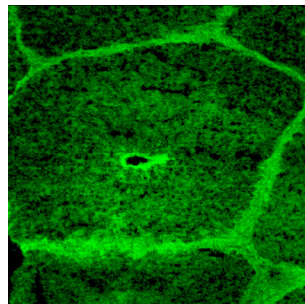

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. B. Fleischer

**Komplementregulator Faktor H von *Sus scrofa* :
Klonierung, funktionelle Charakterisierung und
molekulare Pathogenese der Defizienz**



D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Guido Hegasy

aus Leverkusen

Hamburg, 2002

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 31.10.2002 (mündliche Prüfung)

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. B. Fleischer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. P. Zipfel

Stellvertretendes Mitglied: Prof. Dr. F. Nolte

1 Einleitung

1.1 Das Komplementsystem

1.1.1	Historischer Überblick	4
1.1.2	Grundriss der Funktionsweise.....	5
1.1.3	Der Klassische Aktivierungsweg	8
1.1.4	Der Lektin-Weg	9
1.1.5	Der Alternative Aktivierungsweg	9
1.1.6	Die Amplifizierungsschleife	11
1.1.7	Der Terminale Weg und der MAC	12

1.2 Die Regulation des Komplementsystems

1.2.1	Übersicht	13
1.2.2	Flüssig-Phase Regulatoren des CP: C1 Inh, C4BP.....	14
1.2.3	Flüssig-Phase Regulatoren des AP: FH, FI.....	14
1.2.4	Flüssig-Phase Regulatoren des TP: Vitronectin, Clusterin	15
1.2.5	Membranständige Regulatoren des CP und AP: DAF, MCP, CR1	16
1.2.6	Membranständige Regulatoren des TP: HRF, CD59.....	16

1.3 Der Komplementregulator Faktor H

1.3.1	Sequenz und Struktur von Faktor H.....	17
1.3.2	Funktionen von FH	18
1.3.3	FH-ähnliche und FH-verwandte Proteine	21

1.4 Pathologien durch Defizienz für Komplementregulatoren

1.4.1	C1-Inhibitor: HAE	22
1.4.2	DAF, HRF und CD59: PNH.....	23
1.4.3	FH: MPGN II, Kollagen III GP, aHUS und Infektionen	24

1.5 Pathologien der Defizienz und Dysfunktion von Faktor H

1.5.1	Pathophysiologie.....	24
1.5.2	Die Glomerulonephritiden	25
1.5.3	MPGN II und Kollagen III GP bei Mensch und <i>Sus scrofa</i>	26
1.5.4	Das atypische Hämolytisch Urämische Syndrom.....	31

1.6 Pathologien der Lebertransplantation von *Sus Scrofa* zu Mensch

1.6.1	Die Xenotransplantation der Schweineleber.....	34
1.6.2	Komplementsystem und Hyperakute Abstoßungsreaktion.....	35

1.7 Die Zielsetzungen dieser Arbeit

1.7.1	Klonierung von FH von <i>Sus Scrofa</i>	37
1.7.2	Funktionelle Charakterisierung von pigFH	37
1.7.3	Molekulare Pathogenese der MPGN II im Tiermodell.....	37

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1	Molekularbiologie.....	38
2.1.2	Gewebe und Seren	38
2.1.3	Zellen und Medien	39
2.1.4	Antikörper und Proteine.....	39
2.1.5	Equipment und Software.....	39

2.2 Methoden

2.2.1	Molekularbiologie.....	41
2.2.2	Zellkultur.....	50
2.2.3	Proteintechniken	52
2.2.4	Bindungsassays und Funktionsanalytik	55

2.2.5	Immunhistologie	56
3	Ergebnisse	
3.1	Klonierung von Faktor H des Schweines	
3.1.1	cDNA-Bank und Screening	58
3.1.2	Die Sequenz von pigFH	59
3.2	Rekombinante Expression von pigFH-Fragmenten	
3.2.1	Expression dreier pigFH-Fragmente.....	62
3.3	Bindungs- und Funktionsstudien	
3.3.1	Interaktion mit Heparin.....	64
3.3.2	Interaktion mit hC3b	65
3.3.3	Kofaktor-Aktivität von pigFH mit hFI und hC3b.....	66
3.3.4	Quantitativer Vergleich der Kofaktor-Aktivität.....	67
3.4	Untersuchungen zur plasmatischen pigFH-Defizienz	
3.4.1	Vergleich der pigFH mRNA Expression	68
3.4.2	cDNA-Sequenzierung und Nachweis von zwei Mutationen	69
3.4.3	Nachweis der pigFH Proteine in Plasma und Leber	71
3.4.4	Nachweis von pigFH in Hepatozyten <i>in situ</i>	73
4	Diskussion	
4.1	Die Sequenz von Faktor H von <i>Sus scrofa</i>	
4.1.1	Sequenzvergleich von pigFH mit anderen Spezies.....	76
4.1.2	Homologien einzelner SCRs von pigFH und hFH	79
4.2	Die funktionellen Domänen von pigFH im Vergleich mit hFH	
4.2.1	Lokalisationen der Heparin-Bindungsdomänen	80
4.2.2	Lokalisationen und Affinitäten der hC3b-Bindungsdomänen	81
4.2.3	pigFH zeigt Spezies-übergreifende regulatorische Aktivität.....	82
4.3	Die molekulare Pathogenese von pigFH-Defizienz und MPGN II	
4.3.1	Missense-Mutationen in SCR 9 und SCR 20.....	82
4.3.2	Plasmatische Defizienz und hepatischer Sekretionsblock	84
4.3.3	pigFH Protein-Akkumulation in den Hepatozyten	86
4.4	Die Rolle von FH-Genmutationen für nicht-strukturbildende AS	
4.4.1	MPGN II und FH-Genmutationen bei <i>Sus scrofa</i> und Mensch	88
4.4.2	FH-Genmutationen und aHUS.....	89
4.5	Die Rolle von pigFH in der Xenotransplantation	
4.5.1	pigFH und die Hyperakute Abstoßungsreaktion.....	91
4.5.2	pigFH und spätere Phasen der Xenotransplantation	92
5	Zusammenfassung	94
6	Literaturverzeichnis	95
7	Danksagung	105
8	Lebenslauf	106
9	Erklärung	108
10	Publikationen	109

Abkürzungsverzeichnis

aHUS	Atypisches Hämolytisch Urämisches Syndrom
AP	Alternativer Aktivierungsweg (alternative pathway)
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
cDNA	komplementäre DNA
CP	Klassischer Aktivierungsweg (classical pathway)
DAF	Decay Accelerating Factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
FI	Faktor I
FH	Faktor H
FHL-1/reconnectin	Faktor H-ähnliches Protein-1 (factor H-like protein-1)
FHR	Faktor H-verwandtes Protein (factor H-related protein)
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GN	Glomerulonephritis
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
h-	Human-
HAE	Hereditäres Angioneurotisches Ödem (hereditary angioedema)
HAR	Hyperakute Abstoßungsreaktion (hyperacute rejection)
HUS	Hämolytisch Urämisches Syndrom
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kollagen III GP	Kollagen Typ III Glomerulopathie
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MAC	Membran Angriffs Komplex (membrane attack complex)
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	Membran Kofaktor Protein (membrane cofactor protein)
MPGN II	Membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
Ni ²⁺	Nickel
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
pig-	Schweine-
pmol	picomol
PNH	Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie
RCA	Gencluster der Regulatoren der Komplement Aktivierung
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
SCR	Repetitive Struktureinheit (short consensus repeat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
TBE	Tris-Borat-EDTA
TP	Terminaler Komplementweg (terminal pathway)
U	Units (Enzymeinheit)
Ü/N	Über Nacht
UTR	Untranslatierte Region
VBS	Veronal-gepufferte Salzlösung (veronal buffered saline)

1 Einleitung

1.1 Das Komplementsystem

1.1.1 Historischer Überblick

Der Begriff Komplement wurde erstmals im Jahr 1899 von Ehrlich eingeführt^[1]. Er beschrieb damit einen hitze-empfindlichen Bestandteil des Serums, der in der Lage war, die antibakterielle Aktivität von Antikörpern zu "komplementieren". Die Erstentdeckung dieser hitze-labilen Aktivität von Serum geht auf Bordet zurück, der ab dem Jahr 1895 seine Studien zur Zellyse durch humanes Serum veröffentlichte^[2]. Bordet zeigte, daß zur spezifischen Lyse von Bakterien durch Patientenserum eine Serum-Komponente notwendig war, die durch Erhitzen des Serums zerstört werden konnte. Durch Zusatz von nicht-erhitztem Serum von Patienten, die niemals Kontakt mit dem entsprechenden Bakterium hatten, konnte die Lyse-Aktivität des erhitzten Serums wiederhergestellt werden. Somit waren eine bakterium-spezifische, hitze-stabile Fraktion und eine unspezifische, hitze-labile Fraktion des Serums zur Lyse von Bakterien identifiziert. Die hitze-labile Fraktion wurde als pathogenunabhängig charakterisiert, die die hitze-stabile und pathogen-spezifische Fraktion vervollständigte und somit "komplementierte". Im Jahr 1907 demonstrierte Ferrata, daß die hitze-labile Serumfraktion durch Dialyse in zwei weitere Komponenten aufgeteilt werden konnte, die nur gemeinsam die lytische Aktivität entfalteten^[3]. Diese entsprechen nach heutiger Nomenklatur den Komponenten C1 und C2. Pillemer war im Jahr 1954 der erste, der für Komplement eine lytische Aktivität unabhängig von Antikörpern nachwies^[4]. Damit wurde erstmals die rein komplettierende Konnotation des Begriffes Komplement in Frage gestellt und ein zweiter Aktivierungsweg postuliert. In seinen Versuchen wurde Komplement durch Zymosan, einem Glykoprotein in der Zellwand von Hefen, unabhängig von Antikörpern aktiviert, wobei er demonstrierte, daß kein Verbrauch von C1 oder C2 und damit der Komponenten des klassischen Aktivierungsweges stattfand. Somit war ein zweiter Aktivierungsmechanismus von Komplement entdeckt, der heute als Alternativer Weg bezeichnet wird. Im Jahr 1960 identifizierte Müller-Eberhard das Molekül C3 als die zentrale Komponente beider bis dahin bekannten Aktivierungswege von Komplement und reinigte die terminalen Komponenten C5 bis C9 aus humanem Serum auf^[5]. Diese Komponenten waren bis dahin alle als eine einzige aufgefasst worden. Der Erfolgsmechanismus der terminalen Zell-Lyse durch Komplement wurde

erstmalig 1972 von Mayer dargestellt. Lyse durch Integration einer Pore in die Oberfläche der Zielstruktur, bestehend aus den Komponenten C5 bis C9, wurde von Mayer damals unter der Bezeichnung "doughnut hypothesis" veröffentlicht^[6]. Die von ihm beschriebene Struktur des terminalen Weges des Komplementsystems wird heute als Membran Angriffs Komplex bezeichnet. Ein dritter Aktivierungsweg des Komplementsystems wurde erstmalig 1994 von Sato nachgewiesen^[7]. Dieser Aktivierungsweg erfolgt ebenfalls Antikörper-unabhängig und wird heute als Lektin-Weg der Aktivierung bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Weg durch terminale Mannose-Zucker auf der Oberfläche von Bakterien initiiert werden kann, ohne daß eine Interaktion mit Antikörpern stattfindet.

1.1.2 Grundriss der Funktionsweise

Das Komplementsystem wird in den Bereich der angeborenen Immunabwehr gerechnet und stellt den phylogenetisch älteren Anteil des Immunsystems dar. Das angeborene Immunsystem wehrt Fremdstrukturen schnell und effektiv ab, jedoch ist diese Abwehr nicht pathogen-spezifisch und ein erneuter Kontakt mit dem Eindringling wird immer gleich beantwortet. Die adaptive Abwehr, deren Träger u. a. B- und T-Lymphozyten sind, ist phylogenetisch jünger und wird beim Kontakt mit einem Eindringling erst mit Verzögerung aktiviert. Allerdings gewährleistet es eine spezifische Immunantwort und erzeugt ein immunologisches Gedächtnis, welches Immunität gegen Re-Infektionen verleihen kann. Zwischen beiden Systemen gibt es zahlreiche Querverbindungen^[8].

Nach heutigem Kenntnisstand besteht das Komplementsystem aus mindestens 40 Serum-Proteinen sowie deren Regulatoren und Rezeptoren. Alle Serum-Bestandteile des Komplementsystems werden mit dem Buchstaben C sowie einer Zahl gekennzeichnet. Da die Komponenten des Komplementsystems nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung und nicht nach ihrer Position im Reaktionsablauf benannt wurden, hat sich bis heute eine zum Teil verwirrende Nomenklatur ergeben. Wird eine Komponente proteolytisch gespalten, so erhalten die entstandenen Fragmente zusätzlich noch einen Buchstaben, meist a für das kleinere und inaktive Fragment, und b für das größere und aktive Fragment, doch auch hiervon gibt es Ausnahmen.

Das Komplementsystem wird durch jede Art von Oberflächen aktiviert. Dabei stehen als Identifizierungsmechanismen einerseits deren Immunogenität für Antikörper (Klassischer Weg) oder die rein biochemische Oberflächenzusammensetzung (Alternativer Weg und Lektin Weg) zur Verfügung. Das Reaktionsprinzip des

Komplementsystems ist das einer Kaskade: Bei der Initiierung des Systems über einen der drei Wege werden Komponenten des Systems durch limitierte Proteolyse aktiviert, die dann ihrerseits wiederum in der Lage sind, weitere Komponenten proteolytisch zu aktivieren. Die Aktivierung des zentralen Moleküls C3 zu C3b stellt dabei den ersten gemeinsamen Schritt aller Initiierungswege dar^[9]. Von hier aus erfolgt innerhalb der Kaskade eine Amplifizierungsschleife, um eine effiziente Beladung der Fremdoberfläche mit C3b zu gewährleisten. Partikel, deren Oberfläche mit C3b beladen sind, werden von Phagozyten erkannt (Opsonisierung) und phagozytiert. Gemeinsame Endstrecke ist die Aktivierung der Proteine C5 bis C9, die sich in der Fremdoberfläche zu einer ringförmigen, poren-artigen Struktur zusammenlagern und in die Fremdmembran integrieren. Diese Membran-Integration führt, wenn möglich, zur Lyse des Fremdorganismus^[10]. Der Ablauf der Komplementkaskade ist in **Abbildung 1** schematisch im Überblick dargestellt.

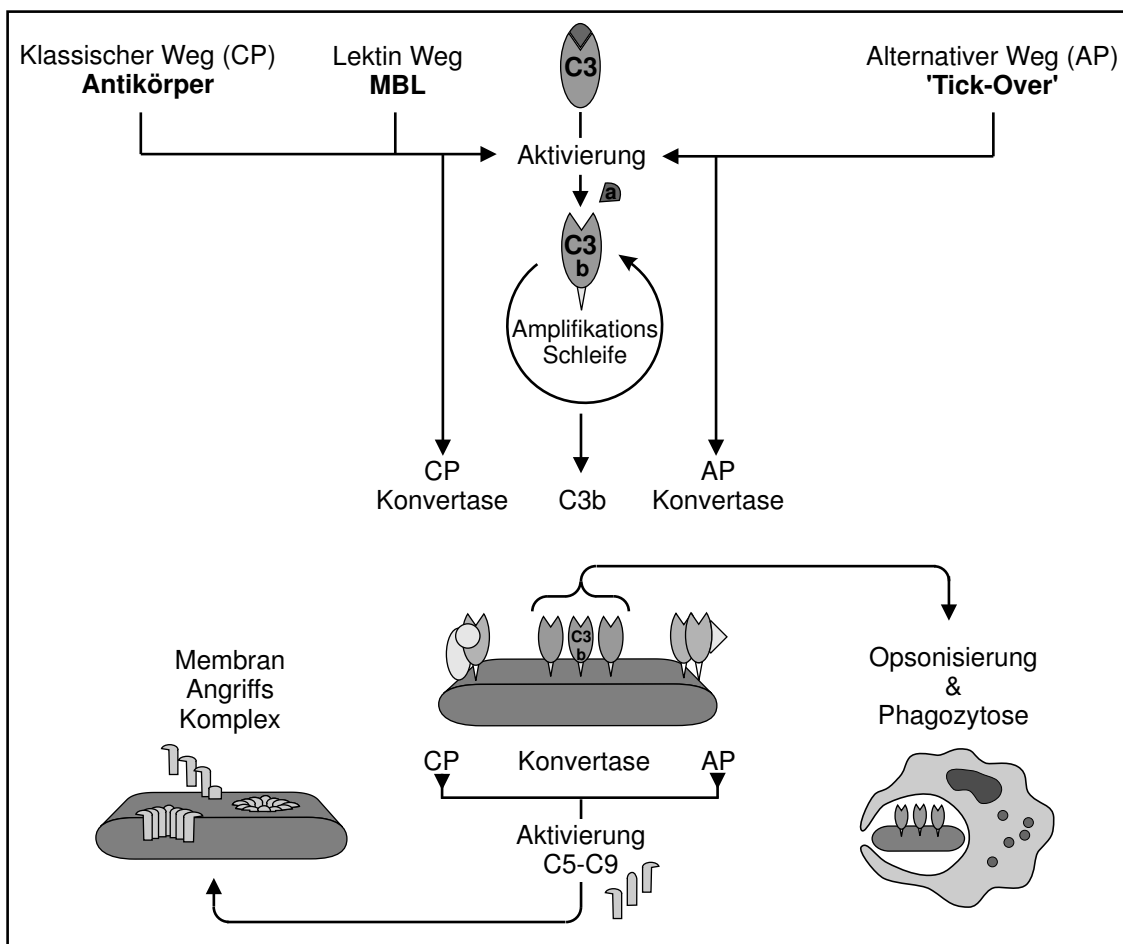


Abb. 1: Überblick über die Komplementkaskade. Im oberen Teil sind dargestellt die drei Aktivierungswege, die Aktivierung des zentralen Moleküls C3 zu C3b und die Amplifikations-Schleife. Im unteren Teil sind dargestellt die Phagozytose von C3b-beladenen Partikeln, die C5-Konvertasen und der Terminale Weg mit der Bildung des Membran Angriffs Komplexes.

Der Klassische Weg (Classical Pathway, CP) wird durch die Bindung eines Antikörpers an eine Fremdoberfläche initiiert. Der Lektin-Weg beginnt mit der Bindung des Proteins Mannose-bindendes Lektin (MBL) an Zuckerstrukturen auf Fremdoberflächen. Der Alternative Weg (Alternative Pathway, AP) wird konstant minimal im Plasma aktiviert, ohne daß a priori schon eine aktivierende Struktur vorhanden sein muß. Diese Aktivierungsform wird als Tick-over bezeichnet. Alle Oberflächen, ganz gleich ob fremd oder eigen, werden demnach im Alternativen Weg angegriffen; eine weitere Aktivierung des AP wird erst durch Regulatoren auf körpereigenen Zellen verhindert.

Alle drei Aktivierungswege münden in die proteolytische Aktivierung des zentralen Moleküls C3, das in seine aktive Form C3b überführt wird und auf der Oberfläche bindet, wobei das kleinere Fragment C3a freigesetzt wird. Nun erfolgt eine Amplifikationsschleife, die innerhalb kürzester Zeit zur exponentiellen Beladung mit weiteren C3b-Molekülen führt. Ziel aller Aktivierungswege ist einerseits die Opsonisierung und Phagozytose von C3b-beladenen Partikeln, andererseits die Bildung einer C5-Konvertase. Die C5-Konvertase ist bei den Aktivierungswegen zwar unterschiedlich aufgebaut ist, übt aber die gleiche Funktion aus: Die Aktivierung des Moleküls C5 zu C5b, wobei das Fragment C5a freigesetzt wird, und der nachfolgenden Aktivierung der Moleküle C6 bis C9. Diese Moleküle bilden den Terminalen Weg des Komplementsystems und lagern sich in die zu attackierende Oberfläche ein. Dort bilden sie eine Pore, die als Membran Angriffs Komplex (Membrane Attack Complex, MAC) bezeichnet wird. Diese Pore führt zur Membrandestabilisierung und, falls möglich, zur Lyse der Fremdstruktur.

Die in der Kaskade freigesetzten Spaltungs-Fragmente haben entscheidende biologische Bedeutungen und besitzen immun-aktivierende und -modulierende Funktionen. Die Fragmente C3a und C5a lösen eine lokale und systemische Entzündungsreaktion aus^[11]. Beide Fragmente binden an Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen und bewirken eine Freisetzung von vasoaktiven Aminen^[12]. Diese vermitteln eine Vasodilatation und erhöhen die Gefäßpermeabilität (Anaphylaxis). C3a und insbesondere C5a aktivieren Phagozyten und bewirken deren Migration entlang des Konzentrationsgradienten in das Entzündungsgebiet (Chemotaxis)^[13]. Eine systemische Reaktion besteht in der Synthese von Akut-Phase-Proteinen durch Hepatozyten, welche durch zirkulierendes C5a ausgelöst wird^[14]. Phagozyten erkennen C3b beladene Partikel als fremd und phagozytieren diese (Opsonisierung)^[15]. C3b und C4b auf Immunkomplexen vermitteln die Bindung an Erythrozyten, die diese zu Leber und Milz transportieren, wo der Abbau

im Retikulo-Endothelialen System erfolgt (Immun-Clearance)^[16]. C3 Fragmente vermitteln darüberhinaus Immunreaktionen in Lymphknoten, so zum Beispiel die Präsentation von prozessierten Antigenen der Immunkomplexe durch die Follikulären Dendritischen Zellen an Lymphozyten^[17]. Im Folgenden werden die drei bekannten Aktivierungswege sowie die Amplifizierungsschleife und der Terminale Weg näher erläutert.

1.1.3 Der Klassische Aktivierungsweg

Der klassische Weg der Komplementaktivierung beginnt mit der Bindung eines Antikörpers an die Oberfläche einer fremden Struktur, wie es in **Abbildung 2** dargestellt ist^[18,19]. Der Begriff Fremdstruktur wird in diesem Zusammenhang benutzt, da es sich sowohl um ein Bakterium oder einen Parasiten handeln kann, als auch um ein als fremd erkanntes Gewebe oder eine Kunststoff-Oberfläche.

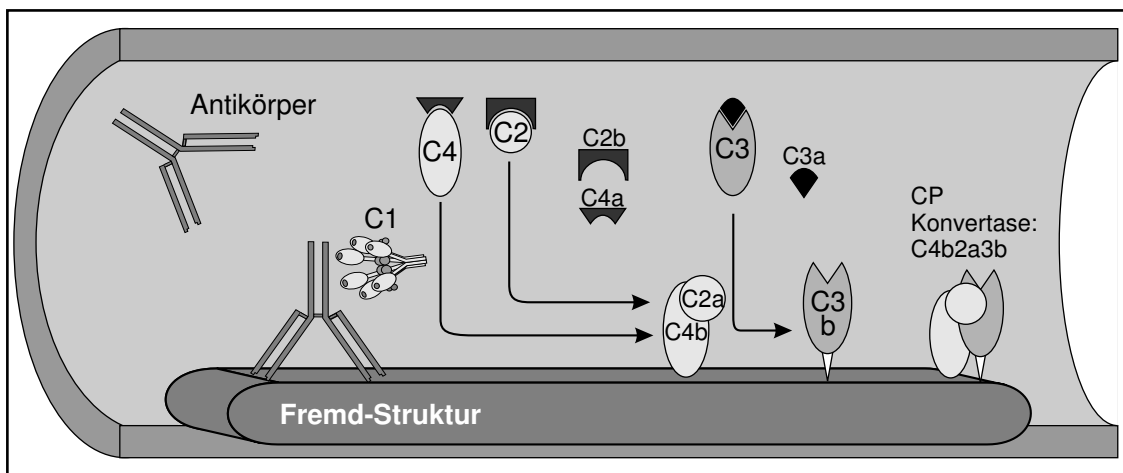


Abb. 2: Der Klassische Weg der Komplementaktivierung (CP). Dargestellt sind die Initiierung durch die Bindung eines Antikörpers an eine Fremdoberfläche und die Aktivierung der Komplementkaskade: C1 aktiviert C4 und C2, die in ihre Fragmente a und b gespalten werden. Die entstehende C3-Konvertase C4b2a aktiviert C3 zu C3b. Die C5-Konvertase des CP besteht aus dem Komplex C4b2a3b.

An den gebundenen Antikörper bindet nun das Molekül C1, das aus dem Molekül C1q und je zwei Molekülen C1r und C1s besteht^[20]. Durch die Bindung an den Fc-Teil des Antikörpers kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb des Moleküls, und die Serinproteasen C1r und C1s werden aktiviert^[21,22]. Aktiviertes C1s ist nun in der Lage, das Molekül C4 zu spalten und zu aktivieren, wobei das Fragment C4a freigesetzt wird. C4b exponiert dabei einen hochreaktiven Thioester, der kovalent an nukleophile Strukturen auf der Fremdoberfläche binden kann^[23].

C2 bindet an C4b und wird ebenfalls von C1s durch Spaltung in seine aktive Form überführt, wobei C2b freigesetzt wird^[24]. Der entstandene Komplex C4b2a besitzt nun

seinerseits enzymatische Aktivität und fungiert als Konvertase für die Aktivierung des zentralen Moleküls C3, das in seine aktive Form C3b gespalten wird, wobei das Fragment C3a freigesetzt wird^[25]. Dabei exponiert in Analogie zu C4b auch das Molekül C3b eine hochreaktive Thioestergruppe, die in der Lage ist, kovalent an nukleophile Moleküle wie Amino- und Carboxylgruppen zu binden. Der Konvertase-Komplex aus den Molekülen C4b, C2a und C3b, kurz C4b2a3b, bildet nun die Konvertase des Klassischen Aktivierungsweges für das Molekül C5^[26].

1.1.4 Der Lektin-Weg

Ein dem klassischen Weg ähnlicher, aber Antikörper-unabhängiger Aktivierungsweg des Komplementsystems ist erst kürzlich beschrieben worden^[7]. Dieser Lektin-Weg wird durch das Mannose-bindende Lektin (mannan-binding lectin, MBL) initiiert, welches an Mannose-Reste auf der Oberfläche von Fremdstrukturen bindet. Dadurch werden die zwei MBL-assoziierten Proteasen MASP-1 und MASP-2 aktiviert (MBL associated serine protease, MASP), die analog zum Klassischen Aktivierungsweg C4 spalten und aktivieren^[27,28]. In diesem Reaktionsschritt laufen Klassischer Weg und Lektin-Weg zusammen, die weitere Aktivierung verläuft analog zum Klassischen Weg.

1.1.5 Der Alternative Aktivierungsweg

Der Alternative Weg (Alternative Pathway, AP) stellt, da unabhängig von Antikörpern, den evolutionär älteren Teil des Komplementsystems dar. Während der Klassische Weg erst nach der Identifizierung einer Fremdstruktur aktiviert wird, stellt der AP das umgekehrte Prinzip dar: Jede Struktur, die dem Plasma ausgesetzt ist, wird durch diesen Weg attackiert, wobei wieder jede Fremdstruktur wie Bakterien, Pilze, Parasiten, aber auch Fremdgewebe und Kunststoffoberflächen Ziel des Angriffs sein kann. Erst der Schutz durch Regulatoren beendet den Angriff auf körpereigene Strukturen wieder auf einer frühen Stufe.

Im Plasma und damit der Flüssigen Phase wird das Molekül C3 kontinuierlich zu C3i aktiviert^[29]. Diese Aktivierung entsteht durch die spontane Hydrolyse des internen Thioesters von C3 in einer Reaktion mit H₂O^[30]. Durch eine Konformationsänderung entsteht das Molekül C3i, das auch als C3(H₂O) bezeichnet wird^[31]. C3i ist in der Lage, den Faktor B aus dem Plasma zu binden, der unter Vermittlung des Faktors D in seine Fragmente Ba und Bb gespalten wird^[32,33]. Das Fragment Bb bleibt an C3i gebunden und der Komplex C3iBb entsteht. Dieses Flüssig-Phase-Molekül spaltet nun seinerseits C3 in die aktive Form C3b, wobei C3a freigesetzt wird^[34]. Diese Kaskade wird

kontinuierlich im Plasma aktiviert, ohne daß eine aktivierende Struktur vorhanden sein muß und wird als ‘Tick-over Activation‘ bezeichnet. Ist keine Fremdstruktur in der Nachbarschaft zum aktivierten C3b Molekül, so wird es im Plasma sofort zu iC3 inaktiviert (cave: iC3 $\neq$ C3i). Dies ist im gesunden Organismus der Regelfall. Sollte sich aber eine als fremd eingestufte Struktur in der Nähe des aktivierten C3b Moleküls befinden, so bindet C3b mit seinem Thioester kovalent an dessen Oberfläche, wenn diese nicht davor geschützt ist^[35,36]. C3b bindet wiederum den Faktor B, der durch Faktor D in Ba und Bb gespalten wird und bildet C3bBb, welches durch Properdin stabilisiert wird^[37]. Im Komplex mit einem weiteren Molekül C3b entsteht C3bBb3b. Dieser Komplex ist die C5 Konvertase des Alternativen Weges^[26]. In **Abbildung 3** ist der AP zusammenfassend dargestellt.

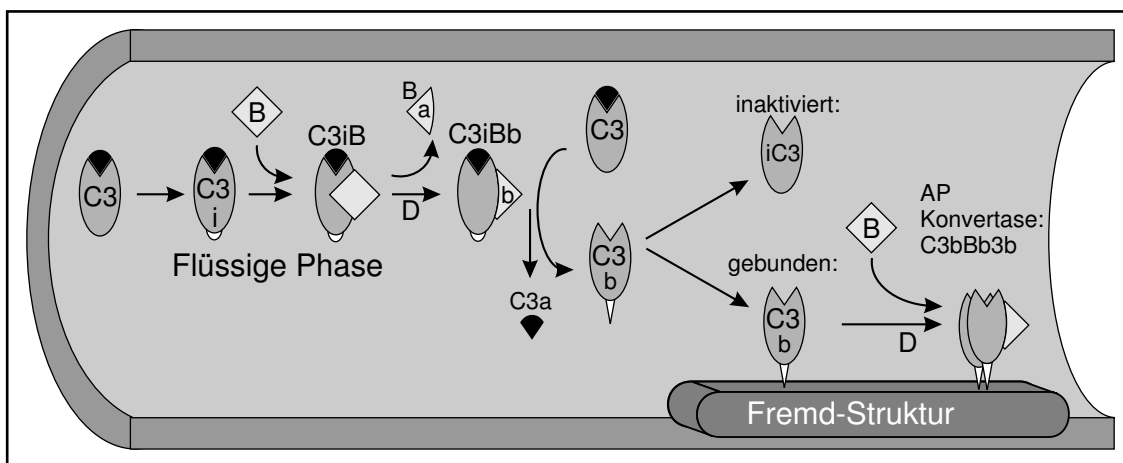


Abb. 3: Der Alternative Weg der Komplementaktivierung. Dargestellt ist die Initiierung in der Flüssigen Phase, die Aktivierung von C3b sowie Inaktivierung oder Bindung an Fremdstrukturen. C3 wird kontinuierlich im Plasma zu C3i aktiviert (Tick-over). C3i bindet Faktor B, welcher durch Faktor D in seine Fragmente gespalten wird. C3iBb aktiviert C3 zu C3b, welches entweder inaktiviert wird (iC3), oder an eine Fremd-Oberfläche bindet. Der Komplex C3bBb3b stellt die C5-Konvertase des AP dar.

Der AP stellt somit einen Mechanismus dar, der alle Plasma-exponierten Oberflächen auf ihr Aktivierungspotential überprüft. Dabei wird in Kauf genommen, daß auch auf körpereigenen Strukturen zunächst eine Aktivierung stattfindet, die erst sekundär von Regulatoren beendet wird und so eine weitere Deposition von Komplement-Komponenten verhindern. Sind Regulatoren auf der attackierten Oberfläche vorhanden, wie es bei körpereigenen Strukturen der Fall ist, so unterbinden diese eine weitere Aktivierung und der Angriff wird beendet. Besitzt die Oberfläche aber keine Regulatoren, so wird der Angriff fortgesetzt und führt zur Beladung mit C3b, zur Freisetzung immunaktivierender Fragmente, zu Opsonisierung und Phagozytose der Fremdstruktur und zur Bildung des MAC.

1.1.6 Die Amplifizierungsschleife

Ein einzelnes Molekül C3b, das kovalent an eine Fremd-Oberfläche gebunden ist, vermag noch keinen effektiven Angriff auf eine Fremd-Struktur auszulösen. Daher erfolgt nun eine Amplifizierungsschleife, die in der Lage ist, die Fremd-Oberfläche innerhalb kürzester Zeit exponentiell mit weiteren C3b Molekülen zu beladen und diese kovalent an die Oberfläche zu binden. Diese Amplifikation findet sowohl nach der Initiierung durch den Klassischen als auch durch den Alternativen Weg und den Lektin-Weg statt. Die Amplifizierungsschleife ist schematisch in **Abbildung 4** dargestellt.

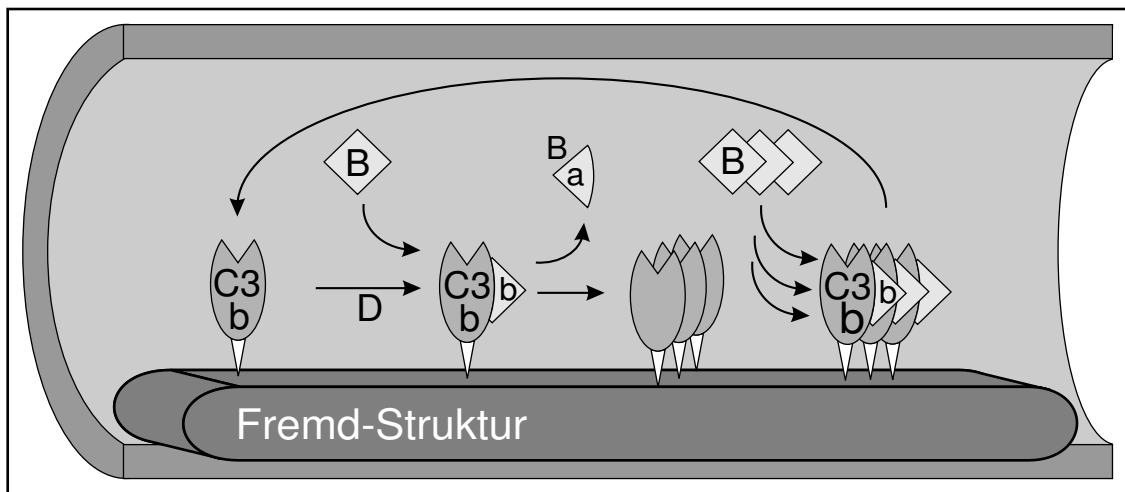


Abb. 4: Die Amplifizierungsschleife. Dargestellt ist die Amplifikation von C3b auf der Oberfläche der Fremd-Struktur, die bei allen drei Aktivierungswegen stattfindet. Oberflächengebundenen C3b bindet Faktor B, welcher durch Faktor D gespalten wird. Der entstandene Komplex C3bBb aktiviert seinerseits weitere C3 Moleküle zu oberflächengebundenem C3b, die wiederum Faktor B binden und neue C3bBb-Komplexe bilden.

Kovalent gebundenes C3b akquiriert den Faktor B aus dem Plasma, welcher unter Einwirkung von Faktor D gespalten wird, so daß C3bBb entsteht, wie es schon für den Alternativen Weg dargestellt wurde^[32,33]. C3bBb ist nun in der Lage, weitere C3 Moleküle zu C3b zu aktivieren, die ebenfalls kovalent an die Oberfläche binden. Diese akquirieren ihrerseits wiederum Faktor B, der unter Einwirkung von Faktor D gespalten wird. Es entsteht erneut C3bBb, und ein weiterer Zyklus der Reaktion beginnt^[38]. Diese Amplifizierungsschleife ist in der Lage, eine exponentielle Beladung der Fremd-Oberfläche mit C3b zu generieren, was Voraussetzung für einen effizienten Angriff auf die Fremdstruktur ist^[39,40]. Die Beladung mit C3b vermittelt dann Opsonisierung und Phagozytose der Partikel, die Freisetzung von C3a Chemotaxis und Anaphylatoxie. Die Verknüpfung aller drei Aktivierungswege wird durch die Amplifizierungsschleife ebenfalls gewährleistet.

1.1.7 Der Terminale Weg und der MAC

Alle drei Aktivierungswege münden in der Generierung einer C5-Konvertase, die den entscheidenden Schritt zum Terminalen Weg darstellt. Der Terminale Weg und der Membran Angriffs Komplex (Membrane Attack Complex, MAC) sind in **Abbildung 5** dargestellt.

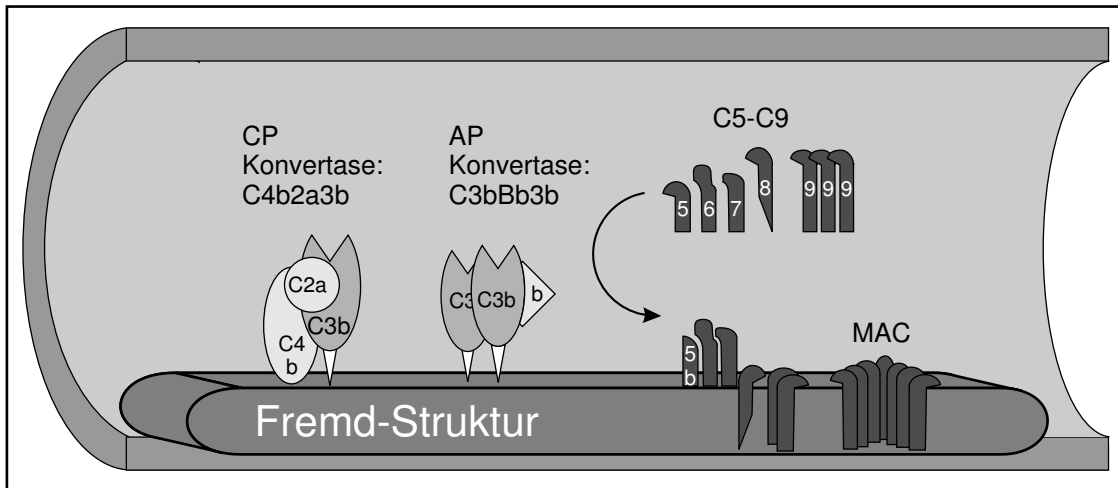


Abb. 5: Der Terminale Weg und die Bildung des Membran Angriffs Komplex (MAC). Dargestellt sind die C5-Konvertasen und die Bildung des Membran Angriffs Komplex (MAC). Die Konvertasen aktivieren C5 zu C5b, welches mit C6 und C7 assoziiert. Der Komplex C5b67 bindet C8, welches als erste Komponente in die Membran integriert. C5b678 bindet mehrere Moleküle C9, die zur Pore des MAC in der Membran polymerisieren und diese destabilisieren.

Die C5-Konvertase des Klassischen Weges ist der Komplex C4b2a3b^[26], die des Alternativen Weges der Komplex C3bBb3b^[41]. Beide haben enzymatische Aktivität zur Aktivierung des Moleküls C5, das in C5a und C5b gespalten wird. Freigesetztes C5a hat chemotaktische und anaphylaktische Wirkung. C5b bindet an C6 und C7, um den Komplex C5b67 zu bilden. Dieser Komplex ist hydrophob und besitzt eine membranbindende Domäne, die den Komplex an die Oberfläche der Fremdstruktur bindet. C8 bindet an den Komplex und integriert als erstes Molekül in die Fremdmembran. Als letzter Schritt inserieren mehrere Moleküle C9, die polymerisieren und die Pore des MAC bilden^[42,43]. Durch die Destabilisierung der Membran, die durch die Insertion des MAC hervorgerufen wird, lysiert die Fremdstruktur, soweit diese überhaupt lysierbar ist^[10,43].

1.2 Die Regulation des Komplementsystems

1.2.1 Übersicht

Das Komplementsystem stellt einen effizienten Weg zur Abwehr von Eindringlingen im Organismus dar. Das System reagiert schnell und aggressiv. Daher müssen körpereigene Strukturen vor dem Angriff des Systems geschützt werden. Insbesondere der Alternative Weg, dessen Aktivierung kontinuierlich im Plasma stattfindet, bedarf dabei einer strikten Regulation, um körpereigene Gewebe vor dem Angriff durch Komplement zu schützen. Dieser Schutz wird durch eine Reihe von Regulatoren gewährleistet, die teils einzigartige, teils überlappende Funktionen haben. Viele dieser Regulatoren haben aber auch wichtige Funktionen außerhalb des Komplementsystems, auf die hier nur am Rande eingegangen werden soll. Grundsätzlich können die membranständigen Regulatoren von denen des Plasmas unterschieden werden. Weiterhin wird unterteilt, an welchem Weg der Aktivierung und an welchem Punkt der Kaskade der entsprechende Regulator eingreift. Da die Regulatoren zum Teil überlappende Funktionen und Angriffsorte haben, kann kein Ordnungssystem alleine eine umfassende Klassifizierung liefern. In **Tabelle 1** sind die bekannten Regulatoren und ihre Angriffspunkte zusammengestellt.

Plasmatisch:	MW (kDa)	Konz. (µg/ml)	Interaktion mit Komplement-Komponente	Aktivierungs-Weg	Referenz
C1-Inhibitor	71-105	200	C1r, C1s	CP	[44]
C4BP	460-570	250	C4b, C4b2a, C4b2a3b	CP	[45]
Faktor H	155	500	C3b, C3bB, C3bBb, C3i	AP	[46]
FHL-1	42	50	C3b, C3bBb	AP	[47]
Faktor I	88	50	C3b, C4b	CP, AP	[48]
Vitronectin	77	500	C5b67	TP	[49]
Clusterin	80	300	C7, C8, C9	TP	[50]

Membran-ständig:	MW (kDa)	Anker:	Interaktion mit Komplement-Komponente	Aktivierungs-Weg	Referenz
DAF	70	GPI	C4b2a, C3bBb	CP, AP	[51]
MCP	45-70	TM	C3b, C4b	CP, AP	[52]
CR1	190-220	TM	C3b, C4b, C4b2a	CP, AP	[53]
HRF	50-65	GPI	C7, C8, C9	TP	[54]
CD59	18-23	GPI	C5b678	TP	[55]

Tab 1: Übersicht über die Komplementregulatoren. MW= Molekulargewicht, Konz.= Plasmakonzentration, CP= Klassischer Weg, AP= Alternativer Weg, TP= Terminaler Weg, Anker= Membranverankerung, GPI= Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol, TM= Transmembran.

