

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

**Regulation und Expression der Komplementproteine
Faktor H und FHL-1/Reconectin in physiologischen
und pathologischen Prozessen**

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

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

Manuel Alexander Friese

aus Hamburg

Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 14. August 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. B. Fleischer

Koreferent: Prof. Dr. R. Laufs

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Angeborene und erworbene Immunität	2
1.2 Das Komplementsystem	2
1.3 Der Klassische Weg (classical pathway, CP).....	6
1.4 Der MBLeitin Weg (lectin pathway, LP).....	7
1.5 Der Alternative Weg (alternative pathway, AP).....	8
1.6 Zentrale Rolle des C3-Moleküls	8
1.7 Terminaler Weg (terminal pathway, TP).....	9
1.8 Regulation des Komplementsystems.....	10
1.9 Faktor H und FHL-1/Reconnectin	14
1.10 Faktor H-Genfamilie	21
1.11 Komplementaktivierung und Erkrankungen	23
1.12 Zielsetzung und Problemstellung	26
2 MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Allgemein verwendete Puffer, Medien und Lösungen	28
2.2 Molekularbiologische Methoden	28
2.3 Zellkulturtechniken	37
2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden	42
3 ERGEBNISSE	49
3.1 Expression von Faktor H und FHL-1/Reconnectin	49
3.2 Induktion und Regulation von Faktor H und FHL-1/Reconnectin.....	51
3.3 Kinetik der Faktor H und FHL-1/Reconnectin Expression	52
3.4 Promotorregulation von Faktor H und FHL-1/Reconnectin.....	53
3.5 Detektion von Faktor H und FHL-1/Reconnectin in Synovialflüssigkeiten	56
3.6 Synthese von Faktor H und FHL-1/Reconnectin durch Synovialfibroblasten	58
3.7 Identifizierung von funktionellen Elementen des Faktor H und FHL-1/Reconnectin-Promotors in Synovialfibroblasten.....	59

3.8	Bindung von Faktor H- und FHL-1/Reconnectin an Synovialfibroblasten	61
3.9	Detektion von Faktor H und FHL-1/Reconnectin in Synovialgewebe.....	62
3.10	Komplement-vermittelte Lyse von Synovialfibroblasten	63
3.11	mRNA-Expression von Faktor H und FHL-1/Reconnectin durch Tumorzellen.....	63
3.12	Proteinsynthese von Faktor H und FHL-1/Reconnectin durch H2-Zellen	65
3.13	Komplementlyse von H2-Zellen nach Enzymbehandlung.....	67
3.14	Bindung von Faktor H und FHL-1/Reconnectin an die Oberfläche von H2-Zellen	68
3.15	Komplementlyse von H2-Zellen nach Behandlung mit Anti-FHL-1/Faktor H mAb	69
3.16	Klonierung und Expression des FHR-4 SCR 4-5 Fragments	70
3.17	Funktionelle Charakterisierung von FHR-4, FHR-4 SCR 4-5 und Faktor H	71
4	DISKUSSION.....	73
4.1	Expression und Genregulation von Faktor H und FHL-1/Reconnectin.....	73
4.2	FHL-1/Reconnectin und Faktor H in rheumatoider Arthritis	77
4.3	FHL-1/Reconnectin und Faktor H in Tumorerkrankungen	81
4.4	C3b-Bindestelle im SCR 20 von Faktor H.....	84
4.5	Schlußfolgerung und Ausblick.....	86
	ZUSAMMENFASSUNG.....	87
	LITERATURVERZEICHNIS	88
	DANKSAGUNG	98
	LEBENS LAUF.....	99
	ERKLÄRUNG	101
	PUBLIKATIONEN	102

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alternativer Komplementweg (alternative pathway)
bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serumalbumin (bovine serum albumine)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CP	Klassischer Komplementweg (classical pathway)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelstängige DNA
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FH	Komplementfaktor H
FHL-1	Faktor H-ähnliches Protein 1 (factor H-like protein 1)/Reconnectin
FHR	Faktor H-verwandtes Protein (factor H-related protein)
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mAk	monoklonaler Antikörper
mA	Miliampere
MAC	Membranangriffskomplex (membrane attack complex)
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
NHS	normales humanes Serum (normal human serum)
OD	optische Dichte
ODN	Oligodeoxynukleotide
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pmol	Picomol
RA	rheumatoide Arthritis
reFHR-4	rekombinantes FHR-4 (für andere Proteine entsprechend)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
SCR	repetitive Struktureinheit (short consensus repeat)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S-ODN	Phosphorothioat Oligodeoxynukleotide
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TP	Terminaler Komplementweg (terminal pathway)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
upm	Umdrehungen pro Minute
ü/N	über Nacht
VBS	Veronal-gepufferte Kochsalzlösung (veronal buffered saline)
v/v	Volumen zu Volumen (volume/volume)
w/v	Gewicht zu Volumen (weight/volume)

1 EINLEITUNG

1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Der menschliche Organismus muss sich vor Krankheitserregern schützen und die Zellintegrität aufrechterhalten. Zu diesem Zweck stehen ihm zwei sich einander ergänzende Systeme zur Verfügung:

- (i) Das angeborene Immunsystem besteht aus den Faktoren des humoralen Komplementsystems und anderer Plasmaproteine, die die Fähigkeit haben, körperfremde und veränderte körpereigene Zellen abzutöten, Antigen-Antikörper-Komplexe zu binden und körpereigene Zellen zu aktivieren, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Weiterhin besteht dieses System aus zellulären Komponenten, wie den phagozytierenden Leukozyten und Makrophagen, die Krankheitserreger und Antigen-Antikörper-Komplexe zerstören und eine wichtige Rolle bei der Erkennung körperfremder Strukturen durch das erworbene Immunsystem einnimmt.
- (ii) Das erworbene Immunsystem ist befähigt, auf zelluläre, partikuläre und molekulare Fremdstoffe (Antigene) zu reagieren, indem es spezifische Abwehrkörper bildet, die zellständig (T-Zellrezeptor, spezifische zelluläre Abwehr) oder im Plasma gelöst sind (Antikörper, spezifische humorale Abwehr) und diese Fremdstoffe angreifen und binden.

Durch die Verzögerung, bevor die initiale erworbene Immunantwort eintritt, hat die angeborene Immunabwehr in der Frühphase ihre kritische Bedeutung. Das angeborene Immunsystem wird innerhalb von Sekunden aktiviert und kontrolliert die Infektionen während dieser Zeit. Zudem dirigiert die angeborene Abwehr die erworbene Abwehr, die ohne diese als Kostimulus nicht adäquat aktiviert werden würde (JANEWAY and TRAVERS 1996) und somit B- und T- Zellen nicht entscheiden könnten, ob eine Reaktion ausgelöst werden soll oder nicht. Diese kostimulatorischen Signale werden z.B. durch das Komplementsystem vermittelt und entscheiden somit auch zwischen Toleranz oder Aktivierung (LISZEWSKI and ATKINSON 1991, FEARON and LOCKSLEY 1996, BENDELAC and FEARON 1997).

1.2 Das Komplementsystem

Diese Arbeit befasst sich mit dem Komplementsystem, das die frühe Phase der Immunantwort darstellt und eine wesentliche Rolle bei der Eliminierung von pathogenen Organismen spielt. Das System ist dabei in der Lage zwischen körpereigenen Strukturen und Fremdorganismen zu unterscheiden, indem ein genau reguliertes Gleichgewicht von Komplementaktivierung und -inhibition aufrechterhalten wird. In dieser Arbeit wird die Rolle der Komplementregulatoren und deren genaue Funktion bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts untersucht und

inwieweit pathologische Prozesse dieses physiologische Gleichgewicht stören oder eine Störung des Gleichgewichts zu Krankheiten führt.

1.2.1 Historischer Überblick

RICHARD PFEIFFER (1858-1945) hatte 1894 die Entdeckung gemacht, dass die Injektion von Choleravibrionen zusammen mit Immuneserum eines choleraimmun Kaninchens zur Auflösung der Vibrionen führt („PFEIFFER’scher Versuch“). METSCHNIKOFF (1845-1916) beschrieb 1885, dass der Zerfall der Keime im Reagenzglas nur eintrat, wenn dem Gemisch aus Bakterien und Immuneserum Peritonealexsudat vom Meerschweinchen zugesetzt wurde. JULIUS BORDET (1870-1961) beobachtete, dass Anstelle von Peritonealexsudat frisch gewonnenes Immuneserum oder Normalserum verwendet werden konnte, die ihre Wirksamkeit durch Erhitzen auf 56°C verloren. Er postulierte deshalb zwei wirksame Substanzen: Eine hitzelabile „substance bactéricide“ (von HANS BUCHNER (1850-1902) 1885 als „Alexine“ beschrieben), die auch im Normalserum vorkommt und eine hitzestabile „substance préventive“. Die von BORDET auf Erythrozyten erweiterten Versuche zeigten, dass ein von Meerschweinchen frisch gewonnenes Immuneserum gegen Kaninchenerythrozyten die roten Blutkörperchen der Kaninchen auflöste, bei Erhitzen auf 56°C der Verlust der hämolytischen Aktivität eintrat und diese durch frisch entnommenes Normalserum wiederhergestellt werden konnte. PAUL EHRLICH (1852-1915) nannte die hitzestabile „substance préventive“ „Immunkörper“. Die hitzelabile „substance bactéricide“ bearbeitete er mit seinen Mitarbeitern JULIUS MORGENROTH (1871-1924) und HANS SACHS (1877-1945) und bezeichnete sie zunächst als Addiment, später als „Komplement“. Die Immunkörper nannte er daraufhin „Ambozeptoren“. (KÖHLER 1994)

1.2.2 Stand der Wissenschaft

Das Komplementsystem (Abb. 1.1) ist ein im Plasma vorhandenes Kaskadensystem aus mehr als 30 Plasma- und Membranproteinen (Tab. 1.1-1.3), die elektrophoretisch in der β -Globulinfraktion wandern und etwa 5 % der Plasmaproteinkonzentration ausmachen. Das Komplementsystem ist der Hauptbestandteil des angeborenen Abwehrsystems. Die Hauptaufgaben des Komplementsystems sind die Abwehr von Fremdmaterial und -organismen, die Degradation von Immunkomplexen, die Bildung von Entzündungsmediatoren (Anaphylatoxinen) sowie die Gewährleistung der Eigenstruktur des Organismus durch Eliminierung veränderter Zellen. Die Komplementproteine werden im inaktiven Zustand zumeist von der Leber sezerniert. Eine geringe, physiologische Aktivierung läuft beim Gesunden ständig ab (Ruheaktivierung). Sie wird jedoch durch ein Gegenregulationssystem aus inhibitorischen Proteinen in ihrem Ausmaß kontrolliert (Tab. 1.2, 1.3). Diese verhindern das

Auftreten einer pathologischen Daueraktivierung. Die Ausbildung der vollständigen Enzymkaskaden des Komplementsystems geschieht nur an Oberflächen, nicht jedoch in freier Lösung und erfolgt durch den Kontakt mit fremden oder geschädigten körpereigenen Strukturen. Die Aktivierung wird anfänglich von einer Kaskade proteolytischer Schritte vermittelt, die durch Serinproteasen katalysiert werden.

Drei unterschiedliche Wege der Aktivierung des Komplementsystems sind bekannt: Durch einen an ein Antigen gebundenen Antikörper (Klassischer Weg, CP), bestimmte Polysaccharidstrukturen (MBLektin Weg) oder durch die Erkennung von „fremden“ Oberflächenstrukturen durch das Komplementsystem (Alternativer Weg, AP) werden diese ausgelöst. Alle Wege münden in der Aktivierung von C3 und konvergieren nachfolgend auf der Ebene von C5. Es entsteht dabei eine Beladung der aktivierenden Oberfläche mit C3b (Opsonisierung). In der gemeinsamen terminalen Endstrecke (C5 bis C9, TP), werden die Komponenten in nichtproteolytischen Schritten zusammengesetzt und resultieren im Membranangriffskomplex (membrane attack complex, MAC), der eine direkte Lyse von Zellen bewirkt.

Leistungen des Komplementsystems:

1. Bei der Aktivierung der Kaskade bis zu C5 entstehen Fragmente, die nachfolgende Komplementfaktoren aktivieren und solche mit Signalcharakter wie C3a, C4a und C5a, die als Anaphylatoxine bezeichnet werden. Diese Anaphylatoxine binden an spezifische Rezeptoren (C3aR, C5aR), die auf Granulozyten und Monozyten/Makrophagen exprimiert werden und konsekutiv die Phagozytoseaktivität der Zielzellen verstärken. Zudem sind diese Mediatoren chemotaktisch wirksam. Eine Entzündungsreaktion erfolgt durch die Induktion der Kontraktion glatter Muskulatur, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und Mastzelldegranulation (HUGLI 1984).
2. C3b ist reaktiv und wird auf Oberflächen abgelagert. Phagozyten, die spezifische Rezeptoren für das Fragment C3b, aber auch für C4b und C5b besitzen, erkennen im Sinne einer Opsonisierung Zellen, die mit diesen Fragmenten beladen sind und erleichtern damit die Phagozytose (JANEWAY and TRAVERS 1996).
3. Die Antikörperproduktion der B-Zellen wird im Sinne einer Aktivierung von T-Zell abhängigen Antigenen oder einer Suppression von B-Zellen, die selbstreaktive Antikörper produzieren, moduliert. Diese Funktionen werden über den CR2-Rezeptor und (CD21)/CD19/Tapa-1 Korezeptor auf B-Zellen vermittelt (FEARON and LOCKSLEY 1996, CARROLL 1998).
4. Mit Antikörpern beladene Zellen werden aufgrund der perforierenden Wirkung des aktivierten terminalen Membranangriffskomplexes C5b-C9 lysiert (MÜLLER-EBERHARD 1986).

5. Immunkomplexe werden aus der Zirkulation entfernt. Durch die Anlagerung von Komplementbruchstücken an die Immunkomplexe werden diese von dem CR1-Rezeptor (CD35) der Blutzellen gebunden und zur Entsorgung in das retikuloendotheliale System von Leber und Milz transportiert (MORGAN and WALPORT 1991).
6. Apoptotische Zellen werden beseitigt. Über C3bi-Markierung apoptotischer Zellen und spezifische Erkennung durch Makrophagen über die Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) werden apoptotische Zellen verstärkt phagozytiert (MEVORACH *et al.* 1998). Die Komplementkomponente C1q ist zudem für die Degradierung apoptotischer Zellen mitverantwortlich (BOTTO *et al.* 1998).

Komponente	Molekulargewicht in kDa	Plasmakonzentration (µg/ml)
Factor B	93	200
Factor D	24	2
Properdin (v.a. Oligomere)	11, 165, 200 (Monomer:55)	25
C1q	460 (6 Untereinheiten mit jeweils 3 Ketten: A, 26; B, 26; C, 24)	150
C1r	85	50
C1s	85	50
C4	205 (α, 97; β, 75; γ, 33)	300-600
C2	102	20
C3	185 (α, 110; β, 75)	1200-1300
MBL (bevorzugte Form)	200, 300, 400 (2-4 Untereinheiten mit 3 Ketten von jeweils 32 kDa)	1 (0,01-20)
MASP-1	100	1,5-12
MASP-2	76	ND
C5	190 (α, 115; β, 75)	80
C6	110	45
C7	100	990
C8	150 (α, 64; β, 64; γ, 22)	55
C9	70	60

Tabelle 1.1: aktivierende Komplementproteine im Plasma

Komponente	Molekulargewicht in kDa	Plasmakonzentration (µg/ml)
Faktor I	88 (55 + 38)	35
Faktor H	150	300-400
FHL-1/Reconectin	42	5-20
C1-Inh	105	240
C4bp	550 (7 x 70, 1 x 45)	250
S-Protein (Vitronectin)	84	500
Clusterin (SP-40,40)	70 (35 + 35)	50
Carboxypeptidase N (Anaphylatoxin Inaktivator)	280 (2x 90, 2 x 50)	35

Tabelle 1.2: Komplement-Kontrollproteine im Plasma

Komponente (CD Nummer)	Molekulargewicht in kDa	Gewebeverteilung
CR1 (CD35)	190	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Erythrozyten, B- und T- Zellen, Follikuläre dendritische Zellen
DAF (CD55)	70	Periphere Blutzellen (außer NK-Zellen), Erythrozyten, epitheliale und sekretorische Zellen, endotheliale und mesenchymale Zellen
MCP (CD46)	45-70	Wie DAF (aber nicht auf Erythrozyten)
Protektin (CD59)	18-20	Wie DAF

Tabelle 1.3: Komplement-Kontrollproteine auf Zellmembranen

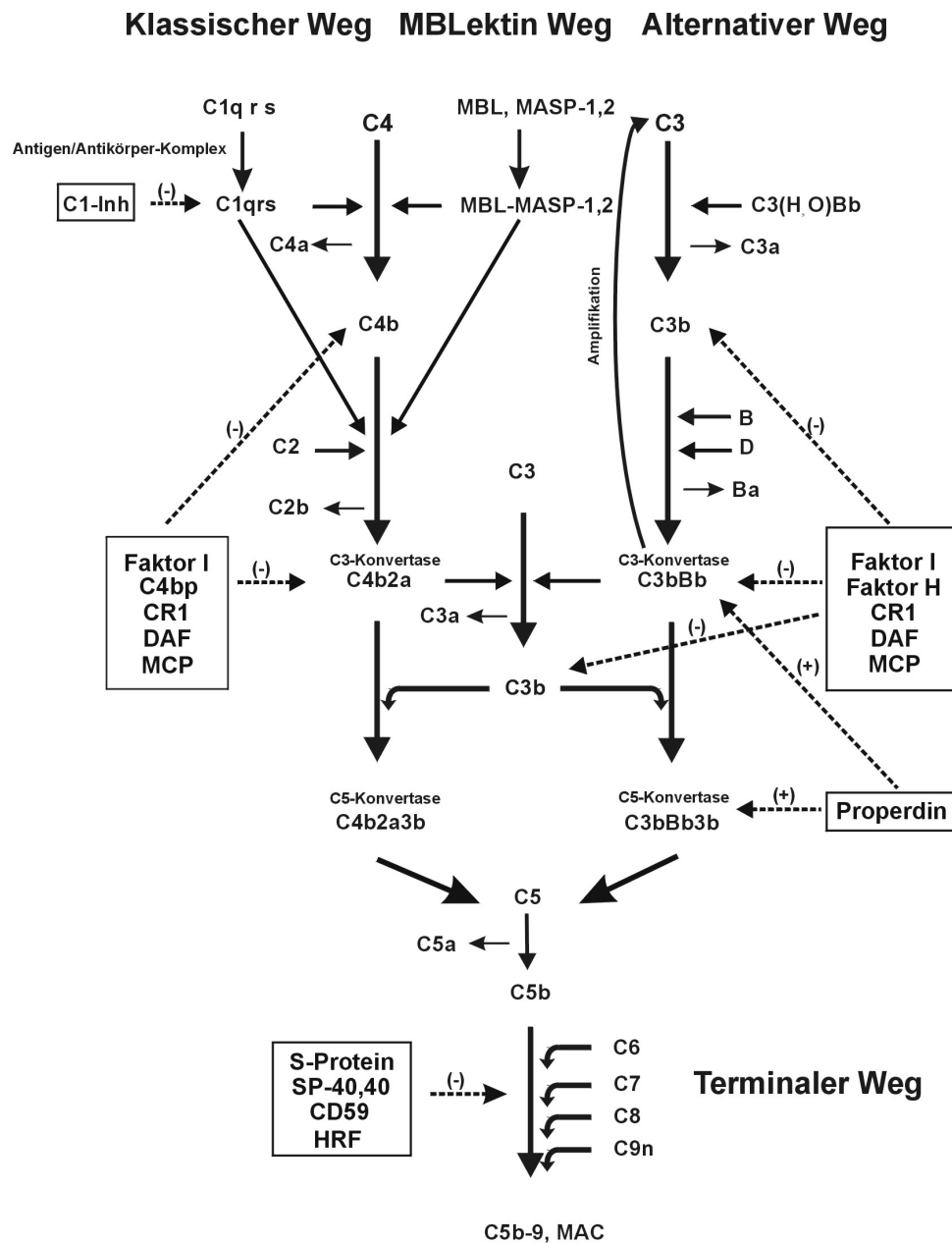


Abb. 1.1: Das Komplementsystem. Die drei unterschiedlichen Aktivierungswege sind zusammen mit den regulatorischen Proteinen schematisch dargestellt. Die Anzahl der C9 Moleküle (n) innerhalb des C5b-9 Komplexes variiert zwischen 1 und 18.

1.3 Der Klassische Weg (classical pathway, CP)

Der CP wird durch die Bindung des C1-Komplexes an Antigen-gebundenes IgG oder IgM aktiviert. Die Aktivierung von C1 kann auch durch die Interaktion mit Polyanionen (z.B. bakterielle Lipopolysaccharide, DNA, RNA), kleinen Polysacchariden, Myelin, viralen Membranen (z.B. HIV-1) und dem C-reaktiven Protein erfolgen (SIM and REID 1991). Das C1-Protein besteht aus den drei unterschiedlichen Proteinen C1q, C1r und C1s. Das C1q-Molekül, das keine enzymatische Aktivität besitzt, ist für die Bindung an Immunkomplexe verantwortlich. Es ist aus sechs globulären „Köpfen“ zusammengesetzt, die jeweils über Kollagen-Tripelhelixstrukturen an eine zentrale Kernregion gebunden sind. Die „Köpfe“ des C1q zeigen

eine schwache Bindung an die Fc-Region von monomerem IgG, wohingegen multiple Fc-Regionen, wie sie in aggregierten IgG-Immunkomplexen vorkommen, die Bindungsstärke dramatisch erhöhen. Verschiedene IgG-Isoformen variieren in der Fähigkeit an C1q zu binden und Komplement zu aktivieren. Beim Menschen sind IgG1 und IgG3 aktiv, während IgG2 weniger aktiv ist und IgG4 nicht aktiv ist. Während der Interaktion mit Antigenen erlaubt IgM eine starke IgM-C1q-Bindung durch die Exposition der Binderegionen in seiner Fc-Region (fünf Fc-Regionen pro Molekül). Nach Ig-Bindung und Konformationsänderung des C1q-Moleküls entsteht die enzymatische Aktivität des C1-Komplexes durch die Aktivierung von je zwei Molekülen der Proenzyme C1r und C1s. Dadurch entsteht ein Ca^{2+} -abhängiger $\text{C1r}_2\text{-C1s}_2$ -Komplex.

Das drei-kettige C4-Molekül wird danach durch C1s in seiner α -Kette gespalten und es entsteht das Anaphylatoxin C4a (MG: 9000 Da) und das größere C4b-Fragment. Das C4b-Molekül durchläuft eine starke Konformationsänderung, wodurch der interne Thioester exponiert wird und Amid- oder Esterbindungen mit umgebenden Molekülen (Proteinen, Kohlenhydraten, Wasser) eingehen kann (LAW and DODDS 1997). Die größte Anzahl der gebildeten C4b-Moleküle reagieren mit Wasser, während etwa 5 % der C4b-Moleküle kovalent an naheliegende Oberflächenstrukturen binden. Auf diese Weise wird eine Zelle oder Oberfläche mit C4b bedeckt (MÜLLER-EBERHARD 1988).

C2, eine Serinprotease, bindet danach an ein aktives C4b-Molekül. In diesem so gebildeten Mg^{2+} -abhängigen Komplex ist C2 für die Spaltung durch C1s in C2a (größeres Fragment, bleibt assoziiert mit C4b) und C2b (freigesetztes kleineres Fragment mit Kininaktivität) zugänglich. C2a ist das enzymatisch aktive Fragment im C4b2a-Komplex, der so genannten C3-Konvertase des CP.

1.4 Der MBLektin Weg (lectin pathway, LP)

Das Serumlektin „mannan binding lectin“ (MBL) kann ebenfalls den CP aktivieren. In diesem Prozess werden die Serumproteasen „MBL-associated serine protease I, II“ (MASP-I,-II) (JI *et al.* 1993) benötigt (SIM and MALHOTRA 1994, TURNER 1996a, b). Der MBL-MASP-Komplex aktiviert C4 und C2, wenn das MBL an einen geeigneten Kohlenhydratliganden gebunden hat (Oberflächen von Bakterien oder Hefen). Zusätzlich zu der Kohlenhydratbindungsregionen besitzt das MBL-Molekül eine tripelhelikale kollagen-ähnliche Struktur und hat demnach eine strukturelle Ähnlichkeit mit C1q. Das MASP-I und -II-Enzym ist zudem in seiner Struktur dem C1r und C1s sehr ähnlich, was auf die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zwischen dem $\text{C1r}_2\text{-C1s}_2$ und dem MBL-MASP-Komplex hinweist (MATSUSHITA and FUJITA 1992, THIEL *et al.* 1997). MBL kann ebenso mit $\text{C1r}_2\text{-C1s}_2$ interagieren und eine C1s-Aktivierung ermöglichen (LU *et al.* 1990).

1.5 Der Alternative Weg (alternative pathway, AP)

Der AP wird kontinuierlich aktiviert. Dabei wird C3 ständig mit einer niedrigen Umsatzrate im humanen Plasma zu C3(H₂O) aktiviert („tickover-aktivierung“). C3(H₂O) entsteht durch eine spontane Reaktion des internen Thioesters von C3 mit Wasser, so dass etwa 0,5 % des nativen C3 als C3(H₂O) vorliegt (HACK *et al.* 1990). C3(H₂O) assoziiert mit Faktor B in einer Mg²⁺-abhängigen Reaktion. In diesem Komplex ist Faktor B zugänglich für die Spaltung durch Faktor D (FEARON and AUSTEN 1975a, TACK *et al.* 1980, PANGBURN *et al.* 1981, ISENMAN *et al.* 1981, ISAAC *et al.* 1998). Das enzymatisch aktive Bb-Fragment bleibt an C3(H₂O) gebunden und bildet die initiale C3-Konvertase des AP (C3(H₂O)Bb), welche durch Spaltungen weiterer C3-Moleküle, viele C3b-Komponenten generiert. Diese C3b-Moleküle binden kovalent an Hydroxylgruppen (über Esterbindungen) oder an Aminogruppen (über Amidbindungen) auf Zieloberflächen. Die Anlagerung eines einzigen C3b- oder C3(H₂O)-Moleküls auf eine aktivierende Oberfläche verursacht die explosionsartig operierende positive Amplifikationsschleife (NICOL and LACHMANN 1973, FEARON and AUSTEN 1977, PANGBURN and MÜLLER-EBERHARD 1978) (Abb. 1.1). Dabei assoziieren die C3b-Moleküle mit Faktor B in der Anwesenheit von Mg²⁺ und werden durch Faktor D, einer Serinprotease, aktiviert. Nach der Entstehung von C3bBb, der eigentlichen C3-Konvertase und Ablösung von Ba, geht Faktor D wieder in seinen inaktiven Zustand über. Das an die Oberflächen gebundene C3bBb ist nun wiederum in der Lage weitere C3b-Moleküle zu generieren und C3b an die Oberfläche zu binden; damit hat sich der Kreis der Amplifikation geschlossen. Solange Bb an C3b gebunden bleibt und Properdin den C3bBb-Komplex gegen den Zerfall stabilisiert bleibt die Konvertase aktiv (FEARON and AUSTEN 1975b).

1.6 Zentrale Rolle des C3-Moleküls

Der CP, LP und AP mündet in der Aktivierung des C3-Moleküls, so dass das C3-Protein eine Schlüsselposition im Komplementsystem einnimmt. Das Protein hat eine Größe von 190 kDa und besteht aus einer α -Kette von 115 kDa und einer β -Kette mit 75 kDa, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (FISHELSON 1991, SIM *et al.* 1981) (Abb. 1.2). Durch die Aktivierung des C3-Moleküls entstehen die Fragmente C3a und C3b (MÜLLER-EBERHARD 1988). C3a ist ein Anaphylatoxin, das aus den ersten 77 Aminosäuren der α -Kette des C3-Moleküls besteht; der Rest des Moleküls ist C3b (Abb. 1.2). Die Konformationsänderung im C3b-Teil des Moleküls führt zur Exposition des internen Thioesters (TACK *et al.* 1980, ISAAC *et al.* 1998). Der freigesetzte Thioester ist mit Nukleophilen, einschließlich Wasser und anderen Molekülen, die Hydroxyl- oder Aminogruppen tragen, extrem reaktionsfreudig. C3b bindet deshalb kovalent durch eine Ester- oder Amidbindung an Zelloberflächen, wobei kein

Unterschied zwischen Fremd- und Wirtszelle gemacht wird (LAW and LEVINE 1977, LAW *et al.* 1979).

Obwohl die Beliebbarkeit der Bindungsreaktion bei allen fremden Zellen gewünscht ist, muß die Bindung an Wirtszellen so gering wie möglich gehalten werden. Die Steuerung geschieht durch die Inhibitoren, die auf den Zellen exprimiert werden oder durch eine unterschiedliche Affinität der Inhibitoren für bestimmte Oberflächen. Im wäßrigen Medium wird der Thioester i.d.R. sofort durch das umgebende Wasser hydrolysiert und limitiert somit erfolgreich die Reichweite des aktivierten C3b (SIM *et al.* 1981).

1.7 Terminaler Weg (terminal pathway, TP)

Die unterschiedlichen Aktivierungswege konvergieren auf der Ebene des C5-Moleküls, welches die nächste Stufe der Aktivierungskaskade darstellt. C5 ist ein homologes Molekül zu C3 und C4. Es wird durch einen ähnlichen Mechanismus wie C3 und C4 aktiviert. Dabei entsteht das kleinere C5a- sowie das größere C5b-Fragment. Das C5b-Fragment besitzt jedoch keinen internen Thioester. C5b initiiert die Entstehung des Membranangriffskomplex (MAC), während C5a das potenteste Anaphylatoxin und damit der wichtigste Entzündungsmediator des Komplementsystems ist (HUGLI 1984).

Im CP bindet C3 nach Aktivierung durch C4b2a kovalent an C4b und der C4b3b2a-Komplex (C5-Konvertase des CP) (COOPER 1985, TAKATA *et al.* 1987, KIM *et al.* 1992) entsteht. Ähnlich verläuft die Aktivierung von C3 durch die C3-Konvertase (C3bBb-Enzym) des AP. Die C3-Konvertasen des AP führt zu einer kovalenten Bindung von neu aktiviertem C3b an das C3b des C3bBb-Enzyms und bildet damit den C3b₂Bb-Komplex (DAHA *et al.* 1976). Dieser stellt die C5-Konvertase des AP dar (KINOSHITA *et al.* 1988). In beiden Aktivierungswegen können die C5-Konvertasen demnach als C3-Konvertasen betrachtet werden, die durch Addition von C3b entstehen.

Das Ziel des TP ist die lytische Aktivität des Komplementsystems. Diese entsteht durch die Bildung eines lipophilen Komplexes aus den Glykoproteinen C5, C6, C7, C8 und C9, welche, um die typischen zytolytischen Komplementläsionen herzustellen, eine hydrophile-amphiphile Veränderung durchlaufen (MÜLLER-EBERHARD 1988). Die Komponenten C5 bis C9 bilden zusammen den MAC, ein Proteinkomplex von $1-2 \times 10^6$ Da. Der MAC stellt transmembranäre Kanäle her und unterbricht somit die Phospholipiddoppelschicht der Zielzellen. Dieser Mechanismus führt zu einem Zustand des osmotischen Ungleichgewichtes und resultiert durch den Wasserinflux in einer Zellschwellung mit anschließender Zelllyse (ESSER 1991, BHAKDI and TRANUM-JENSEN 1991).

Das einzige proteolytische Ereignis in der Bildung des MAC ist die Spaltung von C5 in C5a und C5b durch die C5-Konvertasen der Aktivierungswege. Das aktivierte C5b ist schwach an C3b

gebunden und bindet C6. Der C5b-C6-Komplex bindet dann an C7 und es entsteht der C5b-7-Komplex, der vom C3b dissoziiert. Wenn der C5b-7-Komplex nicht sofort an eine Membranoberfläche bindet, ist seine potentielle zytolytische Aktivität verloren und eine Selbstaggregation in der flüssigen Phase findet statt (THOMPSON and LACHMANN 1970). Nachdem C8 gebunden ist, dirigiert die C8a-Untereinheit die Inkorporation von C9 und es entsteht der C5b-9-Komplex. Der MAC ist zusammengesetzt aus C5b-8(C9)_n, wobei n zwischen 1 und 18 liegen kann und die Art der Läsion von der Anzahl der C9-Moleküle abhängt (PODACK and TSCHOPP 1982). Zylinderartige Membranläsionen sind typischerweise bei einem C9:C5b-8 Verhältnis von 6:1 zu sehen (BHAKDI and TRANUM-JENSEN 1986, DANKERT and ESSER 1985).

1.8 Regulation des Komplementsystems

Da eine Komplementaktivierung zur Zellschädigung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt, müssen sich körpereigene Zellen vor den toxischen Aktivierungsprodukten schützen. Eine unkontrollierte Aktivierung würde zudem die Konzentrationen der Komplementproteine sehr schnell reduzieren, so dass diese für die Abwehr nicht mehr zur Verfügung stünden (MOLLNES and LACHMANN 1988). Um diese Vorgänge zu verhindern sind die aktivierten Komponenten unter der Kontrolle von verschiedenen Regulatorproteinen. Die Bedeutung der Regulation geht aus der hohen Anzahl von Regulatorproteinen hervor (Tab.1.2, 1.3).

1.8.1 Regulation der CP-Aktivierung

Die Aktivierung des CP ist unter der Kontrolle des C1-Inhibitors (C1-Inh), welcher kovalent an die aktivierten Moleküle C1r und C1s bindet und sie dadurch sehr schnell vom Antikörper-Antigen-C1q-Komplex entfernt. In diesem Komplex hat C1s sein Potential C4 zu spalten verloren. Der inhibitorische Effekt des C1-Inh kann durch effiziente Aktivatoren (z.B. Immunkomplexe) überwunden werden. Der C1-Inh wird abgelöst, wenn zwei oder mehr der „Köpfe“ von C1q mit einem möglichen Aktivator interagieren und damit eine konformationelle Änderung innerhalb des C1q-Komplexes induzieren.

Der C1-Inh ist normalerweise in hohen Konzentrationen im Plasma vorhanden. Eine Defizienz des C1-Inh wurde als die Ursache des hereditären Angioödems beschrieben (DONALDSON *et al.* 1985). Bei dieser Erkrankung liegt eine Defizienz des C1-Inh vor, welche autosomal dominant vererbt wird und mit Attacken von lokalisierter, erhöhter Gefäßpermeabilität assoziiert ist. Diese gehen vermutlich auf die kinin-ähnliche Aktivität des C2b-Fragments zurück, das im Überschuß gebildet wird. Der C1-Inh ist wahrscheinlich auch bei der Kontrolle der MASP-1

und MASP-2 Proteine beteiligt und agiert als Inhibitor von Plasmin, Kallikrein und den Gerinnungsfaktoren XIa und XIIa (RATNOFF *et al.* 1969, WUILLEMIN *et al.* 1995).

1.8.2 Regulation der Anaphylatoxinaktivität

Die bei der Aktivierung des CP, LP und AP entstehenden Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a sind Peptide von 74-77 Aminosäuren Länge, die durch Spaltung einer Arg-X (X=jede beliebige Aminosäure) Verbindung in der α -Kette von C3, C4 oder C5, entstehen. Diese Peptide vermitteln zahlreiche inflammatorische Wirkungen und sind bei der Immunregulation beteiligt (HUGLI *et al.* 1981). Die Potenz der drei Anaphylatoxine nimmt von C5a über C3a bis C4a ab. C5a ist im immunologischen Kontext sicherlich das weitaus wichtigste Anaphylatoxin. Durch Interaktion mit einem G-Protein gekoppelten Rezeptor (C5aR) vermittelt C5a zusätzlich eine umfangreiche Stimulation von Neutrophilen, die eine Chemotaxis und Superoxidproduktion einschließt (WETSEL 1995). Die Aktivität der Anaphylatoxine wird im Blut durch den Anaphylatoxininaktivator (Carboxypeptidase N) kontrolliert, der durch Entfernung des C-terminalen Arg die Peptide inaktiviert.

1.8.3 Regulation der C3-Aktivierung

Da das C3-Molekül als zentrales Element in der Komplementkaskade fungiert und in der frühen Phase sowohl durch den AP, als auch durch den CP aktiviert wird, ist die Kontrolle dieses Moleküls entscheidend für die Zellintegrität des Organismus. Die C3-Konvertasen (C3bBb und C3(H₂O)Bb) würden ohne Kontrolle sehr schnell durch den positiven Rückkopplungsmechanismus sämtliches C3 zu dem toxischen C3b aktivieren und verbrauchen. Ein sehr wichtiges Molekül ist Faktor I, eine hochspezifische Serinprotease, die in der Regulation der C3/C5-Konvertasen beider Aktivierungswege eingreift. Das Enzym benötigt, um die α' -Kette von C4b oder C3b zu spalten, Kofaktoren, wie das C4-bindende Protein (C4bp) (SCHARFSTEIN *et al.* 1978, FUJITA *et al.* 1978) oder Faktor H. Dieser Schritt führt zum schnellen Verlust der biologischen Aktivität von C4b und C3b. Zwei Membranproteine, der Komplementrezeptor Typ 1 (complement receptor type 1, CR1, CD35) und das Membran-Kofaktor-Protein (membrane cofactor protein, MCP, CD46) können ebenso als Kofaktoren für Faktor I dienen und zur Spaltung von C3b und C4b führen. Im Gegensatz zu C4bp oder Faktor H, können die membranständigen Proteine zusammen mit Faktor I sowohl C3b als auch C4b spalten (LAW 1988) (Tab. 1.4).

Neben der Kofaktoraktivität für Faktor I können die Regulatorproteine den Zerfall der C3/C5-Konvertasen-Komplexe beschleunigen (decay acceleration activity). Die fünf Regulatorproteine (FH, C4bp, CR1, MCP, DAF) sind strukturell miteinander verwandt, da sie beinahe ausschließlich aus so genannten SCR- (short consensus repeat) bzw. CCP- (complement control

protein) Domänen aufgebaut sind. Während die löslichen Proteine Faktor H und C4bp sowohl den Zerfall der C3-Konvertase beschleunigen, als auch die Kofaktoraktivität für C3b bzw. C4b vermitteln, können die Membranproteine MCP und das GPI-verankerte DAF (decay accelerating factor, CD55) jeweils nur eine der zwei regulativen Funktionen ausüben (wie ihre Namen nahelegen), diese aber sowohl auf C3b als auch auf C4b. CR1 hingegen hat die Fähigkeit alle vier Funktionen auszuüben und zusätzlich als ein Rezeptor für C3b und C4b zu fungieren (WEISMAN *et al.* 1990) (Tab. 1.4)

Faktor I spaltet C3b an zwei Positionen in der α' -Kette und es entsteht iC3b und C3f (HARRISON and LACHMANN 1980) (Abb. 1.2). iC3b wird weiter durch verschiedene Serumproteasen zu C3c, C3dg und C3d abgebaut. Während iC3b, C3dg und C3d keine weitere Bedeutung in der Komplementaktivierung haben, sind sie als Liganden für die Rezeptoren CR2 (iC3b, C3dg und C3d) und CR3 (iC3b) wichtig. Die Interaktion von C3-Fragmenten auf Immunkomplexen oder Zielzellen mit C3-Rezeptoren von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten ist wichtig für die Beseitigung von Immunkomplexen (MORGAN and WALPORT 1991) und der Stimulation von Immunantworten des spezifischen Immunsystems (FEARON and LOCKSLEY 1996, CARROLL 1998) (Tab. 1.5). Faktor I spaltet an zwei Stellen an der α' -Kette von C4b an jeder Seite des Thioesters und es entstehen die Fragmente C4c und C4d (FUJITA and NUSSENZWEIG 1979).

	Zerfallsbeschleunigung		Kofaktoraktivität für Faktor I	
	C3bBb	C4b2a	C3b	C4b
Faktor H/FHL-1	+	-	+	-
C4bp	-	+	-	+
CR1	+	+	+	+
MCP	-	-	+	+
DAF	+	+	-	-

Tabelle 1.4: Funktion der Komplementkontrollproteine

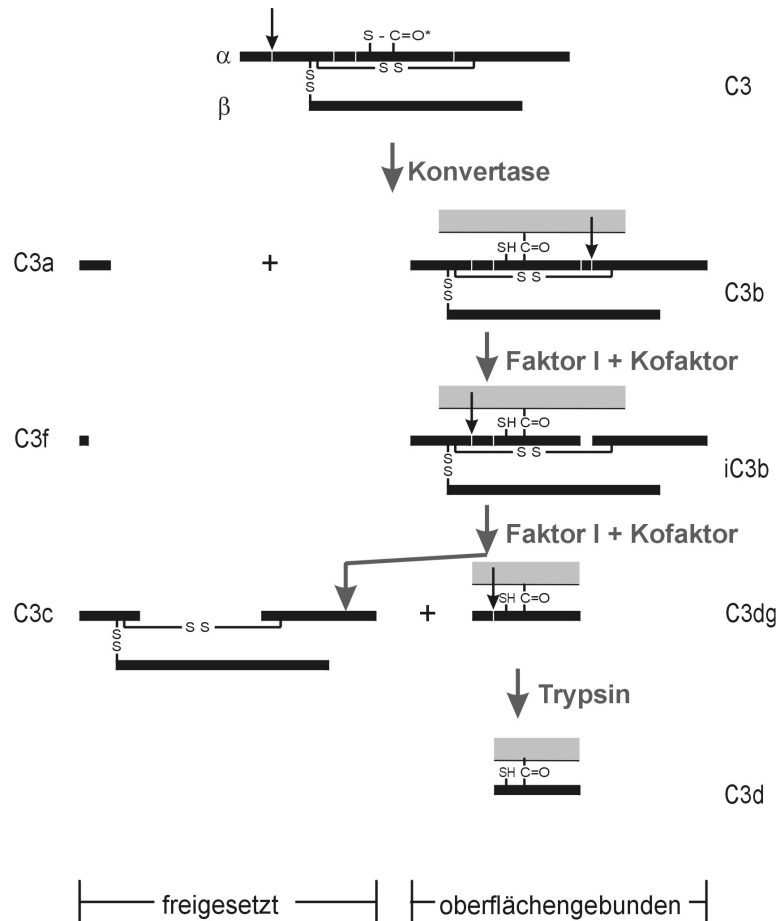


Abb. 1.2: Schematische Struktur von C3. Spaltungsstellen und die entstehenden C3-Fragmente sind dargestellt. Faktor I spaltet C3b an drei verschiedenen Stellen.

