

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

**Etablierung eines Messverfahrens für die
Komplementkomponente FHR-3 und seine
Anwendung auf die Bestimmung von FHR-3-
Plasmakonzentrationen bei Patienten mit
altersabhängiger Makuladegeneration**

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

vorgelegt von Daniela Och

aus Düren

Göttingen 2012

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann
2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Koziolk
3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|------------|
| I. | Abkürzungsverzeichnis | IX |
| II. | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | XIV |
| II.1 | Abbildungsverzeichnis..... | XIV |
| II.2 | Tabellenverzeichnis..... | XVI |
| 1. | Einleitung | |
| 1.1 | Das Komplementsystem..... | 1 |
| 1.2 | Die Regulation des Komplementsystems..... | 4 |
| 1.3 | Die Faktor-H-Proteinfamilie..... | 5 |
| 1.4 | Erkrankungen durch Dysfunktionen und Defizienzen von Faktor H und anderen Faktor-H-Familienmitgliedern..... | 10 |
| 1.5 | Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD)..... | 11 |
| 1.6 | Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit..... | 15 |
| 2. | Materialien | |
| 2.1 | Geräte und Zubehör..... | 16 |
| 2.2 | Labormaterialien..... | 17 |
| 2.3 | Chemikalien, Kits und sonstige Materialien..... | 18 |
| 2.4 | Lösungen und Puffer..... | 20 |
| 2.5 | Monoklonale Antikörper..... | 22 |
| 2.6 | Polyklonale Antikörper und Antikörper-Konjugate..... | 23 |
| 2.7 | Eukaryote Zelllinien..... | 24 |
| 2.8 | Zellkulturmedien..... | 24 |
| 3. | Methoden | |
| 3.1 | Zellkultur..... | 25 |
| 3.1.1 | Zell-Kultivierung..... | 25 |
| 3.1.2 | Bestimmung von Zellzahl und Vitalität..... | 25 |
| 3.1.3 | Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen..... | 25 |
| 3.2 | Herstellung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für FHR-3..... | 26 |
| 3.2.1 | Allgemeines zum Verfahren..... | 26 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.2 | Immunisierung der Mäuse..... | 27 |
| 3.2.3 | Präparation von Maus-Peritoneal-Makrophagen..... | 28 |
| 3.2.4 | Zellfusion und selektive Aufzucht von Hybridomen..... | 29 |
| 3.2.5 | Identifizierung von Hybridomen mit der gewünschten Spezifität..... | 30 |
| 3.2.6 | Subklonierung der positiven Klone..... | 30 |
| 3.2.7 | Antikörper-Massenproduktion im MiniPerm-Bioreaktor..... | 31 |
| 3.3 | Antikörperaufreinigung mittels Protein-G Affinitätschromatografie.. | 32 |
| 3.4 | Biotinylierung der aufgereinigten Antikörper..... | 32 |
| 3.5 | ELISA-Verfahren..... | 33 |
| 3.5.1 | Allgemeines zum Verfahren..... | 33 |
| 3.5.2 | ELISA zum Nachweis von anti-FHR-3-Antikörpern in Hybridomüberständen..... | 35 |
| 3.5.3 | ELISA zur Immunglobulin-Subklassifizierung..... | 36 |
| 3.5.4 | Epitopanalyse mittels ELISA..... | 36 |
| 3.5.5 | ELISA zur Quantifizierung von FHR-3..... | 37 |
| 3.6 | Patientenproben..... | 37 |
| 3.6.1 | Aufarbeitung der Patientenproben..... | 37 |
| 3.6.2 | Thrombozyten-Spender..... | 37 |
| 3.6.3 | AMD- und Kontroll-Proben..... | 38 |
| 3.6.4 | Tageszeitliche FHR-3-Konzentrations-Schwankungen..... | 38 |
| 3.6.5 | FHR-3-Polymorphismus..... | 38 |
| 3.7 | Auftrennen und Nachweis von Proteinen..... | 39 |
| 3.7.1 | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese..... | 39 |
| 3.7.1.1 | Gießen eines Polyacrylamidgels..... | 39 |
| 3.7.1.2 | Vorbereitung der Proben und der Elektrophorese..... | 40 |
| 3.7.2 | Proteinfärbung mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung..... | 41 |
| 3.7.3 | Immunoblot..... | 41 |

4. Ergebnisse

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1 | Herstellung und Biotinylierung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für FHR-3..... | 43 |
| 4.1.1 | Immunisierung..... | 43 |
| 4.1.2 | Zellfusion und Austestung der Hybridom-Überstände..... | 44 |
| 4.1.3 | Sub-Klonierung..... | 46 |
| 4.1.4 | Isotyp-Bestimmung der Antikörper..... | 46 |
| 4.1.5 | Massenproduktion in der MiniPerm-Anlage..... | 46 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1.6 | Aufreinigung der monoklonalen Antikörper mittels Protein-G-Affinitätschromatographie..... | 47 |
| 4.1.7 | Biotinylierung der aufgereinigten monoklonalen Antikörper..... | 50 |
| 4.2 | Einteilung der hergestellten monoklonalen Antikörper anhand ihrer Epitopspezifität..... | 52 |
| 4.2.1 | Analyse der SCR-Kartierung der Klone..... | 52 |
| 4.2.2 | Analyse der Epitop-Spezifität mittels ELISA..... | 53 |
| 4.2.2.1 | Sandwich-ELISA durch Kombination von FH- und FHR-3-spezifischen Antikörpern..... | 53 |
| 4.2.2.2 | Sandwich-ELISA durch Kombination zweier FHR-3-spezifischer Antikörper..... | 58 |
| 4.2.3 | Analyse der Antikörper-Spezifität mittels Immunoblot..... | 63 |
| 4.2.4 | Zusammenfassende Darstellung der Antikörper-Spezifitäten..... | 64 |
| 4.3 | Etablierung eines ELISA zur Quantifizierung von FHR-3 auf der Basis zweier monoklonaler Antikörper..... | 66 |
| 4.3.1 | Identifizierung einer geeigneten Antikörper-Kombination..... | 66 |
| 4.3.2 | Optimierung der Testbedingungen..... | 68 |
| 4.3.3 | Spezifität des ELISA für FHR-3..... | 71 |
| 4.4 | Bestimmung der FHR-3-Konzentration in den Plasmen gesunder Probanden..... | 73 |
| 4.5 | Bestimmung der FHR-3-Konzentration in den Plasmen von AMD-Patienten und Kontroll-Proben..... | 75 |
| 4.6 | Tageszeitliche Schwankungen der FHR-3-Konzentration..... | 77 |
| 4.7 | Statistische Auswertungen der AMD-Studienpopulation..... | 78 |
| 4.8 | FHR-3-Polymorphismus..... | 83 |
| 5. | Diskussion | 85 |
| 6. | Zusammenfassung | 94 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 96 |

I. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ABTS | 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz |
| AMD | Altersabhängige Makuladegeneration |
| Arg | Arginin |
| AS | Aminosäure |
| Asp | Aspartat |
| biot. | Biotinyliert |
| BM | Basalmembran |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| C | Cytosin |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| cFA | Komplettes Freund-Adjuvans |
| CNV | Choroidale Neovaskularisation |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CR1 | Komplementrezeptor 1 |
| CRP | C-reaktives Protein |
| Cys | Cystein |
| Da | Dalton |
| DAF | <i>Decay-Accelerating-Factor</i> |
| def. | Defizient |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DR | Drusen |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | <i>Enhanced Chemoluminescence</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| et al. | et alii |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FD | Faktor D |
| FH | Faktor H |
| FHL-1 | <i>Factor H-like Protein 1</i> |
| FHR | <i>Factor H related Protein</i> |

| | |
|--------|---|
| FI | Faktor I |
| G | Guanin |
| G | Gramm |
| G | Gravitation |
| GA | Geographische Atrophie |
| Glu | Glutamat |
| Gly | Glycin |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| GM-CSF | <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> |
| H | Stunde(n) |
| HAT | Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin |
| Hep | Heparin |
| His | Histidin |
| HUS | hämolytisch-urämisches Syndrom |
| iFA | inkomplettes Freund-Adjuvans |
| Ig | Immunglobulin |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| IL | Interleukin |
| Ile | Isoleucin |
| Kap. | Kapitel |
| kB | Kilo Byte |
| kDa | Kilo Dalton |
| KG | Kommanditgesellschaft |
| Leu | Leucin |
| LiCl | Lithiumchlorid |
| LIPC | Hepatische Triglycerid-Lipase |
| 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 |
| min. | Minute(n) |
| MPGNII | Membranproliferative Glomerulonephritis Typ II |
| MW | Molekulargewicht |

| | |
|---------------|--|
| N | Anzahl |
| N- | Amino- |
| NHS | <i>N</i> -hydroxysuccinimid |
| OD | Optische Dichte |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PNH | Paroxysmal nächtliche Hämoglobinurie |
| RCA | <i>Regulator of Complement Activation</i> |
| rek. | rekombinant |
| RFLP | Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus |
| RPE | retinales Pigmentepithel |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SAVP | Streptavidin-gekoppelte Peroxidase |
| SCR | <i>Short-Consensus-Repeat-Domäne</i> |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat |
| sek. | Sekunde(n) |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| sog. | sogenannt(e/er) |
| Tab. | Tabelle |
| TBS | <i>TRIS Buffered Sialine</i> |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TNF- α | Tumor-Nekrosefaktor Alpha |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tyr | Threonin |
| UpM | Umdrehung(en) pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| Val | Valin |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| X63.Ag8.653 | Myelomzelllinie |

II. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

II.1 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------------------|---|----|
| Abb. 1.1 | Der alternative Weg der Komplementaktivierung..... | 3 |
| Abb. 1.2 | Homologien innerhalb der FH-Familie..... | 8 |
| Abb. 1.3 | Gen-Cluster „ <i>Regulator of Complement Activation</i> “..... | 14 |
| Abb. 3.1 | Herstellung monoklonaler Antikörper..... | 26 |
| Abb. 4.1 | Austestung des Fusionsmaus-Serums..... | 44 |
| Abb. 4.2 | Antikörper-Aufreinigung des Klons 3D11 an Protein-G-Sepharose..... | 48 |
| Abb. 4.3 | Überprüfung des Erfolgs der Antikörper-Aufreinigung des Klons 3D11... | 49 |
| Abb. 4.4 | Biotinylierungserfolg des Antikörpers 3D11..... | 51 |
| Abb. 4.5 | Schematische Darstellung der Überprüfung des Biotinylierungserfolges des Antikörpers 3D11 mit Hilfe zweier verschiedener Nachweis- Verfahren..... | 52 |
| Abb. 4.6 | Reaktivität der mAK mit Serum..... | 54 |
| Abb. 4.7 | Reaktivität der mAK mit FHR-3-defizientem Serum..... | 55 |
| Abb. 4.8 | Reaktivität der mAK mit Serum..... | 56 |
| Abb. 4.9 | Reaktivität der mAK mit FHR-3-defizientem Serum..... | 57 |
| Abb. 4.10 | Reaktivität der mAK mit FHR-3..... | 59 |
| Abb. 4.11 | Reaktivität der mAK mit Faktor H..... | 60 |
| Abb. 4.12 | Reaktivität der mAK mit Serum..... | 62 |
| Abb. 4.13 | Reaktivität der mAK 23D5, 18A7, L20/3, 19E9, 3D11 und 18H8 im Immunoblot..... | 64 |
| Abb. 4.14 | Identifikation einer geeigneten Antikörper-Kombination..... | 67 |
| Abb. 4.15 | Optimierung des Fang-Antikörpers..... | 68 |
| Abb. 4.16 | Optimierung des biotinylierten Nachweis-Antikörpers..... | 69 |
| Abb. 4.17 | Optimierung der Streptavidin-Peroxidase..... | 70 |
| Abb. 4.18 | Standard-Kurve zur Quantifizierung von FHR-3..... | 71 |
| Abb. 4.19 | Parallelität der FHR-3-Verdünnungsreihe und der Serumverdünnungsreihe..... | 72 |
| Abb. 4.20 | Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA-Nachweisverfahrens. | 73 |
| Abb. 4.21 | Quantifizierung des FHR-3-Gehaltes im Plasma von 141 gesunden Thrombozyten-Spendern..... | 74 |
| Abb. 4.22 | Vergleich der FHR-3-Plasma-Konzentration der einzelnen Kohorten..... | 76 |

| | | |
|------------------|--|----|
| Abb. 4.23 | Tagesabhängige Schwankungen der FHR-3-Konzentration..... | 77 |
| Abb. 4.24 | Altersverteilung der Subpopulationen Thrombozytenspender, AMD- und Kontrollprobanden und deren FHR-3-Plasmakonzentrationen..... | 80 |
| Abb. 4.25 | Verteilung der FHR-3-Konzentration auf das Geschlecht..... | 81 |
| Abb. 4.26 | Mittlere FHR-3-Konzentration und Standardabweichung der unterschiedlichen Genotypen des Polymorphismus rs2274700 in der AMD-Kohorte..... | 82 |
| Abb. 4.27 | Mittlere FHR-3-Konzentration und Standardabweichung der unterschiedlichen Genotypen des Polymorphismus rs1061170 in der AMD-Kohorte..... | 83 |

II.2 Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tab. 1.1 | Einteilung der AMD-Erkrankung anhand des fundoskopischen Befundes | 12 |
| Tab. 2.1 | Verwendete monoklonale Antikörper..... | 23 |
| Tab. 3.1 | Immunsierungsschema zur Herstellung monoklonaler anti-FHR-3-Antikörper..... | 28 |
| Tab. 3.2 | Ablauf eines <i>Sandwich</i> -ELISAs..... | 35 |
| Tab. 3.3 | Zusammensetzung eines Gradientengels..... | 40 |
| Tab. 4.1 | Identifikation anti-FHR-3-Ig-produzierender Hybridomzellen..... | 45 |
| Tab. 4.2 | Immunglobulin-Produktion (Ausbeute in mg) mittels MiniPerm-Anlage sowie Isotyp-Bestimmung der anti-FHR-3-Antikörper..... | 47 |
| Tab. 4.3 | Gesamtausbeute der mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aufgereinigten Antikörper..... | 50 |
| Tab. 4.4 | Versuchsaufbau zur Untersuchung der generierten Antikörper hinsichtlich ihrer Eignung als Fang- und Nachweis-Antikörper zum Nachweis von FHR-3 bzw. FH im Serum..... | 53 |
| Tab. 4.5 | Zusammenfassende Darstellung der FHR-3- und FH-Reaktivitäten der hergestellten Antikörper im ELISA und Immunoblot..... | 65 |
| Tab. 4.6 | Zusammenstellung der Studienpopulation..... | 75 |
| Tab. 4.7 | Zusammenfassendes Ergebnis der Plasma-FHR-3-Quantifizierung verschiedener Kohorten..... | 76 |
| Tab. 4.8 | Mittelwert und Standardabweichung von Komplement-Parametern der AMD-Studienpopulation und deren Korrelation zum FHR-3-Gehalt..... | 79 |
| Tab. 4.9 | Mittlere FHR-3-Konzentration und Standardabweichung der beiden FH-SNP rs2274700 und rs1061170 sowie deren Unterteilung in die unterschiedlichen Genotypen..... | 81 |

1. Einleitung

1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen körpereigenen Immunabwehr. Zu seinen Hauptaufgaben gehören die Elimination mikrobieller Pathogene und die Beseitigung von Immunkomplexen sowie zellulärem Debris aus Gewebe und Zirkulation (Walport 2001). Durch die Bildung eines Membranangriffs-Komplexes wirkt das Komplementsystem zytotoxisch für Fremdorganismen (Flierman, Daha 2007). Des Weiteren besitzt das Komplementsystem immunregulatorische Eigenschaften (Carroll 2004), indem es die Antigen-Prozessierung und –Präsentation beeinflusst und dadurch die primäre und sekundäre Immunantwort verstärkt (Ricklin et al. 2010). Nach heutigem Kenntnisstand besteht das Komplementsystem aus mindestens 40 verschiedenen Komponenten, die sowohl in löslicher Form (Plasmaproteine) als auch als membrangebundene Regulatorproteine (Rezeptoren) vorkommen.

Es werden drei unterschiedliche Aktivierungswege des Komplementsystems unterschieden (klassischer, Lektin- und alternativer Weg). Der Ablauf erfolgt stets kaskadenförmig, wobei inaktive Komponenten durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form umgewandelt werden, die ihrerseits nachgeschaltete Vorläufermoleküle aktivieren. Alle Initiierungswege münden in einer gemeinsamen Endstrecke (Walport 2001) der Aktivierung von C3 und C5. Die verantwortlichen C3- und C5-Konvertasen der jeweiligen Aktivierungswege unterscheiden sich jedoch in ihrer Zusammensetzung.

Im Verlauf der Komplementkaskade entsteht das zentrale Spaltprodukt C3b. Durch den Vorgang der Opsonierung markiert C3b Oberflächen als „fremd“ und rekrutiert Immunabwehrzellen (z.B. Phagozyten), die den Fremdkörper erkennen, aufnehmen und intrazellulär degradieren. Ebenso entstehen die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a durch proteolytische Spaltung der biologisch inaktiven Vorläuferproteine C3, C4 und C5. Sie besitzen chemotaktische Eigenschaften und bewirken die Einwanderung von Zellen des Immunsystems, wie z.B. Granulozyten und Makrophagen (Gasque 2004). Außerdem fördern sie die Ausschüttung von Histamin und anderen Effektormolekülen aus Mastzellen und basophilen Granulozyten.

Die gemeinsame Endstrecke der Komplementaktivierung wird durch die C5-Konvertase eingeleitet. Sie aktiviert nacheinander die Proteine C5-C9, die zusammen einen Membranangriffs-Komplex ausbilden. Dieser lagert sich in die Membran der Zielzelle ein und führt zu dessen Lyse.

Die Komplementaktivierung des klassischen Wegs wird durch Bindung eines Antikörpers an ein Antigen ausgelöst. Daraufhin lagert sich die Serin-Esterase C1 über die C1q-Untereinheit an den Fc-Teil dieses Antikörpers, wodurch die C1-Untereinheiten C1r und C1s aktiviert werden. C4 wird von C1s zu C4a und C4b gespalten. An C4b heftet sich nun C2, das ebenfalls von C1s in seine aktive Form umgewandelt wird. C2b wird freigesetzt, der bimolekulare C4b2a-Komplex stellt die zentrale C3-Konvertase des klassischen Wegs dar. Durch die Anlagerung eines C3b-Moleküls entsteht die C5-Konvertase C4b2a3b.

Durch Anlagerung des Mannose-bindenden Lektins (MBL) an Mannose-Reste auf der Oberfläche von Fremdpartikeln wird die Komplementaktivierung über den Lektin-Weg in Gang gesetzt. Diese Verbindung interagiert mit den Serin-Proteasen MASP-1 und MASP-2, die als C1s-analoges Protein die Moleküle C4 und C2 spalten und aktivieren. An dieser Stelle mündet der Lektin Weg in die Spaltung von C3. Alle weiteren Reaktionsschritte verlaufen analog zum klassischen Komplementaktivierungsweg.

Komponenten des alternativen Wegs der Komplementaktivierung sind C3, Faktor B, Faktor D sowie regulatorische Proteine (FH) (Thurman, Holers 2006). Im Gegensatz zu den anderen Komplementaktivierungs-Mechanismen werden weder Antikörper noch MBLs zur Erkennung von Fremdoberflächen benötigt, da dieser Weg auf geringem Niveau ständig aktiv ist. Dieses Phänomen wird als „*tick-over*“- Mechanismus bezeichnet (Lachmann und Hughes-Jones 1984). Bei einem geringen Anteil des Plasma-C3 wird dauerhaft der interne Thioester hydrolysiert, wodurch C3(H₂O) entsteht. Durch die Bindung von Faktor B entsteht der Komplex C3(H₂O),B, der in seiner aktiven Form C3(H₂O),Bb die Entstehung von C3b katalysiert. C3b ist in der Lage, an Oberflächen zu binden und die Bildung weiterer C3-Konvertasen in Gang zu setzen. Durch diesen Mechanismus kommt es zur ständigen Anlagerung von C3b auf Oberflächen, die mit Komplementproteinen in Kontakt gekommen sind. Während die Regulatoren des Komplementsystems C3b auf körpereigenen Zellen zügig inaktivieren, ist ihnen C3b auf Aktivator-Oberflächen nicht zugänglich. Die Aktivierung des alternativen Wegs vollzieht sich dementsprechend mit der Ablagerung von C3b auf der Oberfläche eines Aktivators. Mikrobielle Oberflächen wie z.B. Zellwandbestandteile von Hefen kommen hierfür in Frage. Anschließend bindet Faktor B an Oberflächen-gebundenes C3b und wird innerhalb dieses Komplexes von Faktor D in die zwei Fragmente Ba und Bb gespalten. Das kleinere Ba-Fragment dissoziiert vom Komplex ab, während Bb in Verbindung mit dem C3b-Molekül die C3-Konvertase C3bBb bildet. Diese Konvertase spaltet C3 in C3a und C3b. Die Formation der C5-Konvertase C3bBbC3b entsteht durch die Anlagerung eines weiteren C3b-Moleküls an die C3-Konvertase. Die C5-Konvertase führt schließlich zur Ausbildung des terminalen Membranangriffs-Komplexes. Das Molekül C3b ist weiterhin in der Lage, Faktor B zu binden und damit zahlreiche neue C3-Konvertasen herzustellen. Diese positive Rückkopplung führt in kürzester Zeit zu einer effektiven

Verstärkung. Zugleich werden zuverlässige Regulatoren benötigt, die dafür sorgen, dass Komplement zwar einerseits spezifisch auf Fremdoberflächen aktiviert wird, andererseits jedoch körpereigene Zellen vor den Folgen einer überschüssigen Aktivierung geschützt sind.

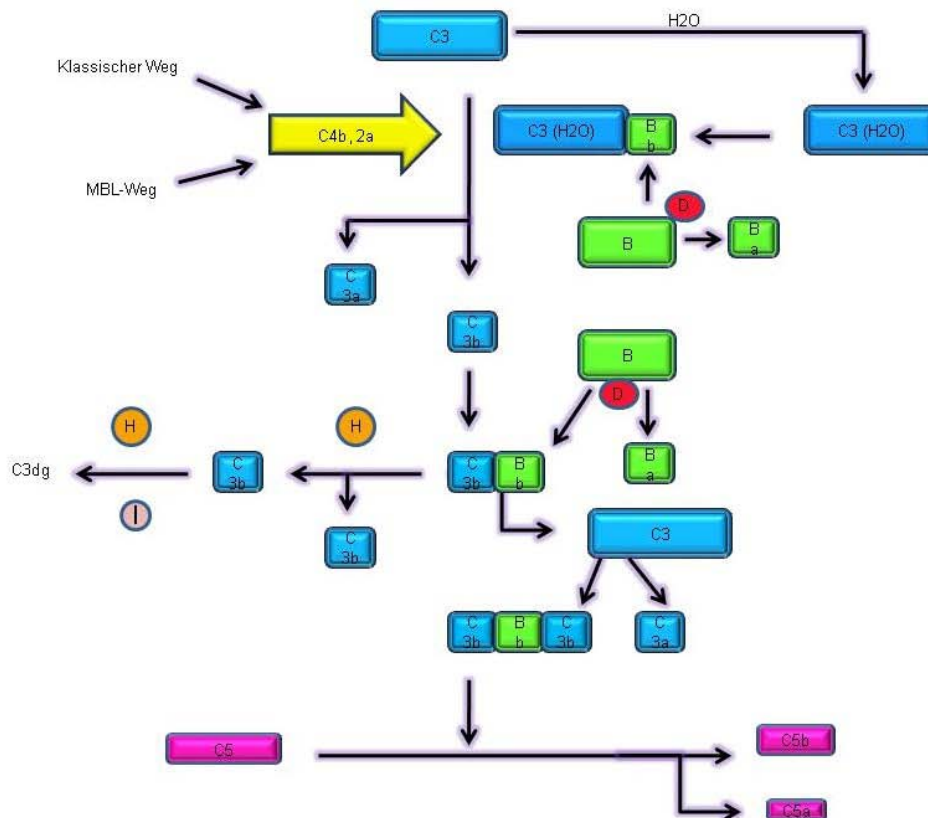


Abb. 1.1 Der alternative Weg der Komplementaktivierung. Insgesamt werden drei unterschiedliche Komplementaktivierungswege (alternativer, klassischer, Lektin- Weg) unterschieden. Ihr Ablauf ist stets kaskadenförmig, wobei inaktive Komponenten durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form umgewandelt werden. Hier dargestellt ist der alternative Komplementaktivierungsweg. Dieses System ist durch die Hydrolyse des Plasma-C3 zu C3(H₂O) auf geringem Niveau ständig aktiv („tick-over“- Mechanismus). Durch Anlagerung des aktivierten Faktor B (Bb) entsteht C3(H₂O),Bb, welches wiederum die Entstehung von C3b katalysiert. Lagert sich Bb an C3b an, entsteht die C3-Konvertase C3bBb, die in der Lage ist C3 in C3a und C3b zu spalten. Durch die Anbindung eines weiteren C3b-Fragments an die C3-Konvertase entsteht die C5-Konvertase C3bBbC3b, welche die Ausbildung des terminalen Membranangriffs-Komplexes initiiert.

Alle drei Komplementaktivierungswege münden in der Herstellung der C5-Konvertase. Beim alternativen Weg besteht die C5-Konvertase aus dem Komplex C3bBbC3b; beim klassischen und beim Lektin-Weg aus der Zusammenlagerung von C4b2a3b. Beide spalten C5 in C5a und C5b. C5a hat anaphylaktische und chemotaktische Eigenschaften. C5b initiiert die Ausbildung des Membranangriffskomplexes, indem es eine Verbindung mit C6 und C7

eingeht. C5b67 bindet sich über eine lipophile Domäne an die Oberfläche von Fremdkörpern. Anschließend lagert sich C8 hinzu und integriert sich in die Fremdmembran. Der dabei entstandene C5b678-Komplex löst die Polymerisierung mehrerer C9-Moleküle aus, wodurch sich eine Pore in der Membran des Erregers bildet, was dessen Lyse und Zelltod zur Folge hat.

1.2 Die Regulation des Komplementsystems

Das Komplementsystem bekämpft pathogene Fremdorganismen sehr effizient. Um eine Schädigung körpereigener Strukturen zu vermeiden, bedarf es einer ausreichenden Regulation und Kontrolle. Zudem sollen Komplementkomponenten nicht unnötig verbraucht werden. Der alternative Weg des Komplementsystems bedarf einer besonders strikten Kontrolle, da er ständig auf niedrigem Niveau aktiv ist.

Die Regulationsproteine lassen sich in membranständige und lösliche Proteine unterteilen. Hauptsächlich wirken sie auf der Ebene von C3, da C3 die zentrale Komponente aller drei Komplementkaskaden darstellt.

Der *Decay-Accelerating-Factor* (DAF, CD55), das Membran-Cofaktor-Protein (MCP) sowie der Komplementrezeptor CR1 (CD35) (Kim und Song 2006) gehören zu den membranständigen Regulatorproteinen. Sie steuern hauptsächlich die Bildung und den Abbau der C3-Konvertase. Zu den löslichen Kontrollproteinen zählt u.a. Faktor I (FI). Mithilfe der Cofaktoren MCP und CR1 spaltet und inaktiviert Faktor I C3b-Moleküle.

Als wichtigster Regulator des alternativen Komplementaktivierungsweges gilt Faktor H (FH), der sowohl auf Membranoberflächen als auch in flüssiger Phase im Blutplasma aktiv ist. Für Faktor H sind bislang drei Wirkmechanismen beschrieben. Zum einen besitzt er *Decay-Accelerating*-Aktivität, indem er den Zerfall der C3-Konvertase beschleunigt (Rodríguez de Córdoba et al. 2004), zum anderen Cofaktor-Aktivität für den Abbau von C3b durch Faktor I. Des Weiteren konkurriert Faktor H mit Faktor B um die Bindung an C3b.

Wie notwendig eine gezielte Kontrolle des Komplementsystems ist, zeigen die Auswirkungen, die aus dem Ausfall von komplementregulatorischen Proteinen resultieren. Das Fehlen von Faktor H führt z.B. zu ungehinderter Komplementaktivität. Krankheiten, die mit Defekten im Faktor-H-Gen assoziiert sind, sind u.a. die altersbedingte Makuladegeneration (AMD), das atypische hämolytisch-urämische Syndrom (aHUS) sowie die membranproliferative Glomerulonephritis Typ II (MPGN2).

1.3 Die Faktor-H-Proteinfamilie

Faktor H

FH ist ein Plasmaprotein, welches für ein Gleichgewicht zwischen Komplementaktivierung und -deaktivierung sorgt und somit sicherstellt, dass Komplementreaktionen nur auf körperfremden aktivierenden Oberflächen stattfinden. Faktor H ist dementsprechend der wichtigste Inhibitor der Komplementaktivierung über den alternativen Weg in der flüssigen Phase (Sim und DiScipio 1982, Rodriguez de Córdoba et al. 2004). Faktor H ist ein ca. 150 kDa großes Glykoprotein, das im menschlichen Serum in einer Konzentration von 120 - 560 µg/ml vorliegt. Die FH-Synthese erfolgt hauptsächlich in der Leber. Extrahepatische Synthesorte sind u.a. retinale Pigmentepithelzellen, Monozyten, Hautfibroblasten, Endothelzellen, Gliazellen, Neurone, glomeruläre Mesangiumzellen und Tumorzellen wie Glioblastomzellen. Diese zusätzliche extrahepatische Produktion erhöht die lokale Konzentration von FH und unterstützt damit den Schutz körpereigener Zellen vor Komplementaktivierung im Falle einer Infektion. Der FH-Gehalt im menschlichen Plasma in der Bevölkerung variiert sowohl inter- wie auch intraindividuell in erheblichem Maße. Hierfür werden sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren verantwortlich gemacht. Die Konzentration an FH nimmt mit fortschreitendem Alter und bei Rauchern ab. Über 60% der Variabilität des FH-Gehaltes im Serum ist genetisch determiniert (Rodriguez de Córdoba et al. 2004).

Das kodierende Gen für FH liegt auf dem Chromosom 1q, einer Region, in der viele weitere Regulatoren und Rezeptoren des Komplementsystems lokalisiert sind. Deshalb wird dieser Bereich auch als „*Regulator of Complement Activation*“ (RCA) *Gen-Cluster* bezeichnet. Das FH-Gen ist 94 kB groß und enthält 23 Exons (Male et al. 2000), wobei jedes Exon für eine repetitive *Short-Consensus-Repeat*-Domäne (SCRs) kodiert. Ausnahmen bilden die Domäne SCR2, die von den Exonen 3 und 4 gemeinsam kodiert wird (Male et al. 2000) und das Exon 10, das nicht für das FH-Transkript abgelesen wird.

Als erstes Mitglied der Faktor-H-Familie wurde FH erstmals 1965 unter der Bezeichnung beta1H als Kontaminante im Rahmen der Isolierung von C5 identifiziert (Nilsson und Müller-Eberhard 1965). 1976 folgte die Beschreibung seiner komplementregulatorischen Eigenschaften (Whaley und Ruddy 1976a, Whaley und Ruddy 1976b, Weiler et al. 1976) und 1986 die Analyse der primären Proteinstruktur (Kristensen et al. 1986).

Gemeinsames Merkmal der Komplementregulatoren aus der FH-Familie ist ihr Aufbau aus repetitiven *Short-Consensus-Repeat*-Domänen (SCRs). Jedes dieser SCRs besteht aus etwa 60 Aminosäuren und ist durch ein charakteristisches Disulfidgerüst gekennzeichnet, welches aus 4 Cysteinen gebildet wird. Innerhalb eines SCRs sind die Cysteine für die

Ausbildung von zwei Disulfidbrücken in einem Cys-1 – Cys-3- und Cys-2 – Cys-4-Muster verantwortlich, welche die Tertiärstruktur jedes einzelnen SCR stabilisieren (Janatova et al. 1986). FH setzt sich aus 20 SCRs zusammen, die in elektronenmikroskopischer Analyse eine perlschnurartige Konformation aufweisen.

Mithilfe von rekombinant hergestellten FH-Fragmenten und epitopspezifischen Antikörpern konnten die bekannten Funktionen von FH auf bestimmten SCR-Domänen lokalisiert werden. FH reguliert die Komplementaktivität über drei wesentliche Mechanismen: die Interaktion mit C3b, die *Decay-Accelerating*-Aktivität und die Cofaktor-Funktion für die Faktor-I-vermittelte Inaktivierung von C3b.

FH interagiert über drei verschiedene Bindungsstellen mit C3b. Diese erstrecken sich über die Bereiche SCR1-4, SCR12-14 und SCR19-20 (Jokiranta et al. 2000). Jede dieser drei Bindungsregionen interagiert mit unterschiedlichen Abschnitten der C3- α -Kette (Jokiranta et al. 2000). Faktor H konkurriert mit Faktor B bzw. Bb um die Bindung an C3b (Becherer et al. 1992, Lambris et al. 1996, Oran und Isenman 1999). Verdrängt FH Bb aus seiner Zusammenlagerung mit C3b, so wird der Zerfall der C3-Konvertase C3bBb beschleunigt und FH erfüllt seine *Decay-Accelerating*-Aktivität. Des Weiteren ist FH Cofaktor für die Faktor-I-vermittelte Inaktivierung von C3b und Überführung in das inaktive iC3b-Fragment. Dieser Regulationsschritt kommt durch die Interaktion der Domänen SCR 1-4 mit den Aminosäuren 727-768 der C3- α -Kette zustande (Gordon et al. 1995, Kühn et al. 1995, Lambris et al. 1996).

Das Komplementsystem wird von FH sowohl in der flüssigen Phase als auch auf Zelloberflächen reguliert. Während FH in der flüssigen Phase C3b zügig bindet und inaktiviert, ist die Inaktivierung von Oberflächen-gebundenen C3b abhängig von der physikalisch-chemischen Zusammensetzung dieser Oberfläche (Rodriguez de Córdoba et al. 2004). Das Aktivierungspotential der Oberflächen bestimmt sich vor allem durch den Gehalt an negativen Ladungen, die u.a. durch polyanionische Ladungsträger wie Sialinsäuren, Heparin und Glykosaminoglykane hervorgerufen werden. Die Anwesenheit von Sialinsäure erhöht die Affinität von FH zu membranständigen C3b um das 10-fache (Kazatchkine et al. 1979). Die enzymatische Entfernung oder Modifikation dieser polyanionischen Membranmoleküle kann eine vor Komplementattacken geschützte „Selbst“- Oberfläche (Non-Aktivator-Oberfläche) in eine „Fremd“- Oberfläche (Aktivator-Oberfläche) konvertieren. Als Bindungsstelle für Sialinsäure wurden die SCR-Regionen 19-20 identifiziert (Rodriguez de Córdoba, Goicoechea de Jorge 2007). Heparin interagiert mit den Domänen SCR7 (Blackmore et al. 1998) und SCR 18-20 (Blackmore et al. 1998). Als weitere Heparin-Bindungsstellen werden SCR9 und SCR13 (Pangburn et al. 1991) diskutiert. Um diesem Erkennungs-Mechanismus des angeborenen Immunsystems zu entgehen, exprimieren einige pathogene Erreger eigene Rezeptoren für FH. So ist das Protein M der Streptokokken

in der Lage, über die SCR-Region 7 an FH zu binden und somit sich vor einer Komplementattacke zu schützen (Rodriguez de Córdoba et al. 2004).

Die Bereiche SCR7 und SCR8-11 sind Regionen auf FH, die mit dem C-reaktiven Protein (CRP) interagieren (Jarva et al. 1999). CRP gehört zu der Familie der Pentraxine. Im Falle einer Akute-Phase-Reaktion wird es vermehrt in Hepatozyten durch Stimulation proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 synthetisiert (Gewurz et al. 1995). Die Interaktion von FH und CRP inhibiert den alternativen Weg der Komplementkaskade (Jiang et al. 1991). Die Bindung von CRP an eine Oberfläche fördert dessen Opsonierung und verhindert gleichzeitig die Komplement-vermittelte Lyse.

Neben diesen Komplement-regulatorischen Funktionen erfüllt FH noch weitere immunmodulatorische Aufgaben. Hierzu gehören u.a. die Aktivierung von Monozyten sowie die Inhibition der Antikörperfreisetzung aus B-Lymphozyten. Ebenso interagiert FH über den MAK (CD11b/CD18)-Rezeptor mit neutrophilen Granulozyten und führt zu einer erhöhten intrazellulären Generierung von Sauerstoffradikalen, sofern diese Zellen durch C5a oder TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor α) stimuliert wurden.

FH-ähnliche und FH-verwandte Proteine

In humanem Plasma lassen sich weitere sechs Proteine nachweisen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu FH aufweisen. Es handelt sich um eine alternative Splice-Variante des FH-Gens (FHL-1) und um fünf FH-verwandte Proteine, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden (FHR1-5). Die AS-Sequenz der FHL-1-Splicevariante ist mit den ersten SCR1-7 von FH identisch und weist vier zusätzliche carboxyterminale Aminosäuren (Ser-Phe-Leu-Thr) auf, welche vom Exon 10 von FH kodiert werden (Estaller et al. 1991). Bei einer Plasmakonzentration von 10-50 $\mu\text{g/ml}$ weist FHL-1 ein Molekulargewicht von 42kD auf (Zipfel und Skerka 1999). Neben strukturellen Ähnlichkeiten zeigt FHL-1 auch funktionelle Gemeinsamkeiten mit FH. Es verfügt ebenso über *Decay-Accelerating*- und Cofaktor-Aktivität für die FI-vermittelte C3b-Degradierung. Über die Region SCR7 ist FHL-1 in der Lage, Polyanionen wie Heparin zu binden (Zipfel und Skerka 1994). Über eine RGD-Domäne (Arg-Gly-Asp) in SCR4 ist FHL-1 imstande, Zelladhäsionen an Matrixproteine wie Fibronectin herzustellen. Diese Sequenz befindet sich auch im SCR4 von FH, allerdings konnte bei FH keine Zelladhäsions-vermittelnde Funktion nachgewiesen werden.

