphismen auf die Aktivität des Komplementsystems *in vivo* nachgewiesen werden. Im Folgenden soll diskutiert werden, inwiefern sich die *in vivo* gemessene systemische Komplementaktivierung durch die *in vitro* erhobenen Befunde erklären lassen könnte und inwiefern sich die Hauptbefunde dieser Arbeit in ein übergeordnetes pathophysiologische Konzept der AMD integrieren lassen.

Ein Hauptbefund der vorliegenden Arbeit ist die reduzierte CRP-Bindung von FH-62V/402H im Vergleich zu FH-62I/402Y. Wie bereits in Kapitel 1.2 näher ausgeführt, ist CRP gleichzeitig Aktivator des klassischen Weges und Inhibitor des Alternativweges des Komplementsystems, wobei die Interaktion von CRP mit FH essentiell für die Komplementinhibition ist (Mold et al. 1999). Eine verminderte CRP-Bindung von FH-62V/402H könnte somit zu einem Überwiegen der komplementaktivierenden Funktion von CRP mit verstärkter Bildung des Membranangriffskomplexes C5b-9 (MAK) und des Anaphylotoxins C5a führen, welche als Bestandteile von Drusen in der Retina von

AMD-Patienten nachgewiesen wurden (Nozaki et al. 2006). Neben seinen proinflammatorischen Eigenschaften (Vasodilatation, chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten und Induktion der Bildung radikaler Sauerstoffspezies) scheint C5a auch eine proangiogenetische Wirkung über den Botenstoff *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) zu haben, was die Entstehung choroidaler Neovaskularisationen (CNV) unterstützen könnte (Guo und Ward 2005, Nozaki et al. 2006). Auch der Membranangriffskomplex (MAK) scheint bei der Entstehung der CNV im Mausmodell eine wichtige Rolle zu spielen (Bora et al. 2005). Eine reduzierte CRP-Bindung von FH-402H/62V könnte also indirekt nicht nur proinflammatorische, sondern auch proangiogenetische Effekte zur Folge haben.

Die eingeschränkte Cofaktor-Aktivität von FH-402H für die Prozessierung von iC3b zu C3dg könnte im Auge zu einer Akkumulation von iC3b führen (s. Abb. 5.2). Das C3-Fragment iC3b ist Ligand der Komplementrezeptoren CR3 und CR4, die zur Familie der β_2 -Integrine gehören und vornehmlich auf Monozyten und Makrophagen exprimiert werden (Luo et al. 2007, van Lookeren Campagne et al. 2007). Diese Moleküle sind Heterodimere aus einer variablen α -Kette (CD11) und einer gemeinsamen β -Kette (CD18) (Gahmberg et al. 1998). β_2 -Integrine sind u.a. an der Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe beteiligt (Gahmberg et al. 1998). CR3 exprimierende Zellen lassen sich auch in der Choroidea nachweisen (Moore et al. 1993, Forrester et al. 1994). Es ist vorstellbar, dass durch die iC3b-Akkumulation eine vermehrte Interaktion dieses C3-Fragments mit seinen Rezeptoren stattfinden könnte. In der Folge könnten Signalwege in CR3/CR4 exprimierenden Zellen (z.B. Monozyten) aktiviert werden, welche proinflammatorische Wirkungen in der Retina auslösen.

Die Interaktion von iC3b mit CR3/4 könnte auch für die Ausbildung von choroidalen Neovaskularisationen eine wichtige Rolle spielen. Verschiedene im Mausmodell erhobene Daten deuten auf eine proangiogenetische Funktion von Makrophagen und speziell ihres CR3-Rezeptorkomplexes bei AMD hin (Espinosa-Heidmann et al. 2003, Sakurai et al. 2003a, Sakurai et al. 2003b). Es wäre denkbar, dass iC3b durch

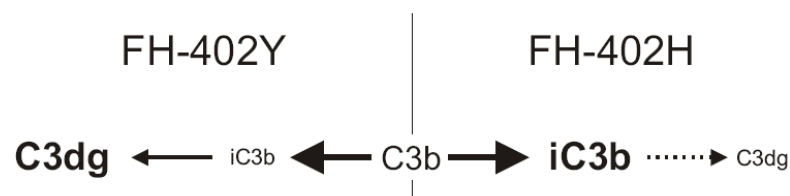


Abb. 5.2 Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf die C3b-Prozessierung (Hypothese). FH ist Cofaktor für den C3b-Abbau durch Faktor I. Die schnelle Umwandlung von C3b zu iC3b erfolgt gleichermaßen gut in Anwesenheit von FH-402Y oder FH-402H. Während iC3b in Anwesenheit von FH-402Y rasch zu C3dg abgebaut wird, ist dieser Schritt in Anwesenheit von FH-402H stark eingeschränkt. Während bei FH-402Y C3dg das Haupt-C3-Abbauprodukt ist, könnte es deshalb bei FH-402H zu einer Akkumulation des Zwischenproduktes iC3b kommen.

