Analyse und Expression der Komplementproteine Faktor H und Faktor I der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Thorsten Demberg
aus Hameln

Göttingen 2003

D7

Referent:	Prof. Dr. rer. nat. F. Mayer
Korreferent:	Prof. Dr. rer. nat. R. Hardeland
Tag der mündlichen Prüfung:	5.11.2003

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis: 5
Abkürzungsverzeichnis: 8
1 Einleitung 9
1.1 Das Immunsystem 9
1.1.1 Angeborene Immunität 11
1.2 Das Komplementsystem 11
1.2.1 Klassischer Aktivierungsweg 13
1.2.2 MBL-Aktivierungsweg 14
1.2.3 Alternativer Aktivierungsweg 15
1.2.4 Anaphylatoxine 16
1.2.5 Komplementregulatoren 17
1.3 Aufbau und Funktion des Faktor I 21
1.4 Aufbau und Funktion des Faktor H 24
1.5 Aufgabenstellung und Ziele dieser Arbeit 27
2 Material und Methoden 28
2.1 Reagenzien, Chemikalien und Kits 28
2.2 Verwendete Geräte 31
2.3 Lösungen und Puffer 33
2.4 Verwendete Primer 34
2.4.1 Mycoplasmen-Test-Primer: 34
2.4.2 Faktor H-Sondenprimer: 34
2.4.3 Faktor I-TOPO-D-Primer: 34
2.4.4 Faktor I-Gateway-Primer: 35
2.4.5 Faktor H-TOPO-D-Primer: 35
2.4.6 Faktor H-Gateway-Primer: 35
2.4.7 PACE-Primer: 36
2.4.8 Invitrogen pcDNA3.1TOPO-D-Vektorprimer: 36
2.4.9 Clontech λTriplEx-Vektorprimer: 36
2.4.10 Ratten Faktor I-Kontrollprimer: 37
2.4.11 Ratten Faktor H-Kontrollprimer: 37
2.5 Verwendete Vektoren 38
2.6 Zelllinien und Bakterien 41
2.6.1 Zelllinien 41
2.6.2 Bakterienstämme 44
2.7 Verwendete Restriktionsenzyme 45
2.8 Flüssigmedien für die Kultivierung von Mikroorganismen 45
2.8.1 LB-Medium (Luria-Bertani) 45
2.8.2 SOC-Medium 46
2.9 Medien für die Kultur von Mammalia-Zellen 46
2.9.1 80/20-Medium 46
2.9.2 80/20/10-Medium ± G418 46
2.9.3 DMEM (Dullbecco´s Modifiziertes Eagle Medium) ± G418 47
2.10 Antibiotika-Lösungen 47
2.11 RNA-Isolierung unter Verwendung eines Qiagen-RNA-Isolierungskits 48
2.12 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA 49
2.13 DNA-Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen-PCR-Aufreinigungs-Kit 49
2.14 DNA-Aufreinigung mittels TaKaRa-Minigelfiltrationssäulen 51
2.15 DNA-Aufreinigung mittels PEG-8000 (Eliminierung von DNA-Fragmenten <300bp) 51

2.16 Identifizierung der Rattenfaktor H-Sequenz ... 52
2.16.1 LB-Medium (Luria-Bertani) / LB-Platten ... 52
2.16.2 LB/TET-Platten / LB/TET/$MgSO_4$-Platten ... 52
2.16.3 LB/CARB-Platten ... 53
2.16.4 LB/KAN/CAM-Platten ... 53
2.16.5 Top-Agar ... 53
2.16.6 Vorbereiten der Bakterien-Stammkulturen ... 54
2.16.7 PFU (Plaque-Forming-Units)-Bestimmung ... 54
2.16.8 Auszählen des Anteils an rekombinanten Phagen ... 55
2.16.9 Ausplattieren und Abklatschen der Bakterienplatten (Vorbereitende Arbeitsschritte) ... 56
2.16.10 Herstellung der Faktor H-Sonde ... 56
2.16.11 Radioaktives Markieren der Faktor H-Sonde ... 58
2.16.12 Ausplatieren und Abklatschen der Bakterienplatten Teil B ... 59
2.16.13 Konversion des λTriplEx-Plasmid in ein pTriplEx-Plasmid ... 61
2.16.14 Miniplasmidpreparation nach SeqLab-Laccone ... 62
2.16.15 Midi-Plasmidpreparation mittels Qiagen High Speed Plasmid Kit ... 62
2.16.16 Sequenzieren der Plasmide ... 63
2.17 Immunaffinitätsaufreinigung der Rattenfaktoren H und I ... 66
2.18 Entwicklung des ELISA zur Detektion des Ratten FH ... 68
2.18.1 Immunisierung der Tiere ... 68
2.18.2 Antikörperaufreinigung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum mittels Protein A „Low Salt“ Methode ... 69
2.18.3 Aufbau des Ratten FH Sandwich-ELISA ... 70
2.18.4 Nachweis der Protease „Paired Aminoacid Clearing Enzyme“ (PACE) in den potentiellen Faktor I Expressions-Zelllinien ... 72
2.19 Rekombinante Herstellung der Ratten-Komplementproteine Faktor I und Faktor H ... 73
2.19.1 TOPO-D-Klonierung ... 73
2.19.2 “Gateway”-Klonierung ... 74
2.19.3 Fluoreszenzfärbung zur Vitalitätsbestimmung der für die rekombinante Herstellung verwendeten Zellen ... 78
2.19.4 Mycoplasmen-Test mittels PCR ... 80
2.19.5 Transfektion der Mammalia-Zellen mittels Elektroporation ... 81
2.19.6 Chemische Transfektion der Mammalia-Zellen ... 82
2.19.7 Calcium-Phosphat Transfektion ... 84
2.19.8 Etablierung der transfizierten Mammalia-Zellen als stabile Zelllinie ... 84
2.19.9 Adaption der adhärenten Zelllinien (FAO, H4IIE) und der adhärenten stabil-transfizierten Zelllinie (HEK293) an spezielle Zellkulturpartikel für eine Suspensionskultur ... 85
2.19.10 Kultivierung der auf den Microcarrierpartikeln adhärierten HEK293-Zellen in der Minipermanlage ... 86
2.19.11 Aufreinigung der rekombinanten Proteine ... 87
2.19.12 Zellaufschluss mit Triton X-114 ... 90
2.19.13 Proteinbestimmung nach Lowry (Mikromethode) ... 90
2.19.14 Trichloressigsäure-(TCA)-Fällung ... 91
2.19.15 SDS-PAGE ... 93
2.19.16 Immunblot ... 94
2.20 Glycoprotein-Nachweis mit der PAS-Färbung ... 95
2.21 Silberfärbung der aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch gereinigten Proteine Faktor H und Faktor I im SDS-Gel ... 97
2.22 Expression des FH(SCR1-4) in SF21-Insektenzellen ... 97

2.22.1 Aufreinigung des rekombinanten FH(SCR1-4) mittels MagneHis™ Nickelmagnetpartikeln aus SF21-Zellen und Zellkultur-überstand 99
2.23 Komplement-Hämolysetest des klassischen Weges (CH_{50}-Test) 100
2.24 Komplement-Hämolysetest des alternativen Weges ($APCH_{50}$) 102
3 Ergebnisteil 105
3.1 Identifizierung der Primärstruktur des Ratten FH 105
3.1.1 PCR-Validerung FH-positiver Phagenspots 105
3.1.2 Identifizierung der Rattenfaktor H Gesamtnukleotidsequenz 107
3.1.3 Vergleich der Faktor H Aminosäuresequenzen aus Mensch, Maus und Ratte 110
3.2 Generierung von PCR-Amplifikaten für die Einklonierung des Faktor H und des Faktor I 113
3.3 Überprüfung der FH(SCR1-7)- und FI-Plasmidkonstrukte 115
3.3.1 Verdau der Faktor H und der Faktor I TOPO-D-Klone 115
3.3.2 Verdau der pENTR-FH-Klone 116
3.3.3 Verdau der FH12.2-Klone 118
3.4 Transfektion von Mammalia-Zellen mit den ersten sieben Domänen des Rattenfaktor H 119
3.4.1 Analyse der „Green Fluorescent Protein“ (GFP)-kontroll-transfizierten Zellen 120
3.4.2 Durchmusterung der mit Faktor H(SCR1-7) transfizierten HEK293-Zellen. 122
3.4.3 Aufreinigung des rekombinanten Ratten FH(SCR1-7) aus den Überständen von HEK293-Zellen mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie 123
3.4.4 Nachweis des rekombinanten, mittels Strep-Tag-Affinitätschromatographie gereinigten FH(SCR1-7) aus den Zellkulturüberständen von HEK293- und Mono-Mac-6-Zellen 124
3.5 N-terminale Ansequenzierung des in HEK293-Zellen rekombinant hergestellten FH(SCR1-7) 127
3.6 Kultivierung der mit dem FH(SCR1-7) transfizierten HEK293-Zellen auf Suspensionskulturpartikeln (Microcarrier-Partikel) 128
3.7 Immunaffinitätschromatographische Aufreinigung des Faktor H aus Rattenserum 130
3.7.1 Analyse der FH-Elutionsfraktionen nach immunaffinitätschromatographischer Aufreinigung in der Silberfärbung 130
3.8 Untersuchung des polyklonalen anti-Ratten FH Antikörpers (aus dem Kaninchen) und des monoklonalen anti-Ratten FH Antikörpers (mAK 4-7D) (aus der Maus) im Immunblot 131
3.9 Untersuchung des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH und des rekombinanten FH(SCR1-7) auf Glykosylierung mittels der PAS („Periodic Acid Schiff“)-Färbung 133
3.10 Expression der ersten vier Domänen des Ratten FH in SF21-Insektenzellen 135
3.10.1 PAS-Färbung des in SF21-Insektenzellen hergestellten Ratten FH(SCR1-4) 137
3.11 Größenvergleich des FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) jeweils unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen im Immunblot 138
3.12 Immunaffinitätschromatografische Aufreinigung des Ratten Faktor I aus Serum 139
3.12.1 Analyse des immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FI in der Silberfärbung 140
3.12.2 Analyse des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI in der Coomassieblau-Färbung 141
3.12.3 Untersuchung des aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI auf Glykosylierung mittels PAS-Färbung 142

3.12.4 Vergleich des selbst hergestellten monoklonalen anti-FI AK 15F11-2 mit dem selbst generierten polyklonalen anti-FI Antikörper aus dem Kaninchen und dem kommerziellen polyklonalen anti-humanen FI-Antikörper (kreuzreaktiv mit dem FI der Ratte) der Firma „The Binding Site“ im Immunblot 144
3.13 Nachweis des für die Prozessierung des FI wichtigen „Paired-Aminoacid-Cleaving“-Enzyms (PACE) 146
3.13.1 Untersuchung unterschiedlicher Zelllinien auf die Expression des PACE mittels RT-PCR 146
3.13.2 Nukleotidsequenzierung des PACE-Amplifikates zu seiner Identifizierung . 148
3.14 Nachweis von PACE-Aktivität bei der Prozessierung des FI mittels präzipitierter Zellkulturüberstände im Immunblot 149
3.15 Etablierung eines Sandwich-ELISA zur Quantifizierung des Faktor H der Ratte . 150
3.16 Einsatz der Komplement-inhibitorischen Faktoren im Komplement Hämolyse Test (CH_{50}) des klassischen Weges 152
3.16.1 Inhibition des Komplement Hämolyse Test (CH_{50}-Test) des klassischen Weges mit den rekombinant hergestellten FH(SCR1-7) und dem immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH 152
3.16.2 Inhibition des Komplement Hämolyse Test (CH_{50}) des klassischen Weges mit dem immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI 160
3.16.3 Inhibition des Komplement Hämolyse Tests (CH_{50}) des klassischen Weges mit den aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch gereinigten Faktoren I und H in Kombination 163
3.17 Weitere Ergebnisse 166
3.17.1 Einsatz der Komplement-inhibitorischen Faktoren im Komplement Hämolyse Test des alternativen Weges ($APCH_{50}$-Test) 166
3.17.2 Versuch des Aufbaus eines ELISA zur Quantifizierung des Ratten-FI 166
3.17.3 Versuchte Expression des Rattenfaktor I 167
4 Diskussion 168
4.1 Diskussion der Ratten FH-Sequenz 168
4.2 Rekombinante Expression des Ratten FI 170
4.3 Quantifizierung des FH im Rattenserum 172
4.4 Expression des Ratten FH(SCR1-7) in Mammalia-Zellen und des Ratten FH(SCR1-4) in Insektenzellen 173
4.5 Größenvergleich des FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und des FH(SCR1-4) nach Auftrennung im SDS-Gel unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen 174
4.6 Funktionen der isolierten FH(SCR1-20) und FI sowie der rekombinanten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) des klassischen Weges der Komplementaktivierung (CH_{50}-Test) 178
4.7 Nicht funktionierende Untersuchung der Komplement-inhibitorischen Faktoren im Hämolysetest zur Darstellung des alternativen Weges der Komplementaktivierung ($APCH_{50}$-Test) 182
4.8 Ausblick / Zukünftige Experimente 183
5 Zusammenfassung 185
6 Literaturverzeichnis 186

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Primäre Barrieren des menschlichen Körpers für die Pathogenabwehr. 10
Abb. 2: Aktivierung und Funktion der drei bekannten Komplementwege. 13
Abb. 3: Schematische Darstellung des alternativen Aktivierungsweges mit seinem „amplifikation-loop“ bis zur Bildung der C5 Konvertase. 16
Abb. 4: Funktionsschema einer Serinprotease am Beispiel des Chymotrypsins (Biochemistry Pathways 2000). 24
Abb. 5: Schematischer Aufbau des FH mit den Funktionen der einzelnen SCR innerhalb des Proteins. 26
Abb. 6: Vektorkarte des pEGFP-N1-Vektors der Firma Clontech. 38
Abb. 7: Vektorkarte des pcDNA3.1D/V5-His-TOPO Vektors der Firma Invitrogen. 39
Abb. 8: Vektorkarte des pDONR201-Vektors aus dem Gateway-Klonierungskit der Firma Invitrogen. 40
Abb. 9: Vektorkarte des pDEST12.2-Vektors aus dem Gateway-Klonierungskit der Firma Invitrogen. 41
Abb. 10: Schematischer Aufbau eines „Sandwich“-ELISA. 71
Abb. 11: Schematischer Ablauf der TOPO-D Klonierung (übernommen aus dem Invitrogen Manual). 74
Abb. 12: Schematischer Ablauf einer BP-Reaktion (übernommen aus dem Invitrogen Manual). 75
Abb. 13: Schema der LR-Reaktion (übernommen aus dem Invitrogen Manual). 78
Abb. 14: Schematischer Ablauf der Proteinaufreinigung mittels einer Strep-Tactin-Sepharose-Säule nach dem Handbuch der Firma IBA GmbH. 89
Abb. 15: PCR-Untersuchung der FH-Insertgröße in einer Auswahl positiver Klone. 106
Abb. 16: Nukleotidsequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz des Faktor H der Ratte. 109
Abb. 17: Alignment der Aminosäuresequenzen des Faktor H aus den Spezies Ratte, Maus und Mensch. 112
Abb. 18: Größenbestimmung der FH-TOPO-D-PCR-Fragmente im Agarosegel. 114
Abb. 19: Agarosegelelektrophoretische Analyse des gereinigten FI-PCR-Amplifikats. 114
Abb. 20: Kontrolle der Restriktionsanalyse im Agarosegel. 116
Abb. 21: Verdau der aus der „BP“-Reaktion erhaltenen FH-Klone. 117
Abb. 22: Restriktionsanalyse der „Gateway“ FH-Expressionsklone FH12.2-17 und FH12.2-19. 119
Abb. 23: GFP-transfizierte HEK293-Zellen nach 24 h. 120
Abb. 24: Zellen der Linien CaCo-2 und Mono-Mac-6 48 h nach der GFP-Transfektion mit Lipofectamin 2000. 121
Abb. 25: Immunblot verschiedener Zellkulturüberstände von FH(SCR1-7) transfizierten HEK293-Klonen. 122
Abb. 26: Untersuchung der Elutionsfraktionen des FH(SCR1-7) aus HEK293-Kulturüberstand nach der StrepTag Immunaffinitätschromatographie im Immunblot (A) mit korrespondierender Coomassieblau-Färbung (B). 123
Abb. 27: Darstellung von mittels Streptactinsäulen aufgereingtem FH(SCR1-7) aus dem Zellkulturüberständen von HEK293- und Mono-Mac-6-Zellen im Immunblot und in der Coomassieblau-Färbung. 125
Abb. 28: Immunblot mit rekombinantem FH(SCR1-7) und immunaffinitätschromatographisch gereinigtem FH nach Detektion mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin oder dem Kaninchen anti-FH pAK. 126
Abb. 29: Coomassieblau-Färbung und korrespondierender Immunblot der FH(SCR1-7) Präparationen, die für die Proteinansequenzierung verwendet wurden. 127

Abb. 30: Ergebnis der N-terminalen Proteinansequenzierung des FH(SCR1-7). 128
Abb. 31: Wachstumsverlauf der mit dem FH(SCR1-7) transfizierten HEK293-Zellen auf den Cytopore 2 Zellkulturpartikeln mittels FDA/Ethidiumbromid Doppelfärbung. 129
Abb. 32: Silberfärbung der FH-Elutionsfraktionen nach immunaffinitätschromato-graphischer Reinigung aus Rattenserum. 130
Abb. 33: Reinheitskontrolle der aus Kaninchenserum aufgereinigten IgG-Fraktion in der Coomassieblau-Färbung. 132
Abb. 34: Detektion des immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH und des im Serum enthaltenen FH mit dem polyklonalen AK aus dem Kaninchen (Bahn 1, 2) und dem monoklonalen mAK4-7D (Bahn 3, 4). 132
Abb. 35: PAS-Färbung des rekombinanten FH(SCR1-7) und des immunaffinitästchromatographisch gereinigten FH zur Analyse der Glykosylierung. . 134
Abb. 36: Erste Musterung der transduzierten SF21-Zellen auf eine rekombinante Expression des FH(SCR1-4). 135
Abb. 37: Nachweis des mittels Nickel-Chelat Chromatographie aufgereinigten FH(SCR1-4) aus SF21-Zellen im Immunblot. 136
Abb. 38: PAS-Färbung des in SF21-Zellen hergestellten FH(SCR1-4) zur Detektion einer möglichen Glykosylierung. 137
Abb. 39: Größenvergleich des FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen im Immunblot 138
Abb. 40: Dokumentation der Reinheit des FI mittels Silberfärbung in den Elutionsfraktionen nach immunaffinitätschromatographischer Reinigung. 140
Abb.41: Coomassieblau-Färbung und Immunblot des immunaffinitäts-chromatographisch aufgereinigten und im SDS-Gel aufgetrennten FI. 141
Abb. 42: Analyse des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen in der PAS-Färbung. 143
Abb. 43: Vergleich des selbst generierten mAK 15F11-2 mit dem selbst generierten polyklonalen Antikörper und dem kommerziellen polyklonalen Antikörper von „The Binding Site“ hinsichtlich der Erkennung von immunaffinitätschromatographisch gereinigtem FI unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen im Immunblot. 144
Abb. 44: Identifizierung PACE-spezifischer mRNA mittels RT-PCR verschiedener Zelllinien. 146
Abb. 45: Ansequenzierung der PACE-spezifischen Amplifikate aus H4IIE-Hepatom-zellen der Ratte, HIT-T15-Zellen aus dem Hamster und den HEK293-Zellen aus dem Menschen. 148
Abb. 46: Untersuchung der FI Prozessierung durch das PACE in den Zellkulturüberständen von FAO-, H4IIE- und HepG2-Zellen im Immunblot. 149
Abb. 47: Eichkurve des Ratten FH-Sandwich ELISA 151
Abb. 48: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten FH (Versuchsreihe 1) (Erythrozytencharge vom 13.5.2003). 153
Abb. 49: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten FH (Versuchsreihe 2) (Erythrozytencharge vom 3.6.2003). 155
Abb. 50: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten FH (Versuchsreihe 3) (Erythrozytencharge vom 22.7.2003). 156
Abb. 51: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den in HEK293-Zellen hergestellten FH(SCR1-7). 157
Abb. 52: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den in Mono-Mac-6-Zellen hergestellten FH(SCR1-7). 158
Abb. 53: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den in SF21-Insektenzellen hergestellten FH(SCR1-4). 159

Abb. 54: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FI (Versuchsreihe 1, Erythrozyten-charge vom 3.6.2003). 161
Abb. 55: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FI (Versuchsreihe 2, Erythrozyten-charge vom 22.7.2003). 162
Abb. 56: CH_{50}-Inhibitionsassay mit konstant vorgelegten 1,5 µg des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH (etwa 50%ige Inhibition) unter weiteren Zusatz von immunaffinitätschromatographisch gereinigtem FI. 163
Abb. 57: CH_{50}-Inhibitionsassay mit konstant vorgelegten 2,65 µg des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI (etwa 50%ige Inhibition) unter weiterem Zusatz von immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH. 165
Abb. 58: Schematische Darstellung der von Zipfel und Skerka vorgeschlagenen Struktur für den SCR 4 des FHL-1/Reconectin und des FH 177
Abb. 59: Schematischer Aufbau des FH mit den Funktionen der einzelnen SCR innerhalb des Proteins. 179

Abkürzungsverzeichnis:

µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di 3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	„Bovin serum albumin“/Rinderserumalbumin
CFA	„Complete Freund`s Adjuvant“
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EGTA	„Ethylene glycol-bis[β-aminoethylether]-N,N,N´,N´-tetraacetic acid“
EMBL	„European Molecular Biology Laboratory“
FDA	Fluoresceindiacetat
FCS	„Fetal Calf Serum“/Fetales Rinderserum
FHR	„Factor H related“
FHL	„Factor H Like“
g	Erdbeschleunigung
h	„hour“/Stunde/n
IFA	„Incomplete Freund`s Adjuvant“
IgG,	Immunglobulin der Klasse G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactoside
kDa	Kilodalton
LMW	„Low Molecular Weight“
mAK, pAK	monoklonaler Antikörper, polyklonaler Antikörper
M	Molar (mol/Liter)
mg	Milligramm
min	Minuten
mM	milimolar
MWM	„Molecular Weight Marker“
ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethyhlenglycol
s	Sekunden
SCR	„Short Consensus Repeat“
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethyleethylenediamine
TRIS	2-Amino-2 (hydroxymethyl)-aminoethan
TCA	„Trichloroacetic acid“
v	Volumen
w	„Weight“/Gewicht

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Unsere Umwelt enthält eine große Anzahl an infektiösen Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen, Protozoen), Viren und multizellulären Parasiten. Viele von ihnen können Krankheiten auslösen und unter bestimmten Bedingungen ihren Wirt töten. Die meisten Infektionen sind bei gesunden Menschen nur von kurzer Dauer und hinterlassen keine bleibenden Schäden. Dass die Infektion nur von kurzer Dauer ist, meistens nicht einmal wahrgenommen wird, und keine Schäden zurückbleiben, ist einem intakten Immunsystem zuzuschreiben.

Da pathogene Organismen in so unterschiedlichen Formen an den Wirt herantreten, benötigt dieser ein breites Repertoire an Immunantworten, um jeder Art von Infektion wirkungsvoll begegnen zu können.

Als erste Instanz gegen potentielle Eindringlinge besitzt unser Körper die Haut, die als externe mechanische Barriere ein wirkungsvoller Schutz vor den meisten Organismen ist. Viele Pathogene verschaffen sich jedoch Zutritt zu unserem Körper über die Epithelien des Gastrointestinal- oder Urogenitaltrakts. Andere wiederum infizieren den Nasopharynx oder die Lunge. Wenige Pathogene wie z.B. die Erreger von Malaria oder Hepatitis B können nur eine Infektion auslösen, wenn sie direkt in die Blutbahn gelangen. Für jeden Bereich des Körpers gibt es, wie in Abbildung 1 gezeigt wird, eine primäre Barriere. Dazu gehören z.B. muköse Oberflächen, Flimmerepithelien oder Oberflächen die durch extreme pH-Werte charakterisiert sind.

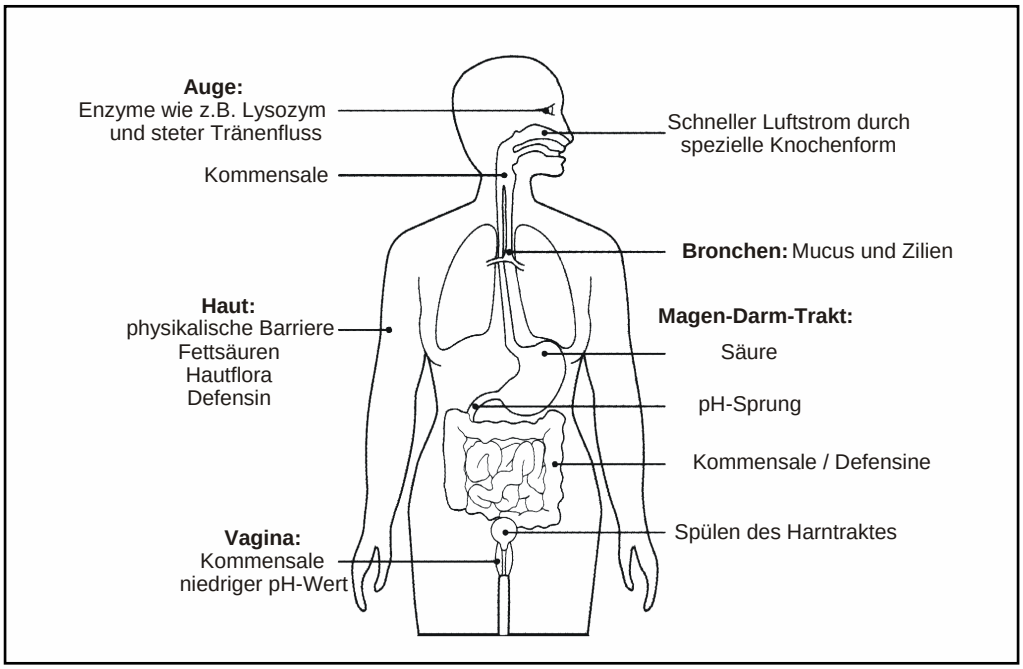


Abb. 1: Primäre Barrieren des menschlichen Körpers für die Pathogenabwehr.

Selbst die Mikroflora auf unserer Haut und ihr Säureschutzmantel sowie kommensale Bakterien im Gastrointestinaltrakt helfen uns, so dass sich pathogene Keime nur schwer oder gar nicht etablieren können.

Der Infektionsort und der Typus des Pathogens bestimmen, welche Immunantwort am effektivsten zur Pathogenbekämpfung eingesetzt wird. Der wichtigste Parameter für die Immunantwort ist, ob das Pathogen in die Wirtszellen eindringt und sich dort repliziert oder die Wirtszellen nicht penetriert. Alle Viren, einige Bakterien und Protozoen vermehren sich in Wirtszellen. Um diesen Infektionen Einhalt zu gebieten und sie final zu beseitigen, muss das Immunsystem in der Lage sein, die infizierten Zellen zu erkennen, um sie gezielt zu zerstören. Viele Bakterien und Parasiten leben in Geweben, Körperflüssigkeiten oder in extrazellulären Zwischenräumen, so dass eine sehr differenzierte Antwort auf diese Pathogene gefordert ist. Während des Verlaufs einer Infektion müssen z.B. intrazellulär lebende Pathogene zu ihren Wirtszellen gelangen und dabei den Blutstrom oder Gewebeflüssigkeiten passieren. In diesen Momenten sind sie für das Immunsystem, vor dem sie in ihren Wirtszellen weitestgehend geschützt sind, angreifbar.

Jede Immunantwort besteht aus
1. der Erkennung eines Pathogens
2. dem Versuch, dieses zu eliminieren.

Die Immunabwehr lässt sich grob in zwei Kategorien aufteilen; die angeborene und die adaptive (erworbene) Immunabwehr. Die wichtigsten Unterschiede zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität bestehen in der hohen Spezifität und dem „immunologischen

Gedächtnis“ der erworbenen Immunität. Die angeborene Immunität wird auf eine wiederkehrende Infektion nahezu mit gleicher Intensität antworten, wohingegen die adaptive Immunität auf wiederkehrende Infektionen gezielter und mit höherer Effizienz reagieren wird.

1.1.1 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität besteht aus einer zellulären und einer humoralen Komponente. Sie ist unspezifisch und verfügt über kein „immunologisches Gedächtnis“. Zu den löslichen Komponenten der humoralen angeborenen Immunität gehören Substanzen wie z.B. die Defensine, Lysozym, Granzyme sowie das Komplementsystem. Zu den zellulären Komponenten der angeborenen Immunität gehören z.B. die Granulozyten und die „Natural killer“-Zellen (NK-Zellen). Die langlebigen granulären Phagozyten entwickeln sich aus der so genannten mononukleären Phagozytenlinie, d.h. sie stammen alle von den gleichen Knochenmarksstammzellen ab. Ihre wichtigste Aufgabe ist die Entfernung von „Fremdpartikeln“, zu denen z.B. Bakterien, Parasiten, etc. gehören. Die Partikel werden aufgenommen, eingeschlossen, abgetötet und im Regelfall verdaut.

1.2 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus ca. 30 Serumproteinen und diversen zellulären Rezeptoren, die zuerst als hitzelabile Serumbestandteile entdeckt wurden. Zusammen machen sie etwa 10% des Gesamtserumproteins aus. Das Komplementsystem (KS) ist ein hoch effizientes Verteidigungssystem unseres Körpers und wird zu der angeborenen Resistenz („Innate Immunity“) gezählt. Dieses System ist phylogenetisch wesentlich älter als die Systeme der adaptiven Immunantwort. Die Funktionen, des Komplementsystems, umfassen die Initiation entzündlicher Reaktionen und der Chemotaxis, die Beseitigung von Immunkomplexen, die Zellaktivierung und die Abwehr von Bakterien, Pilzen und Viren.
Die Nomenklatur des Komplementsystems beruht auf der Reihenfolge der im Jahr 1938 vom Japaner Ueno experimentell herausgefundenen Bestandteile. Wie wichtig das Komplementsystem für unsere Gesundheit ist, lässt sich anhand der Symptome zeigen, an den Menschen leiden, denen durch genetische Defekte Komplementkomponenten fehlen. Patienten mit heriditärer C3-Komplementdefizienz leiden verstärkt an bakteriellen Infektionen. Personen, denen eine oder mehrere der terminalen Komponenten C5-C8 fehlten, entwickeln signifikant häufiger Neisserien-bedingte Infektionen wie z.B. bakterielle Meningitiden.

Für die Aktivierung des Komplementsystems sind bis heute drei Aktivierungswege bekannt. Allen Wegen gemeinsam ist die Aktivierung des C3-Proteins und der weitere Fortgang der Aktivierungskaskade. Die bekannten Aktivierungswege sind der klassische, der MBL- („Mannan-Binding Lectin“) und der alternative Weg. Jeder dieser Wege wird durch seine speziellen aktivierenden Pathogenoberflächen oder durch aktivierende Substrate initialisiert. Generell wird jedem Komplementweg eine eigene Aufgabe bei der Beseitigung der Pathogene zugeschrieben, die jedoch immer mit der Lyse bzw. der Abtötung des Pathogens endet.

Der klassische Weg ist phylogenetisch der jüngste Aktivierungsweg, da er durch Antikörperkomplexe aktiviert wird und somit einen Brückenschlag zwischen angeborener und der jüngeren adaptiven Immunität bildet. Seine Aufgabe ist die Opsonisierung von Pathogenen, damit Makrophagen sie leichter beseitigen können.

Der MBL-Weg wird durch Mannosereste auf Pathogenoberflächen aktiviert. Sein Ziel ist in Analogie zum klassischen Weg die Eliminierung von Pathogenen über den Membranangriffskomplex (MAC-Komplex) oder die Opsonisierung der Pathogene.

Die Existenz eines alternativen Aktivierungswegs gegenüber dem klassischen Weg wurde erstmalig von Pillemer et al. im Jahre 1954 beschrieben. Der Alternative Weg gilt als der „aggressivste“ der drei bekannten Wege, da er generell durch viele Pathogenoberflächen auf Viren und Bakterien aber auch durch künstliche Oberflächen wie Dialysemembranen und Schläuche etc. aktiviert werden kann.

Eine Übersicht über die Aktivierungswege zeigt Abbildung 2.

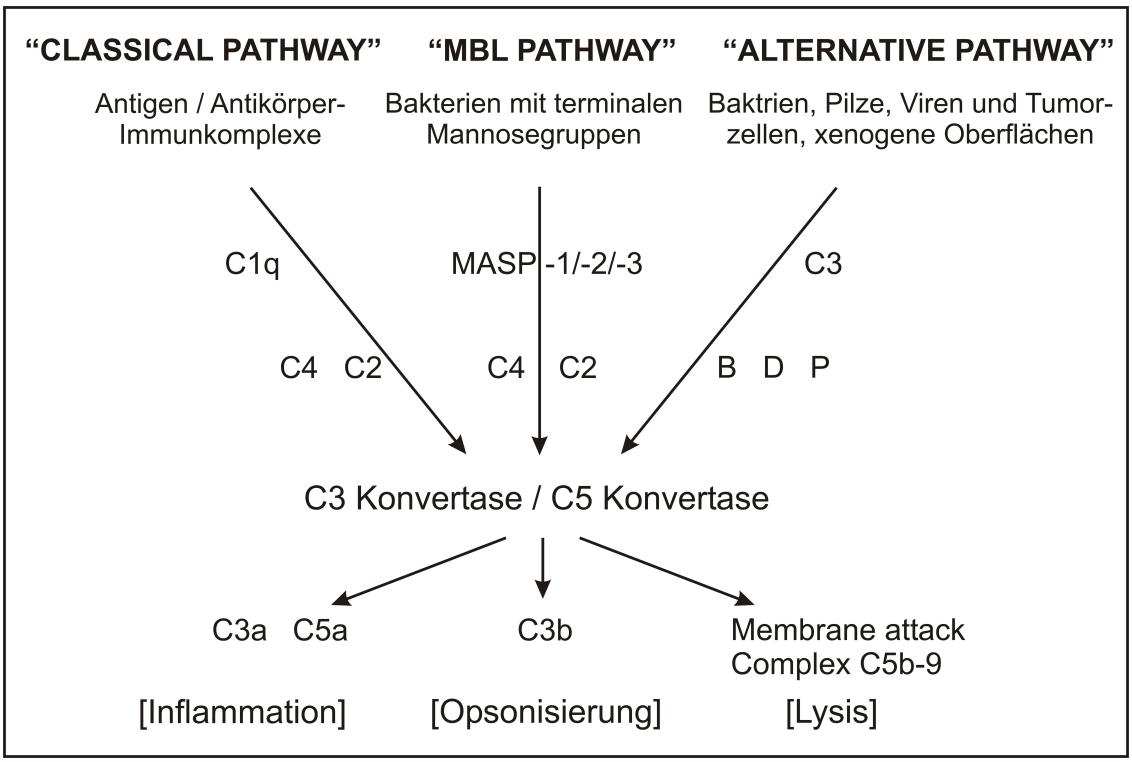


Abb. 2: Aktivierung und Funktion der drei bekannten Komplementwege.

1.2.1 Klassischer Aktivierungsweg

Der klassische, phylogenetisch jüngere Komplementweg ist der zuerst entdeckte Aktivierungsweg. Darauf ist seine Namensgebung nach dem Bekanntwerden der anderen Aktivierungswege (alternativer und MBL-Weg) zurückzuführen.

Der klassische Weg wird durch die direkte Bindung des C1q-Proteins an eine Pathogenoberfläche wie gramnegative Bakterien (CLAS und LOOS, 1981; LOOS, 1982), Viren (COOPER et al., 1976; EBENBICHLER et al., 1991) typischer weise jedoch durch die Bindung an einen Antigen-Antikörper-Komplex initialisiert. Über die Beteiligung von Antikörpern stellt der klassische Weg eine evolutionäre Verknüpfung zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar.

C1q ist ein Protein, welches aus sechs identischen Untereinheiten mit globulären Köpfen und langen Collagen-ähnlichen Schwänzen besteht. Die Schwänze sorgen in Kombination für die Komplexierung jeweils zweier Proteine C1r und C1s. Die Gesamtheit aus C1q und jeweils zweier C1r- und C1s-Proteine bilden den C1-Komplex $C1q(C1r{:}C1s)_2$ (STRANG et al., 1982). Das C1q-Protein ist ein calziumabhängiger, zuckerbindender Komplex, d.h. ein Lectin aus der Familie der Collectine. Durch die Bindung von mehr als einem Kopf des C1q im C1-Aggregat an einen Immunkomplex kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins C1q (GOLAN et al., 1982). Aufgrund dieser Änderung kommt es zu einer autokatalytischen

Aktivierung des C1r innerhalb des C1-Komplexes (DODDS et al., 1978). Das aktivierte C1r schneidet nun im benachbarten C1s ein Fragment heraus, wodurch das C1s-Protein zu einer aktiven Serinprotease modifiziert wird. Die Serinprotease C1s innerhalb des C1-Komplexes wirkt nun enzymatisch auf die nächsten beiden Proteine der Komplementaktivierungskaskade, das C4 und das C2. Das C4 wird durch C1s in das große C4b-Fragment und das kleine Anaphylatoxin C4a gespalten. Das C4b kann nun auf aktivierenden Oberflächen mit seiner reaktiven Acylgruppe an Hydroxyl- oder Aminogruppen binden. Dieses führt zu einer vermehrten Ablagerung von C4b in der Nähe des C1-Komplexes.

Gebundenes C4b fungiert als C2-Akzeptor. C2 wird gebunden und durch C1s gespalten. C2a ist das wegdiffundierende kleine Spaltungsfragment, wohingegen das C2b mit seiner Serinproteasefunktion einen Komplex mit dem C4b-Fragment eingeht. Damit ist der C4b2b-Komplex die aktive C3-Konvertase des klassischen Komplementaktivierungsweges.

Diese C3-Konvertase spaltet nun die C3-Komponente in das große Fragment C3b, welches auf der Pathogenoberfläche über seinen reaktiven Thioester kovalent bindet. Das C3a zählt wie das C5a zu den Anaphylatoxinen. Bei diesen handelt es sich um die kleinen Spaltprodukte C3a, C4a und C5a, die bei der Komplementaktivierung entstehen. Das C3b bindet kovalent an der Stelle der komplementaktivierenden Oberfläche, an der es entsteht. So werden ca. 240 C3b-Moleküle um einen C1q-Komplex herum abgelagert (OLLERT et al., 1994). C3b geht einen Komplex mit der C3-Konvertase ein, um einen vergrößerten Komplex aus C4b2b3b zu bilden. Dieser Komplex bildet die aktive C5-Konvertase des klassischen Komplementweges.

1.2.2 MBL-Aktivierungsweg

Der Mannose-bindendes-Lektin-Weg (MBL-Weg) verläuft größtenteils analog dem klassischen Weg. Es werden ebenso die C2-, C3- und die C4-Komponenten verwendet. Lediglich die Aktivierung verläuft anders. Der MBL-Weg wird nicht durch Immunkomplexe initialisiert.

Ähnlich dem C1q ist das MBL ein sechsköpfiges Molekül, das aus einem Komplex aus MASP („mannan-activated-serin-protease“)-1-, MASP-2- und MASP-3-Molekülen besteht. Analog dem klassischen Weg agieren auch MASP-1, MASP-2 und MASP-3. MBL wird nicht durch die Bindung an Immunkomplexe aktiviert, sondern durch die Bindung an Mannose-haltige Proteine oder durch entsprechende Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche von Bakterien oder der Hülle von Viren.

Nach Aktivierung und Deposition von C4b wird durch die MASPs ebenfalls C2 gespalten, und es bildet sich in Analogie zum klassischen Weg aus C4b2b die C3-Konvertase. Nach der

Spaltung von C3 ergibt sich durch die Komplexierung mit C3b wiederum analog dem klassischen Weg die aktive C5-Konvertase (C4b2b3b).

1.2.3 Alternativer Aktivierungsweg

Der alternative Komplementaktivierungsweg unterscheidet sich deutlich vom klassischen- und vom MBL-Weg. Er bedarf keiner besonderen Aktivierung, da er immer aktiv ist. Diese „Standby"-Aktivität ist allerdings sehr gering. Erst in Anwesenheit von aktivierenden Oberflächen wie z.B. Zellwänden gram-negativer Bakterien und Pilzzellwänden steigt die Aktivität sprunghaft an (PANGBURN und MÜLLER-EBERHARDT, 1984).
Die ständige minimale Aktivität beruht auf der Labilität der C3-internen Thioesterbrücke, die empfindlich für eine spontane Hydrolyse ist (PANGBURN et al., 1981). Durch diese Hydrolyse wird das C3 aktiviert (NICOL und LACHMANN, 1973). Dieses aktivierte C3 ($C3H_2O$) kann nun einen Komplex mit Faktor B eingehen, der nach der Komplexbildung gespalten wird. Das kleine Fragment Ba diffundiert davon, und die Komponente Bb geht in die „vorläufige" C3-Konvertase ($C3H_2OBb$) ein (PANGBURN et al., 1981). Diese Konvertase ist äußerst labil und „zerfällt" ebenso rasch wie sie sich gebildet hat. In der Nähe aktivierender Oberflächen ist sie jedoch in der Lage, weitere C3-Moleküle zu spalten. Das C3b lagert sich auf den aktivierenden Oberflächen ab und bildet dort mit dem Faktor B einen Komplex. Der Faktor B wird nun durch den Faktor D in Bb und Ba gespalten und der entstandene C3bBb-Komplex durch Properdin (P) stabilisiert. Die Halbwertszeit der C3-Konvertase C3bBb(P) des alternativen Wegs steigt von 1-2 min im Komplex mit Properdin auf durchschnittlich 18 min an (FEARON und AUSTEN, 1975). Die C3-Konvertase spaltet nun weiteres C3, so dass sich wiederum neu generiertes C3b auf der Pathogenoberfläche ablagert, einen Komplex mit Faktor B eingeht und zu weiteren C3bBb-Konvertasenkomplexen führen kann. Zwei Konvertasen spalten im Idealfall zwei weitere Moleküle C3 was zu weiteren C3-Konvertasen führen kann. So „schaukelt" sich das System in einer Kettenreaktion, dem so genannten „amplification loop", hoch. Dieser „amplification loop" führt dazu, dass in sehr kurzer Zeit erhebliche Mengen an C3b auf der aktivierenden Oberfläche abgelagert werden.
Lagert sich ein weiteres C3b an den Komplex C3bBb(P) an, ergibt sich ein neuer Komplex, der die C5-Konvertase des Alternativen Wegs bildet. Die C5-Konvertase C3bC3bBb(P) bindet und spaltet C5-Moleküle in das Anaphylatoxin C5a und das große Fragment C5b, welches ebenfalls auf der Pathogenoberfläche abgelagert wird. Mit der Ablagerung von C5b, welches nicht kovalent auf der Oberfläche bindet, wird die terminale lytische

Komplementsequenz eingeleitet. Dieser terminale Weg formt den so genannten MAC, den „membrane attack complex“. Hier laufen alle drei Komplementaktivierungswege zusammen.

Das C5b bindet ein C6-Molekül und ein C7-Molekül, erst dieser Komplex C5bC6C7 bindet kovalent durch das C7-Molekül auf der Pathogenoberfläche. Nun wird ein C8-Molekül gebunden, welches in die Zellmembran des Pathogens eindringt. Durch die Bindung von C9 startet eine C9-Polymerisationsreaktion, die eine Pore bestehend aus 10-16 C9-Molekülen ergibt. Diese Pore hat einen Durchmesser von etwa 10 nm und eine Länge von 15 nm. Sie sorgt für einen schnellen Ein- und Ausstrom von Ionen und Proteinen, wodurch das angegriffene Pathogen eliminiert wird.

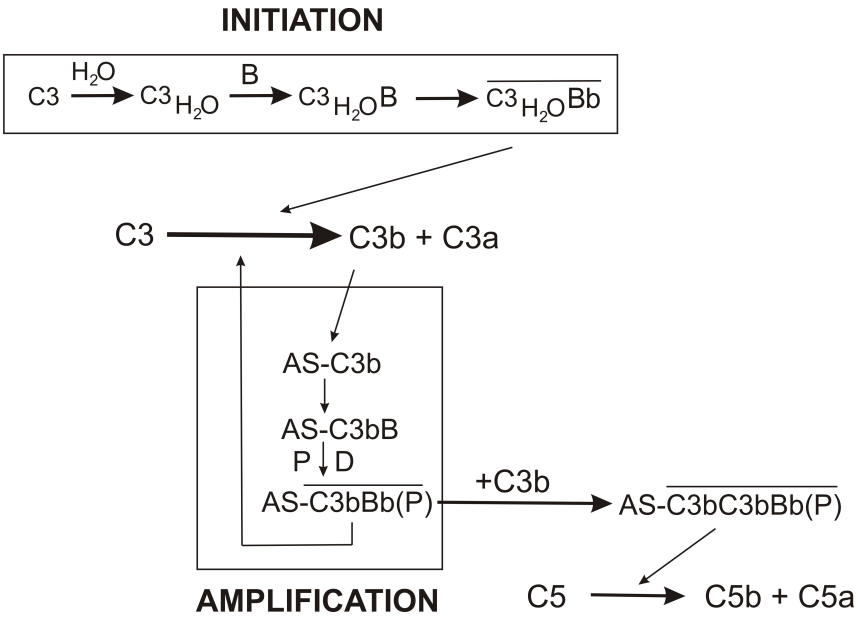


Abb. 3: Schematische Darstellung des alternativen Aktivierungsweges mit seinem „amplifikation-loop“ bis zur Bildung der C5 Konvertase. AS: Activating Surface (Zelloberfläche etc.), Überstrichen: aktive Konvertasen

1.2.4 Anaphylatoxine

Die Bezeichnung Anaphylatoxine geht auf Beobachtungen von Friedberger im Jahre 1910 zurück. Die Injektion von aktiviertem Serum in Versuchstiere führte zu einer „anaphylaktischen“ Reaktion, ähnlich der eines Schocks bei akuter Hypersensitivität. Diese anaphylaktoide Reaktion in den Versuchstieren wurde später den kleinen bioaktiven Fragmenten des Komplementsystems zugeschrieben.

Die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a sind die kleinen Spaltprodukte die entstehen, wenn C3, C4 und C5 aktiviert werden. Die Anaphylatoxine sind bis auf C4a chemotaktische

Faktoren, die z.B. eine lokale Entzündung fördern, indem sie weitere Leukozyten an den Endzündungsherd heranlocken. Über ihre Wirkung als vasoaktive Substanzen erleichtern die Anaphylatoxine die weitere Infiltration dieser Zellen (LEPOW et al., 1970; WUEPPER et al., 1972; VALLOTA und MÜLLER-EBERHARDT, 1973).

Alle Anaphylatoxine besitzen am C-terminalen Ende ein Arginin, welches rasch durch die im Serum vorhandene Carboxypetidase N abgespalten wird. Die so veränderten Anaphylatoxine werden als $C3a_{desarg}$, $C4a_{desarg}$ und als $C5a_{desarg}$ bezeichnet.

Die Bioaktivität des C3a ist auf wenige Zellen begrenzt. C3a ist ein starkes Chemoattraktant für Eosinophile. Es induziert in Eosinophilen und Mastzellen die Freisetzung der Granula (DAFFERN et al., 1995; TAKAFUJI et al., 1994; ELSNER et al., 1994). Die Restriktion auf diese wenige Zelltypen und die lokal begrenzte Aktivität lassen darauf schließen, dass C3a eine wichtige Rolle in allergischen Reaktionen zu spielen scheint.

C5a ist der potenteste Chemoattraktant und besitzt Aktivator- und Effektorfunktionen für ein breites Spektrum an Leukozyten. C5a wirkt auf Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile und Basophile stark chemotaktisch (NILSSON et al., 1996; PIETERS et al., 1995; SNYDERMAN et al., 1971). C5a fördert zudem wie auch C3a bei neutrophilen Granulozyten, Eosinophilen und Mastzellen die Degranulation (HENSON, 1971; GOETZEL und AUSTEN, 1974; TAKFUJI et al., 1994).

1.2.5 Komplementregulatoren

Die wichtigste Aufgabe der Komplementregulatoren besteht darin, das eigene Gewebe vor der Zerstörung durch das potentiell autoaggressive Komplementsystem zu bewahren. Die weitere Aufgabe liegt darin, die Reaktion des Komplementsystems bzw. seine Aktivierung so zu regulieren, dass es nicht zu einer unkontrollierten und damit überschießenden Aktivierung und somit zum vollständigen Verbrauch der Komponenten kommt. Des weiteren wird verhindert, dass es nicht zu einem systemischen Schock durch die Folgen einer überschießenden Produktion von Anaphylatoxinen kommt.

Die Komplementregulatoren lassen sich in zwei Gruppen aufteilen, die membranständigen und die löslichen Regulatoren.

Zu der Gruppe der membranständigen Regulatoren gehören z.B. der CR1 („Complement Receptor 1“), CR2 („Complement Receptor 2“), DAF („Decay Accelerating Factor“, CD55) und das MCP („Membrane Cofactor Protein“) sowie CD59 (Protectin). Zu den löslichen Regulatoren gehören der Faktor H, Faktor I, das C4BP („C4-Binding Protein“), das S-Protein („Site-Specific-Protein“)/ Vitronectin, das Clusterin und der C1-INH („C1-Inhibitor“).

Die meisten der obigen Proteine gehören zum so genannten RCA-Cluster, dem „Regulators of Complement Activation-Cluster“. Die RCA-Gene sind eine Gruppe von Genen auf dem Chromosom 1q32 (human), die für alle Komplementregulatoren mit wenigen Ausnahmen codieren. Eine dieser Ausnahmen ist der Faktor I. Faktor I ist auf dem Chromosom 4q25 (human) codiert (GOLDBERGER et al., 1987).

Allen im RCA codierten Regulatoren (CR1, CR2, DAF, MCP, FH, C4BP) ist ein repetitives Sequenzmotif gemein: Sie enthalten in unterschiedlicher Anzahl so genannte „Short Consensus Repeats“ (SCR). Es handelt sich um ein Sequenzmotif von ca. 60 Aminosäuren Länge, das je nach Protein eine bis zu 20-fache Wiederholung findet (z.B. FH). Aus der großen Homologie und der benachbarten genetischen Lokalisation lässt sich schließen, dass die Proteine eng miteinander verwandt sind und offensichtlich zum Zweck der Komplementregulierung entstanden sind (HOURCADE et al., 1989).

Der CR1 befindet sich auf diversen Zellen des Immunsystems wie z.B. auf B- und T-Zellen, Makrophagen/Monozyten/dendritischen Zellen, auf Neutrophilen, Eosinophilen und Mastzellen (MIWA und SONG, 2001). Darüberhinaus kommt er auch auf Erythrozyten vor. Er kann C3b, C4b, iC3b und C3c binden. Er beschleunigt den Zerfall der C3/C5-Konvertase des alternativen und klassischen Aktivierungsweges und dient als Ko-Faktor für den Faktor I. Der CR1 ist ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von rund 190 kDa. Er besitzt eine helikale Struktur und besteht aus 30 SCR (AHEARN und FEARON, 1989).

Über den CR2 ist nicht so viel bekannt. Er befindet sich als Teil des B-Zellrezeptorkomplexes auf B-Zellen sowie follikulären dendritischen Zellen. Genetisch gehört er ebenfalls zum RCA-Cluster; funktionell spielt er aber nur eine untergeordnete Rolle. Er ist in der Lage, iC3b und C3dg zu binden.

Das C4BP ist ein lösliches Protein und besteht aus sieben identischen 75 kDa großen α-Ketten und einer β-Kette von 45 kDa (BARNUM und DAHLBAECK, 1990). Jede α-Kette besteht aus 549 Aminosäuren, die sich auf 8 SCR aufteilen. Der aus jeder der α-Ketten verbleibende Rest von 58 Aminosäuren bildet den Kern, der die Ketten zusammenhält. Die beta-Kette besteht aus 3 SCR und besitzt eine Bindungsstelle für das S-Protein, welches eine Rolle bei der Blutgerinnung spielt. Die Funktion des C4BP besteht in der Bindung von bis zu vier C4b-Molekülen, die Verdrängung von C2a aus der C3-Konvertase des klassischen Weges und der Ko-Faktor-Aktivität für den Faktor I beim Abbau des C4b. Durch die Bindung des C4b an das C4BP oder an das MCP kommt es zu einer Konformationsänderung im C4b, wodurch der Faktor I das C4b degradieren kann (FUJITA et al., 1978).

Das MCP (CD46) ist ein membranständiges Protein und kommt auf allen Zellen außer auf Erythrozyten vor (SEYA und ATKINSON, 1989; SEYA et al., 1986). Es tritt in vier Isoformen auf, die sich in zwei Regionen aufgrund alternativen Splicens unterscheiden (POST et al., 1991; RUSSELL et al., 1992). Jede Isoform besteht aus vier SCR und besitzt drei N-Glycosylierungsstellen. Zudem gibt es noch eine O-glycosylierte splicing-Variante mit einer so genannten „Ser/Thr/Pro-Enriched (STP)-Domain". Das MCP kann C4b und C3b binden und besitzt eine Ko-Faktor-Funktion für den Faktor I (SEYA und ATKINSON, 1989; SEYA et al., 1986).

Der DAF (CD55) besteht aus 347 Aminosäuren (WONG et al., 1989). Die Vorläuferform des DAF besitzt eine vorgeschaltete Signalsequenz von 34 Aminosäuren, die beim Ausschleusen durch die Zellmembran abgeschnitten wird. Das Protein besteht aus vier SCR und einem GPI-Anker, mit dem es in der Zellmembran verankert ist. Der DAF hat eine N-Glycosylierungsstelle in SCR 1. Er besitzt wie der MCP auch die STP-Domäne, in der eine O-Glycosylierung vorhanden ist. Diese O-Glycosylierung ist dominant. Sie macht etwa 26 kDa des Molekulargewichts aus (LISZEWSKI et al., 1996). Der DAF kann die C3-Konvertase des klassischen und des MBL-Weges binden und dabei in Analogie zum C4BP das C2b verdrängen, wodurch am C4b die Schnittstelle für den Faktor I frei wird (FUJITA et al., 1987). Der DAF ist des weiteren in der Lage, die C3-Konvertase des alternativen Weges zu binden und dabei Bb zu verdrängen (FUJITA et al., 1987). Auch hierbei wird die Schnittstelle für den Faktor I zugänglich, was eine Inaktivierung des C3b zur Folge hat. Die regulatorische Funktion des DAF für den klassischen Komplementaktivierungsweg befindet sich in den Modulen SCR-2-3; die für den alternativen Komplementaktivierungsweg ist in den SCR 2-4 lokalisiert (BRODBECK et al., 1996).

CD59 (auch Protectin genannt) ist ein 18-20 kDa großes membranständiges Protein. Das Vorläufer-Protein besteht aus 128 AS und einer 25 AS großen Signalsequenz. Protectin besitzt eine N-Glycosylierungsstelle und intramolekulare Disulfidbrücken aufgrund einer 10 Aminosäuren-großen Cystein-Gruppe. Der Genlocus des CD59 beim Menschen befindet sich auf Chromosom 11 an Position 11p13 (HEKHL-OSTREICHER et al., 1993; TONE et al., 1992). CD59 bindet C8- und C9-Moleküle (NAKANO et al., 1995; LOCKERT et al., 1995) nachdem der C5b-7-Komplex in die Zellmembran inseriert worden ist und verhindert somit, quasi auf der letzten Ebene, bei der ein Eingreifen noch möglich ist, die Formation der Pore des Membranangriffskomplexes (DAVIES et al., 1989).

Das S-Protein/Vitronectin ist ein 78-83 kDa großes Glycoprotein mit einer durchschnittlichen Serumkonzentration im Menschen von 0,25-0,45 mg/ml. Das S-Protein besteht aus 478 AS und ist ein zweikettiges Protein, dessen Signalsequenz 19 Aminosäuren umfasst (JENNE und

STANLEY, 1987; BARNES und REING, 1985). Der Zuckergehalt des Proteins liegt bei durchschnittlich 10-15% (w/w). Die genetische Lokalisation des S-Proteins befindet sich auf der zentromerischen Region des Chromosoms 17 beim Menschen (17q11) (FINK et al., 1992). Das Vitronectin kann zum einen in der flüssigen Phase den C5b-7 Komplex binden und dadurch inaktivieren, zum anderen die Porenbildung (C5b-8 mit multipler Insertion des C9) durch Änderung der Komplexkonformation verhindern (FALK et al., 1983; MOLLNES et al., 1984).

Clusterin ist ein ca. 80 kDa großes Serumprotein. Es besteht aus zwei nicht identischen je 40 kDa großen Ketten, der α- und β-Kette. Die Ketten stammen aus einem gemeinsamen einkettigen Vorläuferprotein und sind über Disulfidbrücken verbunden (TSURUTA et al., 1990). Das Protein ist mit 25-30% (w/w) hochgradig verzuckert und besitzt sechs N-Glycosylierungsstellen (drei in jeder Kette). Der humane Genlokus befindet sich auf Chromosom 8 (8p21) (FINK et al., 1993). Im Plasma kommt Clusterin häufig mit HDL („high density lipoprotein“) und dem Apolipoprotein J verbunden vor (de SILVA et al., 1990; JAMES et al., 1991). Die Funktion ist ähnlich der des S-Proteins: Durch Bindung des C5b-7-Komplexes in der flüssigen Phase wird die Bildung des MAC inhibiert (CHOI et al., 1990, MURPHY et al., 1989).

Das C1-INH (C1-Inhibitor)-Protein wird durch ein 17 kB großes Gen auf dem Chromosom 11 codiert, und gehört somit nicht zu den im RCA-Cluster codierten Komplementregulatoren (THERIAULT et al., 1989). C1-INH ist ein 478 Aminosäuren (AS) umfassendes Glycoprotein mit einer 22 AS langen Signalsequenz. Es gehört in die Familie der Serpine („**Ser**ine **P**roteinase **In**hibitors“). Das C1-INH-Protein hat einen Glycosylierungsanteil von 26%, wodurch das Molekulargewicht von 52,8 kDa auf 71,1 kDa ansteigt (BOCK et al., 1986; PERKIN et al., 1990). Die Zuckerreste verteilen sich auf sechs N- und sieben O-Glycosylierungen (BOCK et al., 1986; PERKIN et al., 1990). Das C1-INH-Protein inaktiviert C1r und C1s exklusiv (SIM et al., 1979; ZICCARDI, 1981). Zusätzlich inaktiviert es weitere Proteine, zu denen die MASPs, der Koagulationsfaktor XII und Kallikrein gehören (SCHREIBER et al., 1973; GIGLI et al., 1970, MATSUSHITA und FUJITA, 1996; AGOSTINI et al. 1984). Das C1-INH-Protein blockiert den klassischen Weg an einem sehr frühen Punkt. Nachdem das C1q an einen Antigen-Antikörper-Komplex gebunden hat und C1r und C1s aktiviert wurden, verdrängt der C1-INH die Proteine C1r und C1s aus dem Komplex und verhindert so die weitere Aktivierung des klassischen Aktivierungsweges.

1.3 Aufbau und Funktion des Faktor I

Der Komplementfaktor I (FI) ist eine Serinprotease des Plasmas, die erstmalig unabhängig voneinander von Lachmann und Müller-Eberhard (1968) und Tamura und Nelson (1967) beschrieben wurde. Der Faktor I spaltet die Alpha-Kette der Komplementproteine C3b und C4b, wodurch verhindert wird, dass sich die C3- und C5-Konvertasen bilden.
Auf diese Weise wird die Formation des terminalen Membranangriffkomplexes (MAK) verhindert (DAVIES und HARRISON, 1982; ROSS et al., 1982; HSIUNG et al., 1982). Der wichtigste Ko-Faktor und essentiell für eine hohe Affinität und damit Aktivität dieser Serinprotease (FI) ist der Komplementfaktor H (FH). Weitere Ko-Faktoren des FI sind der lösliche, sowie der membrangebundene Komplementrezeptor 1 (CR1), das Membran Ko-Faktor-Protein (MCP) sowie das C4b Bindungsprotein (C4BP). Die Affinität des FI für die Bindung an C3b ist in Anwesenheit des Faktor H um den Faktor 15 höher als ohne jeglichen Ko-Faktor (DISCIPIO, 1992).
Die biologische Bedeutung des FI zeigt sich bei verschiedenen genetischen Defekten, so sind bei erblichem FI-Mangel (GONZALEZ-RUBIO et al., 2001) chronisch entzündliche Darmerkrankungen häufiger zu beobachten. Bei genetischem FI-Mangel ist der alternative Komplementaktivierungsweg nicht reguliert, und es kommt über einen ständigen Verbrauch des C3 zu einer Komplementdepletion (VYSE et al., 1996). Auch kommt es bei Patienten mit FI-Mangel zu einem ständigen Verbrauch der Faktoren B und H (VYSE et al., 1994). Als Folge wird der so genannte „alternative pathway amplifikation loop“ (LACHMANN und NICOL, 1973) nicht unterbrochen, wodurch C3 ständig über den alternativen Weg verbraucht wird. Dies führt zu einem erhöhten Verlust an Komplementaktivität und endet in ständig wiederkehrenden Infektionen (ROSS und DENSEN, 1994; RASMUSSEN, 1991, AMADEI et al., 2001; GONZALEZ-RUBIO et al., 2001). Es sind mehrere Berichte bekannt, nach denen der FI-Mangel zu einer multisystemischen Vaskulitis mit z.T. tödlichem Ausgang führte (VYSE et al., 1994; RASMUSSEN et al., 1988; SOLAL-CELIGNY et al., 1982).
Der humane Komplementfaktor I wurde erstmals von Pangburn et al. (1977) aufgereinigt. Das Glykoprotein aus dem Serum hat ein relatives Molekulargewicht von 88 kDa und besteht aus zwei Polypetidketten von jeweils 50 kDa und 38 kDa, die mittels einer Disulfidbrücke verbunden sind. Das humane Protein zirkuliert im Plasma in einer durchschnittlichen Konzentration von 35 µg/ml (SIM et al., 1993). Der Faktor I wird nicht durch im Plasma zirkulierende Protease-Inhibitoren gehemmt und besitzt zudem eine hohe Substratspezifität (SIM et al., 1993).

Aufgrund von sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen, drei auf jeder Kette und einem Unterschied von 23 kDa zwischen der nach der Primärstruktur berechneten Größe und den mittels Immunblot kalkulierten Molekulargewichten, ist es wahrscheinlich, dass alle potentiellen Glykosylierungsstellen auch tatsächlich verzuckert sind. Der Kohlenhydratanteil am Gesamtprotein wurde von Pangburn et al. (1977) und Fearon (1977) zunächst auf etwa 10 % des Molekulargewichts bestimmt. Tatsächlich allerdings beträgt der Zuckeranteil am Molekulargewicht beim menschlichen Faktor I etwa 27 % (GOLDBERGER et al., 1984) und beim FI der Ratte etwa 25 % (SCHLAF et al., 1999).

Das Gen, welches für den humanen Faktor I kodiert, liegt auf dem vierten Chromosom (4q25) telomerisch zum Gen des epidermalen Wachstumfaktors und centromerisch zum Gen für IL-2 (SHIANG et al., 1989; GOLDBERGER et al., 1987). Es umfasst 63 kB und enthält 13 Exons (VYSE et al., 1994). Die komplette primäre Struktur des Faktor I (FI) wurde durch das Sequenzieren von cDNA-Klonen für das humane- (CATTERALL et al., 1987; GOLDBERGER et al., 1987), das Maus- (MINTA et al., 1996), das Krallenfrosch- (KUNNATH-MUGLIA et al., 1993) und das Rattenprotein (SCHLAF et al., 1999) ermittelt. Die mRNA (etwa 2,4 kB) des humanen Faktor I kodiert für ein einkettiges Vorläuferpeptid mit 583 Aminosäuren (AS) (CATTERALL et al., 1987; GOLDBERGER et al., 1987), wohingegen die Vorläuferproteine der Maus 603 AS (MINTA et al., 1996) und der Ratte 604 AS umfassen (SCHLAF et al., 1999). Durch posttranslationale Modifikationen wird aus dem einkettigen Vorläuferprotein ein N-glykosyliertes, heterodimeres Protein mit 565 AS generiert. Dabei wird die Anfangssequenz (Leader Sequenz), die bei dem humanen Protein 18 AS lang ist, abgeschnitten. Ebenso wird eine aus vier AS (Arg-Arg-Lys-Arg) bestehende, die beiden Ketten verbindende, „Linker“-Sequenz durch das so genannte „PACE“-Enzym („**P**aired **A**mino Acid **C**leaving **E**nzyme“) herausgeschnitten (WONG et al., 1995). Die so entstandene, nicht katalytische Schwerkette enthält die C3b-Bindungstelle und diverse Domänen, die sich auch in einer Reihe verschiedener anderer Proteine wieder finden lassen. Diese Proteindomänen tauchen neben FI zusätzlich in verschiedenen Komplementproteinen (C6/C7) auf. Sie werden daher als Mosaikproteine bezeichnet und sind modular aufgebaut (DODDS et al., 1993; DAY und BARON, 1991). Die Schwerkette des menschlichen Faktor I besteht aus 318 AS (DODDS et al., 1993; CATTERALL et al., 1987), die Schwerkette der Maus aus 342 AS (MINTA et al., 1996) und die der Ratte aus 343 AS (SCHLAF et al., 1999). Die Schwerkette des humanen Faktor I besitzt eine 66 AS umfassende Sequenz (Position 23-89) die, wie oben erwähnt, auch in den Proteinen C6 und C7 vorkommt und FIMAC-Modul („Factor I Membrane Attack Complex Protein“) genannt wird (DISCIPIO et al., 1984; DISCIPIO und HUGLI, 1989). Es schließt sich ein zweimal vorhandenes Modul an, welches

zuerst im LDL-Rezeptor (Low Density Lipoprotein Receptor) entdeckt wurde (YAMAMOTO et al., 1984). Dieses Modul kommt wie das FIMAC-Modul neben dem Faktor I auch in den Komplementproteinen C6, C7, C8 und C9 vor (DODDS et al., 1993). Ein weiteres Modul des FI ist das CD5-Modul, welches im gleichnamigen Protein CD5 vorkommt. Es besitzt eine Länge von etwa 100 AS (FREEMAN et al., 1990). Die katalytisch aktive leichte Kette besteht im humanen FI aus 243 AS und in Ratte und Maus aus jeweils 244 AS. Ihre Organisation ist ähnlich dem Aufbau anderer Chymotrypsin-ähnlicher Serinpeptidasen (VYSE et al., 1994; CATTERALL et al., 1987; MINTA et al., 1996). Der Faktor I besitzt jedoch ein zusätzliches Paar an Cysteinen (Cys-355 und Cys-426), die eine interne Disulfidbrücke in der leichten Kette bilden (CATTERALL et al., 1987; GOLDBERGER et al., 1987).

Die Reaktion der Serinpeptidasen, d.h. die Spaltung der Peptidbindung verläuft in zwei Stufen und wird hier am Beispiel der Endopeptidase Chymotrypsin kurz erläutert. Der erste Reaktionsschritt ist die Acylierung. Die Reaktion beginnt mit einem nukleophilen Angriff des Hydroxyl-Sauerstoffatoms vom Serin 195 der Protease auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrats, wobei das Proton auf das Histidin 57 der Protease übertragen wird (Abb.4). Das entstandene Histidin-Kation wird durch die benachbarte Carboxylgruppe vom Aspartat 102 stabilisiert (Abb.4). Ein weiterer Transfer des Protons auf das Amid-Stickstoffatom des Substrats bewirkt die Spaltung der Peptidbindung, so dass die Aminokomponente freigesetzt wird (Abb.4). Der zweite Schritt ist die Deacylierung der Peptidase (Abb.4 untere Bildhälfte). Dieser Schritt ist die Umkehrung der Acylierung, wobei Wasser die Rolle der Aminokomponente einnimmt, so dass die Carboxylkomponente abgegeben wird (Abb.4). Neben Peptidbindungen können auch Esterbindungen nach einem ähnlichen Schema gespalten werden.

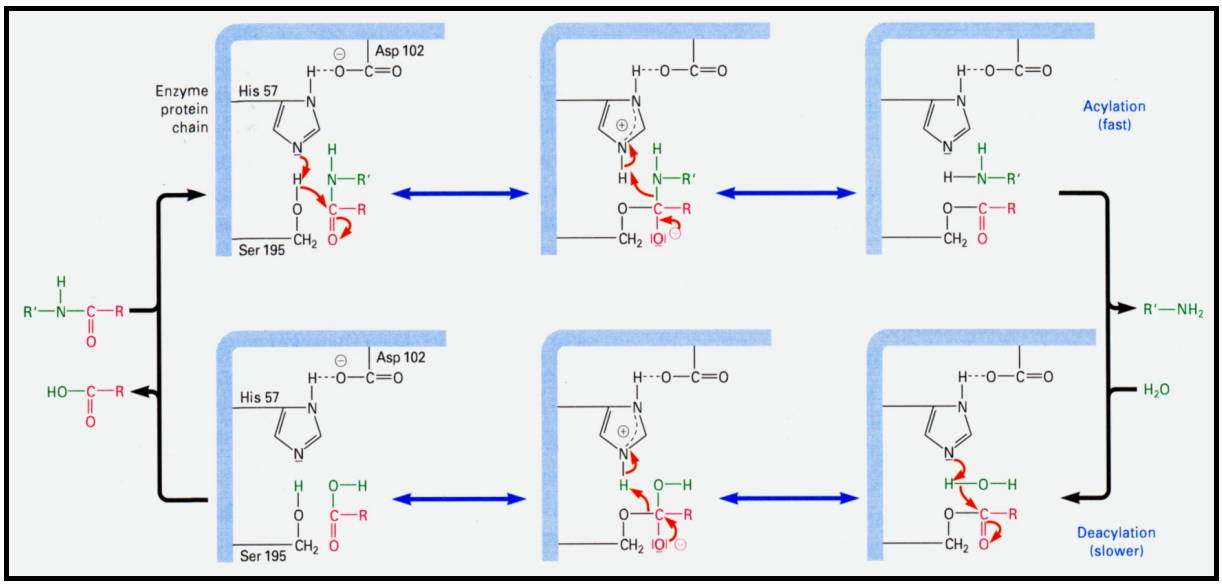


Abb. 4: Funktionsschema einer Serinprotease am Beispiel des Chymotrypsins (Biochemistry Pathways 2000).

Der Hauptteil des produzierten FI wird in der Leber gebildet (GOLDBERGER et al., 1984), wie an Leberzellisolaten der Ratte gezeigt wurde. Die Synthese in der Leber erfolgt in den Hepatozyten (HC) und im Gegensatz zum FH nicht zusätzlich in Kupfferzellen (KC) (SCHLAF et al., 1999; 2001). Neben den Hepatozyten wurden nur wenige weitere extrahepatische Quellen für den Faktor I wie z.B. Monozyten (WHALEY, 1980) und Lymphozyten (LAMBRIS et al., 1980; VETVICKA et al., 1993) genannt, die nach neueren Befunden (SCHLAF et al. 1999, 2001; TERADO et al., 2002) allerdings eher in Zweifel zu ziehen sind. Eine weitere Quelle für den Faktor I sind die von Ripoche et al. (1988), Julen et al. (1992) und Schlaf et al. (1999) untersuchten humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC).