Fünf weitere Plasmaproteine mit struktureller Verwandtschaft zu FH konnten bisher identifiziert werden. Sie werden als FHR-1 bis FHR-5 (*FH-related Proteins, FHRs*) bezeichnet. Nach heutigem Wissenstand geht man davon aus, dass durch Duplikation des FH-Gens weitere Gene innerhalb des RCA-Clusters („Regulator of Complement Activation“,

RCA s.o.) entstanden sind, welche später modifiziert wurden (Rodriguez de Córdoba et al. 2004). Die *FH-related Proteins* sind ebenfalls aus SCR-Einheiten aufgebaut mit jeweils unterschiedlicher Homologie zu FH-SCRs. In Abbildung 1.2 sind die verschiedenen FHR-Proteine, deren Aufbau und AS-Übereinstimmung zu FHR-3 in Prozentangaben dargestellt:

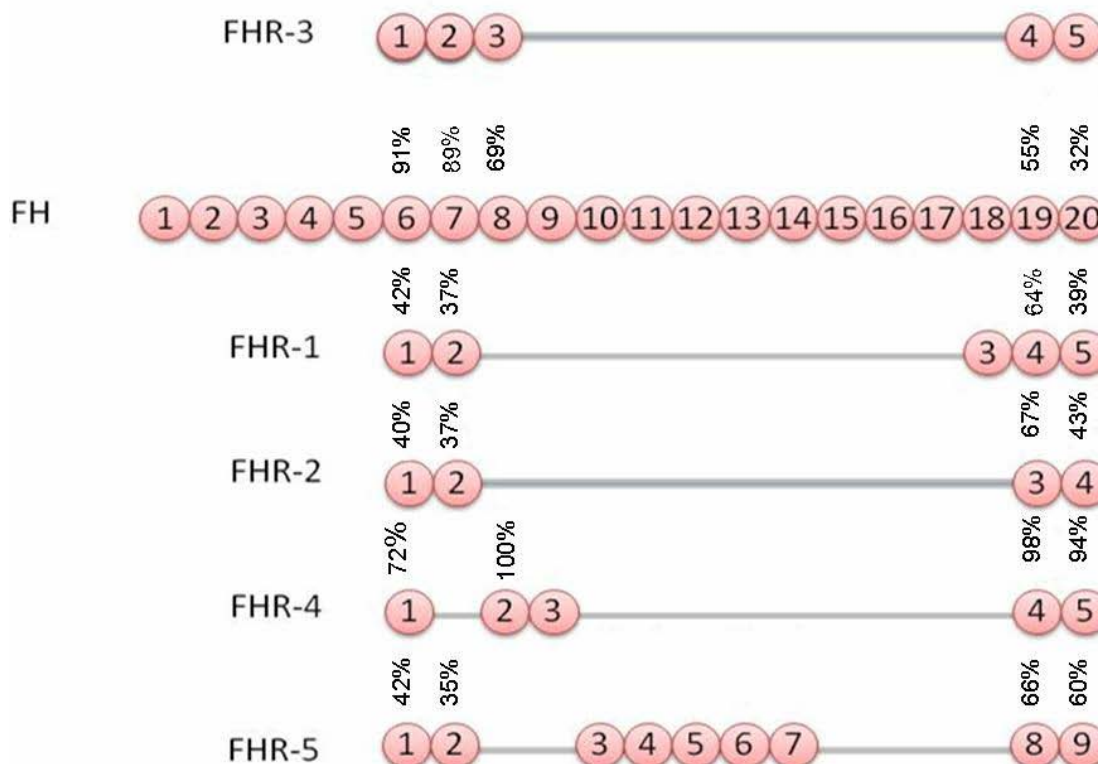


Abb. 1.2 Homologien innerhalb der FH-Familie. Dargestellt ist der Aufbau der verschiedenen *FH-related Proteins* aus SCRs. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Ähnlichkeit der Aminosäure-Sequenz aller SCRs im Bezug zu den SCRs von FHR-3 analysiert und in Prozentangaben angegeben. Die größte Homologie zu FHR-3 besitzt FHR-4, gefolgt von FH. FHR-1 zeigt die geringste strukturelle Ähnlichkeit zu FHR-3 auf.

Alle FHRs haben gemeinsam, dass ihr Aminoterminus eine hohe Homologie zu SCR6, ihr Carboxyterminus hingegen eine hohe Homologie zu den SCRs 19 und 20 von FH aufweist. Sie bestehen meist aus vier bzw. fünf SCR-Domänen, FHR-5 ist mit 9 SCRs das größte Protein unter den FH-verwandten Proteinen.

FHR-1

Das Protein FHR-1 besteht aus 5 SCR-Domänen. FHR-1 existiert in den beiden Glykosylierungsformen FHR-1 α und FHR-1 β . Während die α -Form einfach glykosyliert ist, ist die β -Form zweifach glykosyliert. Zwischen den Domänen SCR3-5 von FHR-1 und den Domänen SCR19-20 von FH besteht eine nahezu 100%ige Homologie (Skerka et al. 2007).

Im menschlichen Plasma liegt FHR-1 in einer Konzentration von 70 bis 100 µg/ml vor. In einer gesunden Studienpopulation wurden 1,3% FHR-1-defiziente Individuen identifiziert (Fritsche et al. 2010). Ursächlich ist eine Punktmutation in homozygoter Form, die zu einem Stop Codon im FHR-1-N-Terminus führt. FHR-1 besitzt Komplement-regulatorische Funktionen, indem es die C5-Konvertase, die Aggregation sowie die Membraninsertion des terminalen Komplementkomplexes (TCC) inhibiert (Fritsche et al. 2010).

FHR-2

FHR-2 ist aus vier SCR- Domänen aufgebaut und besitzt ein Molekulargewicht von 24 bzw. 29 kDa. In Serum wird es ebenfalls in zwei Formen nachgewiesen, dem nicht glykosylierten FHR-2 und dem einfach glykosylierten FHR-2α.

FHR-3

FHR-3 ist ein Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 45 bis 56kDa und setzt sich aus fünf SCR-Domänen zusammen. In einer aktuellen Studie einer mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe konnte mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper gezeigt werden, dass FHR-3 ein Regulator des Komplementsystems ist (Fritsche et al, 2010). FHR3 fungiert als Cofaktor für den Serin-Protease-Faktor I bei der Inaktivierung von C3b. Ebenso beeinflusst FHR-3 die Konzentration von C5. Des Weiteren besitzt FHR-3 anti-inflammatorische Eigenschaften und verringert die Chemotaxis von Neutrophilen. FHR-3 konkurriert mit FHR-1 und Faktor H um die Bindung an C3b und erhöht die hämolytische Aktivität von Serum. Somit können FHR-3 sowohl komplement-regulatorische als auch immunmodulatorische Eigenschaften zugesprochen werden (Fritsche et al. 2010).

FHR-4

Das Serumprotein FHR-4 setzt sich aus vier SCR-Regionen zusammen und liegt als 86 kDa Homodimer vor. FHR-4 kommt als Apoprotein in Triglycerid-reichen Lipoproteinen vor. Aus diesem Grund wird diskutiert, ob FHR-4 möglicherweise eine Rolle im Lipidstoffwechsel spielt (Zipfel et al. 2002).

FHR-5

Bei der Untersuchung von glomerulären Immundepositenablagerungen wurde FHR-5 in vivo auf Komplement-lysierten Erythrozyten entdeckt. Dabei wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der gegen Komponenten des terminalen Weges der Komplementkaskade gerichtet war. Des Weiteren zeigte sich, dass FHR-5 in vitro C3b bindet.

1.4 Erkrankungen durch Dysfunktionen und Defizienzen von Faktor H und anderen Faktor-H-Familienmitgliedern

Eine intakte Regulation des Komplementsystems ist für den Organismus sehr wichtig. Dysfunktionen oder gar Defizienzen von FH verursachen einen selektiven Regulationsverlust des alternativen Weges sowie der Amplifizierungsschleife. Aufgrund der kontinuierlichen *Tick-over* Aktivierung des alternativen Weges wird C3 ständig zu C3b aktiviert und damit verbraucht. Es kommt zu einer sekundären Defizienz von C3 und damit zu einer Hypokomplementämie. Als letzte Regulationsinstanzen dienen die membranständigen Regulatoren DAF und MCP. Der Organismus ist deshalb nicht mehr so effizient gegen eindringende Pathogene gerüstet und anfälliger für Infektionen. Im Zusammenhang mit FH-Pathologien werden dementsprechend rezidivierende Infektionen mit *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* beschrieben.

Weitere mit FH assoziierte Erkrankungen sind die membranproliferative Glomerulonephritis Typ 2 (MPGN2), das atypische hämolytisch-urämische Syndrom (aHUS) sowie die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit AMD.

Die membranproliferative Glomerulonephritis (MPGN) ist eine seltene primäre Glomerulopathie, die zu einer chronischen Nephritis führen kann. Sie ist charakterisiert durch die Proliferation mesangialer und endothelialer Zellen sowie durch eine Verdickung der Basalmembran (GBM), verursacht durch immunologische oder intermembranöse Ablagerungen von Immunkomplexen. Betroffen sind hauptsächlich Kinder und junge Erwachsene im Alter von 6 bis 30 Jahren. Insgesamt werden drei Typen der MPGN unterschieden. Obwohl alle drei Typen mit unterschiedlichen Mechanismen der Komplementaktivierung einhergehen, haben alle eine Hypokomplementämie zur Folge. Während bei der MPGN 1 und 3 Immunkomplex-Ablagerungen eine Rolle spielen, können diese bei der MPGN 2 nicht gefunden werden. Neben der Hypokomplementämie ist die MPGN 2 charakterisiert durch Ablagerungen von C3c in der GBM sowie einen reduzierten C3-Gehalt im Blut. Studien konnten hierfür FH-Defizienzen, FH-Mutationen oder inhibitorische Antikörper verantwortlich machen. Die FH-Defizienz resultiert aus einer Mutation im FH-Gen, wodurch FH aufgrund des Austausches von hochkonservierten Cysteinresten die strukturell relevanten Disulfidbrücken (s.o.) nicht ausbilden kann und so nicht in die Zirkulation sezerniert werden kann (Ault et al. 1997, Schmidt et al. 1999). An Tiermodellen konnte demonstriert werden, dass diese unkontrollierte C3-Aktivierung durch den Verlust an FH essentiell für die Ausbildung einer MPGN2 ist (Pickering et al. 2002).

Eine weitere Erkrankung, die mit polymorphen Variationen im FH-Gen assoziiert ist, ist das atypische hämolytisch urämische Syndrom (aHUS). Diese systemische Erkrankung manifestiert sich durch Thrombozytopenie, hämolytische Anämie und akutes Nierenversagen (Remuzzi und Ruggenti 1998). Es werden zwei Formen unterschieden. Die typische Form des HUS folgt einer Infektion mit Verotoxin-produzierenden E.coli und ist mit einer Diarrhoe assoziiert. 5-10% der HUS-Patienten erkranken ohne eine vorher durchgemachte Gastroenteritis. In diesen Fällen spricht man von der atypischen HUS-Form. Sowohl Erwachsene als auch Kinder sind von der HUS betroffen. Mit einer Mortalität von bis zu 30% hat die HUS eine sehr schlechte Prognose. Studien deckten bei an aHUS erkrankten Personen als prävalente genetische Ursache *Missense*-Mutationen im FH-Gen auf. Diese Polymorphismen fanden sich in den Exonen von FH, die für die C-terminalen Domänen SCR 19 und 20 codieren (Pickering und Cook 2008). Wie bereits bei der Funktion von FH beschrieben, sorgt diese Region für den Schutz körpereigener Zelloberflächen vor komplementvermittelter Schädigung. In Anbetracht der Lokalisation der Mutation im FH-Gen werden bei der aHUS im Gegensatz zur MPGN2 normale FH-Proteine gebildet. Es kommt weder zu einer Hypokomplementämie noch zu einem reduzierten FH-Gehalt im Blut. Träger dieser Mutation synthetisieren FH-Moleküle, die normale Cofaktor-Aktivität ausüben. Aufgrund der Lokalisation der FH-Mutation im Carboxyterminus verfügen diese Moleküle allerdings über eine eingeschränkte Kapazität, körpereigene Zellen vor Komplementaktivierung zu schützen.

Diese Beispiele verdeutlichen, welche Folgen FH-Funktionseinschränkungen haben können.

1.5 Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Eine weitere mit FH in Zusammenhang stehende Erkrankung ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD), eine Erkrankung der Netzhaut. Diese Krankheit stellt nicht nur für die Betroffenen eine große individuelle Beeinträchtigung dar, sondern hat auch eine enorme sozioökonomische Bedeutung, da sie als häufigste Erblindungsursache älterer Menschen (>55 Jahren) in den Industriestaaten gilt (Nowak 2006). Weltweit ist die AMD die dritthäufigste Erblindungsursache. Die Prävalenz variiert entlang ethnischer Gruppen.

AMD führt bei den Betroffenen zu einem progressiven und irreversiblen Verlust des zentralen Sehens (Nowak 2006). Degenerative Veränderungen betreffen die Makula lutea, das retinale Pigmentepithel (RPE), die Bruch-Membran (BM) und die Choroidia (Spraul et al. 1999).

Phänotypisch wird die AMD anhand des fundoskopischen Augenbefundes als „early“ oder „late“ onset klassifiziert (Hageman et al. 2005). Die frühe Form ist charakterisiert durch Drusen (>10) sowie durch Pigmentveränderungen (Hypo-, Hyperpigmentation). Die späte Form der AMD unterteilt sich erneut in eine „trockene“ und eine „feuchte“ Form (Hageman et al. 2001) (Tab. 1.1).

| AMD-Formen | Sub-Formen | Klinik |
|------------|------------|--|
| Trocken | Drusen | Drusen, Pigmentveränderungen |
| | GA | RPE-Atrophie, choroidale Gefäßzeichnung, |
| Feucht | CNV | Formation neuer Blutgefäße in der Choroidia, die |
| | | das RPE durchbrechen, Narbenbildung |

Tab. 1.1 Einteilung der AMD-Erkrankung anhand des fundoskopischen Befundes. (GA = Geographische Atrophie, CNV = choroidale Neovaskularisationen)

85% aller AMD-Betroffenen leiden unter der trockenen Form, welche durch Drusen und Degeneration des RPEs gekennzeichnet ist und auch als geographische Atrophie (GA) bezeichnet wird (Nowak 2006, Lotery und Trump 2007, Jager et al. 2008). Unter Drusen versteht man Ablagerungen zwischen der basalen Fläche des Retinalen Pigment-Epithels (RPE) und der Basalmembran (BM) mit einem Durchmesser von etwa 100µm (Mullins et al 2000, Anderson et al, 2002, Jager et al. 2008). Sie stellen einen Risikofaktor für den Übergang in die feuchte Form dar. Etwa 15% der Betroffenen leiden unter dieser AMD-Form (Bressler et al 1990, Lotery und Trump 2007). Charakteristisch für die feuchte AMD sind choroidale Neovaskularisationen (CNV). Leckagen in diesen Gefäßen können zu Einblutungen in die Netzhaut und somit zu plötzlichem Sehverlust führen (Nowak 2006). Der Botenstoff *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist pathogenetisch an den Neovaskularisationen beteiligt und ein vielversprechender Angriffspunkt für aktuelle Therapieversuche (Gragoudas et al 2004, Rosenfeld et al. 2006, Shams und Ianchulev 2006).

Die Entstehung der AMD ist multifaktoriell bedingt. Als Hauptrisikofaktoren gelten Alter und Rauchen. In Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl das Alter als auch das Rauchen den FH-Plasma-Spiegel beeinflusst (Esparza-Gordillo et al. 2004).

Obwohl die Pathogenese der AMD bisher nicht vollständig aufgeklärt ist, gehen mehrere Studien davon aus, dass inflammatorische Prozesse, oxidativer Stress und eine erhöhte Lipidperoxidation eine Rolle bei der Entstehung der AMD spielen (Donoso et al. 2006, Kijlstra

et al. 2005, Anderson et al. 2010). Potenziell bedeutsam, wenn auch aktuell unverstanden, ist die Aktivierung des alternativen Wegs des Komplementsystems bei der AMD. Die Komplementhypothese wird durch den Nachweis von Komplementkomponenten (C3, C5a, MAK) und Regulatoren (FH) in Drusen von AMD-Patienten untermauert (Mullins et al. 2000). Die Erkenntnis, dass Variationen in Genen, die für Proteine des Komplementsystems kodieren (Komplementproteine C2, Faktor B und C3 und FH), das AMD-Erkrankungsrisiko modulieren, deutet ebenfalls auf eine wesentliche Rolle des Komplementsystems bei AMD (Scholl et al, 2008). FH scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AMD zu spielen, da der Einfluss von verschiedenen FH-Polymorphismen auf das Erkrankungsrisiko mittlerweile vielfach dokumentiert wurde (Gold et al. 2006, Yates et al. 2007). Zudem ähneln bei MPGN2-erkrankten Personen die glomerulären Ablagerungen (Mullins et al. 2000) sowie Ablagerungen in der Netzhaut (Huang et al. 2003) in ihrer biochemischen Zusammensetzung den Drusen AMD-Erkrankter.

Im Jahre 2005 wiesen drei voneinander unabhängig durchgeführte genomweite Assoziations-Studien auf einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen FH und AMD hin (Edwards et al. 2005, Haines et al. 2005, Klein et al. 2005). Der Austausch der Aminosäure Histidin (Variante) für Tyrosin (Wildtyp) in Position 402 in Exon 9 von FH wurde auf diese Weise mit der AMD assoziiert. Diese Variation befindet sich auf SCR-7. Auf dieser Domäne sind ebenfalls die Bindungsstellen für Heparin und CRP lokalisiert (Giannakis et al. 2001). Homozygote Träger dieser Histidin-Variante weisen ein bis zu 7-fach höheres Risiko auf, an AMD zu erkranken (Klein et al. 2005). Heterozygote Träger erwartet ein 2,7-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko. Mehrere Studien verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass dieser Polymorphismus Funktionseinschränkungen von Faktor H zur Folge hat. Die AMD-Risikovariante FH-402H bindet im Vergleich zu FH-402Y schwächer an CRP. Des Weiteren ist ihre Cofaktor-Aktivität für den Abbau der C3-Konverase reduziert (Edwards et al. 2005, Haines et al. 2005, Klein et al. 2005, Hageman et al. 2005).

Zahlreiche Studien beschreiben eine Schlüsselrolle von erhöhter Lipidperoxidation und oxidativen Schädigungen in der Pathogenese der AMD. Malondialdehyd (MDA) ist ein Lipidperoxidationsprodukt. Es reagiert mit zellulären Proteinen und formt so Addukte, die als Marker für oxidativen Stress gelten. MDA-modifizierte Proteine induzieren Entzündungsreaktionen. Einer aktuellen Publikation zufolge ist FH ein wichtiges MDA-Bindungsprotein (Weismann et al, 2011). FH manipuliert sowohl die Aufnahme von MDA-Proteinen durch Makrophagen als auch die MDA-induzierten Entzündungsprozesse. Die FH-Anlagerung an MDA erfolgt über SCR 7 und 20. Der Y402H-Polymorphismus befindet sich ebenfalls auf der SCR-7-Region. Die AMD-Variante modifizierter FH-402H bindet deutlich schlechter an MDA. In der Konsequenz wird die Komplement-vermittelte Entzündungsreaktion weniger stark gegenreguliert. Somit konnte im Rahmen dieser Studie

erstmalig ein schlüssiges pathophysiologisches Modell für die Assoziation des FH-Y402H-SNPs mit AMD etabliert werden (Weismann et al, 2011). Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit (89%) von FHR-3 und FH in der MDA-Bindungsdomäne (89%) kann postuliert werden, dass FHR-3 ebenfalls über diesen Mechanismus das Krankheitsgeschehen beeinflusst.

Insgesamt sind derzeit 8 genetische Variationen unterschiedlicher Proteine inner- und außerhalb des Komplementsystems (FH, LIPC, C2, FB, C3, FI) bekannt, die mit AMD in Zusammenhang stehen. 2006 wurde erstmals ein AMD-protektiver FH-Haplotyp, welcher mit der Defizienz der Proteine FHR-3 und FHR-1 einhergeht, beschrieben (Hughes et al. 2006). Die Genfrequenz der FHR-1/FHR-3-Defizienz beträgt bei Gesunden ca. 20%, bei AMD-Erkrankten jedoch nur 8%. Die Defizienz umfasst eine Länge von 84,682 Basen (Abb. 1.3). Aktuelle Studien (Fritsche et al. 2010) belegen, dass die FHR-1/FHR-3-Defizienz unabhängig von allen bisher bekannten AMD-assoziierten FH-Polymorphismen auftritt. Somit spielen diese Proteine eine eigene Krankheits-modulierende Rolle. Derzeitige Hypothesen bauen auf der Erkenntnis auf, dass FHR-3 mit FHR-1 und Faktor H um die Bindung an C3b konkurriert. Im Falle einer Defizienz dieser Proteine (FHR-3 und FHR-1) resultiert eine erhöhte Bindung sowie eine erhöhte Komplementregulation durch FH, da FH wesentlich stärkere Komplementregulatorische Eigenschaften als FHR-3 und FHR-1 besitzt.

Complement Activation Gene Cluster

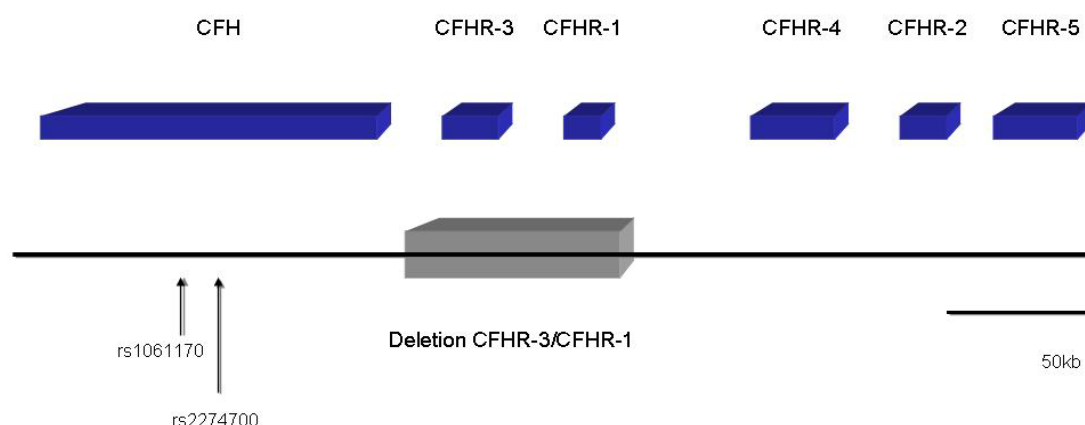


Abb. 1.3. Gen-Clusters „Regulator of Complement Activation“. Das 300-kb große Gen-Cluster der „Regulation of Complement Activation“ beinhaltet FH und weitere fünf FH-related Proteine. FHR-3 und FHR-1 sind eng benachbarte Proteine innerhalb des Gen-Clusters. Die Defizienz dieser Proteine umfasst 84,682 Basen.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Dissertation baut auf der Erkenntnis auf, dass eine Defizienz der Komplementparameter FHR-3 und FHR-1 mit einem niedrigeren Erkrankungsrisiko an AMD assoziiert ist. Zwei Kohorten, bestehend aus 141 Thrombozyten-Spendern und einer Studienpopulation aus 92 AMD-Patienten und 65 vergleichbaren Kontrollen, sollten hinsichtlich ihres FHR-3-Plasmagehaltes untersucht werden. Zusätzlich sollte die Häufigkeit einer FHR-3-Defizienz festgestellt werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob nicht nur eine absolute FHR-3-Defizienz, sondern auch relativ veränderte FHR-3-Plasmaspiegel mit dieser Erkrankung assoziiert sind. Eventuell vorhandene FHR-3-Polymorphismen sollten im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten sollten aufgedeckt und analysiert werden. Zusammenfassend sollte die Rolle von FHR-3 als diagnostischer und prognostischer Faktor bei der Manifestierung einer AMD untersucht werden.

Ein wesentliches Werkzeug dieser Dissertation waren monoklonale anti-FHR-3-Antikörper, mit deren Hilfe ein Messverfahren in Form eines Sandwich-ELISA (*enzym-linked immunosorbent assay*) etabliert werden sollte. Dadurch sollte erstmals eine Bestimmung der FHR-3-Serumkonzentration sowie der Häufigkeit von FHR-3-Defizienzen im Serum möglich werden. Der zu etablierende FHR-3-Test sollte leicht durchzuführen sein und über eine hohe Spezifität und Sensitivität verfügen.

2. Materialien

2.1 Geräte und Zubehör

| | |
|--|--|
| 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) |
| Brutschrank , Typ B5061 FC-CO ₂ , T6060 | Heraeus (Hanau) |
| Elektroblot-Gerät , Typ Multiphor II | Pharmacia LKB (Freiburg) |
| Feinwaage , Typ 1205, 1264 MP, 1265 MP, KB BA | Sartorius (Göttingen) |
| Fluor-S Multi-Imager | Bio-Rad (München) |
| Gen5TM , ELISA-Software | Biotek Instruments (Jena) |
| 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 | Liebherr (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) |
| Mikroskop , Typ IM 15, Televal 31 | Zeiss (Oberkochen) |
| 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 , | Molecular Devices (Menlo Park, |

| | |
|---|--|
| Typ Thermo-max microplate reader | USA) |
| 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 | Hofer 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 (Melsungen) |
| Vortex-Mixer, Typ Vortex-Genie 2TM | Bender & Hobein (Zürich, Schweiz) |
| Wasserbad, Typ Tecam | Bodo Schmidt (Göttingen) |
| Zählkammer, Typ Neubauer Improved | Krannich GmbH (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 GmbH (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 (0,5 / 1,5 / 2 ml) | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Falcontubes 15 ml | Greiner Bio-One (Solingen) |
| Falcontubes 50 ml | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Klebefolie | Herma (Filderstadt) |
| Kryokonservierungsröhrchen | Costar (Cambridge, USA) |
| Küvetten (Uvette 220-160 nm) | Eppendorf (Hamburg) |

| | |
|---|--|
| 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,) |
| Sterilfilter (Porengröße 0,45 / 0,22 µm) | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Zellkulturflaschen (50 ml/250 ml/500 ml) | Sarstedt (Nümbrecht) |
| 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) |

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) |
| Ammoniumpersulfat | Bio-Rad (München) |
| Antibiotika/Antimykotika | Gibco (Karlsruhe) |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Butanol | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Coomassie Brilliant Blau R-250 | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Dimethylformamid (DMF) | Merck (Darmstadt) |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| ECL-Westernblot-Kit RPN 2108 | Amersham Biosciences (Braunschweig) |
| EDTA | Serva (Heidelberg) |
| Essigsäure | Merck (Darmstadt) |
| Entwickler und Fixierer | Kodak (Stuttgart) |
| EZ-Link NHS-Chromogenic Biotin | Pierce (Rockford, USA) |
| Faktor H | Merck (Darmstadt) |
| FHR-3 rekombinant | Arbeitsgruppe Prof. Zipfel (Jena) |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Biochrom (Berlin) |

| | |
|--|---|
| Freund'sches Adjuvans (komplett / inkomplett) | Difco (Augsburg) |
| Gelatine | Difco (Augsburg) |
| Glycin | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Harnstoff | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) | Flow (Meckenheim) |
| Instantmedium RPMI 1640 | SERO-Med (Wien, Österreich) |
| Instantmedium 199 Earle | SERO-Med (Wien, Österreich) |
| 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) |
| 2-Mercaptoethanol | Merck (Darmstadt) |
| Methanol | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Mouse MonoAb ID Kit | Invitrogen (Carlsbad, USA) |
| Natriumacetat (Na-Acetat x 3 H ₂ O) | Merck (Darmstadt) |
| Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃) | Merck (Darmstadt) |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O) | Merck (Darmstadt) |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Merck (Darmstadt) |
| Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O) | Merck (Darmstadt) |
| Nicht essentielle Aminosäuren | Gibco (Karlsruhe) |
| N,N-Methylen-Bisacrylamid | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Phenolrot | Merck (Darmstadt) |
| Polyethylenglykol PEG4000 | Merck (Darmstadt) |
| Protein G Sepharose 4 Fast Flow | GE Healthcare Bio-Science (Uppsala, Schweden) |
| SDS (Dodecylsulfat-Natrium-Salz) | Serva (Heidelberg) |
| Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (SAVP) | Jackson ImmunoResearch (Suffolk; Großbritannien) |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Trichloressigsäure | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Tris | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) |
| Trypanblau | Merck (Darmstadt) |
| Tween | Serva (Heidelberg) |

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 (40%) für Gradientengel (P2)

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

Coating-Puffer (P3)

| | |
|---|-------|
| 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 (P4)

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

Entfärber-Lösung (P5)

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

Gelatine-Blockadepuffer (P6)

| | |
|----------|-------|
| Gelatine | 1,0 % |
| in PBS | |

Kathodenpuffer für Gradientengele (P7)

| | |
|-----------------|---------|
| SDS | 1 mg/ml |
| in Anodenpuffer | |

Kopplungspuffer für Biotinylierung (P9)

| | |
|--------------------|--------|
| NaHCO ₃ | 100 mM |
| NaCl | 150 mM |
| pH | 7,2 |

Laufpuffer / Anodenpuffer für Gradientengele (P10)

| | |
|----------------------|---------|
| Tris | 4,8 g/l |
| Glycin | 3 g/l |
| in dH ₂ O | |

Magermilchpuffer (P11)

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

PBS [9 mM Phosphatpuffer mit physiologischem Salzgehalt (P12)]

| | |
|---|--------|
| Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O (0,5 M) | 130 ml |
| NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (0,5M) | 50 ml |
| NaCl | 72 g |
| ad 10 l H ₂ O | |
| pH | 7,4 |

PBS/Tween (P13)

| | |
|--------|--------|
| Tween | 0,05 % |
| in PBS | |

Phosphatpuffer für Protein-G-Affinitätschromatographie(P14)

| | |
|----------------------------------|--------|
| Na ₂ HPO ₄ | 76,3 g |
| NaH ₂ PO ₄ | 5,1 g |
| gelöst in 5 l H ₂ O | |
| pH 7,5 | |

Probenpuffer für SDS-PAGE (Gradienten-Gel, P15)

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

Regenerationspuffer für Protein-G-Affinitätschromatographie (P16)

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

Säulenpuffer für Affinitätschromatographie (P17)

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

Semidry-Puffer (P18)

| | |
|------------------------------|--------|
| Glycin | 58 g |
| SDS | 740 mg |
| Tris | 11,6 g |
| Methanol | 400 ml |
| Ad 4000 ml dH ₂ O | |

TBS (10 x, P19)

| | |
|------------------------------|------|
| NaCl | 80 g |
| Tris | 24 g |
| ad 2000 ml dH ₂ O | |
| pH 7,6 | |

TBS/Tween (P20)

| | |
|------------------------------|--------|
| TBS (10 x) | 100 ml |
| Tween | 0,05 % |
| Ad 1000 ml dH ₂ O | |

2.5 Monoklonale Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den monoklonalen Antikörpern (mAK) mit Spezifität für FHR-3 weitere Antikörper mit Spezifität für FH und der Histidin- bzw. Tyrosin-betreffenden Variante von FH verwendet. Diese mAK waren zuvor in der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universität Göttingen hergestellt und eingehend charakterisiert worden (Brandt 1993, Börncke 2011).

| Anti-FH Antikörper | Ig-Subklasse | Epitop |
|---------------------------------|---------------------|---------------|
| C18/3 | IgG1 | SCR15-20 |
| E14/8 | IgA | SCR20 |
| E22/11 | IgG1 | SCR3 |
| L20/3 | IgG1 | SCR19 |
| B22/11 | IgG1 | SCR5 |
| H4/15 | IgG1 | SCR15 |
| E20/2 | IgG1 | SCR11-15 |
| C21/14 | IgG1 | SCR8-20 |
| T13/15 | IgG1 | SCR15 |
| Anti-FH (His) Antikörper | Ig-Subklasse | Epitop |
| 23 F8 | IgG1 | SCR7 |
| Anti-FH (Tyr) Antikörper | Ig-Subklasse | Epitop |
| 1 H1 | IgG1 | SCR7 |

Tab. 2.1 Verwendete monoklonale Antikörper

2.6 Polyklonale Antikörper und Antikörper-Konjugate

| | |
|--|---|
| Esel-anti-Ziege-IgG-Peroxidase | Jackson ImmunoResearch (Suffolk, Großbritannien) |
| Esel-anti-Ziege-IgG | Jackson ImmunoResearch (Suffolk, Großbritannien) |
| Kaninchen-anti-Maus-IgG | Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark) |
| Kaninchen-anti-Maus-IgG-Peroxidase | Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark) |
| Schwein-anti-Kaninchen IgG-Peroxidase | Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark) |
| Ziege-anti-Faktor-H | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Ziege-anti-Maus-IgG | Dako Cytomation (Glostrup, Dänemark) |

2.7 Eukaryote Zelllinien

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

Die verwendete Zelllinie stammt von der *American Type Culture Collection* (ATCC). Die ATCC-Katalognummer ist mit angegeben. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Myelomzelllinie aus der BALB/c-Maus. Diese Ag8-Zellen wachsen nicht adhärent, produzieren keine Immunglobuline und sind HAT-sensitiv (Kearney et al. 1979). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Myelomzellen zur Herstellung Antikörper-synthetisierender Hybridome eingesetzt. Dazu wurden sie mit Maus-Lymphozyten fusioniert. Vor der Fusion wurden sie mit 80/20-10-Medium versetzt.

2.8 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 |

Mit Hilfe der CO₂-Begasung wurde der pH-Wert auf 6,9 eingestellt. Anschließend wurde das 80/20 Medium steril filtriert.

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 (50×Konzentrat) | 10 ml |
| 80/20-10-Medium | 500 ml |

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank unter Laminarluft versorgt. Die verwendeten Materialien und Medien waren autoklaviert. Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Bevor Medien oder Puffer-Lösungen verwendet wurden, wurden sie im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Überprüfung der Zellzahl und -vitalität wurde der Trypan-Blau-Test eingesetzt. Der Farbstoff Trypan-Blau ist in der Lage, selektiv nur in tote oder stark beschädigte Zellen einzudringen und diese blau anzufärben. Zu diesem Zweck wurde die Zellsuspension in einem 1:1 Verhältnis mit dem Farbstoff versetzt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Durch Auszählen der nicht angefärbten Zellen in einem definierten Volumen konnte die Zahl der vitalen Zellen ermittelt werden.

3.1.3 Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen

Die Hybridomzellen wurden gezählt, zentrifugiert (1000 UpM, 10 Minuten), in einem 80/20-10 Medium mit 10% DMSO auf eine Konzentration von 3×10^6 – 1×10^7 eingestellt und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte stufenweise. Nach einer zweistündigen Inkubation bei -20° wurden die Zellen für ein bis zwei Tage bei -80° gelagert und dann dauerhaft bei -150° in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen ins Wasserbad gelegt. Anschließend wurden sie aus dem Röhrchen entnommen und unter tropfenweiser Zugabe von 20 ml Medium in ein 50-ml-Falconröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1000 UpM zentrifugiert, um DMSO zu entfernen. Das Zell-Pellet wurde in 20 ml Medium resuspendiert und in 24-Lochplatten überführt.

3.2. Herstellung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für FHR-3

3.2.1 Allgemeines zum Verfahren

Monoklonale Antikörper sind hochspezifische Antikörper, die im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern nur ein einzelnes, definiertes Epitop auf einem interessierenden Antigen erkennen. Diese strukturell identischen Antikörper werden von einem Klon produziert, der auf einen einzelnen B-Lymphozyten zurückgeht.