Type	Ligand	Verteilung	Funktion
CR1 (CD35)	C3b>C4b>iC3b	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Erythrozyten, B- und T-Zellen, Follikuläre dendritische Zellen	Immunadhärenz, Phagozytose, Immunkomplexbildung, Lokalisation der Immunkomplexe in Keimzentren, Aktivierungskontrolle
CR2 (CD21)	C3dg/C3d>iC3b EBV, CD23, IFN- γ	B-Zellen, aktivierte T-Zellen, epitheliale Zellen, Follikuläre dendritische Zellen (CD21L)	B-Zellaktivierung, Lokalisation der Immunkomplexe in Keimzentren, Schutz der Keimzentrumszellen vor Apoptose
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b, Faktor X, ICAM-1, Faktor H, Fibrinogen, LPS, bestimmte Kohlenhydrate	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen, Follikuläre dendritische Zellen, T-Zellen, Mastzellen	Phagozytose, Zelladhärenz, Signaltransduktion, oxydativer Burst
CR4 (CD11c/CD18)	iC3b, Fibrinogen	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen, T-Zellen, Mastzellen	Phagozytose, Zelladhärenz

Tabelle 1.5: Komplementrezeptoren

1.8.4 Regulation des Membranangriffskomplexes

Auch die lytische Aktivität des MAC wird durch eine Reihe löslicher und membrangebundener Proteine gesteuert. Die Regulation findet sowohl vor der Integration in die Membran als auch während der Porenbildung (Assoziation von C8 und Polymerisation von C9) statt. Die Inhibitoren der flüssigen Phase binden an verschiedene Zwischenprodukte des MAC, v.a. an den C5b-7-Komplex, sobald er von den Zielzellen diffundiert und nebenstehende Wirtszellen schädigen könnte. Das wichtigste Mitglied dieser löslichen inhibitorischen Proteine ist das 80

kDa S-Protein (Vitronectin) (JENNE and STANLEY 1985). Andere Serumlipoproteine wie das Apolipoprotein SP-40,40 (Clusterin) kann den C5b-7-Komplex auf ähnliche Weise inhibieren (MURPHY *et al.* 1988, HAMILTON *et al.* 1993). SP-40,40 wird in hohen Konzentrationen in Seminalplasma gefunden und spielt vermutlich eine Rolle bei dem Schutz der Spermatozoen vor der Komplementattacke (JENNE and TSCHOPP 1989, O'BRYAN *et al.* 1990).

Zu den membrangebundenen Inhibitoren gehört ein Protein, mit 65 kDa das als „C8 binding protein“, „MAC inhibiting factor“ oder als „homologous restriction factor“ bekannt ist. Wie der Name impliziert, bindet das Protein an C8 und interferiert mit dem subsequenten Aufbau des MAC (ZALMAN *et al.* 1986). Ein kleineres Protein (19 kDa) wurde als Oberflächenantigen CD59 identifiziert und als Protektin, HRF29 (homologous restriction factor) oder MACIF (MAC-inhibiting factor) bezeichnet (MERI *et al.* 1990). Es bindet an den C5b-8 Komplex und verhindert die Konformationsänderung des ersten gebunden C9-Moleküls, das für die Bindung von weiteren C9 und die folgende Polymerisation notwendig ist (LACHMANN 1991). CD59 hat einen GPI-Anker und ist auf den meisten Zellmembranen und Geweben vorhanden.

1.9 Faktor H und FHL-1/Reconectin

In dieser Arbeit wird im Besonderen die Funktion und Struktur der Regulatorproteine Faktor H und FHL-1 untersucht, die aus diesem Grunde hier detaillierter vorgestellt werden sollen. Da diese Moleküle die wichtigsten Regulatoren des AP darstellen, bereits an einem frühen Punkt der Komplementaktivierung eingreifen und eine zentrale Bedeutung für die Unterscheidung von Fremd- und Wirtsstrukturen haben, waren sie in physiologischen und pathophysiologischen Fragestellungen Gegenstand der Untersuchungen.

1.9.1 Struktur von Faktor H und FHL-1/Reconectin

Faktor H ist ein Plasmaglykoprotein aus einer einzigen Proteinkette mit einem Molekulargewicht von 150 kDa. Im Plasma liegt es in einer Konzentration von 300-400 µg/ml vor. Faktor H ist aus 20 unabhängig gefalteten Proteindomänen aufgebaut, den so genannten „short consensus repeats“ (SCR) (Abb. 1.3). Jede dieser Einheiten besteht aus 60-70 Aminosäuren, die vier konservierte Cysteine enthalten und eine kompakte globuläre Domäne aus β -Faltblättern bilden (BARLOW *et al.* 1992, BARLOW *et al.* 1993).

Ein weiteres alternativ prozessiertes Produkt des Faktor H-Gens kodiert für das Faktor H ähnliche Protein-1 (FHL-1, factor H like protein-1), auch als Reconectin (regulator of complement and fibronectin-like protein) bezeichnet. Dieses 42 kDa Protein, welches aus den ersten sieben SCRs von Faktor H besteht und vier zusätzliche Aminosäurereste (Ser-Phe-Tyr-Leu) am C-terminalen Ende besitzt, liegt im Plasma in einer Konzentration von 5-20 µg/ml vor (SCHWAEBLE *et al.* 1987, ZIPFEL and SKERKA 1999) (Abb. 1.3).

Das Gen für Faktor H und FHL-1 liegt auf dem Chromosom 1q32, innerhalb des RCA (regulators of complement activation)-Genclusters (RODRIGUEZ DE CORBOBA *et al.* 1985, 1987, HING *et al.* 1988, HEINE-SUNER *et al.* 1997). Die Struktur der kodierenden Sequenz für das humane Faktor H-Gen (MALE *et al.* 2000) entspricht in etwa der Struktur der murinen Sequenz (VIK *et al.* 1988). Das humane Gen besteht aus einem über 95 kb Bereich und enthält 22 Exons, von denen jedes für ein einzelnes SCR kodiert, sowie für das Signalpeptid und die spezifische Domäne für FHL-1. Eine Ausnahme bildet das zweite und dritte Exon, die beide für SCR 2 kodieren. Zwischen dem für SCR 7 und SCR 8 kodierenden Bereich befindet sich beim Menschen ein zusätzliches Exon, welches für den spezifischen C-terminalen Bereich des alternativ prozessierten 1,8 kb FHL-1-Transkriptes kodiert (VIK *et al.* 1988, SIM *et al.* 1993). Sowohl aus muriner, als auch aus humaner Leber läßt sich für Faktor H ein Transkript von 4,4 kb isolieren (KRISTENSEN and TACK 1986, RIPOCHE *et al.* 1988a).

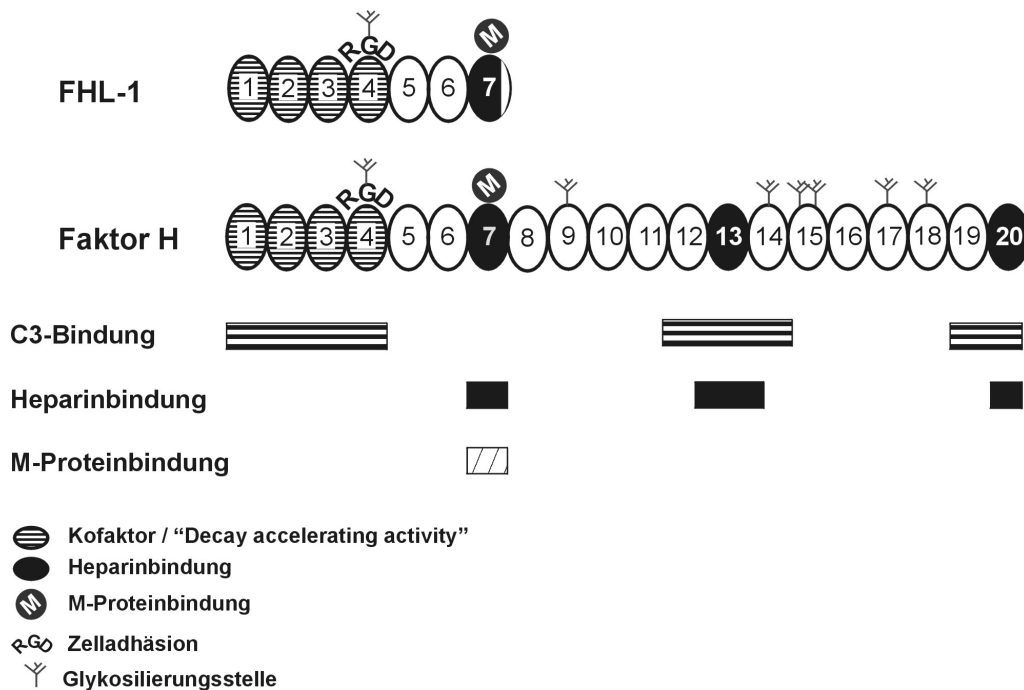


Abb. 1.3: SCR-Struktur von Faktor H und FHL-1/Reconnectin. Die repetitiven Einheiten (SCRs) der individuellen Proteine sind konsekutiv durchnummeriert. Homologe SCR sind durch vertikalen Vergleich untereinander geschrieben.

1.9.2 Funktion von Faktor H und FHL-1/Reconnectin

1.9.2.1 Faktor H im AP

Faktor H hat eine zentrale Funktion im Komplementsystem, da es der entscheidende Regulator des ständig aktivierten AP im Plasma ist und die Anzahl der funktionell aktiven C3b-Moleküle bestimmt. Somit greift Faktor H auf einer frühen Ebene der AP-Aktivierung ein. Faktor H reguliert die AP-Aktivierung indem es mit Faktor B um die C3b-Bindestelle konkurriert. Zudem beschleunigt Faktor H die Dissoziation des C3bBb-Komplexes und hat eine Kofaktorfunktion

für die Protease Faktor I, die zu einer irreversiblen proteolytischen Inaktivierung von C3b führt (WHALEY and RUDDY 1976, WEILER *et al.* 1976, PANGBURN *et al.* 1977) (Abb. 1.4).

Die im Plasma kontinuierlich und spontan gebildeten C3b und C3(H₂O) werden beinahe komplett durch Faktor H gebunden und konsekutiv von Faktor I gespalten und inaktiviert. Das kontinuierlich gebildete C3(H₂O)Bb wird sehr schnell durch Faktor H aufgelöst. Trotzdem bedingt dieser Vorgang die Bildung von einigen reaktiven C3b-Molekülen, die in einer zufälligen, nicht-spezifischen Weise an nahestehende Plasma- und Oberflächenmoleküle binden und ihre toxische Aktivität ausüben (FISHELSON *et al.* 1984). Das Schicksal der an Oberflächen gebundenen C3b-Moleküle wird durch den Aktivator- oder Nicht-Aktivatorcharakter solcher Oberflächen bestimmt. Molekulare Strukturen auf der Zieloberfläche determinieren, ob die Balance der Komplementproteine gestört wird und somit eine Aktivierung und Ablagerung auf der Oberfläche fokussiert wird. Die Fähigkeit des AP zwischen Aktivator und Nicht-Aktivatorstrukturen zu unterscheiden hängt von der Faktor H-Bindung an abgelagertes C3b ab. Die Affinität von Faktor H ist relativ hoch für C3b-Moleküle, die auf Wirtsstrukturen („Nicht-Aktivatoren“) abgelagert sind, während C3b auf fremden Oberflächen („Aktivatoren“) (z.B. invadierende Mikroben und veränderte oder geschädigte Wirtszellen) eine relativ geringe Affinität für Faktor H besitzt. Im letzteren Fall schreitet die AP-Aktivierung voran und führt zur Opsonisierung und darauffolgenden Zerstörung der Strukturen (FEARON and AUSTEN 1977, HORSTMANN *et al.* 1985; PANGBURN and MÜLLER-EBERHARD 1983, 1986) (Abb. 1.4). Ob ein Partikel als Aktivator (Auslösung massiver C3-Aktivierung und C3b-Ablagerung auf der Oberfläche) oder Nicht-Aktivator (effektive Limitierung dieser Reaktion) fungiert, wird somit nur durch die relative Affinität von gebundenem C3b an Faktor H (negativer Regulator) und Faktor B (positiver Regulator) bestimmt. Das Verhältnis der Affinität zu Faktor H und Faktor B ist hauptsächlich durch die verminderte Affinität von Faktor H an Aktivatoroberflächen (ca. 10-fach niedriger) beeinflusst, während Faktor B die gleiche Affinität zu Aktivator und Nicht-Aktivatoroberflächen besitzt.

Als Sicherung sind bei ausgelöster Amplifikationsschleife und überwältigter Faktor H-Kontrolle, einige Wirtszellen weiterhin zu einem gewissen Grade durch die drei Membranproteine CR1 (CD35) (FEARON 1979), DAF (decay accelerating factor, CD46) (NICHOLSON-WELLER *et al.* 1982) und MCP (membrane cofactor protein, CD56) (SEYA *et al.* 1986) vor der Komplementattacke geschützt. Strukturen, denen die Membranregulatoren CR1, DAF und MCP fehlen, wie z.B. den Basalmembranen der Nierenglomeruli, sind jedoch im besonderen Maße von dem Schutz durch Faktor H abhängig (HOGASEN *et al.* 1998).

1.9.2.2 C3b-Bindung

1.9.2.3 Glykosaminoglykan/Heparin-Bindung

1.9.2.4 Faktor H-Interaktionen und Chemotaxis

17

et al. 1992) und dem Komplement-reaktivem Protein CRP (MOLD *et al.* 1984, ARONEN *et al.* 1993, JARVA *et al.* 1999). Faktor H bindet an den Mac-1 (CD11b/CD18) Rezeptor von Neutrophilen und ist in der Lage dadurch die Produktion von Wasserstoffperoxid zu induzieren (DISCIPIO *et al.* 1998). Ebenso ist Faktor H ein Ligand des Adhäsionsmoleküls L-Selektin und induziert dadurch eine TNF- α Sekretion (MALHOTRA *et al.* 1999). Zudem ist Faktor H ein Bindungspartner für die auf verschiedenen Tumoren stark exprimierten Proteine Knochensialoprotein (BSP) und Osteopontin (OPN, ETA-1) (FEDARKO *et al.* 2000).

1.9.2.5 FHL-1/Reconnectin

FHL-1 besitzt dieselben komplementregulativen Funktionen wie Faktor H (ZIPFEL and SKERKA 1999). Zusätzlich dient FHL-1 jedoch als Adhäsionsmolekül und hat zellspreitende Aktivität, die über die RGD-Domäne in SCR 4 vermittelt wird. Diese bindet vermutlich an einen Rezeptor vom Integrintyp (HELLWAGE *et al.* 1997a).

FHL-1 bindet zudem mit höherer Affinität als Faktor H (HORSTMANN *et al.* 1988) an das M-Protein von *Streptococcus pyogenes* (KOTARSKY *et al.* 1998). Da Mikroorganismen, die in den menschlichen Körper eindringen, als Aktivatorstrukturen erkannt werden und mit C3b beladen und attackiert werden, nutzen Streptokokken (JOHNSSON *et al.* 1998) und andere pathogene Keime FHL-1 und Faktor H als Komplementinhibitoren. Ähnliche Strategien machen sich z.B. der *Escherichia coli* Stamm K1 (PLUSCHKE *et al.* 1983), *Neisseria gonorrhoeae* (RAM *et al.* 1998a, b), *Yersinia enterocolitica* (CHINA *et al.* 1993), das HI-Virus (STOIBER *et al.* 1995, 1996, 1997) und der Cestode *Echinococcus granulosus* (DIAZ *et al.* 1997) zu nutze.

Sowohl die komplementregulativen Funktionen, als auch die Interaktion mit Entzündungsmediatoren und -zellen, sowie mit Pathogenen, charakterisieren sowohl Faktor H als auch FHL-1 als wesentliche antiinflammatorische Proteine in der Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen auf verschiedenen Ebenen der Reizantwort.

1.9.3 Synthese und Promotorregulation von Faktor H und FHL-1/Reconnectin

Factor H und FHL-1 werden konstitutiv in der Leber exprimiert und sezerniert (MORRIS *et al.* 1982, SCHWAEBLE *et al.* 1987, MISASI *et al.* 1989, ZIPFEL and SKERKA 1999), wie durch immunhistologische und Northern-Blot Analysen nachgewiesen werden konnte. Der Zelltyp, der für die Synthese verantwortlich ist, ist hingegen noch nicht bekannt und es ist unklar, ob eine periphere Synthese die Konzentrationen in den einzelnen Geweben mitbestimmt. Zusätzlich zur Leber zeigen andere Zellen, wie Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Mesangialzellen, Myoblasten, Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone eine Expression von Faktor H (RIPOCHE *et al.* 1988b, KATZ and STRUNK 1988, KATZ *et al.* 1993, 1995, SCHWAEBLE *et al.* 1991b, GASQUE *et al.* 1992, 1996, VAN DEN DOBBELSTEEN *et al.* 1994, LEGOEDDEC *et al.*

1995, GERRITSMA *et al.* 1997, FRIESE *et al.* 1999). In diesen Analysen blieb jedoch meist ungeklärt, ob sich die Synthese vornehmlich auf Faktor H bezieht oder ob auch das kürzere FHL-1-Transkript exprimiert wird. Abhängig vom Zelltyp werden diese Komplementregulatoren konstitutiv oder nach Induktion durch Zytokine und andere Mediatoren synthetisiert. Interferon- γ und Glukokortikoide sind Modulatoren der Expression, aber auch Interleukin-1, Tumor Nekrose Faktor- α und Lipopolysaccharide beeinflussen die Synthese (Tab. 1.6).

Der humane FHL-1/Faktor H-Promotor ist kürzlich beschrieben worden (WARD *et al.* 1997, WILLIAMS and VIK 1997). Durch Sequenzanalyse sind verschiedene potentielle regulatorische Elemente bekannt. Typische TATA- oder CCAAT-Boxen fehlen jedoch in der Promotorsequenz. Auch andere Komplementproteine, wie C4 (YU 1991), C2 (HORIUCHI *et al.* 1990), C1-Inh (CARTER *et al.* 1991), C4bp (RODRIGUEZ DE CORDOBA *et al.* 1991), MCP (CUI *et al.* 1993), CR1 (VIK and WONG 1993) besitzen keine TATA-Sequenz. Drei responsive Elemente für Glukokortikoide (GRE) sind bei den Positionen -808, -331 und -232 aufzufinden. Andere potentielle regulatorische Elemente umfassen zwei Akut-Phase-Signale (APS) bei -716 und -407, zwei responsive Elemente für cAMP (CREB) bei -688 und -546 und eine Aktivierungsstelle für IFN- γ (GAS) bei -345. Vergleichende Sequenzanalysen des humanen Faktor H-Promotors mit der murinen Promotorsequenz (VIK 1996) zeigen eine Identität von über 60 % in der Region -357 bis -83. Die Region von -280 bis -264 zeigt sogar eine Übereinstimmung von 83 %. Insbesondere eine 7/7 Übereinstimmung mit der Histon-H4-Gen-Bindestelle (H4TF-1) in der Position -273 ist vorhanden. Obwohl die Sequenz ursprünglich im H4-Histongen identifiziert wurde, ist sie bereits in anderen induzierbaren humanen Genen nachgewiesen worden und stellt ein häufiges regulatorisches Element dar. Die H4TF-1-Sequenz liegt innerhalb einer Region von 153 bp, die bei der Induktion des murinen Faktor H durch IFN- γ verantwortlich ist. Ob dieses Element für die Induktion verantwortlich ist, ist noch unklar (VIK *et al.* 1988, VIK 1996).

EINLEITUNG

Zellen/Gewebe	Stimulus	FHL-1	Factor H	Referenz
<i>Lebergewebe</i>		+	+	MORRIS <i>et al.</i> 1982, SCHWAEBLE <i>et al.</i> 1987, FRIESE <i>et al.</i> 1999
<i>Leberzelllinien</i> HepG2, HepG3, HepG4, HepG3B, H-4, Hep3b		-	-	
HUH7	IFN- γ Dexamethason	+ ↑ no effect	+ ↑ ↑	
<i>Monozyten</i> U937		+	+	MALHOTRA and SIM 1985, MINTA 1988, LAPPIN and WHALEY 1990, SCHWAEBLE <i>et al.</i> 1991b, LEMERCIER <i>et al.</i> 1992, FRIESE <i>et al.</i> 1999
	PMA IL-1 LPS IFN- α , - β or - γ TNF- α Dexamethason	ND ND ND ↑ ↑ ↑	↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	
<i>Fibroblasten</i> Hautfibroblasten, MRC-5		+	+	KATZ and STRUNK 1988, SCHWAEBLE <i>et al.</i> 1991b, FRIESE <i>et al.</i> 1999
	IFN- γ LPS IL-1 TNF- α Retinsäure Dexamethason Serum	↑ no effect ↓ ↓ ↑ ↑ ↑	↑ no effect ↓ ↓ ↑ ↑ ↑	
<i>Endothelzellen</i> HUVEC		+	+	RIPOCHE <i>et al.</i> 1988b, BROOIMANS <i>et al.</i> 1989, SCHWAEBLE <i>et al.</i> 1991b, GUC <i>et al.</i> 1993, VASTAG <i>et al.</i> 1998
	IFN- γ LPS IL-1 TNF- α ECGF TCGF(1-2 %) TCGF(5-10 %) Retinsäure Dexamethason	↑ ↓ ↓ no effect ND ND ND ↑ ↑ ↑	↑ ↓ ↓ no effect no effect ↓ ↑ ↑ ↑ ↑	
Endothelzellen EAhy926	IFN- γ Dexamethason	- ↑ ↑	- no effect no effect	FRIESE <i>et al.</i> 1999
<i>glomeruläre Mesangiumzellen</i>	TCGF(5 %) IFN- γ IL-1 IL-2 IL-6 TNF- α	ND ND ND ND ND ND	+ ↑ ↑ ↑ no effect no effect no effect	VAN DEN DOBBELSTEEN <i>et al.</i> 1994
<i>Myoblasten und Rhabdomyosarcoma</i> CRL1598, HTB153		+	+	LEGOEDOC <i>et al.</i> 1995
	IFN- γ IL-1 β	↑ no effect	↑ no effect	
<i>nasopharyngealis Carcinom</i> HEp2		+	+	KATZ <i>et al.</i> 1993
	IFN- γ IL-1 TNF- α	ND ND ND	↑ ↑ ↑	
<i>B-cells</i> BL-41, Bjab, Ramos, Raji		+?	-	ERDEI <i>et al.</i> 1994

Astroglioma CB193, T98G		+	+	GASQUE <i>et al.</i> 1992, GASQUE <i>et al.</i> 1995
	IFN- γ	↑	↑	
	IL-1 β	no effect	no effect	
	TNF- α	↑	↑	
	IL-6	ND	↑	
	IL-2	no effect	no effect	
	Dexamethason	↑	↑	
	PMA	no effect	no effect	
Oligodendrozyten HOG		ND	+	GASQUE and MORGAN 1996
	IFN- γ	ND	↑	
	IL-1 β	ND	no effect	
	IL-2	ND	no effect	
	TNF- α	ND	↑	
	Dexamethason	ND	no effect	
	PMA	ND	no effect	
Neuroblastoma IMR32, SKN-SH		ND	+	GASQUE <i>et al.</i> 1996
	IFN- γ	ND	no effect	
	IL-1 β	ND	no effect	
	TNF- α	ND	↑	
rheumatoide Arthritis				DE CEULAER <i>et al.</i> 1980, GUC <i>et al.</i> 1993, FRIESE <i>et al.</i> 1999
Synovialflüssigkeit				
Makrophagen		ND	+	
Synovialmembran				
Makrophagen		ND	+	
Monozyten		ND	+	
Fibroblasten		++	+	
	IFN- γ	↑	↑	
	TNF- α	no effect	no effect	
	Dexamethason	↑	↑	

Tabelle 1.6: Expression von Faktor H und FHL-1/Reconnectin in hepatischen und extrahepatischen Zellen und Geweben. Die Immunmediatoren, die zur Induktion verwendeten wurden sind aufgezeigt. Frühe Studien haben sich ausschließlich auf Faktor H konzentriert, während neue Studien auch FHL-1 gesondert berücksichtigen.

+: konstitutiv exprimiert; -: nicht exprimiert; ↑, ↓: Induktion/Repression der Synthese durch Stimulus; no effect: kein Effekt mit Stimuli; ND: nicht determiniert. (modifiziert nach FRIESE *et al.* 1999).

1.10 Faktor H-Genfamilie

Faktor H und FHL-1 sind Mitglieder der Faktor H-Proteinfamilie, die bisher aus sechs Plasmaproteinen besteht (ZIPFEL and SKERKA 1994) (Abb. 1.5). Alle Mitglieder dieser Familie sind sezernierte Proteine, die strukturell und immunologisch verwandt sind, starke Sequenzhomologien aufweisen und ausschließlich aus den SCR-Domänen aufgebaut sind (Abb. 1.5). Die Gene für die Mitglieder der Faktor H-Familie liegen auf dem Chromosom 1q32, innerhalb des RCA (regulators of complement activation)-Genclusters (RODRIGUEZ DE CORBOBA *et al.* 1985, 1987, HING *et al.* 1988, HEINE-SUNER *et al.* 1997, DIAZ-GUILLEN *et al.* 1999). Diese Region, enthält weitere Gene von C3b- und C4b-bindenden Proteinen. Sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus existieren noch weitere dem Faktor H ähnliche Transkripte mit Größen von 1,4 bis 5,5 kb (FONTAINE *et al.* 1989, VIK *et al.* 1990, SCHWAEBLE *et al.* 1987, 1991a, b). Mit Faktor H-Antiserum lassen sich neben Faktor H etwa zehn weitere kreuzreagierende Proteine unterschiedlicher molekularer Masse im humanen Plasma nachweisen (FONTAINE *et al.* 1989, ZIPFEL and SKERKA 1994, KÜHN and ZIPFEL

1996). Diese Faktor H-verwandten Proteine, (Factor H-related proteins, FHRs, siehe Abb. 1.2) sind im Gegensatz zu FHL-1 von eigenen Genen kodiert (ZIPFEL and SKERKA 1994, SKERKA *et al.* 1995, RODRIGUEZ DE CORDOBA *et al.* 1999). Von den vier bekannten FHRs (FHR-1, 37-43 kDa; FHR-2, 24-29 kDa; FHR-3, 45-56 kDa, FHR-4, 86 kDa) besitzen jeweils die zwei C-terminal gelegenen Domänen eine sehr hohe Homologie zueinander und zu den beiden C-terminalen Domänen von Faktor H. Andere Domänen von FHRs sind homolog zu Faktor H-Domänen SCR 6-9 und 18 (Abb. 1.5) (SKERKA *et al.* 1991, TIMMANN *et al.* 1991, SKERKA *et al.* 1992, SKERKA *et al.* 1993, KÜHN and ZIPFEL 1996, SKERKA *et al.* 1997, HELLWAGE *et al.* 1997b).

Die Funktion der Faktor H-verwandten Proteine ist bisher noch weitgehend ungeklärt. FHR-1 und FHR-2 wurden zusammen mit Lipopolysaccharid (LPS)-bindendem Protein (LBP) als wichtigster Proteinanteil in einem Komplex aus Apolipoprotein A-I, Phospholipiden und Proteinen beschrieben. Dieser Komplex bindet an CD14 und verstärkt die adhäsive Reaktion neutrophiler Granulozyten auf LPS (PARK and WRIGHT 1996). FHR-3 bindet an Heparin und sowohl FHR-3 als auch FHR-4 besitzen eine Bindestelle für den C3d Teil von C3b, mit dem sie interagieren können. FHR-3 und FHR-4 können als Kofaktor für Faktor I dienen, besitzen aber keine „decay accelerating“ Aktivität (HELLWAGE *et al.* 1999). FHR-4 ist zudem ein Apolipoprotein, das in triglyzeridreichen Partikeln vorhanden ist (SKERKA *et al.* 1997).

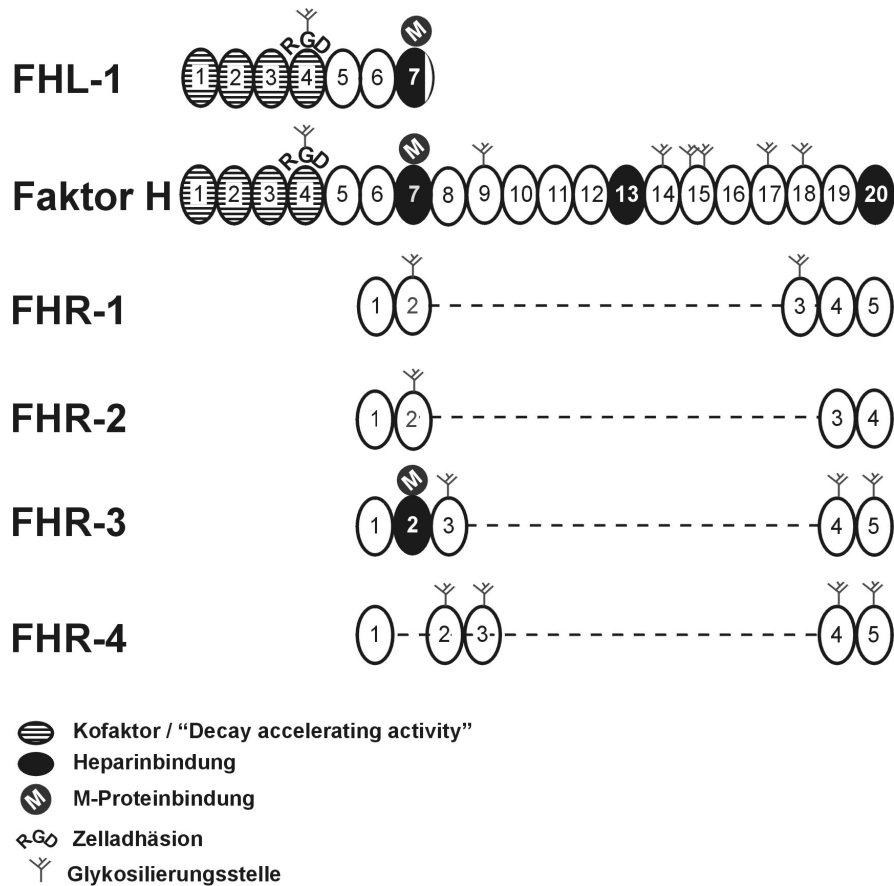


Abb. 1.5: SCR-Struktur der Mitglieder der Faktor H-Familie. Die repetitiven Einheiten (SCRs) der individuellen Proteine sind konsekutiv durchnummeriert. Homologe SCRs sind durch vertikalen Vergleich untereinander geschrieben. Zwischenräume sind durch eine unterbrochene Linie angezeigt und markieren die direkte Nachbarschaft der einzelnen SCRs. Putative N-Glykosilierungsstellen sind schematisch durch Kohlenhydratbäumchen dargestellt.

1.11 Komplementaktivierung und Erkrankungen

Das Komplementsystem ist bei mehreren verschiedenen Krankheitsprozessen beteiligt, da es als ubiquitäres System in beinahe allen Organen und Geweben vorkommt und durch die unterschiedlichsten Auslöser, wie z. B. durch Gewebeschäden, aktiviert wird. Es gibt vier wesentliche Mechanismen durch die das Komplementsystem in die Pathogenese von Erkrankungen eingreift: Genetische und erworbene Defizienzen, exzessive Gewebeschäden, Entzündungen und Neoplasien. Da das Feld sehr groß und umfassend ist, ist die Darstellung auf die Bereiche, in die Faktor H und/oder FHL-1 involviert sind, beschränkt.

1.11.1 Faktor H-Defizienz

Eine Faktor H-Defizienz ist bisher nur selten beschrieben worden (bis 1996 nur 15 Fälle (FIJEN *et al.* 1996)). Die betroffenen Personen zeigen eine erhöhte Infektanfälligkeit, da die ständige Komplementaktivierung die Konzentrationen der verfügbaren Komponenten, besonders C3, stark reduziert (5-10 % des Referenzwertes). Zudem ist die Anzahl zirkulierender

Immunkomplexe auf das 5-10-fache erhöht. Die Auswirkung einer Faktor H-Defizienz ist am Beispiel natürlich vorkommender Faktor H-defizienter Schweine untersucht worden (HOGASEN *et al.* 1995a, JANSEN *et al.* 1995). Diese Tiere leiden bei einer homozygoten Form (kein Faktor H vorhanden) unter einer membranproliferativen Glomerulonephritis (MPGN) vom Typ II, die durch Nierenversagen innerhalb weniger Wochen zum Tode führt. Ein Fall von humaner Faktor H-Defizienz wurde kürzlich auf molekularer Ebene aufgeklärt (AULT *et al.* 1997, SCHMIDT *et al.* 1999). Dabei wurde beschrieben, dass Mutationen in der Gensequenz der Cysteine in SCR 9 und 16, die für die Disulfidbrücken verantwortlich sind, zu einer Sekretionsstase des Faktor H-Moleküls im endoplasmatischen Retikulum führt. Das alternativ prozessierte Produkt aus SCR 1-7, FHL-1 wird dagegen normal synthetisiert und sezerniert und kann vermutlich einen Teil der Faktor H-Funktionen ersetzen, so dass das klinische Bild weniger ausgeprägt ist als bei den porcinen Defizienzen.

Bei lediglich verminderter Faktor H-Konzentration (heterozygote Faktor H-Defizienz) kann sich hingegen das hämolytisch-urämische Syndrom entwickeln. Diese Form des nicht-diarrhoeassoziierten HUS zeichnet sich durch Mikroangiopathien, Thrombozytopenien und Nierenschädigungen aus. Bei dieser Erkrankung scheint neben einer Beteiligung des Komplementsystems durch eine genetische Veränderung des Faktor H-Gens, ein zusätzliches Ereignis, vermutlich eine Infektion, mitverantwortlich und notwendig zu sein (WARWICKER *et al.* 1998, NORIS *et al.* 1999).

Nierenschäden stehen bei einer Faktor H-Defizienz im Vordergrund, da die Basalmembranen der Glomeruli keinen zusätzlichen Komplementschutz durch die membranständigen Regulatoren (MCP, DAF, CR1) besitzen. Durch die Ablagerung von C3b und die konsekutive Entzündungsreaktion nehmen Oberflächen ohne diese Regulatoren vornehmlich Schaden. Die Basalmembranen besitzen keine Komplementinhibitoren und dienen als Filter für zirkulierende Immunkomplexe. Da sich Immunkomplexe in unmittelbarer Nähe der Nierenbasalmembranen ansammeln und zur Komplementaktivierung führen, können somit das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) sowie MPGN Typ II entstehen (FIJEN *et al.* 1996, VOGT *et al.* 1995, WARWICKER *et al.* 1998, NORIS *et al.* 1999).

1.11.2 Komplement und rheumatoide Arthritis

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Autoimmunerkrankung mit einer Prävalenz von ca. 1 % in der Bevölkerung. Obwohl in der Aufklärung der Ätiologie und Pathogenese in der letzten Zeit Fortschritte gemacht wurden, bleiben die Erkenntnisse dennoch unvollständig (ZIFF 1990). Rheumatoide Arthritis ist charakterisiert durch eine chronische Entzündung der synovialen Gelenke und eine Infiltration durch Blutzellen, wie Gedächtnis T-Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen (JANOSSY *et al.* 1981, CUSH and LIPESKY 1988). Diese führen in den meisten Fällen zur progressiven Destruktion des Knorpels und der Knochen und es wird

angenommen, dass der Prozess hauptsächlich durch destruktive Enzyme (v.a. Matrix-Metalloproteinasen) vermittelt wird, die durch Zytokine induziert werden. Zudem ist eine deutliche Vermehrung von neuen Gefäßen und Zeichen einer systemischen Entzündung (z.B. erhöhte Konzentrationen der Akut-Phase-Proteine) zu verzeichnen. In schwereren Fällen sind ebenso die Gefäße und andere Organe mitbeteiligt und die Mortalität erhöht (PINCUS and CALLAHAN 1993). Die Komplementaktivierung ist zudem im pathophysiologischen Prozess der RA von großer Bedeutung, da in Anwesenheit von Komplementregulatoren die Komplementaktivierung und Gewebeschädigung experimentell vermindert werden konnte (GOODFELLOW *et al.* 1997, 2000). Aktivierte Produkte des Komplementsystems können in der Synovialflüssigkeit und im Blut von Patienten, die an aktiver RA leiden, nachgewiesen werden (MORGAN *et al.* 1988, BRODEUR *et al.* 1991, HOGASEN *et al.* 1995b). Produkte der Komplementaktivierung werden ebenso in der Synovia abgelagert (CORVETTA *et al.* 1992). Die Identifizierung der Komplementaktivierungsprodukte zeigt, dass in RA der AP den wesentlichen Anteil an der Komplementaktivierung trägt (BRODEUR *et al.* 1991). Da das für den Knorpel spezifische Kollagen Typ II ein Aktivator des AP ist, ist der Kontakt der Knorpelmatrix mit dem Plasma direkt in der lokalen Pathogenese und Aufrechterhaltung der RA beteiligt (HANAUKE-ABEL *et al.* 1982).

Aus therapeutischer Sicht ist aus den genannten Gründen die Komplementinhibition des AP, sowie die Mechanismen, mit denen sich die Synovia vor der Komplementattacke schützen können, von besonderem Interesse.

1.11.3 Komplement und maligne Tumore

Um in einem immunkompetenten Organismus zu überleben und zu proliferieren, müssen Tumorzellen die Immunabwehrmechanismen, einschließlich des Komplementsystems, kontrollieren. Durch die Expression von Neoantigenen und die veränderten Zuckerstrukturen sind Tumorzellen Auslöser des AP des Komplementsystems. Antikörper, die gegen die Neoantigene gerichtet sind, können zusätzlich den CP auslösen (NICULESCU *et al.* 1992, MATSUMOTO *et al.* 1997). Auf normalen kernhaltigen Zellen ist die Aktivierung von Komplement normalerweise durch die Zelloberflächenproteine MCP, DAF und CD59 reguliert. Verschiedene Studien zeigen, dass eine gesteigerte Expression von Komplementregulatoren auf Tumorzellen stattfindet (HAKULINEN and MERI 1994, BJORGE *et al.* 1994, HOFMAN *et al.* 1994, YAMAKAWA *et al.* 1994, BRASOVEANU *et al.* 1995, VARSANO *et al.* 1995, NIEHANS *et al.* 1996). Die Neutralisation von Komplementinhibitoren auf der Oberfläche von Tumorzellen durch Antikörper erhöht *in vitro* deutlich die Lyse durch Komplement (CHEUNG *et al.* 1988, SEYA *et al.* 1990, HAKULINEN and MERI 1994, YAMAKAWA *et al.* 1994, BRASOVEANU *et al.* 1995). Die einzige relevante Studie, die *in vivo* durchgeführt wurde, zeigt, dass die Vorbehandlung von Ratten mit dem Komplementinhibitor Crry/p65 die Überlebenszeit

der Tiere mit transplantierten Tumoren deutlich erhöht (BARANYI *et al.* 1994). Dieses unterstützt die Hypothese, dass die von Tumoren exprimierten Komplementinhibitoren eine wichtige Rolle in der Promotion des Tumorwachstums spielen.

Die bisher ausgebliebenen Erfolge bei klinischen Studien, bei denen maligne Tumorerkrankungen mit monoklonalen Antikörpern behandelt wurden, kann durch die Anwesenheit von stark exprimierten Komplementinhibitoren bedingt sein. Ebenso kann eine Inhibition dieser Komplementregulatoren eine ineffektive zytolytische Immunantwort gegen die Tumorzellen verstärken, ohne zusätzlich exogene Antikörper gegen spezifische Tumorantigene applizieren zu müssen. Bisher sind MCP, DAF und CD59 als von Tumoren überexprimierte Proteine bekannt, durch die sich die Krebszellen einen Wachstumsvorteil verschaffen. Das Plasmaprotein Faktor H oder ein verwandtes Molekül wurde als Tumormarker von Übergangszellkarzinomen der Blase beschrieben (KINDERS *et al.* 1998), während die pathophysiologische Relevanz noch ungeklärt ist. Dieses Protein reagiert mit polyklonalem Faktor H-Antiserum und wird von verschiedenen vesikalen, renalen und zervikalen Tumorzellen sezerniert. Zusätzliche Studien zeigten, dass dieses Protein als Tumormarker dient, da es mit dem Tumorgrad und -stadium korreliert (IRANI *et al.* 1999, HEICAPPELL *et al.* 1999, THOMAS *et al.* 1999). Zudem hat es die Fähigkeit die Komplementlyse zu reduzieren (COREY *et al.* 2000). Bisher ist nicht bekannt, ob durch die Expression oder Bindung von Faktor H an die Oberfläche der Tumorzellen, analog zu pathogenen Mikroorganismen, die Komplementaktivierung auf ihren Oberflächen vermindert werden kann und sie somit dem tödlichen Effekt der Komplementkaskade entkommen können.

1.12 Zielsetzung und Problemstellung

1. Da die Verteilung der Faktor H-Expression in verschiedenen humanen Organen weitgehend unklar ist, wurde untersucht, ob extrahepatische Zellen Faktor H lokal synthetisieren. Zudem wurde untersucht, ob das alternativ prozessierte Faktor H-Genprodukt, FHL-1/Reconectin, das im Vergleich zu Faktor H andere Funktionen besitzt, unterschiedlich synthetisiert wird und damit dessen funktionelle Differenzen unterstreicht. Verschiedene Entzündungsmediatoren wurden eingesetzt, um die induktive Differenz der beiden Genprodukte zu untersuchen.
2. Anschließend wurden für die hier nachgewiesenen modulierenden Mediatoren der Faktor H und FHL-1 Synthese eine Analyse des FHL-1/Faktor H-Promotors auf responsive Elemente durchgeführt, um die Genregulation des FHL-1/Faktor H-Gens genauer zu verstehen.
3. Da hier auf verschiedenen Ebenen gezeigt werden konnte, dass extrahepatische Zellen Faktor H und FHL-1 produzieren, wurde untersucht, ob eine autokrine Produktion der Proteine zur Protektion der sezernierenden Zellen vor dem vermehrt aktivierten und

destruierenden Komplementsystem in (i) entzündlichen (rheumatoider Arthritis) und (ii) karzinomatösen Prozessen (Glioblastom) beiträgt.

4. Abschließend wurde die regulative C3d-Bindestelle der natürlichen Faktor H-Mutante FHR-4 bestimmt, um relevante Aminosäurepositionen zu identifizieren, die für die C3d-Bindung von Faktor H notwendig sind und die protektiven, komplementregulativen Funktionen ausüben.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht gesondert angegeben, bei Biomol (Hamburg, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland) in der Reinheitsstufe „p.A.“ (zur Analyse) bezogen. Zur Herstellung der Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet, das gegebenenfalls für 20 min bei 121°C und 2×10^5 Pa autoklaviert wurde. Reaktionen mit DNA- oder Proteinproben wurden in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Sofern nicht gesondert angegeben, wurde für Zentrifugationsschritte eine Eppendorf Tischzentrifuge (Modell 5415C) verwendet. Die molekularbiologischen und proteinchemischen Methoden wurden, falls nicht abweichend vermerkt, nach SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt.

