

**Komplement Faktor H:
Die funktionelle Bedeutung des C-Terminus für die
regulatorischen Eigenschaften des Proteins und der
Einfluß von Faktor H Mutationen in der Pathogenese des
atypischen Hämolytisch-Urämischen Syndroms (HUS)**

Vorgelegt

von

Tamara Manuelian
aus München

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
Im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Hamburg, 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. P. ZIPFEL

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. BRETTING

Tag der Disputation: 06. Dezember 2002

Hamburg, den 22. Oktober 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'U. Wienand', written in a cursive style.

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen..... I

Zusammenfassung..... VI

1. Einleitung

1.1 Überblick.....S. 1

1.2 Komplement: Initiation und Aktivierung.....S. 5

1.2.1 Klassischer WegS. 5

1.2.2 Lektin-Weg.....S. 6

1.2.3 Alternativer WegS. 7

1.3 Komplement: Termination.....S. 8

1.4 Regulation.....S. 10

1.4.1 C1-Inhibitor, C4-Binding Protein und Faktor I vermittelte Inaktivierung des C4b.....S. 11

1.4.2 Drehscheibe C3: Faktor I vermittelte Inaktivierung und Zerfall der C3 Konvertasen.....S. 12

1.4.3 Regulation des Terminalen Weges.....S. 14

1.5 Faktor H Proteinfamilie.....S. 15

1.5.1 Faktor HS. 15

1.5.2 FHL-1.....S. 16

1.5.3 Die Faktor H verwandten Proteine 1-5S. 16

1.6 Komplement und Krankheit.....S. 18

1.6.1 Komplement und Infektion: Strategien der Immunevasion.....S. 18

1.6.2 Genetisch bedingte Komplementerkrankungen.....S. 19

1.6.3 Serumproteine des Klassischen und des Lektin Weges.....S. 19

1.6.4 Serumproteine des Alternativen Weges.....S. 20

1.6.5 Proteine des Terminalen Weges.....S. 21

1.6.6 Zelluläre C Regulatoren und Rezeptoren.....S. 21

1.6.7 Hämolytisch Urämisches Syndrom und Faktor H.....S.22

1.7 Zielsetzung.....S. 24

2.	Material und Methoden	
2.1	Material.....	S. 25
2.2	Methoden.....	S. 27
2.2.1	Zellbiologische Arbeiten.....	S. 27
2.2.2	Molekularbiologische Standardmethoden.....	S. 27
2.2.3	Klonierung der Faktor H HUS-Mutanten.....	S. 29
2.2.4	BaculoSystem zur Expression rekombinanter Proteine in der Insektenzellkultur.....	S. 30
2.2.4	Proteinchemische Standardmethoden.....	S. 30
2.2.5	Funktionelle Studien.....	S. 32
3.	Ergebnisse	
3.1	Charakterisierung monoklonaler Antikörper.....	S. 37
3.1.1	Reaktivität mit humanem Serum.....	S. 37
3.2.1	Identifizierung der Faktor H Bindungsstelle: Gruppen.....	S. 38
3.1.3	Epitopanalyse der Gruppe III Antikörper.....	S. 42
3.2	Untersuchungen des Faktor H im Serum von Patienten mit Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS):HUS Register.....	S. 43
3.2.1	Identifizierung von Faktor H Mutationen.....	S. 43
3.2.2	Patient N 11: Die differentielle Reaktivität der mAK identifiziert einen Faktor H Defekt im C-terminalen SCR 20 des Patienten Proteinsden abnormalen Faktor H Phänotyp.....	S. 44
3.2.3	Patient N 1 und N 20: Ein Defekt in SCR 19 führt zu einer Faktor H Doppelbande im Serum des Patienten N 20.....	S. 45
3.3	Untersuchungen einer abnormalen Faktor H Isoform im Serum des Patienten F106.....	S. 46
3.3.1	Detektion eines ungewöhnlichen Faktor H Bandenmusters im Serum von Patient F106	S. 47
3.3.2	Charakterisierung der 175 kDa Faktor H Isoform.....	S. 47
3.3.3	Heparinchromatographie mit Serum des Patienten F106.....	S. 49
3.4.	Funktionelle Untersuchungen des C-Terminus mithilfe der mAK.....	S. 50
3.4.1	Die Faktor H Bindung an C3b wird durch die mAK E14 und C18 blockiert.....	S. 50
3.4.2	Die Faktor H Bindung an Heparin wird durch die mAK E14 und C18 blockiert.....	S. 51
3.5.	Funktionelle Untersuchungen HUS assoziierter Faktor H Mutationen.....	S.52
3.5.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Faktor H Proteine mit den Mutationen R1210C und R1215G.....	S. 52
3.5.2	Die Bindung der rekombinanten, mutierten Faktor H Fragmente an das C3d Molekül ist reduziert	S. 52
3.5.3	Die Bindung der rekombinanten, mutierten Faktor H Fragmente an Heparin ist reduziert.....	S. 53
3.5.4	Die Bindung der rekombinanten, mutierten Faktor H Proteine an Endothelzellen ist reduziert: Immunfluoreszenz und FACS-Analysen.....	S. 55