Die Hybridom-Technik gestattet die Synthese monoklonaler Antikörper in theoretisch unbegrenzter Menge. Bei diesem Verfahren werden B-Lymphozyten aus der Milz einer immunisierten Maus mit Myelomzellen (Ag8-Zellen) fusioniert und anschließend in einem Selektivmedium kultiviert. Das Fusionsprodukt dieser beiden Zellen bezeichnet man als Hybridom. Während Hybridome, die die Antikörper mit der gewünschten Antigenspezifität sezernieren, identifiziert und subkloniert werden müssen, werden überlebensunfähige und sonstige unerwünschte Fusionsprodukte eliminiert. Die Antikörper-Massenproduktion durch ein Hybridom ist in einem speziellen Kultivierungssystem (Bioreaktor) möglich. Die Herstellung monoklonaler Antikörper ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

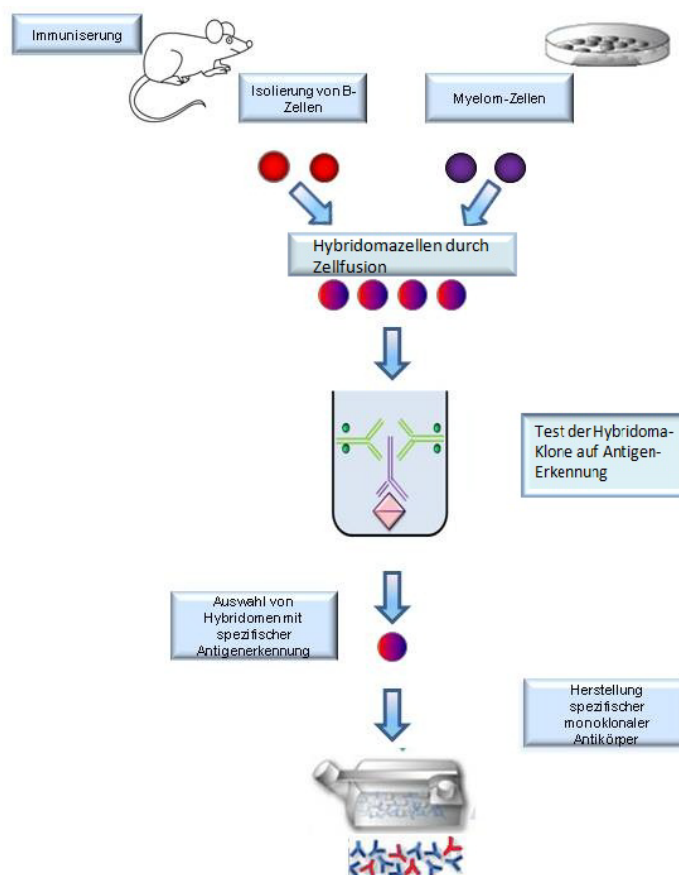


Abb. 3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

3.2.2 Immunisierung der Mäuse

Zu Beginn wird das Immunsystem des Versuchstieres durch eine Immunisierung mit einem Antigen spezifisch moduliert. Ziel dieser Immunisierung ist es, in der Milz der Maus den Anteil an B-Lymphozyten mit der gewünschten Spezifität für das verabreichte Antigen zu erhöhen. Dabei wird dem Tier das Antigen in Kombination mit einem Adjuvans in die Peritonealhöhle injiziert. Die Zugabe eines Adjuvans bewirkt u.a. über eine Stimulation von Toll-like-Rezeptoren auf Antigen-präsentierenden Zellen eine verstärkte Präsentation des entsprechenden Antigens. Hierdurch wird eine maximale Immunreaktion des Versuchstieres erzeugt.

Der Immunisierungsvorgang unterteilt sich in eine Vorimmunisierung und eine Auffrischungsimmunisierung (Boost). Im Rahmen der Vorimmunisierung wurde die Maus über einen Zeitraum von 6 Monaten in regelmäßigen Abständen geimpft. Dieses Vorgehen verspricht eine höhere Affinität der Antikörper-Bindung an das Antigen. Die Auffrischungsimmunisierung ohne Adjuvans erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen unmittelbar vor der Fusion mit den Myelom-Zellen. Dadurch wird eine maximale Proliferation der Antigen-spezifischen B-Lymphoblasten erzielt.

Zunächst wurde eine Wasser-in-Öl-Emulsion aus rekombinantem FHR-3 in PBS (P12) und Freund-Adjuvans (Verhältnis Antigen-Lösung-Adjuvans 1:2) hergestellt. Mit Hilfe von Ultraschall erfolgte die Emulgierung in 5 Schritten zu je 12 Sekunden Dauer. Die erste Immunisierung wurde mit komplettem Freund-Adjuvans (cFA) durchgeführt, die restlichen Immunisierungen hingegen mit inkomplettem Freund-Adjuvans (iFA). Über einen Zeitraum von 6 Monaten wurden der Maus alle 4 Wochen 25 µg Antigen in einem Volumen von je 500 µl intraperitoneal injiziert. Die Boosterung erfolgte fünf Tage vor der geplanten Fusion und wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Dabei wurde das Antigen in PBS (P12) der Maus in einem Volumen von 300 µl gespritzt. Bei der ersten Boosterung entsprach dies einer Antigen-Menge von 25 µg, bei den beiden darauffolgenden je 50 µg. Das Immunisierungsschema ist in der folgenden Tabelle beschrieben:

| Tag | Schritt | rek. FHR-3 [μg] | Volumen [μl] |
|-----|--------------|------------------------------|---------------------------|
| 1 | Priming | 25 | 500 (cFA) |
| 30 | Auffrischung | 25 | 500 (iFA) |
| 60 | Auffrischung | 25 | 500 (iFA) |
| 90 | Auffrischung | 25 | 500 (iFA) |
| 120 | 1. Boost | 25 | 300 (PBS) |
| 121 | 2. Boost | 50 | 300 (PBS) |
| 122 | 3. Boost | 50 | 300 (PBS) |
| 124 | F U S I O N | | |

Tab. 3.1 Immunisierungsschema zur Herstellung monoklonaler anti-FHR-3-Antikörper

3.2.3 Präparation von Maus-Peritoneal-Makrophagen

Eine Woche vor der geplanten Zellfusion wurden die Maus-Peritoneal-Makrophagen (Feederzellen) aus einer immunisierten Balb/c Maus präpariert. Diese Makrophagen begünstigen das Wachstum von Hybridomen, indem sie anfallende Zelltrümmer beseitigen und Zytokine (IL-6) und Wachstumsfaktoren (GM-CSF) produzieren.

Die Maus wurde durch CO₂-Begasung getötet und in Rückenlage auf einer Styroporplatte fixiert. Das Fell wurde vor seiner Entfernung mit 70%igem Ethanol desinfiziert, anschließend konnte der Bauchraum geöffnet werden. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden mehrfach jeweils 1-2 ml kaltes PBS (P12) in die Peritonealhöhle injiziert und nach kurzer Zeit wieder abgesaugt. Die PBS-Makrophagen-Suspension wurde in einem 15-ml-Falconröhrchen gesammelt und in 400 ml 80/20-10 Medium überführt. Anschließend wurden von dieser Zellsuspension je 200 μl pro Napf auf 96-Loch-Mikrotiterplatten mit Flachboden pipettiert und bei 37°C in 5% CO₂-Atmosphäre bis zum Tag der Fusion inkubiert. Vor dem Überführen der Hybridomzellen in die beschichteten Platten wurde der Überstand wieder abgesaugt.

3.2.4 Zellfusion und selektive Aufzucht von Hybridomen

Aus der Mäusemilz gewonnene B-Lymphozyten sind *in vitro* auf Dauer nicht lebensfähig. Aus diesem Grund werden sie mit einer Myelom-Permanent-Zelllinie fusioniert. Dadurch entstehen überlebensfähige Antikörper-produzierende Zellhybride, sog. Hybridome. Es wird i.d.R. eine Myelom-Zelllinie verwendet, die selbst nicht in der Lage ist, Antikörper herzustellen. Die Zellfusion wird durch Inkubation mit Polyethylenglykol initiiert, welches die Zell-Membranen zum Verschmelzen anregt. Bei diesem Verfahren entstehen neben den gewünschten Hybridomen zahlreiche weitere Fusionsprodukte, die z.B. nur aus Lymphozyten oder Myelomzellen, in beliebiger Zusammensetzung, bestehen. Viele nichtfusionierte Zellen und Fusionsprodukte sterben nach kurzer Zeit von selbst in der Kultur ab. Die Myelomzellen sind aufgrund ihrer hohen Teilungsrates in der Lage, Hybridome zu überwachsen, deshalb müssen sie nach erfolgter Zellfusion eliminiert werden. Dies gelingt, indem Myelomzellen mit gezielten Enzymdefekten (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) im Reserveweg des Nucleinsäurestoffwechsels eingesetzt werden. Die Nucleinsäuresynthese ist über zwei unterschiedliche Stoffwechselwege möglich, dem Haupt- und dem Reserveweg. Vergiftet man den Hauptstoffwechsel-Weg des Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsels durch Aminopterin, sterben unfusionierte Myelomzellen ab, da sie nicht auf den Reserveweg ausweichen können. Die Zugabe von Vorstufen des Reservewegs (Hypoxanthin und Thymidin) begünstigt das Überleben immortalisierter Fusionsprodukte. Somit ermöglicht die Kultivierung der Zelle in HAT-Medium (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin) die selektive Anzucht von Lymphozyt-Myelom-Zellhybridomen.

Die Milz einer mit FHR-3 immunisierten Balb/c Maus wurde steril entnommen und auf eine mit 10 ml 80/20-10 Medium gefüllte Petrischale überführt. Das Organ wurde vom Bindegewebe befreit. Die Perforation erfolgte mittels einer Kanüle. Anschließend wurde mehrfach Medium in die Milz injiziert, wodurch Milzzellen mit HAT-Medium aus der Milz gespült wurden. Diese Zellsuspension wurde in 15-ml-Falconröhrchen überführt und für einige Zeit stehen gelassen, damit sich die Bindegewebspartikel am Boden absetzen. Das überstehende Medium wurde mit den Zellen abgenommen und erneut in ein weiteres Röhrchen gefüllt. Die Ag-8 Myelomzellen wurden in einem 50-ml-Falconröhrchen auf eine Zellkonzentration von 1×10^8 Zellen in einem Volumen von 2 ml 80/20-10 Medium eingestellt. Die Ag-8 Myelomzellen wurden nun mit der Milzsuspension vermischt und für 5 Minuten bei 200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet vorsichtig resuspendiert. 1,5 ml vorgewärmte PEG-Lösung wurde über 1 Minute unter langsamem Schütteln hinzugegeben. Es folgte die Zugabe von insgesamt 20 ml warmen PBS (P12) ebenfalls tröpfchenweise und unter Schütteln, indem in den ersten 30 Sekunden 1 ml, in den nächsten 30 Sekunden weitere 3 ml und in der darauffolgenden Minute die restlichen 16 ml

auf die Zellen gegeben wurden. Während dieser Verdünnungsprozedur erfolgte die Zellfusion. Im Anschluss daran wurde die Zelllösung 5 Minuten bei 300 UpM zentrifugiert und dann weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in HAT-Medium resuspendiert und daraufhin in eine mit HAT-Medium gefüllte 500-ml-Flasche überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf mit Feederzellen beschichtete 96-Loch-Platten verteilt.

3.2.5 Identifizierung von Hybridomen mit der gewünschten Spezifität

Die hergestellten Hybridomen-Klone aus Ag8-Myelomzellen und Maus-B-Lymphozyten sezernieren Antikörper in das Zellmedium, wobei nur sehr wenige Immunglobuline mit der gewünschten Antigenspezifität produzieren. Um diese Hybridome zu identifizieren, wurden die Zellüberstände in den Klonierungsplatten eine Woche nach der Fusion mittels direktem ELISA-Verfahren auf FHR-3-spezifische Antikörper getestet.

Hierbei wurden die Platten mit dem Immunisierungspeptid (FHR-3 1 µg/ml) in Coating-Puffer (P3) beschichtet. Als nächstes wurden Kulturüberstände sämtlicher Fusionsplatten unverdünnt in die Näpfe der ELISA-Platte pipettiert. Der Nachweis erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus-Ig (DAKO P260) in einer 1:1000 Verdünnung in PBS-Tween (P13). Als Positiv-Kontrolle diente 1:1000 verdünntes Fusions-Maus-Serum. Der colorimetrische Nachweis erfolgte durch Zugabe des Peroxidase-Substrats ABTS (P1) in Gegenwart von H₂O₂.

Die Klone, die dabei ein positives Signal erbrachten, wurden unter Sicht gepickt und einzeln in Näpfe einer Mikrotiterplatte umgesetzt. Nachdem der heranwachsende Klon den Boden des Napfes bedeckt hatte, wurde der Überstand erneut wie oben beschrieben auf epitopspezifische Antikörper getestet.

3.2.6 Subklonierung der positiven Klone

Klonierung bedeutet im Kontext der vorliegenden Arbeit die Produktion identischer Hybridome bzw. ihrer sekretorischen Produkte, der monoklonalen Antikörper. Die gepickten Zellklone sind zunächst mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit durch andere Zellen kontaminiert, die u. U. den interessierenden Zellklon überwuchern könnten. Ein Klon gilt erst dann als monoklonal, wenn er mindestens einmal subkloniert wurde. Bei einer Subklonierung werden die Zellen so weit verdünnt, dass statistisch weniger als eine Zelle in einen Napf überführt wird. Für das Wachstum der Zellen ist allerdings häufig eine Mindestzelldichte

nötig. Deshalb wurden die Kolonien in verschiedenen Verdünnungsstufen ausgesät und der Napf mit der geringsten Zelldichte weiter propagiert.

Sobald die Klone ausreichend gewachsen waren, wurden sie in Suspension gebracht und in 6 ml HAT-Medium 80/20-10 + IL-6 verdünnt. Anschließend wurden sie dann in einer 1:3 Verdünnungsreihe über 6 Stufen auf einzelne Näpfe einer 96-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Aus den vereinzelteten Hybridomzellen hochwachsende Subklone wurden einzeln gepickt und in eine 96-Loch-Platte, später über eine 24-Loch-Platte schließlich in eine 6-Loch-Platte überführt. Sodann wurden die Zellen in kleinen 50-ml-Flaschen bzw. 250-ml-Zellkulturflaschen vermehrt.

3.2.7 Antikörper-Massenproduktion im MiniPerm-Bioreaktor

Der MiniPerm-Bioreaktor dient der Anzucht von Hybridomen. Dadurch wird eine Antikörper-Produktion in hohen Zelldichten in den Überständen erzielt.

Die Miniperm-Anlage setzt sich aus zwei Modulen zusammen, die durch eine semipermeable Membran verbunden sind: dem Produktionsmodul und dem Versorgungsmodul. Im Produktionsmodul befinden sich die heranwachsenden Zellen und die von ihnen produzierten Antikörper. Beide können die Membran nicht passieren. Hingegen ist der Austausch von niedermolekularen Wachstumsfaktoren und anderen Nährstoffen aus dem Versorgungsmodul in das Produktionsmodul möglich. Das Produktionsmodul wurde mit insgesamt 4×10^7 Zellen in 40 ml 80/20-10 Medium mit IL-6 gefüllt. In das Versorgungsmodul wurden 350 ml 80/20-10 Medium gegeben. Die Kultivierung im Bioreaktor erfolgte bei 5 Umdrehungen pro Minute, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Hybridome erfolgte alle 2-5 Tage die Ernte. Hierfür wurde etwas Überstand aus dem Produktionsmodul abgezogen und die darin enthaltenen Zellen wurden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden sie erneut auf die Ausgangsmenge von 4×10^7 verdünnt und zurück in die MiniPerm-Anlage überführt. Die überschüssige Zellsuspension wurde entnommen und bei 1000 UpM für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Antikörper-enthaltende Hybridomüberstand wurde bis zur Aufreinigung bei -20°C eingefroren.

3.3 Antikörperaufreinigung mittels Protein-G Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie dient der Isolierung von Antikörpern aus den Überständen der Hybridom-Kulturen. Dieses Verfahren nutzt die spezifische Bindung von Immunglobulinen an bakterielle Zellwandbestandteile (Protein A/G) aus. Bei dieser Arbeit wurde rekombinantes Protein G eingesetzt, welches an die Gelmatrix der Säule gebunden war. Während der Affinitätschromatographie wird der aufzureinigende Kulturüberstand auf die Säule gegeben, wobei sich nur die Immunglobuline an das Protein G binden und die restlichen Proteine durchlaufen. Nach ausgiebigem Waschen der Säule mit Waschpuffer wird der Antikörper durch einen stark sauren Puffer vom Protein G gelöst und im Eluat sogleich neutralisiert.

Um eine optimale Ausnutzung der Säule zu gewährleisten, muss die Kapazität der Säule für das aufzureinigende Protein und die ungefähre Menge an zu erwartendem Protein im Kulturüberstand bekannt sein. Im vorliegenden Falle entsprach das einer Immunglobulin-Menge von ungefähr 25 mg pro 5 ml Protein-G-Säulenmaterial.

Vor der Aufreinigung wurde der Kulturüberstand über Nacht gegen 20mM Phosphatpuffer (P14) (pH 7,5) bei 4°C dialysiert. Dazu wurde ein Dialyseschlauch (Ausschlussgrenze 20kDa) aufgekocht, mit zellfreien Kulturüberstand befüllt und mittels Klemmen an beiden Enden verschlossen. Es wurden 3 Pufferwechsel zu je 3L durchgeführt. Die Affinitätschromatographie erfolgte ebenfalls bei 4°C. Zu Beginn wurde die Säule mit 50 ml Phosphatpuffer (P14) äquilibriert. Anschließend wurde der ausdialysierte Überstand mit ca. 2 ml pro Minute auf die Säule gegeben. Danach wurde dieselbe mit 100 ml Säulenpuffer (P17) gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchfluss nachweisbar war. Die Elution erfolgte mit 0,1M Glycin (pH 2,7). Dabei wurde der Antikörper in Fraktionen zu 2 ml aufgefangen und sogleich durch Zugabe von 0,5 ml 1M Tris (pH 9) neutralisiert. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml Regenerationspuffer (P17) regeneriert und mit 100 ml Phosphatpuffer (P14) neutralisiert. Der Immunglobulingehalt der gesammelten Eluat-Fraktionen wurde durch photometrische Bestimmung (OD_{280}) gegen Tris gemessen. Zuletzt wurde der Antikörper bei dreimaligen Pufferwechsel zu je 3L über Nacht bei 4°C gegen PBS (P12) dialysiert.

3.4. Biotinylierung der aufgereinigten Antikörper

Das natürlich vorkommende Vitamin Biotin bindet mit hoher Affinität an das Protein Avidin. Diese Eigenschaft wird in verschiedenen Nachweisverfahren zur Signalverstärkung ausgenutzt. Um die hergestellten und aufgereinigten monoklonalen Antikörper im ELISA

auch als Nachweis-Antikörper einsetzen zu können, erfolgte deren Biotinylierung mittels Biotin-X-NHS. Die Reaktion basiert auf einer NHS-vermittelten Peptidbindung mit den Aminogruppen von Lysinresten der Antikörper. Die biologische Aktivität der derivatisierten Antikörper wird hierdurch kaum beeinträchtigt, da Biotin mit einem Molekulargewicht von 300Da ein relativ kleines Molekül ist.

Die aufgereinigten Antikörper wurden über Nacht bei 4°C und bei dreimaligen Pufferwechseln gegen insgesamt 10L Kopplungspuffer (P8) dialysiert. Anschließend wurden sie auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Das Biotin wurde in Dimethylformamid gelöst (3 mg/ml). Die Biotinylierung erfolgte in 3 verschiedenen Ansätzen, wobei Biotin in einem 5-, 15- und 50fachen molaren Überschuss zu den Antikörpern gegeben wurde. Die Konjugation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Um die Reaktion zu beenden, wurden 100 µl einer 0,1M Glycinlösung zum Ansatz (1 ml) gegeben und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Dialyse gegen insgesamt 10L PBS (P12) über Nacht bei 4°C, um nicht-konjugiertes Biotin zu entfernen. Zuletzt wurde photometrisch (OD_{280}) die Proteinkonzentration ermittelt und der Erfolg der Biotinylierung mittels ELISA überprüft.

3.5 ELISA-Verfahren

3.5.1 Allgemeines zum Verfahren

Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das mit Hilfe einer enzymvermittelten Farbreaktion die spezifische Bindung eines Antikörpers an ein Antigen darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich sogenannte *Sandwich-ELISAs* verwendet. Diese Form des ELISA basiert auf der Verwendung von zwei Antikörpern. Hierbei wird der erste Antikörper an eine Mikrotiterplatte immobilisiert. Überschüssige Antikörper, die nicht an die Platte gebunden haben, werden herausgewaschen, unspezifische Bindungsstellen auf der Platte werden mit Gelatine geblockt. Anschließend wird ein Stoffgemisch (z.B. Kulturüberstände oder Probandenserum) mit dem nachzuweisenden Antigen auf die Platte gegeben. Während der Inkubationszeit bindet das Antigen über den zuvor immobilisierten Antikörper an die Platte. Durch eine variable Anzahl von Waschschrritten werden die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt. Nun erfolgt die Detektion des gebundenen Antigens mit dem zweiten Antikörper. Dabei entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Der Nachweisantikörper ist biotinyliert und weist eine hohe Affinität zu Streptavidin auf, so dass als nächstes Streptavidin-gekoppelte Peroxidase hinzugefügt wird. Diese Peroxidase katalysiert die Spaltung von 2,2'-Azinobis-(3-

ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS, P1) in ein grün gefärbtes Produkt in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Oxidationsmittel. Dieser Farbumschlag ist bei einer OD von 405nm im Photometer messbar.

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten ELISA-Verfahren wurden Nunc-MaxiSorb-Platten verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden mit dem jeweiligen Beschichtungs-Antikörper im alkalischen Milieu über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer beschichtet. Dazu wurde der Fangantikörper in Coating-Puffer (P3) auf die gewünschte Konzentration verdünnt und in jeden Napf 100 µl pipettiert. Nach Inkubation über Nacht folgte eine 45 minütige Inkubation jedes Napfes mit 200 µl Gelatine-Blockpuffer, um nicht besetzte Bindungsstellen der Platte zu blockieren. Danach wurde die Platte zweimal gewaschen. Alle Waschschriffe erfolgten in einem Endvolumen von 200 µl PBS/Tween (P13) pro Napf. Für die folgenden Inkubationsschritte wurde pro Napf jeweils ein Volumen von 100µl eingesetzt. Sie fanden bei Raumtemperatur statt und dauerten jeweils eine Stunde. Die verwendeten Antikörper und Proben wurden stets in PBS/Tween (P13) verdünnt und jeweils in Doppelbestimmung in die Nöpfe einer Mikrotiterplatte gegeben. In den meisten Fällen wurde parallel zu den Proben eine Standardreihe in Doppelbestimmungen aufgetragen, anhand derer eine Kalibrationskurve erstellt wurde. Die Erstellung einer Kalibrationskurve sowie die Auswertung des ELISA erfolgten mit Hilfe der Software Gen5™ (BioTek Instruments GmbH). Eine Übersicht über den Ablauf eines ELISAs bietet die folgende Tabelle:

| | |
|--|--|
| 1. Beschichtung der Platte mit dem Fang-AK | Fang-AK verdünnt in Coatingpuffer (P3): 100µl/Napf, über Nacht, 4°C |
| 2. Platte ausschlagen | |
| 3. Blockade | Gelatine-Blockadepuffer (P6): 200µl/Napf, 1h |
| 4. Waschen | 2mal mit PBS/Tween (P13) |
| 5. Auftragen der Proben / Standard | Proben / Standard verdünnt in PBS/Tween (P13): 100µl/Napf, 1h, Raumtemperatur |
| 6. Waschen | 2mal mit PBS/Tween (P13) |
| 7. Detektion des Immunkomplexes mit Nachweis-AK | Nachweis-AK verdünnt in PBS/Tween (P13): 100µl/Napf, 1h, Raumtemperatur |
| <i>Bei Peroxidase-konjugiertem Nachweisantikörper direkt zu 10. ; bei Biotin-konjugiertem Nachweisantikörper zusätzlich 8.+9.:</i> | |
| 8. Waschen | 3mal mit PBS/Tween (P13) |
| 9. Konjugat | SAVP in PBS/Tween (P13) 1:1000 verdünnt: 100µl/Napf, 45min, Raumtemperatur |
| 10. Waschen | 4mal mit PBS/Tween (P14) |
| 11. ABTS (P1)+H₂O₂ | 100µl/Napf, Warten auf Grünfärbung |
| 12. Computergestützte Auswertung | |

Tab. 3.2 Ablauf eines Sandwich-ELISAs.

3.5.2 ELISA zum Nachweis von anti-FHR-3-Antikörpern in Hybridomüberständen

Mittels ELISA-Verfahren kann nachgewiesen werden, in welchen Konzentrationen die gewünschten Antikörper in den Hybridomüberständen vorliegen. Auf einer Mikrotiterplatte wurden ein Kaninchen anti Maus IgG Antikörper (DAKO Z259) in einer Verdünnung von 1:500 in Beschichtungspuffer gebunden. Je 100 µl des Kulturüberstandes wurden in zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen sowie in Doppelbestimmungen hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit von zwei Stunden wurde der gebundene Antikörper über einen Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper (DAKO P260) in einer

Verdünnung von 1:1000 nachgewiesen. Als Eichstandard diente ein zuvor aufgereinigter Maus IgG1 kappa Antikörper, der in PBS/Tween (P13) verdünnt wurde (1,95 ng/ml bis 500 ng/ml).

3.5.3 ELISA zur Immunglobulin-Subklassifizierung

Mithilfe dieses Verfahrens konnten die unterschiedlichen Immunglobulin-Subklassen der hergestellten FHR-3-spezifischen monoklonalen Antikörper bestimmt werden. Es wurde das Mouse MonoAb ID Kit der Fa. Zymed verwendet. Der Test basiert auf mehreren, aus Kaninchen gewonnenen Antiseren mit Spezifität verschiedener Immunglobulin-Isotypen in der Maus. Als Nachweis-Antikörper diente ein Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper.

Die ELISA-Platten wurden mit dem Immunisationspeptid (FHR-3) in einer Konzentration von 1 µg/ml beschichtet und anschließend über Nacht inkubiert. Es wurden jeweils 100 µl Hybridom-Kulturüberstand aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden in jeden Napf jeweils 50 µl einer der unterschiedlichen Kaninchen-anti-Maus-Isotyp-Lösungen pipettiert. Danach wurde jeweils 50 µl eines Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugats in einer 1:50 Verdünnung zugegeben. Normales Kaninchen-Serum wurde als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (DAKO Z109) in einer Konzentration von 1:500 verwendet. Der Napf mit der höchsten Dichte zeigte die jeweilige Immunglobulin-Subklasse des entsprechenden Antikörpers an.

3.5.4 Epitopanalyse mittels ELISA

Zur Etablierung eines Nachweis-Verfahrens zur Quantifizierung von FHR-3 im Sinne eines Sandwich-ELISA sollte eine bestmögliche Kombination aus zwei anti-FHR-3-Antikörpern, die an zwei verschiedene FHR-3-Epitope binden, gefunden werden. Diese Kombination sollte es ermöglichen, spezifisch FHR-3 im Serum zu detektieren und sollte daher keine Kreuzreaktionen mit anderen FHR-3-verwandten Proteinen aufweisen. Hierzu wurden alle hergestellten monoklonalen Antikörper sowohl als Fang- als auch als biotinylierter Nachweis-Antikörper in allen denkbaren Kombinationen eingesetzt. Besondere Beachtung fand die Analyse der Antikörper hinsichtlich ihrer Reaktivität mit aufgereinigten FHR-3, FH und Serumproteinen.

Die aufgereinigten Fang-Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet, die biotinylierten Nachweis-Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml. Die Detektion

eines Immunkomplexes erfolgte mit 1:1000 verdünnten Peroxidase-konjugiertem Streptavidin. Als Antigen wurde aufgereinigtes FHR-3, FH, FHR-3-defizientes Serum und FH-defizientes Serum in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt.

3.5.5 ELISA zur Quantifizierung von FHR-3

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Sandwich-ELISA für die Quantifizierung von FHR-3 im Plasma zu etablieren. In Vorversuchen wurde ermittelt, welche Antikörperkombination sich am besten zum Aufbau eines FHR-3-spezifischen ELISA eignet. Die dabei ausgewählte Kombination bestand aus dem Fangantikörper 18A7 und dem biotinylierten Nachweisantikörper 19E9. Anschließend wurden die Testbedingungen optimiert. Der auf diese Weise etablierte ELISA erfolgte analog zu dem in Tabelle 3.2 beschriebenen Protokoll. 18A7 wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml und 19E9 in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Bei jeder Messung wurde entweder reines rekombinantes FHR-3 (2,8 ng/ml bis 2000 ng/ml) oder Humanserum (1:10 bis 1:2560) als Eichstandard mitgeführt. Der ELISA wurde mit bekannter FHR-3-Konzentration zur Bestimmung der FHR-3-Konzentration in gesunden Thrombozytenspendern und in AMD-Patienten eingesetzt. Des Weiteren wurde er zur Feststellung einer tagesabhängigen FHR-3-Schwankung eingesetzt. Die Proben wurden in den Verdünnungsstufen 1:250 und 1:750 verwendet und jeweils doppelt bestimmt. Auf jeder ELISA-Platte wurde sowohl eine Positiv-Kontrolle als auch eine Negativ-Kontrolle mitgeführt.

3.6 Patientenproben

3.6.1 Aufarbeitung der Patientenproben

Allen Probanden (Thrombozyten-Spender und AMD-Kohorte) wurde unter sachgerechten Bedingungen venöses Blut abgenommen. Dieses wurde in Serum bzw. EDTA-Monovetten aufgefangen. Direkt nach der Blutentnahme erfolgte die Zentrifugation der Proben für 20 Min. bei 1000 Umdrehungen, um das Plasma von den Blutzellen zu trennen. Der zellfreie Überstand (Serum/Plasma) wurde in ein weiteres Röhrchen überführt und bis zur Analyse der Proben bei -80° gelagert.

3.6.2 Thrombozyten-Spender

Die Bestimmung der normalen FHR-3-Konzentration im Blut erfolgte an einer Studienpopulation aus 134 Blutspendern. Diese wurde freundlicherweise von der Abt. Transfusionsmedizin (Fr. Dr. Pollok-Kopp) des Universitätsklinikum Göttingen bereit gestellt. Den Probanden wurde unter standardisierten Bedingungen EDTA-Plasma und Vollblut abgenommen. Ein positives Votum (Az. 2/12/05) der Ethik Göttingen lag vor.

3.6.3 AMD- und Kontroll-Proben

Die Kohorte, bestehend aus 92 AMD-Patienten und 67 Augen-gesunden Kontrollen, wurde freundlicherweise von der Augenklinik der Universität Bonn (Direktor: Prof. Holz) zur Verfügung gestellt. Die zuständige Ethikkommission der Universität Bonn hat die ethische Unbedenklichkeit der Studie bestätigt.

3.6.4 Tageszeitliche FHR-3-Konzentrations-Schwankungen

Diese Population bestand aus vier Probanden, die sich bereit erklärten, über einen Zeitraum von einer Woche mehrfach Blut zu spenden. Die Teilnehmer waren Mitarbeiter der Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie der Universität Göttingen.

3.6.5 FHR-3-Polymorphismus

Beide Kohorten (Thrombozyten-Spender und AMD- und Kontroll-Gruppe) dienten dazu, zu untersuchen, ob der FH-Polymorphismus rs1061170 (s. Kap. 1.4) ebenfalls auf FHR-3 vorhanden ist. Für dieses Projekt standen zwei anti-FH-Antikörper (1H1, 23F8) zur Verfügung. Diese wurden zuvor im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation (Börncke, 2011) generiert. Der Antikörper 1H1 markiert die Tyrosin Variante des FH-Polymorphismus rs1061170, der Antikörper 23F8 hingegen die Histidin-Variante.

In einer Konzentration von 20 µg/ml wurden die FH-spezifischen Antikörper als *Coating*-Antikörper und in einer Konzentration von 5 µg/ml als Nachweis-Antikörper eingesetzt. Die FHR-3-Antikörper lagen als Fang-Antikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml und als Nachweis-Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml vor. Eingesetzt wurde Humanserum in einem Verhältnis von 1:50, FHR-3 mit 500 ng/ml und PBS-Tween (P13) als Negativ-

Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle dienen die FH-spezifischen Nachweis-Antikörper L20/3 und C18/3.

3.7 Auftrennen und Nachweis von Proteinen

3.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel dient sowohl der Überprüfung der Homogenität von Proteinpräparationen als auch der Bestimmung ihrer Molekulargewichte. Bei diesem Verfahren bewegen sich die Moleküle in einem elektrischen Feld. Als Trenngel fungiert ein Polymerisationsprodukt aus Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid. Letzteres bewirkt eine Quervernetzung des Acrylamids und gibt so die Dichte des Gels vor. Proteine mit geringem Molekulargewicht bewegen sich schneller als große. Damit die Eigenladung keinen Einfluss auf das Wanderungsverhalten der Proteine hat, werden sie mit dem anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat in Kombination mit Harnstoff inkubiert, wodurch alle die gleiche negative Ladungsdichte erhalten. Durch Zusatz eines reduzierenden Reagens (z.B. 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol) können zusätzlich Disulfidbrücken eröffnet und Peptidbindungen getrennt werden. Damit ist es möglich, die Laufgeschwindigkeit der Proteinkomplexe alleine vom Molekulargewicht abhängig zu machen. Es gibt verschiedene SDS-PAGE-Verfahren, die sich in den verwendeten Polyacrylamidgelen unterscheiden. Die Verwendung eines Gradientengels eignet sich besonders für die Auftrennung von Proteinen mit großen Unterschieden im Molekulargewicht. Bei diesem Gel steigt die Acrylamidkonzentration linear von 3% bis 20% in Laufrichtung an. Unterscheiden sich die aufzutrennenden Eiweiße nur gering in ihrer Größe, so wird die SDS-PAGE nach Laemmli verwendet. Bei dieser Methode weist das Trenngel einen konstanten Acrylamidgehalt auf. Ein separates Sammelgel mit niedrigem Acrylamidgehalt dient hierbei der Konzentrierung der Proben vor dem Eintritt in das Trenngel.

3.7.1.1 Gießen eines Polyacrylamidgels

Zuerst wurden zwei Glasplatten der Größe 16 x 18 cm mit Ethanol gesäubert. Anschließend wurden sie mittels Abstandhaltern und Klemmen zu einer Gussform für das Gel zusammengebaut und in eine Gießvorrichtung gespannt. Für die Herstellung eines Gradientengels wurden zeitgleich eine 3%ige sowie eine 20%ige Acrylamidlösung angesetzt

(Tab. 3.3). Als Katalysator der Polymerisation wurden jeweils 5 μl TEMED zu den 10 ml Gellösungen hinzugegeben. Daraufhin wurden die beiden Lösungen zügig in die dafür vorgesehenen Kammern eines Gradientenmischers gefüllt. Nachdem der Rührstab eingeschaltet war, wurde die Verbindung zwischen den Kammern geöffnet. Mit Hilfe einer Pumpe wurde das Acrylamid in die Gussform überführt, so dass ein linearer Gradient der Acrylamidkonzentrationen von 20% am Unterrand bis zu 3% am Oberrand des Gels erzeugt wurde. Anschließend wurde ein Kamm zur Formung der Taschen für den Probenauftrag ins Trenngel eingesetzt. Die Polymerisation erfolgte über einen Zeitraum von zwei Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurde der Kamm wieder entfernt, das Gel in die Halterungen für den Elektrophoreselauf eingespannt und mit Laufpuffer (P10) bedeckt.

| Komponente | 3% | 20% |
|---|-----------------|-----------------|
| 0,8 M Tris pH 8,6 | 2,0 ml | 2,0 ml |
| Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40%, P2) | 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. 3.3 Zusammensetzung eines Gradientengels

3.7.1.2 Vorbereitung der Proben und der Elektrophorese

Zur Vorbehandlung wurde die zu untersuchende Probe mit Probenpuffer (P15) versetzt und nachfolgend bei 99°C 5 Minuten lang gekocht. Mit Hilfe einer Hamiltonspritze wurden die Proben vorsichtig in die Taschen des Gels appliziert. Als Molekulargewichtsmarker diente 7 μl eines kommerziell verfügbaren Molekulargewichtsstandards in Probenpuffer (P15). Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 100mA. Durch das Bromphenolblau im Probenpuffer (P15) wurde das Voranschreiten der Auftrennung an der vordersten Front sichtbar. Nachdem diese Bande das Gel durchwandert hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel entnommen. Vorsichtig wurde das Gel von den Glasplatten gelöst.

3.7.2 Proteinfärbung mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (P4) ist eine Methode zur Darstellung von aufgetrennten Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel. Dabei lagert sich der Farbstoff an aromatische und basische Seitenketten der Aminosäuren nicht kovalent an und färbt stöchiometrisch alle Proteine in einem Gel. Hierbei liegt die Nachweisgrenze bei ungefähr 500 ng pro Bande.

Das Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur in der Färbelösung auf einer Schwenkplatte bewegt. Am nächsten Tag folgte die Entfernung der Hintergrundfärbung mit einer Entfärber-Lösung (P5), um die Proteinbanden voneinander abgrenzbar darstellen zu können. Dies geschah ebenfalls bei Raumtemperatur und unter Schwenken. Dabei wurde die Lösung mehrfach gewechselt.

3.7.3 Immunoblot

Der Immunoblot ist eine sensitive Methode zur Detektion von Proteinen. Grundlage dieses Nachweisverfahrens ist die spezifische Bindung eines Antikörpers an das interessierende Protein. Folglich werden nur die Proteine sichtbar gemacht, die ein Epitop exprimieren, das der verwendete Antikörper erkennt. Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine werden per Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran überführt. Dieser ist senkrecht zur Laufrichtung des Gels ausgerichtet. Durch hydrophobe Wechselwirkungen bleiben die Proteine auf der Membran haften. Anschließend kann die Membran mit den Antikörpern inkubiert werden. Die Proteine werden durch eine Chemilumineszenzreaktion angefärbt. Hierfür ist entweder der Primär-Antikörper direkt oder ein Sekundär-Antikörper mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert. Die Enzymreaktion basiert auf der Oxidation von Luminol und wird abschließend durch CCD-Kameras sichtbar gemacht.