2.1 Allgemein verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Der verwendete TBE-Puffer wurde aus 89 mM Tris/Borat und 2,5 mM Na-EDTA mit einem pH von 8,0 hergestellt.

PBS-Puffer wurde unter Verwendung von 145 mM NaCl, 3,3 NaH₂PO₄ und 6,7 Na₂HPO₄ mit dem pH 7,3 hergestellt.

146 mM NaCl, 1,8 mM Na-5,5-Barbital und 3,2 mM 5,5-Diethylbarbitursäure bei einem pH von 7,4 wurde für die Herstellung des VBS-Puffers eingesetzt.

LB (Luria-Bertani)-Medium wurde mit 10 g tryptisch verdaulichem Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 l H₂O und pH 7,2 hergestellt. Bei Herstellung von Nährböden wurde zusätzlich 15 g Agar-Agar (Difco, Detroit, USA) zugegeben und für die Ampicillin-Selektion wurde 100 µg/ml Ampicillin (Boehringer Mannheim, Deutschland) hinzugefügt.

Für den 6x DNA-Probenpuffer wurden 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencanol FF und 30 % Glycerol in H₂O verwendet.

5x SDS-Probenpuffer wurde mit 1,52 g Tris, 50 ml Glycerin, 5 g SDS, 1 mg Orange G ad 100 ml H₂O (pH 6,8) hergestellt. Für reduzierende Gele wurde gegebenenfalls 2 % β-Mercaptoethanol oder 0,01 M Dithiothreitol (DTT) zum Ansatz hinzugefügt.

10x SDS-Elektrophoresepuffer wurde mit 30,4 g Tris, 144 g Glycin und 10 g SDS ad 1 l H₂O gewonnen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmide

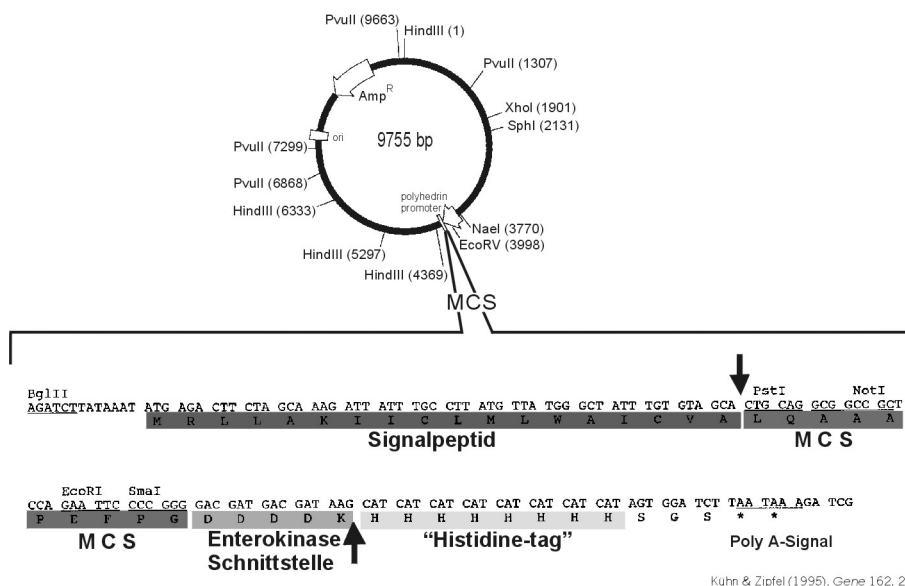
pCRTMII-Vektor (Invitrogen, San Diego, USA):

Der 3,932 kb große Klonierungsvektor wurde für die Subklonierung von PCR-Produkten verwendet. Die matrizenunabhängige Aktivität der Taq-Polymerase bedingt ein Überhang von

einzelnen 3'-Desoxyadenosinen an den Enden von PCR-Produkten. Aufgrund 3'-Desoxythymidinüberhänge des pCRTMII-Vektor kann jedes PCR-Produkt durch komplementäre Basenpaarung direkt in diesen Vektor ligiert werden. Die multiple Klonierungsregion (MCS: multiple cloning site) liegt innerhalb des lacZ-Gens und ermöglicht dadurch eine blau/weiß-Selektion in geeigneten Bakterienstämmen. Transformierte Bakterien wurden über die durch den Vektor vermittelte Ampicillin- als auch Kanamycinresistenz selektiert.

pBSV-8His, Baculovirus-Expressionsvektor (KÜHN and ZIPFEL 1995) (Abb. 2.1):

Die rekombinanten Proteine FHR-4 und FHR-4 SCR 4-5, wurden mit Hilfe des pBSV-8His Vektors exprimiert. Die FHR-4 SCR 4-5 cDNA wurde nach PCR-Amplifikation dieses Abschnitts mit spezifischen Primern (siehe Tab. 2.2) von der FHR-4 cDNA (cDNA Klon SAC6) gewonnen und in den pBSV-8His Vektor kloniert und zur Kotransfektion verwendet. Die FHR-4-cDNA wurde mir freundlicherweise von Frau Priv.-Doz. Dr. Christine Skerka, Bernhard-Nocht-Institut, zur Verfügung gestellt (SKERKA *et al.* 1997). Nach Insertion einer cDNA in den Vektor und Infektion von Insektenzellen, ermöglicht der Vektor die Sekretion der rekombinanten Proteine in das Kulturmedium der Zellen, da der Vektor ein internes Signalpeptid besitzt. Zudem werden die rekombinanten Proteine mit einem C-terminalen Histidin-Schweif aus 8 Histidinen versehen, der die Aufreinigung über eine Nickelchelate-Affinitätschromatographie aus dem Kulturmedium ermöglicht. Dieser Histidin-Schweif kann bei Bedarf an einer N-terminal gelegenen Enterokinase-Schnittstelle nach der Aufreinigung abgespalten werden.



Kühn & Zipfel (1995), Gene 162, 225-229

Abb. 2.1: pBSV-8His-Vektor. Im unteren Teil der Graphik ist die multiple Klonierungsstelle (MCS) dargestellt. Der abwärts gerichtete Pfeil zeigt die Schnittstelle für das Signalpeptid, der aufwärts gerichtete Pfeil zeigt die Schnittstelle für die Enterokinase.

Reporterplasmide:

Der Vektor pGL3-BASIC (Promega, Madison, USA) bildete die Grundlage aller Reporterplasmide, die für transiente Transfektionen eingesetzt wurden. Er besitzt unmittelbar stromaufwärts der kodierenden Region für das Luciferasegen aus *Photinus pyralis* (Amerikanischer Leuchtkäfer) eine MCS, in die verschiedene Längen des FHL-1/Faktor H-Promotors inseriert wurden. Die Deletionskonstrukte des FHL-1/Faktor H-Promotors wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. David L. Gordon, Flinders Medical Centre, Bedford Park, Australien, zur Verfügung gestellt (WARD *et al.* 1997) (Tab. 2.1, Abb. 2.2). Als Positivkontrolle diente der Vektor pGL3-PROMOTER (Promega, Madison, USA). Der pRL-SV40 Vektor wurde in dieser Arbeit als interner Kontrollreporter benutzt und in Kombination mit den experimentellen pGL-3 Reporterkonstrukten in die Mammaliazellen kotransfiziert. Dieser Vektor enthält die cDNA der *Renilla* Luciferase (*Rluc*).

Name	Eigenschaften
pGL-3 BASIC	Plasmidvektor, Lucifersasereporter, kein Promotor, kein Insert
pGL-3 PROMOTER	Plasmidvektor, Lucifersasereporter. SV40 Promotor, kein Insert
pHW-699	pGL-3 BASIC, -699 bis +18 bp des FHL-1/Faktor H Promotors
pHW-636	pGL-3 BASIC, -636 bis +18 bp des FHL-1/Faktor H Promotors
pHW-511	pGL-3 BASIC, -511 bis +18 bp des FHL-1/Faktor H Promotors
pHW-199	pGL-3 BASIC, -199 bis +18 bp des FHL-1/Faktor H Promotors
pHW-38	pGL-3 BASIC, -38 bis +18 bp des FHL-1/Faktor H Promotors

Tabelle 2.1: Verwendete Reporterplasmide.



Abb. 2.2: FHL-1/Faktor H Promotorkonstrukte. Darstellung der Deletionskonstrukte die in den pGL-3 Basic Vektor kloniert wurden und zur transienten Transfektion eingesetzt wurden.

2.2.2 Primer

Für verschiedene Arbeitsschritte wurden Primer benötigt (Tab. 2.2). Die Oligonukleotidsynthese erfolgte durch die Abteilung Virologie des Bernhard-Nocht-Instituts mittels einer „Expedite Nucleic Acid Synthesis System Workstation“ (Millipore, Bedford, USA). Die Oligonukleotide wurden bei 56°C und ü/N Inkubation durch 1 ml 25 %igen Ammoniaklösung von der Synthesäule abgelöst. Nach Abdampfen des Ammoniaks bei 37°C in einem Vakuumkonzentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) konnten die Oligonukleotide nach Verdünnung auf die entsprechenden Arbeitskonzentrationen verwendet werden.

Protein	Sense Primer	Antisense Primer	Position des PCR Produkts	Größe des Amplikons
FHR-4 SCR 4-5	5' TTT <u>CTG CAG</u> AAT TCT TCA GAA AAG TGT GGG 3'	5' TTT <u>GAA TTC</u> TTC GCA TCT GGG GTA TTC CAC 3'	701-1078	377bp
Xpress Factor H	5' CTT CCT TGT AAA TCT CCA CCT G 3'	5' TCT GCA TGT TGG CCT TCC TGT C 3'	2861-3215	354bp
Xpress FHL-1	5' TAC TGG CTG GAT ACC TGC TCC G 3'	5' CAG AAG TTC AGA GGG TAA AGC T 3'	1006-1430	424bp
Xpress FHR-4	5' TAT TAT AAG AGT TTG CGT AGA C 3'	5' TTA AAC CGC ATG CCA TTA CTC T 3'	188- 586	398bp
Xpress Aktin-β	5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA 3'	5' CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG 3'	478-1128	650bp
Xpress CD46 (MCP)	5' TGT GAG GAG CCA CCA ACA TTT G 3'	5' TTG GGG GCT TAC GGC TCC AAA T 3'	137-500	363bp
Xpress CD55 (DAF)	5' TGA CTG TGG CCT TCC CCC AGA T 3'	5' GTG TTA CAT GAG AAG GAG ATG G 3'	168-640	472bp
Xpress CD59	5' CTG CAG TGC TAC AAC TGT CCT A 3'	5' GGG ATG AAG GCT CCA GGC TGC T 3'	139-447	308bp

Tabelle 2.2: Verwendete Primer. Die Unterstrichene Basensequenz repräsentiert die Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung eingefügt wurden.

2.2.3 Photometrische DNA-Quantifizierung

Konzentrationsbestimmungen wurden in einer Verdünnung von 1:200 in *aqua bidest* durchgeführt. Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem Spektrophotometer Spectronic 601 (Milton Roy, Ivyland, USA) in Quarzküvette (Schichtdicke (d) von 1 cm) bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm gegen Wasser. Der DNA-Gehalt wurde folgendermaßen berechnet: Eine OD_{260} von 1 entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Oligonukleotid.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen dienten verschiedenen Arbeitsschritten:

- 1) Herstellung von DNA-Sonden für die Dot-Blot Analyse
- 2) Nachweis der Expression von spezifischen mRNAs in Zellen und Geweben
- 3) Amplifikation und Einführung von Restriktionsschnittstellen zur Klonierung des Bereiches SCR 4-5 von FHR-4
- 4) Insertbestätigung bei der Klonierung
- 5) Überprüfung der rekombinanten Baculoviren auf korrekte Rekombination
- 6) Vorbereitung der automatischen DNA-Sequenzierung

Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus 10 μl PCR-Reaktionspuffer (Pharmacia, Uppsala, Schweden) (15 mM MgCl_2 , 0,5 M KCl, 0,1 M Tris/HCl pH 9,0), sowie 16 μl dNTP-Mix (1,25 mM dNTP-Stammlösungen (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 1:80 in H_2O verdünnt) ad 100 μl H_2O . Zu diesem wurden 10 pmol 5' Primer und 10 pmol 3' Primer gegeben, sowie 100 ng DNA

als Template eingesetzt. Für die Reaktion wurde eine Konzentration von 0,5 µl (2,5 U) Taq-DNA-Polymerase (Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet.

Die Reaktionen wurden in 100 µl Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) im Gene Amp PCR SystemTM 2400 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) durchgeführt.

Das PCR-Programm für die Expressionsstudien lief nach einer 5 min. Denaturierung bei 95°C in 35 Zyklen ab. Jeder Zyklus bestand aus einer 1 min. Denaturierung bei 95°C, einer Anlagerungszeit von 1 min bei 46°C und einer Verlängerungszeit von 1 min bei 72°C. Am Ende der Zyklen wurde eine Verlängerungszeit für die komplementierende Synthese unvollständiger DNA-Fragmente bei 72°C von 10 min eingefügt. Die Reaktion wurde anschließend bei 4°C in Endloszyklen gestoppt.

Das PCR-Programm für die Klonierung lief nach 5 min. Denaturierung bei 95°C in 2 unterschiedlichen Schleifen ab. Die erste Schleife bestand aus 5 Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus einer Denaturierung von 1 min bei 95°C, einer Anlagerungszeit von 1 min bei 46°C und einer Verlängerungszeit von 1 min bei 72°C. Die anschließende zweite Schleife wurde in 25 Zyklen durchgeführt und unterschied sich in der Anlagerungszeit von der ersten Schleife, die hier für 1 min bei 52°C durchgeführt wurde. Für die vollständige Synthese unvollendeter DNA-Fragmente wurde am Ende der zweiten Schleife eine Verlängerungszeit von 10 min bei 72°C eingefügt. Die Reaktion wurde anschließend bei 4°C in Endloszyklen gestoppt.

Amplifizierte Produkte (10 µl von jeder PCR-Probe) wurden parallel zum Größenmarker (Life Technologies, Rockville, USA) elektrophoretisch auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht photographiert. Die Identität der PCR-Produkte wurde durch Subklonierung in den pCRTMII-Vector (Invitrogen, San Diego, USA) und durch Sequenzanalysen bestätigt.

2.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Durch Abtrennung von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Dieser Vorgang erhöht die Effizienz von Ligations- und Sequenzreaktionen und wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Alle Reinigungsschritte erfolgten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 14.000 upm.

2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von cDNA-Fragmenten in den Subklonierungsvektor pCRTMII (Invitrogen, San Diego, USA) und den Expressionsvektor pBSV-8His erfolgte unter Verwendung der T4-Ligase

(Boehringer Mannheim, Deutschland). Für die Ligation wurde der geschnittene Vektor (25ng/µl) und das zu inserierende DNA-Fragment in Mengenverhältnis 3:1 in 10x Ligationspuffer (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgenommen und nach Zugabe von 2-3 U T4-Ligase ü/N bei 12°C-14°C im Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) ligiert.

2.2.7 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Escherichia coli DH5α (HANAHA 1983) wurde als Wirtsbakterium verwendet.

Genotyp: *supE44* δ lacU169 (ϕ 80, *lacZ*ΔM15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyr96* *thi-1* *relA1*

Herstellung kompetenter *Escherichia coli* DH5α-Zellen:

2 ml einer Übernachtskultur wurden in 200 ml LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD von 600 nm im Schüttelinkubator vermehrt. Die *Escherichia coli* wurden 5 min bei 4°C und 3500 upm (3000 g, CPKR Zentrifuge) sedimentiert und in 70 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, ca. 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 1500 upm zentrifugiert. Die Bakterien wurden vorsichtig in 8 ml einer 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15 % Glycerol resuspendiert. Entweder wurden sie für die Transformation des pBSV-8His-Vektors unmittelbar verwendet oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend in Aliquots bei –70°C gelagert.

Transformation kompetenter *Escherichia coli* DH5α-Zellen:

Von den kompetenten Bakterien wurden 100 µl mit 5 µl des Ligationsproduktes (ca. 200 ng Plasmid-DNA) für 15 min auf Eis inkubiert, vorsichtig gemischt und erneut 15 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C (90 s) wurde 400 µl LB-Medium zugesetzt und für 45 min bei 37°C geschüttelt. 50-400 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar ausplattiert. Um die blau/weiß-Selektion durch α-Komplementation des lac-Operons (pCRTMII-Vektor) zu nutzen, wurde zuvor 40 µl X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid; 2 % in Dimethylformamid) als Substrat sowie 40 µl 0,1 M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) zur Induktion auf dem LB-Agar verteilt.

Übernachtskultur:

Die benötigte Menge LB- bzw. LB-Ampicillin-Medium wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt.

2.2.8 Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Eine Übernachtskultur von 3 ml der transformierten *Escherichia coli* Bakterien wurde hergestellt. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.9 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxipräparation)

Die Präparation von größeren Plasmidmengen für den Einsatz in transienten Transfektionen wurde mit dem „Plasmid Megakit“ von Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Es wurden 500 ml *Escherichia coli* DH5 α -LB-Amp-Kulturen ü/N bis zu 24 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Vor dem Auftragen auf die Säule wurde die DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert.

Nach Konzentrationsbestimmung wurden 100 μ l der DNA-Lösung unter sterilen Bedingungen erneut gefällt und auf eine Konzentration von 1 μ g/ μ l eingestellt. Die DNA wurde bei –20°C gelagert.

2.2.10 DNA-Restriktionsanalyse

Die DNA-Restriktionen erfolgten mit dem Puffer „One-Phor-All“ und den Enzymen der Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen und Bedingungen. Für analytische Zwecke wurde ca. 1 μ g DNA und für präparative Zwecke ca. 20-40 μ g DNA verwendet. Die Ansätze wurden jeweils 1-2 h bei 37°C inkubiert. Beendet wurden die Reaktionen durch Einfrieren bei –20°C oder sie wurden direkt mit Probenpuffer versetzt und zur Elektrophorese eingesetzt.

2.2.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Agarose (1-2 %) wurde entsprechend der Größe der zu trennenden Fragmente in TBE, mit einem Zusatz von 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid, gelöst. Die Auftrennung der DNA aus analytischen oder präparativen Zwecken erfolgte durch einen Gellauf bei 10 V/cm in einer horizontalen Flachbettkammer (Bio-Rad, München, Deutschland) mit TBE als Laufpuffer. Für die Größenstandards wurde ein 1:1 Gemisch aus *Hind*III-/Lambda DNA und *Hae*III/ Φ X174 RF DNA (Life Technologies, Rockville, USA) verwendet. Mit einem UV-Transilluminatortisch (Fröbel) und einem Videodokumentationssystem (Intas, Göttingen, Deutschland) wurde die Dokumentation durchgeführt.

2.2.12 Präparative LMP-Gelelektrophorese

DNA wurde direkt aus Agarose-Gelen nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter Verwendung von „Low Melting Point“ (LMP)-Agarose (Life Technologies, Rockville, USA)

isoliert. Für die Isolierung von PCR-Produkten und von DNA-Fragmenten aus Restriktionsanalysen wurde ein Gellauf bei maximal 50-60 V in LMP-Gelen (1 % LMP-Agarose in 1x TBE) durchgeführt. Die erwünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht lokalisiert und mit einem sterilen Einmalskalpell ausgeschnitten. Der erhaltene Gelblock wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Gelstücke wurden bei 68°C im Thermoblock (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) geschmolzen und dabei die DNA freigesetzt, die durch intensives Mischen mit 1/10 Volumen 5 M NaCl stabilisiert wurde. Die weitere Aufarbeitung des DNA-Materials erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender DNA-Fällung.

2.2.13 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Aufreinigung gelöster DNA durch Abtrennung der Enzyme und anderer Proteine, die sich in der Lösung befinden, erfolgte durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Der DNA-Lösung wurde je ½ Volumen Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur unter mehrmaligem Vermischen inkubiert. Die Auftrennung in eine wäßrige und eine organische Phase erfolgte durch anschließendes Zentrifugieren bei 4°C für 10 min bei 14.000 upm. Die wäßrige Phase wurde mit ½ Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und erneut gut gemischt. Die Präzipitation der DNA erfolgte nach dieser Extraktion durch Zentrifugation bei 4°C für 5 min.

2.2.14 DNA-Präzipitation

Die DNA-Fällung aus wäßrigen Lösungen erfolgte durch Alkohol-Präzipitation. Zu der wäßrigen DNA-Lösung wurde 1 µl Glykogen, 1/10 Volumen 5 M NaCl und 2 ½ Volumen absoluten Ethanol (eiskalt) gemischt. Die DNA wurde 1 h bei -70°C oder ü/N bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde die DNA für 45 min bei 4°C zentrifugiert (14.000 upm). Der entstandene DNA-Niederschlag wurde mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen, 5 min bei RT zentrifugiert, im Heizblock bei 56°C getrocknet und entsprechend der gewünschten Konzentration in H₂O resuspendiert.

2.2.15 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des „Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kits“ (Perkin Elmer, Norwalk, USA). Die eingesetzte Plasmid-DNA wurde mit der Qiagen-Minipräparations-Methode isoliert. Die Reaktion erfolgte als „Cycle Sequencing“ im Perkin Elmer Thermocycler unter Verwendung spezifischer Primer für die eingesetzten Vektoren (Tab. 2.3).

Nach 5 min Denaturierung bei 96°C wurde das PCR-Programm (Cycle Sequencing) mit 25 Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einer Denaturierung von 10 sec bei 96°C, einer

Anlagerungszeit von 5 sec bei 50°C und einer Verlängerungszeit von 4 min bei 65°C. Die Reaktion wurde bei 4°C in Endloszyklen gestoppt. Mit dem „373 A DNA-Sequencing System“ (Applied BiosystemsTM) wurden die sequenzierten Proben anschließend analysiert.

Primer	Sequenz	Position im Vektor
T7	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'	407-388 pCR TM II
TA-F	5' ACC GAG CTC GGA TCC ACT AGT 3'	285-305 pCR TM II
TA-R2	5' ATT GGG CCC TCT AGA TGC ATG 3'	384-364 pCR TM II
pBSVF	5' TTT ACT GTT TTC GTA ACA GTT T 3'	-44 polh pBSV
pBSVR	5' TTC CAT CCA ACG ACA AGC TTC A 3'	+269 polh pBSV

Tabelle 2.3: Primer für die DNA-Sequenzierung

2.2.16 Isolierung von Baculovirus-DNA für die PCR

(modifiziert nach SUMMERS and SMITH 1987)

Je 1,5 ml virenhaltiger Zellkulturüberstand wurde zwei bis drei Tage nach der Infektion (siehe 2.3.5) abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für 15 min bei 14.000 upm und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde anschließend vorsichtig in 100µl Virus-Disruptions-Puffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,25 % SDS, pH 7,6) aufgenommen. Bis die Lösung klar erschien wurde sie mit Proteinase K (20 mg/ml) für 15 min bei 37°C im Heizblock (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die freigesetzte DNA wurde mit Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung präzipitiert und anschließend in 20 µl H₂O resuspendiert. Um die korrekte Rekombination zu testen wurde 1 µl DNA für die PCR-Reaktion mit virusspezifischen Primern eingesetzt.

2.2.17 Radioaktive DNA-Markierung

Die durch die Primer „Xpress Faktor H“ gewonnenen dsDNA-PCR-Produkte wurden durch Erhitzen auf 95°C für 2 min und anschließendem sofortigem Abkühlen auf Eis denaturiert. Die radioaktive Markierung erfolgte als zufällige Markierung mit dem Prime-a-GeneTM System (Promega, Madison, USA) nach FEINBERG and VOGELSTEIN (1983, 1984).

25 ng dsDNA wurden mit 50 µCi [α -³²P]dCTP, 5x Labeling Buffer (Promega, Madison, USA), dNTP-Mix (jeweils 500µM, mit Ausnahme von dCTP), 2 µl Nuklease-freier BSA (10 mg/ml) und 5 U DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 60 min bei RT inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 95°C für 2 min und anschließender Abkühlung auf Eis sowie durch ein EDTA-Zusatz (Endkonzentration 20 mM). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration mit Hilfe von Chroma Spin-100 Säulen (Clontech, Palo Alto, USA) nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

2.2.18 RNA Dot-Blot

Um das Vorhandensein von Faktor H mRNA in spezifischen fetalen und adulten Geweben nachzuprüfen, wurde eine Dot-Blot (Clontech, Palo Alto, USA) Analyse durchgeführt. Dieser

RNA Dot Blot (positiv geladene Nylonmembran) enthält abgegliche, immobilisierte Mengen polyA⁺-RNA von 89-514 ng pro Dot von fünfzig verschiedenen humanen Geweben sowie sechs verschiedene RNAs und DNAs zur Kontrolle. Für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Faktor H-cDNA-Probe wurde ca. 20 ng cDNA mit einer Aktivität von 10-20 x 10⁶ cpm verwendet. Die spezifische Aktivität lag über 10⁹ cpm/μg. Die Auswertung der Signale des Dot-Blot wurden mit Hilfe der Autoradiographie durchgeführt.

2.3 Zellkulturtechniken

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (Gelaire) durchgeführt. Für die mikroskopischen Analysen wurde das Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet.

2.3.1 Verwendete Zelllinien

Verschiedene humane Zelllinien, sowie eine Insektenzelllinie wurden verwendet (Tab. 2.4).

Zelllinie	Ursprung
<i>Insektenzellen:</i>	
Sf9	Ovarzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i> , Lepidoptera (Invitrogen, San Diego, USA) (CRL-1711)
<i>Humane Mammaliazellen:</i>	
EAhy926	endotheliales Hybridom
GDR	Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (etabliert von Hermann Eibel, Universität Freiburg)
HepG2	Hepatoblastoma (HB-8065)
Hep3B	hepatozelluläres Karzinom (HB-8064)
HUH7	Hepatoblastoma
HT1092	Fibrosarkom der Mamma
HWL	Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (etabliert von Hermann Eibel, Universität Freiburg)
H2	Glioblastoma (stammt von einer weiblichen Patienten, die an den Folgen des lokalen Tumors gestorben ist (JÄÄSKELÄINEN <i>et al.</i> 1989))
MRC-5	fetale Lungenfibroblasten (CCL-171)
SOZ	Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis (etabliert von Hermann Eibel, Universität Freiburg)
T47D	duktales Mammakarzinom
U251	Glioblastoma
U937	promyelozytische Leukämiezellen
293-T	humane transformierte primäre embryonale Nierenzellen

Tabelle 2.4: Verwendete Zelllinien. Falls vorhanden ist die Referenznummer der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA in Klammern angegeben,

2.3.2 Insektenzellkultur mit Sf9-Zellen

Die Zellen der Spezies *Spodoptera frugiperda* (Sf9) wurden für die Herstellung der rekombinanten Proteine FHR-4 und FHR-4 SCR 4-5 mit Hilfe des Baculovirus-System als Wirtszellen verwendet. Die Zellen wuchsen adhärent als Monolayer in Zellkulturflaschen mit

24, 75 oder 150 cm² Fläche und wurden in 5, 20 bzw. 50 ml Medium bei 27 °C und erhöhter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dreimal wöchentlich wurden die *Sf9*-Zellen mit einem Zellschaber (Costar, Bodenheim, Deutschland) vom Flaschenboden gelöst, mit serumfreiem Grace's Medium gewaschen und nach Resuspension in Grace's Medium im Verhältnis 1:2 auf neue Zellkulturflaschen passagiert. In 20 min adhärten die Zellen und das Medium wurde danach je nach Kulturflaschengröße durch 5, 20 bzw. 50 ml Komplettmedium bzw. Expressionsmedium ersetzt.

Das Kulturmedium (Komplettmedium) bestand aus Grace's Medium (Bio Whittaker), zu dem 10 % FCS (hitzeinaktiviertes fetal calf serum) (Life Technologies, Rockville, USA), sowie 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strp-Mix, Bio Whittaker) und 0,25 µg/ml FungizoneTM (Amphotericin B, Life Technologies, Rockville, USA) zugesetzt wurden. Als Expressionsmedium wurde FCS-freies Insect-Express (Bio Whittaker) verwendet.

2.3.3 Transfektion

In einer Zellkulturschale von 35 mm wurden 6x10⁵ *Sf9*-Zellen mit 0,5 µg Baculo-GoldTM-Virus-DNA (Pharming, Hamburg, Deutschland) und 2 µg des pBSV-8His Vektors, in welchem das kodierende Gen für das herzustellende FHR-4 bzw. FHR-4 SCR 4-5 Protein inseriert war, kotransfiziert. Die Kotransfektion erfolgte mit einer für Insektenzellen modifizierten Kalziumphosphat-Kopräzipitation nach SUMMERS and SMITH (1987): Plasmid-DNA und BaculoGoldTM-DNA wurden zusammenpipettiert. Nach 5 min Inkubation wurden 500 µl HEPES-Puffer (125 mM CaCl₂, 140 mM NaCl, 25 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-Ethansulfonsäure (HEPES), pH 7,1) zu dem Gemisch gegeben und die Transfektionslösung tropfenweise auf die *Sf9* Zellen mit 500 µl Komplettmedium gegeben. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei 27°C. Überschüssiges Präzipitat wurde mit Grace's Medium von den transfizierten Zellen abgewaschen, 3 ml Komplettmedium zugegeben und der Ansatz bei 27°C für 4-7 Tage inkubiert.

2.3.4 Plaque-Assay

Mit Hilfe eines Plaque-Assays wurde der Titer der virushaltigen Überstände bestimmt und einzelne Klone rekombinanter Viren isoliert. Hierzu wurden in Zellkulturschalen von 60 mm, 3x10⁶ Zellen ausgesät und nach Entfernen des Mediums, zusammen mit 500 µl verschiedener Verdünnungen (10⁻²-10⁻⁷) der virushaltigen Lösung inkubiert. Nach 1 h Inkubation wurde der Überstand vollständig entfernt und 4 ml Komplettmedium mit 0,5 % Agarose (Biomol, Hamburg, Deutschland) auf die Zellen gegeben. Nach 4-5 Tagen Inkubation wurden die lebenden Zellen mit Neutralrot angefärbt und die Plaques ausgezählt. Hierfür wurden jeweils 3 ml Kulturmedium mit 0,5 % Agarose und 50 µg/ml Neutralrot auf die überschichteten Insektenzellen gegeben. Nach ca. 10 h wurden in dem konfluenten Zellrasen Lyse-Höfe sichtbar.

Zur Bestimmung des Virustiters wurden Plaques der verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt. Nach dem Ausstechen der Virenplaques wurden die Agaroseblöcke in Kompletmedium aufgenommen, gemischt und die Viren bei 4°C gelagert. Mit den gewonnenen Viren wurden weitere Zellen infiziert. Die Anwesenheit rekombinanter Proteine konnte bei erfolgreicher Infektion nach 5 Tagen durch Western-Blot Analyse nachgewiesen werden. Der Kulturüberstand der infizierten Insektenzellen wurde durch Zentrifugation von Zelltrümmern gereinigt und für die Herstellung von Virusstammlösungen verwendet. Die Stammlösungen wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert (JARVIS and GARCIA 1994).

2.3.5 Infektion von Insektenzellen

Zur Gewinnung von Virusstammlösungen und zur Expression rekombinanter Proteine wurden Sf9-Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70 % mit rekombinanten Viren infiziert und für einen Zeitraum von 5-9 Tagen, bzw. zur Proteinexpression für 3 Tage infiziert. In der Regel wurden die Zellen mit einer „multiplicity of infection“ (Menge infektiöser Viren im Verhältnis zur Zellzahl) von 5 infiziert.

2.3.6 Mammaliazellen

Alle Zelllinien, mit Ausnahme der HT1080 wurden in RPMI-Kompletmedium (RPMI 1640-Medium (Bio Whittaker) mit 10 % FCS (hitzeinaktiviertes fetal calf serum) (Life Technologies, Rockville, USA), sowie 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strp-Mix, Bio Whittaker), 0,25 µg/ml FungizoneTM (Amphotericin B, Life Technologies, Rockville, USA) und 4 mM L-Glutamin (Life Technologies, Rockville, USA) zugesetzt) im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und ausreichender Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zelllinie HT1080, wurde in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit denselben Zusätzen kultiviert. Die Mammalia-Zelllinien (Tab. 2.4) wuchsen adhärent als Monolayer in Zellkulturflaschen mit 24, 75 oder 150 cm² Fläche in 5, 20, bzw. 50 ml Medium. Die Zellen wurden dreimal wöchentlich bei Konfluenz passagiert. Hierzu wurde zuerst das Medium abgesogen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 bis 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (Life Technologies, Rockville, USA)) bei RT inkubiert, bis unter dem Mikroskop die Ablösung der Zellen zu beobachten war. Zellen, die für eine durchflußzytometrische Analyse verwendet wurden, sind ausschließlich mit 0,02 % EDTA, ohne Trypsin abgelöst worden. Mit der Zugabe von 5 bzw. 10 ml Kompletmedium wurde die Trypsinierung wieder gestoppt. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurden diese entsprechend verdünnt und in Flaschen mit vorgelegtem Medium ausgesät.

2.3.7 Stimulierung

Einige Zellen wurden nach Konfluenz für 24 h mit humanem, rekombinantem Interferon- γ (Pharmingen) bei einer Endkonzentration von 100 IU/ml, mit humanem, rekombinantem Tumor Nekrose Faktor- α (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit einer Konzentration von 10 ng/ml oder mit 0,1 μ M Dexamethason (Serva, Heidelberg, Deutschland) für die in der Abbildungen angegebenen Zeiten behandelt. Für Serumstimulationsversuche der Fibroblasten wurden ruhende Zellen für 60 h in Anwesenheit von 0,5 % FCS kultiviert, mit PBS gewaschen und mit 20 % FCS supplementierten Medium für 24 h inkubiert.

2.3.8 RNA Isolierung und cDNA-Synthese

Die gesamte zelluläre RNA wurde, unter Anwendung des TRIZOL® LS Reagenz (Life Technologies, Rockville, USA) nach den Angaben des Herstellers, extrahiert. RNA von humanem Lebergewebe wurde mit Guanidinthiocyanat isoliert und mit CsCl-Zentrifugation aufgereinigt. Diese Leber-RNA wurde mir freundlicherweise von Frau Priv.-Doz. Dr. Christine Skerka, Bernhard-Nocht-Institut zur Verfügung gestellt.

Durch Isopropylalkohol präzipitierte RNA wurde in Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem H₂O gelöst. 1 μ g der RNA wurde bei 70°C für 10 min denaturiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Die Reaktionen wurden bei 37°C für 1 h in einem Volumen von 20 μ l in RT-Puffer (Life Technologies, Rockville, USA) mit 10 mM Dithiothreitol (Life Technologies, Rockville, USA), 500 μ M dNTP Mix (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 25 μ g/ml Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und 200 U „Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase“ (Life Technologies, Rockville, USA) durchgeführt.

2.3.9 Transiente Transfektion mittels FuGENE6™

Für die Transfektion der Mammalia-Zelllinien wurde das nicht-liposomale FuGENE6™ Transfektionsreagenz (Boehringer Mannheim, Deutschland) verwendet. Die jeweiligen Zellen wurden in den Vertiefungen (9,6 cm²) von „6-well“-Platten, bei etwa 80 % Konfluenz, transfiziert. Dazu wurden die Zellen in entsprechender Verdünnung am Vorabend der Transfektion in je 2 ml Kulturmedium in die Makrotiter-Platten umgesetzt. Für jeden Transfektionsansatz wurde 100 μ l serumfreies Medium und 3-6 μ l FuGENE6™ Reagenz zu der Plasmid-DNA (1-2 μ g Reporterplasmid und 0,02 μ g pRL-SV40 in konstanter Gesamtkonzentration) gegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Lösung tropfenweise in die mit 2 ml serumhaltigen Kulturmedium gefüllten Vertiefungen pipettiert. Die Zellen wurden dann für 18-24 h, ohne das Transfektionsgemisch zu entfernen, inkubiert.

2.3.10 Luciferase-Reportergenassay

(nach DE WET *et al.* 1987)

Nach 24-48 h wurde der Kulturüberstand der transfizierten Zellen entfernt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 500 µl „Passive Lysis Buffer“ („Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System, Promega, Madison, USA), bei RT für 15 min in den Vertiefungen der „6-well“-Platten, lysiert. Anschließend wurde das Lysat in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und grobe Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (10 s, 14.000 upm).

Um die Luciferaseaktivität zu bestimmen, wurde ein Luminometer (Berthold Lumat LB9507, Pforzheim, Deutschland) verwendet. 50 µl Zelllysate und 50 µl „Luciferase Assay Reagent II“ (Luciferase Assay System) wurde in einem 75 x 12 mm PS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gemischt und das Gesamtintegral der „Firefly“-Luciferase-Lichtemission über 10 s bei RT gemessen. Durch Zugabe von 50 µl „Stop&GloTM Reagent“ wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase inhibiert und zugleich die der *Renilla*-Luciferase aktiviert. Die resultierende Lichtemission der *Renilla*-Luciferase wurde wiederum über einen Zeitraum von 10 s gemessen. Von jedem Zelllysate wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

2.3.11 Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden

Phosphorothioat-Oligodeoxynukleotide (S-ODN) (Eurogentec, Belgien) wurden korrespondierend zur FHL-1/Faktor H Translationsinitiationsposition konstruiert (Antisense). In einer Konzentration von 2-20 µM wurden die S-ODN mittels FuGENE6 Transfektions-Reagenz in H2-Zellen transfiziert (siehe 2.3.9). Die Spezifität der Inhibition wurde mit Hilfe von unspezifischen S-ODN überprüft. Zum einen durch eine Sense-Sequenz (Reverse Kontrolle) und zum anderen durch eine Mismatch-Sequenz (Mismatch Kontrolle) mit 2 nicht korrespondierenden Nukleotiden (Tab. 2.5). Die verminderte Translation und die damit verminderte Proteinsekretion wurde mittels Western-Blot Analyse der Zellkulturüberstände nachgewiesen.

Oligonukleotid	Sequenz
Antisense	5' CTT TGC TAG AAG TCT CAT 3'
Reverse Kontrolle	5' TAC TCT GAA GAT CGT TTC 3'
Mismatch Kontrolle	5' CTT TGC TAT AAG TAT CAT 3'

Tabelle 2.5: Faktor H Antisense Oligonukleotide. Die nicht korrespondierenden Nukleotide der Mismatch Kontrolle im Vergleich mit den Antisense-Oligonukleotiden sind fett markiert.

2.3.12 Zelllyse-Assays

2 x 10⁶ Zellen wurden in 1 ml RPMI inkl. 10 % FCS für 2 h bei 37°C, mit 100 µCi ⁵¹Cr (Amersham, Buckinghamshire, UK) markiert, anschließend mit RPMI gewaschen, für weitere 30 min inkubiert und erneut gewaschen. Die ⁵¹Cr-markierten Zellen (10⁵ Zellen/50µl) wurden in zwei Aliquots mit den entsprechenden Antikörpern (20 min bei RT) und NHS (30 min bei 37°C) in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert. Um die Effekte der Neuraminidase, des

Trypsins und der Phosphoinositol Phospholipase C (PIPLC) zu untersuchen, wurden die Zellen zuerst für 1 h bei 37°C mit dem entsprechenden Enzym inkubiert. Nach Zentrifugation (500 x g, 5 min) wurde 50 % des Überstandes abgenommen und im γ -Counter (LKB Wallac 1282 Compugamma CS, Turku, Finnland) gemessen. Die Zelllyse wurde als Prozent der ^{51}Cr -Freisetzung angegeben (experimentelle Radioaktivität/totale Radioaktivität – basale Radioaktivität). ^{51}Cr -Freisetzung in der Abwesenheit von Antikörpern wurde als die basale Radioaktivität und Freisetzung nach Behandlung mit 0,1 % Nonidet P40 (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK) als vollständige Lyse (totale Radioaktivität) betrachtet. Die Menge der lysierten Zellen wurde in doppeltem Ansatz bestimmt und die Resultate als Durchschnittswerte mit Standardabweichung angegeben.

2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.4.1 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit zur Proteindetektion verwendeten Antikörper wurden in den hier angegebenen Konzentrationen eingesetzt (Tab. 2.6)

Antikörper	Verdünnung bzw. Konzentration
Kaninchen-Anti-SCRs 1-4-Antikörper (KÜHN and ZIPFEL 1996)	1:500
Kaninchen-Anti-SCRs 19-20-Antikörper (HELLWAGE <i>et al.</i> 1994)	1:500
Kaninchen-Anti-FHR-4-Antikörper (SKERKA <i>et al.</i> 1997)	1:500
Ziegen-Anti-Faktor H-Antikörper (Calbiochem, San Diego, USA)	1:1000
Schwein-Anti-Kaninchen-Fc-Antikörper, HRP-gekoppelt (Dako, Hamburg, Deutschland)	1:400
Schwein-Anti-Ziegen-Fc-Antikörper, HRP-gekoppelt (Dako, Hamburg, Deutschland)	1:400
Ziegen-Anti-Kaninchen-Fc-Antikörper, FITC-markiert (Pharmingen)	1:30
Protein A-gekoppelte Kaninchen-Anti-SCRs 1-4-Antikörper (KÜHN and ZIPFEL 1996)	1:500
monoklonale Anti-Faktor H-Antikörper 131X (Prof. S. Meri, Universität Helsinki, Finnland) (Erkennungsstelle: SCR 8-15)	50 µg/ml
monoklonale Anti-Faktor H-Antikörper 90X (Prof. S. Meri, Universität Helsinki, Finnland) (Erkennungsstelle: SCR 1)	50 µg/ml
monoklonale Anti-Faktor H-Antikörper OX24 (Prof. S. Meri, Universität Helsinki, Finnland) (Erkennungsstelle: SCR5)	50 µg/ml
polyklonaler Anti-H2-Zellen-Antikörper (Prof. S. Meri, Universität Helsinki, Finnland)	1:10

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Herstellerangaben mit dem Pierce BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Als Standard diente BSA (Pierce, Rockford, USA).

2.4.3 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Gelkonzentrationen für die SDS-PAGE wurden entsprechend der Größe der aufzutrennenden Proteine zwischen 10 % und 12 % gewählt.

Unter Verwendung des entsprechenden Puffers (Trenngelbuffer: 91 g Tris, 0,4 % SDS ad 500 ml H₂O, pH 8,8; Sammelgelbuffer: 6,05 g Tris, 0,4 % SDS ad 100 ml H₂O, pH 6,8) und einer 30 %igen Acrylamid/Bisacrylamidlösung (29:1, Life Technologies, Rockville, USA) wurden Trenn- und Sammelgel hergestellt. Die Proteine wurden in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern (Minigel Twin, Biometra, Göttingen, Deutschland). Nach Einlaufen der Proben in das Trenngel bei 20 mA/Gel, wurde die Stromstärke auf 25 mA/Gel erhöht. Als Größenmarker für die Molekulargewichte wurden 3-6 µl „Benchmark“ Standard (Life Technologies, Rockville, USA) verwendet.