1.2.2 Flüssig-Phase Regulatoren des CP: C1 Inh, C4BP

Der CP wird in der Flüssigen Phase vor allem durch die Plasmaproteine C1-Inhibitor (C1-Inh) und C4-bindendes Protein (C4 binding protein, C4BP) reguliert.

Die Regulation des CP am frühesten Punkt der Aktivierung erfolgt durch das Glykoprotein C1-Inh. C1-Inh gehört zur Familie der Serin Protease Inhibitoren (Serpine)^[56] und ist in der Lage, an die Moleküle C1r und C1s innerhalb von C1q und damit dem aktivierten C1-Komplex zu binden. Der Komplex wird dann irreversibel dissoziiert, wobei C1-Inh verbraucht wird. Außerhalb des Komplementsystems ist C1-Inh ein wichtiger Inhibitor vieler anderer Plasmaproteasen, so im Kininsystem (Kallikrein) und im Gerinnungssystem (Faktor XIIa, Faktor XIa und Plasmin)^[57].

C4BP besitzt mehrere Wirkmechanismen: Das Molekül bindet an C4b und ermöglicht damit die Spaltung durch das Plasmaprotein Faktor I (FI). C4b wird dadurch zu iC4b inaktiviert und weiter in die Fragmente C4c und C4d gespalten. Diese Aktivität wird als Kofaktor-Aktivität bezeichnet, da C4BP den Kofaktor für Faktor I in der Spaltung von C4b darstellt^[58]. Die Kofaktor Aktivität von C4BP erfolgt sowohl in der Flüssigen Phase als auch auf Zelloberflächen. Ein zweiter Regulationsmechanismus von C4BP erfolgt über die Interaktion mit C4b2a sowie C4b2a3b, der C3- bzw. C5-Konvertase des Klassischen Weges. C4BP ist in der Lage, den C4b2a- bzw. C4b2a3b-Komplex zu dissoziieren, was als 'Decay Accelerating' Aktivität bezeichnet wird^[59].

Kofaktor-Aktivität und Decay Accelerating Aktivität sind generelle Regulationsprinzipien des Komplementsystems und finden sich bei verschiedenen plasmatischen und zellständigen Regulatoren, wobei die Substrate jedes Regulators unterschiedlich sind.

1.2.3 Flüssig-Phase Regulatoren des AP: FH, FI

Faktor H (FH) ist der entscheidende plasmatische Komplementregulator des Alternativen Weges^[60]. Er übt seine regulatorische Wirkung sowohl im Plasma als auch auf Zelloberflächen aus. Die Regulation bezieht sich primär auf den Alternativen Weg, darüberhinaus greift FH auf der Ebene der Amplifizierungsschleife ein. Eine Aktivierung, die durch den Klassischen Weg initiiert wurde, wird daher ebenfalls durch FH in der Phase der Amplifizierung reguliert. Drei Regulationsmechanismen für das Komplementsystem sind bisher für FH beschrieben: FH hat Kofaktor-Aktivität, Decay Accelerating Aktivität und kompetitiert mit Faktor B^[61,62,63]. Darüberhinaus erfüllt FH verschiedene Funktionen außerhalb des Komplementsystems. Die Kofaktor-Aktivität

übt FH durch die Interaktion mit C3b aus: FH bindet an C3b, welches dann durch die Serinprotease FI in die Fragmente iC3b und C3f gespalten und damit inaktiviert wird. Diese Aktivität findet sowohl in der Flüssigen Phase als auch auf Zelloberflächen statt. Der zweite Regulationsweg besteht in der Konkurrenz mit Faktor B: FH kompetitiert mit Faktor B in der Bindung an C3i in der flüssigen Phase und an C3b auf Zelloberflächen^[64]. Dadurch wird die Amplifizierungsschleife und die Bildung der C5-Konvertase an einem frühen Punkt der Aktivierung reguliert. Dritter Regulationsweg ist die Decay Accelerating Aktivität: FH spaltet auf der Zelloberfläche das Fragment Bb von C3bBb wieder ab^[62]. Dadurch werden Amplifizierungsschleife und Bildung der C5-Konvertase reguliert, wenn der Komplex C3bBb bereits entstanden ist. Neben FH wird im Plasma auch das Faktor H ähnliche Protein FHL-1 / reonectin nachgewiesen (factor H-like protein-1/regulator of complement activation and fibronectin-like adhesion protein), welches ein alternatives Splice-Produkt des FH-Gens darstellt^[47,65]. FHL-1 / reonectin besitzt ebenfalls Decay Accelerating und Kofaktor-Aktivität^[66,67]. Seine Plasmakonzentration entspricht ungefähr 10 % der von FH. FH ist das thematisch zentrale Molekül der vorliegenden Arbeit und wird daher gesondert in **Kapitel 1.3** ausführlicher vorgestellt.

Faktor I (FI) ist eine Serinprotease, die C3b durch Spaltung inaktiviert. Drei Spaltungsstellen wurden bisher nachgewiesen, die zur Generierung der Fragmente iC3b und C3f führt^[68]. Spaltungsaktivität hat FI nur in der Gegenwart eines Kofaktors. Diese Kofaktor-Aktivität besitzen in der Flüssigen Phase C4BP (CP) und FH (AP, Amplifikation), sowie die membranständigen Regulatoren CR1 und MCP (beide CP und AP)^[69].

1.2.4 Flüssig-Phase Regulatoren des TP: Vitronectin, Clusterin

Zwei Plasmaproteine wurden als potentielle Regulatoren des Terminalen Weges identifiziert: Vitronectin (S-Protein; Cell-Spreading Faktor) und Clusterin (Apolipoprotein J; SP-40,40).

Vitronectin bindet an den Komplex C5b67 und bildet den löslichen Komplex SC5b67. Somit wird die Integration von C8 in die Membran und die Bildung des MAC verhindert^[70]. Clusterin bindet an C7, C8 und C9 und inhibiert ebenfalls die Bildung des MAC^[50]. Beide Proteine haben wichtige Funktionen außerhalb des Komplementsystems, so zum Beispiel die Vermittlung von Zelladhäsion^[71,72].

1.2.5 Membranständige Regulatoren des CP und AP: DAF, MCP, CR1

Drei membranständige Regulatoren des Komplementsystems wurden bisher identifiziert, die die Aktivierung von Komplement über CP oder AP auf Selbst-Oberflächen regulieren: Decay Accelerating Factor (DAF, CD55), Membrane Cofactor Protein (MCP, CD46), und Complement Receptor 1 (CR1, CD35)^[73].

DAF ist ein membranständiges Glykoprotein mit vier repetitiven extrazellulären Domänen, das über einen GPI-Anker (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol, GPI) auf Zelloberflächen inseriert. Es wird auf den meisten Körperzellen exprimiert, so zum Beispiel auf Erythrozyten, Leukozyten und Endothelzellen. DAF besitzt Decay Accelerating Aktivität und dissoziiert den C4b2a-Komplex des CP und den C3bBb-Komplex des AP, wenn diese auf einer Selbstoberfläche entstanden seien sollten^[51].

MCP ist ein transmembranes Glykoprotein mit vier repetitiven extrazellulären Domänen, einer transmembranen Region und einer zytoplasmatischen Domäne. Es wird auf vielen zirkulierenden Blutzellen des Abwehrsystems und fast allen bisher untersuchten Gewebezellen exprimiert. MCP dient als membranständiger Kofaktor für die Spaltung von C3b und C4b auf Selbst-Oberflächen durch FI^[74].

CR1 ist ebenfalls ein transmembranes Glykoprotein, bestehend aus dreißig repetitiven extrazellulären Domänen, einer transmembranen Region und einer zytoplasmatischen Domäne. Es wird hauptsächlich auf Erythrozyten und Leukozyten exprimiert, aber z.B. auch auf den Podozyten der Niere und der Astroglia. CR1 besitzt Decay Accelerating und Kofaktor-Aktivität und reguliert membranständig CP und AP^[53]. Daneben hat es weitere Funktionen in der Clearance von Immunkomplexen^[75].

1.2.6 Membranständige Regulatoren des TP: HRF, CD59

Zwei membranständige Proteine wurden als Regulatoren des Terminalen Weges identifiziert: Homologous Restriction Factor (HRF) und CD59 (HRF-20). Beide Glykoproteine sind membranständig mit einem GPI-Anker, und werden auf vielen Körperzellen exprimiert.

HRF bindet hauptsächlich an C8, daneben auch an C7 und C9. Es inhibiert die Bindung von C9 und somit die Formierung des MAC^[54]. CD59 bindet an den C5b678-Komplex. Es verhindert die Integration von C9 und unterbindet so die Desintegration der Membran durch den MAC^[76].

1.3 Der Komplementregulator Faktor H

1.3.1 Sequenz und Struktur von Faktor H

Der Komplementregulator Faktor H (FH) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 155 kDa und liegt im Plasma des Menschen in einer Konzentration von ungefähr 500 µg/L vor. Hauptsyntheseort für plasmatischen FH ist die Leber^[77]. Daneben exprimieren aber auch andere Zellen FH, so z.B. Monozyten, Hautfibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen wie Glioblastomzellen^[78,79,80,81,82]. Das kodierende Gen für FH liegt auf dem Chromosom 1q^[83]. In diese Region konnten weitere Regulatoren und Rezeptoren des Komplementsystems lokalisiert werden, so die Komplementrezeptoren CR1 und CR2, der Plasmaregulator C4BP und die membranständigen Regulatoren DAF und MCP. Diese Region wird daher auch als RCA-Gencluster bezeichnet (Regulators of Complement Activation, RCA)^[84,85,86]. Gemeinsames Strukturmerkmal der Proteine der RCA-Region ist ihr Aufbau aus repetitiven Elementen, die als SCRs bezeichnet werden (Short Consensus Repeat, SCR). Jedes SCR besteht aus ca. 60 Aminosäuren, unter denen sich charakteristischerweise vier Cysteine in konservierten Positionen befinden. Vorrangige Bedeutung der vier positionskonservierten Cysteine ist die Ausbildung von je zwei Disulfidbrücken innerhalb eines SCRs. Diese Cystin-Brücken werden in einem Cys I - Cys III und Cys II - Cys IV Modus ausgebildet und sind von entscheidender Bedeutung für die Stabilisierung der globulären Tertiärstruktur jedes einzelnen SCRs^[87]. Neben FH, welcher ausschließlich aus SCRs aufgebaut ist, beinhalten weitere Regulatoren SCRs in ihrer Struktur: so z.B. MCP (4 SCRs), DAF (4 SCRs) und CR1 (30 SCRs). Der charakteristische Aufbau aus globulären SCRs findet sich auch bei Komplement-Proteinen, die nicht zum RCA-Cluster gehören, so z.B. Faktor B, C1r, C1s und C2b^[88,89,90,91]. Auch außerhalb des Komplementsystems finden sich Proteine, die teilweise aus derartigen Strukturelementen aufgebaut sind, so z.B. der Gerinnungsfaktor XIIIb, das Apolipoprotein R oder der Interleukin-2-Rezeptor^[92,93,94].

Aufbau und Struktur von FH sind in **Abbildung 6** dargestellt. Das sezernierte FH Molekül ist ausschließlich aus 20 SCRs aufgebaut, die sich wie die Perlen einer Kette aneinander aufreihen, wie es in **Abbildung 6A** dargestellt ist. Neben der elongierten Form wurde auch eine in sich selbst zurückgefaltete Form für FH vorgeschlagen, die dann dem Griechischen Buchstaben α ähnelt^[95]. Die Struktur eines einzelnen SCR ist in **Abbildung 6B** wiedergegeben. Hieran soll die globuläre Tertiärstruktur und seine

Stabilisierung durch die Cystin-Brücken verdeutlicht werden. Die Darstellung der Schlaufenstruktur wurde analog zu den Ergebnissen der NMR-Studien von Barlow et al. gezeichnet^[96]. In **Abbildung 6C** ist beispielhaft die Aminosäuresequenz des SCR 20 von FH wiedergegeben. Hervorgehoben sind die Positionen der vier Cysteine und ihr I-III / II-IV Verknüpfungsmodus.

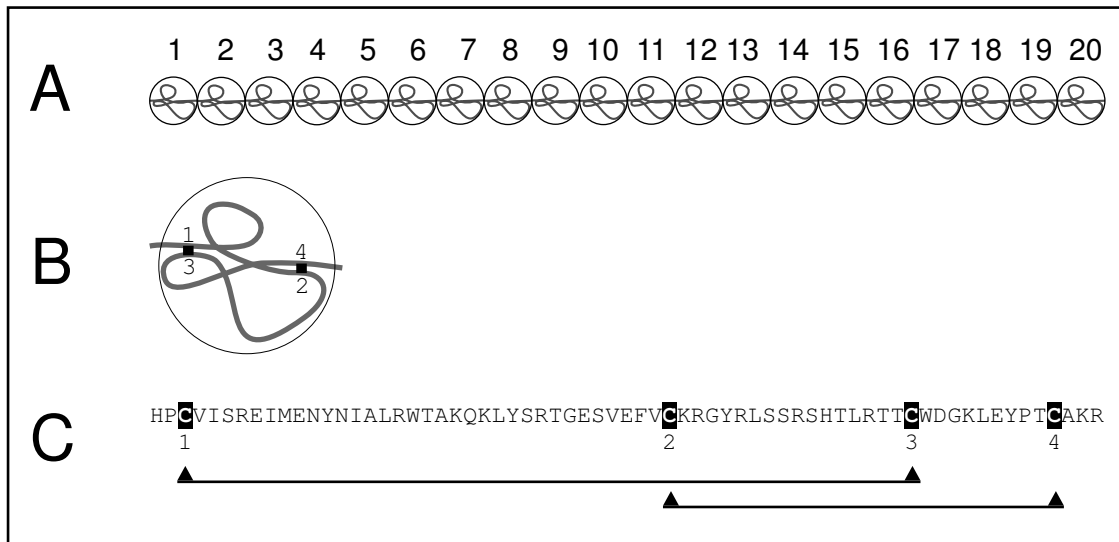


Abb. 6: Aufbau von FH und der SCR. **A:** FH ist aus 20 repetitiven Elementen, den SCR, zusammengesetzt. **B:** Die Tertiärstruktur eines SCR und die Positionen der Cystin-Brücken. **C:** Beispiel der Aminosäuresequenz eines einzelnen SCR (SCR 20); Positionen der Cysteine und ihr Verknüpfungsmodus.

FH wird beim Menschen von einem Gen innerhalb des RCA-Clusters auf Chromosom 1q32 kodiert. Das FH-Gen umfaßt einen Bereich von 100 kb, dessen mRNA Transkript 4,4 kb groß ist und für 1231 Aminosäuren kodiert. Die Sequenz beginnt mit einem Signalpeptid, welches 18 Aminosäuren lang ist und das Protein auf den sekretorischen Pfad innerhalb der Hepatozyten dirigiert. Das reife Protein ist 1213 Aminosäuren groß und ausschließlich aus 20 SCR aufgebaut. Es lassen sich 7 potentielle Glykosilierungsstellen in der Sequenz finden, die in SCR 4, 9, 14, 15, 15, 17 und 18 lokalisiert sind^[97]. In SCR 4 findet sich die Aminosäure-Sequenz RGD (Arg-Gly-Asp), die eine Konsensussequenz für Zelladhäsionsfunktionen darstellt. Für FH konnte allerdings bisher keine funktionelle Bedeutung dieser Sequenz gezeigt werden^[98].

1.3.2 Funktionen von FH

FH ist der entscheidende plasmatische Komplementregulator des Alternativen Weges. Darüberhinaus greift FH auch in die Amplifizierungsschleife auf der Ebene von C3b und C3bBb ein, wodurch eine Aktivierung, die durch den Klassischen Weg initiiert wurde, ebenfalls durch FH reguliert werden kann. Der AP wird im Gegensatz zum CP

ohne eine a priori vorhandene aktivierende Struktur aktiviert und attackiert kontinuierlich alle Oberflächen, die nicht durch Regulatoren geschützt werden. Dieser Schutz wird auf der plasmatischen Ebene durch FH gewährleistet, auf der Ebene der Zelloberfläche durch aus dem Plasma akquirierten FH und die membranständigen Regulatoren DAF, MCP und CR1. Interzelluläre Strukturen sind in ihrem Schutz vor einem fortgesetzten Angriff durch den AP auf FH angewiesen, da sie naturgemäß keine membranständigen Regulatoren tragen. Vor allem die glomeruläre Basalmembran ist physiologisch dem kontinuierlichen Angriff der Tick-over Aktivierung des AP ausgesetzt und muß deshalb durch FH geschützt werden, der aus dem Plasma akquiriert wird. FH übt somit seine regulatorische Funktion sowohl im Plasma als auch auf Zelloberflächen und interzellulären Gewebstrukturen aus. Drei Hauptmechanismen der Regulation durch FH wurden bisher identifiziert, die in **Abbildung 7** schematisch zusammengefasst sind.

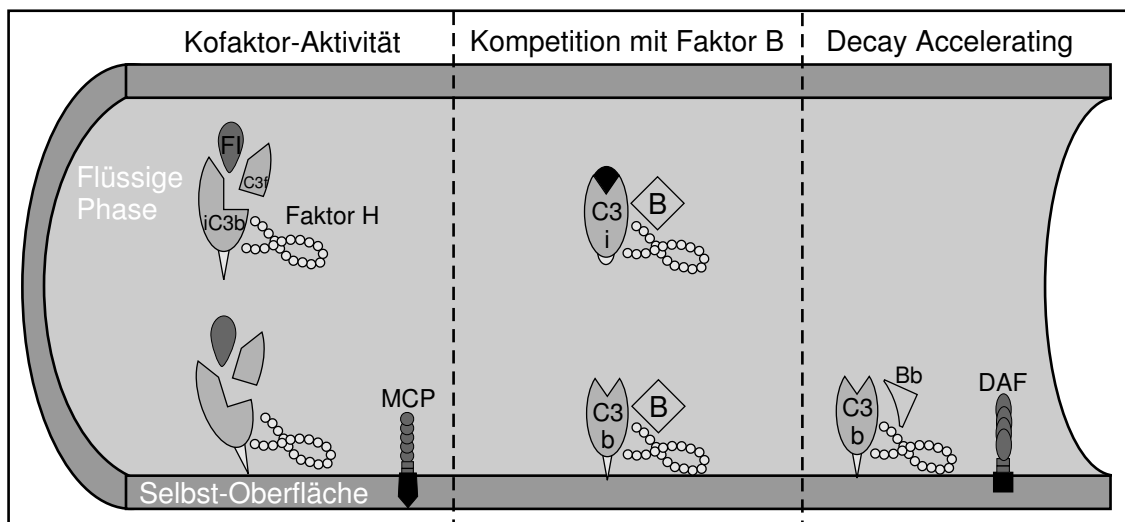


Abb. 7: Komplement-Regulation durch Faktor H. Dargestellt sind die Regulationen in der Flüssigen Phase und auf Selbst-Oberflächen. Kofaktor-Aktivität: Spaltung von C3b durch FI mit FH als Kofaktor in die Fragmente iC3b und C3f. Kompetition mit Faktor B um die Bindung an C3i und C3b. Decay Accelerating Aktivität: Degradation des C3bBb-Komplexes. Die beiden membranständigen Regulatoren MCP und DAF sind bei der entsprechenden Funktion dargestellt. FH ist hier in der Alpha-Form dargestellt.

In der Flüssigen Phase, und damit an einem sehr frühen Schritt der Aktivierung über den AP, besitzt FH Kofaktor-Aktivität für FI in der Spaltung von C3b. Ebenfalls in der flüssigen Phase kompetitiert FH mit Faktor B um die Bindung an C3i. Auf Selbstoberflächen besitzt FH Kofaktor-Aktivität; diese Funktion übt auch das membranständige MCP aus. Weiterhin kompetitiert FH mit Faktor B um die Bindung an C3b, das an Selbstoberflächen gebunden hat. FH hat Decay Accelerating Aktivität auf Selbstoberflächen und spaltet Bb von C3bBb ab; diese Funktion übt auch das

membranständige DAF aus.

Der entscheidende Mechanismus zur Unterscheidung zwischen zu schützender Selbstoberfläche (Non-Aktivator Oberfläche) und zu attackierender Fremdoberfläche (Aktivator-Oberfläche) wird durch FH gewährleistet, indem die Interaktion von FH mit C3b je nach Zusammensetzung der Oberfläche unterschiedlich ist^[99]. Die Affinität von FH zu C3b ist hoch, wenn dieses auf Selbstoberflächen abgelagert ist, während FH mit C3b kaum interagiert, wenn C3b auf Fremdstrukturen gebunden hat. Das Aktivierungspotential der Oberfläche wird nach bisheriger Kenntnis vor allem durch den Gehalt an negativen Ladungen der Oberfläche selbst bestimmt. Als entscheidende polyanionischen Ladungsträger wurden Sialinsäuren, Heparin und Glykosaminoglykane identifiziert^[100,101,102]. Modifikation oder Entfernung dieser polyanionischen Oberflächenmoleküle konvertieren eine Oberfläche von Non-Aktivator zu Aktivator^[103]. So ist die Affinität von FH für C3b, das auf Non-Aktivator Oberflächen gebunden ist, zehnmal höher als auf Aktivator Oberflächen^[104]. Auch die Form der Acetylierung der Sialinsäuren hat Einfluß auf das Aktivierungspotential einer Oberfläche^[105]. Letztlich gewährleistet das komplexe Zusammenspiel von FH mit C3b und der Oberfläche selbst die Unterscheidung zwischen Aktivator- und Non-Aktivator-Struktur^[106].

Die einzelnen bekannten Funktionen von FH konnten auf SCR-Bereiche lokalisiert werden. In **Abbildung 8** sind die Lokalisationen von Funktionen für FH dargestellt.

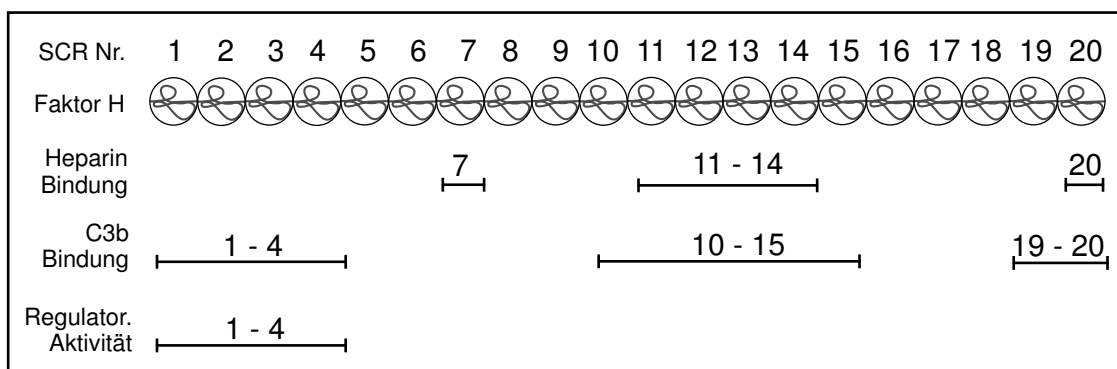


Abb. 8: Lokalisation von Funktionen für FH. Dargestellt ist FH mit seinen 20 SCRs und die Lokalisationen von Funktionsdomänen für Heparin-Bindung, C3b-Bindung und die regulatorische Aktivität (Decay Accelerating und Kofaktor-Aktivität).

Drei Bindungsstellen von FH für Heparin wurden bisher lokalisiert. Diese liegen in den Bereichen SCR 7, SCR 11-14 und SCR 20^[107,108,109,110]. FH bindet an C3b über drei verschiedene Bindungsstellen. Diese liegen innerhalb der Bereiche SCR 1-4, SCR 10-15

und SCR 19-20, wobei jeder Bindungsstelle eine distinkte Region im C3b Molekül zugeordnet ist^[111,112,66,67,113]. Decay Accelerating Aktivität und Kofaktor-Aktivität konnten beide auf die Region SCR 1-4 lokalisiert werden^[114,66,67].

FH hat neben den komplementregulatorischen noch weitere wichtige Funktionen innerhalb des Immunsystems. So bindet FH an Leukozyten und bewirkt die Freisetzung von FI aus Lymphozyten und Arachidonsäurederivaten aus Makrophagen^[115,116]. Des weiteren hat FH immunmodulatorische Wirkungen, so z.B. die Aktivierung von Monozyten und die Inhibition der Antikörperfreisetzung aus B-Zellen^[117,118]. FH ist ein Adhäsionsligand für Neutrophile und bewirkt eine Steigerung der Freisetzung von Sauerstoffradikalen, wenn diese durch C5a oder TNF α (Tumor Nekrose Faktor α , TNF α) stimuliert wurden^[119]. Für diese Interaktion mit Neutrophilen ist der Rezeptor Mac-1 (CD11b/CD18) beschrieben worden.

1.3.3 FH-ähnliche und FH-verwandte Proteine

Neben FH lassen sich in humanem Plasma weitere Proteine nachweisen, die Homologien zu FH aufweisen^[97]. Einmal handelt es sich dabei um eine alternative Splice-Form des Faktor H Gens, des weiteren um fünf strukturell verwandte Proteine, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden^[120]. Die Splicevariante besteht aus den ersten sieben N-terminalen SCRs von FH sowie vier zusätzlichen Aminosäuren. Dieses FH-ähnliche Protein wird als FHL-1 (factor H-like protein-1, FHL-1) oder Reconnectin (regulator of complement activation and fibronectin-like adhesion protein) bezeichnet^[98]. FHL-1 / reconnectin hat neben den strukturellen auch funktionelle Ähnlichkeiten zu FH: Es besitzt Kofaktor-Aktivität, in geringerem Maße Decay Accelerating Aktivität und bindet an Heparin^[66,67]. Eine einzigartige Funktion von FHL-1 / reconnectin besteht in der Vermittlung von Zelladhäsion an Matrixproteine wie Fibronectin. Diese Interaktion findet über eine RGD-Domäne (Arg-Gly-Asp) in SCR 4 statt, die wahrscheinlich von einem Rezeptor vom Integrintyp vermittelt wird^[121]. Die RGD Sequenz findet sich auch in SCR 4 bei FH, für die allerdings keine Zelladhäsionsvermittelnde Funktion gezeigt wurde.

Fünf weitere Plasmaproteine mit Homologie zu FH sind bisher charakterisiert worden und werden als FHR-1 bis FHR-5 bezeichnet (factor H-related protein, FHR)^[120]. Alle FHRs können in humanem Plasma mit Antikörpern gegen FH detektiert werden. Die FHRs sind aus 4 bis 9 SCRs aufgebaut, die Homologie zu einzelnen SCRs innerhalb von FH haben. Das N-terminale SCR aller FHRs hat hohe Homologie zu SCR 6 von

FH, die letzten beiden C-terminalen SCRs aller FHRs haben hohe Homologie zu den SCRs 19 und 20 von FH. Die SCR Zusammensetzung von FHL-1 / reconectin und FHR-1 bis -5 und deren homologe SCRs zu FH sind in **Tabelle 2** wiedergegeben.

	MW (kDa)	SCRs	Homolges SCR zu FH										Ref
FHL-1 / reconectin	42	7	1	2	3	4	5	6	7	+ 4 AS		[122]	
FHR-1	37-43	5	6	7	18	19	20						[123]
FHR-2	24-29	4	6	7	19	20						[124]	
FHR-3	45-56	5	6	7	8	19	20						[125]
FHR-4	42 (Dimer 86)	5	6	8	9	19	20						[126]
FHR-5	65	9	6	7	10	11	12	13	14	19	20	[127]	

Tab. 2: Aufbau von FHL-1 / reconectin und den fünf bekannten FHRs. Angegeben sind FH-ähnliches Protein-1 (FHL-1 / reconectin) und die fünf bisher bekannten FH-verwandte Proteine (FHRs). MW= Molekulargewicht; SCRs= Gesamtanzahl der SCRs; Ref= Referenz. FHL-1 besitzt am C-Terminus 4 zusätzliche Aminosäuren. FHR-4 liegt in humanem Plasma als Dimer vor. Die Molekulargewichte von FHR-1, -2 und -3 variieren je nach Glykosilierungsgrad.

Über die Funktionen der FHRs ist bisher wenig bekannt. Die Proteine FHR-1, -2 und -4 wurden in Apolipoproteinkomplexen nachgewiesen^[128]. Für FHR-3, -4 und -5 konnte die Bindung an C3b gezeigt werden, allerdings ist für kein FHR bisher eine komplementregulatorische Funktion demonstriert worden.

1.4 Pathologien durch Defizienz für Komplementregulatoren

Eine Reihe von Erkrankungen sind beschrieben worden, die die essentielle Bedeutung der Komplementregulatoren verdeutlichen. Es können sowohl Regulatoren in der flüssigen Phase als auch die Membranständigen betroffen sein. Im Folgenden werden drei häufigere Pathologien der Komplementregulatoren und ihre assoziierten Erkrankungen beschrieben. Für andere Regulatordefizienzen wurden bisher zu wenig Fälle beschrieben, um eine Krankheitsentität zu definieren.

1.4.1 C1-Inhibitor: HAE

Das Hereditäre Angioneurotische Ödem (Hereditary Angioedema, HAE) ist eine schwerwiegende systemische Erkrankung, die durch die partielle Defizienz für den plasmatischen Regulator C1-Inh oder dessen Inaktivität verursacht wird^[129]. Das für C1-Inh kodierende Gen wurde auf Chromosom 11 lokalisiert. Es existieren zwei Typen von HAE: Typ I weist eine plasmatische Reduktion von C1-Inh um 50 – 75 % des normalen

Spiegels auf und ist die weitaus häufigere Variante (~ 85 % aller HAE Fälle). Es wurden verschiedene Mutationen beschrieben, die zu Syntheseabbruch oder Trunkierung des Proteins führen^[130]. Beim Typ II handelt es sich meist um Punktmutationen im Bereich von Aminosäuren des aktiven Zentrums, wodurch die Antiprotease-Aktivität verloren geht^[131]. Die Pathologie des HAE ist einerseits durch die kontinuierliche Aktivierung des CP und die Entstehung immunaktivierender Fragmente bedingt, andererseits durch die fehlende Inhibition des Kininsystems^[132]. Klinisch stehen Ödeme an Integument und Mukosa im Vordergrund, die zu massiven Schwellungen in Gesichtsbereich, Larynx und Trachea führen und daher lebensbedrohliche Obstruktionen hervorrufen können^[133]. Therapeutische Regime beinhalten die Infusion von Frischplasmen zur Substitution von C1-Inh und das Testosteronderivat Danazol zur Steigerung der körpereigenen Synthese von C1-Inh^[134]. Obwohl die Symptome klinisch an eine Anaphylaktische Reaktion vom Typ I erinnern, kann die intravenöse Anwendung von Antihistaminika, Kortikosteroiden oder Adrenalin hier keine Wirkung haben^[135].

1.4.2 DAF, HRF und CD59: PNH

Eine definierte Krankheitsentität stellt die Paroxysmal Nächtliche Hämoglobinurie dar (Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria, PNH). Ihr liegt die Proliferation eines Klonen von hämatopoetischen Stammzellen zugrunde, die eine Synthesestörung für das Ankermolekül GPI aufweisen^[136]. Obwohl der gestörte Schritt in der Synthese des GPI-Ankers noch nicht ermittelt wurde, konnte die GPI-Defizienz auf das PIG-A Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert werden^[137]. Da DAF, HRF und CD59 über einen GPI-Anker in der Membran von Blutzellen inserieren, besteht eine Defizienz für alle drei Regulatoren. Weitere GPI-verankerte Moleküle, die Funktionen außerhalb der Komplementregulation haben, werden auf Blutzellen dieser Patienten ebenfalls nicht gefunden^[138]. Aufgrund der Pluripotenz hämatopoetischer Stammzellen können alle Linien der Differenzierung gestört sein.

Durch die Defizienz für die drei membranständigen Regulatoren sind die Blutzellen dem kontinuierlichen Angriff des Komplementsystems ausgesetzt, der über die Tick-over Aktivierung des AP eingeleitet wird. Insbesondere im sauren Milieu ist die Aktivierung und Beladung mit C3b durch den AP ausgeprägt. In nächtlichen Apnoe-Phasen kann eine respiratorische Azidose entstehen, die zu komplementvermittelter Hämolyse und morgendlicher Hämoglobinurie führt^[135], was der Erkrankung ihren

Namen gegeben hat. Klinisch wird die PNH zu den korpuskulär hämolytischen Anämien gerechnet. Da aber auch Thrombozyten von der Erkrankung betroffen sind, kommt es zur Bildung von Mikrothromben und -embolien, welche rezidivierende abdominelle und lumbale Schmerzenepisoden verursachen; hirnischämische Schlaganfälle kommen ebenfalls vor. Die Therapie der PNH ist in der Regel symptomatisch. Eine allogene Knochenmarkstransplantation erscheint zur Zeit als die einzige kausale, aber risikoreiche Therapie^[133].

1.4.3 FH: MPGN II, Kollagen III GP, aHUS und Infektionen

Es sind mehrere Erkrankungen im Zusammenhang mit Dysfunktion oder Defizienz für den plasmatischen Regulator FH beschrieben. Als schwere Nephropathien treten die Membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II (MPGN II) und die Kollagen Typ III Glomerulopathie (GP) auf. Eine systemische Erkrankung, die ebenfalls die Niere betrifft und mit FH-Dysfunktion oder -Defizienz assoziiert ist, ist das Hämolytisch Urämische Syndrom in seiner atypischen Form. Daneben sind rezidivierende Infektionen z.B. mit den Erregern *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* beschrieben worden. Da diese Erkrankungen von zentraler Bedeutung für die Thematik der vorliegenden Arbeit sind, werden sie im folgenden **Kapitel 1.5** gesondert behandelt.

1.5 Pathologien der Defizienz und Dysfunktion von Faktor H

1.5.1 Pathophysiologie

Defizienz oder Dysfunktion von FH verursacht einen selektiven Verlust der Regulation des AP und der Amplifikationsschleife. Wird die kontinuierliche Tick-over Aktivierung des AP nicht durch FH reguliert, so gerät der AP außer Kontrolle. Dadurch kann C3 massiv zu C3b aktiviert und damit verbraucht werden. Als Folge entsteht eine sekundäre Defizienz für C3 und FB und damit eine Hypokomplementämie. Da C3 das zentrale Molekül des Komplementsystems ist, ist der Organismus nun vor eindringenden Pathogenen nicht mehr effektiv geschützt und es kann eine erhöhte Suszeptibilität für Infektionen resultieren. Rezidivierende Infektionen z.B. mit *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* sind häufig im Zusammenhang mit FH-Defizienz oder -Dysfunktion beschrieben^[139].

Fällt FH als AP-Regulator aus, so bleiben als letzte Regulationsinstanz nur noch die membranständigen Regulatoren DAF und MCP übrig. Interzelluläre Gewebestrukturen wie die glomeruläre Basalmembran sind aber in ihrem Schutz vor AP Aktivierung auf

plasmatischen FH angewiesen. Daher sind verschiedene schwere Nierenerkrankungen in Assoziation mit einer FH-Defizienz oder -Dysfunktion beschrieben worden^[60]. Die prominentesten Nierenläsionen stellen die Membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II und die Kollagen Typ III Glomerulopathie dar^[140]. Eine systemische Erkrankung, die ebenfalls die Niere in Mitleidenschaft zieht ist das atypische Hämolytisch Urämische Syndrom^[141].

1.5.2 Die Glomerulonephritiden

Als Primären Glomerulopathien werden die Glomerulonephritiden (GN), die Glomerulosklerosen (GS) und sonstige Glomerulopathien (GP) zusammengefasst. Die Glomerulonephritiden (GN) sind eine Gruppe von Nierenerkrankungen, die keine pathogenetische oder klinische Einheit darstellen, sondern rein histopathologisch definiert sind^[142]. Gemeinsamkeit aller GNs ist die beidseitige entzündliche Reaktion der Nieren, die zuerst innerhalb des Glomerulum auftritt und so von einer interstitiellen Nephritis unterschieden wird. Die Einteilung der GNs erfolgt anhand der Morphologie der am stärksten betroffenen Struktur des Glomerulums, eine Zuordnung kann daher nur über eine Nierenbiopsie erfolgen. Histopathologisch werden folgende Formen unterschieden: Minimal-Läsion GN, Endokapilläre GN, Extrakapilläre GN, Membranoproliferative GN Typ I und II, Mesangioproliferative GN und Membranöse GN^[143,144]. **In Tabelle 3** sind die verschiedenen Formen der GNs und die Hauptaspekte ihrer Histopathologie zusammengefasst.

Bezeichnung	Histopathologie	Ablagerung
Membrano-proliferative GN, Typ I-II (III)	Mesangiumzell-Proliferation und Matrixzunahme, Verdickung der Basalmembran	Typ I: IgG, C3, subendothelial Typ II: isoliert C3, Dense Deposits (Typ III: IgG, C3, subendo-/epithelial)
Endokapilläre GN	Proliferation von Mesangium und Kapillar-Endothelzellen	IgG, IgM, IgA, C3, Humps subepithelial
Extrakapilläre GN, Typ I-III	Halbmondförmige Proliferation des Kapselepthels	Typ I: Linear IgG, C3 Typ II: Granulär IgG, C3 Typ III: Keine Immundepots
Mesangio-proliferative GN	Isolierte Mesangiumzell-Proliferation und Matrixzunahme	IgG, IgM, IgA, C3
Membranöse GN	Isolierte zahnradartige Zunahme der glomerulären Basalmembran (Spikes)	IgG, IgM, IgA, C3, subendotheliale Spike-Bildung der Basalmembran
Minimal-Läsion GN	Keine Lichtmikroskopie, elektronenmikroskopisch Verlust der Podozytenfüßchen	Keine

Tab. 3: Einteilung der Glomerulonephritiden (GN). Einteilung nach den Hauptaspekten der Histopathologie und der Zusammensetzung der Ablagerungskomponenten (WHO-Klassifikation).

Klinisch werden die GNs eingeteilt nach dem Auftreten des Nephrotischen oder des Nephritischen Syndroms^[135]. Leitbefund des Nephrotischen Syndroms die selektive Proteinurie und konsekutiver Ödembildung. Mit einem Nephrotischen Syndrom können sich die Minimal-Läsion GN, die Membranoproliferative GN und die Membranöse GN manifestieren. Das Nephritische Syndrom ist durch das Auftreten einer Makrohämaturie und Oligurie charakterisiert. Nephritisch manifestiert sich die Endokapilläre GN. Die Extrakapilläre GN kann sich von oligosymptomatisch bis zur rapid progredienten Niereninsuffizienz manifestieren und stellt zum Teil den Endpunkt im Verlauf anderer GNs dar.

Für die Glomerulonephritiden sind verschiedene Pathogenesen postuliert worden. Im Tierversuch konnte für einige GNs die erwartete Histopathologie experimentell erzeugt werden (Serum-Nephritis, Heymann-Nephritis, Masugi-Nephritis)^[145,142]. Dabei werden vier Pathophysiologien unterschieden: GN durch zirkulierende Immunkomplexe, GN durch In-Situ-Immunkomplexe, GN durch T-Zell-Vermittlung und GN durch Komplement-Vermittlung. Bei einer GN durch zirkulierende Immunkomplexe werden diese an Basalmembran oder Mesangium abgelagert und aktivieren lokal das Komplementsystem (Mesangioproliferative GN, Membranoproliferative GN Typ I). Bei der GN durch In-situ-Immunkomplexe binden zirkulierende Antikörper an Antigene im Glomerulum; dabei kann das Antigen renal sein (Extrakapilläre GN, Membranöse GN), oder nicht-renal und erst sekundär dort gebunden sein (Endokapilläre GN). Die Zellvermittelte GN wird durch T-Zell Aktivierung und Infiltration ausgelöst (Minimal-Läsion GN). Die Membranoproliferative GN Typ II stellt eine Ausnahme dar, da diese ausschließlich Komplement-vermittelt ist und sich keine Beteiligung von Antikörpern oder Immunkomplexen findet.

1.5.3 MPGN II und Kollagen III GP bei Mensch und *Sus scrofa*

Die Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN) ist eine seltene Primäre Glomerulopathie und macht ca. 3 - 7 % aller bioptisch diagnostizierten GNs aus^[133]. Sie ist durch folgende Histologie gekennzeichnet^[146]: Zunahme mesangialer Zellen, Vermehrung der mesangialen Matrix, massive Verdickung der Basalmembran, Doppelkonturierung der Basalmembran (Bahnschienen-Aspekt), Lobulierung des Schlingenkonvoluts, dichte granulozytäre Infiltration. Es werden allgemein zwei Subtypen der MPGN unterschieden: In der Immunhistologie und Elektronenmikroskopie lassen sich beim Typ I Immunkomplexe mit IgG und C3

subendothelial nachweisen. Beim Typ II wird isoliert nur C3 intramembranös nachgewiesen. Diese werden als Dense Deposits bezeichnet, die MPGN Typ II daher auch als ‘Dense Deposits Disease’. Bei einem vorgeschlagenen Typ III, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Variante des Typs I handelt, wird IgG und C3 subendothelial und subepithelial nachgewiesen.

Die Membranproliferative Glomerulonephritis (MPGN) kann prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten, wird jedoch am häufigsten bei Kindern beobachtet. Beide Subtypen gehen in der Regel mit einem Nephrotischen Syndrom einher: Die Patienten leiden unter einer generalisierten Ödembildung. Diese wird durch die selektive Proteinurie von über 3,5 g / 24 h hervorgerufen, die eine Hypalbuminämie zur Folge hat. Weitere Befunde sind eine Fettstoffwechselentgleisung mit Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie, und ein Hypertonus. Das Risiko für thromboembolische Ereignisse ist erhöht. Daneben gibt es aber auch nephritische Manifestationen. Die Therapie ist symptomorientiert: Zur Behandlung von Ödemen und Hypertonus kommen Schleifendiuretika und ACE-Hemmer zum Einsatz. Eine Progressionsverzögerung soll sich mit Dipyridamol und ASS erzielen lassen. Auch Azathioprin, Chlorambuzil, Cyclophosphamid und Prednisolon sind eingesetzt worden, allerdings mit geringem Erfolg. Über 50 % der Patienten werden innerhalb von 5 Jahren terminalen Niereninsuffizient und bedürfen einer Dialyse oder Transplantation. Bei der MPGN II rekurriert die Erkrankung im Transplantat in mehr als 85 %, und hat einen erneuten Organverlust in 50 % innerhalb eines Jahres zur Folge^[135,133].