1.4 Aufbau und Funktion des Faktor H

Der Faktor H reguliert in Verbindung mit dem Faktor I die weitere Aktivierung des Komplementsystems auf der Ebene des C3b. In diesem Stadium konkurriert der FH mit einem Faktor B-Protein um die Bindungsstelle am C3b (KAZATCHKINE et al., 1979; DISCIPIO, 1981). Die Affinität des C3b zu Faktor H liegt in etwa um das 100-fache höher als zu Faktor B (FEARON und AUSTEN, 1977). So wird durch die Bindung des FH an das C3b-Protein die Bildung der C3-Konvertase des Alternativen Weges verhindert. Nach der Bindung des FH kann der Faktor I mit deutlich erhöhter Affinität und Effizienz das C3b in iC3b inaktivieren (DISCIPIO, 1992).

Da Faktor B nicht kovalent an C3b bindet und nach seiner Spaltung durch Faktor D in Bb und Ba in Verbindung mit C3b die aktive C3-Konvertase (C3bBb) des Alternativen Weges bildet, kann auch hier der FH regulatorisch wirksam werden. Der Faktor H kann hier zusätzlich die bereits aktive C3-Konvertase, d.h. den Komplex aus C3b und Bb durch Verdrängung des Bb-Fragments inaktivieren (Kompetitive Funktion)(WHALEY und RUDDY, 1976; WEILER et al., 1976). Erneut wird durch das Schneiden der Serinprotease FI das nun im Komplex mit FH vorliegende C3b zu iC3b inaktiviert (PANGBURN et al., 1977; SIM et al., 1981).

Die letzte Ebene, auf der der Faktor H regulierend wirkt, ist die der C5-Konvertase. Die C5-Konvertase des alternativen Komplementweges besteht aus $(C3b)_2Bb$ und bindet C5, spaltet es in C5a und C5b. Hier bindet der FH ein C3b und löst es aus dem Komplex heraus („Decay Accelerating Activity"), wodurch die C5-Konvertase in ihrer Funktion gestört wird (DISCIPIO, 1981). Das so gebundene C3b kann wie oben erwähnt vom Faktor I inaktiviert werden.

Der FH ist ein monomeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 155 kDa (DISCIPIO, 1992), wobei beim Menschen der Kohlenhydratanteil durch maximal sechs N-verknüpfte Oligosaccharide (RIPOCHE et al., 1988) annähernd 9% des Gesamtgewichts beträgt (SIM und DISCIPIO, 1982). Die Blutplasmakonzentration des humanen FH liegt bei ca. 0,2-0,6 mg/ml (SIM und DISCIPIO, 1982; WHALEY et al., 1978; WEILER et al., 1976) und übersteigt die des Faktors I (ca. 35 µg/ml) etwa um das 10fache. Die Plasmakonzentration in der Ratte liegt bei etwa 240 µg/ml (DAHA und van ES, 1982; DEMBERG et al., 2002) und ist offensichtlich über einen ebenso breiten Bereich gestreut wie im humanen Plasma. Proteinsequenz- und cDNA-Sequenzanalysen zeigten, dass der FH bei Maus, Mensch und Ratte aus ca. 20 SCR (short consensus repeats) besteht (RIPOCHE et al., 1988; KRISTENSEN und TACK, 1986; DEMBERG et al., 2002). Jedes SCR besteht aus etwa 60 AS (KRISTENSEN und TACK, 1986), von denen jeweils vier Cysteinreste sind, die innerhalb des FH-Proteins Disulfidbrücken zwischen dem 1. und 3. und dem 2. und 4. Cysteinrest einer Domäne ausbilden. Die Gesamtlänge der FH-cDNA und somit die Länge der codierenden mRNA der Maus beträgt ca. 4,4 kB (KRISTENSEN und TACK, 1986). Dieselben Längen weisen die primären Transkripte beim Menschen (RIPOCHE et al. 1988) und bei der Ratte (DEMBERG et al. 2002) auf.

Das den Faktor H codierende Gen liegt im so genannten RCA-Cluster (regulators of complement activation) welcher auf dem langen Arm des ersten humanen Chromosoms (1q32) liegt (HEINER-SUNER et al. 1997). Das humane Vorläuferprotein besteht aus 1234 Aminosäuren (AS) (RIPOCHE et al. 1988) das Protein aus der Maus 1231 AS (KRISTENSEN und TACK, 1986) und aus der Ratte 1236 AS (DEMBERG et al. 2002). Der

humane Faktor H hat wie oben erwähnt ein relatives Molekulargewicht von 155 kDa. Der Faktor H der Ratte hat ein nach der cDNA berechnetes Molekulargewicht von 140,3 kDa (DEMBERG et al. 2002). Tatsächlich läuft er im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen in Analogie mit dem humanen FH bei 155 kDa. Dies bedeutet, dass auch der Ratten FH im Serum der Tiere mit einem Glycosylierungsanteil von etwa 9% vorliegt.

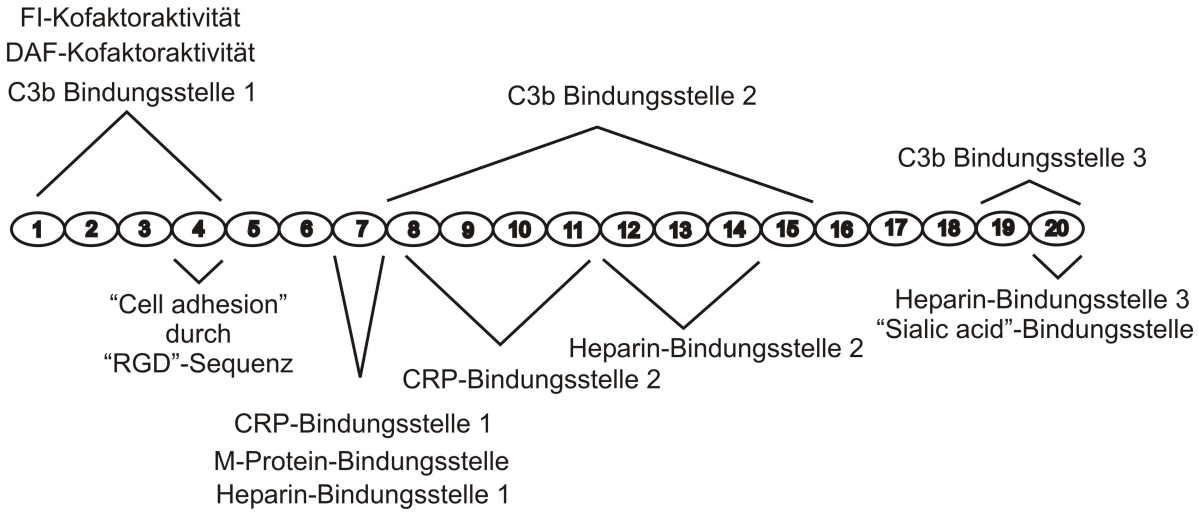


Abb. 5: Schematischer Aufbau des FH mit den Funktionen der einzelnen SCR innerhalb des Proteins.

Für die Faktor I-spezifische Ko-Faktorfunktion des FH sind die ersten vier SCR verantwortlich. Die Bindung des FH an das C3b erfolgt durch die SCR 1-4, 8-16 und 19-20. Es kommt dabei zu einer Konformationsänderung des C3b und zur Offenlegung der FI-Schnittstelle.

Neben dem 4,4 kB umfassenden FH-Transkript gibt es als alternative Splicingvariante ein verkürztes Transkript, das so genannte FH-like Protein /Reconectin (FHL-1). Darüberhinaus existieren die sogenannten „Factor H-related proteins“ (FHR), die zwar partiell homolog zum Faktor H sind, jedoch im Gegensatz zum FHL-1 nicht durch das FH-Gen codiert werden. Das FHL-1 besitzt ein relatives Molekulargewicht von 49 kDa (ZIPFEL und SKERKA, 1999) und entsteht durch alternatives Spleissen des FH-Gens. Es entspricht bis auf vier Aminosäuren am Carboxyterminus (Ser-Phe-Tyr-Leu) den ersten sieben SCR des 155 kDa-FH (ESTALLER et al., 1991; SCHWAEBLE et al., 1987; SKERKA et al., 1992; ZIPFEL und SKERKA, 1993). Das korrespondierende mRNA-Transkript umfasst 1,8 kB (McALEER et al., 1988). Das FHL-1 verfügt über dieselben regulatorischen Funktionen, die auch das 155 kDa-FH-Protein besitzt. Es fungiert als Ko-Faktor für den Faktor I und kann den Faktor B aus dem C3bBb-Komplex (C3-Konvertase des alternativen Wegs) verdrängen (MISASI et al., 1989). Wie auch der FH besitzt das FHL-1-Protein in SCR 4 eine „RGD“-Domäne (Arg-Gly-Asp). Diese

„RGD“-Sequenz entspricht den Positionen 246-248 in der Aminosäuresequenz des FHL-1/Reconectins und des FH in den Spezies Mensch, Maus und Ratte (3.1.3). Diese Arg-Gly-Asp-Sequenz wird auch als „adhesion recognition sequenz“ bezeichnet und ist in verschiedenen Adhäsionsproteinen wie z.B. Fibronectin, Fibrinogen, Vitronectin und im von Willebrandfaktor aufzufinden (ZIPFEL und SKERKA, 1999).
Die „Factor H-related proteins“ (FHR) sind zwar z.T. mit dem 155 kDa-FH homolog, jedoch werden sie nicht durch das FH-Gen codiert. Ihre biologische Funktion im Körper ist unbekannt (TIMMANN et al., 1991). Es sind zur Zeit fünf FHR bekannt: FHR-1α (37 kDa), FHR-1β (43 kDa), FHR-2α (glycosyliert, 29 kDa), FHR-2 (nicht glycosyliert, 24 kDa) und das FHR-3, welches zwar in vitro translatiert, bisher aber nicht im Blut nachgewiesen werden konnte. Die SCR der FHR-Proteine 1 und 2 sind denen des 155 kDa-FH ähnlich nicht aber identisch. Das FHR-3 weist in seiner Struktur zu den SCR 6-8 und 19-20 des 155 kDa-FH hohen Grad an Homologie auf (SKERKA et al., 1992; SKERKA et al., 1993). Zusätzlich zu den FHR-Proteinen wurde ein tryptisches 38 kDa großes Protein identifiziert, welches eine starke Homologie zu den SCR 1-5 und dem halben SCR 6 des 155 kDa-FH besitzt. Das Protein besitzt dieselben regulatorischen Funktionen wie der FH und das FHL-1-Protein (ALSENZ et al., 1984).

1.5 Aufgabenstellung und Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entschlüsselung der bisher nicht publizierten cDNA-Sequenz des Ratten FH. Von diesem Faktor sollten verkürzte aber funktionell aktive Varianten, die die ersten vier bis sieben Module (SCR) enthalten, rekombinant erzeugt werden. Des Weiteren sollte eine funktionelle Analyse der rekombinant erzeugten Varianten erfolgen. Neben dem FH der Ratte sollte auch der Ratten FI rekombinant hergestellt und anschließend funktionell analysiert werden. Beide Faktoren sollten schließlich *in vitro* in Kombination eingesetzt werden, um herauszufinden, ob aus dem kombinatorischen Einsatz beider Faktoren ein synergistischer Effekt resultiert, der die Verwendung der einzelnen Faktoren mit demselben inhibitorischen Effekt in stark verringerten Konzentrationen zulässt. Diese Ziele ließen sich ohne die Generierung von spezifischen gegen die Rattenfaktoren gerichteten mono- und polyklonalen Antikörpern nicht erreichen, so dass auch die Etablierung eines spezifischen Quantifizierungsassays (ELISA) zu den Aufgabenstellungen dieser Arbeit gehörte.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Chemikalien und Kits

Produkt	Hersteller	Bestellnummer
Bakterienkultivierungszubehör		
Bacto Tryptone	Becton Dickinson	211705
Bacto Yeast Extract	Difco	212750
Agarose NEEO	Roth	2267.4
IPTG	Sigma	I-9003
X-Gal	Eppendorf	0032006.400
D(+)-Glucose	Merck	1.08337.1000
Antibiotika		
Kanamycin	Sigma	K-4000
Ampicillin	Sigma	A-9393
Chloramphenicol	Sigma	C-0857
Tetracyclin	Sigma	T-7660
Carbenicillin	Sigma	C-1389
Geneticin (G418)	Gibco/Invitrogen	11811-064
DNA-Marker		
pBR322 DNA/*Alw*44I/*Mva*I	MBI Fermentas	SM0211
Lambda DNA/*Bst* EII	Biomol	51589
100 bp-DNA Leiter equalized	Roth	T833.1
Protein-Marker		
Precision Plus Protein™ Standards	Bio-Rad	161-0363
Prestained MWM	MBI Fermentas	SM0441
LMW-Marker	Amersham Pharmacia	17-0446-01
Vektoren, kompetente Zellen		
PCR Cloning System „Gateway“	Invitrogen	11798-014
„Gateway“ Expression System	Invitrogen	12489-019
pcDNA3.1 TOPO-D	Invitrogen	K4900-40
pEGFP-N1	Clontech	6085-1
Max Efficiency® DH5α™ Competent Cells	Invitrogen	18258-012
One Shot® TOP10 Competent Cells	Invitrogen	28-0126
XL-1 Blue	Clontech	
Affinitätschromatographie		
Strep-Tactin Superflow Column	IBA	2-1207-051
Strep-Tactin Pufferset	IBA	2-1002-000
Strep-Tactin HRP Conjugate	IBA	2-1502-001

Restriktionsenzyme		
BamH I	Invitrogen	15201-031
Not I	Invitrogen	15441-017
EcoR V	Amersham Pharmacia	E1042Y
Pvu I	MBI Fermentas	ER0622
Zellkulturmedien und Chemikalien		
Antibiotische/antimykotische Stammlösung (100x)	PAA	P11-002
Phenol Rot	Sigma	P-4758
Natrium-Pyruvat	Biochrom	L0473
Nicht essentielle Aminosäuren 100x	Biochrom	K0293
RPMI 1640	Biochrom	T121-50
Medium 199	Biochrom	T061-10
L-Glutamin 200mM 100x	Invitrogen	25030-024
FCS	PAN Biotech	3702-P2306
Trypsin-Lösung 10x	Invitrogen	15090-046
DMEM	Gibco/Invitrogen	41966-029
Grace Insektenzell-Medium	Gibco/Invitrogen	11605-045
Transfektionsreagenzien und Zubehör		
Gene Pulser® Cuvettes 4mm	Bio-Rad	1652088
FuGENE 6 Transfection Reagent	Roche	1815091
Lipofectamin™2000	Invitrogen	52887
Optimem	Gibco/Invitrogen	51985-026
RNA, DNA, PCR		
PAN Script DNA Polymerase TM	PAN Biotech	MB-1100600
Taq DNA Polymerase rekombinant	Invitrogen	10342-020
Red Taq™ DNA Polymerase	Sigma	D-5684
SuperScript™ First-Strand Synthese Kit	Invitrogen	11904-018
AccuTaq LA DNA Polymerase	Sigma	D-8045
High Speed Midi Kit	Qiagen	12643
High Speed Maxi Kit	Qiagen	12663
PCR Purification Kit	Qiagen	28104
Buffer QX1	Qiagen	20912
Sequenzierzubehör		
Multiprime DNA Labelling System	Amersham Pharmacia	RPN 1600Y
Thermo Sequenase™ Cy™5.5 Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Pharmacia	US79840
DyeEx Spin Kit	Qiagen	63106

SureFill™ 6% Sequencing Gel	Visible Genetics	VG40222
Chemikalien allgemein, Sonstiges		
2-Propanol	Merck	1.09634.2500
Essigsäure 100%ig	Roth	3738.2
2-Mercaptoethanol	Merck	8.05740.0250
HCl 32%ig	Merck	1.00319.2500
NaH_2PO_4 * H_2O	Merck	6346
Na_2HPO_4 * 12 H_2O	Merck	1.06579.5000
$NaHCO_3$	Merck	1.06329.1000
CH_3COONa * 3 H_2O	Merck	1.06265.1000
Na_2CO_3	Merck	1.06392.1000
NaN_3	Merck	1.06688.0250
NaOH	Merck	1.06498.1006
LiCl	Merck	1.05679.0250
$MgSO_4$ * 7 H_2O	Fluka	63138
H_2O_2 35%ig	Merck	1.08556.9025
Na_2HPO_4 * 2H_2O	Fluka	71638
$MgCl_2$ * 6 H_2O	Riedel-de Haen	31413
$CaCl_2$ * 2 H_2O	Merck	2382
$CuSO_4$ * 5 H_2O	Merck	2790
ABTS	Sigma	A1888
Na-EDTA	Serva	11280
TRIS	Roth	4855.2
PEG-8000	Sigma	P-5413
λTriplEx™ Library	Clontech	6160-1, 6161-1, 61621
Glycoprotein Detection Kit	Sigma	Glyco-pro
Suprec-02 Gelfiltrationssäulen	TaKaRa	9041
NaCl	Roth	3957.2
SDS	Serva	20760
Glycin	Roth	3908.3
Ponceau S Färbelösung	Sigma	P-7170
BSA Fraktion V	PAA	K41-012-50
Tube-O-Dialyzer™	Upstate/Biomol	20-232
Tween®20	Roth	9127.1
Tris	Roth	4855.2
TCA	Merck	1.00807.1000
Borsäure	Merck	1.00165.1000
Triton®X-114	Sigma	T-7003
Glycerol	Sigma	G-7757
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Merck	9001
Bromphenolblau	Merck	8122
NaCl	Roth	3957.2
Hybond-N Nylonmembran	Amersham Pharmacia	RPN303N
Redivue [α-^{32}P]dCTP (250µCi)	Amersham Pharmacia	AA0005
Ficoll 400	Amersham Pharmacia	17-0400-01
Whatmann-Papier	Schleicher und Schuell	
PROTRAN Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell	10 401396
PVDF-Membran	Schleicher und Schuell	

MagneHis™ Nickelmagnetpartikel	Promega	
UltraHyb Hybridisierungslösung	Ambion	8670
Chloroform	Roth	6340.4
BioMax MR (30cm*40 cm) Röntgenfilm	Kodak (Amersham Pharmacia)	V8929655
Aceton	Roth	9372.1
CFA, komplettes Freundsches Adjuvans	Sigma	F5881
IFA, inkomplettes Freundsches Adjuvans	Sigma	F5506
Centriprep YM-3	Millipore	4302
Centriprep YM-10	Millipore	4321
Gelatine	Difco	0143.17.9
FDA	Sigma	F7378
Ethidiumbromid $C_{21}H_{20}N_3Br$ 1%ige Lösung	Merck	1.11608.0030
DMSO	Sigma	D2650
Methanol >99%	Roth	4627.5
HEPES	Calbiochem	391338
Kalium-Natriumtartrat Tetrahydart	Fluka	60412
TEMED p.a.	Roth	2367.3
APS, Ammoniumpersulfat	Bio-Rad	161-0700
DAB, 3,3-Diaminobenzidin	Sigma	D-5637
Paraformaldehyd	Sigma	P-6148
Kalium-Dichromat	Sigma	P6435
Silbernitrat	Sigma	S0139
Na-Barbital	Merck	1.06318.0100
Barbitursäure (Barbital)	Merck	1.00276.0100
EGTA	Sigma	E0396
Ethanol >96%	Nordbrand Nordhausen GmbH	Sorte 410
Protease Inhibitor Cocktail	ICN	158837
S-Monovette® 7,5 ml	Sarstedt	01.1601
Hämolysin	Nordic Immunological Laboratories	

2.2 Verwendete Geräte

Hersteller	Gerät/Gerätebezeichnung
Eppendorf	Centrifuge 5415D
Eppendorf	Thermomixer 5436
Eppendorf	Mastercycler Gradient
Eppendorf	Bio Photometer
Biometra	Taumeltisch WT12
Biometra	Crosslinker
Biometra	Agagel Maxi
Biometra	Minigelsystem
Biometra	Multigel „long“ System
Biometra-Mytron	Hybridisierungsofen

Bio-Rad	Netzteil Modell 500
Bio-Rad	Genepulser I
Amersham Pharmacia	Novablotsystem
Amersham Pharmacia	Netzteil GPS 200/400
Amersham Pharmacia	Netzteil ECPS 3000/150
Pharmacia-LKB	Biochrom 4060 Spectrometer
Zeiss	Photomikroskop 3
Zeiss	Photomikroskop ICM405
Zeiss	Mikroskop TELAVAL 31
Clean Air	Sterilbank Typ DLF BSS6
Clean Air	Sterilbank Typ DLF BSS4
Heraeus	Brutschränke begast/ unbegast
Heraeus	Varifuge RF
Bender und Hobein AG	Vortex Genie II
HLC	Programmierbarer Heizblock KBT100-1P
Watson und Marlow	Pumpen Typ 101U
IKA Werke	Heizbarer Magnetrührer RCT basic
Sharp	Mikrowelle Typ R-212
Sorvall Instruments	Zentrifuge Typ RC-3B
WTW	pH-Meter Typ InoLab
Sigma	Plattenzentrifuge 2-5
Kottermann	beheizbare Wasserbäder
Hettich	Zentrifuge Rotanta/RP
Visible Genetics	DNA-Sequenzierer „Long Read Tower“
Savant	Speed Vac + Vapor Trap, Vakuumzentrifuge
Invitro Systems	Minitherm CTT
Tecnomara	Wipptisch Typ Rockomat
MWG-Biotech (Molecular Devices)	Thermomax microplate reader
Dynatech	Shaker-Inkubator
Nunc	Nunc-Immuno Wash 12
Snijders	Test-Tube-Rotator 34528
Tecan	Sunrise Plattenphotometer
Bio-Med	Thermocyler 60
Berthold	Geigerzähler LB1210 B
Sartorius	Waage 1205 MP

2.3 Lösungen und Puffer

Coomassie-Blau-Färbelösung:

0,2% (w/v) Serva Blue R250

10% (v/v) Essigsäure

30% (v/v) Ethanol

10xTBS:

24 g Tris

80 g NaCl

mit bidest. H_2O auf einen Liter auffüllen, pH-Wert auf 7,6 mit HCl einstellen, die Leitfähigkeit sollte bei ~120 mS liegen.

PBS (einfach):

2,33 g Na_2HPO_4 * 12 H_2O

0,35 g NaH_2PO_4 * H_2O

7,2 g NaCl

den pH-Wert auf 7,2-7,4 mit NaOH einstellen und auf 1 Liter mit bidest. H_2O auffüllen. Die Leitfähigkeit sollte bei ~14 mS liegen.

10xTBE:

216 g Tris

90 g Borsäure

16,64 g EDTA

in bidest. H_2O lösen, den pH-Wert mit HCl auf 8,6 einstellen und anschließend auf 2 Liter auffüllen.

2.4 Verwendete Primer

2.4.1 Mycoplasmen-Test-Primer:

Myc-5´

Sequenz: 5´-CGC CTG AGT AGT ACG TTC GC-3´

Myc-3´

Sequenz: 5´-GCG GTG TGT ACA AGA CCC GA-3´

2.4.2 Faktor H-Sondenprimer:

RatFH-2s

Sequenz: 5´-GTG AAG TGG TG**R** AAT AT**K** GCA-3´

Besonderheiten: gewobbelt R=A+G, K=T+G

RatFH-2as

Sequenz: 5´-GT**S** AGA CCA **Y**TT T**Y**C TCC T**WM** GCA-3´

Besonderheiten: gewobbelt Y=C+T, W=A+T, M=A+C, S=G+C

RatFH-1s

Sequenz: 5´-GAA GAT TG**Y** AA**W** G**RW** C**Y**T CCT CCA-3´

Besonderheiten: gewobbelt Y=C+T, W=A+T, R=A+G

RatFH-1as

Sequenz: 5´-GCA C**Y**A CT**S** ACA ATT **Y**TT CCA TTC-3´

Besonderheiten: gewobbelt Y=C+T, S=G+C

2.4.3 Faktor I-TOPO-D-Primer:

FI-5´TOPO-D (GC-Anteil 54,5%, Länge 55 bp, Molmasse 16780,0 g/mol)

Sequenz: 5´-CAC CAT GAA GCT CGT TCT GCT TAT TCT GCT ACT CTT-3´

FI-Basic-3´ (GC-Anteil 40,5%, Länge 42 bp, Molmasse 13962,0 g/mol)

Sequenz: 5´-TTA TCA GAC ATT GTA TTG AGA AAC AAG GGG –
TCT TCC CAC GTA-3´

2.4.4 Faktor I-Gateway-Primer:

FI-5´1/2attB1 (GC-Anteil 47%, Länge 45 bp, Molmasse 14876 g/mol)

Sequenz: 5´-AAA AAA GCA GGC TCA CCA TGA AGC TCG CTC TGC TTA TTC TGC TAC-3´

FI-5´attB1 (GC-Anteil 48%, Länge 61 bp, Molmasse 20292 g/mol)

Sequenz: 5´-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC ACC ATG AAG CTC GCT CTG CTT ATT CTG CTA C-3´

FI-3´basic1/2attB2 (GC-Anteil 42%, Länge 55 bp, Molmasse 18378 g/mol)

Sequenz: 5´-AGA AAG CTG GGT TTT ATC AGA CAT TGT ATT GAG AAA CAA GGG GTC TTC CCA CGT A-3´

FI-3´basic-attB2 (GC-Anteil 45%, Länge 71 bp, Molmasse 23751 g/mol)

Sequenz: 5´-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAT CAG ACA TTG TAT TGA GAA ACA AGG GGT CTT CCC ACG TA-3´

2.4.5 Faktor H-TOPO-D-Primer:

FH-5´TOPO-D (GC-Anteil 47,3%, Länge 55 bp, Molmasse 16935 g/mol)

Sequenz: 5´-CAC CAT GAG ACT GTC AGC AAG AAT TAT TTG GCT TAT A-3´

FH-3´-STREP (GC-Anteil 42%, Länge 69 bp, Molmasse 22907 g/mol)

Sequenz: 5´-TTA TCA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA GCT AGC TTC TAT ATC TGA TAC TGA ACA AGT CTT GAT ACG-3´

2.4.6 Faktor H-Gateway-Primer:

FH-Basic3´attB2 (GC-Anteil 39,7%, Länge 68 bp, Molmasse 22667 g/mol)

Sequenz: 5´-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TAT CAT TCT ATA TCT GAT ACT GAA CAA GTC TTG ATA CG-3´

FH-Gateway5´attB1 (GC-Anteil 41,4%, Länge 58 bp, Molmasse 17972 g/mol)

Sequenz: 5´-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC ACC ATG AGA CTG TCA GCA AGA ATT ATT T-3´

FH-Basic3´1/2attB2 (GC-Anteil 34,6%, Länge 52 bp, Molmasse 17294 g/mol)

Sequenz: 5´-AGA AAG CTG GGT TTT ATC ATT CTA TAT CTG ATA CTG AAC AAG TCT TGA TAC G-3´

FH-5´-1/2attB1 (GC-Anteil 39%, Länge 41 bp, Molmasse 13636 g/mol)

Sequenz: 5´-AAA AAG CAG GCT CAC CAT GAG ACT GTC AGC AAG AAT TAT TT-3´

2.4.7 PACE-Primer:

PACEse308 (GC-Anteil 59%, Länge 22 bp, Molmasse 7272 g/mol)

Sequenz: 5´-CCA ACA CGT GGG CTG TGC **R**CA T-3´

Besonderheit: gewobbelt R = A oder G

PACEas1170 (GC-Anteil 52,2%, Länge 23bp, Molmasse 7678 g/mol)

Sequenz: 5´-GCT GAT GGA CAG CGT GTA GAT AC-3´

2.4.8 Invitrogen pcDNA3.1TOPO-D-Vektorprimer:

pcDNA3.1 T7 alle Vektoren (Invitrogen)

Sequenz: 5´-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3´

Primer für die Sequenzierung

pcDNA3.1 BGH reverse alle Vektoren (Invitrogen)

Sequenz: 5´-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3´

Primer für die Sequenzierung

2.4.9 Clontech λTriplEx-Vektorprimer:

TriplEx 5´ (GC-Anteil 61,5%, Länge 26 bp, Molmasse 8035,2 g/mol)

Sequenz: 5´-CTC GGG AAG CGC GCC ATT GTG TTG GT-3´

TriplEx 3´ (GC-Anteil 46,2%, Länge 26 bp, Molmasse 8020,2 g/mol)

Sequenz: 5´-ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GG-3´

2.4.10 Ratten Faktor I-Kontrollprimer:

IS 165 (GC-Anteil 63%, Länge 23 bp, Molmasse 7049,6 g/mol)

Sequenz: 5´-GTC TTC TGC CAG CC**R** TGG CAG AG-3´

Besonderheit: gewobbelt, R=A+G

3´Fak I 872 as (GC-Anteil 56,5%, Länge 23 bp, Molmasse 6976,6 g/mol)

Sequenz: 5´-GTG ATG CAG TCC ACC TCA CCG TT-3´

2.4.11 Ratten Faktor H-Kontrollprimer:

FH-S1-sense87: (GC-Anteil 46%, Länge 24 bp, Molmasse 7922 g/mol)

Sequenz: 5´-GAA-GAT-TGT-AAA-GGT-CCT-CCT-CCA-3´

FH-3´Basic: (GC-Anteil 33,3%, Länge 33 bp, Molmasse 10901 g/mol)

Sequenz: 5´-TTC-TAT-ATC-TGA-TAC-TGA-ACA-AGT-CTT-GAT-ACG-3´

2.5 Verwendete Vektoren

pEGFP-N1: Vektor, Bestnr.: 6085-1, der Firma Clontech (www.clontech.com). Enthält eine modifizierte Form des „Green Fluorescent Protein“ GFP. Diese modifizierte Form des GFP ist eine Mutante, die ca. 35-mal intensiver leuchtet als das Wildtypprotein. Der Vektor wurde verwendet, um den Erfolg der Elektroporation oder chemischen Transfektion zu verfolgen.

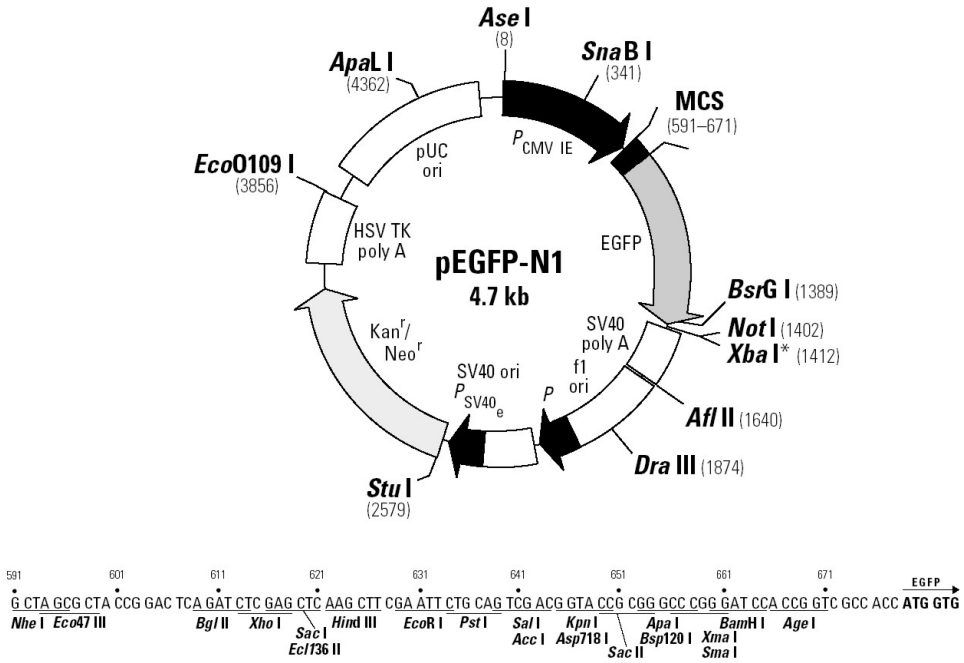


Abb. 6: Vektorkarte des pEGFP-N1-Vektors der Firma Clontech.

pcDNA3.1-TOPO-D: Ein Vektor der Firma Invitrogen (www.Invitrogen.com), der ein gerichtetes Klonieren erlaubt. Durch die kovalent gebundene Topoisomerase verkürzt sich der eigentliche Klonierungsvorgang auf ca. 5-30 min. Die gerichtete Klonierung basiert auf einem komplementären Überhang der Kozak-Sequenz (CACC) (KOZAK, 1987)(siehe Abbildung).

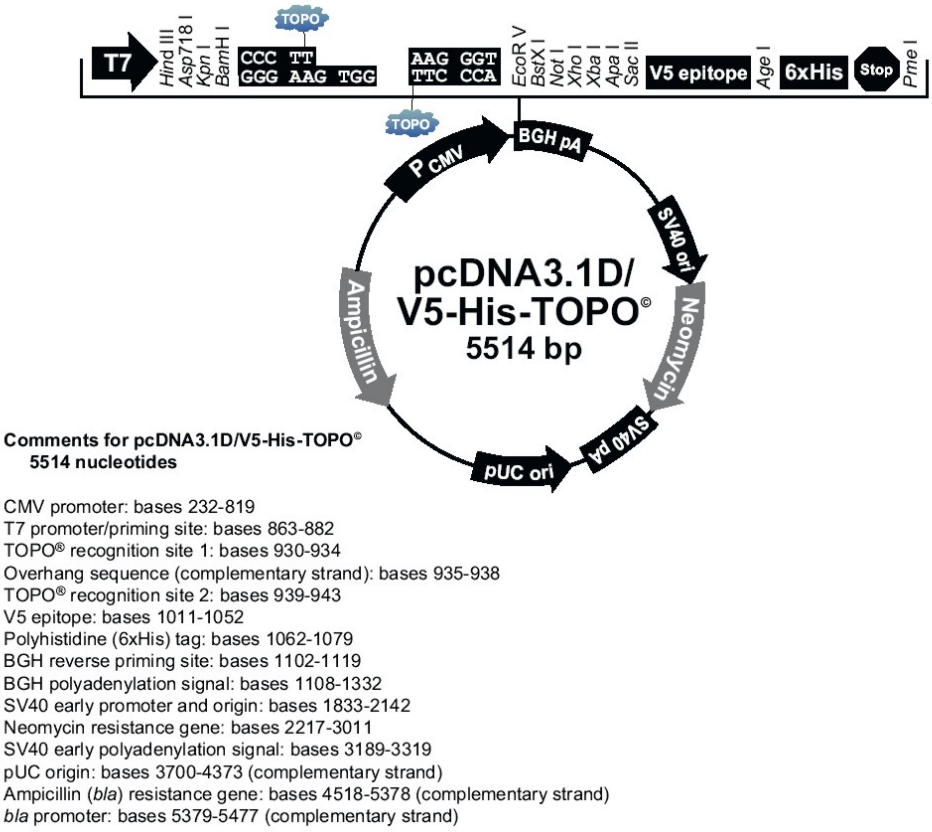


Abb. 7: Vektorkarte des pcDNA3.1D/V5-His-TOPO Vektors der Firma Invitrogen.

pDONR201: Der Vektor pDONR201, ist ebenfalls ein Vektor der Firma Invitrogen (www.Invitrogen.com), der zu dem Gateway-Klonierungssystem gehört. Der pDONR201-Vektor ist kein Expressionsvektor. Von diesem Vektor aus kann ein und dasselbe Fragment parallel in jeden verfügbaren Expressionsvektor einkloniert werden. Durch das im Vektor vorhanden ccB-Gen („Todesgen“) bleibt der Hintergrund an falsch-positiven Klonen verschwindend gering. Im Gegensatz zu den meisten Expressionsvektoren die eine Ampicillinresistenz aufweisen, werden die Entry-Klone gegen Kanamycin selektiert.

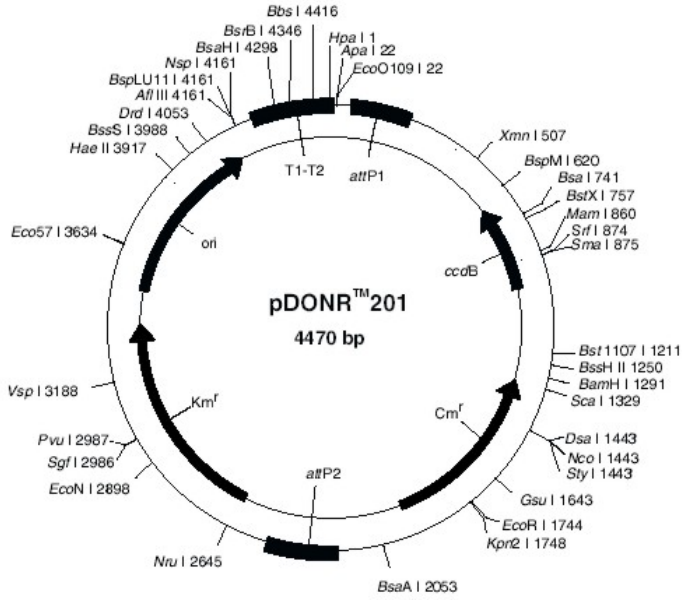


Abb. 8: Vektorkarte des pDONR201-Vektors aus dem Gateway-Klonierungskit der Firma Invitrogen.

pDest12.2: Der Vektor pDest12.2 ist ein Expressinonsvektor der Firma Invitrogen (www.Invitrogen.com), der wie der pDONR201-Vektor zum Gateway-Klonierungs-System gehört. Der pDest12.2 ist für die Expression in Mammalia-Zellen konstruiert. Er besitzt für die Positivselektion der Mammalia-Transfektanten eine Neomycin-Resistenzkassette (G418-Resistenz) und für die Selektion positiver Bakterienklone eine Ampicillin-Resistenz (*bla*-Gen). Für eine hohe Expressionsrate in Mammalia-Zellen enthält der Vektor einen CMV(Cytomegalie-Virus)-Promotor.

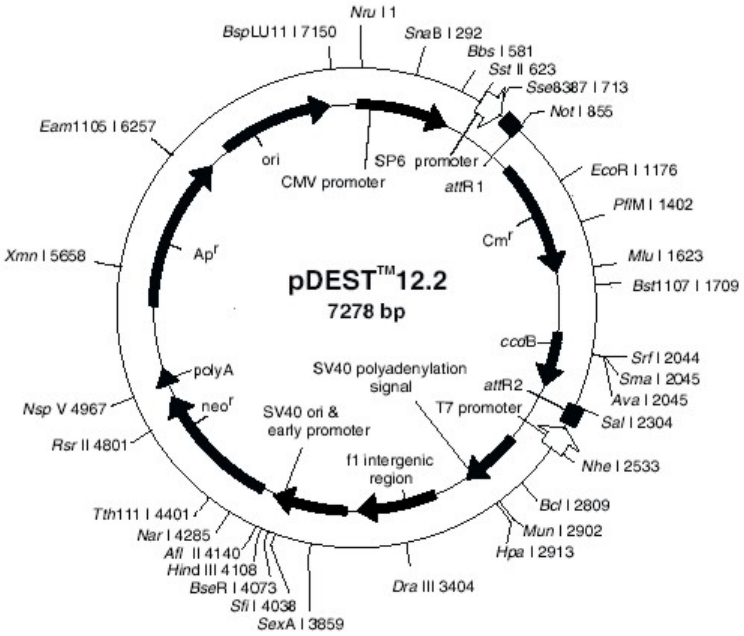


Abb. 9: Vektorkarte des pDEST12.2-Vektors aus dem Gateway-Klonierungskit der Firma Invitrogen.

2.6 Zelllinien und Bakterien

2.6.1 Zelllinien

Für die Expression des Ratten FI wurde das Mammalia-Expressionsystem ausgesucht, da, wie in der Einleitung beschrieben, der Faktor I einen hohen Grad an Verzuckerung mit einem komplexen Muster aufweist (ULLMAN et al. 1998) und nur die Expression in Mammalia-Zellen eine korrekte Verzuckerung liefern kann. Aus rationalen Überlegungen und nach ausgiebiger Literaturrecherche wurde für die Expression des FH-Fragmentes (SCR1-7) ebenfalls das Mammalia-System ausgewählt.

Für die Expression des FI in voller Länge und als funktionsfähiges Protein waren weitere Voruntersuchungen nötig. Die ausgewählte Zelllinie musste in der Lage sein, den FI richtig zu prozessieren und benötigt dafür ein spezielles Enzym, das als „Paired Aminoacid Cleaving Enzyme“ (PACE) oder auch als Furin bezeichnet wird. Das PACE ist nicht nur für die Prozessierung des FI essentiell, sondern auch an der Prozessierung von Albumin und Insulin beteiligt. Die Zelllinien wurden nach entsprechender cDNA-Gewinnung in einer PCR auf das Vorhandensein des PACE (mRNA) getestet.

H4IIE (ATCC-Nr.: CRL-1548): Die H4IIE-Zellen sind aus einem Rattenhepatom gewonnen worden. Sie bilden den Rattenfaktor I konstitutiv in detektierbaren Mengen. Sie wachsen adhärent und erscheinen morphologisch als Epithelzellen. Das für die Kultivierung verwendete Medium war 80/20/10-Medium.

FAO (ECACC-Nr.: 89042701): Die FAO-Zellen sind ebenfalls eine Rattenhepatomzelllinie. Sie stammen von der Zelllinie H4-11E-C3 ab. Wie die H4IIE-Zellen produzieren auch sie den Rattenfaktor I. Für die Kultivierung dieser adhärent wachsenden Zelllinie wurde das 80/20/10-Medium verwandt.

HEK293 (ATCC-Nr.: CRL-1573): Die HEK293-Zellen wurden aus einer humanen, embryonalen, adenoviral-transformierten Niere isoliert. Auch diese Zellen wachsen adhärent, und ihr Erscheinungsbild entspricht dem einer Epithelzelle. Sie wurden ebenfalls in 80/20/10-Medium kultiviert.

COS-7 (ECACC-Nr.: 87021302): Die COS-7-Zelllinie ist aus einer SV40-transformierten Affenniere gewonnenen worden. Die COS-7-Zellen erscheinen morphologisch wie Fibroblasten und wurden in DMEM mit 10% FCS kultiviert.

HIT-T15 (ATCC-Nr.: CRL-1777): Die HIT-T15-Zelllinie ist aus dem Syrischen Goldhamster isoliert worden. Die HIT-Zellen entsprechen funktionell den β-Zellen aus den Langerhans`schen Inseln des Pankreas und produzieren Insulin. Die Zellen wachsen rund bis unförmig in unterschiedlichen Größen als Einzelzellen und Zellklumpen. Die HIT-T15-Zellen wurden in 80/20/10-Medium gehalten.

HeLa (ATCC-Nr.: CCL-2): Die HeLa-Zellen sind eine Zelllinie, die aus einem adenoviralen Cervixkarzinom isoliert werden konnte. Die Morphologie entspricht der einer Epithelzelle. Die Zelllinie wächst adhärent und wurde in 80/20/10-Medium gezogen.

MONO-MAC-6 (DSMZ-Nr.: ACC124): MONO-MAC-6 ist eine aus einer humanen akuten monozytischen Leukämie hervorgegangene Zelllinie. Morphologisch erscheinen die Zellen als Einzelzellen oder als Zellklumpen und sind schwach adhärent. Es treten im geringen Maß auch so genannte Riesenzellen auf. Als Zellkulturmedium wurde für diese Zelllinie 80/20/10-Medium verwendet.

IEC-6 (ECACC-Nr.: 88071401): Bei den IEC-6-Zellen handelt es sich um eine adhärent wachsende Rattendünndarmepithelzelllinie, die morphologisch auch als Epithelzellen wachsen. Als Kultivierungsmedium wurde für diese Zelllinie DMEM mit 10% FCS verwendet.

CACO-2 (ECACC-Nr.: 86010202): Diese Zelllinie wurde aus einem primären Tumor (Kolonkarzinom) eines 72jährigen kaukasischen Mannes isoliert. Die Zellen wachsen epithelartig und wurden in 80/20/10 Medium gehalten.

CHO (ECACC-Nr.: 85050302): Eine Zelllinie aus dem Chinesischen Hamster. Diese CHO-Linie ist ein Subklon der 1957 von Puck hergestellten Hamster Ovar-Zelllinie. Die Zellen wurden ebenfalls in 80/20/10 Medium kultiviert.

HepG2 (ECACC-Nr.: 85011430): Eine humane Hepatomzelllinie, die aus einem 15-jährigen kaukasischem Jungen isoliert wurde. Die Zellen wurden in 80/20/10-Medium gehalten. Sie wachsen epithelartig. Sie produzieren den FI zu ca. 80% als einkettiges Protein.

HuH-7 (http://cellbank.nihs.go.jp Nr: JCRB0403): Diese Hepatomzelllinie wurde aus einem 57 Jahre alten Japaner isoliert, der an Leberkrebs erkrankt war. Die Erstbeschreibung und Charakterisierung der Zelllinie erfolgte im Jahre 1985 von NAKABAYSHI et al.. Die Zelllinie wurde in DMEM mit 10% FCS gehalten. Sie produziert den humanen FI in im Immunblot gut detektierbaren Mengen.

RBL-1 (ECACC-Nr.: 86061001): Bei den RBL-Zellen handelt es sich um Zellen einer basophilen Rattenzelllinie. Die Zellen adhärieren mäßig und besitzen die Morphologie eines Lymphoblasten.

2.6.2 Bakterienstämme

Für die Vervielfältigung der TOPO-D-Vektoren mit FH- und FI-Insert wurden folgende *E.coli*-Stämme benutzt:

***E.coli* Top10:** F^- mcrA Δ(mrr^- $hsdRMS^-$ mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

***E.coli* DH5α:** F^- Φ80 lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k^-,m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-

Verwendete *E.coli*-Stämme für das Gateway Klonierungssystem:

***E.coli* DB3.1:** F^- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^-,m_B^-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δleu mtl1

***E.coli* DH5α:** F^- Φ80 lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k^-,m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-

Für das Screening der Phagenbank wurden folgende *E.coli*-Stämme benutzt:

***E.coli* XL1-Blue:** endA1 gyrA96 hsdR17 lac^- recA1 relA1 supE44 thi-1 [F^- $lacI^q$ZΔM15 proAB Tn10]

***E.coli* BM25.8:** supE44 thi Δ(lac-proAB) [F^- traD36 $proAB^+$ $lacI^q$ZΔM15] λimm434 (kan^R)P1 (cam^R) hsdR(r_{k12}-m_{k12}-)

2.7 Verwendete Restriktionsenzyme

BamH I:

Erkennungs-Sequenz 5´-G↓GATCC-3´, aus *Bacillus amylliquefaciens*, schneidet bei 37°C. Resistent gegen Hitzeinaktivierung (10 min, 65°C). Bezogen wurde es von der Firma Invitrogen in einer Konzentration von 10 U/µl. Das Restriktionsenzym benötigt den React3-Puffer und kann somit zusammen mit Not I eingesetzt werden.

Not I:

Erkennungs-Sequenz 5´-GC↓GGCCGC-3´, aus *Nocardia otitidis-carviarum* (ATCC-Nr.: 14630). Es schneidet bei 37°C. Not I ist sensitiv gegenüber Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65°C. Bezogen wurde das Enzym von der Firma Invitrogen in einer Konzentration von 15 U/µl. Es benötigt den React3-Puffer und kann somit mit BamH I zusammen eingesetzt werden.

EcoR V:

Erkennungs-Sequenz 5´-GAT↓ATC-3´, aus *Escherichia coli*. Es schneidet optimal bei 37°C in Verbindung mit dem mitgelieferten Puffer H. Bezogen wurde EcoR V von der Firma Amersham Pharmacia in einer Konzentration von 15 U/µl.

Pvu I:

Erkennungs-Sequenz 5´-CGAT↓CG-3´, aus *Proteus vulgaris.* Es schneidet bei einem Temperaturoptimum von 37°C und im mitgelieferten Puffer R^+. Bezogen wurde es von der Firma MBI Fermentas in einer Konzentration von 10 U/µl. Es benötigte identische Pufferbedingungen wie BamH I und konnte so mit diesem kombiniert werden.

2.8 Flüssigmedien für die Kultivierung von Mikroorganismen

2.8.1 LB-Medium (Luria-Bertani)

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

auf 1 Liter mit H_2O auffüllen und den pH-Wert mittels 5 N NaOH auf pH 7 einstellen, anschließend autoklavieren.

2.8.2 SOC-Medium

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

10 ml einer 250 mM KCl-Lösung mit bidest. Wasser auf 985 ml auffüllen und den pH-Wert mit 5 N NaOH auf 7,0 einstellen. Das Medium autoklavieren und unmittelbar vor Gebrauch 5 ml einer 2 M $MgCl_2$- und 20 ml einer 1 M Glucose-Lösung zugeben.

2.9 Medien für die Kultur von Mammalia-Zellen

2.9.1 80/20-Medium

für 5 Liter:

50 ml L-Glutamin

50 ml Antibiotische-antimykotische Lösung

50 ml Natrium-Pyruvat

50 ml nicht essentielle Aminosäuren

41,6 g Instantmedium RPMI 1640

9,8 g Instantmedium 199

10 g $NaHCO_3$

4,5 l bidest. H_2O

pH-Wert auf 6,8-7,2 einstellen

2.9.2 80/20/10-Medium ± G418

Zum 80/20-Medium werden 10% (v/v) Hitze-inaktiviertes, sterilfiltriertes FCS gegeben. Dieses Medium wurde für die Kultivierung der CHO- sowie der H4IIE-Zellen verwendet. Lediglich die G418-Konzentration wurde der entsprechenden Zelllinie angepasst. Für die CHO-Zellen z.B. wurden dem Medium 1,2 mg/ml G418 und für die H4IIE-Zellen 0,8 mg/ml G418 zugesetzt. Wegen der schlechten Löslichkeit wurden ca. 20 ml Medium aus einer Flasche abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen, in das zuvor die benötigte Menge G418 eingewogen worden war, überführt. Nachdem sich das G418 vollständig gelöst hatte, wurde das Medium mit einer Spritze aufgezogen und, durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert, in die Flasche zurückgegeben.

2.9.3 DMEM (Dullbecco´s Modifiziertes Eagle Medium) ± G418

Dieses Medium wurde von der Firma Invitrogen (Bestellnummer 41966-029) bezogen. Die Zusammensetzung kann auf der Homepage der Firma (www.invitrogen.com) über den dort bereitgestellten Onlinekatalog abgefragt werden.
Das Medium hatte einen erhöhten Glukosegehalt von 4500 mg/l und wurde zusätzlich mit 10% (v/v) inaktiviertem, sterilfiltriertem FCS versetzt und für die Kultivierung der HEK293-Zellen sowie der COS-7-Zellen verwendet.
Das DMEM wurde (wie beim 80/20/10-Medium beschrieben) mit G418 versetzt und für die HEK293-Zellen wie auch für die COS-7-Zellen mit einer G418-Konzentration von 1,2 mg/ml verwendet.

2.10 Antibiotika-Lösungen

	Lagerungskonzentration	**Lagerungstemperatur**
Ampicillin	100 mg/ml in H_2O	-20°C
Carbenicillin	100 mg/ml in H_2O	-20°C
Chloramphenicol	30 mg/ml in Ethanol	-20°C
Kanamycin	50 mg/ml in H_2O	-20°C
Tetracyclin	5 mg/ml in H_2O	-20°C

Vom Ampicillin und Carbenicillin wurden jeweils 100 mg/ml, vom Kanamycin 50 mg/ml in bidest. H_2O gelöst. Anschließend wurden die Lösungen durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert, in 1-Milliliterportionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Es wurde jeweils 1 ml Antibiotika-Lösung zu einem Liter Medium gegeben, was einer finalen Konzentration von 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml (Kanamycin) entspricht.
Für die Tetracyclin-Gebrauchslösung wurden 5 mg/ml in bidest. Wasser gelöst und sterilfiltriert (0,22 µm-Filter). Die Aliquots wurden vor Licht geschützt bei -20°C gelagert. Auf ein Liter Medium wurden 2,5 ml der Lösung gegeben, womit eine finale Konzentration von 12,5 µg/ml erreicht wurde. Das fertige Medium bzw. die fertigen Agaroseplatten wurden aufgrund der Lichtsensitivität des Tetracyclins bei 4°C lichtgeschützt gelagert.
Vom Chloramphenicol wurden 30 mg/ml in Ethanol (absolut, unvergällt) gelöst. Die fertige Lösung wurde ebenfalls bei -20°C gelagert. Auf ein Liter Medium wurden 0,5 ml Lösung gegeben, wodurch eine finale Konzentration von 15 µg/ml erzielt wurde.

2.11 RNA-Isolierung unter Verwendung eines Qiagen-RNA-Isolierungskits

Die RNA-Isolierung wurde mittels eines Kits der Firma Qiagen (www.qiagen.com) durchgeführt. Vor dem Einsatz des RNA-Isolierungssets wurden die Zellen durch Trypsin-Behandlung abgelöst und in PBS gewaschen. Eine Zählung der Zellen wurde vorgenommen, um eine Überladung der Säulen zu verhindern und die richtige Menge Lysepuffer einzusetzen. Die Zellzahl sollte nicht über 1 x 10^7 Zellen liegen.

Für den Lysepuffer wurden 10 µl Mercaptoethanol mit 1 ml Lysepuffer RLT (aus dem Kit) vermischt. Bei 5 * 10^6 oder weniger Zellen wurden 350 µl Lysepuffer hinzugefügt. Bei mehr als 5 * 10^6 Zellen wurden 600 µl Lysepuffer verwendet. Nun wurde das Lysat für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde es auf die Aufschluss-Säule („Shredder"-Säule aus dem Qiagen-Kit) gegeben und für 2 min bei 14.000 U/min (Eppendorf Tischzentrifuge) zentrifugiert. Es wurde jetzt 1 Volumen (350 µl oder 600 µl) 70%iger Ethanol (unvergällt) hinzugegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt. Das Lysat sollte klar sein. Ausgefallene DNA wurde mit einer Pipettenspitze entfernt. Da die Säule mit maximal 700 µl pro Ansatz befüllt werden konnte, wurde bei mehr als 700 µl Volumen die RNeasy-Säule (Qiagen-Kit) zweimal beladen und jeweils für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Auf die RNeasy-Säule wurden 700 µl Waschpuffer RW 1 (Qiagen-Kit) aufgebracht und erneut für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde mit 500 µl Waschpuffer RPE (Qiagen-Kit) beschickt und für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Anschließend wurden 500 µl Waschpuffer RPE auf die Säule gegeben und für 2 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Die Membran in der Säule wurde nun bei RT für einige Minuten getrocknet. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, und 30 – 50 µl DEPC-Wasser (Qiagen-Kit) wurden direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation für 5 min wurde für weitere 60 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Im Durchfluss war die Gesamt-RNA enthalten.

Nach der Elution der RNA wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt, 2 µl als Probe entnommen und der RNA-Gehalt im Photometer (Eppendorf BioPhotometer 6131) in einer Verdünnung von 1:100 bestimmt. Nachfolgend wurden die Gefäße, aus denen die Proben stammten, beschriftet und bei –80°C eingefroren.

2.12 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Für die reverse Transkription der mittels des Qiagen-Kits gewonnen RNA wurde ein Umschreibe-Set („SuperScript™ First-Strand Synthesis Kit“) der Firma Invitrogen verwendet. Die Vorteile der cDNA (komplementäre DNA) liegen gegenüber der isolierten mRNA in der höheren Stabilität gegen Zerstörung durch freie Enzyme wie RNAsen, in der thermischen Stabilität sowie in einer möglichen Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR). Die Umschreibung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Firma Invitrogen:

Es wurden 1-5 µg RNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 1 µl hexameren Zufallsnukleotiden (Kit) und 1 µl Poly-A-Primern (Kit) versetzt und mit DEPC-H_2O (Kit) auf 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis gestellt. Nun wurden jeweils 2 µl 10x PCR-Puffer, 2 µl 25 mM $MgCl_2$, 1 µl 10 mM dNTPs, 2 µl 0,1 M DTT (alle Lösungen mitgeliefert) hinzupipettiert und gemischt. Im Anschluss wurden die Ansätze kurz anzentrifugiert. Bevor 1 µl SuperScript II-reverse-Transkriptase-minus-RNAse hinzugeben wurde, erfolgte eine Inkubation von 5 min bei 25°C. Nach Zugabe der Transkriptase wurde, erst für 10 min bei 25°C und anschließend für mindestens 50 min bei 42°C inkubiert, gefolgt von einer finalen Inkubation über 15 min bei 70°C. Beim letzten Schritt wurde das Enzym inaktiviert.

Mit der Inaktivierung der reversen Transkriptase war die eigentliche cDNA-Synthese beendet. Je nach weiterer Verwendung wurde die ursprüngliche RNA-Vorlage durch die Zugabe von 1 µl RNAse H verdaut. Die Einwirkzeit der RNAse betrug 20 min bei 37°C, eine anschließende Inaktivierung des Enzyms war nicht notwendig. Die cDNA wurde beschriftet und bei –80°C eingefroren.

2.13 DNA-Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen-PCR-Aufreinigungs-Kit

Das Qiagen-Kit ist für die Aufreinigung von einzel- (ss-) oder doppelstrang- (ds-)DNA aus PCR oder Gel-Extraktion konzipiert. Es kann auch für die Aufreinigung von Restriktionsansätzen verwendet wurden.

Zu einem PCR-Ansatz wurden 5 Volumina an Puffer PB (Qiagen-Kit) gegeben und gut gemischt. Das Gemisch wurde auf eine Qiaquick-Säule (max. Volumen 750 µl) gegeben und bei >10.000 xg für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer (Kit) gewaschen und wie oben zentrifugiert.

Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut zentrifugiert, um die letzten Reste des PE-Puffers zu entfernen. Um die DNA zu eluieren, wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Es wurden 30 µl EB-Puffer aus dem Kit auf die Mitte der Säulenmembran pipettiert. Die Säule mit dem Puffer wurde für 1 min inkubiert und anschließend für eine weitere Minute bei >10.000xg zentrifugiert.

Zur sicheren Lagerung bis zur Weiterverwendung wurde das Eluat bei mindestens -20°C eingefroren. Eine zuvor entnommene Probe wurde auf einem 1%igen Agarosegel (1,5 g Agarose in 150 ml TBS auflösen) aufgetragen um die Reinheit des Amplifikats zu überprüfen.

Eine alternative Methode war die Extraktion des Amplifikates aus dem Agarosegel:

Aus einem Agarosegel wurde die DNA-Bande ausgeschnitten. Dies musste zügig geschehen, da die starke UV-Strahlung die DNA hätte zerstören oder sie mit der Agarose kovalent vernetzen können, was eine Elution erschwert hätte. Das maximale Gewicht des zu verarbeitenden Agarosegelstückchens durfte 250 mg nicht überschreiten. Die Gelstücke wurden jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 3 Volumina QX1-Puffer (Qiagen) je 100 mg Gewicht versetzt.

Die Inkubation wurde bei 50°C für 10 min im Wasserbad unter gelegentlichem Vortexen durchgeführt, wobei die Agarose aufgelöst wurde. Die gelbe Farbe des Puffers zeigte den korrekten pH-Wert an. Verfärbte sich der Puffer orange oder violett, so musste er durch Zugabe von ca. 10 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,0) angesäuert werden. Die Inkubationszeit wurde nach dem Zusetzen des Natriumacetats um 5 min verlängert.

Der Ansatz wurde auf eine Qiaquick-Säule gegeben und bei >10.000xg für eine Minute bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Um letzte Agarosereste zu entfernen, wurde die Säule mit 500 µl QX1-Puffer gewaschen und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Auf die Säule wurden 750 µl PE-Puffer aufgetragen, für 5 min inkubiert und dann bei 10.000xg für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule für eine weitere Minute bei 10.000xg zentrifugiert, um letzte PE-Pufferreste zu eliminieren.

Die Elution der DNA erfolgte durch die Zugabe von 30 µl EB-Puffer, der direkt auf die Membran pipettiert wurde. Die Minigelfiltrationssäule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, um das Eluat aufzufangen. Nach einer einminütigen Inkubation folgte eine Zentrifugation bei 10.000xg für eine Minute. Die aufgereinigte DNA wurde bei mindestens -20°C eingefroren.

Die Reinheit und die Ausbeute des Eluats wurden mittels einer agarosegelelektrophoretischen Auftrennung einer entnommenen Probe im Vergleich mit einem quantitativen Marker (z.B. Lambda-Marker) und im Photometer bestimmt.

2.14 DNA-Aufreinigung mittels TaKaRa-Minigelfiltrationssäulen

Die PCR-Amplifikate wurden auf die TaKaRa-Suprec-02 Reinigungssäulen (Mini-Gelfiltrations-Säulen) (www.takara-bio.co.jp/english/index.htm) gegeben, um Primer und bei der Reaktion nicht benötigte dNTPs zu entfernen.

Der Reaktionsansatz wurde mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) auf ein Volumen von 400 µl aufgefüllt und in die „Ultrafiltrationskassette“ der Suprec-02 Säule gegeben. Nun wurde für 8 min bei 1500xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Ultrafiltrationskassette der Suprec-02 Säule erneut auf ein Volumen von 400 µl mit TE-Puffer aufgefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation wie oben beschrieben. Die Schritte wurden zweimal wiederholt, um sicherzugehen, dass keine Zufalls-Primer und dNTPs mehr in der Kassette zurückblieben.

Aus der Kassette wurde der Rückstand mit 30 µl H_2O versetzt, mehrmals mit einer Pipette gemischt und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen.

Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine kleine Menge des Rückstandes mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Beim Aufreinigen der radioaktiv markierten Sonde konnte man die Reinigungswirkung der Säule direkt nach den einzelnen Waschschritten an der abnehmenden Strahlungsintensität der aufgefangenen Durchflüsse messen. Mit jedem weiteren Reinigungsschritt nahm die Intensität der radioaktiven Strahlung im Durchfluss deutlich ab, wohingegen die markierte, zurückgehaltene DNA (Sonde) eine deutliche β-Strahlung zeigte.

2.15 DNA-Aufreinigung mittels PEG-8000 (Eliminierung von DNA-Fragmenten <300bp)

Dieses Protokoll wurde aus einer Anleitung der Firma Invitrogen in modifizierter Form übernommen. Für die Aufreinigung wurde TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5–8) angesetzt und autoklaviert. Der PEG-8000-Puffer [30 mM $MgCl_2$ und 30% w/v PEG8000 (RNAse-, DNAsefrei)] wurde mit sterilem bidest. H_2O angesetzt.

Ein 50 µl PCR-Ansatz wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 150 µl TE-Puffer versetzt und gemischt. Nun wurden 100 µl PEG-8000-Puffer dazugegeben, und der Ansatz wurde ebenfalls gründlich gemischt (leicht gevortext). Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13.200xg und RT. Der Überstand wurde vorsichtig und vollständig abgenommen und verworfen. Das Pellet (falls sichtbar) wurde mit 500 µl 70%igem vorgekühltem (4°C) und unvergälltem Ethanol gewaschen und im Kühlraum bei

4°C und 13.000xg für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, vorhandene Ethanolreste wurden im Heizblock bei 40°C abgedampft. Das DNA-Pellet wurde in 25 µl bidest. H_2O resuspendiert.
Zur Kontrolle wurden in Abhängigkeit von der Pelletgröße 1-5 µl in einem Agarosegel gegen einen definierten Marker aufgetrennt. Das resuspendierte PCR-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei mindestens -20°C aufbewahrt.

2.16 Identifizierung der Rattenfaktor H-Sequenz

Zur Vorbereitung der Faktor H Sequenzsuche wurden folgende Platten in ausreichenden Mengen hergestellt:

LB-Platten
LB/TET-Platten
LB/CARB-Platten
LB/KAN/CAM-Platten
LB/TET/$MgSO_4$-Platten
Top-Agar

2.16.1 LB-Medium (Luria-Bertani) / LB-Platten

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
auf 1 Liter mit H_2O auffüllen und den pH-Wert mittels 5 N NaOH auf einen pH-Wert von 7 einstellen, anschließend autoklavieren. Für die Herstellung von Agarplatten mußten pro Liter Medium 15 g Agarose zugesetzt werden. Anschließend wurde der Ansatz autoklaviert. So konnten im Anschluss an die Sterilisation umgehend die Platten gegossen wurden. Die Platten sollten nach dem Aushärten kühl (4°C) gelagert werden.

2.16.2 LB/TET-Platten / LB/TET/$MgSO_4$-Platten

Für die LB/TET-Platten wurde wie oben beschrieben ein LB-Medium angesetzt und 15 g Agarose hinzugegeben. Nach dem Autoklavieren sollte das Medium erst auf 60-50°C

abgekühlt sein, bevor 1 ml der Tetracyclin-Lösung hinzugegeben wurde. Die finale Konzentration des Tetracyclins betrug 15µg/ml.
Für die LB/TET/$MgSO_4$-Platten wurden auf einen Liter Medium noch 10 ml $MgSO_4$ (aus einer 1 M Stammlösung) gegeben. Der pH-Wert wurde erneut auf 7,0 eingestellt, und anschließend wurde wie oben beschrieben Tetracyclin hinzugegeben.

2.16.3 LB/CARB-Platten

Bei den LB/CARB-Platten wurde analog den LB/TET-Platten verfahren. Allerdings wurde hier das Tetracyclin gegen Carbenicillin ausgetauscht. Die finale Konzentration des Carbenicillin betrug 100 µg/ml.

2.16.4 LB/KAN/CAM-Platten

Es wurde ebenso wie bei den LB/TET-Platten vorgegangen. Hier wurden jedoch statt Tetracyclin Kanamycin (finale Konzentration 50 µg/ml) und Chloramphenicol (finale Konzentration 34 µg/ml) in das Medium gegeben.

2.16.5 Top-Agar

Zu 500 ml LB-Medium wurden 3,5 g Agarose gegeben und anschließend autoklaviert. War das Medium nach dem Autoklavieren auf ca. 50-45°C abgekühlt, so konnte es direkt als Top-Agar verwendet wurden. Nach dem Erstarren, ließ sich das Medium in einer Mikrowelle für 20 min bei 600 Watt Leistung erneut verflüssigen. Hierzu wurde der Flaschendeckel gelockert und die Top-Agar-Lösung intervallweise geschwenkt um ein Überkochen zu vermeiden. Der so aufbereitete Top-Agar war ebenfalls erst bei einer Temperatur von ca. 50-45°C zu verwenden, da sonst Zellen wie Phagen schaden nehmen konnten. Der Top-Agar wurde steril bei RT gelagert.

2.16.6 Vorbereiten der Bakterien-Stammkulturen

Aus der –80°C-Tiefkühltruhe wurde eine Charge XL1-Blue *E.coli* Bakterien (Firma Clontech) entnommen und auf einer LB/TET-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

Von den hochgewachsenen Kolonien wurde zur Herstellung einer Stammkultur eine einzelne Kolonie in Flüssigmedium (LB/TET/$MgSO_4$) überführt und über Nacht auf einem Schüttler bei 170 Upm bei 37°C inkubiert. Die Kultur sollte am nächsten Tag eine optische Dichte (OD 600) von 2,0 haben. Aus dieser Stammkultur wurden die zukünftigen Arbeitsansätze erstellt. Die Stammkultur war für mehrere Wochen im Kühlschrank haltbar.

2.16.7 PFU (Plaque-Forming-Units)-Bestimmung

10x Lambda-Verdünnungspuffer-Stammlösung

für einen Liter wurden benötigt:

NaCl	1,00 M final	58,30 g
$MgSO_4$*7 H_2O	0,10 M final	24,65 g
Tris-HCl (pH 7,5)	0,35 M final	350,0 ml einer 1 molaren Lösung

Der Ansatz wurde mit bidest. H_2O auf einen Liter aufgefüllt, autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert. Für eine einfache Gebrauchslösung wurde die Stammlösung mit bidestilliertem H_2O verdünnt.

Zur weiteren Vorbereitung gehörte die Kalkulation der **P**laque **F**orming **U**nits pro Milliliter (Pfu/ml), dem Phagentiter. Aus der tiefgefrorenen Phagenbank (Clontech, Rat Liver λTriplEx cDNA Library) wurden 10 µl entnommen und mit dem Lambda-Verdünnungspuffer 1:100 verdünnt. Der so verdünnte Phagenstock wurde zur Lagerung in den Kühlschrank (4°C) gestellt.

Aus dieser so genannten Arbeitsverdünnung wurde nun eine weitere 1:100 Verdünnung erstellt. Mit dieser finalen 1:10.000 Verdünnungsstufe wurde die Virulenz ausgetestet.

Hierzu wurden vier Ansätze nach folgendem Schema pipettiert:

10ml-Röhrchen	Lambda-Verdünnungspuffer in µl	XL1-Blue aus Stammkultur in µl	Phagenansatz 1:10000 in µl
1	100	200	5
2	100	200	10
3	100	200	20
4	100	200	0

Die Ansätze wurden unter der Sterilbank pipettiert. Es erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei 37°C in einem Wasserbad. Durch diesen Inkubationsschritt wurde den Phagen ausreichend Zeit gegeben, sich an die Bakterien zu heften und sie zu infizieren. Die Bakterien-Phagensuspension wurde nun mit 3 ml Top-Agar (45°C) versetzt und auf LB/TET-Platten ausgegossen. Nach dem Erstarren bei Raumtemperatur wurden die Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.
Am nächsten Tag wurden die einzelnen Lysehöfe im Bakterienrasen pro Platte ausgezählt und der arithmetische Mittelwert bestimmt. Für die Bestimmung der Pfu (Phagentiter) wurde folgende Formel herangezogen:

$$pfu / ml = \frac{Plaqueanzahl * Verdünnungsfaktor * 10^3 \mu l / ml}{\mu l}$$

2.16.8 Auszählen des Anteils an rekombinanten Phagen

Nachdem die Pfu bekannt war, musste die Anzahl der rekombinanten Phagen, d.h. die Anzahl an Viren, die ein Teil der Faktor H-Sequenz in sich tragen, beziehungsweise die daraus resultierende Anzahl rekombinanter Bakterienkolonien errechnet werden.
Hierzu wurde eine Verdünnung, die eine überschaubare Zahl an Lysehöfen ergab, ausgewählt. Es wurden, wie bereits oben beschrieben, 10 µl entnommen, um jeweils 200 µl Bakterien zu infizieren. Die Suspension wurde nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37°C im Wasserbad ebenfalls mit 3 ml Top-Agar versetzt und nach kurzem Schwenken auf LB/TET-Agarplatten gegeben, auf die eine Stunde zuvor 100 µl IPTG und 50 µl X-Gal pipettiert worden waren. Nach dem Erhärten des Top-Agars wurden die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37°C gelagert.