Der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran erfolgte mit Hilfe des Semidry-Systems. Hierbei wurden das Gel und die Membran aufeinander gelegt und sowohl von oben als auch von unten von jeweils zwei Lagen Blotting-Papier umgeben. Dabei wurden zwei Lagen Blotting-Papier in Semidry-Puffer (P18) getränkt und auf die Anodenplatte des Elektroblo-Geräts platziert. Es folgte die ebenfalls mit Semidry-Puffer (P18) befeuchtete Nitrocellulose-Membran. Nach Äquilibration des Acrylamidgels im Semidry-Puffer (P18) für fünf Minuten wurde es vorsichtig unter Vermeidung von Blasenbildung auf die Membran gelegt. Es folgten zwei weitere Lagen feuchtes Blotting-Papier. Die Kammer wurde geschlossen und der Elektrotransfer gestartet. Der Elektrotransfer erfolgte für eine Stunde

bei $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$. Nach abgeschlossenem Proteintransfer wurde die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur in Magermilchpuffer (P11) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper wurde in der gewünschten Konzentration in Magermilchpuffer (P11) verdünnt, es folgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4°C auf der Schwenkplatte. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBS/Tween (P20) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Falls ein Antikörper verwendet wurde, der bereits mit Peroxidase konjugiert war, konnte direkt mit der Zugabe des Enzym-Substrats fortgefahren werden. Wurde allerdings ein unkonjugierter oder biotinylierter Antikörper benutzt, folgte ein weiterer Inkubationsschritt mit einem Sekundär-Antikörper. Dabei handelte es sich um ein Streptavidinperoxidase- bzw. Kaninchen-anti-Maus-Peroxidase-konjugierter IgG. Dieser wurde in Magermilchpuffer (P11) auf eine Konzentration von 1:2000 verdünnt und für 1-2 Stunden auf der Schwenkplatte inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe des Substrats, einer frisch angesetzten ECL-Entwicklerlösung. Für ungefähr zwei Minuten wurde diese Substratlösung auf die Membran gegeben. Zuletzt wurde die Lumineszenz computerunterstützt mit dem Immunoblot-Imager ChemiLux 2005 detektiert. Mit der Software QuantityOne erfolgte die densitometrische Auswertung.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung und Biotinylierung monoklonaler Antikörper mit Spezifität für FHR-3

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, monoklonale Antikörper gegen humanes FHR-3 herzustellen. Mit Hilfe dieser Antikörper sollte ein FHR-3-spezifischer ELISA etabliert werden, der eine Bestimmung der FHR-3-Konzentration in Probanden-Seren ermöglicht.

4.1.1 Immunisierung

Durch intraperitoneale Immunisierung einer BALB/c-Maus mit rekombinant hergestelltem FHR-3 unter Zusatz eines Adjuvans wurde diese dazu angeregt, Antikörper produzierende B-Lymphoblasten mit Spezifität für dieses Antigen zu generieren. Um den Erfolg der Immunisierung zu überprüfen, wurde der Maus zum Zeitpunkt der Fusion Blut abgenommen, welches anschließend mittels ELISA untersucht wurde.

Zunächst wurde überprüft, in welcher Konzentration FHR-3 als Antigen in die Mikrotiterplatte geschichtet werden muss, um ein Signal zu detektieren. Dazu wurde FHR-3 in Konzentrationen von 0,02 µg/ml bis 6 µg/ml eingesetzt. Als Probe diente Fusionsmaus-Antiserum (1:500), welches durch einen Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper (1:1000) nachgewiesen wurde. Der Versuch ergab, dass FHR-3 in einer Konzentration von 1 µg/ml ein optimales Signal ergab. Daraufhin wurde diese FHR-3-Konzentration für die folgenden ELISA-Verfahren übernommen.

Anschließend wurde zur Überprüfung des Immunisierungserfolges ein ELISA durchgeführt, der die FHR-3-Reaktivität des Fusionsmausantiseraums mit normalem Mausserum vergleicht. Die Seren wurden in Verdünnungen von 1:500 bis zu 1:128.000 in die FHR-3 (1 µg/ml) beschichteten Näpfe einer ELISA-Platte pipettiert. Die Detektion erfolgte erneut mit einem Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

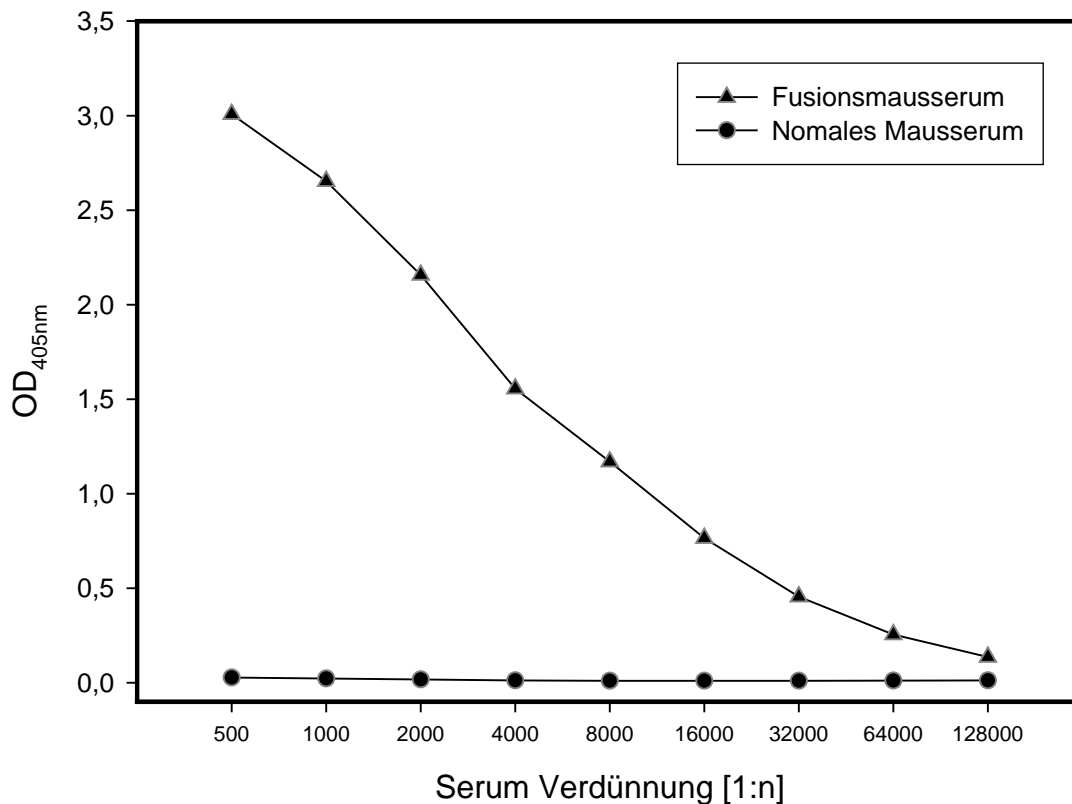


Abb. 4.1 Austestung des Fusionsmaus-Serum. Serum einer mit FHR-3 immunisierten Maus zum Zeitpunkt der Fusion sowie einer Kontrollmaus wurden in 1:2-Schritten verdünnt und ihre FHR-3-Reaktivität mittels ELISA dokumentiert.

Die Abbildung zeigt, dass in dem Serum der immunisierten Maus bis zu einer Verdünnung von 1:128.000 Antikörper gegen das Immunisierungspeptid detektierbar waren, wohingegen das normale Mausserum keine Reaktivität gegen FHR-3 aufwies. Somit war die Immunisierung der Maus erfolgreich verlaufen.

4.1.2 Zellfusion und Austestung der Hybridom-Überstände

Milz-Lymphozyten, die Immunglobuline produzieren, sind in der Zellkultur nicht dauerhaft überlebensfähig. Aus diesem Grund wurden sie mit der Myelomzelllinie Ag8.653 fusioniert, wodurch unlimitiert teilungsfähige Hybridomzellen entstanden, die zugleich die gewünschte Fähigkeit zur Ig-Synthese aufwiesen.

Zwei Wochen nach der Zellfusion, als die ersten mit bloßem Auge erkennbaren Zellklone entstanden waren, wurden mittels ELISA diejenigen Näpfe identifiziert, die anti-FHR-3-Ig produzierende Hybridomzellen enthielten. Dazu wurden Mikrotiter-Platten mit FHR-3 in einer

Konzentration von 1 µg/ml beschichtet und je 100 µl eines Hybridoma-Kulturüberstandes in jeden Napf gegeben. Zur Detektion eines positiven Signals diente ein Peroxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-Ig-Antikörper. Fusions-Maus-Serum (1:1000) diente als Positivkontrolle (Näpfe A1-B1) und Zellkulturmedium als Negativkontrolle (Näpfe C1-H1).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------------|-------|-------|--------------|-------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|--------------|
| A | 3,405 | 0,089 | 0,130 | 0,179 | 0,086 | 0,233 | 0,138 | 0,095 | 0,501 | 0,139 | 0,123 | 0,115 |
| B | 3,391 | 0,267 | 0,099 | 0,177 | 0,085 | 0,130 | 0,251 | 0,115 | 0,875 | 0,096 | 0,476 | 0,091 |
| C | 0,078 | 0,098 | 0,117 | 0,111 | 0,079 | 0,083 | 0,132 | 0,103 | 0,096 | 0,090 | 0,085 | 0,116 |
| D | 0,076 | 0,091 | 0,087 | 0,769 | 0,109 | 0,097 | 0,093 | 0,253 | 0,083 | 0,083 | 1,922 | 0,147 |
| E | 0,076 | 0,094 | 0,102 | 0,102 | 0,177 | 0,239 | 0,148 | 0,169 | 0,138 | 0,258 | 0,137 | 0,796 |
| F | 0,076 | 0,118 | 0,212 | 0,162 | 0,087 | 0,084 | 0,089 | 0,131 | 0,082 | 0,087 | 0,135 | 0,094 |
| G | 0,076 | 0,110 | 0,082 | 0,090 | 0,122 | 0,084 | 0,170 | 0,103 | 0,090 | 0,091 | 0,227 | 0,214 |
| H | 0,076 | 0,083 | 0,084 | 0,298 | 0,085 | 0,087 | 0,666 | 0,087 | 0,085 | 0,085 | 0,122 | 0,467 |

Tab. 4.1 Identifikation anti-FHR-3-Ig-produzierender Hybridomzellen. 100µl Hybridomüberstand wurden auf eine mit FHR-3 (1 µg/ml) beschichtete ELISA-Platte pipettiert und diejenigen Hybridomklone identifiziert, die ein positives Signal (fett) erbrachten.

Tabelle 4.1 zeigt das Ergebnis einer Auswertung in exemplarischer Weise. Die Überstände aus 2300 Näpfen wurden getestet. Dabei wurden insgesamt 66 Hybridoma-Klone mit positiver FHR-3-Reaktivität identifiziert und mit eindeutiger Bezeichnung versehen (z.B. Klon 3D11 ist der Hybridomklon an Position D11 der dritten ausgetesteten Platte).

Um diese 66 Antikörper näher zu charakterisieren, wurden sie im nächsten Schritt auf ihre Reaktivität mit Faktor H und FHR-3 getestet. Faktor H wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml, FHR-3 in einer Konzentration von 1 µg/ml an die ELISA-Platten gebunden. Sowohl die Kontrollen als auch der Nachweis-Antikörper waren identisch zum oben beschriebenen Versuchsaufbau. 19 der insgesamt 66 Kulturüberstände zeigten spezifische Reaktivität mit FHR-3, nicht aber gegen Faktor H. Weitere 14 Klone ergaben sowohl mit FHR-3 als auch mit Faktor H ein positives Signal. Die übrigen 33 Hybridoma reagierten unspezifisch mit der Mikrotiterplatte und wurden von der weiteren Aufarbeitung ausgeschlossen.

Damit konnten im Rahmen eines ersten Screening-Verfahrens 33 Hybridomklone nachgewiesen werden, die ein positives und spezifisches Signal mit FHR-3 im ELISA erzielten und zumindest partiell zugleich mit Faktor H reagierten.

4.1.3 Sub-Klonierung

Um die Monoklonalität der Antikörper herstellenden Hybridoma-Zellen sicherzustellen, wurden sie mindestens zweimal subkloniert. Dazu wurden die Hybridome in unterschiedlichen Verdünnungen auf einer 96-Loch-Mikrotiter-Platte ausgesät.

4.1.4 Isotyp-Bestimmung der Antikörper

Im Rahmen der Charakterisierung der unterschiedlichen Hybridomklone wurden alle 33 Zelllinien auf die Subklassen der von ihnen produzierten Antikörper untersucht. Dabei wurde ein kommerzielles ELISA-System verwendet. Mit Ausnahme der Klone 23D5 (IgG2a) und 21A9 (IgG2b) wiesen alle anderen Hybridome den Ig-Isotypen IgG1 auf. Die leichte Kette war durchgängig von Typ kappa.

4.1.5 Massenproduktion in der MiniPerm-Anlage

Die geeigneten Klone wurden zur Herstellung von Antikörpern in großen Mengen in eine MiniPerm-Anlage überführt. Sobald die einzelnen Klone eine Zellzahl von mindestens 4×10^7 Zellen erreicht hatten, wurden die Hybridome in das Produktionsmodul der MiniPerm Anlage überführt, aus denen in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von mehreren Wochen konditioniertes Medium abgezogen werden konnte.

Insgesamt wurden 10 der 33 Hybridomklone für die Massenproduktion in der MiniPerm-Anlage ausgewählt. Die Ausbeute ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

| Klonname | Isotyp | Volumen (ml) | Ig, Konzentration (mg/ml) | Ig, Ausbeute (mg) |
|----------|--------|--------------|---------------------------|-------------------|
| 3D11 | IgG1 | 335 | 0,5 | 167 |
| 4H9 | IgG1 | 241 | 1,3 | 313 |
| 6E3 | IgG1 | 564 | 0,6 | 339 |
| 12B3 | IgG1 | 67 | 1,1 | 74 |
| 18A7 | IgG1 | 37 | 1,3 | 48,1 |
| 18H8 | IgG1 | 37 | 0,5 | 18,5 |
| 19E9 | IgG1 | 502 | 1,6 | 803 |
| 23D5 | IgG2a | 35 | 1,5 | 52,5 |
| 24D4 | IgG1 | 467 | 0,7 | 327 |
| 24E2 | IgG1 | 167 | 0,1 | 16,7 |

Tab. 4.2 Immunglobulin-Produktion (Ausbeute in mg) mittels MiniPerm-Anlage sowie Isotyp-Bestimmung der anti-FHR-3-Antikörper

Die Tabelle zeigt, dass sich die verschiedenen Zellklone in Hinblick auf ihre Wachstumsrate (Volumen) und ihre Antikörper-Synthese (Ig-Konzentration) unterschiedlich gut für die Massenproduktion mittels MiniPerm-Anlage eignen. Der Klon 24E2 wurde aufgrund seiner geringen Antikörper-Produktion in den weiteren Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

4.1.6 Aufreinigung der monoklonalen Antikörper mittels Protein-G-Affinitätschromatographie

Sämtliche 10 in großen Mengen hergestellten Antikörper wurden mittels Affinitätschromatographie an Protein-G-Sepharose aufgereinigt. Im Nachfolgenden wird der Ablauf exemplarisch am Beispiel des Antikörpers 3D11 erläutert.

Vor der Durchführung einer Aufreinigung mittels Protein-G-Affinitätschromatographie wurde die Konzentration des Antikörpers in dem jeweiligen Kulturüberstand mit Hilfe eines Ig-ELISA ermittelt, um eine optimale Beladung der Säule, welche eine maximale Bindungs-Kapazität von ca. 25 mg Ig aufweist, zu gewährleisten.

Monoklonale Antikörper des Klons 3D11 wurden mit einer Ausgangsmenge von 116 mg in 5 Läufen mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Während des Probenauftrags, des Waschens und der Elution mittels pH-Absenkung wurden pro Lauf jeweils 12 Fraktionen gesammelt. In den ersten 7 Röhren (Probenauftrag und Waschfraktion) wurden Fraktionen zu je 10 ml, in den letzten 5 Röhren (Eluatfraktionen) nur jeweils 2 ml gesammelt, da in diesen letzteren Fraktionen die Antikörper von der Säule eluiert wurden. Die Extinktionsmessung der gewonnenen Fraktionen erfolgte photometrisch

(OD_{280nm}) gegen Elutionspuffer. Zugleich erfolgte die Messung des pH-Wertes. Das Ergebnis eines Säulenlaufs ist in der Abbildung 4.2 exemplarisch dargestellt.

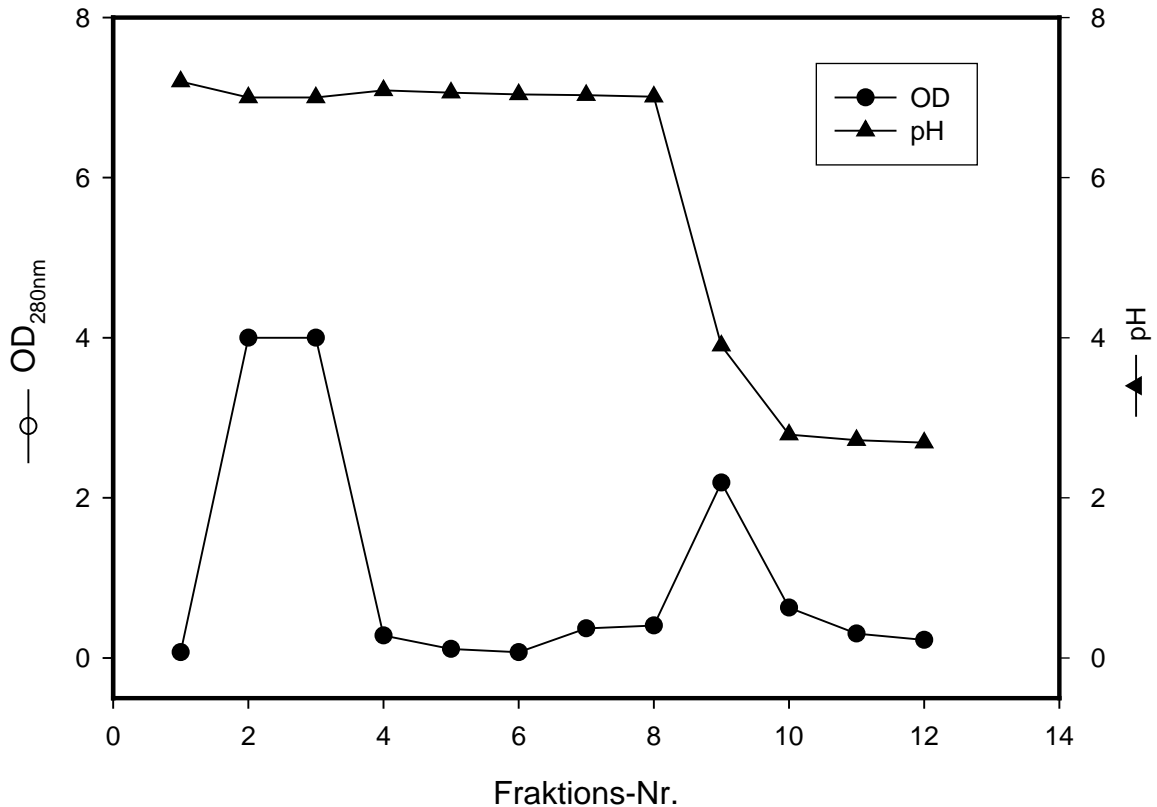


Abb. 4.2 Antikörper-Aufreinigung des Klons 3D11 an Protein-G-Sepharose. OD und pH-Wert der während eines Säulenlaufs der Protein-G-Affinitätschromatographie-Aufreinigung gesammelten Fraktionen wurden bestimmt.

Die anfänglich hohen Extinktionswerte (Fraktion Nr. 2 und 3) sind auf Proteine zurückzuführen, die nicht an das Säulenmaterial binden. Nach dem Waschen (Fraktionen Nr. 4 bis 8) stiegen die Extinktionswerte im weiteren Verlauf erneut an (Fraktion Nr. 9), sobald Antikörper im Eluat aufgefangen wurden. Dieser Anstieg in der Proteinkonzentration in der Probe korrespondierte mit einem Abfall des pH-Wertes nach Zugabe des Elutionspuffers (pH 3,2) in den Fraktionen 9-12.

Die Überprüfung der Reinheit der aufgereinigten Immunglobuline erfolgte mittels SDS-PAGE. Es wurden Fraktionen ausgewählt, die einen hohen Protein-Gehalt aufwiesen. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung erfolgte die Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Blau (Abb. 4.3).

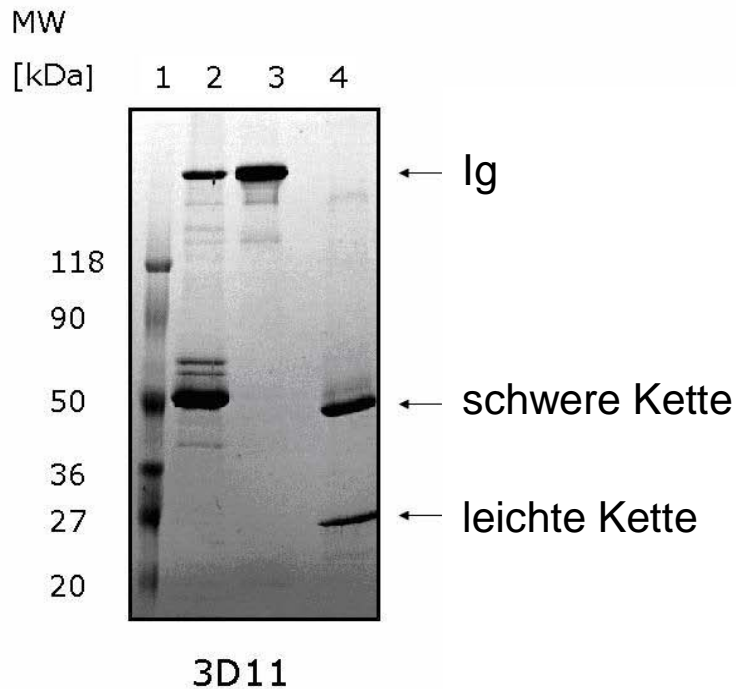


Abb. 4.3 Überprüfung des Erfolgs der Antikörper-Aufreinigung des Klons 3D11. Eine SDS-PAGE diente der Reinheitsüberprüfung. Aufgetragen wurden 5 μg des Antikörper-haltigen Zellkulturüberstands vor der Aufreinigung sowie jeweils 10 μg des aufgereinigten AK mit und ohne Mercaptoethanol. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. 1, Molekulargewichtsmarker; 2, AK vor Aufreinigung; 3, AK nach Aufreinigung; 4, AK nach Aufreinigung mit Mercaptoethanol.

Es zeigte sich eine Reinheit von durchgängig über 90% in den Ig-haltigen Eluatfraktionen. Fraktionen aus verschiedenen Säulenläufen mit demselben monoklonalen Antikörper wurden vereinigt und die resultierende Proteinkonzentration photometrisch erfasst. Differenzen zwischen den Ig-Mengen in Ausgangs- und Endmaterial sind teilweise durch unterschiedliche Ig-Bestimmungsmethoden begründet (Ig-ELISA vs. $\text{OD}_{280\text{nm}}$).

Die Aufreinigung aller gesammelten MiniPerm-Überstände war aus zeitlichen Gründen nicht möglich, für die Zwecke dieses Projektes aber auch nicht erforderlich. Nach Bestimmung der Ig-Konzentration mittels ELISA wurden sie bei -20°C eingefroren, so dass sie für eine spätere Verwendung zur Verfügung standen. Die Tabelle 4.3 zeigt die Gesamtausbeute der Antikörper-Aufreinigung.

| Klonname | Volumen(ml) | Ig in Überstand (mg/ml) | Ausbeute des Ausgangsmaterials (mg) | Gesamtausbeute aufgereinigter Antikörper (mg) |
|----------|-------------|-------------------------|-------------------------------------|---|
| 3D11 | 335 | 0,5 | 167 | 116 |
| 4H9 | 241 | 1,3 | 313 | 373 |
| 6E3 | 564 | 0,6 | 339 | 145 |
| 12B3 | 67 | 1,1 | 74 | 73 |
| 18A7 | 37 | 1,3 | 48,1 | 76 |
| 18 H8 | 37 | 0,5 | 18,5 | 15 |
| 19 E9 | 502 | 1,6 | 803 | 181 |
| 23D5 | 35 | 1,5 | 52,5 | 22 |
| 24D4 | 467 | 0,7 | 327 | 144 |

Tab. 4.3 Gesamtausbeute der mittels Protein-G-Affinitätschromatographie aufgereinigten Antikörper

4.1.7 Biotinylierung der aufgereinigten monoklonalen Antikörper

Eine Teilmenge aller 9 hergestellten Antikörper wurde im Anschluss an die Aufreinigung biotinyliert. Somit sollten alle Antikörper sowohl als unkonjugierte Fangantikörper als auch als biotinylierte Nachweisantikörper für einen später zu etablierenden ELISA zur Verfügung stehen.

Die Biotinylierung der Antikörper erfolgte nach dem im Kapitel 3.4 beschriebenen Verfahren. Pro Antikörper wurden insgesamt 3 mg biotinyliert. Dazu wurde der Antikörper (1 mg/ml) über Nacht bei 4-maligen Pufferwechsel gegen Kopplungspuffer dialysiert. Danach wurde Biotin X-NHS (1 mg/ml DMF) zugesetzt. Es wurden drei Kopplungsansätze angesetzt, wobei Antikörper und Biotin jeweils in einem molaren Verhältnis von 1:5, 1:15 und 1:50 vorlagen.

Der Erfolg der Biotinylierung wurde mittels ELISA-Verfahren geprüft. Dazu wurde FHR-3 (Konzentration 1 µg/ml) an die Platte gebunden und der biotinylierte Nachweis-Antikörper sowohl in verschiedenen Biotin:Ig Relationen (5:1 bis 50:1) als auch in Ig-Konzentrationen von 0,089 µg/ml bis zu 10 µg/ml in die Näpfe pipettiert. Die Detektion erfolgte einerseits mit Streptavidin-Peroxidase (1:4000) und andererseits mit Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-IgG (1:1000).

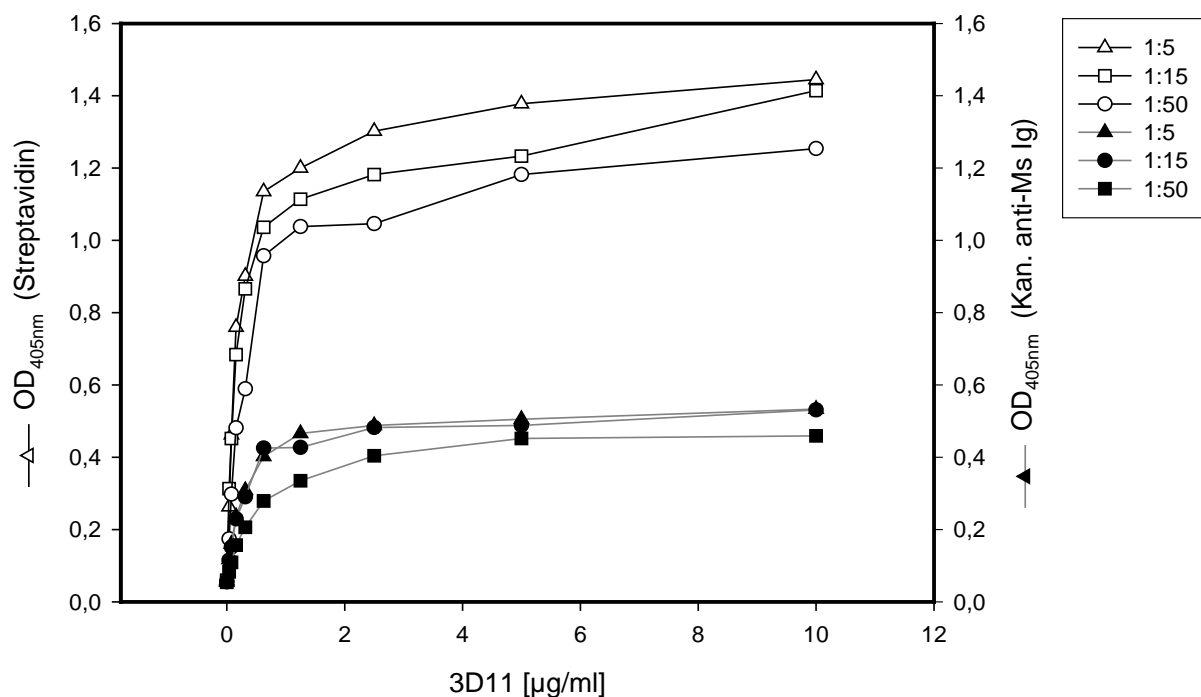


Abb. 4.4 Biotinylierungserfolg des Antikörpers 3D11. Die mit verschiedenen Biotin:Ig-Relationen (5:1 bis 50:1) konjugierten Präparate des 3D11-Antikörpers wurden in Konzentrationen von 0,089 µg/ml bis 10 µg/ml sowohl mit Streptavidin-Peroxidase (SAVP) als auch mit Kaninchen-anti-Maus-Ig überprüft.

Die Abbildung 4.4 stellt den Biotinylierungserfolg des Antikörpers 3D11 dar. Die Extinktionswerte unterscheiden sich in Abhängigkeit der Menge an zugesetztem Biotin. Die höchsten Signale wurden bei der Verwendung eines mit 5-fachem molarem Überschuss biotinylierten Antikörpers gesehen, gefolgt von der 15:1- und schließlich der 50:1-Relation. Somit verlief die Biotinylierung erfolgreich. Der Antikörper 3D11 kann als biotinylierter Nachweis-Antikörper eingesetzt werden.

Beim Einsatz von Streptavidin-Peroxidase als Nachweiskonjugat wurden im Vergleich zum Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper deutlich höhere Signale erzielt. Dieses Ergebnis ist in der sehr hohen Affinität von Biotin zu Streptavidin begründet. Die Bindung von Biotin an Streptavidin ist eine der stärksten und zugleich spezifischsten nicht kovalenten Bindungen und wird häufig als Nachweisverfahren genutzt. Das Streptavidin-Molekül ist aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut und in der Lage, mehrfach an Biotin zu binden. Bei der Detektion mit dem Peroxidase-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper entsteht dagegen ein niedrigeres Signal, weil i.d.R. jeweils nur ein Ig-anti-Ig-Komplex in zudem niedrigerer Affinität gebildet wird.

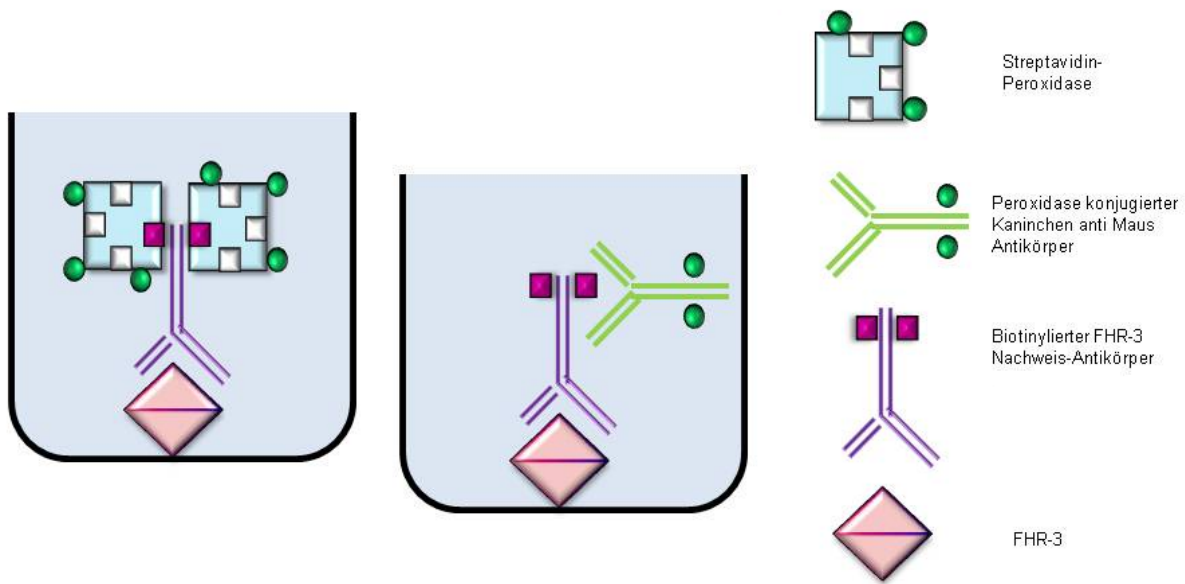


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der Überprüfung des Biotinylierungserfolges des Antikörpers 3D11 mit Hilfe zweier verschiedener Nachweis-Verfahren. Streptavidin-Peroxidase bindet mehrfach an den biotinylierten Nachweis-Antikörper, wodurch ein hohes Signal erzielt wird. Der Peroxidase-konjugierte Kaninchen-anti-Maus-Antikörper dagegen bindet nur ein Epitop und detektiert damit jeweils nur einen Ig-anti-Ig-Komplex, es resultiert ein schwächeres Signal.

Die Biotinylierung der neun anderen Antikörper verlief nach dem gleichen Prinzip und ebenso erfolgreich. Für die weiteren Experimente wurden Antikörperkonjugate eingesetzt, die i.d.R. durch einen 15-fachen Überschuss an Biotin:Ig biotinyliert worden waren.

4.2 Einteilung der hergestellten monoklonalen Antikörper anhand ihrer Epitopspezifität

Die Spezifität der hergestellten monoklonalen Antikörper wurde mit Hilfe von ELISA und Western Blot eingehend untersucht.

4.2.1 Analyse der SCR-Kartierung der Klone

Vor der Massenproduktion der Hybridom-Klone wurden alle 33 FHR-3-spezifischen monoklonalen Antikörper, die ursprünglich identifiziert worden waren, in Hinblick auf ihre Epitop-Spezifität (SCR-Kartierung) untersucht. Diese Aufgabe übernahm freundlicherweise eine mit uns kooperierende Arbeitsgruppe (AG Prof. Zipfel) in Jena. Sie erprobten die Reaktivität der Antikörper-haltigen Hybridomüberstände in ihrer zunächst noch nicht

aufgereinigten Form sowohl im ELISA als auch im Immunoblot mit rekombinant exprimierten SCR-Domänen von FHR-3. Es ergab sich eine Einteilung der Antikörper in zwei unterschiedliche Gruppen: Während die eine Gruppe ihr Epitop auf den FHR-3 SCR-Domänen 1-3 erkennen, reagieren die anderen mit Epitopen auf den SCR-Domänen 4-5. Diese vorläufige SCR-Kartierung wurde nach der Produktion der Antikörper in aufgereinigter Form wiederholt. Die Ergebnisse konnten bestätigt werden.

4.2.2 Analyse der Epitop-Spezifität mittels ELISA

Durch die Massenproduktion und Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für FHR-3 (s. Kapitel 3.1) konnten mehrere FHR-3-spezifische Antikörper in ausreichenden Mengen gewonnen werden. Jeder einzelne Antikörper wurde aufgereinigt und biotinyliert, so dass er sowohl als Fang- als auch als Nachweis-Antikörper eingesetzt werden konnte und hinsichtlich seines zu erkennenden Epitops analysiert werden konnte.

4.2.2.1 Sandwich-ELISA durch Kombination von FH- und FHR-3-spezifischen Antikörpern

In der Arbeitsgruppe standen bereits gut charakterisierte monoklonale Antikörper mit Spezifität für FH zur Verfügung, von denen einige mit Epitopen auf SCR-Domänen reagieren, welche zwischen FH und FHR-3 hoch konserviert sind. Die SCR-Kartierung der benutzten AK ist im Kapitel 2.6 dargestellt. Daher wurden die neu hergestellten FHR-3-spezifischen Antikörper in Kombination mit den FH-spezifischen Antikörpern jeweils als Fang- bzw. als biotinylierte Nachweisantikörper auf ihre Eignung zum Nachweis von FHR-3 bzw. FH im Serum ausgetestet. Um zwischen FH- und FHR-3 Reaktivität unterscheiden zu können, wurde zusätzlich sowohl normales als auch FHR-3-defizientes (aber FH-suffizientes) Serum eingesetzt. Der Aufbau des Versuches ist tabellarisch dargestellt:

| Versuchsnummer | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|
| Fang-Antikörper | anti-FH-AK | anti-FH-AK | anti-FHR-3-AK | anti-FHR-3-AK |
| Antigen | Serum | FHR-3 def. Serum | Serum | FHR-3 def. Serum |
| Nachweis-Antikörper | anti-FHR-3-AK | anti-FHR-3-AK | anti-FH-AK | anti-FH-AK |

Tab. 4.4 Versuchsaufbau zur Untersuchung der generierten Antikörper hinsichtlich ihrer Eignung als Fang- und Nachweis-Antikörper zum Nachweis von FHR-3 bzw. FH im Serum.

Die Anti-Faktor-H-Antikörper wurden als *Coating*-Antikörper in einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ und als Nachweis-Antikörper in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die FHR-3-Antikörper wurden in Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ als *Coating*-Antikörper und 1 $\mu\text{g/ml}$ als Nachweis-Antikörper verwendet. Sowohl Humanserum als auch das FHR-3-defiziente Serum wurden in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt. Die Versuche 1 und 2 dienten der Überprüfung der FHR-3-spezifischen AK hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit als Nachweis-Antikörper zur Detektion von FHR-3 und FH. In den Versuchen 1 und 2 fingen die FH-spezifischen Antikörper Faktor-H sowohl aus Humanserum als auch aus FHR-3-defizientem Serum ein und präsentieren es den FHR-3-Nachweis-Antikörpern. Das Ergebnis ist aus den folgenden beiden Abbildungen (Abb. 4.6 und 4.7) ersichtlich.