Die MPGN II ist die einzige GN, bei der sich isoliert C3, aber keine Immunglobuline als Ablagerung nachweisen lassen. Dieser Unterschied ist von herausragender Bedeutung für eine Klärung der Pathogenese, da es sich der MPGN Typ II offensichtlich nicht, wie bei fast allen anderen GNs, um ein Immunkomplex-vermitteltes Geschehen handelt. Vielmehr legt das isolierte Auftreten von C3-Ablagerungen eine pathologische Aktivierung oder mangelnde Regulierung des Alternativen Weges des Komplementsystems nahe, was in Übereinstimmung mit der Hypokomplementämie der Patienten steht. Auch die Rekurrenz der Erkrankung in der Transplantatniere mit identischer Histopathologie weist auf eine systemische Erkrankung unter Beteiligung des AP hin. Da Faktor H der entscheidende Regulator des AP ist, ist eine Assoziation von MPGN II mit FH-Defizienz und -Dysfunktion Gegenstand kontinuierlicher Untersuchung.

Die Klassifizierung der Primären Glomerulopathien ist einem stetigen Wandel

unterworfen. So wurde als eigenständige Histopathologie die Kollagen Typ III Glomerulopathie (Kollagen III GP) vorgeschlagen^[147]. Die histologische Beschreibung umfasst lichtmikroskopisch eine Mesangiumzell-Proliferation und Matrixzunahme sowie eine Verdickung der Basalmembran. Elektronenmikroskopisch wird eine mesangiale Deposition von fibrillären Strukturen beschrieben. In der Immunfluoreszenz kann Kollagen Typ III dargestellt werden. Die Akzeptanz dieser Histopathologie als eigenständige Entität ist unregelmäßig, in der aktuellen Literatur findet sie sich kaum noch. Präsenz oder Abwesenheit von abgelagertem C3 ist nicht als Kriterium in die Beschreibung integriert. Hingegen wurde diese Histologie bereits bei ihrer Erstdefinition mit der der MPGN II verglichen, der sie auch klinisch sehr ähnelt^[148]. Darüber hinaus ist das Auftreten von Kollagen Typ III bei verschiedenen Glomerulonephritiden beschrieben, und wurde als unspezifisches Reaktionsmuster auf glomeruläre Schädigung gewertet^[149]. In der vorliegenden Arbeit werden MPGN II und Kollagen III GP so genannt, wie sie in den Erstbeschreibungen der Fälle klassifiziert wurden, obwohl nach aktuellen Nomenklaturen eine gemeinsame Klassifizierung der genannten Fälle möglich erscheint. Im Folgenden werden die Veröffentlichungen, die eine Assoziation dieser Erkrankungen mit plasmatischer FH-Defizienz beschrieben haben, dargestellt.

Levy et al. berichteten 1986 von zwei Algerischen Brüdern, die unter Glomerulonephritis litten, bei denen die Plasmaspiegel von FH unter 10 % erniedrigt waren^[150]. C3 war ebenfalls unter 10 % erniedrigt, FB unter 20 %, die terminalen Komponenten (C5 - C9) unter 35 %. In der Histologie der Nierenbiopsie fanden sich mesangiale Proliferation und Matrixzunahme, Doppelkonturierung der Basalmembran und ein isolierter Nachweis von C3. Für beide Eltern konnten halbnormale Plasmaspiegel für FH nachgewiesen werden (Vater 40 %, Mutter 55 %), für zwei Geschwister der Patienten ein Spiegel von jeweils 40 %. Es wurde daher ein autosomal rezessiver Vererbungsmodus für die FH-Defizienz angenommen. Lopez-Larrea et al. berichteten 1987 über drei Schwestern, die an MPGN erkrankten^[140]. Zwei Schwestern entwickelten zusätzlich eine Sepsis, die durch *Neisseria meningitidis* ausgelöst wurde. Bei allen drei Schwestern lag der Plasmaspiegel für FH unterhalb der Nachweisgrenze, C3 war stark erniedrigt, FB lag unter 15 %, die terminalen Komponenten unter 10 %. Bei beiden Eltern wurden allerdings normale FH-Spiegel gefunden. 1988 berichteten Brai et al. über eine italienische Familie mit komplexer Komplementdefizienz für FH und C2^[151]. Ein Kind litt bei FH-Spiegeln von < 1 % unter einer Nephritis sowie dem

Systemischen Lupus Erythematoses, die zwei Geschwister unter Meningitis durch *Neisseria meningitidis*. Die Plasmatische Defizienz für FH war autosomal rezessiv von den Eltern vererbt worden, deren Plasmaspiegel für FH um 50 % lagen. Diese Familie wurde im Jahr 2000 von Sanchez-Corral et al. weiter untersucht^[152]. Hier fand sich eine Mutation [G638T], die zur Einführung eines Stop-Codons [E171^{Stop}] in SCR 3 führte, wobei diese Mutation bei den Patienten homozygot gefunden wurde. Beide Eltern waren heterozygot für diese Mutation, so daß ein autosomal rezessiver Erbgang nachgewiesen wurde. Eine zweite Mutation [C2707T] veränderte die AS-Folge nicht und wurde als Polymorphismus gewertet.

Eine ausführliche Fallbeschreibung von plasmatischer FH-Defizienz in Assoziation mit Kollagen Typ III Glomerulopathie stammt von Vogt et al. aus dem Jahr 1995^[153]. Patient war ein 13 Monate alter Amerikanischer Indianerjunge (Sioux), der mit Hypertonus und Hypokomplementämie vorgestellt wurde. Eine Nierenbiopsie wurde als Kollagen III GP mit segmentaler C3 Ablagerung klassifiziert. Die Plasmaspiegel für C3 und FB waren erniedrigt und es konnte kein FH im Plasma nachgewiesen werden. Nur leicht erniedrigte FH Plasmaspiegel wurden bei beiden Eltern gefunden. Die molekulare Pathogenese dieses Falles konnte 1997 durch Ault et al. geklärt werden^[154]. Es wurden zwei Mutationen gefunden: eine Mutation [T1679C] führt zu einem AS-Austausch [C518R] in SCR 9, eine zweite Mutation [G2949A] führt zu einem AS-Austausch [C941Y] in SCR 16. Die Mutationen fanden sich jeweils auf einem der beiden Allele. Die SCR 9 Mutation wurde heterozygot bei der Mutter gefunden, die SCR 16 Mutation heterozygot beim Vater. Immunohistologische Untersuchungen von Hautfibroblasten des Patienten zeigten eine massive intrazelluläre Anreicherung von FH, die innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert werden konnte. Die gefundenen Mutationen betreffen jeweils den zweiten Cystein-Rest innerhalb der entsprechenden SCRs. Cysteine sind durch die Ausbildung von I-III und II-IV Cystin-Brücken für die Tertiärstruktur der SCRs von entscheidender Bedeutung. Die gefundenen Mutationen machen eine korrekte Verknüpfung der Cysteine unmöglich und zerstören die Tertiärstruktur der betroffenen SCRs. Als Folge wird das Protein im ER reteniert und reichert sich hier an. Der Nachweis von akkumuliertem FH in den Fibroblasten bei totalem Fehlen von FH im Plasma stellt einen Sekretionsblock für das pathologisch veränderte Protein dar. Dieser Block führt zwar zu einer totalen Plasmadefizienz für FH, aber das alternative Spliceprodukt FHL-1 / reconectin kann normal sezerniert werden, da es nur aus den ersten 7 SCRs und 4 weiteren AS besteht und somit von der Mutation

nicht betroffen ist. Schmidt et al. führten 1999 Transfektionsstudien der gefunden Mutationen durch und bestätigten Sekretionsblock und ER-Anreicherung, daneben fanden sie eine verlangsamte Degradierung des Proteins^[155].

Ein Tiermodell für die Assoziation von plasmatischer FH-Defizienz und MPGN II wurde 1993 bei *Sus Scrofa* von Jansen et al. beschrieben^[156,157]. In einer Norwegischen *Yorkshire*-Schweinezucht wurde eine auffallend hohe Sterblichkeit der Ferkel beobachtet, bei deren Sektion ungewöhnlich geschwollene Nieren auffielen. In der histologischen Untersuchung wurde eine Membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II diagnostiziert mit verdickter glomerulärer Basalmembran, glomerulären C3-Ablagerungen und ultrastrukturell intramembranösen Dense Deposits. Plasma-Proben der betroffenen Ferkel wiesen erniedrigte C3-Spiegel sowie Erhöhung der Nierenparameter auf. Hogasen et al. wiesen 1995 nach, daß fraktioniertes Plasma der gesunden Ferkel durch Transfusion auf die Erkrankten den Median der Überlebenszeit von 37 Tage auf 82 Tage anheben konnte. Die Maximale Lebenszeit wurde von 72 Tage auf 375 Tage erhöht. Fortschreitende Plasma-Fraktionierungen identifizierten ein einziges Plasmaprotein, welches für die lebensverlängernde Wirkung verantwortlich war^[158]. Das Protein wurde ansequenziert und mittels Homologievergleiche als analoges Protein zu humanem Faktor H identifiziert. Eine totale Plasmaproteindefizienz für FH des Schweines wurde bei homozygot erkrankten Ferkeln nachgewiesen, heterozygot erkrankte Ferkel konnten über halbnormale Plasmaspiegel identifiziert werden. Kreuzungsexperimente enthüllten einen autosomal-rezessiven Vererbungsmodus mit kompletter Penetranz. Durch Ausschluß von heterozygot erkrankten Schweinen von der weiteren Zucht konnte die Krankheit eliminiert werden^[159]. Die molekulare Grundlage der Erkrankung wurde bisher nicht aufgeklärt.

Neben der Plasmaproteindefizienz für FH sind auch Fälle beschrieben worden, die zu einer Dysfunktion von FH führen. Dabei stört der zugrundeliegende pathologische Prozess die Interaktion von FH mit seinen Bindungspartnern in der Regulation des AP. Meri et al. beschrieben eine Patientin mit hypokomplementämischer MPGN, deren Plasmaspiegel für FH normal waren^[160]. Aus Serum und Urin wurde ein monoklonales Immunglobulin Lambda Leichtketten Dimer isoliert und als Protein LOI bezeichnet. Es konnte von Jokiranta et al. nachgewiesen werden, daß dieser Autoantikörper LOI den AP in einer direkten Dosis-Wirkungs-Beziehung aktiviert^[161]. Eine Bindung von LOI an FH wurde gezeigt, die innerhalb von SCR 3 lokalisiert werden konnte. Im Bereich von SCR 1-4 ist die regulatorische Aktivität von FH lokalisiert. Die vorgeschlagene

Pathophysiologie besteht in einer Bindung von LOI an FH, wodurch dessen Interaktion mit C3b verhindert wird, was eine nicht regulierte Aktivierung des Komplementsystems über den AP zur Folge hat.

Die Regulation des AP kann auch durch Pathologien gestört sein, die die Interaktion von normalem FH mit C3bBb betreffen. Als Nephritische Faktoren (Nephritic Factors, NeF) sind Autoantikörper beschrieben worden, die an die C3-Konvertase C3bBb binden^[162]. Daha et al. zeigten, daß die C3-Konvertase des AP durch die NeF Bindung pathologisch stabilisiert und resistent gegen die Regulation des AP durch FH wird^[163]. Eine Verzehnfachung der Halbwertszeit der Konvertase ist die Folge.

Für eine Assoziation von FH-Defizienz und Dysfunktion mit MPGN II oder Kollagen III GP sind zusammenfassend verschiedene Pathogenesen beschrieben: einerseits Dysfunktion durch Antikörper, die die Interaktion von FH und C3b bzw. C3bBb auf einem der beiden Aktionspartnern stören, andererseits hereditäre plasmatische Defizienz bei Mensch und *Sus scrofa*. Beide Pathomechanismen führen zur mangelnden Regulation des AP durch FH, zu unkontrollierter Komplementaktivierung, zur isolierten Ablagerung von C3b in der Niere und letztlich zu MPGN II oder Kollagen III GP mit Niereninsuffizienz. Die kodominante Expression der beiden FH Allele steht in Übereinstimmung mit den beschriebenen Fällen von autosomal rezessivem Erbgang bei subnormalen FH-Plasmaspiegeln der Eltern und totaler plasmatischer FH-Defizienz bei den Patienten. Die molekulare Pathogenese der plasmatischen FH-Defizienz in Assoziation mit MPGN II / Kollagen III GP konnte bisher nur in einem einzigen Fall geklärt werden. In diesem von Ault et al. beschriebenen Fall führen zwei Mutationen auf je einem Allel zum AS-Austausch hochkonservierter Cystein-Reste, was die korrekte Ausbildung der SCR-Struktur verhindert und einen Sekretionsblock für das pathologische Protein zur Folge hat. Die molekulare Pathogenese der Plasmadefizien für FH im Tiermodell *Sus scrofa* konnte bisher nicht geklärt werden.

1.5.4 Das atypische Hämolytisch Urämische Syndrom

Eine weitere Erkrankung, für die eine Assoziation mit FH gefunden wurde, ist die atypischen Form des Hämolytisch Urämischen Syndroms. Das Hämolytisch Urämische Syndrom (HUS) ist eine akute systemische Erkrankung, die durch Mikroangiopathie, Hämolyse und Thrombozytopenie gekennzeichnet ist und zum akuten Nierenversagen führen kann^[164]. Formalpathogenetisch beginnt die Erkrankung mit einer Gefäßwandveränderung der Endstrombahn und einer primären Schädigung des

Endothels^[165]. Als Folge kommt es zum Auftreten von Mikrothrombosen, die bevorzugt die Niere betreffen. Hier kommt es histologisch zur ödematösen Schwellung mit Ablösung der Endothelien und thrombotischer Verlegung des Kapillarlumens. Die thrombotische Mikroangiopathie löst ihrerseits eine mechanische Zerstörung der Erythrozyten aus, die als Fragmentozyten im Ausstrich pathognomisch sind^[135,142].

Es werden zwei Formen von HUS unterschieden^[166]. Die typische Form von HUS ist mit einer Diarrhoe assoziiert und wird in der Regel durch Enterohämorrhagische *E.coli* (EHEC) ausgelöst. Die typische, Diarrhoe-assoziierte Form wird auch als dHUS bezeichnet. EHEC der Serogruppe O157:H7 können prophagenabhängig ein shigaähnliches Toxin bilden, welches für dHUS verantwortlich gemacht wird. dHUS hat eine gute Prognose, Rückfälle sind selten und Rekurrenz in einer Transplantatnieren kommen kaum vor. Eine zweite Form stellt das atypische HUS dar (aHUS). Diese Form steht nicht im Zusammenhang mit einer EHEC-Infektion, sondern tritt familiär gehäuft oder sporadisch auf. Die Prognose ist schlecht, Rückfälle sind häufig und kommen oft auch nach einer Nierentransplantation wieder vor. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist Gegenstand kontinuierlicher Forschung.

Thompson et al. berichteten 1981 über 2 Geschwister mit aHUS, deren plasmatische FH-Spiegel unter 10 % lagen^[167]. Der Indexfall präsentierte sich im Alter von 8 Monaten mit aHUS. Die miteinander verwandten Eltern hatten um ca. 50 % reduzierte FH-Plasmaspiegel. 1990 berichteten Roodhooft et al. über ein Mädchen, das drei Episoden von aHUS erlitt, die letzte nach einer Nierentransplantation^[168]. Die FH-Plasmaspiegel der jungen Patientin lagen bei 48 %, die des gesunden Vaters bei 34 %. Pichette et al. beschrieben 1994 eine große Familie, bei denen mehrere Mitglieder FH-Spiegel von ca. 50 % aufwiesen^[169]. Der Indexfall hatte FH-Spiegel von 5 %, seit dem Alter von 19 Jahren hatte sie drei Episoden von aHUS erlitten. Rougier et al. untersuchten 1998 vier nicht verwandte und zwei verwandten Patienten, von denen sich fünf mit den klinischen Symptomen von aHUS präsentierten^[170]. In vier Fällen konnten die histologischen Merkmale der Thrombotischen Mikroangiopathie nachgewiesen werden, in einem Fall wurde keine Biopsie durchgeführt. Die Plasmaspiegel der Patienten lagen bei 40 %, 30 %, 45 % und bei zwei Patienten unter 5 %. Eine 13-jährige Patientin mit FH-Spiegeln von 16 %, die sich nicht mit aHUS-Symptomen präsentierte, wies in der Nierenbiopsie eine massenhafte, isolierte C3-Ablagerung auf, was eine Einordnung zur MPGN II möglich erscheinen läßt. Die molekulare Pathogenese konnte in keinem der oben genannten Fälle geklärt werden.

Im Jahr 1998 führten Warwicker et al. erstmals eine Kopplungsanalyse an 4 Familien mit familiärem aHUS durch und wiesen eine Ko-Segregation der Region 1q32 nach, in der auch das FH-Gen liegt^[171]. In dieser Studie wurden erstmalig zwei Mutationen im FH-Gen beschrieben, die mit aHUS assoziiert sind. Drei weitere große genetische Studien sind im Jahr 2001 veröffentlicht worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Autor, Jahr, Ref.	Mutation	SCR	AS-Austausch	FH-Plasma-spiegel	Anmerkung
Warwicker, 1998, ^[172]	A154 ^{del 4bp}	1	Stop nach 4AS	50 %	Sporadischer Fall
	C3716G	20	R1215G	Normal	2 große Familien
Richards, 2001, ^[173]	C3299G, A3559 ^{del}	18 19	Q1076E, Stop nach 6 AS	Reduziert	Sporadischer Fall, je 1 Allel betroffen
	A3429G	19	D1119G	Normal	2 Geschwister
	C3716G	20	R1215G	Normal	Sporadischer Fall
	C3624G	20	T1184R	Normal	Sporadischer Fall
	C3645T, T3663C	20 20	S1191L, V1197A	Normal	1 Patient, 2 Mutat. auf 1 Allel
Perez-Caballero, 2001, ^[174]	G3621T	20	W1183L	>1000 mg/dl	Sporadischer Fall, Heterozygot
	T3663C, 1 Nullallel	20	V1197A	~100 mg/dl	1 Patient, ein mütterl. Nullallel
	T3639G	20	L1189R	>1000 mg/dl	1 Patient, Heterozygot
	C2940T	16	T956M	~800 mg/dl	Sporadischer Fall, Heterozygot
Caprioli, 2001, ^[175]	G3717A	20	R1215Q	Normal	Nur 1 Patient von Familie, heterozygot
	A1494 ^{del 6bp}	8	Stop nach 5 AS in SCR 8	Normal	2 Brüder, heterozygot
	C3701T	20	R1210C	Normal, zweite Bande	2 Geschwister heterozygot
	A3673T und C3675 ^{del 24bp}	20	Y1225F und Stop nach 2 AS	<70 mg/dl	Beduinen-Familie, autosomal rezessiv
	C3701T	20	R1210C	Normal, zweite Bande	Sporadischer Fall
	T3663C	20	V1197A	nicht untersucht	Sporadischer Fall

Tab. 4: Assoziation von aHUS und FH-Genmutationen. Zusammengefasst sind die Ergebnisse der vier genetischen Studien, die Mutationen im FH-Gen in Assoziation mit aHUS nachgewiesen haben.

1.6 Pathologien der Lebertransplantation von *Sus Scrofa* zu Mensch

1.6.1 Die Xenotransplantation der Schweineleber

Im Jahr 1999 wurden in Deutschland 757 Lebertransplantationen mit Lebern von Leichenspendern durchgeführt, was weniger als dreiviertel des Bedarfs entsprach (Quelle: Deutsche Stiftung Organtransplantation e.V.). Somit verstarben in diesem Jahr mindestens 250 Patienten auf der Warteliste für eine Lebertransplantation. Die Dunkelziffer liegt wahrscheinlich um ein vielfaches höher, da bei der herrschenden Knappheit an Spenderlebern ohnehin nur ein Teil der bedürftigen Patienten auf die als aussichtslos geltende Transplantationsliste gesetzt werden. Um dem Organmangel zu begegnen, ist die Suche nach tierischen Organspendern Gegenstand kontinuierlicher Forschung^[176]. Das Hausschwein *Sus scrofa* wird allgemein als geeignetste Spezies für die Xenotransplantation (die Transplantation eines Organes über Spezies-Grenzen hinweg) gesehen. Verschiedene Überlegungen haben zu dieser Wahl geführt^[177]: (1) Das Schwein ist seit Jahrhunderten domestiziert, Aufzucht und Pflege sind bekannt und einfach. (2) Die Wurfzahlen des Schweines sind hoch und die Tragzeiten kurz. (3) Die Organe des Schweines haben eine passende Größe und ein ähnliches Bioleistungsprofil wie die des Menschen. (4) Das Schwein ist als Nutztier gesellschaftlich akzeptiert, seine Nutzung als Organquelle wirft (im Gegensatz z.B. zum Affen) allgemein geringere ethischen Bedenken auf.

Die Transplantation eines Organes von einer Spezies auf eine andere löst allerdings eine massive Immunreaktion im Abwehrsystem des Organempfängers aus^[178]. Mit dem Anschluß des Gefäßsystems der Schweineleber an den Kreislauf des Patienten beginnt eine Sequenz von Abstoßungsreaktionen, die in vier Phasen unterteilt wird: Die Hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) setzt sofort mit dem Anschluß der Gefäßsysteme ein. Sie wird durch die Aktivierung des Komplementsystems über beide Aktivierungswege vermittelt^[179]. Die Akute Vaskuläre Abstoßungsreaktion (AVR) tritt nach Stunden bis Tagen auf. Sie wird durch B-Zellen vermittelt, die Antikörper gegen Epitope auf der Endotheloberfläche der Lebergefäße produzieren^[180]. Die Zelluläre Abstoßungsreaktion wird durch T-Zellen vermittelt. Sie tritt nach Wochen bis Monaten auf und wird durch HLA-Antigene des Transplantats ausgelöst, die die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen zur Folge hat^[181]. Eine Chronische Abstoßungsreaktion wird nur in Analogie zur allogenen (Mensch-zu-Mensch) Transplantation postuliert, da in den bisherigen experimentellen Xenotransplantation noch keine monatelange Toleranz

erreicht worden ist. Die beschriebene Sequenz der Abstoßungsreaktionen wurde im Tiermodell der Schwein-zu-Affe Xenotransplantation ermittelt.

1.6.2 Komplementsystem und Hyperakute Abstoßungsreaktion

Die HAR stellt zur Zeit die größte Barriere in der Etablierung der Xenotransplantation der Schweineleber dar. Sie wird über die Aktivierung des Komplementsystems vermittelt und führt innerhalb von Minuten bis Stunden zum Verlust des Organes. Zielstruktur des Komplementangriffs ist das Gefäßendothel der Schweineleber^[182]. Durch Komplementangriff werden die Endothelzellen lysiert und Mediatoren freigesetzt. Das Gerinnungssystem wird aktiviert und führt zum Gefäßverschluß. Das transplantierte Organ wird ischämisch, Nekrose und letztlich Organverlust sind die Folge. Es wurde sowohl über den CP als auch über den AP eine Aktivierung des Komplementsystems gezeigt. Der CP wird über präformierte Antikörper aktiviert, die sich gegen das Galaktosyl- α -1,3-Galaktosyl Epitop richten^[183]. Dieses Kohlenhydrat findet sich auf den Endothelzellen aller nicht-primaten Mammalier und damit auch bei *Sus scrofa*, nicht aber bei Alt-Welt Primaten und Menschen, die gegen dieses Epitop präformierte Antikörper besitzen. Die Aktivierung des Komplementsystems über den AP ist in mehreren Arbeiten gezeigt worden, allerdings ist die genaue Pathophysiologie nicht bekannt. Zhao et al. konnten in Lyse-Assays einen Beitrag des AP von ungefähr 50 % in der Lyse von Schweineendothelzellen durch humanes Komplement nachweisen^[184]. In einem ähnlichen Versuchsansatz zeigten Schaapherder et al. ebenfalls eine essentielle Beteiligung des AP^[185]. Suckfull et al. perfundierten lebende Schweineherzen *ex vivo* mit humanem Blut und wiesen immunhistologisch die Aktivierung von Komplement über den AP durch das Endothel nach^[186]. Andere Autoren haben allerdings die Relevanz des AP bei der Entstehung der HAR bezweifelt^[187].

Verschiedene Strategien sind entwickelt worden, um die Entstehung der HAR zu unterbinden. Da präformierte Antikörper bereits im Blut des Empfängers vorhanden sind, können Immunsuppressiva hier nicht wirksam sein. In einigen Ansätzen wurde versucht, das Galaktosyl- α -1,3-Galaktosyl Epitop zu modifizieren und somit das Ziel-Antigen der präformierten Antikörper zu eliminieren^[188]. Andere Strategien verfolgen die temporäre Inhibition des Komplementsystems im Empfängerblut mittels löslichem Komplementrezeptor 1 (soluble Complement Receptor 1, sCR1), oder die Depletierung mit einer Fraktion des Schlangengiftes der Kobra (Cobra Venom Factor, CVF)^[189,190].

Die eleganteste Lösung zur Regulation des Komplementsystems in der Xenotransplantation und damit zur Unterbindung der HAR besteht in der Nutzung von Regulatoren, die die Schweineleber exprimiert. Daher wurden die membranständigen Regulatoren DAF, MCP und CD59 des Schweines kloniert und auf ihre regulatorische Aktivität untersucht^[191,192,193]. Allerdings sind Komplementregulatoren teilweise in ihrer Potenz auf das zugehörige Komplementsystem ihrer Spezies beschränkt^[194]. Es sind daher erfolgreiche Untersuchungen unternommen worden, um transgene Schweine für den humanen Komplementregulator DAF zu züchten (human DAF, hDAF)^[195,196]. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß bei Lebern von Schweinen, die transgen für hDAF sind, die Entwicklung einer HAR nach einer Transplantation in Affen vermindert werden kann und die Überlebenszeit des Organs signifikant verlängert wird^[197]. Ähnliche Untersuchungen wurden mit transgenen Schweinen für die Regulatoren hMCP und hCD59 durchgeführt^[198,199]. Die Aktivierung des Komplementsystems wird durch diese membranständigen Regulatoren aber erst auf einer späten Stufe erfasst, darüberhinaus bleibt der AP in der Flüssigen Phase, und damit am frühesten Punkt der Aktivierung, unreguliert. Untersuchungen zur effizienten Regulation des AP in der Flüssigen Phase und der Amplifikationsschleife durch Regulatoren des Schweines sind bisher nicht durchgeführt worden.

1.7 Die Zielsetzungen dieser Arbeit

1.7.1 Klonierung von FH von *Sus Scrofa*

Zunächst war es von Interesse, das Äquivalent zu humanem Faktor H beim Schwein (pigFH) erstmals zu klonieren. Dem zugrunde lagen folgende Fragestellungen:

- Welche Sequenz hat das Äquivalent zu humanem FH beim Schwein? Welche konservierten strukturellen und funktionellen Elemente und Motive können in der pigFH-Sequenz gefunden werden, die von FH anderer Spezies bekannt sind?
- Ist pigFH in SCRs mit deren charakteristischer Cystein-Abfolge organisiert? Welcher Konservierungsgrad besteht für einzelne SCRs von pigFH und humanem FH und welche Aussagen lassen sich dadurch über deren Funktion treffen?

1.7.2 Funktionelle Charakterisierung von pigFH

Nach einer Analyse auf der Sequenzebene sollte eine funktionelle Charakterisierung durchgeführt werden, der folgende Fragestellungen zugrunde lagen:

- Lassen sich für pigFH ähnliche Bindungspartner nachweisen wie für hFH? Bindet pigFH an Heparin? Bindet pigFH an C3b? Sind die funktionell ermittelten Domänen auf ähnlichen SCRs lokalisiert, wie sie von humanem FH bekannt sind?
- Zeigt pigFH regulatorische Aktivität auch mit humanem C3b und humanem FI? In wie weit ist pigFH ein qualitatives und quantitatives Äquivalent zu humanem FH?
- Welche Bedeutung hat eine Spezies-übergreifende regulatorische Aktivität von pigFH für die Xenotransplantation einer Schweineleber auf den Menschen?

1.7.3 Molekulare Pathogenese der MPGN II im Tiermodell

Darüber hinaus bot die Information der Sequenz von pigFH die Möglichkeit, die molekulare Pathogenese von Plasmapdefizienz für FH in Assoziation mit MPGN II im Tiermodell der Norwegischen *Yorkshire* Schweine zu studieren:

- Lassen sich Mutationen im pigFH-Gen des Schweines im Sequenzvergleich zwischen homozygot gesundem und erkranktem Schwein ermitteln?
 - Welche Auswirkungen haben diese Mutationen für die Expression von pigFH auf der Ebene von mRNA und Protein im Lebergewebe?
 - Wie ist die molekulare Pathogenese der FH-Plasmapdefizienz und MPGN II in diesem Tiermodell und welche Rückschlüsse lassen sich daraus auf die Pathophysiologie der MPGN II und anderer FH-assoziiierter Erkrankung wie dem atypischen Hämolytisch Urämischen Syndrom beim Menschen ziehen?
-

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Molekularbiologie

Alle Chemikalien wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle Plastikwaren wurde von Greiner (Solingen, Deutschland) und Nalgen-Nunc (Wiesbaden, Deutschland) bezogen. TRIzol Reagenz, SuperScriptII Reverse Transkriptase und Oligo(dT)-Primer wurden von Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Alle Restriktionsenzyme, Taq DNA Polymerase und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ Redivue wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) bezogen. Protein-Extraktionspuffer PE-LB und Proteinaseinhibitor Protease-Arrest wurden von CellConcepts (Umkirch, Deutschland) bezogen. High Pure Tissue RNA Kit und T4 DNA-Ligase wurden von Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. TOPO-TA Cloning Kit wurde von Invitrogen (Groningen, Holland) bezogen. Nytran Nylonfilter und Protran Nitrocellulosefilter wurden von Schleicher&Schuell (Dassel, Deutschland) bezogen. Poly-Atract mRNA Isolation System und Prime-a-Gene labeling system wurden von Promega (Mannheim, Deutschland) bezogen. Von Qiagen (Hilden, Deutschland) wurden QIAprep Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit und Ni^{2+} -NTA Agarose bezogen. Microspin S300 Säulen wurden von Bio-Rad (München, Deutschland) bezogen. ZAP-cDNA Sythesis Kit und ZAP-cDNA GigapackIII Gold Cloning Kit wurden von Stratagene (Amsterdam, Holland) bezogen. Dialyseschlauch SpectraPor 6 MWCO 1000 wurde von Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Ultrafree-15 Zentrifugen-Filter Biomax-5k wurden von Millipore (Eschborn, Deutschland) bezogen. BCA Protein Assay Reagentien wurden von Pierce (Rockford, USA) bezogen. BaculoGold Baculovirus DNA wurde von BD Pharmingen (San Diego, USA) bezogen. BigDye Terminator Kit zur Sequenzierung wurde von Applied Biosystems (Langen, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Gewebe und Seren

Frisches Schweinelebergewebe wurde von der Schlachtereier Ernst (Hamburg, Deutschland) bezogen. Die Schweinerasse des weiblichen Tieres war *Deutsches Mastschwein*. Die Schlachtung des Tieres wurde ausschließlich zum Zwecke der

Fleischproduktion durchgeführt. Die als Abfallprodukt anfallende Leber des Schweines bildete das Ausgangsmaterial für mehrere Untersuchungen in dieser Arbeit. Nach vorschriftsgemäßer Tötung und Zerlegung des Tieres wurden Gewebestücke der Leber in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C aufbewahrt. Lebergewebe von einem homozygot FH-defizienten Ferkel und einem gesunden Ferkel der Schweinerasse *Yorkshire* wurden von Dr. Kolbjorn Hogasen (Lillehammer, Norwegen) zur Verfügung gestellt, ebenso Plasma der beiden Tiere. Für die vorliegende Arbeit stand nur das genannte Material dieser beiden Tiere zur Verfügung. Da die Erkrankung in der Norwegischen *Yorkshire* Schweinezucht eliminiert wurde, ist weiteres Material für zusätzliche Studien nicht verfügbar^[159].

2.1.3 Zellen und Medien

Spodoptera frugiperda Zellen (SF9) wurden von Invitrogen (Groningen, Holland) bezogen. Grace's Medium und X-Press Medium wurden von BioWhittaker (Vervier, Belgien) bezogen. Fötales Kälber Serum (FCS), Streptomycin, Penicillin und Amphotericin B wurden von Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Zellkultur-Flaschen und Zellkultur-Plastikwaren wurden von Nunc (Roskilde, Dänemark) bezogen.

2.1.4 Antikörper und Proteine

α -pigFH(rabbit) Antiserum wurde von Dr. Kolbjorn Hogasen zur Verfügung gestellt. α -hFH SCR1-4(rabbit) Antiserum wurde von Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt unter der Verwendung von rekombinant exprimiertem, humanem FH SCR1-4 Fragment. α -C3(sheep) Antikörper wurde von The Binding Site (Birmingham, England) bezogen. Antikörper α -humanFH(goat) und die HRP-konjugierten Antikörper α -rabbitIgG(goat), α -mouseIgG(rabbit) und α -sheepIgG(rabbit) wurden von Dako (Glostrup, Dänemark) bezogen. α -HisTag(mouse) Antikörper wurde von Sigma (Heidelberg, Deutschland) bezogen. FITC-gekoppelter zweiter Antikörper α -rabbitIgG(goat) wurde von ICN (Eschwege, Deutschland) bezogen. Humanes C3b, Faktor H und Faktor I wurden von Calbiochem (Schwabach, Deutschland) bezogen. HiTrap Heparin Säulen wurden von AP Biotech (Freiburg, Deutschland) bezogen.

2.1.5 Equipment und Software

PCR Reaktionen wurden in zwei Geräten durchgeführt: GeneAmp 9700 von Applied Biosystems (Langen, Deutschland) und Robocycler von Stratagene (Heidelberg,

Deutschland). Die Sequenzierung wurde am Bernhard-Nocht-Institut mit einem Abi Prism 377 Sequencer von Applied Biosystems durchgeführt. Oligonukleotide wurden am Bernhard-Nocht-Institut synthetisiert an einer Expedite Workstation von Millipore (Eschborn, Deutschland). UV-Crosslinking wurde mit dem Stratalinker 1800 von Stratagene (Amsterdam, Holland) durchgeführt. BCA-Proteinassays wurden im Elisareader MRX-Microplatereader von Dynatech (Denkendorf, Deutschland) ausgewertet. Für die konfokale Lasermikroskopie wurde das Modell TCS von Leica (Heidelberg, Deutschland) benutzt. Protein/Protein Interaktion wurde mit dem BIAcore[®] 2000 Gerät und dem CM5 Sensor Chip von BIAcore AB (Uppsala, Sweden) durchgeführt. Heparin-Bindungsassays wurden mit dem ÄKTAprime Instrument von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) durchgeführt.

Bandenquantifizierung wurde mit der Software Gene Tools von Syngene (Cambridge, England) durchgeführt. Homologievergleiche und Contigs wurden mit einer Demonstrations-Version der Software VectorNTI 5.5 von InforMax (Oxford, England) erstellt. Dabei wurde der ClustalW-Algorithmus verwandt mit niedriger Gap-Open- und Gap-Extension-Penalty sowie der Blosom62 Proteinmatrix. Alle grafischen Datenauswertungen wurden mit GraphPad Prism 2.1 von GraphPad Software (San Diego, USA) erstellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologie

Standardpuffer

TBE	89 mM Tris/Borat; 2,5 mM Na-EDTA; pH 8,0
PBS	145 mM NaCl; 3,3 mM NaH ₂ PO ₄ ; 6,7 mM Na ₂ HPO ₄
VBS (5x)	83 g NaCl; 10,19 g Na-5,5'-diethyl-barbiturat Salz; ad 2L; pH 7,3
SDS-Puffer (10x)	30,4 g Tris; 144 g Glycin; 10 g SDS; ad 1L
DNA-PP. (6x)	30 % Glycerol; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol in H ₂ O
SDS-PP. (2x)	1,25 g Tris; 20 ml Glycerin; 2 g SDS; 1 mg Bromphenolblau; ad 100 ml; pH 6,8; reduzierend: Zusatz von 0,1 M DTT (Endkonz. der Probe)

Kulturmedien

SM Medium	5,8 g NaCl; 2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 50 ml 1 M Tris pH 7,5; 5 ml Gelatine 2 %
LB Medium	10 g Peptone tryptisch verdaut; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; ad 1 L; pH 7,2
NZY Medium	5 g NaCl; 2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 5 g Hefeextrakt; 10 g NZ Casein

Für die Herstellung von Nährböden erfolgte die Zugabe von 15 g Agar pro Liter Medium.

Für die Herstellung von Top-Agar wurden 7 g Agar zugesetzt pro Liter Medium.

Für eine Ampicillin-Selektion wurden 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

Sämtliche Lösungen wurden mit Aqua Bidest angesetzt und autoklaviert. Bei Verwendung thermolabiler Ingredientien erfolgte stattdessen eine Sterilfiltration der Lösungen durch Spritzenfilter der Porengröße 0,2 µm.

PCR-Reaktion

Der Standard-Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

10 µl	10x PCR-Reaktionspuffer
16 µl	dNTP- Mix (1,25 mM each)
5 µl	Forward-Primer
5 µl	Reverse-Primer
1-3 µl	Template DNA
1 µl	Taq DNA-Polymerase
ad 100 µl	ddH ₂ O

PCR-Programme

Folgende PCR-Programme wurden in den Cyclern GeneAmp 9700 von Applied Biosystems und Robocycler von Stratagene eingesetzt:

Gerät: GeneAmp 9700

Programm: I

Zyklenzahl	1x	35x			1x	
Temperatur	95 °C	95 °C	56 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Zeit	5 min	45 sec	45 sec	90 sec	10 min	∞

Programm: II

Zyklenzahl	1x	35x			1x	
Temperatur	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Zeit	5 min	60 sec	60 sec	90 sec	10 min	∞

Programm: III

Zyklenzahl	1 x	30 x			1 x	
Temperatur	95 °C	95 °C	50 °C	60 °C	4 °C	
Zeit	2 min	10 sec	5 sec	240 sec	∞	

Gerät: Robocycler

Programm: IV

Zyklenzahl	1x	35x			1x	
Temperatur	95 °C	95 °C	56 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Zeit	5 min	90 sec	90 sec	75 sec	8 min	∞

PCR-Primer

Folgende Primer wurden in der PCR verwendet:

Name	Sequenz	Position
1. Sequenzierungs-Primer		
pigFH 0 ^{For}	GCAGAACCTGACACAGTGTTG	14
pigFH 1 ^{For}	GGAGGATTGTCACTGGTGCC	537
pigFH 1 ^{Rev}	GCATCTGATACCCCTCATCGC	414
pigFH 2 ^{For}	GGTTTTTACACACCTGAATC	896
pigFH 2 ^{Rev}	GATTCAGGTGTGTAAAAACC	896
pigFH 3 ^{For}	GTTCACTGCTATCCCGGCTAC	1307
pigFH 3 ^{Rev}	GTAGCCGGGATAGCACTGAAC	1307
pigFH 4 ^{For}	TGCGCCACTACCTGAGAATG	1597
pigFH 4 ^{Rev}	TCAAACCCTTGCTGGCATTC	1670
pigFH 5 ^{For}	GGGGAAAATCAGAAAGCAAATACTC	2415
pigFH 5 ^{Rev}	GAGTATTTGCTTTCTGATTTTCCCC	2415
pigFH 6 ^{For}	TGCATGTGTAGTTTCAGAAG	3583
pigFH 6 ^{Rev}	CTTCTGAAACTACACATGCA	3583
pigFH 7 ^{Rev}	TGCCAAGTTTAATGAGATGC	3974
pigFH 8 ^{For}	CATAGGCCCAAAGAAGCCATCG	3091
pigFH 8 ^{Rev}	CGATGGCTTCTTTGGGCCTATG	3091
pigFH 9 ^{For}	CTTGTGAAGATGGTTTCGAG	2793
pigFH 9 ^{Rev}	CTCGAAACCATCTTCACAAG	2793
pigFH 10 ^{For}	CAAACCACCTCAGTGCAAAGAC	3379
pigFH 10 ^{Rev}	GTCTTTGCACTGAGGTGGTTTG	3379
pigFH 11 ^{For}	TGAACCACCTGAAATAGACC	2683
pigFH 12 ^{For}	TTTGGGATTGATGGACCTGC	2978
pigFH 13 ^{For}	AGCACGTTATGAGTGCATCG	3304
EST 5 ^{For}	CCACCCCCTCAACTCCTCAATGG	1964
EST 3 ^{Rev}	GGGTCCAACCAGTGAAAATGATGCA	2230
2. Klonierungs-Primer		
pigFH-SCR1 PstI ^{For}	AACTGCAGGAAGACTGTAGAGAACCTCCTCC	120
pigFH-SCR1 NotI ^{For}	GCGGCCGCTGAAGACTGTAGAGAACCTCCTCC	120
pigFH-SCR4 EcoRI ^{Rev}	GGAATTCTACACATGAAGGAAGTGGGGCCCA	839
pigFH-SCR7 EcoRI ^{Rev}	GGAATTCGACAAGGATGCACTTGGGAGGAGG	1379
pigFH-SCR15 NotI ^{For}	GCGGCCGCTGAAAAAATTCCATGTTCTGAACCACC	2657
pigFH-SCR 20 EcoRI ^{Rev}	GGAATTCTCCACACGTAGGATAGGCCACTTTGCC	3749
3. Kontroll-Primer		
h β -Actin ^{For}	TGACGGGGTCAACCCACACTGTGCCCATCTA	508
h β -Actin ^{Rev}	GGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCC	1067
p β -Actin ^{For}	ACGGGCAGGTCATCACCATC	365
p β -Actin ^{Rev}	ACACGGAGTACTTGCGCTCG	632

Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten zur Abtrennung von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen wurde das QIAquick PCR Purification Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Alternativ wurden auch Verdaus über diese Säulen aufgereinigt, um Restriktionsenzyme und Stuffer-Fragmente vor nachfolgenden Ligationsschritten zu entfernen. Es wurde immer in den vom Hersteller mitgelieferten Puffer EB eluiert.