Die Behandlung der Agar-Platten mit IPTG und X-Gal diente dem Zweck, die rekombinanten von den nicht-rekombinanten Kolonien unterscheiden zu können. Diese Technik nutzt einen genetischen Defekt der Bakterienlinie XL1-Blue aus. Dieser beruht auf der Fähigkeit der Bakterien, keine funktionsfähige β-Galaktosidase bilden zu können (siehe auch 2.6). Mit Hilfe der Phagen, in deren Genom sich das LacZ-Gen befindet, sind die Bakterien in der Lage, ein funktionsfähiges Enzym zu bilden. Allerdings enthalten nur die Phagen ein vollständiges LacZ-Gen, die keine genetische Information in Form von cDNA aus der Rattenleber besitzen. Somit handelt es sich bei den Phagen-infizierten um die nicht gewünschten Zellen. Diese bilden in Verbindung mit IPTG und X-Gal blaue Kolonien auf der Agarplatte.
Auf den Platten wurden die Kolonien der jeweiligen Farbe ausgezählt und der prozentuale Anteil der blauen, d.h. der nicht rekombinanten Kolonien bestimmt. Der Anteil der rekombinanten (weißen) Bakterienkolonien sollte größer als 75 % sein.

2.16.9 Ausplattieren und Abklatschen der Bakterienplatten (Vorbereitende Arbeitsschritte)

Um die Phagen zu finden, die ein Sequenzbruchstück des Ratten Faktor-H enthalten, mussten sie entsprechend markiert werden. Hierzu wurde eine Plaque-Hybridisierung angewendet. Die in den Phagen enthaltene DNA wurde auf eine Nylonmembran aufgebracht, dort kovalent vernetzt und anschließend mit einer sequenzspezifischen (komplementären) Sonde nachgewiesen. Die hier verwendete Sonde wurde mittels PCR erzeugt und in einem separaten Markierungsschritt radioaktiv mit Phosphor-32 markiert.

2.16.10 Herstellung der Faktor H-Sonde

Die für die Sequenzsuche verwendete Faktor H-Sonde wurde mittels der **P**olymerase-**K**etten-**R**eaktion (PCR) gewonnen. Für diese wurden die Primer ratFH-2s und ratFH-2as verwendet, deren Produkt eine Sonde mit einer Länge von 1003 Bp ergab. Als Matrize wurde cDNA, die aus H4IIE-Rattenhepatomzellen gewonnen worden war, benutzt. Um aus der Bibliothek den 5´-Bereich der Faktor H Sequenz zu finden, wurde noch eine zweite kürzere Sonde hergestellt. Die Primer, mit deren Hilfe die zweite Sonde erzeugt wurde, wurden als ratFH-1s und ratFH-1as bezeichnet. In der PCR erzeugten sie ein Amplifikat von 428 Bp Länge.

Um genügende Mengen der Sonde zu produzieren, wurden insgesamt acht Ansätze pipettiert, die jeweils die folgende Zusammensetzung hatten:

1 µl RedTaq-Polymerase
5 µl RedTaq-Puffer
1 µl ratFH-2s oder ratFH-1s
1 µl ratFH-2as oder ratFH-1as
1 µl dNTPs
2 µl cDNA-Template
39 µl H_2O bidest.

50 µl Gesamtvolumen je PCR-Reaktionsgefäß
Das verwendete PCR-Programm war folgendermaßen aufgebaut:

1. 5 min 94°C anfängliche Denaturierung
2. 1 min 94°C Denaturierung
3. 1 min 54°C Primeranlagerung (Annealing)
4. 2 min 72°C Polymerasereaktion (Elongation)
5. 10 min 72°C finale Polymerasereaktion (Elongation)
6. ohne Zeitlimit 15°C

Die Schritte 2-4 wurden 34-mal wiederholt.

DNA-Auftragspuffer (10x):

20% (w/v) Ficoll 400
0,1 M EDTA
1% (w/v) SDS
0,25% (w/v) Bromphenolblau
in bidestilliertem Wasser lösen und den pH-Wert mit NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 einstellen. Anschließend wurde das Volumen auf 100 ml aufgefüllt.
Um das entstandene Amplifikat zu überprüfen, wurden von jedem Ansatz 5 µl der Reaktion mit Auftragspuffer versetzt und in einem Agarosegel aufgetrennt. Die PCR war dann erfolgreich, wenn auf Höhe der entsprechenden Markerbande eine distinkte Bande im UV-Licht zu sehen war.

Zur weiteren Verwendung musste die Sonde von der Polymerase sowie von den unverbrauchten dNTPs und den Primern getrennt werden. Dies wurde mit Hilfe eines Qiagen-Kits erreicht, welcher wirkungsvoll alle Nukleotide und Primer bis 70 Bp und die Polymerase enfernte (siehe DNA-Aufreinigung mittels des Qiagen-PCR-Extraktion-Kits).
Um die absoluten Mengen der aufgereinigten DNA bestimmen zu können, wurden 1-5 µl in einem Agarosegel zum Vergleich mit einen quantitativen Marker aufgetrennt. Durch die Abschätzung der Leuchtintensität der Sonden-DNA im Vergleich zu einer entsprechend intensiv leuchtenden Markerbande wurde die absolute DNA-Menge bestimmt.

2.16.11 Radioaktives Markieren der Faktor H-Sonde

Um die DNA-Sonde radioaktiv zu markieren, wurde ein Kit („Multiprime DNA Labelling System“) der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Dieser Kit beruht auf dem System der Erststrangsynthese mit Hilfe von Zufallsprimern und einer DNA-Polymerase (Klenow-Polymerase).
Zu 1-10 µg DNA-Sonde in einem Volumen von 20 µl, die für 10 min bei 94°C denaturiert und anschließend rasch auf Eis abgekühlt worden waren, wurden auf Eis hinzupipettiert:

4 µl GTP
4 µl TTP
4 µl ATP
5 µl Reaktionspuffer
5 µl Zufalls-Nukleotid-Primer
5 µl radioaktives CTP (^{32}P markiert)

Der Ansatz wurde gründlich gemischt und anzentrifugiert. Um die Reaktion zu starten, wurden 2 µl Klenow-Polymerase hinzugefügt und das Volumen mit bidest. H_2O auf 50 µl aufgefüllt. Die Markierungsreaktion erfolgte bei 37°C im Heizblock für mindestens eine Stunde. Die Sonde wurde nach kurzem Anzentrifugieren über die TaKaRa-Gelfiltrationssäulen aufgereinigt (siehe DNA-Aufreinigung mittels der TaKaRa-Säule). Durch die Verwendung der Säulen wurden nicht inkorporierte, radioaktive CTPs sowie überschüssige andere dNTPs und Zufallsprimer entfernt. Die gebrauchsfertige Sonde wurde in 30 µl H_2O aufgenommen und bei –20°C eingefroren.

2.16.12 Ausplatieren und Abklatschen der Bakterienplatten Teil B

Die XL1-Blue Bakterien wurden nun wie unter dem Punkt 2.16.7 beschrieben infiziert und auf LB/TET/$MgSO_4$-Platten ohne IPTG und X-Gal ausplattiert. Die Platten wurden am nächsten Tag aus dem 37°C Brutschrank genommen und für 30 min im Kühlschrank gelagert. In der Zwischenzeit wurden ein Sterilisierungsofen auf 80°C und ein Hybridisierungsofen auf 42°C vorgeheizt.

Auf die gekühlten Agaroseplatten wurde unter sterilen Bedingungen je eine passende, ungeladene Nylonmembran (Amersham, Hybond N) gelegt und für eine Minute auf den Agarplatten belassen. In dieser Zeit difundierten ausreichend Phagen aus den Lysehöfen auf die Nylon-Membran. Die Position der Membran während des Abklatschens der Agaroseplatte wurde mit einem wasserfesten Filzstift an der Petrischale und auf der Membran markiert. Somit ließ sich das Hybridisierungsmuster, welches der Röntgenfilm später zeigt, einem oder zumindest einer Gruppe von Phagenplaques zuordnen.

Als nächstes galt es, die Phagen, die an die Membran gebunden hatten, zu lysieren. Durch die Lyse wurde die in den Phagen enthaltene DNA freigesetzt, um an die Nylonmembran zu binden. Die Lyse erfolgte, indem die Membran mit der phagenbedeckten Seite nach oben auf ein mit 20%iger SDS-Lösung getränktes Whatmann-Filterpapier gegeben wurde. Die Inkubation mit der Lyselösung erfolgte bei Raumtemperatur für 2 min. Nach der Lyse wurde die DNA denaturiert, damit sie bei der späteren Waschung und Hybridisierung nicht abgespült werden konnte. Die Denaturierung erfolgte für 3 min bei Raumtemperatur durch die Denaturierungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH), mit der ebenfalls Whatmann-Papier getränkt worden war. Überschüssige Flüssigkeit, die an den Membranen haftete, wurde am Rand des jeweiligen Inkubationsgefäßes abgestreift, wodurch eine zu starke Vermischung der Lösungen verhindert wurde. Im Anschluss an die Denaturierung erfolgten zwei Neutralisierungsschritte, beide auf mit Neutralisierungslösung getränktem Whatmann-Papier. Die Neutralisierungslösung [1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0)] war für beide Neutralisierungsschritte identisch. Beide Neutralisierungen erfolgten nacheinander und wurden bei RT für jeweils drei Minuten durchgeführt. Zuletzt wurden die Membranen durch ein mit 2x SSC gefülltes Bad gezogen und auf einem Bogen Filterpapier zum Trocknen ausgelegt.

Nachdem alle Hybondmembranen getrocknet waren, wurden sie bei 80°C zur DNA-Vernetzung im Sterilisierungs-Ofen für 2 h „gebacken“. Während dieser Zeit, wurde die Ambion UltraHyb-Lösung auf 65°C erhitzt und gelegentlich geschwenkt. Die Hybridisierungslösung wurde so lange im Wasserbad inkubiert, bis sie klar und homogen

erschien. Je nach Anzahl der Membranen wurden eine oder mehrere Hybridisierungsflaschen (max. 9 Membranen pro Flasche) mit 2x SSC-Puffer gefüllt. Die entsprechende Filterzahl wurde mit einer Pinzette möglichst luftblasenfrei und mit der die DNA enthaltenden Seite nach innen zeigend in die Hybridisierungsflaschen gegeben.

Der 2x SSC-Puffer wurde vorsichtig dekantiert und gegen 15 ml vorgewärmte UltraHyb-Lösung ausgetauscht. Die Prähybridisierung erfolgte bei 42°C und für 30 min im Rollerofen. Nach der Prähybridisierung wurden dem Ansatz 30 µl der radioaktiv markierten Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung wurde ebenfalls bei 42°C über Nacht im Rollerofen durchgeführt. Die Sonde war zuvor für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend zur Verhinderung einer Renaturierung sofort auf Eis gestellt worden.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung, in der noch ungebundene Sonde vorhanden war, abgegossen und zur Wiederverwendung bei –20°C eingefroren. Die Membranen wurden mit dem ersten Waschpuffer (Waschpuffer I: 2x SSC, 0,1% SDS) für 2 x 5 min bei 42°C im Hybridisierungsofen gewaschen. Waschpuffer I wurde dekantiert, und die Proben wurden mit Waschpuffer II (0,1x SSC, 0,1% SDS) für 2 x 15 min behandelt. Die Inkubation erfolgt bei 42°C im Hybridisierungsofen. Nach jedem Waschvorgang wurde mit einem Geigerzähler die Radioaktivität des Waschpuffers und die Rest-Strahlung der Membranen gemessen, um die Gewissheit zu haben, dass unspezifisch gebundene DNA weitestgehend entfernt worden war.

Zuletzt wurden die Filter für 30 min in bidestilliertem Wasser gewässert. Für die Detektion wurden die Nylonfilter auf einen Bogen Whatmann-Filterpapier mit der nicht Proben-behafteten Seite gelegt und getrocknet. Anschließend wurden sie auf einem neuen Bogen festgeklebt. Diese Membran-Whatmann-Papier-Kombination wurde mittels Klebeband in einer Röntgenfilm-Kassette fixiert und mit Frischhaltefolie überzogen. In der Dunkelkammer wurde ein Kodak Biomax MR 30x40cm Röntgenfilm aufgelegt und die Kassette verschlossen. Der Film wurde über Nacht bei –70°C belichtet. Am nächsten Tag wurde der Film entwickelt. Die auf dem Film als positiv identifizierten Plaques wurden mit den entsprechenden Agaroseplatten verglichen und nach der Markierung ausgerichtet. Befand sich unter dem Spot ein Lysehof, so wurde er unter der Sterilbank ausgestanzt und in 5 ml 1x Lambda/Chloroform-Puffer (auf 5 ml 1x Lambda-Puffer einen Tropfen Chloroform) gegeben. Während einer dreistündigen Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Phagen aus dem Agar in den Puffer diffundieren. Diese Ansätze wurden bei 4°C gelagert.

Die primär positiven Ansätze wurden wie oben beschrieben erneut ausplattiert. So wurde überprüft, ob es sich um einen positiven Phagenspot handelte. Enthielt der ausgeschnittene Lysehof tatsächlich FH-spezifische DNA, d.h. handelte es sich um ein echtes

Hybridisierungssignal, so war mit einer starken Zunahme der positiven Plaques in der folgenden Ausplattierung (Rekolonierung) und Hybridisierung zu rechnen. Die dritte Rekolonierung erbrachte in der Regel einheitlich positive Plaques.

2.16.13 Konversion des λTriplEx-Plasmid in ein pTriplEx-Plasmid

Für die Konversion des λTriplEx-Plasmids in ein pTriplEx-Plasmid wurden zuerst *E.coli*-BM25.8 auf einer LB-Platte ausgestrichen. Von dieser Platte wurde eine gut isolierte Kolonie über Nacht in 10 ml LB/$MgSO_4$-Medium bei 31°C kultiviert. In den Ansatz wurden nun 100 µl 1M $MgCl_2$ gegeben, so dass eine finale Konzentration von 10 mM entstand. Die OD_{600} der Kultur sollte am nächsten Tag zwischen 1,1 und 1,4 liegen.
Nun wurde ein als positiv identifizierter und gut vereinzelter Phagen-Spot in 350 µl 1x Lambda-Verdünnungspuffer aufgenommen und wie beschrieben bei 37°C im Wasserbad für 3-4 h inkubiert. In einem 20 ml Röhrchen wurden 200 µl der BM 25.8-Zellen mit 150 µl der obigen Phagen-Lösung vorsichtig gemischt und bei 31°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 400 µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz wurde für eine Stunde unter vorsichtigem Schütteln (225 rpm) bei 31°C inkubiert. Nun wurden auf den für 1 h bei Raumtemperatur vorgewärmten LB/CARB-Platten jeweils 1-10 µl des Bakterien-Phagen-Ansatzes ausplattiert, um sauber vereinzelte Kolonien zu erhalten. Die Platten wurden im Brutschrank bei 31°C über Nacht inkubiert.
Für die Plasmid-Insert-Kontrolle wurden einzelne Kolonien gepickt und in 5 ml LB/CARB-Medium in Flüssigkultur genommen. Nach einer Wachstumszeit von ca. 6 h bei 31°C wurde je 1 ml der Kultur abgenommen und die enthaltenen Zellen bei 13.000xg für 3 min pelletiert. Das überständige Medium wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 30 µl bidest. H_2O resuspendiert. Mittels einer PCR mit flankierenden Vectorprimern (TriplEx-Primer) wurden die isolierten Plasmide auf die Länge der in ihnen enthaltenen Faktor H-Sequenzabschnitte untersucht.
Waren die Bruchstücke (PCR-Amplifikate) nicht zu klein (d.h. >300 Bp), so wurde von weiteren zwei bis fünf Millilitern der entsprechenden Kultur eine Miniplasmidpreparation nach SeqLab-Laccone durchgeführt, um die Nukleotidsequenzen der entsprechenden FH-Fragmente zu identifizieren.

2.16.14 Miniplasmidpreparation nach SeqLab-Laccone

Die abgenommenen 2-5 ml der Baktriensuspension wurden nun bei 4.000xg für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Medium wurde vollständig abgenommen. Um restliche Mediumbestandteile zu entfernen, wurde das Bakterienpellet in Trispuffer (10 mM; pH 8,0) resuspendiert und wie oben beschrieben erneut zentrifugiert. Der Trispuffer wurde abgenommen und die Zellen in 100 µl Resuspensionspuffer (RE-Puffer) aus dem Kit (Seqlab) aufgenommen, gut resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (E-Cup) überführt. Nun wurden dem Ansatz 200 µl Lysepuffer (LY) zugesetzt. Es wurde einmal über-Kopf-geschwenkt und für maximal 5 min bei RT inkubiert. Nach der erfolgten Lyse wurden 150 µl Neutralisierungspuffer (NE) hinzupipettiert. Es wurde wiederholt über-Kopf-geschwenkt und ebenfalls für maximal 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Cups bei 14.000xg für 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 2 Volumina absolutem, unvergälltem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde mit einer Pipette gründlich gemischt und für 20 min bei 14.000xg bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet (falls sichtbar) wurde mit mindestens einem Milliliter 70%igem unvergälltem Ethanol gewaschen, für 5 min bei RT inkubiert und im Anschluss bei 14.000xg für 5 min und bei RT zentrifugiert.
Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet bei 37°C im Heizblock getrocknet und anschließend in 30 µl bidest. H_2O aufgenommen.

2.16.15 Midi-Plasmidpreparation mittels Qiagen High Speed Plasmid Kit

Die Bakterien einer in 50 ml LB-Medium und selektivem Antibiotikum gewachsenen Übernachtkultur wurden bei 6.000xg für 15 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 6 ml Resuspensionspuffer (P1 aus dem Qiagen-Kit) gründlich resuspendiert (vortexen), so dass keine Zellklumpen zurückblieben.
Die Zellen wurden durch die Zugabe von 6 ml Lysepuffer (P2) bei Raumtemperatur für maximal 5 min lysiert. Das Lysat wurde vorsichtig 4-6-mal über-Kopf-geschwenkt. Durch 6 ml des auf 4°C vorgekühlten Puffers P3 (Qiagen) wurde das Gemisch neutralisiert und die Lyse gestoppt. Der Ansatz wurde ebenfalls 4-6-mal geschwenkt, umgehend auf die Qiagen Qiafilter Kartusche gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Qiagen HiSpeed-Säule durch die Zugabe von 4 ml des QBT-Puffers aktiviert. Der durchgelaufene Puffer wurde verworfen, restlicher auf der Säule

verbliebener Puffer wurde dort belassen. Der Inhalt der Filterkartusche wurde nun mit Hilfe des mitgelieferten Spritzenkolbens auf die HiSpeed-Säule gegeben. Das durch die Filtration klare Lysat lief nur aufgrund der Gravitation durch die Säule. Der Durchfluss wurde verworfen. Nachdem das Lysat komplett durchgelaufen war, wurden 20 ml Waschpuffer (QC) auf die Säule gegeben. Auch dieser Puffer sickerte ohne weitere Krafteinwirkung durch die Säule und wurde verworfen. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Waschen mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch die Zugabe von 3,5 ml (0,7 Volumina) Isopropanol präzipitiert. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde aus einer 20 ml Spritze der Kolben herausgezogen und der Qiaprecipitator (Feinfilter) an der Spritze befestigt. Die Eluat-Isopropanolmischung wurde nun in die Spritze gegeben und mit Hilfe des Kolbens durch den Filter gepresst. Der Durchfluss wurde verworfen und der Qiaprecipitator abgenommen. Die Spritze wurde mit 2 ml 70%igem Ethanol (unvergällt) aufgezogen, der Filter wurde wieder aufgesetzt und mit dem Alkohol gewaschen. Der Qiaprecipitator wurde nun erneut abgenommen, an eine Vakuumpumpe angeschlossen und für drei Minuten am Vakuum belassen. Nun wurde der Kolben aus einer 5 ml Spritze (ebenfalls mitgeliefert) entfernt und der Filter wieder auf die Auslassöffnung aufgesetzt. In die Spritze wurde nun 1 ml TE-Puffer (Qiagen-Kit) gegeben, um die Plasmid-DNA von dem Filter zu eluieren. Das Eluat wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Elution wurde wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Das Eluat wurde erneut gesammelt und ein Teil im Photometer vermessen. Ein weiterer Teil wurde zur Bestimmung der Reinheit in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA wurde direkt weiterverwendet oder bei mindestens –20°C eingefroren.

2.16.16 Sequenzieren der Plasmide

Für die Sequenzierungen wurde ein Kit („Thermo Sequenase™ Cy™5.5 Terminator Cycle Sequencing Kit“) der Firma Amersham Pharmacia und die Hardware und Software der Firma VisibleGenetics verwendet. Dieses Sequenziersystem beruht in Anlehnung an die von SANGER et al. 1977 entwickelte Methode auf der Technik des Kettenabbruchs durch terminierend eingebaute Dideoxynukleotide (ddNTP). Im Gegensatz zu einer normalen PCR, die durch die Primer von 5`- in 3`-Richtung beide Matrizenstränge kopiert, wird bei der Sequenzier-PCR nur ein Strang „kopiert“, d.h. sequenziert. Wie auch bei der normalen PCR befinden sich im Reaktionsansatz die 2´-Deoxynukleosid-5´-triphosphate, die sogenannten dNTPs. Sie sorgen für eine normale Strangsynthese, bis ein terminierendes ddNTP eingebaut

wird. Die ddNTPs gibt es als ddATP, ddCTP, ddGTP und als ddTTP, so dass nach jedem Nukleotid der Neustrangsynthese eine Termination stattfinden kann. Die in diesem Kit vorhanden ddNTPs sind mit dem laserdetektierbaren Farbstoff Cy5.5 markiert. Da alle terminierenden ddNTPs mit dem gleichen Farbstoff markiert sind, wurde für jeden der vier Terminatoren eine eigene Sequenzier-PCR angesetzt. Durch den gemeinsamen Auftrag der vier getrennten Sequenzier-Proben nebeneinander (A-, C-, G-, T-Reaktion) auf das Sequenziergel (6% Acrylamid) und die gemeinsame Laserdetektion, lässt sich die Nukleotidsequenz entschlüsseln, weil sich die mittels Laser detektierten DNA-Fragmente nur um jeweils ein Nukleotid unterscheiden.
Die in diesem Kit eingesetzte Polymerase ist eine Thermosequenase-DNA-Polymerase. Diese ist thermostabil ohne Exonukleaseaktivität und besitzt eine gebundene thermostabile inorganische Pyrophosphatase (TAP). Diese gebundene Pyrophosphatase verhindert durch die Hydrolyse des inorganischen Pyrophosphates (PPi), welches als ein Beiprodukt des Polymerisationsprozesses auftritt, die Pyrophospholyse der 5´-3´-Verbindung. Durch die nicht gewünschte Pyrophospholyse dieser Bindung könnte es sonst vorkommen, dass ein terminierendes ddNTP abgespalten wird und zurück in den ddNTP-Pool der Lösung geht. Der zuvor terminierte Strang würde so für den Detektionslaser unsichtbar bleiben, und das abgespaltene ddNTP würde, wenn es nicht herausgereinigt wird, für einen höheren Hintergrund bei der Detektion sorgen.
Der Cy5.5-Farbstoff ist abgeleitet von einem Cyanin-Farbstoff mit einem Extinktionsmaximum von 676 nm. Für einen Sequenzieransatz hatte sich herausgestellt, dass eine DNA-Matrizenmenge von ca. 1000 ng für die vier ddNTP-Reaktionsansätze sehr gute Ergebnisse erzielt.

Es wurde ein „Mastermix“ nach folgendem Schema auf Eis pipettiert:

3,5 µl Reaktionspuffer
2,0 µl Primer
2,0 µl Thermosequenase
x,x µl Matrize (ca. 1000 ng, 250 µg pro Reaktion)
x,x µl H_2O bidest. in Abhängigkeit von der Matrizenmenge
31,5 µl Gesamtvolumen
Von dem Mastermix wurden 7 µl auf die jeweils 2 µl in den PCR-Cups vorgelegte ddNTP-Lösung pipettiert. Durch mehrfaches Auf-und-Abpumpen mit der Pipette wurde der jeweilige

Mix gemischt und in den Thermocycler gestellt, der auf 95°C vorgeheizt worden war (Hot-Start).
Für die Sequenzierreaktion wurde folgendes Programm verwendet:

1. 95°C 2 min
2. 95°C 45 s
3. 55°C 45 s
4. 72°C 2 min

die Schritte 2-4 wurden 36-mal wiederholt
Final 4°C ohne Zeitlimit

Nachdem die Sequenzier-PCR beendet war, wurden alle Ansätze auf 20 µl mit bidest. H_2O aufgefüllt. Bevor die Proben auf das Sequenziergel aufgetragen wurden, waren alle nichtverbrauchten ddNTPs, dNTPs sowie Primer durch Miniigelfiltrationssäulen entfernt worden.
Für die Aufreinigung wurden die Qiagen DyeEx Spin-Säulen verwendet. Hierzu wurde die Säulenmatrix gründlich resuspendiert und der untere Auslaufschutz entfernt. Anschließend wurde der Deckel gelockert und die Säulen in deckellosen 2-ml-Reaktionsgefäßen für 3 min bei 750xg und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße gestellt. Die Gelfiltrationssäulen wurden nun mit dem jeweiligen Reaktionsansatz befüllt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einer Vakuumzentrifuge zur Trocknung eingeengt. Anschließend wurde das Pellet in 6 µl formamidhaltigem Beladungspuffer unter mäßigem Vortexen resuspendiert und anzentrifugiert. Unmittelbar vor dem Beladen des 6%igen Acrylamidgels („SureFill™ 6% Sequencing Gel“) wurden die Proben für 4 min bei 90°C denaturiert und umgehend auf Eis abgekühlt. Es wurden 1,5 µl der jeweiligen Probe auf die Geltaschen aufgetragen. Für die Detektion der endmarkierten DNA-Stränge wurde der „Longread-Tower“ der Firma Visible Genetics verwendet. Die Auswertung der Sequenzierläufe erfolgte über die mitgelieferte Software GeneObjects 3.0.2 .

2.17 Immunaffinitätsaufreinigung der Rattenfaktoren H und I

Kopplung der monoklonalen anti-Faktor H und anti-Faktor I Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose 4B.

Für die Kopplung der Antikörper wurde CNBr-aktivierte Sepharose 4B der Firma Pharmacia Biotech verwendet. Da die Sepharose als ein gefriergetrocknetes, mit Konservierungsstoffen versetztes Pulver geliefert wurde, musste sie vor der eigentlichen Kopplungsreaktion bei einem pH-Wert von 2-3 gewaschen werden. Das Waschen bei niedrigen pH-Werten ist nötig, damit die Matrix nicht während des Waschens aktiviert wird und anschließend mit sich selbst reagiert. Da die Sepharose auf das 3,5 fache Volumen quillt, wurden drei Gramm des trockenen Pulvers in ein 50 ml-Becherglas eingewogen. Diese drei Gramm waren ausreichend, um damit zwei PD-10 Säulen (Amersham Pharmacia) mit jeweils ca. 5 ml Gel zu befüllen. Auf das Pulver wurde soviel 1mM HCl gegeben, bis es vollständig gequollen und bedeckt war. Die Gelmasse wurde nun auf eine Fritte aus gesintertem Glas gegeben und anschließend mit ca. 200 ml 1 mM HCl pro Gramm Trockenpulver gewaschen. Für die Kopplungsreaktionen wurden ca. 4-5 mg des jeweiligen monoklonalen Antikörpers pro ml Gel mit Kopplungspuffer versetzt. Für die Aufreinigung des Ratten FH wurde der selbst generierte monoklonale Antikörper 4-7D und für die Aufreinigung des Ratten FI der ebenfalls selbst generierte mAK 15F11-2 verwendet.

<u>Kopplungspuffer:</u>

0,1 M $NaHCO_3$; pH 8,3

0,5 M NaCl

Für die Kopplungsreaktion waren ca. 5 ml Kopplungspuffer pro Gramm Trockenpulver nötig. Die gewaschene Gelmasse wurde nun auf die zwei Kopplungsansätze verteilt und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rotor in Kopplungspuffer inkubiert.

Nach der Inkubation wurden beide Säulen mit jeweils fünf Volumina Kopplungspuffer gewaschen. Um die aktiven Gruppen der Gelmatrix abzusättigen, wurde die Matrix in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) Puffer überführt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach dem Absättigen wurden die Säulen mindestens dreimal mit jeweils 5 Volumina alternierend auf einen pH-Wert von 4 und 8 gebracht. Für den pH4-Waschschritt wurde 0,1 M Acetatpuffer (pH 4) mit 0,5 M NaCl verwendet, gefolgt von 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) mit ebenfalls 0,5 M NaCl für den pH8-Waschschritt. Die Säulen wurden bis zur weiteren Verwendung mit fünf

Volumina PBS und anschließend mit drei Volumina PBS + 0,02% (w/v) Azid gespült und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.
Das für die immunaffinitäschromatographische Reinigung der Faktoren H und I benötigte Rattenserum wurde durch Herzpunktion der Tiere gewonnen. Zunächst wurden die Ratten (Wistar) mit einem Alter von über 12 Monaten durch CO_2-Begasung soweit betäubt, dass sie keine Schmerzreaktion und keinen Liedschlag mehr zeigten. Die Ratten wurden auf dem Rücken liegend fixiert und mit sterilem Besteck eröffnet. Durch Aufschneiden des Brustraums wurde das noch schlagende Herz freigelegt. Über die Punktion der rechten Herzkammer mit einer 0,9 mm Kanüle wurde das Vollblut langsam in die Serummonovette gezogen. Das maximal gewonnene Blutvolumen betrug in Abhängigkeit von Gewicht der Ratte 10-15 ml. Der Inhalt der Monovetten wurde vorsichtig geschwenkt und für eine völlige Koagulation des Blutes über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Serum abzentrifugiert und mit einem Protease-Inhibitor Cocktail der Firma ICN versetzt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Serum bei -70° eingefroren.
Für eine optimale Bindung des FH aus Rattenserum an den gekoppelten Antikörper wurde der NaCl-Gehalt des Rattenserums von den physiologischen 0,12 M auf 0,4 M erhöht. Das mit NaCl angereicherte Serum wurde nun 1:4 mit Waschpuffer [50 mM Tris, 400 mM NaCl (pH 8,0)] verdünnt. Die Säulenmatrix wurde mit 50 ml Waschpuffer äquilibriert. Das verdünnte Serum wurde zweimal langsam über die Säule geführt, und der Durchfluss wurde aufgehoben. Die Säule wurde nun mit 40 ml alkalischem Waschpuffer (pH 9,5), dann mit 40 ml saurem Na-Acetat Waschpuffer (100 mM, pH 5) und zuletzt mit 40 ml Waschpuffer (pH 8,0) gewaschen. Die unterschiedlichen Waschfraktionen wurden zunächst aufgehoben. Die Elution des gebundenen FH erfolgte mit 4 M $MgCl_2$. Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Säule wurde mit 50 ml PBS/0,02% Na-Azid gewaschen und in diesem Puffer gelagert. Von den Elutionsfraktionen wurden jeweils 15 µl mit TCA (2.19.14) gefällt, auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend einer Silberfärbung (2.21) unterzogen. Die Proben, in denen sich der FH befand, wurden anschließend vereinigt und vollständig gegen PBS über Nacht bei 4°C dialysiert. Nach der Dialyse wurden die Proben über Centriprep-Ankonzentrierungssäulen (Durchlassgrenze 10.000 Da) bei 2.300xg in einer Zentrifuge (4°C; 30-90 min) ankonzentriert und bei -20°C eingefroren.

Der Ratten FI wurde aufgrund seiner etwa zehnfach geringeren Serumkonzentration in einem abgeänderten Verfahren, dem so genannten Batch-Verfahren gewonnen. Hierzu wurde die Säule zunächst mit 60 ml Waschpuffer (50 mM Tris; 0,3 M NaCl; pH 7,8) äquilibriert. Das Rattenserum wurde 4-fach mit Waschpuffer verdünnt. Die abgesetzte Matrix wurde aus der

Säule in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit dem Serum-Waschpuffergemisch versetzt. Der Ansatz wurde zunächst für 2 h bei Raumtemperatur, dann für 20 h bei 4°C in einem Überkopf-Rotor inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Material in die Säule zurückgegossen, der Durchfluss aufgefangen und zunächst bei 4°C gelagert. Die Säule wurde nun mit 40 ml Waschpuffer gewaschen. Der Durchfluss wurde aufgehoben und ebenfalls bei 4°C gelagert. Die Elution erfolgte mit 20 ml Elutionspuffer (100 mM Citrat; 0,3 M NaCl; pH 3,5). Das Eluat wurde in Fraktionen a 0,5 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen, in die zur sofortigen Neutralisation 0,05 ml 2 M Tris (pH 8,0) vorgelegt worden waren. Nach der Elution wurde die Säule mit 10 ml Neutralisierungspuffer (100 mM Tris; 0,3 M NaCl; pH 7,8) gespült. Alle Proben wurden im Photometer bei einer OD von 280 nm vermessen. Die Elutionsfraktionen, in denen die höchste OD gemessen wurde (in der Regel die Fraktionen 1-10), wurden vereinigt und gegen 10 l PBS dialysiert (Durchlassgrenze 10.000 Da).
Nach der Dialyse wurde das Dialysat über eine Centriprep-Ankonzentrierungssäule mit einer Durchlassgrenze von 3.000 Da in einer Zentrifuge bei 2.300xg eingeengt. Die eingeengten Proben wurden bei -80°C eingefroren.

2.18 Entwicklung des ELISA zur Detektion des Ratten FH

2.18.1 Immunisierung der Tiere

Für die Gewinnung eines polyklonalen Serums gegen den Rattenfaktor H und gegen den Rattenfaktor I wurde jeweils ein Chinchillabastard-Kaninchen (geliefert von der Firma Charles River) mit dem im SDS-Gel aufgetrennten und neutralisierten Protein wiederholt subkutan immunisiert. Für die Immunisierung wurde ein SDS-Gelstück, welches die spezifische Proteinbande in der Coomassiefärbung zeigte, mit 0,625 M Tris-HCl (pH 6,75) auf einen pH-Wert von 7 umgepuffert, ausgeschnitten und zu einem Gelbrei zermörsert. In den applizierten Gelstücken waren je nach Protein 70-280 µg enthalten, so dass eine gute Immunreaktion zu erwarten war. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen. Die zermörserten Gelstücke wurden nun in CFA (1. Immunisierung/Grundimmunisierung) oder IFA (Boosterimmunisierungen) aufgenommen und dem Tier subkutan gespritzt.
Nach der zweiten bzw. dritten Immunisierung wurden dem Tier zur Kontrolle der Antikörpertiterentwicklung ca. 1-5 ml Blut abgenommen. Das Serum wurde nach der Blutgerinnung bei 4°C über Nacht durch Zentrifugation (300xg) gewonnen und im

Immunblot und ELISA mit Festphasen-gebundenem Antigen gegen die immunaffinitätsgereinigten FH und FI gestestet.

Immunisierungstagebuch für den polyklonalen FI-Antikörper:

Tier: Chinchilla Bastard, weiblich, geb. Nov.02; Immunisierungen: subkutan

1. 150 µg FI CFA am 2.4.2003
2. 70 µg FI IFA am 6.5.2003
3. 100 µg FI IFA am 16.6.2003
4. Titertest 2 ml Blut abgenommen am 25.6.2003
5. 100 µg FI IFA am 14.7.2003
6. Tötung des Tieres am 23.7.2003

Immunisierungstagebuch für den polyklonalen FH-Antikörper:

Tier: Chinchilla Bastard, weiblich, geb. Jan.01; Immunisierungen: subkutan

1. 150 µg FH CFA am 25.6.2001
2. 280 µg FH IFA am 24.7.2001
3. Titertest 5 ml Blut abgenommen am 10.8.2001
4. 215 µg FH IFA am 1.10.2001
5. 207 µg FH IFA am 6.11.2001
6. 225 µg FH IFA am 30.1.2002
7. Tötung des Tieres am 7.2.2002

2.18.2 Antikörperaufreinigung der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum mittels Protein A „Low Salt“ Methode

Die Protein A-Säule wurde zu Beginn mit 70 ml PBS gewaschen. Das Kaninchenserum (5 ml) wurde mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) auf 20 ml aufgefüllt. Das verdünnte Serum wurde nun dreimal über die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde tiefgefroren. Dies war eine Vorsichtsmaßnahme falls die Bindung der Antikörper nicht stattgefunden hätte. Die Säule wurde nun zweimal mit 50 ml Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen. In der Zwischenzeit wurden zwanzig 1,5 ml Reaktionsgefäße durchnummeriert und jeweils mit 70 µl 1 M Tris pH 8,7 gefüllt. Die Waschfraktionen wurden zunächst gesammelt. Die Elution der IgG-Fraktion erfolgte mit 100 mM Glycin/HCl (pH 3,0). Das Totvolumen der Säule (~ 2 ml) wurde separat aufgefangen, bevor jeweils 1 ml Eluatvolumen pro Reaktionsgefäß gesammelt wurde. Die Identifizierung der die Antikörper enthaltenden Fraktionen erfolgte im Photometer bei einer OD von 280 nm. Als Referenzwert diente eine Probe des 100 mM Glycin/HCl (pH 3,0) Elutionspuffers. Die Fraktionen, in denen sich die Antikörper befanden, wurden vereinigt und

über Nacht gegen 5 l PBS bei 4°C dialysiert. Die Säule wurde mit 50 ml 1 M LiCl-Lösung regeneriert und anschließend mit 50 ml PBS mit 0,02% NaN_3 gespült und bei 4°C gelagert.

2.18.3 Aufbau des Ratten FH Sandwich-ELISA

Für den Aufbau des Ratten FH-ELISA wurde der so genannte Sandwich-Aufbau verwendet. Der Sandwich-Aufbau beruht darauf, dass ein Antikörper (in diesem Fall ein monoklonaler Antikörper) auf der ELISA-Platte immobilisiert wird. Die Adsorption des AK an die Plastikoperfläche wird als „Coating“ bezeichnet und über Nacht in einem speziellen leicht basischen Coating-Puffer bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Anschließend wurde die ELISA-Platte mit einer Blocklösung (1% Gelatine in Coating-Puffer) für 30 min bei RT geblockt. Nun wurde das antigenhaltige Rattenserum oder das aufgereinigte Antigen zur ELISA-Standardisierung in unterschiedlichen Verdünnungsstufen in die Näpfe der Platte gegeben, so dass das Antigen vom Fang-Antikörper immobilisiert wurde. Nach dem Waschen des ELISA kam nun der zweite, der Nachweisantikörper auf die Platte. In diesem Fall handelte es sich um eine polyklonale IgG-Fraktion aus dem Kaninchen. Die gegen das Antigen gerichteten polyklonalen Antikörper banden das bereits durch den Fangantikörper spezifisch gebundene Antigen und sorgten durch mehrere Bindungsstellen für die nötige Sensitivität dieses Immunassays. Nach erneutem Waschen musste nur noch die Bindung der Antikörper sichtbar gemacht werden. Dieses geschah durch einen Enzym-gekoppelten dritten Antikörper, einen so genannten Sekundärantikörper, der ebenfalls polyklonal und gegen die IgG-Nachweisantikörper aus dem Kaninchen gerichtet war. Mit einer Farbsubstratlösung (ABTS) und unter Zugabe von H_2O_2 erfolgte die Reaktion. In den Näpfen, in denen viel Antigen gebunden worden war, wurde mehr Substrat umgesetzt als in den Näpfen, in denen weniger Antigen vorhanden war. Die Intensität der Farbreaktion war in gewissen Grenzen der gebundenen Antigenmenge direkt proportional.
Der schematische Aufbau wird in der folgenden Abbildung noch einmal verdeutlicht.

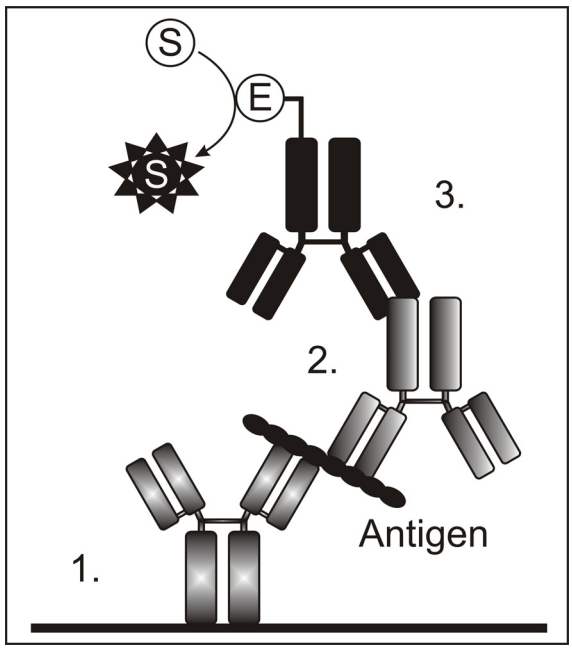


Abb. 10: Schematischer Aufbau eines „Sandwich“-ELISA. Auf eine Polystyrolplatte (96 Well) wurde über Nacht ein Fangantikörper (1.) gecoatet. Nach dem Blocken freier Bindungsstellen auf der Polystyrolplatte, wurde die antigenhaltige Lösung (Ag, z.B. Rattenserum) in die Näpfe pipettiert. Das Antigen wurde durch den ersten Antikörper (1.) (Fangantikörper) aus dem Serum „gefangen“. Im nächsten Schritt wurde der polyklonale Nachweisantikörper (2.) auf die Platte gegeben. Er band ebenfalls an das Antigen. Nicht gebundene Antikörper wurden ausgewaschen. Um die Antigenbindung sichtbar zu machen, wurde ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper (3.) hinzugegeben. Dieser Antikörper war gegen den Nachweisantikörper (2.) gerichtet. Das zugesetzte Farbsubstrat wurde durch das an diesen Sekundärantikörper gekoppelte Enzym (Peroxydase) umgesetzt. Die Intensität des umgesetzten Farbsubstrats (ABTS) wurde in einem Photometer bei 492 nm (Referenzwellenlänge 405 nm) vermessen und war der Menge an vorhandenem Antigen direkt proportional.

Coating-Puffer:

Lösung A: 0,2 M Na_2CO_3; 21,2 g/l

Lösung B: 0,2 M $NaHCO_3$; 8,4 g/500 ml

Coating-Puffer: 85 ml Lösung A und 40 ml Lösung B auf 500 ml mit bidest. H_2O auffüllen.

Als Fangantikörper für die Detektion des FH wurde der monoklonale AK 4-7D verwendet. Die Konzentration, in der der AK verwendet wurde, lag bei 10 µg/ml. Dazu wurde der Antikörper in Coating-Puffer verdünnt. Die Inkubation auf der Maxisorb-Platte (NUNC-GmbH) erfolgte bei 4°C und über Nacht. Nach dem Coaten wurde die Platte ausgeschlagen. Anschließend wurden freie Bindungsstellen in den Näpfen mit einer Blocklösung (1% Gelatine in Coating-Puffer) für 30 min bei RT abgesättigt. Die Blocklösung wurde ebenfalls nur ausgeklopft.

Für die Prä-Absorption des Nachweisantikörpers wurde 1% normales Mausserum als Zusatz verwendet. Der Nachweisantikörper (polyklonale anti-FH IgG-Fraktion aus dem Kaninchen) wurde in einer Konzentration von 6,6 µg/ml und, mit Mausserum 1:100 präabsorbiert, für 2 h auf Eis inkubiert. Durch diesen Schritt wurde eine gegen den Fangantikörper gerichtete Aktivität des Detektionsantikörpers eliminiert und somit der Hintergrund des ELISA massiv gesenkt. Nur noch die FH-spezifischen Antikörper gingen in das entstehenden Signal ein. Die Inkubation des ELISA mit dem Nachweisantikörper fand für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde die ELISA-Platte wie oben beschrieben erneut gewaschen. Da der Nachweisantikörper nicht Enzym-gekoppelt ist, wurde noch ein anti-Kaninchen-IgG Antikörper, der Peroxidase-gekoppelt war, verwendet. Dieser Schaf-anti-Kaninchen Antikörper (Dianova GmbH) wurde in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt. Nach Zugabe des Chromogens ABTS (2,2`-Azino-di-(3-ethyl)benzthiazolinsulfonsäure) und von Wasserstoffperoxid, führte die Aktivität der an den Antikörper gekoppelten Peroxydase zu einer Farbreaktion. Die Intensität des Substratumsatzes und die daraus resultierende Färbung wurde in einem Plattenphotometer gemessen. Für die Eichreihen und den später bei der Vermessung des FH in den Rattenseren benötigten Standard wurde der ELISA mit reinem immunaffinitätsgereinigtem Rattenfaktor H kalibriert.

2.18.4 Nachweis der Protease „Paired Aminoacid Clearing Enzyme“ (PACE) in den potentiellen Faktor I Expressions-Zelllinien

Da der Faktor I wie bereits erwähnt (1.3), in seiner aktiven Form ein stark glykosylierts und zweikettiges Protein ist, benötigt er für seine Prozessierung in die doppelkettige aktive Form unter Entfernung der Linker-Sequenz (RRKR) das PACE-Enzym. Anhand der im Internet verfügbaren Sequenz, wurden die unter dem Abschnitt „Primer“ aufgeführten PACE-spezifischen Primer herausgesucht. Die Primer waren degeneriert, so dass sie sich für die Untersuchung humaner- und Rattenzelllinien eigneten. Das entstandene Amplifikat besaß eine Größe von 863 Bp. Von den potentiellen Zielzellen wurde RNA gewonnen, die unverzüglich in cDNA umgeschrieben und in der PCR eingesetzt wurde.
Die PCR verlief nach einem Standardprotokoll:

1 µl RedTaq-Polymerase
5 µl RedTaq-Puffer
1 µl PACEse308
1 µl PACEas1170

1 µl dNTPs

2 µl cDNA-Matrize

39 µl H_2O bidest.

50 µl Gesamtvolumen je PCR-Reaktionsgefäß

Das verwendete PCR-Programm (PACE):

1. 5 min 94°C anfängliche Denaturierung
2. 1 min 94°C Denaturierung
3. 1 min 60°C Primeranlagerung
4. 2 min 72°C Polymerasereaktion (Elongation)
5. 10 min 72°C finale Polymerasereaktion (Elongation)
6. ohne Zeitlimit 4°C

Die Schritte 2-4 wurden 35-mal wiederholt.

Die hohe Annealing-Temperatur des Primers (60°C) wurde durch eine Gradienten-PCR mit einem Temperatur-Gradienten von 50-70°C ermittelt, wodurch zuvor vorhandene Nebenamplifikate eliminiert werden konnten.

Von den Amplifikationsansätzen wurden jeweils 25 µl eines 50 µl Ansatzes mit 5 µl Auftragspuffer versetzt und auf einem Agarosegel aufgetragen. Das entstandene Amplifikat von 863 Bp, dass sich zwischen der 702 Bp und der 1264 Bp Markerbande (Lambda *Bst* EII) befand, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Um letzte Gewissheit zur Identität des Amplifikats zu haben, wurde es analog den FH- und FI-Plasmiden ansequenziert (2.16.16).

2.19 Rekombinante Herstellung der Ratten-Komplementproteine Faktor I und Faktor H

2.19.1 TOPO-D-Klonierung

Für die Klonierung des FH-Streptag-PCR Produktes und des FI-PCR Produktes wurde ein Vektor der Firma Invitrogen verwendet. Bei ihm handelt es sich um den pcDNA3.1-TOPO-D-Vektor. Die Besonderheit dieses Vektors lag darin, dass das Produkt gerichtet einkloniert werden konnte und dass es keiner Restriktionsenzyme zum Schneiden des Vektors oder des PCR-Produktes bedurfte. An der Stelle, an der die DNA eingefügt werden soll, befinden sich

kovalent gebundene Topoisomerasen, die die Einklonierung vornehmen. Für die Einklonierung eines PCR-Produktes in den Vektor musste das Produkt zwei Voraussetzungen erfüllen. Es musste eine CACC-Sequenz (Kozak-Sequenz) am 5´-Ende tragen, und die 3´-Sequenz durfte nicht komplementär zur 5´-Sequenz sein. Die folgende Abbildung verdeutlicht die Funktionsweise des Vektors.

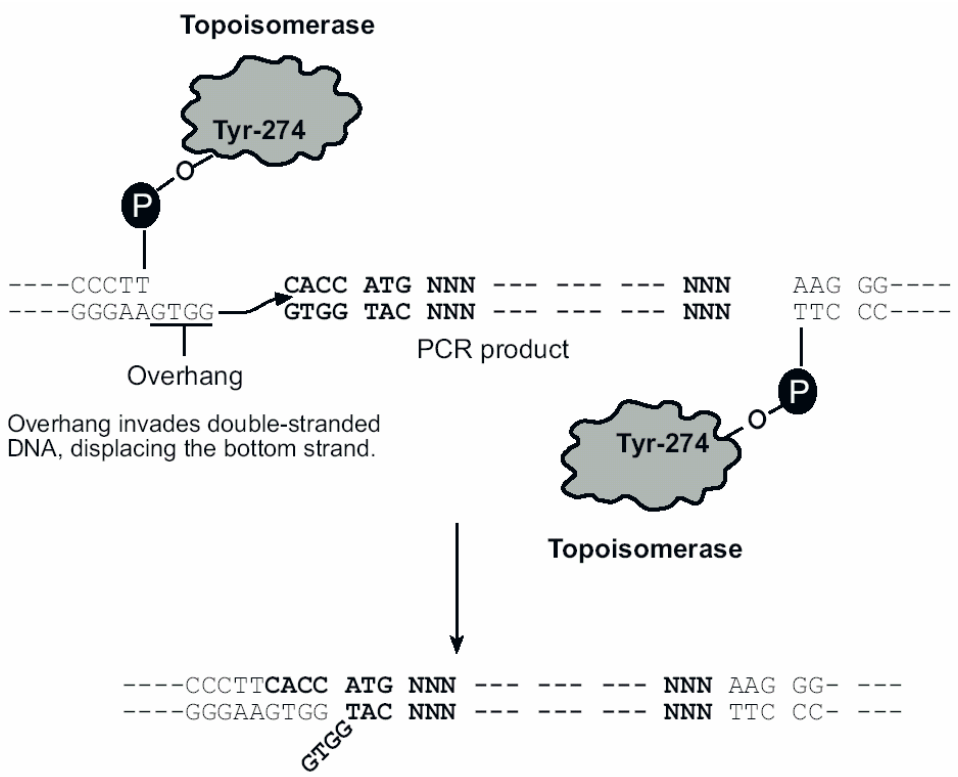


Abb. 11: Schematischer Ablauf der TOPO-D Klonierung (übernommen aus dem Invitrogen Manual).

2.19.2 "Gateway"-Klonierung

Für die "Gateway"-Klonierung wurden zwei Kits der Firma Invitrogen verwendet. Der erste Kit wird als „PCR Cloning System" der zweite als „Mammalia Expression System" bezeichnet. Das „Gateway"-System besteht aus zwei Reaktionsschritten. Im ersten wurde das PCR-Produkt in einen so genannten „Entry"-Vektor integriert. In diesem Vektor konnte das Protein nicht exprimiert werden. Vom Entry-Vektor aus konnte das Insert in jeden beliebigen Expressionsvektor (z.B. Bakterien-, Mammalia- und Insektenzellexpression) über einen zweiten Reaktionsschritt einkloniert werden.

Für das Einbringen des PCR-Produktes in den „Entry"-Vektor wurde eine so genannte „BP-Reaktion" vollzogen. Hierzu musste das PCR-Produkt an den flankierenden Seiten die attB

(attachment)-Sequenzen tragen. Diese Sequenzen wurden durch einen aus Lambdaphagen und *E.coli* stammenden Enzymmix (Clonase-Mix) erkannt. Über eine Rekombination wurde das im Vektor enthaltene *E.coli*-Gen gegen das PCR-Produkt ausgetauscht (Abb.12). Die Rekombination in *E.coli* geschah mittels der Phagenenzyme durch die Lambda-spezifischen att-Stellen im ersten Schritt. Sie erfolgte an der B-Stelle im *E.coli*-Genom und an der P-Stelle im Phagengenom (deshalb BP-Reaktion). Damit entsprach sie der Rekombination wie sie beim lysogenen Phagen-Zyklus vorkommt. Der hier verwendete „Entry"-Vektor pDONR201 trug die aus dem *E.coli*-Genom übernommenen und genetisch optimierten „attachment-sites", so dass eine so genannte BP-Reaktion mit dem entsprechenden PCR-Produkt möglich war.

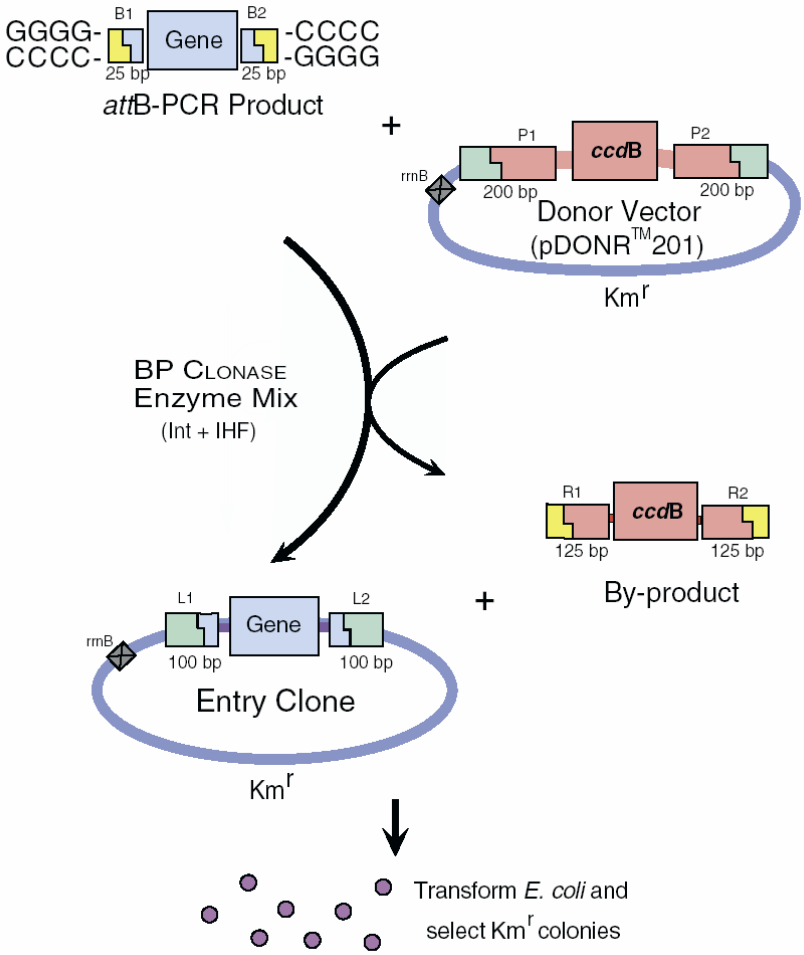


Abb. 12: Schematischer Ablauf einer BP-Reaktion (übernommen aus dem Invitrogen Manual).

Um die Faktoren H und I mit den vollständigen att-Schnittstellen zu versehen, wurde zunächst eine Zweischritt-PCR vollzogen. Im ersten Schritt wurden die halben att-Sequenzen (B-Bereich) an die jeweiligen cDNA-Matrizen mit Hilfe der entsprechenden Primer angefügt. Die Produkte wurden in einem Agarosegel auf ihre Größe und Reinheit überprüft und

anschließend durch eine DNA-Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen-PCR-Aufreinigungs-Kit (2.13) oder über die DNA-Aufreinigung mittels PEG-8000 (2.15) aufgereinigt. Von den gelösten, aufgereinigten PCR-Produkten wurde jeweils 1 µl in einer neuen PCR als Vorlage eingesetzt. Die Primer in dieser PCR enthielten die vollständige att-Sequenz, damit die im Anschluss aufgereinigten Produkte für die BP-Reaktion herangezogen werden konnten.

Für die BP-Reaktion (modifiziertes „One Tube"-Protokoll) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammen pipettiert:

5 µl entsprechen 200 ng PCR-Produkte
2,5 µl pDONR201 (150 ng/µl)
5 µl BP-Reaktionspuffer
12,5 µl TE [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA]
5 µl BP-Clonasemix
25 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde nun für 6 Stunden bei 25°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 5 µl des Ansatzes in ein separates 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 0,5 µl Proteinase K versetzt und bei 37°C für 10 min inkubiert. Diesem Ansatz wurde nun 1 µl entnommen, um 50 µl DH5α-Zellen (*E.coli*) zu transformieren. Die Zellen wurden mit der DNA für 20 min auf Eis inkubiert, anschließend für 30 s bei 42°C geschockt und für 2 min auf Eis gestellt. Nun wurden zu je 50 µl Zellen 250 µl SOC-Medium gegeben und die Zellen für 1 h unter Schütteln in einem Thermoheizblock bei 37°C inkubiert. Die mit dem „Entry"-Vektor transformierten *E.coli* DH5α-Zellen wurden auf LB/Kan-Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Vereinzelte Kolonien wurden gepickt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße, in denen 1 ml LB-Medium mit 1,2 µl Kanamycinlösung vorgelegt waren, überführt und für 6 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Aus den Flüssigkulturen wurden für das nun folgende PCR-Screening jeweils 5 µl pro 50 µl-Ansatz verwendet. Als Primer wurden die jeweiligen FH- oder FI-Kontrollprimer verwendet. Zeigte sich im Agarosegel ein entsprechendes Amplifikat in der richtigen Größe, so wurde der positive Klon über Nacht in 25 ml LB-Medium mit jeweils 30 µl Kanamycin für eine nachfolgende Plasmidpreparation (2.16.15) expandiert.

Zu den verbliebenen 20 µl des BP-Reaktionsansatzes (Fortsetzung des „One-Tube"-Protokolls) wurden unter gründlicher Durchmischung hinzugegeben:

1 µl NaCl (0,75 M)

3 µl Zielvektor pDEST12.2 (150ng/ml linearisiert)

6 µl LR-Clonasemix

30 µl finales Volumen

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 25°C.

Durch die Zugabe von NaCl, dem Zielvektor und dem LR-Clonasemix wurde die nachfolgende sogenannte LR-Reaktion gestartet. Die att L- und die att R-Positionen sind besonders empfänglich für einen Austausch gegen die zwischen den att B- und den att P-Stellen vorhandene DNA (siehe Abbildung 13). Die LR-Reaktion stellt erneut eine Rekombination dar. Bei der LR-Reaktion jedoch wird das Zielgen (Insert) aus einem „Entry"-Vektor in einen Zielvektor, in diesem Fall in den pDEST12.2-Vektor rekombiniert. Diese Reaktion wird ebenfalls durch *E.coli*-Enzyme und Lambdaphagenenzyme katalysiert. Der Enzymmix, der bei der LR-Reaktion benötigt wird, entspricht den Lambdaphagenenzymen, die beim lytischen Zyklus eine Rolle spielen. Somit entsprechen die bei der BP-Reaktion (siehe oben) verwendeten Enzyme denen des lysogenen Zyklus und die bei der LR-Reaktion benötigten denen des lytischen Zyklus. Die att B-, att P-, att L- und die att R-Sequenzen sind gegenüber den Wildtypsequenzen aus *E.coli* und dem Lambdaphagen genetisch optimiert worden, wodurch die BP- und die LR-Reaktion mit den entsprechenden Enzymmixturen ideal zusammenwirken und eine hohe Rekombinationsrate garantieren sollten. Zu dem obigen LR-Reaktionsansatz wurden nun 3 µl Proteinase K-Lösung gegeben und bei 37°C für 10 min inkubiert. Nun wurden erneut 50 µl DH5α-Zellen mit jeweils 1 µl des LR-Reaktionsansatzes transformiert und auf LB/Amp-Platten ausplattiert. Vereinzelt gewachsene Kolonien wurden wie oben beschrieben gepickt und in Ampicillin-haltigem Medium hochgezogen. Zuletzt folgte wie oben beschrieben ein PCR-Screening zur Identifizierung der DH5α-Zellen, die das Zielgen in sich trugen.

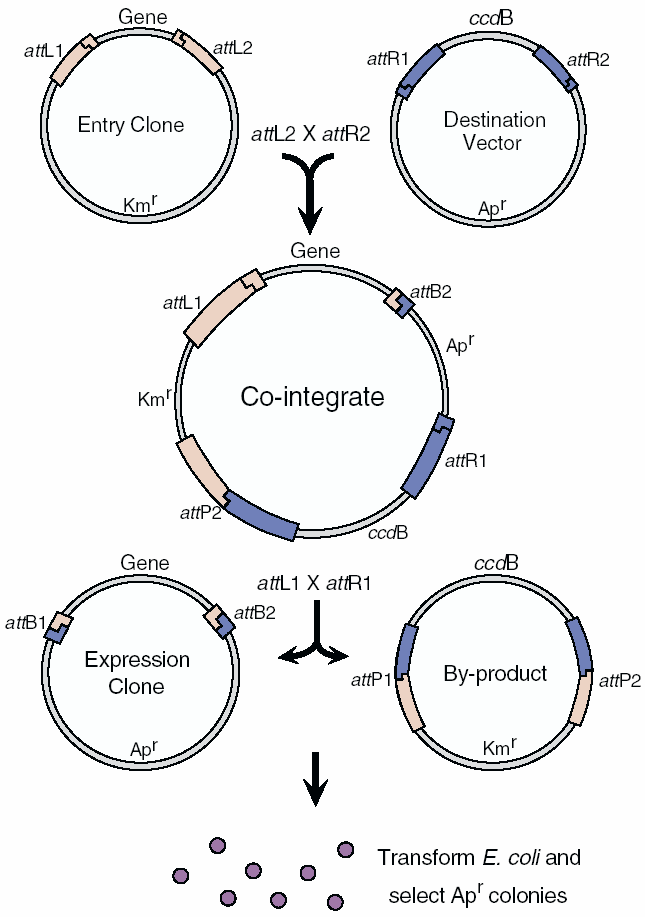
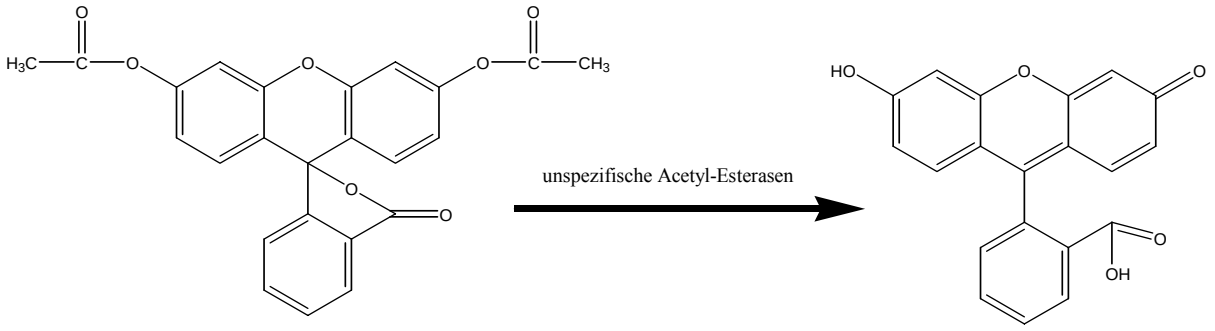


Abb. 13: Schema der LR-Reaktion (übernommen aus dem Invitrogen Manual).

2.19.3 Fluoreszenzfärbung zur Vitalitätsbestimmung der für die rekombinante Herstellung verwendeten Zellen

Der hier verwendete Vitalitätstest bestand aus einer Doppelfärbung. Zum einen wurden die vitalen Zellen mittels FDA (Fluoresceindiacetat) und die toten Zellen mittels Ethidiumbromid gefärbt. Das Absorptionsspektrum beider Farbstoffe liegt bei ca. 254-366 nm. Ethidiumbromid emittiert Licht im rot-orangen Spektralbereich bei 590 nm, wohingegen FDA ein Emissionsmaximum bei 493 nm im grünen Bereich hat.

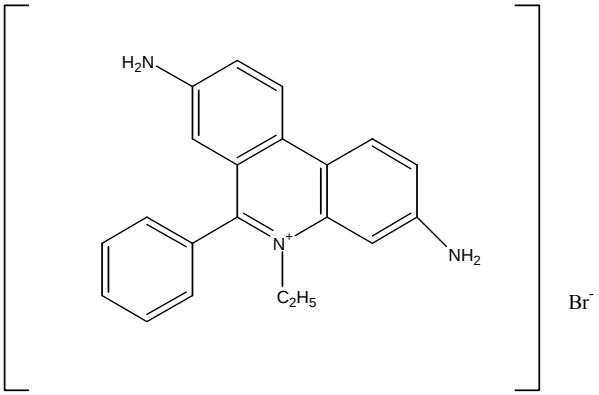
Bei FDA handelt es sich um einen so genannten Vitalfarbstoff. Es ist zunächst eine nicht fluoreszierende, farblose bis leicht gelbe Vorstufe des eigentlichen Farbstoffes. Da FDA lipophil ist, dringt es durch die Zellmembran in das Innere der Zelle ein. Dort wird es durch unspezifische intrazelluläre Acetyl-Esterasen nur in den vitalen Zellen zu einem grün fluoreszierenden Farbstoff (Fluorescein) umgesetzt. Da in nicht vitalen Zellen keine Esterasen vorhanden sind, kann in ihnen das FDA nicht umgesetzt werden. Die Umsetzung des FDA erfolgt nach folgendem Schema:



Flouresceindiacetat (FDA)
inaktiv, farblos bis hellgelb

Floureszein
aktiv, floureszierend grün, Maximum bei 493 nm

Struktur des Nukleinsäure-interkalierenden Ethidiumbromids:



Ethidiumbromid kann die Zellmembran einer intakten, lebenden Zelle nicht passieren. Somit kann der Farbstoff nicht in die Zelle eindringen und folglich nicht an die DNA/RNA binden, so dass vitale Zellen nicht gefärbt wurden. Ethidiumbromid dringt lediglich durch perforierte Zellmembranen apoptotischer oder aus anderen Gründen abgestorbener Zellen ein und bildet dort mit der RNA und DNA Komplexe. Die mit Ethidiumbromid markierten Zellen leuchten deutlich rot auf.

Ansetzen der Stammlösungen:
Da das FDA nicht wasserlöslich ist, wurde es in einem organischen Lösungsmittel gelöst. Hierzu wurde DMSO oder Aceton verwendet. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 4 mg FDA pro ml Aceton durch Vortexen gelöst. Die fertige Lösung ist lichtempfindlich und sollte deshalb lichtgeschützt sowie kühl (4°C) oder tiefgefroren (-20°C) gelagert werden.
Das Ethidiumbromid wurde gebrauchsfertig als 1%ige wässrige Stammlösung gekauft und ist bei Raumtemperatur haltbar.

Gebrauchslösungen:

Aus der FDA-Stammlösung wurde 1 Volumenanteil auf 9 Volumenteile PBS (pH 7,2) gegeben. Das Ethidiumbromid wurde zum Gebrauch 1:1000 in bidest. H_2O oder in PBS verdünnt. Auf 90 µl resuspendierte Zellen wurden 10 µl der FDA-Gebrauchslösung und 0,5 µl der Ethidiumbromidgebrauchslösung gegeben. Die Zellen wurden mit den Ansätzen beider Farbstoffe vorsichtig mit der Pipette vermischt und umgehend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.19.4 Mycoplasmen-Test mittels PCR

Für den Mycoplasmentest wurde das PCR-Verfahren gewählt, da es einfach zu handhaben ist und schnelle, zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse gegenüber der DAPI-Färbung liefert.

Für die PCR wurden die Primer Myc-5` und Myc-3` verwendet. Beide Primer basieren auf den Arbeiten von van KUPPEVELD et al. (1992, 1993). Die Primer sind so gewählt, dass ein Stück der Mycoplasmenspezifischen 16sRNA /DNA amplifiziert wird. Sie ergeben aus der 16s RNA von *Mycoplasma meleagridis* (L24106) und *Mycoplasma capricolum* (E03288) ein Amplifikat von ca. 500 Bp. Anhand eines Positivbefundes in den eigenen Kulturen konnte die Amplifikatgröße von rund 500 Bp bestätigt werden.

Das PCR-Programm war wie folgt aufgebaut:

1. 2 min 95°C
2. 40 s 95°C
3. 40 s 55°C
4. 1 min 72°C

Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt

5. 2 min 72°C
6. 4°C hold

Für die PCR wurden 100 µl Zellkulturüberstand direkt über den Zellen abgenommen. Der Überstand wurde für 10 min im Wasserbad gekocht. Von diesem aufgekochten Überstand wurden 10 µl in einen 50 µl PCR-Ansatz als Matrize pipettiert. Die Amplifikate wurden gegen eine 100 Bp-Leiter im Agarosegel (1,2%ig) aufgetrennt.

2.19.5 Transfektion der Mammalia-Zellen mittels Elektroporation

Für die Elektroporation der HEK293-, COS-7-, IEC-6-, CaCo-2-, Mono-Mac-6-, HIT-T15-, HeLa- und CHO-Zellen wurde eine Elektroporationsapparatur (Genepulser) der Firma Biorad verwendet. Die Zellen wurden für die Elektroporation abgespült, mit kaltem PBS (4°C) zweimal gewaschen und anschließend in vorgekühltem PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt. Jeweils $3x10^6$ Zellen/800 µl (HEK293- und COS-7-Zellen) oder $5x10^6$ Zellen/700 µl (CHO-Zellen) wurden in die auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvetten (4mm) für die Transfektion mit dem FH (SCR1-7) oder dem FI pipettiert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Zu den HEK293- und COS-7-Zellen wurden pro Ansatz 20 µg Plasmid-DNA, zu den CHO-Zellen pro Ansatz 50 µg Plasmid-DNA pipettiert. Die HIT-T15-Zellen und HeLa-, IEC-6-, CaCo-2-, Mono-Mac-6-Zellen wurden in einer Dichte von jeweils $3*10^6$ Zellen in 700 µl PBS in die 0,4 mm-Elektroporationsküvetten gefüllt und mit jeweils 20 µg Plasmid elektroporiert. Alle verwendeten Zelllinien wurden mit verschiedenen Faktor H enthaltenden Plasmiden oder dem Faktor I Plasmid elektroporiert. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit dem Vektor pEGFP-N1 der Firma Clontech elektroporiert. Dieser Vektor enthielt eine genetisch veränderte Variante des GFP („green fluorescence protein-GFP“), so dass die mit ihm transfizierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop grün aufleuchteten. Das GFP-Plasmid wurde analog den FH- und FI-Plasmiden eingesetzt. So konnte die Ausbeute der Transfektion relativ schnell beurteilt werden. Auch dieser GFP-Vektor ermöglichte die Selektion der mit ihm elektroporierten Zellen über seine Neomycinresistenz (G418-Resistenz). Alle Plasmide wurden für die Elektroporationen und auch für die chemischen Transfektionen ungeschnitten und linearisiert verwendet.

Die geschnittenen Plasmide waren zuvor einem Verdau bei 37°C für 2 h unterzogen worden. Die Linearisierung war mit dem Restriktionsenzym Pvu I erfolgt, so dass der CMV-Promotor, das einklonierte FH- bzw. FI-Fragment sowie das Neomycinresistenzgen unangetastet blieben. Andere verwendete Plasmide waren mit Not I oder Hind III geschnitten worden. Diese Enzyme waren so gewählt worden, dass sie ausschließlich im Vektor, nicht aber im FH-Fragment oder in der GFP-Sequenz schnitten.