Interaktion mit CR3 zu einer Aktivierung von Makrophagen führt, die u.a. auch VEGF produzieren (Grossniklaus et al. 2002). Neuere Untersuchungen legen allerdings nahe, dass Makrophagen nicht pro- sondern antiangiogenetische Signale vermitteln (Apte et al. 2006). Diese Schlussfolgerung stützt sich auf die Beobachtung, dass die Ausbildung einer laserinduzierten CNV bei Mäusen durch den *Knock-out* des Makrophagenhemmenden Zytokins IL-10 gehemmt und durch die intraokuläre Injektion von IL-10 gesteigert wird (Apte et al. 2006). Es bestehen Hinweise darauf, dass ein reduzierter Abbau von iC3b durch FH-402H auch an diesem Punkt relevant sein könnte, weil iC3b die IL-10-Sekretion durch Monozyten über Interaktion mit CR3 steigern kann (Yoshida et al. 1998, Sohn et al. 2003). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Makrophagen in den Augen von gealterten Mäusen mehr IL-10 bilden als Makrophagen junger Mäuse (Kelly et al. 2007). Alter und iC3b-Konzentration könnten also theoretisch einen additiven Effekt haben und zur Überschreitung einer kritischen IL-10-Konzentration führen. Die Vorstellung einer grundsätzlich protektiven Funktion von Makrophagen bei AMD wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass Mäuse, die entweder defizient für *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) oder dessen Rezeptor *C-C Chemokine receptor-2* (CCR-2) sind, spontan alle Merkmale der Makuladegeneration bis hin zur choroidalen Neovaskularisation entwickeln (Ambati et al. 2003). Das Chemokin MCP-1, welches von Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und auch RPE-Zellen produziert wird, sowie dessen Rezeptor CCR-2 vermitteln die Mobilisation und Extravasation von Monozyten (Leonard und Yoshimura 1990, Lu et al. 1998, Kuziel et al. 1997, Crane et al. 2000). In einzelnen Publikationen sind hemmende Einflüsse von iC3b auf die Synthese von MCP-1 und CCR-2 beschrieben worden (Verbovetski et al. 2002, Trinidad et al. 2006). Möglicherweise reduzieren hohe iC3b-Konzentrationen im Auge die Einwanderung protektiver Makrophagen, was die Entstehung choroidaler Neovaskularisationen wiederum begünstigen könnte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein verminderter iC3b-Abbau durch FH-402H theoretisch zu einer Aktivierung von CR3/CR4-tragenden Entzündungszellen und zur Bildung choroidaler Neovaskularisationen führen könnte. Gegen das hier präsentierte Modell spricht allerdings die Beobachtung, dass die Bindung von iC3b an CR3 die Synthese von IL-12 und andere proinflammatorische Signale in Monozyten unterdrücken kann (Marth und Kelsall 1997). Da die iC3b-Beladung von apoptotischen Zellen deren Abbau durch Makrophagen über Interaktion mit CR3 verstärkt, könnte die Akkumulation von iC3b theoretisch auch den Abbau von Drusen begünstigen und dadurch einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf der AMD haben (Takizawa et al. 1996). Für eine bedeutsame Rolle von iC3b in der AMD-Pathogenese spricht wiederum, dass auch bei der Membranproliferativen Glomerulonephritis Typ 2 (MPGNII) Hinweise auf eine besondere Bedeutung von C3-Fragmenten wie iC3b bestehen (Dragon-Durey et al. 2004, Rose et al. 2008). Da sich auch bei MPGNII-Patienten Drusen nachweisen lassen (Huang et al. 2003), scheint es plausibel, dass

der Erkrankung ähnliche pathophysiologische Mechanismen zugrunde liegen wie der AMD. Nicht zuletzt konnte gezeigt werden, dass der Y402H-Polymorphismus auch mit MPGNII assoziiert ist (Abrera-Abeleda et al. 2005).

Die reduzierte Bindung von FH-62V/402H an CRP sowie der reduzierte Abbau von iC3b in Anwesenheit von FH-402H könnten also theoretisch über eine resultierende reduzierte Komplementkontrolle und Aktivierung von Entzündungszellen zu einer systemischen Komplementaktivierung führen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit bei AMD-Patienten *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus ist es auf Grund der obigen Ausführungen denkbar, dass der Y402H- und der I62V-Polymorphismus auch die Ausbildungen von Neovaskularisationen im Auge begünstigen könnten. In der Tat weisen einige genetische Studien auf eine besondere Assoziation der beiden Polymorphismen mit fortgeschrittenen und feuchten Formen der AMD hin (Seddon et al. 2007, Shuler et al. 2007, Wegscheider et al. 2007, Kondo et al. 2009). Somit gibt die vorliegende Arbeit erstmals eindeutige Hinweise darauf, dass über die genetische Assoziation hinaus auch funktionelle Zusammenhänge zwischen Komplementpolymorphismen (und dabei speziell FH-Polymorphismen) und AMD bestehen könnten. Diese Zusammenhänge müssen im Detail noch besser verstanden werden. Es bleibt abzuwarten, ob sich auf der Basis dieser neuen Erkenntnisse zukünftig neue Therapiemöglichkeiten für AMD-Patienten ergeben.

6. Zusammenfassung

Faktor H (FH) ist der wichtigste Regulator der Komplementaktivierung über den alternativen Weg in der flüssigen Phase. Ein mit der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) assoziierter FH-Polymorphismus (Y402H) hat den Austausch von Tyrosin gegen Histidin an Position 402 innerhalb der Domäne SCR7 zur Folge, welche u.a. die Bindung von FH an Heparin und CRP vermittelt. Darüber hinaus bindet FH auch C3b und ist zugleich Cofaktor für dessen Abbau durch Faktor I.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresubstitution an Position 402 Einfluss auf einige der Funktionen von FH hat. So bindet die AMD-Risikovariante FH-402H schwächer an CRP als FH-402Y und weist eine reduzierte Cofaktor-Aktivität für den Abbau des C3-Fragments iC3b zu C3dg auf. Die Bedeutung von FH als Cofaktor für diesen Schritt des C3b-Abbaus unter physiologischen Bedingungen in der flüssigen Phase konnte in dieser Arbeit erstmalig dokumentiert werden. Diese Ergebnisse wurden durch vergleichende funktionelle Untersuchungen von FH-402Y und FH-402H in nativer Form und voller Länge gewonnen. Beide FH-Varianten wurden hierzu aus dem Plasma von gesunden genotypisierten Spendern mittels Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt. Darüber hinaus gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit, monoklonale Antikörper zu generieren, die spezifisch nur FH-402Y oder FH-402H binden. Unter Zuhilfenahme dieser Antikörper wurde das FH-Epitop 402 funktionell charakterisiert. Den eigenen Daten zufolge könnte die Aminosäure an Position 402 direkt an der Bindung von FH an Heparin und an der Cofaktor-Aktivität für die Überführung von iC3b in C3dg beteiligt sein. An der CRP-Bindung hingegen ist das polymorphe Epitop nicht direkt beteiligt, ein indirekter Einfluss des Y402H-Polymorphismus auf diese FH-Funktion erscheint daher plausibel.