2.4.4 Western-Blot (Western-Immunoblot mit Peroxidase-Nachweis)

(modifiziert nach KYHSE-ANDERSEN 1984)

Mit der Methode des Western-Blots werden Proteine, die mit Hilfe des SDS-PAGE aufgetrennt wurden, aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Transfer erfolgte mittels „Semi-Dry-Blotting“ unter Verwendung einer Semi-Dry-Blotkammer mit Graphitelektroden (von Kreutz, Reiskirchen, Deutschland) für 1 h bei 0,8 mA/cm². Das Proteingel wurde nach der Auftrennung zunächst für 15 min in Kathodenlösung inkubiert.

Die Filter für den Western-Transfer wurden nach folgender Reihenfolge angeordnet: Von oben betrachtet folgte nach der Kathode (-) eine Schicht aus 9 Lagen Whatman-Papier, die in Kathodenlösung (5,2 g 6-Aminohexanol (Crotonsäure) 40 mM, 200 ml Methanol (20 %), ad 1000 ml H₂O, pH 7,6) getränkt wurden. Darauf folgte das Gel (Orientierung entsprechend dem SDS-PAGE-Lauf) und die Nitrocellulose-Membran Optitran BA-S 83 (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) in Richtung Anode. Nach 3 Lagen Whatman-Papier, die in Anodenlösung II (3,03 g Tris (25 mM), 100 ml Methanol (20 %), ad 500 ml H₂O, pH 10,4) getränkt wurden, wurde eine Schicht aus 6 Lagen Whatman-Papier, befeuchtet in Anodenlösung I (18,15 g Tris (0,3 M), 100 ml Methanol (20 %), ad 500 ml H₂O, pH 10,4), direkt auf die Anode (+) gelegt.

Die spezifische Detektion der transferierten Proteine erfolgte durch einen Antikörper-Peroxidase-Nachweis. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 30 min in 5 % Milchpulver/PBS (Glücksklee, Nestlé Deutschland AG, Frankfurt) inkubiert. Danach erfolgte ü/N bei 4°C die Reaktion mit dem ersten spezifischen Antiserum in 2,5 % Milchpulver/PBS. Nach gründlichem Waschen in PBS wurde die Nitrocellulose mit dem transferierten Protein in die zweite HRP- („Horseradish peroxidase“)-gekoppelten Anti-Antikörperlösung in 2,5 % Milchpulver/PBS gegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens 3 h. Nach gründlichem Spülen in PBS wurde der Peroxidase-Nachweis in der

Färbelösung (45 ml PBS, 5 ml Methanol/4-Chloronaphtol (Serva, Heidelberg, Deutschland), 50 μ l H_2O_2) durchgeführt, bis die spezifischen Banden sichtbar wurden. Nach kurzem Schwenken in H_2O wurde die Membran getrocknet und dunkel gelagert.

2.4.5 Silberfärbung

Ein SDS-Polyacrylamidgel (ca. 9 x 6 cm) wurde in den verschiedenen Lösungen für mindestens 10 min in einem Volumen von etwa 50 ml inkubiert. Das Gel wurde zunächst in 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure (Lösung 1) fixiert, anschließend in 30 % Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5 % Glutaraldehyd und 0,2 % Natriumthiosulfat (Lösung 2) inkubiert und dann ca. 1-2 h in H_2O (Lösung 3) gewässert. Nach Inkubation in 0,1 % $AgNO_3$ und 0,02 % Formaldehyd (Lösung 4) erfolgte die Farbreaktion in 2,5 % Natriumcarbonat und 0,01 % Formaldehyd (Lösung 5). Die Reaktion wurde, sobald die gewünschte Farbintensität erreicht wurde, mit 0,05 M EDTA (Lösung 6) gestoppt. Anschließend wurde das Gel in H_2O gewässert und getrocknet.

2.4.6 Enterokinase-Spaltung

Der pBSV-8His Vektor ermöglicht die Abspaltung der acht C-terminalen Histidinreste durch die vektorkodierte Enterokinase-Schnittstelle vor den Histidin-Resten. Die Spaltung von 50 μ g des dialysierten Proteins erfolgte mit 4 U rekombinantem EnterokinaseMaxTM (Invitrogen, San Diego, USA) ü/N bei 37°C. Vor der weiteren Verwendung des Proteins wurde das Enzym durch Zugabe von Serum Trypsin Inhibitor (STI) in seiner Aktivität blockiert. Die Abspaltung der C-terminalen Histidine wurde durch die veränderte Mobilität des Proteins in der SDS-PAGE überprüft.

2.4.7 Deglykosylierung von Proteinen durch Peptid-N-Glykosidase F

2 μ g Protein wurden in PBS (pH 7,3) aufgenommen, mit 1/10 Volumen 0,5 M Na_2 -EDTA versetzt (Endkonzentration: 50 mM) und für 3 h mit 2 U Peptid-N-Glykosidase F (Boehringer Mannheim, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Die Abspaltung der Glykosylreste wurde durch die veränderte Mobilität des Proteins mittels SDS-PAGE überprüft.

2.4.8 Nickelchelate-Affinitätschromatographie

(HOCHULI *et al.* 1987; KÜHN and ZIPFEL 1995)

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte aus dem Kulturüberstand der infizierten Insekten-Zellen (Express-Medium) unter Verwendung einer Ni^{2+} -NTA-Agarose (Diagen)-Säulenpräparation im „Batch“-Verfahren, mit losem Säulenmaterial in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark).

Das Säulenmaterial wurde durch Zentrifugation (450 g, 10 min, 20 °C) in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) sedimentiert und der alkoholische

Überstand dekantiert. Nach einem Waschvorgang mit 3 Volumen H₂O und anschließender Zentrifugation (s.o.) wurde das Säulenmaterial mit 5 Volumen Nickelsulfat-haltigem „Charge-Buffer“ für 1 h inkubiert. Dann erfolgte eine Äquilibration mit 3 Volumen „Binding buffer“ (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 5 mM Imidazol).

Das so vorbereitete Säulenmaterial wurde ü/N bei 4°C oder mindestens für 3 h bei RT mit dem Kulturüberstand auf einem Walzenrüttler inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Säulenmaterial mit dem gebundenen Protein wurde daraufhin zweimal mit 10 Volumen „Binding Buffer“ gereinigt. Dann erfolgte ein Reinigungsschritt höherer Stringenz mit 10 Volumen „Wash Buffer“ (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 60 M Imidazol). Die Elution der Hauptmenge des Proteins erfolgte durch zweimalige Inkubation mit „Elution Buffer“ (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1 M Imidazol) für jeweils mindestens 30 min. Anschließend wurden die am Säulenmaterial verbliebenen Proteine mit einem „Strip Buffer“ (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM EDTA) von der Ni²⁺-NTA Agarose abgelöst.

2.4.9 Dialyse und Einengung

Die aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden, um die Proteine in einem optimalen Puffer für die weitere Verwendung zu bringen, dialysiert. Die Eluate wurden bei 4°C ü/N in einem SpectraPor 6TM (Serva, Heidelberg, Deutschland) Dialyseschlauch mit einem molekularen Ausschlußvolumen (MWCO, molecular weight cut-off) von 1000 Da gegen den gewünschten Puffer (0,5x PBS) dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Zentrifugation in Biomax 5K Filtern (Millipore, Bedford, USA), nach Angaben des Herstellers, bis zur gewünschten Konzentration eingengt.

2.4.10 Biosynthetische Markierung von Proteinen

Zur *in vivo*-Markierung von neu synthetisierten Proteinen der H2- und U251-Zellen wurde eine radioaktive Markierung von Proteinen vorgenommen. Die Zellen wurden in „6-well“-Platten bis zur 90 %igen Konfluenz in Kompletmedium vermehrt. Anschließend wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und in RPMI 1640-Methionin-Mangelmedium, inkl. 5 % gegen 1x PBS dialysiertes FCS, gehalten. Zu diesem Medium wurde nach 1 h 100 µCi/ml S³⁵-markiertes Methionin (Amersham, Buckinghamshire, UK) gegeben und für 15 min, 1 h, 4 h oder 20 h inkubiert. Der Zellüberstand wurde jeweils zu den angegebenen Zeiten abgenommen und durch Zentrifugation bei 10.000 x g (5 min) der Zellabfall entfernt. Anschließend wurden die nachzuweisenden Proteine durch Immunaффinitätsaufreinigung angereichert.

2.4.11 Immunaффinitätaufreinigung

Die Immunaффinitätaufreinigung wurde zur Anreicherung von Proteinen aus dem Überstand der H2- und U251-Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden 200 µl Protein-A für 1 h mit 10 µl Antiserum (Kaninchen-Anti-SCRs 1-4-Antikörper) bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Partikel 2 x mit 0,2 M Na-Borat (pH 9,0) gewaschen und erneut in 2 ml Na-Borat resuspendiert. Tropfenweise wurde Dimethylpimelimidat (DMP) zur Suspension gegeben (Endkonzentration: 20 mM) und 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Die Partikel wurden mit 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen und 2 h bei RT mit 2 ml Ethanolamin inkubiert. Anschließend wurden die Partikel einmal mit Ethanolamin und einmal mit PBS gewaschen. Die mit Antikörpern beladenen Protein-A-Partikel wurden in 200 µl PBS resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

100 µl Zellkulturüberstand der H2- bzw. U251-Zellen wurde mit 20 µl Protein-A-Partikeln 1 h bei RT inkubiert, um die an Protein-A unspezifisch bindenden Proteine zu entfernen. Anschließend wurde diese Suspension sedimentiert (2000 upm) und der Überstand zu 100 µl Protein-A-Partikeln gegeben, die mit spezifischen Antikörpern beladen waren. 100 µl PBS wurden zugefügt und ü/N bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit PBS entfernt und die Partikel mit 10 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0) äquibriert. Die an Antikörper gebundenen Proteine wurden von den sedimentierten Partikeln mit 40 µl 100 mM Triethylamin (pH 11,5) eluiert. Zum Absenken des pH-Wertes wurde zum Eluat 1/20 Volumen 1 M Phosphat-Puffer (pH 6,8) gegeben. Das Eluat wurde mittels Western-Blot auf eine spezifische Anreicherung untersucht.

2.4.12 ELISA (enzym-linked immuno sorbant assay)

Für die Bestimmung der Faktor H- bzw. FHL-1-Konzentrationen in biologischen Proben wurde ein ELISA entwickelt. Die „wells“ in der Mikrotiterplatte wurden mit polyklonalem Ziegen-Anti-Human Faktor H IgG (2,5 µg/ml) ü/N bei 4°C inkubiert. Nach Blockierung mit 3-5 % BSA/PBS wurden die Zellüberstände (Zellwachstum für 24 h ohne FCS), NHS oder Synovialflüssigkeiten (gewonnen von Patienten, die an RA leiden; diese Proben wurden mir freundlicherweise durch Herrn Dr. Hermann Eibel, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt) hinzugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurde der 90X oder 131X mAk (1 µg/ml) für die Analyse der Zellüberstände, bzw. Anti-SCR 1-4-Ak oder Anti-SCR 19-20-Ak (1 µg/ml) für die Analyse des NHS und der Synovialflüssigkeiten hinzugegeben. Die Platten wurden für 2 h bei 37°C inkubiert, gewaschen und der gebundene Antikörper mit einem HRP-konjugiertem Kaninchen-Anti-Maus IgG (Jackson, West Grove, USA) bzw. einem HRP-konjugiertem Schwein-Anti-Kaninchen IgG (Dako, Hamburg, Deutschland) detektiert. Gefolgt von der Inkubation mit dem Substrat (OPD, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für die HRP (Life Technologies, Rockville, USA) wurde die Farbreaktion mit H₂SO₄ gestoppt und die

Intensität bei 492 nm (MRX Microplate Reader, Dynatech Lab., Denkendorf, Deutschland) gemessen.

2.4.13 Durchflußzytometrie

Die Bindung von Faktor H und FHL-1 an Zellmembranen wurde mittels durchflußzytometrischer Analysen von H2-, U251-, EAhy926-Zellen und Synovialfibroblasten untersucht. Die Zellen wurden durch die Behandlung mit 0,02 % EDTA von der Zellkulturfläche abgelöst. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 0,5 % BSA/PBS verdünnt. Für jeden Ansatz wurden 5×10^5 Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen für 1 h bei 37°C mit NHS (1:4 verdünnt), gereinigtem Faktor H (200 µl/ml) oder FHL-1 (50 µl/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert.

Als nächster Schritt folgte eine Inkubation von 30 min mit polyklonalem Anti-Faktor H-Ak, Anti-SCR 1-4-Ak oder Anti-SCR 19-20-Ak bei 4°C. Die Zellen wurden vorsichtig gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (FITC-konjugierter Kaninchen-Anti-Ziegen IgG bzw. FITC-konjugierter Ziegen-Anti-Kaninchen IgG) für 30 min bei 4°C inkubiert, gewaschen und mit einem Becton Dickinson FACScan 440 flow cytometer (San Jose, CA, USA) analysiert. Kontrollreaktionen wurden, unter Verwendung von unspezifischen Mäuse- oder Kaninchen-IgG als primäre Antikörper, durchgeführt.

2.4.14 Immunhistochemie

Für die Immunperoxidasefärbung wurden frische Gewebeproben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Serielle Kryostatschnitte (4-5 µm) wurden auf poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetragen, an der Luft getrocknet, in Aceton (-20 °C) für 5-10 min fixiert und in PBS mit 0,1 % Phenylhydrazin für 30 min inkubiert. Die Schnitte wurden mit 1 % BSA/PBS für 30 min blockiert. Die primären monoklonalen Antikörper (VIG8, 196X) wurden bei optimaler Konzentration auf die Schnitte gegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Irrelevante IgG von der Maus (Coulter Immunology, Hialeah, FL) wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Schnitte wurden 3x in PBS/0,1 % Tween gewaschen und für 60 min mit HRP-konjugierten Kaninchen Anti-Maus IgG (Dako) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1 % Tween und Inkubation in 0,3 M Na-Acetat, pH 5,2-5,8 wurden die Objektträger mit Aminoethylcarbazol als Chromogen behandelt. Die Schnitte wurden schließlich mit Hämalun (Merck, Darmstadt, Germany) gegengefärbt.

2.4.15 Biosensortechnik

Die Biosensormessungen erfolgten mit dem BIACORE 2000 Instrument und der BIAevaluation V 3.0 Software (Biacore AB, Uppsala, Schweden) am Haartman Institut der Universität Helsinki, Finnland. Dabei wurde zunächst C3b auf einem carboxylierten Dextran CM5

Sensorchip immobilisiert (Biacore, Uppsala, Schweden). Hierzu wurde entweder die herkömmliche Aminokopplung oder eine Enzymkaskadendeposition von C3b auf der Chipoberfläche durchgeführt. Der erste Vorgang geschieht ungerichtet, so dass nur bei einem Teil des so gebundenen C3b die Bindestellen zur Verfügung stehen. Daher wurde vor allem die zuletzt genannte Beschichtungsmethode verwendet, die eine physiologische Ablagerung von C3b auf der Chipoberfläche durch Ausbildung einer Thioesterbindung ermöglicht (Abb. 2.3) (HELLWAGE *et al.* 1999). Durch aufeinanderfolgende Injektionen von aufgereinigten Komplementproteinen C3, Faktor B und Faktor D bei gleichzeitiger Stabilisierung durch Nickelionen (1 mM Ni^{2+}) wurden C3-Konvertasen des AP auf der Chipoberfläche generiert. Die folgende Injektion von C3 bewirkte jeweils eine effektive physiologische Anlagerung von C3b auf der Chipoberfläche. Vor Verwendung des Chips wurde Elutionspuffer und anschließend Puffer ohne Nickelionen durch die Flußzelle geleitet und dadurch die Konvertasen und alle nicht kovalent gebundenen Moleküle von der Oberfläche entfernt. Die Analysen wurden in Veronalpuffer (veronal buffered saline, VBS) oder 1/3 x VBS-Puffer bei einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ für qualitative Analysen und 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ für Kinetikanalysen durchgeführt. Nach jedem Experiment wurde die Oberfläche durch Injektion von 30 ml Regenerationspuffer (2 M NaCl in Acetatspuffer, pH 4,6) in die Flußzelle regeneriert.

Für die Messungen mit C3d wurde das Protein durch Aminokopplung an die Chipoberfläche gebunden, da die physiologische Anlagerung nicht möglich ist. Als interne Kontrolle wurde eine unbeschichtete Flußzelle verwendet.

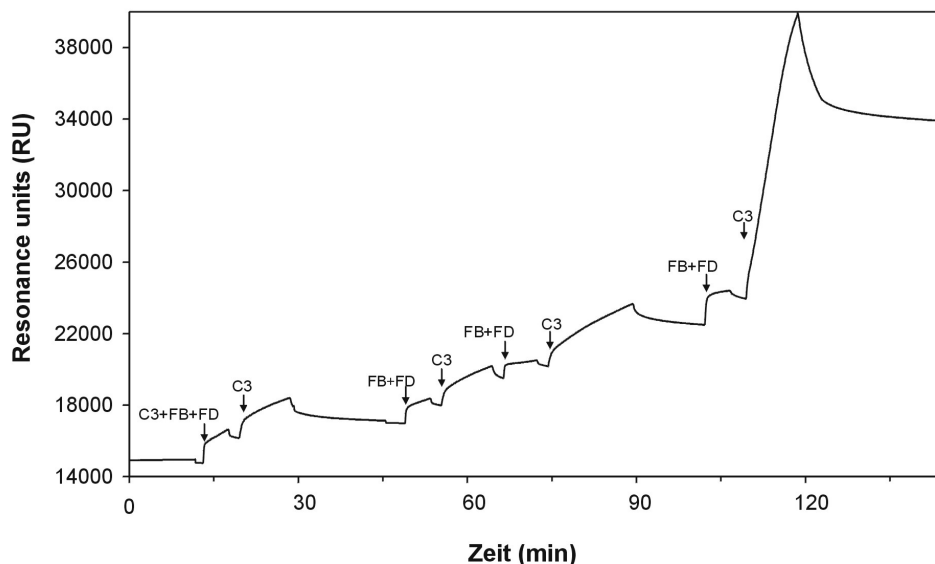


Abb. 2.3: Beschichtung der Biosensorchip-Oberfläche. In die Flußzelle wurden nacheinander die aufgereinigten Komplementproteine C3, Faktor B und Faktor D injiziert. Die C3b Anlagerung wird durch die gebildete C3-Konvertase, die durch die Anwesenheit von Nickelionen im Puffer stabilisiert wurde, amplifiziert. Der Anstieg der „Resonance units“ zeigt diesen Vorgang an.

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression von Faktor H und FHL-1/Reconnectin

Die Verteilung der Faktor H-Genexpression in verschiedenen humanen Organen ist weitgehend ungeklärt. Aus diesem Grunde wurden cDNA Proben aus 50 verschiedenen Geweben mittels Dot-Blot mit einer spezifischen radioaktiv markierten Faktor H-Sonde untersucht. Die Ergebnisse, nach der Stärke der Signale geordnet, sind aus Tab. 3.1 und Abb. 3.1 zu entnehmen. In den Negativkontrollen (H1-6) war kein Signal zu erkennen und die Positivkontrollen (H7, H8) zeigten Intensitätsunterschiede in der Signalstärke, die mit der eingesetzten DNA-Menge korreliert.

starke Expression	mittelstarke Expression	schwache Expression
adulte Leber (E2)	Herz (C1)	Aorta (C2)
fetale Leber (G4)	Ovarien (D2)	Kolon (C4)
	Dünndarm (E3)	Blase (C5)
	Trachea (F3)	Nebenniere (D5)
		Schilddrüse (D6)
		Speicheldrüse (D7)
		Magen (C8)
		Brustdrüse (D8)
		Rückenmark (B7)
		fetale Lunge (G7)
		adulte Lunge (F2)
		Lymphknoten (E7)
		Nieren (E1)
		Appendix (F1)

Tabelle 3.1: Expression von Faktor H und FHL-1/Reconnectin in verschiedenen humanen Geweben. Untersuchung mittels Dot-Blot Analyse.

Weitere Gewebe zeigten eine sehr schwache Expression: Gehirn (A1), Amygdala (A2), Nucleus caudatus (A3), Zerebellum (A4), Kortex (A5), Frontallappen (A6), Hippocampus (A7), Medulla oblongata (A8), Occipitallappen (B1), Putamen (B2), Substantia nigra (B3), Temporallappen (B4), Thalamus (B5), Nucleus accumbens (B6), Skelettmuskulatur (C3), Uterus (C6), Prostata (C7), Testis (D1), Pankreas (D3), Hypothalamus (D4), Milz (E4), Thymus (E5), periphere Leukozyten (E6), Knochenmark (E8), Plazenta (F4), fetales Gehirn (G1), fetales Herz (G2), fetale Niere (G3), fetale Milz (G5), fetaler Thymus (G6).

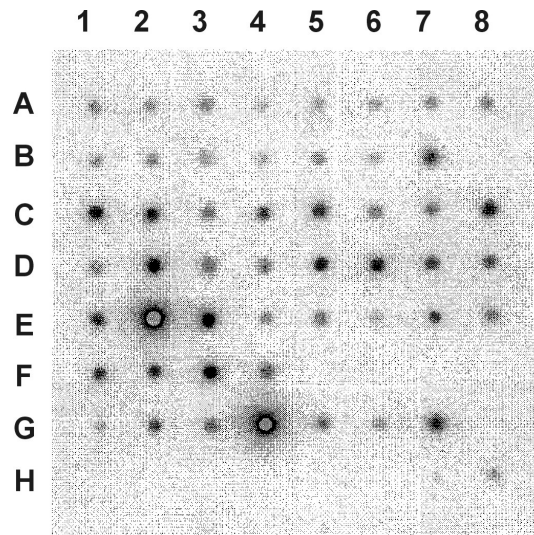


Abb. 3.1: RNA-Analyse. Der RNA Dot Blot enthält polyA⁺-RNA von fünfzig verschiedenen humanen Geweben, sowie Kontrollen. Nach Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten Faktor H-cDNA Probe wurde die Detektion der Signale per Autoradiographie durchgeführt.

Um die Synthese und Regulation der beiden verschiedenen Faktor H-Genprodukte, Faktor H und FHL-1, zu unterscheiden und weiter zu verstehen, wurde die RNA-Expression und Regulation in hepatischen und extrahepatischen Zelllinien mittels RT-PCR untersucht. Die cDNA wurde mit Reverser Transkriptase aus der isolierten mRNA der Zelllinien hergestellt und mit spezifischen Primern amplifiziert (RT-PCR) (Abb. 3.2). Die Methode der RT-PCR erlaubte es, zwischen Faktor H und FHL-1 zu differenzieren, da die kurze spezifische C-terminale Sequenz von FHL-1 als ein Primertemplate diente. Faktor H-Transkripte waren in promyelozytischen Leukämiezellen (U937) (Spur 7) und in der Hepatoblastoma Zelllinie HUH7 (Spur 10) detektierbar, während die übrigen acht untersuchten Zelllinien keine detektierbaren Signale zeigten. mRNA von humaner Leber diente als Positivkontrolle (Spur 11).

Die FHL-1 mRNA, die ein alternativ prozessiertes Produkt des Faktor H-Gens repräsentiert, zeigte eine unterschiedliche Expression. Diese mRNA ist in höheren Konzentrationen in U937-Zellen zu detektieren und zudem in unstimulierten MRC-5 Lungenfibroblasten (Spur 5) nachweisbar.

Die mRNA von FHR-4, wurde in den Hepatozyten HUH7 und dem Kontrollgewebe detektiert, während sie in keiner anderen Zelllinien nachweisbar war.

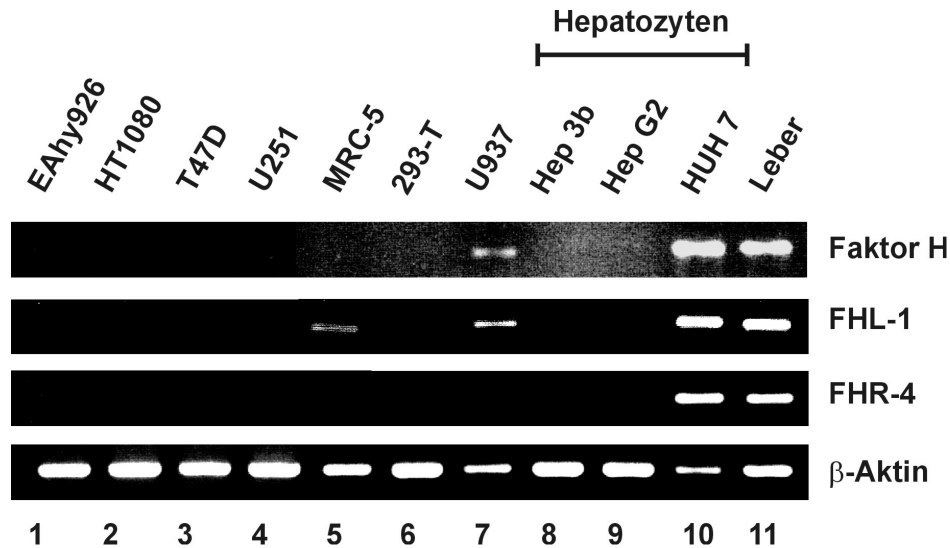


Abb. 3.2: RT-PCR Analyse der mRNA-Expression von Faktor H, FHL-1/Reconectin und FHR-4 in hepatischen und extrahepatischen Zellen. Die mRNA wurde aus den angegebenen Zellen isoliert und durch Reverse Transkriptase umgeschrieben. Sequenzspezifische Primer wurden für die PCR-Analyse verwendet und cDNA aus humanem Lebergewebe als Kontrolle eingesetzt.

3.2 Induktion und Regulation von Faktor H und FHL-1/Reconectin

Da die zwei Faktor H-Genprodukte in hepatischen und extrahepatischen Zellen unterschiedlich exprimiert wurden, war von Interesse, ob die Expression der beiden Gene Faktor H und FHL-1 unterschiedlich reguliert wird. In den hepatischen Zelllinien Hep3b und HepG2 konnte in unstimulierten Zellen keine Faktor H mRNA detektiert werden (Kontrolle) (Abb. 3.3 A,B). Die Expression konnte durch das proinflammatorische Zytokin Interferon- γ induziert werden (Abb. 3.3 A,B Spur 2). Das Glukokortikoid Dexamethason (DXM) hingegen induzierte Faktor H-Transkripte in Hep3b, aber nicht in HepG2 Zellen (Abb. 3.3 A,B Spur 3). In Hep3b Zellen konnte das FHL-1-Transkript mit IFN- γ , nicht aber mit DXM induziert werden, während das FHR-4-Transkript durch DXM, nicht aber mit IFN- γ hochreguliert wurde.

Die unterschiedliche Expression und Regulation der beiden mRNAs wurde auch in nicht transformierten humanen Lungenfibroblasten beobachtet (Abb. 3.3 C). In diesen Zellen wurden beide Faktor H und FHL-1 Transkripte, durch Serumstimulation, IFN- γ und DXM induziert (Spur 2, 3 und 4). Wiederum wurden unterschiedliche Konzentrationen der Transkripte detektiert. Das FHR-4-Transkript konnte in MRC-5 Fibroblasten unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde die Regulation der zwei Transkripte in der humanen endothelialen Zelllinie EAhy926 untersucht, um zu sehen, ob das Endothel zur Synthese der Moleküle beiträgt. Das spezifische FHL-1 Transkript konnte durch IFN- γ - und DXM-Behandlung hochreguliert werden, während Faktor H und FHR-4 mRNA in diesen Zellen nicht induzierbar waren (Abb. 3.3 D).

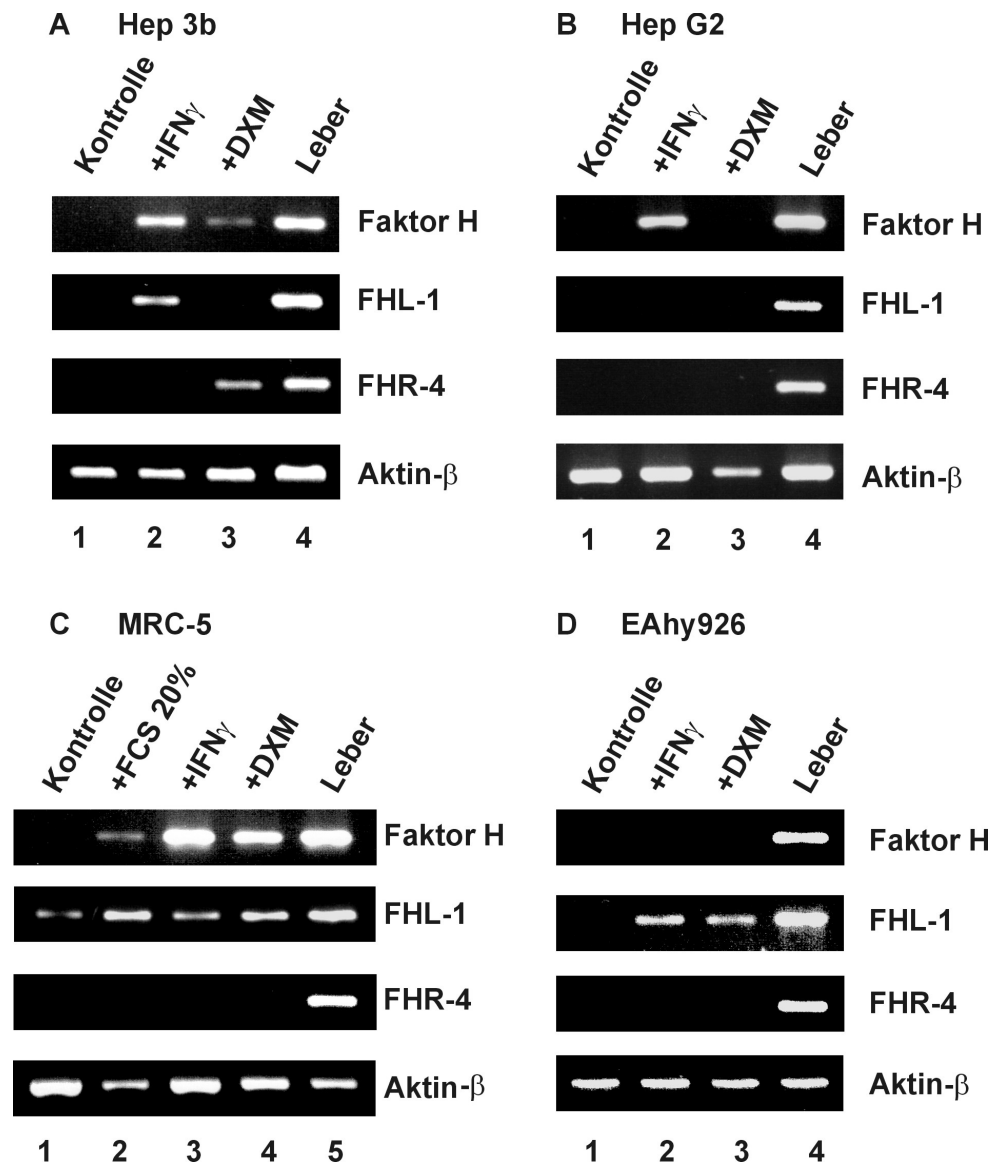


Abb. 3.3: Induktion und Regulation von Faktor H, FHL-1/Reconnectin und FHR-4 in verschiedenen Zelllinien. Die mRNA wurde aus hepatischen Hep3b (A), HepG2 (B), Fibroblasten (C) und Endothelzellen (D) entweder unbehandelt isoliert (Kontrolle) oder nach Behandlung mit IFN- γ (100 U/ml) für 24 h oder für 48 h mit Dexamethason (0,1 μ M). Die mRNA wurde mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und sequenzspezifische Primer für die PCR-Analyse verwendet. Humane Lungenfibroblasten wurden zudem bei niedriger Serumkonzentration für 3 Tage gehalten und die mRNA wurde nach 24 h Serumbehandlung isoliert (C, Spur 2).

3.3 Kinetik der Faktor H und FHL-1/Reconnectin Expression

Um die unterschiedliche Regulation der Faktor H und FHL-1 mRNA-Expression genauer zu untersuchen, wurde die Kinetik der beiden Transkripte in hepatischen Hep3b-Zellen und extrahepatischen MRC-5-Fibroblasten nach DXM-Stimulation betrachtet (Abb. 3.4). Die Faktor H mRNA wurde in unbehandelten Hep3b Zellen nicht detektiert, war aber nach 48 h und 72 h DXM-Behandlung zeitabhängig induzierbar, während FHL-1 nicht nachzuweisen war (Spur 3 und 4). MRC-5-Fibroblasten exprimierten das FHL-1-Transkript konstitutiv und beide mRNAs

wurden nach DXM-Behandlung abhängig von der Dauer der Stimulation weiter erhöht. Die Kinetik der Faktor H-Induktion war in hepatischen und in extrahepatischen Zellen vergleichbar.

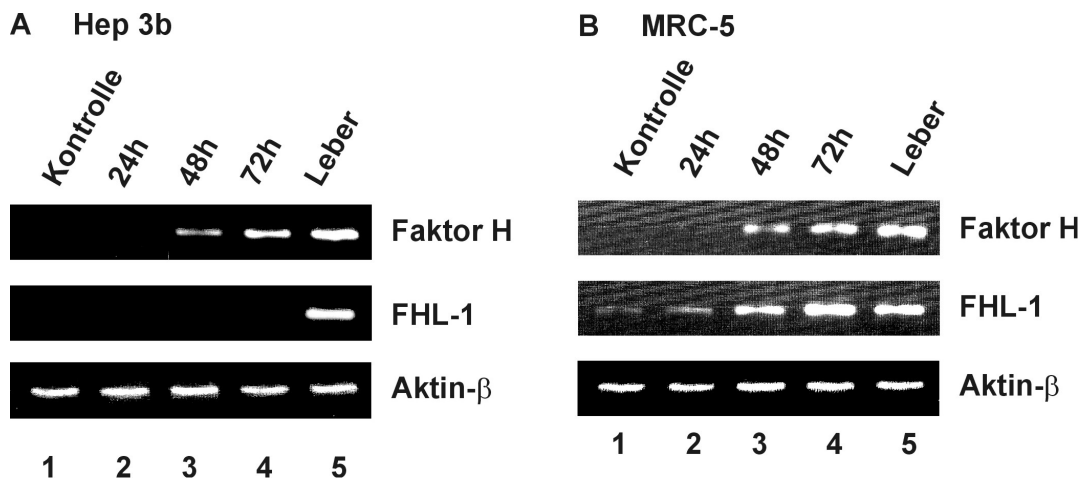


Abb. 3.4: Zeitverlauf der Faktor H und FHL-1/Reconnectin Expression. Die mRNA wurde aus der humanen Leberzelllinie Hep3b (A) und Lungenfibroblasten (B) isoliert, die entweder unbehandelt (Kontrolle) oder für den angegebenen Zeitraum mit Dexamethason (0,1 μ M) behandelt wurden. Die mRNA wurde revers transkribiert und es wurden sequenzspezifische Primer für die PCR-Analyse verwendet.

3.4 Promotorregulation von Faktor H und FHL-1/Reconnectin

Um die transkriptionelle Induktion des FHL-1/Faktor H Genpromotors durch pro- und antiinflammatorische Stimuli in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurden verschiedene Promotordeletionskonstrukte in transienter Transfektion verwendet.

Die basalen Aktivitäten des längsten Promotorkonstrukts variierten beträchtlich zwischen den unterschiedlichen Zelllinien. Die 293-T Zellen wiesen eine Aktivität von 1.022.028 RLU auf, während die HUH7 Zellen mit 118.810 RLU niedriger lagen. Die Fibroblasten zeigten eine mittlere Aktivität von 15.995 RLU.

Bei Deletion der Region zwischen -699 und -511 erniedrigte sich die basale Promotoraktivität in allen drei untersuchten Zelllinien (293-T, HUH7, MRC-5) um 25-50 % (Abb. 3.5). Weitere Deletionen (pHW-199) zeigten hingegen eine Steigerung der Aktivität um 150-200 % in 293-T- und HUH7-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte in MRC-5-Fibroblasten, eine unveränderte Promotoraktivität mit dem pHW-199 Konstrukt beobachtet werden. Der minimale Promotor pHW-38 (-38 bis +18) zeigte in allen drei Zelllinien eine sehr geringe Luciferaseaktivität.

Um responsive Elemente für die induzierenden externen Stimuli, Interferon- γ und dem Glukokortikoid Dexamethason, zu identifizieren, wurde die Aktivität des FHL-1/Faktor H-Promotors nach Behandlung der Zellen mit diesen Immunmediatoren untersucht. In HUH7-Zellen zeigte das vollständige pHW-699 Konstrukt nach IFN- γ -Behandlung eine 7-8-fache Steigerung der Promotoraktivität, während die anderen Konstrukte um das 3-4-fache induziert wurden. In MRC-5-Zellen konnte ein davon abweichendes Muster der Stimulation detektiert werden. Eine 3-4-fache Induktion war für die Konstrukte pHW-699 bis pHW-199 zu sehen,

während das minimale Konstrukt pHW-38 eine 5-6-fach gesteigerte Aktivität aufwies. Die Promotoraktivität in Nierenzellen (293-T) wies keinerlei Änderungen nach der IFN- γ -Stimulation auf (Abb. 3.6).

In keiner der drei Zelllinien konnte ein induktiver Effekt von DXM beobachtet werden (Abb. 3.7).

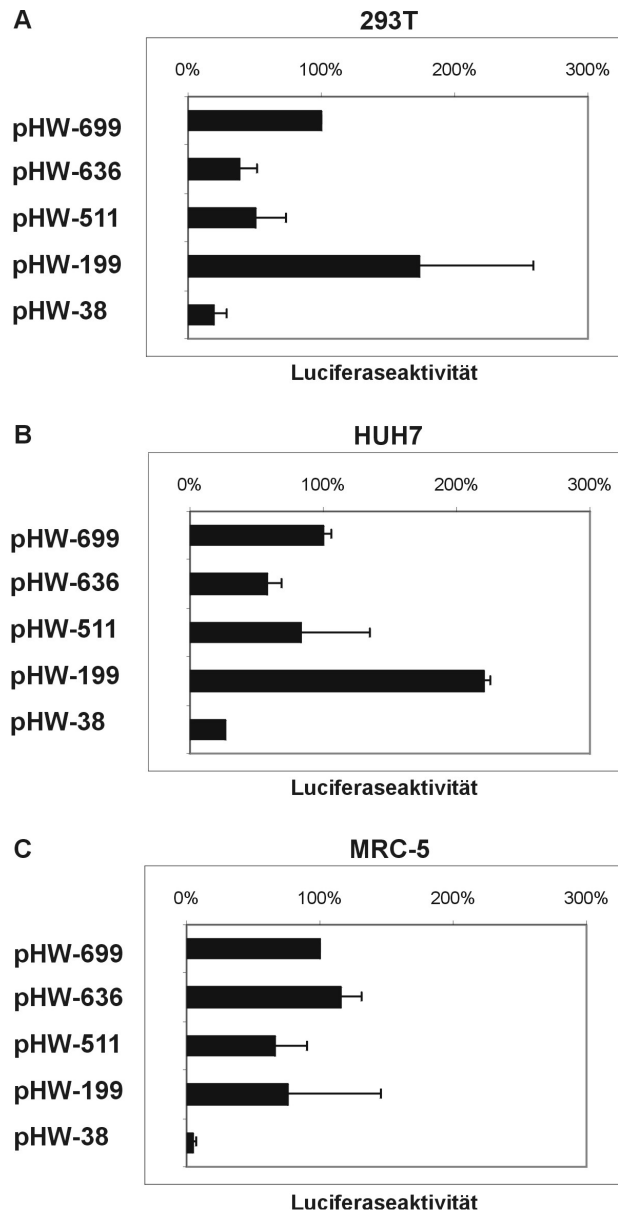


Abb. 3.5: Basale Promotoraktivität des humanen FHL-1/Faktor H-Gens in verschiedenen Zellen. Schematische Darstellung der basalen Luciferaseaktivität der Deletionskonstrukte der FHL-1/Faktor H 5' flankierenden Region in 293T Nierenzellen (A), HUH7 Leberzellen (B) und MRC-5 Lungenfibroblasten (C). Die Aktivität wurde anhand des längsten Promotorkonstrukts (pHW-699) normalisiert, dessen Aktivität als 100 % gesetzt wurde. Jede Säule repräsentiert den Durchschnittswert von mindestens fünf unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung.

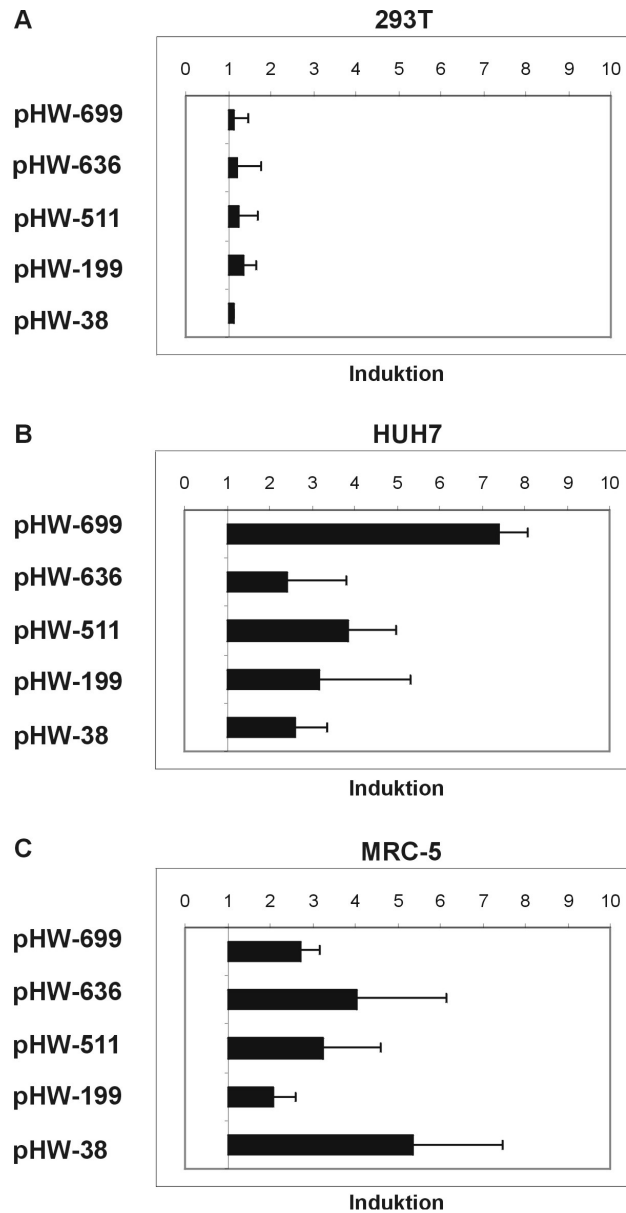


Abb. 3.6: Effekt von IFN- γ auf die FHL-1/Faktor H-Promotoraktivität in unterschiedlichen Zellen. Die Konstrukte enthalten die Sequenz des humanen FHL-1/Faktor H-Promotors, welcher in verschiedenen Deletionen stromaufwärts des Luciferasereportergens kloniert wurde. Diese Konstrukte wurden transient in die angegebenen Zellen transfiziert, die mit oder ohne IFN- γ (100 U/ml, 24 h) behandelt wurden. Die angegebenen Werte repräsentieren die Anzahl der Induktionssteigerung ausgehend von der basalen Aktivität des jeweiligen Konstruktes (1x). Jede Säule repräsentiert die Durchschnittswerte von mindestens fünf unabhängigen Messungen, sowie die Standardabweichung.