Für die HEK293-, COS-7-Zellen wurde eine Spannung von 300 V und eine Kapazität von 960 µF ausgewählt. Dies entsprach einer Feldstärke von 0,75 kV/cm. Für die CHO-Zellen wurde ein Spannung von 750 V und eine Kapazität von 25 µF eingestellt. Die resultierende Feldstärke betrug 1,88 kV/cm bei einer Pulslänge von 0,5 msec. Für die HIT-T15-, CaCo-2-, Mono-Mac-6-, IEC-6- und HeLa-Zellen wurden bei einer Spannung von 300 V und einer

Feldstärke von 0,75 kV/cm elektroporiert; die Kapazität der Anlage war dabei auf 960 µF eingestellt.
Nach erfolgter Elektroporation wurden die Küvetten für weitere 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden nun aus den Küvetten in 15 ml-Röhrchen, die mit 10 ml kaltem Medium (80/20/10) gefüllt waren, überführt und bei 800 U/min für 5 min in einer Hettich Rotanta/RP Zentrifuge sedimentiert. Das überständige Medium wurde abgesaugt und die Zellen in 1,2 ml ihres entsprechenden Medium resuspendiert. Ein Elektroporationsansatz wurde auf sechs Näpfe einer 24-Lochplatte, in denen jeweils 1 ml Medium vorgelegt worden war, in 200 µl-Portionen verteilt. Nach 24 h und nach 48 h wurde das Medium jeweils durch G418-haltiges Selektivmedium ersetzt. Das im Selektivmedium enthaltene G418 tötete durch seine Ribosomen-blockierende Wirkung innerhalb von zwei bis drei Tagen alle nichtresistenten (untransfizierten) Zellen ab.

2.19.6 Chemische Transfektion der Mammalia-Zellen

Für die Transfektion der Mammalia-Zellen fanden die Transfektionsreagenzien Lipofectamin 2000 der Firma Invitrogen, GeneJuice der Firma Novagen oder Fugene 6 der Firma Roche Verwendung. Alle Zellen wurden parallel jeweils mit FH- und FI-DNA transfiziert.
Die Transfektion mit Lipofectamin 2000 wurde in einer 24-Loch-Platte durchgeführt. Folgenden Zellen wurden mit Lipofectamin 2000 transfiziert:
H4IIE, HUH-7, HEK293, FAO, IEC-6, HIT-T15, Mono-Mac-6, CaCo-2, HeLa.
Am Beispiel der HEK293-Zellen wird hier stellvertretend für alle verwendeten Zelllinien eine Transfektion beschrieben. Die Hek293-Zellen wurden einen Tag zuvor mit einer Zellzahl von $3x10^5$ pro Napf in serumfreiem DMEM ausplattiert. Für eine optimale Transfektion wurde ein Verhältnis von 1 Teil DNA: 7 Teilen Lipofectamin (w/v) eingehalten, d.h. pro µ-Gramm an aufgereinigter Plasmid-DNA wurden 7 µl Lipofectamin 2000 hinzugegeben. Da das Transfektionsreagenz durch Bestandteile, die dem normalen Zellkulturmedium zugesetzt werden (Serum, Antibiotika/Antimykotika), inhibiert oder inaktiviert wird, wurde die Transfektion unter Serum-freien Bedingungen oder mit Spezialmedium (OPTIMEM; Firma Invitrogen) vollzogen.
Für jeden Napf wurde 1 µg Plasmid-DNA in 50 µl Medium (OPTIMEM) gelöst. Vom Lipofectamin 2000 wurden 3 µl pro Napf in 50 µl in OPTIMEM-Medium unter Auf- und Abpumpen mit einer Pipette gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Nachdem die Inkubation abgeschlossen war, wurden beide Lösungen zusammengegeben und mit einer Pipette durch

vorsichtiges Aufziehen gründlich gemischt. Dieser Ansatz wurde nun für 20 min inkubiert, so dass das Lipofectamin die Plasmid-DNA komplexieren konnte.
Die Platte mit den einen Tag zuvor ausgesäten Zellen ($3*10^5$ pro Napf) wurde aus dem Brutschrank (37°C, 5% CO_2) genommen. Das Medium wurde am Morgen der Transfektion abgesaugt und gegen 0,5 ml DMEM (ohne Antibiotika und FCS) ausgetauscht. Unter leichtem Schütteln (keine kreisenden Bewegungen) wurden je 100 µl des Transfektionsansatzes tröpfchenweise in jeden zu transfizierenden Napf pipettiert. Die Zellen wurden anschließend in den Brutschrank (37°C, 5% CO_2) zurückgestellt und für 5 Stunden inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Transfektionsmedium entfernt und gegen je 1 ml des von den Zellen benötigten Kulturmediums mit Antibiotikalösung und FCS ausgetauscht. Nach 24 h bzw. 48 h wurde das normale Zellkulturmedium gegen G418-haltiges Selektivmedium (z.B. für HEK293-Zellen: DMEM (10% FCS) mit 1,2 mg/ml G418) ersetzt.

Die Transfektion mit GeneJuice wurde an H4IIE-, HepG2- und RBL-Zellen ausprobiert. Das Verhältnis (w/v) von DNA zu Transfektionsreagenz lag anfangs bei 1 µg:3 µl und wurde später auf 1 µg:5 µl erhöht. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in einer Dichte von $3x10^5$ Zellen/35mm Napf ausplattiert. Vor der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 1 ml Antibiotika- und FCS-freies 80/20-Medium ersetzt. Zu je 3 µl GeneJuice wurden 100 µl 80/20-Medium gegeben und der Ansatz gründlich gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die DNA hinzugegeben und der Gesamtansatz erneut gemischt und für weitere 15 min inkubiert. Tropfenweise und unter leichtem Schütteln wurde das GeneJuice/DNA-Gemisch zu den Zellen gegeben. Nach 6 Stunden wurde das Medium gegen das von den Zellen benötigte Zellkulturmedium ausgetauscht. Die weitere Kultivierung erfolgte analog den unter der Lipofectamintransfekion beschriebenen Bedingungen.
Das Vorgehen für eine Transfektion mit Fugene 6 lief analog dem Vorgehen unter Verwendung von Lipofectamin 2000 ab. Das Verhältnis DNA zu Transfektionsreagenz (w/v) lag bei 1 µg zu 6 µl. Die Zellen waren in einer Dichte von $3x10^5$ Zellen/Napf ausgesät worden. Bei den Zelllinien, die mit Fugene 6-transfiziert worden waren, handelte es sich um H4IIE, HUH-7, HEK293, FAO, IEC-6, HIT-T15, Mono-Mac-6, CaCo-2 und HeLa.

2.19.7 Calcium-Phosphat Transfektion

Für die Calcium-Phosphat Transfektion wurden die Zellen (HIT-T15, H4IIE, Mono-Mac-6, CaCo-2, IEC-6, HEK293) eine Tag vor der Transfektion mit durchschnittlich $5*10^6$ Zellen pro Platte auf 15 cm Schalen ausplattiert. Die Konfluenz der Zellen lag am Tag der Transfektion bei etwa 50 %. Für die Transfektion wurden folgende Lösungen benötigt.

Calciumchlorid-Lösung: 2,5 molar in bidest. H_2O (sterilfiltriert)

HEPES-Puffer (2x): 140 mM NaCl-Lösung
50 mM HEPES
1,5 mM Na_2HPO_4 * 2 H_2O

Die obigen Chemikalien wurden in 90 ml bidest. H_2O gelöst und der pH-Wert mit NaOH (0,5 M) auf 7,1 eingestellt. Das Volumen wurde mit bidest. H_2O auf 100 ml gebracht. Die Lösung wurde sterilfiltriert und in 5 ml-Aliquots bei -20°C eingefroren.

Zu 20 µg Plasmid-DNA wurden 200 µl $CaCl_2$-Lösung pipettiert; das Volumen wurde mit bidest. H_2O auf 1 ml aufgefüllt. In einem anderen Röhrchen wurden 2 ml des 2fachen HEPES-Puffers vorgelegt. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde nun tropfenweise zu dem vorgelegten HEPES-Puffer pipettiert. Die nun fertige Transfektionslösung (3 ml pro Schale) war leicht trübe. Sie durfte allerdings keine Flocken enthalten, da sie sonst unbrauchbar gewesen wäre. Die Lösung wurde nun tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, um zu prüfen, ob sich die Calcium-DNA-Kopräzipitate als Kristalle auf den Zellen angelagert hatten. Die Zellen wurden für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde anschließend vollständig abgenommen. Die Zellen wurden mit 3 ml einer 10%igen Glycerin/PBS-Lösung geschockt und anschließend mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit neuem Medium für weitere 24 h kultiviert, bevor dem Medium G418 als Selektionsantibiotikum zugesetzt wurde.

2.19.8 Etablierung der transfizierten Mammalia-Zellen als stabile Zelllinie

Nach einigen Tagen Kulturdauer unter dem selektiven Druck des Antibiotikums G418 wurden die Näpfe unter einem Mikroskop auf resistente überlebende Zellen überprüft. Die in den Näpfen expandierenden resistenten Zellen wurden mit einem Milliliter Medium abgespült, in jeweils 100µl-Portionen auf neue Näpfe verteilt und mit Selektivmedium auf einen Milliliter

aufgefüllt. Bei gut sichtbaren Einzelkolonien wurde versucht, mit einer Pipette Zellen aus diesen durch einmaliges Aufsaugen von 50-100 µl zu gewinnen und in einen neuen Napf zu überführen. Jeder dieser Subklone wurde im Immunblot auf die Produktion von Faktor H oder I untersucht. Durch den weiter vorhandenen G418-vermittelten Selektionsdruck waren die Zellen gezwungen, die Plasmide in ihr Genom zu integrieren. Durch weitere Subklonierungen wurden Zellen (Klone) isoliert, deren Produktionsrate eine Aufreinigung des entsprechenden Proteins aus den Zellkulturüberständen erlaubte.

2.19.9 Adaption der adhärenten Zelllinien (FAO, H4IIE) und der adhärenten stabil-transfizierten Zelllinie (HEK293) an spezielle Zellkulturpartikel für eine Suspensionskultur

Die stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden, um eine höhere Zellkulturdichte und somit eine höhere Proteinkonzentration im Überstand zu erreichen, auf speziellen Zellkulturpartikeln vermehrt.
In Voruntersuchungen wurden drei unterschiedliche Partikel A. Cytodex 1, B. Cytopore 1 und C. Cytopore 2 der Firma Amersham Pharmacia auf ihre Verwendbarkeit zur Kultivierung adherenter Zellen mit den Rattenhepatomzelllinien H4IIE- und FAO-Zellen getestet.
Die folgende Tabelle fast die physikalischen Eigenschaften der einzelnen Partikel zusammen.
Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften der getesteten Microcarrier.

Partikel	Cytodex 1	Cytopore 1	Cytopore 2
Dichte* (g/ml)	1,03	1,03	1,03
Größe* d_{50} (µm)	180	230	230
d_{5-95} (µm)	131-220	200-280	200-280
Durchschn. Oberfläche (m^2/g Trockengewicht)	0,44	1,1	1,1
Durchschn. Anzahl an Microcarriern /g Trockengewicht	$6{,}8 \times 10^6$	—	—
Schwellungsrate (ml/g Trockengewicht)	18	40	40

* In 0,9% NaCl. Alle Angaben sind Herstellerangaben.

Cytodex 1 besteht aus quervernetztem, positiv geladenem Dextran. Cytopore 1 und 2 bestehen aus quervernetzter Baumwollzellulose mit einer positiv geladenen, hydrophilen DEAE-(N,N,-diethylaminoethanol)-Oberfläche. Die durchschnittliche Porengröße liegt bei 30 µm. Der

Unterschied zwischen den Partikeln Cytopore 1 und Cytopore 2 liegt in der Kapazität. Sie beträgt bei Cytopore 1 1,1 meq/g (Milliäquivalente pro Gramm) und bei Cytopore 2 1,8 meq/g. Bei genauer Betrachtung unter dem Mikroskop erscheinen die Cytopore 2 Partikel zudem etwas grobporiger.

Aufgrund der extrem porösen Struktur der Cytopore-Partikel, konnten die Zellen in die Poren einwandern und waren deshalb vor negativen mechanischen Einflüssen relativ geschützt. Im Gegensatz dazu waren die auf den glatten Cytodex-Partikeln kultivierten Zellen äußeren Einflüssen ungeschützt ausgesetzt.

Die Partikel wurden nach Herstellerangaben mit 100 ml PBS /g Partikel in silikonisierten Glasgefäßen für die Zellkultur vorbereitet und autoklaviert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die in PBS bei 4°C gelagerten Microcarrier mit vorgewärmten Medium (z.B. 80/20/10) gespült. Die Hepatomzellen, die für diese Vorversuche verwendet wurden, waren in Petrischalen zu einem konfluenten Rasen gezogen worden und wurden nun für die Adaption an die Microcarrier mit sterilem PBS abgespült und auf je $1x10^6$ Zellen eingestellt.

Die Partikel wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Für eine stationäre Kultur wurde empfohlen, den Boden der Petrischale mit den aufbereiteten Partikeln einschichtig zu bedecken. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Microcarrierpartikeln in Doppelansätzen auf die neuen Petrischalen (d=10 cm) gegeben. Die Kultivierung der FAO-, H4IIE- und HEK293-Zellen auf den Partikeln erfolgte in einer statischen Kultur im Brutschrank (37°C und 5% CO_2) mit normalem Medium (80/20/10). Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden die Kulturen beobachtet. Nach 48 h, 96 h und 168 h (7 Tage) wurden Aliquots aus den Kulturen entnommen, einer Ethidiumbromid/FDA-Färbung unterzogen und fotografiert. Weil auf den Cytopore II-Partikeln, die FAO- und H4IIE-Zellen am vitalsten und in der höchsten Dichte gewachsen waren, wurden diese Partikel für die Kultivierung mit den HEK293-Zellen in der Miniperm-Anlage herangezogen, um zu einer gegenüber der statischen Kultur erhöhten Ausbeute von FH(SCR1-7) zu gelangen.

2.19.10 Kultivierung der auf den Microcarrierpartikeln adhärierten HEK293-Zellen in der Minipermanlage

Für die Kultivierung in der Miniperm-Anlage wurden die Microcarrier zu den transfizierten HEK293-Zellen gegeben. Nachdem die Zellen die Partikel in ausreichender Dichte besiedelt hatten, wurden sie mit samt den Partikeln in das Minipermproduktionsmodul umgesiedelt. Die Minipermmodule wurden nun auf der Rollapparatur bei 2 U/min bei 37°C und 5% CO_2 gehalten.

2.19.11 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Für die Aufreinigung des rekombinanten FH-Proteins wurde ein "Tag"-System der Göttinger Firma IBA GmbH (www.iba-go.com) verwendet. Dieser „Tag“ wird als Strep-Tag II bezeichnet und bestand aus acht Aminosäuren. Diese wurden durch 24 Nukleotide codiert, die an das 3`Ende des PCR-Produktes mit Hilfe entsprechend synthetisierter Primer herangefügt worden waren. Die Aminosäuresequenz (WSHPQFEK) wurde von den Entwicklern dieses Systems so ausgewählt, weil der „Tag“ elektrisch neutral ist und im Regelfall die Proteinfaltung und die Proteinfunktion nicht negativ beeinflusst. Die mit dem Strep-Tag II versehenen rekombinanten Proteine verfügen über eine hohe Affinität zu Streptactin. Bei Streptactin handelt es sich um ein genetisch modifiziertes Avidin, das in der Affinitätssäule kovalent an eine kreuzvernetzte Sepharosematrix gekoppelt wird. Der Strep-Tag II wurde von den Entwicklern so optimiert, dass die Bindungsfähigkeit an das natürliche Streptavidin im Vergleich zum alten Strep-Tag I um 50% reduziert werden konnte. Mit Hilfe des Strep-Tag II ist es möglich, in einer Einschrittaufreinigung durch den Einsatz von Desthiobiotin das Protein zur Homogenität aufzureinigen.

Das in den Mammalia-Zellen rekombinant hergestellte FH-Fragment besaß carboxyterminal den Strep-Tag II. So wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und für die Strep-Tag-Aufreinigung vorbereitet. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt, und die Überstände wurden sterilfiltriert.
Die von der IBA mitgelieferten und für die Aufreinigung verwendeten Puffer waren:

Waschpuffer W:	100 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA, pH-Wert 8,0 mit HCl einstellen.
Elutionspuffer E:	100 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM Desthiobiotin; pH-Wert 8,0 mit HCl einstellen.
Regenerationspuffer R:	100 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM HABA (Hydroxy-azophenyl-benzoe-Säure); pH-Wert auf 8,0 mit HCl einstellen.

Die Strep-Tactin-Säule, gefüllt mit 5 ml Superflow-(6% kreuzvernetzter Sepharose)-Strep-Tactin, wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen (25 ml) an Puffer W bei Raumtemperatur

gewaschen. Danach wurde der gesammelte und vorbehandelte Zellkulturüberstand (auf Eis stehend) zweimal bei RT über die Säule geleitet. Die Flussrate der an eine Pumpe angeschlossenen Strep-Tactin-Säule lag bei 500 ml pro Stunde. Nachdem der Zellkulturüberstand zweimal durch die Säule geführt worden war, wurde die Strep-Tactin-Säule mit 40 ml Puffer W gewaschen. Nach dem Waschen erfolgte die Elution des gebundenen rekombinanten Proteins mittels 10 ml Elutionspuffer E. Der Durchfluss wurde in 1 ml-Fraktionen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die Elutionsfraktionen wurden im Photometer gegen den Elutionspuffer auf ihren Proteingehalt vermessen. Von den Proben, die die höchsten Werte erzielten und vom Durchfluss wurde je ein Aliqout mit TCA präzipitiert (2.19.14) und auf ein SDS-Gel (10%) zur weiteren Analyse aufgetragen.
Das restliche Eluat wurde entweder sofort gegen PBS dialysiert oder bei –20°C eingefroren. Die Säule wurde mit 50 ml Regenerationspuffer R regeneriert. Im Anschluss wurde sie erst mit 25 ml Puffer W ohne Azid und dann mit 15 ml Puffer W mit 0,2 % (w/v) Natriumazid gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurde sie im Kühlschrank (4°C) gelagert.

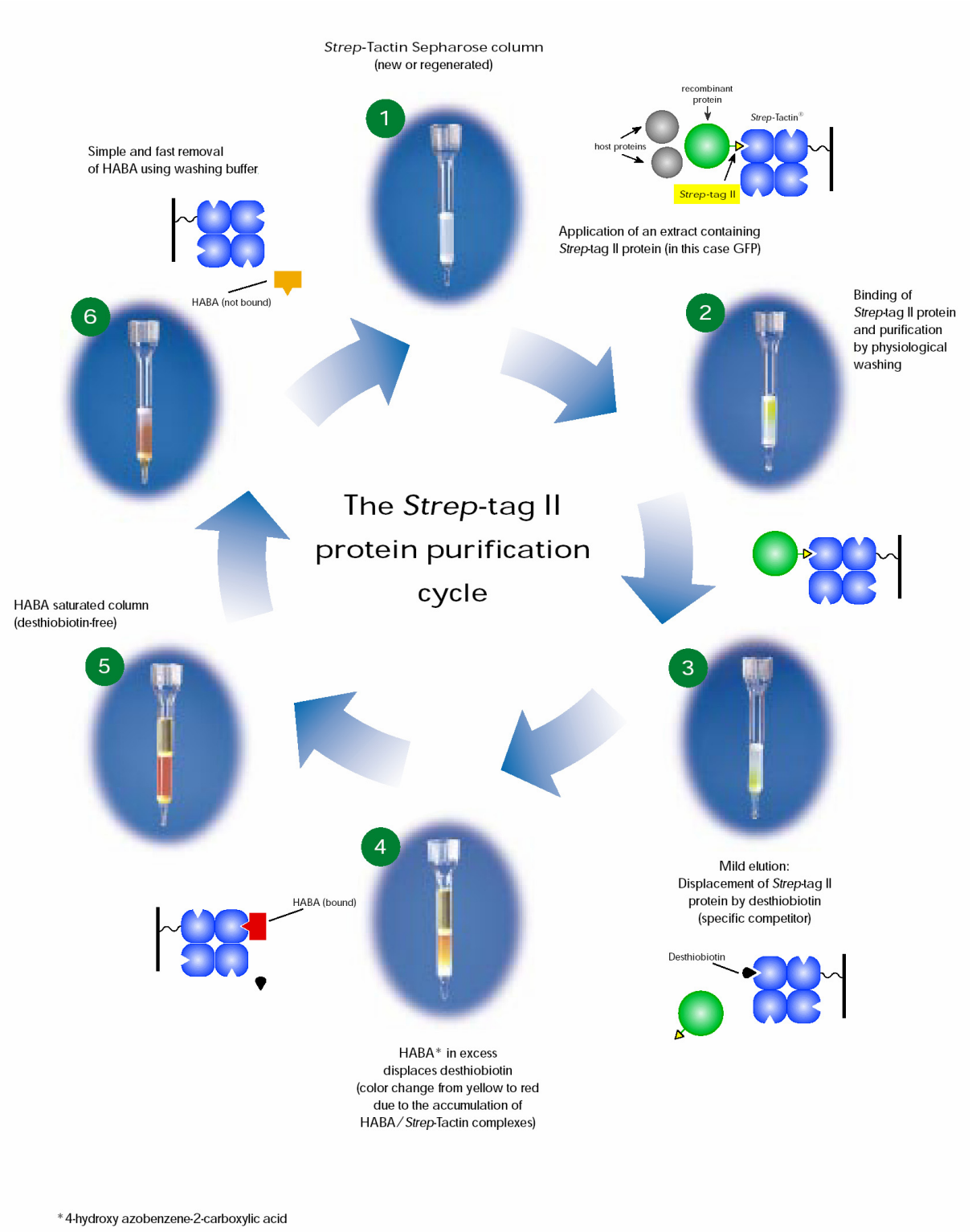


Abb. 14: Schematischer Ablauf der Proteinaufreinigung mittels einer Strep-Tactin-Sepharose-Säule nach dem Handbuch der Firma IBA GmbH.

2.19.12 Zellaufschluss mit Triton X-114

Triton X-114 ist ein nicht ionisches Detergenz aus der der t-Octylphenoxypolyethoxyethanol - Gruppe. Mit Hilfe von Triton X-114 ist es möglich, die Zellen ohne die Verwendung einer Ultrazentrifuge in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aufzuschließen und die hydrophoben von den hydrophilen Proteinen zu trennen. Der „Cloudpoint“ von Triton X-114 liegt bei 21°C, wodurch im gemäßigten Temperaturbereich sehr proteinschonend, eine Phasentrennung durch Zentrifugation vollzogen werden kann, ohne die Proteine thermisch zu denaturieren.
Für den Zellaufschluss wurde eine bei 4°C gelagerte 20%ige präkondensierte Triton X-114 Stammlösung (BORDIER, 1981) verwendet. Die transfizierten Zellen wurden aus dem Brutschrank genommen und das Medium vollständig abgezogen. Nun wurden die Platten zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Stammlösung wurde 1:10 mit PBS verdünnt, und es wurden jeweils 2 ml der Gebrauchslösung auf eine 10 cm Schale pipettiert. Durch mehrfaches Auf- und Abpumpen wurden die adhärenten Zellen von der Oberfläche abgespült und lysiert. Das Lysat wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und unter gelegentlichem Schütteln für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat zur Entfernung der Zelltrümmer und Kerne für 10 min bei 5.000xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Das in dieser Inkubation eingetrübte Lysat wurde nun für 10 min bei 800xg in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die obere hydrophile Phase wurde abgenommen, im Lowry (Mikromethode) vermessen und im Immunblot untersucht.

2.19.13 Proteinbestimmung nach Lowry (Mikromethode)

Die Lowry-Reaktion zur Proteinbestimmung ist eine Erweiterung der Biuret-Methode. Im ersten Schritt wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet. Dieser Komplex reduziert ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz), wobei eine intensive Blaufärbung entsteht. Zunächst wurde mit BSA eine Eichkurve angefertigt. Das BSA lag in 1 ml Aliquots der Konzentration 0,1 mg/ml in Aqua dest. tiefgefroren vor. Als Doppelproben wurden Volumina aufgenommen, die folgende Mengen an BSA enthielten: 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40 und 50 µg. Alle Proben wurden mit PBS auf ein Volumen von 500 µl gebracht und mit 500 µl 40%iger TCA versetzt, so dass eine finale Fällungskonzentration von 20 % TCA vorlag. Die Proben wurden für 30 min auf Eis gestellt und gelegentlich geschüttelt, anschließend bei maximaler Umdrehungszahl in

einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 30 min bei 4°C pelletiert. Es folgte die Waschung des Pellets mit eiskaltem Aceton (-25°C) und die nochmalige Pelletierung in einer Zentrifuge bei 11.000xg für 10 min bei RT. Auf eine zweite Waschung mit Aceton konnte im Fall des BSA-Pellets verzichtet werden. Eventuell vorhandenes Restaceton wurde bei 50°C im Heizblock abgedampft.

Folgende Lösungen wurden für den Mikro-Lowry angesetzt:
Lösung A: 2 % (w/v) Natriumcarbonat in 0,1 N Natronlauge.
Lösung B: 1 % (w/v) Kupfersulfat x 5 H_2O; 2 % (w/v) Kaliumnatriumtartrat.

Das Kupfersulfat und das Kaliumnatriumtartrat wurden gleichanteilig gemischt, woraus Lösung B entstand. Lösung C: Zu 50 ml Lösung A wurde 1 ml Lösung B gegeben.
Das zuvor getrocknete BSA-Pellet wurde nun in 750 µl Lösung C resuspendiert und anschließend bei Raumtemperatur für 30 min abgedunkelt inkubiert. Nun wurden 75 µl Lösung D (Folinreagenz und destilliertes Wasser im Verhältnis 1:2) zugegeben und für weitere 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen. Als Nullwert-Referenz diente ein Lösungsansatz ohne Protein. Die ermittelten Extinktionen wurden gegen den bekannten BSA-Gehalt in einem Koordinatensystem aufgetragen. Wurden andere Proteine bzw. Proteingemische mit den obigen Lösungen versetzt, so konnte in der Eichkurve der absolute Proteingehalt der jeweiligen Probe abgelesen werden. Im Fall besonders hydrophober Proteine ergab sich das Problem der schlechten Löslichkeit der Proteinpellets nach der Acetonwaschung. Abhilfe konnte hier durch Zugabe von zunächst 50 µl 1 N NaOH bis zur Pelletlösung und anschließend von nur 700 µl der Lösung C geleistet werden. Dieses veränderte Verhältnis musste auch in der Referenzlösung Berücksichtigung finden.

2.19.14 Trichloressigsäure-(TCA)-Fällung

In den Kulturüberständen der transfizierten Zellen war nach 48 h eine zu geringe Konzentration des jeweiligen rekombinanten Proteins vorhanden, um es direkt in einem Volumen von 20 µl in eine Geltasche zu geben und nach einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nachweisen zu können. Um das Protein aus den Proben zu fällen und es anschließen auf ein SDS-Gel aufzutragen, bot sich die Trichloressigsäure-(TCA)-Fällung mit anschließender Acetonwaschung an:

Maximal 1 ml der Zellkulturüberstände wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl 40%iger TCA-Lösung versetzt. Die TCA-Fällungskonzentration liegt in diesem Fall bei etwa 13 %. Dieser Wert sollte nicht unterschritten werden, um zu einer quantitativen Fällung enthaltener Proteine zu gelangen. Waren nur kleinere Volumina zu fällen, so wurde durch ein Mischungsverhältnis von 1:2 eine TCA-Konzentration von 20 % eingehalten. Kleinere Probenvolumina als 250 µl wurden mit PBS auf 500 µl aufgefüllt und anschließend mit 500 µl TCA versetzt, so dass z.B. auch hochkonzentrierte, detergenzhaltige Proben auf ein „pipettierbares" Volumen mit 20%iger TCA-Konzentration gebracht wurden. Der Fällungsansatz wurde anschließend für 30 min unter gelegentlichem Vortexen auf Eis gestellt. Es folgte ein 30 minütiger Zentrifugationsschritt bei 11.000xg in der Zentrifuge für 1,5 ml-Reaktionsgefäße zur Pelletierung des präzipitierten Proteins. Der TCA-Überstand wurde abgenommen und das Pellet unabhängig von seiner Größe mit 1 ml eiskaltem Aceton (tiefgekühlt bei –25°C) gewaschen (vortexen) und anschließend für 10 min bei 11.000xg zentrifugiert. Im Anschluss wurde nach Abnahme des Überstandes das verbleibende Restaceton im Heizblock bei 50°C abgedampft.
Das Pellet wurde nun in 20 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Zeigte das im zugegebenen SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer; LAEMMLI, 1970) vorhandene Bromphenolblau durch gelben Farbumschlag noch verbliebene TCA-Reste an, so wurden diese durch Zugabe von 1-2 µl gesättigter TRIS-Lösung neutralisiert. Die Zugabe von TRIS hat in dieser Konzentration keine negativen Auswirkungen auf die Laufeigenschaften des Gels. Nicht neutralisierte TCA hingegen zerstört Proteine unter Hitzeeinwirkung. Vor dem Auftragen wurde das Pellet für max. 5 min bei 100°C im SDS-Probenpuffer aufgekocht, damit noch ungelöste Proteinreste in Lösung gehen.

<u>SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer) (10ml):</u>
2 ml 0,625 M Tris/HCl pH 6,8
0,2 g SDS
5 ml Glycerin
0,1 ml Bromphenolblau (1%ige Lösung in Ethanol)
2,9 ml bidestilliertes H_2O

2.19.15 SDS-PAGE

Für die Durchführung der SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurde ein vertikales Mini-Gelelektrophorese-System der Firma Biometra verwendet. Für die meisten Anwendungen wurde ein 10%iges Gel gegossen. Das Polyacrylamidgel besteht aus zwei Gel-Komponenten, dem Sammelgel und dem Trenngel. Die Angabe „10 %“ bezieht sich auf den Polyacrylamidanteil im Trenngel. Im Sammelgel befinden sich die Auftragstaschen. Die Proteinproben erreichen innerhalb dieses Gels eine einheitliche Startlinie, bevor sie im Trenngel nach ihrem unterschiedlichen relativen Molekulargewicht aufgetrennt werden.
Ein 10%iges Gel wurde nach folgendem Rezept gegossen:

Trenngel 6 ml (10%ig):
2 ml 30%ige Acrylamid-; 0,8%ige Bisacrylamidstammlösung
1,2 ml 1,88 M Tris/HCl (pH 8,8)
1,2 ml 0,5%ige SDS
1,6 ml bidest. H_2O
3 µl TEMED
30 µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung

Nachdem das Trenngel in den Gelträger gegossen war, wurde es mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Dieses Überschichten sorgte für einen glatten Abschluss des Trenngels. Auf dieses wurde das Sammelgel gegossen. War das Gel auspolymerisiert, so konnte man unterhalb der wässrigen Phase eine Trennlinie erkennen. Das Butanol und das Restwasser wurden mit bidestilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurde restliches Wasser mit einem Papiertuch vom Gel abgezogen. Das Sammelgel wurde jetzt auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Taschen in das Gel gesteckt.

Sammelgel 2ml (5%ig):
0,33 ml 30%ige Acrylamid-; 0,8%ige Bisacrylamidstammlösung
0,4 ml 0,625 M Tris/HCl (pH 6,8)
0,4 ml 0,5%ige SDS
0,87 ml bidest. H_2O
2 µl TEMED
10 µl 10%ige Ammoniumpersulfatlösung

Das Gel wurde in das Mini-Gel-System eingespannt und die Apparatur mit SDS-Laufpuffer versehen. Eventuell vorhandene Luftblasen zwischen den Glasplatten wurden mit einer Spritze entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült.

Laufpuffer (2 l):
6,04 g Tris-Base
28,8 g Glycin
2 g SDS

Nachdem die Proben in Probenpuffer aufgenommen und aufgekocht worden waren, wurden je 20 µl der Probe in eine Geltasche gegeben. Damit eine Größenbestimmung möglich war, wurden 15 µl eines Proteinstandards [Firma MBI Fermentas (www.fermentas.de) oder Bio-Rad (www.bio-rad.com)] aufgetragen. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug bei 20 mA etwa 1,5-2 Stunden. Nach Austritt der Bromphenolblau-Front aus dem Gel wurde die Elektrophorese abgebrochen. Das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt und eine Ecke des Trenngels markiert, um bei symmetrisch beladenen Gelen die Reihenfolge des Probenauftrags zu verfolgen. Das Gel wurde für 5 min in Blotpuffer äquilibriert und anschließend im „Semi Dry-Blotsystem“ geblottet.

2.19.16 Immunblot

Blotpuffer 1l (pH 8,9):
5,8 g Tris Base
2,9 g Glycin
0,37 g SDS
200 ml Methanol
Auf 1 l mit bidestilliertem H_2O auffüllen. Der Puffer wurde sowohl als Anoden als auch Kathodenpuffer verwendet.

Auf die kathodische Graphitplatte wurden drei Lagen Blotpuffer-getränktes „Whatmann“-Filterpapier gegeben. Auf die Filterpapierlagen wurde die zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran (Protran mit Porendurchmesser von 0,2 µm; Schleicher & Schüll), ebenfalls in Blotpuffer getränkt, aufgelegt. Auf die Membran wurde das Trenngel möglichst luftblasenfrei und drei weitere Lagen des getränkten Filterpapiers aufgelegt. Mit einer Pipette wurden eventuell vorhandene Luftblasen herausgerollt. Das System wurde verriegelt und mit

Gewichten beschwert. Der Transfer wurde für 1,5 Stunden bei 150 mA durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung reversibel gefärbt und die Banden des Molekulargewichtsstandards mit einem Kugelschreiber markiert. Die Nitrozellulosemembran wurde nun durch Schwenken auf einem Taummeltisch in TBS/Tween (1% v/v) entfärbt. Anschließend wurde sie mit 2%igem BSA in PBS für 30 min geblockt. Nach dem Blocken wurde der erste Antikörper in TBS/Tween oder PBS/Tween auf die Membran gegeben.

Für den Nachweis des Ratten FH wurde der monoklonale Antikörper (mAK) 4-7D in einer Konzentration 6,6 µg/ml eingesetzt, was bei 20 ml TBS/Tween 132 µg Antikörper absolut bedeutet. Der polyklonale anti-Ratten FH Antikörper aus dem Kaninchen (aufgereinigte IgG-Fraktion) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 (entsprach ~7 µg/ml) eingesetzt. Zum Nachweis des Ratten FI wurde der mAK15F-11/2 in einer Konzentration von 10 µl/ml eingesetzt. Der kommerzielle polyklonale anti-humane FI und den Ratten FI erkennende Antikörper aus dem Schaf wurde in einer Verdünnung von 1:1000 (entsprach ~5,5 µg/ml) eingesetzt. Der selbstgenerierte polyklonale anti-FI pAK aus dem Kaninchen (IgG-Fraktion) wurde ebenfalls 1:1000 verdünnt (~7 µg/ml) eingesetzt.

Unter stetem Schwenken belief sich die Inkubationszeit mit dem polyklonalen Antikörper auf 2,5 Stunden bei RT. Mit den monoklonalen AK wurde in der Regel über Nacht bei 4°C oder alternativ für 2,5 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss an die jeweilige Inkubation wurde dreimal für je 5 min mit PBS/Tween gewaschen. Der Sekundärantikörper (Peroxidase markierter anti-Maus oder anti-Kaninchen IgG) wurde in einer Verdünnung von 1:4000 auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Die Inkubation wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Taumeltisch durchgeführt. Nach dreimaligem fünf-minütigem Waschen mit TBS/Tween folgte die Entwicklung des Blots. Zu diesem Zweck wurden 25 mg 3,3´-Diaminobenzidin (DAB) in 50 ml TBS/Tween gelöst und auf die Membran gegeben. Die Farbreaktion startete nach der Zugabe von 500 µl H_2O_2 (3%ig). Detektierte Proteinbanden färbten sich braun. Die Reaktion wurde durch Waschen in TBS/Tween gestoppt. Die Membran wurde zur Aufbewahrung zwischen „Whatmann“-Papier getrocknet.

2.20 Glycoprotein-Nachweis mit der PAS-Färbung

Der „Glycoprotein Detection Kit“ der Firma Sigma (www.sigmaaldrich.com) dient dem Zweck, verzuckerte Proteine im SDS-Gel nachzuweisen. Die Methode basiert auf der PAS („Periodic acid Schiff“)-Färbung. Die Proteine die glykosyliert sind, werden im Gel hintergrundfrei blau-violett angefärbt. Das Detektionslimit des Kits liegt bei etwa 25-100 ng

Kohlenhydrat pro Proteinbande. Als Positivkontrolle ist dem Kit die Meerrettichperoxidase beigefügt, die mit einem relativen Molekulargewicht von 47 kDa einen Verzuckerungsgrad von etwa 16% besitzt.

Die Komponenten des Kits wurden wie folgt angesetzt:

Zu der Oxidationskomponente wurden nach Anleitung 950 ml bidest. Wassers zugegeben. Die Flasche wurde geschüttelt, bis die Substanzen vollständig gelöst waren. Anschließend wurde dest. H_2O auf 1000 ml aufgefüllt. Die Flasche wurde mehrfach invertiert, um eine homogene Lösung zu bekommen. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Die Reduktionkomponente wurde analog der Oxidationskomponente angesetzt und ebenfalls bei RT gelagert. Die Fixierungslösung bestand aus 200 ml bidest. Wasser und 200 ml Methanol. Sie wurde bei Raumtemperatur gelagert. Die Aufbewahrungslösung wurde aus 380 ml bidest. Wasser mit 20 ml Eisessig hergestellt und wurde ebenfalls bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Meerrettichperoxydase als glycosyliertes Referenzprotein wurde in 500 µl bidest. H_2O gelöst. Von dieser Ausgangslösung in einer Konzentration von 2 mg/ml wurde eine Gebrauchslösung in der Konzentration von 1 mg/ml durch Verdünnung mit SDS-Probenpuffer hergestellt. Die nicht benötigte restliche Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Im ersten Schritt wurde das Gel mit dem rekombinaten FH und dem Kontrollprotein beladen und nach dem Lauf in die Fixierungslösung (200 ml) für 60 min auf dem Wipptaumeltisch bei RT gegeben. Nach der Fixierung wurde das Gel zweimal mit je 300 ml bidest. Wasser für je 20 min gewaschen. Im Anschluss wurde das Gel in 200 ml Oxidationslösung getaucht und wie bei der Fixierung für 60 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Oxidation erfolgten erneut zwei Waschschritte in je 300 ml H_2O für je 20 min. Nach dem Waschen wurde das Gel für ca. 2 Stunden in die gebrauchsfertige Färbelösung (150 ml) aus dem Kit gegeben und unter sanftem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Die Banden wurden nach 1-2 Stunden sichtbar. Das Gel wurde nun ohne Waschung in die Reduktionslösung (ca. 200 ml) gegeben und für weitere 2 h auf dem Taumeltisch inkubiert. Dies führte zu einer Trübung des Gels. Nach dem Reduktionsschritt wurde das Gel so lange mit bidest. H_2O gewaschen, bis der Niederschlag und die Geltrübung verschwunden waren. Das Wasser wurde, sobald es farbig war, gewechselt. Die nach dem Reduzieren unsichtbar gewordenen Banden wurden mit jedem Waschschritt deutlicher in blau-violetter Färbung sichtbar. Um das Gel zu lagern, wurde es in die Aufbewahrungslösung gegeben und bei 4°C gelagert.

2.21 Silberfärbung der aus Rattenserum immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten Proteine Faktor H und Faktor I im SDS-Gel

Das SDS-Gel wurde, nachdem die Auftragspufferbande aus dem Gel herausgelaufen war, aus der Apparatur genommen und für 30 min auf einem Taummeltisch bei RT in 10%iger TCA-Lösung fixiert. In der Zwischenzeit wurde die DTT-Lösung angesetzt. Hierzu wurden 6 mg DTT in bidest. H_2O gelöst und mit absolutem Ethanol (final 20% v/v) und Essigsäure (final 5% v/v) versetzt. Das Volumen wurde mit bidest. H_2O auf 200 ml gebracht. Das Gel wurde nach der Fixierung für weitere 30 min und RT in der DTT-Lösung auf dem Taummeltisch reduziert. Für die weitere Entwicklung wurden folgende Lösungen benötigt:

0,5% w/v Kalium-Dichromat in bidest. H_2O
0,1% w/v Silbernitrat in bidest. H_2O
0,02% w/v Paraformaldehyd; 3% w/v Natriumcarbonat in bidest. H_2O
1%ige Essigsäurelösung

Nach der Reduktion in der DTT-Lösung wurde das Gel für 5 min in der Kaliumdichromatlösung inkubiert. Im Anschluss wurde das Gel für 5 min in bidest. H_2O gewässert und dann für 10 min in der Silbernitratlösung geschwenkt. Nach der Inkubation wurde das SDS-Gel für eine Minute gewässert. Die Farbentwicklung erfolgte in der Paraformaldehyd-Natriumcarbonatlösung. Da dieser Schritt je nach Protein und Proteinmenge unterschiedlich schnell (bis 7 min) abläuft, sollte er unbedingt beobachtet werden. Die Entwicklung wurde durch Umbetten des Gels in die 1%ige Essigsäurelösung abgestoppt.

2.22 Expression des FH(SCR1-4) in SF21-Insektenzellen

Die Expression des FH(SCR1-4) wurde nach dem Handbuch der Firma Clontech „BacPAK, Baculovirus Expression System“ unter Verwendung des pBacPak9-Vektors (Clonetech) durchgeführt. Die FH-Sequenz (SCR1-4) wurde über eine PCR mit einem C-terminalen His-Tag versehen und über eine 5`-BamH I- und eine 3`-Xba I-Schnittstelle in den Vektor ligiert. Die amplifizierte FH-Sequenz umfasste 858 Bp, was den ersten 286 AS (inkl. Leadersequenz) entspricht. Das FH-PCR-Amplifikat, welches für die Ligation Verwendung fand, war insgesamt 1014 Bp [FH-Sequenz (858 Bp); His-Tag, 2x Stopcodon,Primer (156 Bp)] groß.

Der BacPak9-Vektor wurde in ausreichender Menge in TOP10-Zellen vermehrt und anschließend isoliert. Um die rekombinanten Viruspartikel zu erhalten, wurde eine 75cm^2-Flasche mit 2x10^7 SF21-Zellen mit dem BacPak9-Vektor und dem BakPak6-Vektor kotransfiziert. Die Kultur wurde so lange erhalten, bis die Zellen deutlich granuliert waren d.h. ihre Morphologie deutlich geändert war. Der Überstand wurde abgenommen und ein Plaqueassay durchgeführt. Nachdem aus dem Plaqueassay die Infektionsrate als „Plaque Forming Units“ (PFU) berechnet worden war, wurde das Virus in mehreren SF21-Zellkulturen erneut vermehrt. Von den einzelnen Chargen wurden Viruspartikel gewonnen und in einer PCR auf die Insertion des Faktor H Fragmentes (SCR1-4) überprüft. Positive Chargen wurden in größeren Kulturen, die mit einer „Multiplicity of Infection“ (MOI) von 0,1 angeimpft worden waren, weitervermehrt. Die nun gewonnen Viruspartikel waren der so genannte „Workingstock“. Von diesen Viruspartikeln wurde ebenfalls ein Plaqueassay durchgeführt. Es ergaben sich folgende Werte:

Charge H1: 5x10^8 pfu/ml

Charge H2: 6,3x10^8 pfu/ml

Charge H3: 4,6x10^8 pfu/ml

Von jedem Ansatz waren ca. 8-10 ml vorhanden.

Mit der Herstellung des „Workingstock“ inklusive der pfu-Bestimmung waren die Vorarbeiten abgeschlossen.

Die SF21-Zellen wurden in Grace-Insektenmedium bei 27°C ohne CO_2-Begasung in Kultur genommen. Dadurch, dass die Viruspartikel etwa für ein Jahr gelagert worden waren, wurde entgegen den Empfehlungen des Herstellers eine deutlich höhere MOI für die Infektion der Zellen verwendet. Laut Hersteller wird je nach Protein eine MOI zwischen 5-20 empfohlen. Für die Transduktion mit dem länger gelagerten Virusstock wurden MOI von 16, 33 und 50 ausgewählt. Die hohen MOI wurden ausgewählt, um eine hohe Transduktionsrate auch bei Lagerungs-bedingten Verlusten an infektiösen Viruspartikeln sicherzustellen. Die Transduktion mit einer hohen MOI hatte den Vorteil, dass bereits nach wesentlich kürzerer Kultivierungsdauer das rekombinante Protein im Zellkulturüberstand detektierbar war. Für die Transduktion wurden die SF21-Zellen in 10 cm Schalen in einer Dichte von 3x10^6 Zellen pro Platte ausgesät. Ihrer jeweiligen MOI entsprechend wurden Aliquots des Virusstocks zu den Zellen pipettiert. Nach 2-3 Tagen, wenn die Produktion der viral kodierten Gene (auch die des FH(SCR1-4)) am höchsten war, waren auch die Zellen in den Kulturschalen so weit gewachsen, dass sie komplett mit dem Medium in 75 cm^2-Flaschen überführt wurden. Aus jeder Kulturschale wurde vor dem Transfer 2 ml Überstand abgenommen und für einen Immunblot mit TCA gefällt. Nach dem Transfer wurden jeweils 15 ml frisches Medium in die

75 cm^2-Flaschen gegeben und die Zellen für 5 Tage weiterkultiviert, bis fast alle Zellen tot waren. Der Überstand wurde abgegossen und zentrifugiert, um die Zelltrümmer und Zellen zu entfernen. Anschließend wurde er bis zur Aufreinigung bei -20°C tiefgefroren.

2.22.1 Aufreinigung des rekombinanten FH(SCR1-4) mittels MagneHis™ Nickelmagnetpartikeln aus SF21-Zellen und Zellkultur-überstand

In die Sequenz des FH(SCR1-4) war über das Design des reversen Primers ein so genannter His-Tag (sechs Histidine in Folge) angeschlossen, so dass für seine Aufreinigung eine Ni-Chelat Chromatographie verwendet werden konnte.
Für die Proteinaufreinigung mittels der in dieser Arbeit verwendeten Promega MagneHis™ Nickelmagnetpartikel (www.promega.com) wurden folgende Puffer benutzt:

Waschpuffer (Promega):	100 mM HEPES 10 mM Imidazol; pH 7,5
Elutionspuffer I(Promega):	100 mM HEPES 500 mM Imidazol; pH 7,5
Elutionspuffer II:	1 M Imidazol; pH 7,9

Aufreinigung des FH(SCR1-4) aus SF21-Insektenzellen
Zu dem Zellpellet wurden 450 µl Promega-Lysepuffer und 70 µl 10%ige SDS-Lösung gegeben. Mit einer Pipette wurde der Ansatz gut gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 70 µl der Magnetpartikelsuspension gegeben und gut durchmischt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 10 min. Die Magnetpartikel wurden mit einem starken Magneten (z.B. Dynal MPC-1 „magnetic particle concentrator“) an der Wand des Gefäßes gebunden. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und auf Eis gelagert. Das Gefäß wurde nun aus der Magnethalterung entnommen und die Partikel mit 800 µl Promega-Waschpuffer resuspendiert und für 2 min unter Schwenken inkubiert. Wie oben beschrieben wurden die Partikel fixiert und der Waschpuffer abgenommen und auf Eis gelagert. Die zweite und dritte Waschung erfolgte mit jeweils 400 µl Promega-Waschpuffer bei einer Inkubationszeit von 2 min bei RT. Die Puffer wurden wie bei der ersten Waschung abgenommen und zunächst aufgehoben. Für die Elution wurden die Partikel in 100 µl Promega-Elutionspuffer (500 mM Imidazol; pH 7,9) resuspendiert und unter Schwenken für 5 min bei RT inkubiert. Der Elutionspuffer wurde vollständig entfernt und umgehend auf Eis gestellt. Die Partikel wurden für eine zweite Elution in 200 µl Promega-Elutionspuffer

resuspendiert und wie bei der ersten Elution behandelt. Der Überstand wurden ebenfalls gesammelt und auf Eis gelagert. Die Überstände wurden im Photometer gegen den entsprechenden Puffer vermessen. Je nach Ausbeute wurden von jedem Überstand zwei Aliquots abgenommen und mit TCA präzipitiert. Die Proben wurden für die Bestimmung der Reinheit im Coomassiegel und zur Identifizierung des rekombinanten Proteins im Immunblot verwendet.

Aufreinigung des FH(SCR1-4) aus SF21-Insektenzellkulturüberstand

Für die Aufreinigung des FH(SCR1-4) aus dem Überstand der Insektenzellen wurden ebenfalls die Promega MagneHis™ Nickelmagnetpartikel verwendet. Da der Überstand von den SF21-Insektenzellen einen pH-Wert von 6,3 hatte, wurde er gegen PBS dialysiert. Die Bindung des FH(SCR1-4) mit seinem His-Tag an die Magnetpartikel verläuft am effektivsten bei einem pH-Wert von 7,5. Zu 30 ml dialysiertem Überstand wurden 700 µl der Magnetpartikelsuspension gegeben und unter stetem Schwenken für 20 min bei RT inkubiert. Nachdem die Partikel durch die Magnetkräfte fixiert worden waren, wurde der Überstand vollständig mit einer Pipette entfernt. Die Partikel wurden nun dreimal mit je 5 ml Promega-Waschpuffer für jeweils 5 min bei RT unter leichtem Schwenken gewaschen. Die Waschfraktionen wurden gesondert gesammelt. Die erste Elution erfolgte unter vorsichtigem Schütteln mit ca. 2 ml Promega-Elutionspuffer für 5 min bei RT. Die Elutionsfraktion und die Waschfraktionen wurden gesammelt und auf Eis gestellt. Die zweite Elution erfolgte mit 1 molarem Imidazol (pH 7,9) für 5 min bei RT. Die Elutionsfraktionen wurden im Photometer gegen den entsprechenden Elutionspuffer vermessen und im Anschluss gegen 10 l PBS über Nacht bei 4°C dialysiert.

Von allen Waschfraktionen und vom Überstand wurden jeweils 2 ml mit TCA gefällt. Von den Elutionsfraktionen wurden je nach Ausbeute (Photometerwerte) jeweils 100-500 µl mit TCA präzipitiert. Eine Probe wurde wie oben beschrieben im SDS-Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassieblau-gefärbt, die andere wurde für einen Immunblot verwendet.

2.23 Komplement-Hämolysetest des klassischen Weges (CH_{50}-Test)

Durch diesen Komplement-vermittelten Hämolysetest kann die funktionelle Aktivität des klassischen Weges bestimmt werden. Das grundsätzliche Prinzip des CH_{50}-Tests beruht darauf, dass konstante Mengen von mit Antikörpern beladenen Schaferythrozyten mit aufsteigenden Volumina des zu testenden Serums in einer 1:20 Vorverdünnung inkubiert werden. Aufgrund der Aktivierung der im Serum enthaltenen Komplementkomponenten

kommt es zur Lyse der Erythrozyten. Nach einer Zentrifugation wird bei 405 nm und 650 nm photometrisch der Hämolysegrad über die Hämoglobinfreisetzung gemessen. Das aus dieser 1:20 Vorverdünnung entnommene Serumvolumen, das zu einer 50%igen Lyse des maximal möglichen Werts führt, ist per definitionem der CH_{50}-Wert.
Für den Komplement-Hämolysetest (CH_{50}) wurden folgende Puffer benötigt:

Veronalpuffer(VB)$^{++}$-Puffer (5-fach)

23 g Barbitursäure (MW 184,2) in einem Liter unter Kochen lösen
419 g NaCl
10 g Na-Barbital (MW 206,18)
5 g $MgCl_2$x $6H_2O$ (MW 203,3)
1,1 g $CaCl_2$ x $2H_2O$ (MW 174,02)
in bidest. H_2O lösen mit 1 l gelöster Barbitursäure vermischen und auf 10 Liter mit bidest. H_2O auffüllen.

Gelatine-Veronalpuffer(GVB)$^{++}$-Puffer

200 ml VB^{++}
1 g Gelatine
pH-Wert auf 7,2 einstellen und mit bidest. H_2O auf 1 l auffüllen.

Die für den Test notwendigen Antikörper-beladenen Schaferythrozyten wurden jeweils frisch aus dem Routinelabor der Abteilung Immunologie bezogen. Die Beladung der Erythrozyten war mit einem speziellen für die Diagnostik zugelassenen Kit (Hämolysin) der Firma „Nordic Immunological Laboratories“ erfolgt. Die Erythrozyten waren auf $1*10^9$ Zellen/ml eingestellt worden und wurden anschließend 1:2 mit GVB^{++} verdünnt, um eine finale Konzentration von $5*10^8$ Zellen/ml zu ergeben. Die hämolytische Aktivität des Rattenserums wurde nun in dem CH_{50}-Test austitriert. Das definierte Volumen des Rattenserums, welches bei einer Vorverdünnung von 1:20 zur halbmaximalen lytischen Aktivität führte, wurde für alle weiteren Tests ebenfalls 1:20 mit GVB^{++}-Puffer vorverdünnt. Die weiteren Tests bestanden darin, die komplementabhängige 50%ige Lyse der Erythrozyten durch die Zugabe von FH(gesamt)/FH(SCR1-7)/FH(SCR1-4)/FI (einzeln und in Kombination) zu inhibieren, um auf diese Weise ihre Komplement-inhibitorische Aktivität quantitativ zu vermessen. Die Testansätze wurden in einer 96-Well Mikrotiterplatte (Rundboden) auf Eis zusammenpipettiert. Das maximale Volumen des Tests lag bei 215 µl. Ein typischer

Testansatz, um die inhibierende Funktion vom FH(gesamt)/FH(SCR1-7)/FH(SCR1-4)/FI zu analysieren, ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Testansätze	GVB^{++}	RS	EA	FH/FH(SCR1-7)/ FH(SCR1-4)/FI
1	161 µl	25 µl	29 µl	-
2	151 µl	25 µl	29 µl	10 µl
3	141 µl	25 µl	29 µl	20 µl
4	121 µl	25 µl	29 µl	40 µl
5	81 µl	25 µl	29 µl	80 µl

GVB^{++}:(GVB^{++}-Puffer), RS:(Rattenserum), EA:(mit Antikörpern beladene Erythrozyten), FH: (immunaffinitätschromatographisch gereinigter FH), FH(SCR1-7): in HEK293- und in Mono-Mac-6-Zellen rekombinant hergestellter FH(SCR1-7), FH(SCR1-4): In SF21-Insektenzellen rekombinant hergestellter FH(SCR1-4), FI: (immunaffinitätschromatographisch gereinigter FI)

Nachdem alle Komponenten zusammenpipettiert worden waren, wurde die Mikrotiterplatte kurz geschüttelt und anschließend für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte für 3 min in einer Plattenzentrifuge (Sigma 2-5) bei 1.400 U/min zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 50 µl in eine neue Mikrotiterplatte (Flachboden) überführt und im Plattenphotometer bei 405 nm vermessen.

2.24 Komplement-Hämolysetest des alternativen Weges ($APCH_{50}$)

Der $APCH_{50}$ ist wie der CH_{50} ein hämolytischer Assay, um die Funktionalität des Komplementsystems zu überprüfen, wobei mittels CH_{50} der klassische Weg und mittels $APCH_{50}$ der alternative Komplementweg quantitativ vermessen werden kann. Der klassische Aktivierungsweg ist im Gegensatz zum alternativen Weg abhängig von der Anwesenheit von Calcium- und Magnesiumionen. Der alternative Weg ist nur auf die Anwesenheit von Magnesiumionen angewiesen. Um den klassischen Aktivierungsweg zu blockieren und die Funktionalität des alternativen Weges zu prüfen, werden im $APCH_{50}$ Calcium- und Magnesiumionen durch dem Serum die Zugabe von EGTA zunächst vollständig entzogen. Durch den Zusatz von Magnesium wird dann wiederum gewährleistet, dass nur der alternative Komplementaktivierungsweg ablaufen kann.

Für den $APCH_{50}$ werden folgenden Puffer benötigt:

VB^{--}-Puffer (5-fach):

23 g Barbitursäure (MW 184,2), in einem Liter unter Kochen lösen

419 g NaCl

10 g Na-Barbital (MW 206,18)

in bidest. H_2O lösen, mit dem Liter gelöste Barbitursäure vermischen und auf 10 Liter mit bidest. H_2O auffüllen.

GVB^{--}-Puffer:

200 ml VB^{--}

1 g Gelatine

pH-Wert auf 7,2 einstellen und mit bidest. H_2O auf 1 l auffüllen.

Mg-EGTA (0,2 M):

7,608 g EGTA

50 ml 1 M (N) NaOH

pH-Wert auf 8,5 einstellen und mit bidest. H_2O auf 100 ml auffüllen. 100 ml einer 0,2 molaren $MgCl_2$ x $6H_2O$ (4,064 g/100 ml) mit bidest. H_2O auf 1 Liter auffüllen.

GVBE-Puffer:

2 ml 0,2 M EDTA-Lösung (pH 7,2)

38 ml GVB^{--}-Puffer

Gebrauchspuffer:

Zu 475 ml GVB^{--} wurden 0,5 g Gelatine gegeben. Anschließend wurde der Puffer aufgekocht, damit sich die Gelatine löst. Nachdem der Puffer abgekühlt war, wurden 25 ml des Mg-EGTA-Puffers hinzugegeben.

Für den $APCH_{50}$-Test wurden an Stelle Antikörper-beladener Schaferythrozyten nicht modifizierte Kaninchenerythrozyten verwendet. Zwei Milliliter Kaninchenerythrozyten wurden dreimal mit dem Gebrauchspuffer (GVB^{--}) gewaschen. Die erste Waschung erfolgte vor einer anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 2.500 U/min, die folgenden Waschschritte erfolgten mit einer anschließenden Zentrifugation bei 1.500 U/min ebenfalls für 10 min. Wichtig war, dass der jeweilige Überstand nach dem Waschen klar war. Die Erythrozyten wurden nun mit dem Gebrauchspuffer auf 5 ml aufgefüllt und auf $1x10^9$ Zellen/ml eingestellt. Für eine 100%ige Lyse wurden 20 µl Kaninchenerythrozyten zu 2 ml

H_2O (bidest.) gegeben. Die Extinktion wurde bei 412 nm gemessen. Dieser Lyseschritt diente der retrospektiven Einstellung einer geeigneten Zelldichte der Kaninchenerythrozyten. Die OD_{412} der lysierten Erythrozyten sollte bei 1,1 liegen. Nachdem die Zellen erfolgreich so eingestellt worden waren, dass ihre OD bei einer 100%igen Lyse 1,1 betrug, wurden die Kaninchenerythrozyten für die weiteren Lyseansätze zur Bestimmung des $APCH_{50}$ mit dem Gebrauchspuffer auf $6x10^7$ Zellen/ml eingestellt. Das Rattenserum und das Humanserum wurden wie folgt vorverdünnt. Zu 95 µl Serum wurden 5 µl Mg-EGTA-Puffer zugegeben. Folgende Ansätze wurden im Eisbad pipettiert:

Ansatz	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**Farb-kontrolle**	**2x Puffer**	**2x H_2O**
Serum	25µl	12µl	8µl	6µl	5µl	3µl	2,5µl	25µl	-	-
Gebrauchs-puffer	25µl	38µl	42µl	44µl	45µl	47µl	47,5µl	125µl	50µl	50µl H_2O
Kaninchen-erythrozyten	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	-	100µl	100µl
60 min Inkubation bei 37°C im Wasserbad. Nach 30 min Ansätze kurz aufmischen.										
GVBE-Puffer	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml H_2O

Nach der 60-minütigen Inkubation wurden die Ansätze für 5 min bei 1.500 U/min zentrifugiert. 200 µl von jedem Überstand wurden in eine 96-Napf Mikrotiterplatte überführt. Die Extinktion der Überstände wurde nun bei 412 nm gemessen. Der Ansatz, der nur mit Wasser pipettiert wurde, sollte die höchste Extinktion (komplette Lyse; OD=1,1) zeigen; der Pufferwert sollte in etwa der Farbkontrolle entsprechen.

Für die Inhibition des alternativen Wegs wurde analog dem CH_{50}-Test des klassischen Komplementweges ein Serumvolumen ausgewählt, das zur halbmaximalen Erythrozytenlyse führte. Die Serummenge wurde von der Gebrauchspuffermenge abgezogen und die restlichen Volumina sollten nun durch FH(gesamt)/FH(SCR1-7)/FH(SCR1-4)/FI ersetzt werden, bis eine komplette Inhibition der Lyse erreicht worden wäre.

3 Ergebnisteil

3.1 Identifizierung der Primärstruktur des Ratten FH

Für die Sequenzanalyse des FH wurden degenerierte Primer, die aus dem Vergleich der Maus- mit der humanen Sequenz gewonnen worden waren, benutzt. Die erste Sonde umfasste ein Fragment von 1003 bp Länge. Die Durchmusterung von ca. $6*10^5$ Phagenplaques (2.16) ergab 10 Klone. Diese 10 Klone enthielten Bruchstücke aus der Ratten FH-Sequenz zwischen 1000 und 2200 Bp. Mit den in ihnen enthaltenen Teilsequenzen war es möglich, die Gesamtsequenz von Position 1028 (siehe Abb. 16) bis zum Poly-A-Schwanz zu ermitteln. Die so identifizierte Sequenz umfasste 3229 Basenpaare. Aufgrund der Verwendung einer oligo-dt-geprimten cDNA-Bank war es jedoch nicht möglich, mit der 1003 Bp umfassenden Sonde den bisher nicht erfassten 5´-Bereich der Sequenz zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde eine den 5´-Bereich der Sequenz umfassende Sonde aus den Primern FH1s und FH1as generiert. Nach mehreren Anläufen gelang es, einen positiven „Phagenspot“ zu ermitteln. Dieser „Phagenspot“ ermöglichte es, die verbleibende Sequenz zu identifizieren. Der Phage enthielt die Sequenz von Position -23 (untranslatierter 5´-Bereich) bis Position 1105. Die gesamte ermittelte Sequenz umfasst damit 4240 Nukleotide. Der offene Leserahmen umspannt 3708 Bp gefolgt von einem Stopcodon und einem 3´-untranslatierten Bereich von 478 Nukleotiden und dem Poly A-Schwanz. Im 3´-untranslatierten Bereich befindet sich das Polyadenylierungssignal (AATAAA) an Position 4194-4199, 15 Nukleotide vor Beginn des Poly-A-Schwanzes. Die Ratten FH-Gesamtsequenz wurde unter der Zugangsnummer AJ320522 in den EMBL- und SwissProt-Datenbanken niedergelegt.

3.1.1 PCR-Validerung FH-positiver Phagenspots

Es wurden verschiedene positive Klone identifiziert, die jeweils unterschiedlich große Sequenzbruchstücke des Ratten Faktor H enthielten. Um die Größen der in den Plasmiden enthaltenen Sequenz-Fragmente festzustellen, wurden die Plasmide nach ihrer Isolation einer PCR mit speziellen, das Insert (die FH-Sequenz) flankierenden Primern (TriplEx5´ und TriplEx3´), unterzogen. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,2%igen Agarosegel zur Analyse aufgetrennt. Da manche Klone, wie auch in Abbildung 15 gezeigt, aufgrund ihrer geringen Größe zu wenig Sequenzinformation enthielten, lohnte eine Sequenzierung nicht. Um die gesamte Ratten FH Sequenz zu erhalten, wurden die Einzelsequenzen aufgrund ihrer Überlappungen auch unter Berücksichtigung der Sequenzhomologien zu den bekannten

Human- und Maussequenzen nach und nach zu der vollständigen Sequenz zusammengesetzt. In der folgenden Abbildung ist ein Beispiel für eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte verschiedener positiver Klone gezeigt.

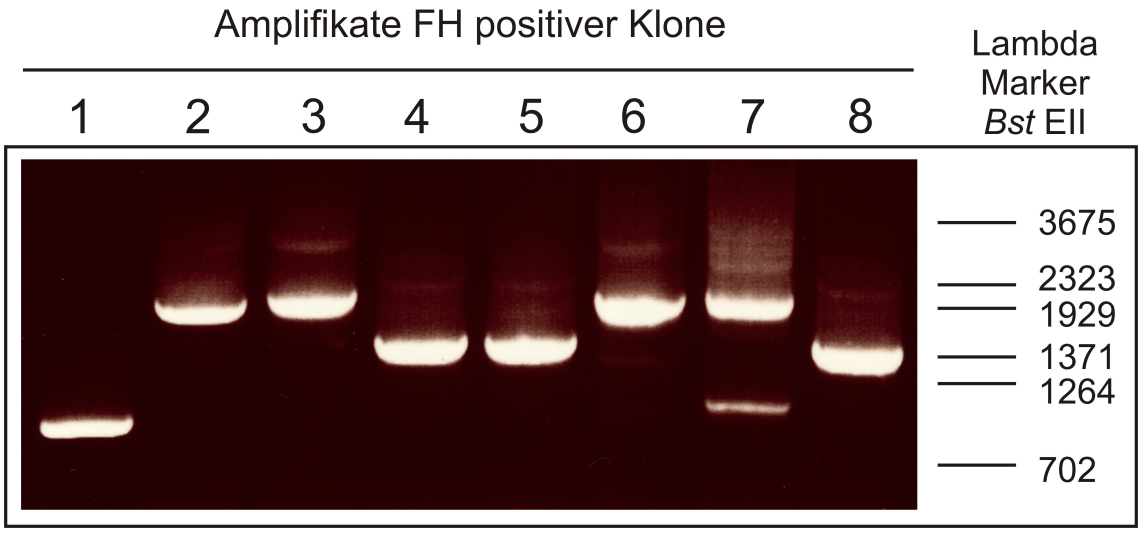


Abb. 15: PCR-Untersuchung der FH-Insertgröße in einer Auswahl positiver Klone. Acht Klone wurden in einer PCR auf die Größe ihres FH-Inserts untersucht. Als Ausgangsmaterial dienten Bakterienklone, die das pTriplEx-Plasmid enthielten. Unter Verwendung der flankierenden TriplEx5´- und TriplEx3´-Primer wurde die Insertgröße in einer PCR ermittelt. Die Amplifikate wurden in einem 0,8%igen Agarosegel mit 10 µl des Lambdamarkers als Größenreferenz elektrophoretisch aufgetrennt. Die Klone 2, 3, 6 und 7 zeigten jeweils eine Bande von ca. 2200 Bp, die Klone 4, 5 und 8 ein Amplifikat von 1400 Bp und Klon 1 ein Amplifikat von ca. 800 Bp.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, wurden acht Klone in einer PCR auf die Größe ihres FH-cDNA-Inserts untersucht. Die Klone 2-6 und 8 wurden aufgrund ihrer Amplifikatgröße für eine Midi-Plasmidpräparation (2.16.15) herangezogen. Klon 1 lieferte ein Amplifikat, welches aufgrund der geringen Größe nicht analysiert wurde. Bei Klon 7 erkennt man neben der dominanten Bande eine zweite, kleine Bande im Bereich von 1000 Bp. Diese Bande legte nahe, dass der Klon noch nicht „klonal“, sondern durch einen weiteren Klon kontaminiert war. Er wurde deshalb erneut auf einer Agarplatte ausgestrichen. Weitere Untersuchungen von Einzelkolonien dieses Klons in der PCR zeigten nur noch eine Bande.