4. Diskussion

4.1	Ein Faktor H Assoziiertes HUS ist in einer Untergruppe der Patienten festzustellen.....	S. 58
4.2	Die hochmolekulare Faktor H Isoform im Serum des Patienten F106 repräsentiert den Phänotyp der Substitution R1210C in SCR 20.....	S.62
4.3	Die Interaktion des Faktor H Proteins mit dem C3 Molekül ist abhängig von der Integrität der C-terminalen Faktor H Domäne SCR 20.....	S. 63
4.4	Die Interaktion des Faktor H Proteins mit Heparin ist abhängig von der Integrität der C-terminalen Faktor H Domäne SCR 20.....	S. 64
4.5	Thrombotische Mikroangiopathie.....	S. 67
4.6	Implikationen für eine physiologische Bedeutung der Faktor H Mutationen in der Pathenogese des HUS.....	S. 69
	Literatur	S. 71
	Anhang	

Abkürzungen

Die physikalischen und chemischen Einheiten sind im SI-Standard angegeben. Die Bezeichnung einzelner Aminosäuren erfolgt im Ein-Buchstaben-Code. Es werden Standard Abkürzungen für Chemikalien und ihre Verbindungen benutzt.

Abb	Abbildungen
Ag	Antigen
mAK	monoklonaler Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagles Medium
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HUS	Hämolytisch Urämisches Syndrom
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulphat
	Polyacrylamid-Gelelectrophorese
TMA	Thrombotische Mikroangiopathie
TTP	Thrombotisch Thrombozytische Mikroangiopathie
dNTP	desoxy-Nukleotid-Tri-Phosphat

Liste der Eigennamen und Abkürzungen die aus dem Englischen übersetzt oder übernommen wurden:

AW	Alternativer Weg (engl.: alternative Pathway)
C	Complement
KW	Klassischer Weg (engl.: classical Pathway)
CR	Complement Receptor
CD	Cluster of differentiation
DAF	Decay-Accelerating-Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FH	Factor H
FHR	Factor H related
FHL-1	Factor H Like proteine-1
HUVEC	Human Umbilical Cord Vene Endothelial Cells
MAC	engl.: Membrane attack complex steht für den terminalen Angriffskomplex

MBL	M annan- B indendes- L ektin (engl.: M annan- B inding- L ectin)
MCP	M embrane- C ofactor- P rotein
SCR	S hort C onsensus R epet
SSCP	engl.: S ingle S trand C onformational P olymorphism steht für die native PAGE von einzelsträngiger DNA
RCA	R egulators of C omplement A ctivation
TW	T erminaler W eg (engl.: Terminal Pathway)