Die Risikovariante FH-402H mit ihrer reduzierten CRP-Bindung und eingeschränkten Cofaktor-Aktivität könnte zu einer reduzierten Komplementkontrolle und zu einer Akkumulation von iC3b führen, was wiederum die Ausbildung von Neovaskularisationen und ein chronisches Entzündungsgeschehen zur Folge haben könnte. Durch die Untersuchung von AMD-Patienten-Plasmen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei der Erkrankung eine systemische chronische Aktivierung des Alternativwegs nachweisbar ist. Selbige ist auch bei Augen-gesunden Probanden nachweisbar, welche genetisch die Kombination verschiedener AMD-Risikopolymorphismen tragen. Der FH-Polymorphismus Y402H allein führt zu keiner systemischen Komplementaktivierung. Passend zu dieser Beobachtung konnte auf molekularer Ebene gezeigt werden, dass die FH-Polymorphismen I62V und Y402H additive Effekte auf die CRP-Bindung haben.

Die Daten der vorliegenden Arbeit geben also Anlass zu der Vermutung, dass die Kombination mehrerer FH-Polymorphismen über additive funktionelle Effekte zu einer

chronischen Komplementaktivierung führen könnte. Da schon seit längerem vielfach Hinweise auf eine lokale Komplementaktivierung in den Augen von AMD-Patienten bestehen, erweitern die Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, die aktuellen pathophysiologischen Konzepte der AMD-Entstehung.

7. Literaturverzeichnis

Abdul Ajees A, Gunasekaran K, Volanakis JE, Narayana SV, Kotwal GJ, Murthy HM (2006): The structure of complement C3b provides insights into complement activation and regulation. *Nature* 444(7116), 221-225

Abrera-Abeleda MA, Nishimura C, Smith JL, Sethi S, McRae JL, Murphy BF, Silvestri G, Skerka C, Józsi M, Zipfel PF, Hageman GS, Smith RJ (2005): Variations in the complement regulatory genes factor H (CFH) and factor H related 5 (CFHR5) are associated with membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease). *J Med Genet* 43(7), 582-589

Age-Related Eye Disease Study Research Group (2000): Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology* 107(12), 2224-2232

Alsensz J, Lambris JD, Schulz TF, Dierich MP (1984): Localization of the complement-component-C3b-binding site and the cofactor activity for factor I in the 38kDa tryptic fragment of factor H. *Biochem J* 224(2), 389-398.

Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK (2003): An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 9(11), 1390-1397

Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV (2002): A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol* 134(3), 411-431

Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, Hancox LS, Hu J, Ebright JN, Malek G, Hauser MA, Rickman CB, Bok D, Hageman GS, Johnson LV (2010): The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res* 29(2), 95-112

Andrásfalvy M, Prechl J, Hardy T, Erdei A, Bajtay Z (2002): Mucosal type mast cells express complement receptor type 2 (CD21). *Immunol Lett* 82(1-2), 29-34

Apte RS, Richter J, Herndon J, Ferguson TA (2006): Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS Med* 3(8), 1371-1381

Ault BH, Schmidt BZ, Fowler NL, Kashtan CE, Ahmed AE, Vogt BA, Colten HR (1997): Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism. *J Biol Chem* 272(40), 25168-25175

Becherer JD, Alsensz J, Esparza I, Hack CE, Lambris JD (1992): Segment spanning residues 727-768 of the complement C3 sequence contains a neoantigenic site and accommodates the binding of CR1, factor H, and factor B. *Biochemistry* 31(6), 1787-1794

- Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN (2008):** The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol Immunol* 45(8), 2370-2379
- Blackmore TK, Sadlon TA, Ward HM, Lublin DM, Gordon DL (1996):** Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J Immunol* 157(12), 5422-5427
- Blackmore TK, Hellwage J, Sadlon TA, Higgs N, Zipfel PF, Ward HM, Gordon DL (1998):** Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J Immunol* 160(7), 3342-3348
- Bora NS, Kaliappan S, Jha P, Xu Q, Sohn JH, Dhulakhandi DB, Kaplan HJ, Bora PS (2006):** Complement activation via alternative pathway is critical in the development of laser-induced choroidal neovascularization: role of factor B and factor H. *J Immunol* 177(3), 1872-1878
- Bora PS, Sohn JH, Cruz JM, Jha P, Nishihori H, Wang Y, Kaliappan S, Kaplan HJ, Bora NS (2005):** Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J Immunol* 174(1), 491-497
- Bourke BE, Moss IK, Mumford P, Horsfall A, Maini RN (1982):** The complement fixing ability of putative circulating immune complexes in rheumatoid arthritis and its relationship to extra-articular disease. *Clin Exp Immunol* 48(3), 726-732
- Bressler SB, Maguire MG, Bressler NM, Fine SL (1990):** Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration. The Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol* 108(10), 1442-1447
- Carroll MC (2004):** The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5(10), 981-986
- Clark SJ, Higman VA, Mulloy B, Perkins SJ, Lea SM, Sim RB, Day AJ (2006):** His-384 allotypic variant of factor H associated with age-related macular degeneration has different heparin binding properties from the non-disease-associated form. *J Biol Chem* 281(34), 24713-24720
- Coffey PJ, Gias C, McDermott CJ, Lundh P, Pickering MC, Sethi C, Bird A, Fitzke FW, Maass A, Chen LL, Holder GE, Luthert PJ, Salt TE, Moss SE, Greenwood J (2007):** Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(42), 16651-16656
- Crane IJ, Wallace CA, McKillop-Smith S, Forrester JV (2000):** Control of chemokine production at the blood-retina barrier. *Immunology* 101(3), 426-433
- Davis AE 3rd, Harrison RA (1982):** Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry* 21(23), 5745-5749
- Davis AE 3rd, Harrison RA, Lachmann PJ (1984):** Physiologic inactivation of fluid phase C3b: isolation and structural analysis of C3c, C3d,g (alpha 2D), and C3g. *J Immunol* 132(4), 1960-1966

- DiScipio RG (1992):** Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. *J Immunol* 149(8), 2592-2599
- Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman G (2006):** The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 51(2), 137-152
- Dragon-Durey MA, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C, Blouin J, Niaudet P, Deschenes G, Coppo P, Herman Fridman W, Weiss L (2003):** Heterozygous and homozygous factor h deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases. *J Am Soc Nephrol* 15(3), 787-95
- Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM (1996):** ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* 62(2), 155-169
- Eccleston E, Leonard BJ, Lowe JS, Welford HJ (1973):** Basophilic leukaemia in the albino rat and a demonstration of the basopoietin. *Nat New Biol* 244(133), 73-76
- Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA (2005):** Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308(5720), 421-424
- Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, Rodríguez de Córdoba S (2004):** Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics* 56(2), 77-82
- Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW (2003):** Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(8), 3586-3592
- Estaller C, Schwaeble W, Dierich M, Weiss EH (1991):** Human complement factor H: two factor H proteins are derived from alternatively spliced transcripts. *Eur J Immunol* 21(3), 799-802
- Fearon DT (1978):** Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(4), 1971-1975
- Forrester JV, McMenamin PG, Holthouse I, Lumsden L, Liversidge J (1994):** Localization and characterization of major histocompatibility complex class II-positive cells in the posterior segment of the eye: implications for induction of autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(1), 64-77
- Gahmberg CG, Valmu L, Fagerholm S, Kotovuori P, Ihanus E, Tian L, Pessa-Morikawa T (1998):** Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 54(6), 549-555
- Gasque P (2004):** Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* 41(11), 1089-1098

Gewurz H, Zhang XH, Lint TF (1995): Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol* 7(1), 54-64

Giannakis E, Male DA, Ormsby RJ, Mold C, Jokiranta TS, Ranganathan S, Gordon DL (2001): Multiple ligand binding sites on domain seven of human complement factor H. *Int Immunopharmacol* 1(3), 433-443

Giannakis E, Jokiranta TS, Male DA, Ranganathan S, Ormsby RJ, Fischetti VA, Mold C, Gordon DL (2003): A common site within factor H SCR 7 responsible for binding heparin, C-reactive protein and streptococcal M protein. *Eur J Immunol* 33(4), 962-969

Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Barile GR, Smith RT; AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman GS, Dean M, Allikmets R (2006): Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38(4), 458-462

Gordon DL, Kaufman RM, Blackmore TK, Kwong J, Lublin DM (1995): Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J Immunol* 155(1), 348-356

Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR; VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group (2004): Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351(27), 2805-2816

Grossniklaus HE, Ling JX, Wallace TM, Dithmar S, Lawson DH, Cohen C, Elner VM, Elner SG, Sternberg P Jr (2002): Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 8, 119-126

Guo RF, Ward PA (2005): Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 23, 821-852

Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM, Smith RJ, Silvestri G, Russell SR, Klaver CC, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R (2005): A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(20), 7227-7232

Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Nouredine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA (2005): Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308(5720), 419-421

Harrison RA, Lachmann PJ (1980): The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol Immunol* 17(1), 9-20

Hecker LA, Edwards AO, Ryu E, Tosakulwong N, Baratz KH, Brown WL, Charbel Issa P, Scholl HP, Pollok-Kopp B, Schmid-Kubista KE, Bailey KR, Oppermann M (2010): Genetic control of the

alternative pathway of complement in humans and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 19(1), 209-215

Huang SJ, Costa DL, Gross NE, Yannuzzi LA (2003): Peripheral drusen in membranoproliferative glomerulonephritis type II. *Retina* 23(3), 429-431

Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U (2006): A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38(10), 1173-1177

Jager RD, Mieler WF, Miller JW (2008): Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 358(24), 2606-2617

Janatova J (1986): Detection of disulphide bonds and localization of interchain linkages in the third (C3) and the fourth (C4) components of human complement. *Biochem J* 233(3), 819-825

Janatova J, Reid KB, Willis AC (1989): Disulfide bonds are localized within the short consensus repeat units of complement regulatory proteins: C4b-binding protein. *Biochemistry* 28(11), 4754-4761

Janssen BJ, Gros P (2007): Structural insights into the central complement component C3. *Mol Immunol* 44(1-3), 3-10

Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P (2006): Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature* 444(7116), 213-216

Jarva H, Jokiranta TS, Hellwage J, Zipfel PF, Meri S (1999): Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11. *J Immunol* 163(7), 3957-3962

Jiang HX, Siegel JN, Gewurz H (1991): Binding and complement activation by C-reactive protein via the collagen-like region of C1q and inhibition of these reactions by monoclonal antibodies to C-reactive protein and C1q. *J Immunol* 146(7), 2324-2330

Johnson PT, Betts KE, Radeke MJ, Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV (2006): Individuals homozygous for the age-related macular degeneration risk-conferring variant of complement factor H have elevated levels of CRP in the choroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46), 17456-17461

Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Zipfel PF, Meri S (2000): Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J Biol Chem* 275(36), 27657-27662

Jokiranta TS, Cheng ZZ, Seeberger H, Jözsi M, Heinen S, Noris M, Remuzzi G, Ormsby R, Gordon DL, Meri S, Hellwage J, Zipfel PF (2005): Binding of complement factor H to endothelial cells is mediated by the carboxy-terminal glycosaminoglycan binding site. *Am J Pathol* 167(4), 1173-1181

Jözsi M, Heinen S, Hartmann A, Ostrowicz CW, Hälbig S, Richter H, Kunert A, Licht C, Saunders RE, Perkins SJ, Zipfel PF, Skerka C (2006): Factor H and atypical hemolytic uremic syndrome: mutations

in the C-terminus cause structural changes and defective recognition functions. *J Am Soc Nephrol* 17(1), 170-177

Józsi M, Oppermann M, Lambris JD, Zipfel PF (2007): The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Mol Immunol* 44(10), 2697-2706

Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF (1979): Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. *J Immunol* 122(1), 75-81

Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K (1979): A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immunol* 123(4), 1548-1550

Kelly J, Ali Khan A, Yin J, Ferguson TA, Apte RS (2007): Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice. *J Clin Invest* 117(11), 3421-3426

Kijlstra A, La Heij E, Hendrikse F (2005): Immunological factors in the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration. *Ocul Immunol Inflamm* 13(1), 3-11

Kim DD, Song WC (2006): Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 118(2-3), 127-136

Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J (2005): Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308(5720), 385-389

Kondo N, Honda S, Kuno S, Negi A (2009): Coding variant I62V in the complement factor H gene is strongly associated with polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmology* 116(2), 304-310

Kotarsky H, Hellwage J, Johnsson E, Skerka C, Svensson HG, Lindahl G, Sjöbring U, Zipfel PF (1998): Identification of a domain in human factor H and factor H-like protein-1 required for the interaction with streptococcal M proteins. *J Immunol* 160(7), 3349-3354

Kristensen T, Wetsel RA, Tack BF (1986): Structural analysis of human complement protein H: homology with C4b binding protein, beta 2-glycoprotein I, and the Ba fragment of B2. *J Immunol* 136(9), 3407-3411

Kühn S, Skerka C, Zipfel PF (1995): Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol* 155(12), 5663-5670

Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N (1997): Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(22), 12053-12058

Lachmann PJ, Hughes-Jones NC (1984): Initiation of complement activation. *Springer Semin Immunopathol* 7(2-3), 143-162

- Lachmann PJ, Pangburn MK, Oldroyd RG (1982):** Breakdown of C3 after complement activation. Identification of a new fragment C3g, using monoclonal antibodies. *J Exp Med* 156(1), 205-216
- Laemmli UK (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685
- Laine M, Jarva H, Seitsonen S, Haapasalo K, Lehtinen MJ, Lindeman N, Anderson DH, Johnson PT, Järvelä I, Jokiranta TS, Hageman GS, Immonen I, Meri S (2007):** Y402H polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein. *J Immunol* 178(6), 3831-3836
- Lambris JD, Lao Z, Oglesby TJ, Atkinson JP, Hack CE, Becherer JD (1996):** Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *J Immunol* 156(12), 4821-4832
- Law SK, Fearon DT, Levine RP (1979a):** Action of the C3b-inactivator on the cell-bound C3b. *J Immunol* 122(3), 759-765
- Law SK, Lichtenberg NA, Levine RP (1979b):** Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. *J Immunol* 123(3), 1388-1394
- Leonard EJ, Yoshimura T (1990) :** Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 11(3), 97-101
- Levy M, Halbwachs-Mecarelli L, Gubler MC, Kohout G, Bensenouci A, Niaudet P, Hauptmann G, Lesavre P (1986):** H deficiency in two brothers with atypical dense intramembranous deposit disease. *Kidney Int* 30(6), 949-956
- Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R, Wade MS, Li Y, Liang L, Zarepari S, Swaroop A, Abecasis GR (2006):** CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet* 38(9), 1049-1054
- Lim SK (2003):** Freund adjuvant induces TLR2 but not TLR4 expression in the liver of mice. *Int Immunopharmacol* 3(1), 115-118
- Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP (1991):** Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 9, 431-455
- Lotery A, Trump D (2007):** Progress in defining the molecular biology of age related macular degeneration. *Hum Genet* 122(3-4), 219-236
- Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ (1998):** Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med* 187(4), 601-608
- Lublin DM, Atkinson JP (1989):** Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol* 7, 35-58