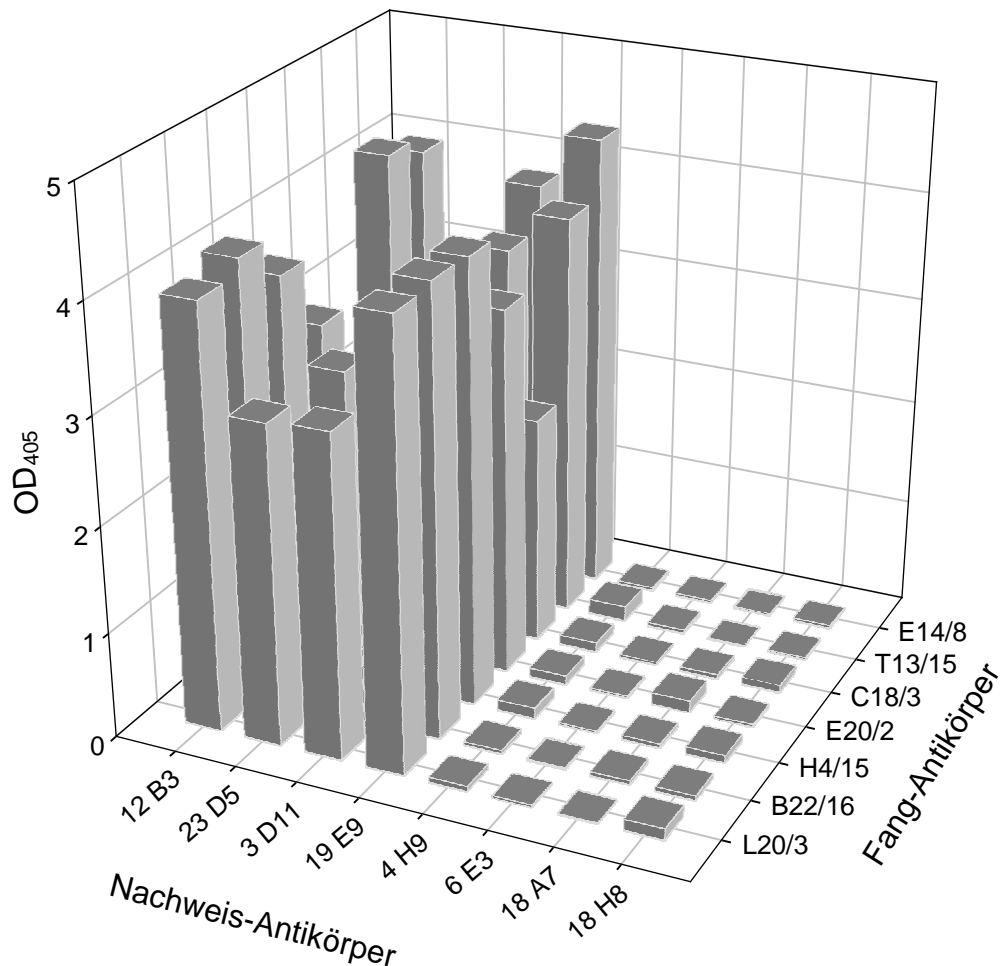


Abb. 4.6 Reaktivität der mAK mit Serum. Die FHR-3-spezifischen AK (unten links) wurden hinsichtlich ihrer Qualitäten als Nachweis-Antikörper zur Detektion von FHR-3 und FH in Serum (1:50) untersucht. Die ELISA-Platten wurden mit FH-spezifischen Fang-Antikörpern (unten rechts) beschichtet. Die Höhe der Säulen entspricht der jeweiligen OD_{405nm}.

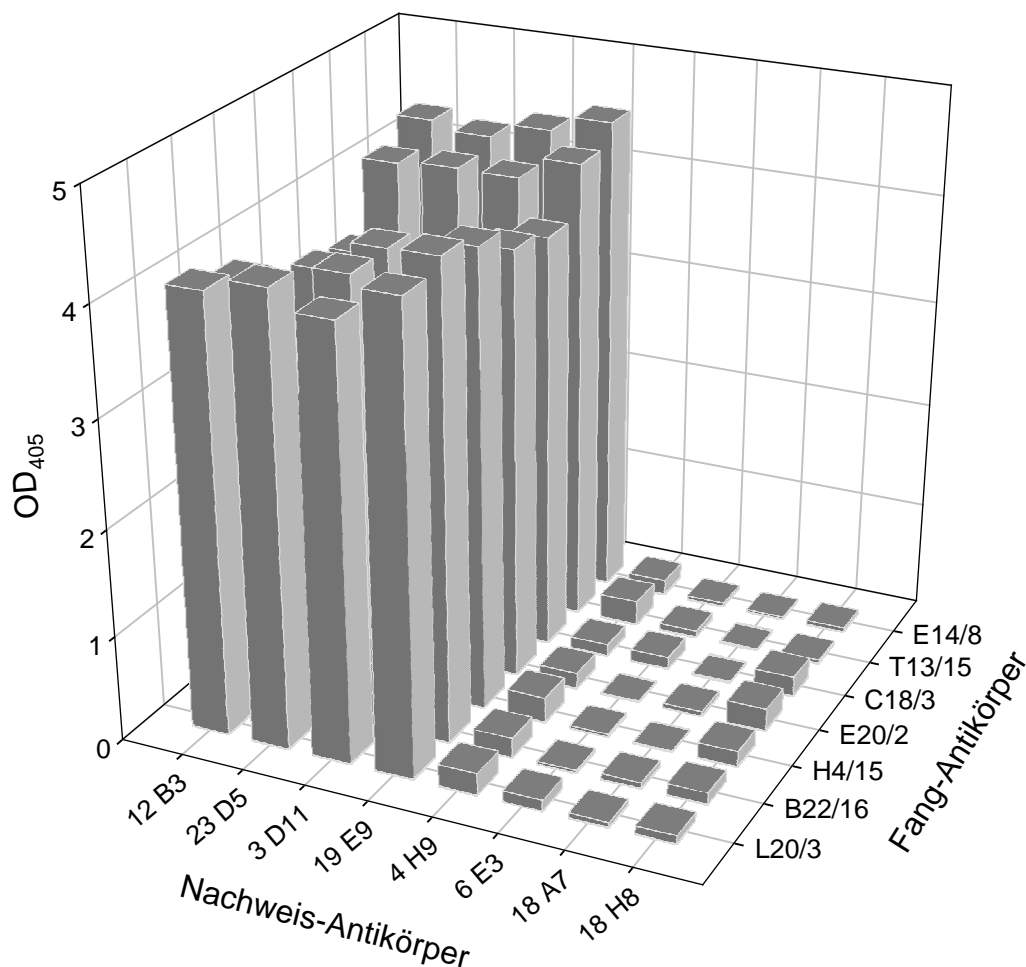


Abb. 4.7 **Reaktivität der mAK mit FHR-3-defizientem Serum.** Die FHR-3-spezifischen AK (unten links) wurden hinsichtlich ihrer Qualitäten als Nachweis-AK zur Detektion von FHR-3 und FH in FHR-3-defizientem Serum (1:50) untersucht. An die ELISA-Platten wurden zuvor FH-spezifische Fangantikörper (unten rechts) geheftet. Die Höhe der Säulen entspricht der jeweiligen OD_{405nm} .

Die beiden Testansätze decken AK-Kombination auf, die bei Verwendung beider Antigenquellen jeweils ein hohes Signal ergaben, sowie AK-Kombinationen, die gar kein Signal erzielten. Kombinationen unter Verwendung von SCR 4-5 spezifischen FHR-3-AK als Nachweis-Antikörper, erbrachten weder mit normalem Serum noch mit FHR-3-defizientem Serum eine positive Reaktion. Dementsprechend eignen sie sich nicht für den Nachweis von FH oder FHR-3, sofern sie mit einem FH-spezifischen AK als Fangantikörper kombiniert werden.

Hingegen reagierten die FHR-3-AK (SCR 1-3) bei Verwendung von Serum und FHR-3-defizientem Serum mit einem gleichermaßen hohen positiven Signal, welches auf die Bindung von Serum-FH zurückgeführt werden kann. Somit eignen sich diese FHR-3-AK bestens, in Kombination mit bereits verfügbaren FH-spezifischen Fangantikörpern, zur

Detektion von FH im Serum. Zur Identifikation von FHR-3 sind sie allerdings nicht in der Lage, sofern in der Probe zugleich FH vorhanden ist.

In den nachfolgenden Versuchen (s. Tab. 4.4 Versuch 3 und 4) wurde die mögliche Eignung der FHR-3-spezifischen AK als Fang-Antikörper zum Nachweis von FHR-3 und FH untersucht. Der Nachweis des Immunkomplexes erfolgte mittels FH-spezifischen AK, als Antigen diente wiederum Serum und FHR-3-defizientes Serum. Das Ergebnis ist in den Abbildungen 4.8 und 4.9 dargestellt.

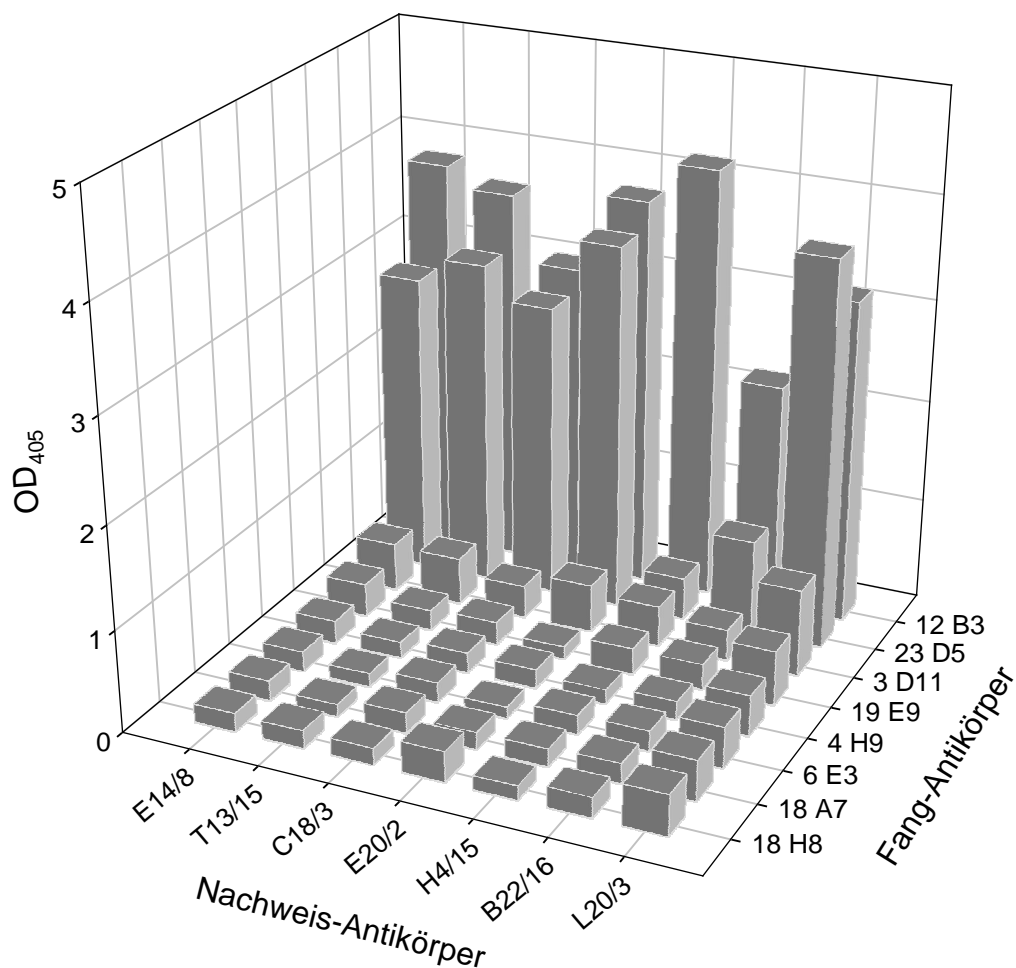


Abb. 4.8 Reaktivität der mAK mit Serum. Die FHR-3-spezifischen AK (unten rechts) wurden hinsichtlich ihrer Qualitäten als Fang-AK zum Nachweis von FHR-3 und FH in Serum (1:50) untersucht. Die Detektion des Immunkomplexes erfolgte mit FH-spezifischen Nachweisantikörper (unten links). Die Höhe der Säulen entspricht der jeweiligen OD_{405nm}.

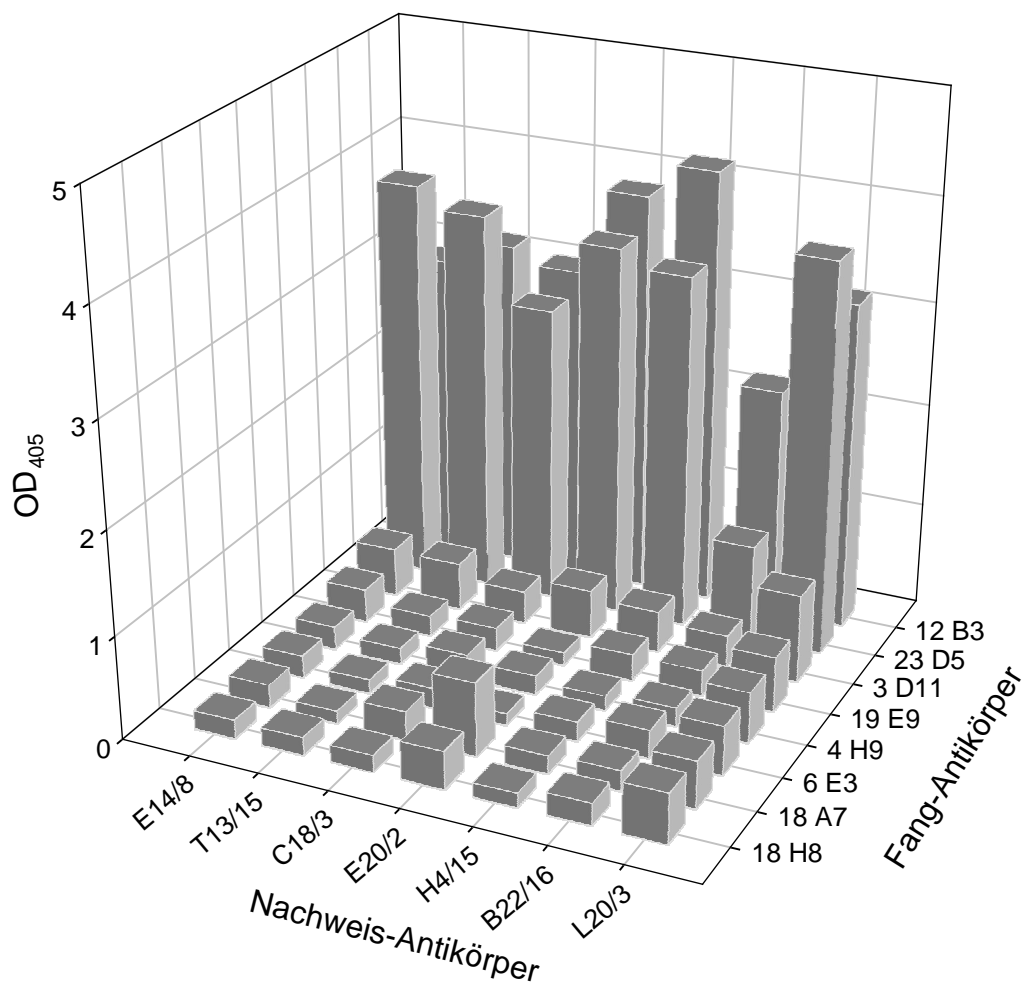


Abb. 4.9 Reaktivität der mAK mit FHR-3-defizientem Serum. Die FHR-3-spezifischen AK (unten rechts) wurden hinsichtlich ihrer Qualitäten als Fang-AK zur Detektion von FHR-3 und FH in FHR-3-defizientem Serum (1:50) untersucht. Der Nachweis des Immunkomplexes erfolgte mit FH-spezifischen Nachweisantikörpern (unten links). Die Höhe der Säulen entspricht der jeweiligen OD_{405nm} .

Aus den beiden Abbildungen geht hervor, dass die FHR-3 (SCR1-3) -AK im Vergleich zu den FHR-3 (4-5) -AK wesentlich höhere Signale in Kombination mit den FH-spezifischen AK erbrachten. Besonders die Fang-AK 12B3 und 23D5 erzielten bei Verwendung von Serum und FHR-3-defizientem Serum die höchsten Signale. Dieses Ergebnis spricht für eine hohe Affinität dieser Antikörper zu Faktor H. Damit sind sie in Kombination mit FH-AK zum Nachweis von FH, aber nicht zum Nachweis von FHR-3, geeignet. Die FHR-3-AK (SCR4-5) ergaben mit keinem der beiden Seren ein positives Signal. Folglich sind sie in Kombination mit FH-AK weder zur Detektion von FHR-3 noch von FH in Serum geeignet.

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Kombination aus jeweils einem FHR-3-spezifischen AK und einem FH-spezifischen AK aufgrund der hohen Homologie der einzelnen FH-

Familienmitglieder untereinander zur Quantifizierung von FH, jedoch nicht zur Quantifizierung von FHR-3, geeignet ist.

4.2.2.2 Sandwich-ELISA durch Kombination zweier FHR-3-spezifischer Antikörper

Insgesamt standen 9 FHR-3-spezifische Antikörper zur Verfügung, die sowohl als Fang- als auch als biotinylierte Nachweis-Antikörper eingesetzt wurden. Damit ergaben sich 81 mögliche Antikörper-Kombinationen aus zwei FHR-3-spezifischen Antikörpern. Für die Etablierung eines zur Quantifizierung von FHR-3 geeigneten ELISAs sollte die bestmögliche Antikörper-Kombination identifiziert werden. Dabei sollte sichergestellt sein, dass diese Kombination selektiv FHR-3, nicht jedoch andere Mitglieder der FH-Familie, in den Plasmen verschiedener Blutproben detektiert. Aufgrund der ausgeprägten Übereinstimmungen in der AS-Sequenz zwischen FHR-3 und anderen FH-Mitgliedern (s. Kapitel 1.2 „Die Faktor H-Familie“) wurde besonders auf die Spezifität der Antikörper für FHR-3 geachtet.

Um geeignete Antikörper zu identifizieren, wurden alle denkbaren Kombinationen der vorhandenen Antikörper im ELISA ausgetestet. Dabei wurden in einer Matrixanordnung alle neun Antikörper sowohl als Fang-(10 µg/ml) als auch als biotinylierte Nachweis-Antikörper (1 µg/ml) eingesetzt. Als Antigene fungierten FHR-3 in einer Konzentration von 50 ng/ml, Faktor H in einer Konzentration von 250 ng/ml und 1:50 verdünntes Humanserum. Als Leerwertkontrolle wurde PBS-Tween, als Positiv-Kontrolle ein Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:1000) verwendet. Dieser wurde mit einem Schwein-anti-Kaninchen Peroxidase-konjugiertem IgG 1:1000 verdünnt nachgewiesen. Der Nachweis der übrigen biotinylierten Antikörper erfolgte mittels Streptavidin-Peroxidase (1:2000). Der Versuch erfolgte nach dem im Kapitel 3.5 beschriebenen Schema. Das Ergebnis ist in Abb. 4.10 dargestellt.

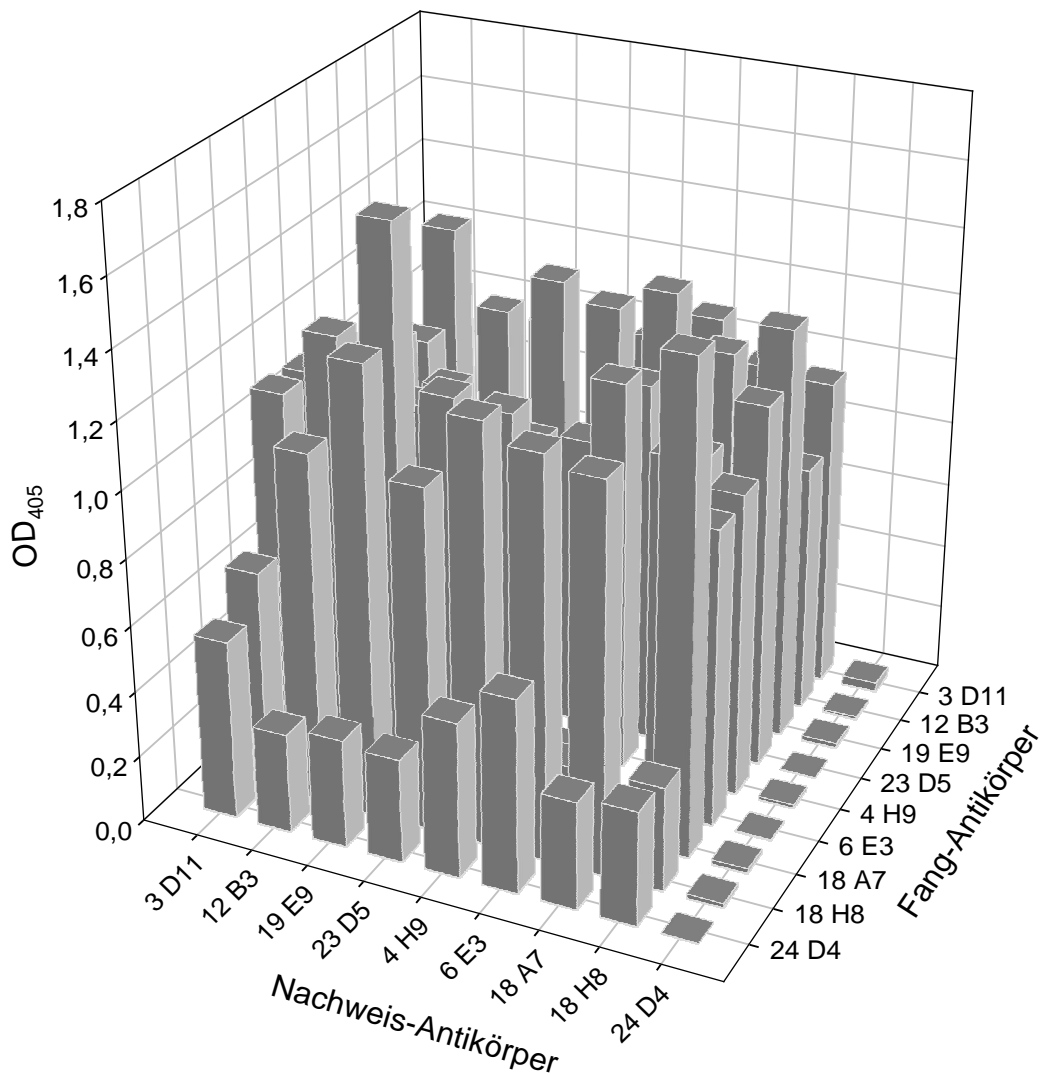


Abb. 4.10 Reaktivität der mAK mit FHR-3. Alle 81 möglichen Antikörper Kombinationen wurden auf ihre Reaktivität mit rekombinantem FHR-3 (50 ng/ml) als Antigen ausgetestet. Die Fang-Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml und die Nachweis-Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. 1:2000 verdünntes Streptavidin-Peroxidase diente zur Detektion eines positiven Signals. Die Höhe der Säulen entspricht jeweiligen der OD_{405nm}.

Aus dieser Darstellung ist ersichtlich, dass die hergestellten monoklonalen Antikörper bei Verwendung von rekombinantem FHR-3 als Antigen nahezu durchgängig hohe Signale erzielten. Lediglich der Antikörper 24D4 bildete eine Ausnahme: Wurde der Antikörper 24D4 als Nachweis-Antikörper eingesetzt, erbrachte die entsprechende Antikörper-Kombination keinen positiven Extinktionswert. Eingesetzt als Fang-Antikörper, reagierte 24D4 ebenfalls nur mit einem sehr schwachen Signal. Dementsprechend deckte dieser Versuch auf, dass der Antikörper 24D4 keine ausreichende Affinität zu FHR-3 besitzt.

Kombinationen, bei denen sowohl der Fang- als auch der Nachweis-Antikörper von dem gleichen Antikörper gestellt wurde, somit das identische Epitop besetzt wurde, ergaben

ebenfalls kein Signal. Folglich ist jedes Epitop, das von einem der eingesetzten Antikörper detektiert wird, auf dem FHR-3-Molekül nur einmal vorhanden. Eine Ausnahme bildete der Antikörper 3D11. Wurde 3D11 als Fang- wie auch als Nachweis-Antikörper eingesetzt, resultierte ein positives Signal. Dementsprechend blockieren sich in diesem Fall Fang- und Nachweis-Antikörper nicht gegenseitig. Dies lies die Vermutung zu, dass das Epitop, welches von dem Antikörper 3D11 erkannt wird, mehrfach auf FHR-3 vorhanden sein könnte.

Ferner verdeutlichten die hohen Signale aller anderen Antikörper-Kombinationen, dass sich die entsprechenden Kombinationen zur Detektion von FHR-3 prinzipiell eignen, da sie offenbar jeweils unterschiedliche Epitope auf FHR-3 erkennen.

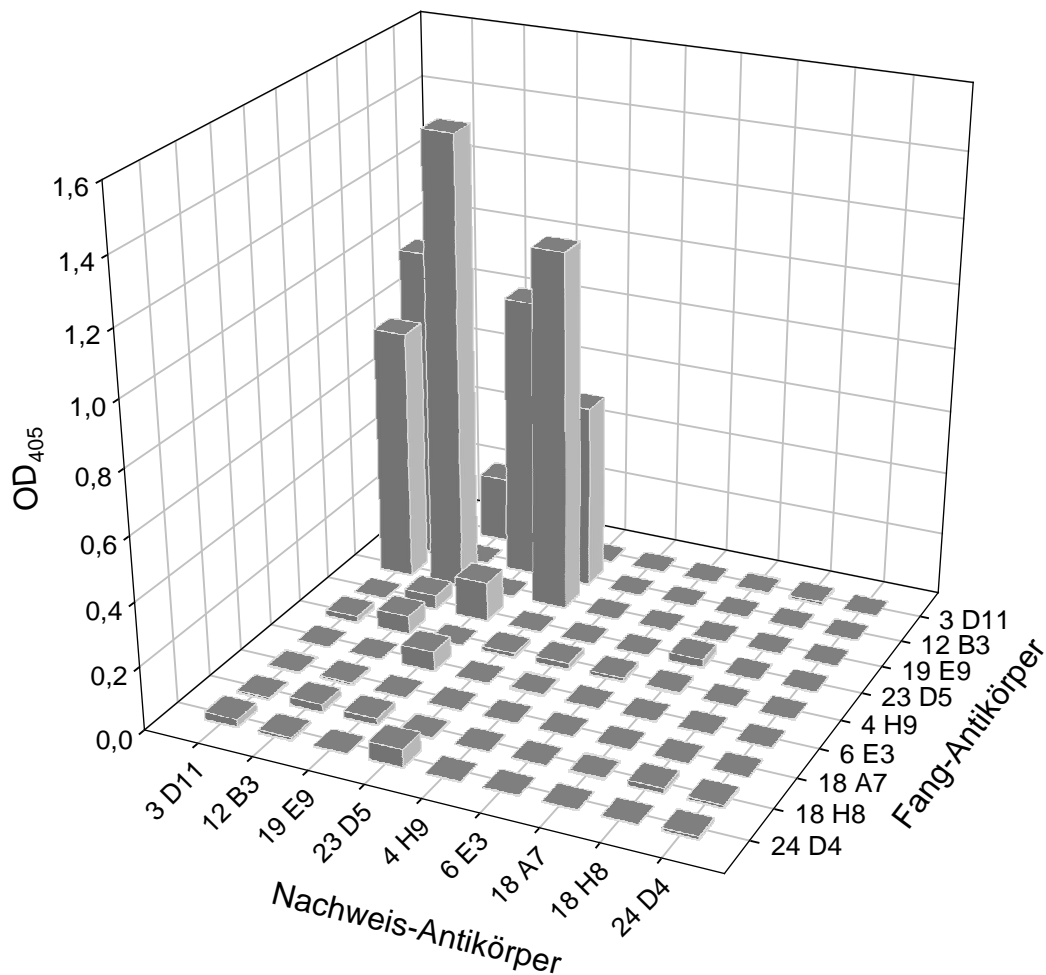


Abb. 4.11 Reaktivität der mAK mit Faktor H. Alle 81 möglichen Antikörper Kombinationen wurden in Hinblick auf Ihre Reaktivität mit dem Antigen Faktor H (250 µg/ml) untersucht. Die Fang-Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml und die Nachweis-Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. 1:2000 verdünntes SAVP diente zur Detektion eines positiven Signals. Die Höhe der Säulen entspricht der jeweiligen OD_{405nm} .

Aufgrund der Gemeinsamkeiten in der Primärstruktur zwischen Faktor H und FHR-3 wurde ein weiterer ELISA durchgeführt, um die Reaktivität der hergestellten monoklonalen Antikörper mit aufgereinigtem Faktor H zu analysieren. Faktor H ist darüber hinaus das Mitglied aus der erweiterten FH-Familie, welches in Serum in der mit Abstand höchsten Konzentration vorhanden ist. Hierbei zeigte sich, dass nur vier der neun Antikörper FH erkennen. Dieses Testergebnis deckte sich mit der zuvor vorgenommenen Einteilung der Antikörper anhand der SCR-Kartierung in zwei unterschiedliche Gruppen (s.o.). Mit Hilfe der SCR-Kartierung konnten diesen vier Antikörpern (3D11, 12B3, 19E9, 23D5) Epitope auf den SCR-Domänen 1-3 zugeordnet werden. Die anderen fünf Antikörper (4H9, 6E3, 18A7, 18H8, 24D4), deren Epitope auf den SCR-Domänen 4-5 liegen, reagieren hingegen nicht mit Faktor H. Diese Beobachtung deckt sich mit den unterschiedlichen Homologie-Raten zwischen den SCR-Domänen von Faktor H und FHR-3 (s. Einleitung). Die SCR-Regionen 1-3 von FHR-3 ähneln den SCR-Regionen 6-8 von Faktor H zu 63% bis 94%. Dementsprechend sind die Antikörper, deren Epitop in diesem Bereich liegt, ebenfalls in der Lage FH zu detektieren. Hingegen besteht zwischen den SCR-Domänen 4-5 von FHR-3 und den Faktor-H-Domänen 19-20 lediglich eine Homologie von 36% bis 62%, so dass sie nicht mit Faktor H reagieren. Aus den vorliegenden Ergebnissen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass fünf der hergestellten Antikörper spezifisch FHR-3 erkennen und nicht mit FH kreuzreagieren.

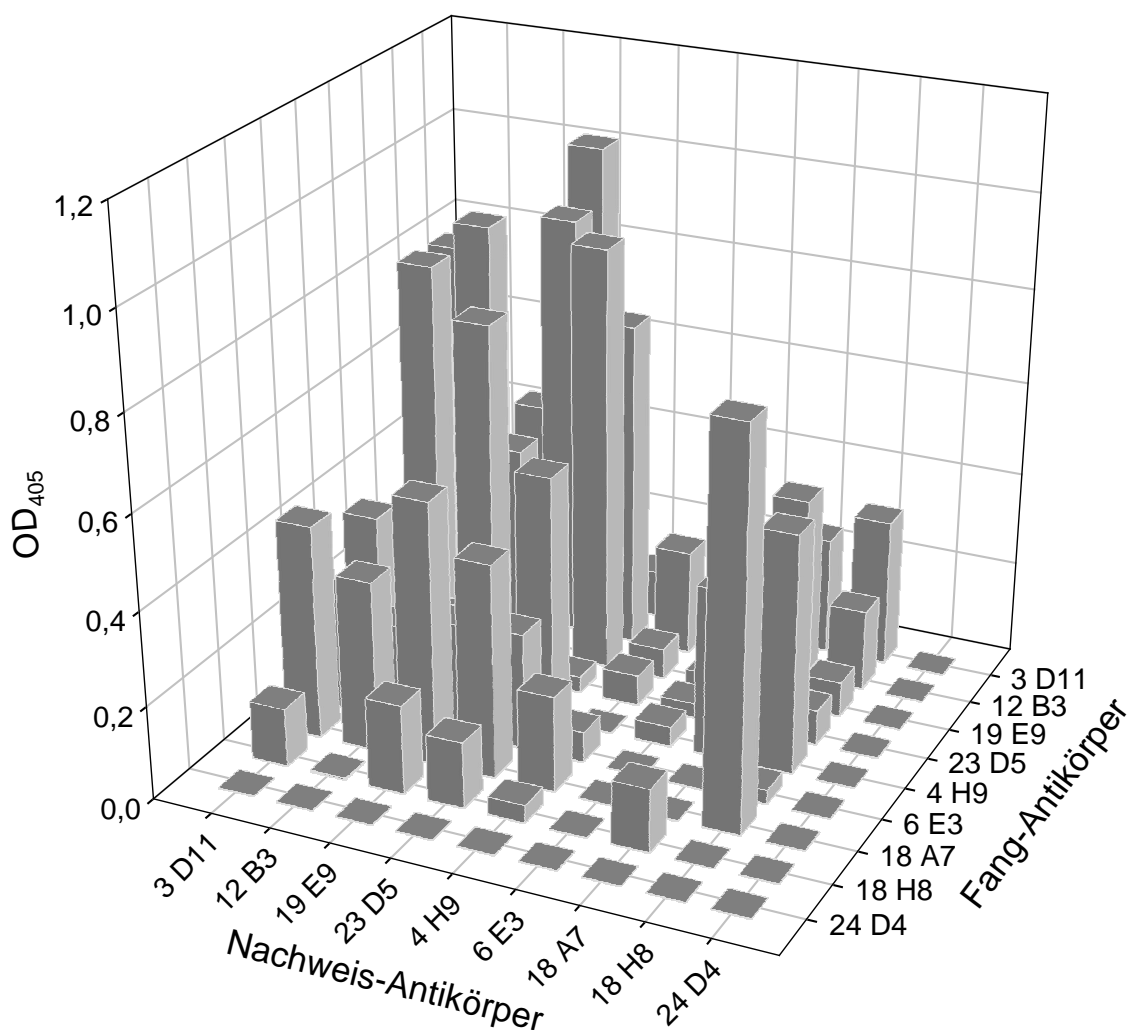


Abb. 4.12 Reaktivität der mAK mit Serum. Die Reaktion von 81 möglichen Antikörper-Kombinationen auf Humanserum (1:50) wurde untersucht. Die Fang-Antikörper (unten rechts) wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml und die Nachweis-Antikörper (unten links) in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Zur Detektion eines positiven Signals wurde 1:2000 verdünntes SAVP verwendet. Die Höhe der Säulen entspricht der jeweiligen OD_{405nm} .

In Hinblick auf die Etablierung eines Testverfahrens zur spezifischen Quantifizierung von FHR-3 im Plasma von Probanden, wurden alle 81 möglichen Antikörper-Kombinationen auf ihre Reaktion mit Humanserum gemessen (Abb. 4.12). Dabei fanden sich Antikörper-Kombinationen mit stark unterschiedlichen ELISA-Signalen, Kombinationen mit hohen sowie solche mit niedrigen OD-Werten. Beim Einsatz von Antikörpern, deren Epitop sich auf den SCR-Domänen 1-3 befindet, wurde präferentiell Serum-Faktor H gebunden. Da Faktor H in wesentlich höheren Konzentrationen (150 – 500 µg/ml) als FHR-3 (25 – 29 µg/ml) im Blut vorliegt, wurden alle Antikörper-Bindungsstellen auf den FHR-3/FH-spezifischen Fangantikörpern von Faktor H besetzt. Bei der Verwendung von Fang-Antikörpern, deren Epitop auf den SCR-Domänen 4-5 liegt, können dagegen alle Signale als FHR-3-Detektion interpretiert werden.

4.2.3 Analyse der Antikörper-Spezifität mittels Immunoblot

Die weitere Charakterisierung der FHR-3-spezifischen Antikörper erfolgte mittels Immunoblotting (Kapitel 3.6). Alle neun hergestellten monoklonalen Antikörper wurden in Hinblick auf ihre Reaktivität mit aufgereinigten FHR-3- bzw. FH-Präparaten sowie Serum im Immunoblot erprobt.

Hierzu wurden jeweils 0,7 µl Humanserum sowie aufgereinigter FH bzw. FHR-3 (500 ng) mittels SDS-Page aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran. Über Nacht wurde diese mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte mittels Peroxidase-konjugiertem polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin.

Die verschiedenen Immunoblots zeigten, dass alle neun Antikörper rekombinantes FHR-3 markieren. Auch der Antikörper 24D4, der im ELISA nur schwache FHR-3-Reaktivität zeigte, detektierte eine spezifische FHR-3 kDa-Bande. Zudem reagierten vier Antikörper (3D11, 12B3, 19E9 und 23D5) mit aus Serum aufgereinigtem Faktor H. Diese Antikörper zeigten bereits FH-Reaktivität im ELISA (Kapitel 4.2.2.1, Abb. 4.11).

Zur Detektion von FHR-3 als auch von Faktor H (im Serum und in rekombinanter Form) ist nur der Antikörper 19E9 fähig. Des Weiteren zeigte das Immunoblot-Verfahren, dass lediglich der Antikörper 18H8 FHR-3 im Serum erkennt. Die anderen Antikörper entdeckten FHR-3 im Serum vermutlich nicht, da 0,7 µl Serum umgerechnet nur ungefähr 20 ng FHR-3 enthält, eine für den Nachweis mittels Immunoblotting möglicherweise nicht ausreichende Proteinmenge. Die Abbildung 4.13 zeigt die Immunoblots exemplarisch an ausgewählten Antikörpern. Zur besseren Übersicht ist der FH-spezifische mAK L20/3 mit aufgeführt, der mit FH im Serum und in aufgereinigter Form stark reagiert. FHR-3 markiert er nicht.