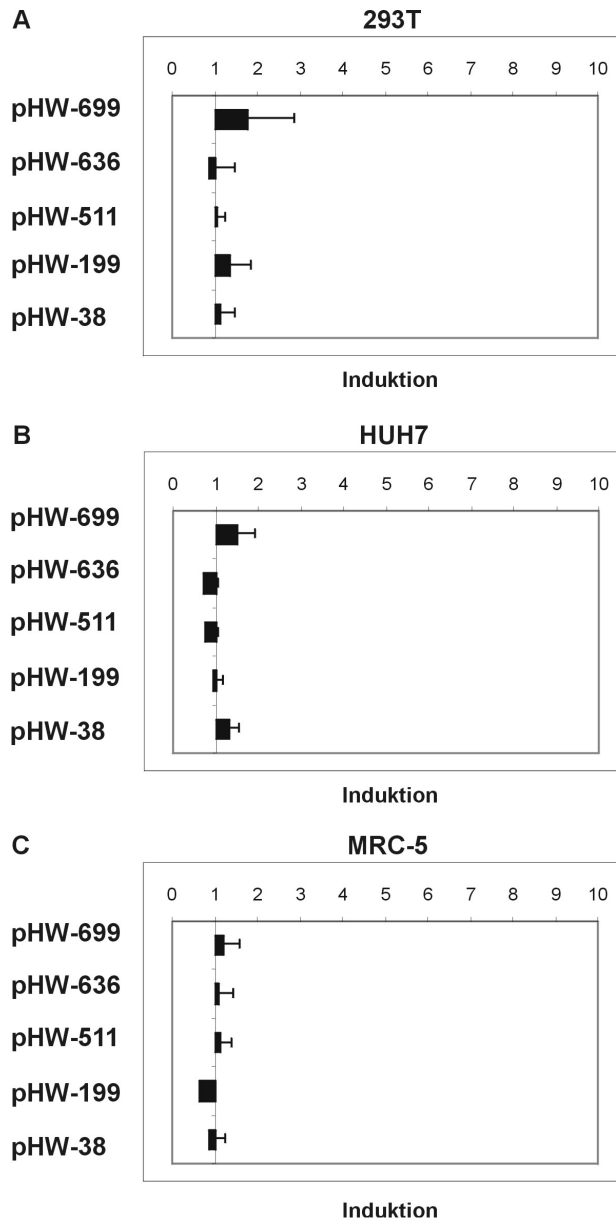


Abb. 3.7: Effekt von Dexamethason auf die FHL-1/Faktor H-Promotoraktivität in unterschiedlichen Zellen. Die Konstrukte enthalten die Sequenz des humanen FHL-1/Faktor H-Promotors, welcher in verschiedenen Deletionen stromaufwärts des Luciferasereportergens kloniert wurde. Diese Konstrukte wurden transient in die angegebenen Zellen transfiziert, die mit oder ohne Dexamethason (0,1 μ M, 24 h) behandelt wurden. Die angegebenen Werte repräsentieren die Anzahl der Induktionssteigerung ausgehend von der basalen Aktivität des jeweiligen Konstruktes (1x). Jede Säule repräsentiert die Durchschnittswerte von mindestens fünf unabhängigen Messungen, sowie die Standardabweichung.

3.5 Detektion von Faktor H und FHL-1/Reconnectin in Synovialflüssigkeiten

Da die beiden Faktor H-Genprodukte unterschiedliche Expression und Regulation zeigten und ihre transkriptionelle Induktion durch Entzündungsmediatoren reguliert wird, wurde als nächstes die Expression dieser Gene und die Proteinsynthese in Synovialflüssigkeiten aus entzündlichen Gelenken untersucht, um eine *in vivo* Situation der komplexen

Entzündungsreaktion zu verstehen. Zunächst wurde die Anwesenheit der Proteine Faktor H und FHL-1 in Synovialflüssigkeiten von Patienten mit rheumatoider (Abb. 3.8 A) oder reaktiver Arthritis (Abb. 3.8 B) per Western-Blot Analysen bestimmt. In den Synovialflüssigkeiten wurden sowohl das 150 kDa Faktor H Protein als auch das FHL-1 Protein, das hier in einer Doppelbande von 42 und 43 kDa vorlag, detektiert (Abb 3.8). Die Konzentrationen der beiden Proteine Faktor H und FHL-1 wurden zudem mit einem neu entwickelten ELISA und zwei unterschiedlichen Antikörpern quantitativ untersucht. Der Anti-SCR 1-4-Ak detektiert beide Proteine, Faktor H und FHL-1, da er am gemeinsamen N-terminalen Bereich der Proteine bindet, während der Anti-SCR 19-20-Ak ausschließlich Faktor H erkennt und somit durch Subtraktion die Konzentration von FHL-1 bestimmt werden kann. Dieses subtraktive Vorgehen war notwendig, da bis dato kein spezifischer Antikörper gegen FHL-1 vorhanden ist. Das Verhältnis der beiden Proteine zueinander, verhielt sich bei diesem Vorgehen abweichend von dem im Plasma. Das molare Verhältnis war in den untersuchten Proben zugunsten des FHL-1-Moleküls verschoben. In den Synovialflüssigkeiten war ein durchschnittliches FHL-1/Faktor H-Verhältnis von 1,10 zu detektieren, während im Serum ein Verhältnis von 0,32 vorlag (Tab. 3.2).

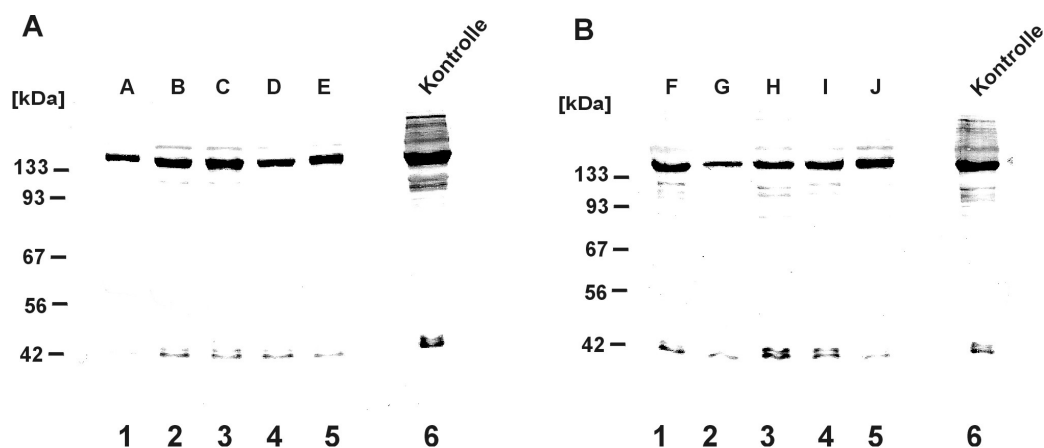


Abb. 3.8: Expression von Faktor H und FHL-1/Reconectin in Synovialflüssigkeiten. Die Synovialflüssigkeiten wurden aus den Gelenken von Patienten mit rheumatoider (A) oder von Patienten mit reaktiver Arthritis (B) isoliert. Diese Flüssigkeiten wurden durch ein SDS-PAGE separiert, durch Elektroblothing auf Nitrozellulose transferiert und mit spezifischem Antiserum gegen Faktor H und FHL-1/Reconectin entwickelt. Normales humanes Serum diente als Kontrolle. Die Mobilität des Größenmarkers ist am linken Rand angegeben.

Patient	ELISA I spezifisch für Faktor H (µg/ml)	Konzentration von Faktor H (µM)	ELISA II detektiert Faktor H + FHL-1 (µg/ml)	Differenz (µg/ml)	FHL-1 (µM)	FHL-1:Faktor H (molares Verhältnis)
NHS 1	386	2,6	425	39	0,80	0,31
NHS 2	529	3,5	584	55	1,13	0,32
<i>Rheumatoide Arthritis</i>						
A	91	0,6	132	41	0,85	1,41
B	145	1,0	203	58	1,20	1,20
C	167	1,1	226	59	1,22	1,11
D	121	0,8	142	21	0,43	0,54
E	163	1,1	216	53	1,09	0,99
<i>Reaktive Arthritis</i>						
F	105	0,7	169	64	1,32	1,89
G	186	1,2	223	37	0,76	0,64
H	210	1,4	259	49	1,01	0,72
I	192	1,3	252	60	1,24	0,95
J	162	1,1	240	78	1,61	1,46

Tabelle 3.2: Konzentrationen von Faktor H und FHL-1/Reconnectin in humanem Serum und in Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider und reaktiver Arthritis. Die Konzentrationen wurden durch eine Kombination von zwei ELISA-Systemen bestimmt.

ELISA I verwendete ein Kaninchenantiserum (Anti-SCR 19-20), welches spezifisch für die C-terminale Domäne für Faktor H ist, die im FHL-1 Protein nicht vorkommt. Das System wurde an aufgereinigtem Faktor H als Standard kalibriert.

ELISA II nutzte ein anderes Antiserum zur Detektion als ELISA I. Das Detektionsantiserum identifiziert ein Epitop innerhalb der SCRs 1-4, eine Region, die sowohl im Faktor H, als auch im FHL-1 vorkommt. Dieses System wurde ebenso an gereinigtem Faktor H kalibriert.

Subtraktion der erhaltenen Werte von ELISA I von denen aus ELISA II reflektiert demnach die Konzentration von FHL-1.

3.6 Synthese von Faktor H und FHL-1/Reconnectin durch Synovialfibroblasten

Um festzustellen, ob die in der Synovialflüssigkeit nachgewiesenen Proteine Faktor H und FHL-1 von Synovialzellen synthetisiert werden, wurde die Expression dieser Moleküle in Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene untersucht. Zudem wurde die Expression der Komplementregulatoren CD46, CD55 und CD59 mituntersucht. Konstitutive Expression von FHL-1, CD46, CD55 und CD59 konnte in den Zelllinien nachgewiesen werden, während Faktor H unter diesen Umständen nicht detektiert werden konnte (Abb. 3.9 A).

Um die Induzierbarkeit von Faktor H und FHL-1 durch inflammatorische Mediatoren zu überprüfen, deren Einfluß in der entzündlichen Reaktion der RA von wesentlicher Bedeutung ist, wurden die Synovialfibroblasten mit den Zytokinen IFN- γ und TNF- α , sowie mit dem antiinflammatorischen Medikament DXM behandelt. In allen drei untersuchten Zelllinien wurde Faktor H und FHL-1 durch IFN- γ und DXM induziert, während CD46, CD55 und CD59 in ihrer Expression unverändert blieben (Abb. 3.9). TNF- α hatte hingegen keinen Einfluß auf die Expression sämtlicher untersuchter Komplementregulatoren (Abb. 3.9 A, Spur 2).

Um die Ergebnisse der Transkriptebene auf der Proteinebene zu bestätigen, wurde die Anwesenheit der Proteine Faktor H und FHL-1 in den Kulturüberständen untersucht. In unbehandelten Zellen konnte per Western-Blot FHL-1 nachgewiesen werden, während IFN- γ und DXM die Expression von Faktor H und FHL-1 induzierten (Abb. 3.9 B). Das Zytokin TNF- α zeigte auf der Proteinebene keinen Effekt.

Bei identischen Ergebnissen der 3 Zelllinien GDR, HWL und SOZ ist in der Abb. 3.9 ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

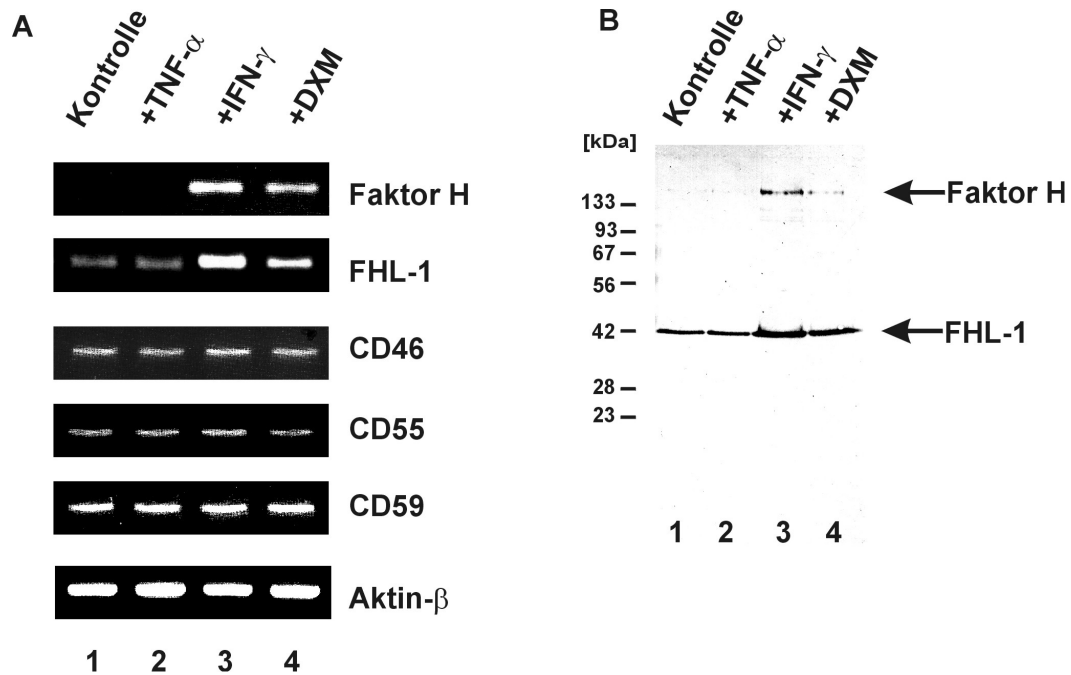


Abb. 3.9: Expression von Faktor H und FHL-1/Reconectin und der membranständigen Komplementregulatoren durch Synovialfibroblasten. (A) Expression der Komplementregulatoren Faktor H, FHL-1/Reconectin, CD46, CD55 und CD59 in Synovialfibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Synovialfibroblasten von einem repräsentativen Patienten wurde entweder unbehandelt (Kontrolle), für 24 h mit TNF- α (10 ng/ml), für 24 h mit IFN- γ (100 U/ml) oder für 48 h mit Dexamethason (0,1 μ M) behandelt. Die mRNA wurde von den angegebenen Zelllinien isoliert mit Reverser Transkriptase umgeschrieben und mit sequenzspezifischen Primern in einer PCR-Analyse amplifiziert. Aktin- β wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

(B) Expression der Proteine Faktor H and FHL-1/Reconectin im Kulturüberstand. Synovialfibroblasten wurden in serumfreiem Medium kultiviert und der Kulturüberstand wurde entweder von unbehandelten Zellen (Kontrolle) gewonnen oder von Zellen, die für 24 h mit TNF- α (10 ng/ml), für 24 h mit IFN- γ (100 U/ml) oder für 48 h mit Dexamethason (0,1 μ M) behandelt worden. Der Überstand wurde durch eine SDS-PAGE separiert, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch spezifische Antiseren für Faktor H und FHL-1/Reconectin visualisiert.

3.7 Identifizierung von funktionellen Elementen des Faktor H und FHL-1/Reconectin-Promotors in Synovialfibroblasten

Um die transkriptionelle Regulation des FHL-1/Faktor H-Genpromotors durch die verwendeten pro- und antiinflammatorischen Stimuli in Synovialfibroblasten zu untersuchen, wurden die Promotorkonstrukte in Patientenfibroblasten transfiziert und untersucht.

Die Fibroblasten zeigten eine durchschnittliche basale RLU-Aktivität von 14.305 RLU.

Bei Deletion der Region zwischen -699 und -511 erniedrigte sich die basale Promotoraktivität in den untersuchten Zelllinien um 25-50 % (Abb. 3.10 A), vergleichbar mit den vorher untersuchten drei anderen Zelllinien (Abb. 3.5). Das kürzere Deletionskonstrukt pHW-199 zeigte eine weitere Reduktion der Promotoraktivität auf ca. 30 %. Der minimale Promotor pHW-38 behielt sehr geringe Luciferaseaktivität.

Die Aktivität des FHL-1/Faktor H-Promotors nach Behandlung der Synovialfibroblasten mit dem antiinflammatorischen Medikament Dexamethason ergab eine 8-fache Steigerung der Promotoraktivität in den Synovialfibroblasten. Dieser Effekt ging vom pHW-199 Konstrukt zum pHW-38 Konstrukt verloren. (Abb. 3.10 D). Die Immunmediatoren Interferon- γ und Tumor Nekrose Faktor- α konnten hingegen keinerlei Änderungen in der Promotoraktivität induzieren (Abb. 3.10 B, C).

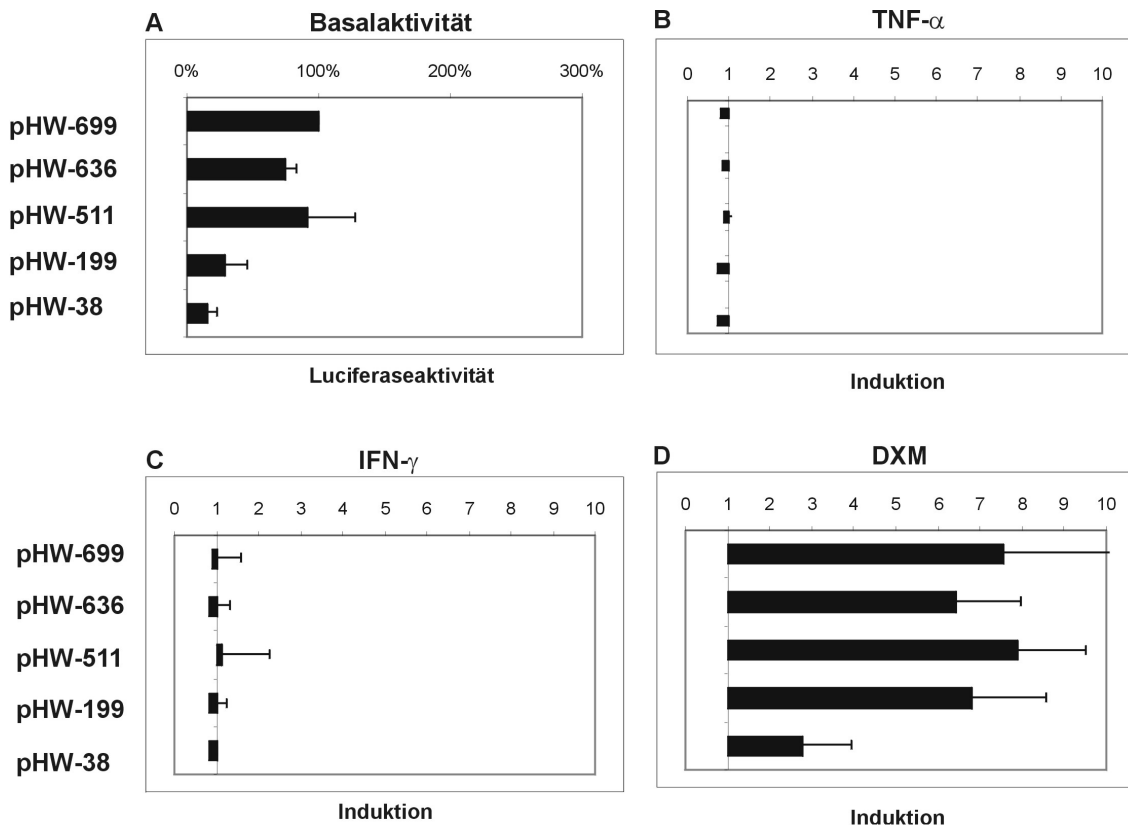


Abb. 3.10: Transkriptionelle Regulation des humanen FHL-1/Faktor H-Gens in Synovialfibroblasten. Darstellung der basalen Luciferaseaktivität der Deletionskonstrukte der FHL-1/Faktor H 5' flankierenden Region in Synovialfibroblasten (A). Die Aktivität wurde anhand des Promotorkonstrukts (pHW-699) normalisiert, dessen Aktivität als 100 % gesetzt wurde. Jede Säule repräsentiert den Durchschnittswert von mindestens fünf unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung. Effekt der Meditoren TNF- α (10 ng/ml) (B), IFN- γ (100 U/ml, 24 h) (C) und DXM (0,1 μ M, 24 h) (D) auf die Promotorkonstrukte. Die angegebenen Werte repräsentieren die Induktionssteigerung ausgehend von der basalen Aktivität des jeweiligen Konstruktes (1x). Jede Säule repräsentiert die Durchschnittswerte von mindestens fünf unabhängigen Messungen, sowie die Standardabweichung.

3.8 Bindung von Faktor H- und FHL-1/Reconnectin an Synovialfibroblasten

Da Synovialfibroblasten Faktor H und FHL-1 sezernieren, sollte die direkte Bindung an die Zelloberfläche dieser Proteine untersucht und die funktionelle Bedeutung herausgefunden werden. Hierfür wurden Synovialfibroblasten in NHS, das als Quelle für Faktor H und FHL-1 diente oder in gereinigtem Faktor H (200 µg/ml) bzw. rekombinantem FHL-1 (50 µg/ml) inkubiert. Die Bindung der Proteine wurde durch polyklonales anti-SCR 1-4- bzw. anti-SCR 19-20-Antiserum in FACS-Analysen nachgewiesen, so dass eine Unterscheidung zwischen Faktor H und FHL-1 möglich war. Beide Proteine hatten auf der Oberfläche von Synovialfibroblasten gebunden. Nach NHS-Inkubation färbten sich 87 % der Zellen mit dem anti-SCR 1-4-Ak positiv (Abb. 3.11 A) und 81 % der Zellen mit dem anti-SCR 19-20-Ak (Abb. 3.11 B). Nach der Behandlung mit isoliertem Faktor H waren 84 % der Zellen positiv gefärbt (Abb. 3.11 C). Nach der Inkubation mit rekombinantem FHL-1 fixierten 99,4 % der untersuchte Zellen das Protein. In den Kontrollen konnte dagegen keine Bindung von einem der Ak beobachtet werden.

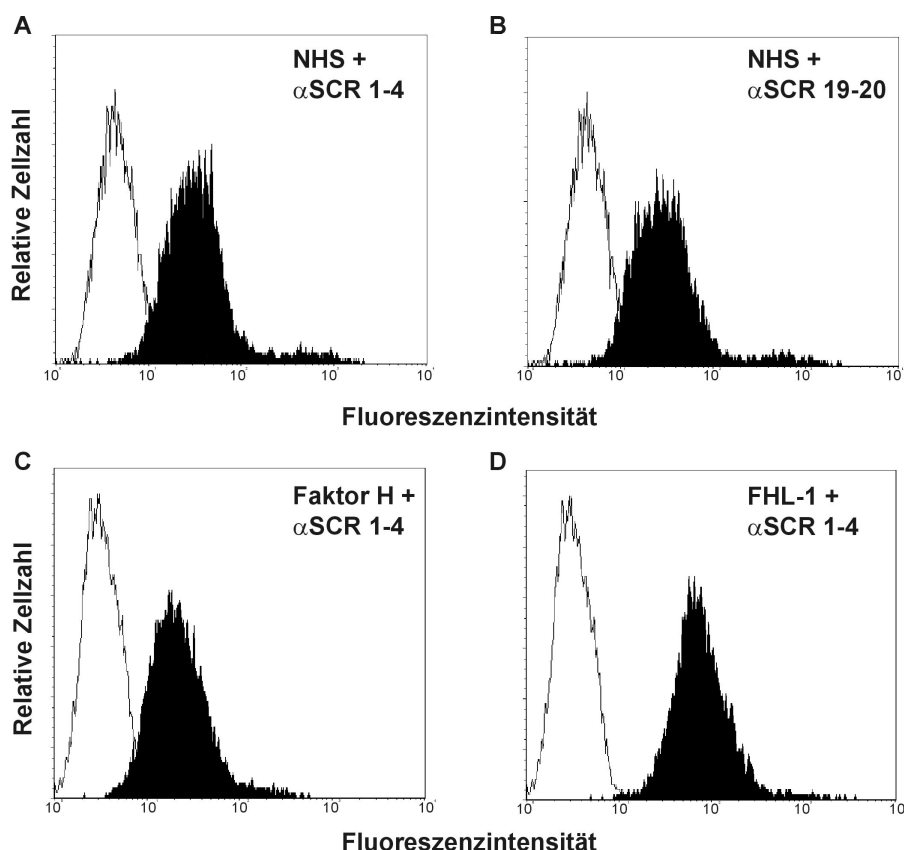


Abb. 3.11: Durchflusszytometrischer Nachweis der Bindung von Faktor H und FHL-1/Reconnectin an Synovialfibroblasten. Die Synovialzellen wurden in NHS (A, B) bzw. gereinigtem Faktor H (C) bzw. rFHL-1 (D) inkubiert und nach einem Waschvorgang mit polyklonalem anti-SCR 1-4- bzw. anti-SCR 19-20-Ak behandelt. FITC-markierte Schweine anti-Kaninchen Ak wurden für die Detektion eingesetzt (schwarze Histogramme). Unspezifische Maus-IgG wurden als primäre Ak für die Negativkontrolle eingesetzt (offene Histogramme).

3.9 Detektion von Faktor H und FHL-1/Reconectin in Synovialgewebe.

Um die Expression, Bindung und Lokalisation der lokal produzierten antiinflammatorischen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 direkt im Synovialgewebe nachzuweisen, wurde dieses Gewebe mit einem immunhistochemischen Verfahren untersucht. Es wurden Gefrierschnitte von Synovialzotten aus den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis und als Vergleich Patienten mit Osteoarthritis verwendet. Die Färbung mit dem VIG8 mAk, welcher an das C-terminale Ende von Faktor H bindet und damit nur Faktor H detektiert, zeigte eine starke Expression von Faktor H im intersitiellen Raum und im Bindegewebe, sowie im Lumen der angeschnittenen Gefäße (Abb. 3.12 A).

Der 196X mAk, der ein Epitop in SCR 1 erkennt und damit Faktor H und FHL-1 gleichermaßen detektiert, zeigte im Interstitium die gleiche Färbung wie der VIG8 mAk. Zusätzlich konnte jedoch ein starkes Signal an den Synovialzellen (Abb. 3.12 B), welche aus Synovialfibroblasten und Makrophagen zusammengesetzt sind, erkannt werden. Die Makrophagen wurden mit dem anti-CD68 mAk gefärbt und v.a. in der synovialen Grenzschicht detektiert (Präparat nicht gezeigt). Die Schnitte der Arthrosepatienten ohne Entzündungsreaktion zeigten hingegen weder eine Färbung mit VIG8 noch mit 196X mAk (Abb. 3.12 C, D).

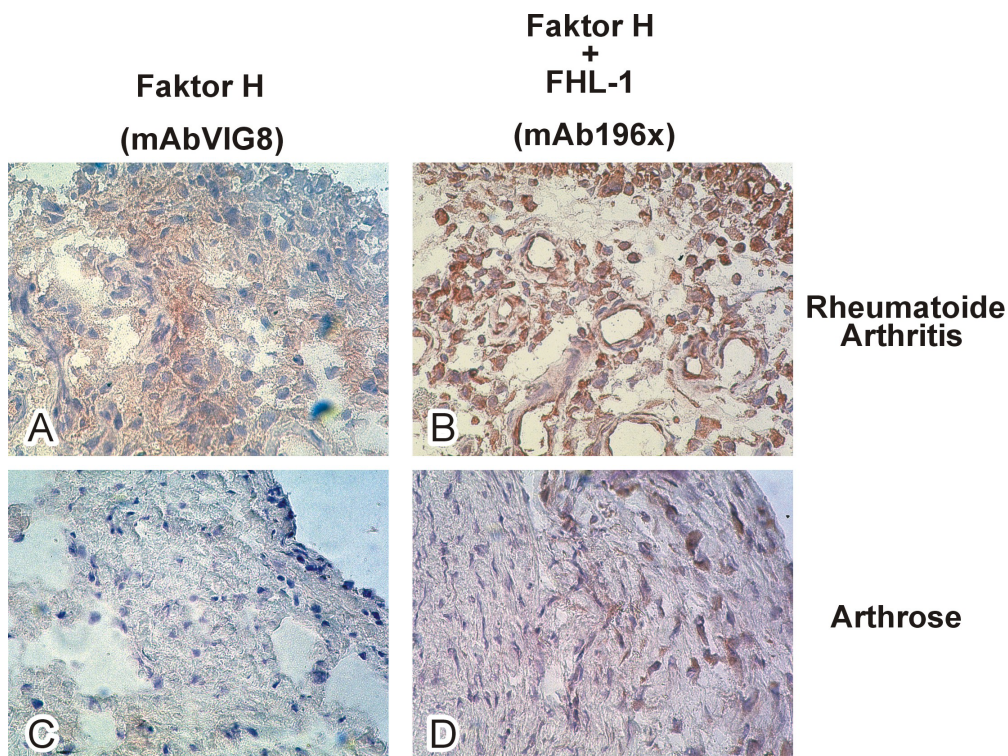


Abb. 3.12: Faktor H und FHL-1-Detektion in Synovialgewebe eines repräsentativen Falles von rheumatoider Arthritis (A und B) und Arthrose (C und D). Faktor H wurde mit dem VIG8 mAk (Epitop: SCR 19-20) sichtbar gemacht und ist im Interstitium der RA-Patienten exprimiert (A), während keine Färbung im Gewebe von Arthrosepatienten (C) sichtbar ist. FHL-1/Reconectin und Faktor H wurde mit 196X mAk sichtbar gemacht (Epitop: SCR 1). Färbung der Synovialgrenzmembran (Fibroblasten, einige Makrophagen) und des intersitiellen Raumes wird in Patienten mit RA beobachtet (B), aber nicht in der Arthrosekontrolle (D). (40x Vergrößerung).

3.10 Komplement-vermittelte Lyse von Synovialfibroblasten

Da Synovialfibroblasten und entzündliches Synovialgewebe große Mengen FHL-1 und Faktor H sezernieren und an ihre Oberflächen fixieren, wurde untersucht, ob durch diese Moleküle die Zellen vor der Lyse durch das Komplementsystem geschützt werden. Durch die Behandlung der Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Faktor H und FHL-1, wurde die Komplementlyse der Zellen signifikant erhöht. Der anti-SCR 1-4-Ak (schwarze Kreise), der beide Moleküle, Faktor H und FHL-1 neutralisiert, konnte die Lyse, im Vergleich zum anti-SCR 19-20-Ak (offene Kreise), der nur an Faktor H und nicht an FHL-1 bindet, von einer basalen Lyse um ca. 35 % der Zellen auf ca. 60 % der Zellen steigern (Abb. 3.13).

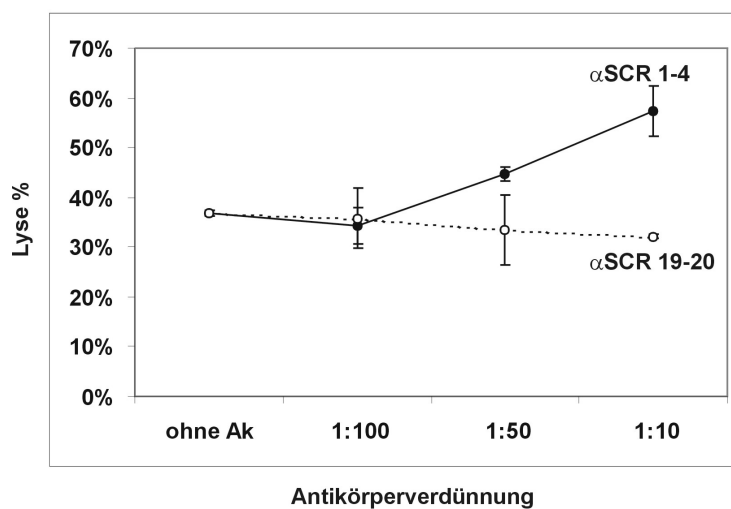


Abb. 3.13: Komplement vermittelte Lyse von Synovialfibroblasten nach Neutralisation von Faktor H und FHL-1/Reconnectin. ⁵¹Cr-markierte Zellen wurden mit den Ak anti-SCR 1-4 (schwarze Kreise) oder anti-SCR 19-20 (offene Kreise) respektive und in NHS, welches auf 1:4 verdünnt wurde und als Komplementquelle diente, behandelt. Die Resultate repräsentieren Durchschnittswerte $\pm$ SD von zwei Experimenten.

3.11 mRNA-Expression von Faktor H und FHL-1/Reconnectin durch Tumorzellen

Um zu untersuchen, ob autokrin synthetisiertes Faktor H und FHL-1 die sezernierenden Zellen in karzinomatösen Vorgängen, analog zu entzündlichen Prozessen, vor der autologen Komplementlyse schützen können, wurden verschiedene Tumorzelllinien auf die Expression dieser Moleküle untersucht. Die besonders komplementresistente Glioblastomazelllinie H2 (Abb. 3.15) zeigte eine Überexpression von FHL-1 und Faktor H in unstimuliertem Zustand, während andere Tumorzelllinien, wie die U251-Glioblastomazellen (Abb. 3.14 A) und zwei Mammakarzinomzelllinien (T47D, HT1080) im Vergleich keine Expression zeigten (Abb. 3.14 B, C). Das spezifische FHL-1 Transkript konnte in den drei letztgenannten Zelllinien durch eine

IFN- γ - und DXM-Behandlung hochreguliert werden, während Faktor H und FHL-4 mRNA nicht exprimiert wurden und auch nicht induzierbar waren (Abb. 3.14).

Die RT-PCR Ergebnisse von Faktor H und FHL-1 waren in H2-Zellen vergleichbar mit humanem Lebergewebe, welches als Hauptquelle für die Plasmaproteine *in vivo* dient. Die mRNA Expression der anderen bekannten membranständigen Komplementregulatoren CD46, CD55 und CD59 wurde in der H2 und U251 Glioblastomazelllinien ebenso durch RT-PCR analysiert. Während die mRNA von Faktor H und FHL-1 nur in den komplementresistenten H2-Zellen detektiert werden konnten, nicht aber in den durch Komplement lysierbare U251-Zellen, konnten die übrigen bekannten Komplementregulatoren in beiden Zelllinien gleichermaßen nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Zudem konnte ein etwas stärkeres Signal für CD55 und CD59 in der H2-Zelllinie, im Vergleich mit der U251 Zelllinie, detektiert werden. Zwischen den beiden Zelllinien konnte keine klare Differenz in der CD46 mRNA-Expression beobachtet werden.

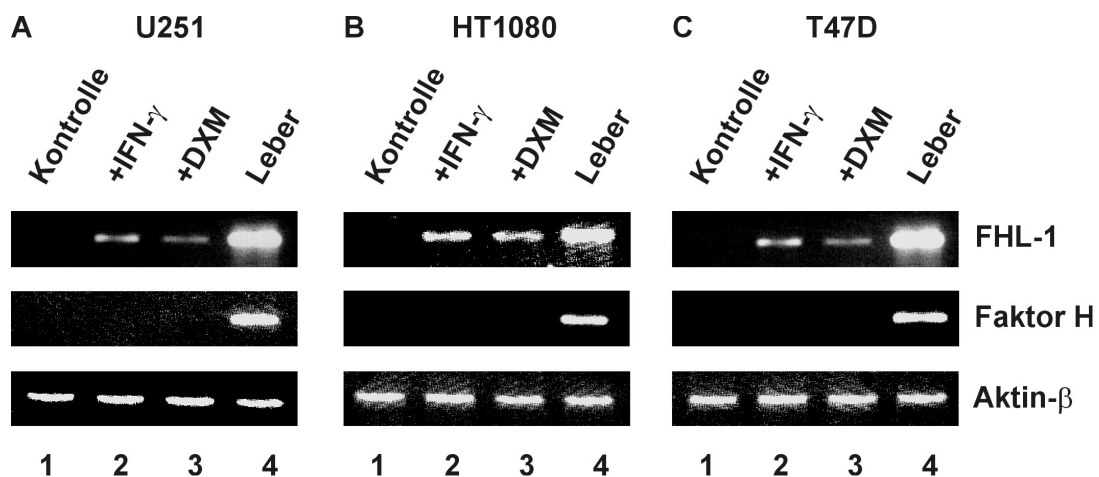


Abb. 3.14: Induktion und Regulation von Faktor H, FHL-1/Reconectin und FHL-4 in verschiedenen Tumorzelllinien. Die mRNA wurde aus den Glioblastomazellen U251 (A), dem Fibrosarkom der Mamma HT1080 (B) und dem Mammakarzinom T47D (C) entweder in unbehandeltem Zustand (Kontrolle) oder nach Behandlung mit IFN- γ (100 U/ml) für 24 h oder für 48 h mit Dexamethason (0,1 μ M) isoliert. Die mRNA wurde mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und sequenzspezifische Primer für die PCR-Analyse verwendet.

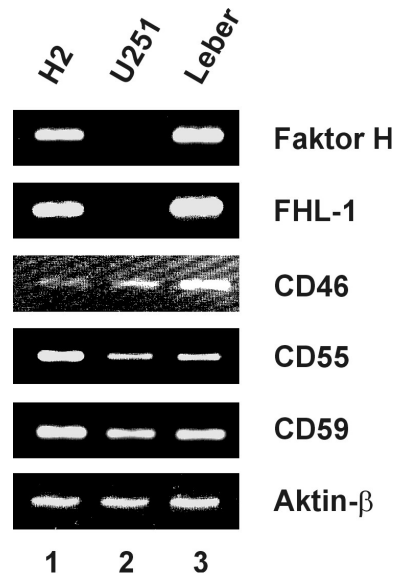


Abb. 3.15: RT-PCR Analyse der Expression der Komplementregulatoren in den komplementresistenten H2- und der komplementsensitiven U251-Glioblastomazellen. Die mRNA wurde aus den angegebenen Zellen isoliert und durch Reverse Transkriptase umgeschrieben. Sequenzspezifische Primer für Faktor H, FHL-1/Reconectin, CD46 (MCP), CD55 (DAF) und CD59 (Protektin) wurden für die PCR-Analyse verwendet und cDNA aus humanem Lebergewebe als Kontrolle eingesetzt.

3.12 Proteinsynthese von Faktor H und FHL-1/Reconectin durch H2-Zellen

Da H2-Zellen Faktor H- und FHL-1-Transkripte exprimieren, wurde versucht diese Expression auf Proteinebene zu bestätigen. Dafür wurde eine ELISA-Detektion, eine Western-Blot Analyse, sowie biosynthetische Markierungen und Antisense-Untersuchungen von H2- und U251-Zellkulturüberständen durchgeführt.

Um eventuelle Kontaminationen zu vermeiden wurden die Zellen gewaschen und in RPMI 1640 ohne FCS-Zusatz kultiviert. Unter Verwendung der mAk 131X und 90X, wurde mit dem ELISA festgestellt, dass die H2-Zellen, aber nicht die U251-Zellen, Faktor H und FHL-1 in das Medium sezernieren. Als Standard wurde isolierter Faktor H genommen. Faktor H und FHL-1 konnten zusammen mit einer Konzentration von 2 ng/ml/10⁵ Zellen nach 24 h gemessen werden.

Western-Blot Analysen mit dem Anti-SCR 1-4-Ak, welcher an Epitope in den ersten 4 SCRs von Faktor H und FHL-1 bindet, konnten zeigen, dass H2-Zellen sowohl das 150 kDa Faktor H als auch das 42 kDa FHL-1 Protein produzieren (Abb. 3.16). FHL-1 wird in größeren Mengen als Faktor H gebildet. Die Faktor H und FHL-1 Proteine konnten bereits nach 24 h Inkubation detektiert werden und wurden nach 48 h in höheren Konzentrationen nachgewiesen. Bei der Kontrollzelllinie U251 konnte hingegen während des gleichen 48 h Zeitraums keine detektierbaren Mengen von Faktor H oder FHL-1 nachgewiesen werden (Abb. 3.16).

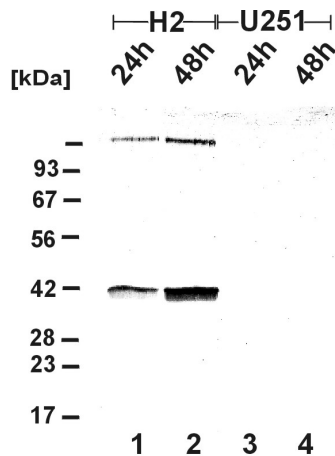


Abb. 3.16: Western-Blot Analyse der Faktor H und FHL-1/Reconnectin Sekretion durch H2 und U251 Zellen. Die H2- und U251-Glioblastomazellen wurden für 24 oder 48 h in serumfreiem Medium gehalten. Der Zellkulturüberstand wurde konzentriert und durch SDS-PAGE und Western-Blot Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Anti-SCR 1-4-Ak untersucht.

Als Nachweis für die tatsächliche Neuproduktion der Proteine diente die Markierung der neu synthetisierten Proteine durch S^{35} -markiertes Methionin. Nach vier verschiedenen Zeitabständen wurden die Überstände gewonnen und durch Immunaффinitätsaufreinigung konzentriert. Die Proben wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen per Autoradiographie visualisiert. Schon nach 15 min konnte bei dem H2-Zellüberstand, nicht jedoch bei den U251-Zellen eine spezifische Bande für Faktor H entdeckt werden, die in einem zeitabhängigem Rahmen bis zu 20 h stetig zunahm. FHL-1 konnte unter diesen Bedingungen nicht detektiert werden und es trat stets eine unspezifische Bande im H2- und U251-Zellüberstand auf.