Zusammenfassung

Das Komplementsystem bildet als essentieller Teil der angeborenen Immunität des Menschen eine effektive Abwehr gegenüber eingedrungenen Mikroorganismen, humanpathogenen Pilzen oder Parasiten. Die Komplementkaskade wird über drei Wege, den klassischen, den Lektin- oder den alternativen Weg aktiviert und resultiert in der Markierung, Phagozytose oder Lyse der Fremdzellen. Die Wirkung der Komplementkaskade in der Immunabwehr ist äußerst effektiv und wird auf körpereigenen Zellen streng reguliert. So stehen den etwa 40 Effektorproteinen des Komplementsystems eine Vielzahl negativ regulatorischer Proteine gegenüber, um eine ungerichtete und ungewollte Schädigung körpereigener Zellen oder des benachbarten Gewebes (Bystander-Lyse) zu verhindern. Inhibitorisch wirksame Mechanismen greifen an unterschiedlichen Stellen in den Verlauf der Kaskade ein. Den Schwerpunkt bildet jedoch die Regulation auf Ebene der zentralen Komplementkomponente C3 und der enzymatisch aktiven Derivate, den C3 und C5 Konvertasen. Hier treffen alle drei Aktivierungswege zusammen und münden, wenn ungehindert, in den terminalen, lytischen Weg der Komplementkaskade. Die Regulation auf Ebene des C3 Moleküls erfolgt durch inhibitorische Proteine die sich entweder membrangebunden auf autologen Zellen befinden oder im Serum gelöst sind. Im alternativen Weg der Komplementaktivierung fällt dem Serumprotein Faktor H eine wichtige inhibitorische Bedeutung zu. Faktor H ist das am besten charakterisierte Mitglied der Faktor H Proteinfamilie, zu der neben dem Faktor H ähnlichen Protein (FHL-1) weitere fünf Faktor H verwandte Proteine zählen.

Komplement-regulatorische Funktionen sind bisher für Faktor H und das FHL-1 Protein bekannt. Beide Proteine agieren als Kofaktor in der Faktor I vermittelten Inaktivierung von C3b und fördern die Destabilisierung des C3 Konvertasekomplexes C3bBb. Diese Funktionen werden über die vier N-terminalen Domänen der nativen Proteine ausgeübt. Eine besondere Eigenschaft des Faktor H ist, dass es mit dem Protein Faktor B um die Bindung an das membrangebundene, aktivierte C3b Molekül konkurriert. Diese spezielle Funktion des Faktor H Proteins verhindert die Ausbildung der initialen C3 Konvertase des alternativen Weges und die Amplifizierung der Kaskade.

Das Faktor H Protein übt die regulatorischen Funktionen aufgrund seiner Eigenschaft aus, direkt an das C3b Molekül zu binden und Glykosaminoglykane, die sich auf den Membranen autologer Zellen befinden und Bestandteile des extrazellulären Kompartimentes sind, zu erkennen. Beide Interaktionen werden über verschiedene funktionelle Domänen, die sich in N-terminalen, zentralen und C-terminalen Regionen innerhalb des Faktor H Moleküls befinden, vermittelt.

In der vorliegenden Doktorarbeit gelang erstmals der experimentelle Nachweis für die besondere Bedeutung des C-Terminus des Faktor H Proteins für diese interaktiven Eigenschaften und die funktionelle Relevanz von krankheits-assoziierten Faktor H Mutationen in dieser Molekülregion.

Die funktionellen Analysen zur C3b- und Heparin-Bindung umfassten Studien an dem intakten Faktor H Molekül, an humanem Serum als auch an rekombinant exprimierten Faktor H Fragmenten, die sich vom Wildtyp-Fragment durch einen einzelnen Austausch in einer C-terminalen Aminosäure unterschieden. In Immunfluoreszenz und FACS Analysen wurde die Bindung dieser Faktor H Fragmente an die Oberfläche humaner Endothelzellen zusätzlich untersucht. Die Proteine mit der zugrundeliegenden Punktmutationen wurden mittels site-directed Mutagenese-Technik generiert und in Insektenzellen mithilfe des Baculo-Systems rekombinant exprimiert. Die beiden Mutationen, die zu den Aminosäure-Substitutionen R1210C und R1215G im C-Terminus des Faktor H führen, sind in Patienten die an der atypischen Form des Hämolytisch Urämischen Syndroms leiden, beschrieben. Eine Assoziation von Faktor H Defekten mit dem Syndrom wurde durch die eigenen Western Blot Analysen an Patientenserum bestätigt.

Die Basis der genannten Untersuchungen bildete eine Charakterisierung der Faktor H Bindung von insgesamt elf monoklonalen Antikörpern. In Dot Blot und Western Blot Analysen wurden die individuellen Bindungsstellen der Antikörper innerhalb des Faktor H Moleküls identifiziert, um auf diesem Wege nützliche Werkzeuge für die funktionellen Studien und die Serumanalysen zu erhalten.