Restriktionsverdau

Restriktionsverdaus wurden sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken für spätere Ligationen durchgeführt. Standardenzyme waren EcoRI, NotI und PstI, die alle im Hersteller-Puffer H bei 37 °C optimal schneiden. Mengen und Inkubationszeiten wurden den jeweiligen Anforderungen angepaßt.

Ligation von DNA-Fragmenten

Standard-Ligation war die Ligation von PCR-Produkten in den pCR2-Vektor mit dem TOPO-TA-Cloning Kit wie es der Hersteller vorschreibt. Der mit Topoisomerase aktivierte Vektor erlaubt kurze Ligationszeiten und hohe Ausbeuten. Für die Ligation in pBSV8His wurden der geschnittene Vektor (25 ng/µl) und das zu inserierende DNA-Fragment im Mengenverhältnis 1:1 eingesetzt und mit Ligationspuffer und T4 DNA-Ligase inkubiert. Die Reaktionen wurden mindestens Ü/N bei 13 °C im Thermoblock durchgeführt.

Herstellung kompetenter *E.coli* DH 5α

Verwendeter Zellstamm: *Escherichia coli* DH 5α

Zwei Milliliter einer Ü/N-Kultur wurden in 200 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 im Schüttelinkubator herangezogen. Die Zellen wurden anschließend bei 4 °C und 3000 g sedimentiert, in 70 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C wurden die Bakterien vorsichtig in 8 ml einer 0,1 M CaCl-Lösung (Zusatz von 15 % Glycerol) resuspendiert. Die Bakterien wurden nach Inkubation Ü/N bei 4 °C in Aliquots von 100 µl bei -70 °C gelagert.

Transformation kompetenter Bakterien

Hundert Mikroliter der kompetenten Zellen wurden mit 5 µl des Ligationsproduktes (ca. 200 ng Plasmid-DNA) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für

1,5 min bei 42 °C wurde der Ansatz mit 400 µl LB-Medium für 45 min bei 37 °C geschüttelt. 50 - 400 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Für die Nutzung der Blau/Weiß-Selektion erfolgte eine Zugabe von 40 µl X-Gal als Substrat und 40 µl IPTG zur Induktion des Lac-Operons. Nach Inkubation der ausplattierten Bakterien Ü/N bei 37 °C erfolgte die Isolierung der positiven weißen Kolonien und deren Anzucht als Ü/N-Kultur in LB Ampicillin Medium zur weiteren Analyse.

Plasmidisolierung

Von einzelnen Bakterienkolonien wurde eine 3 ml Übernachtskultur in LB-Amp-Medium angesetzt. Anderntags erfolgte gemäß Herstellerangaben eine Plasmidpräparation mit QIAprep Miniprep Säulen. Die Plasmid-DNA wurde in Puffer EB eluiert, per Restriktionsanalyse auf Inserts untersucht und anschließend sequenziert .

Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA zu analytischen oder präparativen Zwecken erfolgte in 1 % (w/v) Agarose, gelöst in 1 x TBE unter Zusatz von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Der Gellauf wurde in horizontalen Flachgelkammern mit 1 x TBE als Laufpuffer bei 10 V/cm Gellänge durchgeführt. Die Proben wurden vor der Auftragung mit 0,2 Vol. DNA-Probenpuffer (DNA-Dye) versetzt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators, Kamera und Videoprinter.

Gelextraktion

Gele, die zur Präparation bestimmt waren, wurden im Preparativ-Modus auf dem UV-Tisch visualisiert und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Diese wurde mit QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert nach Anweisung des Herstellers.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Die DNA-Lösung wurde mit einem halben Volumenanteil Phenol (Tris-gesättigt, vom Gefäßboden abgenommen) und einem halben Volumenanteil Chloroform gut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Mischen inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 10.000 g erfolgte eine Auftrennung in wässrige und organische Phase. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA präzipitiert.

DNA-Präzipitation

Die Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Alkohol-Präzipitation. Zu der wässrigen DNA-Lösung wurden 1 µl Glykogen und 2 Vol Ethanol –20 °C gegeben. Die DNA wurde 1 h bei –70 °C oder Ü/N bei –20 °C präzipitiert und anschließend für 15 min bei 10.000 g, 4 °C in der Tischzentrifuge pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde der DNA-Niederschlag mit 1 ml 70 % Ethanol –20 °C gewaschen und erneut für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde bei 40 °C offen im Thermoblock getrocknet und entsprechend der gewünschten Konzentration in ddH₂O (min 10 µl) resuspendiert.

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des BigDye Terminator Sequencing Kits. Als Template dienten QIAprep gereinigte Plasmid-DNA oder das QIAquick gereinigte PCR-Produkt. Der Reaktionsansatz bestand aus 4 µl ReadyReaction-Mix, 1 µl Primer (10 pmol), 1-2 µg DNA und HPLC-H₂O ad 20 µl. Das Temperatur-Profil der PCR-Reaktion ist unter Programm III beschrieben. Die Reaktionsprodukte wurden in 90 µl HPLC-H₂O (1 M Na-Acetat; pH 4,6) aufgenommen, 250 µl Ethanol abs. zugegeben, gevortext und sofort 15 min bei RT 10.000 g gefällt. Nach einem weiteren Waschschriff mit 70 % Ethanol wurden die Reaktionsprodukte 10 min offen im Thermoblock bei 37 °C getrocknet. Die anschließende Sequenzierung erfolgte im Hause.

RNA-Isolation

Das Ausgangsgewebe wurde bei –70 °C gelagert. Ungefähr 0,9 g Gewebe wurden unter kontinuierlicher Zugabe von flüssigem Stickstoff zu Pulver gemörsert. Das Gewebepulver wurde mit einem gekühlten Spatel in ein Falcon überführt, das 9 ml vorgewärmtes Trizol enthielt, sofort geschüttelt und so lange gevortext, bis sämtliches Gewebe aufgelöst war. Um ein einfacheres Handling zu ermöglichen, wurde die Lösung auf 2 ml-Tubes aliquotiert. Die Tubes wurden nach der Anleitung des Herstellers bearbeitet, beginnend mit der Zugabe von 300 µl Chloroform. Die RNA-Pellets wurde in ddH₂O aufgenommen, gepoolt und photometrisch quantifiziert. Aus 0,9 g Gewebe konnten 1,87 mg gesamt RNA isoliert.

Poly-(A)mRNA-Selektion

Die Isolation wurde durchgeführt, wie es das Protokoll des Herstellers vorsieht. 1 mg gesamt-RNA in einem Volumen von 500 µl ddH₂O wurde zur mRNA-Isolation

eingesetzt. Die RNA wurde 10 min bei 65 °C erhitzt und mit SSC-Puffer und Biotin/Oligo-d(T) Primer versetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die gewaschenen und equilibrierten Streptavidin MagnaSphere Partikel zum Ansatz dazugegeben und weitere 10 min inkubiert. Dann wurden die Partikel mit dem Magnetständer zur Tube-Wand gezogen und die Restflüssigkeit entfernt. Es folgten 4 Waschschrte mit 0,1x SSC. Die Elution erfolgte in 2 Schritten mit 0,1 und 0,15 ml ddH₂O, die anschließend gepoolt und gefällt wurden. Aus 1 mg gesamt-RNA konnten so 12,5 µg Poly(A)mRNA isoliert werden, dies entsprach mit ca. 1 % dem erwarteten Anteil der mRNA an der gesamt-RNA

Herstellung einer cDNA-Bank

5 µg Poly(A)mRNA wurden zur cDNA-Synthese eingesetzt, wie es das Protokoll des Herstellers vorsieht. Im Folgenden wird nur das zugrundeliegende Prinzip der gerichteten Klonierung einer cDNA Bank erläutert, da alle praktischen Reaktionsschritte ohnehin in der Anleitung des Herstellers beschrieben sind und genau befolgt wurden.

Der dNTP-Mix zur Erststrangsynthese enthält im Nukleotidmix neben dATP, dGTP und dTTP noch 5-methyl-dCTP als vierte Base. Da spätere Schritte einen Restriktions-Verdau erfordern, bleibt die bis dahin synthetisierte cDNA vor einem Verdau geschützt, denn die eingesetzten Restriktionsenzyme sind Methylierungs-sensitiv. Primer für die Erststrangsynthese ist ein Oligo(dT)-Primer, der stromabwärts eine XhoI-Site trägt. Somit steht nach der Erststrangsynthese ein Transkript zur Verfügung, das bereits eine potentielle Schnittstelle am 5'-Ende und einen Restriktionsschutz über die gesamte sonstige Sequenz trägt. Die Template RNA wird mit RNaseH verdaut. Die entstandenen Fragmente dienen als intrinsische Primer zur Zweitstrangsynthese, da diese RNA-Fragmente von der DNA-PolymeraseI nick-translatiert werden, sodaß der zweite cDNA-Strang aufgebaut wird. Der Nukleotid-Mix wird vorher so stark mit dCTP angereichert, daß ein Einbau von verbliebenem 5-methyl-dCTP statistisch äußerst unwahrscheinlich ist. Im weiteren werden die überhängenden Enden des Doppelstranges mit *Pfu*-Polymerase aufgefüllt, um glatte 3'-Enden zu erzeugen. An diese wird im nächsten Schritt der vorgefertigte EcoRI-Adapter stumpf ligiert. Um die richtige Orientierung des Adapters zu gewährleisten, ist dieser an einem Strang dephosphoriert. Die Phosphatgruppe wird in einem weiteren Schritt angehängt, um das EcoRI-Ende

ligierungsfähig zu machen. Es folgt ein Restriktionsverdau mit XhoI, um am 5'-Ende den zweiten Adapter freizugeben. In den Reaktionen der Erst- und Zweitstrangsynthese wird neben dem mitgelieferten dNTP-Mix auch [α -³²P]dATP eingesetzt. Später werden Aliquots der Synthese-Schritte auf einem alkalischen 1 % Agarosegel mit anschließender Röntgenfilmexposition kontrolliert, um den Erfolg der Reaktionen zu überprüfen. Die ligationsfertigen cDNA Fragmente werden dann auf einer Sepharose-Säule aufgetrennt, um einen unteren Cut-Off an Insert-Größe zu gewährleisten. Gleichzeitig werden Enzyme und Schnittfragmente entfernt. Die Fragment-Größen jeder Fraktion werden auch hier durch ein Agarosegel und Filmexposition visualisiert. Als Größenstandard dient eine parallele Anfärbung eines konventionellen DNA-Markers im selben Gel mit Ethidiumbromid. Die Fraktion, die die gewünschten Fragment-Größen enthält, wird nun in den Uni-Zap Vektor ligiert. Dieser ist mit EcoRI und XhoI vorverdaut, so daß eine gerichtete Klonierung erfolgen kann. Der Vektor wird anschließend in die Phagenhülle verpackt und liegt nun als infektiöses Partikel vor. Es wird der Titer bestimmt und eine Amplifikation der Bank vorgenommen, um diese lagerungsfähig zu machen. Dieser Amplifikationsschritt kann nur in Bakterienstämmen erfolgen, die hemi-methylierte DNA nicht abbauen. Nach einer Passage liegen die Inserts dann unmethyliert vor. Der Titer wird in pfu (plaque forming units) pro μ l cDNA-Bank gemessen. Der Insertgehalt der Bank kann anhand der Blau-Weiß-Selektion auf IPTG/XGal-Medien ermittelt werden. Für eine genauere Bestimmung und zur Ermittlung des Größen-Bereiches der Inserts werden ca. 18 unabhängige Klone isoliert und deren Inserts per PCR bestimmt.

Plaque-Lifts und Membranfixierung

Für das Screening im Rahmen dieser Arbeit wurde die noch nicht amplifizierte cDNA-Bank eingesetzt. Auf 11 NZY-Platten mit 150 mm Durchmesser wurden insgesamt 30 μ l cDNA-Bank mit 800 μ l XL-Blue Ü/N-Kultur in Top-Agar gegossen und wachsen gelassen. Um das Wachstum auf genau 'nahezu konfluent' zu bringen, wurden die Platten über Nacht bei RT inkubiert und am nächsten Tag unter stündlicher Kontrolle bei 37 °C wachsen gelassen. Es wurden jeweils ca. 30.000 Klone pro Platte erzeugt, so daß insgesamt 330.000 primäre Klone zum Screening bereit standen. Von den Platten wurden doppelte Filterabzüge auf Nylonmembran angefertigt. Zur Denaturierung wurden die Filter auf flüssigkeitsgesättigtem Whatmanpapier inkubiert. Inkubationszeit war jeweils 5 min, die Puffer waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Lösung 1	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Lösung 2	1,5 M NaCl; 0,5 M Tris pH 7,5
Lösung 3	0,2 M Tris pH 7,5; 2 x SSC

Die somit denaturierte DNA wurde mittels UV-Crosslink mit 1200 kJoule auf der Membran fixiert.

Sondenherstellung

Als Zielsequenz wurde ein Klon aus der EST-Datenbank des NIH gewählt, der hohe Homologie zu humanem FH aufwies (*Sus scrofa* small intestine cDNA library, clone c16b01, AccessionNr. F22851^[200]). Vom EST wurden die Primer EST 5^{For} und EST 3^{Rev} abgeleitet, die erwartungsgemäß ein Fragment von 291bp amplifizierten (PCR-Programm I). Wie aus den Homologievergleichen mit der humanen Sequenz zu bestimmen war, umfaßt der genannte Klon c16b01 eine Sequenz von 380 Basen, die Homologie zu den humanen SCRs 11-13 hat. Mit dieser Sequenz als Sonde konnten daher keine möglichen Klone der Faktor-H Genfamilie gefunden werden, die diese SCRs nicht beinhalten. Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde eluiert und als Template für die Prime-a-Gene Markierungs-Reaktion eingesetzt, wie es der Hersteller empfiehlt. Als Radionukleotid wurde wiederum [α -³²P]dATP verwandt. Der Reaktionsansatz wurde über eine S300 Sepharose-Säule aufgetrennt, um nicht-inkorporierte Nukleotide zu entfernen. Zur Denaturierung wurde die Sonde für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Screening

Die Filterabzüge wurden im Church-Mix (0,5 M Na₂HPO₄; 7 % SDS; 1 mM EDTA; pH 7,2) prähybridisiert. Dazu wurden jeweils 11 Filter in eine Hybridisierungs-Glasröhre gegeben, kurz mit ddH₂O angefeuchtet und dann mit Church-Mix 1 h bei 50 °C unter kontinuierlicher Rotation inkubiert. Zur Hybridisierung wurde die denaturierte Sonde zur Prähybridisierungs-Lösung dazugegeben und Ü/N rotierend bei 50 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Filter einmal 30 min mit Church-Wash (40 mM Na₂HPO₄; 1 % SDS; pH 7,2) bei 50 °C gewaschen und in PE-Folie eingeschweißt. Mit fluoreszierenden Leuchtstiften wurden die asymmetrischen Filtermarkierungen für die Darstellung auf dem Röntgenfilm markiert. Die Inkubationszeit der radioaktiv markierten Filter mit dem Röntgenfilm betrug 48 h bei -70 °C in einer Verstärker-Kassette. Die Röntgenfilme wurden anhand der

Markierungen mit den Ursprungs-Platten übereinander gelegt und so die positiven Klone identifiziert. Die Klone wurden mit dem breiten Ende einer Pasteur-Pipette ausgestochen und in 200 µl SM-Medium mit 10 µl Chloroform eluiert. 1 µl Eluat wurde für die zweite Screening-Runde in Verdünnungsschritten von 1:10 bis 1:1000 eingesetzt. Von der zweiten Screening-Runde wurden die nun einzeln liegenden positiven Plaques mit einem autoklavierten Zahnstocher gepickt und jeweils einzeln in einem 5-Pfennigstück großen Areal so nah wie möglich ausplattiert, um eine hohe Phagendichte für die nächste Elution zu gewährleisten. Der phagendichte Agar-Plug wurde dann in 1 ml SM-Medium eluiert und das Eluat nach positiver PCR-Kontrolle zur In-Vivo-Excision verwandt. Die In-Vivo-Excision schneidet durch Ko-Infektion mit dem ExAssist Helfer-Phagen aus dem Uni-Zap Vektor den Phagemid pBluescript heraus, der wiederum das gescreente Banken-Insert trägt. Dadurch ist es möglich, in jedem weiteren Schritt nur noch das pBluescript-Plasmid anstelle der kompletten Lambda-DNA zu bearbeiten. Das Plasmid wird nach Standardprotokoll propagiert, präpariert und steht dann zur Sequenzierung bereit.

2.2.2 Zellkultur

Kulturmedien

Aufzucht-Medium	4 % FCS (hitzeinaktiviert); 0,2 U/ml Penicillin; 0,2 mg/ml Streptomycin; 250 ng/ml Amphotericin B; in Xpress Medium
Teilungs-Medium	0,2 U/ml Penicillin; 0,2 mg/ml Streptomycin; 250 ng/ml Amphotericin B; in Grace's Medium
Transfektions-Medium	10 % FCS (hitzeinaktiviert); 0,2 U/ml Penicillin; 0,2 mg/ml Streptomycin; 250 ng/ml Amphotericin B; in Grace's Medium
Expressions-Medium	0,2 U/ml Penicillin; 0,2 mg/ml Streptomycin; 250 ng/ml Amphotericin B; in X-Press Medium
70/30-Medium	70 % Teilungsmedium, 30 % Expressionsmedium, 8 % FCS (hitzeinaktiviert)

Passagieren von *SF9*-Zellen

Für das Bavulovirus-Expressionssystem wurden Lepidoptera-Darmzellen der Zelllinie *Sf9* von *Spodoptera frugiperda* verwendet. Die Zellen wurden adhärent als Monolayer in Zellkulturflaschen mit 150 cm² Fläche kultiviert. Sie wuchsen in einem Maximalvolumen von 50 ml des jeweiligen Zellkultur-Mediums bei 27 °C und erhöhter Luftfeuchtigkeit und wurden dreimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurden

die Sf9-Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst, in 50 ml Falcons überführt und bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in 30 ml Teilungsmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:2 auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Zellen adhärten für 20 min bei 27 °C und wurden anschließend nach Austausch des Teilungsmediums gegen das jeweils funktionelle Medium in Kultur gehalten. Zur Vermehrung der Zellen wurden diese in Aufzuchtmedium gehalten. Zellen, die zur Transfektion bestimmt waren, mußten zunächst an X-Press freies Medium gewöhnt werden und wurden daher in 70/30-Medium gehalten. Die Transfektion erfolgte dann in X-Press freiem Transfektionsmedium. Zellen zur Proteinexpression wurden in Expressionsmedium gehalten.

Verwendeter Virus

Zur Kotransfektion von Insektenzellen mit dem Expressionsvektor pBSV-8His wurde linearisierte BaculoGold Baculovirus DNA des *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) der Familie der *Baculoviridae* eingesetzt^[201].

Ko-Transfektion von Insektenzellen

Plasmid-DNA des rekombinanten pBSV8His-Expressionsvektors wurde zunächst photometrisch quantifiziert, um 2 µg DNA für die Transfektion bereitzustellen. Sf9-Zellen (6×10^5 Zellen) in einer 35 mm Zellkulturschale, die zuvor in 70/30-Medium gehalten worden waren, wurden mit 0,5 µg BaculoGold Virus DNA und 2 µg rekombinanter Plasmid-DNA kotransfiziert. Die Ko-Transfektion erfolgte mittels einer für Insektenzellen modifizierten Calciumphosphat Ko-Präzipitation^[201]: Die Zellen wurden zunächst in Teilungsmedium aufgeteilt und in kleinen Titterschalen zum Adhärenz gebracht. Anschließend wurde das Medium gegen 500 µl Transfektionsmedium ausgetauscht. Plasmid-DNA und BaculoGold Virus DNA wurden zusammenpipettiert. Nach 10 min Inkubationszeit wurde 500 µl HEPES-Puffer (25 mM HEPES; 140 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; pH 7,1) in die Lösung pipettiert und die DNA tropfenweise auf die Insektenzellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 27 °C. Dann wurde der Überstand abgezogen und gegen 3 ml frisches Transfektionsmedium ersetzt. Der Ansatz wurde bei 27 °C für 5 Tage inkubiert. Im Fünf-Tage-Rhythmus wurden die Transfektionsüberstände dann in die jeweils nächstgrößeren Zellkulturflaschen überführt, sodaß über 24 cm² und 75 cm² Kulturflaschen nach 20 Tagen eine 150 cm²-Flasche mit Transfektionüberstand zur Verfügung stand. Dieser wurde als Ultrastock der Proteinexpression verwandt.

Eukaryontische Expression rekombinanter Proteine

Zur Expression rekombinanter Proteine wurden ca. 2×10^7 Insektenzellen in einer 150 cm Zellkulturflasche adhärirt, mit 35 ml Expressionsmedium versetzt und dem entsprechenden Virusstock infiziert. Das Verhältnis von fünf infektiösen Viren pro Insektenzelle ermöglicht in der Praxis die höchste Expressionsrate rekombinanter Proteine. Die infizierten Zellen wurden zwischen 8 und 12 Tagen kultiviert und die rekombinanten Proteine anschließend aus dem Überstand aufgereinigt.

2.2.3 Proteintechniken

SDS-PAGE

Trenngelpuffer	91 g Tris-Base; 2 g SDS; ad 500 ml H ₂ O; pH 8,8
Sammelgelpuffer	6,05 g Tris-Base; 0,4 g SDS; ad 100 ml H ₂ O; pH 6,8

Die Auftrennung im SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) erfolgte als diskontinuierliche Elektrophorese mit pH-Shift, um eine höhere Trennschärfe der Proteinbanden zu erzielen.

Für je zwei Gele wurde folgende Polymerisation angesetzt:

Trenngel (12 %)	6 ml Acrylamid (30 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1), 3,75 ml Trenngelpuffer; 5,25 ml H ₂ O; 50 µl APS; 10 µl TEMED
Sammelgel (5%)	0,65 ml Acrylamid (30 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1), 1,25 ml Sammelgelpuffer; 3 ml H ₂ O; 25 µl APS; 5 µl TEMED

Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit H₂O-gesättigtem Iso-Butanol überschichtet, um Luftsauerstoff auszuschließen. Der Probenauftrag erfolgte in Volumina zwischen 15 und 35 µl pro Geltasche, wobei jede Probe mit 0,5 Vol SDS-Probenpuffer versetzt wurde. Der Probenlauf erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern mit 1x SDS-Laufpuffer. Für komplexe Proteinauftrennungen wie Serum und Gewebextrakten wurde eine niedrige Spannung von 20 V für zwei Gele angelegt und bis zu 7 Stunden laufen gelassen. Für einfache Proteingemische oder Reinproteine wurden bis zu 70 Volt für zwei Gele bei entsprechend kurzer Laufzeit angelegt.

Silberfärbung

Lösung 1	Fixierung	30 % Ethanol; 10 % Essigsäure
Lösung 2	Inkubation	30 % Ethanol; 0,5 M Natriumacetat; 0,5 % Glutaraldehyd; 0,2 % Natriumthiosulfat
Lösung 3	Waschen	ddH ₂ O
Lösung 4	Silber	0,1 % AgNO ₃ ; 0,02 % Formaldehyd
Lösung 5	Entwickler	2,5 % Natriumcarbonat; 0,01 % Formaldehyd; pH 11,0
Lösung 6	Stopper	0,05 M EDTA

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde in allen Lösungen für mindestens jeweils 10 min in einem Volumen von 50 ml schüttelnd inkubiert. Der Waschschrift wurde 3 mal wiederholt oder es wurde Ü/N bei 4 °C gewaschen. Die silbergefärbten Gele wurden unter Zugabe von Lösung 6 in Folie eingeschweißt und unter Durchleuchtung eingescannt.

Western Blot

Anodenlösung 1	18,15 g Tris; 100 ml Methanol; ad 500 ml H ₂ O; pH 10,4
Anodenlösung 2	51 g Tris; 100 ml Methanol; ad 500 ml H ₂ O; pH 10,4
Kathodenlösung	5,2 g 6-Aminohexansäure; 200 ml Methanol; ad 1 L H ₂ O; pH 7,6
Färbelösung	5 ml Methanol; 15 mg 4-Chloro-1-naphtol; 50 µl H ₂ O ₂ ; ad 50 ml PBS

Beim Western Transfer werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte mittels Semi-Dry-Elektroblotting unter Verwendung einer Semi-Dry-Blotkammer mit Graphitelektroden für 1 h bei 0,8 mA/cm². Vor dem Transfer wurde das Proteingel für 15 min in der Kathodenlösung inkubiert.

Die Schichtung der Filter für den Western Transfer war wie folgt aufgebaut:

Kathode	oben
9 Lagen Whatman-Papier	getränkt in Kathodenlösung
SDS-Gel	getränkt in Kathodenlösung
Nitrocellulose-Membran Protran	getränkt in Anodenlösung 2
3 Lagen Whatman-Papier	getränkt in Anodenlösung 2
6 Lagen Whatman-Papier	getränkt in Anodenlösung 1
Anode	unten

Die Membran wurde nach dem Proteintransfer für mind. 15 min in PBS mit 5 % Milchpulver (MP) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Über Nacht wurde dann bei 4 °C mit dem entsprechenden Antikörper 1:400 in PBS (2 % MP) verdünnt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation des Proteinblots mit dem Zweitantikörper, der HRP-gekoppelt war. Es wurde 3 h bei RT in PBS (2 % MP) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Farbreaktion durchgeführt und bei der gewünschten Farbtintensität durch Trocknen der Membran auf Whatmanpapier gestoppt.

BCA Protein Assay

Um Proteinkonzentrationen zu bestimmen und einzustellen, wurde der BCA Protein Assay durchgeführt. Eine Serien-Verdünnungsreihe mit BSA von 500 µg / ml bis 31,25 µg / ml wurde als Standard gewählt. Alle Messungen wurden in einer 96-well Elisa-Platte durchgeführt und jede Messung dreifach angesetzt. Nach Zugabe der BCA-Reagentien wurden die Proben 45 min bei 37 °C inkubiert und dann in einem Elisareader bei 570 nm gelesen. Standardkurven und Probenauswertung wurden durch die Software erstellt.

Ni²⁺-Chelat Aufreinigung rekombinanter Proteine

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte aus dem Kulturüberstand der infizierten Insekten-Zellen unter Verwendung von Ni²⁺-NTA Agarose im Batch-Verfahren.

Ladepuffer	50 mM Nickelsulfat
Bindungspuffer	5 mM Imidazol; 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl; pH 7,9
Waschpuffer I	30 mM Imidazol; 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl; pH 7,9
Waschpuffer II	50 mM Imidazol; 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl; pH 7,9
Elutionspuffer	1 M Imidazol; 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl; pH 7,9
Strip-Puffer	100 mM EDTA; 0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl; pH 7,9

Das Säulenmaterial wurde durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 450 g) in einem 50 ml Falcon sedimentiert und der alkoholische Überstand dekantiert. Nach einem Waschvorgang mit ddH₂O und anschließender Zentrifugation wurde das Säulenmaterial mit 5 Vol Ladepuffer für 30 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschr mit Bindungspuffer wurde der Kulturüberstand auf die Säule gegeben und Ü/N bei 4 °C rollend inkubiert. Es erfolgten Waschschr mit Bindungspuffer und beiden

Waschpuffern. Das Protein wurde zweimal mit Elutionspuffer eluiert und gepoolt. Mit dem Strip-Puffer wurde das komplette Nickelsulfat entfernt und das Säulenmaterial stand für eine weitere Runde zum Beladen zur Verfügung. Bei jedem Schritt wurde ein Aliquot aufbewahrt, um später den Erfolg im SDS-PAGE kontrollieren zu können.

Dialyse und Einengung

Die aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden gegen 1x VBS Puffer dialysiert. Jeweils 80 ml Eluat, gepoolt aus erster und zweiter Elution, wurden zweimal Ü/N bei 4 °C in einem SpectraPor 6 Dialyseschlauch (MWCO 1000) gegen 4 Liter VBS dialysiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zentrifugation in Ultrafree Biomax 5K Filtern nach Angaben des Herstellers eingengt.

Protein-Extraktion aus Lebergewebe

100 µg Gewebe-Pulver wurde in 1,5 ml Extraktionspuffer PE-LB gegeben, der den Proteaseinhibitormix Protease-Arrest nach Angaben des Herstellers enthielt. Die Lösung wurde dann mit einem Ultraturrax homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 1 h bei 4 °C und 100.000 g, um unlösliches Material zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und die Proteinkonzentration im BCA Assay bestimmt.

2.2.4 Bindungsassays und Funktionsanalytik

Heparin Affinitäts-Chromatographie

Bindung an Heparin und damit polyanionische Oberflächen wurde unter Verwendung des Säulen-Chromatographiesystemes ÄKTAPrime untersucht. 10 ml Zellkultur-Überstand wurden in Laufpuffer (50 mM NaCl; 0,33x PBS) verdünnt und auf eine Heparin HiTrap Säule (1 ml Agarose-Säule gekoppelt mit 10 mg Heparin) gegeben. Die Proben wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben. Nach gründlichem Waschen der Säule mit 20 ml Laufpuffer erfolgte die Elution über einen linearen NaCl-Gradienten von 50 mM bis 500 mM. Fraktionen von je 1 ml des Waschschrilles und der Elutionen wurden über den automatischen Sammler ÄKTAPrime erhalten und davon je 50 µl für SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt.

Interaktionsmessung mit BIAcore Biosensortechnik

Protein/Protein-Interaktion wurden mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonenresonanz-Technik gemessen. Dazu wurde humanes C3b mittels einer Standard-Aminokopplung

an die Dextranoberfläche eines CM5 Biosensor-Chips gekoppelt^[112]. Zwei Fließzellen wurden mit 35 µl NHS (0.05M N-hydroxysuccinimid-carbodiimid) und EDC (0,2 M N-ethyl-N'-(dimethyl-aminopropyl) aktiviert. C3b wurde gegen Acetatpuffer (10 mM Acetat pH 4,8 – 5,5) dialysiert und in 10 µg-Portionen (>150 µg/ml) in die Fließzellen injiziert, bis eine angemessene Kopplung erfolgt war (über 4000 Resonanzeinheiten). Ein nichtgekoppelter Kanal der Fließzelle diente als Negativkontrolle. Verbliebene NHS-Estergruppen wurden mit einer Ethanolamin-HCl-Injektion (35 µl) deaktiviert. Anschließend wurden die Fließzellen mit Injektionen von Ladepuffer (10 mM HEPES; 0,075 M NaCl; pH 7,4) und Regenerationspuffer (3 M NaCl in 10 mM Acetate Puffer; pH 4.6) gewaschen. Interaktion der rekombinanten Fragmente mit humanem C3b wurde untersucht. Die Proteine wurden gegen den Ladepuffer dialysiert. Jedes zu untersuchende Fragment wurde separat in beide Fußzellen injiziert bei einer Flußrate von 10 µl/min bei 22 °C. Die Konzentrationen der Fragmente lagen dabei zwischen 100-150 µg/ml. Alle Interaktionsstudien wurden mindestens zweimal auf unabhängig präparierten Biosensorchips wiederholt.

Kofaktor-Assay

Um die Kofaktor-Aktivität zu untersuchen, wurde ein C3b-Spaltungs Assay verwandt, der eine nicht-radioaktive Variante des klassischen Ansatzes nach Alsenz et al. darstellt^[202]. Zu 25 µl VBS-Puffer, welcher 0,5 µg Faktor I und 2,5 µg C3b enthielt, wurden Reihenverdünnungen der rekombinanten Fragmente gegeben. Um Gleichverteilung aller Komponenten sicher zu stellen, wurde, wo immer möglich, ein Master-Mix angesetzt. Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation der Tubes inkubiert. Dann wurde SDS-Probenpuffer und DTT hinzugegeben, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden entweder silbergefärbt oder im Western Blot analysiert.

2.2.5 Immunhistologie

Kryo-Gewebeschnitte und Immunofluoreszenzfärbung

Gewebestücke von Schweinelebern wurden in Einbettmedium gegeben und im Kryostaten bei -20 °C eingefroren. Nach der Aushärtung des Einbettmediums wurden die Blöcke auf dem Chuck des Kryostaten festgefroren. Die Proben wurden mit einer ungefähren Dicke von 8 µm geschnitten und auf L-Lysine beschichtete Objektträger aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden in einer Feuchtigkeitskammer bei 4 °C

ausgeführt. Die Schnitte wurden zunächst 5 min mit Fixationslösung (1 % Formaldehyd; 0,1 % Glutaraldehyd in PBS) fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen abzusättigen wurde mit 3 % BSA in PBS für 15 min geblockt. Der erste Antikörper α -pigFH(rabbit) wurde 1:80 in PBS (3 % BSA) verdünnt, auf die Gewebeschnitte gegeben und Ü/N inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden einige Schnitte nur mit PBS (3 % BSA) inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS (0,05 % Tween) wurde der FITC-gekoppelte zweite Antikörper α -rabbitIgG(goat) 1:50 in PBS (3 % BSA) verdünnt und 1 h auf die Schnitte gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Antifade-Medium bedeckt und mit Deckgläsern versehen. Die Schnitte wurden bis zur Visualisierung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Konfokale Lasermikroskopie

Alle immunhistologischen Schnitte wurden mit dem Leica TCS Konfokales Lasermikroskop analysiert. Unter Durchleuchtung der Quecksilberlampe wurden die Zielstrukturen eingestellt und dann auf die Lasereinheit umgeschaltet. Als Filtereinstellungen wurde der vorgegebene Standard-FITC Modus gewählt. Zunächst wurde in der senkrecht auf dem Schnitt stehenden Z-Achse die optimale Schnittebene gewählt und die Helligkeit mit dem Eingangsregler eingestellt. Eine Mehrschnitt-Integration entlang der Z-Achse wurde nicht durchgeführt. Um den Signal-Rausch-Abstand zu verbessern, wurde das Bild viermal gescannt und die akkumulierten Bilder integriert, wie es der Hersteller empfiehlt. An Objektiven kamen x 10, x 20 und (mit Immersionsöl) x 63 zum Einsatz.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung von Faktor H des Schweines

3.1.1 cDNA-Bank und Screening

Die Synthese der Quell-cDNA aus der isolierten mRNA wurde unter Zugabe des Radionukleotids [α - 32 P]dATP durchgeführt, um die Größenverteilung der Fragmente in allen Schritten im alkalischen Agarosegel kontrollieren zu können. In **Abbildung 9** sind die zugehörigen Autoradiogramme gezeigt. Wie in **Abbildung 9A** zu erkennen, rangieren die cDNA-Fragmente der Erststrangsynthese zwischen 0,3 kb und 4,0 kb. Die Zweitstrangsynthese erzeugt Fragmente bis zu einer Länge von über 9,5 kb. Diese Größenzunahme ist in der teilweisen Rückfaltung und Loopbildung des Erststranges begründet, der dann durch die Polymerase verlängert wird.

Die cDNA-Fragmente wurden dann auf einer Sepharose-Säule aufgetrennt und größenfraktioniert. **Abbildung 9B** zeigt die Größenverteilung der cDNA Fragmente in den einzelnen Fraktionen, die im zugehörigen Autoradiogramm nachgewiesen wurden. Fraktion 3 wurde zur weiteren Bearbeitung ausgesucht. In dieser Fraktion waren einerseits die höchsten Fragmentgrößen zu verzeichnen, andererseits garantierte ein unterer Cut-off bei ca. 600 bp ein Minimum an Insertgröße.

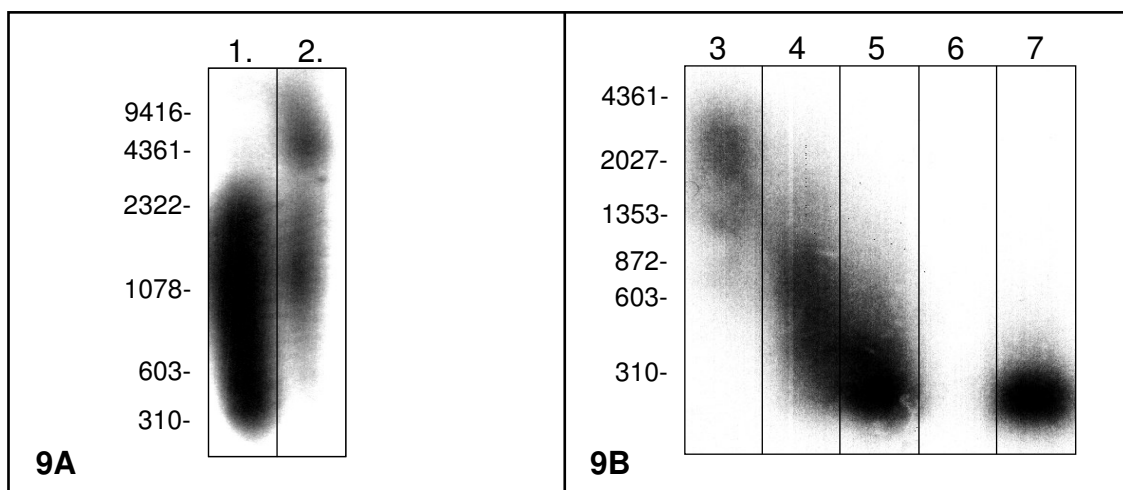


Abb. 9: Größenverteilung der Fragmente der cDNA-Banksynthese, im Autoradiogramm nachgewiesen. 9A: Autoradiogramme der Erst- und Zweitstrangsynthese. Die Größe der Fragmente der Erststrangsynthese (1.) rangieren zwischen 0,3 und 4,5 kb, die der Zweitstrangsynthese (2.) zwischen 6,0 und über 9,5 kb. **9B:** Autoradiogramme der Größenfraktionierung (Fraktionen 3 bis 7). Fraktion 3 enthält Fragmente zwischen 6,0 und 4,5 kb. Positionen des DNA-Markers sind jeweils links in bp angegeben.

Von der nicht amplifizierten Bank wurde 1 µl auf einer 150 mm Bakterienplatte ausplattiert. Es resultierten ca. 20.000 Klone, von denen nur einer bei der Blau/Weiß-Selektion als insertfrei eingeschätzt werden mußte. Es wurden 18 Klone zufällig gepickt und die Insertgröße per PCR bestimmt. Die Größenverteilung der Inserts lag zwischen 0,8 kb und 3,9 kb mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 1,6 kb. Der Titer der Bank wurde mit 4×10^7 pfu / µg DNA bestimmt. Die Bank wurde auf 11 Platten mit je 30.000 pfu (plaque forming units) ausplattiert, so daß ein Screen von 330.000 unabhängigen unamplifizierten Klonen möglich war. Es wurden 48 positive Klone in der ersten Screening-Runde gefunden, die in der PCR auf ihre Inserts untersucht wurden (Primer EST 5^{For} und M13^{Rev}, PCR Programm I). 11 Klone mit den ähnlich größten Inserts wurden ausgewählt und einer zweiten Runde unterzogen. Von der zweiten Screening-Runde wurde der längste Klon ausgewählt, als Klon pigFH11 benannt und die Nukleotidsequenz des Inserts bestimmt. Die Bestimmung der Sequenz wurde in beide Richtungen ausgeführt. Die eingesetzten Sequenzierungsprimer sind in der Primerliste mit ihrer später bestimmten Position aufgeführt. Die gefundene Nukleotidsequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigen hohe Homologie zu allen bisher bekannten FH-Sequenzen. Die Homologie beträgt 62 % zum Menschen, 58 % zur Maus und 60 % zur Ratte auf Aminosäure-Ebene. Daher wurde der Klon mit pigFH benannt (GenBank Accession Nr. AJ278470).

3.1.2 Die Sequenz von pigFH

Das Insert des in zwei Screening-Runden gefundenen Klones pigFH ist insgesamt 4003 bp lang. Es beginnt mit einer 59 Basen langen 5' untranslatierten Region (UTR). Mit dem Basen-Triplet ATG beginnt der Protein-kodierende Teil der Sequenz, der ein durchgängiges offenes Leseraster (open reading frame, ORF) von 3702 bp umfaßt.

Der Protein-kodierende Teil beginnt mit einem Signalpeptid, welches 18 Aminosäuren lang ist, und das Protein auf den sekretorischen Pfad innerhalb der Hepatozyten dirigiert. Dieses Signalpeptid wurde mit zwei Verfahren bestimmt: einmal mit dem SignalP-Algorhythmus, und einmal über den Homologie-Vergleich mit den bekannten FH-Signalsequenzen von Mensch und Ratte. Der SignalP-Algorhythmus ermittelt für die Gesamtsequenz von pigFH anhand der Abfolge der positiv geladenen Anfangsregion, der zentralen hydrophoben Region und der neutralen Endregion das 18 Aminosäuren lange Signalpeptid^[203]. Diese *in silicio* ermittelte Aminosäure-Sequenz

des Signalpeptids weist eine Homologie von 72 % zur humanen Signalsequenz und von 55 % zur Signalsequenz der Ratte auf.

Das reife Protein beginnt mit Glu (E-1) und besteht aus 1216 Aminosäuren. Das kalkulierte Molekulargewicht beträgt 136 kDa. Der 3' UTR umfaßt 222 Basen, der vom Poly(A)-Schwanz gefolgt wird. Das Polyadenylierungssignal mit der Konsensus-Sequenz ATTAAA befindet sich 17 Basen upstream des Poly(A)-Schwanzes. Die Homologie über die gesamte Sequenz des reifen Proteins beträgt 62 % für Schwein und Mensch, 58 % für Schwein und Maus, und 60 % für Schwein und Ratte auf der Aminosäure-Ebene. Da von FH vom Rind nur die Sequenz von SCR 3 bis SCR 12 bekannt ist, konnte kein Homologievergleich mit dieser Spezies durchgeführt werden. Vier potentielle Glykosilierungsstellen mit der Konsensus-Sequenz NXS oder NXT können von der Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Diese liegen in SCR 9, 12, 13 und 18. Nur eine davon (NDT) in SCR 9 ist identisch mit der humanen Site. Die Homologie zur Sequenz des EST, von dem die Sonde zum Screen der cDNA-Bank abgeleitet wurde, beträgt 90 %. Dieser relativ niedrige Homologiegrad erklärt sich durch mehrere fehlende Basen im 3' Bereich des EST, was als Sequenzierungsfehler des EST-Klones zu werten ist. In allen bisher bekannten Sequenzen von FH ist in SCR 4 die Aminosäure-Sequenz RGD (Arg-Gly-Asp) gefunden worden, die eine Konsensus-Sequenz für Zelladhäsions-Funktionen darstellt. In der Sequenz von pigFH findet sich an dieser Stelle hingegen die Abfolge RGE. Dieses Ergebnis wurde durch Sequenzierung einer getrennt isolierten cDNA eines Schweines anderer Rasse und Herkunft abgesichert.