- Luo BH, Carman CV, Springer TA (2007):** Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25, 619-647
- Male DA, Ormsby RJ, Ranganathan S, Giannakis E, Gordon DL (2000):** Complement factor H: sequence analysis of 221 kb of human genomic DNA containing the entire fH, fHR-1 and fHR-3 genes. *Mol Immunol* 37(1-2), 41-52
- Manuelian T, Hellwage J, Meri S, Caprioli J, Noris M, Heinen S, Jozsi M, Neumann HP, Remuzzi G, Zipfel PF (2003):** Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest* 111(8), 1181-1190
- Marth T, Kelsall BL (1997):** Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J Exp Med* 185(11), 1987-1995
- McGwin G, Hall TA, Xie A, Owsley C (2005):** The relation between C reactive protein and age related macular degeneration in the Cardiovascular Health Study. *Br J Ophthalmol* 89(9), 1166-1170
- Medicus RG, Melamed J, Arnaout MA (1983):** Role of human factor I and C3b receptor in the cleavage of surface-bound C3bi molecules. *Eur J Immunol* 13(6), 465-470
- Medof ME, Prince GM, Mold C (1982):** Release of soluble immune complexes from immune adherence receptors on human erythrocytes is mediated by C3b inactivator independently of Beta 1H and is accompanied by generation of C3c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(16), 5047-5051
- Meuth JL, Morgan EL, DiSipio RG, Hugli TE (1983):** Suppression of T lymphocyte functions by human C3 fragments. I. Inhibition of human T cell proliferative responses by a kallikrein cleavage fragment of human iC3b. *J Immunol* 130(6), 2605-2811
- Mold C, Gewurz H, Du Clos TW (1999):** Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* 42(1-3), 23-30
- Mollnes TE, Lea T, Mellbye OJ, Pahle J, Grand O, Harboe M (1986):** Complement activation in rheumatoid arthritis evaluated by C3dg and the terminal complement complex. *Arthritis Rheum* 29(6), 715-721
- Mollnes TE, Jokiranta TS, Truedsson L, Nilsson B, Rodriguez de Cordoba S, Kirschfink M (2007):** Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 44(16), 3838-3849
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993):** Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-190
- Müller-Eberhard HJ (1975):** Complement. *Annu Rev Biochem* 44, 697-724
- Müller-Eberhard HJ (1988):** Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 57, 321-347

- Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS (2000):** Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 14(7), 835-846
- Nilsson UR, Müller-Eberhard HJ (1965):** Isolation of beta1F-globulin from human serum and its characterization as the fifth component of complement. *J Exp Med* 122, 277-298
- Nowak JZ (2006):** Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep* 58(3), 353-363
- Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J (2006):** Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7), 2328-2333
- Oppermann M, Haubitz M, Quentin E, Götze O (1988):** Complement activation in patients with renal failure as detected through the quantitation of fragments of the complement proteins C3, C5, and factor B. *Klin Wochenschr* 66(18), 857-864
- Oppermann M, Baumgarten H, Brandt E, Gottsleben W, Kurts C, Götze O (1990):** Quantitation of components of the alternative pathway of complement (APC) by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods* 133(2), 181-190
- Oppermann M, Kurts C, Zierz R, Quentin E, Weber MH, Götze O (1991a):** Elevated plasma levels of the immunosuppressive complement fragment Ba in renal failure. *Kidney Int* 40(5), 939-947
- Oppermann M, Schulze M, Götze O (1991b):** A sensitive enzyme immunoassay for the quantitation of human C5a/C5a(desArg) anaphylatoxin using a monoclonal antibody with specificity for a neopeptide. *Complement Inflamm* 8(1), 13-24
- Oppermann M, Höpken U, Götze O (1992):** Assessment of complement activation in vivo. *Immunopharmacology* 24(2), 119-134
- Oppermann M, Manuelian T, Józsi M, Brandt E, Jokiranta TS, Heinen S, Meri S, Skerka C, Götze O, Zipfel PF (2006):** The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clin Exp Immunol* 144(2), 342-352
- Oran AE, Isenman DE (1999):** Identification of residues within the 727-767 segment of human complement component C3 important for its interaction with factor H and with complement receptor 1 (CR1, CD35). *J Biol Chem* 274(8), 5120-5130
- Ormsby RJ, Jokiranta TS, Duthy TG, Griggs KM, Sadlon TA, Giannakis E, Gordon DL (2006):** Localization of the third heparin-binding site in the human complement regulator factor H1. *Mol Immunol* 43(10), 1624-1632
- Pangburn MK (2000):** Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology* 49(1-2), 149-157

Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ (1984): The alternative pathway of complement. Springer Semin Immunopathol 7(2-3), 163-192

Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ (1977): Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. J Exp Med 146(1), 257-270

Pangburn MK, Atkinson MA, Meri S (1991): Localization of the heparin-binding site on complement factor H. J Biol Chem 266(25), 16847-16853

Perkins SJ, Gilbert HE, Aslam M, Hannan J, Holers VM, Goodship TH (2002): Solution structures of complement components by X-ray and neutron scattering and analytical ultracentrifugation. Biochem Soc Trans 30, 996-1001

Pickering MC, Cook HT (2008): Translational mini-review series on complement factor H: renal diseases associated with complement factor H: novel insights from humans and animals. Clin Exp Immunol 151(2), 210-230

Pickering MC, Cook HT, Warren J, Bygrave AE, Moss J, Walport MJ, Botto M (2002): Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. Nat Genet 31(4), 424-428

Prosser BE, Johnson S, Roversi P, Herbert AP, Blaum BS, Tyrrell J, Jowitt TA, Clark SJ, Tarelli E, Uhrin D, Barlow PN, Sim RB, Day AJ, Lea SM (2007): Structural basis for complement factor H linked age-related macular degeneration. J Exp Med 204(10), 2277-2283

Remuzzi G, Ruggenenti P (1998): The hemolytic uremic syndrome. Kidney Int Suppl 66, 54-57

Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM (2009): Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. Invest Ophthalmol Vis Sci 50(12), 5818-5827

Ripoche J, Day AJ, Harris TJ, Sim RB (1988): The complete amino acid sequence of human complement factor H. Biochem J 249(2), 593-602

Rodríguez de Córdoba S, Díaz-Guillén MA, Heine-Suñer D (1999): An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. Mol Immunol 36(13-14), 803-808

Rodríguez de Córdoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sánchez-Corral P (2004): The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. Mol Immunol 41(4), 355-367

Rose KL, Paixao-Cavalcante D, Fish J, Manderson AP, Malik TH, Bygrave AE, Lin T, Sacks SH, Walport MJ, Cook HT, Botto M, Pickering MC (2008): Factor I is required for the development of membranoproliferative glomerulonephritis in factor H-deficient mice. J Clin Invest 118(2), 608-618

- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY; MARINA Study Group (2006):** Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355(14), 1419-1431
- Ross GD, Lambris JD, Cain JA, Newman SL (1982):** Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol* 129(5), 2051-2060
- Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J (2003a):** Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(8), 3578-3585
- Sakurai E, Taguchi H, Anand A, Ambati BK, Gragoudas ES, Miller JW, Adamis AP, Ambati J (2003b):** Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(6), 2743-2749
- Sánchez-Corral P, Pérez-Caballero D, Huarte O, Simckes AM, Goicoechea E, López-Trascasa M, de Córdoba SR (2002):** Structural and functional characterization of factor H mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet* 71(6), 1285-1295
- Sanger F, Coulson AR (1975):** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94(3), 441-448
- Schmidt BZ, Fowler NL, Hidvegi T, Perlmutter DH, Colten HR (1999):** Disruption of disulfide bonds is responsible for impaired secretion in human complement factor H deficiency. *J Biol Chem* 274(17), 11782-11788
- Scholl HP, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, Fritsche LG, Chong NV, Fimmers R, Wienker T, Holz FG, Weber BH, Oppermann M (2008):** Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One* 3(7), e2593
- Schreiber RD (1984):** The chemistry and biology of complement receptors. *Springer Semin Immunopathol* 7(2-3), 221-249
- Seddon JM, Chen CA (2004):** The epidemiology of age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin* 44(4), 17-39
- Seddon JM, Gensler G, Milton RC, Klein ML, Rifai N (2004):** Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. *JAMA* 291(6), 704-710
- Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Klein ML (2007):** Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *JAMA* 297(16), 1793-1800
- Shams N, Ianchulev T (2006):** Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin North Am* 19(3), 335-344

- Sharma AK, Pangburn MK (1996):** Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20), 10996-11001
- Shuler RK Jr, Hauser MA, Caldwell J, Gallins P, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Haines JL, Pericak-Vance MA, Postel EA (2007):** Neovascular age-related macular degeneration and its association with LOC387715 and complement factor H polymorphism. *Arch Ophthalmol* 125(1), 63-67
- Sim RB, DiScipio RG (1982):** Purification and structural studies on the complement-system control protein beta 1H (Factor H). *Biochem J* 205(2), 285-293
- Sjöberg AP, Trouw LA, Clark SJ, Sjölander J, Heinegård D, Sim RB, Day AJ, Blom AM (2007):** The factor H variant associated with age-related macular degeneration (His-384) and the non-disease-associated form bind differentially to C-reactive protein, fibromodulin, DNA, and necrotic cells. *J Biol Chem* 282(15), 10894-10900
- Skerka C, Lauer N, Weinberger AA, Keilhauer CN, Sühnel J, Smith R, Schlötzer-Schrehardt U, Fritsche L, Heinen S, Hartmann A, Weber BH, Zipfel PF (2007):** Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration. *Mol Immunol* 44(13), 3398-3406
- Soames CJ, Sim RB (1997):** Interactions between human complement components factor H, factor I and C3b. *Biochem J* 326, 553-561
- Sohn JH, Bora PS, Suk HJ, Molina H, Kaplan HJ, Bora NS (2003):** Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. *Nat Med* 9(2), 206-212
- Spraul CW, Lang GE, Grossniklaus HE, Lang GK (1999):** Histologic and morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in postmortem eyes with age-related macular degeneration and histologic examination of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Surv Ophthalmol* 44, 10-32
- Takizawa F, Tsuji S, Nagasawa S (1996):** Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett* 397(2-3), 269-272
- The International HapMap Consortium (2003):** The International HapMap Project. *Nature* 426(6968), 789-796
- The International HapMap Consortium (2005):** A haplotype map of the human genome. *Nature* 437(7063), 1299-1320
- Thompson RA, Winterborn MH (1981):** Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol* 46(1), 110-119
- Thurman JM, Holers VM (2006):** The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol* 176(3), 1305-1310