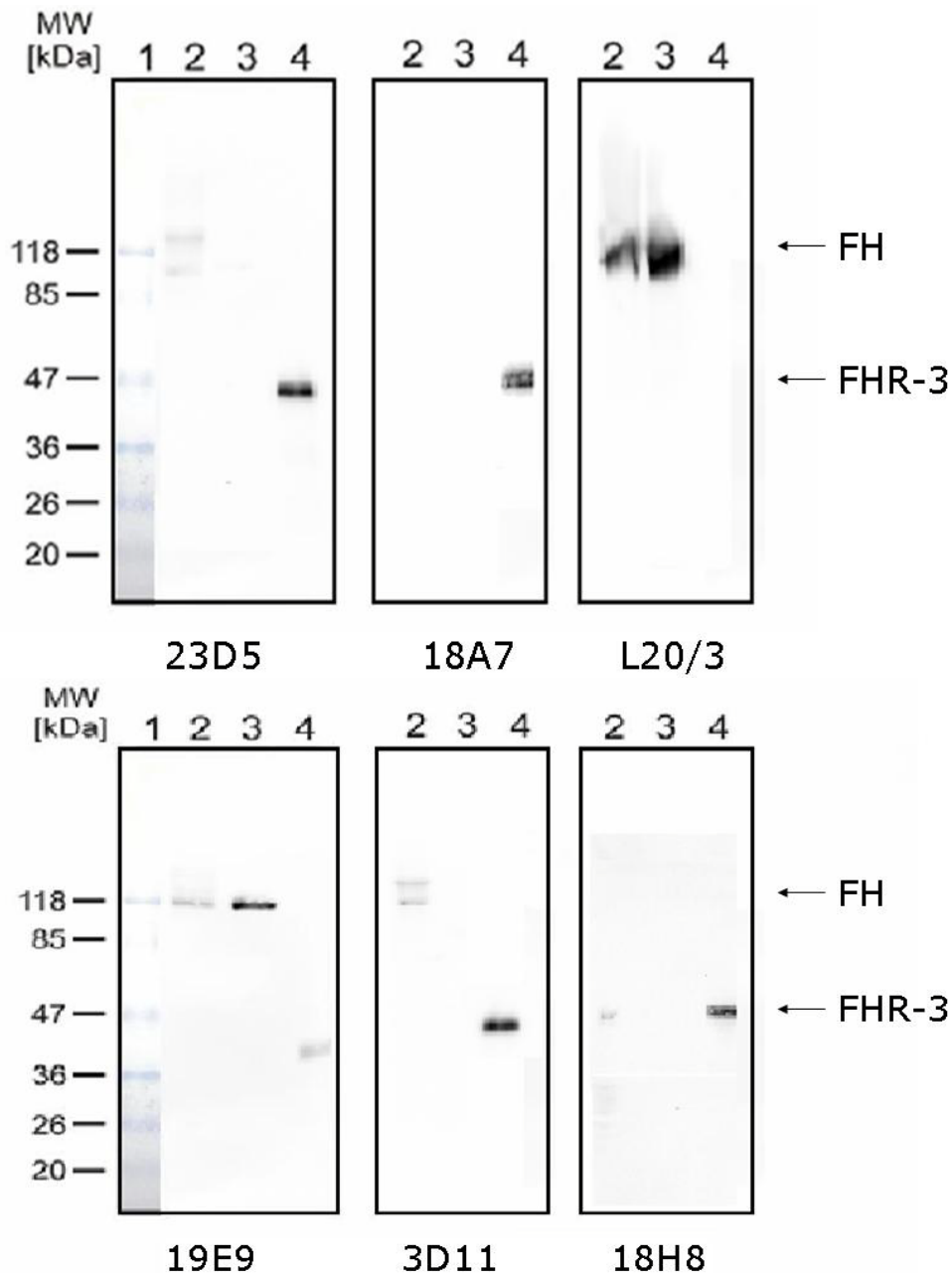


Abb. 4.13 Reaktivität der mAK 23D5, 18A7, L20/3, 19E9, 3D11 und 18H8 im Immunoblot. Plasma (0,7 µl), aufgereinigter FH (500 ng) und aufgereinigtes FHR-3 (500 ng) wurden auf einen SDS-Gradientengel aufgetragen, die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblotting dargestellt. 1, Molekulargewichtsmarker; 2, aufgereinigter FH; 3, Plasma; 4, aufgereinigtes FHR-3. Der Antikörper L20/3 reagiert (ausschließlich) mit FH.

4.2.4 Zusammenfassende Darstellung der Antikörper-Spezifitäten

Aufgrund ihrer unterschiedlichen ELISA-Reaktivitäten gelang es, die neun im Rahmen dieser Arbeit hergestellten monoklonalen Antikörper mit FHR-3-Reaktivität in zwei Gruppen einzuteilen: Die erste Gruppe besteht aus den Antikörpern 3D11, 12B3, 19E9 und 23D5. Diese Antikörper erkennen die FHR-3-Domänen SCR 1-3, welche eine starke

Übereinstimmung der Aminosäuren-Abfolge mit den Domänen SCR 6-8 von Faktor H aufweist. Diese mAK sind in der Lage, im ELISA sowohl mit FHR-3 als auch mit Faktor H zu reagieren. Die zweite Gruppe besteht aus den Antikörpern 4H9, 6E3, 18A7 und 18H8. Sie zeigen im ELISA eine spezifische Reaktion nur mit FHR-3, nicht jedoch mit FH. Sie binden Epitope auf den Domänen SCR 4-5 im FHR-3-Molekül, welche nur eine geringgradige Übereinstimmung mit Faktor H aufweisen. Der Antikörper 24D4 zeigt im ELISA weder mit FHR-3, FH noch mit Serum eine Reaktion. Eine Reaktivität mit Serum zeigen im ELISA alle Mitglieder der ersten und zweiten Gruppe. Lediglich der Antikörper 18H8 (2. Gruppe) ist beim Einsatz von Serum nur als Nachweis-Antikörper einsetzbar. Möglicherweise werden seine Bindungsstellen von anderen Serum-Bestandteilen besetzt, welche von einem FHR-3- bzw. FH-spezifischen Nachweis-Antikörper nicht erkannt werden können. Somit wird kein Signal erzielt. Durch den Immunoblot konnten die Antikörper weiter differenziert werden. Alle Antikörper erkennen FHR-3 in seiner rekombinanten Form. Aufgereinigter Faktor H wird nur von den Antikörpern 3D11, 12B3 und 19E9 erkannt. Bei der Anwendung von Humanserum markiert nur der Antikörper 18H8 FHR-3, wohingegen Faktor H von den Antikörpern 19E9, 23D5 und 4H9 kenntlich gemacht wird. Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

| | SCR-Domäne | ELISA | | | Blot | | |
|-------------|-------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Reaktivität mit FH | Reaktivität mit FHR-3 | Reaktivität mit Serum | Reaktivität mit FH | Reaktivität mit FHR-3 | Reaktivität mit Serum |
| 3D11 | FHR-3 (1-3) | √ | √ | √ | √ | √ | - |
| 12B3 | FHR-3 (1-3) | √ | √ | √ | √ | √ | - |
| 19E9 | FHR-3 (1-3) | √ | √ | √ | √ | √ | FH |
| 23D5 | FHR-3 (1-3) | √ | √ | √ | - | √ | FH |
| 4H9 | FHR-3 (4-5) | - | √ | √ | - | √ | FH |
| 6E3 | FHR-3 (4-5) | - | √ | √ | - | √ | - |
| 18A7 | FHR-3 (4-5) | - | √ | √ | - | √ | - |
| 18H8 | FHR-3 (4-5) | - | √ | nur als Nachweis-AK | - | √ | FHR-3 |
| 24D4 | FHR-3 (4-5) | - | - | - | - | √ | - |

Tab. 4.5 Zusammenfassende Darstellung der FHR-3- und FH-Reaktivitäten der hergestellten Antikörper im ELISA und Immunoblot

4.3 Etablierung eines ELISA zur Quantifizierung von FHR-3 auf der Basis zweier monoklonaler Antikörper

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen ELISA auf der Grundlage zweier FHR-3-spezifischer AK herzustellen, der sich zur Messung der FHR-3-Konzentrationen in Humanserum bzw. -plasma eignet.

4.3.1 Identifizierung einer geeigneten Antikörper-Kombination

Zur Etablierung eines FHR-3-spezifischen Testes wurde besonderes Augenmerk auf die Auswahl einer geeigneten Antikörper-Kombination gelegt, da die verwendeten Antikörper die Spezifität des Nachweisverfahrens massgeblich determinieren. Hierfür wurde die zuvor durchgeführte Epitopanalyse (s. 4.2.4) der verschiedenen Antikörper zugrunde gelegt. Es sollte eine Antikörper-Kombination gefunden werden, die mit FHR-3 und normalem Serum als Antigen deutlich reagierte, nicht jedoch mit Faktor H und FHR-3-defizientem Serum. Ebenso sollte sie niedrige Extinktionswerte in den Leerwertkontrollen erzielen. In den oben beschriebenen Versuchen zur „Analyse der Antikörperspezifität“ zeigte sich, dass nahezu alle Antikörper mit rekombinatem FHR-3 reagierten, allerdings nicht in der Lage waren, FHR-3 im Serum zu detektieren. Dies lässt sich damit erklären, dass das rekombinante FHR-3 in einer höheren Menge als der normalen, im Serum zu vermutenden FHR-3-Konzentration eingesetzt wurde. In Hinblick darauf, dass der etablierte ELISA den FHR-3-Gehalt im Serum von Probanden messen soll, wurde eine Kombination ausgewählt, die ein hohes Signal mit Serum als auch mit rekombinatem FHR-3 erbrachte. Eine Kombination aus zwei Antikörpern, die beide Epitope auf demselben SCR erkennen, stellte sich als untauglich dar. Eine Kombination zweier SCR-4-5-spezifischer AK zeigte keine Reaktion mit Serum. Bei Kombination zweier SCR-1-3-spezifischer AK muss, wegen der bekannten FH-Kreuzreaktivität dieser Antikörper, davon ausgegangen werden, dass präferentiell FH gemessen wird. Somit stellte sich eine Kombination aus zwei Antikörpern, die einerseits mit Epitopen auf SCR 1-3, andererseits auf SCR 4-5 reagieren, als sinnvoll heraus. Diese Kombination hat den Vorteil, dass sich die AK durch die Bindung an Epitope auf unterschiedliche Regionen sterisch nicht gegenseitig blockieren.

Die Analyse der Antikörper-Epitop-Spezifität kam weiterhin zu dem Ergebnis, dass der Fang-AK aus der Gruppe der FHR-3-spezifischen AK (SCR4-5) stammen sollte, da nur so gewährleistet werden kann, dass FHR-3 und nicht FH gebunden wird.

Auf der Grundlage der vorangegangenen Versuchsergebnisse wurden sechs Antikörper-Kombinationen identifiziert, die diesen Kriterien entsprachen und erneut im ELISA ausgetestet. Dazu wurde diesmal zusätzlich zu den bisher verwendeten Antigenen auch FHR-3-defizientes Serum eingesetzt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 4.14 dargestellt.

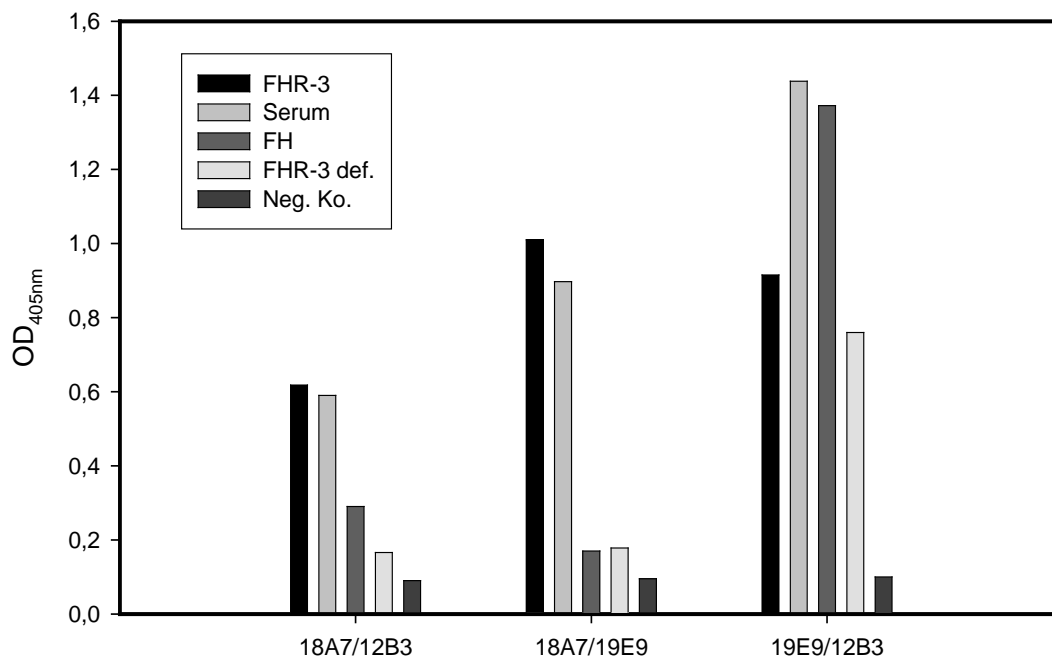


Abb. 4.14 Identifikation einer geeigneten Antikörper-Kombination. Dargestellt sind die Antikörper-Kombination 18A7/12B3, 18A7/19E9 und 19E9/12B3 und ihre Reaktivität mit FHR-3 (50ng/ml), FH (1:1000), Humanserum (1:50) und FHR-3-defizientes Serum (1:50). Als Negativ Kontrolle diente 100 µl PBS-Tween.

Diese Versuchsreihe ergab als wesentliches Resultat, dass zwei der sechs Antikörper-Kombinationen (18A7/12B3, 18A7/19E9) keine Reaktion mit FHR-3-defizientem Serum und Faktor H zeigten, gleichzeitig jedoch ein hohes Signal mit Humanserum und mit FHR-3. Die AK-Kombination 19E9/12B3 entsprach nicht den oben beschriebenen Bedingungen für eine geeignete Antikörper-Kombination und soll an dieser Stelle beispielhaft eine ungeeignete Kombination darstellen. Bei der Verwendung von FH und FHR-3-defizientem Serum weist sie dennoch hohe Signale auf, wodurch deutlich wird, dass diese AK-Kombinationen nicht spezifisch FHR-3 detektiert.

Da FHR-3-defizientes Serum eine selektive Defizienz für FHR-3 und FHR-1, aber normale Konzentrationen von FH sowie aller anderen FH-verwandten Proteine aufweist, erkennen diese zwei AK-Kombinationen spezifisch FHR-3 im menschlichen Serum. Eine Kreuzreaktion mit anderen Vertretern der FH-Familie (FHR-1 weist eine sehr geringe Homologie zu FHR-3

auf und wird im Immunoblot nicht detektiert) ist somit auszuschliessen. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Kombination 18A7 und 19E9 die besten Voraussetzungen für die Etablierung eines FHR-3-spezifischen ELISAs bietet, da sie im Vergleich zu der Kombination 18A7 und 12B3 höhere Signale mit FHR-3 und Serum erbrachte und keine Reaktion mit Faktor H zeigte. Ein weiteres Kriterium für die Wahl der Antikörper 18A7 und 19E9 war, dass beide in ausreichender Menge zur Verfügung standen.

4.3.2 Optimierung der Testbedingungen

Signalstärke und Sensitivität des neu etablierten Nachweisverfahrens hängen wesentlich von Parametern des Testsystems ab. Aus diesem Grund mussten alle Inkubationsschritte im Hinblick auf die Auswahl der Reagenzien, deren Konzentration und der Inkubationsdauer optimiert werden. Das jeweils zu überprüfende Reagenz wurde dazu in verschiedenen Verdünnungsstufen bei jeweils optimaler Konzentration der anderen Reaktanden ausgetestet. Als Antigen diente in allen Fällen 1:20 verdünntes Humanserum. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

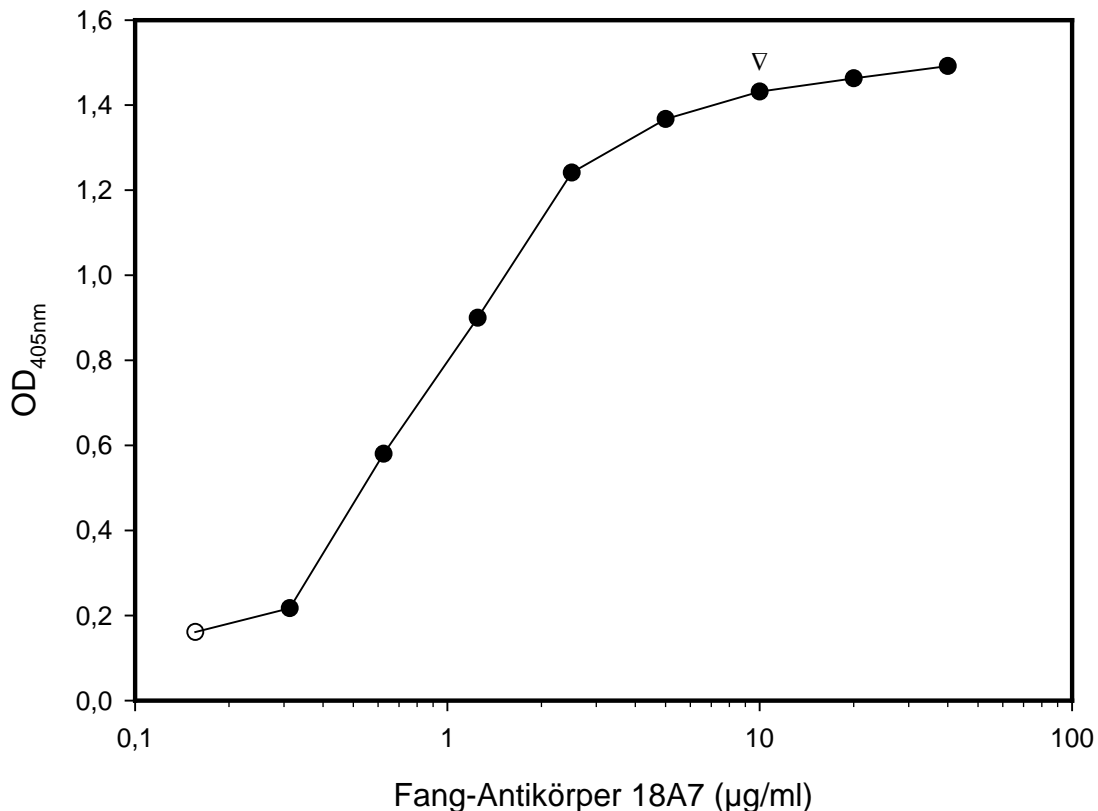


Abb. 4.15 Optimierung des Fang-Antikörpers. Der Fang-Antikörper 18A7 wurde in den verschiedenen Verdünnungsstufen von 0,156 µg/ml bis 40 µg/ml in Hinblick auf seine optimale Konzentration ausgetestet. Der Pfeil (Δ) kennzeichnet die ermittelte optimale Konzentration des Fang-AK.

Der Fang-Antikörper 18A7 wurde in Konzentrationen zwischen 0,156 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$ ausgetestet. Je höher die Antikörperkonzentration war, desto höher war auch das Signal im ELISA (Abb. 4.15). Bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ stellte sich allerdings ein Plateau ein. Dementsprechend wurde für den Fang-Antikörper 18A7 eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ gewählt, die deutlich im Sättigungsbereich lag. Damit konnte gesichert werden, dass selbst Abweichungen in der Konzentration dieses Antikörpers um den Faktor 2 die Messwerte nicht nennenswert beeinflussen konnten.

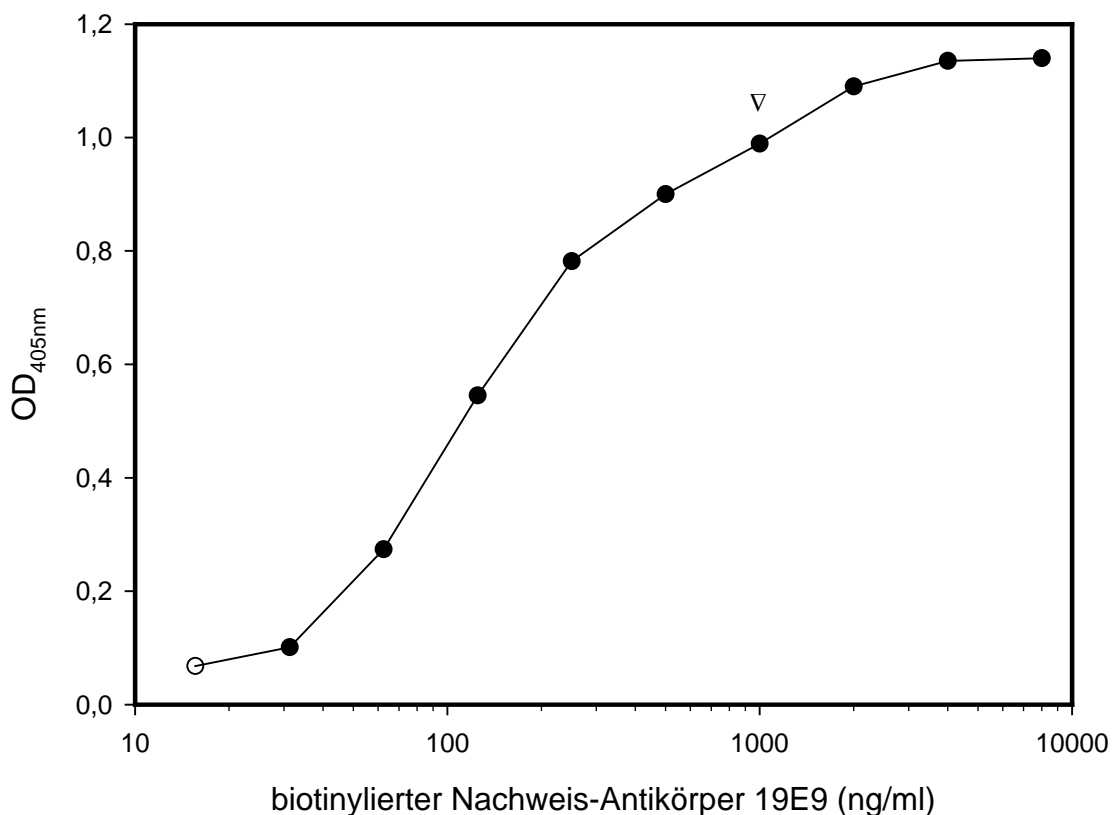


Abb. 4.16 Optimierung des biotinylierten Nachweis-Antikörpers: Um die optimale Konzentration des biotinylierten Nachweis-Antikörpers zu ermitteln, wurde er in einem Bereich von 15,6 ng/ml bis 8000 ng/ml getestet. Der Pfeil (Δ) kennzeichnet die ermittelte optimale AK-Konzentration.

Die Optimierung des biotinylierten Nachweis-Antikörpers 19E9 und des Streptavidin-Peroxidase-Konjugat erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Der Nachweis-Antikörper wurde in einem Bereich von 15,6 ng/ml bis 8000 ng/ml ausgetestet, das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in Verdünnungen zwischen 1:500 und 1:128000. Dabei ergab sich für den biotinylierten Nachweis-Antikörper 19E9 eine optimale Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ (Abb 4.16).

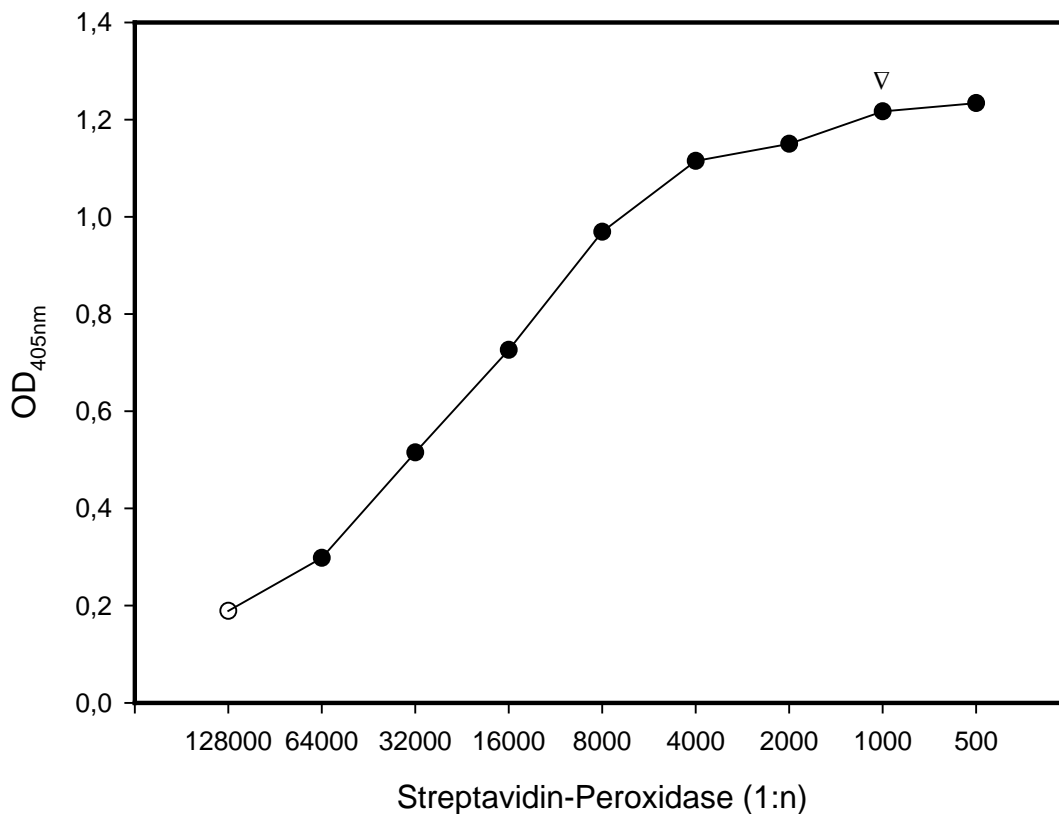


Abb. 4.17 Optimierung der Streptavidin-Peroxidase. Im Rahmen der Optimierung der Testbedingungen wurde das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in den Verdünnungen 1:500 bis zu 1:128000 in PBS-Tween ausprobiert. Der Pfeil (Δ) markiert die ermittelte optimale Streptavidin-Peroxidase-Konzentration.

Das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wurde in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt (Abb. 4.17).

Die Zuordnung der Konzentrationsangaben von gemessenen FHR-3 zu den ermittelten Extinktionswerten erfolgte anhand eines im Test mitgeführten Eichstandards. Dazu diente eine Verdünnungsreihe von FHR-3 (2,8 ng/ml bis 8000 ng/ml), wie im Kapitel 3.5.5 beschrieben. Der lineare Messbereich der Eichgerade lag zwischen 62,5 ng/ml und 2000 ng/ml (Abb. 4.18). In späteren Messungen wurde ein Serumstandard mit bekannter FHR-3-Konzentration (8,89 μ g/ml) in Verdünnungen zwischen 1:10 und 1:2560 eingesetzt.

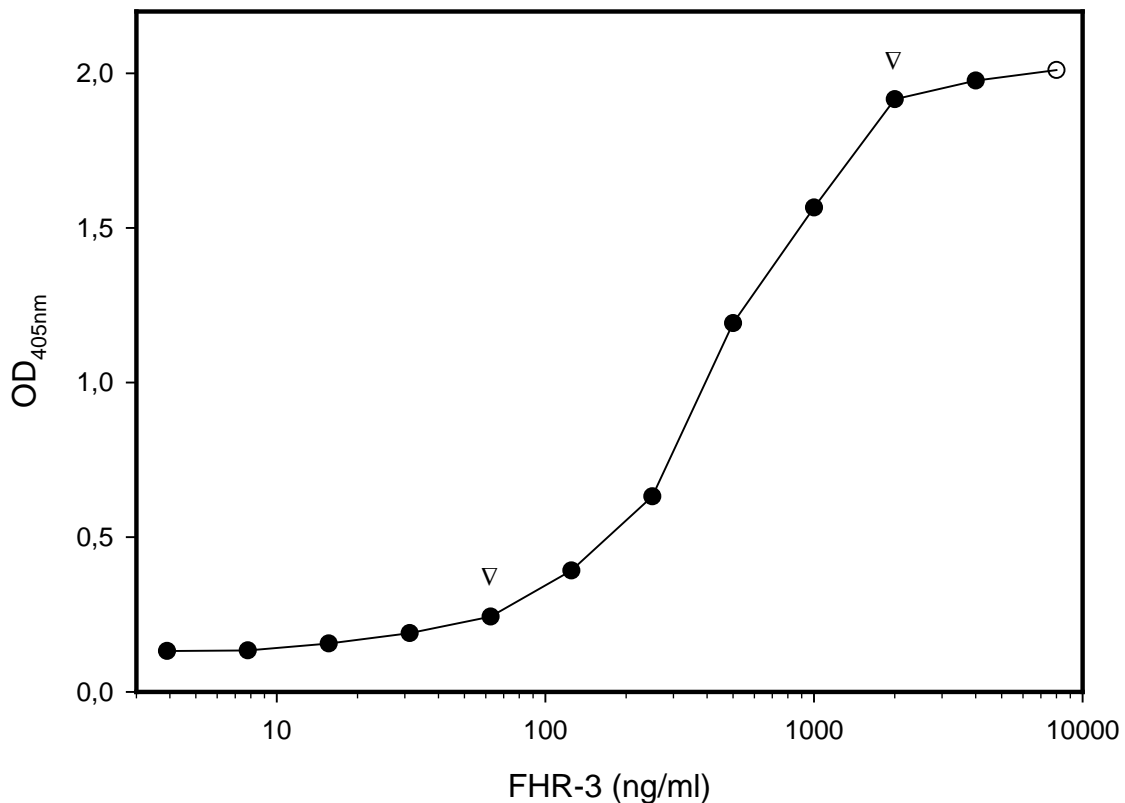


Abb. 4.18 Standard-Kurve zur Quantifizierung von FHR-3. Ein Eichstandard zur Zuordnung von FHR-3-Konzentrationsangaben zu OD-Werten wurde angefertigt.

4.3.3 Spezifität des ELISA für FHR-3

Aufgrund der Spezifität der im ELISA verwendeten Antikörper für FHR-3 kann der neu etablierte ELISA als zuverlässiges Messverfahren für die Quantifizierung von FHR-3 eingesetzt werden. Um auszuschließen, dass Serumproteine in hohen Konzentrationen mit der FHR-3-Messung interferieren, wurde der Verlauf der FHR-3-Verdünnungsreihe mit einer Serumverdünnungsreihe verglichen. Beide Verdünnungsreihen verliefen parallel, so dass ein Serumeffekt ausgeschlossen werden konnte (Abb. 4.19). In weiteren Experimenten (nicht gezeigt) wurde nachgewiesen, dass auch ein mit FHR-3 in bekannter Konzentration aufgestocktes FHR-3-defizientes Serum gleichfalls parallel zur Standardreihe verlief.

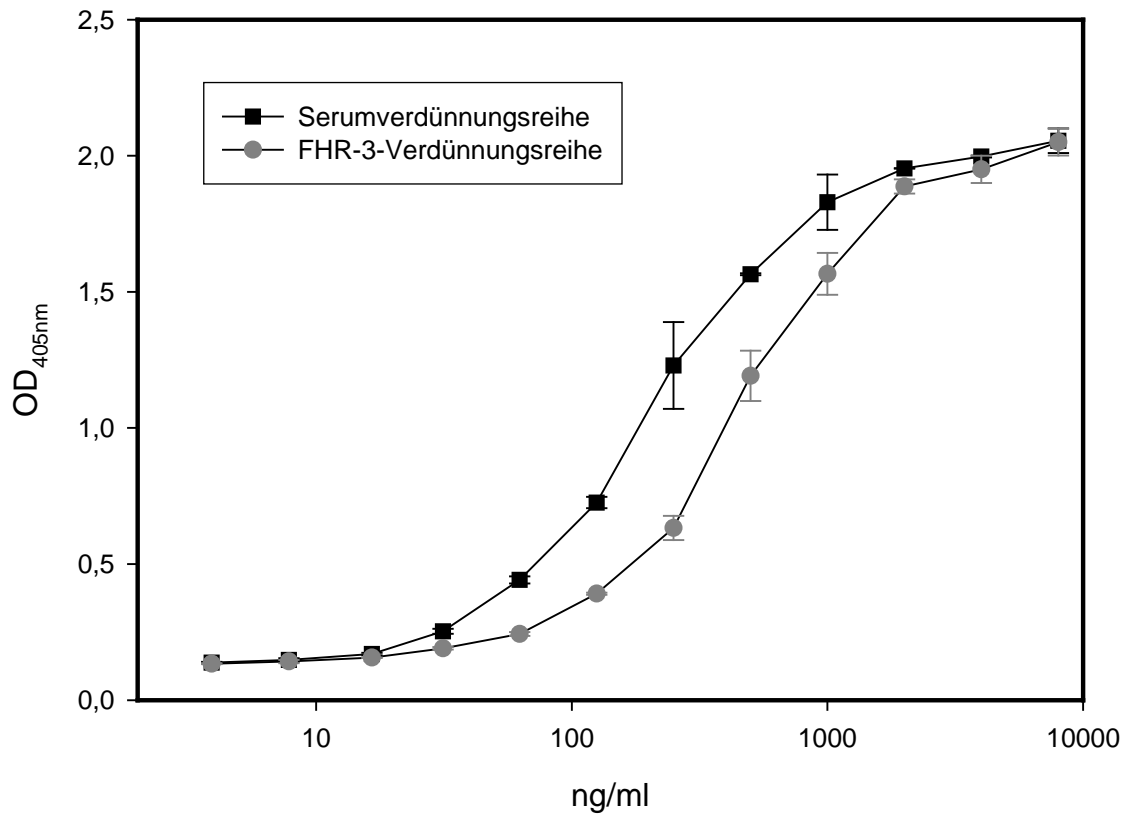


Abb. 4.19 Parallelität der FHR-3-Verdünnungsreihe und der Serumverdünnungsreihe. Sowohl die FHR-3-Standardreihe als auch die Serum-Standardreihe wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen ausitiert und auf ihre Parallelität getestet.

Alle Messungen wurden stets in Doppelbestimmung durchgeführt. In jedem FHR-3-ELISA wurden zwei Kontrollseren mitgeführt. Somit konnte die Inter- bzw. Intraassay Variabilität kontrolliert werden. Die Interassay-Variabilität lag bei 18%, die Intraassay-Variabilität bei 11,3%.

Der schematische Aufbau dieses Testverfahrens ist in der Abbildung dargestellt.

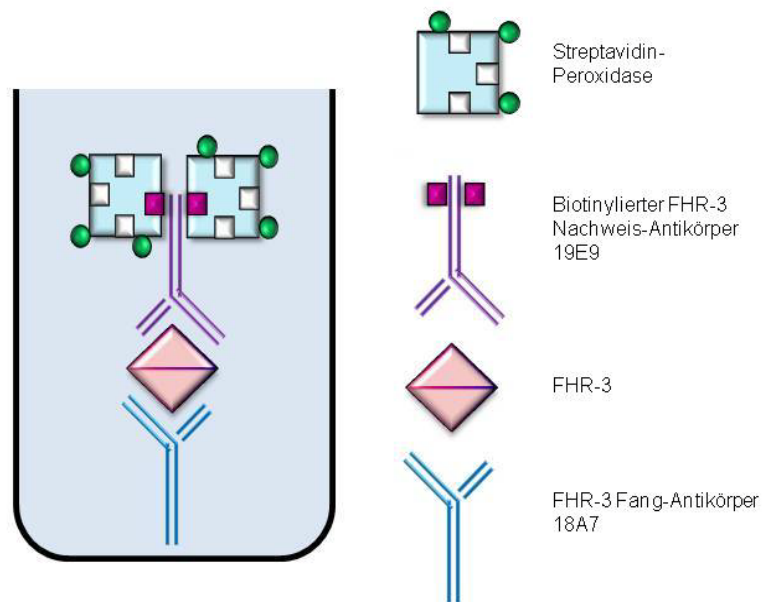


Abb. 4.20 Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA-Nachweisverfahrens

4.4 Bestimmung der FHR-3-Konzentration in den Plasmen gesunder Probanden

Mit Hilfe des neu etablierten ELISA wurde der FHR-3-Gehalt im EDTA-Plasma von 141 gesunden Blutspendern ermittelt. Die Proben wurden freundlicherweise von der Abt. Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Allen Probanden wurde unter standardisierten Bedingungen EDTA-Blut abgenommen. Sofort nach der Abnahme erfolgte die Zentrifugation des EDTA-Blutes für 20 Minuten bei 500 UpM. Das Plasma wurde abgehoben und umgehend bei -70°C eingefroren.

Der FHR-3-spezifische ELISA wurde unter zuvor optimierten Bedingungen mit dem Fangantikörper 18A7 in einer Konzentration von $10\ \mu\text{g/ml}$ und dem Nachweis-Antikörper 19E9 mit $1\ \mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe aus rekombinatem FHR-3 mit bekannter Proteinkonzentration. Die Proben wurden in einer 1:100 Verdünnung in PBS-Tween verwendet. Alle Messungen wurden in Doppelbestimmung bewerkstelligt. Ebenso wurden stets zwei Kontrollseren mitgeführt.

Bei insgesamt 141 Probanden ergab sich ein FHR-3-Mittelwert im EDTA-Blut von 28,2 µg/ml. Fünf Spender waren FHR-3-defizient ($\leq 1\mu\text{g/ml}$). Die Häufigkeit einer FHR-3-Defizienz bei gesunden Blutspendern betrug somit 3,5 %. Der Minimalwert lag bei 8,6 µg/ml, der Maximalwert bei 74,11 µg/ml. Die Standardabweichung betrug 13,9 µg/ml. Die Messungen sind in der Abb. 4.21 und der Tab. 4.7 aufgeführt.