Die Ergebnisse dieser funktionellen Studien zeigen, dass die Bindungen des Faktor H Moleküls an das C3b Molekül und an das polyanionische Heparin über den C-Terminus des Moleküls vermittelt werden und ein einzelner Aminosäureaustausch in dieser Domäne zum Verlust der Faktor H Funktion führen kann. Dies ermöglicht einen ersten Einblick in die biologische Relevanz der Faktor H Mutationen für die Pathogenese des Haemolytisch Urämischen Syndroms.

1. Einleitung

1.1 Überblick

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität des Menschen, und übernimmt eine Schlüsselrolle in der frühen Immunabwehr gegen bakterielle Mikroorganismen, Viren, humanpathogene Pilze oder auch parasitäre Invertebraten. Durch das Komplementsystem werden eingedrungene Pathogene oder veränderte, körpereigene Zellen unschädlich gemacht, indem sowohl eine zytotoxische Aktivität über den terminalen Angriffskomplex (im Englischen: **Membrane Attack Complex, MAC**) ausgeübt wird, als auch phagozytäre Immunzellen rekrutiert und aktiviert werden. Im menschlichen Organismus übernehmen Komponenten des Komplementsystems eine wichtige Rolle in der Erkennung, Prozessierung, Größenregulierung und Beseitigung von Immunkomplexen (im Englischen: Clearance), der Markierung (Opsonisierung) und Beseitigung von zellulärem Debris oder seneszenten Erythrozyten ein. Einige Produkte (Anaphylatoxine), die durch proteolytische Spaltprozesse in der Komplementkaskade entstehen, wirken chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems und übernehmen eine vermittelnde Rolle zwischen dem Komplementsystem und der zellulären Immunantwort. Zudem wirkt das Komplementsystem immunregulatorisch sowohl auf die Antigen Prozessierung und Präsentation als auch auf die Induktion der primären und sekundären humoralen Immunantwort ein.

Aktivierung und Verlauf der Komplementkaskade werden durch das enge Zusammenspiel von mehr als 40 serumlöslichen und membrangebundenen Proteinen bestimmt. Im allgemeinen wird ein inaktives Vorläufermolekül meist enzymatisch vermittelt in den aktiven Zustand versetzt, um wiederum selbst z.B. als Serin-Protease zu fungieren und zahlreiche Zielmoleküle zu aktivieren. Dies macht die Komplementkaskade zu einem überaus effektiven und potenten System und begründet die Vielfalt der negativ regulatorischen Mechanismen. Den Effektorproteinen stehen eine Vielzahl von inhibitorischen Proteinen gegenüber, die an unterschiedlichen Ebenen der Kaskade eingreifen können.

Die Nomenklatur der einzelnen Effektorproteine als z.B. C1-C9 ist historisch bedingt, wobei die Nummerierung nicht unbedingt dem zeitlichen Auftreten in der Kaskade entspricht. Auf viele membrangebundene Komplementproteine wird entsprechend ihrer Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern die Cluster of **D**ifferentiation (CD) Nomenklatur angewendet. Diese Nomenklatur wird in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den gebräuchlichsten Trivialnamen berücksichtigt. Im allgemeinen wird die aktivierte Form der Komplementproteine mit einem Suffix gekennzeichnet, z.B. C1q*. Die meisten Komplementproteine setzen sich aus multiplen Domänen zusammen und sind in der Lage Komplexe aus homo- und heteromeren Aggregaten zu bilden. Einige Proteine des Komplementsystems werden aufgrund ihrer genetischen, strukturellen und funktionellen Eigenschaften in insgesamt 5 Proteinfamilien zusammengefasst (Tabelle 1.1). So bilden die regulatorisch wirksamen Proteine „C4 **B**inding Protein“ (C4bp), „Decay-Accelerating-Factor“ (DAF; CD 55), „Membrane Cofactor Protein“ (MCP; CD 46), Mitglieder der Faktor H Proteinfamilie, und die Komplement-Rezeptoren CR 1 (CD 35) und CR 2, die Multigen-Familie der „Regulators of Complement Activation“ (RCA). Die RCA Proteine

werden von Genen codiert, die auf dem langen Arm des Chromosom 1 (1q 32) liegen. Sie gleichen sich strukturell und bestehen größtenteils, und im Falle der Faktor H Proteine ausschließlich, aus den Cysteinreichen „Short Consensus Repeat“ (SCR) Domänen, die aus ca. 60 Aminosäuren aufgebaut sind (Zipfel *et al.*, 1999). Namensgebend für diese Familie ist ihre gemeinsame Funktion, die Regulation der Komplementaktivierung.