Die gefundenen Charakteristika der pigFH-Sequenz sind in **Tabelle 5** zusammengefasst. Die cDNA-Sequenz von pigFH ist in **Abbildung 10** wiedergegeben.

Insert	4003 bp	Molekular-Gewicht	136 kDa
5'-UTR	59 bp	Struktur	20 SCRs
3'-UTR	222 bp	Glykosilierungsstellen	SCR 9, 12, 13, 18
ORF	3702 bp	Homologie Schwein-Mensch	62 %
Signal-Peptid	18 AS	Homologie Schwein-Maus	58 %
Reifes Protein	1216 AS	Homologie Schwein-Ratte	60 %

Tab. 5: Zusammenfassung der Charakteristika der gefundenen Sequenz von pigFH. Das Molekulargewicht wurde anhand der AS-Zusammensetzung berechnet. Die Glykosilierungsstellen wurden anhand der bei pigFH gefundenen Konsensus-Sequenzen NXS und NXT ermittelt. Die Homologien wurden auf AS-Ebene für die Gesamt-Sequenzen bestimmt.

													-Signal Peptid																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
													-18 M R C P A K F V V W L I L W T V C													-3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
1		...cagaacc	tgacacagtg	ttgaacactc	aactcctaga	tgtagccctga	acgggtcccca	aaATGAGATG	TCCAGCAAAG	TTGTGTGGC	TAATATTGTG	GACTGTTTGT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
-SCR 1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
108	GTTCGAGAAG	ACTGTAGAGA	ACCTCCTCCA	AGAAAGAGAA	CAGAAATGTG	ATCAGCTGTC	TGGAGTGAAC	AAACATATCC	AGAAGGCACT	CAGGCTACAT	ACAAATGCGC	CCCTGGATAC	38																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
													-SCR 2																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
228	RTTLG	SGTIV	MVC	KDGGK	WVVS	LHP	SRIC	RKK	PCG	HPGD	TTSF	GSF	78																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
228	AGAACACTTG	GGAGTATTGT	TATGGTGTGC	AAGGATGGAA	AATGGGTGTC	TCTTCATCCG	TCCAGGATAT	GTCCGAAAAA	GCCTGTGGGA	CATCCTGGAG	ACACATCCTT	TGGTCTTTTC																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
													-SCR 3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
348	HLAVG	GTQ	FTE	GAK	VVY	T	CDE	GYQ	M	LGE	I	NF	RE	CTD	TNG	W	TN	118																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
348	CATCTTCGAG	TAGGAATCTA	GTTTGAATAC	GGTGCCAAGT	TGTTTTCAC	ATGCGATGAG	GGGTATCAGA	TGCTGGGTGA	GATTAAATTT	CGTGAATGTG	ATACAAACGG	ATGGACCAAT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
													-SCR 4																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
468	NIPPL	CEV	V	K	LPV	T	EPE	NGR	I	V	S	G	A	L	E	P	D	G	E	T	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T	G	A	C	T	T

SCR 10-15 und SCR 19-20^[111,112,66,67,113]. Kofaktor- und DecayAccelerating-Aktivität liegen im Bereich SCR 1-4^[114,66,67]. Alle drei Fragmente wurden per PCR mit dem im Screen gefundenen Klon pigFH als Template amplifiziert. Die Primer enthielten die Klonierungsschnittstellen, die durch den Namen gekennzeichnet sind. Primer pigFH-SCR1PstI^{For} und pigFH-SCR4EcoRI^{Rev} amplifizierten ein Fragment von 751bp, Primer pigFH-SCR1PstI^{For} und pigFH-SCR7 EcoRI^{Rev} ein Fragment von 1292 bp, Primer pigFH-SCR15NotI^{For} und pigFH-SCR20EcoRI^{Rev} ein Fragment von 1126 bp. Alle drei Fragmente konnten amplifiziert und in den Vektor pBSV8His ligiert werden. In **Abbildung 12A** sind die Lokalisationen der exprimierten Fragmente sowie die bekannten Funktionen von hFH dargestellt.

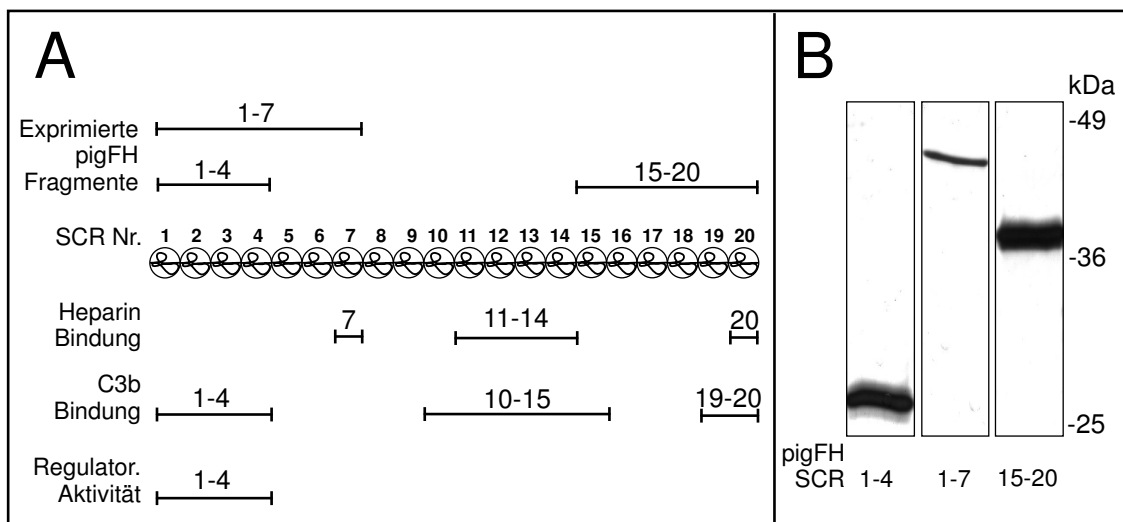


Abb. 12: Rekombinant exprimierte Fragmente von pigFH. In **12 A** sind die Lokalisationen der drei exprimierten Fragmente pigFH SCR1-4, pigFH SCR1-7 und pigFH SCR15-20 dargestellt. Im unteren Bereich sind die bekannten Funktionen von hFH und ihre Lokalisationen dargestellt. In **12 B** ist ein Silbergel der drei aufgereinigten pigFH Protein-Fragmente dargestellt. Positionen des Proteinmarkers sind rechts in kDa eingezeichnet.

Die Fragmente pig FH SCR1-4, SCR1-7 und SCR15-20 wurden im Baculovirus-System exprimiert, um hohe Expressionsausbeute, richtige Faltung und Glykosilierung zu gewährleisten. Alle drei Fragmente konnten im Kulturüberstand sowohl mit α -pigFH als auch mit α -HisTag Antikörpern mittels Western Blot nachgewiesen werden. Die Ni^{2+} Chelat Aufreinigung wurde wie beschrieben durchgeführt und konnte die Proteine in hoher Reinheit aufreinigen. Die aufgereinigte Proteinlösung wurde gegen VBS-Puffer dialysiert und mittels Filterzentrifugation eingengt. Die Fragmente pigFH SCR1-4 und pigFH SCR15-20 konnten so konzentriert werden. Das Fragment pigFH SCR1-7 präzipitierte bei der Einengung, so daß eine stärkere Konzentrierung nicht möglich war. In **Abbildung 12B** ist ein Silbergel der aufgereinigten Fragmente dargestellt.

3.3 Bindungs- und Funktionsstudien

3.3.1 Interaktion mit Heparin

Bindung von FH an Heparin ist ein gängiges *in vitro* Modell, um die Interaktion von FH mit negativ geladenen Oberflächen zu demonstrieren, was Voraussetzung für die Unterscheidung Aktivator / Non-Aktivator durch FH ist. Die Bindung der rekombinanten Fragmente pigFH SCR1-4, SCR1-7 und SCR15-20 wurde mittels Heparinaffinitäts-Chromatographie untersucht. Dazu wurde der Zellkultur-Überstand mit den jeweiligen rekombinanten Proteinen aufgetragen, die Heparin-Säule gewaschen und gebundene Fragmente mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt im Western Blot mit α -pigFH(rabbit) Antiserum detektiert. **Abbildung 13** zeigt den Western Blot der einzelnen Fraktionen.

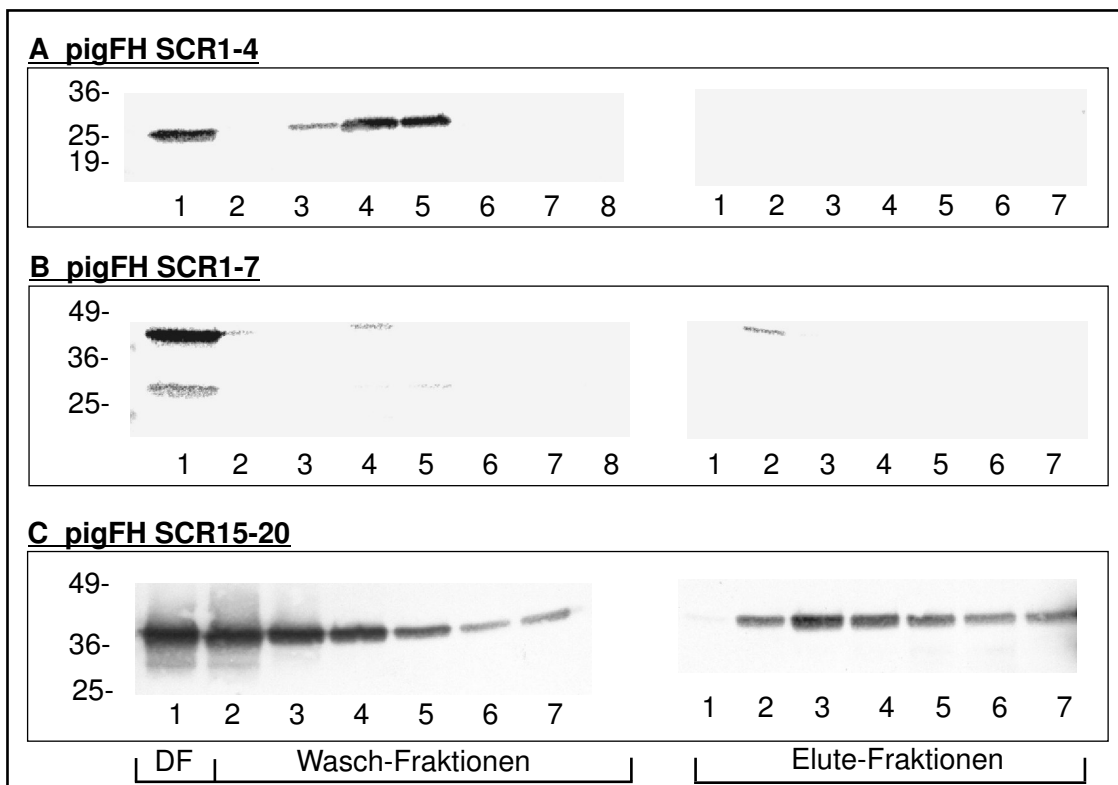


Abb. 13: Heparin Bindungsassay. Affinität der Fragmente pigFH SCR 1-4 (**A**), pigFH SCR 1-7 (**B**) und pigFH SCR 15-20 (**C**) für Heparin im Säulenassay. Kulturüberstand wurde auf die Säulen gegeben, der Durchfluß (DF) und die Wasch-Fraktionen gesammelt. Gebundene Fragmente wurden von der Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Alle Fraktionen wurden im SDS-Page aufgetrennt und im Western Blot mit α -pigFH Antiserum detektiert. Positionen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben.

Das Fragment pigFH SCR1-4 konnte in keiner Elute-Fraktion detektiert werden und zeigt somit keine Bindung an Heparin (**13A**). Dies steht in Übereinstimmung mit hFH, da im Bereich von SCR 1-4 bisher keine Heparinbindungsstelle gefunden wurde. Das Fragment pigFH SCR1-7 konnte in der zweiten Elute-Fraktion detektiert werden und

zeigt daher Bindung an Heparin (**13B**). Auch dies stimmt mit hFH überein, da in SCR 7 eine Heparinbindungsstelle gezeigt worden ist^[107]. Das Fragment pigFH SCR 15-20 konnte in den Elute-Fractionen 2 bis 7 detektiert werden und zeigt also Bindung an Heparin (**13C**). Allerdings wurde das Fragment auch noch in späten Waschfraktionen in erhöhter Menge detektiert, wobei die erste Elute-Fraktion dann kein Protein mehr enthielt. Für pigFH konnte so eine zweite Heparinbindungsstelle in SCR 15-20 gezeigt werden, die bei hFH ebenfalls in SCR 20 lokalisiert ist^[108].

3.3.2 Interaktion mit hC3b

Die Bindung von pigFH an C3b wurde mit der Technik der Oberflächen-Plasmonenresonanz im Biacore Instrument gemessen. Dabei kann die Interaktion der beiden Bindungspartner in Echtzeit und ohne Markierung der Interaktionspartner dargestellt werden. Als Bindungspartner wurde humanes C3b (hC3b) auf dem Sensorchip immobilisiert. Die Bindung des zu untersuchenden Fragmentes wird in Resonance Units (RU) ausgedrückt, die der Affinität der beiden Bindungspartner direkt proportional ist. Als Negativ-Kontrolle diente ein Kanal des Sensorchips, auf dem kein hC3b immobilisiert wurde. Die Intensität der Bindung wird dargestellt durch die Differenz der Zunahme in RU zwischen dem hC3b-beschichteten Kanal (Kinetik) und dem unbeschichteten Kanal (Kontrolle) der Fließzelle. Auf ihre Bindungsfähigkeit an humanes C3b wurden die rekombinant exprimierten Fragmente pigFH SCR1-4 und pigFH SCR15-20 untersucht. Alle Interaktionsstudien wurden mindestens zweimal auf unabhängig präparierten Biosensorchips wiederholt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 14** dargestellt.

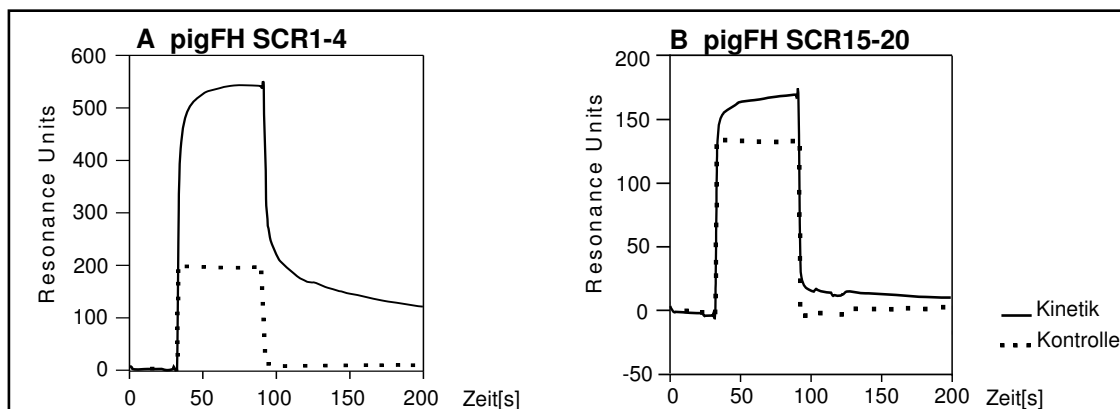


Abb. 14: Interaktionsmessung von pigFH-Fragmenten mit humanem C3b. Dargestellt sind die Bindungskinetiken der Fragmente pigFH SCR1-4 (**A**) und pigFH SCR15-20 (**B**) mit hC3b. Die Bindung wird dargestellt durch die Zunahme der Resonance Units (RU) als Funktion der Zeit. RU-Zunahme ist der Affinität der Proteine füreinander direkt proportional. Als Negativ-Kontrolle wurde das jeweilige Fragment in einen unbeschichteten Kanal der Fließzelle injiziert. Der Maßstab von **A** und **B** ist unterschiedlich.

Das Fragment pigFH SCR1-4 bindet an hC3b am Maximum seiner Kinetik mit einer Differenz von ca. 350 RU zum unbeschichtetem Kanal (A). Dies steht in Übereinstimmung mit humanem FH, für das eine Bindungsstelle für hC3b ebenfalls auf die Region SCR1-4 lokalisiert werden konnte. Im Gegensatz dazu bindet das Fragment pigFH SCR15-20 mit geringerer Affinität an hC3b (B). Am Maximum der Kinetik wird eine Differenz von 40 RU zur Kontrolle erreicht. Eine Interaktion der beiden Proteine wird damit zwar gezeigt, diese ist jedoch relativ schwach ausgeprägt. Dies steht im Kontrast zu hFH, für das eine hC3b-Bindungsstelle mit hoher Affinität in der Region SCR 19-20 gezeigt wurde.

3.3.3 Kofaktor-Aktivität von pigFH mit hFI und hC3b

Kofaktor-Aktivität ist eine der drei entscheidenden Regulationsmechanismen von humanem FH im Komplementsystem. Dabei wird hC3b in Gegenwart des Kofaktors hFH durch die Serinprotease hFI gespalten. Um eine mögliche Kofaktor-Aktivität von pigFH für hFI in der Spaltung von hC3b nachzuweisen, wurde ein nicht-radioaktiver Spaltungs-Assay eingesetzt. Die Ergebnisse dieses Experiments im Western Blot sind in **Abbildung 15** dargestellt.

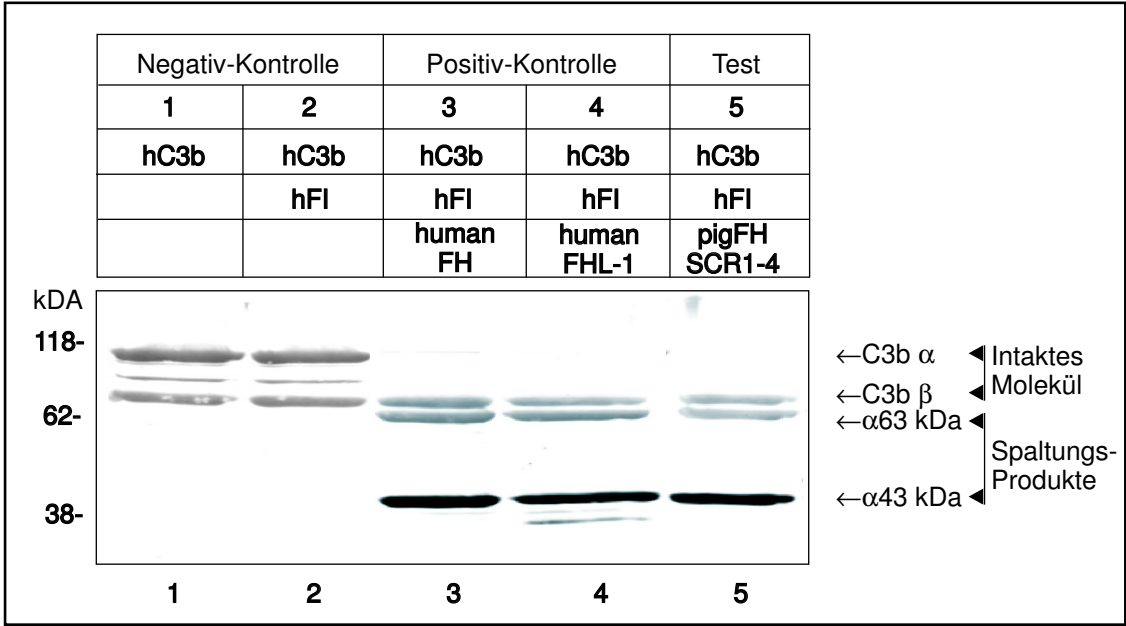


Abb. 15: Kofaktor-Aktivität von Fragment pigFH SCR1-4 für hFI in der Spaltung von hC3b. Dargestellt sind die Komponenten des Versuchsansatzes und der zugehörige Western Blot, der mit α-C3b Antikörper entwickelt wurde. Negativ-Kontrollen enthielten keinen Kofaktor. Positiv-Kontrollen enthielten hFH oder hFHL-1. Als Test-Fragment wurde pigFH SCR1-4 eingesetzt. Kofaktor-Aktivität wird durch die Spaltung der hC3b α-Kette in die Spaltungsprodukte α63 kDa und α43 kDa gezeigt. Positionen des Proteinmarkers sind links in kDa angegeben.

Die Kofaktor-Aktivität wird demonstriert durch die Spaltung der 118 kDa Kette von hC3b durch die Serinprotease hFI mit einem Kofaktor. Dabei wird im Western Blot die Abnahme der 118 kDa Bande und das Erscheinen der Banden α 63 kDa und α 43 kDa von hC3b nachgewiesen. Als Negativ-Kontrollen wurden hC3b oder hC3b und hFI ohne Kofaktor inkubiert. Als Positiv-Kontrollen wurden einmal hFH und einmal hFHL-1 als Kofaktoren eingesetzt. Da sich das Fragment pigFH SCR1-7 nicht genügend konzentrieren ließ, um es für diesen Assay einzusetzen, wurde das Fragment pigFH SCR1-4 für dieses Experiment gewählt. In einer weiteren Negativ-Kontrolle wurden hC3b und hFI mit pigFH SCR15-20 inkubiert (nicht abgebildet), wobei angenommen wurde, daß dieses Fragment keine Kofaktor-Aktivität aufweist. Alle Positiv- und Negativ-Kontrollen fielen erwartungsgemäß aus. Die Kofaktor-Aktivität des Fragmentes pigFH SCR1-4 wird im Western Blot durch die Abnahme der 118 kDa Bande und das Erscheinen der Banden α 63 kDa und α 43 kDa von hC3b nachgewiesen. Somit zeigt pigFH Kofaktor-Aktivität auch für humanen FI in der Spaltung von humanem C3b und überschreitet in seiner regulatorischen Aktivität die Spezies-Grenzen. Um zu überprüfen, ob die in diesem Experiment gefundene Spezies-übergreifende Kofaktor-Aktivität von pigFH auch quantitativ vergleichbar zu hFH ist, wurde der beschriebene Kofaktor Assay nun quantitativ mit Verdünnungsreihen durchgeführt.

3.3.4 Quantitativer Vergleich der Kofaktor-Aktivität

Da der durchgeführte Kofaktor Assay zeigt, daß pigFH Kofaktor-Aktivität für hFI in der Spaltung von hC3b besitzt, sollte diese Aktivität in einem weiteren Assay auch quantitativ untersucht werden. Als Vergleichs-Standard wurde das rekombinante Protein FHL-1 / reconectin gewählt, welches aus den ersten 7 SCR von hFH und 4 zusätzlichen AS aufgebaut ist. FHL-1 / reconectin besitzt wie FH Kofaktor-Aktivität. Da das Fragment pigFH SCR1-7 nicht ausreichend konzentriert werden konnte, wurde pigFH SCR1-4 gewählt. Von beiden Proteinen wurden initial 0,7 μ g eingesetzt und dann 1 : 1 Reihenverdünnungen hergestellt. Beide Verdünnungsreihen wurden als Kofaktoren für hFI in der Spaltung von hC3b eingesetzt. Der Titer wurde definiert als derjenige Verdünnungsschritt, bei dem die halbmaximale Spaltung von hC3b beobachtet wird. Spaltung von hC3b wurde gemessen anhand des Erscheinens der α 63 kDa-Bande von hC3b. Da die Identität der entstehenden Banden bereits im vorangegangenen Experiment gesichert wurde, und kein möglicher quantitativer

Störfaktor durch einen Western Blot eingeführt werden sollte, wurde dieses Experiment im Silbergel ausgewertet. Die Ergebnisse dieses Experiments im Silbergel sind in **Abbildung 16** dargestellt.

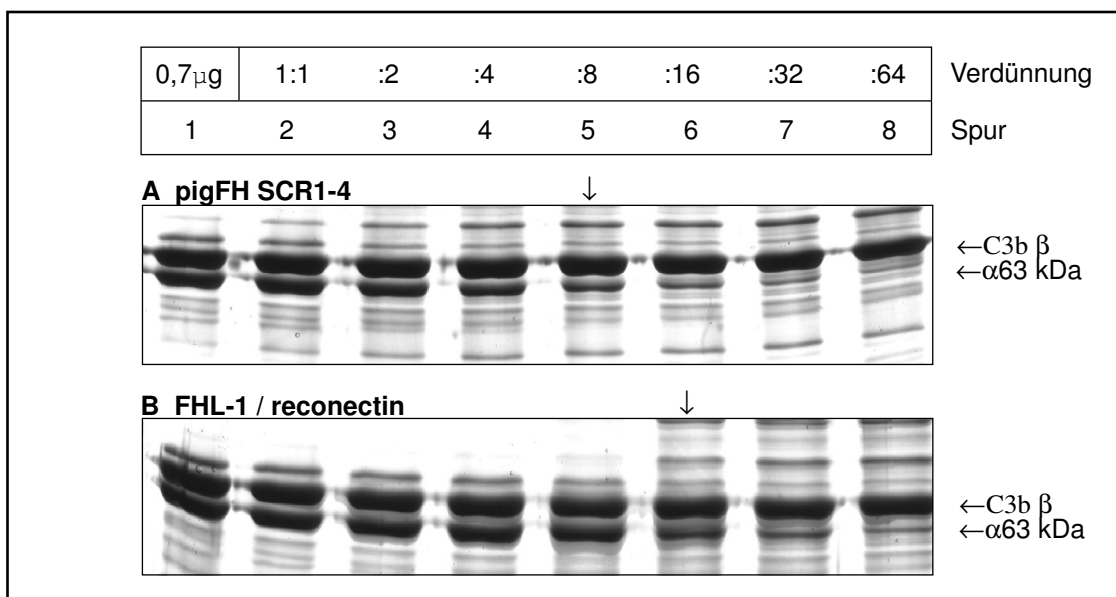


Abb. 16: Quantitativer Vergleich der Kofaktor-Aktivität von pigFH SCR1-4 (A) und hFHL-1/reconnectin (B). Beide Fragmente wurden auf 0,7 µg eingestellt und dann reihenverdünt. Korrespondierende Spuren entsprechen gleichen Konzentrationen des Kofaktors. Der Titer (↓) wurde definiert als halbmaximale Kofaktor-Aktivität, demonstriert durch das Erscheinen der α63 kDa Bande von hC3b im Silbergel. Für pigFH SCR1-4 wurde halbmaximale Aktivität in Spur 5 bestimmt (1:8), für FHL-1 / reconnectin in Spur 6 (1:16).

Durch den optischen Vergleich der Gele wurde eingeschätzt, daß für das Fragment pigFH SCR1-4 der Verdünnungsschritt 1:8 den Titer darstellt (**16A**, Spur 5). Für FHL-1 / reconnectin wurde der Verdünnungsschritt 1:16 als Titer ermittelt (**16B**, Spur 6). Um dieses Ergebnis abzusichern, wurde eine Bandenquantifizierung mit dem Gentools Gel-Analysesystem durchgeführt. Diese Quantifizierung anhand der α63 kDa-Bande von hC3b ermittelte für das Fragment pigFH SCR1-4 eine Aktivität von 60 % im Verhältnis zu FHL-1 / reconnectin, was in Übereinstimmung mit dem durch optischen Vergleich ermittelten Titer steht.

3.4 Untersuchungen zur plasmatischen pigFH-Defizienz

3.4.1 Vergleich der pigFH mRNA Expression

Für die Assoziation von plasmatischer Defizienz für FH mit MPGN II stellen die Schweine der Norwegischen *Yorkshire* Zucht ein ideales Tiermodell dar. Daher ist es von Interesse, die molekulare Ursache dieser plasmatischen FH-Defizienz zu klären. Um zu überprüfen, ob die erkrankten Tiere dieser Zucht überhaupt mRNA für pigFH

synthetisieren, sollte zunächst untersucht werden, ob in der Leber der homozygot erkrankten Schweine pigFH mRNA nachweisbar ist. Dazu wurde RNA aus Lebergewebe von einem gesunden und einem erkrankten Schwein isoliert, cDNA synthetisiert und mit den pigFH-spezifischen Primer EST 3^{For} und EST 5^{Rev} ein 291 bp großes Fragment amplifiziert. Als Vergleichs-Standard wurde Beta-Aktin mit zwei verschiedenen Primerpaaren amplifiziert (p β -Actin^{For} und p β -Actin^{Rev}, h β -Actin^{For} und h β -Actin^{Rev}). Das Ergebnis ist in **Abbildung 17** wiedergegeben.

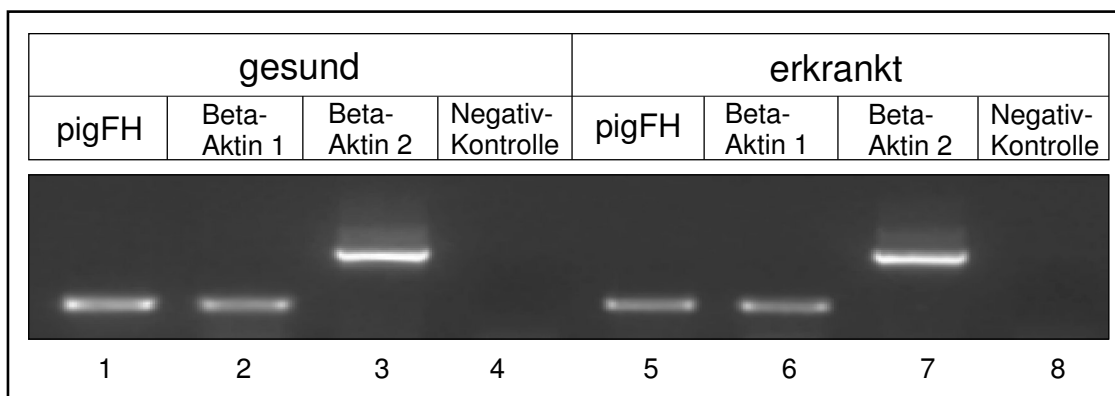


Abb. 17: Vergleich der pigFH mRNA Expression zwischen gesundem und erkranktem Schwein. RNA wurde aus Lebergewebe beider Tiere isoliert, cDNA synthetisiert und mit verschiedenen Primern amplifiziert. Amplifikate wurden im Agarosegel aufgetrennt. In Spur 1 und 5 wurden pigFH-spezifische Primer verwandt. In Spur 2 und 6 sowie 3 und 7 wurden zwei verschiedene Primerpaare für Beta-Aktin verwandt. In Spur 4 und 8 wurden RT-minus Kontrollen durchgeführt.

Bei dem gesunden und dem erkrankten Schwein konnte die pigFH-spezifische Bande in vergleichbarer Intensität nachgewiesen werden (Spur 1 und 5). Beide Beta-Aktin Banden waren bei dem gesunden und dem erkrankten Tier ebenfalls in vergleichbarer Intensität vorhanden, so daß von gleichen Mengen an gesamt RNA ausgegangen werden kann (Spur 2 und 6, Spur 3 und 7). Die Negativ-Kontrolle wurde als RT-minus PCR ausgeführt (PCR mit der RNA-Präparation als Template ohne reverse Transkription) und zeigte, daß die isolierte RNA nicht mit genomischer DNA kontaminiert war (Spur 4 und 8). Somit konnte gezeigt werden, daß mRNA für pigFH in vergleichbarer Menge in der Leber sowohl beim gesunden als auch beim erkrankten Tier vorhanden ist.

3.4.2 cDNA-Sequenzierung und Nachweis von zwei Mutationen

Da nachgewiesen wurde, daß mRNA für pigFH bei dem gesunden und dem erkrankten Tier in vergleichbarer Menge vorhanden war, wurde diese auf Mutationen untersucht. Dazu wurde von gesundem und Plasma-FH defizientem Schwein RNA aus Lebergewebe isoliert, revers transkribiert und die pigFH-spezifische mRNA in zwei überlappenden Fragmenten amplifiziert. Es wurden zunächst die Nukleotidsequenzen

im PCR-Produkt bestimmt. Dann wurde das PCR-Produkt aus weiteren PCR-Reaktionen subkloniert und die Inserts von einzelnen Klonen sequenziert. Primerpaare waren pigFH 0^{For} und EST 3^{Rev}, sowie EST 5^{For} und pigFH 7^{Rev}, die amplifizierten Fragmente wurden mit pigFH 0-3 (2241 bp) und pigFH 5-7 (2030 bp) benannt. Der überlappende Bereich entsprach dem veröffentlichten EST. Die PCR-Produkte des gesunden Norwegischen Schweines der Rasse *Yorkshire* wurde kloniert, sequenziert und mit der ebenfalls in dieser Arbeit gefundenen pigFH-Normalsequenz verglichen (Rasse *Deutsches Mastschwein*). Auf Nukleotid-Ebene fand sich dabei ein Austausch [A2939G]. Dieser Austausch führt zu keiner Änderung der Aminosäure-Sequenz und wurde daher als Polymorphismus gewertet. cDNA von der Leber des erkrankten Schweines wurde mit den beschriebenen Primern amplifiziert und das PCR-Produkt direkt sequenziert. Die Sequenz unterschied sich an zwei Positionen von der Normalsequenz: Eine Mutation [C1590G] führt zu einem AS-Austausch [L493V] in SCR 9. Eine zweite Mutation [T3610G] wurde gefunden, die zu einem Aminosäure-Austausch [I1166 R] in SCR 20 führt. Die Sequenzierungs-Chromatogramme der PCR-Produkte sind in **Abbildung 18** wiedergegeben.

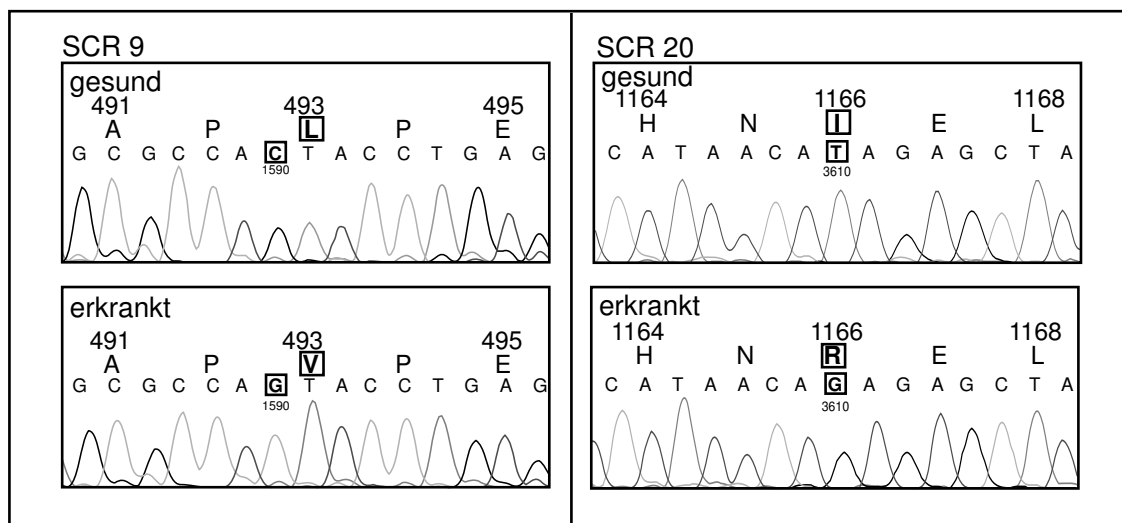


Abb. 18: Nachweis von zwei Mutationen beim Schwein mit Plasmadefizienz für pigFH. Von gesundem und erkranktem Schwein wurde RNA aus Lebergewebe isoliert, mit pigFH-spezifischen Primern in zwei Fragmenten amplifiziert und in beiden Richtungen sequenziert. Dargestellt sind die Sequenz-Chromatogramme der gefundenen Mutationen: In SCR 9 wurde eine Mutation [C1590G] gefunden, die zu einem AS Austausch [L493V] führt. In SCR 20 wurde eine Mutation [T3610G] gefunden, die zu einem AS Austausch [I1166R] führt.

Die Mutationen wurden auf zwei Wegen bestätigt: (1.) Die PCR-Produkte wurden zur direkten Sequenzierung eingesetzt. In den sequenzierten PCR-Produkten konnten dabei keine Doppelpeaks einzelner Basen ausgemacht werden, wie sie für Heterozygoten

oder Taq-Fehler typisch sind. (2.) PCR-Produkte verschiedener PCR-Reaktionen wurden subkloniert und einzelne unabhängige Klone durchsequenziert. Von dem Fragment pigFH 0-3, welches die Mutation in SCR 9 enthält, wurden 6 Klone durchsequenziert. Von dem Fragment pigFH 5-7, welches die Mutation in SCR 20 enthält, wurden 10 Klone durchsequenziert. Die genannten Mutationen fanden sich in allen entsprechenden Klonen.

3.4.3 Nachweis der pigFH Proteine in Plasma und Leber

Um die Auswirkung der gefundenen Mutationen auf der Proteinebene zu untersuchen, wurden Plasmaproben und Leber-Proteinextrakte von gesundem und erkranktem Tier im SDS-Page aufgetrennt und im Western Blot detektiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 19** wiedergegeben. Zur Detektion wurden zwei Antiseren eingesetzt: α -pigFH Antiserum (**A**) und α -hFH SCR1-4 Antiserum (**B**), welches Kreuzreaktivität mit pigFH zeigt. Gleiche Proteinkonzentrationen der korrespondierenden Proben wurden im BCA-Assay eingestellt (nicht dargestellt) und im Silbergel überprüft (**C**).

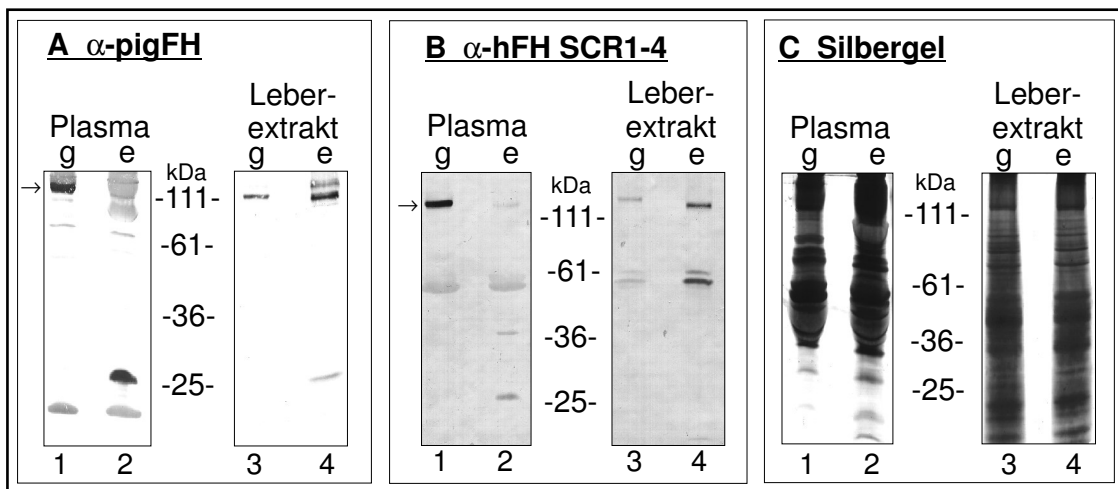


Abb. 19: Western Blots und Silbergel von Plasmaproben und Leberextrakten des gesunden und des erkrankten Schweines. Blots wurden entweder mit α -pigFH (A), oder mit α -hFH SCR1-4 detektiert (B). Gleiche Proteinkonzentrationen der korrespondierenden Proben wurden im Silbergel überprüft (C). g= gesund, e= erkrankt. Positionen des Proteinmarkers sind in kDa angegeben. Die Position der pigFH-Bande ist mit $\rightarrow$ markiert.

Im Plasma des gesunden Schweines wurde das pigFH Protein als Bande bei 136 kDa nachgewiesen, im Plasma des erkrankten Schweines konnte das pigFH Protein hingegen nicht nachgewiesen werden. Ein Protein mit einer ungefähren Größe von 28 kDa wurde im Plasma des erkrankten Tieres nachgewiesen und lag hier in deutlich erhöhter Konzentration vor, wohingegen dieses Protein im Plasma des gesunden Tieres fast nicht

zu detektieren war. Beide Proben zeigten weitere Proteine mit Größen von 70 kDa und 19 kDa in jeweils vergleichbaren Konzentrationen.

Im Leberextraktes des gesunden Schweines konnte das pigFH Protein nachgewiesen werden. Im Leberextrakt des erkrankten Schweines wurde das pigFH Protein ebenfalls nachgewiesen, hier zeigt sich jedoch zusätzlich eine deutlich erhöhte Konzentration. Auch hier war wieder das 28 kDa Protein zu detektieren. pigFH wird also im Plasma des erkrankten Schweines nicht nachgewiesen, findet sich aber im Leberextrakt dieses Tieres, wo es in deutlich erhöhter Konzentration vorliegt. Somit wird pigFH zwar in der Leber des erkrankten Schweines synthetisiert, wird aber nicht ins Plasma sezerniert, sondern akkumuliert im Lebergewebe, wo es in erhöhter Konzentration vorliegt.

Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde eine zweite Serie von Western Blots mit demselben Probenauftrag durchgeführt und das Antiserum α -hFH SCR1-4 zur Detektion eingesetzt (**B**). Das pigFH Protein wurde auch hier deutlich im Plasma des gesunden Tieres nachgewiesen, wohingegen das Protein im Plasma des defizienten Schweines allenfalls in geringsten Mengen nachweisbar war. Im Plasma des defizienten Schweines wurden zwei weitere Proteine mit einer Größe von 40 kDa und 28 kDa detektiert. In den Leberextrakten beider Proben wurde das pigFH Protein und zwei weitere Proteine mit einer Größe von 55 kDa und 59 kDa nachgewiesen. Alle drei Proteine wurden im Leberextrakt des erkrankten Tieres in stark erhöhter Konzentration nachgewiesen. Die Mobilität der pigFH-Bande war beim erkrankten Schwein möglicherweise leicht erhöht.

pigFH wurde in dieser Blotserie in den Leberextrakten des gesunden und des erkrankten Tieres nachgewiesen, allerdings ist die Konzentration im Leberextrakt des erkrankten Schweines deutlich erhöht. Somit konnte Präsenz und erhöhte Konzentration des pigFH Proteins im Lebergewebe des erkrankten Schweines und die plasmatische Defizienz auch in dieser Blotserie bestätigt werden. Das Protein pigFH wird im Lebergewebe des erkrankten Schweines synthetisiert und liegt hier in erhöhter Konzentration vor. Während pigFH Protein im Plasma nicht vorhanden ist, akkumuliert das Protein im Lebergewebe des erkrankten Tieres.