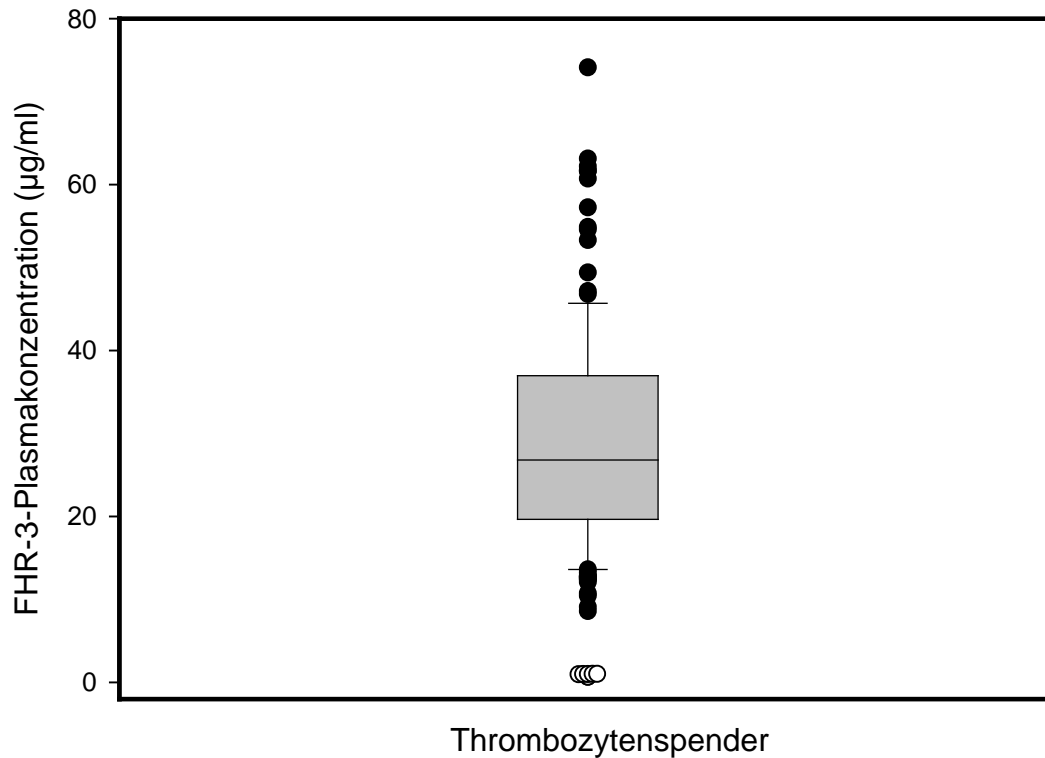


Abb. 4.21 Quantifizierung des FHR-3-Gehaltes im Plasma von 141 gesunden Thrombozyten-Spendern. Der zuvor hergestellte ELISA auf Basis zweier monoklonaler FHR-3-AK diente der Erfassung einer FHR-3-Konzentration im menschlichen Plasma. Dargestellt ist der Median-Wert sowie die 25%/75%-Perzentile (graues Areal) und die 10%/90%-Perzentile (Fehlerbalken). Die offenen Symbole repräsentieren die FHR-3-defizienten Spender.

4.5 Bestimmung der FHR-3-Konzentration in den Plasmen von AMD-Patienten und Kontroll-Proben

Der neu etablierte ELISA wurde zur Bestimmung der FHR-3-Konzentration in AMD-Patienten eingesetzt. Die hierbei untersuchten Materialien wurden freundlicherweise von der Universitätsaugenklinik Bonn (Prof. F.G. Holz) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um 92 Blutproben von AMD-Patienten, die auf der Grundlage des fundoskopischen Befundes in 67 CNV-Erkrankte, 9 DR-Erkrankte und 16 GA-Erkrankte unterteilt werden konnten. Verglichen wurden die Patienten mit 65 fundoskopisch unauffälligen Kontroll-Probanden, die hinsichtlich Alter, Geschlecht, Rauchgewohnheiten und anderer klinischer Parameter den AMD-Patienten weitgehend glichen (Tab.4.6).

| | Kontrollen | AMD-Patienten |
|---------------------|-------------|---------------|
| Gesamt (n) | 65 | 92 |
| Männlich (n) | 41 | 37 |
| Weiblich (n) | 24 | 55 |
| Alter (Jahre) | 70 ± 5,9 | 75,2 ± 6,8 |
| Kreatinin [mg/dl] | 0,91 ± 0,18 | 0,98 ± 0,37 |
| AMD-Phänotyp | | |
| DR | - | 9 |
| GA | - | 16 |
| CNV | - | 67 |

Tab. 4.6 Zusammenstellung der Studienpopulation. DR=Trocken, GA=Geographische Atrophie, CNV=Choroidale Neovaskularisation.

Zur Überprüfung der Intra- bzw. Inter-Assay Variabilität wurden stets Doppelbestimmungen angefertigt und zwei Kontrollplasmen mitgeführt. Des Weiteren wurden Patienten- und Kontrollproben auf die Mikrotiterplatte gleichmäßig verteilt, um einem Plattenartefakt entgegenzuwirken. Der ELISA verlief nach dem im Kapitel 3.5 beschriebenen Schema und erbrachte folgendes Ergebnis (Tab. 4.7):

| | AMD | CNV | DR | GA | KO | Blutspender |
|---------------------------|---------------|---------------|------|------|------|---------------|
| Anzahl | 92 | 67 | 9 | 16 | 65 | 141 |
| Minimum | 0,25 | 0,25 | 12,8 | 7,6 | 5,4 | 0,7 |
| Maximum | 79,1 | 68,7 | 36,6 | 79,1 | 88,4 | 74,1 |
| Mittelwert | 28,9 | 29,3 | 23,8 | 33,9 | 25,3 | 28,2 |
| Standardabweichung | 14,6 | 15,8 | 8,8 | 19,1 | 18,6 | 13,9 |
| FHR-3 Defizienz | n=1 (1,1%) | n=1 (1,5%) | n=0 | n=0 | n=0 | N=5 (3,5%) |

Tab. 4.7 Zusammenfassendes Ergebnis der Plasma-FHR-3-Quantifizierung verschiedener Kohorten., AMD=Altersbedingte Makuladegeneration, CNV=Choroidale Neovaskularisation, DR=Drusen, GA=Geographische Atrophie, KO=Kontrolle.

Unter allen untersuchten Blutproben fand sich ein FHR-3-defizienter CNV-Patient. Dies entspricht einer Häufigkeit von 1,1% unter allen AMD-Patienten, die im Vergleich zu den Blutspendern (3,5%) etwas geringer, aber nicht signifikant niedriger, ausfällt. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der FHR-3-Konzentration innerhalb der einzelnen Kohorten graphisch dargestellt:

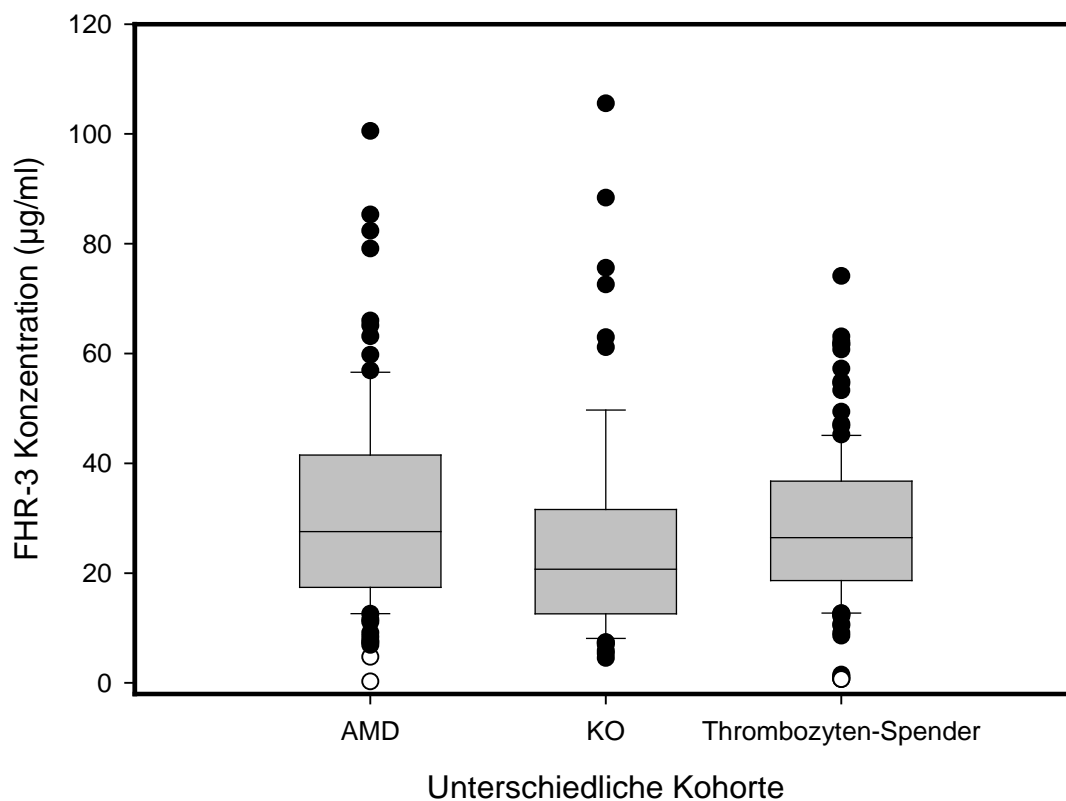


Abb. 4.22 Vergleich der FHR-3-Plasma-Konzentration der einzelnen Kohorten: Die FHR-3-Plasma-Konzentration der unterschiedlichen Kohorten (AMD-Erkrankte, deren Kontrollgruppe, und Blutspender) sind in der Abbildung dargestellt. Dargestellt ist der Median-Wert sowie die 25%/75%-Perzentile (graues Areal) und die 10%/90%-Perzentile (Fehlerbalken). Die offenen Symbole repräsentieren die FHR-3-defizienten Spender.

Die Versuchsreihe zeigte, dass bei der vorliegenden Größe der Studienpopulation weder zwischen den unterschiedlichen Erkrankungs-Formen der AMD noch zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den AMD-Erkrankten signifikante Unterschiede bezüglich ihrer FHR-3 Plasma-Konzentration oder der Anzahl der FHR-3-Defizienzen detektierbar sind.

4.6 Tageszeitliche Schwankung der FHR-3-Konzentration

Wegen der starken Streuung von FHR-3-Plasma-Konzentrationen in allen untersuchten Probandengruppen sollten weitere Variablen, die Plasmawerte beeinflussen könnten, identifiziert werden. U.a. wurde untersucht, wie stabil FHR-3-Plasma-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf bei verschiedenen Spendern sind. Es sollte untersucht werden, ob die beobachtete Schwankung mit der gewöhnlichen Standardabweichung (Fehlerquelle aufgrund des Testes) zu begründen ist oder ob eine physiologische Änderung der FHR-3-Konzentration vorliegt. Dazu wurden vier Testpersonen im Laufe einer Woche mehrmals Blut abgenommen. Zwei Probanden waren damit einverstanden, zweimal täglich Blut zu spenden, bei den anderen erfolgte eine tägliche Blutabnahme. Am Ende der Woche wurden die Blutproben mit Hilfe des FHR-3-spezifischen ELISA nach dem üblichen Verfahren untersucht. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis:

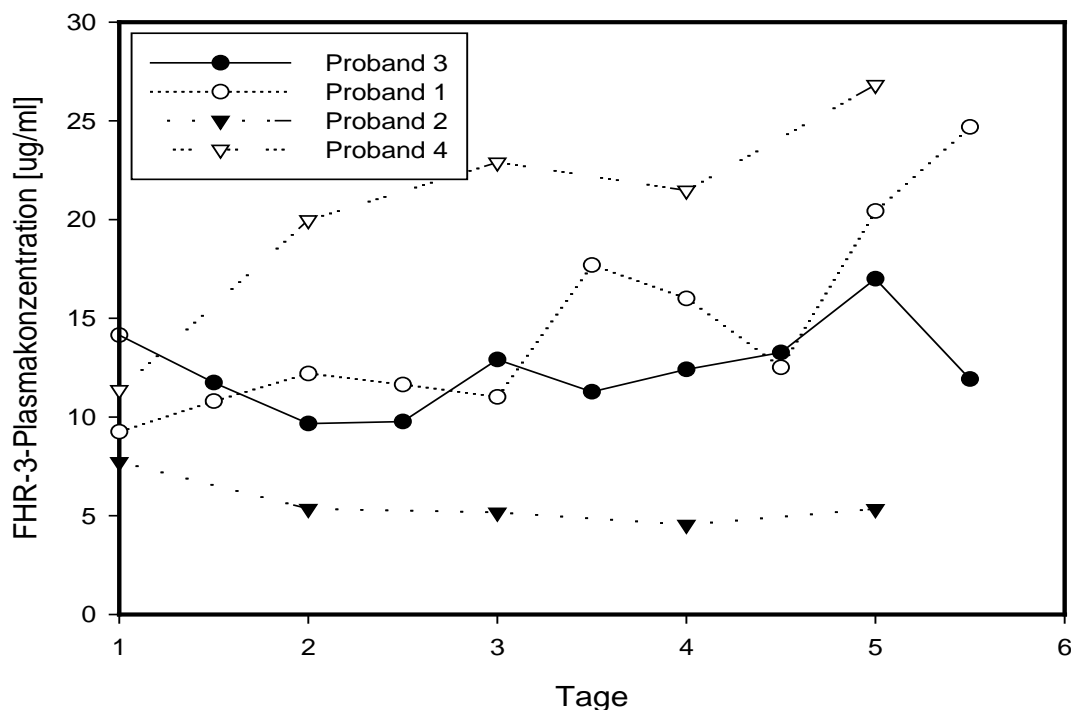


Abb. 4.23 Tagesabhängige Schwankungen der FHR-3-Konzentration. Vier Probanden wurde mehrfach innerhalb einer Woche Blut abgenommen, um die Schwankungen der FHR-3-Plasma-Konzentration zu untersuchen.

Hierbei zeigten sich teilweise deutliche Unterschiede der FHR-3-Konzentrationen. Bei den Probanden 1 und 3 wurden 10 Blutabnahmen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Abweichung der FHR-3-Konzentrationen betrug bei Proband 1 17% und bei Proband 3 34%. Den Probanden 2 und 4 wurde insgesamt 5 mal an 5 aufeinanderfolgenden Tagen Blut abgenommen. Für Proband 2 wurde eine Schwankung der FHR-3-Konzentration um 21% berechnet. Die Messungen von Proband 3 ergaben einen Unterschied von 28%.

4.7 Statistische Auswertungen der AMD-Studienpopulation

Im Zusammenhang einer vorangegangenen Studie zur Komplementaktivierung bei AMD (Scholl et al, 2008) standen umfangreiche klinische, laborchemische sowie genetische Informationen der untersuchten Bonner AMD-Studienpopulation zur Verfügung. Bei der Zusammenstellung dieser Kohorte (s. Tab. 4.6) wurde darauf geachtet, dass die Kontrollgruppe bezüglich Alter und Geschlecht den AMD-Patienten glich. Da Rauchen als signifikantester Umwelt-Risikofaktor für die Entstehung der Krankheit gilt, ähnelten sich die Probanden ebenfalls in ihren Nicht-Raucher-Eigenschaften. Abweichungen zwischen den publizierten Angaben (Scholl et al. 2008) und der vorliegenden Arbeit (Abb. 4.8) sind darauf zurückzuführen, dass von manchen Studienteilnehmern nicht mehr ausreichend Probenmaterial für FHR-3-Messungen vorhanden war, so dass sich die Teilnehmeranzahl etwas verkleinerte. Die Quantifizierung der einzelnen Komplement-Komponenten im Plasma der Proben erfolgte mittels ELISA (Komplement-Aktivierungsprodukte Ba, C3a, C5a, Substrat-Proteine C3, C4, Faktor B und Komplement-Regulatoren Faktor H und Faktor D). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde diese Studie um den Gehalt an FHR-3 ergänzt. Zudem wurden Korrelationen zwischen der FHR-3-Konzentration und Plasma Konzentrationen anderer Komplement-Parameter überprüft (Abb. 4.8).

| Komplement Protein | Einheit | Kontrollen (Mittelwert±STABW) n=66 | AMD-Patienten (Mittelwert±STABW) N=91 | Gesamt (Mittelwert±STABW) n=157 | Korrelation mit FHR-3 (p-Wert) |
|--------------------|---------|--|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| C3 | [mg/ml] | 1,18 ± 0,2 | 1,16 ± 0,19 | 1,2 ± 0,2 | n.s.* |
| C4 | [mg/ml] | 0,24 ± 0,06 | 0,24 ± 0,07 | 0,24 ± 0,06 | n.s.* |
| Faktor B | [µg/ml] | 731 ± 287 | 859 ± 304 | 805 ± 303 | n.s.* |
| Faktor H | [µg/ml] | 527 ± 105 | 560 ± 111 | 546 ± 109 | 0,015 |
| Faktor D | [µg/ml] | 1,02 ± 0,38 | 1,36 ± 0,48 | 1,22 ± 0,47 | 0,013 |
| C3a | [ng/ml] | 14,8 ± 3,1 | 16 ± 3,4 | 15,5 ± 3,4 | 0,012 |
| C5a | [ng/ml] | 1,57 ± 0,51 | 1,74 ± 0,62 | 1,67 ± 0,6 | n.s.* |
| Ba | [µg/ml] | 1,13 ± 0,35 | 1,43 ± 0,4 | 1,31 ± 0,4 | 0,0003 |
| FHR-3 | [µg/ml] | 25 ± 20 | 31 ± 19 | 29 ± 19,5 | |
| Kreatinin | [mg/dl] | 0,96 ± 0,3 | 0,91 ± 0,24 | 0,93 ± 0,27 | n.s.* |

Tab. 4.8 Mittelwert und Standardabweichung von Komplement-Parametern der AMD-Studienpopulation und deren Korrelationen zum FHR-3-Gehalt. *n.s. nicht signifikant. Die Daten für die Komplementprotein-Konzentrationen (außer FHR-3) entstammen einer früheren Publikation (Scholl et al. 2008).

Die statistische Auswertung der AMD-Studienpopulation erfolgte mit dem Programm „Statistica“ mit Unterstützung durch die Abteilung Medizinische Statistik der Universität Göttingen (Dr. K. Lange). Dabei konnte ein signifikanter, positiver Zusammenhang zwischen der FHR-3- und der FH- ($p=0,015$), FD- ($p=0,013$) sowie der C3a- ($p=0,012$) und Ba-Konzentration ($p=0,0003$) aufgedeckt werden.

Die Erkenntnis, dass der FH-Spiegel mit steigendem Alter abnimmt (Esparza-Gordillo et al. 2004) und FH und FHR-3 genetisch verwandt sind, gab Anlass zur Fragestellung, ob eine Korrelation zwischen FHR-3 und dem Alter der Probanden besteht (Abb. 4.24). In diese Untersuchung wurden die Thrombozytenspender mit eingeschlossen. Dabei resultierte, dass dieser Zusammenhang für FHR-3 nicht repliziert werden konnte. Eine differenzierte Analyse zeigte, dass bei den Frauen die FHR-3-Konzentration mit dem Alter tendenziell abnimmt, wohingegen sie bei den Männern eher steigt.

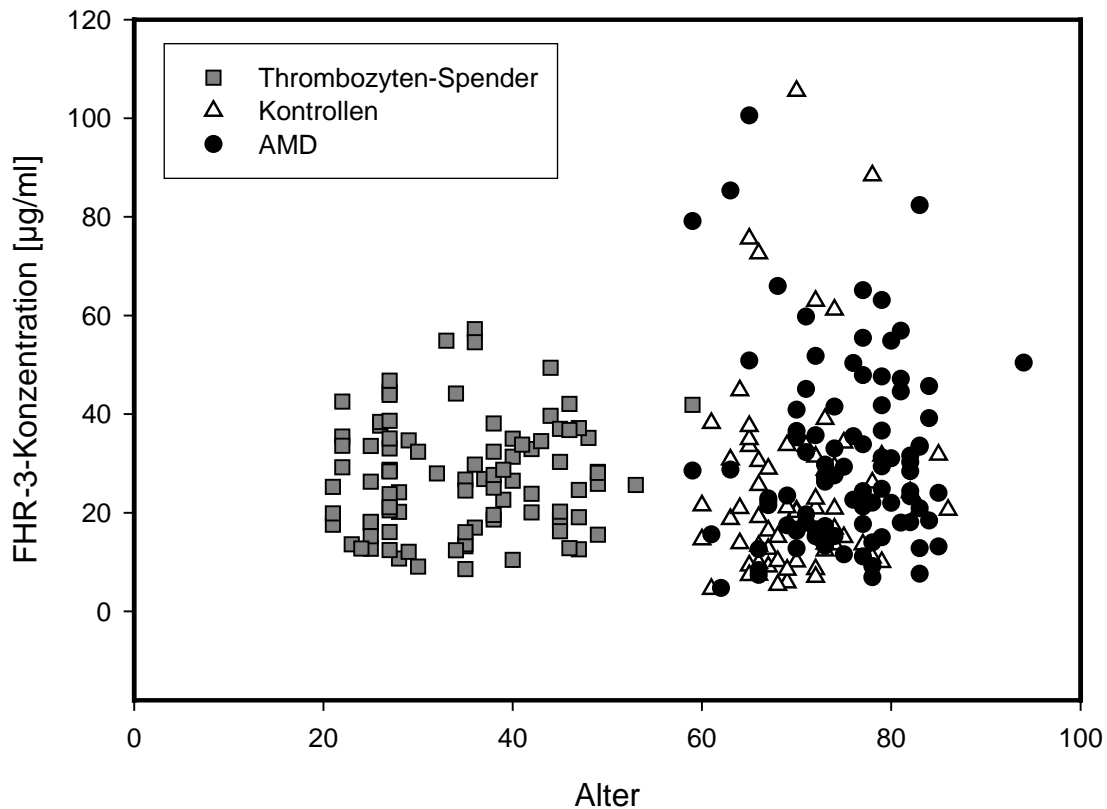


Abb. 4.24 Altersverteilung der Subpopulationen Thrombozytenspender, AMD- und Kontrollprobanden und deren FHR-3-Plasmakonzentration

Daraufhin wurde der Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Studienteilnehmer und der FHR-3-Plasma-Konzentration analysiert. Dabei konnte aufgedeckt werden, dass Frauen eine signifikant höhere FHR-3-Konzentration als Männer ($p=0,011$) haben (Abb. 4.25).

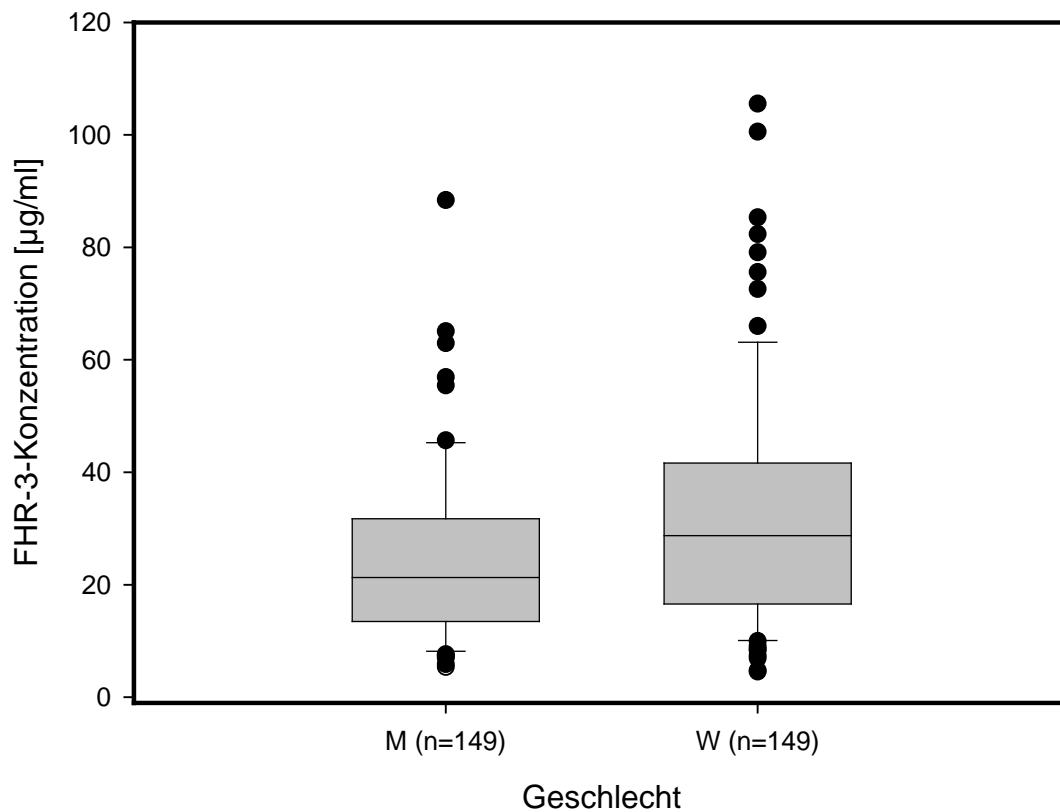


Abb. 4.25 Verteilung der FHR-3-Konzentration auf das Geschlecht. Es wurden sowohl gesunde Kontrollen als auch AMD-Patienten untersucht. Dargestellt ist der Median-Wert sowie die 25%/75%-Perzentile (graues Areal) und die 10%/90%-Perzentile (Fehlerbalken).

Genetische Untersuchungen der AMD- Studienpopulation ermöglichten eine Einteilung der Probanden nach deren FH-Haplotypen. Der SNP rs2274700 wurde als protektive Variante und der SNP rs1061170 als Risiko-Variante für die Entstehung einer AMD identifiziert (s. Einleitung Kap. 1.5). Die statistische Auswertung sollte Aufschlüsse über einen Zusammenhang zwischen FHR-3 und dem jeweiligen Haplotypen erbringen und zeigte folgende FHR-3-Konzentrationen in den Genotyp-Gruppen (Tab. 4.8).

| | rs2274700 | | | rs1061170 | | |
|---------------------------|-----------|---------|---------|-----------|---------|---------|
| | A/A | G/A | G/G | C/C | C/T | T/T |
| Anzahl (n) | 14 | 65 | 78 | 39 | 75 | 43 |
| Mittelwert (µg/ml) | 14 ± 19 | 22 ± 12 | 37 ± 21 | 27 ± 10 | 30 ± 19 | 29 ± 26 |
| Standardabweichung | | | | | | |

Tab. 4.9 Mittlere FHR-3-Konzentration und Standardabweichung der beiden FH-SNP rs2274700 und rs1061170 sowie deren Unterteilung in die unterschiedlichen Genotypen

Die globale Auswertung mithilfe des ANOVA-Verfahrens zeigte, dass eine signifikante Korrelation zwischen der FHR-3-Konzentration und dem Genotypen des Polymorphismus rs2274700 vorliegt. Der p-Wert lag unter 0,0001. Daraufhin wurden die einzelnen Subgruppen miteinander verglichen. Zwischen der FHR-3-Konzentration in der G/G und der G/A Gruppe liegt eine signifikante Korrelation (p-Wert 0,000001) vor. Ebenso zwischen den Genotypen G/G und A/A (p-Wert 0,0002). Bei der statistischen Auswertung der Subpopulationen A/A und G/A liegt der p-Wert allerdings bei 0,07. Damit liegt keine signifikante Korrelation dieser beiden Gruppen vor. Dieses Ergebnis ist allerdings als eine Tendenz zur Korrelation zu deuten, da die Gruppe der A/A-Probanden mit 16 relativ klein ist. Wir vermuten eine signifikante Korrelation dieser Gruppen bei der Auswertung einer größeren Probenanzahl

Bei dem SNP rs2274700 gilt der Genotyp A/A als protektive Variante. Hier zeigt sich ein im Vergleich zu den anderen Genotypen und der errechneten Normalkonzentration von FHR-3 mit Hilfe der Thrombozytenspender (28,2 µg/ml) deutlich erniedrigter FHR-3-Plasmaspiegel (14 ± 19 µg/ml). Zu beachten ist allerdings, dass diese Subpopulation mit einer Anzahl von 16 Teilnehmern relativ klein ist (Abb. 4.26).

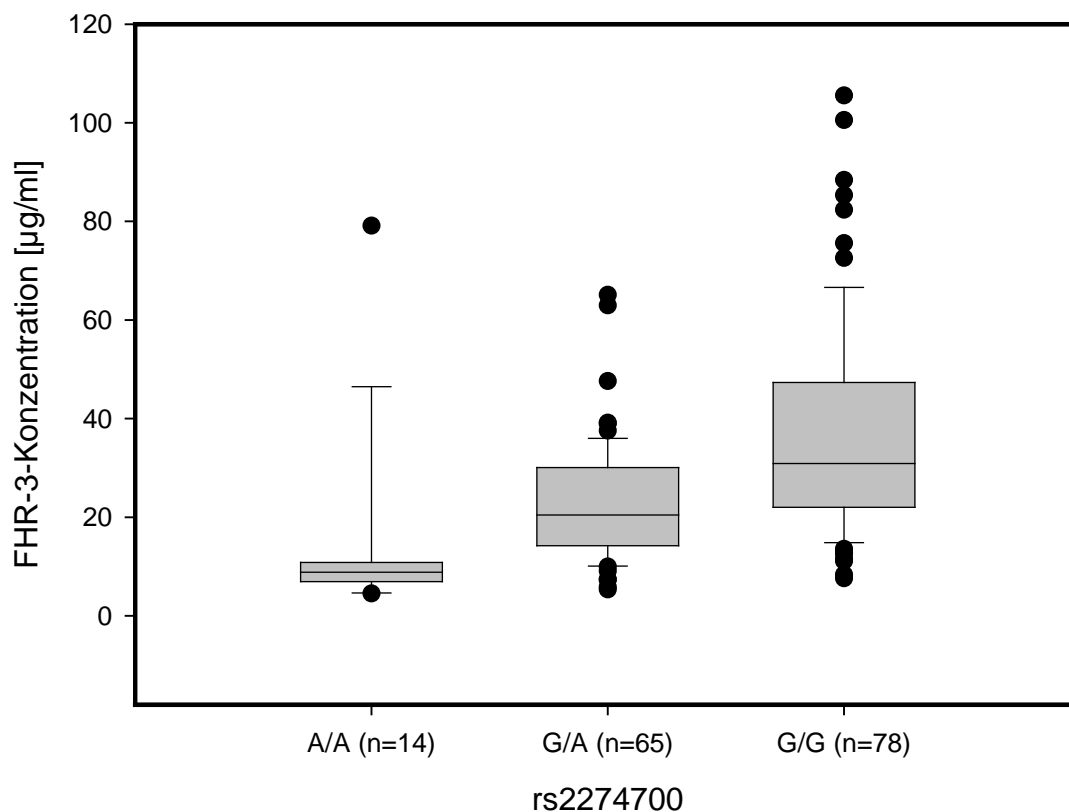


Abb. 4.26 Mittlere FHR-3-Konzentration und Standardabweichung der unterschiedlichen Genotypen des Polymorphismus rs2274700 in der AMD-Kohorte Dargestellt ist der Median-Wert sowie die 25%/75%-Perzentile (graues Areal) und die 10%/90%-Perzentile (Fehlerbalken).

Die statistische Auswertung des SNP rs1061170 anhand des ANOVA-Verfahrens zeigte keine signifikante Korrelation zwischen der FHR-3-Plasma-Konzentration und den verschiedenen Genotypen.

Der Genotyp C/C gilt als Risikovariante. Bei der Betrachtung der FHR-3-Konzentrationen zeigt sich, dass kein signifikanter Unterschied in den FHR-3-Konzentrationen zwischen den Subgruppen besteht (Abb. 4.27) und die FHR-3-Spiegel in allen Genotyp-Gruppen mit dem errechneten Normwert (28,2 µg/ml) weitgehend übereinstimmen.

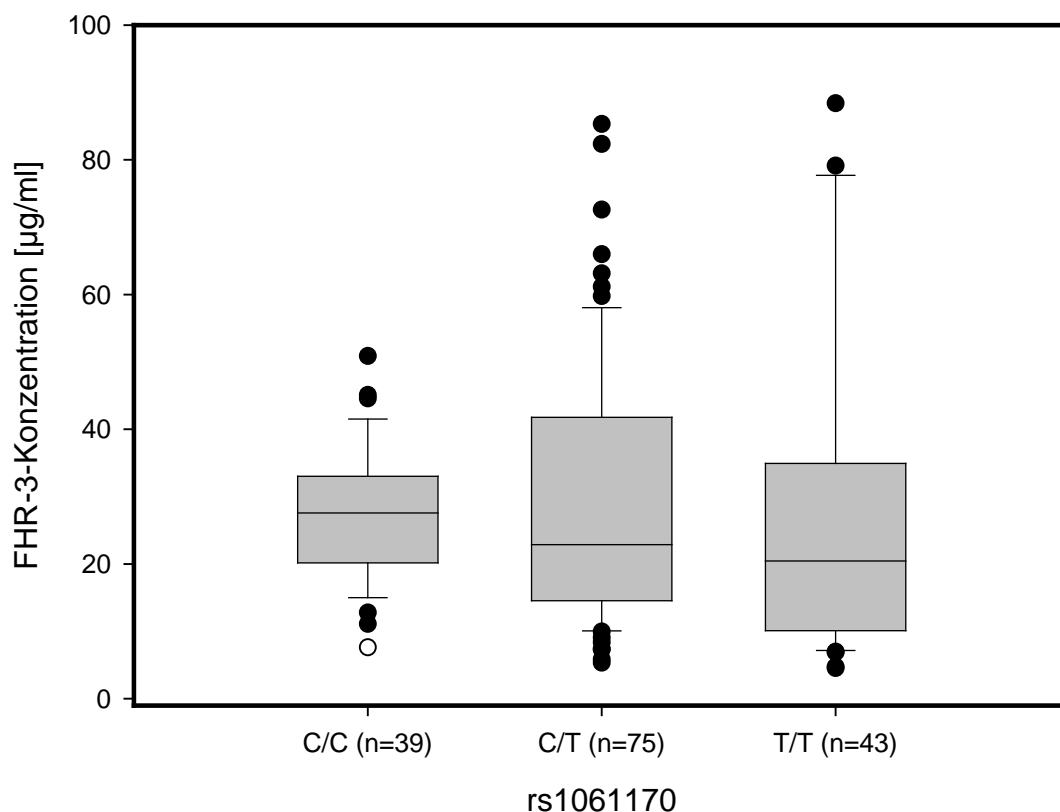


Abb. 4.27 Mittlere FHR-3-Konzentration und Standardabweichung der unterschiedlichen Genotypen des Polymorphismus rs1061170 in der AMD-Kohorte. Dargestellt ist der Median-Wert sowie die 25%/75%-Perzentile (graues Areal) und die 10%/90%-Perzentile (Fehlerbalken).

4.8 FHR-3-Polymorphismus

Aufgrund der hohen genetischen Verwandtschaft von FH und FHR-3 stellte sich im Laufe der vorliegenden Dissertation die Frage, ob sich der FH-Polymorphismus rs1061170, der einen Austausch von Tyrosin an Position 402 von FH gegen Histidin bewirkt, ebenfalls auf FHR-3 befindet. Zur Identifikation dieses SNPs wurden verschiedene ELISA mit Hilfe von Faktor-

H Antikörpern, die spezifisch den Polymorphismus detektieren, durchgeführt. Der zuvor in der Arbeitsgruppe hergestellte monoklonale Antikörper 1H1 markiert die Tyrosin Variante, der Antikörper 23F8 hingegen die Histidin Variante von FH.

Berücksichtigt man die Epitopanalyse der hergestellten anti-FHR-3 mAK (s. Kap. 4.2) und die Homologien der FH-Familienmitglieder (s. Kap. 1.3), besteht die geeignete Antikörper-Kombination aus einem anti-FHR-3 Fang-AK mit Spezifität für die SCR-Domänen 4-5 und einem anti-FH Nachweis-Antikörper. Die Epitopanalyse hatte gezeigt, dass die FHR-3-AK mit Spezifität der SCR 1-3 eine zu große strukturelle Ähnlichkeit zu FH aufweisen, weshalb davon auszugehen ist, dass das Einfangen mit einem solchen AK nicht den FHR-3-Polymorphismus, sondern den bekannten FH-Polymorphismus gemessen hätte.

Daraufhin wurden die hergestellten neun FHR-3-spezifischen mAK als Fang-AK (Konzentration 10µg/ml) und die beiden FH-spezifischen Nachweis-AK (Konzentration 10µg/ml) in einer Matrixanordnung (2×9) im ELISA ausgetestet. Eingesetzt wurde Humanserum in einem Verhältnis von 1:50, FHR-3 (500 ng/ml) und PBS-Tween als Negativ-Kontrolle. Als Positiv-Kontrolle dienten die FH-spezifischen Nachweis-Antikörper L20/3 und C18/3.

Der ELISA identifizierte die AK-Kombinationen aus dem Fang-AK 18A7 (FHR-3 SCR4-5) und den jeweiligen, den FH-Polymorphismus markierenden, FH-AK als geeignete Kombination. Diese Zusammenstellung erzielte sowohl mit Serum als auch mit rekombinantem FHR-3 ein positives Signal. Daraufhin wurden erneut alle Testbedingungen (Konzentration des Fang- und Nachweis-AK, Menge des SAVP) optimiert. Schließlich wurde der ELISA sowohl bei den Thrombozyten-Spendern als auch bei der AMD-Kohorte angewandt.