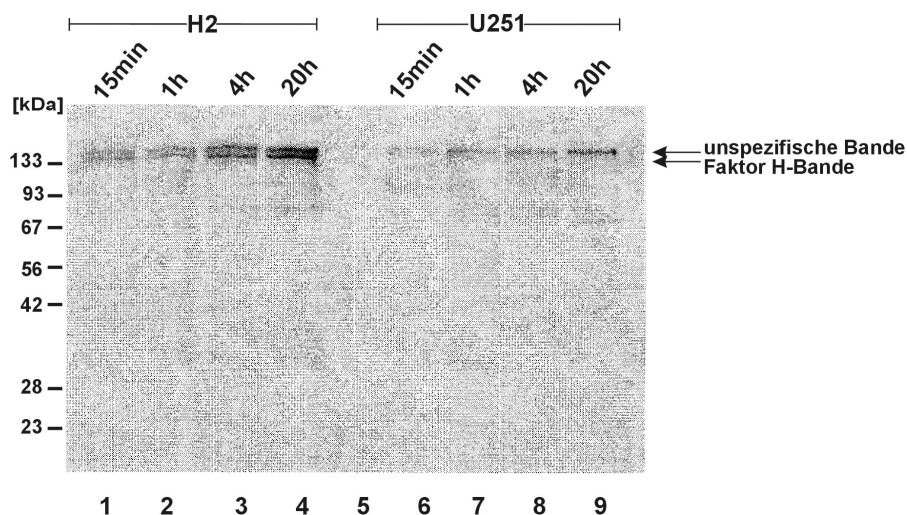


Abb. 3.17: Biosynthetische Markierung von sezernierten Proteinen der H2- und U251-Zellen. Die Zellen wurden in 100 $\mu\text{Ci/ml}$ S^{35} -markiertem Methionin kultiviert und für 15 min, 1 h, 4 h oder 20 h inkubiert. Der Zellüberstand wurde jeweils zu den angegebenen Zeiten abgenommen und anschließend die nachzuweisenden Proteine durch Immunaффinitätsaufreinigung angereichert und über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse mit Anti-SCR 1-4-Ak sichtbar gemacht.

Als zusätzlicher Nachweis für die *de novo* Synthese von Faktor H und FHL-1 diente die Behandlung der H2-Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden (S-ODN). Durch diese Methode konnte nachgewiesen werden, dass die spezifischen Oligonukleotide vorübergehend ein so genanntes spezifisches „knock out“ des FHL-1/Faktor H-Gens erzeugten und die Proteintranslation bzw. -synthese sistierte. In H2-Zellen wurde die Faktor H- und FHL-1-Synthese durch die Antisense S-ODNs blockiert, während durch die Behandlung mit der „Mismatch Kontrolle“ und „Reverse Kontrolle“ sich die Proteinsynthese wie bei den unbehandelten Zellen (Kontrolle) verhielt (Abb. 3.18).

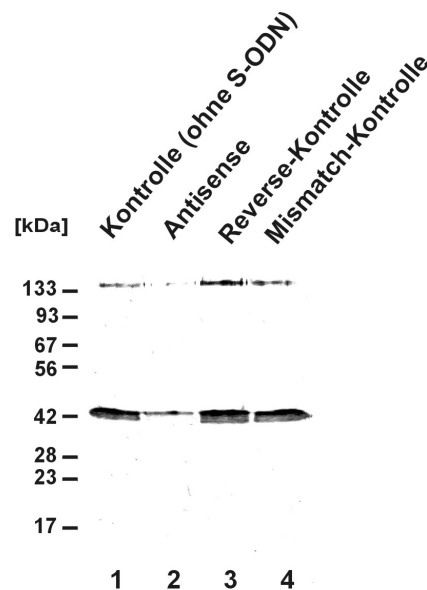


Abb. 3.18: Hemmung der FHL-1/Faktor H Synthese durch Antisense Oligonukleotide in H2-Zellen. Die zur FHL-1/Faktor H Translationsinitiationsposition korrespondierenden Phosphorothioat Oligodeoxynukleotide (S-ODN) (20µM) (Antisense) wurden in H2-Zellen transfiziert. Die Spezifität wurde mit Hilfe von unspezifischen S-ODN sowie mit einer Probe ohne S-ODNs (Kontrolle) überprüft. Zum einen durch eine Sense-Sequenz (Reverse Kontrolle) und zum anderen durch eine Mismatch-Sequenz mit 2 nicht korrespondierenden Nukleotiden. Der Translationsabbruch und die daraus resultierende verminderte Proteinsekretion wurde mittels Westen-Blot Analyse der Zellkulturüberstände nachgewiesen.

3.13 Komplementlyse von H2-Zellen nach Enzymbehandlung

Um zu analysieren, ob Zelloberflächenstrukturen für die außergewöhnliche Komplementresistenz verantwortlich sein können, wurden die Zellen mit verschiedenen, die Oberflächen verändernden Enzymen behandelt und nachfolgend ein Zelllyseassay durchgeführt. Die Behandlung der H2-Zellen mit *A. ureafaciens* Neuraminidase konnte die Zelllyserate signifikant erhöhen (Abb. 3.19 A). Auch die Trypsinbehandlung der Zellen konnte die Effizienz der Komplementlyse erheblich erhöhen (Abb. 3.19 B). Im Gegensatz dazu konnte die *Bacillus cereus* Phosphoinositol Phospholipase C (PIPLC) (0,4 IU/ml), die z. B. die beiden GPI-verankerten Proteine DAF (CD55) und Protektin (CD59) von der Oberfläche abspaltet, die Sensitivität der Zellen für die Komplementlyse nicht erhöhen (Abb. 3.19 C).

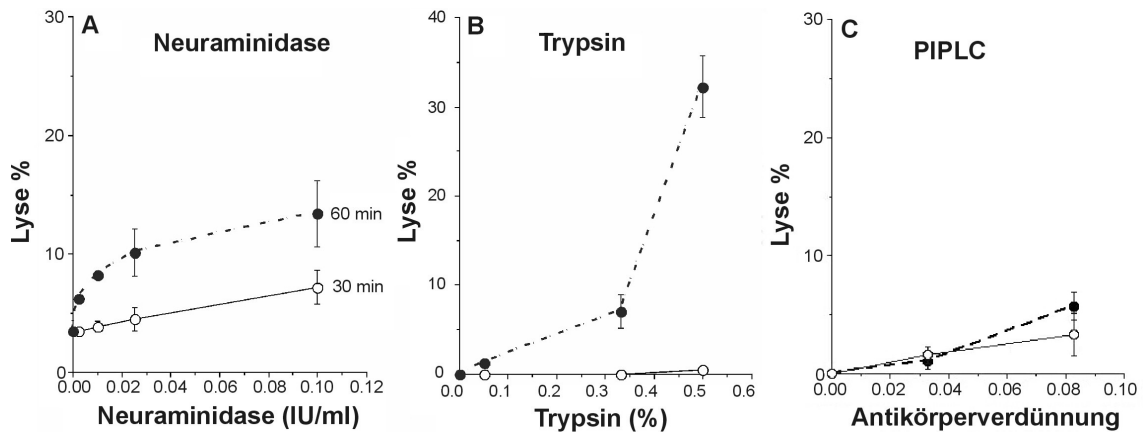


Abb. 3.19: Effekt der Enzymbehandlung mit Neuraminidase (A), Trypsin (B) oder PIPLC (C) auf die Komplementlyse der H2-Zellen. Die Zellen wurden mit der angegebenen Konzentration von *A. ureafaciens* Neuraminidase für 30 oder 60 min vor dem Lyseassay behandelt (A). Die Zellen wurden mit Trypsin behandelt und danach mit polyklonalem Anti-H2-Ak und NHS (geschlossene Kreise) oder NHS ohne Ak (offene Kreise) inkubiert (B). Die H2-Zellen wurden mit *B. cereus* PIPLC (C) (0,4 U/ml) (geschlossene Kreise) oder mit Wachstumsmedium (offene Kreise) behandelt und danach mit polyklonalem Anti-H2-Ak und NHS inkubiert. In allen Fällen wurde die Lyse durch einen ^{51}Cr -Assay bestimmt. Die Kurven zeigen den Durchschnittswert und die Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment.

3.14 Bindung von Faktor H und FHL-1/Reconnectin an die Oberfläche von H2-Zellen

Da H2-Zellen Faktor H und FHL-1 in das Wachstumsmedium sezernieren und gegen Faktor H gerichtete Ak die residuale Kofaktoraktivität von H2-Zellen neutralisieren (JUNNIKKALA *et al.* 2000), wurde untersucht, ob H2-Zellen direkt Faktor H an ihre Zelloberfläche binden können. H2- und U251-Zellen wurden zuerst mit NHS oder gereinigtem Faktor H (200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) inkubiert, nach dem Waschen mit polyklonalem Anti-Faktor H-Ak behandelt und durch FACS-Analysen untersucht. Faktor H zeigte eine deutlich effizientere Bindung an H2- als an U251-Zellen (Abb. 3.20). In der Abwesenheit von Serum wurde keine Bindung von Faktor H-Ak an H2- oder U251-Zellen gesehen.

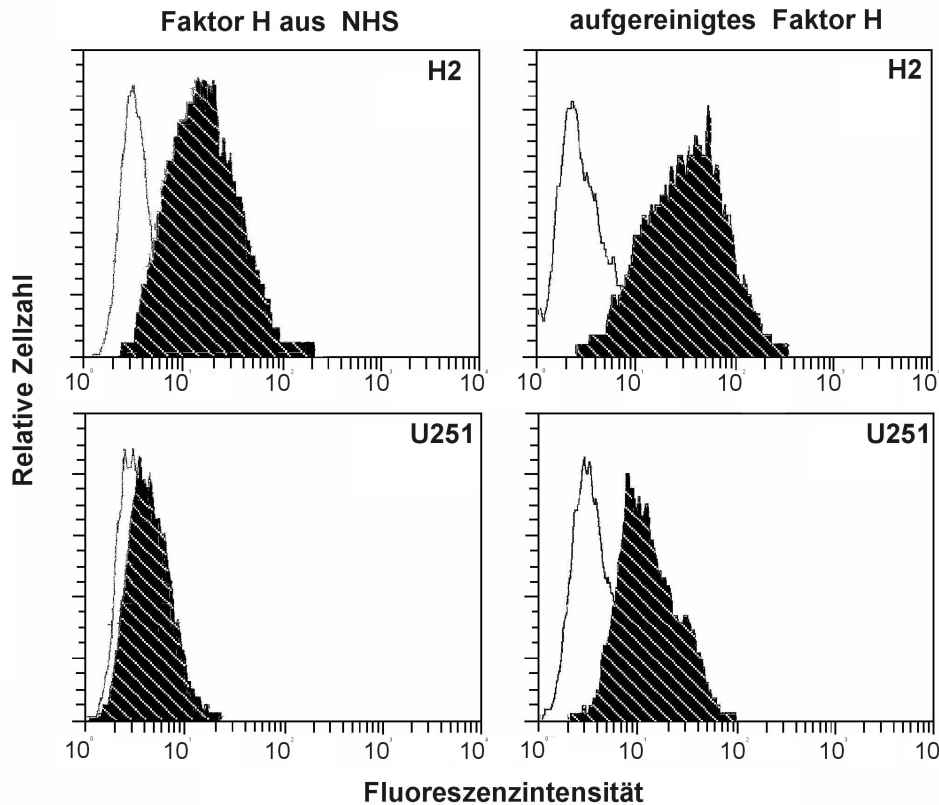


Abb. 3.20: Faktor H-Bindung an H2-Gliomazellen. Die Zellen wurden mit NHS oder mit aufgereinigtem Faktor H (200 µg/ml) und nach dem Waschen mit polyklonalem Anti-Faktor H-Ak (50 µg/ml) und FITC-markiertem Kaninchen-Anti-Ziegen-Ak (schwarzes Histogramm) inkubiert. Kontroll-Kaninchen-IgG wurden als primäre Ak für die Negativkontrolle verwendet (offenes Histogramm).

3.15 Komplementlyse von H2-Zellen nach Behandlung mit Anti-FHL-1/Faktor H mAb

Faktor H- und FHL-1 wurden schließlich auf der Zelloberfläche der H2-Zellen mit Antikörpern neutralisiert, um zu untersuchen, ob lokal produziertes Faktor H und FHL-1 auch zum Schutz der H2-Zellen vor der Komplementlyse beiträgt. Wie in Abb. 3.21 gezeigt wird, ist die Zelllyse von H2-Zellen in Gegenwart von Anti-Faktor H-Ak signifikant erhöht. Für die Neutralisationsexperimente wurden die mAk 131X, der Faktor H, nicht aber FHL-1 bindet und OX24, welcher an beide Proteine, Faktor H und FHL-1 bindet, verwendet. Als die Zellen mit einer Kombination von polyklonalem Anti-H2-Ak und 131X mAk behandelt wurden, konnte die Lyse um das 3-fache erhöht werden. Eine Kombination von zwei monoklonalen Anti-Faktor H Ak (131X und OX24) mit dem polyklonalem Anti-H2 Ak konnte schließlich die Lyse von H2 Zellen um das 5-fache erhöhen (Abb. 3.21).

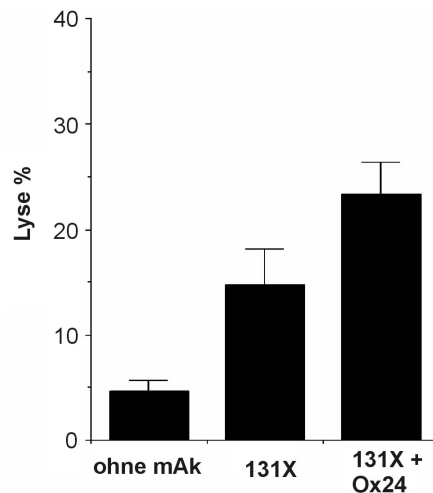


Abb. 3.21: Komplementlyse der H2-Zellen nach Faktor H- und FHL-1/Reconnectin-Neutralisation. Die Zellen wurden nur mit polyklonalem Anti-H2-Antikörpern (ohne mAk) oder in der Anwesenheit von Anti-Faktor H mAk 131X (50 µg/ml) oder mit einer Kombination von Anti-Faktor H mAk 131X und OX24 (beide bei 50 µg/ml) behandelt. NHS (1:4 Verdünnung) diente als Komplementquelle. Die Resultate sind als Durchschnittswert mit Standardabweichung angegeben.

3.16 Klonierung und Expression des FHR-4 SCR 4-5 Fragments

Faktor H stellt in entzündlichen und karzinomatösen Prozessen ein autokrin produziertes Protein dar, das durch die komplementregulative Region den sezernierenden Zellen, Schutz vor Komplementlyse verleiht. FHR-4 ist ein Plasmaprotein unklarer Funktion, dass aber starke strukturelle und einige funktionelle Homologien zu Faktor H aufweist und als natürliche Mutante des Faktor H Proteins betrachtet wird. Für die Bindungsstudien, deren Daten für die genaue Charakterisierung der komplementregulativen Regionen von Faktor H verwendet werden sollten wurde FHR-4 und selektiv die Deletionsmutante FHR-4 SCR 4-5 rekombinant exprimiert und durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Um funktionell aktive Proteine mit korrekter Sekundärstruktur (Disulfidbrücken) zu erhalten, wurde das Baculovirus-Expressionssystem verwendet (KÜHN *et al.* 1995, KÜHN and ZIPFEL 1995). Die Proteine FHR-4 und FHR-4 SCR 4-5 wurden in den Zellen exprimiert, aufgereinigt und im SDS-PAGE aufgetrennt. In Abb. 3.22 ist eine Aufreinigung durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie des Proteins reFHR-4 SCR 4-5 exemplarisch dargestellt. Durch die Silberfärbung ist in der Elutionsfraktion das Protein FHR-4 SCR 4-5 (Abb. Spur 6,7) zu erkennen. Das Protein liegt in unterschiedlich glykosilierten Formen vor.

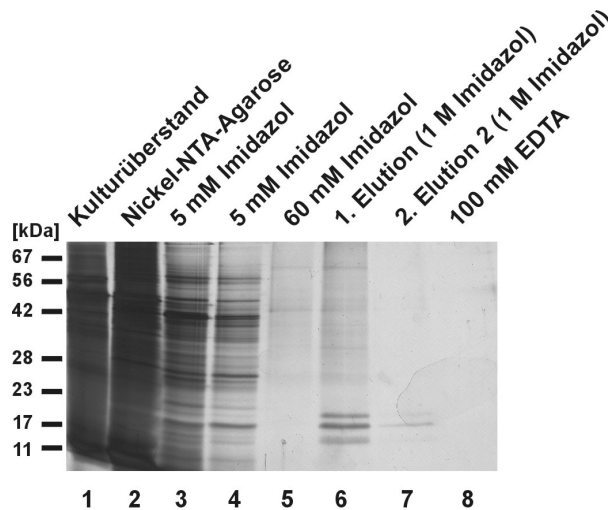


Abb. 3.22: Aufreinigung des rekombinanten Proteins reFHR-4 SCR 4-5 mit der Nickelchelataffinitätschromatographie. Kulturmedium infizierter *Sf9*-Zellen wurde isoliert und die verschiedenen Aufreinigungsfractionen aufgetrennt und durch Silberfärbung nachgewiesen. Der Zellüberstand wurde (Spur 1) nach Inkubation mit Ni^{2+} -NTA-Agarose (Spur 2) zweimal mit geringer Stringenz (5mM Imidazol, Spuren 3, 4) und mit hoher Stringenz (60 mM Imidazol, Spur 5) gewaschen und dann zweifach mit 1M Imidazol eluiert (Spuren 6,7). Die Regeneration des Säulenmaterials unter Aufhebung der Nickelchelatkomplexierung erfolgte mit 100 mM EDTA (Spur 8).

3.17 Funktionelle Charakterisierung von FHR-4, FHR-4 SCR 4-5 und Faktor H

Aufgrund der ähnlichen Sequenz von FHR-4 zu Faktor H und der noch unbekannten Funktion, wurde untersucht, ob auch eine funktionelle Ähnlichkeit der beiden Proteine durch dieselben SCRs vermittelt wird. Da FHR-4 an C3d und C3b bindet, wurde zunächst die Interaktion von FHR-4 mit auf der Chipoberfläche immobilisiertem C3d und C3b bestimmt (HELLWAGE *et al.* 1999). Die Bindung von FHR-4 an C3d und C3b verursachte einen deutlichen Anstieg der Resonanzeinheiten (RU) (Abb. 3.23 A). Dieser Anstieg der RU ist proportional zur Menge an gebundenem FHR-4, wobei RU etwa 1 ng/mm^2 entsprechen. Nach 300 s wurde die Injektion der Proteinlösung beendet, Pufferlösung injiziert und die Dissoziation des FHR-4/C3d- und FHR-4/C3b-Komplexes verfolgt. Die Injektion von FHR-4 in eine Kontroll-Flußzelle, in der keine Proteinbeschichtung durchgeführt wurde, zeigte nur den durch Injektion der Proteinmasse entstehenden geringeren „bulk effect“ (Kontrolle). Es konnte keine Assoziation oder Dissoziation eines Komplexes gesehen werden.

Als nächstes wurde die Bindung von FHR-4 SCR 4-5, die zu den SCRs 19-20 von Faktor H homolog sind, an C3d und C3b untersucht. C3d bzw. C3b wurden an die Chipoberfläche gekoppelt und FHR-4 SCR 4-5 injiziert. Ähnlich wie FHR-4 war auch FHR-4 SCR 4-5 in der Lage, an C3d (Abb. 3.23 B) und C3b zu binden.

Zum Vergleich der Bindungscharakteristik mit FHR-4 und FHR-4 SCR 4-5 wurde Faktor H als bekannter Ligand von C3d und C3b in demselben Versuchssystem eingesetzt. Das rekombinante Protein FHR-3 SCRs 1-3 wurde als Negativkontrolle eingesetzt, da bekannt ist, dass es nicht als

Bindungspartner für C3d und C3b dient. Faktor H besitzt drei Bindestellen für C3b. Wie erwartet, zeigte das Protein eine deutliche Bindung an C3d (Abb. 3.23 C) und C3b. FHR-3 SCRs 1-3 zeigte hingegen keine Bindung (Abb. 3.23 D).

Da die Bindungskurven der untersuchten Proteine für C3b und C3d identisch waren, sind hier nur die Ergebnisse für C3d gezeigt.

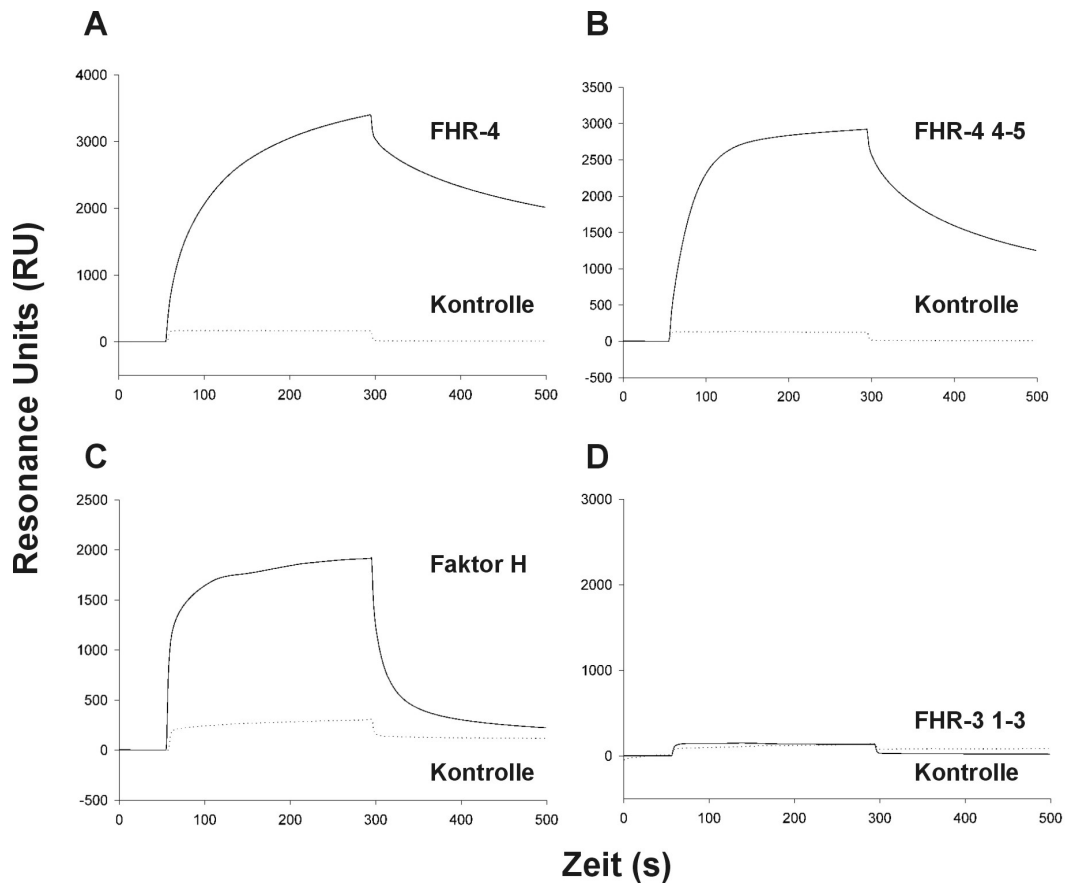


Abb. 3.23: Messungen zur Bindung von FHR-4, FHR-4 4-5, Faktor H und FHR-3 1-3 an C3b und C3d mittels Biacore™-Technik. Interaktion von FHR-4 (A), FHR-4 SCRs 4-5 (B), Faktor H (C) und FHR-3 SCRs 1-3 (D) mit immobilisiertem C3d. Die Resonanzeinheiten („resonance units, RU“) sind als Funktion der Zeit abgebildet. Es sind jeweils die Bindungskurven im Vergleich zur Kontroll-Flußzelle, in der keine Proteinbeschichtung durchgeführt wurde gezeigt.

4 DISKUSSION

4.1 Expression und Genregulation von Faktor H und FHL-1/Reconectin

Faktor H agiert als zentrales Regulatorprotein im AP des Komplementsystems, während FHL-1/Reconectin mit klar abgrenzbaren Funktionen neben Faktor H vorhanden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Funktionsunterschiede der alternativ prozessierten Faktor H-Genprodukte, Faktor H und FHL-1, auch in einer unterschiedlichen Synthese und Regulation in hepatischen und extrahepatischen Zellen widerspiegelt.

Die Untersuchung der Faktor H-Expression wurde mit einer Dot-Blot Analyse eingeleitet. Die Vermutung, dass Faktor H in der höchsten mRNA-Kopienzahl in der Leber vorliegt, ließ sich mit dieser Untersuchung bestätigen. Es sind aber auch hohe mRNA-Konzentrationen von Faktor H in einigen anderen Geweben zu detektieren. Offensichtlich wird Faktor H in den unterschiedlichen Geweben in großer Menge synthetisiert und trägt somit zur lokalen Konzentrationssteigerung des Proteins am Ort der Synthese bei. Die Dot Blot Methode erlaubt keine Unterscheidung zwischen den beiden unterschiedlich prozessierten Transkripten des Faktor H-Gens, Faktor H und FHL-1, da die überlappenden Bereiche zu groß sind, um Kreuzreaktionen mit einer 300-400 bp abmessenden Sonde auszuschließen. Durch die Verwendung der RT-PCR Technik kann diese Spezifität jedoch erhalten werden und die konstitutive Expression von Faktor H und FHL-1 kann differentiell in hepatischen und extrahepatischen Zellen nachgewiesen werden. Zum ersten Mal kann ein unterschiedliches Induktions- und Regulationsmuster der beiden Transkripte gezeigt werden. Eine konstitutive Expression der beiden Transkripte Faktor H und FHL-1 zeigen unbehandelte humane hepatische HUH7-Zellen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Dot-Blot Untersuchung und den veröffentlichten Daten überein, dass die Leber einen großen Anteil an der Synthese der beiden Proteine hat. Andererseits sind die beiden Transkripte nicht in Hep3b- und HepG2-Zellen nachzuweisen, was durch den Prozess der Zelltransformation erklärt werden kann. In diesen Zellen ist die Faktor H- und FHL-1-Expression durch den Immunmediator IFN- γ (Abb. 3.3) induzierbar. Dieser Mediator ist auch als Stimulus für die Faktor H-Synthese in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) (RIPOCHE *et al.* 1988b, BROOIMANS *et al.* 1989), humanen Hautfibroblasten (KATZ and STRUNK 1988) und Monozyten (LAPPIN and WHALEY 1990) beschrieben. Zusätzlich induziert das antiinflammatorische Medikament DXM die Faktor H-Transkription in Hep3b-Zellen (Abb. 3.3). Die Anwesenheit von regulatorischen Elementen für IFN- γ und Glukokortikoide (VIK 1996, WARD *et al.* 1997) innerhalb des Faktor H/FHL-1 Promotors stimmen mit den beobachteten Ergebnisse für diese Stimuli überein. Extrahepatische monozytäre U937-Zellen zeigen eine konstitutive Expression von Faktor H und FHL-1 (Abb. 3.2 Spur 7), während unstimulierte humane Lungenfibroblasten ausschließlich FHL-1 konstitutiv

exprimieren. In diesen untransformierten Zellen sind beide mRNAs, Faktor H und FHL-1, durch IFN- γ und DXM induzierbar und beide Transkripte werden nach Wachstumsstimulation von ruhenden Fibroblasten exprimiert. Durch die Expression und Sekretion von Faktor H und FHL-1 tragen Fibroblasten und Endothelzellen zur gesteigerten lokalen Konzentration der beiden Komplementregulatoren bei. Die Rolle von DXM- und Serumstimulation (repräsentiert Seruminflux nach Gewebetrauma) sowie die von IFN- γ als wichtiger Immunmediator bei entzündlichen Prozessen unterstützt die Hypothese, dass Faktor H und FHL-1 lokal am Ort der Entzündung produziert werden und als protektive, antiinflammatorischen Moleküle agieren, um die C3b-Deposition auf der Wirtszelloberfläche zu minimieren. DXM-Stimulation induziert die FHL-1-Transkription, so dass das kleinere Genprodukt schneller prozessiert wird und vermutlich einen günstigen Effekt für den Gewebeschutz, im Rahmen einer Stressantwort, hat. Da FHL-1 an einen Rezeptor vom Integrintyp (HELLWAGE *et al.* 1997a) bindet kann dieses Protein vermutlich an der lokalen Entzündungsstelle fixiert werden.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass die beiden Transkripte, die vom Faktor H-Gen kodiert werden, Faktor H und das alternativ prozessierte FHL-1, unterschiedlich in Zellen verschiedenen Ursprungs reguliert werden. Diese Ergebnisse zeigen eine gewebespezifische und durch Mediatoren kontrollierte Regulation der alternativen Prozessierung. Ein zusätzliches Exon, welches für die spezifische FHL-1-Region kodiert, wurde in der Sequenz des humanen Faktor H-Gens identifiziert (SIM *et al.* 1993). Dieses Exon kodiert für die vier C-terminalen Aminosäuren (Ser-Phe-Tyr-Leu) von FHL-1, das Stopkodon und die spezifische 3' untranslatierte Region und wurde zwischen den Exons, die für SCR 7 und SCR 8 des humanen Faktor H Proteins kodieren, identifiziert. Der Regulationsmechanismus der alternativen Prozessierung ist nicht näher untersucht. Die kurz vorgestellten Ergebnisse zeigen jedoch einen zeitlichen und räumlichen Unterschied in der Regulation und Expression der beiden Moleküle. Diese Differenz steht in Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen funktionellen Unterschiede der beiden Proteine (ZIPFEL and SKERKA 1999).

Die unterschiedliche Regulation der beiden Gentranskripte läßt die Frage nach dem zugrundeliegenden Kontrollmechanismus aufkommen. Die Transkripte der Proteine FHL-1 und Faktor H stammen von demselben Faktor H-Gen, sind über denselben Genpromotor reguliert und die mRNA-Synthese initiiert an derselben Transkriptionsstartstelle. Der Promotor ist für die durch Mediatoren regulierte transkriptionelle Induktion relevant und ist die erste Ebene der komplexen Kontrolle beider Moleküle.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die basale Luciferaseaktivität des transfizierten Promotors in den verschiedenen untersuchten Zellen unterscheidet. 1/100 der Promotoraktivität ist in Fibroblasten und 1/10 in HUH7-Zellen im Vergleich zu 293T-Zellen nachweisbar. In 293T- und HUH7-Zellen ist ein Repressorelement, zwischen den Positionen -511 und -199

aktiv. Dieses Element ist hingegen bei den untersuchten Fibroblasten nicht aktiv. Das Repressorelement kann erst beim stark aktivierten Promotor seine repressive Funktion übernehmen, da es in den schwächer Signal-gebenden Fibroblasten nicht detektierbar ist. Innerhalb dieser Region (–511 bis –199) liegen Konsensusregionen für die Transkription der Faktoren H4TF-1 (–273) und LVa-RS (–325). H4TF-1 wurde ursprünglich im H4 Histongen entdeckt, scheint aber auch in anderen induzierbaren Genen zu finden zu sein. LVa-RS ist ein Faktor der an die regulatorische Region des „Moloney murine leukaemia virus“ und des „Immediate Early 1 Gene“ des humanen Zytomegalovirus bindet (WILLIAMS and VIK 1997). Es bleibt zu klären, ob diese Faktoren eine funktionelle Bedeutung für die Repressoraktivität besitzen. In Fibroblasten spielen hingegen Bindestellen für basale Transkriptionselemente, die sukzessiv mit der Deletion verloren gehen, eine ausgewogene Rolle. Es kann keine spezifische Region identifiziert werden, die für die transkriptionelle Aktivität verantwortlich ist (WARD *et al.* 1997, WILLIAMS and VIK 1997).

Da der Immunregulator IFN- γ und DXM einen starken induktiven Effekt auf die Expression von Faktor H und FHL-1 hat, wurde der FHL-1/Faktor H-Promotor auf seine Induzierbarkeit mit diesen Stimuli untersucht. Die durch Sequenzanalysen beschriebenen responsiven Elemente für die in dieser Arbeit eingesetzten Stimuli, konnten experimentell nicht verifiziert werden. Eine beschriebene Aktivierungsstelle für IFN- γ (GAS) liegt bei Position –345, während eine zweite Bindestelle im Bereich von –74 liegt. Beide Elemente sind aber nicht ausschlaggebend bei der Induktion in HUH7-Zellen oder MRC-5-Fibroblasten. Die beim murinen Faktor H-Genpromotor diskutierte H4TF-1 Stelle, die innerhalb des vermutlich verantwortlichen Region liegt (VIK 1996), ist bei den zugrundeliegenden Ergebnissen nicht entscheidend. Die verantwortliche Region für die Induktion in HUH7-Zellen ist die Region zwischen –699 und –636, in der keine GAS zu finden sind. In diesem Bereich liegt allerdings ein responsives Element für cAMP (CREB) bei –688. Auch die Region –36 bis +18, die im besonderen Maße für die Induktion in MRC-5-Fibroblasten maßgeblich ist, zeigt keine bekannte Konsensusregion. Die Konsensusregionen für responsive Elemente für Glukokortikoide (GRE) sind im FHL-1/Faktor H-Promotor bei –331 und –232 vorhanden. Obwohl in den hier gezeigten Expressionsstudien (Abb. 3.3) eine Induktion der Transkription vorhanden ist, reagieren die MRC-5-Zellen nicht auf die Glukokortikoide mit einem Aktivitätsanstieg. Dieses deutet auf die Rekrutierung von Elementen hin, die weiter stromaufwärts liegen, als das pHW-699 Konstrukt einschließt. Ein weiteres GRE liegt bei Position –808 und wird für eine Induktion in den Zellen verantwortlich sein.

Die Kontrolle des FHL-1/Faktor H-Genpromotors ist zellspezifisch reguliert und vom Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren innerhalb der Zellen abhängig. Die Rekrutierung verschiedener Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zellen reguliert demnach

die RNA-Transkription der antiinflammatorischen Proteine nach Bedarf der lokalen Umgebung und Mediatorpräsenz.

Die hier gezeigte unterschiedliche Regulation und spezifische Expression der zwei verschiedenen Faktor H-Gentranskripte in verschiedenen Zelltypen kann jedoch nicht über die Promotoraktivität reguliert werden und für die verschiedenen beobachteten Expressionsmuster verantwortlich sein. Deshalb muss eine transkriptionelle oder posttranskriptionelle Regulation für diese Unterschiede maßgeblich sein. Durch dieses komplexe Bild der Expression, ist eine Regulation auf verschiedenen Ebenen anzunehmen:

- (i) Elongationsregulation während der Transkription
- (ii) Alternative poly(A)-Signalselektion, die in unterschiedliche mRNA-Polyadenylierung resultiert
- (iii) Regulation der Selektion der Akzeptorstellen für das Spleißen, die ein alternatives Spleißen der hnRNA bedingt (Abb. 4.1).

Nach transkriptioneller Induktion des humanen Faktor H-Gens wird die primäre hnRNA über die Exons gelesen, welche für SCR 7 (Exon IX) und für das FHL-1 spezifische Exon (Exon X) kodieren. Aus diesem Grund ist die Existenz eines Pausensignals oder eines Elongationsblocks nach Exon X anzunehmen, das die Akkumulation der FHL-1-Transkripte erlaubt. Weitere Prozessierung dieses Transkripts durch Polyadenylierung und Spleißen bedingt eine für FHL-1 kodierende mRNA.

Die Prozessierung der hnRNA, die für Faktor H kodiert, ist komplexer. Das primäre Transkript, welches eine Größe von ca. 95 kb hat, benutzt das zweite poly(A)-Signal. Um die Exons IX und XI, die für die SCR 7 und 8 kodieren, zu verbinden, muß das FHL-1 spezifische Signal richtig herausgespleißt werden (Abb. 4.1). Basierend auf diesen Überlegungen scheint das FHL-1-Transkript das primäre, ständig gebildete Transkript zu sein, während die Formation der Faktor H-mRNA durch RNA-Prozessierung gesteuert wird (Abb. 4.1). Die Kontrollmechanismen und die Position der relevanten regulatorischen Elemente sind zur Zeit noch unbekannt.

GEN (1q32)

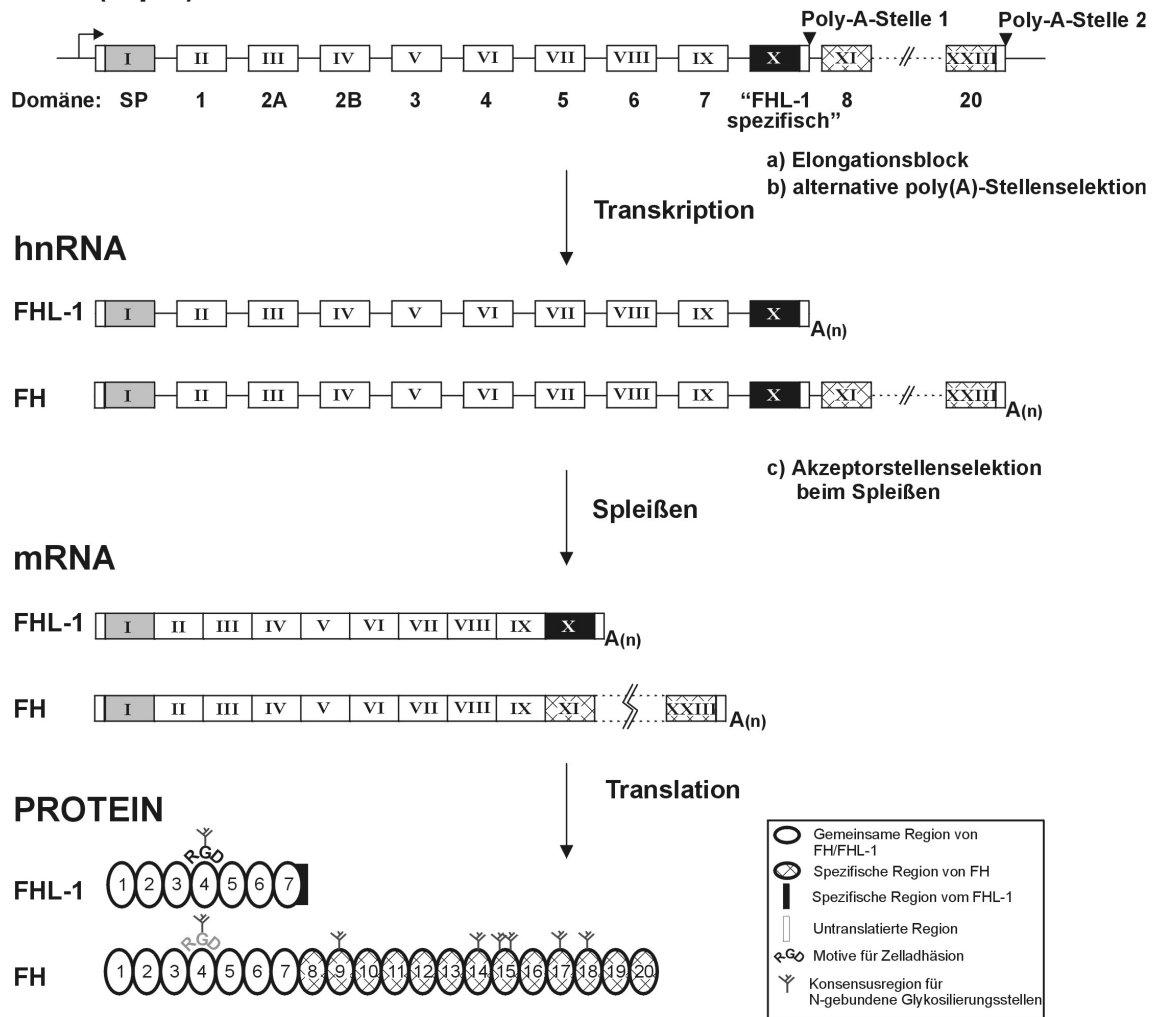


Abb. 4.1: Alternative Regulation der Expression von FHL-1/Reconectin und Faktor H. Die humanen Komplementregulatoren FHL-1/Reconectin und Faktor H stammen beide von demselben Gen. Das menschliche Faktor H-Gen beinhaltet 23 Exons, die für das Signalpeptid (SP) und die korrespondierenden SCRs kodieren. Allgemein kodiert jedes Exon für ein SCR. Eine Ausnahme stellt das Exon III und IV dar, die beide für SCR 2 kodieren. Ein zusätzliches Exon (Exon X) (schwarz dargestellt), dass die vier C-terminalen Aminosäuren und die 3'-UTR der FHL-1/Reconectin mRNA repräsentiert wurde zwischen Exon IX und XI identifiziert (SIM *et al.* 1993). Die Transkription wird durch den FHL-1/Faktor H-Genpromotor induziert und resultiert in zwei unterschiedlichen Transkripten. Die Domänen, die in beiden hnRNAs vorhanden sind, sind hier in weiß dargestellt und die für die Faktor H spezifische Region ist schraffiert gezeigt. Die Regulation der beiden Transkripte könnte durch das Vorhandensein eines potentiellen Pausensignals innerhalb der Sequenz zwischen Exon X und XI über ein Elongationsblock induziert sein. Zusätzlich resultiert die Ablesung verschiedener poly(A)-Signale in zwei verschiedene hnRNA-Transkripte. Richtiges Spleißen der Introns und alternatives Spleißen des FHL-1/Reconectin spezifischen Exon X resultiert in zwei unterschiedliche Transkripte. Diese kodieren entweder für FHL-1/Reconectin oder für Faktor H. Nach Translokation in das Zytoplasma und Translation, setzt die Proteinreifung mit Abspaltung des Signalpeptids, Disulfidbrückenausbildung und Anhängen von N-Glykosylierungen ein. (modifiziert nach FRIESE *et al.* 1999).

4.2 FHL-1/Reconectin und Faktor H in rheumatoider Arthritis

Da Faktor H und FHL-1 lokal synthetisiert und ihre Expression durch Entzündungsmediatoren moduliert werden, wurde hier untersucht, ob auch in pathophysiologischen Bedingungen, wie in einem chronisch entzündlichen Prozess (rheumatoide Arthritis), der antiinflammatorische und protektive Charakter von Faktor H und FHL-1 von dem entzündlichen Gewebe genutzt wird, um

die deletäre Wirkung der aktivierten Komplementkaskade zu vermindern. Dabei stand die Untersuchung der Expression der zwei Moleküle durch Synovialgewebe und die Auswirkung ihrer Neutralisation im Vordergrund.