Zusammenfassend ergibt sich daher folgendes Bild: pigFH kann im Plasma des erkrankten Tieres nicht nachgewiesen werden, dafür findet sich ein Protein mit einer Größe von 28 kDa in erhöhter Konzentration. Im Lebergewebe des erkrankten Tieres hingegen wird das pigFH Protein exprimiert und liegt hier in deutlich erhöhter Konzentration im Vergleich zum Lebergewebe des gesunden Tieres vor. Das pigFH

Protein wird also in der Leber des erkrankten Schweines synthetisiert, kann aber nicht sezerniert werden und akkumuliert daher. Es besteht ein Sekretionsblock für pigFH in der Leber des erkrankten Tieres, welcher die plasmatische Defizienz für pigFH zur Folge hat.

3.4.4 Nachweis von pigFH in Hepatozyten *in situ*

Im Western Blot konnte eine deutliche Anreicherung des pigFH Proteins im Lebergewebe des erkrankten Tieres gezeigt werden. Um diese Akkumulation von pigFH auch im Lebergewebe *in situ* darzustellen und genauer zu lokalisieren, wurden Kryoschnitte der Lebergewebeproben immunhistologische untersucht. Lebergewebe von einem gesunden und einem erkrankten Schwein wurden einer Immunfärbung mit dem α -pigFH(rabbit) Antiserum und einem zweiten FITC-gekoppelten Antikörper unterzogen. Als Negativkontrollen wurden Schnitte nur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Die FITC-Färbung wurde unter konfokaler Lasermikroskopie visualisiert.

Die akquirierten Bilder sind in **Abbildung 20** (Seite 75) gezeigt. Die Bilder **A**, **B** und **C** zeigen die Immunhistologie vom Lebergewebe des gesunden Schweines. Bild **A** zeigt das durch die Septen begrenzte Leberläppchen in seiner hexagonalen Form, eine Vena centralis und im rechten unteren Teil ein Portalfeld. Die Bilder **B** und **C** fokussieren auf dieses Portalfeld. Die Bilder **D**, **E** und **F** zeigen die Immunhistologie vom Lebergewebe des erkrankten Schweines. Bild **D** zeigt die Septen und in der Mitte ein Portalfeld. Die Bilder **E** und **F** fokussieren auf diese Portalfeld. Die Negativkontrollen zeigten nur äußerst geringe und diffuse Fluoreszenzsignale (nicht abgebildet).

Im Lebergewebe des gesunden Schweines wurden nur mäßige Konzentrationen des pigFH Proteins im Parenchym detektiert (**A**). Die angeschnittene Zentralvene des Leberläppchens zeigte die Präsenz von pigFH auch in der Venenwand. pigFH war innerhalb des Läppchenparenchyms vor allem in den Sinusoiden lokalisiert und nahm zur Zentralvene hin zu. Im Bindegewebe der Septen und Periportalfelder konnten die höchsten Konzentrationen an pigFH Protein nachgewiesen werden. In der stärkeren Vergrößerung zeigte sich, daß das pigFH Protein vor allem im Bereich der extrazelluläre Matrix des Bindegewebes lokalisiert war (**B**). Weder Zellgrenzen noch Nuclei konnten abgegrenzt werden (**C**).

Diese Verteilung steht in klarer Übereinstimmung mit der eines sezernierten Proteins: Mäßige Konzentrationen an pigFH Protein in Parenchym und Sinusoiden, die zur Zentralvene hin ansteigt, da das sezernierte Protein hier konzentrierter vorliegt. Da das Bindegewebe von Plasma umflossen ist, sind in den Septen wiederum hohe

Konzentrationen von pigFH Protein nachweisbar, wobei das Protein extrazellulär im Bereich der Bindegewebs-Matrix lokalisiert ist.

Im Lebergewebe des erkrankten Tieres wurde kein pigFH Protein in bindegewebigen Strukturen wie Septen oder Portalfelder nachgewiesen (**D**). Auch in stärkerer Vergrößerung konnte kein pigFH Protein innerhalb der Septen oder Portalfelder gesehen werden (**E**). Hohe Konzentrationen von pigFH Protein wurden hingegen im Bereich des Parenchyms detektiert. In der stärksten Vergrößerung konnte die Lokalisation des pigFH Proteins innerhalb des Parenchyms auf das intrazelluläre Kompartiment der Hepatozyten lokalisiert werden: Der Nukleus lag als ungefärbte oval-runde Struktur innerhalb des Zytoplasmas, welches extrem hohe Konzentrationen an pigFH Protein zeigte (**F**). In den Sinusoide des Parenchyms war im Gegensatz zum Lebergewebe des gesunden Schweines kein pigFH Protein nachweisbar.

Dieses histologische Bild steht in klarer Übereinstimmung mit einem Sekretionsblock für das veränderte pigFH Protein in der Leber der erkrankten Tiere: Hohe Konzentrationen von pigFH Protein sind im Parenchym des Lebergewebes des erkrankten Tieres nachweisbar, wobei diese auf die Hepatozyten lokalisiert werden können. Das Protein findet sich intrazellulär und liegt hier in hoher Konzentration im Zytoplasma vor. In den Sinusoiden kann kein pigFH Protein nachgewiesen werden. Auch im Bereich der bindegewebigen Septen ist kein pigFH Protein nachweisbar, da eine plasmatische Defizienz für das Protein vorliegt. Somit konnten die Ergebnisse der Untersuchungen von Plasma und Leberextrakt auch *in situ* im Lebergewebe dargestellt werden: Präsenz von pigFH Protein in den Hepatozyten, Block der Sekretion und Akkumulation in den Hepatozyten des erkrankten Tieres mit der Folge einer plasmatischen Defizienz für das pigFH Protein.

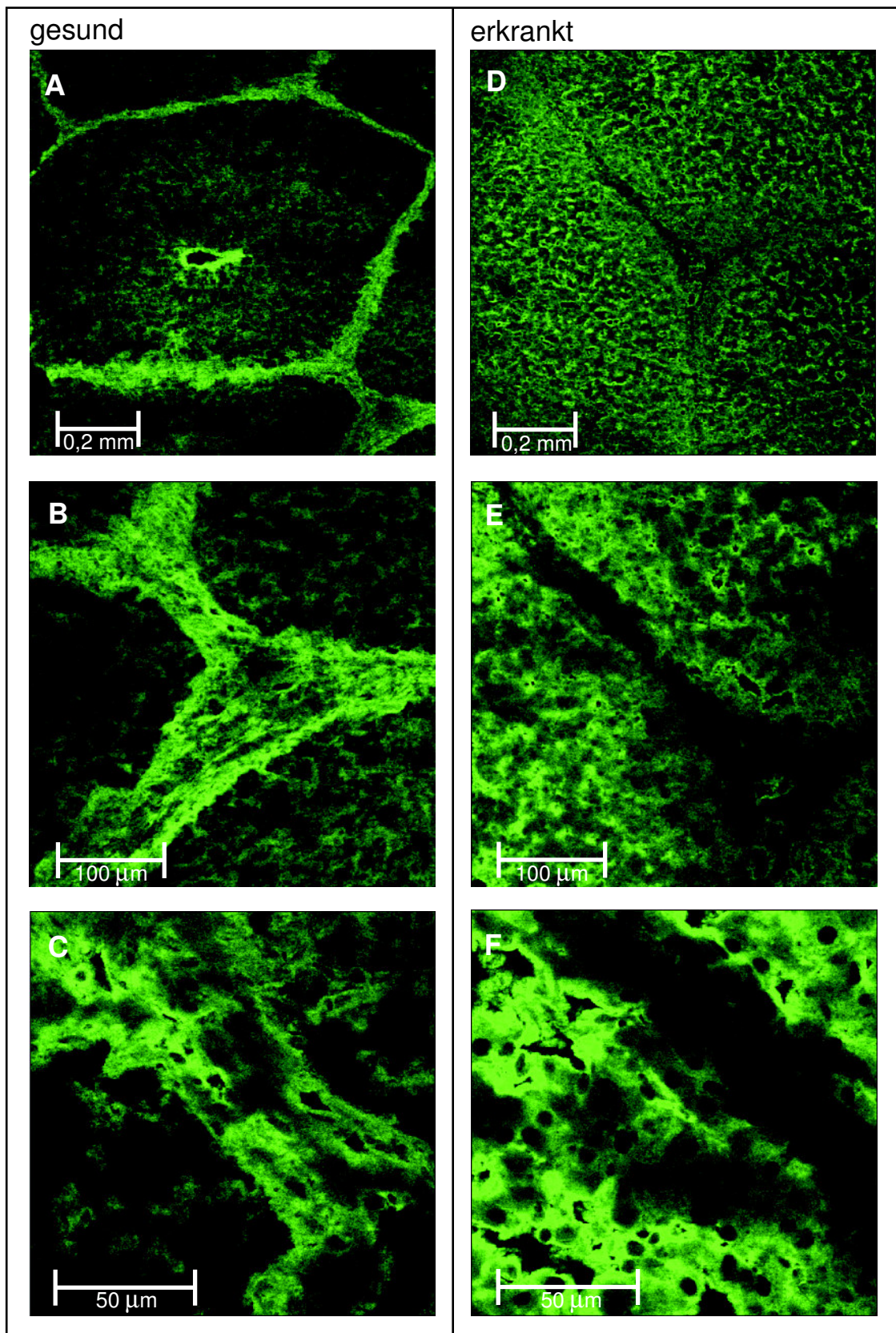


Abb. 20: Konfokale Lasermikroskopie von Lebergewebe, gefärbt mit α -pigFH Antiserum. Bild A, B und C zeigen gesundes Lebergewebe. Bild D, E und F zeigen Lebergewebe des erkrankten Schweines. Auf das Portalfeld in A rechts unten wird in B und C fokussiert. Auf das Portalfeld in der Mitte von D wird in E und F fokussiert. Objektive: A/D= x10, B/E= x20, C/F= x63.

4 Diskussion

4.1 Die Sequenz von Faktor H von *Sus scrofa*

4.1.1 Sequenzvergleich von pigFH mit anderen Spezies

In der vorliegenden Arbeit wird erstmalig die molekulare Klonierung des Analogons des Komplementregulators Faktor H von *Sus scrofa* berichtet. Die gefundene cDNA Sequenz ist 4003 bp lang, der 5'UTR umfaßt 59 bp, der 3' UTR 222 bp. Der Proteinkodierende Bereich beginnt mit einem Signalpeptid, welches 18 AS umfaßt und eine Homologie von 72 % zur humanen Signalsequenz und von 55 % zur Signalsequenz der Ratte aufweist. Das reife Protein besteht aus 1216 Aminosäuren, das kalkulierte Molekulargewicht beträgt 136 kDa. Die Homologie über die gesamte Sequenz des reifen Proteins beträgt 62 % für Schwein und Mensch, 58 % für Schwein und Maus, und 60 % für Schwein und Ratte. Vier potentielle Glykosilierungsstellen liegen in SCR 9, 12, 13 und 18, wovon nur eine in SCR 9 identisch ist mit der humanen Stelle. pigFH ist wie hFH in 20 SCRs organisiert und besitzt die vier charakteristischen Cysteine pro SCR in hoch konservierten Positionen. Die Konsensus-Sequenz von pigFH steht in guter Übereinstimmung mit der von hFH.

In **Abbildung 21** werden alle bisher bekannten Aminosäure-Sequenzen von FH verglichen. Für folgende Spezies ist die Gesamtsequenz des reifen Proteins bekannt: Mensch (Hum)^[77], Maus (Mou)^[204] und Ratte (Rat)^[205]; vom Rind (Bov)^[206] ist bisher nur eine Teilsequenz (SCR 3 bis 12) bekannt. Die Markierung von Homologien erfolgte nach zwei Prinzipien: (1.) Homologe AS innerhalb eines einzelnen SCRs sind grau unterlegt. (2.) Homologe AS, die sich über alle SCRs und Spezies hinweg finden, sind fett gedruckt.

Durch diese Anordnung wird der Sequenzvergleich mehrfach auswertbar: (1.) Aminosäuren, die nur innerhalb eines einzelnen SCR konserviert sind, kommt möglicherweise eine besondere Bedeutung zu, wenn die Funktionalität des betreffenden SCRs experimentell nachgewiesen wurde (grau unterlegt). (2.) Aminosäuren, die in allen SCRs bei allen Spezies homolog sind, sind möglicherweise strukturbildend für SCRs (fett gedruckt). (3.) Aminosäuren, die SCR-strukturbildend sind, kommt wahrscheinlich weniger SCR-spezifische funktionelle Bedeutung zu, und können durch die Doppelmarkierung identifiziert werden (grau unterlegt und fett gedruckt). Dadurch kann die Lokalisierungen rein funktioneller Aminosäuren weiter eingeschränkt werden.

SCR01 Pig	EDCRE-PPPR-K-ETEIVSGSW-TEQ	TYPE-G	TQATYKCRPGYR-TL-GS	IVMCK-DGKWSLHPSRIC
SCR01 Hum	EDCNE-LPPR-R-NTEILTGSW-SDQ	TYPE-G	TQAIYKCRPGYR-SL-GN	VIMVCR-KGEWVALNLRKC
SCR01 Mou	EDCKG-PPPR-E-NSEILSGSW-SEQ	LYPE-G	TQATYKCRPGYR-TL-GT	IVKVCK-NGKVASNPSRIC
SCR01 Rat	EDCKG-PPPR-E-NSEILSGSW-SEQ	LYSE-G	TQATYKCRPGYR-TL-GT	IVKVCK-NGEWVPSNPSRIC
SCR02 Pig	RKKPCG-HPGDTG-FGSFHLL-VGT	QFEBY-G	AKVVYTCDEGYO-ML-GEI	NFRECDTNG-WTNNIP-LCE
SCR02 Hum	OKRPGC-HPGDTG-FGTFTLT-GGN	VFEYB-G	VKAVYTCNEGYO-LL-GEI	NYRECDTDG-WTNDIP-LCE
SCR02 Mou	RKKPCG-HPGDTG-FGSFRLA-VGS	QFEBY-G	AKVVYTCDEGYO-LL-GEI	DYRECDADG-WTNDIP-LCE
SCR02 Rat	RKRPGC-HPGDTG-FGSFRLA-VGS	EFEF-G	AKVVYTCDEGYO-LL-GEI	DYRECDADG-WTNDIP-LCE
SCR03 Pig	VVKCL-PVTEPE-NGRIVSGA-LEPD	QEYTY-G	QVVOFECNSAGYS-LD-GP	KQIHCSAGGVWSGDKP-KCV
SCR03 Hum	VVKCL-PVTAPE-NGKIVSSA-MEPD	REYHF-G	QAVRFVCNSGYK-IE-GD	EEMHCSDDGWSKEKP-KCV
SCR03 Mou	VVKCL-PVTELE-NGRIVSGA-AETD	QEYFY-G	QVVRFEONSQFK-IE-GH	KEIHCSENGLWSNEKP-KCV
SCR03 Rat	VVKCL-PVTELE-NGRIVSGA-AEPD	QEYFY-G	QVVRFEONSQFK-IE-GQ	KEMHCSXNGLWSNEKP-KCV
SCR03 Bov	VVKCL-PVTEPE-NGKIFSDA-LEPD	QEYTY-G	QVVOFECNSGYM-LD-GP	KQIHCSAGGVWSAETP-KCV
SCR04 Pig	GISC-TPPNIL-NGYPIIS-KEI	YKA-N	ERVQYKCSAGFE-YSERGE	TICTASG-WAPV-P-SCV
SCR04 Hum	EISC-KSPDVI-NGSPISQ-KII	YKE-N	ERFOYKCNMGYE-YSERGD	AVCTESG-WRPL-P-SCV
SCR04 Mou	EILC-TPPRVE-NGDGINV-KPV	YKE-N	ERYHYKCKHGYV-PKERGD	AVCTGSG-WSSQ-P-FCE
SCR04 Rat	EISC-LPPRVE-NGDGIYL-KPV	YKE-N	ERFOYKCKQGFV-YKERGD	AVCTGSG-WNPO-P-SCV
SCR04 Bov	EIFC-KPPVIL-NGQAVLP-KAT	YKQ-N	ERVQYKCAAGFE-YGORGD	TVCTKSG-WTPA-P-TCI
SCR05 Pig	EITC-DPPRIP-NGFYTPE-SNR	YRT-G	DRITYHCKEGFY-PEIQGN	VARCTGNH-WSPA-P-RCT
SCR05 Hum	EKSC-DNPYIP-NGDYSP-LRIK	HRT-G	DEITYQCRNGFY-PATRGN	TAKTSTG-WIPA-P-RCT
SCR05 Mou	EKRK-SPPYIL-NGIYTPH-RII	HRS-D	DEIRYECNYGFY-PVTGST	VSKCTPTG-WIPV-P-RCT
SCR05 Rat	EMTC-LTPYIP-NGIYTPH-RIK	HRI-D	DEIRYECNNGFY-PATRSP	VSKCTITG-WIPA-P-RCS
SCR05 Bov	EITC-DPPRIP-NGVYRPE-LSK	YR-G	DKITYECKKGEF-PEIRGT	DATCTRDG-WVPV-P-BCA
SCR06 Pig	LKPC-SRPVIK-HGKLYYD-YRGY	FPA-N	RVNQYFYVYCDHNFV-TPSRRS	GDYLTCKRNG-WSAEVP-CL
SCR06 Hum	LKPC-DYPDIK-HGGLYHENMRPY	FPV-A	VGYYSYCDHEFE-TPSGSY	WDHICTQDG-WSPAVP-CL
SCR06 Mou	LKPC-EFPQFK-YGRLYYEESELRPN	FPV-S	IGNKYSYKCDNGFS-PPS	GYSWDYLRCTAQQ-WEPEVP-CV
SCR06 Rat	LKPC-DFPQFK-HGRLYYEESRRPY	FPV-P	IGKEYSYNCDNGFT-TPSQSY	WDYLRCTVNG-WEPEVP-CL
SCR06 Bov	WKPC-SYDVIK-HGRLYYE-YRGY	FPA-N	RVNQYFYVYCDHNFV-TPSQRS	WDHLACTAEG-WSPEEP-CL
SCR07 Pig	RQC-IFDYLE-HGHNSYS-AKK	YLO-G	ETVRVQCYPGYS-LPDNOD	TLICTENG-WSP-P-KCILV
SCR07 Hum	RKC-YFYLE-NGYNQNH-GRK	FVQ-G	KSIDVACHPGYA-LPKAQT	TVMCMENG-WSPT-P-RCLR
SCR07 Mou	RKC-VFHYVE-NGDSAYW-EKV	YVQ-G	QSLKVQCYNGYS-LONGOD	TMTCTENG-WSP-P-KCIRI
SCR07 Rat	RQC-IFHYVE-YGESSYW-QRR	YIE-G	QSAKVQCHSGYS-LPNGOD	TYCTENG-WSP-P-KCVRI
SCR07 Bov	RQC-IFNYLE-NGHNQHR-EKE	YLO-G	ETVRVHCHYEGYS-LONDON	TMTCTESG-WSP-P-RCLR
SCR08 Pig	KICAKSDIEI-E-NGFFSENI-FT	YLP-N	KQTOYKCKPGYV-TADGAT	SGLITCLQSG-WSAR-P-VCI
SCR08 Hum	KICSKSSIDI-E-NGFISESQ-YT	YAL-K	EKAKYQCKLGIV-TADGET	SGSIFCGKDG-WSAQ-P-TCI
SCR08 Mou	KICSASDIHI-D-NGFLSESS-SI	YAL-N	RETSYRCKQGYV-TNTGEI	SGSITCLQNG-WSPQ-P-SCI
SCR08 Rat	KICSVSDIEI-E-NGFFSESD-YT	YAL-N	RKTRRCKQGYV-TNTGEI	SGIITCLQDG-WSPR-P-SCI
SCR08 Bov	KICSKSNIRI-E-NGFLSEST-FT	YPL-N	KQTEYKCKPGYV-TADGKT	SGLITCLKNG-WSAQ-P-VCI
SCR09 Pig	KSC-DAPLE-NARI-KSD-GTW	EKL-N	DTVDYECQGF-E-SRNGDT	AGSIVCGEDG-WSDK-P-ACV
SCR09 Hum	KSC-DIPVFM-NART-KND-FTW	EKL-N	DILDYECCHGYE-SNTGST	TGSIVCGYNG-WSDL-P-ICV
SCR09 Mou	KSC-DMPVFE-NSIT-KNT-RTW	EKL-N	DKLDYECVGF-NEYKHT	KGSITCTYGG-WSDT-P-SCV
SCR09 Rat	KSC-DMPVFE-NSMT-KNN-NTW	EKL-N	DKLDYECCHGYE-NEYKHT	KGSITCTYDG-WSST-P-SCV
SCR09 Bov	KSC-DMPVFE-KARV-KSD-GTW	EKL-N	DRLDYECVCHGYE-NRDGRT	TGSIVCGQDG-WSDK-A-ACV
SCR10 Pig	EREC-ITPGIK-SYLDAP-KHN	KFKV-G	GVLKHFCHRRER-R-VMLGA	DSVQCY-HFGWSPNLP-TCK
SCR10 Hum	EREC-ELPKID-VHLPDDR-KKD	QYKV-G	EVLKFSCKPGFT-I-VGP	NSVQCY-HFGLSPDLP-ICK
SCR10 Mou	EREC-SVPTLD-RKLVVSP-RKE	KYRV-G	DLLEFSCHSGHR-V-GP	DSVQCY-HFGWSPGFP-TCK
SCR10 Rat	EREC-SIPLLH-ODLVVFP-REV	KYKV-G	DSLFSCHSGHR-V-GA	DLVQCY-HFGWSPNFP-TCE
SCR10 Bov	EREC-SIPEMD-PYLNAYP-RKE	TYKV-G	DVLKFSCHSG-R-IMVGA	DSVQCY-HFGWSPKLP-TCK
SCR11 Pig	AGQVKS-CA-PPPOL-NGEVK-ETQK	GEYOH-S	EVVEYVCPNPRFL-MK-GS	HKIQCV-DGEWT-TLP-VCI
SCR11 Hum	EQVQSG-CA-PPPELL-NGNVK-EKTK	EYGH-S	EVVEYVCPNPRFL-MK-GP	NKIQCV-DGEWT-TLP-VCI
SCR11 Mou	GQVVAS-CA-PPLEIL-NGEIN-GAKK	VEYSH-G	EVVKYDCKPRFL-LK-GP	NKIQCV-DGNWT-TLP-VCI
SCR11 Rat	GQVKS-CA-PPLEIP-NGEIK-GTKK	VEYSH-G	DVVEYDCKPRFL-LK-GP	NKIQCV-DGKWT-TLP-ICV
SCR11 Bov	VKKVKS-CA-PPPEL-NGKRK-EIHK	EYAH-N	EVVEYACNPKFL-MK-GS	HKIQCV-DGEST-ALP-VCI
SCR12 Pig	EEE-RICG-DIPDLD-HGVVR-H-SAP	PYHH-G	DSVEFGNCSAFS-LV-GP	RSITCI-SGKWT-QLP-QCV
SCR12 Hum	VEE-SICG-DIPLEH-HGWAQ-L-SSP	PYYG-G	DSVEFNCSSEFT-MI-GH	RSITCI-HGVWT-QLP-QCV
SCR12 Mou	EEE-RICG-DIPLEH-HGSAK-C-SVP	PYHH-G	DSVEFICENFT-MI-GH	GSVSCI-SGKWT-QLP-KCV
SCR12 Rat	EYE-RICG-DIPLEH-HGSVK-L-SVP	PYHH-G	DSVEFTCTETFT-MI-GH	AVFICI-SGRWT-ELP-QCV
SCR12 Bov	EEE-RICEISDLD-HGDVK-P-SVP	PIHH-G	DSVEFSCREAF-MI-GP	RFITCI-SGEWT-QPP-QCI
SCR13 Pig	ATDKLKKCK-ASKIFASEGNLL-D-KTE	FDH-N	TNQSFKCRGKSE-S	KYSVCI-NGVWDPV-V-SCK
SCR13 Hum	AIDKLKKCK-SSNLIILEHLK-N-KKE	FDH-N	SNIRYRCRGK-E-GW	IHTVCI-NGRWDPE-V-NCS
SCR13 Mou	ATDQLEKCR-VLKSTGIEA-IPKK-LTE	FTH-N	STMDYKCRDKQE-Y	ERSICI-NGKWDPE-P-NCT
SCR13 Rat	ATDQLEKCR-APKSTGIDA-IHPN-KNE	FNH-N	FSVSYRCRQKQE-Y	EHISCI-NGRWDPE-P-NCT
SCR14 Pig	EEVLNS-CP-PPPOIP-NAQDM-TTT	VNYKD-G	EKISILCOENYI-TQ-DG	EEIVCK-DGRWQ-SVP-RCV
SCR14 Hum	MAQQLCP-PPPOIP-NSHNM-TTT	LNVRD-G	EKSVLCOENYI-TQ-EG	EEITCK-DGRWQ-SIP-LCV
SCR14 Mou	SK-TSCP-PPPOIP-NTQVI-ETT	VKYL-D	EKLSVLCQDNYI-TQ-DS	EEMVCK-DGRWQ-SLP-RCI
SCR14 Rat	SK-RFCP-PPPOIP-NAQVI-ETT	VKYL-D	EKSVLCOQDGYL-TQ-GP	EEMVCK-HGRWQ-SLP-RCI
SCR15 Pig	EK-IPCS-EPEPID-HGTIOSPGS-AEERREMFEPKYYAH	G	TRLSYTCEDGFE-IS-EK	EIICH-MGKWS-SLP-QCV
SCR15 Hum	EK-IPCS-PPQIE-HGTINSSRS-SQE	SYAH-G	TKLSYTCGGFR-IS-EE	NETTCY-MGKWS-SPP-QCE
SCR15 Mou	EK-IPCS-PPPIIE-HGSINLPRS-SEERRDSIESSSHEH	G	TIFSVCDDGFR-IP-EE	NRITCY-MGKWS-TTP-RCV
SCR15 Rat	EK-IPCS-PPPKIE-HGSIKSPRS-SEERRDLIESSSYEH	G	TIFSVCDDGFR-IP-EE	NRITCY-MGKWS-SLP-RCV
SCR16 Pig	G-RPCA-PPPEIO-NGAV-AQEK-D-SYLY	G	EEVYSCDEGFG-ID-GP	ASIRCL-GEKWS-HPP-ECI
SCR16 Hum	G-LPCA-SPPEIS-HGVV-AHMS-D-SYQY	G	EEVYKCFEGFG-ID-GP	AIACCL-GEKWS-HPP-SCI
SCR16 Mou	G-LPCA-PPPSIP-LGTV-SLEL-E-SYQH	G	EEVYHCHSTGFG-ID-GP	AFIICE-GEKWS-DPP-KCI
SCR16 Rat	G-IPCG-PPPSIP-LGIV-SHEL-E-SYQY	G	EEVYNCSEGFG-ID-GP	AFIKCV-GGOWS-EPP-KCI
SCR17 Pig	NTDCF-DLPTFN-DAVVIGP-KKP	SYKS-G	EQVTFKCLQYFO-LE-GP	NTIRCI-KSRWI-GKP-ACR
SCR17 Hum	KTDCL-LPSFE-NAIPMGE-KKD	VYKA-G	EQVYTCATYTK-MD-GA	SNVICI-NSRWT-GRP-TCR
SCR17 Mou	KTDCD-VLPTVK-NAIRGK-SKK	SYRT-G	EQVTFRCQSPYQ-MN-GS	DTVTCV-NSRWI-GQP-VCK
SCR17 Rat	KTDCD-NLPTFE-IAKPTK-KKK	SYRS-G	EQVTFRCPPPYR-MD-GS	DIVTCV-NTKWI-GQP-VCK
SCR18 Pig	DVSCVN-P-PSVE-NAVILDK-RSR	YQP-G	ERARYECIEPYA-LY-GD	VEVMCF-NGSWT-KPP-QCK
SCR18 Hum	DTSCVN-P-PTVQ-NAYIVSRQ-MSK	YPS-G	ERVRYCQRSPYE-MF-GD	EEVMCL-NGNWT-EPP-QCK
SCR18 Mou	DNSCVD-P-PHPV-NATIVTRT-KNK	YLH-G	DRVRYCNKPLE-LF-GQ	VEVMCE-NGIWT-EKP-KCR
SCR18 Rat	DNSCVN-P-PHPV-NATILTRH-KTK	YPS-G	DKRVYCNKPF-LF-GE	VEVMCO-NGIWT-EPP-KCR
SCR19 Pig	DSGKCG-PPPID-NGDITSFP-L-P	VYPP-G	TVVEYCCQSYE-LE-GS	SSIKCE-NGOWS-EPP-KCI
SCR19 Hum	DSGKCG-PPPID-NGDITSFP-L-S	VYAP-A	SSVEYCCQLYQ-LE-GN	KRITCR-NGOWS-EPP-KCI
SCR19 Mou	DSGKCG-PPPID-NGDITSLS-L-P	VYEP-L	SSVEYCCQKYLL-LK-GK	KTITCT-NGKWS-EPP-TCL
SCR19 Rat	DSGKCG-PPPID-NGDITSLS-L-P	VYAP-L	SSVEYCCQNYLL-LK-GN	KIVTCR-NGKWS-OPP-TCL
SCR20 Pig	DACV-VSEEMMRKHNLKWRPDKK	LYSRTD	DTIEFRRCQGY-RR-TPLHTFRATCQ	OG-KVAYP-TCG
SCR20 Hum	HPCV-ISREIMSNYNIALRWAKQK	LYSRTG	ESVEFVCKRGYRLSSR-SH-TLRTTCW	DG-KLEYF-TCAKR
SCR20 Mou	HACV-IPENIMESHNIILKWRHTEK	IYSHSG	EDIEFGCKYGY-KARDSP	PFRTKCI-NG-TINYP-TCV
SCR20 Rat	HACV-IPEDIMEKHNIILRWRENAK	IYSSSG	ENIEFMCKPYR-KFRGSP	PFRTKCI-EG-HINYP-TCV

Abb. 21: Homologievergleich der Aminosäure-Sequenzen von FH verschiedener Spezies. Vergleich von Schwein (pig), Mensch (hum), Maus (mou), Ratte (rat) und Rind (bov). Erklärung siehe Text.

Der Sequenzvergleich zeigt einige Unterschiede: Ein RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp), welches Zelladhäsion vermitteln kann, ist in allen bisher bekannten Sequenzen in SCR 4 gefunden worden^[98]. In der Sequenz von pigFH findet sich an dieser Stelle hingegen die Abfolge RGE. Dieses Ergebnis wurde mit den Sequenzen abgesichert, die das gesunde (und auch das erkrankte) Schwein der Norwegischen *Yorkshire*-Zucht lieferten. Da alle drei Sequenzen mehrmals in beide Richtungen sequenziert wurden und darüber hinaus aus verschiedenen Ländern und Zuchtrassen stammen, kann eine Fehlsequenzierung weitestgehend ausgeschlossen werden. Für die RGD-Domäne von FHL-1 / reconectin wurde Zelladhäsions-vermittelnde Funktion gezeigt, allerdings nicht für die von FH^[121]. Wie in **Abbildung 21** erkennbar, ist der Glycin-Rest innerhalb der RGD-Abfolge in dieser Position nicht nur in SCR 4, sondern auch in SCR 1 bis 3, 8, 10 bis 12 und 16 bis 19 bei allen bisher bekannten Spezies konserviert. Es kann für diesen Glycin-Rest daher eine strukturegebende Funktion für SCRs vermutet werden. Dem RGD-Motiv von pigFH kommt unter diesen Gesichtspunkten eher keine Zelladhäsions-vermittelnde Bedeutung zu.

In einer Veröffentlichung von Ranganathan et al. aus dem Jahr 2000 wurde eine 3D-Modellierung der SCR 6 und 7 von humanem FH vorgestellt^[207]. Dabei wurden 6 positiv geladene AS für die Heparinbindung des SCR 7 verantwortlich gemacht (R369/K370/R386/K387/K392). Wie in **Abbildung 21** zu sehen, zeigt die Sequenz von pigFH hier geringere Homologie (pigFH: RQKKE, hFH: RKRKK) und deutlich verminderte Ladung. Nur die AS R369 und K392 sind zur vorgeschlagenen Sequenz auch in ihrer Position konserviert. Beim Vergleich aller Spezies ist nur der erste Arginin-Rest der genannten Sequenz in diesem SCR konserviert, die Abfolgen in den anderen Spezies tragen ebenfalls weitaus weniger positive Ladungen (Maus: RKKVQ, Ratte: RQRRQS, Rind: RQEKET). Für die Region SCR 5-7 konnte bei pigFH aber eine Heparin-Bindungsstelle im Rahmen dieser Arbeit experimentell nachgewiesen werden. Die geringen Homologien stehen daher im Widerspruch zu der *in silicio* ermittelten Sequenz.

Darüberhinaus fällt im abgebildeten Sequenzvergleich auf, daß die Regionen, die die SCRs verbinden, oft über alle Spezies hinweg hoch konserviert sind. Es finden sich aber keine AS, die auch über alle Regionen und hinweg konserviert sind. Daraus kann geschlossen werden, daß die konservierten AS in diesen Regionen möglicherweise nicht nur Distanz-gebende, sondern funktionelle Bedeutung haben. Die SCR-verbindenden Regionen sollten in zukünftigen funktionellen Studien eine stärkere Beachtung finden.

4.1.2 Homologien einzelner SCRs von pigFH und hFH

Um die experimentelle Funktionalität eines SCRs mit seinem Konservierungsgrad korrelieren zu können, wurde der Homologiegrad zwischen pigFH und hFH innerhalb einzelner SCRs ermittelt. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in **Abbildung 22** als Balkendiagramm dargestellt.

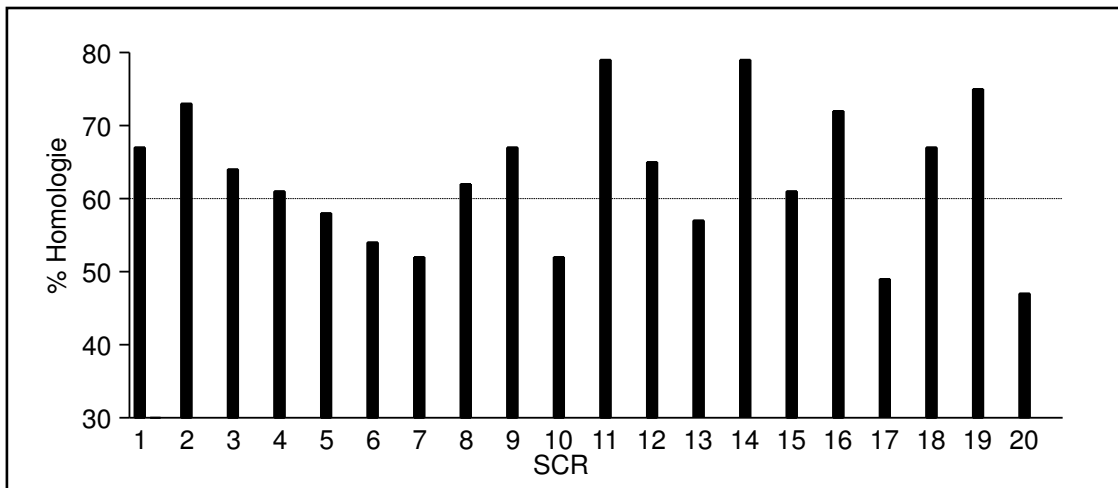


Abb. 22: Homologievergleich zwischen pigFH und hFH. Alle SCRs von pigFH und hFH wurden einzeln verglichen. Der Grad der Homologie ist als Balkendiagramm dargestellt. X-Achse: SCR-Nummer. Y-Achse: Homologie in %. Eine Linie zur einfacheren Orientierung wurde willkürlich bei 60 % eingezeichnet.

Den höchsten Grad an Homologie zeigen SCR 11 und 14 (beide 79 %) und SCR 19 (75 %). Die geringste Homologie findet sich für SCR 20 (47 %) und SCR 17 (49 %). Ähnliche Ergebnisse wurden auch ermittelt, wenn die Sequenzen von Schwein, Mensch, Maus, Ratte und Rind verglichen wurden (nicht abgebildet): Hohe Homologie für SCR 19 (63 %), niedrige Homologie für SCR 20 (33 %) und SCR 17 (34 %).

Bemerkenswert ist der niedrige Konservierungsgrad für SCR 20 von 47 % im Vergleich zwischen Schwein und Mensch, der in dieser Auswertung ermittelt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in der Region pigFH SCR15-20 eine Heparinbindungsstelle liegt. Bei hFH wurde diese auf SCR 20 lokalisiert^[108]. Sollte die Heparinbindungsstelle von pigFH auch in SCR 20 liegen, was mit den in dieser Arbeit exprimierten Fragmenten nicht so weit eingeschränkt werden konnte, so kommt den wenigen zwischen Mensch und Schwein konservierten Aminosäuren in diesem SCR eine besondere funktionelle Bedeutung zu. Dies gilt insbesondere für diejenigen Aminosäuren, die im Sequenzvergleich als homolog, aber nicht strukturbildend, erkennbar sind und positive Ladung tragen. Gleiches kann über SCR 7 gesagt werden: Für hFH wurde in SCR 7 eine Heparinbindungsstelle lokalisiert, für pigFH wurde diese in der Region SCR 5-7 nachgewiesen^[107]. SCR 7 ist wie SCR 20 eines der am

geringsten konservierten SCR. Eine weitere Bindungsstelle von hFH für Heparin ist innerhalb des Bereiches SCR 11-14 lokalisiert worden^[109]. Im Bereich SCR 10-15 liegt auch eine Bindungsstelle für C3b. Da SCR 12 und 13 zu den am geringsten konservierten, SCR 11 und 14 aber zu den am höchsten konservierten SCR gehören, ist es wahrscheinlich, daß in diesen SCR entscheidende Aminosäuren für die Interaktionen liegen. Innerhalb des Bereiches SCR 1-4 wurde sowohl für hFH als auch für pigFH eine C3b-Bindungsstelle und die Kofaktor-Aktivität lokalisiert^[111,67,66]. In diesem Bereich ist SCR 2 das mit Abstand am höchsten konservierte SCR und verdient daher in weiteren Untersuchungen eine besondere Beachtung.

4.2 Die funktionellen Domänen von pigFH im Vergleich mit hFH

4.2.1 Lokalisationen der Heparin-Bindungsdomänen

Die Unterscheidung zwischen Aktivator und Non-Aktivator Oberfläche ist auf die differentielle Bindung von FH an C3b, welches auf Oberflächenstrukturen abgelagert ist, zurückzuführen. Der Gehalt einer Oberfläche an negativ Ladungsträgern wie Heparin, Sialinsäuren oder Glykosaminoglykane ist hierfür entscheidend. Die Bindung an Heparin ist ein gängiges *in vitro* Modell für die Interaktion von FH mit polyanionischen Oberflächen. Drei Bindungsstellen von hFH für Heparin wurden bisher lokalisiert. Diese liegen in den Bereichen SCR 7, SCR 11-14 und SCR 20^[107,108,109,110].

In dieser Arbeit wurden die rekombinant exprimierten pigFH Fragmente auf ihre Fähigkeit hin untersucht, an polyanionische Oberflächen zu binden. Es konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Fragment pigFH SCR1-7 an Heparin bindet. Um die Verteilung der Domänen mit der des menschlichen Proteins zu vergleichen, wurde das rekombinante Fragment pigFH SCR1-4 ebenfalls auf eine Bindung an Heparin untersucht. Hier zeigte sich keine Bindung, was in Übereinstimmung mit dem menschlichen Protein steht, da die N-terminale Heparinbindungsstelle innerhalb von SCR 7 lokalisiert ist^[107]. Der Homologievergleich zwischen pigFH und hFH zeigt für SCR 7 einen Homologie von 58 %, was im Verhältnis zu anderen SCR einen geringen Konservierungsgrad darstellt. Daher kommt den wenigen zwischen Mensch und Schwein konservierten Aminosäuren wahrscheinlich eine besondere funktionelle Bedeutung für die Bindung an Heparin zu, insbesondere den Aminosäuren, die positive Ladung tragen.

Die C-terminale Heparinbindungsstelle ist innerhalb von SCR 20 lokalisiert worden. Für das rekombinante Fragment pigFH SCR 15-20 konnte ebenfalls die Bindung an

Heparin nachgewiesen werden. Auch dies ist in Übereinstimmung mit den korrespondierenden humanen Fragmenten^[108]. Da SCR 20 mit 47 % Homologie zwischen Mensch und Schwein das am geringsten konservierte SCR überhaupt ist, muß den wenigen konservierten Aminosäuren funktionelle Bedeutung für die Interaktion mit Heparin zukommen. Eine mittlere Heparin-Bindungsstelle, die bei hFH innerhalb von SCR 12-14 lokalisiert ist, konnte mit den in dieser Arbeit hergestellten Fragmenten nicht untersucht werden^[109].

4.2.2 Lokalisationen und Affinitäten der hC3b-Bindungsdomänen

Die Interaktion von FH, C3b und Oberflächenstruktur ist entscheidend für die Restriktion des AP im Komplementsystem. Es ist für hFH gezeigt worden, daß jede der drei bisher bekannten Bindungsstellen mit einer eigenen Bindungsstelle am C3b-Molekül interagiert^[111]. Es wurde daher die Interaktion von pigFH Fragmenten mit C3b untersucht. Eine der drei Bindungsstellen von hFH ist im Bereich SCR 1-4 lokalisiert worden^[67,66]. Es konnte gezeigt werden, daß das Fragment pigFH SCR1-4 ebenfalls eine Bindung an humanes C3b aufweist. Eine potentielle Bindungsstelle in SCR10-15 konnte mit den in dieser Arbeit hergestellten Fragmenten nicht untersucht werden. Eine dritte potentielle Bindungsdomäne ist für hFH innerhalb von SCR 19-20 lokalisiert worden. Im Gegensatz zum entsprechenden humanen Fragment zeigt pigFH SCR 15-20 nur eine schwache Affinität für C3b. Da als Bindungspartner humanes C3b eingesetzt wurde, ist anzunehmen, daß eine entsprechende Bindungsstelle mit dem C3b-Analogon des Schweines stärker interagieren würde. Ein Vergleich der Homologie zwischen humanem C3 und C3 des Schweines zeigt einen Konservierungsgrad von 75 % auf der Aminosäure-Ebene^[208,209]. Es ist auch möglich, daß pigFH andere Lokalisationen der Bindungsstellen aufweist, was aber aufgrund der großen Ähnlichkeit von pigFH und hFH auf struktureller und experimenteller Ebene nicht anzunehmen ist.