3.1.2 Identifizierung der Rattenfaktor H Gesamtnukleotidsequenz

Die aus den Einzelsequenzen der unterschiedlichen Phagenplaque-Klone gewonnenen Sequenzbruchstücke wurden zur nachfolgenden Rattenfaktor H-Gesamtsequenz zusammengesetzt:

```
     5' UT REGION        → ←                LEADER SEQUENCE
   CTGCTCCCAGATAGATCCAAGAC ATG AGA CTG TCA GCA AGA ATT ATT TGG CTT ATA TTA TGG ACT    65
                            M   R   L   S   A   R   I   I   W   L   I   L   W   T     14
             →  ←                                  SCR 1
GTT TGT GTA GCA GAA GAT TGT AAA GGT CCT CCT CCA AGA GAA AAT TCA GAA ATT CTC TCA GGT   128
 V   C   V   A   E   D   C   K   G   P   P   P   R   E   N   S   E   I   L   S   G     35
                                            SCR 1
TCG TGG TCT GAA CAA CTA TAT TCA GAA GGC ACT CAG GCA ACC TAC AAA TGC CGC CCT GGA TAC   191
 S   W   S   E   Q   L   Y   S   E   G   T   Q   A   T   Y   K   C   R   P   G   Y     56
                                            SCR 1
CGA ACA CTT GGT ACT ATT GTA AAA GTA TGC AAG AAT GGA GAA TGG GTA CCT TCT AAC CCA TCA   254
 R   T   L   G   T   I   V   K   V   C   K   N   G   E   W   V   P   S   N   P   S     77
    SCR 1    → ←                            SCR 2
AGG ATA TGT CGG AAA AGG CCA TGT GGG CAT CCC GGA GAC ACA CCC TTT GGG TCC TTT AGG CTG   317
 R   I   C   R   K   R   P   C   G   H   P   G   D   T   P   F   G   S   F   R   L     98
                                            SCR 2
GCA GTT GGA TCT GAA TTT GAA TTT GGT GCA AAG GTT GTT TAT ACA TGT GAT GAA GGG TAC CAA   380
 A   V   G   S   E   F   E   F   G   A   K   V   V   Y   T   C   D   E   G   Y   Q    119
                                            SCR 2
CTC TTA GGT GAA ATT GAT TAC CGT GAA TGT GAT GCA GAT GGG TGG ACC AAT GAT ATT CCA ATA   443
 L   L   G   E   I   D   Y   R   E   C   D   A   D   G   W   T   N   D   I   P   I    140
     → ←                                    SCR 3
TGT GAA GTT GTG AAG TGC TTG CCA GTG ACA GAA CTG GAG AAT GGA AGA ATT GTG AGT GGT GCA   506
 C   E   V   V   K   C   L   P   V   T   E   L   E   N   G   R   I   V   S   G   A    161
                                            SCR 3
GCC GAA CCA GAC CAG GAA TAT TAT TTT GGA CAG GTG GTA CGC TTT GAA TGC AAC TCC GGC TTC   569
 A   E   P   D   Q   E   Y   Y   F   G   Q   V   V   R   F   E   C   N   S   G   F    182
                                            SCR 3
AAG ATT GAA GGA CAG AAA GAA ATG CAC TGC TCA GAA AAT GGC CTC TGG AGC AAT GAA AAG CCA   632
 K   I   E   G   Q   K   E   M   H   C   S   E   N   G   L   W   S   N   E   K   P    203
  SCR 3  → ←                                SCR 4
CAG TGT GTG GAA ATT TCT TGC CTG CCA CCA CGA GTT GAA AAT GGA GAT GGT ATA TAG CTG AAA   695
 Q   C   V   E   I   S   C   L   P   P   R   V   E   N   G   D   G   I   Y   L   K    224
                                            SCR 4
CCA GTT TAC AAG GAG AAT GAA AGA TTC CAA TAT AAA TGT AAG CAA GGT TTT GTG TAC AAA GAA   758
 P   V   Y   K   E   N   E   R   F   Q   Y   K   C   K   Q   G   F   V   Y   K   E    245
                                            SCR 4                   → ←   SCR 5
AGA GGG GAT GCT GTC TGC ACG GGT TCT GGA TGG AAT CCT CAG CCT TCC TGT GAA GAA ATG ACA   821
 R   G   D   A   V   C   T   G   S   G   W   N   P   Q   P   S   C   E   E   M   T    266
                                            SCR 5
TGT TTG ACT CCA TAT ATT CCA AAT GGT ATC TAC ACA CCT CAC AGG ATT AAA CAC AGA ATT GAT   884
 C   L   T   P   Y   I   P   N   G   I   Y   T   P   H   R   I   K   H   R   I   D    287
                                            SCR 5
GAT GAA ATC AGA TAT GAA TGT AAA AAT GGC TTA TAT CCT GCA ACC CGA TCA CCT GTT TCA AAG   947
 D   E   I   R   Y   E   C   K   N   G   L   Y   P   A   T   R   S   T   V   S   K    308
                                            SCR 5   → ←         SCR 6
TGT ACA ATT ACT GGC TGG ATC CCT GCT CCA AGA TGT AGC TTG AAA CCT TGT GAT TTT CCA CAA  1010
 C   T   I   T   G   W   I   P   A   P   R   C   S   L   K   P   C   D   F   P   Q    329
                                            SCR 6
TTC AAA CAT GGA CGT CTG TAT TAT GAA GAA AGC CGG AGA CCC TAC TTC CCA GTA CCT ATA GGA  1073
 F   K   H   G   R   L   Y   Y   E   E   S   R   R   P   Y   F   P   V   P   I   G    350
                                            SCR 6
AAG GAG TAC AGC TAT TAC TGT GAC AAC GGG TTT ACA ACG CCT TCA CAG TCA TAC TGG GAC TAC  1136
 K   E   Y   S   Y   Y   C   D   N   G   F   T   T   P   S   Q   S   Y   W   D   Y    371
                                            SCR 6       → ←       SCR 7
CTT CGT TGC ACA GTA AAT GGG TGG GAG CCT GAA GTT CCA TGC CTC AGG CAA TGT ATT TTC CAT  1199
 L   R   C   T   V   N   D   W   E   P   E   V   P   C   L   R   Q   C   I   F   H    392
                                            SCR 7
TAT GTG GAA TAT GGA GAA TCT TTA TAC TGG CAA AGA AGA TAT ATA GAG GGT CAG TCT GCA AAA  1262
 Y   V   E   Y   G   E   S   L   Y   W   Q   R   R   Y   I   E   G   Q   S   A   K    413
                                            SCR 7
GTC CAG TGT CAC AGT GGC TAT AGT CTT CCA AAT GGT CAA GAT ACA ATA TTA TGT ACA GAA AAT  1325
 V   Q   C   H   S   G   Y   S   L   P   N   G   Q   D   T   I   L   C   T   E   N    434
```

```
            SCR 7                   → ←                     SCR 8
GGC TGG TCC CCT CCT CCC AAA TGC GTC CGT ATC AAG ACT TGT TCA GTA TCA GAT ATA GAA ATT  1388
 G   W   S   P   P   P   K   C   V   R   I   K   T   C   S   V   S   D   I   E   I    455
                                        SCR 8
GAA AAT GGG TTT TTT TCT GAA TCT GAT TAT ACA TAT GCT CTA AAT AGA AAA ACA CGG TAT AGA  1451
 E   N   G   F   F   S   E   S   D   Y   T   Y   A   L   N   R   K   T   R   Y   R    476
                                        SCR 8
TGT AAA CAG GGA TAT GTA ACA AAT ACC GGA GAA ATA TCA GGA ATA ATT ACT TGT CTT CAA GAT  1514
 C   K   Q   G   Y   V   T   N   T   G   E   I   S   G   I   I   T   C   L   Q   D    497
            SCR 8               → ←                         SCR 9
GGA TGG TCA CCT CGA CCC TCA TGC ATT AAG TCT TGT GAT ATG CCT GTA TTT GAG AAT GCT ATG  1577
 G   W   S   P   R   P   S   C   I   K   S   C   D   M   P   V   F   E   N   A   M    518
            ♦                           SCR 9
ACT AAG AAT AAT AAC ACA TGG TTT AAA CTC AAT GAC AAA TTA GAC TAT GAA TGT CAC ATT GGA  1640
 T   K   N   N   N   T   W   F   K   L   N   D   K   L   D   Y   E   C   H   I   G    539
                                        SCR 9
TAT GAA AAT GAA TAT AAA CAT ACC AAA GGC TCT ATA ACA TGT ACT TAT GAT GGA TGG TCT AGT  1703
 Y   E   N   E   Y   K   H   T   K   G   S   I   T   C   T   Y   D   G   W   S   S    560
    SCR 9    → ←                        SCR 10
ACA CCC TCC TGT TAT GAA AGA GAA TGC AGC ATT CCC CTG TTA CAC CAA GAC TTA GTT GTT TTT  1766
 T   P   S   C   Y   E   R   E   C   S   I   P   L   L   H   Q   D   L   V   V   F    581
                                        SCR 10
CCC AGA GAA GTA AAA TAC AAA GTT GGA GAT TCG TTG AGT TTC TCT TGC CGT TCA GGA CAC AGA  1829
 P   R   E   V   K   Y   K   V   G   D   S   L   S   F   S   C   R   S   G   H   R    602
                                        SCR 10                                  →
GTT GGA GCA GAT TTA GTG CAA TGC TAC CAC TTT GGA TGG TCC CCT AAT TTC CCA ACG TGT GAA  1892
 V   G   A   D   L   V   Q   C   Y   H   F   G   W   S   P   N   F   P   T   C   E    623
←                                       SCR 11
GGC CAA GTA AAA TCA TGT GAC CAA CCT CTT GAA ATC CCG AAT GGG GAA ATA AAG GGA ACA AAA  1955
 G   Q   V   K   S   C   D   Q   P   L   E   I   P   N   G   E   I   K   G   T   K    644
                                        SCR 11
AAA GTT GAA TAC AGC CAT GGT GAC GTG GTG GAA TAT GAT TGC AAA CCT AGA TTT CTA CTG AAG  2018
 K   V   E   Y   S   H   G   D   V   V   E   Y   D   C   K   P   R   F   L   L   K    665
                                        SCR 11                          →  ← SCR 12
GGA CCC AAT AAA ATC CAG TGT GTT GAC GGG AAG TGG ACA ACC TTG CCG ATA TGC GTT GAG TAT  2081
 G   P   N   K   I   Q   C   V   D   G   K   W   T   T   L   P   I   C   V   E   Y    686
                                        SCR 12
GAG AGA ACA TGT GGA GAC CTT CCT GAA CTT GAG CAT GGC TCT GTC AAG TTA TCT GTC CCT CCC  2144
 E   R   T   C   G   D   L   P   E   L   E   H   G   S   V   K   L   S   V   P   P    707
                                        SCR 12
TAC CAT CAT GGA GAT TCA GTG GAG TTC ACT TGT ACA GAA ACC TTC ACA ATG ATT GGA CAT GCA  2207
 Y   H   H   G   D   S   V   E   F   T   C   T   E   T   F   T   M   I   G   H   A    728
                                        SCR 12              → ←     SCR 13
GTA GTT TTC TGC ATT AGT GGA AGG TGG ACC GAG CTT CCT CAA TGT GTT GCA ACA GAT CAA CTG  2270
 V   V   F   C   I   S   G   R   W   T   E   L   P   Q   C   V   A   T   D   Q   L    749
                                        SCR 13
GAG AAG TGT AAA GCC CCG AAG TCA ACT GGC ATA GAT GCA ATT CAT CCA AAT AAG AAT GAA TTT  2333
 E   K   C   K   A   P   K   S   T   G   I   D   A   I   H   P   N   K   N   E   F    770
        ♦                               SCR 13
AAT CAT AAC TTT AGT GTG AGT TAC AGA TGT AGA CAA AAG CAG GAG TAT GAA CAT TCA ATC TGC  2396
 N   H   N   F   S   V   S   Y   R   C   R   Q   K   Q   E   Y   E   H   S   I   C    791
            SCR 13                  ♦       →  ←            SCR 14
ATC AAT GGA AGA TGG GAT CCT GAA CCA AAC TGT ACA AGA AAT GAG AAA AGA TTC TGC CCT CCT  2459
 I   N   G   R   W   D   P   E   P   N   C   T   R   N   E   K   R   F   C   P   P    812
                                        SCR 14
CCC CCA CAG ATT CCA AAT GCC CAA GTG ATT GAA ACC ACA GTG AAA TAC TTG GAT GGA GAG AAA  2522
 P   P   Q   I   P   N   A   Q   V   I   E   T   T   V   K   Y   L   D   G   E   K    833
                                        SCR 14
GTA TCT GTT CTT TGC CAA GAT GGT TAC CTA ACT CAG GGC CCA GAA GAA ATG GTG TGT AAA CAT  2585
 V   S   V   L   C   Q   D   G   Y   L   T   Q   G   P   E   E   M   V   C   K   H    854
            SCR 14                  → ←                 SCR 15
GGA AGG TGG CAG TCG TTA CCA CGC TGC ACG GAA AAA ATT CCA TGT TCC CAG CCC CCT AAA ATT  2648
 G   R   W   Q   S   L   P   R   C   T   E   K   I   P   C   S   Q   P   P   K   I    875
                                        SCR 15
GAA CAT GGA TCT ATT AAG TCG CCC AGG TCC TCA GAA GAG AGA GAT TTA ATT GAG TCC AGC AGT  2711
 E   H   G   S   I   K   S   P   R   S   S   E   E   R   D   L   I   E   S   S   S    896
                                        SCR 15
TAT GAA CAC GGA ACT ACA TTC AGC TAT GTC TGT GAT GAT GGA TTC AGG ATA TCT GAA GAA AAT  2774
 Y   E   H   G   T   T   F   S   Y   V   C   D   D   G   F   R   I   S   E   E   N    917
                    SCR 15                                  → ←     SCR 16
AGG GTA ACC TGC AAC ATG GGA AAA TGG AGC TCT CTG CCT CGT TGT GTT GGA ATA CCT TGT GGA  2837
 R   V   T   C   N   M   G   K   W   S   S   L   P   R   C   V   G   I   P   C   G    938
                                        SCR 16
CCC CCA CCT TCA ATT CCT CTT GGT ATT GTT TCT CAT GAA CTA GAA AGT TAC CAA TAT GGA GAG  2900
 P   P   P   S   I   P   L   G   I   V   S   H   E   L   E   S   Y   Q   Y   G   E    959
```

```
                 ♦                       SCR 16
GAG GTT ACA TAC AAT TGT TCT GAA GGC TTT GGA ATT GAT GGA CCA GCA TTT ATT AAA TGT GTA  2963
 E   V   T   Y   N   C   S   E   G   F   G   I   D   G   P   A   F   I   K   C   V    980
                 SCR 16                  →  ←             SCR 17
GGA GGA CAG TGG TCT GAA CCT CCC AAA TGC ATA AAA ACT GAT TGT GAC AAC TTG CCC ACA TTT  3026
 G   G   Q   W   S   E   P   P   K   C   I   K   T   D   C   D   N   L   P   T   F   1001
                                         SCR 17
GAA ATT GCC AAA CCG ACA GAA AAG AAA AAA AAA TCA TAC AGG TCA GGA GAA CAA GTG ACA TTC  3089
 E   I   A   K   P   T   E   K   K   K   K   S   Y   R   S   G   E   Q   V   T   F   1022
                                         SCR 17
AGA TGT CCA CCT CCG TAT CGA ATG GAT GGC TCT GAC ATT GTC ACA TGT GTT AAT ACG AAG TGG  3152
 R   C   P   P   P   Y   R   M   D   G   S   D   I   V   T   C   V   N   T   K   W   1043
     SCR 17          →  ←                SCR 18                  ♦
ATT GGA CAG CCG GTA TGC AAA GAT AAT TCC TGT GTG AAT CCA CCA CAT GTG CCA AAT GCT ACT  3215
 I   G   Q   P   V   C   K   D   N   S   C   V   N   P   P   H   V   P   N   A   T   1064
                                         SCR 18
ATA CTA ACA AGG CAC AAG ACT AAA TAT CCA TCT GGT GAC AAA GTA CGT TAT GAC TGT AAT AAA  3278
 I   L   T   R   H   K   T   K   Y   P   S   G   D   K   V   R   Y   D   C   N   K   1085
                                         SCR 18
CCT TTT GAA TTA TTT TGG GGA AGT GGA AGT GAT GTG CCC AAA ACG GGA TTT TGG ACA GAA CCA  3341
 P   F   E   L   F   W   G   S   G   S   D   V   P   K   T   G   F   W   T   E   P   1106
   SCR 18    →  ←                       SCR 19
CCG AAA TGC AAA GAT TCA ACA GGG AAA TGT GGG CCT CCT CCA CCT ATT GAC AAT GGA GAC ATC  3404
 P   K   C   K   D   S   T   G   K   C   G   P   P   P   P   I   D   N   G   D   I   1127
                                         SCR 19
ACC TCC TTG TCA TTA CCA GTA TAT GCA CCA TTA TCA TCA GTT GAA TAT CAA TGC CAG AAC TAT  3467
 T   S   L   S   L   P   V   Y   A   P   L   S   S   V   E   Y   Q   C   Q   N   Y   1148
                                         SCR 19
TAT CTA CTT AAG GGA AAT AAG ATA GTA ACA TGT AGA AAT GGA AAG TGG TCT CAG CCA CCA ACC  3530
 Y   L   L   K   G   N   K   I   V   T   C   R   N   G   K   W   S   Q   P   P   T   1169
SCR 19→ ←                               SCR 20
TGC TTA CAT GCA TGT GTG ATA CCA GAA GAT ATT ATG GAA AAA CAT AAT ATA GTT CTC AGA TGG  3593
 C   L   H   A   C   V   I   P   E   D   I   M   E   K   H   N   I   V   L   R   W   1190
                                         SCR 20
AGG GAA AAT GCA AAG ATT TAT TCC CAA TCA GGG GAG AAT ATT GAA TTC ATG TGT AAA CCT GGA  3656
 R   E   N   A   K   I   Y   S   Q   S   G   E   N   I   E   F   M   C   K   P   G   1211
                                         SCR 20
TAT AGA AAA TTC AGA GGA TCA CCT CCG TTT CGT ACA AAG TGC ATT GAG GGT CAC ATC AAT TAT  3719
 Y   R   K   F   R   G   S   P   P   F   R   T   K   C   I   E   G   H   I   N   Y   1232
 SCR 20      →  ←   3' UT REGION
CCC ACT TGT GTA TAA AATCGCTATACAATTATTAGTAAACCTTATGGATGAACCTTTGTTTAGAAATGCACATGTATA  3797
 P   T   C   V   *                                                                   1236

TTACTAATACAGTTTGAATTTACATTTGAAATATTGTTTAGCTCATTTCTTCTAATAAGTATATAAACTTTTTTTATATGGTG  3880

GTTAATCAAGTAACTTTACAGACTGTTGCCACAAAGCAAGAACATTACATTCAAAACTCCTAATCCAAAATATGATATGTCCA  3963

AGGACAAACTATGTCTAAGCAAGAAAATAAATGTTAGTTCTTCAATGTCTGTTTTTATTCAGGACTTTTCAGATTTTCTTGGA  4046

TACCTTTTGTTGTAGGTTCTGATTCACAGTGAGTGGAAGACACACTGACTCTGACTTCAAATTAGTATTACTTGCCAATACAT  4129
                                                                  PA-SIGNAL
AACAACCAAACTATCATAATATCACAAATGTATACAGCTAATTACTGTGTCCTACCTTTGTATCAATAAAGAAATCTAAGAAA  4212

GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                                         4240
```

Abb. 16: Nukleotidsequenz und korrespondierende Aminosäuresequenz des Faktor H der Ratte. In der Sequenz inkl. Leadersequenz wurden die einzelnen Domänen/“Short Consensus Repeats“ (SCR) 1-20 eingetragen. Der Anfang und das Ende eines jeden SCR ist durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Eine schwarze Raute kennzeichnet jeweils eine potentielle N-Glycosylierungsstelle.

Der codierende Bereich umfasst die Sequenz zwischen dem Startcodon und dem Stopcodon. Der für den Rattenfaktor H codierende Sequenzbereich umfasst damit 3711 Nukleotide. Die 20 einzelnen /“Short Consensus Repeats“ (SCR) sind durch Pfeile eingegrenzt. Eine Raute über der betreffenden Aminosäure deutet an, dass es sich hierbei um eine potentielle N-Glykosylierungsstelle handelt. Die N-Glykosylierungsstellen werden in dem folgenden Abschnitt (3.1.3) genauer beschrieben. Das Molekulargewicht, welches nach der korrespondierenden Aminosäuresequenz der identifizierten cDNA-Sequenz berechnet wurde,

beläuft sich auf 140,3 kDa. Im Immunblot und in der Silberfärbung zeigte sich jedoch, dass der FH ein Molekulargewicht von etwa 155 kDa besitzt, was wiederum für posttranslationale Modifikationen wie z.B. Verzuckerungen an den potentiellen N-Glykosylierungsstellen oder O-Glykosylierungen spricht (siehe auch 3.9 und 3.10.1).

3.1.3 Vergleich der Faktor H Aminosäuresequenzen aus Mensch, Maus und Ratte

Durch die Verwendung des Übersetzungsprogramms TRANSLATE aus dem GCG-Softwarepaket wurde der codierende Bereich der Rattenfaktor H Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz übersetzt. Die erhaltene FH-Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des Computerprogramms PILEUP aus dem GCG-Softwarepaket mit den bereits publizierten Faktor H Aminosäuresequenzen aus der Maus (KRISTENSEN und TACK, 1986) und aus dem Menschen (RIPOCHE et al., 1988) abgeglichen, um Übereinstimmungen und Abweichungen (farblich unterlegt) darzustellen.

Zusätzlich zu dem Abgleichen der Aminosäuresequenzen mittels des PILEUP-GCG-Programms wurde über das GCG-Programm FASTA die Homologie der Rattensequenz zu der Maussequenz und zu der humanen Sequenz berechnet. Es stellte sich heraus, dass die Faktor H Nukleotidsequenz der Ratte 87,8% Homologie mit der Faktor H Sequenz der Maus und 74% Homologie mit der humanen Sequenz aufweist. Die Übereinstimmungen auf der Basis der Faktor H Aminosäuresequenzen liegen zwischen Ratte und Maus bei 81,5% und zwischen Ratte und Mensch bei 63%.

Die Übereinstimmung der N-Glykosylierungsstellen zwischen den Spezies Mensch, Maus und Ratte wurden ebenfalls untersucht. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind in der folgenden Abbildung fett und kursiv hervorgehoben.

```
             1←LEADER SEQUENCE→←                SCR1           50
FH Ratte     MRLSARIIWL ILWTVCVAED CKGPPPRENS EILSGSWSEQ LYSEGTQATY
FH Maus      MRLSARIIWL ILWTVCAAED CKGPPPRENS EILSGSWSEQ LYPEGTQATY
FH Mensch    MRLLAKIICL MLWAICVAED CNELPPRRNT EILTGSWSDQ TYPEGTQAIY

             51            SCR1              →←       SCR2     100
FH Ratte     KCRPGYRTLG TIVKVCKNGE WVPSNPSRIC RKRPCGHPGD TPFGSFRLAV
FH Maus      KCRPGYRTLG TIVKVCKNGK WVASNPSRIC RKKPCGHPGD TPFGSFRLAV
FH Mensch    KCRPGYRSLG NVIMVCRKGE WVALNPLRKC QKRPCGHPGD TPFGTFTLTG

             101                 SCR2                     →←    150
FH Ratte     GSEFEFGAKV VYTCDEGYQL LGEIDYRECD ADGWTNDIPI CEVVKCLPVT
FH Maus      GSQFEFGAKV VYTCDDGYQL LGEIDYRECG ADGWINDIPL CEVVKCLPVT
FH Mensch    GNVFEYGVKA VYTCNEGYQL LGEINYRECD TDGWTNDIPI CEVVKCLPVT
```

```
            151                 SCR3                            200
FH Ratte    ELENGRIVSG AAEPDQEYYF GQVVRFECNS GFKIEGQKEM HCSENGLWSN
FH Maus     ELENGRIVSG AAETDQEYYF GQVVRFECNS GFKIEGHKEI HCSENGLWSN
FH Mensch   APENGKIVSS AMEPDREYHF GQAVRFVCNS GYKIEGDEEM HCSDDGFWSK

            201 →←              SCR4                            250
FH Ratte    EKPQCVEISC LPPRVENGDG IYLKPVYKEN ERFQYKCKQG FVYKERGDAV
FH Maus     EKPRCVEILC TPPRVENGDG INVKPVYKEN ERYHYKCKHG YVPKERGDAV
FH Mensch   EKPKCVEISC KSPDVINGSP ISQKIIYKEN ERFQYKCNMG YEYSERGDAV

            251  SCR4   →←               SCR5                    300
FH Ratte    CTGSGWNPQP SCEEMTCLTP YIPNGIYTPH RIKHRIDDEI RYECKNGLYP
FH Maus     CTGSGWSSQP FCEEKRCSPP YILNGIYTPH RIIHRSDDEI RYECNYGFYP
FH Mensch   CTESGWRPLP SCEEKSCDNP YIPNGDYSPL RIKHRTGDEI TYQCRNGFYP

            301      SCR5        →←            SCR6            350
FH Ratte    ATRSPVSKCT ITGWIPAPRC SLKPCDFPQF KHGRLYYEES RRPYFPVPIG
FH Maus     VTGSTVSKCT PTGWIPVPRC TLKPCEFPQF KYGRLYYEES LRPNFPVSIG
FH Mensch   ATRGNTAKCT STGWIPAPRC TLKPCDYPDI KHGGLYHENM RRPYFPVAVG

            351                 SCR6            →←   SCR7     400
FH Ratte    KEYSYYCDNG FTTPSQSYWD YLRCTVNGWE PEVPCLRQCI FHYVEYGESL
FH Maus     NKYSYKCDNG FSPPSGYSWD YLRCTAQGWE PEVPCVRKCV FHYVENGDSA
FH Mensch   KYYSYYCDEH FETPSGSYWD HIHCTQDGWS PAVPCLRKCY FPYLENGYNQ

            401                 SCR7                     →←   450
FH Ratte    YWQRRYIEGQ SAKVQCHSGY SLPNGQDTIL CTENGWSPPP KCVRIKTCSV
FH Maus     YWEKVYVQGQ SLKVQCYNGY SLQNGQDTMT CTENGWSPPP KCIRIKTCSA
FH Mensch   NHGRKFVQGK SIDVACHPGY ALPKAQTTVT CMENGWSPTP RCIRVKTCSK

            451                 SCR8                            500
FH Ratte    SDIEIENGFF SESDYTYALN RKTRYRCKQG YVTNTGEISG IITCLQDGWS
FH Maus     SDIHIDNGFL SESSSIYALN RETSYRCKQG YVTNTGEISG SITCLQNGWS
FH Mensch   SSIDIENGFI SESQYTYALK EKAKYQCKLG YVTADGETSG SIRCGKDGWS

            501 →←              SCR9                            550
FH Ratte    PRPSCIKSCD MPVFENAMTK NNNTWFKLND KLDYECHIGY ENEYKHTKGS
FH Maus     PQPSCIKSCD MPVFENSITK NTRTWFKLND KLDYECLVGF ENEYKHTKGS
FH Mensch   AQPTCIKSCD IPVFMNARTK NDFTWFKLND TLDYECHDGY ESNTGSTTGS

            551   SCR9   →←              SCR10                   600
FH Ratte    ITCTYDGWSS TPSCYERECS IPLLHQDLVV FPREVKYKVG DSLSFSCRSG
FH Maus     ITCTYYGWSD TPSCYERECS VPTLDRKLVV SPRKEKYRVG DLLEFSCHSG
FH Mensch   IVCGYNGWSD LPICYERECE LPKIDVHLVP DRKKDQYKVG EVLKFSCKPG

            601    SCR10            →←       SCR11            650
FH Ratte    HR.VGADLVQ CYHFGWSPNF PTCEGQVKSC DQPLEIPNGE IKGTKKVEYS
FH Maus     HR.VGPDSVQ CYHFGWSPGF PTCKGQVASC APPLEILNGE INGAKKVEYS
FH Mensch   FTIVGPNSVQ CYHFGLSPDL PICKEQVQSC GPPPELLNGN VKEKTKEEYG

            651                 SCR11           →←   SCR12    700
FH Ratte    HGDVVEYDCK PRFLLKGPNK IQCVDGKWTT LPICVEYERT CGDLPELEHG
FH Maus     HGEVVKYDCK PRFLLKGPNK IQCVDGNWTT LPVCIEEERT CGDIPELEHG
FH Mensch   HSEVVEYYCN PRFLMKGPNK IQCVDGEWTT LPVCIVEEST CGDIPELEHG

            701                 SCR12                       →← 750
FH Ratte    SVKLSVPPYH HGDSVEFTCT ETFTMIGHAV VFCISGRWTE LPQCVATDQL
FH Maus     SAKCSVPPYH HGDSVEFICE ENFTMIGHGS VSCISGKWTQ LPKCVATDQL
FH Mensch   WAQLSSPPYY YGDSVEFNCS ESFTMIGHRS ITCIHGVWTQ LPQCVAIDKL
```

```
             751                  SCR13                          800
FH Ratte     EKCKAPKSTG IDAIHPNKNE FNHNFSVSYR CRQKQEYEHS ICINGRWDPE
FH Maus      EKCRVLKSTG IEAIKPKLTE FTHNSTMDYK CRDKQEYERS ICINGKWDPE
FH Mensch    KKCKSSNLII LEEHLKNKKE FDHNSNIRYR CRGKEGWIHT VCINGRWDPE

             801→←                SCR14                          850
FH Ratte     PNCTRNEKRF CPPPPQIPNA QVIETTVKYL DGEKVSVLCQ DGYLTQGPEE
FH Maus      PNCT..SKTS CPPPPQIPNT QVIETTVKYL DGEKLSVLCQ DNYLTQDSEE
FH Mensch    VNCSMAQIQL CPPPPQIPNS HNMTTTLNYR DGEKVSVLCQ ENYLIQEGEE

             851  SCR14    →←              SCR15                 900
FH Ratte     MVCKHGRWQS LPRCTEKIPC SQPPKIEHGS IKSPRSSEE. RDLIESSSYE
FH Maus      MVCKDGRWQS LPRCIEKIPC SQPPTIEHGS INLPRSSEER RDSIESSSHE
FH Mensch    ITCKDGRWQS IPLCVEKIPC SQPPQIEHGT INSSRSSQE. .......SYA

             901              SCR15                →←   SCR16    950
FH Ratte     HGTTFSYVCD DGFRISEENR VTCNMGKWSS LPRCVGIPCG PPPSIPLGIV
FH Maus      HGTTFSYVCD DGFRIPEENR ITCYMGKWST PPRCVGLPCG PPPSIPLGTV
FH Mensch    HGTKLSYTCE GGFRISEENE TTCYMGKWSS PPQCEGLPCK SPPEISHGVV

             951                  SCR16                    →←  1000
FH Ratte     SHELESYQYG EEVTYNCSEG FGIDGPAFIK CVGGQWSEPP KCIKTDCDNL
FH Maus      SLELESYQHG EEVTYHCSTG FGIDGPAFII CEGGKWSDPP KCIKTDCDVL
FH Mensch    AHMSDSYQYG EEVTYKCFEG FGIDGPAIAK CLGEKWSHPP SCIKTDCLSL

             1001                 SCR17                         1050
FH Ratte     PTFEIAKPTE KKKKSYRSGE QVTFRCPPPY RMDGSDIVTC VNTKWIGQPV
FH Maus      PTVKNAIIRG KSKKSYRTGE QVTFRCQSPY QMNGSDTVTC VNSRWIGQPV
FH Mensch    PSFENAIPMG EKKDVYKAGE QVTYTCATYY KMDGASNVTC INSRWTGRPT

             1051→←                   SCR18                     1100
FH Ratte     CKDNSCVNPP HVPNATILTR HKTKYPSGDK VRYDCNKPFE LFWGSGSDVP
FH Maus      CKDNSCVDPP HVPNATIVTR TKNKYLHGDR VRYECNKPLE LF.GQVEVMC
FH Mensch    CRDTSCVNPP TVQNAYIVSR QMSKYPSGER VRYQCRSPYE MF.GDEEVMC

             1101 SCR18 →←              SCR19                   1150
FH Ratte     KTGFWTEPPK CKDSTGKCGP PPPIDNGDIT SLSLPVYAPL SSVEYQCQNY
FH Maus      ENGIWTEKPK CRDSTGKCGP PPPIDNGDIT SLSLPVYEPL SSVEYQCQKY
FH Mensch    LNGNWTEPPQ CKDSTGKCGP PPPIDNGDIT SFPLSVYAPA SSVEYQCQNL

             1151       SCR19         →←          SCR20         1200
FH Ratte     YLLKGNKIVT CRNGKWSQPP TCLHACVIPE DIMEKHNIVL RWRENAKIYS
FH Maus      YLLKGKKTIT CTNGKWSEPP TCLHACVIPE NIMESHNIIL KWRHTEKIYS
FH Mensch    YQLEGNKRIT CRNGQWSEPP KCLHPCVISR EIMENYNIAL RWTAKQKLYS

             1200             SCR20                   1240
FH Ratte     QSGENIEFMC KPGYRKFRGS PPFRTKCIEG HINYPTCV~~
FH Maus      HSGEDIEFGC KYGYYKARDS PPFRTKCING TINYPTCV~~
FH Mensch    RTGESVEFVC KRGYRLSSRS HTLRTTCWDG KLEYPTCAKR
```

Abb. 17: Alignment der Aminosäuresequenzen des Faktor H aus den Spezies Ratte, Maus und Mensch. Die Aminosäuresequenzen wurden mit dem GCG-Programm PILEUP arrangiert. SCR 1-20: Short Consensus Repeats 1-20. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen wurden nach der Formel N-Xaa-S/T ausfindig gemacht und sind kursiv und durch Fettdruck hervorgehoben. Abweichungen von der Aminosäuresequenz der Ratte sind in den Spezies Maus und Mensch farblich hervorgehoben.

Die theoretische Analyse der potentiellen N-Glykosylierungsstellen (entsprechend der Sequenz N-Xaa-S/T, wobei Xaa kein Prolin sein darf), die in der obigen Abbildung kursiv

dargestellt sind, ergab fünf potentielle N-Glykosylierungspositionen für das Ratten Faktor H Protein im Gegensatz zu sieben Positionen im FH der Maus und neun im humanen FH. Die Konservierung dieser potentiellen N-Glykosylierungsstellen ist gering, denn lediglich die Position (N_{802}) im SCR 13 ist in allen drei Spezies vorhanden. Zwei Positionen (N_{774} und N_{1064}) in SCR 13 und SCR 18 sind in Ratte und Maus, jedoch nicht in der humanen Sequenz konserviert. Die restlichen Positionen sind jeweils nur in einer Spezies vorzufinden. Folglich ist das Muster und der Grad der Glykosylierung zwischen verschiedenen Spezies nicht hoch konserviert. Diese geringe Konservierung kann als Indiz dafür gelten, dass die Glykosylierung für die Funktion des FH keine oder nur eine eingeschränkte funktionelle Bedeutung hat. Ein hypothetischer Oligosaccharidanteil von 3 kDa in jeder der fünf N-Glykosylierungspositionen könnte für die Differenz, die sich aus der Voraussage des relativen Molekulargewichtes des FH nach der cDNA-Sequenz (140,3 kDa) einerseits und dem relativen Molekulargewicht nach der Laufstrecke im Immunblot (155 kDa) andererseits ergibt, stehen. Um festzustellen, ob in den ersten sieben Domänen der rekombinanten FH-Fragmente überhaupt eine Glykosylierung vorliegt, wurde immunaffinitätschromatographisch gereinigter Gesamt FH (SCR1-20) aus Rattenserum, der rekombinante, in Mammaliazellen hergestellte FH(SCR1-7) und der FH(SCR1-4), der in Insektenzellen erzeugt worden war, in der PAS-Färbung (2.20) untersucht.

3.2 Generierung von PCR-Amplifikaten für die Einklonierung des Faktor H und des Faktor I

Um die Reinheit und die Menge des mittels PCR generierten FH-Fragments (SCR1-7) zu überprüfen, wurden jeweils 3 µl und 5 µl aus den gesammelten PCR-Ansätzen auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und quantitativ gegen 10 µl aufgetragenen Lambda-Marker abgeschätzt. Zusätzlich wurde für eine genauere Größenbestimmung ein zweiter Marker (pBR322) aufgetragen. Abbildung 18 zeigt das für die Abschätzung des Faktor-H-Fragmentes aufgetragene Aliquot, welches später in den pcDNA3.1 TOPO-D-Vektor einkloniert wurde. Es sollte deutlich eine einzelne und saubere Bande zu erkennen sein. Die Größe des Amplifikates sollte 1402 Bp [Kozak-Sequenz (4 Bp), FH-Sequenz (SCR1-7) (1362 Bp), Streptag (30 Bp), 2x Stopcodon (6 Bp)] umfassen.

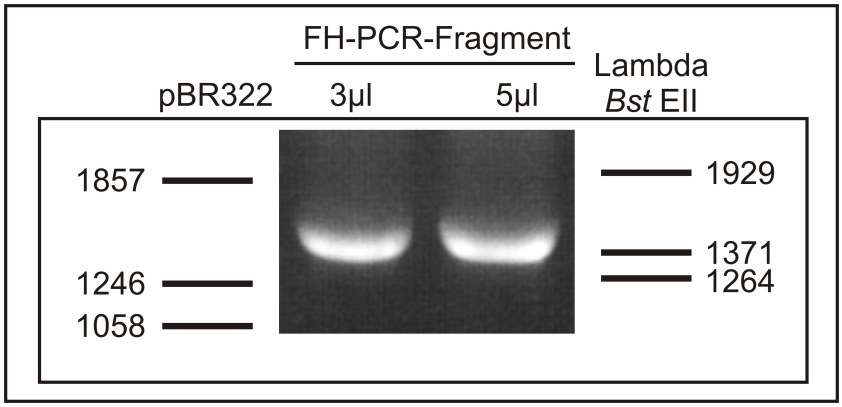


Abb. 18: Größenbestimmung der FH-TOPO-D-PCR-Fragmente im Agarosegel. Es wurden jeweils 3 µl und 5 µl des aufgereinigten Amplifikates [FH(SCR1-7)] im 0,8%igen Agarosegel zum Vergleich mit zwei Größenmarkern (pBR322 und Lambda *Bst* EII) elektrophoretisch aufgetrennt.

In Abbildung 18 erkennt man, dass die Größe des PCR-Produktes mit den erwarteten 1402 Bp übereinstimmte. Neben dem Hauptamplifikat waren keine Nebenamplifikate erkennbar, so dass dieses für die anschließende Einklonierung verwendet wurde.

Analog dem FH-PCR-Fragment wurde auch mit dem aufgereinigten FI-PCR-Fragment verfahren. Es wurden 3 µl und 5 µl des FI-spezifischen PCR-Produktes auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb.19). Als einzige Bande war die FI-Bande in der erwarteten Größe von 1822 Bp [Kozaksequenz (4 Bp), Faktor I-Sequenz (1815 Bp), ein weiteres Stopcodon (3 Bp)] zu erkennen (Abb.19). Wie beim FH-Fragment waren auch hier keine Nebenamplifikate feststellbar. Das PCR-Produkt zeigte die richtige Größe von 1822 Bp.

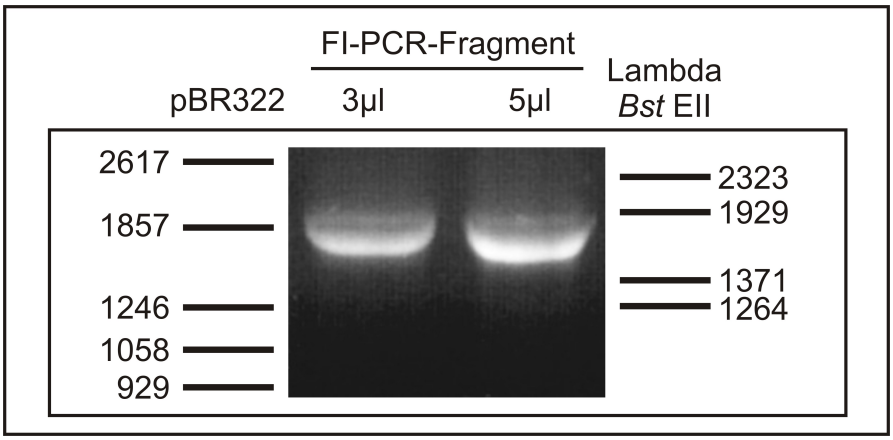


Abb. 19: Agarosegelelektrophoretische Analyse des gereinigten FI-PCR-Amplifikats. Es wurden 3 µl und 5 µl des FI-Amplifikates in einem 0,8%igen Agarosegel zum Größenvergleich mit den Markern pBR322 und Lambda *Bst* EII aufgetrennt.

3.3 Überprüfung der FH(SCR1-7)- und FI-Plasmidkonstrukte

3.3.1 Verdau der Faktor H und der Faktor I TOPO-D-Klone

Die auf den LB/Amp-Platten gewachsenen Klone wurden gepickt und in variabler Flüssigkultur (1, 5 oder 25 ml) unter selektiven Bedingungen kultiviert. Nachdem eine sichtbare Trübung des Mediums aufgetreten war, wurde ein Aliquot abgenommen und für eine PCR aufbereitet. Die Klone, die ein starkes PCR-Signal lieferten, wurden später in 50 ml-Schüttelkulturen über Nacht kultiviert, und es wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Ein Milliliter dieser Kulturen wurde aufbewahrt, um später einen neuen Ansatz animpfen zu können. Um die PCR-Ergebnisse (Amplifikatgröße) abzusichern, wurden die Plasmide einem enzymatischen Verdau unterzogen.
Das Plasmid FI-3 (Vektor pcDNA3.1-TOPO-D) wurde mit EcoR V geschnitten. Bei korrekt erfolgter Ligation, sollte ein Insert von ca. 618 Bp (bei falscher Orientierung ca. 1249 Bp) herausgeschnitten werden. Eine Schnittstelle des Enzyms lag innerhalb des einklonierten FI-Fragments an Position 1225. An Position 1225 schnitt EcoR V einmal im FI-Fragment und einmal im pcDNA3.1-Vektor innerhalb der multiplen Klonierungsstelle 24 Bp nach dem letzten Stopcodon aus der FI-Sequenz. Somit berechnete sich das herausgeschnittene Sequenzstück aus dem Rest des Faktor I-Fragmentes von Position 1225 bis zum letzten Stopcodon zu 594 Bp plus 24 Nukleotide aus dem Vektor. Die Gesamtlänge betrug demnach bei richtiger Insert-Orientierung 618 Bp.

Die FH Plasmide FH-17 und FH -25 (Vektor pcDNA3.1-TOPO-D) wurden mit BamH I geschnitten. Bei richtiger Orientierung des Inserts sollte ein Stück von 958 Bp (bei falscher Orientierung des Inserts ca. 480 Bp) ausgeschnitten werden. Die erste Schnittstelle für das BamH I Enzym lag 18 Bp vor der Einklonierungsstelle des FH-Fragments im Vektor und somit 18 Bp vor dem Startcodon des FH-Fragmentes. Die einzige Schnittstelle des BamH I Enzyms im FH-Fragment lag an Position 940 nach dem Startcodon. Somit ergab sich eine Fragmentgröße von genau 958 Bp bei richtiger Orientierung des Inserts. Wäre das Insert in der falschen Orientierung im Vektor integriert gewesen, so hätte sich eine verringerte Fragmentgröße von 18 Bp aus dem Vektor plus 462 Bp aus dem FH-Fragment (inklusive Strep-Tag) mit insgesamt 480 Nukleotiden ergeben.

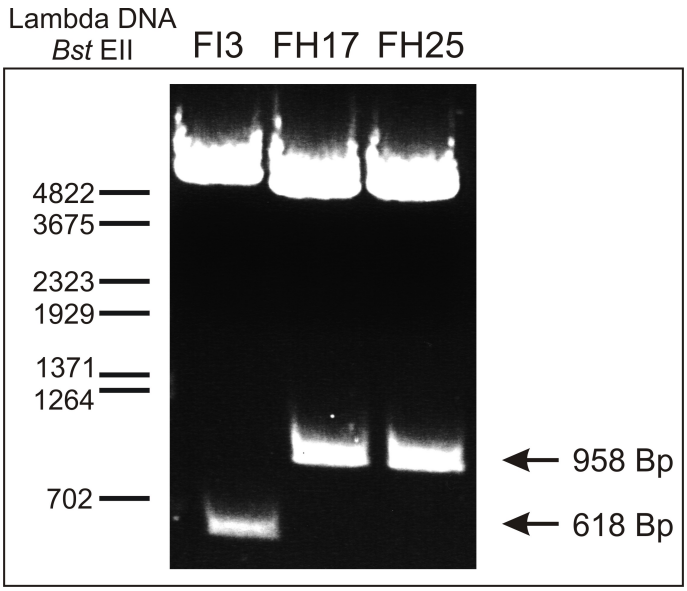


Abb. 20: Kontrolle der Restriktionsanalyse im Agarosegel. In einem 0,8%igen Agarosegel wurden jeweils 20 µl eines Restriktionsverdaus der Plasmide FI3, FH17 und FH25 gegen 10 µl Lambda-Marker aufgetragen. Die durch die Restriktionsenzyme EcoR V (FI3) und BamH I (FH17 und FH25) aus dem Vektor herausgeschnittenen Fragmente von 958 Bp und 618 Bp sind jeweils durch einen Pfeil unter Angabe der korrekten Fragmentgröße markiert.

Das durch das Enzym EcoR V im FI3-Plasmid generierte Fragment lief deutlich unterhalb der 702 Bp-Bande des Markers. Die zuvor berechnete Größe sollte 618 Nukleotide umfassen. Da im Gel neben dem Restvektor keine weitere Bande vorhanden war und die Größe des „Verdaufragments“ unterhalb der 702-Bande auf die richtige Größe hindeutete, konnte somit durch den Restriktionsverdau die richtige Insertorientierung für das FI3-Plasmid bestätigt werden. Für die beiden Faktor H-Plasmide (FH17 und FH25) war bei korrekter Orientierung des Inserts eine theoretische Größe von 958 Bp berechnet worden. Die im Gel zwischen der 1264-Markerbande und der 702-Markerbande laufende Bande aus dem Restriktionsverdau zeigte damit die richtige Größe. Da keine weiteren Banden neben dem Restvektor vorhanden waren, konnte durch die Restriktionsanalyse die richtige Orientierung der Inserts in den beiden Plasmiden bestätigt werden.

3.3.2 Verdau der pENTR-FH-Klone

Da die Gateway-Klonierung ein Zweischrittklonierungssystem ist, mussten die Klone, die aus dem ersten Klonierungsschritt hervorgegangen waren, auf die korrekte Insertion des FH-Fragments untersucht werden. Es musste gewährleistet sein, dass die aufgereinigten Plasmide, die für den zweiten Klonierungsschritt eingesetzt wurden, das 1422 Bp umfassende FH-Fragment [FH-Sequenz (1362 Bp), 2x Stopcodon (6 Bp), Kozak-Sequenz (4 Bp),

„att-sites“ (50 Bp)] in der richtigen Orientierung eingebaut hatten. Hierzu wurden die Plasmide einer Restriktionsanalyse mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente unterzogen. Das pDONR201-Plasmid umfasste ohne Insert 4470 Bp. Das Insert ersetzte im Plasmid die Positionen 111-2352, so dass der neu entstehende Vektor auch kleiner sein konnte. Der pENTR-Vektor (pDONR + FH-Fragment) umfasste 3681 Bp. Die Schnittstelle des Restriktionsenzyms Pvu I lag in der pDONR-Sequenz bei Position 2987. Die Nukleotide von Position 2987 bis zum Ende des Vektors bei Position 4470 plus die Nukleotide vom Vektorstart (d.h. auf die Position 4470 folgt die Position 1) von Position 1 bis Position 111 (Beginn der FH-Sequenz) gehörten zum herausgeschnittenen Fragment, welches aus dem Vektor stammt. Es ergab sich somit ein Vektoranteil an gesamtem herausgeschnittenen Fragment von 1594 Bp. Zu diesem Vektoranteil musste der FH-Fragmentteil, der durch BamH I herausgeschnitten worden war, hinzugezählt werden. Dieser Anteil belief sich auf 969 Bp [att-Sequenz (25 Bp), FH-Sequenz (940 Bp), Kozak-Sequenz (4 Bp)]. Letztlich ergab sich ein Fragment von 2563 Bp (FH-Anteil 969 Bp + Vektoranteil 1594 Bp), welches durch die beiden Schnittenzyme Pvu I und BamH I generiert wurde. Das zweite sich ergebende Fragment stellte den verbliebenen Rest der FH-Sequenz und des Vektors mit einer Größe von 1118 Bp dar [Vektor (gesamt) 3681 Bp – großes Fragment 2563 Bp = kleines Fragment 1118 Bp]. Somit sollten nach einem Verdau der FH-pENTR-Klone mit den Restriktionsenzymen Pvu I und Bam HI im Gel zwei Banden erkennbar sein: die obere Bande mit einer Größe von 2563 Bp und die untere Bande mit 1118 Bp.

Für den Fall, dass der Vektor kein Faktor H Fragment enthalten hätte, hätten sich zwei Banden von 2774 Bp und 1696 Bp Größe ergeben.

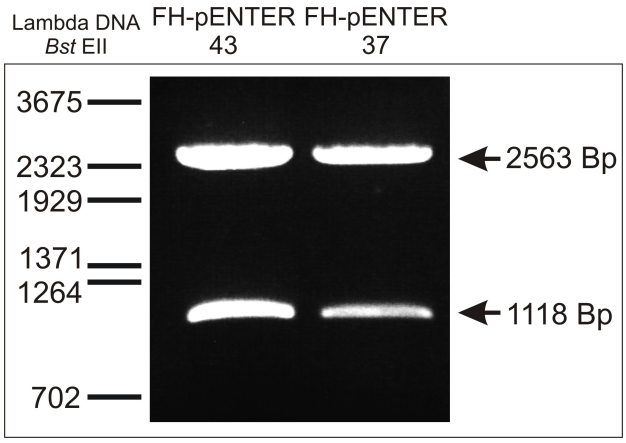


Abb. 21: Verdau der aus der „BP“-Reaktion erhaltenen FH-Klone. Die Abbildung zeigt die elektrophoretische Auftrennung von je 20 µl eines Doppelverdaus im Vergleich mit 10 µl Lambda-Marker in einem 0,8%igen Agarosegel. Zwei FH-Plasmide (FH-ENTR-Klon 43 und 37), die aus dem ersten Gateway-Reaktionsschritt, der so genannten „BP“-Reaktion hervorgegangen sind, wurden einem Doppelverdau mit den Enzymen Pvu I und BamH I für

1 h bei 37°C unterzogen, so dass jeweils zwei Fragmente von 2563 Bp und 1118 Bp entstanden.

Von den entstanden PCR-FH-positiven pENTR-Klonen wurden zwei Klone (FH-pENTR 43 und FH-pENTR 37), deren Plasmidausbeute am höchsten war, ausgewählt und einem Verdau mit Pvu I und Bam HI unterzogen. Wie in der Abbildung 21 zu sehen ist, traten die eine korrekte FH-Insertion anzeigenden Banden auf. Zu erkennen waren das große Schnittfragment mit einer Länge von 2563 Bp und das kleinere Fragment mit 1118 Bp. Die Größenabschätzung erfolgte durch den Vergleich mit dem Lambda-Marker (10 µl). Durch diesen Verdau wurde zusätzlich gewährleistet, dass Plasmide mit korrekten Inserts in Länge und Orientierung, für den nächsten Klonierungsschritt (Zielvektorklonierung) ausgewählt wurden.

3.3.3 Verdau der FH12.2-Klone

Um sicherzustellen, dass die in der PCR als FH-positiv identifizierten 12.2 Expressionsklone die Inserts in der richtigen Orientierung enthielten, wurden die über eine Midipräparation isolierten Plasmide einem Verdau mittels des Restriktionsenzyms BamH I unterzogen. Der 12.2-Expressionsvektor umfasste 7278 Nukleotide. Wurde die Einklonierungsstelle herausgenommen und gegen ein Insert ersetzt, so betrug der eigentliche Vektorteil nur noch 5573 Nukleotide. Das 1422 Bp [FH-Sequenze (1362 Bp), 2x Stopcodon (6 Bp), Kozak-Sequenz (4 Bp), „att-sites“ (50 Bp)] große FH-Insert wurde auf den Vektor aufaddiert, wodurch der finale Expressionsvektor 6995 Bp umfasste. Der Vektor sollte nach dem Verdau mit BamH I zwei Fragmente liefern. Bam HI schnitt im 12.2-Vektor an Position 5081, was bedeutete, dass diese Schnittstelle hinter dem einklonierten FH-Fragment lag. Das Stück von Position 5081 bis zum Ende des Vektors an Position 7278 ergab eine Länge von 2197 Nukleotiden. Zu diesen 2197 Bp mussten noch die Nukleotide von Position 1 des Vektors bis Position 729 im Vektor addiert werden. Für das durch den Verdau entstehende Fragment ergab sich ein Vektoranteil von 2926 Bp. Ab Position 729 begann das FH-Insert. Die Schnittstelle des BamH I-Enzyms lag im FH-Fragment bei Position 940. Zu den 940 Bp mussten noch die Kozak-Sequenz (4 Bp), sowie die „attB1-site“ (25 Bp) hinzu addiert werden. Der Anteil, der aus dem FH-Insert stammte (969 Nukleotide), musste nun noch auf den Vektoranteil aufaddiert werden. Die Gesamtgröße des großen Fragments, welches durch BamH I herausgeschnitten wurde, belief sich letztendlich auf 3895 bp. Das kleine durch den Verdau entstandene Fragment ergab sich aus der Gesamtvektorlänge von 6995 Bp abzüglich des großen Fragments (3895 Bp) und hatte somit eine Größe von exakt 3100 Bp. Im

Agarosegel sollten bei korrekter Insertorientierung zwei Banden erkennbar sein, die obere Bande mit einer Größe von 3895 Bp, die unteren Bande mit einer Größe von 3100 Bp.

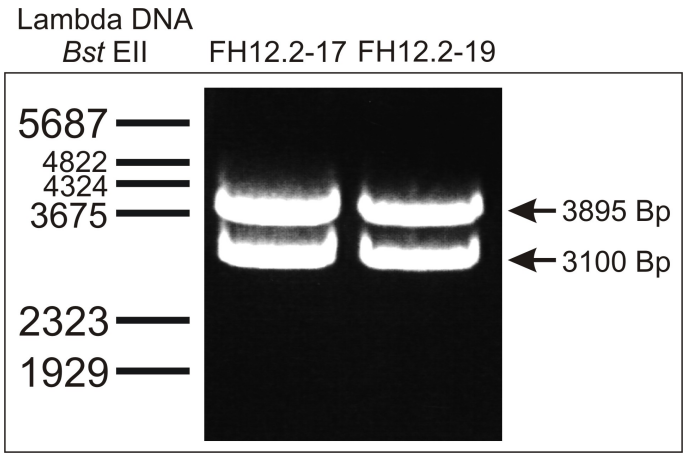


Abb. 22: Restriktionsanalyse der „Gateway" FH-Expressionsklone FH12.2-17 und FH12.2-19. Die „Gateway"-Expressionsklone FH12.2-17 und FH12.2-19 wurden einem Verdau mit BamH I für 1 h bei 37°C unterzogen. Von jedem Ansatz wurden 30 µl in einem 0,8%igen Agarosegel im Vergleich mit 10 µl Lambdamarker aufgetrennt. Anhand der Größe der Restriktionsfragmente von 3895 Bp und 3100 Bp konnte überprüft werden, dass es sich um einen Expressionsklon mit dem Insert in korrekter Länge und Orientierung handelte.

Wie die Abbildung 22 zeigt enthielten die FH12.2-17 und FH12.2-19-Plasmide das Faktor H-Fragmentes in der richtigen Orientierung. Beide Plasmide zeigten eine große Bande von 3895 Bp und eine kleinere Bande von 3100 Bp. Hätten die Vektoren kein FH-Fragment enthalten, so hätte sich ein Muster aus drei Banden ergeben, da das BamH I Enzym in einem vollständigen 12.2-Vektor drei Schnittstellen besitzt. Wäre die Sequenz zwischen den att-Sequenzen beim Klonieren nur herausgeschnitten worden und wäre der Vektor anschließend nur religiert worden, so wäre lediglich eine Bande aufgetreten. Diese Bande hätte dem durch BamH I linearisierten Vektor entsprochen.

3.4 Transfektion von Mammalia-Zellen mit den ersten sieben Domänen des Rattenfaktor H

Neben der Transfektion mit dem Expressionsvektor, der entweder das FH-Fragment (SCR1-7) oder die gesamte Faktor I-Sequenz enthielt, wurden die Zellen parallel mit einem „Green Fluorescent Protein" (GFP)-Vektor transfiziert. Die GFP-Transfektion diente als Kontrolle zur Abschätzung des Transfektionserfolgs und dem Monitoring des Zellwachstums der transfizierten Zellen unter selektiven Bedingungen. Wenn sich unter den GFP-transfizierten Zellen Klone bildeten, konnte davon ausgegangen werden, dass sich auch unter mit den

Faktoren H(SCR1-7)- oder I-transfizierten Zellen Klone durchsetzen würden und dass deren Wachstumsgeschwindigkeit in etwa mit der Wachstumsrate der GFP-Klone übereinstimmte.

3.4.1 Analyse der „Green Fluorescent Protein“ (GFP)-kontroll-transfizierten Zellen

Da die Expressionsvektoren für den Faktor I, den Faktor H und das GFP den viralen CMV-Promotor besitzen, sollte 24-48 Stunden nach der Transfektion ein Expression des Proteins stattfinden. Da die Menge des nach 24-48 Stunden in den Zellkulturüberstand sezernierten Proteins für einen Nachweis im ELISA oder im Immunblot (präzipitierter Überstand) bei weitem zu gering war, blieb nur die Überprüfung der GFP-Kontroll-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop, um den Erfolg der Transfektion abschätzen zu können.

Wenn nach 24-48 Stunden nur einige wenige Zellen im Mikroskop grün leuchteten, so konnte davon ausgegangen werden, dass auch bei den mit FH oder FI transfizierten Zellen die Transfektionsrate sehr gering war. Dies hätte zur Folge gehabt, dass die Methode für die entsprechende Zelllinie noch hätte optimiert oder gewechselt werden können.

Als weiterer Punkt bleibt zu vermerken, dass es bei nur einem geringen Transfektionsprozentsatz der Zellen erheblich länger dauerte, bis sich deutlich sichtbare Klone bildeten. Dies wiederum führte dazu, dass ein Immunblot- oder ELISA-Nachweis des entsprechenden Proteins im Überstand dieser Zellen im Vergleich zu Zellen mit einer hohen Transfektionsrate zeitlich erst stark verzögert stattfinden konnte.

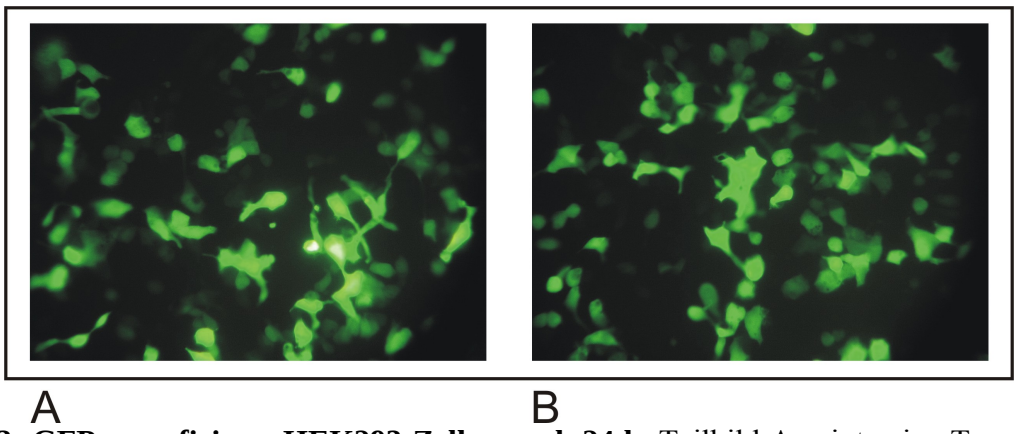


Abb. 23: GFP-transfizierte HEK293-Zellen nach 24 h. Teilbild A zeigte eine Transfektion mit dem GFP-Vektor mittels Lipofectamin 2000, Teilbild B eine weitere Transfektion mit Lipofectamin 2000. 24 h nach der Transfektion wurden die GFP-transfizierten Zellen im Fluoreszenzlicht fotografiert. Aus dem Vergleich beider Abbildungen ergibt sich die Reproduzierbarkeit dieser Methode. Vergößerung im Original 400x. Anregungswellenlänge 488 nm.

Die beiden Teilbilder A und B in Abbildung 23 sehen nahezu identisch aus, was bedeutet, dass die Transfektion der Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 sehr gut reproduzierbar ist. Die Zellen wurden in einer Dichte, wie unter Material und Methoden beschrieben, ausgesät und mit Lipofectamin 2000 und dem GFP-Vektor transfiziert. Die Zellen wurden in einem parallelen Ansatz mit dem FH(SCR1-7) transfiziert.

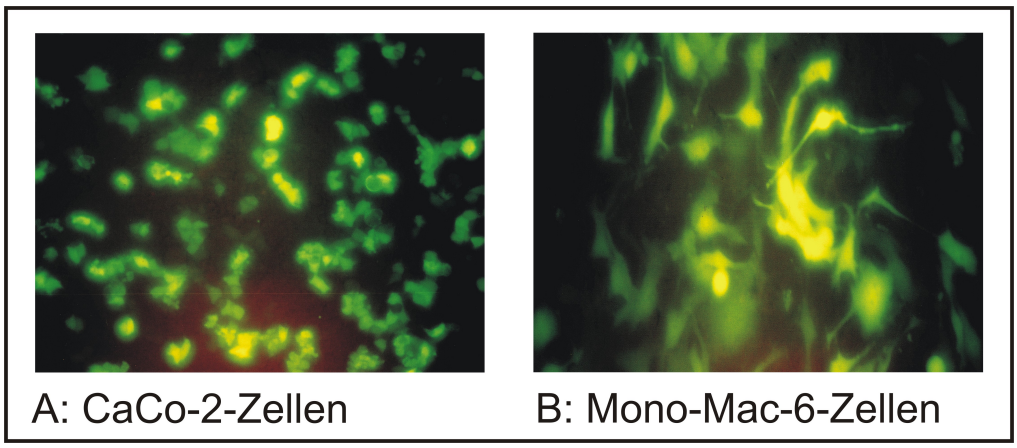


Abb. 24: Zellen der Linien CaCo-2 und Mono-Mac-6 48 h nach der GFP-Transfektion mit Lipofectamin 2000. In Teilbild A wurden CaCo-2-Zellen, in Teilbild B Mono-Mac-6-Zellen nach einer Transfektion mit dem für das GFP kodierenden Vektor pEGFP-N1 abgebildet. Alle Zellen wurden unter Fluoreszenzlicht 48 h nach der Transfektion bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm fotografiert. Vergößerung im Original 400x.

Generell ließen sich verschiedene Zelllinien mühelos transfizieren, was die obige Abbildung verdeutlicht. In beiden Teilbildern ist zu sehen, dass eine ausreichende Menge an Zellen, aus denen potentielle Klone auswachsen konnten, mit dem GFP-Vektor transfiziert worden war und das GFP-Protein exprimierte. Bedingt durch die unterschiedlichen Zelllinien und deren jeweilige Wachstumsdynamik konnte es nach der Transfektion bis zu 7 Tage dauern, ehe die ersten Klone überhaupt erkennbar waren.

Zwischen den chemischen Transfektionsagenzien existierten offensichtlich signifikante Unterschiede. Das Transfektionsreagenz mit der niedrigsten Erfolgsrate (gemessen an der GFP-Kontrolltransfektion) war „GeneJuice“ von der Firma Novagen, gefolgt von Fugene 6 der Firma Roche. Das mit Abstand effizienteste Mittel für alle verwendeten Zelllinien war Lipofectamin 2000 der Firma Invitrogen.

Die Zellkulturen die elektroporiert worden waren, zeigten ein bezüglich der Ausbeute ähnlich gutes Bild wie die mit Lipofectamin 2000 transfizierten Zellen. Sie brauchten jedoch wesentlich länger, um sich zu erholen. Die mit Calzium-Phosphat transfizierten Zellen zeigten nur eine geringe Transfektionsrate.

3.4.2 Durchmusterung der mit Faktor H(SCR1-7) transfizierten HEK293-Zellen

Nachdem sich deutlich sichtbare Klone in den Näpfen einer 24-Lochplatte gebildet hatten, wurden die Klone vereinzelt. Von den vereinzelten Klonen wurde nach konfluentem Wachstum der Zellen 500 µl Überstand (~150 µg Gesamtproteingehalt nach Lowry Assay) abgenommen, von Zellresten befreit und mit TCA präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit Aceton gewaschen, in Probenpuffer aufgenommen und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und der FH(SCR1-7) mit dem für diese Arbeit generierten polyklonalen anti-Ratten FH Kaninchen pAK und anschließend mit HRP-konjugiertem Esel-anti-Kaninchen Antikörper nachgewiesen. Alternativ wurde mit direkt Peroxydase-konjugiertem Streptactin gearbeitet, was für eine verkürzte Inkubation durch den Wegfall der Sekundärantikörperinkubation sorgte.

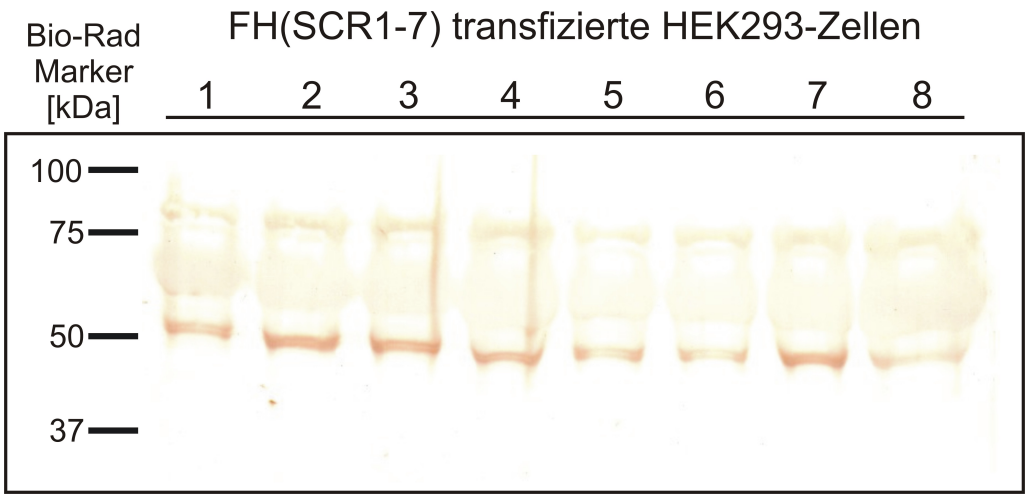


Abb. 25: Immunblot verschiedener Zellkulturüberstände von FH(SCR1-7) transfizierten HEK293-Klonen. Für den Blot wurde Gesamtprotein aus jeweils 500 µl mit TCA präzipitiertem Kulturüberstand im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend für 1 h 30 min auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der FH-Nachweis erfolgte mit einem Kaninchen-anti-FH-pAK und einem HRP-konjugiertem Esel-anti-Kaninchen pAK. Die Detektion erfolgte durch den Umsatz von gelöstem 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in Gegenwart von H_2O_2.

Im Immunblot in Abb. 25 erkennt man deutlich bei allen acht getesteten Klonen eine Bande oberhalb des 50 kDa Markers. Die Bande des FH-Fragmentes (SCR1-7), besaß ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 54 kDa. In Abhängigkeit vom Anteil des FH(SCR1-7) an der aufgetragenen Gesamtproteinmenge war in nahezu allen Bahnen eine mehr oder weniger deutliche Doppelbande im Blot zu erkennen.

Die Klone, die in dieser und einer weiteren Durchmusterung ein deutliches Faktor H Signal zeigten, wurden für die weitere Kultur ausgewählt und expandiert.

3.4.3 Aufreinigung des rekombinanten Ratten FH(SCR1-7) aus den Überständen von HEK293-Zellen mittels Strep-Tag Affinitätschromatographie

Der Zellkulturüberstand der HEK293-Zellen wurde über eine Streptactin-Säule aufgereinigt. Von den 1 ml-Elutionsfraktionen wurden jeweils 100 µl mit TCA gefällt und im SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und der darin enthaltene FH(SCR1-7) sowie der als Referenz aufgetragene immunaffinitätsgereinigte FH (1 µg) wurden mit dem pAK aus dem Kaninchen detektiert. Parallel zum Immunblot wurden aus jeder Elutionsfraktion 500 µl Volumen mit TCA präzipitiert und im SDS-Gel aufgetrennt. Im Anschluss folgt eine Färbung mit Coomassieblau.

In den aufgetragenen Elutionsfraktionen E4-E9 ist jeweils der rekombinante FH(SCR1-7) enthalten. Die Größe der FH-Banden in den Elutionsfraktionen bewegt sich im Bereich der für das Protein vorausgesagten Größe von 54 kDa. Der Gipfel der Elution befindet sich in den Fraktionen E6-E9. In den Fraktionen E6 bis E9 war zu erkennen, dass es sich bei dem eluierten FH(SCR1-7) um eine mit geringem Abstand migrierende Doppelbande handelt.

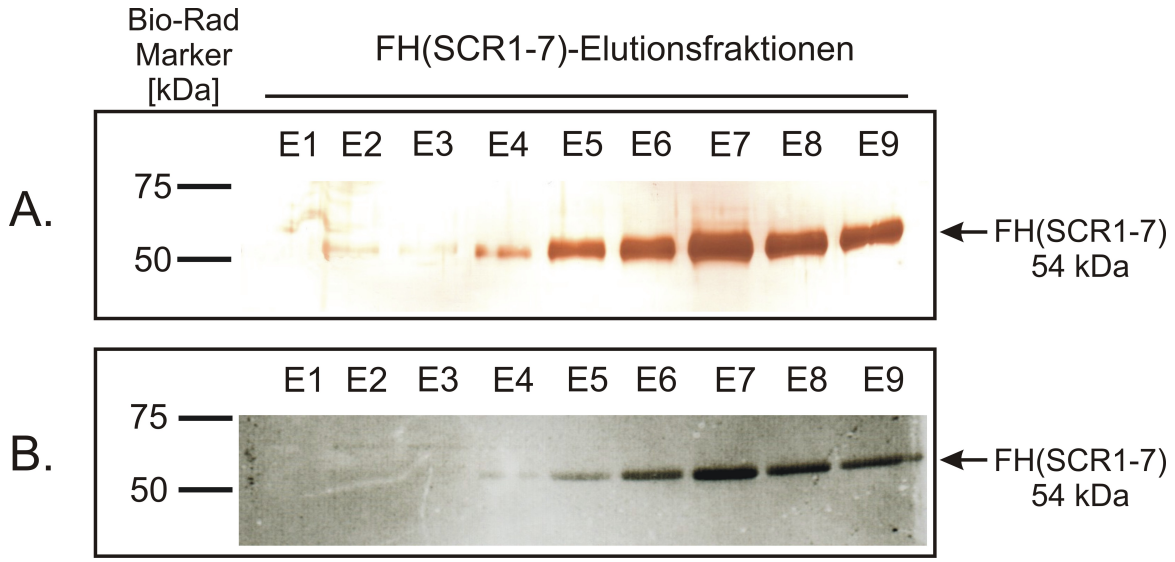


Abb. 26: Untersuchung der Elutionsfraktionen des FH(SCR1-7) aus HEK293-Kulturüberstand nach der StrepTag Immunaffinitätschromatographie im Immunblot (A) mit korrespondierender Coomassieblau-Färbung (B). Teilbild A zeigt den Immunblot der Elutionsfraktionen, von denen jeweils 100 µl mit TCA gefällt und im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden. Der FH(SCR1-7)-Nachweis erfolgte mit einem Kaninchen-anti-FH pAK, gefolgt von einem Peroxidase-konjugierten Esel-anti-

Kaninchen pAK. Teilbild B zeigt das korrespondierenden Coomassieblau-gefärbte Gel, für das jeweils 500 µl der jeweiligen Elutionsfraktion TCA gefällt wurden.

Das mit Coomassieblau gefärbte Gel zeigte, wie auch der zugehörige Immunblot, dass die Hauptelutionsfraktionen die Fraktionen E6-E9 waren. Die Elutionsfraktionen ließen keine Kontaminationen durch andere Proteine erkennen. Die Fraktionen E5-E9 wurden vereinigt und anschließend für die weiteren Anwendungen dialysiert und ankonzentriert.
Die in den Fraktionen E6-E9 in Abb.26 schwach erkennbare und in Abb. 25 deutlich zu erkennende Doppelbande könnte zum einen auf einen Molekulargewichtsunterschied durch eine nur partiell erfolgte Glykosylierung des rekombinanten Proteins, zum anderen auf eine carboxyterminale Degradierung durch Proteasen hinweisen. Die Gewissheit, ob der rekombinante FH(SCR1-7) glycosyliert ist, wurde mit Hilfe der PAS-Färbung (2.20) erlangt. Eine N-Glykosylierung war zwar aufgrund der dafür notwendigen Sequenzen N-Xaa-S/T, die in den SCR1-7 nicht vorkommt (Abb.17), unwahrscheinlich, doch lag die Vermutung nahe, dass es sich um eine nicht auf allen Molekülen vorhandene O-Glykosylierung handeln könnte. Um endgültige Gewissheit zu erlangen, ob es sich bei beiden Banden um den Faktor H handelt, wurden beide Banden separat über einen Edman-Abbau in der Abteilung Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen ansequenziert. Das Ergebnis der Ansequenzierung ist unter 3.5 beschrieben.

3.4.4 Nachweis des rekombinanten, mittels Strep-Tag-Affinitätschromatographie gereinigten FH(SCR1-7) aus den Zellkulturüberständen von HEK293- und Mono-Mac-6-Zellen

Um das HRP-konjugierte Streptactin mit dem FH(SCR1-7) zu testen, wurden 50 ml Kulturüberstand von den mit dem FH(SCR1-7)-transfizierten HEK293-Zellen und 50 ml Überstand der mit dem FH(SCR1-7) transfizierten Mono-Mac-6-Zellen für die Aufreinigung verwendet. Die Elution des an die Säulenmatrix gebundenen FH(SCR1-7)-Fragmentes erfolgte mit jeweils 10 ml Elutionspuffer. Vor der Dialyse und Einengung wurde je ein 250 µl-Aliquot der vereinigten Elutionsfraktionen mit TCA präzipitiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose (NC)-Membran geblottet. Der Nachweis des mit dem Strep-Tag versehenen FH(SCR1-7) erfolgte mit dem HRP-konjugierten Streptactin (Abb.27). Ein 1000 µl-Aliquot der vereinigten Elutionsfraktionen wurde parallel mit TCA präzipitiert und unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und Coomassieblau-gefärbt.