Beide Proteine, Faktor H und FHL-1, sind in Synovialflüssigkeiten von Patienten, die an rheumatoider bzw. reaktiver Arthritis leiden, mittels Western-Blot Analysen, detektierbar. Das Verhältnis von FHL-1 zu Faktor H ist zudem in Synovialflüssigkeiten um das 3-fache höher als in normalem humanem Serum (NHS), wie ELISA-Analysen zeigen. Ursächlich für die Anreicherung dieser Komplementregulatoren in der Synovialflüssigkeit kann entweder eine erhöhte Permeabilität der Synovialmembran während des inflammatorischen Prozesses sein oder die Synovialzellen dienen als lokale Quelle für diese Proteine. RT-PCR Analysen, Western-Blot Analysen von Kulturüberständen sowie Promotoruntersuchungen zeigen, dass Synovialzellen diese beiden Proteine synthetisieren und in ihre Umgebung sezernieren. Faktor H und FHL-1 werden somit lokal am Ort der Synthese gebildet und schaffen um die Zellen eine Mikroatmosphäre, die unabhängig von systemisch sezernierten Proteinen besteht. In Übereinstimmung mit den erhöhten FHL-1/Faktor H-Verhältnis in der Synovialflüssigkeit, zeigen Synovialfibroblasten eine bevorzugte Synthese des FHL-1 Proteins. FHL-1 wird im Gegensatz zu Faktor H konstitutiv ohne Stimulation exprimiert. In diesen Zellen werden jedoch beide Moleküle, FHL-1 und Faktor H durch IFN- γ und DXM induziert, wie auf mRNA und Proteinebene gezeigt wird. Die mRNA der Membraninhibitoren MCP (CD46), DAF (CD55) und Protektin (CD59) können in allen untersuchten Synovialzellen gefunden werden. Da diese Membranregulatoren jedoch im Gegensatz zu Faktor H und FHL-1 durch die wesentlichen Entzündungsmediatoren in ihrer Expression nicht beeinflusst werden, wird ihre Aktivität nicht an veränderte Komplementattacken im Rahmen einer Entzündung adaptiert und kann nicht für eine veränderte Komplementresistenz verantwortlich sein. Von den bekannten Komplementregulatoren, die die Zellen vor der Schädigung bewahren können (LACHMANN 1991), wurde ausschließlich Faktor H und FHL-1 durch das antiinflammatorische Medikament DXM in Konzentrationen, die bei der Behandlung der RA in entzündlichem Gewebe erreicht werden und den Immunmodulator IFN- γ hochreguliert. TNF- α hatte im Gegensatz dazu keine Auswirkung auf die Expression und Promotoraktivität von Faktor H und FHL-1.

Auch die FHL-1/Faktor H-Promotoraktivität in Synovialfibroblasten wird durch DXM stark induziert. Die korrespondierende, verantwortliche Sequenz in den Synovialzellen kann mit den verwendeten Deletionskonstrukten auf die Region zwischen -199 und -38 eingegrenzt werden. Die bisher bekannten responsiven Elemente für Glukokortikoide (GRE) lassen sich jedoch in dieser Region nicht finden. Bei der Stimulation mit IFN- γ hingegen ist die Aktivität des FHL-1/Faktor H-Promotors nicht erhöht, während die Faktor H und FHL-1 mRNA-Expression

induziert wird. Für die Induktion ist demnach ein responsives Element maßgeblich, dass außerhalb der verfügbaren Region liegt.

IFN- γ hat, analog zu DXM, einen protektiven Effekt auf die entzündlichen Prozesse bei einer aktiven RA (BOISSIER *et al.* 1995), so dass diese zwei Mediatoren ihren schützenden Effekt bei erhöhter Komplementaktivierung in den Gelenken zum Teil durch die Induktion der antiinflammatorischen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 in Synovialfibroblasten vermitteln. Die Steroidtherapie bei RA kann über diesen Effekt protektiv wirken (KIRWAN 1995). Im Gegensatz dazu steht TNF- α , das die Expression der zwei protektiven Proteine, wie auch der Membranregulatoren nicht verändert. Diese Beobachtung stimmt mit der destruktiven Rolle dieses proinflammatorischen Zytokins in der Pathogenese der Erkrankung überein (FELDMANN *et al.* 1996). Bei 25-50 % der Patienten mit RA, können erhöhte TNF- α -Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit detektiert werden (SAXNE *et al.* 1988), die mit einem vermehrten Nachweis der Komplementaktivitätsmarker C3a, sC5b-9 und Bb positiv korrelieren (BRODEUR *et al.* 1991). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine verstärkte Genexpression und eine *de novo* Synthese von Faktor H und FHL-1 durch Synovialfibroblasten, die mit Glukokortikoiden oder IFN- γ behandelt wurden, während das Zytokin TNF- α kein Effekt zeigt. Im Gegensatz dazu supprimiert IFN- γ (LAPPIN *et al.* 1992) und DXM (LEMERCIER *et al.* 1992) die proinflammatorischen Proteine Faktor B und C3, während TNF- α die Expression dieser Proteine induziert (KATZ *et al.* 1993). Die lokale Präsenz von inflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren läßt eine fragile Balance vermuten, welche entweder die inflammatorischen Reaktionen herunterreguliert oder die Progression der Erkrankung vorantreibt.

Da Synovialzellen eine deutlich erhöhte Produktion von Faktor H und FHL-1 zeigen, die durch antiinflammatorische Stimuli weiter erhöht wird und zu einer lokalen Anreicherung um die produzierenden Zellen führt, wurde die Auswirkung auf den Komplementschutz und der Schutzmechanismus ausführlicher untersucht. FACS-Analysen zeigen, dass die Fibroblasten die Proteine in einem autokrinen Mechanismus auf ihrer Oberfläche anreichern können. Im Vordergrund steht dabei das FHL-1-Molekül, welches praktisch von allen untersuchten Synovialfibroblasten in physiologischen Konzentrationen auf der Oberfläche fixiert wurde. Da für Faktor H- und FHL-1 Oberflächenstrukturen von Zellen beschrieben sind, die Bindungspartner für die Proteine darstellen, binden diese Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit an eine spezifische Akzeptorstruktur auf der Oberfläche und reichern sich somit an dem lokalen Entzündungsfokus an, wie die erhöhten Konzentrationen dieser Proteine in Synovialflüssigkeiten zeigen. Faktor H bindet z.B. an polymorphkernige Leukozyten (PMN), U937 monozytische Zellen und Raji B lymphoblastoide Zellen (AVERY and GORDON 1993, ERDEI and SIM 1987, DISCIPIO *et al.* 1998). Für den iC3b-Rezeptor (CR3, CD11b/CD18) auf

PMN (DISCIPIO *et al.* 1998), wie für L-Selektin ist eine Rezeptorfunktion für Faktor H beschrieben (DISCIPIO *et al.* 1998). Welches Molekül für die Bindung auf Synovialfibroblasten verantwortlich ist, bleibt jedoch noch zu klären.

Um die lokale Expression in pathologischen Proben zu bestätigen, wurden Gefrierschnitte von Patienten mit RA angefertigt und die Proteine mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen. Es ist eine Produktion und Oberflächenbindung in Schnitten von Patienten mit RA zu detektieren, während Patienten mit Osteoarthritis ohne entzündliche Gelenke, die als Negativkontrolle dienen, keine signifikante Färbung mit anti-FHL-1/Faktor H-Antikörpern zeigen. Faktor H ist im Besonderen im Interstitium und den Gefäßen lokalisiert, während FHL-1 an der Synovialgrenzmembran (Fibroblasten, Makrophagen) in höheren Konzentrationen als Faktor H vorliegt. Diese Beobachtung verhält sich in Übereinstimmung mit der bevorzugten Synthese und Bindung von FHL-1 durch Synovialfibroblasten in Kultur und der erhöhten Konzentration von FHL-1 in Synovialflüssigkeiten.

Um die funktionelle Bedeutung von Faktor H und FHL-1 auf die Komplementlyse der exprimierenden Zellen zu bestätigen, ist die Lyse nach Neutralisation der Proteine untersucht worden. Die Komplementresistenz kann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen den N-terminalen Teil der Proteine erheblich gesteigert werden und die Zellen sind für die Komplementlyse um das 2-fache zu sensibilisieren (Abb. 3.13). Der Antikörper, der nur an Faktor H bindet (Anti-SCR 19-20) konnte hingegen diesen Effekt nicht zeigen. Demnach kommt der Rolle von FHL-1 eine besondere Bedeutung für den Schutz der Zellen zu, aber auch Faktor H ist nicht auszuschließen, da die komplementregulative Domäne gerade im N-terminalen Bereich der Moleküls sitzt. Da die Zellen für den Komplementlyseassay mit NHS inkubiert wurden, ist anzunehmen, dass neben der eigenen Synthese, ein Großteil der Proteine aus dem Serum stammt. Diese Ergebnisse demonstrieren somit, dass Faktor H und im Besonderen das kleinere FHL-1 *de novo* von den Synovialzellen synthetisiert und aus der Synovialflüssigkeit bzw. dem Serum an die Oberfläche utliziert werden, um sich vor der Komplementattacke des eigenen Immunsystems zu schützen.

Da die Protektion von Synovialzellen gegen die durch Komplement vermittelte Schädigung relevant für die Pathogenese der rheumatoiden Arthritis ist und die Aktivierung des AP eine entscheidende Rolle spielt (BRODEUR *et al.* 1991, HANAUSKE-ABEL *et al.* 1982, AGGARWAL *et al.* 2000), gewinnen die beiden Regulatoren des AP, Faktor H und FHL-1 in diesem Umfeld an besonderer Bedeutung. Frühere Studien zeigen, dass Synovialfibroblasten (GUC *et al.* 1993, RUDDY and COLTEN 1974) und andere entzündungsregulierende Zellen, wie Neutrophile (HOGASEN *et al.* 1995b) und Makrophagen (DE CEULAER *et al.* 1980), in normaler und arthritischer Synovia anwesend sind und als lokale Quelle für die aktivierenden Komplementproteine dienen. Dementsprechend trägt die lokale Synthese von inflammatorischen Mediatoren und regulatorischen Komplementproteinen zum inflammatorischen Prozeß bei bzw.

steuert dem entgegen. In erkrankten Gelenken von Patienten mit RA können Immunkomplexe, die Komplement binden, sowie inflammatorische Komplementspaltprodukte nachgewiesen werden. Diese initiieren und perpetuieren die entzündliche Reaktion bis zur Gelenkschädigung (COOKE *et al.* 1972, JASIN 1975, JASIN and COOKE 1978, BRAUER *et al.* 1988). Da die Knorpelmatrix, die während der Progression der Erkrankung exponiert wird, keine Komplementinhibitoren exprimiert und das für Knorpelgewebe spezifische Kollagen Typ II ein Aktivator des AP des Komplementsystems ist (HANAUSKE-ABEL *et al.* 1982), erlauben die verstärkt exprimierte Moleküle, Faktor H und FHL-1 eine lokale Kontrolle der Komplementaktivierung und vermitteln somit dem Knorpel einen Schutz vor der Komplementattacke. Da beide Proteine in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA anwesend sind (Abb. 3.8), ist deren protektive Rolle jedoch ungenügend oder der Gewebeschaden initiiert durch eine bestimmte Oberfläche, an die Faktor H und FHL-1 nicht binden können. Zudem kann ein Ungleichgewicht zwischen Faktor H, FHL-1 und den aktivierenden Komplementkomponenten (C3, Faktor B) vorliegen. Die bevorzugte Expression von FHL-1 in Synovialfibroblasten und das erhöhte Verhältnis von FHL-1/Faktor H in Synovialflüssigkeiten, zeigt eine spezifische Funktion des FHL-1 in diesem Krankheitsvorgang. Innerhalb der Synovia wird insbesondere FHL-1 die Komplementaktivierung herunterregulieren und damit die lokale inflammatorische Reaktion inhibieren. Da Steroide und IFN- γ die antiinflammatorischen Proteine Faktor H und FHL-1 induzieren und zudem protektiv in RA wirken, sind hohe Konzentrationen von Faktor H und FHL-1 für den adäquaten gegenregulatorischen Effekt notwendig. Diese sollten in überphysiologischen Konzentrationen in Tiermodellen auf ihre antiinflammatorische Potenz in RA getestet werden.

4.3 FHL-1/Reconectin und Faktor H in Tumorerkrankungen

Neben entzündlichen Prozessen, ist die Komplementaktivierung auch in karzinomatösen Prozessen erhöht und somit von besonderer Bedeutung. Um zu untersuchen, ob die Synthese von Faktor H und FHL-1, analog zu entzündlichem Gewebe, zum Schutz der sezernierenden, entarteten Zellen beitragen kann, wurden verschiedene Tumorzelllinien untersucht. Eine Glioblastomazelllinie (H2), die im besonderen Maße Faktor H und vor allem FHL-1 exprimiert und aus einem besonders aggressivem Glioblastomafall gewonnen wurde (JÄÄSKELÄINEN *et al.* 1989), wird als außergewöhnlich resistent gegenüber der Zelllyse durch Komplement beschrieben (MÄENPÄÄ *et al.* 1996). In den meisten Fällen ist es möglich, kernhaltige Zellen durch die Neutralisation von CD59 für die Komplementlyse zu sensibilisieren. Wenn CD59 auf U251-Gliomazellen oder EAhy926-Zellen (Endothelzellen) neutralisiert wird, sterben 40 % der Zellen bei einem Standardlyseassay, während keine Steigerung der Lyse nach Neutralisation von CD59 bei H2-Zellen zu beobachten ist (MÄENPÄÄ *et al.* 1996). Weiterhin ist es nicht möglich,

die Lyse der H2-Glioblastomazellen nach Neutralisation der drei Komplementregulatoren MCP (CD46), DAF (CD55) und Protektin (CD59) zu erhöhen, während der vierte mögliche membranständige Regulator CD35 (CR1) nicht auf den Zellen exprimiert wird (MÄENPÄÄ *et al.* 1996). Bei allen bisher getesteten Zelllinien sterben nach Blockierung einer oder mehrerer der drei Regulatoren, ein Großteil der Zellen ab (JUNNIKKALA *et al.* 1994, HAKULINEN and MERI 1994, BJORGE *et al.* 1996). Die Behandlung der H2-Zellen mit PIPLC (Abb. 3.19 C) hat zudem keinerlei Effekt auf die Zelllyse, obwohl diese Behandlung die meisten CD55- und CD59-Moleküle von der Zellmembran entfernt. Die Ergebnisse zeigen, dass die GPI-verankerten Moleküle CD55 und CD59 nicht ausschlaggebend für die Komplementresistenz der H2-Zellen sind. Zusätzlich sind die Zellen mit Heparitinase oder mit dem Cysteinproteinaseinhibitor E-64 behandelt worden. Beides zeigt keinen Effekt auf die Zelllyse (JUNNIKKALA *et al.* 2000).

Da weder die Membraninhibitoren MCP (CD46), DAF (CD55) und Protektin (CD59), noch Heparansulfat oder Cysteinproteasen wie p41 (JEAN *et al.* 1996) für die Resistenz von H2-Zellen verantwortlich sind, sollte Faktor H und FHL-1 produziert werden und die Komplementattacke reduzieren. Die Expression von Faktor H und FHL-1 kann auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden. RT-PCR-Analysen zeigen, dass H2-Zellen eine starke Expression von Faktor H und im Besonderen von FHL-1 mRNA aufweisen, während andere Tumoren, wie U251, T47D oder HT1080 keine Expression zeigen (Abb. 3.14). U251-, T47D- und HT1080-Zellen zeigen dagegen nach IFN- γ und DXM Stimulation eine FHL-1 aber keine Faktor H-Synthese. Durch Western-Blot (Abb. 3.16), radioaktive Markierung (3.17) und ELISA Analysen wird auch nachgewiesen, dass H2-Zellen Faktor H und FHL-1 in die Umgebung sezernieren. Der Blot zeigte, dass mehr FHL-1 als Faktor H in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. Verglichen mit humanem Serum, dass FHL-1 in 10-50-fach niedrigerer Konzentration als Faktor H enthält, ist das Verhältnis im Zellüberstand von H2-Zellen in umgekehrtem Verhältnis. Antisense-Oligonukleotide gegen das FHL-1/Faktor H-Gen der H2-Zellen gerichtet, können durch das gezielte „knock out“ der Synthese und die damit verbundene Blockade der Produktion zeigen, dass diese Proteine *de novo* synthetisiert werden und ein Produkt der H2-Zellen sind.

Frühere Studien (FEARON and AUSTEN 1977, PANGBURN and MÜLLER-EBERHARD 1978, MERI and PANGBURN 1990) zeigen, dass der Regulator des AP Faktor H verantwortlich für die durch Sialinsäure vermittelte Komplementresistenz ist. Die Zellen wurden mit Neuraminidase behandelt, um herauszufinden, ob Sialinsäuren eine Rolle in der Resistenz von H2-Zellen spielen, indem sie Faktor H und FHL-1 an ihre Oberfläche binden. Da H2-Zellen nach der Neuraminidasebehandlung zunehmend empfindlicher für die Komplementattacke werden (Abb. 3.19 A), ist anzunehmen, dass sich H2-Tumorzellen durch die Utilisation von Faktor H und FHL-1 schützen. Die Behandlung der H2-Zellen mit der Protease Trypsin zeigt zudem einen starken Anstieg der Komplementlyse von H2-Zellen (Abb. 3.19 B). Diese Beobachtung zeigt,

dass H2-Zellen für die Lyse sensibilisiert werden, wenn ein Teil der Zelloberflächenproteine und die daran adhärenen Strukturen abgespalten werden.

H2-Zellen können tatsächlich nach Komplementaktivierung mit Antikörper- und Serumbehandlung die Lyse effektiver verhindern, da sie C3b effektiver in iC3b konvertieren können als U251- oder EAhy926-Zellen, die ähnliche Mengen an MCP (CD46) auf ihren Oberflächen besitzen. Zudem ist die Anzahl der terminalen lytischen Komplexe (C5b-9) signifikant auf der Oberfläche der H2-Zellen erniedrigt. Da die H2 Zellen negativ für CR1 sind (JUNNIKKALA *et al.* 2000), ist Faktor H und FHL-1 der einzige bekannte Kandidat für die Kofaktoraktivität und die resultierende Spaltung von C3b.

FACS-Analysen zeigen, dass H2-Zellen fähig sind, Faktor H und FHL-1 aus der flüssigen Phase an ihre Oberfläche zu rekrutieren (Abb. 3.20). Faktor H und FHL-1 werden demnach an eine spezifische Akzeptorstruktur auf der Oberfläche von H2-Zellen gebunden, wobei analoge Rezeptoren wie bei den Synovialfibroblasten in Frage kommen. Die Oberflächenproteine Osteopontin (OPN) und Knochensialoprotein (BSP) sind zudem zwei Strukturen, die auf einigen anderen Tumoren nachgewiesen sind und als Akzeptoren für Faktor H dienen könnten (FEDARKO *et al.* 2000). Faktor H und FHL-1 werden aber am wahrscheinlichsten über Sialinsäuren an die Oberfläche von H2-Zellen gebunden, da die Entfernung von Zellmembransialinsäuren mit Neuraminidase die H2-Zellen sensibler für die durch Komplement vermittelte Lyse macht.

Die Bestätigung der funktionellen Signifikanz von Faktor H und FHL-1 auf die Komplementresistenz, wird durch den Effekt der Faktor H und FHL-1-Neutralisation mit spezifischen Antikörpern in einer Zytotoxizitätsassay geliefert. Da Faktor H mehrere Bindestellen für C3b besitzt (SHARMA and PANGBURN 1996, JOKIRANTA *et al.* 1996), ist der Gebrauch einer Kombination von zwei monoklonalen Anti-Faktor H-Ak (131X und OX24) mit dem polyklonalen Anti-H2-Ak notwendig. Diese Kombination ist fähig die Lyse der H2-Zellen um das 5-fache im Vergleich zu anderen bisherigen Assays und der spontanen Lyse zu steigern (Abb. 3.21). Die Effizienz, mit der H2-Zellen für die durch Komplement vermittelte Lyse sensibilisiert wird, zeigt, dass Faktor H und/oder FHL-1 eine wesentliche protektive Funktion für diese Zellen haben. In einem Lyseassay, welcher etwa 1 h dauert und bei dem die Zellen sorgfältig gewaschen werden, bevor sie mit Antikörpern und Serum behandelt werden, ist es sehr wahrscheinlich, dass die größte Menge des Faktor H und FHL-1 aus dem Serum stammt. Dementsprechend ist es evident, dass H2-Zellen nicht nur Faktor H und FHL-1 synthetisieren und in ihre Mikroatmosphäre sezernieren, sondern die Zellen auch die Proteine aus der flüssigen Phase rekrutieren können. Indem H2-Zellen die Spaltung von zellmembrangebundenem C3b zu seiner inaktivem Form iC3b verstärken und die Deposition des terminalen, destruktiven Komplementkomponenten (C5b-9) auf die Zellmembran reduzieren, können sie effizient die Komplementaktivierung regulieren. Zudem kann die verminderte C3b-Deposition auf

Tumorzellen entscheidend für die geringe Immunogenität von Tumorantigenen sein, da der Kostimulus der Komplementspaltprodukte für die B-Zellaktivierung fehlt (CARROLL 1998). Diese Resultate demonstrieren eine regulatorische Rolle von Faktor H und FHL-1 in der Komplementresistenz von H2-Glioblastomazellen und implizieren, dass die Synthese und Utilisation von Faktor H und FHL-1 ein neuer Mechanismus ist, den sich sowohl maligne Tumorzellen als auch normale Körperzellen oder entzündliches Gewebe wie z.B. Synovialfibroblasten in RA zu nutze machen können, um der Komplementattacke zu entgehen. Auch für andere Tumorzellen wird eine Bedeutung von Faktor H für die Tumorevasion nahegelegt. Faktor H hat z.B. eine regulative Funktion auf der Oberfläche von kernhaltigen Melanomazellen (OLLERT *et al.* 1995). Zusätzlich wird gezeigt, dass bestimmte Glioma- und Neuroblastomazellen Faktor H mRNA exprimieren (GASQUE *et al.* 1992, GASQUE and MORGAN 1996) und eine humane Oligodendrozyten-Zelllinie (HOG) Faktor H sezerniert, die Proteinproduktion aber von der Zytokinzugabe (IFN- γ) abhängig blieb (GASQUE *et al.* 1996), wie hier für die Tumorzellen U251, HT1080 und T47D gezeigt wird (Abb. 3.14). Andere Studien zeigen, dass Faktor H oder ein sehr nahe verwandtes Molekül von Übergangszellkarzinomen der Blase sezerniert wird und im Urin bestimmt werden kann (KINDERS *et al.* 1998). Dieses Molekül ist von hohem diagnostischen Wert, da es als Tumormarker dient und mit dem Tumorgrad und -stadium korreliert und außerdem vor Komplementlyse schützt (IRANI *et al.* 1999, HEICAPPEL *et al.* 1999, THOMAS *et al.* 1999, COREY *et al.* 2000).

In dieser Arbeit wird ein wesentlicher Hinweis für die Rolle von Faktor H in der Resistenz von Tumorzellen gegen Komplementschädigung geliefert. Diese Ergebnisse schlagen zudem zum ersten Mal auch für FHL-1 eine solche Rolle vor. Da FHL-1 die funktionellen Aktivitäten mit Faktor H teilt und eine Zelladhärenz vermittelt (HELLWAGE *et al.* 1997a, ZIPFEL and SKERKA 1999), wird FHL-1 die H2-Zellen gegen die Komplementaktivierung in der gleichen Weise schützen, wie Faktor H. Die im Zellüberstand relativ höhere Expression von FHL-1, im Vergleich zu Faktor H weist darauf hin, dass FHL-1 eine wichtigere Rolle bei der Resistenzentwicklung spielt. Analog zu Mikroorganismen, wie Streptokokken, Yersinien und Neisserien, binden Tumorzellen die Komplementregulatoren an ihre Oberfläche und entgehen damit der Komplementattacke. Auch bei den Bakterien spielt FHL-1 und nicht wie anfänglich vermutet Faktor H die entscheidende Rolle (KOTARSKY *et al.* 1998, JOHNSON *et al.* 1998).

4.4 C3b-Bindestelle im SCR 20 von Faktor H

Die komplementregulative Funktion des Faktor H-Moleküls, die bei der Protektion der Synovialfibroblasten, Glioblastomazellen und der körpereigenen Zellen ausschlaggebend ist, wird durch die Bindung an das C3b-Molekül als zentralen Angriffspunkt vermittelt. Um diese

Bindungsstelle näher zu untersuchen, ist eine natürliche Mutante des Faktor H-Moleküls, FHR-4 von besonderem Interesse. FHR-4 bindet an C3b (HELLWAGE *et al.* 1999). Die genaue Lokalisation der C3b-Bindestelle konnte jedoch bisher nicht näher charakterisiert werden. Das Faktor H Fragment SCR 19-20 bindet an das enzymatische Fragment C3d von C3b (JOKIRANTA *et al.* 2000). Aufgrund der hohen Homologie zwischen den C-terminalen SCRs von FHR-4 und Faktor H wurde das Fragment SCR 4-5 von FHR-4 als Deletionsmutante exprimiert und funktionell untersucht. Das FHR-4 SCR 4-5 Proteinfsegment von FHR-4 konnte mit der Biacore-Technik in C3b-Bindungsstudien eingesetzt werden. Die Bindungsstelle konnte auf diesen beiden SCRs lokalisiert werden und bestätigt die Funktion von SCR 19-20 des Faktor H-Moleküls in der Regulation der C3b-Aktivierung.

Durch weitere Versuche mit dem homologen Molekül FHR-3 und Faktor H durch Tobias U. Wolk, Bernhard-Nocht-Institut, konnte die Bindestelle von Faktor H für C3d als auch für Heparin auf SCR 20 eingegrenzt werden. Die relevanten Aminosäuren von SCR 20, die vermutlich für die C3d-Bindung verantwortlich sind, konnten durch Aminosäurevergleiche zwischen den C3d-bindenden Proteinen Faktor H, FHR-3 und FHR-4 identifiziert werden und wurden durch ein berechnetes molekulares Modell als Ile-65, Ser-66, Met-70, Asn-74, Leu-77, Arg-78, Leu-119 und Tyr-121 bestätigt (JOKIRANTA *et al.* submitted). Die Tertiärstruktur von C3d (NAGAR *et al.* 1998) zeigt die Sequenzen, die bei der Faktor H-Bindung beteiligt sind. Die vorgeschlagenen Aminosäuren des Computermodells auf SCR 20 von Faktor H konnten demnach mit dem Computermodell von C3d in einer Bindungsanalyse eingesetzt werden und zeigen ein sehr gutes Ineinandepassen im Schlüssel und Schloßprinzip (JOKIRANTA *et al.* submitted). Der gleichzeitige Kontakt von Faktor H SCR 20 mit C3d und Sialinsäuren/Heparin in direkter Umgebung untermauert die Hypothese, dass beide dieser Interaktionen auf Nicht-Aktivatoroberflächen in Gebrauch sind, während bei Aktivatoroberflächen nur eine Bindestelle aktiv ist. Mit dieser Überlegung können Zellen, die selber Faktor H synthetisieren, dieses über negative Ladungen auf der Oberfläche binden und sich analog zu Neisserien (RAM *et al.* 1998b) vor der Komplementattacke schützen. Dieser Mechanismus wird auch für die H2-Zellen und Synovialfibroblasten angenommen. Insbesondere für die H2-Zellen wird hier gezeigt, dass die Sialinsäuren eine entscheidende Bedeutung in der Bindung von Faktor H haben, da ihre Entfernung von der Oberfläche der Zellen durch Neuraminidase die Komplementlyse fördert. Das kürzere FHL-1 Protein wird über einen anderen Mechanismus, z.B. einen Integrinrezeptor, an die Oberflächen von Zellen gebunden, da das SCR 20 nicht vorhanden ist und die Heparinbindestelle auf SCR 7 unfähig ist, zwischen C3b auf Schaferythrozyten und Sepharosepartikeln zu unterscheiden (KOISTINEN *et al.* 1998).

4.5 Schlußfolgerung und Ausblick

Die zellspezifische Expression und die durch Mediatoren kontrollierte Induktion der FHL-1 und Faktor H Proteine zeigt einen komplexen transkriptionellen und translationellen Kontrollmechanismus. Für das FHL-1 Protein sind besondere biologische Funktionen beschrieben worden und vorliegende Ergebnisse zeigen eine spezifische Beteiligung dieses Proteins in Krankheitsprozessen, wie in rheumatoider Arthritis und Tumorerkrankungen. Dabei ist die Überexpression von Faktor H und FHL-1 für den lokalen Gewebeschutz verantwortlich.

FHL-1 und Faktor H sind in Synovialflüssigkeiten vorhanden und werden bei rheumatoider Arthritis lokal durch Synovialfibroblasten synthetisiert (DE CEULAER *et al.* 1980, GUC *et al.* 1993). Zugleich zeigt sich eine spezifische Funktion dieser Proteine in der RA, da ihre Synthese durch die medikamentös eingesetzte Glukokortikoide und das in RA vermutlich protektiv wirkende Zytokin IFN- γ hochreguliert wird (BOISSIER *et al.* 1995). Im Gegensatz dazu verändert TNF- α die Transkription der protektiven Moleküle nicht, sondern induziert die inflammatorischen Proteine Faktor B und C3 (KATZ *et al.* 1993). Die bevorzugte Expression von FHL-1 in Synovialfibroblasten und das erhöhte Verhältnis von FHL-1/Faktor H in Synovialflüssigkeiten, zeigt eine spezifische Funktion des FHL-1 in diesem Krankheitsvorgang. Innerhalb der Synovia kann so insbesondere FHL-1 die Komplementaktivierung herunterregulieren und den lokalen inflammatorischen Prozess inhibieren. FHL-1 bindet an Heparin, Sialinsäuren oder Integrinrezeptoren und kann dadurch an Zelloberflächen angereichert werden, um dort zur Zellprotektion beizutragen, wie hier für Synovialfibroblasten und H2-Zellen gezeigt wird. FHL-1, aber auch Faktor H ist demnach ein interessanter Kandidat, um in einem RA-Modell getestet zu werden. Diese Vorgehensweise wird zeigen, ob diese Proteine ähnlich wie lösliches CR1 (soluble CR1) (GOODFELLOW *et al.* 1997, 2000) den zerstörerischen Effekt der kontinuierlichen Komplementaktivierung in RA *in vivo* aufhalten können. Auch die Anwendung dieser Moleküle in der Behandlung von anderen Krankheiten mit schädlicher Komplementaktivierung wie z.B. beim Myokardinfarkt (WEISMAN *et al.* 1990, GRISELLI *et al.* 1999) steht zur Disposition.

Die Überexpression der zwei Komplementregulatoren durch Krebszellen, bietet einen anderen therapeutischen Ausblick. Die exzeptionelle Komplementresistenz der Tumorzellen könnte durch die gezielte Blockade der Produktion von Faktor H und FHL-1 einen neuen Ansatz der Tumorthherapie darstellen. Der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden gegen das FHL-1/Faktor H-Gen der H2-Zellen zeigt bereits eine gezielte Blockade der Synthese und kann nun *in vivo* eingesetzt werden. Die H2-Glioblastomazellen sezernieren sehr hohe Konzentrationen von FHL-1. Obwohl beide Faktor H-Genprodukte vorhanden sind, ist bisher unklar welcher zu der besonderen Resistenz führt. In den beschriebenen Krankheiten ist das Verhältnis FHL-1/Faktor H zugunsten der FHL-1 Seite verschoben. Der Analogieschluß zu Mikroorganismen, die

bevorzugt FHL-1 anstatt Faktor H nutzen und die höhere Konzentration von FHL-1 in Synovialflüssigkeit bei RA und auf den beschriebenen Tumorzellen, lässt das kleinere Molekül besonders attraktiv für die protektiven Funktionen erscheinen.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Komplementregulator Faktor H und das alternativ prozessierte Faktor H-Genprodukt FHL-1, die beide die Aktivierung des Alternativen Komplementaktivierungswegs kontrollieren, werden in verschiedenen Organen und Geweben in unterschiedlichem Maße exprimiert und durch Immunmediatoren, wie Interferon- γ und Tumor Nekrose Faktor- α , sowie durch Steroide in ihrer Synthese unterschiedlich beeinflusst. FHL-1 findet sich vermehrt konstitutiv im peripheren Gewebe und wird durch IFN- γ und Steroide häufiger induziert, während Faktor H in der Leber in hohen Konzentrationen zu finden ist und für die systemischen Proteinspiegel und Kontrolle zu sorgen scheint.

In entzündlichen Krankheiten (rheumatoide Arthritis) und in spezifischen karzinomatösen Prozessen dienen die beiden Proteine dem Schutz vor einer Lyse der autologen Zellen durch die Komplementkaskade, die in diesen pathologischen Prozessen vermehrt aktiviert ist. Vor allem FHL-1 wird in überphysiologischen Konzentrationen von den Zellen synthetisiert und dient der Abwehr, indem die sezernierenden Zellen dieses Molekül, aber auch Faktor H, auf ihre Oberflächen binden und sich damit eine effektive Mikroatmosphäre schaffen, die eine Lyse vermindert und die Integrität des Organismus bewahrt.

Dieser Schutz wird durch das Molekül Faktor H über unterschiedliche Abschnitte in der Proteinkette vermittelt. Die natürliche Mutante des Faktor H, FHR-4, diente dazu die Aminosäuren zu bestimmen, die auf SCR 20 von Faktor H für die Regulation der C3b-Kontrolle verantwortlich sind. Dieser Abschnitt, scheint wesentlich für die Differenzierung von aktivierenden (fremden) Oberflächen und nicht aktivierenden (Wirts-)Oberflächen zu sein, die für den Schutz der sezernierenden Synovialzellen in RA und in karzinomatösen Prozessen von entscheidender Bedeutung sind.

Die vorliegenden Experimente charakterisieren die Komplement- und Immunregulatoren Faktor H und FHL-1 als zentrale antiinflammatorische Substanzen, die in verschiedenen Prozessen erhöhter Komplementaktivierung sezernierenden Zellen besonderen Schutz vor Autolyse durch die Komplementkaskade verleihen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aggarwal, A., A. Bhardwaj, S. Alam, and R. Misra. 2000. Evidence for activation of the alternate complement pathway in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 39:189-92.
- Aronen, M., T. Lehto and S. Meri. 1993. Regulation of alternative pathway complement activation by an interaction of C-reactive protein with factor H. *Immunol. Infect. Dis.* 3:83
- Ault, B. H., B. Z. Schmidt, N. L. Fowler, C. E. Kashtan, A. E. Ahmed, B. A. Vogt, Colten, and 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.
- Avery, V. M. and D. L. Gordon. 1993. Characterization of factor H binding to human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 151:5545-5553.
- Baranyi, L., K. Baranji, H. Takizawa, N. Okada, and H. Okada. 1994. Cell-surface bound complement regulatory activity is necessary for the in vivo survival of KDH-8 rat hepatoma. *Immunology* 82:522-528.
- Barlow, P. N., A. Steinkasserer, D. G. Norman, B. Kieffer, A. P. Wiles, R. B. Sim, and I. D. Campbell. 1993. Solution structure of a pair of complement modules by nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* 232:268-284.
- Barlow, P. N., D. G. Norman, A. Steinkasserer, T. J. Horne, J. Pearce, P. C. Driscoll, R. B. Sim, and I. D. Campbell. 1992. Solution structure of the fifth repeat of factor H: a second example of the complement control protein module. *Biochemistry* 31:3626-3634.
- Bendelac, A. and D. T. Fearon. 1997. Innate pathways that control acquired immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 9:1-3.
- Bhakdi, S. and J. Trantum-Jensen. 1986. C5b-9 assembly: average binding of one C9 molecule to C5b-8 without poly-C9 formation generates a stable transmembrane pore. *J. Immunol.* 136:2999-3005.
- Bhakdi, S. and J. Trantum-Jensen. 1991. Complement lysis: a hole is a hole. *Immunol. Today* 12:318-20.
- Bjorge, L., C. A. Vedeler, E. Ulvestad, and R. Matre. 1994. Expression and function of CD59 on colonic adenocarcinoma cells. *Eur. J. Immunol.* 24:1597-1603.
- Bjorge, L., T. S. Jensen, and R. Matre. 1996. Characterisation of the complement-regulatory proteins decay-accelerating factor (DAF, CD55) and membrane cofactor protein (MCP, CD46) on a human colonic adenocarcinoma cell line. *Cancer Immunol. Immunother.* 42:185-192.
- Blackmore, T. K., J. Hellwage, T. A. Sadlon, N. Higgs, P. F. Zipfel, H. M. Ward, and D. L. Gordon. 1998. Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J. Immunol.* 160:3342-3348.
- Blackmore, T. K., T. A. Sadlon, H. M. Ward, D. M. Lublin, and D. L. Gordon. 1996. Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J. Immunol.* 157:5422-5427.
- Boissier, M. C., G. Chiocchia, N. Bessis, J. Hajnal, G. Garotta, F. Nicoletti, and C. Fournier. 1995. Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 25:1184-1190.
- Botto, M., C. Dell'Agnola, A. E. Bygrave, E. M. Thompson, H. T. Cook, F. Petry, M. Loos, P. P. Pandolfi, and M. J. Walport. 1998. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 19:56-59.
- Brasoveanu, L. I., M. Altomonte, A. Glohini, E. Fonsatti, S. Coral, A. Gasparollo, R. Montagner, I. Cattarossi, C. Simonelli, and A. Cattelan. 1995. Expression of protectin (CD59) in human melanoma and its functional role in cell- and complement-mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer* 61:548-556.
- Brauer, R., K. Thoss, S. Henzgen, and G. Waldmann. 1988. Significance of cell-mediated and humoral immunity in the acute and chronic phase of antigen-induced arthritis in rabbits. *Exp. Pathol.* 34:197-208.
- Brodeur, J. P., S. Ruddy, L. B. Schwartz, and G. Moxley. 1991. Synovial fluid levels of complement SC5b-9 and fragment Bb are elevated in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34:1531-1537.
- Broomans, R. A., P. S. Hiemstra, A. A. van der Ark, R. B. Sim, L. A. van Es, and M. R. Daha. 1989. Biosynthesis of complement factor H by human umbilical vein endothelial cells. Regulation by T cell growth factor and IFN-gamma. *J. Immunol.* 142:2024-2030.
- Carroll, M. C. 1998. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 16:545-68.
- Carter, P. E., C. Duponchel, M. Tosi, and J. E. Fothergill. 1991. Complete nucleotide sequence of the gene for human C1 inhibitor with an unusually high density of Alu elements. *Eur. J. Biochem.* 197:301-308.
- Cheung, N. K., E. I. Walter, W. H. Smith-Mensah, W. D. Ratnoff, M. L. Tykocinski, and M. E. Medof. 1988. Decay-accelerating factor protects human tumor cells from complement-mediated cytotoxicity in vitro. *J. Clin. Invest.* 81:1122-1128.

- China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. De Bruyere, and G. R. Cornelis. 1993. Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect. Immun.* 61:3129-3136.
- Cooke, T. D., E. R. Hurd, M. Ziff, and H. E. Jasin. 1972. The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. II. Preferential localization of antigen-antibody complexes to collagenous tissues. *J. Exp. Med.* 135:323-338.
- Cooper, N. R. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* 37:151-216:151-216.
- Corvetta, A., G. Pomponio, N. Rinaldi, M. M. Luchetti, C. Di Loreto, and D. Stramazzotti. 1992. Terminal complement complex in synovial tissue from patients affected by rheumatoid arthritis, osteoarthritis and acute joint trauma. *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:433-438.
- Corey, M. J., R. J. Kinders, C. M. Poduje, C. L. Bruce, H. Rowley, L. G. Brown, G. M. Hass, and R. L. Vessella. 2000. Mechanistic studies of the effects of anti-factor H antibodies on complement-mediated lysis. *J. Biol. Chem.* 275:12917-25
- Cui, W., D. Hourcade, T. Post, A. C. Greenlund, J. P. Atkinson, and V. Kumar. 1993. Characterization of the promoter region of the membrane cofactor protein (CD46) gene of the human complement system and comparison to a membrane cofactor protein-like genetic element. *J. Immunol.* 151:4137-4146.
- Cush, J. J. and P. E. Lipsky. 1988. Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:1230-1238.
- Daha, M. R., D. T. Fearon, and K. F. Austen. 1976. C3 requirements for formation of alternative pathway C5 convertase. *J. Immunol.* 117:630-634.
- Dankert, J. R. and A. F. Esser. 1985. Proteolytic modification of human complement protein C9: loss of poly(C9) and circular lesion formation without impairment of function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82:2128-2132.
- de Ceulaer, C., S. Papazoglou, and K. Whaley. 1980. Increased biosynthesis of complement components by cultured monocytes, synovial fluid macrophages and synovial membrane cells from patients with rheumatoid arthritis. *Immunology* 41:37-43.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski, and S. Subramani. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7:725-737.
- Diaz, A., A. Ferreira, and R. B. Sim. 1997. Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *J. Immunol.* 158:3779-3786.
- Diaz-Guillen, M. A., S. Rodriguez de Cordoba, and D. Heine-Suner. 1999. A radiation hybrid map of complement factor H and factor H-related genes. *Immunogenetics* 49:549-552.
- DiScipio, R. G., P. J. Daffern, I. U. Schraufstatter, and P. Sriramaraio. 1998. Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* 160:4057-4066.
- Donaldson, V. H., R. A. Harrison, F. S. Rosen, D. H. Bing, G. Kindness, J. Canar, C. J. Wagner, and S. Awad. 1985. Variability in purified dysfunctional C1(-)-inhibitor proteins from patients with hereditary angioneurotic edema. Functional and analytical gel studies. *J. Clin. Invest.* 75:124-132.
- Easterbrook-Smith, S. B., M. R. Wilson, and B. D. Wines. 1992. RHP is antigenically related to factor H and binds to the globular heads of C1q. *Mol. Immunol.* 29:1203-1207.
- Erdei A, N. Julen, P. Marschang, E. Feifel, K. Kerekes, and M. P. Dietrich. 1994. A novel, complement factor H-related regulatory protein expressed on the surface of human B cell lines. *Eur J Immunol.* 24:867-72.
- Erdei, A. and R. B. Sim. 1987. Complement factor H-binding protein of Raji cells and tonsil B lymphocytes. *Biochem. J.* 246:149-156.
- Esser, A. F. 1991. Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol. Today* 12:316-8; discussion 321.
- Fearon, D. T. 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.
- Fearon, D. T. 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.
- Fearon, D. T. and K. F. Austen. 1975a. Initiation of C3 cleavage in the alternative complement pathway. *J. Immunol.* 115:1357-1361.
- Fearon, D. T. and K. F. Austen. 1975b. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J. Exp. Med.* 142:856-863.
- Fearon, D. T. and K. F. Austen. 1977. Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:1683-1687.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50-53.