- Tortajada A, Montes T, Martínez-Barricarte R, Morgan BP, Harris CL, de Córdoba SR (2009):** The disease-protective complement factor H allotypic variant Ile62 shows increased binding affinity for C3b and enhanced cofactor activity. *Hum Mol Genet* 18(18), 3452-3461
- Trinidad AG, de la Puerta ML, Fernández N, Bayón Y, Crespo MS, Alonso A (2006):** Coupling of C3bi to IgG inhibits the tyrosine phosphorylation signaling cascade downstream Syk and reduces cytokine induction in monocytes. *J Leukoc Biol* 79(5), 1073-1082
- van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ (2007):** Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cell Microbiol* 9(9), 2095-2102
- Verbovetski I, Bychkov H, Trahtenberg U, Shapira I, Hareuveni M, Ben-Tal O, Kutikov I, Gill O, Mevorach D (2002):** Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *J Exp Med* 196(12), 1553-1561
- Vine AK, Stader J, Branham K, Musch DC, Swaroop A (2005):** Biomarkers of cardiovascular disease as risk factors for age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 112(12), 2076-2080
- Volanakis JE, Barnum SR, Giddens M, Galla JH (1985):** Renal filtration and catabolism of complement protein D. *N Engl J Med* 312(7), 395-399
- Walport MJ (2001):** Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344(14), 1058-1066
- Wegscheider BJ, Weger M, Renner W, Steinbrugger I, März W, Mossböck G, Temmel W, El-Shabrawi Y, Schmut O, Jahrbacher R, Haas A (2007):** Association of complement factor H Y402H gene polymorphism with different subtypes of exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 114(4), 738-742
- Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT (1976):** Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(9), 3268-3272
- Whaley K, Ruddy S (1976a):** Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator. *Science* 193(4257), 1011-1013
- Whaley K, Ruddy S (1976b):** Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med* 144(5), 1147-1163
- Würzner R, Oppermann M, Zierz R, Baumgarten H, Götze O (1990):** Determination of the epitope specificities of monoclonal antibodies using unprocessed supernatants of hybridoma cultures. *J Immunol Methods* 126(2), 231-217
- Würzner R, Schulze M, Happe L, Franzke A, Bieber FA, Oppermann M, Götze O (1991):** Inhibition of terminal complement complex formation and cell lysis by monoclonal antibodies. *Complement Inflamm* 8(5-6), 328-340

Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrecht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT; Genetic Factors in AMD Study Group (2007): Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 357(6), 553-561.

Yoshida Y, Kang K, Berger M, Chen G, Gilliam AC, Moser A, Wu L, Hammerberg C, Cooper KD (1998): Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin. *J Immunol* 161(11), 5873-5879

Yu J, Wiita P, Kawaguchi R, Honda J, Jorgensen A, Zhang K, Fischetti VA, Sun H (2007): Biochemical analysis of a common human polymorphism associated with age-related macular degeneration. *Biochemistry* 46(28), 8451-8461

Zarepari S, Branham KE, Li M, Shah S, Klein RJ, Ott J, Hoh J, Abecasis GR, Swaroop A (2005): Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 77(1), 149-153.

Zipfel PF, Skerka C (1994): Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today* 15(3), 121-126

Zipfel PF, Skerka C (1999): FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* 20(3), 135-140

Zipfel PF, Skerka C (2009): Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 9(10), 729-740

Zipfel PF, Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Meri S (1999): The factor H protein family. *Immunopharmacology* 42(1-3), 53-60

Zipfel PF, Skerka C, Hellwage J, Jokiranta ST, Meri S, Brade V, Kraiczky P, Noris M, Remuzzi G (2002): Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans* 30, 971-978

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Oppermann danke ich zum einen für die interessante Fragestellung und die gute Betreuung während meiner Arbeit in seinem Labor. Er stand mir jederzeit als persönlicher Ansprechpartner zur Verfügung und hat jede Frage stets geduldig und mit bestem Wissen beantwortet. Zum anderen möchte ich ihm für seine Förderung und Beratung danken, z.B. in Form von Unterstützung bei Vorträgen im Rahmen der internen Abteilungsfortbildungen und Kongressen. Darüber hinaus danke ich Prof. Oppermann für die intensive Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Dr. Beatrix Pollok-Kopp danke ich sehr für ihre intensive Hilfe und Beratung bei meiner Arbeit in theoretischen und praktischen Belangen. Besonderer Dank gilt ihr für die Rekrutierung der Blut- und Plasmaspender sowie für die Verfassung des Ethikantrags. Besonders danken möchte ich auch Gabriele Sonntag, die mich mit größter Sorgfalt in alle Methoden eingearbeitet hat und mir stets beratend und unterstützend zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Mladen Tzvetkov (Abteilung Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen, Direktor: Prof. Brockmöller), der mir bei der Planung der Genotypisierungen half und darüber hinaus Geräte und Materialien aus seiner Abteilung zur Verfügung stellte.

Herrn Privatdozent Dr. Scholl und Herrn Dr. Charbel Issa (Universitätsaugenklinik Bonn, Direktor: Prof. Holz) danke ich für die Rekrutierung und Untersuchung der Probanden und das Sammeln der Plasmen zur Bestimmung der Konzentration verschiedener Komplementparameter.

Den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Weber) möchte ich für die Genotypisierung der von Herrn Scholl und Herrn Charbel Issa rekrutierten Probanden danken.

Lebenslauf

Ich, Florian Börncke, wurde am 19.04.1982 als Sohn von Gudrun und Max-Erhard Börncke in Lübeck geboren. Von 1988 bis 1992 besuchte ich dort die Albert-Schweitzer-Grundschule, darauffolgend das Johanneum zu Lübeck, an dem ich 2001 mein Abitur ablegte. Von August 2001 bis Mai 2002 leistete ich meinen Zivildienst bei den Marliwerkstätten in Lübeck ab, bevor ich im Oktober 2002 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen aufnahm. Im Herbst 2004 legte ich dort die Ärztliche Vorprüfung ab. Im Wintersemester 2005/2006 begann ich meine Promotion in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universitätsmedizin bei Prof. Dr. Martin Oppermann und unterbrach von da an das Medizinstudium bis einschließlich Sommersemester 2006 zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Von August 2008 bis Juli 2009 leistete ich mein Praktisches Jahr in der Universitätsmedizin Göttingen, bevor ich im Dezember 2009 die Ärztliche Prüfung bestand. Seit Juni 2010 arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen.