Von den Mono-Mac-6-Zellen konnte wie auch von den HEK293-Zellen eine ausreichende Menge an rekombinantem FH(SCR1-7) gewonnen werden, um dieses Protein im *in vitro*-CH_{50}-Test auf seine Funktionalität zu untersuchen.

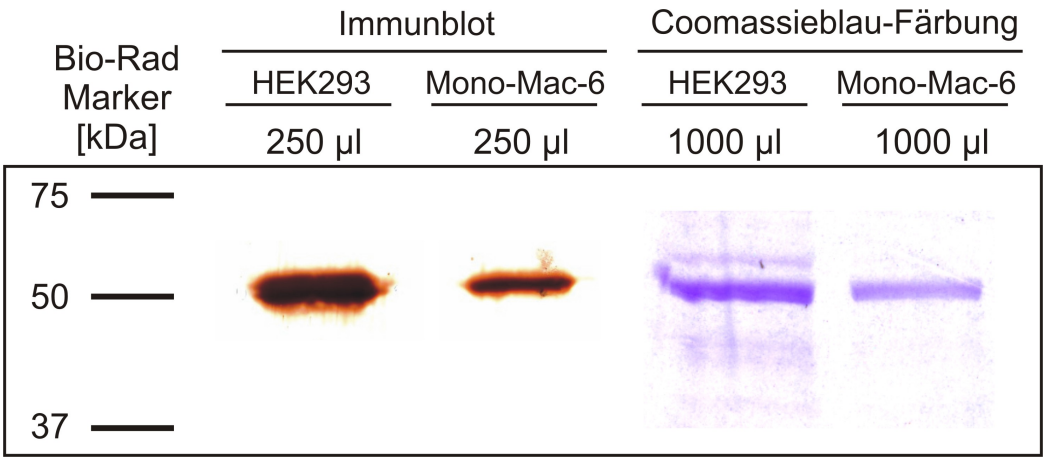


Abb. 27: Darstellung von mittels Streptactinsäulen aufgereingtem FH(SCR1-7) aus dem Zellkulturüberständen von HEK293- und Mono-Mac-6-Zellen im Immunblot und in der Coomassieblau-Färbung. Der Nachweis des FH(SCR1-7) im Immunblot erfolgte mittels Peroxidase-markiertem Streptactin.

Auch die stabil transfizierten Mono-Mac-6-Zellen enthielten in 250 µl Überstand ausreichende Mengen an FH(SCR1-7), um diesen im Immunblot zu detektieren. Im korrespondierenden Coomassieblau-gefärbten Gel, sind neben der dominanten FH(SCR1-7)-Bande aus dem Überstand von HEK293-Zellen lediglich geringfügige durch kontaminierende Proteine verursachte Banden zu erkennen, die im Immunblot keine Signale zeigen. Der aus dem Überstand von Mono-Mac-6-Zellen aufgereinigte FH(SCR1-7) war frei von Kontaminanten und somit zur Homogenität aufgereinigt.

Um zu validieren, dass es sich bei dem durch das Streptactin erkannten Protein tatsächlich um das exprimierte FH(SCR1-7)-Fragment handelte, wurden in Abb. 28 auf ein SDS-Gel in die Bahnen 1 und 3 je 1 µg aufgereinigter FH(SCR1-7) und auf den Bahnen 2 und 4 je 1 µg immunaffinitätsgereinigter FH aufgetrennt. Die Membran wurde nach dem Proteintransfer durchgeschnitten. Eine Hälfte wurde mit dem Peroxidase-konjugierten Streptactin inkubiert, welches nur den FH(SCR1-7), nicht aber den immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH erkennt, die andere Hälfte wurde mit dem polyklonalen Kaninchen anti-FH AK, auf den ein Peroxidase-konjugierter Esel- anti-Kaninchen Antikörper folgte, inkubiert.

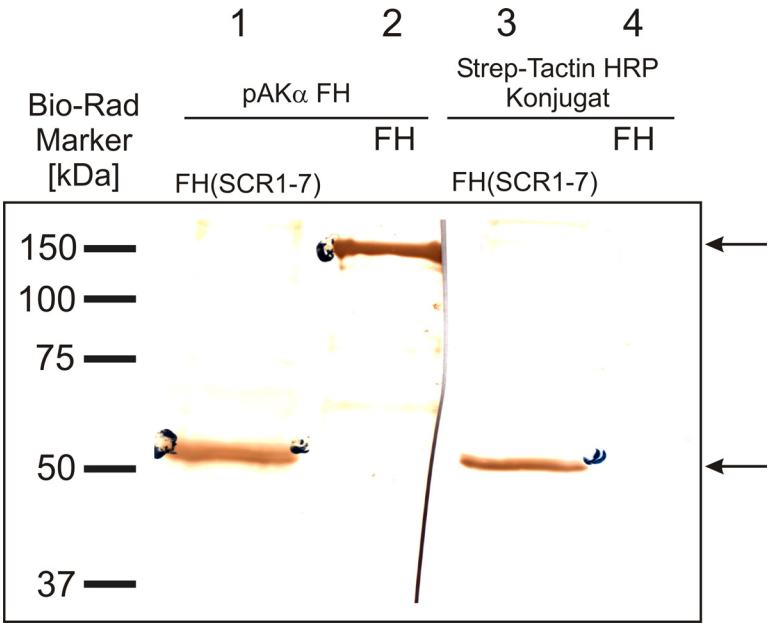


Abb. 28: Immunblot mit rekombinantem FH(SCR1-7) und immunaffinitätschromatographisch gereinigtem FH nach Detektion mit HRP-konjugiertem Strep-Tactin oder dem Kaninchen anti-FH pAK. In einem SDS-Gel wurden unter reduzierenden Bedingungen jeweils 1 µg FH(SCR1-7) (Bahn 1 und 3) oder 1 µg immunaffinitätschromatographisch gereinigter FH (Bahn 2 und 4) aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer wurde die NC-Membran durchgeschnitten, die linke Hälfte mit dem polyklonalen anti-FH pAK, die rechte Hälfte mit dem Peroxidase-konjugierten Streptactin inkubiert. Der Pfeil im Bereich von 54 kDa zeigt die Bande des FH(SCR1-7), der Pfeil auf Höhe des 150 kDa Markers deutet auf den immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH(SCR1-20) im Bereich von 155 kDa.

Es zeigte sich, dass der polyklonale Antikörper sowohl den 155 kDa großen immunaffinitätsgereinigten Gesamt-FH, als auch das FH(SCR1-7)-Fragment deutlich erkannte. Das Streptactin-HRP-Konjugat erkannte hingegen nur das mit einem Strep-Tag versehene FH(SCR1-7)-Fragment, nicht aber den immunaffinitätsgereinigten FH. Dadurch, dass der polyklonale anti-FH-Antikörper die gleiche Bande wie das HRP-konjugierte Streptactin mit einem Molekulargewicht von 54 kDa erkannte, ließ sich mit relativ großer Sicherheit ausschließen, dass es sich um ein falsch-positives Signal, dass auf einer eventuellen Kreuzreaktivität des polyklonalen Antikörpers beruhte, handelte. Darüber hinaus ließ sich auch mit großer Sicherheit ausschließen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um ein unspezifisch an die Säulenmatrix gebundenes und anschließend eluiertes Protein handelte.

3.5 N-terminale Ansequenzierung des in HEK293-Zellen rekombinant hergestellten FH(SCR1-7)

Nachdem die Identität des FH(SCR1-7) mittels des polyklonalen anti-FH Antikörpers und des HRP-markierten Streptactins validiert wurde, sollte der aufgereinigte, rekombinant hergestellte FH(SCR1-7) durch eine zusätzliche Methode, die N-terminale Proteinsequenzierung nach Edman, mit absoluter Sicherheit identifiziert werden. Ein weiterer Vorteil der Methode ist der, dass durch die Bestimmung der Proteinsequenz Rückschlüsse auf die Prozessierung des rekombinanten Proteins in der Weise gezogen werden können, dass Aufschluss über eine korrekte Entfernung der Leadersequenz vermittelt wird. Für die Ansequenzierung wurde von den HEK293-Zellen aufgereinigter, dialysierter und eingeengter FH(SCR1-7) in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran geblottet. Die sich zeigende Doppelbande war ebenfalls in der Coomassieblau-Färbung der PVDF-Membran gut sichtbar. Beide Banden dieser mit Coomassieblau gefärbten Proteindublette wurden nun der N-terminalen Sequenzierung nach Edman unterzogen.

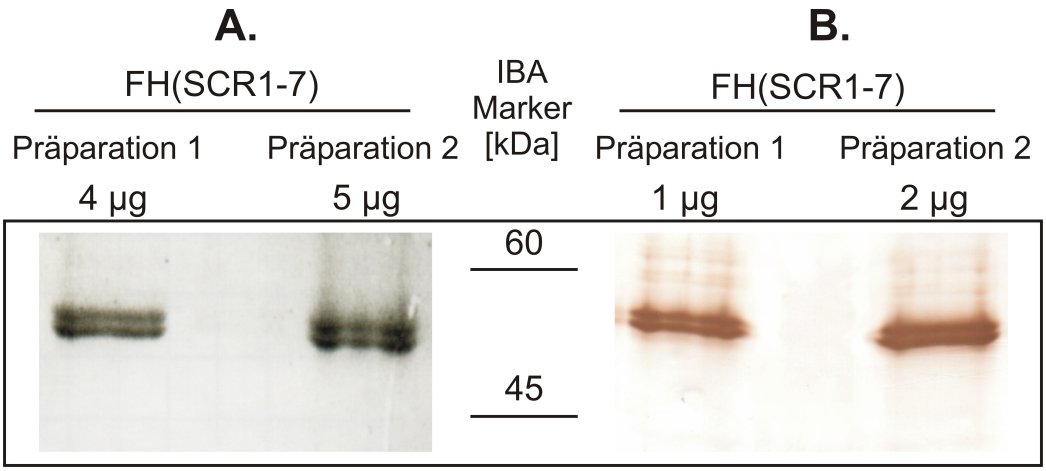


Abb. 29: Coomassieblau-Färbung und korrespondierender Immunblot der FH(SCR1-7) Präparationen, die für die Proteinansequenzierung verwendet wurden. Teilbild A. zeigt eine Coomassieblau-Färbung des für die N-terminale Ansequenzierung verwendeten FH. Teilbild B. zeigt den korrespondierenden Immunblot. Der FH(SCR1-7) wurde mit dem direkt Peroxidase-markiertem Streptactin nachgewiesen.

```
1←LEADER SEQUENCE→←                SCR1          50
MRLSARIIWL ILWTVCVAED CKGPPPRENS EILSGSWSEQ LYSEGTQATY

51            SCR1              →←       SCR2     100
KCRPGYRTLG TIVKVCKNGE WVPSNPSRIC RKRPCGHPGD TPFGSFRLAV
```

Abb. 30: Ergebnis der N-terminalen Proteinansequenzierung des FH(SCR1-7).
Die identifizierte Sequenz EDCKGPPPRENS (Fettdruck) gibt die auf die Leader-Sequenz folgenden 12 AS wieder. Es wurde auf diese Weise nachgewiesen, dass der FH(SCR1-7) unter Entfernung des Signalpeptides (Leadersequenz) korrekt prozessiert wird.

Anhand des Sequenzierergebnisses konnte eindeutig belegt werden, dass es sich bei beiden ansequenzierten Proteinbanden tatsächlich um den FH(SCR1-7), handelte. Es handelte sich bei den 12 identifizierten Aminosäureresten um die ersten 12 AS (EDCKGPPPRENS) des sezernierten FH(SCR1-7), die anhand der der cDNA-Bank entnommenen und publizierten Sequenz (DEMBERG et al. 2002, siehe auch 3.1.3) zu 100% identifiziert werden konnten.

3.6 Kultivierung der mit dem FH(SCR1-7) transfizierten HEK293-Zellen auf Suspensionskulturpartikeln (Microcarrier-Partikel)

Da für eine Benutzung der Zellkulturpartikel Cytodex und Cytopore 1 und 2 keine Erfahrungen vorlagen, wurden die Partikel in unbewegten Kulturen zunächst mit zwei Hepatomzelllinien der Ratte (FAO und H4IIE) stellvertretend für adhärente Zelllinien getestet. Weil Zellen der Linie HEK293 erfolgreich mit dem FH(SCR1-7) transfiziert worden waren, wurde ihr Wachstum auf den Zellkulturpartikeln anschließend mit einer FDA/Ethidiumbromid-Doppelfärbung über einen Zeitraum von 7 Tagen verfolgt. Alle 24 h wurde eine Probe aus den Kulturen abgenommen und unter dem Mikroskop untersucht. Die Vitalität der jeweiligen Zellen wurde durch den Vitalfarbstoff FDA angezeigt. Neben der Vitalität der Zellen wurde auch die Stabilität der Partikel beobachtet. Die Zunahme bzw. die Proliferation der Zellen wurde anhand der Parameter Vitalität und Bewuchsdichte auf den Partikeln beurteilt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Schwarz aus dem Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät Göttingen aufgenommen.

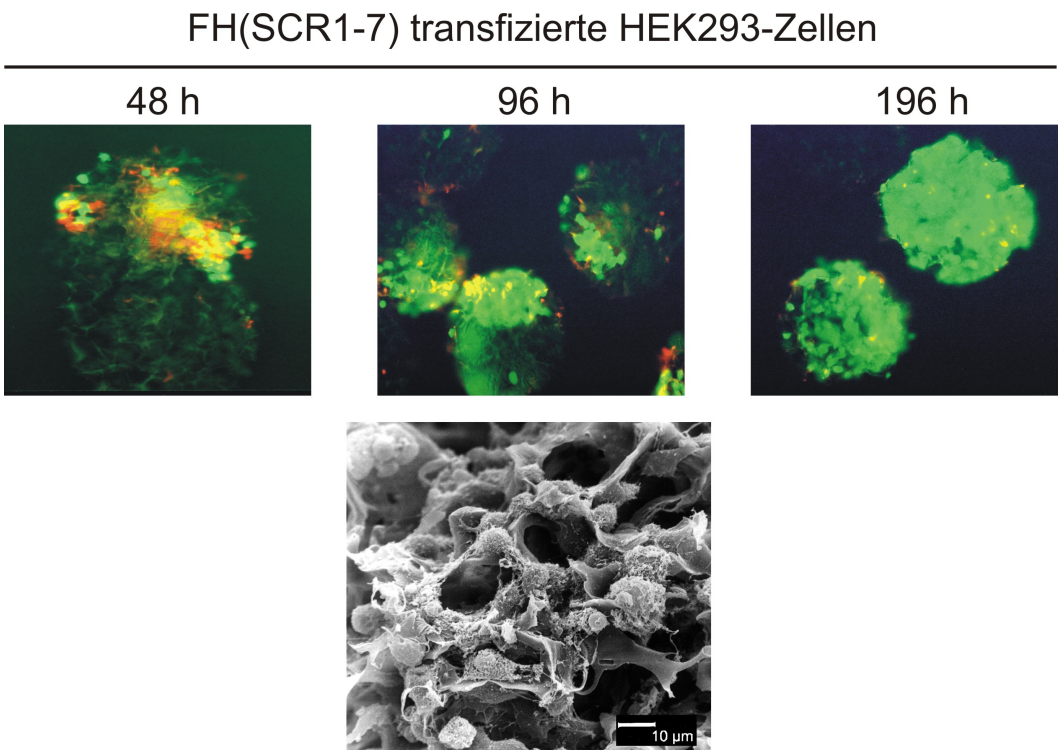


Abb. 31: Wachstumsverlauf der mit dem FH(SCR1-7) transfizierten HEK293-Zellen auf den Cytopore 2 Zellkulturpartikeln mittels FDA/Ethidiumbromid Doppelfärbung.
Oberer Abbildungsteil: Zu HEK293-Zellen wurden die Microcarrierpartikel Cytopore 2 gegeben. Nach 48 h, 96 h und 196 h wurde die Zellkultur unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Unteres Bild: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines verwendeten Cytopore 2 –Partikels nach 96 stündiger Kultivierung von HEK293-Zellen. Deutlich ist zu erkennen, dass die Zellen nicht nur die äußeren Strukturen des Partikels besiedeln, sondern auch in die Krypten eingewandert sind.

Wie man der Abb. 31 entnehmen kann, wuchsen die HEK293-Zellen sehr gut auf den Cytopore 2 Zellkulturpartikeln. Nach 48 h hatten sich bereits einige Zellen auf den Partikeln angesiedelt. Nach 96 h hatten die HEK293-Zellen die Partikel deutlich d.h. zu etwa ¼ besiedelt, und nach 196 h waren die Carrier vollständig bewachsen. Anhand der überwiegend grün aufleuchtenden Zellen ließ sich festhalten, dass die Zellen die Partikel besiedelt hatten und auf ihnen in hoher Dichte und mit großer Vitalität wuchsen. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme bestätigte noch einmal die gute Akzeptanz der Partikel durch die Zellen und zeigte, dass die Zellen in erster Linie innerhalb der Krypten wuchsen, was sie vor Scherkräften an der Oberfläche schützte.

3.7 Immunaffinitätschromatographische Aufreinigung des Faktor H aus Rattenserum

Neben der rekombinanten Herstellung des FH(SCR1-7) in HEK293- und Mono-Mac-6-Zellen und des FH(SCR1-4) mittels Baculovirussystem in SF21-Insektenzellen wurde der FH immunaffinitätschromatographisch aus dem Serum von Ratten isoliert. Dieses Ziel wurde zum einen verfolgt, um das FH-Gesamtprotein insbesondere in funktionellen Assays als Referenzmolekül im Vergleich zu den rekombinanten FH-Molekülen zu erhalten. Zum anderen diente das Gesamtprotein dazu, ein Kaninchen zu immunisieren, um später ein polyklonales Serum gegen den Ratten FH aus Serum und die rekombinanten FH-Proteine zu haben. Der monoklonale Antikörper (mAK 4-7D) wurde wie unter 2.17 beschrieben an eine Matrix gekoppelt. Der FH wurde aus dem Rattenserum wie unter 2.17 beschrieben aufgereinigt.

3.7.1 Analyse der FH-Elutionsfraktionen nach immunaffinitätschromatographischer Aufreinigung in der Silberfärbung

Die Elutionsfraktionen des immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH wurden einer Silberfärbung unterzogen. Durch eine Silberfärbung ist es möglich, Proteine im unteren dreistelligen Picogrammbereich nachzuweisen. Somit lässt sich die Reinheit eines Proteins mit erheblich weniger eingesetztem Probenvolumen als bei einer Coomassieblau-Färbung (Detektionsgrenze:~1 µg) und oft ohne vorhergehende TCA-Fällung überprüfen.

Abb. 32: Silberfärbung der FH-Elutionsfraktionen nach immunaffinitätschromatographischer Reinigung aus Rattenserum. Ein Aliquot (10 µl) aus jeder Elutionsfraktion (E1-E9) wurde entnommen und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das Gel wie unter Material und Methoden 2.21, erläutert gefärbt. Als Größenstandard

wurden 15 µl eines Proteinmarkers der Firma Bio-Rad verwendet. Der Faktor H eluierte in den Elutionsfraktionen E3-E9 mit einem Maximum in E5 und E6.

Abbildung 32 zeigte, dass der Faktor H nach der Elution von der Immunaffinitätssäule eluiert zur Homogenität aufgereinigt war. Neben der FH-Bande bei 155 kDa waren keine anderen Banden vorhanden. Die den FH enthaltenden Elutionsfraktionen waren die Fraktionen E3-E9, wobei das Maximum in die Elutionsfraktionen E5 und E6 lag. Für die weitere Verwendung wurden die Proben E4-E9 vereinigt, gegen PBS dialysiert und anschließend mittels Lowry-Assay quantifiziert.

3.8 Untersuchung des polyklonalen anti-Ratten FH Antikörpers (aus dem Kaninchen) und des monoklonalen anti-Ratten FH Antikörpers (mAK 4-7D) (aus der Maus) im Immunblot

Nachdem ein Kaninchen mit dem immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH mehrfach wie unter Material und Methoden (2.18.1) beschrieben immunisiert worden war, wurde das Serum des Tieres gewonnen. Der Titer des Serums wurde nach der zweiten Immunisierung bestimmt. Das Serum des Tieres enthielt Antikörper, die im ELISA mit dem in einer Konzentration von 10 µg/ml Festphasen-gebundenen immunaffinitäts-chromatographisch aufgereinigten FH bei einer Serumverdünnung von 1:1.024.000 noch ein Signal zeigten, was dem doppelten Plattenhintergrundwert ohne Antigen entsprach. Das Serum wurde 1:3 mit PBS verdünnt und die IgG-Antikörperfraktion mittels Protein A-Affinitätschromatographie aus dem Serum isoliert (2.18.2). Nachdem die IgG-Fraktion quantitativ vermessen (Lowry) und auf ihre Reinheit unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel mit anschließender Coomassieblau-Färbung überprüft worden war (Abb.33), wurde sie im Immunblot auf die Detektion von aufgereinigtem FH und von im Serum enthaltenem FH im Vergleich zu dem anti-FH mAK 4-7D getestet. Dazu wurden in Abbildung 34 in die Taschen eines 10%igen SDS-Gels neben dem Bio-Rad Marker 1 µl Rattenserum (Bahn 1) 1 µg FH(SCR1-20) (Bahn 2), 1 µl Rattenserum (Bahn 3) und 1 µg FH(SCR1-20) aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese nach der Ponceau S-Färbung in der Mitte getrennt. Die linke Hälfte wurde mit dem neuen polyklonalen Antikörper (Kaninchen-anti-FH pAK) inkubiert. Die rechte Hälfte wurde mit dem gegen den Ratten FH gerichteten und ebenfalls in der Abteilung Immunologie generierten monoklonalen Antikörper 4-7D inkubiert.

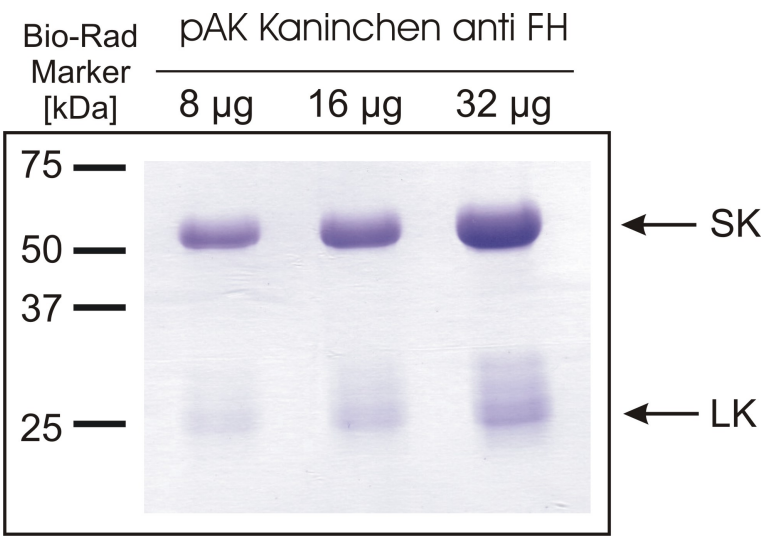


Abb. 33: Reinheitskontrolle der aus Kaninchenserum aufgereinigten IgG-Fraktion in der Coomassieblau-Färbung.
In einem 10%igen SDS-Gel wurden 8, 16 und 32 µg der isolierten IgG-Fraktion unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend Coomassieblau-gefärbt. Deutlich ist die Schwerkette (Pfeil SK) bei etwa 55 kDa und die Leichtkette (Pfeil LK) bei etwa 25 kDa zu erkennen.

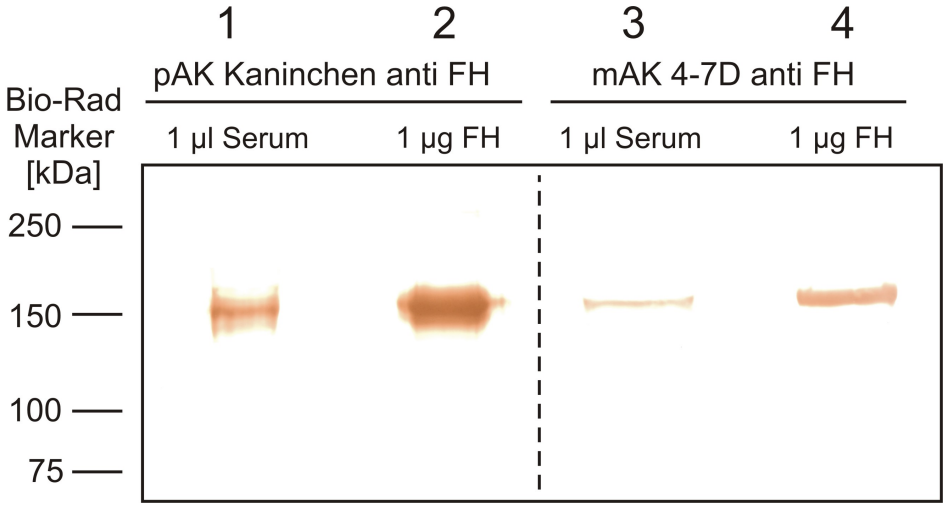


Abb. 34: Detektion des immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH und des im Serum enthaltenen FH mit dem polyklonalen AK aus dem Kaninchen (Bahn 1, 2) und dem monoklonalen mAK4-7D (Bahn 3, 4).
In den Bahnen 1 und 3 wurde jeweils 1 µl Rattenserum und in den Bahnen 2 und 4 jeweils 1 µg des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf eine NC-Membran wurde das Gel halbiert. In den Bahnen 1 und 2 erfolgte der FH-Nachweis mit dem polyklonalen anti-FH AK. In den Bahnen 3 und 4 wurde der FH mit dem monoklonalen AK (mAK 4-7D) detektiert.

Es wurde deutlich, dass sowohl das polyklonale IgG als auch der mAK 4-7D den Ratten FH in aufgereinigter Form und als Serumbestandteil gut erkennen. Der Blot zeigte auch in Bahn 2, in der das Rattenserum aufgetragen wurde, keinen Hintergrund. Das relative Molekulargewicht des aufgereinigten FH (155 kDa) entsprach dem relativen Molekulargewicht des im Serum vorhanden FH. Dies wurde als Indiz dafür verwendet, dass

das FH-Protein keinen Schaden (z.B. durch Proteolyse oder irreversible Aggregatbildung) bei der immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung genommen hatte.

3.9 Untersuchung des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH und des rekombinanten FH(SCR1-7) auf Glykosylierung mittels der PAS („Periodic Acid Schiff“)-Färbung

Nachdem potentielle N-Glykosylierungsstellen entsprechend der Sequenz N-Xaa-S/T (wobei Xaa kein Prolin sein darf) gesucht worden waren, ergab sich aus der Aminosäuresequenz, dass in den ersten acht SCR der Ratte und der Maus keine N-Glykosylierungsstellen vorhanden sind. Allerdings bestand der in HEK293- und Mono-Mac-6-Zellen exprimierte FH(SCR1-7) aus einer Doppelbande von lediglich 1-2 kDa Molekulargewichtsunterschied. Die N-terminale Ansequenzierung der Aminosäurereste brachte für beide Banden ein identisches Resultat: Identifiziert wurden die ersten 12 AS nach der Leadersequenz (siehe 3.5). Deshalb lag es nahe, dass der Molekulargewichtsunterschied auf Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation, d.h. im Glykosylierungsmuster zurückzuführen ist. Konkret wurde vermutet, dass es sich bei der oberen Bande um den glycosylierten FH(SCR1-7) und bei der unteren Bande um ihre nicht glykosylierte Variante handelte.

Um diese theoretischen Überlegung zu belegen, wurde auf ein SDS-Gel das hochglykosylierte Kontrollprotein Meerrettichperoxidase (HRP) mit eine Molekulargewicht von 47 kDa zusammen mit dem FH(SCR1-7) und dem immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH aufgetragen. Da im Gesamt-Ratten FH fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen vorhanden sind, sollte sich theoretisch eine Verzuckerung nachweisen lassen. Die Peroxidase weist einen Verzuckerungsanteil ca. 18% auf und sollte als Referenzprotein ein deutliches Signal in der PAS-Färbung ergeben. Da der FH(SCR1-7) aus den ersten sieben Domänen besteht, sollte er in theoretisch kein aus einer N-Glykosylierung resultierendes Signal zeigen. Es bestand jedoch darüber hinaus die Möglichkeit, dass der FH(SCR1-7) O-glykosyliert ist.

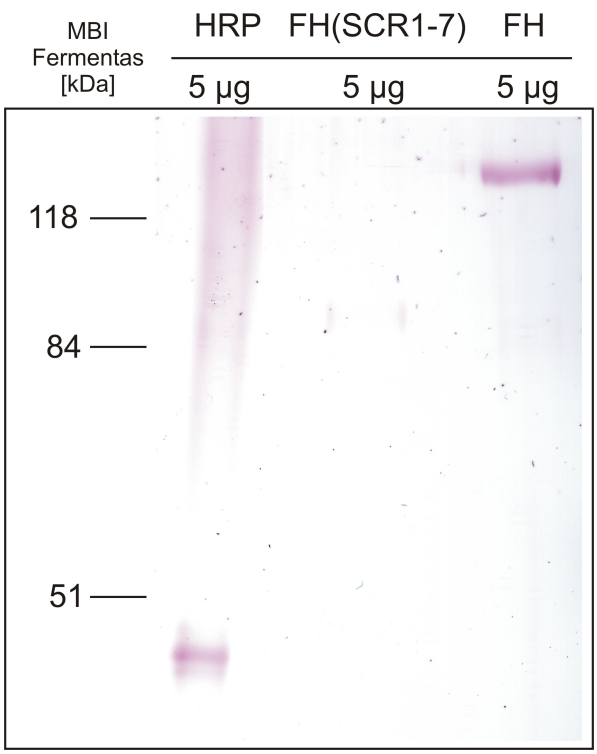


Abb. 35: PAS-Färbung des rekombinanten FH(SCR1-7) und des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH zur Analyse der Glykosylierung. In einem SDS-Gel wurden 5 µg des Kontrollproteins (Meerrettichperoxidase, M_r= 47 kDa), 5 µg FH(SCR1-7), M_r= 54 kDa und 5 µg FH (immunaffinitätschromatographisch gereinigt, M_r= 155 kDa) aufgetrennt.

Abbildung 35 zeigt, dass die Meerrettichperoxidase (47 kDa) als Kontrollprotein mit 18% Glykosylierungsanteil ein deutliches Signal lieferte. Der Gesamt-Ratten FH zeigte aufgrund seiner fünf N-Glykosylierungsstellen ebenfalls ein Signal, was beweist, dass die potentiellen fünf Glykosylierungspositionen zumindest teilweise verzuckert sind. Die 5 µg rekombinanter FH(SCR1-7) lieferten keine sichtbare Bande. Dieses Ergebnis bestätigte die nach der Primärstruktur getroffene Voraussage, dass in den ersten sieben Domänen (SCR) des Rattenfaktor H keine N-Glykosylierungsstelle vorhanden ist. Darüberhinaus konnte der Schluß gezogen werden, dass der FH(SCR1-7) auch keine O-Glykosylierung besitzt. Somit ist die auftretende Doppelbande offensichtlich auf eine C-terminale Degradation des Proteins durch Proteasen zurückzuführen, weil die N-terminale Ansequenzierung beider Banden die gleiche Aminosäuresequenz ergab und für keine der beiden Banden ein Glykosylierungsanteil nachweisbar war.

3.10 Expression der ersten vier Domänen des Ratten FH in SF21-Insektenzellen

Neben der Expression in den Mammalia-Zelllinien HEK293 und Mono-Mac-6, die durch eine geringe Ausbeute charakterisiert waren, wurde die Expression der ersten 4 Domänen des Ratten FH in SF21-Insektenzellen verfolgt. Das so genannte baculovirale Expressionssystem sollte im Gegensatz zu den Mammaliazellen höhere Ausbeuten liefern. Die Effizienz der Expression in den so genannten SF21-Zellen wurde von dem insektenzell-spezifischen Polyhedrin-Promotor bestimmt. Das Maximum der Proteinproduktion sollte nach ca. 60 h erreicht sein. Durch den Polyhedrin-Promotor kann der Anteil eines Proteins im Extremfall auf 30% des in der Zelle enthaltenen Gesamtproteins anwachsen (BacPAK™ Baculovirus Expression System User Manual). Durch die natürliche Leadersequenz, die zusätzlich in den Vektor einkloniert worden war, sollte genau wie der FH(SCR1-7) aus den HEK293-Zellen der FH(SCR1-4) aus den SF21-Zellen ausgeschleust werden. Ob die für die Ausschleusung aus Säugerzellen benötigte Leadersequenz auch die Ausschleusung eines Proteins aus den SF21-Zellen vermittelt, war zu Beginn der Experimente unbekannt. Da auch die Ausbeute nicht vorhersagbar war, wurden bei der ersten Musterung relativ große Volumina (2 ml) des jeweiligen SF21-Kulturüberstandes 52 h nach der Infektion mit TCA gefällt und im Immunblot auf die Expression des FH(SCR1-4) untersucht.

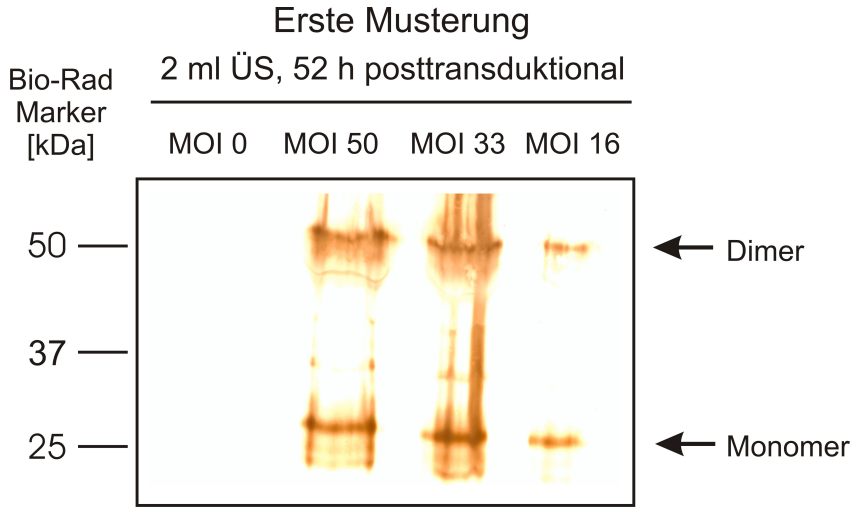


Abb. 36: Erste Musterung der transduzierten SF21-Zellen auf eine rekombinante Expression des FH(SCR1-4).
MOI:„Multiplicity of Infection“. In einem 10%igen SDS-Gel wurden je 2 ml des mit TCA präzipitierten Zellkulturüberstandes unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Nachweis des rekombinanten FH(SCR1-4) erfolgte mittels des Kaninchen anti-FH pAK.

In Abbildung 36 sind Banden im Bereich von 28 kDa (unterer Pfeil) und im Bereich von 56 kDa (oberer Pfeil) sichtbar. Beide Banden werden durch den Kaninchen anti-FH pAK

erkannt, was bedeutet, dass die untere Bande mit dem relativen Molekulargewicht von etwa 28 kDa dem FH(SCR1-4) Monomer und die Bande im Bereich von 56 kDa dem Dimer des FH(SCR1-4) entspricht. Die Dimerisierung könnte auf ein bereits in der Literatur beschriebenes Phänomen einer durch den HIS-Tag verursachte Dimerisierung zurück zu führen sein. Diese Dimerisierung kann unter Umständen zum völligen Funktionsverlust des rekombinant exprimierten Proteins führen.

Bei einer Transduktion mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 0 (Negativkontrolle ohne Infektion der SF21-Zellen) wurde weder beim ersten Durchmustern nach 52 h noch bei einer zweiten Durchmusterung (nach 72 h auf die ersten folgend) ein Signal erkennbar. Bei der ersten Durchmusterung der transduzierten Zellen ließ sich zwischen einer Infektionsrate von 33 und von 50 kein Unterschied erkennen, lediglich bei einer Infektionsrate von 16 war ein deutlich schwächeres Immunblotsignal zu verzeichnen. Ob die Dimerisierung des FH(SCR1-4) durch die weitere Aufreinigung und Lagerung noch zunahm, wurde durch einen weiteren Immunblot mit unterschiedlichen Mengen an aufgetragenem FH(SCR1-4) überprüft. Im erstmalig abgenommenen Zellkulturüberstand überwog zunächst das Monomer bzw. lag in etwa in der gleichen Menge wie das Dimer vor (Abb. 36). Bei der Aufreinigung mittels Nickel-Chelat-Chromatographie erfolgte eine starke Ankonzentrierung des Proteins, die mit einer zunehmenden Dimerisierung einherging (Abb. 37).

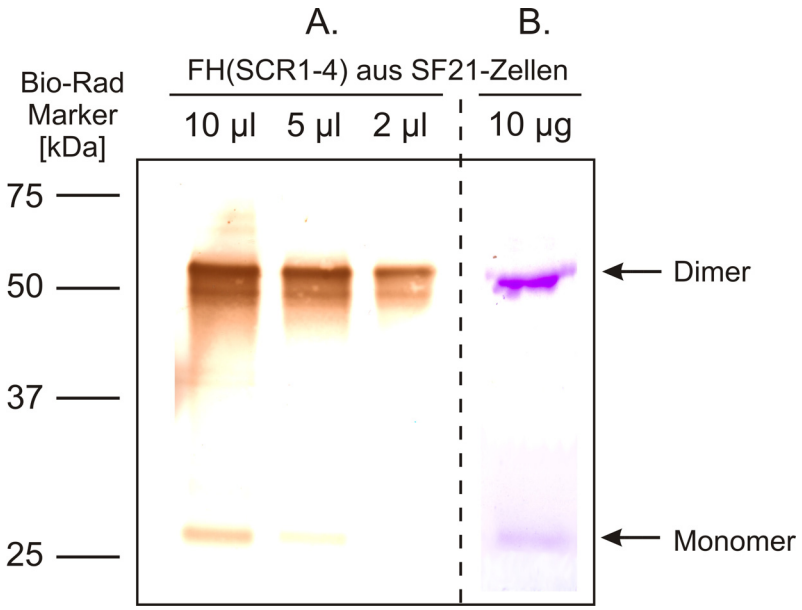


Abb. 37: Nachweis des mittels Nickel-Chelat Chromatographie aufgereinigten FH(SCR1-4) aus SF21-Zellen im Immunblot. Teilbild A: Auf ein SDS-Gel wurden 10 µl, 5 µl und 2 µl des aufgereinigten FH(SCR1-4) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem Kaninchen anti-FH pAK. Die Dominanz des Dimers (oberer Pfeil) ist deutlich zu sehen. Lediglich bei einem Auftrag von 10 µl ist das Monomer (unterer Pfeil) zu erkennen. Teilbild B: Es wurden 10 µg des aufgereinigten FH(SCR1-4) in einem 10%igen SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt

und anschließend Coomassieblau-gefärbt. Wie im Immunblot überwiegt das Dimer gegenüber dem nur schwach sichtbaren Monomer auch in der Coomassieblau-Färbung.

Wie in der Abbildung 37 deutlich zu erkennen, dominierte nach der Aufreinigung des in Insektenzellen hergestellten FH(SCR1-4) bei der Auftrennung im SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen deutlich das Dimer. Das Monomer war im Immunblot bei einem Auftrag von 10 µl gerade noch zu erkennen. Das Dimer lag selbst bei einem Auftrag von nur 2 µl noch als deutliche Bande vor. Im Coomassieblau-gefärbten Gel zeigte sich ein identisches Bild. Das Dimer mit einer Größe von etwa 56 kDa war gut zu erkennen, wohingegen das Monomer mit einem Gewicht von etwa 28 kDa nur eine schwache Bande zeigte.

3.10.1 PAS-Färbung des in SF21-Insektenzellen hergestellten Ratten FH(SCR1-4)

Da Insektenzellen im Vergleich mit Säugerzellen ein anderes Glykosylierungsmuster der in ihnen exprimierten Proteine aufweisen können, wurde der FH(SCR1-4) aus den Insektenzellen ebenfalls in der PAS-Färbung untersucht.

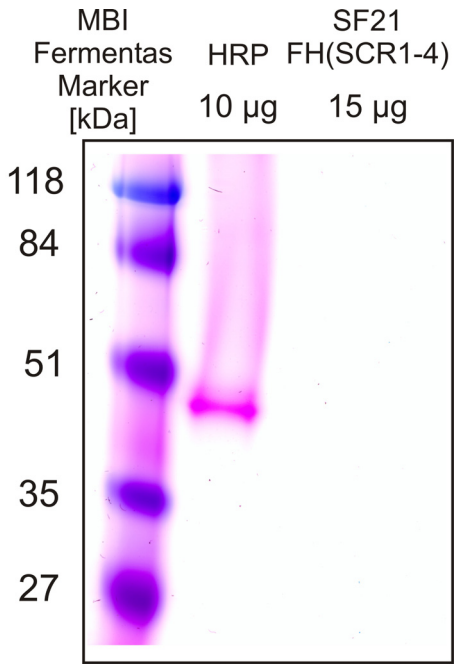


Abb. 38: PAS-Färbung des in SF21-Zellen hergestellten FH(SCR1-4) zur Detektion einer möglichen Glykosylierung. In die Taschen eines 10%igen SDS-Mingels wurden von links nach rechts 15 µl vorgefärbter Marker, 10 µg Meerrettichperoxidase (HRP) als Positivkontrolle mit einem relativen Molekulargewicht von 47 kDa und 15 µg FH(SCR1-4) aus SF21-Zellen aufgetragen. Das in den Insektenzellen erzeugte FH-Fragment (SCR1-4) zeigt keine Glykosylierung.

Analog der PAS-Färbung des FH(SCR1-7) aus den HEK293-Zellen konnte auch bei dem in Insektenzellen hergestellten FH(SCR1-4) keine Verzuckerung (weder N- noch O-Glykosylierung) festgestellt werden. Deutlich hingegen war bei der Meerrettichperoxidase als Referenzprotein eine Verzuckerung nachweisbar.

3.11 Größenvergleich des FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) jeweils unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen im Immunblot

Bei mehreren Nachweisen des FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) im Immunblot unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen fiel auf, dass in Abhängigkeit von einer Reduktion erhebliche Größendiskrepanzen zwischen dem nach der Primärstruktur berechneten und dem im Immunblot angezeigten relativen Molekulargewicht bestanden. Deshalb wurden die unter beiden Bedingungen in einem 10%igen SDS-Gel parallel aufgetragenen Proteine auf ihr relatives Molekulargewicht untersucht.

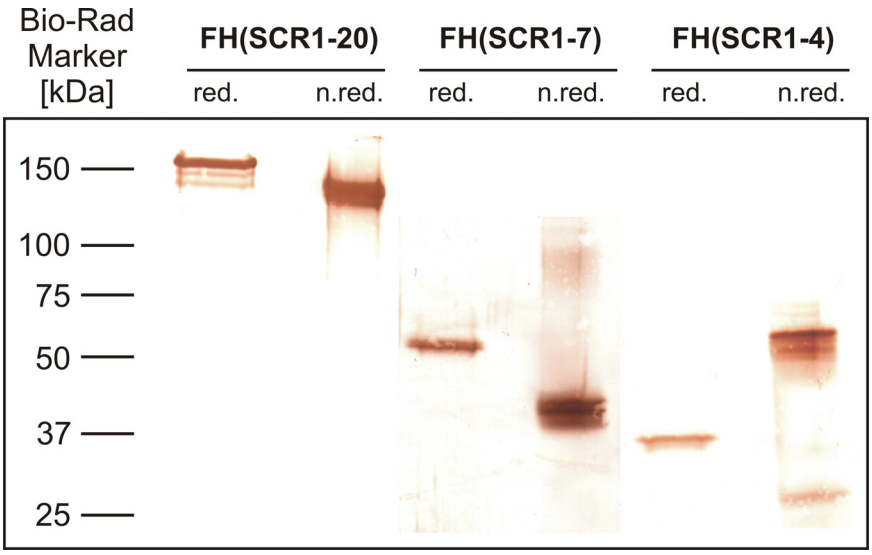


Abb. 39: Größenvergleich des FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen im Immunblot. In einem 10%igen SDS-Gel wurden parallel je 1 µg FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Die Detektion der Faktoren FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) erfolgte gemeinsam mit dem Kaninchen-anti FH pAK.

Der FH(SCR1-20) zeigte unter reduzierenden (red.) Bedingungen, das in der Literatur beschriebene rel. Molekulargewicht von ca. 155 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen hingegen wies er nur ein relatives Molekulargewicht von rund 125 kDa auf. Der Unterschied im rel. Molekulargewicht zwischen dem FH(SCR1-20) unter red. Bedingungen und unter

nicht red. Bedingungen betrug damit 30 kDa und lag so bei knapp einem Fünftel des Molekulargewichts. Beim FH(SCR1-7) zeigte sich ein ähnliches Bild wie für den FH(SCR1-20). Unter reduzierenden Bedingungen zeigte er das theoretisch erwartete relative Molekulargewicht von etwa 54 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde der FH(SCR1-7) hingegen mit einem M_r von nur 43 kDa detektiert. Die Differenz im rel. Molekulargewicht betrug 11 kDa und damit ebenfalls knapp ein Fünftel des Molekulargewichts. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte der FH(SCR1-7) eine leichte Tendenz zur Dimerisierung, wobei die Dimere ein M_r von etwa 84 kDa zeigten. Der in Insektenzellen rekombinant hergestellte FH(SCR1-4) zeigte unter nicht red. Bedingungen offensichtlich aufgrund seines HIS-Tags eine starke Tendenz zur Dimerisierung. Das Dimer mit einem relativen Molekulargewicht von ca. 56 kDa zeigte sich im Immunblot unter nicht red. Bedingungen als die dominierende Bande. Das nur schwach zu erkennende Monomer besaß eine Größe von ca. 28 kDa unter nicht reduzierenden Bedingungen bei einem berechneten Molekulargewicht von etwa 36 kDa. Dieses zeigte der FH(SCR1-4) allerdings nur unter reduzierenden Bedingungen im Immunblot. Unter reduzierenden Bedingungen war zudem die Dimerisierung auch vollständig aufgehoben. Der Molekulargewichtsunterschied des FH(SCR1-4) unter red. und nicht red. Bedingungen betrug damit etwa 8 kDa, d.h. mehr als ein Fünftel des vorhergesagten theoretischen Molekulargewichts. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass die nach der Primärstruktur berechneten Molekulargewichte im Immunblot nur erreicht wurden, wenn die FH-Fragmente und das Gesamtprotein zuvor unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt worden waren.

3.12 Immunaffinitätschromatografische Aufreinigung des Ratten Faktor I aus Serum

Wie der Ratten FH wurde auch der Ratten FI immunaffinitätschromatographisch nach der Kopplung des monoklonalen Antikörpers mAK 15F11-2 an eine Sepharosematrix (CNBr aktivierte Sepharose) aus Rattenserum herausgereinigt. Dies geschah bei der Aufreinigung des FI allerdings im so genannten „Batchverfahren“. Aus den nach der Vermessung im Photometer ausgewählten Elutionsfraktionen wurde vor der Dialyse des eluierten FI jeweils ein Aliquot entnommen und in einem SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Reinheit des FI wurde (siehe auch 3.7.1) mittels Silberfärbung dokumentiert.

3.12.1 Analyse des immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FI in der Silberfärbung

Nach jeder Aufreinigung des FI wurden von jeder Elutionsfraktion 10 µl in einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung unterzogen. Der Vorteil dieser Färbemethode ist ihre hohe Sensitivität im unteren dreistelligen Picogrammbereich. Zum Nachweis seiner Reinheit wurde deshalb immer nur ein kleiner Anteil des eluierten FI benötigt. Auch kleinste Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen des FI wurden durch die Sensitivität der Silberfärbung sichtbar gemacht.

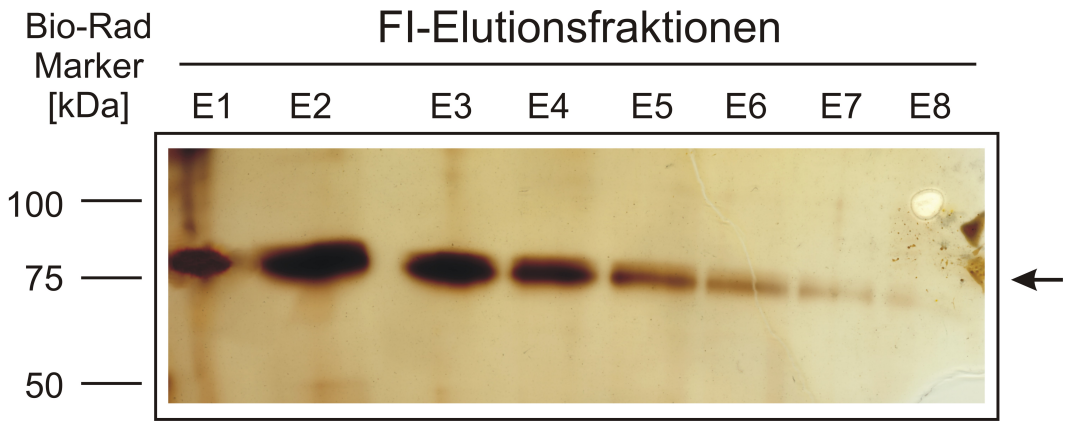


Abb. 40: Dokumentation der Reinheit des FI mittels Silberfärbung in den Elutionsfraktionen nach immunaffinitätschromatographischer Reinigung. Nach der Elution des FI von dem matrixgebundenen mAK 15F11-2 wurden je 10 µl jeder Elutionsfraktion (1,5 ml) in einem 10%igen SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend der Silberfärbung unterzogen. Die Buchstaben E1-E8 bezeichnen die einzelnen Elutionsfraktionen. Der Pfeil kennzeichnet den im Molekulargewichtsbereich von 88 kDa aufgetrennten, nicht reduzierten Ratten FI.

Abbildung 40 zeigte, dass der FI in den Fraktionen E1-E8 eluiert wird. Die Hauptfraktionen stellen die Fraktionen E1-E4 dar. In den Fraktionen E7 und E8 ist die Menge des eluierten FI schon so gering, dass sie verworfen wurden. Neben der FI Bande im Bereich von 88 kDa sind keine weiteren Banden, die auf eine Kontamination durch andere Proteine schließen lassen, vorhanden. Das bedeutet, dass auch der FI immunaffinitätschromatographisch zur Homogenität aufgereinigt wurde. Die Elutionsfraktionen E1-E6 wurden vereinigt und für die weiteren Verwendungen dialysiert und anschließend ankonzentriert.

3.12.2 Analyse des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI in der Coomassieblau-Färbung

Nachdem der Faktor I aus Rattenserum aufgereinigt worden war, wurde die FI-Präparation mit einer Centriprep-Apparatur ankonzentriert. Nach dem Ankonzentrieren wurde der FI im Lowry-Assay quantifiziert. Die Reinheit der FI-Proben und eventuell entstehende Abbruchfragmente wurden durch Auftrennung im SDS-Gel mit nachfolgender Coomassieblau-Färbung, seine Identität im Immunblot durch den Nachweis mit dem anti-Ratten FI mAK 15F11-2 untersucht.

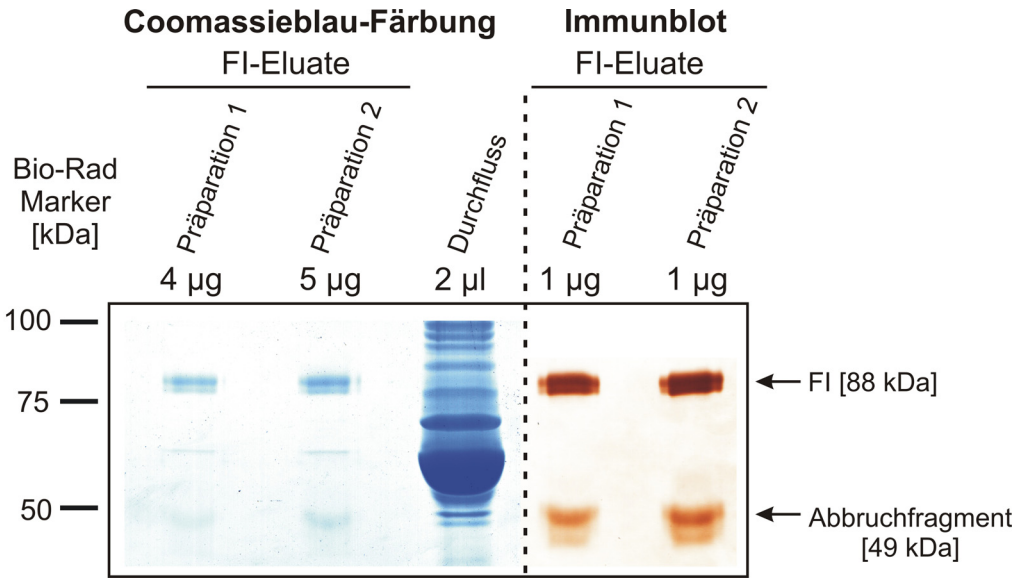


Abb.41: Coomassieblau-Färbung und Immunblot des immunaffinitäts-chromatographisch aufgereinigten und im SDS-Gel aufgetrennten FI. Nach der Lowry-Vermessung wurden aus Präparation 1 4 µg und aus Präparation 2 5 µg des eingeengten FI mit 2 µl „Durchfluss" der immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt. Der Pfeil oberhalb des 75 kDa-Markers deutet auf die Bande des ankonzentrierten FI (ca. 88 kDa). Der untere Pfeil zeigt ein Abbruchfragment von etwa 49 kDa Molekulargewicht. Sowohl das Gesamtprotein als auch das Abbruchfragment werden durch den anti-Ratten FI mAK 15F11-2 erkannt.

Abbildung 41 zeigte, dass der Faktor I zur Homogenität aufgereinigt wurde. Im Durchfluss, dem verdünnten Serum befanden sich alle Proteine außer den FI. Um nun ein Tier zu immunisieren, welches hochspezifische Antikörper gegen den Ratten FI liefern sollte, wurde die durch den Pfeil markierte saubere FI-Bande des Coomassieblau-gefärbten Gels bei 88 kDa ausgeschnitten und dem Tier als auf physiologischen pH-Wert eingestellter Acrylamidbrei appliziert. Neben der dominierenden FI-Bande war lediglich eine leichte Restkontamination durch Albumin sowie ein Abbruchfragment (49 kDa) aus der Schwerkette des FI zu erkennen. In einem parallel durchgeführten Immunblot unter nicht reduzierenden Bedingungen war nach

der Auftrennung von je 1 µg aus jeder Präparation neben dem dominierenden FI bei 88 kDa nur das Abbruchfragment der Schwerkette (49 kDa) zu erkennen. Weil das Epitop des anti-FI mAK als Schwerkettenepitop bekannt ist, musste es sich um ein Abbruchfragment der Schwerkette handeln.

3.12.3 Untersuchung des aus Rattenserum immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten FI auf Glykosylierung mittels PAS-Färbung

Um die Identität des zur Homogenität aufgereinigten FI auch hinsichtlich seiner Glykosylierung zu analysieren, wurde er vor seinem funktionellen Einsatz in der PAS-Färbung untersucht. Die Literatur gibt für den FI der Ratte sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine hohen Glykosylierungsanteil von etwa 25% des Molekulargewichtes an (SCHLAF et al., 1999). Von den potentiellen N-Glykosylierungsstellen liegen vier auf der Schwerkette und zwei auf der Leichtkette. Um die in erster Linie aus der Primärstruktur des Ratten FI abgeleiteten Literaturangaben zu bestätigen, wurde in der PAS-Färbung der aufgereinigte FI einmal unter nicht reduzierenden und einmal unter reduzierenden Bedingungen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Positivkontrolle der PAS-Färbung diente erneut die Meerrettichperoxidase (HRP) mit einem Molekulargewicht von 47 kDa. Durch die reduzierenden Bedingungen wurde die Disulfidbrücke zwischen der leichten und schweren Kette getrennt, was eine separate Untersuchung der Einzelketten auf ihre Glykosylierung ermöglichte.

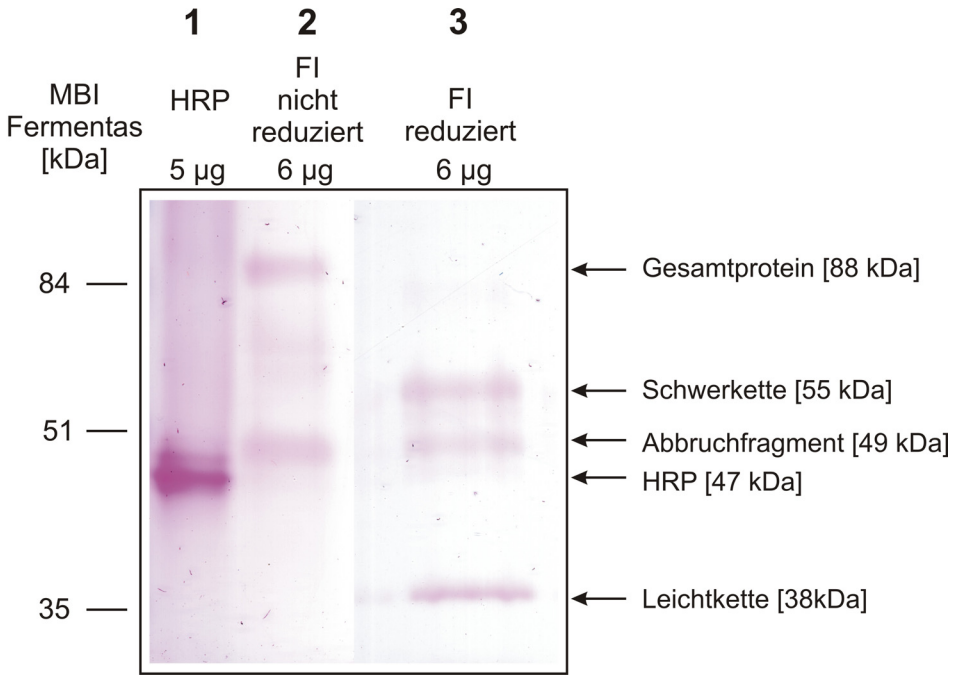


Abb. 42: Analyse des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen in der PAS-Färbung. In einem 10%igen SDS-Gel wurden 5 µg der Meerrettichperoxidase (HRP, 47 kDa), 6 µg FI unter reduzierenden und 6 µg FI unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Bahn 1 zeigt als Referenzprotein der PAS-Färbung die Meerrettichperoxidase (HRP) mit einem relativen Molekulargewicht von 47 kDa. In Bahn 2 ist der FI unter nicht reduzierenden Bedingungen mit einem M_r von etwa 88 kDa aufgetrennt. Ein Abbruchfragment der Schwerkette von FI ist auf Höhe des 49 kDa-Markers unter nicht reduzierenden (Bahn 2) und reduzierenden Bedingungen (Bahn 3) gleichermaßen zu erkennen. Auf Bahn 3 sind nach der Auftragung des FI unter reduzierenden Bedingungen deutlich die Schwer- (55 kDa) und die Leichtkette (38 kDa), sowie unterhalb der Schwerkette ihr Abbruchfragment bei etwa 49 kDa sichtbar.

Analysen des humanen FI, für den verschiedene Untersuchungen ein äußerst komplexes Glykosylierungsmuster nahelegten wurden durch diese mittels PAS-Färbung erhobenen Befunde (Abb. 42) bestätigt. Das Gesamtprotein zeigte eine etwas diffuse Bande oberhalb des 84 kDa Markers im Bereich von 88 kDa. Eine zweite Bande knapp unterhalb des 51 kDa Markers ließ sich für den Faktor I unter nicht reduzierenden als auch unter reduzierenden Bedingungen nachweisen. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich um ein Abbruchfragment der Schwerkette, da es auch durch FI-spezifische Antikörper im Immunblot erkannt wurde(3.12.2, 3.12.4). Als Ursache für die Entstehung dieses Fragmentes lassen sich z.B. eine limitierte Proteolyse im Serum oder eine Hitze-sensitive Peptidbindung anführen, die durch die Vorbereitung für das SDS-Gel zerstört wird. Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich, dass sowohl die Schwer- als auch die Leichtkette verzuckert sind. Dieser Befund deckte sich mit den in der Literatur beschriebenen vier potentielle N-Glykosylierungsstellen für die Schwerkette und zwei N-Glykosylierungstellen für die Leichtkette beim Faktor I der

Ratte (SCHLAF et al.1999). Die Frage, ob die deutliche Färbung auch auf zusätzliche O-Glykosylierungen zurückzuführen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

3.12.4 Vergleich des selbst hergestellten monoklonalen anti-FI AK 15F11-2 mit dem selbst generierten polyklonalen anti-FI Antikörper aus dem Kaninchen und dem kommerziellen polyklonalen anti-humanen FI-Antikörper (kreuzreaktiv mit dem FI der Ratte) der Firma „The Binding Site“ im Immunblot

Nachdem der FI aus dem Serum aufgereinigt worden war, wurde er im Immunblot unter nicht reduzierenden Bedingungen untersucht. Zum einen wurde der FI mit dem für seine immunaffinitätschromatographische Reinigung verwendeten Antikörper mAK 15F11-2 nachgewiesen, zum anderen fand seine Detektion mit dem polyklonalen kommerziellen anti-humanen FI Antikörper der Firma „The Binding Site“ (www.bindingsite.co.uk) und dem selbst hergestellten polyklonalen Kaninchen anti-FI Antikörper statt. Der selbst generierte polyklonale anti-FI AK wurde analog dem anti-FH pAK hergestellt und aufgereinigt. Das Tier hatte beim Titertest einen Titer von 1:512.000 gegen den Festphasen-gebundenen FI gezeigt.

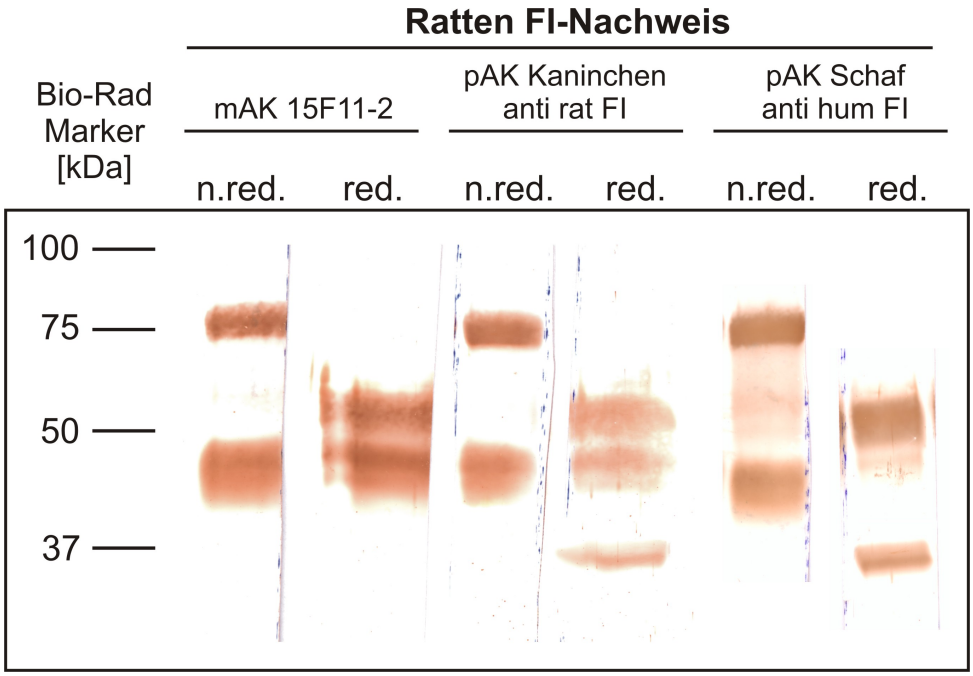


Abb. 43: Vergleich des selbst generierten mAK 15F11-2 mit dem selbst generierten polyklonalen Antikörper und dem kommerziellen polyklonalen Antikörper von „The Binding Site“ hinsichtlich der Erkennung von immunaffinitätschromatographisch gereinigtem FI unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen im Immunblot. Pro Bahn wurde je 1 µg des FI unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran durchgetrennt. Der Nachweis des FI im linken Drittel erfolgte mit dem mAK

15F11-2, in der Mitte mit dem selbst hergestellten pAK aus dem Kaninchen, im rechten Drittel mit dem polyklonalen Antikörper der Firma „The Binding Site“.

Im linken Drittel (Abb. 43) war der FI unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen aufgetrennt worden und wurde anschließend mit dem mAK 15F11-2 detektiert. Der Antikörper war gegen ein synthetisches Peptid aus der Schwerkette des Ratten FI hergestellt worden und sollte somit die Leichtkette des Ratten FI-Proteins unter reduzierenden Bedingungen nicht erkennen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wies der mAK den gesamten FI mit einem relativen Molekulargewicht von 88 kDa sowie das bereits beschriebene Abbruchfragment der Schwerkette mit einem Molekulargewicht von etwa 49 kDa nach. Unter red. Bedingungen erkannte der mAK 15F11-2 nur die Bande der FI-Schwerkette mit einem rel. Molekulargewicht von 55 kDa und erneut das Abbruchfragment.

Im mittleren Abschnitt des Immunblots (Abb. 43) erfolgte die Detektion des unter reduzierenden und nicht red. Bedingungen aufgetragenen Ratten FI mittels des selbst generierten polyklonalen anti-FH pAK. Der polyklonale anti-FH Antikörper sollte unter red. Bedingungen die Schwerkette des Ratten FI (55 kDa), das Abbruchfragment der Schwerkette (etwa 49 kDa) sowie die Leichtkette des Proteins (38 kDa) erkennen. Unter nicht red. Bedingungen sollte der gesamte FI mit einem relativen Molekulargewicht von 88 kDa und das Abbruchfragment der Schwerkette detektierbar sein. Die für die jeweiligen Bedingungen, nicht reduziert und reduziert vorhergesagten Muster wurden, wie aus Abb. 43 zu entnehmen ist, durch den polyklonalen anti-FH Antikörper erzeugt.
Im rechte Abschnitt des Immunblots wurde der FI mit dem kommerziellen Antikörper der Firma „The Binding Site“ nachgewiesen. Wie man der Abbildung 43 entnehmen kann, entsprach das erkannte Muster dem des selbst generierten pAK. Man erkennt unter nicht red. Bedingungen das gesamte FI-Protein (88 kDa) sowie das Abbruchfragment (49 kDa) und unter reduzierenden Bedingungen die Schwerkette (55 kDa), das Abbruchfragment und die Leichtkette (38 kDa) des Ratten FI.

3.13 Nachweis des für die Prozessierung des FI wichtigen „Paired-Aminoacid-Cleaving“-Enzyms (PACE)

Das PACE ist für Prozessierung des Faktor I essentiell. Es schneidet aus dem FI-Vorläuferprotein die Linker-Sequenz (RRKR) heraus und generiert damit die aktive zweikettige Serinprotease FI.

3.13.1 Untersuchung unterschiedlicher Zelllinien auf die Expression des PACE mittels RT-PCR

Die Auswahl der PACE-Primer war so erfolgt, dass sie cDNA der Spezies Mensch und Ratte amplifizieren konnten. Da aber auch Zelllinien aus anderen Spezies wie z.B. Affe oder Hamster als potentielle Zelllinien für die Expression des Komplementfaktors I zur Diskussion standen, war nicht klar, ob sie ebenfalls aus diesen Spezies PACE-spezifische cDNA amplifizierten. Allerdings ergaben auch cDNA-Präparationen aus Zellen der Spezies Affe und Hamster ebenso wie die Präparationen aus Mensch und Ratte ein Amplifikat von etwa 863 Bp Größe, an dessen PACE-Spezifität durch verschiedenen Identifizierungssequenzierungen kein Zweifel bestand. Aus Zelllinien der Spezies Mensch, Ratte und Hamster wurde mindestens ein PACE-Amplifikat ansequenziert. Alle verfügbaren und für die Expression des FI zunächst in Frage kommenden Zelllinien wurden für die PCR-Untersuchung zur Identifizierung des PACE herangezogen. Abb. 43 zeigt die auf die Expression des PACE untersuchten Zelllinien.

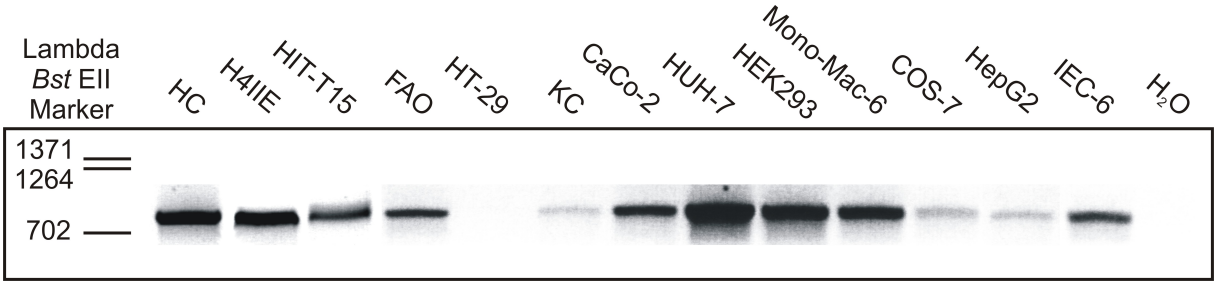


Abb. 44: Identifizierung PACE-spezifischer mRNA mittels RT-PCR verschiedener Zelllinien. Das PACE-spezifische Amplifikat umfasste 863 Basenpaare.

Abbildung 44 zeigte, dass alle getesteten Zelllinien bis auf die Zelllinie HT29 ein deutliches PACE-spezifisches Amplifikat lieferten. Zur Kontrolle wurde auch cDNA primär kultivierter Rattenhepatozyten (HC) amplifiziert, denn diese Zellen stellen die Hauptsynthesequelle des für seine korrekte Prozessierung auf das PACE angewiesenen FI dar. HepG2- und COS-7-

Zellen zeigten in mehreren Versuchen eine gerade noch erkennbare Bande auf der Höhe von 863 Bp. Dies war interessant, weil von der Hepatomzelllinie HepG2 bekannt ist, dass sie nicht in der Lage ist, 80% des von ihr sezernierten FI richtig d.h. zweikettig zu prozessieren (GOLDBERGER et al., 1984). Aufgrund dieser schwachen Amplifikation PACE-spezifischer cDNA ließ sich mutmaßen, dass offenbar das als Protein vorhandene PACE nicht ausreicht. Die nur schwache PACE-Amplifikate hervorbringenden Zelllinien HepG2 und COS-7 schieden deshalb für die Transfektion mit dem FI-Gen aus. Die ebenfalls kaum nachweisbare mRNA-Expression in primär kultivierten Rattenkupfferzellen (KC) wurde durch Untersuchungen bestätigt, deren Ergebnis es war, dass Kupfferzellen keinen FI produzieren (SCHLAF et al. 2001). Es liegt nahe, dass die hier nachgewiesene minimale Basisexpression des PACE auf präparative Kontaminationen durch Nicht-Kupfferzellen (<2%) zurückzuführen ist.