Tabelle 1.1: Proteinfamilien

Familie	Proteine	Strukturelemente								
		Interner Thioester	Kollagen	TS	EGF	LDL	SCR	Perforin	vWF	Protease
Serin Proteasen	C1r/C1s				+/+		+/+			+/+
	C2/Faktor B						+/+		+/+	+/+
	Faktor I					+				+
RCA Proteine	CR1/CR2						+/+			
	DAF/MCP						+/+			
	FH						+			
	C4bp						+			
Porenformende Proteine	C6			+	+	+		+		
	C7			+	+	+		+		
	C8			+	+	+		+		
	C9			+	+	+		+		
Membranbindende Proteine	C3/C4	+								
	C5									
Kollagenartige Proteine	C1q		+							
	MBL		+							

Aus dem Englischen: TS, Thrombospondin; EGF, Epidermal Growth Factor-like; LDL, Low Density Lipoprotein Receptor-like; SCR, Short Consensus Repeat; vWF, von Willebrand Factor-like; RCA, Regulators of Complement Activation; MBL, Mannan-Binding-Lectin

Die Leber, v.a. Hepatozyten, ist der Hauptbildungsort der meisten löslichen Komplementproteine. Viele Komplement-Proteine werden aber auch in anderen Zelltypen gebildet, so ist das regulatorisch wirksame Faktor H auch Bestandteil der α Granulae reifer Thrombozyten (Devine & Rosse, 1987). Auf den Membranoberflächen körpereigener (autologer) Zellen, wie z.B. Endothelzellen der Gefäßwand aber auch Zellen des Immunsystems, sind die Regulatoren DAF (CD 55), MCP (CD 46) und Protektin (CD 59) verteilt (Cole *et al.*, 1985; Kinoshita *et al.*, 1985; Davies *et al.*, 1989; Meri *et al.*, 1991). Die Integrine CR1 (CD 35, auch C3b Rezeptor), CR3 (CD 11b/CD18) und CR4 (CD 11c/CD18), und der C1q Rezeptor, der den Kolektinen zugehört, finden sich auf allen phagozytären Zellen, den Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen (Ross *et al.*, 1987; Collard *et al.*, 1999). Diese Rezeptorproteine vermitteln die phagozytäre Funktion des Komplement. Ihre Liganden sind u.a. die Komplementproteine C1q, Mannose-Bindendes-Lektin (MBL) oder das C4b Molekül und die Aktivierungsprodukte des C3, C3b und iC3b. Die Aktivierung der Rezeptoren und die Transduktion des spezifischen Effektorsignales ist abhängig vom

jeweiligen Liganden, und somit haben diese Interaktionen entsprechend vielfältige Auswirkungen auf die Zielzellen. Neben der Rolle als Vermittler in der Komplement-abhängigen Phagozytose wirkt z.B. CR 1, das von Erythrozyten exprimiert wird, als Rezeptor für Immunkomplexe und bewirkt somit die C3b-abhängige Neutralisation (im Englischen: Clearance) der Immunglobulin-Aggregate (Schifferli *et al.*, 1986). Komplement Rezeptor CR 2 wird sowohl auf T und B-Lymphozyten als auch auf follikulären dendritischen Zellen exprimiert und vermittelt zusammen mit C3 und CD 19 immunregulatorische Funktionen (Weis *et al.*, 1984; Tedder *et al.*, 1986; Carter *et al.*, 1988; Lowell *et al.*, 1989).