Die Ergebnisse der durchgeführten Bindungsstudien sind in verschiedener Hinsicht relevant: Die Heparinbindungs-Experimente zeigen, daß hFH und pigFH Heparin-Bindungsstellen in gleicher Lokalisation teilen, soweit dies mit den hergestellten Fragmenten untersucht werden konnte (zwei untersuchte Bindungsstellen von drei möglichen). Ebenso zeigen die C3b-Interaktionsstudien, daß pigFH mindestens zwei ähnlich lokalisierte Bindungsstellen für C3b wie hFH hat (ebenfalls zwei untersuchte Bindungsstellen von drei möglichen). Die gemessenen Unterschiede in der Affinität dieser Bindungsstellen können durch die Spezies-Verschiedenheit des Bindungspartners hC3b erklärt werden. Darüber hinaus kann die Lokalisation der für Bindungen

verantwortlichen Aminosäuren auf diejenigen lokalisiert werden, die zwischen Mensch und Schwein in den entsprechenden SCRs konserviert sind. pigFH und hFH zeigen über den Homologiegrad hinaus auch funktionelle Vergleichbarkeit in der Heparin- und hC3b-Bindung mit ähnlichen Lokalisationen der Bindungsstellen.

4.2.3 pigFH zeigt Spezies-übergreifende regulatorische Aktivität

Da die Homologie-Auswertungen sowie die beschriebenen Bindungsstudien ausgeprägte Analogien zwischen pigFH und hFH zeigten, wurde untersucht, ob eine biologische Aktivität von pigFH auch im humanen Protein-Kontext nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurde ein Kofaktor-Assay durchgeführt, bei dem humanes C3 und humaner FI eingesetzt wurden. Das Fragment pigFH SCR 1-4 wurde für diese Untersuchung eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß pigFH Kofaktor-Aktivität für hFI in der Spaltung von hC3b hat. Um die Aktivität auch quantitativ zwischen pigFH und hFH zu vergleichen, wurde ein Spaltungs-Assay mit Verdünnungsserien von pigFH SCR1-4 und FHL-1 / Reconnectin durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die Titer für beide Proteine nur um einen Verdünnungsschritt differieren und das Fragment pigFH SCR1-4 ca. 60 % der Aktivität von FHL-1 / reconnectin hat. Innerhalb der Meßgenauigkeit, die dieser Assay liefern kann, wird die Kofaktor-Aktivität beider Proteine mit humanem FI in der Spaltung von humanem C3b daher als ähnlich eingeschätzt. Dieses Ergebnis ist in sofern bemerkenswert, als daß Komplementregulatoren häufig nicht zwischen den Spezies austauschbar sind^[104,194,210]. Im Gegensatz dazu konnte schon in den Bindungsstudien eine Interaktion von pigFH mit hC3b nachgewiesen werden, wenn diese auch an einer Bindungsstelle eine geringere Affinität aufwies. pigFH ist nach den vorliegenden Untersuchungen in der Lage, die Spezies-Grenzen zu überschreiten und für humanen FI qualitativ und quantitativ als Kofaktor zu fungieren und damit humanes Komplement zu regulieren. Die Relevanz dieser Ergebnisse für die die Spezies-Grenzen überschreitende Transplantation der Schweineleber auf den Menschen wird in **Kapitel 4.4** diskutiert.

4.3 Die molekulare Pathogenese von pigFH-Defizienz und MPGN II

4.3.1 Missense-Mutationen in SCR 9 und SCR 20

Plasmatische FH-Defizienz in Assoziation mit Membranoproliferativer Glomerulonephritis Typ II (MPGN II) oder Kollagen Typ III Glomerulopathie (Kollagen III GP) ist in 6 Fällen beim Menschen berichtet worden, doch nur in einem

Fall konnte bisher die molekulare Ursache bestimmt werden^{[150,140][211,154]}. Das Auftreten dieser Assoziation in der Norwegischen *Yorkshire* Schweine-Zucht bot die Möglichkeit, die molekulare Ursache dieser seltenen Erkrankung anhand der in dieser Arbeit ebenfalls gefundenen pigFH-Normalsequenz zu studieren.

Zu diesem Zweck wurde RNA aus Leberproben von einem homozygot gesundem und homozygot krankem Ferkel isoliert, revers transkribiert und amplifiziert. Homozygotie wurde anhand der pigFH Plasmaspiegel ermittelt. Material von einem heterozygoten Schwein mit halbnormalem Plasmaspiegel stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung, da die Erkrankung in dieser Zucht bereits eliminiert wurde^[159]. Die Sequenz des gesunden Norwegischen *Yorkshire*-Schweines zeigt einen Austausch [G2939A] im Vergleich zur Normalsequenz des *Deutschen Mastschweines*. Dieser Austausch bleibt auf der Aminosäure-Ebene stumm. Zwei Mutationen finden sich im Vergleich zwischen gesundem und erkranktem *Yorkshire*-Schwein: eine Mutation [C1590G] führt zu einem Austausch [L493V] in SCR 9, eine zweite Mutation [T3610G] führt zu einem Austausch [I1166 R] in SCR 20. Beide Mutationen liegen auf einem Allel, welches bei den erkrankten Schweinen homozygot vorliegt. Um die Relevanz beider Mutationen einzuschätzen, wurden die gefunden Mutationen mit den FH-Normal-Sequenzen von gesundem Schwein, Mensch, Maus, Ratte und Rind verglichen. Dieser Sequenzvergleich ist in **Abbildung 23** wiedergegeben.

SCR 9		[L493V]
Pig mut	KSCDAPV P ENARIKSDGTWFKLNDTVDYEC Q QGFESRNGDTAGSIV C GEDGWSDKPA C Y	
Pig norm	KSCDAP L PENARIKSDGTWFKLNDTVDYEC Q QGFESRNGDTAGSIV C GEDGWSDKPA C Y	
Hum	KSCDIP V FMNARTKNDFTWFKLNDTLDYEC H DGYESNTGSTTGSIV C GYNGWSDLPI C Y	
Mou	KSCDMP V FENSITKNTRTWFKLNDKLDYEC L VGFENEYKHTKGSIT C TYYGWSDTPS C Y	
Rat	KSCDMP V FENSMTKNNNTWFKLNDKLDYEC H IGYENEYKHTKGSIT C TYDGWSTPS C Y	
Bov	KSCDRP V FEKARVKSDGTWFKLNDRLDYEC V DGYENRDGRTTGSIV C QDGWSDKA A Y	
SCR 20		[I1166R]
Pig mut	DACVVSEEMMRKH N ELKWRPDKKLYSRTDDTIEFR R QGY--RR--TPLHTFRAT C QQGVAYPT C G	
Pig norm	DACVVSEEMMRKH N ELKWRPDKKLYSRTDDTIEFR R QGY--RR--TPLHTFRAT C QQGVAYPT C G	
Hum	HPCVISREIMENY N IALRWTAQKLYSRTGESVEFV K RGYRLSSR--SH--TLRTTCWDGKLEYPT C AKR	
Mou	HACVIPENIMESH N ILKWRHTEKIYSHSGEDIEFG K YGY--KARDSP--PFRTKCINGTINYPT C V	
Rat	HACVIPEDIMEKH N ILRWRENAKIYSQSGENIEFM K PGYR-KFRGSP--PFRTKCIEGHINYPT C V	

Abb. 23: Sequenzvergleich der gefundenen pigFH Mutationen mit den FH-Normalsequenzen von gesundem Schwein, Mensch, Maus, Ratte und Rind. Dargestellt sind die Aminosäure-Sequenzen von SCR 9 und SCR 20. Pig mut= erkranktes Schwein, Pig norm= gesundes Schwein, Hum= Mensch, Mou= Maus, Rat= Ratte, Bov= Rind. Konservierte Cysteine sind invers gedruckt. Die Positionen der Mutationen sind mit ↓ gekennzeichnet und fett gedruckt, die konservierten Aminosäuren an den Positionen der Mutationen sind grau unterlegt.

Die Mutation in SCR 9 hat offensichtlich nur untergeordnete Relevanz: (1.) Valin wird, wie im Sequenzvergleich in **Abbildung 23** dargestellt ist, an dieser Stelle bei Mensch, Maus, Ratte und Rind gefunden. Die Mutation führt also zu einer Aminosäure, die in dieser Position ohnehin bei allen anderen bekannten Spezies gefunden wird. (2.) Die Aminosäuren Valin und Leucin sind beide ungeladen, unpolar und aliphatisch, so daß diese ohnehin als austauschbar angesehen werden. Die Mutation in SCR 9 wird daher als Polymorphismus gewertet.

Die zweite Mutation [I1166 R] in SCR 20 hingegen wird für die plasmatische pigFH-Defizienz verantwortlich gemacht: (1.) Isoleucin ist an dieser Position in SCR 20 bei allen bisher bekannten Spezies konserviert, wie es im gezeigten Sequenzvergleich in **Abbildung 23** dargestellt ist. (2.) Isoleucin findet sich an entsprechender Position mit gleichem Konservierungsgrad in SCR 1, 3, 15 und 18, wie es in **Abbildung 21** dargestellt ist. (3.) Unter dem Gesichtspunkt der Austauschbarkeit von Aminosäuren stellt der Austausch von Isoleucin zu Arginin eine Änderung von einer ungeladenen zur einer geladenen Aminosäure dar. (4.) Die Mutation liegt innerhalb von SCR 20, welches entscheidende funktionelle Bedeutung für das FH Molekül hat. (5.) SCR 20 ist in mehreren genetischen Studien als Hotspot für Mutationen beschrieben worden^[174,173]. Die Mutation [I1166 R] in SCR 20 wird daher für die plasmatische pigFH-Defizienz des erkrankten Tieres verantwortlich gemacht. Um die Auswirkungen dieser Mutation auf die Expression des Proteins zu untersuchen, wurden Plasma und Leberextrakte auf die Präsenz von pigFH Protein analysiert.

4.3.2 Plasmatische Defizienz und hepatischer Sekretionsblock

Wie gezeigt wurde, ist pigFH-spezifische mRNA im Lebergewebe des erkrankten Tieres in vergleichbarer Konzentration vorhanden wie in dem des gesunden Tieres. Diese trägt aber zwei Mutationen, von denen die Mutation [I1166 R] in SCR 20 von evidenter Relevanz für die Entwicklung der plasmatischen FH-Defizienz ist. Daher wurde die Auswirkung auf die Expression des pigFH Proteins untersucht. Um das Verteilungsmuster von Proteinen der FH-Familie in gesundem und defizientem Lebergewebe und Plasma zu untersuchen, wurden Leber-Proteinextrakte und Plasmaproben auf vergleichbare Gesamtprotein-Konzentrationen eingestellt und mittels Western Blot analysiert.

Die Detektion mit dem α -pigFH Antiserum zeigt das Fehlen des pigFH Proteins im Plasma des erkrankten Schweines. Stattdessen ist ein Protein mit einer Größe von 28 kDa im Plasma des erkrankten Tieres vorhanden, welches im Plasma des gesunden

Schweines kaum nachzuweisen ist. Innerhalb der humanen FH-Familie hat FHR-2 eine ähnliche Molekülgröße wie das hier detektierte Protein^[124]. Es kann sich daher bei dem 28 kDa Protein um das analoge Mitglied der FH-Familie beim Schwein handeln. In der pathologischen Situation der plasmatischen pigFH-Defizienz könnte die Expression von FH-verwandten Proteinen hoch reguliert werden, um eine Kompensation der Defizienz zu versuchen.

Die Western Blot Analysen mit dem α -pigFH Antiserum zeigen die Präsenz des pigFH Proteins im Lebergewebe sowohl des gesunden als auch des Plasma-pigFH defizienten Schweines. Darüberhinaus ist das pigFH Protein im Lebergewebe des Plasma-pigFH defizienten Schweines nicht nur vorhanden, es liegt hier sogar in hoher Konzentration vor. Das pigFH Protein wird also nicht nur in der Leber des erkrankten Schweines synthetisiert, es findet sich hier sogar in wesentlich höherer Konzentration als beim gesunden Tier. Da die RNA-Quantifizierung eine normale Transkription von pigFH-spezifischer mRNA ergab, und das pigFH Protein in erhöhter Konzentration im Lebergewebe des Plasma-pigFH defizienten Schweines vorliegt, ist diese hohe Konzentration eindeutig auf eine Akkumulation des Proteins im Lebergewebe zurückzuführen. Das Protein wird in der Leber des erkrankten Schweines synthetisiert, kann aber nicht sezerniert werden, und reichert sich daher in der Leber an. Ein Sekretionsblock für das mutierte Protein ist daher die molekulare Ursache der plasmatischen pigFH-Defizienz in der Norwegischen *Yorkshire* Schweinezeit.

Dieses Ergebnis wurde in weiteren Analysen mit dem α -hFH SCR1-4 Antiserum verifiziert. Im Lebergewebe des gesunden und des erkrankten Schweines zeigt sich die Präsenz des pigFH Proteins sowie von zwei weiteren Proteinen mit einer Größe von 59 kDa und von 55 kDa, wobei die Konzentration aller drei Proteine wiederum im Lebergewebe des erkrankten Tieres deutlich höher ist. Die Akkumulation von pigFH Protein konnte daher auch mit diesem Antiserum bestätigt werden. Bei dem 59 kDa Protein handelt es sich möglicherweise um das Analogon zum erst kürzlich beim Menschen beschriebenen Protein FHR-5, welches eine ähnliche Größe aufweist^[127]. Interessanterweise wurde dieses Protein identifiziert, indem Antiseren gegen Nierengewebe mit experimentellen und idiopathischen Glomerulonephritiden hergestellt wurden.

Im Plasma des pigFH-defizienten Schweines werden zwei Proteine mit einer Größe von 40 kDa und 28 kDa mit dem α -hFH SCR1-4 Antiserum nachgewiesen. Das 40 kDa Protein repräsentiert wahrscheinlich das Äquivalent zu FHL-1/reconnectin beim

Schwein, das in humanem Plasma mit diesem Antiserum auf dieser Laufhöhe detektiert wird. Normale FHL-1 / reconectin-Sekretion wurde in dem Fall von humaner FH-Defizienz berichtet, in dem die gefundenen Mutationen nach dem 7. SCR liegen^[154]. Eine ähnliche Situation liegt auch beim Schwein vor, da die gefundenen Mutationen erst in SCR 9 und SCR 20 liegen.

In diesem Blot kann auch gesehen werden, daß die pigFH-Bande beim Leberextrakt des defizienten Schweines eine geringfügige höhere Mobilität als beim gesunden Tier aufweist. Möglicherweise verändert die SCR 20 Mutation die Konformation des Proteins derartig, daß die Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-PAGE verändert ist. Auch könnte das Protein tatsächlich eine kleinere Molekülgröße haben und trunziert sein. Dies könnte zum Beispiel durch die Einführung eines proteolytischen Signals durch die gefundene Mutation in SCR 20 zustande kommen.

Zusammenfassend ergibt sich daher folgendes Bild: pigFH wird auf der Ebene der mRNA auch in der Leber des erkrankten Schweines synthetisiert und das pigFH Protein translatiert. Die gefundene Mutation [I1166 R] in SCR 20 führt aber dazu, daß das Protein nicht sezerniert wird. Das pigFH Protein verbleibt intrazellulär und akkumuliert hier, daher ist die Konzentration von pigFH Protein in der Leber des erkrankten Schweines stark erhöht. Weitere Proteine der FH-Familie des Schweines werden möglicherweise vermehrt exprimiert. Der Sekretionsblock für das pigFH-Protein führt zu plasmatischer pigFH-Defizienz, die wiederum ihrerseits die Entwicklung einer MPGN II nach sich zieht.

4.3.3 pigFH Protein-Akkumulation in den Hepatozyten

Um die Akkumulation des pigFH Proteins in der Leber des erkrankten Schweines auch *in situ* nachzuweisen, und darüberhinaus die Lokalisation des Proteins innerhalb des Lebergewebes zu bestimmen, wurden Lebergewebeproben von gesundem und erkranktem Schwein mit α -pigFH Antiserum und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper gefärbt und mit konfokaler Lasermikroskopie visualisiert.

In gesundem Lebergewebe ist das pigFH Protein nur in mäßiger Konzentrationen im Läppchenparenchym vorhanden. Innerhalb des Parenchyms ist das Protein vor allem in den Sinusoiden lokalisiert und nimmt in seiner Konzentration zur Zentralvene leicht hin zu. Der Grund liegt in der ansteigenden Konzentration des sezernierten pigFH Proteins zur Zentralvene hin. Sehr hohe Konzentrationen von pigFH Protein finden sich hingegen im Bindegewebe der Septen und Periportalfelder. Hier zeigt sich, daß das Protein im Bereich der extrazelluläre Matrix des Bindegewebes lokalisiert ist. Diese

Lokalisation kann aus der Morphologie der Strukturen geschlossen werden, da weder Zellgrenzen noch Nuclei abgegrenzt werden können. Die starke Anfärbung der Septen der normalen Schweineleber ist darauf zurückzuführen, daß das Bindegewebe von Plasma umflossen ist, welches beim gesunden Schwein pigFH Protein enthält. Die vorliegende Arbeit ist die erste immunhistologische Darstellung von FH im Lebergewebe, daher ist kein Vergleich mit Untersuchungen von anderen Organismen möglich. Die beschriebene Verteilung von pigFH Protein in der Leber des gesunden Schweines steht in Übereinstimmung mit der eines von den Hepatozyten sezernierten Proteins: Das Protein ist in mäßigen Konzentrationen im Parenchym und hier vorwiegend in den Sinusoiden vorhanden. Mit zunehmender Nähe zur Zentralvene, von der aus sezernierte Proteine in den Kreislauf gelangen, steigt auch die Konzentration des Proteins leicht an. Das pigFH Protein liegt dann im Plasma vor, welches das Bindegewebe und die interzelluläre Matrix umfließt, zu der das Protein Affinität hat. Daher erscheint pigFH dann wieder im Bindegewebe der Septen und Portalfelder und liegt hier in den höchsten Konzentrationen vor.

Im Lebergewebe des erkrankten Tieres bietet sich ein nahezu inverses Bild. Hier ist das pigFH Protein nicht in den bindegewebigen Strukturen lokalisiert, da die Septen und Portalfelder wie ausgestanzt erscheinen. Hingegen ist das Protein in hoher Konzentration im Bereich des Parenchyms zu detektieren. Innerhalb des Parenchyms sind die hohen Konzentrationen des Proteins in den Hepatozyten lokalisiert. In den Sinusoiden ist, im Gegensatz zum Lebergewebe des gesunden Schweines, kaum Protein vorhanden. Das pigFH Protein ist in den Hepatozyten im intrazelluläre Kompartiment lokalisiert: Das Zytoplasma enthält hohe Konzentrationen von pigFH Protein, während der Nukleus als oval-runde Struktur innerhalb der Zellen ausgespart ist. Diese histologischen Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse der Analysen von RNA- und Protein-Ebene: Das pigFH Protein wird in den Hepatozyten des erkrankten Schweines synthetisiert, die Sekretion ist jedoch blockiert. Das Protein akkumuliert in den Hepatozyten und reichert sich hier an. Während andere Mitglieder der FH Protein-Familie im Plasma zu vorhanden sind, hier sogar in erhöhter Konzentration vorkommen, ist das pigFH-Molekül selbst durch die Mutation blockiert und akkumuliert im Zytoplasma der Hepatozyten. Der Sekretionsblock führt zur plasmatischen Defizienz für das pigFH Protein, mit der Folge der Entwicklung einer MPGN II.

4.4 Die Rolle von FH-Genmutationen für nicht-strukturbildende AS

4.4.1 MPGN II und FH-Genmutationen bei *Sus scrofa* und Mensch

Die Arbeit von Ault et al. stellt bisher die einzige Veröffentlichung dar, in der der molekulare Defekt einer plasmatischen FH-Defizienz in Assoziation mit einer Primären Glomerulopathie beim Menschen aufgeklärt werden konnte^[154]. In dem beschriebenen Fall finden sich zwei Mutationen, die in je einem Allel die konservierten strukturbildenden Cysteine in SCR 9 [C518R] beziehungsweise SCR 16 [C941Y] verändern. Diese Mutationen führen zu einem Block der Sekretion und einer Akkumulation des Proteins innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums, wie an Patientenfibroblasten demonstriert werden konnte^[155]. Das Protein zeigt darüberhinaus eine verlangsamte Degradierung. Die für die korrekte Bildung der Cystin-Brücken und damit der globulären Tertiärstruktur der SCRs entscheidenden strukturbildenden Cysteine werden durch die gefundenen Mutationen ausgetauscht und verursachen einen Sekretionsblock für das Protein.

Die histologische Beschreibung der Nierenpathologie dieses Patienten wurde der Kollagen Typ III Glomerulopathie (Kollagen III GP) zugeordnet. Allerdings hat sich diese Entität in der aktuellen Literatur kaum durchgesetzt. Auch sind die lichtmikroskopischen Kriterien (Mesangiumzell-Proliferation, Matrixzunahme, Verdickung der Basalmembran) und elektronenmikroskopischen Kriterien (mesangiale Deposition) mit der der MPGN II vereinbar, Präsenz oder Abwesenheit von abgelagertem C3 ist nicht als Kriterium in die Beschreibung der Kollagen III GP integriert. Diese Histologie wurde bereits bei ihrer Erstdefinition mit der der MPGN II verglichen, daneben ist das Auftreten von Kollagen Typ III als unspezifisches Reaktionsmuster des Glomerulums auf eine Schädigung beschrieben worden^[148,149]. Da in dem von Ault et al. beschriebenen Fall zusätzlich eine isolierte C3-Ablagerung im Glomerulum nachgewiesen wurde, erscheint eine Zuordnung zur MPGN II nach aktuellen Nomenklaturen zumindest möglich, wenn nicht sogar zutreffend.

MPGN II bei Schweinen der Norwegischen *Yorkshire* Zucht und Kollagen III GP oder MPGN II im beschriebenen Fall in Assoziation mit plasmatischer FH-Defizienz zeigen mehrere Übereinstimmungen in ihrer Pathophysiologie: (1.) Synthese und Präsenz von FH in der Leber, (2.) Blockierung der Sekretion des Proteins, (3.) Intrazelluläre Akkumulation und Anreicherung des Proteins (4.) Plasmatische Defizienz für den Komplementregulator FH, (5.) Entwicklung einer Primären Glomerulopathie (MPGN II / Kollagen III GP). Diese Befundkonstellation konnte in der vorliegenden Untersuchung

für die erkrankten Schweine der Norwegischen *Yorkshire* Zucht auf RNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden, darüberhinaus wurde die intrazelluläre Akkumulation in den Hepatozyten *in situ* gezeigt. Allerdings liegen im Unterschied zu dem humanen Fall die gefundenen Mutationen beim erkrankten Schwein in SCR 9 und SCR 20. Beide Mutationen befinden sich auf einem Allel, welches bei den erkrankten Tieren homozygot vorliegt. Bemerkenswert ist aber vor allem, daß die gefundenen Mutationen keine strukturbildenden Cysteine betreffen, sondern AS, die nach bisheriger Kenntnis an der Ausbildung der globulären Tertiärstruktur der SCRs nicht beteiligt sind.

Die Bedeutung der Cysteine ist auch für ein anderes aus SCRs aufgebautes Plasmaprotein gezeigt worden. Die Untereinheit b des Gerinnungsfaktor XIII ist aus 10 SCRs aufgebaut. Das kodierende Gen ist wie das FH-Gen auf Chromosom 1q31 lokalisiert worden und liegt nahe des RCA^[212]. Für Faktor XIIIb ist in einem Fall das Auftreten von zwei Mutationen auf je einem Allel beschrieben worden. Eine der beiden Mutation [G11499T] veränderte ein konserviertes Cystein [C430F] zu einem Phenylalanin. Bei der Patientin lag eine totale plasmatische Defizienz für Faktor XIIIb vor, ein Sekretionsblock für das pathologische Protein konnte in Transfektionsstudien nachgewiesen werden^[213,214].

Die vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit zeigen erstmals, daß Mutationen von Aminosäuren, die nicht Cysteine betreffen und daher nicht SCR-strukturbildend sind, ebenfalls einen Sekretionsblock für ein aus SCRs aufgebautes Protein bewirken können.

4.4.2 FH-Genmutationen und aHUS

Das Auftreten von Missense-Mutationen für nicht-strukturbildende AS ist bei einer zweiten Erkrankung, die mit FH-Defizienz oder -Dysfunktion assoziiert ist, genauer beschrieben worden: dem atypischen Hämolytisch Urämisches Syndrom (aHUS). In vier großen genetischen Studien wurden insgesamt 19 FH-Genmutationen in Assoziation mit aHUS gefunden^[172,173,174,175]. 13 der gefundenen Mutationen liegen in SCR 20. Aufgrund der Clusterung der Mutationen in SCR 20 wurde von den Autoren hier ein Hotspot vorgeschlagen. Zwei der in diesen Arbeiten beschriebenen Mutationen sind Deletionen und führen zu Frameshift und Einführung eines Stopcodons, womit die molekulare Grundlage hinreichend geklärt ist. Die unabhängig gefundenen Missense-Mutationen in SCR 20 des FH-Gens, für die eine Assoziation mit aHUS in diesen Veröffentlichungen beim Menschen beschrieben wurden, sind in **Abbildung 24** zusammengefasst.

Regulation des AP scheint den entscheidenden Ausschlag zu geben, ob sich ein aHUS oder eine MPGN II entwickelt: Partielle FH-Defizienz oder -Dysfunktion führt zu aHUS, totale FH-Defizienz oder -Dysfunktion zu MPGN II^[165].

Eine totale Dysfunktion kann durch homozygote Mutationen bedingt sein, die funktionell wichtige AS verändern, so daß FH zwar im Plasma nachgewiesen werden kann, dieser aber keine regulatorische Funktionen mehr ausübt. Ebenfalls kann eine totale Dysfunktion auch durch Antikörper bedingt sein, die an plasmatischen FH binden und seine Interaktion mit C3b verhindern, wie dies für das Protein LOI von Meri et al. gezeigt wurde^[160]. Totale plasmatische Defizienz für FH, wie sie bei *Sus scrofa* in der vorliegenden Untersuchung und auch beim Menschen gezeigt wurde, wird durch homozygote Mutationen hervorgerufen. In diesem Tiermodell wird die Bedeutung der nicht-strukturbildenden Aminosäuren für die molekulare Pathogenese der plasmatischen FH-Defizienz und MPGN II gezeigt. Diese Pathophysiologie eines Sekretionsblocks durch Mutationen von nicht-strukturbildenden Aminosäuren kann auch den heterozygoten aHUS-assoziierten Mutationen zugrunde liegen und hier die Ursache einer partiellen plasmatischen FH-Defizienz beim Menschen sein.

4.5 Die Rolle von pigFH in der Xenotransplantation

4.5.1 pigFH und die Hyperakute Abstoßungsreaktion

Effiziente Regulation des Komplementsystems ist eine entscheidende Voraussetzung für die Vermeidung der Hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) und damit ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur erfolgreichen Etablierung einer Schweineleber im Menschen im Rahmen der Xenotransplantation. Die Rolle des AP der Komplementaktivierung im Zusammenhang mit der HAR ist kontrovers diskutiert worden^[187]. Einige Autoren haben die Aktivierung des AP in dieser Transplantations-Konstellation gezeigt, während andere die Relevanz des AP für die Entwicklung der HAR bezweifelt haben. Eine Klärung dieser Fragestellung erscheint schwierig, solange die entscheidenden Regulatoren noch nicht bekannt sind. Da FH neben dem AP auch die Amplifikationsschleife reguliert, unabhängig davon, ob eine Aktivierung über den CP oder den AP initiiert wurde, hat dieser Regulator evidente Relevanz für die komplementvermittelten Pathologien der Xenotransplantation. In dieser Arbeit wurde daher die Klonierung von pigFH von *Sus scrofa* unternommen.

Die klinische Situation der Xenotransplantation einer Schweineleber zum Menschen zeigt in ihren verschiedenen Phasen unterschiedliche Anforderungen an das

Komplementsystem. Während und kurz nach einer Xenotransplantation muß sich die Donorleber vor dem zirkulierenden Komplementsystem des Menschen schützen, da sonst HAR und letztlich Organverlust die Folgen sind. Expression der humanen zellständigen Komplementregulatoren hDAF und hMCP haben sich hier als eine wichtige Maßnahmen zur Beeinflussung der HAR erwiesen^[197]. Allerdings wird inzwischen angenommen, daß nicht die Transgenität für den humanen Regulator, sondern nur alleine die Überexpression für den Erfolg verantwortlich ist^[215].

Sowohl auf der Ebene des Homologiegrades als auch in der experimentellen Lokalisierung funktioneller Domänen zeigen sich in der vorliegenden Arbeit große Ähnlichkeiten zwischen pigFH und hFH. In den vorliegenden Untersuchungen wird gezeigt, daß pigFH die Spezies-Grenzen überschreitet, mit humanem C3b interagiert und Kofaktor-Aktivität für hFI in der Spaltung von hC3b hat. Das Protein pigFH stellt daher ein qualitatives und quantitatives Äquivalent zu hFH dar. Trotzdem besteht auch ein Unterschied in der Affinität einer Bindungsstelle für humanes C3b. Wenn sich in weiteren Untersuchungen die Austauschbarkeit von pigFH und hFH auch unter physiologischen Bedingungen demonstrieren läßt, so muß keine Transgenität für hFH hergestellt werden, wie sie für hDAF und hMCP durchgeführt wurde. Die reine Überexpression von pigFH kann dann ausreichend sein, um das Auftreten der HAR zu beeinflussen.

4.5.2 pigFH und spätere Phasen der Xenotransplantation

Nach der Etablierung einer Schweineleber im menschlichen Organismus über die HAR hinaus werden andere Anforderungen an die Komplementregulatoren gestellt. Humane Regulatoren müssen dann eine Aktivierung des Komplements verhindern, welches durch die xenotransplantierte Schweineleber in den humanen Akzeptororganismus abgegeben wird. Membranständige Regulatoren müssen eine Aktivierung des xenogenen Komplementsystems zum Beispiel auf Gefäßendothelien verhindern. Oberflächen, die keine eigenen membranständigen Regulatoren tragen, wie die glomeruläre Basalmembran der Niere, sind hier auf die Flüssig-Phase Regulatoren angewiesen. Daher hat die Frage der Austauschbarkeit von pigFH und hFH Relevanz für die Langzeit-Etablierung der Schweineleber im menschlichen Organismus.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch die molekularen Grundlagen einer FH-Defizienz im Tiermodell untersucht, die zu der frühen Entwicklung einer MPGN II führten. Nach den bisherigen Fallberichten verläuft die FH-Defizienz beim Menschen zwar nicht derart rapide wie beim Schwein, die totale FH-Defizienz und -Dysfunktion

führt aber auch beim Menschen zur MPGN II, die partielle zum aHUS. Beide Erkrankungen münden letztlich in lebensbedrohlicher Niereninsuffizienz. Wenn pigFH kein funktionelles Äquivalent zu hFH darstellt, wird im Rahmen einer Xenotransplantation eine totale FH-Dysfunktion iatrogen hergestellt. Diese käme einer homozygoten plasmatischen FH-Defizienz gleich und mündet, wie bei Schwein und Mensch gezeigt, in die Entwicklung einer MPGN II. Die Xenotransplantation der Schweineleber um den Preis einer bald folgenden Niereninsuffizienz kann aber kein akzeptables Ergebnis einer therapeutischen Intervention sein. Äquivalenz von pigFH und hFH sind daher von evidenter Bedeutung für die Xenotransplantation der Schweineleber. Die durchgeführten Bindungs- und Funktionsstudien dieser Arbeit zeigen, daß pigFH ein qualitatives und quantitatives Äquivalent zu hFH bezüglich der Bindung an Heparin und damit der Oberflächeninteraktion, sowie der Bindung an C3b und der Kofaktor-Aktivität darstellt. Dennoch sind weitere Untersuchungen *in vivo* nötig, um die Austauschbarkeit der beiden Proteine auch unter physiologischen Bedingungen zu bestätigen. Sollten sich pigFH und hFH nur quantitativ in ihrer Aktivität unterscheiden, wie es für die hDAF-transgenen Schweine bereits vermutet wird, so wäre eine Transgenität der Transplantationsschweine für hFH redundant. Die Überexpression von pigFH kann dann ebenfalls ausreichend sein.

In den verschiedenen Phasen der Xenotransplantation kann überexprimiertes pigFH Protein unterschiedliche Funktionen wahrnehmen: In der akuten Phase kann pigFH die Entwicklung der HAR beeinflussen. Nach der Etablierung des Organs verhindert pigFH dann das Auftreten einer MPGN II oder eines aHUS. Eine Modifikation der Expression von pigFH ist daher ein vielversprechender Schritt auf dem Weg zu einer erfolgreichen Xenotransplantation der Schweineleber auf den Menschen. Diese Überlegung ist Teil einer Patentanmeldung, die die DNA-Sequenz und das Protein pigFH zum Gegenstand hat^[216].

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die Klonierung und Charakterisierung des Komplementregulators Faktor H von *Sus scrofa* (pigFH) berichtet.

- Zur Klonierung von pigFH wurde eine cDNA-Bank einer Schweineleber hergestellt, gescreent, der gesuchte Klon isoliert und die gefundene Sequenz auf funktionelle und strukturbildende Motive hin analysiert.
- Um funktionelle Domänen lokalisieren zu können, wurden drei pigFH Fragmente rekombinant exprimierten und dann Bindungs- und Funktionsstudien durchgeführt.
- Es wurde gezeigt, daß pigFH mit Heparin und C3b über jeweils mindestens zwei Bindungsstellen interagiert. Für diese Domänen wurden die Lokalisationen auf SCR-Bereiche eingeschränkt und mit denen von humanem FH verglichen.
- Es konnte gezeigt werden, daß das pigFH Protein qualitativ und quantitativ als Kofaktor für humanen Faktor I in der Spaltung von humanem C3b fungieren kann. Damit wurde nachgewiesen, daß pigFH in der Lage ist, in seiner Aktivität die Spezies-Grenzen zu überschreiten und auch humanes Komplement zu regulieren.
- Die Relevanz dieser Spezies-übergreifenden Aktivität für die Immunpathologie der Xenotransplantation einer Schweineleber auf den Menschen wurde diskutiert. Es wurde vorgeschlagen, daß eine Überexpression von pigFH in den Transplantations-Schweinen die verschiedenen Phasen einer Xenotransplantation beeinflussen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Pathogenese der plasmatischen FH-Defizienz in Assoziation mit der Membranoproliferativen Glomerulonephritis Typ II (MPGN II) im Tiermodell *Sus scrofa* aufgeklärt.

- Es wurden zwei Missense-Mutationen auf einem Allel identifiziert, welches bei den erkrankten Tieren homozygot vorliegt, und die zum Austausch von nicht-strukturbildende Aminosäuren führen.
- Es konnte gezeigt werden, daß diese Mutationen zu einem Sekretionsblock und einer Akkumulation von pigFH Protein im Lebergewebe der erkrankten Tiere führen und die plasmatische pigFH-Defizienz zur Folge haben. Die Akkumulation des pigFH Proteins konnte in den Hepatozyten *in situ* nachgewiesen werden.
- Die molekulare Pathogenese der pigFH-Defizienz in Assoziation mit MPGN II konnte damit in diesem Tiermodell aufgeklärt werden. Diese molekulare Pathogenese wurde für die veröffentlichten FH-Genmutationen in Assoziation mit dem atypischen Hämolytisch Urämischen Syndrom beim Menschen vorgeschlagen.

Die DNA-Sequenz und das Protein pigFH wurden zum Patent angemeldet.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Ehrlich, P, Morgenroth, J (1899) Zur Theorie der Lysinwirkung. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 36: 6
 - 2 Bordet, J (1900) Les sérums hémolytiques, leurs antitoxines et les théories des sérum cytolytiques. *Annales de l'Institut Pasteur*. 15: 257
 - 3 Ferrata, A (1907) Die Unwirksamkeit der komplexen Hämolyse in salzfreien Lösungen. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 44: 366
 - 4 Pillemer, L, Blum, L, Lepow, IH, Ross, OA, Todd, EW, Wardlaw, AC (1954) The properdin system and immunity. Demonstration of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* . 120: 279
 - 5 Muller-Eberhard, HJ (1969) Complement. *Annu Rev Biochem*. 38: 389- 414
 - 6 Mayer, MM (1972) Mechanism of cytolysis by complement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69: 2954-2958
 - 7 Sato, T, Endo, Y, Matsushita, M, Fujita, T (1994) Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Int Immunol*. 6: 665- 669
 - 8 Roitt, I, Brostoff, J, Male, J (1998) Immunology. *Mosby Int*. 5th Edition
 - 9 Muller-Eberhard, HJ (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem*. 57: 321- 347
 - 10 Esser, AF, Kolb, WP, Podack, ER, Muller-Eberhard, HJ (1979) Molecular reorganization of lipid bilayers by complement: a possible mechanism for membranolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76: 1410- 1414
 - 11 Hugli, TE, Muller-Eberhard, HJ (1978) Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Adv Immunol*. 26: 1- 53
 - 12 Johnson, AR, Hugli, TE, Muller-Eberhard, HJ (1975) Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. *Immunology*. 28: 1067-
 - 13 Fernandez, HN, Henson, PM, Otani, A, Hugli, TE (1978) Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and under stimulated in vivo conditions. *J Immunol*. 120: 109- 115
 - 14 McCoy, R, Haviland, DL, Molmenti, EP, Ziambaras, T, Wetsel, RA, Perlmutter, DH (1995) N-formylpeptide and complement C5a receptors are expressed in liver cells and mediate hepatic acute phase gene regulation. *J Exp Med*. 182: 207- 217
 - 15 Schreiber, RD (1984) The chemistry and biology of complement receptors. *Springer Semin Immunopathol*. 7: 221- 249
 - 16 Schifferli, JA, Ng, YC, Peters, DK (1986) The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med*. 315: 488- 495
 - 17 Dierich, MP, Erdei, A, Huemer, H, Petzer, A, Stauder, R, Schulz, TF, Gergely, J (1987) Involvement of complement in B-cell, T-cell and monocyte/macrophage activation. *Immunol Lett*. 14: 235- 242
 - 18 Dodds, AW, Sim, RB, Porter, RR, Kerr, MA (1978) Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates. *Biochem J*. 175: 383- 390
 - 19 Reid, KB, Day, AJ (1990) Ig-binding domains of C1q. *Immunol Today*. 11: 387- 388
 - 20 Schumaker, VN, Calcott, MA, Spiegelberg, HL, Muller-Eberhard, HJ (1976) Ultracentrifuge studies of the binding of IgG of different subclasses to the C1q subunit of the first component of complement. *Biochemistry*. 15: 5175- 5181
 - 21 Sim, RB (1981) The human complement system serine proteases C1r and C1s and their proenzymes. *Methods Enzymol*. 80 Pt C: 26- 42
 - 22 Ziccardi, RJ, Cooper, NR (1976) Activation of C1r by proteolytic cleavage. *J Immunol*. 116: 504-509
 - 23 Dodds, AW, Ren, XD, Willis, AC, Law, SK (1996) The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature*. 379: 177- 179
 - 24 Oglesby, TJ, Accavitti, MA, Volanakis, JE (1988) Evidence for a C4b binding site on the C2b domain of C2. *J Immunol*. 141: 926- 931
 - 25 Muller-Eberhard, HJ, Polley, MJ, Calcott, MA (1967) Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and the fourth component of human complement. *J Exp Med*. 125: 359- 380
 - 26 Vogt, W, Schmidt, G, Von Buttlar, B, Dieminger, L (1978) A new function of the activated third component of complement: binding to C5, an essential step for C5 activation. *Immunology*. 34: 29- 40
-