3.13.2 Nukleotidsequenzierung des PACE-Amplifikates zu seiner Identifizierung

Um festzustellen, ob es sich bei dem in der PCR auftretenden Amplifikat wirklich um einen Teil der PACE-Sequenz handelte, wurden unabhängig voneinander erzeugte Amplifikate isoliert und ansequenziert. Von den humanen HEK293-Zellen, den H4IIE-Hepatomzellen aus der Ratte und den HIT-T15-Zellen aus dem Hamster wurden PACE-spezifische Amplifikate generiert und für ihre Ansequenzierung aus einem Agarosegel isoliert, so dass das PACE der drei Spezies Mensch, Ratte und Hamster nachgewiesen werden konnte.

```
Mensch (HEK293):  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..C AGG AGC CCA
Ratte (H4IIE):    CCA AGC AAA GGG CCA AGA GGG ACG TGT ATC AGG AGC CCA
Hamster (HIT-T15):... ... ... GGA CCA AGC GGG ACG TGT ATC AGG AGC CCA

Mensch (HEK293):  CAG ACC CCA AGT TTC CTC AGC AGT GGT ACC TGT CTG GTG
Ratte (H4IIE):    CAG ACC CCA AGT TCC CTC AGC AGT GGT ACC TGT CTG GGG
Hamster (HIT-T15):CAG ACC CCA AGT TTC CCC AGC AGT GGT ACC TGT CTG GTG

Mensch (HEK293): TCA CTC AGC GGG ACC TGA ATG TGA AGG CGG CCT GGG CGC
Ratte (H4IIE):   TCA CTC AGC GAG ACC TGA ATG TGA AGG AAG CCT GGG CCC
Hamster(HIT-T15):TCA CTC AGC GAG ACC TGA ATG TGA AGG AAG CCT GGG CCC

Mensch (HEK293): AGG GCT ACA CAG GGC ACG GCA TTG TGG TCT ... ... ...
Ratte (H4IIE):   AGG GCT TCA CAG GGC GTG GCA TTG TGG TCT CCA TCC TGG
Hamster(HIT-T15):AGG GCT TCA CAG GTC ACG GCA TTG TGG TCT CCA TCC TGG

Mensch (HEK293): ... ... ... ... ... ...
Ratte (H4IIE):   ATG ACG G.. ... ... ...
Hamster(HIT-T15):ACG ACG GCA TTG AGA AGA
```

Abb. 45: Ansequenzierung der PACE-spezifischen Amplifikate aus H4IIE-Hepatomzellen der Ratte, HIT-T15-Zellen aus dem Hamster und den HEK293-Zellen aus dem Menschen.

Die in der Abbildung 45 dargestellten Sequenzen wurden mit der aus der NCBI-Nukleotiddatenbank entnommen Sequenz des humanen PACE (ROEBROEK et al., 1986), des PACE aus der Ratte (MISUMI et al., 1990) und aus dem Hamster (SPENCE et al., 1995) verglichen.

Die aus der Ratte identifizierte, 163 Nukleotide umfassende Teilsequenz entsprach den Positionen 744 bis 907 der PACE-Ratten-cDNA-Sequenz (NCBI-Nr.: X55660). Die 118 Bp lange Teilsequenz aus dem Amplifikat der HEK293-Zellen konnte in der humanen PACE-cDNA-Sequenz als Teilstück zwischen den Positionen 546 und 664 (NCBI-Nr.: NM002569) identifiziert werden. Aus dem Hamster (HIT-T15-Zellen Amplifikat) konnte ein 165

Nukleotide umfassendes Stück sequenziert und als PACE-cDNA-Sequenz zwischen den Positionen 334 und 499 (NCBI-Nr.: U20436) identifiziert werden.

3.14 Nachweis von PACE-Aktivität bei der Prozessierung des FI mittels präzipitierter Zellkulturüberstände im Immunblot

Um herauszufinden, ob aus einem schwachen PACE-Amplifikat in der PCR auch eine verminderte oder veränderte FI-Protein Expression in Hepatomzellen resultiert, wurde folgender Immunblot durchgeführt. Von H4IIE-, FAO- und HepG2-Zellen wurde jeweils 1 ml Zellkulturüberstand mit TCA präzipitiert und in einem 10%igen SDS-Gel einmal unter nicht reduzierenden und einmal unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Bei den Rattenhepatomzelllinien H4IIE und FAO und der humanen Hepatomzelllinie HepG2 handelt es sich um Zellen, die den FI konstitutiv sezernieren. Der Nachweis des FI im Immunblot erfolgte mit dem selbst generierten polyklonalen Kaninchen anti-FI pAK.

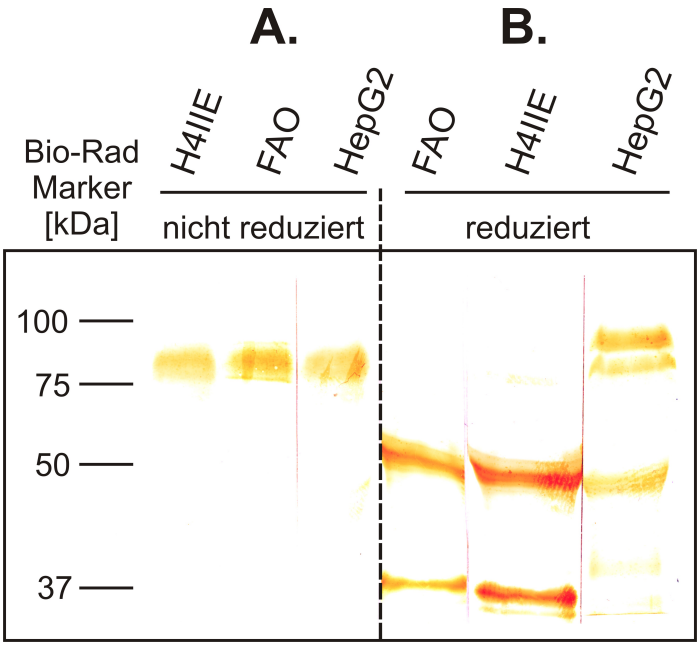


Abb. 46: Untersuchung der FI Prozessierung durch das PACE in den Zellkulturüberständen von FAO-, H4IIE- und HepG2-Zellen im Immunblot. In Teilbild A wurden in einem 10%igen SDS-Gel je 1 ml TCA-präzipitierter Zellkulturüberstand von H4IIE-, FAO- und HepG2-Zellen unter nicht reduzierenden Bedingungen, in Teilbild B je 1 ml des TCA-präzipitierten Zellkulturüberstandes unter red. Bedingungen aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchen anti-FI Antikörper.

Abbildung 46 zeigt deutlich, dass unter nicht reduzierenden Bedingungen (Teilbild A) in allen drei Hepatomzelllinien eine Bande auf Höhe des Faktor I-Gesamtproteins (88 kDa) detektierbar war. Unter reduzierenden Bedingungen d.h. nach der Reduktion der beide Ketten verbindenden Disulfidbrücke zeigte sich, ob die Prozessierung des FI durch das PACE korrekt erfolgt war. Bei den FAO- und H4IIE-Zellen war durch die Reduktion der intramolekularen

Schwefelbrücke der FI in seine zwei Ketten zerfallen (Teilbild B), d.h. beide Ketten (die Schwerkette mit einem rel. Molekulargewicht von 55 kDa und die Leichtkette mit einem rel. Molekulargewicht von 38 kDa) konnten durch den polyklonalen Antikörper separat detektiert werden. Bei den HepG2-Zellen zeigt sich ein anderes Bild: Auffällig war, dass trotz reduzierender Bedingungen eine deutliche Bande auf Höhe des FI-Gesamtproteins auch unter nicht reduzierenden Bedingungen (88 kDa) durch den polyklonalen Antikörper erkannt wurde. Daraus musste geschlossen werden, dass der in den Überstand sezernierte FI vor seiner Sezernierung durch die Entfernung der Linker-Sequenz (RRKR) nicht korrekt prozessiert wurde. In überwiegender Menge (~70%) wurde er auch unter reduzierenden Bedingungen als einkettiges Vorläuferprotein detektiert, weil offensichtlich die Linkersequenz RRKR zwischen den beiden FI-Ketten durch das PACE nicht herausgeschnitten wurde. Da die HepG2-Zellen in der PACE-PCR ein sehr schwaches Amplifikat lieferten, lag die Vermutung nahe, dass das vorhandene PACE in seiner von den HepG2-Zellen synthetisierten Menge nicht ausreicht, um den FI in seiner Gesamtheit richtig zu prozessieren.

3.15 Etablierung eines Sandwich-ELISA zur Quantifizierung des Faktor H der Ratte

Für die Quantifizierung des Ratten FH aus Serum oder aus Zellkulturüberständen wurde ein Sandwich-ELISA entwickelt. Hierzu wurde der neu hergestellte monoklonale Antikörper mAK 4-7D als Fangantikörper eingesetzt. Als Detektionsantikörper wurde die polyklonale anti-FH IgG-Fraktion aus Kaninchenserum verwendet. Zur Reduktion des Messhintergrundes wurde dieser polyklonale Detektionsantikörper mit Normalserum (Maus) 1:100 präabsorbiert. Durch die Bindung eines Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen Sekundärantikörpers wurde die spätere Farbreaktion ausgelöst. Der ELISA wurde mit immunaffinitätschromatographisch gereinigtem Rattenfaktor H geeicht, dessen Homogenität mittels Silberfärbung überprüft worden war. Der lineare Messbereich der Kalibrierkurve (halblogarithmische Skalierung) lag zwischen 1 und 20 ng/ml.

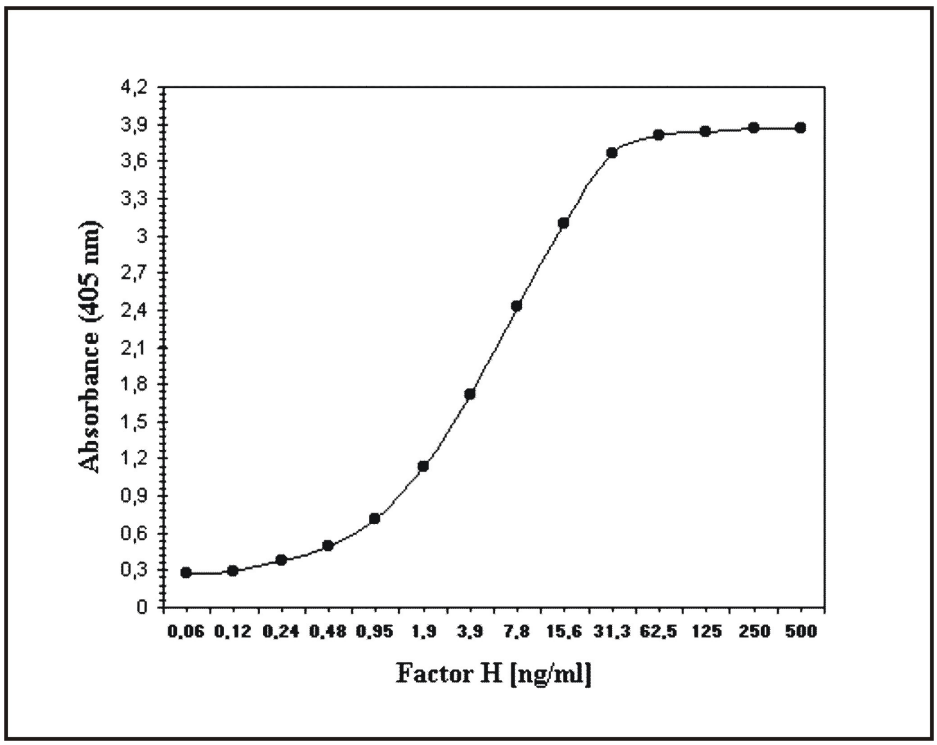


Abb. 47: Eichkurve des Ratten FH-Sandwich ELISA

Das Detektionslimit des ELISA lag bei 500 pg/ml, was dem doppelten Plattenhintergrundwert ohne aufgetragenes Antigen entsprach. Die „Within-Day"-Variationskoeffizienten lagen bei 1,9% für hohe Werte (16 ng/ml) und bei 4,9% für niedrige Werte (2 ng/ml). Die „Day-to-Day"-Variationskoeffizienten lagen bei 4,5% für hohe Werte (16 ng/ml) und bei 11,5% für niedrige Werte (2 ng/ml). Durch diese niedrigen Variationsparameter für „Within-Day"-Anwendungen und „Day-to-Day"-Anwendungen zeigte sich der etablierte ELISA als zuverlässiges Werkzeug für die Quantifizierung des Ratten FH in Rattenserum und in Zellkulturüberständen. Um den durchschnittlichen Serumspiegel des FH in Ratten zu bestimmen, wurden jeweils sechs Ratten der Stämme Lou und Lewis im Alter von 6-18 Monaten getötet und das Blut durch Herzpunktion gewonnen. Das Blut wurde über Nacht in den Serummonovetten bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Seren im ELISA vermessen. Eine Quantifizierung des FH in Rattenserum ergab, dass die Serumkonzentration bei etwa 238±21 µg/ml (Mittelwert±Standardabweichung), wobei der Altersunterschied der Tiere in dieser Größenordnung offensichtlich keine Rolle spielte.

3.16 Einsatz der Komplement-inhibitorischen Faktoren im Komplement Hämolyse Test (CH_{50}) des klassischen Weges

Bei dem CH_{50}-Test handelt es sich um einen Verfahren, dessen Werte von mehreren Faktoren abhängig sind und der in Abhängigkeit von diesen Variablen bei jedem Versuch neu austitriert werden muss. Die Variablen sind zum einen die mit Antikörpern beladenen Erythrozyten, zum anderen die verwendeten individuellen Seren. Um einen repräsentativen Ausgangswert für die Inhibitionsversuche zu haben, wurden mehrere Chargen Rattenserum ausgetestet. Darüber hinaus wurde immer ein Kontrollwert mit humanem Serum aus dem diagnostischen Labor der Abteilung erhoben. Trotzdem kam es vor, dass ein Serum, welches im einen Test eine halbmaximale Lyse bei 10 µl Serumzugabe zeigte, im nächsten Test unter Verwendung anderer Erythrozyten eine 50%ige Lyse erst nach Zugabe von 15 µl Volumen zeigte. Normalerweise (d.h. für die immunologische Diagnostik) wäre mit dem Austitrieren des halbmaximalen Lysewertes der CH_{50}-Test als solcher abgeschlossen gewesen. Für die in dieser Arbeit auf ihre Funktion zu untersuchenden inhibitorischen Komplementfaktoren war der halbmaximale Lysewert (CH_{50}-Wert) des verwendeten Rattenserums aber nur Ausgangswert für die weiteren Untersuchungen. Die Schwierigkeit, die sich dabei ergab, war die Konstanz dieser Ausgangsbedingungen für diesen relativ aufwendigen Inhibitions-Test. Als weitere Schwierigkeit ergab es sich, dass nur relativ begrenzte Volumina der in aufsteigenden Mengen zugesetzten inhibitorischen Faktoren in die Ansätze pipettiert werden konnten, weil andernfalls die für das Funktionieren des Assays wichtige Pufferung zusammenbrach. Aus diesem Grund mussten die inhibitorischen Komponenten in relativ hoher Konzentration vorliegen.

3.16.1 Inhibition des Komplement Hämolyse Test (CH_{50}-Test) des klassischen Weges mit den rekombinant hergestellten FH(SCR1-7) und dem immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH

Nachdem für den CH_{50}-Test mehrere Rattenseren bis zur halbmaximalen Lyse austitriert worden waren, wurde für alle weiteren Tests die Serumcharge genommen, mit der der CH_{50}-Assay einen repräsentativen Mittelwert ergab. Für die folgenden Inhibitionsversuche wurden der immunaffinitätschromatographisch aufgereinigte FH sowie die in HEK293- und Mono-Mac-6-Zellen hergestellten FH(SCR1-7) herangezogen. Für eine Vergleichbarkeit der inhibitorischen Funktion wurden mehrere CH_{50}-Inhibitionstests parallel mit ein und derselben Erythrozytencharge durchgeführt (n= 3 oder n= 4).

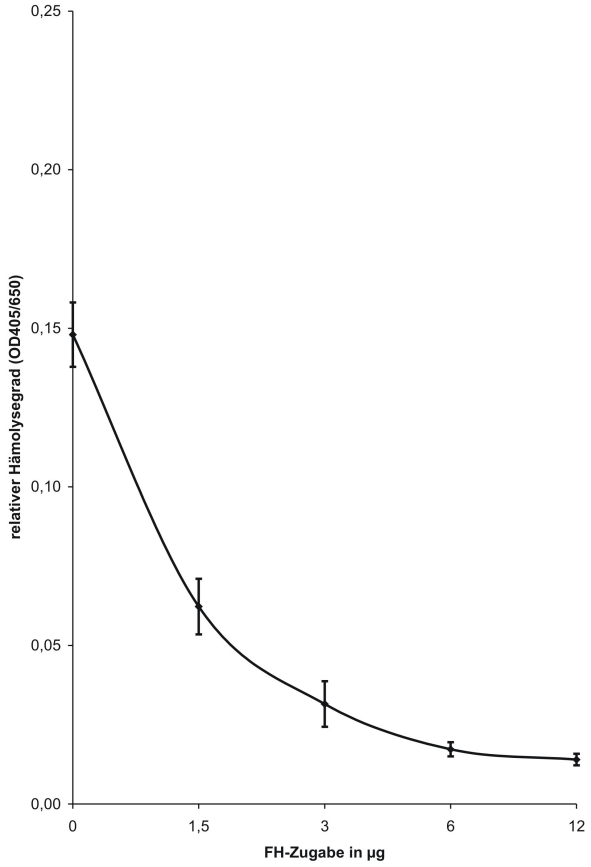


Abb. 48: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten FH (Versuchsreihe 1) (Erythrozytencharge vom 13.5.2003).

Der Graph in Abb. 48 zeigt die Komplement-inhibitorische Wirkung von unterschiedlichen Chargen des immunaffinitätschromatographisch gereinigten Ratten FH (n=3) mit einer Erythrozytencharge (vom 13.5.2003). Der Mittelwertquotient (OD405/650) der halbmaximalen Lyse (CH_{50}-Test) lag im Durchschnitt bei etwa 0,15 (ohne Zugabe von FH). Nach einer Zugabe von 1,5 µg (absolut) des immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH trat bereits eine über 50%ige Hemmung der Komplement-vermittelten Erythrozytenlyse ein, wodurch der OD405/650 Quotient auf einen Durchschnittswert von ca. 0,07 sank. Bei einer Gesamtzugabe von 3 µg (abs.) war eine ca. 70%ige Hemmung erreicht. Bei einer Gesamtzugabe von 6 bzw. 12 µg (abs.) zeichnete sich die asymptotische Annäherung der Durchschnittsverlaufskurve an eine Basislinie parallel zur X-Achse ab. Eine völlige Inhibition der Erythrozytenlyse konnte offensichtlich auch durch eine weitere Zugabe an Faktor H nicht erreicht werden. Da das System bei einer Zugabe von mehr als 12 µg FH durch das zugesetzte Volumen den Pufferbereich, in dem der Assay arbeitet, verließ, konnten weitere Daten aufgrund der in diesem Grenzbereich auftretenden relativ hohen Messwertschwankungen nur vereinzelt und nicht immer reproduzierbar gewonnen werden,

weshalb sie in die Graphik in Abb.48 nicht mit eingeflossen sind. Grundsätzlich zeigten diese Werte jedoch auch, dass die Basislinie des Inhibitionsassays nicht auf der Abszisse, sondern etwa bei 0,015 lag und damit etwa 10% des Ausgangswertes (0,15) betrug.

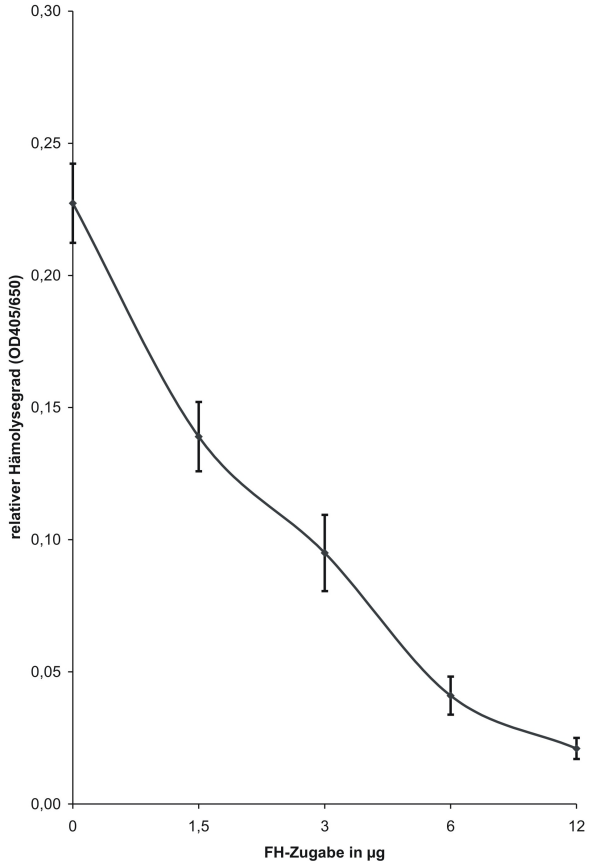


Abb. 49: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten FH (Versuchsreihe 2) (Erythrozytencharge vom 3.6.2003).

Abbildung 49 zeigt einen mehr linearen Kurvenverlauf. Die verwendete Serumcharge sowie die verwendeten FH-Präparation (n=3) waren identisch mit denen, die im CH_{50}-Assay in Abb. 48 verwendet wurden. Lediglich bei den Erythrozyten, die in diesem Test eingesetzt wurden, handelte es sich um eine andere Präparation (3.6.2003). Der Ausgangswert (ohne FH-Zugabe) des OD405/650-Quotienten lag bei diesem Inhibitionsassay im Durchschnitt bei etwa 0,23 und damit höher als der Ausgangswert der Versuchsreihe 1 (Abb. 48). Eine Hemmung der Lyse um ca. 50% trat erst bei einer Zugabe von etwa 2 µg FH ein, eine 70%ige Hemmung der Komplement-bedingten Lyse erst bei einer Zugabe von ca. 6 µg. Das entsprach nahezu der doppelten Menge, die im ersten CH_{50}-Test (Versuchsreihe 1) Abb. 48 nötig war. Eine asymptotische Annäherung an einen hypothetischen Basiswert zeichnete sich frühestens bei einer Zugabe von 12 µg ab. Da der CH_{50}-Assay bei einer Zugabe von mehr als 12 µg aufgrund des nicht mehr wirksamen Puffersystems zusammenbrach, konnten weitere Daten in dieser Versuchsreihe (2) auch nicht einzeln erhoben werden.

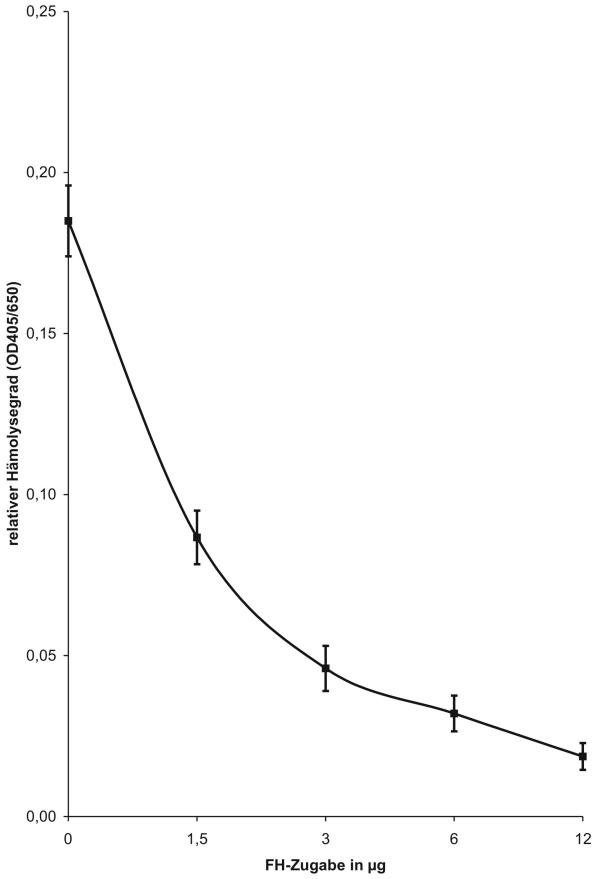


Abb. 50: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten FH (Versuchsreihe 3) (Erythrozytencharge vom 22.7.2003).

Der Verlauf des in Abbildung 50 gezeigten Mittelwertgraphen (n=4) ähnelt stark der in Versuchsreihe 1 (Abb. 48) abgebildeten Kurve. Die für diesen CH_{50}-Assay verwendeten Erythrozyten stammten vom 22.7.2003. Bei den verwendeten FH-Präparationen handelte es sich um die drei in den Versuchsreihe 1 (Abb. 48) und Versuchsreihe 2 (Abb. 49) verwendeten und eine zusätzliche neue Präparation.

Das verwendete Serum entsprach dem der ersten beiden Versuchsreihen. Der Wert des OD405/650-Quotienten lag ohne Zugabe des FH bei etwa 0,18 und damit höher als in Versuchsreihe 1 aber niedriger als in Versuchsreihe 2. Bereits nach einer Zugabe von 1,5 µg trat in Analogie zu Versuchsreihe 1 eine 50%ige Inhibition der Erythrozytenlyse ein. Der Quotient lag im Mittel nur noch bei ca. 0,08. Die 70%ige Hemmung des klassischen Weges war durch Zugabe von ca. 3 µg FH (abs.) ebenfalls in Übereinstimmung mit Versuchsreihe 1 gegeben. Es war zu erkennen, dass sich die Kurve bei Zugabe von 12 µg FH einem Wert von etwa 0,02 näherte. Dieser wurde auch durch zwei weitere Messwerte (bei 24 µg Zugabe) nur knapp mit 0,018 unterschritten oder lag mit 0,021 fast gleich. Weil nur zwei Messwerte für

die Zugabe von 24 µg FH erhoben werden konnten, sind diese Werte nicht in den Graphen eingegangen.

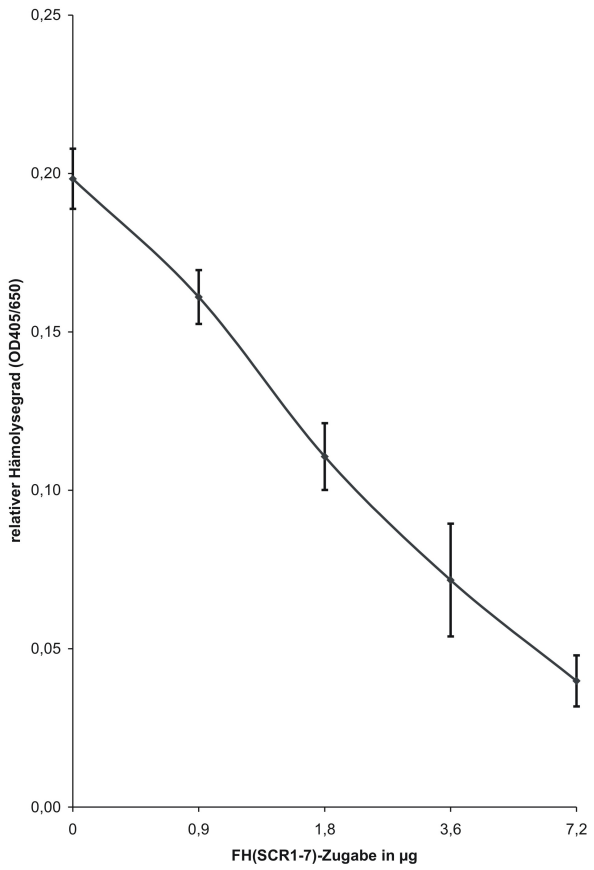


Abb. 51: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den in HEK293-Zellen hergestellten FH(SCR1-7).

Bei dem in HEK293-Zellen rekombinant hergestellten FH(SCR1-7), der in dieser Versuchsreihe (n=3) eingesetzt wurde, sieht man in Abb. 51 einen mehr linearen Verlauf der Inhibitionskurve, ähnlich wie er mit dem FH(SCR1-20) (Versuchsreihe 2, Abb. 49) und der Erythrozytencharge vom 3.6.2003 zu finden war. Der molare Umrechnungsfaktor für den FH(SCR1-7) im Vergleich zum Gesamt-FH liegt bei etwa 3. Das bedeutet, dass in 1 µg FH(SCR1-7) näherungsweise dreimal mehr Moleküle (18,5 pmol) enthalten sind als in 1 µg FH(SCR1-20) (6,1 pmol). Der Startquotient lag bei etwa 0.20. Eine Halbierung dieses Wertes (50%ige Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse) wurde bei einer Zugabe von ca. 2 µg abs. erreicht. Da in 2 µg FH(SCR1-7) die ca. 3-fache Molekülmenge (37 pmol) enthalten ist, musste dieser Wert mit dem Wert verglichen werden, der mit 6 µg (abs.) FH(SCR1-20) (38 pmol) durchschnittlich erzielt worden ist. In allen Tests, die mit dem FH(SCR1-20) durchgeführt worden waren, wurde mit einem Einsatz von 6 µg eine Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse von ≥70% erreicht. Dies bedeutete, dass der rekombinant erzeugte FH(SCR1-7) aus HEK293-Zellen nur etwa die halbe Aktivität des aus Rattenserum

immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH(SCR1-20) besaß. Eine asymptotische Annäherung an den hypothetischen Basiswert (Parallele zur Abszisse) wurde auch mit der maximal möglichen Zugabemenge von 7,2 µg absolut (133 pmol) nicht erreicht. Auch hier lag der Wert des OD405/650-Quotienten über den Werten, die mit dem FH(SCR1-20) im Durchschnitt der drei Versuchsreihen bei einer Zugabe von 6 µg (38 pmol) oder 12 µg (76 pmol) erreicht worden waren.

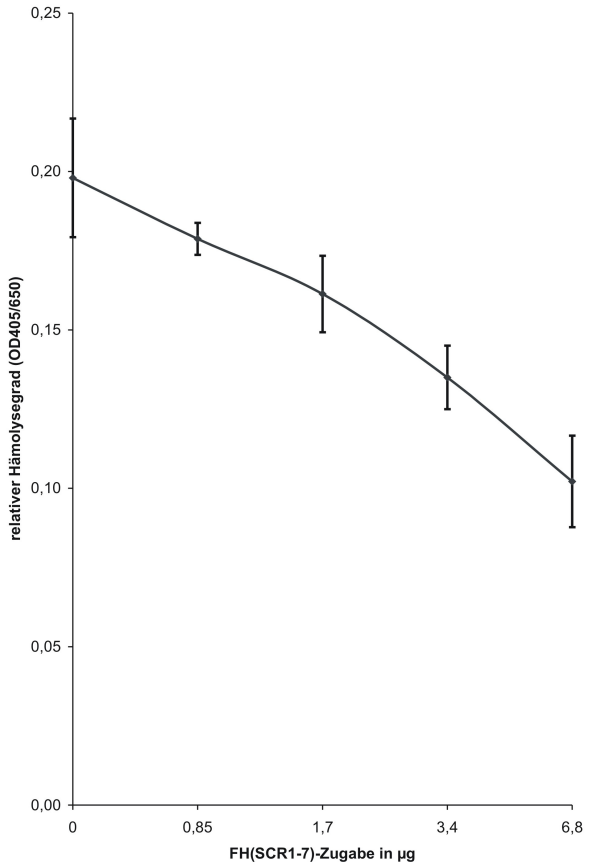


Abb. 52: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den in Mono-Mac-6-Zellen hergestellten FH(SCR1-7).

In Abb. 52 wurde der in Mono-Mac-6-Zellen rekombinant hergestellte FH(SCR1-7) zur Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse im CH_{50}-Test (n=3) eingesetzt. Wie der Abb. 52 zu entnehmen ist, ist der Verlauf des Graphen nahezu linear. Der Quotient der der 50%igen Komplement-vermittelten Lyse ohne Zugabe des FH ist mit einem Mittelwert von 0,20 nahezu identisch mit dem Wert aus der Versuchsreihe unter Verwendung des FH(SCR1-7) aus HEK293-Zellen. Das molare Verhältnis zwischen dem FH(SCR1-20) und dem FH(SCR1-7) aus den Mono-Mac-6-Zellen liegt bei 1:3, so dass in einem 1 µg FH(SCR1-7) (18,5 pmol) dreimal so viele Moleküle enthalten sind wie in 1 µg FH(SCR1-20)(6,1 pmol). Generell ist auch unter Verwendung des FH(SCR1-7) aus Mono-Mac-6-Zellen ein inhibierender Effekt zu beobachten. Jedoch liegt dieser erheblich geringer als der des

FH(SCR1-7) aus HEK293-Zellen. Bei einem aufgrund des limitierten Volumens maximal möglichen Einsatz von 6,8 µg absolut des FH(SCR1-7) (125,8 pmol) aus Mono-Mac-6-Zellen wurde im Mittel maximal eine 50%ige Hemmung der Lyse erreicht. Vergleicht man die Aktivität des FH(SCR1-7) aus Mono-Mac-6-Zellen mit der aus HEK293-Zellen, so ergibt sich, dass der FH(SCR1-7) aus Mono-Mac-6-Zellen in etwa nur die halbe Aktivität aufweist. Das bedeutet, er verfügt über eine 6-fach niedrigere Aktivität im Vergleich zum FH(SCR1-20), der immunaffinitätschromatographisch aus Rattenserum isoliert worden war.

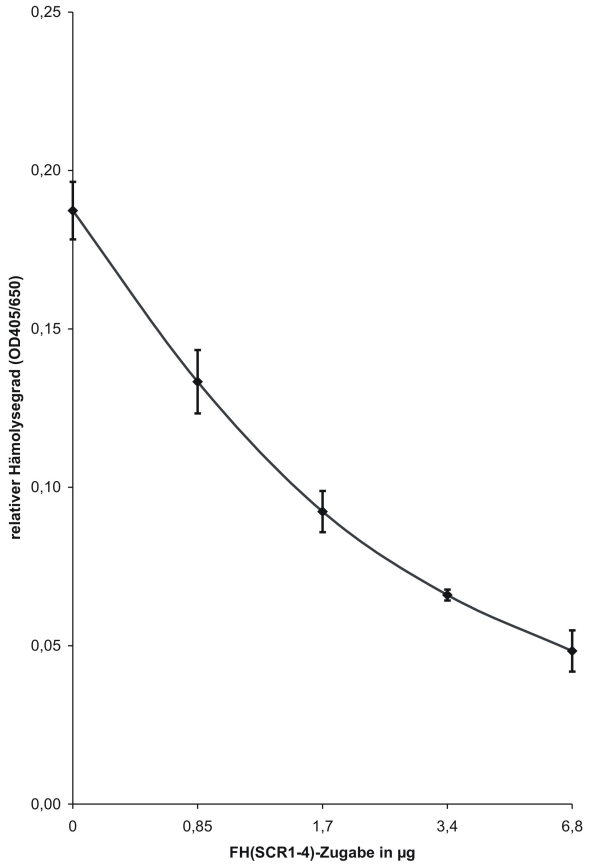


Abb. 53: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den in SF21-Insektenzellen hergestellten FH(SCR1-4).

Der aus dem Überstand von SF21-Zellen gewonnene FH(SCR1-4) wurde im CH_{50}-Test in einer Konzentration von 85 µg/ml eingesetzt. Der Verlauf des Graphen aus dieser CH_{50}-Test-Versuchsreihe (Abb.53) (n=3) ähnelt stark dem Verlauf des Graphen in Abb.51. Das Molekulargewichtsverhältnis zwischen FH(SCR1-20) und dem aus Insektenzellen stammenden FH(SCR1-4) liegt bei 1:5, das Verhältnis zwischen dem FH(SCR1-7) und dem FH(SCR1-4) liegt bei 1: 1,5. Das bedeutet, dass in 1 µg Gesamtmenge etwa 1,5x so viele Moleküle vom FH(SCR1-4) (28 pmol) enthalten sind wie vom FH(SCR1-7) (18,5 pmol). Der Ausgangswert [ohne FH(SCR1-4) Zugabe] lag mit 0,18 etwas niedriger als der Ausgangswert

des CH_{50}-Inhibitionstest für die Austestung der aus HEK293- und Mono-Mac-6-Zellen stammenden FH(SCR1-7). Dennoch war der in Insektenzellen hergestellte FH(SCR1-4) aktiv und hemmte bereits nach einer Zugabe von 1,7 µg absolut (47,6 pmol) die Komplement-vermittelte Erythrozytenlyse um 50%. Insgesamt war auch in dieser Versuchsreihe die Tendenz erkennbar, dass sich der Graph asymptotisch einer Parallelgeraden zur Abszisse nähert. Nach der maximal möglichen Zugabe von 6,8 µg (abs.) (190 pmol) wurde die Komplement-vermittelte Lyse um insgesamt weitere 30% verringert, so dass sich eine Gesamtinhibition von etwa 80% ergab. Im Vergleich mit dem aus HEK293- oder Mono-Mac-6-Zellen stammenden FH(SCR1-7) ergab sich eine geringere molare Aktivität gegenüber des FH aus den HEK293-Zellen und eine etwa identische molare Aktivität mit dem aus Mono-Mac-6-Zellen stammenden FH(SCR1-7).

3.16.2 Inhibition des Komplement Hämolyse Test (CH_{50}) des klassischen Weges mit dem immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI

Für die Inhibitionsversuche mit dem aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch gewonnen FI wurde dieselbe Charge an Rattenserum verwendet, wie sie auch bei den Inhibitionsversuchen mit dem FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) benutzt worden war. Für die Vergleichbarkeit der inhibitorischen Funktion des Ratten FI in der Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse im CH_{50}-Test wurden drei CH_{50}-Tests parallel mit ein und derselben Erythrozytencharge durchgeführt.

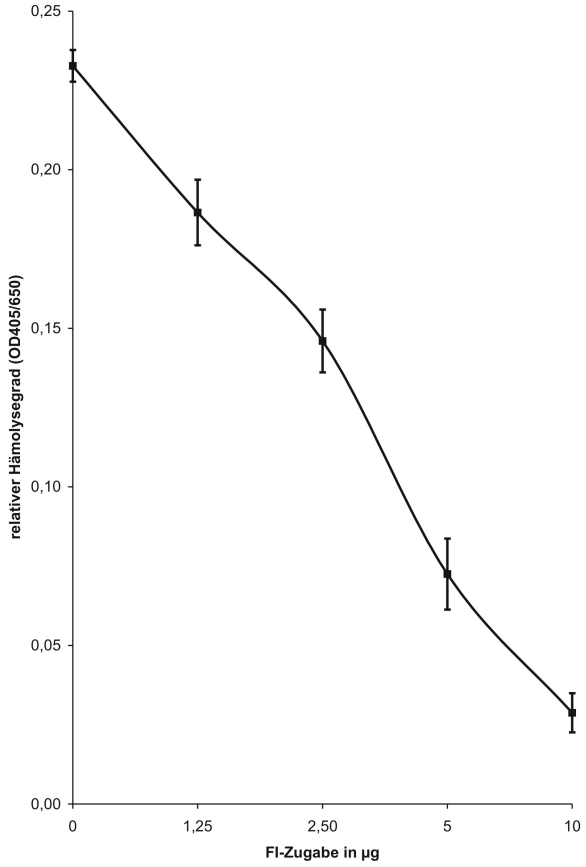


Abb. 54: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FI (Versuchsreihe 1, Erythrozyten-charge vom 3.6.2003).

Wie man Abbildung 54 entnehmen kann, liegt der CH_{50}-Ausgangswert dieser Versuchsreihe (n=3) bei etwa 0,23 und damit höher als in allen zuvor durchgeführten CH_{50}-Tests. Nach einer Zugabe von ca. 3 µg FI absolut (34 pmol) wurde eine Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse um 50% erreicht. Bei dem annähernd linearen Verlauf der Inhibitionskurve z.B. im Vergleich zur Kurve in Abbildung 55 ist in dieser Versuchsreihe eine Annäherung an einen hypothetischen Basiswert nur schwer zu erkennen. Selbst nach einer FI-Zugabe von 5 µg absolut (56 pmol) und der maximal möglichen Zugabe von 10 µg FI (abs.) (113 pmol), wurde der die relative Lyse anzeigenden Quotient von etwa 0,07 auf etwa 0,03 näherungsweise halbiert.

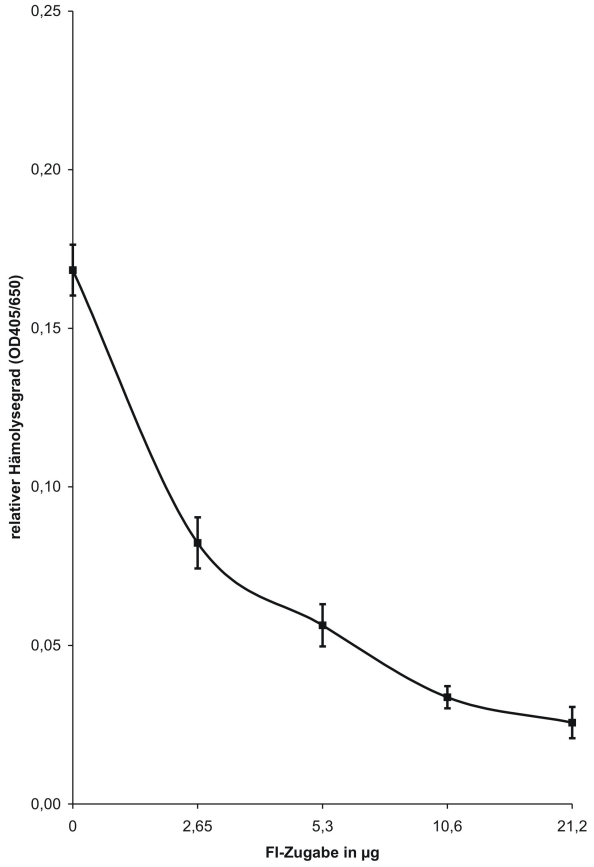


Abb. 55: Inhibition der Lyse im CH_{50}-Test durch den aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FI (Versuchsreihe 2, Erythrozyten-charge vom 22.7.2003).

Im Gegensatz zu Abb. 54 ist in dieser Versuchsreihe (n=3) (Abb.55) eine asymptotischer Verlauf des Inhibitionsgraphen des CH_{50}-Assays zu erkennen. Trotz des niedrigeren Ausgangswertes von etwa 0,17 sank der Wert nach einer Zugabe von 2,65 µg FI (abs.) (30 pmol) um mehr als 50% auf einen Wert von 0,07 ab. Nach einer weiteren Zugabe von 2,65 µg [d.h. von 5,3 µg gesamt (60 pmol)] flachte der Graph deutlich ab. Nach einer Zugabe von 10,6 µg FI (abs.) (120 pmol) war deutlich festzustellen, dass sich die Kurve asymptotisch einer Parallelgeraden zur Abszisse näherte. Diese Annäherung wurde bei Betrachtung des Wertes für die aufgrund der Volumenbeschränkung maximal mögliche Zugabe von 21,2 µg FI (240 pmol) noch deutlicher. Der Wert fiel trotz einer Verdopplung der zugesetzten Menge nur von 0,004 auf 0,003. Damit lag der unter „maximaler“ Reduktion des Komplementssystems erreichte Basiswert des CH_{50}-Tests bei etwa 17% des Ausgangswertes.

3.16.3 Inhibition des Komplement Hämolyse Tests (CH_{50}) des klassischen Weges mit den aus Rattenserum immunaffinitäts-chromatographisch gereinigten Faktoren I und H in Kombination

Neben der Austestung der einzelnen Faktoren [FH(SCR1-20), FH(SCR1-7), FH(SCR1-4) und FI] auf ihre Komplement-inhibitorische Funktion im CH_{50}-Test galt es zu untersuchen, ob es durch die Verwendung beider Faktoren (H und I) in Kombination einen synergistischen Effekt gibt. Dadurch hätte im Vergleich zu der mit nur einem Faktor erreichten Inhibition dieselbe inhibitorische Wirkung durch einen erheblich reduzierten Einsatz der einzelnen Faktoren bewirkt werden können (Arbeitshypothese).

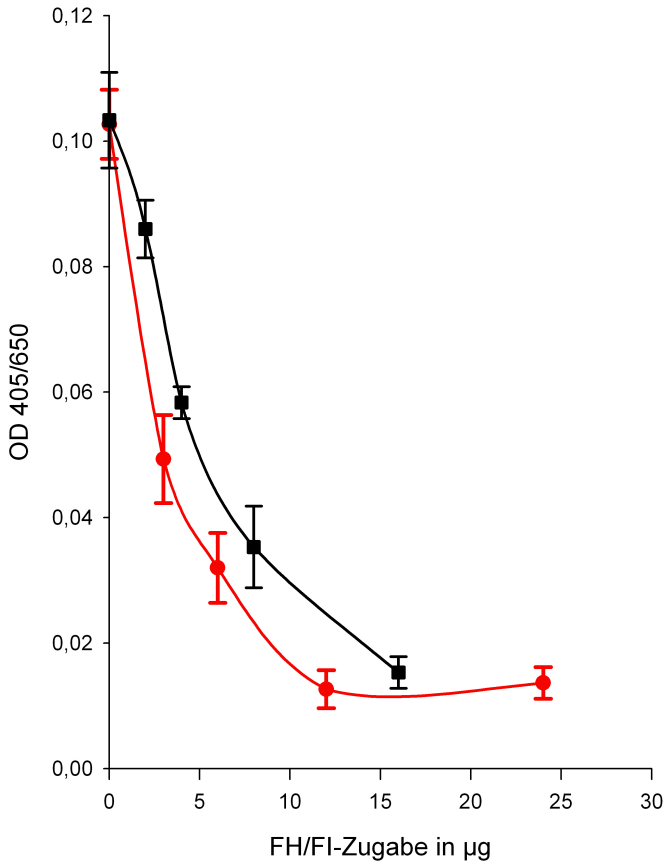


Abb. 56: CH_{50}-Inhibitionsassay mit konstant vorgelegten 1,5 µg des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH (etwa 50%ige Inhibition) unter weiteren Zusatz von immunaffinitätschromatographisch gereinigtem FI.
Rote Kurve: Vorgabe vom 1,5 µg FH und weitere Reduktion durch FI.
Schwarze Kurve: Vorgabe von 1,5 µg FH und weitere Reduktion durch FH.

Für die Untersuchungen dieser Versuchsreihe (n=3) wurde jeweils eine konstante Menge von 1,5 µg des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH(SCR1-20) vorgelegt. Somit war der Ausgangspunkt (Beginn der Messungen) dieser Versuchsreihe der Wert, der durch die Vorlage von 1,5 µg FH den ursprünglichen CH_{50}-Serumwert um etwa 50% reduziert. Die rote

Kurve zeigt den Verlauf der Untersuchungen, bei denen der FH (1,5 µg abs.) vorgelegt worden war und der FI hinzugegeben wurde. Der schwarze Graph gibt den CH_{50}-Assay mit dem vorgelegten FH und dessen weitere Zugabe wieder. Wie aus dem nahezu identischen Verlauf beider Graphen entnommen werden kann, scheint es in den eingesetzten Konzentrationen keinen synergistischen Effekt beider Faktoren in Kombination zu geben. Eine asymptotische Annäherung an eine Parallelgerade zur Abszisse ist in beiden Graphen nach Zugabe von 12 µg FI bzw. 15 µg FH zu erkennen. Durch die Möglichkeit der maximalen Zugabe von etwa 24 µg FI bei 1,5 µg vorgelegtem FH konnte gezeigt werden, dass sich im Vergleich zur Zugabe von 12 µg FI keine weitere Inhibition des klassischen Komplementweges ergab. Die minimale Hämolyse bzw. deren maximale Suppression lag bei einem Wert von etwa 0,016 (OD405/650) und betrug damit etwa 10% des „nicht inhibierten“ ursprünglichen CH_{50}-Wertes [0,18 (OD405/650)].

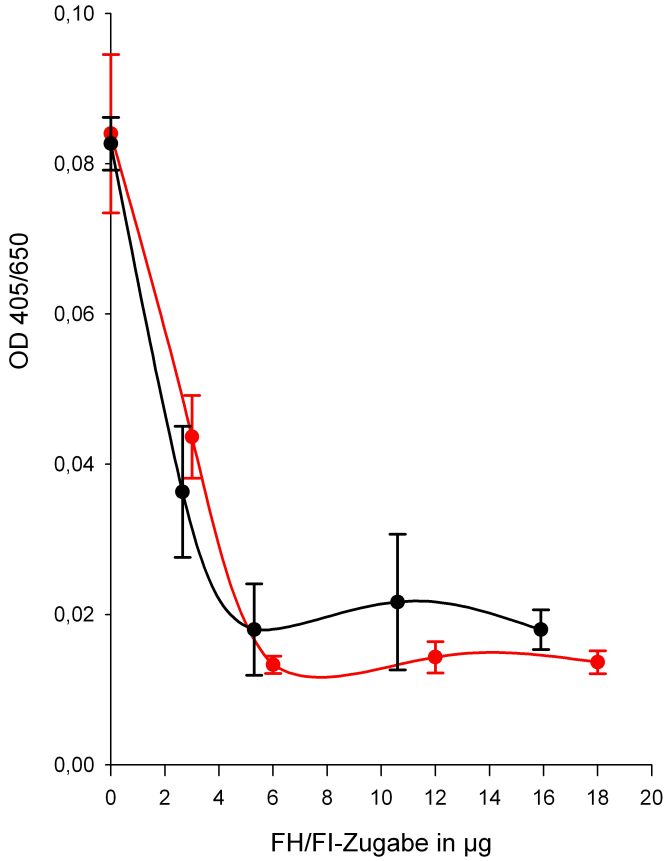


Abb. 57: CH_{50}-Inhibitionsassay mit konstant vorgelegten 2,65 µg des immunaffinitätschromatographisch gereinigten FI (etwa 50%ige Inhibition) unter weiterem Zusatz von immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH.
Rote Kurve: Vorgabe von 2,65 µg FI und weitere Reduktion durch FI.
Schwarze Kurve: Vorgabe von 2,65 µg FI und weitere Reduktion durch FH.

In der in Abb. 57 abgebildeten Versuchsreihe wurden 2,65 µg FI absolut für etwa 50%ige Inhibition des CH_{50}-Wertes vorgelegt und zur Austestung eines postulierten Synergismus in Umkehr zu der in Abb. 56 gezeigten Versuchsreihe immunaffinitätschromatographisch gereinigter FH (schwarze Kurve) hinzugegeben. Parallel wurde eine Inhibition des CH_{50}-Assays mit zusätzlich hinzutitriertem FI durchgeführt (rote Kurve). Der Ausgangswert lag mit 0,08 (OD405/650) bei der Vorlage von 2,65 µg FI etwas niedriger als mit 0,11 (OD405/650) in Abb. 56 bei einer Vorlage von 1,5 µg (abs.) an immunaffinitätschromatographisch gereinigtem FH. Ein synergistischer Effekt war allerdings auch durch die Vorlage von Faktor I und durch die weitere Lyseinhibition durch Zugabe von FH nicht zu erkennen. Eine asymptotische Annäherung der beiden Graphen in Abb. 57 an eine Parallelgerade zur Abszisse war nach einer Zugabe von ca. 5 µg FH (abs.) und nach Zugabe von 6 µg FI (abs.) zu erkennen. Beide Graphen erreichten einen Wert von etwa 0,018 (OD405/650). Dieser Wert konnte auch durch die weitere Zugabe von bis zu maximal 18 µg Faktor I bzw. 16 µg FH

(abs.) nicht unterschritten werden und betrug etwa 10% des ursprünglichen CH_{50}-Wertes ohne jede Inhibition [0,17 (OD405/650)].

3.17 Weitere Ergebnisse

3.17.1 Einsatz der Komplement-inhibitorischen Faktoren im Komplement Hämolyse Test des alternativen Weges ($APCH_{50}$-Test)

Es wurde versucht, die immunaffinitätschromatographisch gereinigten Faktoren H und I der Ratte, sowie die rekombinant hergestellten Faktoren FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) im $APCH_{50}$-Test einzusetzen. Leider ließ sich der $APCH_{50}$-Test aus dem immunologischen Routinelabor der Abteilung nicht von humanem auf Rattenserum umstellen. Sowohl seine Einstellung mit Rattenserum als auch die versuchte Inhibition des mit humanem Serum eingestellten $APCH_{50}$-Tests durch den rekombinanten FH(SCR1-7) bzw. FH(SCR1-4) sowie die immunaffinitätschromatographisch gereinigten Faktoren H und I war nicht möglich. Trotz wiederholter Versuche mit humanem und Rattenserum blieb der Ansatz, die rekombinanten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) als auch die immunaffinitätschromatographisch gereinigten Faktoren H und I im $APCH_{50}$-Test einzusetzen, erfolglos. Der mit humanem Serum eingestellte $APCH_{50}$-Wert ließ sich nicht inhibieren. Somit konnten keine Daten zur Inhibition der über den alternativen Komplementweg in humanem und Rattenserum verlaufenden Lyse gesammelt werden.

3.17.2 Versuch des Aufbaus eines ELISA zur Quantifizierung des Ratten-FI

Der für den ELISA verwendete monoklonale anti-Ratten FI Antikörper wurde im Zuge meiner Diplomarbeit mit dem Titel: „Induktion und Regulation des Komplementproteins Faktor I“ (zugehörige Publikation: Schlaf et al., 2001) hergestellt. Der für die immunaffinitätschromatographische Aufreinigung des FI aus Serum verwendete mAK 15F11-2 wurde im ersten Versuch, einen FI-spezifischen ELISA aufzubauen, als Fangantikörper an der Festphase immobilisiert, und der polyklonale Kaninchen anti-FI AK wurde als Nachweisantikörper verwendet. Obwohl beide Antikörper den FI im Immunblot detektierten und der mAK sogar für die immunaffinitätschromatographische Aufreinigung des FI geeignet war, konnte kein funktioneller ELISA hergestellt werden. Der umgekehrte Einsatz beider

Antikörper, d.h. des pAK als Fangantikörper und des mAK als Nachweisantikörper in Kombination mit einem POD-konjugierten anti-Maus Sekundärantikörper führte ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg.

3.17.3 Versuchte Expression des Rattenfaktor I

Die rekombinante Expression des FI sollte nach gründlichen Überlegungen insbesondere hinsichtlich der postranslationalen Modifikationen im Mammalia-System stattfinden. Da die Mammalia-Zellen im Gegensatz zu den Insektenzellen die originäre und für die Funktion des FI essentielle Verzuckerung durchführen können, wurden alle zur Verfügung stehenden Zelllinien auf die Expression des PACE-Proteins untersucht. Insbesondere wurden die Zellen von Hepatomlinien untersucht, deren nicht transformierte Form (Hepatozyten) als natürliche Quellen für den FI bekannt waren. In zweiter Linie wurden die Zelllinen untersucht, die in der Literatur erfolgreich für die Expression einer ganzen Reihe von Proteinen herangezogen worden waren (z.B. HeLa, COS-7, HEK293) und die von den Herstellern der Transfektionsagenzien getestet und empfohlen worden waren. Nach der Herstellung und Aufreinigung eines die gesamte FI-Sequenz enthaltenden Plasmids wurden die unterschiedlichen Zelllinien mit den diversen Transfektionsreagenzien und Methoden transfiziert. Zur Kontrolle wurde analog der Transfektion der Zellen mit dem FI eine Transfektion mit dem GFP-Plasmid durchgeführt. Die Kontroll-Transfektanten bildeten wie die mit der FI-Sequenz transfizierten Zellen unter selektiven Bedingungen (G418-Resistenz) Klone. Die Proteine aus den Überständen der mit dem FI transfizierten Zellen wurden im Immunblot mit dem selbst generierten anti-FI pAK inkubiert. Leider konnte bei den FI-transfizierten Zellen in keinem Fall eine stärkere Expression als die Basisexpression der Zelllinien, die konstitutiv eine Quelle für den FI darstellen (FAO, H4IIE und HuH-7), oder bei den FI nicht konstitutiv exprimierenden Zelllinien überhaupt eine Expression des rekombianten FI detektiert werden.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ratten FH-Sequenz

Die Rattenfaktor H cDNA-Sequenz wurde unter Zuteilung der „accession number“ A91883 an die „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL)-Datenbank übermittelt. Im Zuge weiterer Recherchen wurden Übereinstimmungen mit einer unter der Patentnummer WO 9823638-A/1 geschützten Sequenz aus dem Jahre 1998, die erst später von W. Schwaeble und R.B. Sim an die EMBL-Datenbank übermittelt worden war (EMBL-Datenbank-Nummer: A91883 von 2000), festgestellt. Die patentierte Sequenz ist in weiten Teilen homolog mit der von uns identifizierten Ratten FH-Sequenz. Es sind jedoch in einigen Bereichen deutliche Abweichungen vorhanden. So liegt in der Aminosäuresequenz des Patents an Position 194 ein Stopcodon (TAA). In der Maus FH-Sequenz (KRISTENSEN und TACK; 1986) und in der von uns identifizierten Ratten FH-Sequenz (DEMBERG et al. 2002) befindet sich an Position 194 in der Aminosäuresequenz eine Glutaminsäure (GAA). Da es von der korrespondierenden Aminosäuresequenz der patentierten Sequenz (WO 9823638-A/1) keinen Eintrag in der Swissprot- oder in der EMBL-Datenbank gibt, wurde sie zum Vergleich mit der Ratten FH-Sequenz in dieser Arbeit und der Maus FH-Sequenz (KRISTENSEN und TACK; 1986) in die korrespondierende Aminosäuresequenz übersetzt. Insgesamt wurden 11 Unterschiede, die einzelne Aminosäuren in den entsprechenden Sequenzbereichen betreffen, festgestellt. Neben diesen Einzeldifferenzen wurden zwei Abschnitte von jeweils 6 und 11 Aminosäuren Länge identifiziert, die in der patentierten Sequenz nicht vorhanden sind oder völlig von der in dieser Arbeit erhobenen Sequenz (DEMBERG et al., 2002) abweichen. Der erste Abschnitt umfasst die Positionen 804 bis 810 der eigenen Aminosäuresequenz, die von der von W. Schwaeble und R.B. Sim patentierten Sequenz vollkommen abweichen und darüberhinaus in der von uns abgeleiteten Aminosäuresequenz mit einer Länge von 1236 AS für zwei weitere Aminosäuren im Vergleich zur Primärstruktur von Schwaeble und Sim codieren, wenn das von ihnen publizierte Stop-Codon an Position 194 als Glutaminsäure übersetzt wird. Der zweite Abschnitt umfasst die Positionen 1093-1104 der Aminosäuresequenz aus der eigenen Publikation (DEMBERG et al., 2002). In der Patentsequenz sind zwölf völlig abweichende Aminosäuren zu der von uns identifizierten Sequenz aufgelistet.

Das in dieser Arbeit berechnete Molekulargewicht von 140,3 kDa und des aufgrund der Wanderungsstrecke im SDS-Gel angezeigte korrespondierende rel. Molekulargewicht von 155 kDa entspräche einem Glykosylierungsanteil von etwa 3 kDa an allen fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Diese Daten stimmen mit dem von Gardner et al. aus dem Jahre 1980 und dem von Sim und DiScipio kalkulierten Glykosylierungsanteil des FH aus dem Jahre 1982 überein. Beide Arbeitsgruppen fanden heraus, dass der Faktor H einen Glykosylierungsanteil von 9 bzw. 9,3% hat. Der in dieser Arbeit anhand der Differenz aus der Primärstruktur und dem relativen Molekulargewicht im SDS-Gel abgeleitete Anteil der Glykosylierung am Gesamtgewicht beträgt etwa 9,5% Molekulargewichts des FH.

Tabelle: Homologievergleiche zwischen der cDNA-Sequenz des Ratten FH und ausgewählten FH-, FH-related Protein-cDNA-Sequenzen

EMBL-Datenbank-Nummer	Codiertes Protein	Grad der Homologie in %
M12660	„mouse CfH, complete coding sequence“	87,8
M29007	„mouse complement factor H-related protein“	85,3
M29009	„mouse complement factor H-related protein“	85,2
M29010	„mouse complement factor H-related protein“	84
X07525	„human complement factor H sequence“	74
X98697	„B.taurus complement FH“	70,6
X98337	„hum. FHR 4“	69
AF295327	„hum. FHR 5“	68,3
X56209	„hum. FHR 1“	68

Die Tabelle verdeutlicht noch einmal den Homologiegrad zwischen der cDNA des Ratten FH und den FH-spezifischen cDNA-Sequenzen sowie den bekannten „Factor H related-Proteins“-cDNA-Sequenzen anderer Spezies.

Da die in der vorliegenden Arbeit abgeleitete Ratten FH-Aminosäure-Gesamtsequenz in weiten Teilen mit der Maussequenz identisch ist (81,5% auf der Ebene der

korrespondierenden Aminosäuren), sollten alle strukturellen wie auch funktionellen Aspekte, die für den Maus-FH gelten, auch auf den FH der Ratte zutreffen. Hier nicht weiter diskutierte strukturelle Aspekte der humanen FH-Sequenz und der Maus-FH-Sequenz wurden bereits ausgiebig diskutiert (KRISTENSEN und TACK, 1986; RIPOCHE et al., 1988) und können direkt auf den Ratten FH übertragen werden.

4.2 Rekombinante Expression des Ratten FI

Zur rekombinanten Expression des Faktor I sind in der Literatur lediglich zwei Veröffentlichungen zu finden. Zum einen ist die rekombinante Herstellung des FI in Mammalia-Zellen (WONG et al., 1995) anzuführen, zum anderen die Expression des FI in „High Five“ Insektenzellen mittels des Baculovirus-Systems (ULLMAN et al., 1998). Wong und Mitarbeiter versuchten, den FI in COS-1- und in CHO-K1-Zellen zu exprimieren. Hierzu führten sie zum einen eine Transfektion mit einem für den FI-kodierenden Plasmid allein, zum anderen eine Kotransfektion mit einem für das PACE-kodierenden Plasmid durch. Die erhaltenen Resultate müssen eher als ernüchternd bezeichnet werden. Der von den CHO-K1-Zellen sezernierte Faktor I lag zu 50% als nicht prozessierte Vorläuferform vor. Eine Angabe der Ausbeute erfolgte von den Autoren nicht. Bei dem aus COS-1-Zellen sezernierten FI ließen sich 90% des Proteins als nicht-prozessierte Vorläuferform im Westernblot detektieren. Die Expression erreichte nach 72 h ihr Maximum mit einer Ausbeute von 770 ng/10^7 Zellen/ml. Erst nach der Kotransfektion der verwendeten COS-1-Zellen mit dem PACE ließ sich der korrekt prozessierte zweikettige FI im Zellkulturüberstand nachweisen. Die Größen der Schwer- und der Leichtketten stimmten mit einem rel. Molekulargewicht von 47 kDa statt 50 kDa für die Schwer- und 35 kDa statt 38 kDa für die Leichtkette nicht mit den rel. Molekulargewichten des aus Serum isolierten humanen FI überein. Auch die Aktivität des rekombinant hergestellten FI lag bei maximal 50% des aus Serum isolierten. Als mögliche Ursachen für die geringe Expressionsrate und Aktivität des rekombinant erzeugten FI führen Wong et al. (1995) an:

A: eine zu hohe Expression der Gene und eine sich daraus ergebende Anergisierung der Zellen

B: eine nicht ausreichende Prozessierungskapazität für das Vorläuferpeptid in den Zellen, weil die verwendeten Zellen nicht die natürlichen Syntheseorte für den FI sind

C: ein zu schnell ablaufender Transit des rekombinanten Proteins, um es vollständig zu prozessieren

Die Expression des humanen FI in High Five-Insektenzellen unter Verwendung des Baculovirus-Systems wurde von Ullman et al. (1998) durchgeführt. Die Insektenzellen wurden mit einer Infektionsrate (MOI) von 3 infiziert. Nach 72 h wurden die Überstände gesammelt und der darin enthaltene FI immunaffinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Ausbeute belief sich maximal auf 1,25 mg pro Liter Kulturüberstand. Ullman und Mitarbeiter konnten feststellen, dass die Leader- (MKLLHVFLLFLCFHLRFC) und die Linker-Sequenz (RRKR) durch die Insektenzellen korrekt entfernt worden war. Als offensichtlicher Nachteil trat jedoch eine Abweichung im rel. Molekulargewicht der Schwer- und der Leichtkette des rekombinanten FI auf. Die Schwerkette des rekombinanten FI zeigte statt der erwarteten 50 kDa ein relatives Molekulargewicht von 48 kDa, und die Leichtkette wies nur ein rel. Molekulargewicht von 36 kDa statt 38 kDa auf. Eine Untersuchung der Verzuckerung erbrachte den Beweis, dass der rekombinante FI auf der Schwer- und der Leichtkette Verzuckerungen besaß. Weil die Aktivität des rekombinanten FI trotz korrekter Prozessierung aber nur bei ca. 55% im Vergleich zum aus Serum isolierten FI lag, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Aktivitätsverlust und das zu geringe Molekulargewicht auf die zwar vorhandene aber unphysiologische Verzuckerung zurückzuführen ist. Insektenzellen sind nicht in der Lage, komplexe Verzuckerungen auszuführen, wie sie auf dem aus Serum isolierten FI-Molekül vorliegen und offensichtlich für die funktionelle Aktivität des FI erforderlich sind.

Mit dem Ziel der funktionellen Expression des FI wurde in dieser Arbeit die baculovirale Expression in Insektenzellen von vornherein verworfen. Für die Expression in Mammaliazellen wurden die zur Verfügung stehenden Zelllinien zunächst auf die Expression des PACE untersucht, welches für die Prozessierung notwendig ist und zudem in ausreichenden Mengen in den Zellen enthalten sein sollte, wie aus der Studie von Wong et al. (1995) zu folgern ist. Auch die Auswahl einiger Zelllinien (H4IIE, FAO, HuH-7), die ebenso wie ihre nicht transformierte Wildtypen (Hepatozyten) als Syntheseorte für den FI bekannt sind, wurde für die Untersuchungen und späteren Expressionsversuche getroffen. Von den untersuchten Zelllinien wurden die Zellen, die ein deutliches PACE-Signal in der RT-PCR, vergleichbar mit dem primär kultivierter Hepatozyten zeigten (Abb. 44), für eine Expression ausgewählt. Wie wichtig das PACE-Enzym für die korrekte Prozessierung des FI ist, zeigte der Vergleich des von den Zelllinien FAO, H4IIE und HepG2 sezernierten FI (3.14). Deutlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden (Abb. 46), dass der überwiegende Anteil des von HepG2-Zellen sezernierten FI auch unter reduzierenden Bedingungen als einkettiges, nicht korrekt prozessiertes Protein detektiert wurde. Diese Daten korrelieren mit denen von Goldberger et al. (1984) zur Prozessierung des von HepG2-Zellen sezernierten FI. Durch

diesen Befund wurde die Rolle des PACE-Enzyms für eine erfolgreiche rekombinante FI Expression zusätzlich unterstrichen. Die HepG2-Zellen kamen wie auch andere Zellen mit einem nur schwachen PACE-spezifischen Amplifikat für eine Transfektion nicht weiter in Frage.

Für eine möglichst ergibiege Expression wurde zudem ein Vektor ausgewählt, der den CMV-Promotor enthielt, da dieser Promotor in den meisten Säuger-Zelllinien für eine hohe Expressionsrate sorgt. Nachdem die Transfektionen erfolgreich verlaufen waren, was anhand der Kontrolltransfektionen mit dem GFP-Vektor festgestellt werden konnte und die ersten Klone gewachsen und vereinzelt worden waren, wurden die einzelnen Überstände auf die Produktion des FI durchgemustert. Für die Detektion kam entweder kreuzreaktives polyklonales Schaf anti-human FI IgG (The Binding Site) oder das in dieser Arbeit generierte polyklonale Kaninchen anti-FH IgG zum Einsatz. Leider konnte in keinem der getesten Überstände (auch bei einem verwendeten Fällungsvolumen von 2 ml) rekombinanter Ratten FI im Immunblot detektiert werden. Detektierbar war lediglich der konstitutiv gebildete FI aus den HuH-7-, FAO- und H4IIE-Zellen. Im Vergleich zum parallel untersuchten Überstand von nicht transfizierten Zellen war keine Intensitätszunahme des FI-spezifischen Immunblotsignals, die eine erhöhte und damit rekombinante FI-Expression angezeigt hätte, erkennbar. Aufgrund der eingesetzten Plasmidmenge und der überprüften Reinheit der verwendeten Plasmide ist nicht anzunehmen, das die nicht gelungene Expression auf den Expressionsvektor zurückzuführen ist. Die Kulturdauer betrug in unserem Fall unter G418-selektiven Bedingungen mindestens zwei Wochen, bis erste Klone so weit hochgewachsen waren, dass eine Vereinzelung stattfinden konnte. Die Wachstumskinetik der Klone ließ deshalb zunächst keinen Zweifel an einer erfolgreichen Selektion potentiell FI-positiver Zellklone aufkommen. Weshalb trotz gründlicher Auswahl der für die Expression vorgesehenen Zelllinien kein rekombinanter FI im Überstand detektiert wurde, muss deshalb reine Spekulation bleiben.

4.3 Quantifizierung des FH im Rattenserum

Aus der Messung der durchschnittlichen FH-Konzentration im Serum von jeweils sechs Ratten der Linien Lou und Lewis ergab sich eine durchschnittliche Konzentration von 238±21 µg/ml (DEMBERG et al., 2002). Der FH-Gehalt war unabhängig vom Alter der Ratten (zwischen 6 und 18 Monate). Diese Daten stimmen sehr gut mit den von Daha und van Es (1982) erhobenen Daten überein. Daha und van Es (1982) untersuchten den FH-

Serumgehalt in 20 Wistar-Ratten, die nicht älter als 4 Monate waren. Mittels Radialimmundiffusionsassay erhielten sie einen durchschnittlichen FH-Gehalt von 244±36 µg/ml im Serum der Tiere. Im Zuge der in dieser Arbeit unternommenen Hämolysetest-(CH_{50}-) Untersuchungen wurde das Rattenserum, welches für den CH_{50}-Assay verwendet wurde, im ELISA vermessen, um dessen Konzentration an FH zu bestimmen. Dieser Wert musste bekannt sein, um errechnen zu können, um welchen Faktor die basal im Serum vorhandene FH-Konzentration erhöht werden muss, so dass das Komplementsystem inhibiert wurde. Das für diesen Test verwendete Rattenserum war aus verschiedenen Ratten der Linie Wistar gewonnen und anschließend vereinigt worden. Die für diesen Serumpool erhobenen ELISA-Daten ergaben eine mittlere Konzentration des FH von ca. 700 µg/ml. Dies bedeutet, dass die FH-Konzentration im Serum der Ratte offensichtlich einer ähnlichen Konzentrationsbreite wie im humanen Serum unterliegt. Für den humanen FH wurden zuvor durchschnittliche Serumkonzentration von 120 µg/ml (ADINOLFI et al., 1981), über 300 µg/ml (SIM und DISCIPIO, 1982; WHALEY et al., 1978), 450-600 µg/ml (WEILER et al., 1976) bis zu Werten von 620-790 µg/ml (CHARLESWORTH et al. 1979) angegeben. Somit liegen die von uns für die Rattenseren ermittelten Daten im normalen Messwertbereich der in humanen Seren gemessenen FH-Konzentration.