Bei der Aktivierung des C3, C4 und des C5 Moleküls entstehen kleine Fragmente, die als überaus wirksame Mediatoren in die Entzündungsreaktion eingreifen, indem sie chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems wirken und eine rezeptorvermittelte Zytokin-Ausschüttung in den Zielzellen induzieren (Ward *et al.*, 1966; Bokisch *et al.*, 1969; Damerau *et al.*, 1978; Warheit *et al.*, 1985). Da die Fragmente C3a, C4a und C5a Entzündungssymptome im Organismus hervorrufen, bezeichnet man die drei Moleküle als Anaphylatoxine. Die Bedeutung des C4a Moleküls als Anaphylatoxin ist allerdings umstritten. Die Anaphylatoxine bewirken eine lokal erhöhte vaskuläre Permeabilität, die Kontraktion glatter Muskelzellen, und sie fördern die Ausschüttung des inflammatorisch wirkenden Histamins und anderer Effektormoleküle in Mastzellen und Basophilen. Die stärkste Wirkung entfaltet das C5a Molekül, die Aktivität des C3a Fragmentes ist am Geringsten. Alle drei Moleküle üben ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen aus (Haribabu *et al.*, 2002). Das C5a Protein übernimmt eine überaus wichtige Rolle in der Aktivierung von phagozytären Zellen. Es induziert dort die Sekretion lysosomaler Mediatoren, wie „Platelet-Activating Factor“ (PAF) und Eicosanoide, erhöht die Expression unterschiedlicher Membranproteine und Integrine, darunter C3 Rezeptoren, es führt zur Aggregation von Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen und induziert proagulative Reaktionen (Wojta *et al.*, 2002). Desweiteren bewirkt die Interaktion des C5a Moleküls mit Monozyten und Makrophagen die Bildung und Sekretion inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1, TNF- α , und IL-6 (Mollnes *et al.*, 2002; Schraufstatter *et al.*, 2002).

Die Aktivierung des Komplement erfolgt über eine von insgesamt drei Routen, entweder über den klassischen (KW) oder den Lektin (MBL) Weg, oder nach selbstinduzierter Aktivierung des C3 über den alternativen Weg (AW). Die Aktivierungsphase mündet unabhängig von der anfänglichen Route in der Opsonisierung aktivierender Membranoberflächen mit dem C3b Molekül, der Bildung der C3 Konvertasen C4bC2a bzw. C3bBb und im weiteren Verlauf der Bildung der C5 Konvertasen C4bC3b2a bzw. C3b₂Bb. Die Aktivierung des C5 führt zur Bildung des terminalen Angriffskomplexes (MAC) aus den Komponenten C5-9, der eine durchlässige Pore in die angegriffene Membran bohrt und die Zellyse einleitet (Walport, 2001). In Abb. 1.1 sind diese Vorgänge schematisch dargestellt.

Im folgenden wird zunächst ein Überblick über die drei Wege der Komplementaktivierung und die Termination der Kaskade gegeben. Hierbei wird auf eine beschränkte Anzahl einzelner Komponenten und biochemischer Abläufe im Detail eingegangen. Die Regulation des Komplement ist entscheidend und bietet körpereigenen Zellen den notwendigen Schutz vor Verletzungen oder sogar der Komplement-vermittelten Zellyse. Aus diesem Grunde werden inhibitorische Mechanismen des Komplement in einem

späteren Abschnitt eingehend behandelt. Abschließend werden krankheitsassoziierte Störungen des Komplementsystems dargestellt, insbesondere wird hierbei auf die mögliche Assoziation von Faktor H Mutationen mit der atypischen Form des Hämolytisch Urämischen Syndroms (HUS) eingegangen.