- Fedarko, N. S., B. Fohr, P. G. Robey, M. F. Young, and L. W. Fisher. 2000. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor evasion of complement-mediated attack. *J. Biol. Chem.* 275:16666-16672.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein. 1984. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* 137:266-267.
- Feldmann, M., F. M. Brennan, and R. N. Maini. 1996. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 14:397-440:397-440.
- Fijen, C. A., E. J. Kuijper, M. Te Bulte, M. M. van de Heuvel, A. C. Holdrinet, R. B. Sim, M. R. Daha, and J. Dankert. 1996. Heterozygous and homozygous factor H deficiency states in a Dutch family. *Clin. Exp. Immunol.* 105:511-516.
- Fishelson, Z. 1991. Complement C3: a molecular mosaic of binding sites. *Mol. Immunol.* 28:545-552.
- Fishelson, Z., M. K. Pangburn, and H. J. Muller-Eberhard. 1984. Characterization of the initial C3 convertase of the alternative pathway of human complement. *J. Immunol.* 132:1430-1434.
- Fontaine, M., M. J. Demares, V. Koistinen, A. J. Day, C. Davrinche, R. B. Sim, and J. Ripoche. 1989. Truncated forms of human complement factor H. *Biochem. J.* 258:927-930.
- Friese, M. A., J. Hellwege, T. S. Jokiranta, S. Meri, H. H. Peter, H. Eibel, and P. F. Zipfel. 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.* 36:809-18.
- Fujita, T. and V. Nussenzweig. 1979. The role of C4-binding protein and beta 1H in proteolysis of C4b and C3b. *J. Exp. Med.* 150:267-276.
- Fujita, T., I. Gigli, and V. Nussenzweig. 1978. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J. Exp. Med.* 148:1044-1051.
- Gasque, P., M. Fontaine, and B. P. Morgan. 1995. Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines. *J. Immunol.* 154:4726-33.
- Gasque, P., N. Julien, A. M. Ischenko, C. Picot, C. Mauger, C. Chauzy, J. Ripoche, and M. Fontaine. 1992. Expression of complement components of the alternative pathway by glioma cell lines. *J. Immunol.* 149:1381-1387.
- Gasque, P. and B. P. Morgan. 1996. Complement regulatory protein expression by a human oligodendrocyte cell line: cytokine regulation and comparison with astrocytes. *Immunology* 89:338-347.
- Gasque, P., A. Thomas, M. Fontaine, and B. P. Morgan. 1996. Complement activation on human neuroblastoma cell lines in vitro: route of activation and expression of functional complement regulatory proteins. *J. Neuroimmunol.* 66:29-40.
- Gerritsma, J. S., A. F. Gerritsen, M. De Ley, L. A. van Es, and M. R. Daha. 1997. Interferon-gamma induces biosynthesis of complement components C2, C4 and factor H by human proximal tubular epithelial cells. *Cytokine* 9:276-283.
- Goodfellow, R. M., A. S. Williams, J. L. Levin, B. D. Williams, and B. P. Morgan. 1997. Local therapy with soluble complement receptor 1 (sCR1) suppresses inflammation in rat mono-articular arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 110:45-52.
- Goodfellow, R. M., A. S. Williams, J. L. Levin, B. D. Williams, and B. P. Morgan. 2000. Soluble complement receptor one (sCR1) inhibits the development and progression of rat collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 119:210-6.
- Gordon, D. L., R. M. Kaufman, T. K. Blackmore, J. Kwong, and D. M. Lublin. 1995. Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J. Immunol.* 155:348-356.
- Griselli, M., J. Herbert, W. L. Hutchinson, K. M. Taylor, M. Sohail, T. Krausz, and M. B. Pepys. 1999. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J. Exp. Med.* 190: 1733-1739.
- Guc, D., P. Gulati, C. Lemerrier, D. Lappin, G. D. Birnie, and K. Whaley. 1993. Expression of the components and regulatory proteins of the alternative complement pathway and the membrane attack complex in normal and diseased synovium. *Rheumatology International* 13:139-146.
- Hack, C. E., J. Paardekooper, and F. Van Milligen. 1990. Demonstration in human plasma of a form of C3 that has the conformation of "C3b-like C3". *J. Immunol.* 144:4249-4255.
- Hakulinen, J. and S. Meri. 1994. Expression and function of the complement membrane attack complex inhibitor protectin (CD59) on human breast cancer cells. *Lab. Invest.* 71:820-827.
- Hamilton, K. K., J. Zhao, and P. J. Sims. 1993. Interaction between apolipoproteins A-I and A-II and the membrane attack complex of complement. Affinity of the apoproteins for polymeric C9. *J. Biol. Chem.* 268:3632-3638.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.

- Hanauske-Abel, H. M., B. F. Pontz, and H. U. Schorlemmer. 1982. Cartilage specific collagen activates macrophages and the alternative pathway of complement: evidence for an immunopathogenic concept of rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 41:168-176.
- Harrison, R. A. and P. J. Lachmann. 1980. The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol. Immunol.* 17:9-20.
- Heicappell, R., I. C. Wettig, M. Schostak, M. Muller, U. Steiner, T. Sauter, and K. Miller. 1999. Quantitative detection of human complement factor H-related protein in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur. Urol.* 35:81-87.
- Heine-Suner, D., M. A. Diaz-Guillen, F. P. de Villena, M. Robledo, J. Benitez, and S. Rodriguez de Cordoba. 1997. A high-resolution map of the regulator of the complement activation gene cluster on 1q32 that integrates new genes and markers. *Immunogenetics* 45:422-427.
- Hellwage, J., 1994. Rekoinante Expression und funktionelle Charakterisierung ausgewählter Proteindomänen von Komplement Faktor H. *Diplomarbeit*. Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- Hellwage, J., S. Kühn, and P. F. Zipfel. 1997a. The human complement regulatory factor-H-like protein 1, which represents a truncated form of factor H, displays cell-attachment activity. *Biochem. J.* 326:321-327.
- Hellwage, J., C. Skerka, and P. F. Zipfel. 1997b. Biochemical and functional characterization of the factor-H- related protein 4 (FHR-4). *Immunopharmacology* 38:149-157.
- Hellwage, J., Jokiranta, T. S., Koistinen, V., Vaarala, O., Meri, S., and P. F. Zipfel. 1999. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* 462:345-52.
- Hing, S., A. J. Day, S. J. Linton, J. Ripoche, R. B. Sim, K. B. Reid, and E. Solomon. 1988. Assignment of complement components C4 binding protein (C4BP) and factor H (FH) to human chromosome 1q, using cDNA probes. *Ann. Hum. Genet.* 52:117-122.
- Hochuli, E., H. Dobeli, and A. Schacher. 1987. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 411:177-84.
- Hofman, P., B. L. Hsi, S. Manie, P. Fenichel, A. Thyss, and B. Rossi. 1994. High expression of the antigen recognized by the monoclonal antibody GB24 on human breast carcinomas: a preventive mechanism of malignant tumor cells against complement attack? *Breast Cancer Res. Treat.* 32:213-219.
- Hogasen, K., J. H. Jansen, T. E. Mollnes, J. Hovdenes, and M. Harboe. 1995a. Hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II is caused by factor H deficiency. *J. Clin. Invest.* 95:1054-1061.
- Hogasen, K., S. Meri, and J. H. Jansen. 1998. Membranoproliferative glomerulonephritis type II: factor H dysfunction nephritis. *Immunologist* 6:23
- Hogasen, K., T. E. Mollnes, M. Harboe, O. Gotze, H. B. Hammer, and M. Oppermann. 1995b. Terminal complement pathway activation and low lysis inhibitors in rheumatoid arthritis synovial fluid. *J. Rheumatol.* 22:24-28.
- Horiuchi, T., K. J. Macon, V. J. Kidd, and J. E. Volanakis. 1990. Translational regulation of complement protein C2 expression by differential utilization of the 5'-untranslated region of mRNA. *J. Biol. Chem.* 265:6521-6524.
- Horstmann, R. D., M. K. Pangburn, and H. J. Müller-Enerhard. 1985. Species specificity of recognition by the alternative pathway of complement. *J. Immunol.* 134:1101.
- Horstmann, R. D., H. J. Sievertsen, J. Knobloch, and V. A. Fischetti. 1988. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:1657-1661.
- Hugli, T. E. 1984. Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin. Immunopathol.* 7:193-219.
- Hugli, T. E., C. Gerard, M. Kawahara, M. E. Scheetz, 2d, R. Barton, S. Briggs, G. Koppel, and S. Russell. 1981. Isolation of three separate anaphylatoxins from complement-activated human serum. *Mol. Cell Biochem.* 41:59-66.
- Irani, J., F. Desgrandchamps, C. Millet, M. E. Toubert, D. Bon, J. Aubert, and A. Le Duc. 1999. BTA stat and BTA TRAK: A comparative evaluation of urine testing for the diagnosis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur. Urol.* 35:89-92.
- Isaac, L., D. Aivazian, A. Taniguchi-Sidle, R. O. Ebanks, C. S. Farah, M. P. Florido, M. K. Pangburn, and D. E. Isenman. 1998. Native conformations of human complement components C3 and C4 show different dependencies on thioester formation. *Biochem. J.* 329:705-712.
- Isenman, D. E., D. I. Kells, N. R. Cooper, H. J. Muller-Eberhard, and M. K. Pangburn. 1981. Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry* 20:4458-4467.
- Jääskeläinen, J., P. Kalliomaki, A. Paetau, and T. Timonen. 1989. Effect of LAK cells against three-dimensional tumor tissue. In vitro study using multi-cellular human glioma spheroids as targets. *J. Immunol.* 142:1036-1045.
- Janeway, C. A., and P. Travers. 1996. Immunobiology: the immune system in health and disease. second ed.. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc.

- Janosy, G., G. Panayi, O. Duke, M. Bofill, L. W. Poulter, and G. Goldstein. 1981. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 2:839-842.
- Jansen, J. H., K. Hogasen, and A. M. Grondahl. 1995. Porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II: an autosomal recessive deficiency of factor H. *Vet. Rec.* 137:240-244.
- Jarva, H., T. S. Jokiranta, J. Hellwage, P. F. Zipfel, and S. Meri. 1999. Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11. *J. Immunol.* 163: 3957-3962.
- Jarvis, D. L. and A. Garcia Jr. 1994. Long-term stability of baculovirus stored under various conditions. *Biotechniques.* 16:508
- Jasin, H. E. 1975. Mechanism of trapping of immune complexes in joint collagenous tissues. *Clin. Exp. Immunol.* 22:473-485.
- Jasin, H. E. and T. D. Cooke. 1978. The inflammatory role of immune complexes trapped in joint collagenous tissues. *Clin. Exp. Immunol.* 33:416-424.
- Jean, D., M. Bar-Eli, S. Huang, K. Xie, F. Rodrigues-Lima, J. Hermann, and R. Frade. 1996. A cysteine proteinase, which cleaves human C3, the third component of complement, is involved in tumorigenicity and metastasis of human melanoma. *Cancer Res.* 56:254-258.
- Jenne, D. and K. K. Stanley. 1985. Molecular cloning of S-protein, a link between complement, coagulation and cell-substrate adhesion. *EMBO J.* 4:3153-3157.
- Jenne, D. E. and J. Tschopp. 1989. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxic inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:7123-7127.
- Ji, Y. H., T. Fujita, H. Hatsuse, A. Takahashi, M. Matsushita, and M. Kawakami. 1993. Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor. *J. Immunol.* 150:571-578.
- Johnsson, E., K. Berggard, H. Kotarsky, J. Hellwage, P. F. Zipfel, U. Sjöbring, and G. Lindahl. 1998. Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. *J. Immunol.* 161: 4894-4901
- Jokiranta, T. S., J. Hellwage, V. Koistinen, P. F. Zipfel, and S. Meri. 2000. Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J. Biol. Chem.* Jun 2.
- Jokiranta, T. S., P. F. Zipfel, J. Hakulinen, S. Kuhn, M. K. Pangburn, J. D. Tamerius, and S. Meri. 1996. Analysis of the recognition mechanism of the alternative pathway of complement by monoclonal anti-factor H antibodies: evidence for multiple interactions between H and surface bound C3b. *FEBS Letters* 393:297-302.
- Junnikkala, S., J. Hakulinen, and S. Meri. 1994. Targeted neutralization of the complement membrane attack complex inhibitor CD59 on the surface of human melanoma cells. *Eur. J. Immunol.* 24:611-615.
- Junnikkala, S., T. S. Jokiranta, M. A. Friese, H. Jarva, P. F. Zipfel, and S. Meri. 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.
- Katz, Y. and R. C. Strunk. 1988. Synthesis and regulation of complement protein factor H in human skin fibroblasts. *J. Immunol.* 141:559-563.
- Katz, Y., M. Guterman, and E. Lahat. 1993. Regulation of synthesis of complement proteins in HEp2 cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67:117-123.
- Katz, Y., S. Gur, M. Aladjem, and R. C. Strunk. 1995. Synthesis of complement proteins in amnion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:2027-2032.
- Kim, Y. U., M. C. Carroll, D. E. Isenman, M. Nonaka, P. Pramoongjago, J. Takeda, K. Inoue, and T. Kinoshita. 1992. Covalent binding of C3b to C4b within the classical complement pathway C5 convertase. Determination of amino acid residues involved in ester linkage formation. *J. Biol. Chem.* 267:4171-4176.
- Kinders, R., T. Jones, R. Root, C. Bruce, H. Murchison, M. Corey, L. Williams, D. Enfield, and G. M. Hass. 1998. Complement factor H or a related protein is a marker for transitional cell cancer of the bladder. *Clin. Cancer Res.* 4:2511-2520.
- Kinoshita, T., Y. Takata, H. Kozono, J. Takeda, K. S. Hong, and K. Inoue. 1988. C5 convertase of the alternative complement pathway: covalent linkage between two C3b molecules within the trimolecular complex enzyme. *J. Immunol.* 141:3895-3901.
- Kirwan, J. R. 1995. The effect of glucocorticoids on joint destruction in rheumatoid arthritis. The arthritis and rheumatism council low-dose glucocorticoid study group. *N. Engl. J. Med.* 24:181-97
- Köhler, W. 1994. Historische Entwicklung der Medizinischen Mikrobiologie. In: Brandis, H., H. J. Eggers, W. Köhler, G. Pulverer (ed.). *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 7. Aufl., Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York 1994.

- Koistinen, V., T. S. Jokiranta, J. Hellwage, P. F. Zipfel, and S. Meri. 1998. Functional analysis of recombinant fragments of factor H on surface-bound and fluid phase C3b. *Mol. Immunol.* 35:360 (Abstract).
- Kotarsky, H., J. Hellwage, E. Johnsson, C. Skerka, H. G. Svensson, G. Lindahl, U. Sjöbring, and P. F. Zipfel. 1998. Identification of a domain in human factor H and factor H-like protein-1 required for the interaction with streptococcal M proteins. *J. Immunol.* 160:3349-3354.
- Kristensen, T. and B. F. Tack. 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.
- Kühn, S. and P. F. Zipfel. 1995. The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins. *Gene* 162:225-229.
- Kühn, S. and P. F. Zipfel. 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.
- Kühn, S., C. Skerka, and P. F. Zipfel. 1995. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J. Immunol.* 155:5663-5670.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10:203-209.
- Lachmann, P. J. 1991. The control of homologous lysis. *Immunol. Today* 12:312-315.
- Lappin, D. F., D. Guc, A. Hill, T. McShane, and K. Whaley. 1992. Effect of interferon-gamma on complement gene expression in different cell types. *Biochem. J.* 281:437-42.
- Lappin, D. F. and K. Whaley. 1990. Interferon-induced transcriptional and post-transcriptional modulation of factor H and C4 binding-protein synthesis in human monocytes. *Biochem. J.* 271:767-772.
- Law, S. K. 1988. C3 receptors on macrophages. *J. Cell. Sci. Suppl.* 9:67-97.
- Law, S. K., and A. W. Dodds. 1997. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* 6:263-74.
- Law, S. K., and R. P. Levine. 1977. Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:2701-5.
- Law, S. K., N. A. Lichtenberg, and R. P. Levine. 1979. Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. *J. Immunol.* 123:1388-94.
- Legoedec, J., P. Gasque, J. F. Jeanne, and M. Fontaine. 1995. Expression of the complement alternative pathway by human myoblasts in vitro: biosynthesis of C3, factor B, factor H and factor I. *Eur. J. Immunol.* 25:3460-3466.
- Lemercier, C., N. Julien, M. Couplier, H. Dauchel, D. Ozanne, M. Fontaine, and J. Ripoche. 1992. Differential modulation by glucocorticoids of alternative complement protein secretion in cells of the monocyte/macrophage lineage. *Eur. J. Immunol.* 22:909-15.
- Liszewski, M. K. and J. P. Atkinson. 1991. The role of complement in autoimmunity. *Immunol. Ser.* 54:13-37:13-37.
- Lu, J. H., S. Thiel, H. Wiedemann, R. Timpl, and K. B. Reid. 1990. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J. Immunol.* 144:2287-2294.
- Mäenpää, A., S. Junnikkala, J. Hakulinen, T. Timonen, and S. Meri. 1996. Expression of complement membrane regulators membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59) in human malignant gliomas. *Am. J. Pathol.* 148:1139-1152.
- Male, D. A., R. J. Ormsby, S. Ranganathan, E. Giannakis, and D. L. Gordon. 2000. Complement factor H: sequence analysis of 221 kb of human genomic DNA containing the entire fH, fHR-1 and fHR-3 genes. *Mol. Immunol.* 37:41-52.
- Malhotra, V., and R. B. Sim. 1985. Expression of complement factor H on the surface of the human monocytic cell line U937. *Eur. J. Immunol.* 15:935.
- Malhotra, R., M. Ward, R. B. Sim, and M. I. Bird. 1999. Identification of human complement Factor H as a ligand for L-selectin. *Biochem. J.* 341:61-69.
- Matsumoto, M., J. Takeda, N. Inoue, T. Hara, M. Hatanaka, K. Takahashi, S. Nagasawa, H. Akedo, and T. Seya. 1997. A novel protein that participates in nonself discrimination of malignant cells by homologous complement. *Nat. Med.* 3:1266-1270.
- Matsushita, M. and T. Fujita. 1992. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.* 176:1497-1502.
- Meri, S. and M. K. Pangburn. 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.

- Meri, S. and M. K. Pangburn. 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.
- Meri, S., B. P. Morgan, M. Wing, J. Jones, A. Davies, E. Podack, and P. J. Lachmann. 1990. Human protectin (CD59), an 18-20-kD homologous complement restriction factor, does not restrict perforin-mediated lysis. *J. Exp. Med.* 172:367-370.
- Mevorach, D., J. O. Mascarenhas, D. Gershov, and K. B. Elkon. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J. Exp. Med.* 188:2313-2320.
- Minta, J. O. 1988. Regulation of complement factor H synthesis in U-937 cells by phorbol myristate acetate, lipopolysaccharide, and IL-1. *J. Immunol.* 141:1630-5.
- Misasi, R., H. P. Huemer, W. Schwaeble, E. Solder, C. Larcher, and M. P. Dierich. 1989. Human complement factor H: an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. *Eur. J. Immunol.* 19:1765-1768.
- Mold, C., M. Kingzette, and H. Gewurz. 1984. C-reactive protein inhibits pneumococcal activation of the alternative pathway by increasing the interaction between factor H and C3b. *J. Immunol.* 133:882-885.
- Mollnes, T. E. and P. J. Lachmann. 1988. Regulation of complement. *Scand. J. Immunol.* 27:127-142.
- Morgan, B. P. and M. J. Walport. 1991. Complement deficiency and disease. *Immunol. Today* 12:301-306.
- Morgan, B. P., R. H. Daniels, and B. D. Williams. 1988. Measurement of terminal complement complexes in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 73:473-478.
- Morris, K. M., D. P. Aden, B. B. Knowles, and H. R. Colten. 1982. Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2. *J. Clin. Invest.* 70:906-913.
- Müller-Eberhard, H. J. 1986. The membrane attack complex of complement. *Annu. Rev. Immunol.* 4:503-28.
- Müller-Eberhard, H. J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Annu. Rev. Biochem.* 57:321-47.
- Müller-Eberhard, H. J. and R. D. Schreiber. 1980. Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement. *Adv. Immunol.* 29:1-53.
- Murphy, B. F., L. Kirsbaum, I. D. Walker, and A. J. d'Apice. 1988. SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 81:1858-1864.
- Nabil, K., B. Rihn, M. C. Jaurand, J. M. Vignaud, J. Ripoche, Y. Martinet, and N. Martinet. 1997. Identification of human complement factor H as a chemotactic protein for monocytes. *Biochem. J.* 326:377-383.
- Nagar, B., R. J. Jones, R. J. Diefenbach, D. E. Isenman, and J. M. Rini. 1998. X-ray Crystal Structure of C3d: A C3 Fragment and Ligand for Complement Receptor 2. *Science* 280:1277-1281.
- Nicholson-Weller, A., J. Burge, D. T. Fearon, P. F. Weller, and K. F. Austen. 1982. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay- accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J. Immunol.* 129:184-189.
- Nicol, P. A. and P. J. Lachmann. 1973. The alternate pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF). *Immunology* 24:259-275.
- Niculescu, F., H. G. Rus, M. Retegan, and R. Vlaicu. 1992. Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 140:1039-1043.
- Niehans, G. A., D. L. Cherwitz, N. A. Staley, D. J. Knapp, and A. P. Dalmasso. 1996. Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am. J. Pathol.* 149:129-142.
- Noris, M., P. Ruggerenti, A. Perna, S. Orisio, J. Caprioli, C. Skerka, B. Vasile, P. F. Zipfel, and G. Remuzzi. 1999. Hypocomplementemia discloses genetic predisposition to hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: role of factor H abnormalities. Italian Registry of Familial and Recurrent Hemolytic Uremic Syndrome/Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10:281-293.
- O'Bryan, M. K., H. W. Baker, J. R. Saunders, L. Kirsbaum, I. D. Walker, P. Hudson, D. Y. Liu, M. D. Glew, A. J. d'Apice, and B. F. Murphy. 1990. Human seminal clusterin (SP-40,40). Isolation and characterization. *J. Clin. Invest.* 85:1477-1486.
- Ollert, M. W., K. David, R. Bredehorst, and C. W. Vogel. 1995. Classical complement pathway activation on nucleated cells. Role of factor H in the control of deposited C3b. *Journal of Immunology* 155:4955-4962.
- Pangburn, M. K. and H. J. Müller-Eberhard. 1978. Complement C3 convertase: cell surface restriction of beta1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75:2416-2420.
- Pangburn, M. K. and H. J. Müller-Eberhard. 1983. Kinetic and thermodynamic analysis of the control of C3b by the complement regulatory proteins factors H and I. *Biochemistry* 22:178-185.

- Pangburn, M. K. and H. J. Müller-Eberhard. 1986. The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem. J.* 235:723-730.
- Pangburn, M. K., M. A. Atkinson, and S. Meri. 1991. Localization of the heparin-binding site on complement factor H. *J. Biol. Chem.* 266:16847-16853.
- Pangburn, M. K., R. D. Schreiber, and H. J. Müller-Eberhard. 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.
- Pangburn, M. K., R. D. Schreiber, and H. J. Müller-Eberhard. 1981. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J. Exp. Med.* 154:856-867.
- Park, C. T. and S. D. Wright. 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.
- Pincus, T. and L. F. Callahan. 1993. The 'side effects' of rheumatoid arthritis: joint destruction, disability and early mortality. *Br. J. Rheumatol.* 32 Suppl 1:28-37:28-37.
- Pluschke, G., J. Mayden, M. Achtman, and R. P. Levine. 1983. Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect. Immun.* 42:907-913.
- Podack, E. R. and J. Tschopp. 1982. Polymerization of the ninth component of complement (C9): formation of poly(C9) with a tubular ultrastructure resembling the membrane attack complex of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:574-578.
- Proding, W. M., J. Hellwege, M. Spruth, M. P. Dierich, and P. F. Zipfel. 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.* 331:41-47.
- Ram, S., D. P. McQuillen, S. Gulati, C. Elkins, M. K. Pangburn, and P. A. Rice. 1998a. Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* 188:671-80.
- Ram, S., A. K. Sharma, S. D. Simpson, S. Gulati, D. P. McQuillen, M. K. Pangburn, and P. A. Rice. 1998b. A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* 187:743-752.
- Ratnoff, O. D., J. Pensky, D. Ogston, and G. B. Naff. 1969. The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and the C'1r subcomponent of the first component of complement by serum C'1 esterase inhibitor. *J. Exp. Med.* 129:315-31.
- Ripoche, J., A. J. Day, T. J. Harris, and R. B. Sim. 1988a. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem. J.* 249:593-602.
- Ripoche, J., J. A. Mitchell, A. Erdei, C. Madin, B. Moffatt, T. Mokoena, S. Gordon, and R. B. Sim. 1988b. Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *J. Exp. Med.* 168:1917-1922.
- Rodriguez de Cordoba, S., M. A. Diaz-Guillen, and D. Heine-Suner. 1999. An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. *Mol Immunol.* 36:803-8.
- Rodriguez de Cordoba, S. and P. Rubinstein. 1987. New alleles of C4-binding protein and factor H and further linkage data in the regulator of complement activation (RCA) gene cluster in man. *Immunogenetics* 25:267-268.
- Rodriguez de Cordoba, S., D. M. Lublin, P. Rubinstein, and J. P. Atkinson. 1985. Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *J. Exp. Med.* 161:1189-1195.
- Rodriguez de Cordoba, S., P. Sanchez-Corral, and J. Rey-Campos. 1991. Structure of the gene coding for the alpha polypeptide chain of the human complement component C4b-binding protein. *J. Exp. Med.* 173:1073-1082.
- Ruddy, S. and H. R. Colten. 1974. Rheumatoid arthritis. Biosynthesis of complement proteins by synovial tissues. *N. Engl. J. Med.* 290:1284-1288.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
- Scharfstein, J., A. Ferreira, I. Gigli, and V. Nussenzweig. 1978. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J. Exp. Med.* 148:207-222.
- Schmidt, B. Z., N. L. Fowler, T. Hidvegi, D. H. Perlmutter, and H. R. Colten. 1999. Disruption of disulfide bonds is responsible for impaired secretion in human complement factor H deficiency. *J. Biol. Chem.* 274:11782-11788.
- Schwaible, W., E. Feifel, C. Estaller, A. Barbieri, M. Molgg, V. Koistinen, E. H. Weiss, and M. P. Dierich. 1991a. Human complement factor H: molecular cloning and cDNA expression reveals variability in the factor H-related mRNA species of 1.4 kb. *Immunobiology* 182:307-322.

- Schwaeble, W., H. Schwaiger, R. A. Brooimans, A. Barbieri, J. Most, M. Hirsch-Kauffmann, M. Tiefenthaler, D. F. Lappin, M. R. Daha, and K. Whaley. 1991b. Human complement factor H. Tissue specificity in the expression of three different mRNA species. *Eur. J. Biochem.* 198:399-404.
- Schwaeble, W., J. Zwirner, T. F. Schulz, R. P. Linke, M. P. Dierich, and E. H. Weiss. 1987. Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver. *Eur. J. Immunol.* 17:1485-1489.
- Seya, T., J. R. Turner, and J. P. Atkinson. 1986. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J. Exp. Med.* 163:837-855.
- Seya, T., T. Hara, M. Matsumoto, and H. Akedo. 1990. Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation. *J. Immunol.* 145:238-245.
- Sharma, A. K. and M. K. Pangburn. 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.
- Sim, R. B. and K. B. Reid. 1991. C1: molecular interactions with activating systems. *Immunol. Today* 12:307-311.
- Sim, R. B. and R. Malhotra. 1994. Interactions of carbohydrates and lectins with complement. *Biochem. Soc. Trans.* 22:106-111.
- Sim, R. B., K. Kolble, M. A. McAleer, O. Dominguez, and V. M. Dee. 1993. Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system. *Int. Rev. Immunol.* 10:65-86.
- Sim, R. B., T. M. Twose, D. S. Paterson, and E. Sim. 1981. The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem. J.* 193:115-127.
- Skerka, C., C. Timmann, R. D. Horstmann, and P. F. Zipfel. 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.
- Skerka, C., J. Hellwege, W. Weber, A. Tilkorn, F. Buck, T. Marti, E. Kampen, U. Beisiegel, and P. F. Zipfel. 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.
- Skerka, C., J. M. Moulds, P. Taillon-Miller, D. Hourcade, and P. F. Zipfel. 1995. The human factor H-related gene 2 (FHR2): structure and linkage to the coagulation factor XIIIb gene. *Immunogenetics* 42:268-274.
- Skerka, C., R. D. Horstmann, and P. F. Zipfel. 1991. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J. Biol. Chem.* 266:12015-12020.
- Skerka, C., S. Kühn, K. Günther, K. Lingelbach, and P. F. Zipfel. 1993. A novel short consensus repeat-containing molecule is related to human complement factor H. *J. Biol. Chem.* 268:2904-2908.
- Stoiber, H., A. Clivio, and M. P. Dierich. 1997. Role of complement in HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* 15:649-74:649-674.
- Stoiber, H., C. Pinter, A. G. Siccardi, A. Clivio, and M. P. Dierich. 1996. Efficient destruction of human immunodeficiency virus in human serum by inhibiting the protective action of complement factor H and decay accelerating factor (DAF, CD55). *J. Exp. Med.* 183:307-310.
- Stoiber, H., R. Schneider, J. Janatova, and M. P. Dierich. 1995. Human complement proteins C3b, C4b, factor H and properdin react with specific sites in gp120 and gp41, the envelope proteins of HIV-1. *Immunobiology* 193:98-113.
- Summers, M. D., and G. E. Smith. 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin no. 1555*.
- Tack, B. F., R. A. Harrison, J. Janatova, M. L. Thomas, and J. W. Prahl. 1980. Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:5764-5768.
- Takata, Y., T. Kinoshita, H. Kozono, J. Takeda, E. Tanaka, K. Hong, and K. Inoue. 1987. Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. *J. Exp. Med.* 165:1494-1507.
- Thiel, S., T. Vorup-Jensen, C. M. Stover, W. Schwaeble, S. B. Laursen, K. Poulsen, A. C. Willis, P. Eggleton, S. Hansen, U. Holmskov, K. B. Reid, and J. C. Jensenius. 1997. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386:506-510.
- Thomas, L., H. Leyh, M. Marberger, E. Bombardieri, P. Bassi, F. Pagano, V. Pansadoro, C. N. Sternberg, L. Boccon-Gibod, V. Ravery, D. Le Guludec, A. Meulemans, P. Conort, and L. Ishak. 1999. Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer. *Clin. Chem.* 45:472-477.
- Thompson, R. A. and P. J. Lachmann. 1970. Reactive lysis: the complement-mediated lysis of unsensitized cells. I. The characterization of the indicator factor and its identification as C7. *J. Exp. Med.* 131:629-641.
- Timmann, C., M. Leippe, and R. D. Horstmann. 1991. Two major serum components antigenically related to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no factor H-like complement regulatory functions. *J. Immunol.* 146:1265-1270.
- Turner, M. W. 1996a. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol. Today* 17:532-540.

- Turner, M. W. 1996b. The lectin pathway of complement activation. *Res. Immunol.* 147:110-115.
- van den Dobbelaars, M. E., V. Verhasselt, J. G. Kaashoek, J. J. Timmerman, W. E. Schreijers, C. L. Verweij, F. J. van der Woude, L. A. van Es, and M. R. Daha. 1994. Regulation of C3 and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma. *Clin. Exp. Immunol.* 95:173-180.
- Varsano, S., I. Frolkis, and D. Ophir. 1995. Expression and distribution of cell-membrane complement regulatory glycoproteins along the human respiratory tract. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:1087-1093.
- Vastag, M., J. Skopal, J. Kramer, k. Kolev, Z. Voko, E. Csonka, R. Machovich, and R. Nagy. 1998. Endothelial cells cultured from human brain microvessels produce complement proteins factor H, factor B, C1 inhibitor, and C4. *Immunobiology.* 199:5-13.
- Vik, D. P. 1996. Regulation of expression of the complement factor H gene in a murine liver cell line by interferon-gamma. *Scand. J. Immunol.* 44:215-222.
- Vik, D. P. and W. W. Wong. 1993. Structure of the gene for the F allele of complement receptor type 1 and sequence of the coding region unique to the S allele. *J. Immunol.* 151:6214-6224.
- Vik, D. P., J. B. Keeney, P. Munoz-Canoves, D. D. Chaplin, and B. F. Tack. 1988. Structure of the murine complement factor H gene. *J. Biol. Chem.* 263:16720-16724.
- Vik, D. P., P. Munoz-Canoves, H. Kozono, L. G. Martin, B. F. Tack, and D. D. Chaplin. 1990. Identification and sequence analysis of four complement factor H-related transcripts in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 265:3193-3201.
- Vogt, B. A., R. J. Wyatt, B. A. Burke, S. C. Simonton, and C. E. Kashtan. 1995. Inherited factor H deficiency and collagen type III glomerulopathy. *Pediatr. Nephrol.* 9:11-15.
- Ward, H. M., N. H. Higgs, T. K. Blackmore, T. A. Sadlon, and D. L. Gordon. 1997. Cloning and analysis of the human complement factor H gene promoter. *Immunol. Cell Biol.* 75:508-510.
- Warwicker, P., T. H. Goodship, R. L. Donne, Y. Pirson, A. Nicholls, R. M. Ward, P. Turnpenny, and J. A. Goodship. 1998. Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 53:836-844.
- Weiler, J. M., M. R. Daha, K. F. Austen, and D. T. Fearon. 1976. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73:3268-3272.
- Weisman, H. F., T. Bartow, M. K. Leppo, H. C. Marsh, Jr., G. R. Carson, M. F. Concino, M. P. Boyle, K. H. Roux, M. L. Weisfeldt, and D. T. Fearon. 1990. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 249:146-151.
- Wetsel, R. A. 1995. Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 7:48-53.
- Whaley, K. and S. Ruddy. 1976. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J. Exp. Med.* 144:1147-1163.
- Williams, S. A. and D. P. Vik. 1997. Characterization of the 5' flanking region of the human complement factor H gene. *Scand. J. Immunol.* 45:7-15.
- Wuillemin, W. A., M. Minnema, J. C. Meijers, D. Roem, A. J. Eerenberg, J. H. Nuijens, H. ten Cate, and C. E. Hack. 1995. Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring XIa-protease inhibitor complexes: major role for C1-inhibitor. *Blood* 85:1517-26.
- Yamakawa, M., K. Yamada, T. Tsuge, H. Ohrai, T. Ogata, M. Dobashi, and Y. Imai. 1994. Protection of thyroid cancer cells by complement-regulatory factors. *Cancer* 73:2808-2817.
- Yu, C. Y. 1991. The complete exon-intron structure of a human complement component C4A gene. DNA sequences, polymorphism, and linkage to the 21-hydroxylase gene. *J. Immunol.* 146:1057-1066.
- Zalman, L. S., L. M. Wood, and H. J. Muller-Eberhard. 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.
- Ziff, M. 1990. Rheumatoid arthritis--its present and future. *J. Rheumatol.* 17:127-133.
- Zipfel, P. F. and C. Skerka. 1994. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol. Today* 15:121-126.
- Zipfel, P. F. and C. Skerka. 1999. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell- adhesive function. *Immunol. Today* 20:135-140.

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter F. Zipfel für die Betreuung meiner Promotion danken und für die fundierte Ausbildung im wissenschaftlichen Arbeiten. Die stets freundschaftliche Zuwendung und das rege Interesse an meiner Arbeit wird mir besonders positiv im Gedächtnis bleiben. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Fleischer für die Übernahme meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Seppo Meri, T. Sakari Jokiranta und Sami Junnikkala danke ich für die hervorragende Unterstützung, freundliche Aufnahme und wissenschaftliche Kooperation während meines Aufenthalts am Haartman Institut der Universität Helsinki.

Den gleichen Dank möchte ich Herrn Dr. Hermann Eibel und Prof. Dr. Hans H. Peter von der Arbeitsgruppe für experimentelle Rheumatologie der Universität Freiburg entgegenbringen, die mir in kurzer Zeit in einer sehr freundlichen Atmosphäre die wesentlichen Methoden der Immunhistochemie beibringen konnten. Zudem danke ich der Arbeitsgruppe für die kooperative Zusammenarbeit und die Möglichkeit des Probenaustausches.

Im Besonderen gebührt mein Dank der Arbeitsgruppe für Biomolekulare Medizin des Bernhard-Nocht-Instituts für die wunderbaren Arbeitsbedingungen. Jens Hellwage, Eva Kampen, Alexandra Bialonski, Eva Decker und Claudia Kemper möchte ich für die Geduld danken, die mir bei der Unterweisung in Arbeitstechniken entgegengebracht wurde und Frau Priv.-Doz. Christine Skerka, Tobias Wolk, Guido Hegasy, Tamara Manuelian und Sylvain Djoha für die gute Stimmung und Arbeitsatmosphäre.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes möchte ich für die konstante finanzielle und ideelle Unterstützung danken. Dem DAAD danke ich für die Bewilligung des Austauschprogrammes mit der Arbeitsgruppe aus Helsinki.

Ich danke meinen Eltern Jörn und Ursula und meiner Schwester Anja für ihre Unterstützung, Liebe und Ausdauer. Wiebke möchte ich für ihre Liebe und ihre Geduld danken.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Geburtsdatum/-ort: 21. Oktober 1973, Hamburg

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980 - 1984 Grundschole Hamburg-Duvenstedt

1984 - 1993 Gymnasium Hamburg-Ohlstedt

Sept. 1990 - März 1991 als Austauschschüler in Seattle, Washington State, USA

Mai 1993 Abitur

Wehr-/Ersatzdienst:

Aug. 1993 - Okt. 1994 Zivildienst in der Klinik Poppenbüttel in Hamburg

Hochschulbildung:

seit Okt. 1994 Studium der Medizin in Hamburg

Okt. 1994 – Aug. 1996 Studium der Philosophie in Hamburg

Aug. 1996 Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)

Aug. 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

Okt. 1997 Erster Abschnitt des amerikanischen Staatsexamens (USMLE Step 1) (91%)

März 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

April 2000 Zweiter Abschnitt des amerikanischen Staatsexamens (USMLE Step 2) (86%)

Famulaturen:

März 1996 Innere Abteilung des Israelitischen Krankenhauses in Hamburg (Prof. Dr. P. Layer)

Sept. 1997 Pathologie des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Barmbek (Prof. Dr. W.W. Höpker)

Sept.1998 - Okt. 1998 Allgemeinohirurgie und Tropenmedizin am Udaipur Hospital in

Udaipur, Indien (Prof. Dr. A.K. Pendse)

Feb. 1999 – März 1999 Neurologie/Neurochirurgie am Western General Hospital,
University of Edinburgh, Großbritannien (Prof. Dr. C. P. Warlow)

Praktisches Jahr

April 2000 - Aug. 2000 Chirurgie am Allgemeinen Krankenhaus St.Georg in Hamburg
(Prof. Dr. Ch. Eggers)

Aug. 2000- Okt. 2000 Innere Medizin am Allgemeinen Krankenhaus St.Georg in
Hamburg (Prof. Dr. K.H. Kuck)

Okt. 2000 -Dez. 2000 Innere Medizin am Nuffield Department of Medicine,
University of Oxford

Dez. 2000 - April 2001 Neurologie am Institute of Neurology, Queen Square, London

Wissenschaftliche Ausbildung:

März 1997 Molekularbiologisches Praktikum am Institut für Zellbiologie und
klinische Neurobiologie der Universität Hamburg
(Prof. Dr. D. Richter)

Nov. 1997 – Okt. 2000 Promotion am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in
Hamburg bei Prof. Dr. P.F. Zipfel

Aug. 1998 wissenschaftlicher Forschungsaufenthalt am Haartman-Institut für
Mikrobiologie und Immunologie, Universität Helsinki, Finnland
(Prof. Dr. S. Meri)

April 1999 Symposium für „*Complement and Chronic Infectious Disease*“ EU-
Biomed-2 complement program (BMH4-CT96-1005) in Paris

Aug. 1999 wissenschaftlicher Forschungsaufenthalt in der klinischen
Forschergruppe für Rheumatologie, Universität Freiburg
(Dr. H. Eibel)

Stipendien:

seit Nov. 1997 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

Sonstige Kenntnisse und Hobbys:

Sprachen: Englisch, Latein

Hobbys: Rudern, Literatur, Philosophie, klassische Musik

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 und 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.

PUBLIKATIONEN

Diese Arbeit basiert auf folgenden Originalartikeln:

- I. Peter F. Zipfel, Jens Hellwage, **Manuel A. Frieese**, Guido Hegasy, T. Sakari Jokiranta & Seppo Meri. Factor H and disease: A complement regulator affects vital body functions. *Mol. Immunol.* 1999, 36: 241-248
- II. **Manuel A. Frieese**, Jens Hellwage, T. Sakari Jokiranta, Seppo Meri, Hans H. Peter, Hermann Eibel & Peter F. Zipfel. FHL-1/reconectin and factor H: two human complement regulators which are encoded by the same gene are differently expressed and regulated. *Mol. Immunol.* 1999, 36: 809-818
- III. Sami Junnikkala, T. Sakari Jokiranta, **Manuel A. Frieese**, Hanna Jarva, Peter F. Zipfel & Seppo Meri. 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.* 2000, 164: 6075-6081
- IV. **Manuel A. Frieese**, Jens Hellwage, T. Sakari Jokiranta, Seppo Meri, Hans J. Müller-Quernheim, Hans H. Peter, Hermann Eibel & Peter F. Zipfel. Different regulation of factor H and FHL-1/reconectin by inflammatory mediators and in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 2000, 121:406-416.
- V. **Manuel A. Frieese**, Jens Hellwage, Christine Skerka und Peter F. Zipfel. Komplement, ein Effektorsystem der angeborenen Immunität: Regulation durch Reconectin/FHL-1 und Faktor H. *Biospectrum* 2000, 5:21-26.
- VI. T. Sakari Jokiranta, Jens Hellwage, **Manuel A. Frieese**, Tobias U. Wolk, Peter F. Zipfel & Seppo Meri. Identification of C3d and heparin binding sites on SCR20 domain of complement factor H. *Manuskript eingereicht.*
- VII. **Manuel A. Frieese**, Tamara Manuelian, Sami Junnikkala, Jens Hellwage, T. Sakari Jokiranta, Seppo Meri, Hans H. Peter, David L. Gordon, Hermann Eibel, and Peter F. Zipfel. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis resist complement-mediated cytotoxicity due to increased secretion and binding of FHL-1/reconectin and factor H. *Manuscript eingereicht.*

Datenbankeneinträge

T. Sakari Jokiranta, Jens Hellwage, **Manuel Frieese**, Tobias Wolk, Peter F. Zipfel, and Seppo Meri, 1999. 1FHC: complement factor H domains SCR19-20. Sequence deposited in the Brookhaven Protein database (Pdb.pdb.bnl.gov at <http://www.rcsb.org/pdb/>). The Protein Data Bank is operated by the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) under a contract to the U.S. National Science Foundation.