4.4 Expression des Ratten FH(SCR1-7) in Mammalia-Zellen und des Ratten FH(SCR1-4) in Insektenzellen

Generell lässt sich der FH sowohl in Insektenzellen und als auch in Säugerzellen rekombinant herstellen. Die Tatsache, dass die Verzuckerung für die Funktion des FH nicht essentiell ist (JOUVIN et al., 1984), wird durch die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Aminosäuresequenzen aus Maus, Mensch und Ratte (Abb.17) und dem sich daraus ergebenden geringen Konserviertheitsgrad der N-Glykosylierungsstellen bestätigt. Im Gegensatz zur rekombinanten Herstellung des FI ergab sich deshalb kein Hinweis gegen eine Expression des FH und seiner verkürzten Varianten in Insektenzellen mittels Baculovirussystem. Mit Hilfe dieses Expressionssystems wurde der FH sowie verschiedene verkürzte und Deletionsvarianten des Proteins in Insektenzellen von mehreren Arbeitsgruppen hergestellt (SHARMA und PANGBURN, 1994; KÜHN und ZIPFEL, 1995; PANGBURN et al., 2000; HELLWAGE et al. 2002). Eine wie in der eigenen Arbeit durchgeführte Expression des FH oder einer verkürzten FH-Variante in Säugerzellen ist in der Literatur lediglich für eine **transiente** Transfektion in COS-Zellen beschrieben worden (ESTALLER et al., 1991).

Hierzu wurden 10^7 COS-Zellen mit 60 µg Plasmid durch Elektroporation transfiziert. Über die Ausbeuten an FH-Protein und an FHL-1 Protein (SCR1-7) wurden keine Aussagen gemacht. Anhand von Intensitätsvergleichen der FH- bzw. FHL-1-spezifischen Immunblotsignale, die in der Publikation abgebildet sind, läßt sich jedoch erkennen, dass in 80 µl des 20fach ankonzentrierten COS-Zellkulturüberstandes weniger rekombinant hergestellter FH und in etwa gleich viel rekombinant hergestellter FHL-1 (SCR1-7) vorhanden waren wie in 3 µl humanem Serum, die als Referenz aufgetrennt worden waren. Geht man von einem durchschnittlichen FH-Gehalt im humanen Serum von etwa 300 µg/ml aus (SIM und DISCIPIO, 1982; WHALEY et al., 1978), so waren in den 3 µl aufgetragenem humanem Serum 900 ng FH enthalten. In der Annahme, dass in den 80 µl Überstand der transfizierten COS-Zellen ebenfalls 900 ng rekombinanter FH enthalten waren, ergibt sich eine Ausbeute im nicht ankonzentrierten Zellkulturüberstand von etwa 560 ng/ml. Diese relativ geringen Ausbeuten an rekombinant exprimiertem Gesamt-FH entsprechen den in dieser Arbeit erhaltenen durchschnittlichen Ausbeuten von 600 ng FH(SCR1-7) pro Milliliter aus dem Überstand der HEK293-Zellen in etwa. Die Ausbeute an FHL-1 (SCR1-7) in der Arbeit von Estaller und Mitarbeitern fällt in etwa um den Faktor 10 geringer aus (ca. 50 ng/ml).

4.5 Größenvergleich des FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und des FH(SCR1-4) nach Auftrennung im SDS-Gel unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen

Das in der vorliegenden Arbeit rekombinant hergestellte Protein FH(SCR1-7) enthielt die ersten sieben SCR sowie die ersten 12 Aminosäuren des achten SCR entsprechend der Ratten FH cDNA-Sequenz (DEMBERG et al., 2002). Das für dieses Protein kodierende cDNA-Amplifikat umfasste 1362 Bp, was einer Größe von 454 Aminosäuren entsprach. Durch eine einfache Rechnung wurde die theoretisch zu erwartende Größe des rekombinanten Proteins berechnet. In der Literatur werden für den FH zwei Molekulargewichte vorgeschlagen, die bei 150 kDa (WHALEY und RUDDY, 1976) oder 155 kDa (SIM und DISCIPIO, 1982) liegen und auf der Bestimmung der Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten beruhen. Teilt man dieses Molekulargewicht durch die Anzahl der SCR und multipliziert den erhaltenen Wert mit der Anzahl der SCR, die das rekombinante Protein enthält, so bekommt man einen Wert, der in etwa das Molekulargewicht des rekombinanten Proteins angibt. Für den FH(SCR1-7) ergibt sich auf diese Weise ein Molekulargewicht von etwa 52,5 kDa (wenn Gesamt-FH=150 kDa) oder etwa 54,3 kDa (wenn Gesamt-FH=155 kDa). Da sich das mittels SDS-Gel unter

reduzierenden Bedingungen ermittelte relative Molekulargewicht mit der oben aufgeführten Berechnung von etwa 54 kDa deckte, konnte das von Schwaeble et al. (1987) postulierte relative Molekulargewicht von 43 kDa für das FHL-1 Protein, welches ebenfalls aus den ersten sieben SCR des humanen FH besteht, nicht zutreffen. Nach den Untersuchungen der eigenen Arbeit (Abb. 39) scheint die Gewichtsbestimmung von Schwaeble und Mitarbeitern nur aus dem Laufverhalten im SDS-Gel unter **nicht reduzierenden** Bedingungen abgeschätzt worden zu sein. Gegen ein rel. Molekulargewicht von 43 kDa spricht auch, dass im humanen FH in SCR 4 eine N-Glykosylierungsstelle vorhanden ist, die, weil das FHL-1 aus dem ersten sieben SCR besteht, in diesem ebenfalls vorhanden ist. Falls diese N-Glykosylierungsstelle tatsächlich glykosyliert ist, müsste sich das relative Molekulargewicht sogar noch um etwa 3 kDa erhöhen. Unterstützt wird die These, dass ein relatives Molekulargewicht von 43 kDa im SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen das tatsächliche Molekulargewicht des FH(SCR1-7) nicht repräsentiert, auch durch die Untersuchungen von Ripoche et al. (1988) und die Angaben von Zipfel und Skerka (1999) zum errechneten Molekulargewicht des FHL-1/Reconectin-Moleküls: Beide Gruppen geben für die humane FHL-1-Sequenz (SCR1-7) ein theoretisches Molekulargewicht von 49 kDa an. Dieses ergibt sich aus folgenden Überlegungen: Das FHL-1-Protein besteht aus 449 Aminosäuren, von denen 18 Aminosäuren der Leader-Sequenz zuzuschreiben sind, die bei der Ausschleusung des FHL-1 entfernt wird. Das für die verbleibenden Aminosäurereste (431 AS) berechnete Molekulargewicht des sezernierten Proteins beläuft sich auf 49 kDa (SKERKA und ZIPFEL, 1999; RIPOCHE et al., 1988). Wird nun noch eine maximale Verzuckerung durch die in SCR 4 enthaltene potentielle N-Glykosylierungsstelle von 3 kDa hinzuaddiert, so ergibt sich ein Molekulargewicht von 52 kDa. Die Molekulargewichtsdifferenz gegenüber dem FHL-1 der Publikationen von Schwaeble et al. (1987) und derselben Arbeitsgruppe unter der Autorenschaft von Estaller et al. (1991) beträgt damit fast 10 kDa, d.h. nahezu 1/5 des Gesamtgewichtes. Da das von uns rekombinant hergestellte FH(SCR1-7)-Protein nach der Entfernung der Leadersequenz 15 AS größer ist als das FHL-1-Protein, weil es 15 zusätzliche Aminosäurereste des SCR 8 enthält, müssen auf das Molekulargewicht von 49 kDa (ohne Verzuckerung) oder 52 kDa (inkl. Verzuckerung) noch ca. 1,7 kDa aufaddiert werden. Somit sollte der in dieser Arbeit rekombinant hergestellte FH(SCR1-7) ein theoretisches Molekulargewicht zwischen 50,7-53,7 kDa besitzen. Diese Daten decken sich mit den Erkenntnissen der eigenen Arbeit aus dem Laufverhalten des rekombinanten FH(SCR1-7) im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen, unter denen dieses Protein bei etwa 54 kDa aufgetrennt wurde.

Der rekombinant hergestellte FH(SCR1-4) besitzt eine Größe von 276 Aminosäuren ohne Leadersequenz (inkl. HIS-Tag). Das daraus resultierende theoretische Molekulargewicht

beläuft sich auf rund 34 kDa. Das von Sim und DiScipio (1982) und Alsenz et al. (1984) beschriebene tryptische FH-Fragment, welches die SCR1-5 enthält, zeigte mit einer angegebenen Größe von 34 kDa unter nicht reduzierenden Bedingungen (SIM und DISCIPIO, 1982) bzw. 38 kDa unter reduzierenden Bedingungen (ALSENZ et al., 1984; SCHULZ et al., 1986) wie auch der rekombinante FH(SCR1-4) ebenfalls Unterschiede in der Auftrennung im SDS-Gel, die offensichtlich im Zusammenhang mit der Benutzung eines reduzierenden Agenzes stehen.

Der gesamt-FH(SCR1-20), der in dieser Arbeit im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen mit einem relativen Molekulargewicht von 155 kDa detektiert wurde, wurde in der Publikation von Sim und DiScipio (1982) ebenfalls bei 155 kDa aufgetrennt. Die Autoren fanden über die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten und des Diffusionskoeffizienten ein Molekulargewicht zwischen 154,5-156,5 kDa heraus und waren damit offensichtlich genauer als Whaley und Ruddy (1976), die mittels der gleichen Methoden ein Molekulargewicht von 150 kDa festgestellt hatten. Darüberhinaus zeigten Sim und DiScipio (1982), ohne diesen Aspekt in ihrer Studie anzusprechen, dass der von ihnen chromatographisch aufgereinigte FH im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen ein etwa 20 kDa höheres relatives Molekulargewicht aufwies als unter nicht reduzierenden Bedingungen. Somit wurden die erstmalig innerhalb der eigenen Arbeit detailliert untersuchten Beobachtungen bereits von Sim und DiScipio (1982) experimentell dargestellt, auch wenn sie keinerlei Beachtung fanden.

Die unterschiedlichen Größen des FH(SCR1-20) sowie seiner Fragmente, des FH(SCR1-7) und des FH(SCR1-4) unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel lassen sich ganz offensichtlich auf die internen Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten I und III sowie II und IV in den jeweiligen SCR zurückführen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen nimmt das Protein offensichtlich eine elongierte, kettenähnliche Konformation ein, wohingegen unter reduzierenden Bedingungen, d.h. unter Spaltung der Disulfidbrücken das Protein in seiner dreidimensionalen Struktur ausladender zu sein scheint. Damit stellt es der Migration im SDS-Gel einen höheren Widerstand entgegen und wird bei einem höheren relativen Molekulargewicht detektiert. Diese in dieser Arbeit erstmalig konkretisierte These wird durch den vorhergesagten Aufbau eines SCR am Beispiel des humanen FHL-1-Proteins (SCR1-7 des FH) durch Zipfel und Skerka (1999) unterstützt. Die spezielle Struktur eines SCR könnte das in Abb. 39 gezeigte unterschiedliche Laufverhalten des FH und seiner verkürzten Varianten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen erklären. Zipfel und Skerka (1999) übertrugen damit das erstmalig für das C4b-bindende Protein, das aus 8 SCR pro Untereinheit besteht, von Janatova et al. (1989) entwickelte Modell der

Disulfidbrückenbildung innerhalb eines SCR auf den FH bzw. seine verkürzte Splicingvariante.

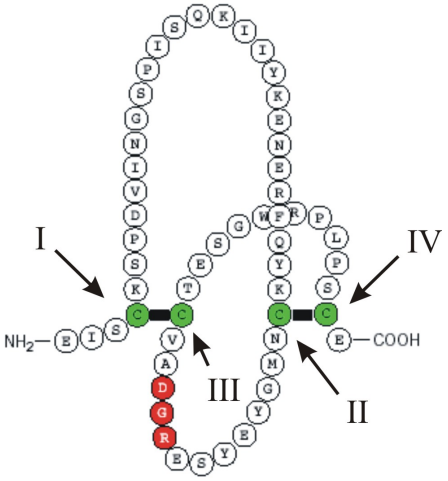


Abb. 58: Schematische Darstellung der von Zipfel und Skerka vorgeschlagenen Struktur für den SCR 4 des FHL-1/Reconectin und des FH
Die Cysteine sind grün und durch römischen Zahlen markiert. Rot ist das RGD-Motif für die Zelladhäsion gekennzeichnet.

Durch das Modell der Cystein-Cystein-Disulfidbrücken lassen sich auch die Molekulargewichtsunterschiede des immunaffinitästchromatographisch aufgereinigten und im SDS-Gel unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragenen FH erklären. So konnten in dieser Arbeit der immunaffinitätschromatographisch aufgereinigte FH unter reduzierenden Bedingungen mit einem relativen Molekulargewicht von 155 kDa im Immunblot detektiert und unter nicht reduzierenden Bedingungen mit einem rel. Molekulargewicht von nur etwa 125 kDa detektiert werden. Diesbezüglich stehen unsere Daten, die wie bereits erwähnt durch die Auftrennungen des humanen FH (SIM und DISCIPIO, 1982) bestätigt werden, in Kontrast zu den von Daha und van Es (1982) erhobenen. Daha und van Es (1982) konnten mit dem von ihnen chromatographisch aufgereinigten FH keinen Unterschied im rel. Molekulargewicht unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen feststellen. Eine Erklärung für diesen abweichenden Befund in der Arbeit von Daha und van Es (1982) kann in dieser Diskussion nicht geliefert werden.
Auch für den mittels Baculovirus-System hergestellten rekombinanten FH(SCR1-4), der in SF21-Insektenzellen exprimiert wurde, gilt dieser Grundsatz, auch wenn es durch den für die Aufreinigung des Proteins „angehängten“ HIS-Tag zusätzlich zu einer starken Dimerisierung kommt (Abb. 37, 39). Das Monomer des FH(SCR1-4) wurde in der eigenen Arbeit unter nicht reduzierenden Bedingungen bei etwa 28 kDa, unter reduzierenden Bedingungen bei etwa 36 kDa aufgetrennt.

4.6 Funktionen der isolierten FH(SCR1-20) und FI sowie der rekombinanten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) des klassischen Weges der Komplementaktivierung (CH_{50}-Test)

Durch die Publikationen von Gordon et al. (1995), Sharma und Pangburn (1996) und Pangburn et al. (2000) wurde durch die Untersuchung verschiedener FH-Deletionsmutanten oder verkürzter Varianten gezeigt, dass für die den FI betreffende Ko-Faktoraktivität des FH nur die ersten vier SCR von Bedeutung sind. Darüberhinaus bilden die SCR1-4 die erste C3b-Bindungsstelle. Die übrigen SCR 5-20 enthalten zwar zwei weitere C3b-bindende Bereiche (SCR 8-15 und SCR 19-20), die jedoch keine Ko-Faktorfunktion enthalten. Ihre Funktion liegt unter anderem in der Inhibition der Komplementkaskade durch die Bindung von C3b auf körpereigenen Zellen, die vor einem Komplementangriff geschützt werden müssen (SHARMA und PANGBURN, 1996; PANGBURN et al., 2000). Die Deletion der SCR11-15 führte dazu, dass eine Komplementinhibition nicht auf das System nicht aktivierenden Schaferythrozyten als Modell für körpereigene Zellen *in vitro* um das 6-10-fache zurückging (PANGBURN et al., 2000). In gleicher Weise führte die Deletion der SCR16-20 in demselben *in vitro*-Test dazu, dass die Inhibition der Komplementaktivität um das 11-16-fache reduziert wurde (PANGBURN et al., 2000). Die Deletion der SCR1-5 erniedrigte die C3b-Bindung 6-fach im Vergleich zum FH(SCR1-20) (SHARMA und PANGBURN, 1996). FH-Mutanten, bei denen die SCR6-10 bzw. die SCR16-20 deletiert worden waren, zeigten jeweils einen identischen, etwa 6-fachen Bindungsverlust im Vergleich zum FH(SCR1-20) (SHARMA und PANGBURN, 1996). Zusammenfassend kann aus den erhobenen Daten der Gruppe um Pangburn gefolgert werden, dass das FH-Protein über drei „gleichberechtigte“ C3b-Bindungstellen verfügt.

Wie in der Einleitung beschrieben, bezieht sich in Übereinstimmung mit fast allen Literaturangaben die Aktivität des FH(SCR1-20) in erster Linie auf den alternativen Komplementaktivierungsweg. Der FH kann die Bildung der aktiven C3-Konvertase (C3bBb) durch Verdrängung der Komponente Bb verhindern (kompetitive Funktion) (WEILER et al., 1976; WHALEY und RUDDY, 1976). Auf der Ebene der C5-Konvertase des alternativen Weges $(C3b)_2Bb$ wirkt der FH über seine so genannte „Decay Accelerating Activity“, über die in Analogie zur kompetitiven Funktion, d.h. ebenfalls durch die Bindung des FH an C3b, dieser Komplex zum Zerfall geführt wird. Als dritte den klassischen und den alternativen Aktivierungsweg betreffende Funktion wirkt der FH als Ko-Faktor für die Faktor I-vermittelte Spaltung und damit Inaktivierung der Komplementkomponente C3b. Die Funktion, dass der FH die Bildung der C5-Konvertase des klassischen Weges (C4b2b3b) durch Bindung an das

C3b-Molekül ebenfalls inhibieren kann, wird in der Literatur mit sehr wenigen Ausnahmen (LISZEWSKI et al., 1996; GIANNAKIS et al. 2001) unterschlagen. Gäbe es diese Funktion des FH nicht, so wäre sein in dieser Arbeit gezeigter massiver Effekt bei der Inhibition des klassischen Komplementhämolysetests (CH_{50}-Test) nicht erklärbar.

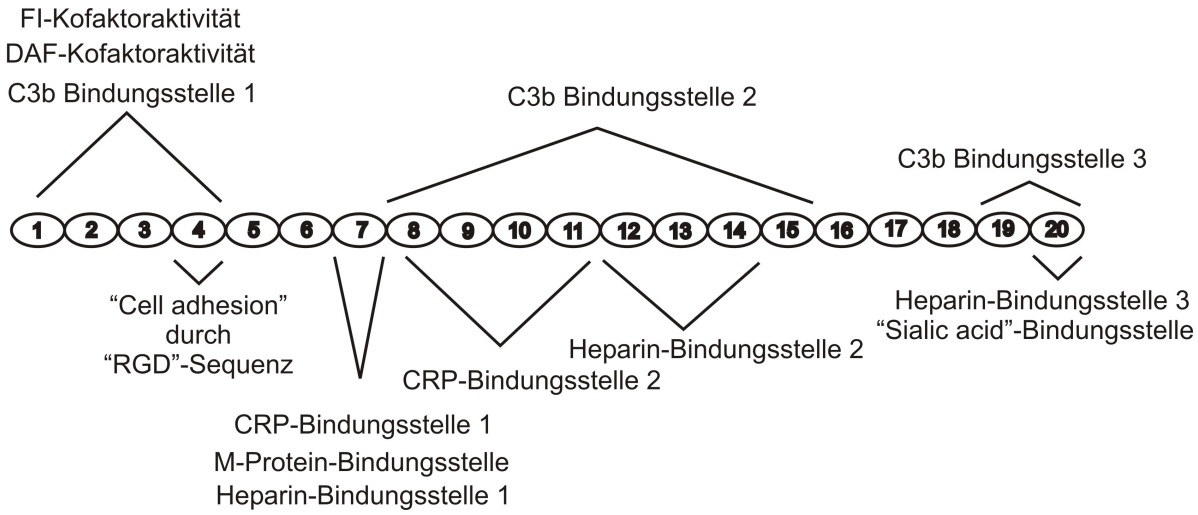


Abb. 59: Schematischer Aufbau des FH mit den Funktionen der einzelnen SCR innerhalb des Proteins.

Für die nun folgenden Kalkulationen wurde für den FI in Analogie zum humanen Serum eine durchschnittliche Konzentration von 40 µg/ml zu Grunde gelegt, so dass 40 ng absolut in den CH_{50}-Test eingingen. Daraus ergibt sich, dass für eine 50%ige Hemmung des CH_{50}-Wertes eine 66-fache, für eine Reduktion auf den nicht mehr zu drückenden Basiswert eine etwa 250-fache Erhöhung des in der Serumprobe vorhandenen FI notwendig war. Im Vergleich zum Zusatz des FH und seiner rekombinanten Varianten sind diese Daten eher ernüchternd. Mittels des in dieser Arbeit entwickelten ELISA wurde die Konzentration des FH im verwendeten Serumpool auf 700 µg/ml bestimmt, d.h. 700 ng FH absolut (4,27 pmol) gingen in den CH_{50}-Test ein. Eine 50%ige Hemmung ergab sich somit aus einer etwa 2,4-fachen Erhöhung (1,7 µg/ 10,4 pmol) dieses Wertes, eine Reduktion auf den Basiswert durch eine etwa 17-fache Erhöhung (12 µg/ 73,2 pmol) des absoluten FH(SCR1-20)-Gehaltes. Für die rekombinanten Varianten ergeben sich diesbezüglich folgende Werte, wobei die Basiswerte der kompletten Inhibition über eine Extrapolation der ensprechenden Inhibitionsgraphen gewonnen wurden, weil in den meisten Fällen aufgrund der begrenzten Volumenkapazität des CH_{50}-Tests ein Basiswert nicht gänzlich erreicht wurde:

Tabelle 1: Eingesetzte Gesamtmengen (µg abs.) der rekombinanten Faktoren zur 50%igen bzw. kompletten Inhibition.

Faktor H Variante	50%ige Inhibition (Zugabe abs.)	Faktor 50%ige Inhibition	Basiswert extrapoliert (komplette Inhib., Zugabe abs.)	Faktor Basiswert
FH(SCR1-7) aus HEK293	2 µg	2,9x	8 µg	11,4x
FH(SCR1-4) aus SF21	1,7 µg	2,4x	7 µg	10x

Aufgrund der Tatsache, dass der in HEK293-Zellen hergestellte FH(SCR1-7) nur etwa 1/3 des Molekulargewichtes des FH(SCR1-20) und der in SF21-Zellen exprimierte FH(SCR1-4) nur etwa 1/5 des Molekulargewichtes vom FH(SCR1-20) umfassen, müssen die Werte der obigen Tabelle um ebendiese Faktoren korrigiert werden, damit alle drei FH-Varianten untereinander in Bezug auf die im Test eingesetzte Teilchenzahl (d.h. molar) verglichen werden können (stöchiometrische Bereinigung).

Tabelle 2: Eingesetzte Gesamtmengen (µg abs.) und korrespondierende molare Mengen zur 50%igen bzw. kompletten Inhibition.

Faktor H Variante	50%ige Inhibition (Zugabe abs. und in pmol)	Korrigierter Faktor 50%ige Inhibition	Basiswert extrapoliert (komplette Inhib., Zugabe abs. und in pmol)	Korrigierter Faktor Basiswert
FH(SCR1-7) aus HEK293	2 µg (37 pmol)	8,7x	8 µg (148 pmol)	34,2x
FH(SCR1-4) aus SF21	1,7 µg (47,6 pmol)	12x	7 µg (196 pmol)	50x

Gemessen an der Erhöhung der entsprechenden Faktormengen im Serum erweist sich sowohl die Zugabe des FH(SCR1-20) als auch seiner Varianten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) als günstiger. Hierbei handelt es sich um einen für uns unerwarteten Befund, weil aufgrund theoretischer Überlegungen zu Beginn dieser Arbeit davon ausgegangen wurde, dass ein in 10-fach geringerer Konzentration im Serum vorliegender Komplementinhibitor durch eine entsprechend geringere Konzentrationserhöhung bereits einen deutlichen Effekt zeigt. Offensichtlich ist jedoch der direkt inhibierende Einfluss des FH durch die Bindung des C3b mit nachfolgender Inhibition der C5-Konvertase des klassischen Weges (C4b2b3b) weitaus wichtiger als seine Einflussnahme auf die Inhibition des klassischen Komplement-aktivierungsweges als Ko-Faktor des FI. Diese Hypothese wird untermauert durch den

kombinatorischen Einsatz beider Faktoren, aus dem als Nettoeffekt dieses Hämolysetests keinerlei Synergismus abgeleitet werden kann. Untersuchungen von DiScipio (1992) legten einen solchen Synergismus zunächst nahe. Der Nutzen, FI und FH in Kombination zur Komplementinhibition zu verwenden, schien aus seinen Untersuchungen hervorzugehen, die zeigten, dass die Affinität von humanem FI für C3b in Gegenwart des FH um das 15-fache gesteigert wird.

Unter pragmatischen Gesichtspunkten erscheint es relativ egal, ob die Komplementinhibition durch Zugabe des FI oder FH bzw. seiner rekombinanten Varianten durchgeführt wird, weil die absoluten Mengen zur Erreichung desselben Maßes an Inhibitions im CH_{50}-Test näherungsweise nicht all zu sehr variieren. Weil allerdings der FH aufgrund seiner 10-fach höheren Serumkonzentration mit erheblich geringerem Aufwand mittels Immunaffinitäts-chromatographie aus Serum aufzureinigen ist und die rekombinante Expression mittels Baculovirussystem zu vergeichsweise guten Ausbeuten führt, werden die im Ausblick unterbreiteten Experimente höchstwahrscheinlich mit diesen beiden Varianten durchgeführt werden.

Im ersten Absatz dieses Kapitels wurde einleitend erwähnt, dass der Faktor H(SCR1-20) über drei Bindungsstellen für die Komponente C3b verfügt. Bereits die Studien von Sharma und Pangburn (1996) und Pangburn et al. (2000) legten nahe, dass alle drei Bindungsstellen durch C3b belegt werden. Aus unseren Daten zum molaren Einsatz (Tabelle 2, mit stöchiometrischer Bereinigung) ergibt sich unter Berücksichtigung der Quotienten [verwendete Mole der FH-Varianten/ eingesetzte Mole FH(SCR1-20)] für die 50%ige bzw. komplette Hemmung folgende Werte:

Tabelle 3: Quotienten der molaren Mengen [FH(SCR1-7)/FH(SCR1-20)] und [FH(SCR1-4)/FH(SCR1-20)] bei der 50%igen bzw. kompletten Inhibition.

	50%ige Inhibition	**Basiswert (komplette Inhibition)**
Quotient pmol FH(SCR1-7)/ pmol FH(SCR1-20)	3,6 37 / 10,4	2 148 / 73,2
Quotient pmol FH(SCR1-4)/ pmol FH(SCR1-20)	4,5 47,6 / 10,4	2,7 196 / 73,2

Eine Mittelwertbildung der vier Quotienten ergibt einen Wert von etwa 3,2 und steht somit für eine 3-fach höhere molare Aktivität des drei C3b-Bindungsstellen umfassenden FH(SCR1-20) im Vergleich zu den jeweils nur eine C3b-Bindungsstelle enthaltenden FH(SCR1-7) und

FH(SCR1-4). Durch die nachgewiesene etwa dreifach höhere Aktivität des FH(SCR1-20) im Vergleich zu den beiden rekombinanten Varianten, legen auch die in dieser Arbeit durchgeführten Hämolyseexperimente nahe, dass der FH(SCR1-20) für eine Komplementinhibition alle drei C3b-Bindungsstellen einsetzt.

4.7 Nicht funktionierende Untersuchung der Komplement-inhibitorischen Faktoren im Hämolysetest zur Darstellung des alternativen Weges der Komplementaktivierung ($APCH_{50}$-Test)

Wie unter 3.17.1 beschrieben konnten keine Daten zur Funktion der immunaffinitätschromatographisch gewonnenen Rattenfaktoren H und I sowie der rekombinant erzeugten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) in der Variation des den alternativen Weg der Komplementaktivierung darstellenden $APCH_{50}$-Tests gewonnen werden. Die Adaptation des $APCH_{50}$-Tests an Rattenserum ließ sich grundsätzlich nicht durchführen. Mit humanem Serum ließ sich zwar ein $APCH_{50}$-Wert einstellen, allerdings konnte dieser Wert nicht durch die Zugabe der inhibitorischen Faktoren beeinflusst werden.

Ein Grund für den nicht funktionellen Einsatz der Rattenfaktoren könnte die evolutionäre Distanz zwischen Ratte und Mensch sein. So weist das Komplementsystem der Nager zum Beispiel ein Komplementregulatorprotein auf, welches im Menschen und anderen Säugern nicht aufzufinden ist und für das es offensichtlich auch kein homologes Protein gibt. Dieses als Crry („complement receptor 1-related gene/ protein y“) bezeichnete Protein (AEGERTER-SHAW et al., 1987; PARKS et al., 1987) spielt in der Regulation des Komplementsystems der Nagetiere eine bedeutende Rolle. Ähnlich dem „Decay Accelerating Factor“ (DAF), den es in Ratten, Mäusen und im Menschen in einer membrangebundenen und in einer löslichen Form gibt, kommt das Crry-Protein in Ratten und Mäusen ebenfalls im Serum und als Membranprotein vor. Wie die meisten Komplementinhibitoren ist es ebenfalls modulär aufgebaut. In der Ratte besteht es aus 6-7 SCR, wobei die ersten 4 SCR einen hohen Grad an Homologie mit dem ersten SCR des humanen CR1 zeigen. Die weiteren SCR des Crry besitzen eine starke Homologie mit den letzten beiden SCR des humanen CR1. Untersuchungen in der Maus haben gezeigt, dass der DAF in der fluiden Phase ein potenterer Inhibitor der C3-Konvertase des klassischen Weges ist, wohingegen das Crry ein wesentlich effektiverer Inhibitor der C3-Konvertase des alternativen Komplementaktivierungsweges ist (KRAUS et al. 2000). Diese Betrachtungen zeigen, dass der aus der Diagnostik des humanen Systems stammende $APCH_{50}$-Test nicht zwangsläufig für die Darstellung und Modifikation des alternativen Komplement-aktivierungsweges der Ratte geeignet sein muss.

4.8 Ausblick / Zukünftige Experimente

Für die weitere Expression der rekombinanten Varianten des FH [FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4)] sollen die Methoden weiter verfeinert werden, um hohe Ausbeuten bei möglichst geringem zeitlichem und finanziellem Aufwand zu erzielen. Hierzu soll der FH(SCR1-4), der im Baculovirussystem in Insektenzellen erfolgreich hergestellt wurde, im mittleren Maßstab in so genannten „Spinner Flasks“ (Rührkulturflaschen) mit einem Volumen von maximal zwei Litern rekombinant hergestellt werden. Die Zellen können in diesen Rührkulturflaschen in einer wesentlich höheren Zelldichte kultiviert werden. Eine höhere Zelldichte bei gleicher Infektionsrate (MOI) wie in einer statischen Kultur verspricht wesentlich höhere Ausbeuten an rekombinantem Protein pro Milliliter.

Der FH(SCR1-7) soll aufgrund der in dieser Arbeit erzielten relativ geringen Ausbeuten bei der Expression in Säugerzellen in Zukunft analog dem FH(SCR1-4) in einen baculoviralen Vektor einkloniert und anschließend in Insektenzellen zur Expression gebracht werden.

Für die rekombinante Expression des Ratten FI ist ihre Wiederholung in Säugerzellen geplant. Für Zellen, die sich zwar grundsätzlich gut transfizieren lassen, die das PACE aber nicht oder nur schwach konstitutiv exprimieren, soll eine Kotransfektion der Zellen mit einem für dieses Enzym kodierenden Vektor erfolgen. So soll sichergestellt werden, dass die mit dem FI transfizierten Zellen unabhängig von der Stärke des konstitutiv vorhandenen PACE-Amplifikates in den entsprechenden PCR-Untersuchungen ausreichend Enzym für eine zweikettige Prozessierung des rekombinant exprimierten FI zur Verfügung stellen.

Parallel soll der FI ebenfalls in Insektenzellen exprimiert werden. Kürzlich wurde eine Insektenzelllinie der Firma Invitrogen vorgestellt, die auch komplexe Glykosylierungen durch die genomische Integration von Säugergenen, die für Verzuckerungsenzyme kodieren, durchführen kann. Durch diese als „Mimic™Sf9“ bezeichneten Insektenzellen soll es laut Hersteller möglich sein, Proteine auch mit einem nur in Säugerzellen vorzufindenden Glykosylierungsmuster (z.B. mit endständigen Sialinsäuren) rekombinant herzustellen.

Die hergestellten rekombinanten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) sowie die zur Homogenität aufgereinigten FH und FI sollen in experimentellen Erkrankungen der Ratte eingesetzt werden. Durch den Einsatz dieser Faktoren soll der Anteil des Komplementsystems an der Pathogenese dieser Erkrankungen insbesondere in Bezug auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Ischämie/Reperfusions-Schäden nach Gefäßligationen *in vivo* untersucht werden. Ein erster Ansatz zur Komplementmodifikation *in vivo* wurde von Veerhuis et al. (1985) publiziert. In der Studie von Veerhuis und Mitarbeitern wurde das Komplementsystem von Ratten durch die intravenöse Gabe von inhibitorischen anti-FH

Antikörpern in Dosen von 2,1-8,4 mg/Tier beeinflusst. Gegenüber den Kontrolltieren (unspezifische IgG-Gabe) war eine deutliche Aktivierung des Komplementsystems von durchschnittlich mehr als 80% zu verzeichnen. Durch diese Experimente von Veerhuis und Mitarbeitern wurde erstmalig gezeigt, dass das Komplementsystem *in vivo* gezielt beeinflußt werden kann. In einer weiteren Studie (WEISMAN et al., 1990) wurden in einem Rattenmodell die auf einen „Myokardinfarkt“ folgende Gewebenekrose durch die Applikation des rekombinanten löslichen humanen Komplementrezeptors vom Typ 1 (sCR 1) günstig beeinflusst. Die immunhistochemisch nachgewiesene Gewebeschädigung konnte um 44% reduziert werden.

Für die unmittelbare Zukunft ist geplant, die zur Verfügung stehenden Komplement-inhibitorischen Faktoren gesunden Ratten *in vivo* zu verabreichen, um Aufschlüsse über die Dosierung dieser Faktoren zur vollständigen Komplementinhibition zu erhalten (Dosis-Effekt-Kurve). Darüberhinaus soll die Zeitkinetik der Inhibition bei einmaliger Applikation der Faktoren untersucht werden. Beide Parameter sollen durch die Abnahme von Blut aus dem Komplement-supprimierten Tier in noch zu definierenden Zeitabständen gemessen werden. Das aus dem Blut gewonnene Serum wird dann *in vitro* einem CH_{50}-Hämolysetest unterzogen. Auch eine eventuelle Applikation der im Zuge dieser Arbeit hergestellten Komplement-inhibitorischen Faktoren über einen längeren Zeitraum oder in wiederholten hohen Dosen ist aus der derzeitigen Sicht unproblematisch, weil es sich bei den verabreichten Faktoren um körpereigene Proteine handelt, die nicht immunogen sein sollten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die zuvor nicht bekannte komplette cDNA-Sequenz des Ratten FH identifiziert. Zusätzlich wurden zwei verkürzte rekombinante Varianten des Ratten FH hergestellt. Eine bestand aus den ersten 7 SCR des FH und wurde in HEK293- und Mono-Mac-6-Säugerzellen exprimiert, die andere bestand aus den ersten 4 SCR des FH und wurde mit Hilfe des Baculovirussystems in SF21-Insektenzellen exprimiert. Beide rekombinanten Faktoren FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) zeigten eine Komplement-inhibitorische Wirkung im CH_{50}-Hämolysetest und konnten damit als funktionell aktiv charakterisiert werden.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen anti-FH Antikörpers (mAK 4-7D) konnte eine immunaffinitätschromatographische Aufreinigung des FH aus Rattenserum etabliert werden, die den Gesamt-FH(SCR1-20) im zweistelligen mg-Bereich für strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Verfügung stellte. In Verbindung mit dem ebenfalls neu generierten anti-FH IgG (polyklonaler Antikörper des Kaninchens) wurde für die Detektion und Quantifizierung des FH ein Sandwich-ELISA etabliert. Durch die bereits im Rahmen der eigenen Diplomarbeit („Induktion und Regulation des Komplementproteins Faktor I“) erfolgte Generierung eines monoklonalen anti-Ratten FI Antikörpers und die innerhalb dieser Arbeit zusätzlich erfolgte Herstellung eines polyklonalen anti-Ratten FI IgG (ebenfalls aus dem Kaninchen) wurden weitere Werkzeuge für die Detektion des FI im Immunblotverfahren geschaffen. Durch die Immobilisierung des anti-Ratten FI mAK15F11-2 an einer Matrix war es zusätzlich möglich, den Ratten FI in funktionell aktiver Form aus Serum zu isolieren. Die beiden mittels Immunaffinitätschromatographie aus Serum isolierten Faktoren H und I erwiesen sich wie auch die beiden rekombinanten FH-Varianten (SCR1-4 und SCR1-7) im CH_{50}-Hämolysetest als aktive Proteine, so dass sie für weitere *in vitro* aber auch für geplante *in vivo* Experimente zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend sei festgestellt, dass mit dieser Arbeit eine breite Basis an Werkzeugen für die Detektion, Quantifizierung und strukturelle Untersuchung der Komplement-inhibitorischen Faktoren H und I der Ratte geschaffen wurde. Darüberhinaus stehen beide Faktoren in zur Homogenität aufgereinigter Form, der Faktor H zusätzlich in zwei rekombinanten Varianten (SCR1-4 und SCR1-7) funktionell aktiv für einen therapeutischen Einsatz in verschiedenen Krankheitsmodellen der Ratte zur Verfügung.

6 Literaturverzeichnis

Adinolfi M., Dobson N.C., Bradwell A.R.; Synthesis of two components of human complement, beta 1H and C3bINA, during fetal life.
Acta Paediatr. Scand. 1981; 70: 705-710.

Aegerter-Shaw M., Cole J.L., Klickstein L.B., Wong W.W., Fearon D.T., Lalley P.A.; Expansion of the complement receptor gene family. Identification in the mouse of two new genes related to the CR1 and CR2 family.
J.Immunol. 1987; 138:3488-3894.

Agostini A., Lijnen H.R., Pixley R.A., Colman R.W., Schapira M.; Interaction of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C1-inhibitor.
J.Clin.Invest. 1984; 73:1542-1549.

Ahearn J.M., Fearon D.T.; Structure and function of the complement receptors, CR-1 (CD35) and CR-2 (CD21).
Adv.Immunol. 1989; 6:183-219.

Alsenz J., Lambris J.D., Schulz T.F., Dierich M.P.; Localization of the complement-component C3b-binding site and the cofactor activity for factor I in the 38 kDa tryptic fragment of factor H.
Biochem.J. 1984; 244:389-398.

Amadaei N., Baracho G.V., Nudelman V., Bastos W., Florido M.P., Isaac L.; Inherited complement factor I deficiency associated with systemic lupus erythematosus, higher susceptibility to infection and low levels of factor H.
Scand.J.Immunol. 2001; 53:615-621.

BacPAK™ Baculovirus Expression System User Manual; Document-Nr.: PT1260-1;
Clontech, Mai 1999.

Barnes D.W., Reing J.; Human spreading factor: synthesis and response by HepG2 cells in culture.
J.Cell.Physiol. 1985; 125:207-214.

Barnum S.R., Dahlbaeck B.; C4b-binding protein, a regulatory component of the classical pathway of complement, is an acute-phase protein and is elevated in systemic lupus erythematosous.
Compl.Inflamm: 1990; 7:71-77.

Bock S.C., Skriver K., Nielsen E., Huber R., Thogersen H.C., Wiman B., Donaldson V.H., Eddy R.C., Marrinan J., et al.; Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization.
Biochemistry 1986; 25:4292-4301.

Bordier C.; Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution.
J.Biol.Chem. 1981; 256:1604-1607.

Brodbeck W.G., Liu D., Sperry J., Mold C., Medof M.E.; Localization of classical and alternative pathway regulatory domains in human decay-accelerating factor.
J.Immunol. 1996; 156:2528-2533.

Catterall C.F., Lyons A., Sim R.B., Day A.J., Harris T.J.; Characterisation of primary amino acid sequence of human complement control protein factor I from analysis of cDNA clones.
Biochem. J. 1987; 242: 849-856.

Charlesworth J.A., Scott D.M., Russell B.A., Peters D.K.; Metabolism of human beta 1H: studies in man and experimental animals.
Clin.Exp.Immunol. 1979; 38:397-404.

Choi N.H., Nakano Y., Tobe T., Mazda T., Tomita M.; Incorporation of SP-40,40, into the soluble membrane attack complex (SMAC, SC5b-9) of complement.
Int. Immunol. 1990; 2:413-417.

Clas F., Loos M.; Antibody-independent binding of the first component of complement (C1) and its subcomponent C1q to the S and R forms of Salmonella minnesota.
Infec. Immun. 1981; 31:1138-1144.

Cooper N.R., Jensen F.C., Welsh R.M. Jr., Oldstone M.B.A.; Lysis of RNA tumor viruses by human serum: direct antibody-independent triggering of the classical complement pathway. J.Exp.Med. 1976; 144:970-984.

Daffern P.J., Pfeifer P.H., Ember J.A., Hugli T.E., C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. J.Exp.Med 1995; 181:2119-2127.

Daha M.R., van Es L.A.; Isolation, characterisation, and mechanism of action of rat beta 1H. J.Immunol. 1982; 128:1839-1843.

Davies A. E., Simmons D.L., Hale G., Harrison R.A., Tighe H., Lachmann P.J., Waldmann H.; CD59, an LY6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologues cells.
J.Exp.Med. 1989; 170:637-654.

Davies A.E., Harrison R.A.; Structural characterisation of factor I mediated cleavage of the third component of complement.
Biochemistry 1982; 21: 5745-5749.

Day A.J., Baron M.; Structure/function interrelationships of mosaic proteins.
J.Biomed. Sci. 1991; 1: 153-163.

Demberg T., Pollok-Kopp B., Gerke D., Götze O., Schlaf G.; Rat complement factor H: molecular cloning, sequencing and quantification with a newly established ELISA. Scand.J.Immunol. 2002; 56:149-160.

De Silva H.V., Stuart W.D., Duvic C.R., Wetterau J.R., Ray M.J., Ferguson D.G., Albers H.W., Smith W.R., Harmony J.A.; A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins.
J.Biol.Chem. 1990; 265:13240-13247.

DiScipio R.G.; The binding of human complement proteins C5, Factor B, β1H and properdin to complement fragment C3b on zymosan.
Biochem.J. 1981; 199:485-496.

DiScipio R.G.; Ultrastructures and interaction of complement factors H and I.
J.Immunol. 1992; 149:2592-2599.

DiScipio R.G., Hugli T.E.; The molecular architecture of human complement component C6.
J. Biol. Chem. 1989; 264: 16197-16206.

DiScipio R.G., Gehring M.R., Podack E.R., Kan C.C., Hugli T.E., Fey G.H.; Nucleotide sequence of cDNA and derived amino acid sequence of human complement component C9.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984; 81: 7298-7302.

Dodds A.W., Day A.J.; Complement in health and disease (K. Whaley, ed.).
Kluwer Academic Pupl. 1993, Dordrecht, The Netherlands.

Dodds A.W., Sim R.B., Porter R.R., Kerr M.A.; Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates.
Biochem.J. 1978; 175:383-390.

Ebenbichler C.F., Thielens N.M., Vornhagen R., Marschang P., Arlaud G.J., Dierich M.P.; Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp^{41}.
J.Exp.Med. 1991; 174:1417-1424.

Elsner J., Oppermann M., Czech W., Dobos G., Schopf E., Norgauer J., Kapp A.; C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils.
Eur.J.Immunol. 1994; 24:518-522.

Estaller C., Koistinen V., Schwaeble W., Dierich M.P., Weiss E.H.; Cloning of the 1,4 kB mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150 kDa molecule.
J.Immunol. 1991; 146:3190-3196.

Falk R.J., Dalmasso A.P., Kim Y., Tsai C.H., Scheinman J.I., Gewurz H., Michael A.F.; Neoantigen of the polymerized ninth component of complement. Characterization of a monoclonal antibody and immunohistochemical localization in renal disease.
J.Clin.Invest. 1983; 72:560-573.

Fearon D.T., Austen K.F.; Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase.
J.Exp.Med. 1975; 142:856-863.

Fearon D.T., Austen K.F.; Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms.
Proc.Natl.Acad. Sci. USA 1977; 74:1683-1687.

Fearon D.T.; Regulation by membrane sialic acid of β1H-dependant decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1978; 75:1971-1975.

Fearon D.T.; Purification of C3b inactivator and demonstration of its two polypeptide chain structure.
J.Immunol. 1977; 119: 1248-1252.

Fink T.M., Jenne D.E., Lichter P.; The human vitronectin (complement S-protein) gene maps to centromeric region of 17q.
Human Genet. 1992; 88:569-572.

Fink T.M., Zimmer M., Tschopp J., Etienne J., Jenne D.E., Lichter P.; Human clusterin (CLI) maps to 8p21 in proximity to the lipoprotein lipase (LPL) gene.
Genomics 1993; 16:526-528.

Freeman M., Ashkenas J., Rees D.J., Kingsley D.M., Copeland N.G., Jenkins N.A., Krieger M.; An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1990; 87: 8810-8817.

Friedberger E.; Weitere Untersuchungen über Eisissanaphylatoxie: IV. Mitteilung. Immunitaeta-forsch.Exp.Ther. 1910; 4:636-690.

Friese M.A., Hellwage J., Jokiranta S., Meri S., Peter H.H., Eibel H., Zipfel P.F.; FHL-1/reconectin and factor H: two human complement regulators which are encoded by the same gene are differently expressed and regulated.
Molec. Immunol. 1999; 36: 809-818.

Fujita T., Inoue T., Ogawa K., Iida K., Tamura N.; The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertase by dissociating C2a and Bb.
J.Exp.Med. 1987; 166:1221-1228.

Fujita T., Gigli I., Nussenzweig V.; Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator.
J.Exp.Med. 1978; 148:1044-1051.

Gardner W.D., White P.J., Hoch S.O.; Identification of a major human serum DNA-binding protein as beta 1H of the alternative pathway of complement activation. Biochem.Biophys.Res.Commun. 1980; 94:61-67.

Gigli I., Mason J.W., Colman R.W., Austen K.F.; Interaction of plasma kallikrein with the C1 inhibitor.
J.Immunol. 1970; 104:574-581.

Goetzl E.J., Austen K.F.; Stimulation of human neutrophil leukocyte aerobic glucose metabolism by purified chemotactic factors.
J.Clin.Invest. 1974; 53:591-599.

Golan M.D., Burger R., Loos M.; Conformational changes in C1q after binding to immune complexes detection of neoantigens with monoclonal antibodies.
J.Immunol. 1982; 129:445-447.

Goldberger G., Arnaout M.A., Aden D., Kay R., Ritz M., Colten H.R.; Biosynthesis and postsynthetic processing of human C3b/C4b inactivator (factor I) in three hepatoma cell lines.
J. Biol. Chem. 1984; 259: 6492-6497.

Goldberger G., Bruns G.A.P., Ritz M., Edge, M.D., Kwiatkowski D.J.; Human complement factor I: Analysis of cDNA-derived primary structure and assignment of its gene to chromosome 4.
J. Biol. Chem. 1987; 262: 10065-10071.

Gonzalez-Rubio C., Ferreira-Cerdan A., Ponce I.M., Arpa J., Fontan G., Lopez-Trascasa M.; Complement factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation.
Arch.Neurol. 2001; 58:1923-1928.

Gordon D.L., Kaufman R.M., Blackmore T.K., Kwong J., Lublin D.M.; Identification of complement regulatory domains in human factor H.
J.Immunol. 1995; 155:348-356.

Heiner-Suner D., Diaz-Guillen M.A., de Villena F.P., Robledo M., Benitez J., Rodriguez de Cordoba S.; A high-resolution map of the regulator of the complement activation gene cluster on 1q32 that integrates new genes and markers.
Immunogenetics 1997; 45:422-427.

Hekhl-Ostreicher B., Ragg S., Drechsler M., Scherthan H., Royer-Pokora B.; Localization of the human CD59 gene by fluorescence in situ hybridisation and pulse-field gel electrophoresis.
Cytogenet.Cell.Genet. 1993; 63:144-146.

Hellwage J., Jokiranta T.S., Friese M.A., Wolk T.U., Kampen E., Zipfel P.F., Meri S.; Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H.
J.Immunol. 2002; 169:6935-6944.

Henson P.M.; The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles.
J.Immunol. 1971; 107:1535-1546.

Hourcade D., Holers V.M., Atkinson J.P.; The regulators of complement activation (RCA) gene cluster.
Adv.Immunol. 1989; 45:381-416.

Hsiung M.L., Barclay A.M., Gagnon J., Brandon M.R., Porter R.R.; The C3b inactivator is a serine protease.
Mol. Immunol. 1982; 19:1376 (abstract).

James R.W., Hochstrasser A.C., Borghini I., Martin B., Pometta D., Hochstrasser D.; Characterization of a human high density lipoprotein-associated protein, NA1/NA2. Identity with SP-40,40, an inhibitor of complement-mediated cytolysis.
Arterioscler.Thromb. 1991; 11:645-652.

Janatova J., Reid K.B., Willis A.C.; Disulfide bonds are localized within the short consensus repeat units of complement regulatory proteins: C4b-binding protein.
Biochemistry 1989; 28:4754-61.

Jenne D., Stanley K.K., Nucleotide sequence and organization of the human S-protein gene: Repeating peptide motifs in the „pexin“ family and a model for their evolution.
Biochemistry 1987; 26:6735-6742.

Ji Y-H., Fujita T., Hatsuse H., Takahashi A., Matsushita M., Kawakami M.; Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor.
J.Immunol. 1993; 150:571-578.

Jouvin M.H., Kazatchkine M.D., Cahour A., Bernard N.; Lysine residues, but not carbohydrates, are required for regulatory function of H on the amplification C3 convertase of complement.
J Immunol 1984; 133:3250-3254

Julen N., Dauchel H., Lemercier C., Sim R.B., Fontaine M., Ripoche J.; In vitro biosynthesis of complement factor I by human endothelial cells.
Eur. J. Immunol. 1992; 22: 213-217.

Kazatchkine M.D., Fearon D.T., Austen K.F.; Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and β1H for cell-bound C3b.
J.Immunol. 1979; 122:75-81.

Kozak M.; At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells.
J.Mol.Biol. 1987; 196:947-950.

Kraus D., Guthbridge J.M., Marsh jr. H.C., Holers V.M.; A direct comparison of complement inhibitory capacities of the GPI and transmembrane forms of mouse DAF to mouse Crry and human rsCR1.
Immunopharmacology 2000; 49:46 (abstract).

Kristensen T., Tack B.F.; Murine protein H is comprised of 20 repeating units, 61 amino acids in length.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1986; 83:3963-3967.

Kühn S., Zipfel P.F.; The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion histidine-tagged proteins.
Gene 1995; 162(2):225-229.

Kunnath-Muglia L.M., Chang G.H., Sim R.B., Day A.J., Ezekowitz R.A.B.; Characterisation of Xenopus laevis complement factor I structure-conservations of molecular structure except for unusual insert not present in human factor I.
Molec. Immunol. 1993; 30: 1249-1256.

Lachmann P.J., Müller-Eberhardt H.J.; The demonstration in human serum of "conglutininogen activating factor" and its effect on the third component of complement. J.Immunol. 1968; 100: 691-698.

Lachmann P.J., Nicol P.; Reaction mechanism of the alternative pathway of complement fixation.
Lancet 1973; 1: 465-467.

Laemmli U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 1970; 277:680-685.

Lambris J.D., Dobson N.J., Ross G.D.; Release of endogenous C3b inactivator from lymphocytes in response to triggering membrane receptors for ß1H globulin.
J.Exp.Med. 1980; 152: 1625-1644.

Lepow I.H., Willms-Kretschmer R.A., Patrick R.A., Rosen F.S.; Gross and ultrastructural observations of lesions produced by intradermal injection of human C3a in man.
Am J.Pathol. 1970; 61:13-20.

Liszewski M., Farries T., Lublin D., Rooney I., Atkinson J.; Control of the complement system.
Adv.Immunol. 1996; 61:201-283.

Lockert D.H., Kaufman K.M., Chang C.P., Husler T., Sodetz J.M., Sims P.J.; Identity of the segment of human complement C8 recognized by complement regulatory protein CD59. J.Biol.Chem. 1995; 270:19723-19728.

Loos M., Antibody-independent activation of C1, the first component of complement.
Ann. Immunol. (Inst Pasteur) 1982; 133C:165-179.

Matsushita M., Fujita T., Inhibition of mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) by C1 inhibitor (C1 INH).
Mol.Immunol. 1996; 33:44.

Matsushita M., Fujita T., Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease.
J.Exp.Med. 1992; 176:1497-1502.

Matsushita M., Fujita T.; Inhibition of mannose-binding protein-associated serine protease (MASP) by C1 inhibitor (C1 INH).
Mol.Immunol. 1996; 33:44 (abstract).

McAleer M.A., Ripoche J., Day A.J., Sim R.B.; Alternative splicing in factor H, a member of the RCA gene family.
Genome 1988; 30:136 (abstract).

Minta J.O., Wong M.J., Kozak C.A., Kunnath-Muglia L.M., Goldberger G.; cDNA cloning, sequencing and chromosomal assignment of the gene for mouse complement factor I (C3b/C4b inactivator), identification of species specific divergent segment in factor I.
Molec. Immunol. 1996; 33: 101-112.

Misasi R., Huemer H.P., Schwaeble W., Sölder E., Larcher C., Dierich M.P.; Human complement factor H: an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement.
Eur.J.Immunol. 1989; 19:1765-1768.

Misumi Y., Sohda M., Ikehara Y.; Sequence of the cDNA encoding rat furin, a possible propetide-processing endoprotease.
Nucleic Acids Res. 1990:18 (22):6719.

Miwa T., Song W.C.; Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases.
Int.Immunopharmacology 2001; 1:445-459.

Mollnes T.E., Lea T., Harboe M.; Detection and quantification of the terminal C5b-C9 complex of human complement by a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. Scand.J.Immunol. 1984; 20:157-166.

Murphy B.F., Saunders J.R., O´Bryan M.K., Kirszbaum L., Walker I.D., d´Apice A.J.; SP-40,40 is an inhibitor of C5b-6-initiated haemolysis.
Int.Immunol. 1989; 1:551-554.

Nakabayashi H., Taketa K., Miyano K., Yamane T., Sato J.; Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium.
Cancer Res. 1982, 42:3858-3863.

Nakano Y., Tozaki T., Kikuta N., Tobe T., Oda F., Miura N., Sakamoto T, Tomita M.; Determination of the active site of CD59 with synthetic peptides.
Mol.Immunol. 1995; 32:241-247.

Nicol A.E., Lachmann P.J.; The alternative pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF).
Immunology 1973; 24: 259-275

Nilsson G., Johnell M., Hammer C.H., Tiffany H.L., Nilsson K., Metcalfe D.D., Siegbahn A., Murphy P.M.; C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via pertussis toxin sensitive signal transduction pathway.
J.Immunol. 1996; 157:1693-1698.

Oglesby T.J., Allen C.J., Liszewski M.K., White D.J.G., Atkinson J.P.; Membrane cofactor protein (CD46) protects cells from complement-mediated attack by an intrinsic mechanism. J.Exp.Med. 1992; 175: 1547-1551.

Ollert M.W., Kadlec J.V., David K., Petrella E.C., Bredehorst R., Vogel C.W.; Antibody-mediated complement activation on nucleated cells. A quantitative analysis of the individual reaction steps.
J.Immunol. 1994; 153:2213-2221.

Pangburn M.K., Pangburn K.L.W., Koistinen V., Meri S., Sharma A.K.; Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: Interaction among factor H, C3b, and target in the alternative pathway of human complement.
J.Immunol. 2000; 164:4742-4751.

Pangburn M.K., Müller-Eberhard H.J.; The alternative pathway of complement. Semin.Immunopathol. 1984; 7:163-192.

Pangburn M.K., Schreiber R.D., Müller-Eberhard H.J.; Formation of the initial C3-convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3.
J.Exp.Med. 1981; 154:856-867.

Pangburn M.K., Schreiber R.D., Müller-Eberhardt H.J.; Human complement C3b inactivator: isolation, characterisation and demonstration of an absolute requirement for the serum protein ß1H for cleavage of C3b and C4b in solution.
J.Exp.Med. 1977; 146: 257-270.

Parks D.L., Gruner B.A., Hourcarde D.E., Holers V.M.; Characterization of a murine cDNA with both intra- and extra-cytoplasmic homology to human CR1.
Complement 1987; 4:3 (abstract).

Perkins S.J., Smith K.F., Amatayakul S., Ashford D., Rademacher T.W., Dwek R.A., Lachmann P.J., Harrison R.A., et al.; Two-domain structure of native and reactive centre cleaved forms of C1 inhibitor of human complement by neutron scattering.
J.Mol.Biol. 1990; 214:751-763.

Pieters W.R., Houghten R.A., Koenderman L., Raaijmakers J.A.; C5a-induced migration of human monocytes is primed by dexamethasone.
Am.J.rspir.Cell.Mol.Biol. 1995; 12:691-696.

Pillemer L., Blum L., Lepow I.H., Ross O.A., Todd E.W., Wardlaw E.W.; The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena.
Science 1954; 120:279-285.

Post T.W., Liszewski M.K., Adams E.M., Tedja I., Miller E.A., Atkinson J.P.; Membrane cofactor protein of complement system: alternative splicing of serin/threonin/proline-rich exons and cytoplasmatic tails produces multiple isoforms which correlate with protein phenotype.
J.Exp.Med. 1991; 174:93-102.

Rasmussen J.M.; Inherited deficiencies of complement proteins with special reference to congenital deficiency of the regulatory protein factor I.
APMIS Suppl. 1991; 22: 1-48.

Rasmussen J.M., Teisner B., Jepsen H.H., Svehag S.E., Knudsen F., Kirstein H., Buhl M.; Three cases of factor I deficiency: the effect of treatment with plasma.
Clin.Exp.Immunol. 1988; 74: 131-136.

Ripoche J., Mitchell J.A., Erdei C., Madin C., Moffat B., Mokoena T., Gordon S., Sim R.B.; Interferon γ induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture.
J.Exp.Med. 1988; 168: 1917-1922.

Ripoche J., Day A.J., Harris T.J.R., Sim R.B.; The complete amino acid sequence of human complement factor H.
Biochem.J. 1988; 249:593-602.

Roebroek A.J., Schalken J.A., Leunissen, J.A., Onnekink, C., Bloemers, H.P. und Van de Ven, W.J.; Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein.
EMBO 1986; J.5:2197-2202.

Ross G.D., Lambris J.D., Cain J.A., Newman S.L.; Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity.
J.Immunol. 1982; 129: 2051-2060

Ross S.C., Densen P.; Complement deficiency states and infection: Epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. Medicine 1984; 63: 243-273.

Russell S.M., Sparrow R.L., McKenzie I.F.C., Purcell D.F.J.; Tissue-specific and allelic expression of the complement regulator CD46 is controlled by alternative splicing. Eur.J.Immunol. 1992; 22:1513-1518.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc.Natl.Acad.Science USA (1977) 74:5463-5467.

Sato T., Endo Y., Matsushita M., Fujita T., Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. Int.Immunol.1994;6:665-669.

Schlaf G., Demberg T., Beisel N., Schieferdecker H.L., Götze O.; Expression and regulation of complement factors H and I in rat and human cells: Some critical notes.
Mol.Immunol. 2001; 38:231-239.

Schlaf G., Rothermel E., Oppermann M., Schieferdecker H.L., Jungermann K., Götze O.; Rat complement factor I: Molecular cloning, sequencing and expression in tissues and isolated cells.
Immunology 1999; 98: 464-474.

Schreiber A.D., Kaplan A.P., Austen K.F.; Inhibition by C1-INH of Hageman factor fragment activation of coagulation, fibrinolysis, and kinin generation.
J.Clin.Invest.1973; 52:1402-1409.

Schulz F.T., Schwaeble W., Stanley K.K., Weiß E., Dierich M.P.; Human complement factor H: Isolation of cDNA clones and partial cDNA sequenz of the 38-kDa tryptic fragment containing the binding site for C3b.
Eur.J.Immunol. 1986; 16:1351-1355.

Schwaeble W., Zwirner J., Schulz T.F., Linke R.P., Dierich M.P., Weiss E.H.; Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver.
Eur.J.Immunol 1987; 17:1485-1489.

Seya T., Atkinson J.P.; Functional properties of membrane cofactor protein of complement. Biochemistry 1989; 264:581-588.

Seya T., Turner J.R., Atkinson J.P.; Purification and characterization of membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b.
J.Exp.Med.1986; 163:837-855.

Seya T., Turmer J.R., Atkinson J.P.; Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b.
J.Exp.Med. 1986: 163:837-855.

Sharma A.K., Pangburn M.K.; Biological active recombinant human complement factor H: synthesis and secretion by the baculovirus system.
Gene 1994; 143:301-302.

Shiang R., Murray J.C., Morton C.C., Buetow K.H., Wasmuth J.J., Olney A.H., Sanger W.G., Goldberger G.; Mapping of the human complement factor I gene to 4q25.
Genomics 1989; 4: 82-86.

Sim R.B., Reboul A., Arlaud G.J., Villiers C.L., Colomb M.G.; Interaction of 125-labelled complement components C1r and C1s with protease inhibitors in plasma.
FEBS Lett. 1979; 97:111-115.

Sim R.B., Day A.J., Moffatt B.E., Fontaine M.; Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes.
Methods in Enzymologie 1993; Vol. 223: 13-35.

Sim E., Wood A.B., Hsiung L.-M-, Sim R.B.; Pattern of degradation of human complement fragment C3b.
FEBS Lett. 1981; 132:55-60.

Sim R.B., DiScipio R.G.; Purification and structural studies on the complement-system control protein β1H (Factor H).
Biochem J. 1982; 205:285-293.

Skerka C., Zipfel P.F.; FHL-1/reconectin: A human complement and immune regulator with cell-adhesive function.
Immunology Today 1999 Vol.20 3:135-140.

Skerka C., Kühn S., Günther K., Lingelbach K., Zipfel P.F.; A novel short consensus repeat-containing molecule is related to human complement factor H.
J.Biol.Chem. 1993; 268:2904-2908.

Skerka C., Timmann C., Horstmann R.D., Zipfel P.F.; Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H.
J.Immunol. 1992; 148:3313-3318.

Snyderman R., Shin H.S., Hausman M.H.; A chemotactic factor for mononuclear leukocytes.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 1971; 138:387-390.

Solal-Celigny P., Laviolette J., Hebert J., Atkins P.C., Sirois M., Brun G., Lehner-Netsch G., Delage J.M.; C3b inactivator deficiency with immune complex manifestations.
Clin.Exp.Immunol. 1982; 47: 197-205.

Spence M.J., Sucic J.F., Foley B.T., Moehring,T.J.; Analysis of mutations in alleles of the fur gene from an endoprotease-deficient Chinese hamster ovary cell strain.
Somat.Cell Mol.Genet. 1995; 21:1-18.

Strang C.J., Siegel R.C., Phillips M.L., Poon P.H., Schumaker V.N.; Ultrastructure of the first component of human complement: Electron microscopy of the crosslinked complex.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1982; 79:586-590.

Takafuji S., Tadokoro K., Ito K., Dahinden C.A.; Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a.
Int.Arch.Allergy Immunol. 1994; 104:27-29.

Takayama Y., Takada F., Takahashi A., Kawakami M.; A 100 kDa protein in the C4-activating component of Ra-reaktive factor is a new serin protease having module organization similar to C1r and C1s.
J.Immunol. 1994; 152:2308-2316.

Tamura N., Nelson R.A.; Three naturally-occurring inhibitors of components of complements in guinea pig and rabbit serum.
J.Immunol. 1967; 99: 582-589.

Taylor M.E., Brickell P.M., Craig R.K., Summerfield J.A., Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein.
Biochem.J. 1989; 262:763-771.

Terado T., Nonaka M.I., Nonaka M., Kimura H.; Conservation of the modular structure of complement factor I through vertebrate evolution.
Dev.Comp.Immunol. 2002; 26:403-413.

Theriault A., Whaley K., McPhaden A., Boyd E., Connor J.; Regional assignment of the human C1-inhibitor gene to 11q11-q13.1.
Hum.Genet.1989; 84:477-479.

Timmann C., Leippe M., Horstmann R.D.; Two major serum components antigenically related to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no factor H-like complement regulatory functions.
J.Immunol. 1991; 146:1265-1270.

Tone M., Walsh L.A., Waldmann H.; Gene structure of human CD59 and demonstration that discrete mRNAs are generated by alternative polyadenylation.
J.Mol.Biol. 1992; 227:971-976.

Tsuruta J.K., Wong K., Fritz I.B., Grisworld M.D.; Structural analysis of sulphated glycoprotein 2 from amino acid sequence. Relationship to clusterin and serum protein 40,40.
Biochem.J. 1990; 268:571-578.

Ueno S.; Studien über die Komponenten des Komplements. I and II. 1938; 7: 201, 225.

Ullman C.G.,Chamberlain D., Ansari A., Emery V.C., Haris P.I., Sim R.B., Perkins S.J.; Human complement faktor I: it`s expression by insect cells and its biochemical and structural characterisation.
Mol.Immunol. 1998; 35:503-512.

Vallota E.H., Müller-Eberhardt H.J.; Isolation and characterization of a new and highly active form of C5a anaphylatoxin from epsilon-aminocaproic acid-containing porcine serum. J.Exp.Med. 1973; 137:1109-1123.

Van Kuppeveld F.J.M., van der Logt J.T., Angulo A.F., van Zoest M.J., Quint W.G., Niesters H.G., Galama J.M. und Melchers W.J.; Genus- and species-specific identification of mycoplasma by 16S rRNA amplification.
Appl.Environ.Microbiol. 1992, Vol 58(8), 2606-2615.

Van Kuppeveld F.J.M., van der Logt J.T.M., Angulo A.F., van Zoest M.J., Quint W.G.V., Niesters H.G.M., Galama J.M.D. und Melchers W.J.G.; Genus- and species-specific identification of mycoplasma by 16S rRNA amplification.
Appl.Environ.Microbiol. 1993, Vol 59(2), 655.

Veerhuis R., van Es L.A., Daha M.R.; In vivo modulation of rat complement activities by infusion of anti-H antibodies.
Immunobiol. 1985; 170:133-145.

Vetvicka V., Reed W., Hoover M.L., Ross G.D.; Complement factors H and I synthesised by B cell lines function to generate a growth factor activity from C3.
J.Immunol. 1993; 150: 4052-4060.

Vorup-Jensen T., Stover C., Poulsen K., et al.; Cloning of cDNA encoding a human MASP-like protein (MASP-2).
Mol.Immunol. 1996; 33:81 (abstract).

Vyse T.J., Bartok I., Theodoridis E.L., Davis K.A., Walport M.J., Marley B.J.; The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency.
J.Clin.Invest. 1996; 97: 925-933.

Vyse T.J., Späth P.J., Davies K.A., Morley B.J., Philippe P., Athanassiou P., Giles C.M., Walport M.J.; Hereditary complement factor I deficiency.
Quart. J.Med. 1994; 87: 385-402.

Weiler J.M., Daha M.R., Austen K.F., Fearon D.T.; Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein β1H.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1976; 73:3268-72.

Weisman H.F., Bartow T., Leppo M.K., Marsh Jr. H.C., Carson G.R., Concino M.F., Boyle M.P., Roux K.H., Weisfeldt M.L., Fearon D.T.; Soluble human complement receptor type 1: In vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis.
Science 1990; 249(4965):146-151.

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

Whaley K., Widener H., Ruddy S.; In: Clinical Aspects of the Complement System. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1978, 99-112.

Whaley K.; Biosynthesis of the complement components and regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes.
J.Exp.Med. 1980; 151: 501-516.

Wong M.J., Goldberger G., Isenman D.E., Minta J.O.; Processing of human factor I in COS-1 cells co-transfected with factor I and paired basic amino acid cleaving enzyme (PACE) cDNA.
Molec.Immunol. 1995; 32: 379-387.

Wong W.W., Cahill J.M., Rosen M.D., Kennedy C.A., Bonaccio E.T., Morris M.J., Wilson J.G., Klickstein L.B., Fearon D.T., Structure of the human CR1 gene. Molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele. J.Exp.Med. 1989; 169:847-863.

Wuepper K.D., Bokisch V.A., Müller-Eberhard H.J., Stoughton R.B.; Cutaneous responses to human C3 anaphylatoxin in man.
Clin.Exp.Immunol. 1972; 11:13-20.

Yamamoto T., Davies C.G., Brown M.S., Schneider W.J., Casey M.L., Goldstein J.L., Russel, D.W.; The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA.
Cell 1984; 39: 27-38.

Ziccardi R.J.; Activation of the early components of the classical complement pathway under physiological conditions.
J.Immunol.1981; 126:1768-1773.

Zipfel J.B., Skerka C.; FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function.
Immunol.Today 1993; 20:135-140.

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. O. Götze für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie die weitere ideelle und finanzielle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F. Mayer und Herrn Prof. Dr. R. Hardeland danke ich für ihre sofortige Bereitschaft, das Referat bzw. Korreferat dieser Arbeit zu übernehmen. Angesichts der bei weitem nicht überall vorhandenen Bereitschaft möchte ich an dieser Stelle die Übernahme des nicht unerheblichen zusätzlichen Arbeitsaufwandes, den die Betreuung einer externen Dissertation mit sich bringt, besonders würdigen.

Ich danke insbesondere Herrn Dr. Schlaf, Frau Ines Heine und Frau Daniela Gerke für vielfältige Hilfestellungen im Laboralltag.

Lebenslauf

Name:	Demberg
Vorname:	Thorsten
Geburtsdatum:	09.02.1974
Geburtsort:	Hameln
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1980-84	Grundschule in Hameln
1985-87	Orientierungsstufe in Hameln
1987-93	Besuch des „Albert-Einstein"-Gymnasiums in Hameln mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst:

1993-1994	Grundwehrdienst in Munster

Studium:

WS1994/95	Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen
Juli 1999	Vordiplom in den Fächern: Botanik, Zoologie, anorganische Chemie und physikalische Chemie
Oktober 1999	Hauptdiplomprüfung in den Fächern: Mikrobiologie, Immunologie, physikalische Chemie
Januar 2000-November 2000	Externe Diplomarbeit in der Abteilung Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen; Titel der Diplomarbeit: „Induktion und Regulation des Komplementproteins Faktor I"
November 2000	Diplom/Biologie
November 2000	Beginn der Promotionsarbeit in der Abteilung Immunologie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. O. Götze.
Dezember 2000-Oktober 2003	Stipendiat im Graduiertenkolleg 335 „Klinische, Zelluläre und Molekulare Biologie Innerer Organe"