Diese Testreihe deckte Proben auf, die mit beiden Nachweis-AK ein positives Signal erzielten als auch solche, die mit keinem reagierten. Des Weiteren gab es Proben, die nur mit einem Nachweis-Antikörper einen Farbumschlag markierten.

Zur Interpretation dieses Resultats zogen wir die genetischen Informationen der AMD-Kohorte (Scholl et al, 2008) heran. Leider deckten sich unsere Testergebnisse nicht mit diesen Daten, so dass wir den ELISA als untauglich zur Identifikation des FHR-3-Polymorphismus rs1061170 auf FHR-3 verwerfen mussten. Es bleibt somit weiter unklar, ob der FH-Polymorphismus (Y402H) ebenfalls auf FHR-3 existiert und ob diese beiden polymorphen Variationen von FH und FHR-3 womöglich gekoppelt sind.

5. Diskussion

Vorrangiges Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung eines zur Quantifizierung von FHR-3 geeigneten Messverfahrens. Dazu sollte ein Sandwich-ELISA auf der Basis zweier FHR-3-spezifischer monoklonaler Antikörper etabliert werden. Zu diesem Zweck wurden anti-FHR-3 mAK hergestellt, die anschließend im Rahmen der weiteren Prozessierung aufgereinigt und biotinyliert wurden. Besondere Sorgfalt wurde auf die Epitopanalyse der generierten Antikörper aufgewandt, da diese ausschlaggebend für die Identifizierung einer geeigneten Antikörper-Kombination für den Sandwich-ELISA war. Nachdem die Sensitivität des Messverfahrens durch Optimierung der Testbedingungen nochmals gesteigert werden konnte, wurde er zur Quantifizierung von FHR-3 in Plasma-Spendern eingesetzt. Als Studienpopulationen standen 141 gesunde Thrombozytenspender zur Verfügung, die zur Etablierung eines Normwert-Bereiches für FHR-3 und der Bestimmung der Häufigkeit einer FHR-3-Defizienz in einer gesunden Normalpopulation dienten. Die zweite Kohorte bestand aus 97 AMD-Patienten sowie 67 gesunden, hinsichtlich ihrer Alterszusammensetzung abgeglichenen Kontrollen. Diese Proben wurden in Hinblick auf mögliche Unterschiede in dem FHR-3-Plasma-Gehalt sowie der Verteilung der FHR-3-Defizienz innerhalb der verschiedenen Subgruppen analysiert. Damit sollte die Hypothese überprüft werden, dass FHR-3 eine diagnostische oder sogar prognostische Rolle bei der Manifestation der AMD spielt. Anschließend wurden die Ergebnisse mit anderen im Zusammenhang früherer Studien (Scholl et al. 2008) erfassten Daten (Plasma-Konzentration anderer Komplementparameter, Alter, Geschlecht) statistisch ausgewertet. Weiterhin wurden tagesabhängige Schwankungen der FHR-3-Konzentration analysiert. Die Etablierung eines Messverfahrens zur Detektion des FH-Polymorphismus Y402H bei FHR-3 gelang leider nicht.

FHR-3- und die Faktor-H-Familie

Factor-H related Protein 3 (FHR-3) ist ein Mitglied der FH-Familie. Diese setzt sich aus FH, einem *Factor-H like Protein* (FHL-1) und insgesamt fünf *Factor-H related Proteins* (FHR-1 bis FHR-5) zusammen. Nach heutigem Wissensstand geht man davon aus, dass durch Duplikation des *FH-Gens* weitere Gene innerhalb des *RCA-Clusters* („*Regulator of Complement Activation*“) entstanden sind, welche für diese FHR-Proteine kodieren (Rodriguez de Córdoba et al. 2004).

Allen FH-Familienmitgliedern gemeinsam ist ihr Aufbau aus repetitiven *short consensus repeats* (SCRs). FHR-3 setzt sich aus 5 SCR-Domänen zusammen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen SCRs aller FH-Familienmitglieder mit den SCRs von FHR-3 verglichen und deren Homologie errechnet (Abb. 1.3). Im Rahmen dieser Analyse ergab es sich, dass FHR-4 mit Übereinstimmungen in der AS-Sequenz von 72-100% FHR-3 am meisten ähnelt. Ebenso zeigten die Regionen SCR 1-3 (FHR-3) eine strukturelle Ähnlichkeit zu den SCR 6-8 (FH) von 63% bis 94%. Die geringste Ähnlichkeit mit FHR-3 besitzt FHR-1 (37-64%). Diese Informationen waren bei der Epitopenalyse der hergestellten monoklonalen Antikörper von großer Bedeutung. Es sollte sichergestellt werden, dass die mAK spezifisch mit FHR-3 reagieren und keine Kreuzreaktivität zu anderen FH-Mitgliedern aufweisen.

FH gilt als wichtigster Regulator der Komplementaktivierung über den alternativen Weg in der flüssigen Phase (Zipfel et al. 1999 und Skerka et al. 2009). Über die Funktionen der *FH-related proteins* ist dagegen bisher nur wenig bekannt. Aktuellen Erkenntnissen zufolge werden abnormale Aktivierungen des alternativen Weges der Komplementaktivierung mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. Im Jahr 2005 wurde erstmalig ein Zusammenhang zwischen dem Komplementsystem, insbesondere FH, und der Augenerkrankung AMD entdeckt (Haines et al. 2005, Edwards et al. 2005, Klein et al. 2005). Die Hypothese einer wesentlichen Funktion des Komplementsystems für die Pathogenese der AMD stützt sich v.a. auf zwei Beobachtungen. Zum einen konnten Komplement-Proteine (C3, C5a, MAK) sowie –Regulatoren (FH) in den Drüsen der Retina von AMD-Patienten nachgewiesen werden (Nowak 2006). Zum anderen modulieren Variationen in Genen, die für verschiedene Komplementparameter (C2, FB, C3 und FH) kodieren, das Manifestationsrisiko der AMD.

Forschungsergebnisse aus dem Jahr 2006 beschrieben erstmals einen Haplotyp innerhalb des RCA Locus, der mit der Defizienz der Komplement-Proteine FHR-3 und FHR-1 einhergeht und einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der Erkrankung zu haben scheint (Hughes et al. 2006). Diese Deletion umfasst 84,682 Basen. 20% der gesunden Teilnehmer einer Studienpopulation waren im Vergleich zu nur 8% bei den AMD-Erkrankten Genträger für den FHR-3 defizienten Haplotyp. Umgekehrt scheint die FHR-3/FHR-1-Defizienz mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS) verbunden zu sein (Moore et al. 2010). Die Deletion tritt unabhängig von anderen bisher bekannten FH-Genvarianten auf. Folglich deutet dieser Befund auf einen weiteren, das Erkrankungsrisiko beeinflussenden Pathogenese-Mechanismus hin (Fritsche et al. 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Plasmakonzentrationen, Defizienzen und ferner funktionelle Eigenschaften von FHR-3 charakterisiert werden. Letztere Aufgabe übernahm

eine kooperierende Arbeitsgruppe in Jena, die Ergebnisse wurden kürzlich veröffentlicht (Fritsche et al. 2010). Im Rahmen der Kooperation stellten wir die hier beschriebenen anti-FHR-3 mAK zur Verfügung. Es stellte sich heraus, dass FHR-3 eine Rolle als Cofaktor für die Serin-Protease-Faktor I bei der Trennung von C3b spielt. Ebenso ergab sich, dass FHR-3 als C5-Konvertase fungiert. Des Weiteren besitzt FHR-3 anti-inflammatorische Eigenschaften und verringert die Chemotaxis von Neutrophilen. Ebenso wurde berichtet, dass FHR-3 weder die C3-Konvertase dissoziieren kann, noch deren enzymatische Aktivität beeinflusst. FHR-3 erhöht die hämolytische Aktivität im humanen Plasma. Die vermutlich bedeutendste Erkenntnis dieser Studie war jedoch, dass FHR-3 mit FHR-1 und Faktor H um die Bindung an C3b konkurriert. Darauf stützt sich die Hypothese, dass der Verlust von FHR-3/FHR-1 eine verstärkte Wirkung von Faktor H zur Folge hat, dessen regulatorische Funktionen wesentlich stärker sind. Ist kein bzw. nur wenig FHR-3 im Plasma vorhanden, führt die reduzierte FH/FHR-3 Konkurrenz möglicherweise zu einer stärkeren Aktivität von FH. Diese Beobachtungen bilden die Basis für die derzeit gültige Theorie, warum eine FHR-3/FHR-1-Defizienz vor der Manifestation der AMD schützen könnte.

Herstellung der Antikörper und Testetablierung

Die zur Herstellung der mAK verwendete Balb/c Maus wurde mit rekombinantem FHR-3 (SCR1-5) als Antigen immunisiert. Überlegungen, ob aufgrund der ausgeprägten Homologie zu FH alternativ nur ein (rekombinant exprimiertes) SCR von FHR-3 mit der geringsten Ähnlichkeit zu FH zu Immunsierungszwecken eingesetzt werden sollte, um die Chance zu erhöhen, spezifische Antikörper nur für FHR-3 zu generieren, wurden verworfen. Beim Einsatz eines sehr kleinen Antigens wäre das Risiko, keine funktionierende Antikörper-Kombination zu finden, zu groß gewesen. Schließlich konnten durch die Immunisierung mit dem kompletten FHR-3-Molekül aus anfänglich 66 Klonen nur zwei Antikörper-Kombinationen gefunden werden, die im ELISA spezifisch mit FHR-3 reagierten. Somit erscheint die Entscheidung für eine Immunisierung mit dem intakten FHR-3-Protein im Nachhinein gerechtfertigt.

Die Herstellung von monoklonalen anti-FHR-3-Antikörpern war eine essentielle Voraussetzung zum Aufbau eines zur Quantifizierung von FHR-3 geeigneten sensitiven und spezifischen Nachweisverfahrens. Der ELISA sollte als Sandwich-ELISA aus zwei FHR-3-spezifischen mAK bestehen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt acht mAK generiert und eingehend charakterisiert werden. Mittels SDS-PAGE wurde der hohe Reinheitsgrad dieser AK-Präparationen dokumentiert.

Anschließend erfolgte eine detaillierte Epitopenalyse mittels ELISA und Immunoblot mit dem Ziel Antikörper zu identifizieren, die keine Kreuzreaktion zu anderen FH-Mitgliedern

aufweisen. Besonders die Interaktion mit FH sollte ausgeschlossen werden, da Plasmaproben wesentlich höhere FH- als FHR-3-Konzentrationen beinhalten. Für diese Untersuchung standen FH, FH-defizientes Serum, rekombinantes FHR-3 und FHR-3-defizientes Serum zur Verfügung. Die Testreihe detektierte insgesamt vier Antikörper, die im ELISA keinerlei Reaktion mit FH zeigten. Bei diesen Antikörpern handelte es sich ausschließlich um FHR-3-AK, deren Epitop auf SCR-Region 4-5 eingegrenzt werden konnte. Im Gegensatz zu den SCR 1-3 (FHR-3), die eine hohe Ähnlichkeit zu SCR 6-8 auf FH besitzen (s. o.), haben die SCR 4-5 (FHR-3) nur eine relativ geringe Homologie zu FH (36% bis 62%). Somit ist verständlich, dass die FHR-3-AK (SCR1-3) mit FH reagierten und zum direkten Nachweis von FHR-3 nicht geeignet waren. Zusammenfassend konnten durch die Epitopanalyse vier Antikörper identifiziert werden, die im Plasma spezifisch FHR-3 markieren und zugleich keine Interaktion mit FH zeigen (Tab. 4.5.).

Die beschriebenen Experimente hätten um die Analyse der Antikörper-Reaktivität zu anderen FH-Familienmitgliedern erweitert werden können. Besonders die Überprüfung einer möglichen Kreuzreaktion mit FHR-4 wäre sinnvoll gewesen, da zwischen FHR-3 und FHR-4 die höchste Homologie besteht (s.o.). Bisher steht FHR-4 weder in rekombinanter Form noch aus Serum isoliert zur Verfügung. Daher musste auf diese Untersuchung leider verzichtet werden. Die Immunoblot-Untersuchungen zeigten jedoch, dass keiner der hergestellten FHR-3-Antikörper nennenswerte Kreuzreaktivität mit anderen FH-Familienmitgliedern im Serum aufweist.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Defizienz von FHR-3 und FHR-1 gekoppelt auftritt, war es von Bedeutung, dass das zu etablierende Messverfahren keine Kreuzreaktion zu FHR-1 aufweist, da ein für FHR-3 hochspezifisches Nachweisverfahren angestrebt wurde. In diesem Zusammenhang war die Analyse der Homologierate innerhalb der FH-Familie sehr aufschlussreich, da sie verdeutlichte, dass FHR-1 die geringste Ähnlichkeit zu FHR-3 besitzt. Obwohl wir auf die Reaktivitätsanalyse der Antikörper mit anderen FH-verwandten Proteine verzichten mussten, können wir trotzdem von einer hohen FHR-3-Spezifität des ELISA-Testverfahrens ausgehen, da Kreuzreaktivitäten mit anderen Mitgliedern der FH-Familie im Plasma mit einer zuverlässigen Detektion von selektiven FHR-3-Defizienzen ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$) nicht vereinbar gewesen wäre.

Vor der Anwendung des Testes wurde dessen Präzision durch die Optimierung der Reaktanden-Konzentrationen und Inkubationszeit gesteigert. Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmalig ein spezifisches Messverfahren zur Quantifizierung von FHR-3 im Plasma etabliert werden, welches es ermöglicht, in kurzer Zeit Blutproben auf ihren Gehalt an FHR-3 zu untersuchen und dabei FHR-3-Defizienzen zuverlässig zu identifizieren.

Dieses Testverfahren wurde zur Analyse von zwei unterschiedlichen Studienpopulationen angewendet. Die erste Kohorte bestand aus 141 gesunden Blutspendern, über die außer Alter und Geschlecht keine weiteren Informationen vorhanden waren. Diese Studienpopulation diente der Etablierung eines Normwertes für FHR-3 im menschlichen Blut. Weiterhin wurde der Fragestellung nachgegangen, ob sich geschlechts- oder altersspezifische Unterschiede der FHR-3-Konzentrationen finden lassen. Neben dieser quantitativen Analyse sollte die Häufigkeit einer FHR-3-Defizienz in einer gesunden Normalpopulation bestimmt werden.

Die zweite Kohorte bestand aus 92 AMD-Patienten sowie 65 fundoskopisch unauffälligen Kontroll-Probanden, die hinsichtlich Alter, Geschlecht, Rauchgewohnheiten und anderer klinischer Parameter mit den AMD-Patienten vergleichbar waren. Diese Studienpopulation wurde bereits im Rahmen vorangegangener Studien auf genetische sowie andere klinische Parameter untersucht. Diese vorhandenen Daten wurden genutzt, um Korrelationen zwischen FHR-3 und anderen Komplementproteinen sowie genetische Konstellationen auszuwerten. Des Weiteren wurde der FHR-3-Spiegel sowie das Auftreten einer FHR-3-Defizienz der Studienteilnehmer bestimmt, um Unterschiede in den Subgruppen zu identifizieren.

Die Rolle von FHR-3 als diagnostischer Parameter bei AMD und anderen Erkrankungen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation gelang es mit Hilfe des neu etablierten Testverfahrens erstmalig, einen Normbereich für die FHR-3-Plasmakonzentration ($28 \mu\text{g/ml} \pm 14 \mu\text{g/ml}$) zu etablieren (Tab. 4.7). Diesem Zweck diente die Kohorte der gesunden Thrombozytenspender. Dieser Normwert wurde mit denen anderer FH-Familienmitglieder verglichen, soweit diese in der Vergangenheit bestimmt wurden. Bisher bekannt sind die FH- (116 - 562 $\mu\text{g/ml}$) und die FHR-1-Konzentration (70 – 100 $\mu\text{g/ml}$) in Serum (Heinen et al. 2009). Derartige quantitative Aussagen sind wichtig für eine Einschätzung der patho-/physiologischen Bedeutung der verschiedenen FH-Familienmitglieder, da diese nach aktuellen Überlegungen um die Bindung an dieselben Substratproteine konkurrieren. Die Tatsache, dass die Größenordnung des durch uns festgelegten FHR-3-Normbereiches mit denen der anderen verwandten Proteine übereinstimmt und außerdem vorangegangene semiquantitative Abschätzungen des FHR-3-Gehaltes mittels Immunoblot bestätigt, spricht für die Aussagefähigkeit des neu etablierten Messverfahrens. Die Konzentrationsschwankungen sind auf physiologische, biologische und intraindividuelle Faktoren zurückzuführen. Ebenso könnte Heterozygotie hinsichtlich der FHR-3-Defizienz den Plasmagehalt beeinflussen.

Innerhalb unserer Studienpopulation konnten 5 homozygote FHR-3-defiziente Spender (3,5%) identifiziert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit aktuellen Genotypisierungs-Studien überein, die die Häufigkeit einer FHR-3-Defizienz in homozygoter Form bei 2,6% angesiedelt hatten (Spencer et al. 2007).

Die Verteilung der FHR-3-Konzentrationen aller Probanden zeigte keine deutlichen Unterschiede an, die eine Erkennung von heterozygoten Spendern möglich gemacht hätte. Dementsprechend kann darauf geschlossen werden, dass das Vorliegen einer Heterozygotie für eine FHR-3-Defizienz keinen nachhaltigen Einfluss auf die Höhe der Plasmakonzentration hat. Um den Einfluss einer FHR-3-defizienten Heterozygotie auf FHR-3-Plasmaspiegel eindeutig zu bestimmen, hätte der Genotyp der Spender bekannt sein müssen. Diese Daten wurden jedoch nicht erhoben.

Hingegen fiel bei dieser Auswertung auf, dass der FHR-3-Gehalt derselben Spender, denen teilweise wiederholt Blut abgenommen wurde, intraindividuellen Schwankungen unterlag. Daraus ergab sich die Fragestellung, wie stabil die FHR-3-Konzentrationen im Serum sind. Zur Untersuchung einer möglichen tagesabhängigen Schwankung wurde mehreren Probanden (mehrmals) täglich Blut abgenommen und die darin befindliche FHR-3-Konzentration bestimmt.

Als wesentliches Resultat ergaben sich Abweichungen der FHR-3-Konzentrationen zwischen minimal 17% und maximal 34% bei mehrmaliger Blutabnahme bei den einzelnen Spendern. Alle Blutabnahmen zusammen betrachtet zeigten einen mittleren Streuungswert von 25%. Als Ursachen einer tagesabhängigen Schwankung der FHR-3-Konzentration können folgende Gründe diskutiert werden:

Da FHR-3 hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird (Fritsche et al. 2010), ist es plausibel, dass Faktoren, die die Leberfunktion beeinflussen, ebenfalls Auswirkungen auf den FHR-3-Spiegel im Blut haben könnten. Zu nennen sind an dieser Stelle infektiöse Lebererkrankungen (Hepatitis), Leberfibrose oder eine Leberzirrhose. Viele Komplementproteine sind Akute-Phase-Proteine, deren Serumspiegel durch inflammatorische Stimuli beeinflusst werden- dies könnte auch auf FHR-3 zutreffen.

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass FH und FHR-3 hoch korrelieren (s. statistische Auswertung der AMD-Kohorte), haben vermutlich die gleichen Einflussfaktoren, die für FH identifiziert worden sind (Esparza-Gordillo et al. 2004), einen Effekt auf die Generierung von FHR-3. Zu diesen Einflussgrößen gehören das Rauchen, das Alter und das Geschlecht.

Tatsächlich fanden wir in dieser Studie deutliche Hinweise auf geschlechtsspezifische Unterschiede in den FHR-3-Konzentrationen unserer Probanden (Abb. 4.25). Möglicherweise sind diese Unterschiede hormonell (z.B. durch unterschiedliche

Östrogenspiegel) bedingt. Kurzfristige intraindividuelle Schwankungen der FHR-3-Serumkonzentrationen können dadurch aber nicht erklärt werden.

Bei der Untersuchung der zweiten Kohorte, bestehend aus AMD-Patienten und altersangeglichenen Kontrollprobanden, wurde der Fragestellung nachgegangen, ob sich die FHR-3-Konzentrationen und die Häufigkeit einer FHR-3-Defizienz innerhalb der beiden Populationen unterscheiden. So sollte geprüft werden, ob lediglich die FHR-3-Defizienz AMD-protektiv wirkt, oder ob bei gesunden Studienteilnehmern im Vergleich zu AMD-Patienten auch (signifikant) niedrigere FHR-3-Konzentration festgestellt werden können. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Blutproben von Patienten in Anfangsstadien (Drusen) der Erkrankung einen anderen FHR-3-Gehalt aufweisen, als solche von Patienten in fortgeschrittenen Stadien, die FHR-3-Konzentration also den Krankheitsfortschritt widerspiegelt. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den erkrankten und den gesunden Studienteilnehmern. Auch zwischen den einzelnen AMD-Subtypen (CNV, GA, DR) ließen sich keine signifikanten Abweichungen in der FHR-3-Konzentration feststellen. Möglicherweise war die Probandenanzahl für den Nachweis eines schwachen Effektes nicht ausreichend.

Die Analyse der Häufigkeit einer FHR-3-Defizienz identifizierte einen entsprechend Defizienten unter den AMD-Studienteilnehmern ($n=1$, 1,1%) (Tab. 4.7). Dieses Resultat stimmt mit vorangegangenen Genotypisierungs-Studien überein, die eine Häufigkeit der FHR-3-Defizienz bei 0,8% der AMD-Patienten aufdeckten (Spencer et al. 2008). Verglichen mit der Kohorte der Thrombozytenspender, bei denen eine FHR-3-Defizienz bei 3,5% der Probanden gefunden werden konnte, replizieren unsere Ergebnisse die derzeit aktuelle Theorie, dass eine FHR-3-Defizienz bei gesunden Kontrollen häufiger als bei AMD-Patienten vorkommt. Dementsprechend schützt eine FHR-3-Defizienz offenbar vor der Manifestation der AMD.

Die AMD-Studienpopulation wurde im Rahmen einer vorangegangenen Studie zur Rolle des Komplementsystems bei der Entstehung der AMD auf klinische, laborchemische und genetische Parameter eingehend untersucht (Scholl et al. 2008). Im Vorfeld dieser Studie wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass sich die Patienten und die gesunden Kontrollen in Alter, Geschlecht und Nicht-Raucher-Eigenschaften ähnelten. Die Plasma-Konzentrationen einzelner Komplement-Komponenten (Komplement-Aktivierungsprodukte Ba, C3a, C5a, Substrat-Proteine C3, C4, Faktor B und Komplement-Regulatoren Faktor H und Faktor D) wurden mit Hilfe von ELISA-Nachweisverfahren gemessen.

Im Rahmen dieser vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass die Plasma-Konzentration verschiedener Komplementaktivierungsprodukte bei der AMD-Population im

Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht ist (Scholl et al. 2008, Börncke et al. 2011). So wurden bei den Erkrankten signifikant erhöhte Konzentrationen von Faktor B und Faktor D beobachtet. Des Weiteren fielen sie im Vergleich zu den Kontrollen durch erhöhte Konzentrationen von Parametern der chronischen Komplementaktivierung, Ba und C3a, auf. Zusammenfassend resultierte aus dieser Studie, dass es sich bei der AMD um eine Systemerkrankung mit erhöhtem Komplement-Umsatz und lokaler Krankheitsmanifestation an der Macula handelt. Die Befunde ergaben insbesondere einen Hinweis auf eine Aktivierung von Komplementproteinen, die dem alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems zugerechnet werden. Diese Befunde konnten in einer weiteren Studie mit einer AMD-Kohorte aus Rochester (USA) repliziert werden (Hecker et al. 2010).

Es war daher ein weiteres Ziel der vorliegenden Dissertation, die Datenbasis um den FHR-3-Gehalt bei den untersuchten Patienten zu erweitern und mögliche Zusammenhänge zwischen FHR-3 und den zuvor bestimmten Komplementparametern zu ermitteln.

Hier zeigte sich, dass der FHR-3-Gehalt im Plasma der Studienteilnehmer mit dem FH-Gehalt signifikant korreliert ($p=0,015$). Zusammen mit der funktionellen Verwandtschaft beider Proteine und der Lokalisation auf einem gemeinsamen *Gen-Cluster* deutet dieser Befund auf eine gekoppelte Regulation der Serumspiegel beider Komplementproteine hin.

Es fand sich weiterhin eine positive signifikante Korrelation ($p=0,013$) zwischen dem FHR-3- und Faktor-D-Gehalt derselben Probanden. Diese Beobachtung erklärt sich vermutlich ebenfalls über die an FH-gekoppelten FHR-3-Serumkonzentrationen, da zuvor bereits berichtet worden war, dass Faktor-H- und Faktor-D-Konzentrationen eng korreliert sind (Scholl et al. 2008). Bislang ist die Erhöhung des FD-Spiegels bei AMD-Patienten unverstanden. Erhöhte Serum-Spiegel von FD finden sich häufig bei niereninsuffizienten Patienten. Da bei der Zusammenstellung der Kohorte (Tab. 4.6) allerdings auf normale Nierenfunktionsparameter (Kreatinin und Cystatin C) geachtet wurde, scheidet eine renale Ursache für die erhöhte FD-Konzentration aus.

Außerdem kam die Auswertung der AMD-Studienkohorte zu dem Ergebnis, dass eine positive signifikante Korrelation zwischen der FHR-3-Konzentration und Konzentrationen der chronischen Komplementaktivierungsprodukte Ba ($p=0,0003$) und C3a ($p=0,012$) besteht. Ba gilt als zuverlässiger Marker für chronische Komplementaktivierung über den alternativen Komplementaktivierungsweg. In der vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass Ba in den vorliegenden AMD-Blutproben im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht ist (Scholl et al. 2008). Die positive signifikante Korrelation von FHR-3 und Ba kann als Hinweis auf einen möglichen komplementregulatorischen Einfluss von FHR-3 auf die Kontrolle der Alternativweg-Aktivierung und somit auf die Generierung der FB-Spaltprodukte gewertet werden. Die Tatsache, dass zwischen Faktor B und FHR-3 keine Korrelation besteht, spricht

dafür, dass FHR-3 eher auf der Ebene des Substratumsatzes Einfluss auf die Bakonzentration nimmt.

Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass die FHR-3/FHR-1-Defizienz unabhängig von den bisher bekannten FH-Polymorphismen auftritt. Ursächlich ist ihre getrennte Lokalisation auf dem RCA *Gen-Cluster*. Der SNP rs2274700 wurde als protektive und der SNP rs1061170 als Risiko-Variante identifiziert. Aus unserer Analyse resultierte, dass die FHR-3-Konzentration der Subpopulation rs1061170 mit den ermittelten Normwerten für FHR-3 (28 µg/ml) übereinstimmt. Hingegen fiel der protektive Haplotyp (rs2274700) durch eine erniedrigte FHR-3-Konzentration auf. Allerdings ist unsere zur Verfügung stehende Subpopulation mit 14 Probanden zu klein, um zu verlässlichen Aussagen zu kommen.

Somit konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein spezifisches Messverfahren zur Quantifizierung und Feststellung der Häufigkeit von FHR-3 etabliert werden. Die Zuverlässigkeit und die Aussagefähigkeit dieses Testverfahrens konnten sichergestellt werden. Zudem ist es möglich, in kurzer Zeit viele Blutproben auf ihren FHR-3-Gehalt zu testen. Ein klinisches Anwendungsbeispiel wird mit der Untersuchung von AMD-Patienten in dieser Arbeit vorgelegt. In Zukunft könnte dieser Test weiterhin bei Patienten mit atypischem Hämolytisch-Urämischen Syndrom (aHUS) angewandt werden, weil eine FHR-3-Defizienz ebenfalls das aHUS-Erkrankungsrisiko beeinflussen soll (Moore et al. 2010). Weitere potentielle Anwendungsgebiete sind andere mit Veränderungen des Komplementsystems einhergehende Krankheitsbilder, wie z.B. die Membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II (MPGNII) (Dragon-Durey et al. 2003).

Zusammenfassend zeigte die Analyse der AMD-Studienpopulationen, dass sich die Quantifizierung von FHR-3 für diagnostische oder prognostische Zwecke hinsichtlich des AMD-Erkrankungsrisikos nicht unmittelbar eignet. Bei der Gegenüberstellung der von uns untersuchten AMD-Studienpopulation mit einer Kontrollpopulation gesunder Thrombozytenspender konnte zwar der zuvor erhobene Befund, dass die absolute FHR-3-Defizienz bei AMD-Patienten seltener gefunden wird, repliziert werden - die mittlere FHR-3-Plasmakonzentration in den beiden untersuchten Kohorten unterschied sich jedoch nicht. Bei Berücksichtigung der hier beobachteten starken intraindividuellen Schwankungen, reicht die einmalige Bestimmung von FHR-3-Plasmakonzentrationen zum Nachweis eines möglicherweise nur schwachen FHR-3-Effekts in dieser Studienpopulation wahrscheinlich nicht aus. Außerdem muss bedacht werden, dass die FHR-3-Defizienz zugleich mit einer Defizienz an FHR-1 einhergeht. Möglicherweise könnten Effekte niedriger FHR-3-Plasmakonzentrationen durch gleichzeitig höhere FHR-1-Spiegel kompensiert werden. FHR-1-Konzentrationen wurden in der aktuellen Studie nicht erhoben. Die Rolle von FHR-1 bei AMD sollte in Folgestudien adressiert werden.

6. Zusammenfassung

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache für eine Erblindung in fortgeschrittenem Lebensalter. Die Pathogenese der Erkrankung ist komplex und beinhaltet eine deutliche genetische Komponente. Im Jahre 2005 haben mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander eine Variante des Gens für den Komplementregulator Faktor H (FH) als genetischen Risikofaktor für die AMD identifiziert. In den Folgejahren wurden weitere polymorphe Variationen in Komplementgenen mit dieser Erkrankung in Zusammenhang gebracht. Eine vollständige Defizienz der FH-verwandten Proteine FHR-1 und FHR-3 schützt offenbar vor der AMD-Manifestation, indem FHR-1 und FHR-3 mit dem stärker komplementinhibitorischen FH-Protein gemeinsam um die Bindung an C3b konkurrieren. Der vorliegenden Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass nicht nur eine absolute FHR-3-Defizienz bei AMD-Patienten seltener gefunden wird, sondern möglicherweise auch relative FHR-3-Plasmaspiegel bei dieser Erkrankung verändert sind. Es sollten methodische Voraussetzungen für die FHR-3-Quantifizierung geschaffen und auf geeignete Studienpopulationen angewandt werden.

Mittels Hybridomtechnologie wurden zehn verschiedene FHR-3-spezifische monoklonale Antikörper generiert und eingehend charakterisiert. Zwei dieser Antikörper wurden ausgewählt, um ein spezifisches und ausreichend sensitives Messverfahren (*Sandwich-ELISA*) zur Quantifizierung von FHR-3 in Untersuchungsproben zu etablieren.

Unter Anwendung auf eine Studienpopulation gesunder Blutspender (n=141) konnte erstmalig ein Normwert für FHR-3 ($28 \mu\text{g/ml} \pm 14 \mu\text{g/ml}$) im menschlichen Plasma definiert werden. 3,5% der Spender waren FHR-3-defizient. Es wurde ferner dokumentiert, dass FHR-3-Plasmakonzentrationen deutlichen intraindividuellen Schwankungen unterliegen.

Bei der Untersuchung von AMD-Patienten (n=92) und altersangeglichenen Kontroll-Probanden (n=65) fand sich kein signifikanter Unterschied in den FHR-3-Konzentrationen. Auch bei Analyse der unterschiedlichen AMD-Subpopulationen (CNV, GA und DR) zeigten sich keine Unterschiede. Es bestätigte sich, dass die FHR-3-Defizienz bei AMD-Patienten (1,1%) im Vergleich zu Gesunden seltener auftritt und somit offenbar vor der Manifestation einer AMD schützt.

Die FHR-3-Konzentration im Plasma korrelierte signifikant mit der Faktor-H-Konzentration sowie weiteren Komplementparametern (FD, C3a, Ba). Frauen wiesen einen signifikant höheren FHR-3-Plasmaspiegel auf als Männer.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmalig ein Testverfahren (ELISA) etabliert werden, das für die Quantifizierung von FHR-3 und zum Nachweis einer FHR-3-Defizienz im Serum geeignet ist. In Zukunft könnte es Anwendung finden in der Untersuchung von Erkrankungen, die mit Änderungen von FH/FHR-3 assoziiert sind.

7. Literaturverzeichnis

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, 2224-2232

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, 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, 95-112

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, 25168-25175

Becherer JD, Alsenz 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, 1787-1794

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, 3342-3348

Börncke F (2011): Funktionelle Charakterisierung der mit altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) assoziierte Komplementfaktor-H-Variante Y402H. Med. Dissertation, Göttingen

Brandt E (1993): Charakterisierung funktionell relevanter Epitope auf Faktor H des Komplementsystems mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Med. Dissertation, Göttingen

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, 1442-1447

Carroll MC (2004): The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol* 5(10), 981-986

Donoso LA, Vrabec T, Kuivaniemi H (2010): The Role of Complement Factor H in Age-related Macular Degeneration: A review. *Surv Ophthalmol* 55, 227-246

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, 787-95

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, 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, 77-82

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, 799-802

Flierman R, Daha MR (2007): The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology* 212, 363-70

Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, Keilhauer C, Oppermann M, Pandey M, Köhl J, Zipfel PF, Weber BHF, Skerka C (2010): An imbalance of complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration *J Med Genet* 43, 582-589

Gasque P (2004): Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol.* 41, 1089-98

Gewurz H, Zhang XH, Lint TF (1995): Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol* 7, 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, 433-443

Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR (2004): Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351, 2805-16.

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, 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, 348-356

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, 7227-7232

Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Noureddine 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, 419-421

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, 209-215

Heinen, S., A. Hartmann, N. Lauer, U. Wiehl, H. M. Dahse, S. Schirmer, K. Gropp, T. Enghardt, R. Wallich, S. Halbich, M. Mihlan, U. Schlotzer Schrehardt, P. F. Zipfel, and C. Skerda (2009): Factor-H related Protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* 114, 2439-2447

Huang SJ, Costa DL, Gross NE, Yannuzzi LA (2003): Peripheral drusen in membranoproliferative glomerulonephritis type II. *Retina* 23, 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, 1173-1177

Jager RD, Mieler WF, Miller JW (2008): Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 358, 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, 819-825

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, 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, 2324-2330

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, 27657-27662

Józsi M, Heinen S, Hartmann A, Ostrowicz CW, Hälbich 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, 170-177

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, 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, 1548-1550

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

Kim DD, Song WC (2006): Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 118, 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, 385-389

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, 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, 5663-5670

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

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, 4821-4832

Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, Keilhauer C, Oppermann M, Pandey M, Köhl J, Zipfel PF, Weber BHF, Skerka C (2010): An imbalance of complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration *J Med Genet* 43, 582-589

Lotery A, Trump D (2007): Progress in defining the molecular biology of age related macular degeneration. *Hum Genet* 122, 219-236

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, 41-52

Mollnes TE, Jokiranta TS, Truedsson L, Nilsson B, Rodriguez de Cordoba S, Kirschfink M (2007): Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol* 44, 3838-3849

Moore I, Strain L, Pappworth I et al. (2010): Association of factor H autoantibodies with deletion of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical haemolytic uremic syndrome. *Blood* 115, 379-387

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, 835-846

Nilsson UR, Müller-Eberhard HJ, (1965): Isolation of beta1F-globulin from human serum and its characterisation 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, 353-363

Oran AE, Iseman 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, 5120-5130

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

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

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, 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, 424-428

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

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD (2010): Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11

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, 355-367

Rodríguez de Córdoba S, Goicoechea de Jorge E, (2007): Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol* 151, 1-13

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, 1419-1431

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, 1285-1295

Schmid-Kubista, K.E., N. Tosakulwong, Y. Wu, E. Ryu, L.A. Hecker, K.H. Baratz, W.L. Brown, A.O. Edwards (2009): Contribution of Copy Number Variation in the Regulation of Complement Activation Locus to Development of Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 5070-5079

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, 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, e2593

Seddon JM, Chen CA (2004): The epidemiology of age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin* 44, 17-39

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, 1793-1800

Seddon JM, Reynolds R, Rosner B (2010): Association of smoking, body mass index, dietary lutein, and the LIPC genetic variant rs10468017 with advanced age-related macular degeneration. *Molecular Vision* 16, 2412-2424

Shams N, Ianchulev T (2006): Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin North Am* 19, 335-344

Sim RB, DiScipio RG (1982): Purification and structural studies on the complement-system control protein beta 1H (Factor H). *Biochem J* 205, 285-293

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, 3398-3406

Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA, Haines JL. (2008): Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2008, 971-7

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

Stone EM, Sheffield VC, Hageman GS (2001): Molecular genetics of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2001, 2285-92.

Thurman JM, Holers VM (2006): The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol* 176, 1305-1310

Walport MJ (2001): Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344, 1058-1066

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 USA* 73, 3268-3272

Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, Bennett KL, Scholl HP, Charbel Issa P, Cano M, Brandstätter H, Tsimikas S, Skerka C, Superti-Furga G, Handa JT, Zipfel PF, Witztum JL, Binder CJ. (2011): Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 478, 76-81

Whaley K, Ruddy S (1976a): Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator. *Science* 193, 1011-1013

Whaley K, Ruddy S (1976b): Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med* 144, 1147-1163

Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrrecht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT (2007): Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 6, 553-61

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

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

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

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

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