-
- 27 Sim, RB, Malhotra, R (1994) Interactions of carbohydrates and lectins with complement. *Biochem Soc Trans.* 22: 106- 111
 - 28 Thiel, S, Petersen, SV, Vorup-Jensen, T, Matsushita, M, Fujita, T, Stover, CM, Schwaebler, WJ, Jensenius, JC (2000) Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MASP19. *J Immunol.* 165: 878- 887
 - 29 Pangburn, MK, Muller-Eberhard, HJ (1984) The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immunopathol.* 7: 163- 192
 - 30 Pangburn, MK, Muller-Eberhard, HJ (1983) Initiation of the alternative complement pathway due to spontaneous hydrolysis of the thioester of C3. *Ann N Y Acad Sci.* 421: 291- 298
 - 31 Fearon, DT, Austen, KF (1975) Initiation of C3 cleavage in the alternative complement pathway. *J Immunol.* 115: 1357- 1361
 - 32 Niemann, MA, Volanakis, JE, Mole, JE (1980) Amino-terminal sequence of human factor B of the alternative complement pathway and its cleavage fragments, Ba and Bb. *Biochemistry.* 19: 1576- 1583
 - 33 Niemann, MA, Bhowan, AS, Bennett, JC, Volanakis, JE (1984) Amino acid sequence of human D of the alternative complement pathway. *Biochemistry.* 23: 2482- 2486
 - 34 Fishelson, Z, Pangburn, MK, Muller-Eberhard, HJ (1984) Characterization of the initial C3 convertase of the alternative pathway of human complement. *J Immunol.* 132: 1430- 1434
 - 35 Law, SK, Levine, RP (1977) Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74: 2701- 2705
 - 36 Fearon, DT, Daha, MR, Weiler, JM, Austen, KF (1976) The natural modulation of the amplification phase of complement activation. *Transplant Rev.* 32: 12- 25
 - 37 Medicus, RG, Gotze, O, Muller-Eberhard, HJ (1976) Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J Exp Med.* 144: 1076- 1093
 - 38 Gotze, O, Muller-Eberhard, HJ (1976) The alternative pathway of complement activation. *Adv Immunol.* 24: 1- 35
 - 39 Lachmann, PJ, Nicol, P (1973) Reaction mechanism of the alternative pathway of complement fixation. *Lancet.* 1: 465- 467
 - 40 Nicol, PA, Lachmann, PJ (1973) The alternate pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF). *Immunology.* 24: 259- 275
 - 41 Daha, MR, Fearon, DT, Austen, KF (1976) C3 requirements for formation of alternative pathway C5 convertase. *J Immunol.* 117: 630- 634
 - 42 Tschopp, J, Podack, ER, Muller-Eberhard, HJ (1982) Ultrastructure of the membrane attack complex of complement: detection of the tetramolecular C9-polymerizing complex C5b-8. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79: 7474- 7478
 - 43 Tschopp, J, Muller-Eberhard, HJ, Podack, ER (1982) Formation of transmembrane tubules by spontaneous polymerization of the hydrophilic complement protein C9. *Nature.* 298: 534- 538
 - 44 Pensky, J, Schwick, HG (1969) Human serum inhibitor of C' 1 esterase: identity with alpha-2-neuraminoglycoprotein. *Science.* 163: 698- 699
 - 45 Scharfstein, J, Ferreira, A, Gigli, I, Nussenzweig, V (1978) Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J Exp Med.* 148: 207- 222
 - 46 Nilsson, UR, Muller-Eberhard, HJ (1965) Isolation of B1H globulin from human serum and its characterization as the fifth component of complement. *J Exp Med.* 122: 277- 298
 - 47 Fontaine, M, Demares, MJ, Koistinen, V, Day, AJ, Davrinche, C, Sim, RB, Ripoche, J (1989) Truncated forms of human complement factor H. *Biochem J.* 258: 927- 930
 - 48 Lachmann, PJ, Muller-Eberhard, HJ (1968) The demonstration in human serum of "conglutinin-activating factor" and its effect on the third component of complement. *J Immunol.* 100: 691- 698
 - 49 Podack, ER, Muller-Eberhard, HJ (1979) Isolation of human S-protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. *J Biol Chem.* 254: 9808- 9814
 - 50 Murphy, BF, Saunders, JR, O' Bryan, MK, Kirszbaum, L, Walker, ID, D' Apice, AJ (1989) SP-40,40 is an inhibitor of C5b-6-initiated haemolysis. *Int Immunol.* 1: 551- 554
 - 51 Hoffmann, EM (1969) Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. II. Studies on the site and mechanism of action. *Immunochemistry.* 6: 405- 419
-

-
- 52 Cole, JL, Housley, GA, Jr., Dykman, TR, MacDermott, RP, Atkinson, JP (1985) Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 859- 863
- 53 Fearon, DT (1979) Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76: 5867- 5871
- 54 Zalman, LS, Wood, LM, Muller-Eberhard, HJ (1986) Isolation of a human erythrocyte membrane protein capable of inhibiting expression of homologous complement transmembrane channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 6975- 6979
- 55 Sugita, Y, Nakano, Y, Tomita, M (1988) Isolation from human erythrocytes of a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. *J Biochem (Tokyo).* 104: 633- 637
- 56 Potempa, J, Korzus, E, Travis, J (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 269: 15957- 15960
- 57 Forbes, CD, Pensky, J, Ratnoff, OD (1970) Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma thromboplastin antecedent by purified serum C1 inactivator. *J Lab Clin Med.* 76: 809- 815
- 58 Fujita, T, Gigli, I, Nussenzweig, V (1978) Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b- inactivator. *J Exp Med.* 148: 1044- 1051
- 59 Gigli, I, Fujita, T, Nussenzweig, V (1979) Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76: 6596- 6600
- 60 Zipfel, PF, Hellwage, J, Friese, MA, Hegasy, G, Jokiranta, ST, Meri, S (1999) Factor H and disease: a complement regulator affects vital body functions. *Mol Immunol.* 36: 241- 248
- 61 Whaley, K, Ruddy, S (1976) Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med.* 144: 1147- 1163
- 62 Weiler, JM, Daha, MR, Austen, KF, Fearon, DT (1976) Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73: 3268- 3272
- 63 Pangburn, MK, Schreiber, RD, Muller-Eberhard, HJ (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med.* 146: 257- 270
- 64 Conrad, DH, Carlo, JR, Ruddy, S (1978) Interaction of beta1H globulin with cell-bound C3b: quantitative analysis of binding and influence of alternative pathway components on binding. *J Exp Med.* 147: 1792- 1805
- 65 Friese, MA, Hellwage, J, Jokiranta, TS, Meri, S, Peter, HH, Eibel, H, Zipfel, PF (1999) FHL-1/reconnectin and factor H: two human complement regulators which are encoded by the same gene are differently expressed and regulated. *Mol Immunol.* 36: 809- 818
- 66 Kuhn, S, Skerka, C, Zipfel, PF (1995) Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol.* 155: 5663- 5670
- 67 Kuhn, S, Zipfel, PF (1996) Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H. *Eur J Immunol.* 26: 2383- 2387
- 68 Harrison, RA, Lachmann, PJ (1980) The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol Immunol.* 17: 9- 20
- 69 Sim, RB, Day, AJ, Moffatt, BE, Fontaine, M (1993) Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Methods Enzymol.* 223: 13- 35
- 70 Podack, ER, Preissner, KT, Muller-Eberhard, HJ (1984) Inhibition of C9 polymerization within the SC5b-9 complex of complement by S-protein. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Suppl.* 284: 89- 96
- 71 Barnes, DW, Silnutzer, J (1983) Isolation of human serum spreading factor. *J Biol Chem.* 258: 12548- 12552
- 72 Blaschuk, O, Burdzy, K, Fritz, IB (1983) Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem.* 258: 7714- 7720
- 73 Morgan, BP, Meri, S (1994) Membrane proteins that protect against complement lysis. *Springer Semin Immunopathol.* 15: 369- 396
- 74 Seya, T, Atkinson, JP (1989) Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J.* 264: 581- 588
- 75 Medof, ME, Prince, GM, Mold, C (1982) Release of soluble immune complexes from immune adherence receptors on human erythrocytes is mediated by C3b inactivator
-

- independently of Beta 1H and is accompanied by generation of C3c. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79: 5047- 5051
- 76 Meri, S, Morgan, BP, Davies, A, Daniels, RH, Olavesen, MG, Waldmann, H, Lachmann, PJ (1990) Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*. 71: 1- 9
- 77 Ripoche, J, Day, AJ, Harris, TJ, Sim, RB (1988) The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem J*. 249: 593- 602
- 78 Whaley, K (1980) Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med*. 151: 501- 516
- 79 Katz, Y, Strunk, RC (1988) Synthesis and regulation of complement protein factor H in human skin fibroblasts. *J Immunol*. 141: 559- 563
- 80 Ripoche, J, Mitchell, JA, Erdei, A, Madin, C, Moffatt, B, Mokoena, T, Gordon, S, Sim, RB (1988) Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *J Exp Med*. 168: 1917- 1922
- 81 Gasque, P, Julen, N, Ischenko, AM, Picot, C, Mauger, C, Chauzy, C, Ripoche, J, Fontaine, M (1992) Expression of complement components of the alternative pathway by glioma cell lines. *J Immunol*. 149: 1381- 1387
- 82 Junnikkala, S, Jokiranta, TS, Friese, MA, Jarva, H, Zipfel, PF, Meri, S (2000) Exceptional resistance of human H2 glioblastoma cells to complement-mediated killing by expression and utilization of factor H and factor H-like protein 1. *J Immunol*. 164: 6075- 6081
- 83 Hing, S, Day, AJ, Linton, SJ, Ripoche, J, Sim, RB, Reid, KB, Solomon, E (1988) Assignment of complement components C4 binding protein (C4BP) and factor H (FH) to human chromosome 1q, using cDNA probes. *Ann Hum Genet*. 52 (Pt 2): 117- 122
- 84 Rey-Campos, J, Rubinstein, P, Rodriguez, DC (1987) Decay-accelerating factor. Genetic polymorphism and linkage to the RCA (regulator of complement activation) gene cluster in humans. *J Exp Med*. 166: 246- 252
- 85 Rey-Campos, J, Rubinstein, P, Rodriguez, DC (1988) A physical map of the human regulator of complement activation gene cluster linking the complement genes CR1, CR2, DAF, and C4BP. *J Exp Med*. 167: 664- 669
- 86 Rodriguez, DC, Lublin, DM, Rubinstein, P, Atkinson, JP (1985) Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *J Exp Med*. 161: 1189- 1195
- 87 Norman, DG, Barlow, PN, Baron, M, Day, AJ, Sim, RB, Campbell, ID (1991) Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J Mol Biol*. 219: 717- 725
- 88 Perkins, SJ, Nealis, AS (1989) The quaternary structure in solution of human complement subcomponent C1r2C1s2. *Biochem J*. 263: 463- 469
- 89 Bentley, DR, Campbell, RD (1986) C2 and factor B: structure and genetics. *Biochem Soc Symp*. 51: 7- 18
- 90 Bentley, DR (1986) Primary structure of human complement component C2. Homology to two unrelated protein families. *Biochem J*. 239: 339- 345
- 91 Day, AJ, Barlow, PN, Steinkasserer, A, Campbell, ID, Sim, RB (1993) Progress in determining module structures in C1r and C1s. *Behring Inst Mitt*. 31- 40
- 92 Cooper, ST, Attie, AD (1992) Pig apolipoprotein R: a new member of the short consensus repeat family of proteins. *Biochemistry*. 31: 12328- 12336
- 93 Ichinose, A, Davie, EW (1988) Primary structure of human coagulation factor XIII. *Adv Exp Med Biol*. 231: 15- 27
- 94 Shimuzu, A, Kondo, S, Takeda, S, Yodoi, J, Ishida, N, Sabe, H, Osawa, H, Diamantstein, T, Nikaido, T, Honjo, T (1985) Nucleotide sequence of mouse IL-2 receptor cDNA and its comparison with the human IL-2 receptor sequence. *Nucleic Acids Res*. 13: 1505- 1516
- 95 Aslam, M, Perkins, SJ (2001) Folded-back solution structure of monomeric factor H of human complement by synchrotron X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained molecular modelling. *J Mol Biol*. 309: 1117- 1138
- 96 Barlow, PN, Steinkasserer, A, Norman, DG, Kieffer, B, Wiles, AP, Sim, RB, Campbell, ID (1993) Solution structure of a pair of complement modules by nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol*. 232: 268- 284
- 97 Zipfel, PF, Jokiranta, TS, Hellwage, J, Koistinen, V, Meri, S (1999) The factor H protein family. *Immunopharmacology*. 42: 53- 60
- 98 Zipfel, PF, Skerka, C (1999) FHL-1/reconnectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today*. 20: 135- 140

-
- 99 Meri, S, Pangburn, MK (1990) Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 3982- 3986
- 100 Kazatchkine, MD, Fearon, DT, Silbert, JE, Austen, KF (1979) Surface-associated heparin inhibits zymosan-induced activation of the human alternative complement pathway by augmenting the regulatory action of the control proteins on particle-bound C3b. *J Exp Med*. 150: 1202- 1215
- 101 Kazatchkine, MD, Fearon, DT, Austen, KF (1979) Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. *J Immunol*. 122: 75- 81
- 102 Meri, S, Pangburn, MK (1994) Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site on factor H. *Biochem Biophys Res Commun*. 198: 52- 59
- 103 Fearon, DT (1978) Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75: 1971- 1975
- 104 Horstmann, RD, Pangburn, MK, Muller-Eberhard, HJ (1985) Species specificity of recognition by the alternative pathway of complement. *J Immunol*. 134: 1101- 1104
- 105 Shi, WX, Chammas, R, Varki, NM, Powell, L, Varki, A (1996) Sialic acid 9-O-acetylation on murine erythroleukemia cells affects complement activation, binding to I-type lectins, and tissue homing. *J Biol Chem*. 271: 31526- 31532
- 106 Carreno, MP, Labarre, D, Maillet, F, Jozefowicz, M, Kazatchkine, MD (1989) Regulation of the human alternative complement pathway: formation of a ternary complex between factor H, surface-bound C3b and chemical groups on nonactivating surfaces. *Eur J Immunol*. 19: 2145- 2150
- 107 Blackmore, TK, Sadlon, TA, Ward, HM, Lublin, DM, Gordon, DL (1996) Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J Immunol*. 157: 5422- 5427
- 108 Blackmore, TK, Hellwage, J, Sadlon, TA, Higgs, N, Zipfel, PF, Ward, HM, Gordon, DL (1998) Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J Immunol*. 160: 3342- 3348
- 109 Pangburn, MK, Atkinson, MA, Meri, S (1991) Localization of the heparin-binding site on complement factor H. *J Biol Chem*. 266: 16847- 16853
- 110 Prodinger, WM, Hellwage, J, Spruth, M, Dierich, MP, Zipfel, PF (1998) The C-terminus of factor H: monoclonal antibodies inhibit heparin binding and identify epitopes common to factor H and factor H-related proteins. *Biochem J*. 331 (Pt 1): 41- 47
- 111 Jokiranta, TS, Hellwage, J, Koistinen, V, Zipfel, PF, Meri, S (2000) Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J Biol Chem*. 275: 27657- 27662
- 112 Jokiranta, TS, Westin, J, Nilsson, UR, Nilsson, B, Hellwage, J, Lofas, S, Gordon, DL, Ekdahl, KN, Meri, S (2001) Complement C3b interactions studied with surface plasmon resonance technique. *Int Immunopharmacol*. 1: 495- 506
- 113 Sharma, AK, Pangburn, MK (1996) Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 10996- 11001
- 114 Gordon, DL, Kaufman, RM, Blackmore, TK, Kwong, J, Lublin, DM (1995) Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J Immunol*. 155: 348- 356
- 115 Lambris, JD, Ross, GD (1982) Characterization of the lymphocyte membrane receptor for factor H (beta 1H-globulin) with an antibody to anti-factor H idiotype. *J Exp Med*. 155: 1400- 1411
- 116 Hartung, HP, Hadding, U, Bitter-Suermann, D, Gerns, D (1984) Release of prostaglandin E and thromboxane from macrophages by stimulation with factor H. *Clin Exp Immunol*. 56: 453- 458
- 117 Schopf, RE, Hammann, KP, Scheiner, O, Lemmel, EM, Dierich, MP (1982) Activation of human monocytes by both human beta 1H and C3b. *Immunology*. 46: 307- 312
- 118 Tsokos, GC, Inghirami, G, Tsoukas, CD, Balow, JE, Lambris, JD (1985) Regulation of immunoglobulin secretion by factor H of human complement. *Immunology*. 55: 419- 426
-

-
- 119 DiScipio, RG, Daffern, PJ, Schraufstatter, IU, Sriramaraio, P (1998) Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J Immunol.* 160: 4057- 4066
- 120 Zipfel, PF, Skerka, C (1994) Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol Today.* 15: 121- 126
- 121 Hellwage, J, Kuhn, S, Zipfel, PF (1997) The human complement regulatory factor-H-like protein 1, which represents a truncated form of factor H, displays cell-attachment activity. *Biochem J.* 326 (Pt 2): 321- 327
- 122 Estaller, C, Schwaeble, W, Dierich, M, Weiss, EH (1991) Human complement factor H: two factor H proteins are derived from alternatively spliced transcripts. *Eur J Immunol.* 21: 799- 802
- 123 Skerka, C, Horstmann, RD, Zipfel, PF (1991) Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J Biol Chem.* 266: 12015- 12020
- 124 Skerka, C, Timmann, C, Horstmann, RD, Zipfel, PF (1992) Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H. Evidence for a family of factor H-related genes. *J Immunol.* 148: 3313- 3318
- 125 Skerka, C, Kuhn, S, Gunther, K, Lingelbach, K, Zipfel, PF (1993) A novel short consensus repeat-containing molecule is related to human complement factor H. *J Biol Chem.* 268: 2904- 2908
- 126 Skerka, C, Hellwage, J, Weber, W, Tilkorn, A, Buck, F, Marti, T, Kampen, E, Beisiegel, U, Zipfel, PF (1997) The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins. *J Biol Chem.* 272: 5627- 5634
- 127 McRae, JL, Cowan, PJ, Power, DA, Mitchelhill, KI, Kemp, BE, Morgan, BP, Murphy, BF (2001) Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *J Biol Chem.* 276: 6747- 6754
- 128 Park, CT, Wright, SD (1996) Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J Biol Chem.* 271: 18054- 18060
- 129 Frank, MM (1982) The C1 esterase inhibitor and hereditary angioedema. *J Clin Immunol.* 2: 65- 68
- 130 Siddique, Z, McPhaden, AR, Fothergill, JE, Whaley, K (1993) A point mutation in the C1-inhibitor gene causes type I hereditary angioedema. *Hum Hered.* 43: 155- 158
- 131 Siddique, Z, McPhaden, AR, Whaley, K (1992) Type II hereditary angio-oedema associated with two mutations in one allele of the C1-inhibitor gene around the reactive-site coding region. *Hum Hered.* 42: 298- 301
- 132 Siddique, Z, McPhaden, AR, Whaley, K (1995) Characterisation of nucleotide sequence variants and disease-specific mutations involving the 3' end of the C1-inhibitor gene in hereditary angio-oedema. *Hum Hered.* 45: 98- 102
- 133 Herold, G (1997) Innere Medizin. *Herold Verlag.* Auflage 1997
- 134 Sheffer, AL, Fearon, DT, Austen, KF (1987) Hereditary angioedema: a decade of management with stanazolol. *J Allergy Clin Immunol.* 80: 855- 860
- 135 Baenkler, HW (1999) Innere Medizin. Duale Reihe:
- 136 Kinoshita, T, Inoue, N, Takeda, J (1996) Role of phosphatidylinositol-linked proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria pathogenesis. *Annu Rev Med.* 47: 1- 10
- 137 Miyata, T, Yamada, N, Iida, Y, Nishimura, J, Takeda, J, Kitani, T, Kinoshita, T (1994) Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 330: 249- 255
- 138 Udenfriend, S, Kodukula, K (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem.* 64: 563- 591
- 139 Fijen, CA, Kuijper, EJ, te Bulte, MT, Daha, MR, Dankert, J (1999) Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in The Netherlands. *Clin Infect Dis.* 28: 98- 105
- 140 Lopez-Larrea, C, Dieguez, M, Enguix, A, Dominguez, O, Marin, B, Gomez, F (1987) A familial deficiency of complement factor H. *Biochem Soc Trans.* 15: 648- 649
- 141 Zipfel, PF, Skerka, C, Caprioli, J, Manuelian, T, Neumann, HH, Noris, M, Remuzzi, G (2001) Complement factor H and hemolytic uremic syndrome. *Int Immunopharmacol.* 1: 461- 468
- 142 Riede, UN, Schaefer, HE (1995) Allgemeine und spezielle Pathologie. *Thieme Verlag.* 4. Auflage
- 143 Seymour, AE (1985) Glomerulonephritis: approaches to classification. *Pathology.* 17: 225- 238
- 144 Thomas, C (1996) Spezielle Pathologie. *Schattauer Verlag.* 1. Auflage
-

-
- 145 Schiller, B, He, C, Salant, DJ, Lim, A, Alexander, JJ, Quigg, RJ (1998) Inhibition of complement regulation is key to the pathogenesis of active Heymann nephritis. *J Exp Med.* 188: 1353- 1358
- 146 Thomas, C (1996) Histopathologie. *Schattauer Verlag.* 12. Auflage
- 147 Gubler, MC, Dommergues, JP, Foulard, M, Bensman, A, Leroy, JP, Broyer, M, Habib, R (1993) Collagen type III glomerulopathy: a new type of hereditary nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 7: 354- 360
- 148 Imbasciati, E, Gherardi, G, Morozumi, K, Gudat, F, Epper, R, Basler, V, Mihatsch, MJ (1991) Collagen type III glomerulopathy: a new idiopathic glomerular disease. *Am J Nephrol.* 11: 422- 429
- 149 Yoshioka, K, Takemura, T, Tohda, M, Akano, N, Miyamoto, H, Ooshima, A, Maki, S (1989) Glomerular localization of type III collagen in human kidney disease. *Kidney Int.* 35: 1203- 1211
- 150 Levy, M, Halbwachs-Mecarelli, L, Gubler, MC, Kohout, G, Bensenouci, A, Niaudet, P, Hauptmann, G, Lesavre, P (1986) H deficiency in two brothers with atypical dense intramembranous deposit disease. *Kidney Int.* 30: 949- 956
- 151 Brai, M, Misiano, G, Maringhini, S, Cutaja, I, Hauptmann, G (1988) Combined homozygous factor H and heterozygous C2 deficiency in an Italian family. *J Clin Immunol.* 8: 50- 56
- 152 Sanchez-Corral, P, Bellavia, D, Amico, L, Brai, M, Rodriguez, DC (2000) Molecular basis for factor H and FHL-1 deficiency in an Italian family. *Immunogenetics.* 51: 366- 369
- 153 Vogt, BA, Wyatt, RJ, Burke, BA, Simonton, SC, Kashtan, CE (1995) Inherited factor H deficiency and collagen type III glomerulopathy. *Pediatr Nephrol.* 9: 11- 15
- 154 Ault, BH, Schmidt, BZ, Fowler, NL, Kashtan, CE, Ahmed, AE, Vogt, BA, Colten, HR (1997) Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism. *J Biol Chem.* 272: 25168- 25175
- 155 Schmidt, BZ, Fowler, NL, Hidvegi, T, Perlmuter, DH, Colten, HR (1999) Disruption of disulfide bonds is responsible for impaired secretion in human complement factor H deficiency. *J Biol Chem.* 274: 11782- 11788
- 156 Jansen, JH, Hogasen, K, Mollnes, TE (1993) Extensive complement activation in hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II (porcine dense deposit disease). *Am J Pathol.* 143: 1356- 1365
- 157 Jansen, JH (1993) Porcine membranoproliferative glomerulonephritis with intramembranous dense deposits (porcine dense deposit disease). *APMIS.* 101: 281- 289
- 158 Hogasen, K, Jansen, JH, Mollnes, TE, Hovdenes, J, Harboe, M (1995) Hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II is caused by factor H deficiency. *J Clin Invest.* 95: 1054- 1061
- 159 Hogasen, K, Jansen, JH, Harboe, M (1997) Eradication of porcine factor H deficiency in Norway. *Vet Rec.* 140: 392- 395
- 160 Meri, S, Koistinen, V, Miettinen, A, Tornroth, T, Seppala, IJ (1992) Activation of the alternative pathway of complement by monoclonal lambda light chains in membranoproliferative glomerulonephritis. *J Exp Med.* 175: 939- 950
- 161 Jokiranta, TS, Solomon, A, Pangburn, MK, Zipfel, PF, Meri, S (1999) Nephritogenic lambda light chain dimer: a unique human miniautoantibody against complement factor H. *J Immunol.* 163: 4590- 4596
- 162 West, CD (1994) Nephritic factors predispose to chronic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 24: 956- 963
- 163 Daha, MR, Fearon, DT, Austen, KF (1976) C3 nephritic factor (C3NeF): stabilization of fluid phase and cell-bound alternative pathway convertase. *J Immunol.* 116: 1- 7
- 164 Kaplan, BS, Thomson, PD, MacNab, GM (1973) Letter: Serum-complement levels in haemolytic-uraemic syndrome. *Lancet.* 2: 1505- 1506
- 165 Zipfel, PF (2001) Hemolytic uremic syndrome: how do factor H mutants mediate endothelial damage? *Trends Immunol.* 22: 345- 348
- 166 Remuzzi, G, Ruggenenti, P (1998) The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl.* 66: S54- S57
- 167 Thompson, RA, Winterborn, MH (1981) Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol.* 46: 110- 119
- 168 Roodhooft, AM, McLean, RH, Elst, E, Van Acker, KJ (1990) Recurrent haemolytic uraemic syndrome and acquired hypomorphic variant of the third component of complement. *Pediatr Nephrol.* 4: 597- 599
-

-
- 169 Pichette, V, Querin, S, Schurch, W, Brun, G, Lehner-Netsch, G, Delage, JM (1994) Familial hemolytic-uremic syndrome and homozygous factor H deficiency. *Am J Kidney Dis.* 24: 936- 941
- 170 Rougier, N, Kazatchkine, MD, Rougier, JP, Fremeaux-Bacchi, V, Blouin, J, Deschenes, G, Soto, B, Baudouin, V, Pautard, B, Proesmans, W, Weiss, E, Weiss, L (1998) Human complement factor H deficiency associated with hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 9: 2318- 2326
- 171 Warwicker, P, Goodship, TH, Donne, RL, Pirson, Y, Nicholls, A, Ward, RM, Turnpenny, P, Goodship, JA (1998) Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 53: 836- 844
- 172 Warwicker, P, Donne, RL, Goodship, JA, Goodship, TH, Howie, AJ, Kumararatne, DS, Thompson, RA, Taylor, CM (1999) Familial relapsing haemolytic uraemic syndrome and complement factor H deficiency. *Nephrol Dial Transplant.* 14: 1229- 1233
- 173 Richards, A, Buddles, MR, Donne, RL, Kaplan, BS, Kirk, E, Venning, MC, Tielemans, CL, Goodship, JA, Goodship, TH (2001) Factor H Mutations in Hemolytic Uremic Syndrome Cluster in Exons 18-20, a Domain Important for Host Cell Recognition. *Am J Hum Genet.* 68: 485- 490
- 174 Perez-Caballero, D, Gonzalez-Rubio, C, Gallardo, ME, Vera, M, Lopez-Trascasa, M, Rodriguez, DC, Sanchez-Corral, P (2001) Clustering of Missense Mutations in the C-Terminal Region of Factor H in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am J Hum Genet.* 68: 478- 484
- 175 Caprioli, J, Bettinaglio, P, Zipfel, PF, Amadei, B, Daina, E, Gamba, S, Skerka, C, Marziliano, N, Remuzzi, G, Noris, M (2001) The Molecular Basis of Familial Hemolytic Uremic Syndrome: Mutation Analysis of Factor H Gene Reveals a Hot Spot in Short Consensus Repeat 20. *J Am Soc Nephrol.* 12: 297- 307
- 176 Cooper, DKC (1996) Xenotransplantation - State of the art. *Front Biosci.* 1: d248- d265
- 177 Lambrigts, D, Sachs, DH, Cooper, DK (1998) Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation.* 66: 547- 561
- 178 Geller, RL, Turman, MA, Dalmaso, AP, Platt, JL (1992) The natural immune barrier to xenotransplantation. *J Am Soc Nephrol.* 3: 1189- 1200
- 179 Platt, JL (1992) Mechanisms of tissue injury in hyperacute xenograft rejection. *ASAIO J.* 38: 8- 16
- 180 Platt, JL, Lin, SS, McGregor, CG (1998) Acute vascular rejection. *Xenotransplantation.* 5: 169- 175
- 181 Brouard, S, Gagne, K, Blanco, G, Souillou, JP (1999) T cell response in xenorecognition and xenografts: a review. *Hum Immunol.* 60: 455- 468
- 182 Platt, JL, Fischel, RJ, Matas, AJ, Reif, SA, Bolman, RM, Bach, FH (1991) Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation.* 52: 214- 220
- 183 Cooper, DK, Good, AH, Koren, E, Oriol, R, Malcolm, AJ, Ippolito, RM, Neethling, FA, Ye, Y, Romano, E, Zuhdi, N (1993) Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man. *Transpl Immunol.* 1: 198- 205
- 184 Zhao, Z, Termignon, JL, Cardoso, J, Chereau, C, Gautreau, C, Calmus, Y, Houssin, D, Weill, B (1994) Hyperacute xenograft rejection in the swine-to-human donor-recipient combination. In vitro analysis of complement activation. *Transplantation.* 57: 245- 249
- 185 Schaapherder, AF, Gooszen, HG, te Bulte, MT, Daha, MR (1995) Human complement activation via the alternative pathway on porcine endothelium initiated by IgA antibodies. *Transplantation.* 60: 287- 291
- 186 Suckfull, M, Mudsam, M, Pieske, O, Enders, G, Babic, R, Hammer, C (1994) Immunohistological studies of complement activation after xenogeneic perfusion of a working heart model. *Transpl Int.* 7: 324- 328
- 187 Platt, JL, Saadi, S (1999) The role of complement in transplantation. *Mol Immunol.* 36: 965- 971
- 188 Costa, C, Zhao, L, Burton, WV, Bondioli, KR, Williams, BL, Hoagland, TA, Ditullio, PA, Ebert, KM, Fodor, WL (1999) Expression of the human alpha1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis. *FASEB J.* 13: 1762- 1773
- 189 Asghar, SS, Pasch, MC (2000) Therapeutic inhibition of the complement system. Y2K update. *Front Biosci.* 5: E63- E81
- 190 Asghar, SS (1996) Pharmacological manipulation of the complement system in human diseases. *Front Biosci.* 1: e15- e25
-

- 191 Hinchliffe, SJ, Rushmere, NK, Hanna, SM, Morgan, BP (1998) Molecular cloning and functional characterization of the pig analogue of CD59: relevance to xenotransplantation. *J Immunol.* 160: 3924- 3932
- 192 Perez de la Lastra JM, Harris, CL, Hinchliffe, SJ, Holt, DS, Rushmere, NK, Morgan, BP (2000) Pigs express multiple forms of decay-accelerating factor (CD55), all of which contain only three short consensus repeats. *J Immunol.* 165: 2563- 2573
- 193 van den Berg, CW, Perez de la Lastra JM, Llanes, D, Morgan, BP (1997) Purification and characterization of the pig analogue of human membrane cofactor protein (CD46/MCP). *J Immunol.* 158: 1703- 1709
- 194 Ish, C, Ong, GL, Desai, N, Mattes, MJ (1993) The specificity of alternative complement pathway-mediated lysis of erythrocytes: a survey of complement and target cells from 25 species. *Scand J Immunol.* 38: 113- 122
- 195 Schmoekel, M, Bhatti, FN, Zaidi, A, Cozzi, E, Pino-Chavez, G, Dunning, JJ, Wallwork, J, White, DJ (1997) Xenotransplantation of pig organs transgenic for human DAF: an update. *Transplant Proc.* 29: 3157- 3158
- 196 Storck, M, Abendroth, D, Prestel, R, Pino-Chavez, G, Muller-Hoker, J, White, DJ, Hammer, C (1997) Morphology of hDAF (CD55) transgenic pig kidneys following ex-vivo hemoperfusion with human blood. *Transplantation.* 63: 304- 310
- 197 Ramirez, P, Chavez, R, Majado, M, Munitiz, V, Munoz, A, Hernandez, Q, Palenciano, CG, Pino-Chavez, G, Loba, M, Minguela, A, Yelamos, J, Gago, MR, Vizcaino, AS, Asensi, H, Cayuela, MG, Segura, B, Marin, F, Rubio, A, Fuente, T, Robles, R, Bueno, FS, Sansano, T, Acosta, F, Rodriguez, JM, Navarro, F, Cabezuolo, J, Cozzi, E, White, DJ, Calne, RY, Parrilla, P (2000) Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days. *Transplantation.* 70: 989- 998
- 198 Adams, DH, Kadner, A, Chen, RH, Farivar, RS (2001) Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation.* 8: 36- 40
- 199 Kroshus, TJ, Bolman, RM, Dalmaso, AP, Rollins, SA, Guilmette, ER, Williams, BL, Squinto, SP, Fodor, WL (1996) Expression of human CD59 in transgenic pig organs enhances organ survival in an ex vivo xenogeneic perfusion model. *Transplantation.* 61: 1513- 1521
- 200 Wintero, AK, Fredholm, M, Davies, W (1996) Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library: analysis of 839 clones. *Mamm Genome.* 7: 509- 517
- 201 Kuhn, S, Zipfel, PF (1995) The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins. *Gene.* 162: 225- 229
- 202 Alsenz, J, Schulz, TF, Lambris, JD, Sim, RB, Dierich, MP (1985) Structural and functional analysis of the complement component factor H with the use of different enzymes and monoclonal antibodies to factor H. *Biochem J.* 232: 841- 850
- 203 Nielsen, H, Engelbrecht, J, Brunak, S, von Heijne, G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1- 6
- 204 Kristensen, T, Tack, BF (1986) Murine protein H is comprised of 20 repeating units, 61 amino acids in length. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83: 3963- 3967
- 205 Schwaeble, W, Sim, RB (1997) Complement Inhibitor. *World Intellectual Property Organization.* PCT/GB97/03275, WO 9823638:
- 206 Soames, CJ, Day, AJ, Sim, RB (1996) Prediction from sequence comparisons of residues of factor H involved in the interaction with complement component C3b. *Biochem J.* 315 (Pt 2): 523- 531
- 207 Ranganathan, S, Male, DA, Ormsby, RJ, Giannakis, E, Gordon, DL (2000) Pinpointing the putative heparin/sialic acid-binding residues in the ' sushi' domain 7 of factor H: a molecular modeling study. *Pac Symp Biocomput.* 155- 167
- 208 de Bruijn, MH, Fey, GH (1985) Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 708- 712
- 209 Wimmers, K, Mekchay, S, Ponsuksili, S, Hardge, T, Yerle, M, Schellander, K (2001) Polymorphic sites in exon 15 and 30 of the porcine C3 gene. *Anim Genet.* 32: 46- 47
- 210 Yu, J, Dong, S, Rushmere, NK, Morgan, BP, Abagyan, R, Tomlinson, S (1997) Mapping the regions of the complement inhibitor CD59 responsible for its species selective activity. *Biochemistry.* 36: 9423- 9428
- 211 Ault, BH (2000) Factor H and the pathogenesis of renal diseases. *Pediatr Nephrol.* 14: 1045- 1053

-
- 212 Rodriguez, DC, Rey-Campos, J, Dykes, DD, McAlpine, PJ, Wong, P, Rubinstein, P (1988) Coagulation factor XIII B subunit is encoded by a gene linked to the regulator of complement activation (RCA) gene cluster in man. *Immunogenetics*. 28: 452- 454
- 213 Hashiguchi, T, Saito, M, Morishita, E, Matsuda, T, Ichinose, A (1993) Two genetic defects in a patient with complete deficiency of the b-subunit for coagulation factor XIII. *Blood*. 82: 145- 150
- 214 Hashiguchi, T, Ichinose, A (1995) Molecular and cellular basis of deficiency of the b subunit for factor XIII secondary to a Cys430-Phe mutation in the seventh Sushi domain. *J Clin Invest*. 95: 1002- 1008
- 215 Harris, CL, Spiller, OB, Morgan, BP (2000) Human and rodent decay-accelerating factors (CD55) are not species restricted in their complement-inhibiting activities. *Immunology*. 100: 462- 470
- 216 Hegasy, G, Zipfel, PF (2002) Porcine Complement Regulator Factor H and its use. Patent Application. *European Patent Office* EP 02003482.3
-

7 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Peter Zipfel. Ich danke ihm für seine interessanten Themenstellungen, seine kontinuierliche Anleitung und Hilfe, seine allseitige Unterstützung, und vor allem für seine ständige Mühe um mein Fortkommen und meine Person.

Ich danke weiterhin ganz besonders Ute Willhöft für die freiwillige Betreuung meiner Arbeit, ihre Anleitungen, ihre Unterweisungen, und für ihre anregenden Diskussionen über die Molekularbiologie.

Eva Kampen und Alexandra Bialonski danke ich für ihre hervorragende praktische Anleitung und ihre dauerhafte Unterstützung.

Jens Hellwage und Tamara Manuelian danke ich für ihre Kooperationen an diesem Projekt.

Manuel Friese und Tobias Wolk danke ich für ihre fachlichen und privaten Diskussionen.

Für ihre liebevolle Unterstützung und das kontinuierliche Interesse an meiner Arbeit danke ich meinem Vater, meiner Mutter und meiner Schwester.

Ich danke Herrn Bernhard Fleischer für die formelle Übernahme dieser Promotionsarbeit.

Das BNI bot mir allzeit ein Umfeld von unkomplizierter, spontaner und professioneller Hilfe, was in Forschungseinrichtungen nicht immer selbstverständlich ist. Für Hilfestellungen und Geräteunterweisungen bin ich daher vielen Forschern am BNI sehr dankbar, insbesondere: Heike Bruhn (Lasermikroskopie), Heidrun Buß (Sequenzierung), Christoph Gelhaus (Proteinchemie), Rose Nickel (Bankenbau), Ulrike Klauenberg (Kryostat), Marie-Luise Eschenbach (Material), Christel Schmetz (Lasermikroskopie), und Christian Drost (Lightcycler).

Des weiteren danke ich:

Der Vereinigung der Freunde des Tropeninstitutes. Ein Teil dieser Promotionsarbeit wurde mit Hilfe eines Stipendiums der Vereinigung finanziert.

Der Hamburgischen Universitätsstiftung. Eine Kongressteilnahme wurde zum Teil mit Hilfe der Stiftung finanziert.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsort Leverkusen, Nordrhein-Westfalen
 Geburtsdatum 04.07.1970
 Staatsangehörigkeit Deutsch
 Familienstand Ledig
 Adresse Wrangelstrasse 115, 20253 Hamburg
 Telefon & Fax 040-4205097
 E-mail G.hegasy@bni.uni-hamburg.de

Schulische Ausbildung

09/80-06/89 Freiherr-vom-Stein Gymnasium, Leverkusen
 07/89 Abitur mit den Leistungskursen Englisch, Kunst,
 Biologie und Geographie

Zivildienst

10/89-03/91 Rheinische Landeslinik der Universität Düsseldorf,
 Abteilung Kinder- und Jugendpsychiatrie

Berufliche Ausbildung

08/91-06/94 Tischlerlehre, Möbelschreinerei 'pro form', Bergisch Gladbach
 07/94 Gesellenprüfung, 1. Platz des Design-Wettbewerbs

Universitäre Ausbildung

04/95-12/02 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
 04/97 Physikum, Note 'gut'
 04/98 Erstes Deutsches Staatsexamen, Note 'gut'
 06/98 Erstes Amerikanisches Staatsexamen (USMLE Step 1)
 09/01 Zweites Deutsches Staatsexamen, Note 'gut'
 10/01 Zweites Amerikanisches Staatsexamen (USMLE Step 2)
 12/02 Drittes Deutsches Staatsexamen, Note 'sehr gut',
 Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung 'sehr gut'

Klinische Ausbildung Famulaturen

09/97-10/97 Innere Medizin, Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg
 09/98-10/98 Mikrobiologie, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
 02/00-03/00 Neurologie, Deutsche Klinik für Diagnostik, Wiesbaden
 07/00-08/00 Neurologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg

Praktisches Jahr

10/01-02/02 Innere Medizin, Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg
 02/02-04/02 Neurologie, Allgemeines Krankenhaus St. Georg, Hamburg
 04/02-06/02 Neurologie, The National Hospital of Neurology, London/ England
 06/02-10/02 Chirurgie, Stadtspital Waid, Zürich/ Schweiz

Wissenschaftliche Ausbildung

10/98-11/98 Molekular- und Zellbiologisches Methodenpraktikum, Institut für
 Hormon- und Fortpflanzungsforschung, Hamburg
 12/98-03/01 Promotion am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg,
 AG Molekulare Medizin, Prof. Dr. Peter F. Zipfel
 04/02 Einreichung der Dissertation 'Komplementregulator Faktor H von *Sus*
scrofa: Klonierung, funktionelle Charakterisierung und
 molekulare Pathogenese der Defizienz'
 10/02 Mündliche Promotions-Prüfung,
 Gesamtnote der Promotion 'summa cum laude'

Stipendium

09/00-03/01 Promotions-Stipendium der "Vereinigung der Freunde des Tropeninstituts", Hamburg

Publikationen Artikel

- 04/99 Zipfel PF, Hellwage J, Friese MA, Hegasy G, Jokiranta ST, Meri S. Factor H and disease: a complement regulator affects vital body functions. Mol Immunol. 1999 Mar-Apr;36(4-5):241-8
- 08/02 Hegasy GA, Willhoeft U, Manjo S, Zipfel PF, Hellwage J. Porcine complement regulator factor H: molecular cloning, functional characterization and relevance to cross-species transplantation. Zur Publikation eingereicht.
- 12/02 Hegasy GA, Manuelian T, Hogasen K, Jansen JH, Zipfel PF. The molecular basis for hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II: point mutations in the factor H coding sequence block protein secretion. Am J Pathol. 2002 Dec;161(6):2027-34

Sequenzdeposition

- 06/00 Hegasy GA. Sus scrofa complete mRNA for complement regulator factor H. GenBank. Acc.-Nr. AJ278470

Patentanmeldung

- 03/02 Hegasy GA, Zipfel PF. Porcine complement regulator factor H and its use. European Patent Office. EP 02003482.3

Präsentationen Poster

- 06/99 7th European Meeting on Complement in Human Disease, Helsinki/Finland
- 09/01 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Dresden

Vortrag

- 09/01 8th European Meeting on Complement in Human Disease, Strasbourg/Frankreich

Weitere Kenntnisse Sprachen

Englisch, diskussionsfähig
Französisch, konversationsfähig

Computer

Vector NTI Suite 5.5, Graphpad Prism 2.1, Corel Graphics 9.0, Reference Manager 9.5, MS Excel, MS Word, MS Windows

Interessen Wissenschaftlich

Biostatistik, Wissenschaftsdidaktik

Privat

Kunst und Literatur der klassischen Moderne, Kochen, Antiquitäten

Referenzen Prof.Dr.P.Zipfel

Abteilung Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut, Beutenbergstr 11a, 07745 Jena, Tel. 03641-656900, Zipfel@pmail.hki-jena.de

Prof.Dr.B.Fleischer

Direktor des Bernhard-Nocht-Instituts, Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359 Hamburg, Tel. 040-42818402, Fleischer@bni-hamburg.de

9 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band, Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

10 Publikationen

Artikel

Zipfel PF, Hellwage J, Friese MA, Hegasy G, Jokiranta ST, Meri S.
Factor H and disease: a complement regulator affects vital body functions.
Mol Immunol. 1999 Mar-Apr;36(4-5):241-8

Hegasy GA, Willhoeft U, Manjo S, Zipfel PF, Hellwage J.
Porcine complement regulator factor H: molecular cloning, functional characterization
and relevance to cross-species transplantation.
Zur Publikation eingereicht.

Hegasy GA, Manuelian T, Hogasen K, Jansen JH, Zipfel PF.
The molecular basis for hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis
type II: point mutations in the factor H coding sequence block protein secretion.
Am J Pathol. 2002 Dec;161(6):2027-34

Sequenzdeposition

Hegasy GA.
Sus scrofa complete mRNA for complement regulator factor H.
GenBank. Accession Nr. AJ278470

Patentanmeldung

Hegasy GA, Zipfel PF.
Porcine complement regulator factor H and its use.
European Patent Office. EP 02003482.3