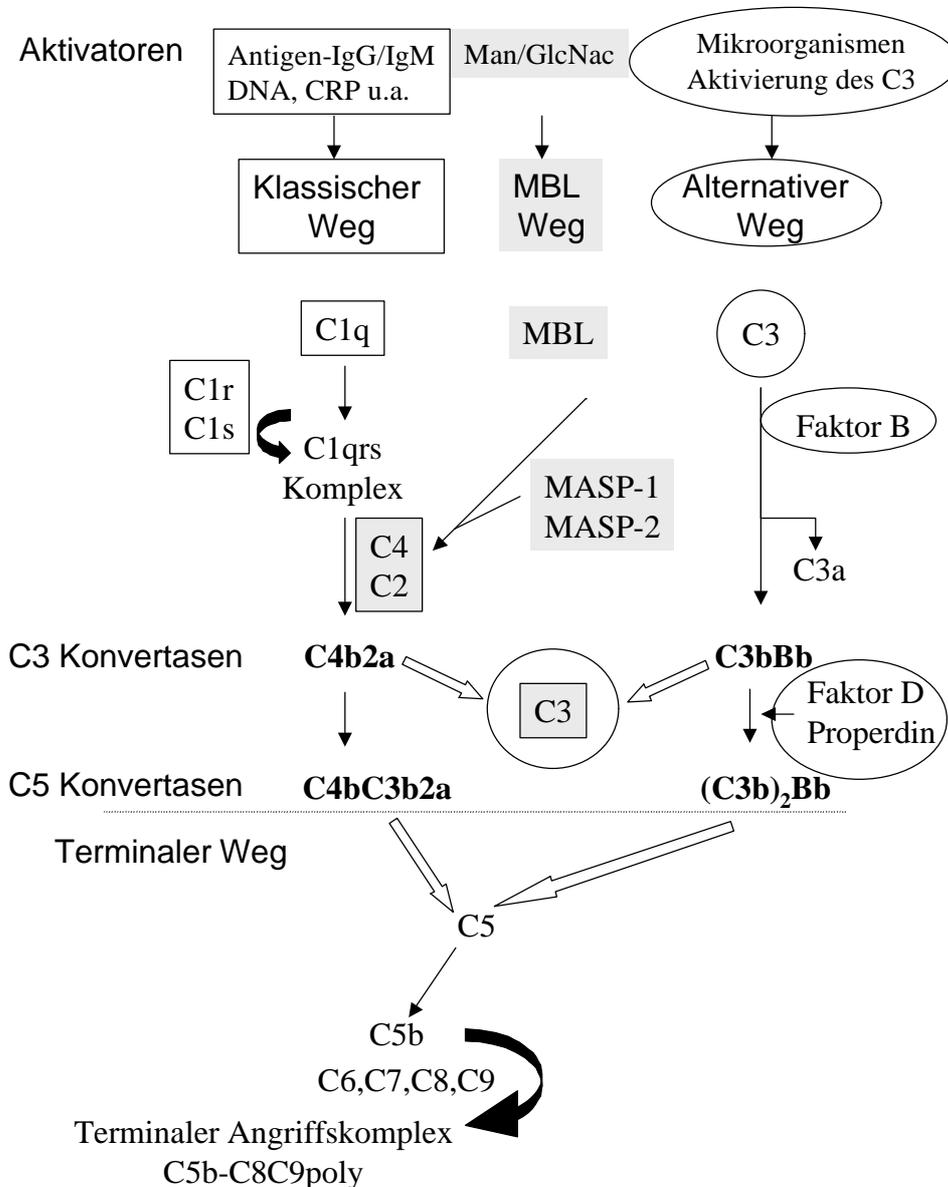


Abb 1.1 Wege der Komplementaktivierung

Die drei Wege der Komplementaktivierung sind schematisch dargestellt. Wird nach antikörperabhängiger oder –unabhängiger Aktivierung der klassische Weg initiiert, folgt auf die Bildung des C1qrs Komplexes, oder im Lektin Weg des MBL-MASP Komplexes, die Aktivierung der Proteine C4 und C2. An Aktivatoren-Oberflächen führt dies im Weiteren zur Bildung der klassischen C3 Konvertase C4bC2a. Der alternative Weg wird durch die Hydrolyse eines internen Thioesters im C3 Molekül oder durch Mikroorganismen aktiviert. Auf Aktivator-Oberflächen wird Faktor B im initialen Komplex mit C3b von der Serin Protease Faktor D gespalten, und es entsteht die alternative C3 Konvertase C3bBb. Das Properdin stabilisiert den Komplex. Mit der Bindung eines zusätzlichen C3b Moleküls entstehen die beiden C5 Konvertasen, die das C5 Molekül aktivieren können und somit den terminalen, lytischen Weg der Kaskade einleiten. Der terminale Angriffskomplex C5b-C8C9poly ist porenbildend und führt zur Lyse der angegriffenen Zelle.

1.2 Komplement: Initiation und Aktivierung

1.2.1 Klassischer Weg

Tabelle 1.2: Aktivierende Komponenten des Klassischen Weges

	Mol. Gewicht [kDa]	Anzahl der Polypeptideinheiten	Plasmakonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Genlocus	Aktivität
C1q	460	6x3	66-180	1q34.1-36.3	Bindung an Aktivatoren des KW-Initiation des KW
C1r	83	1	34-100	12p13	Serin Protease Spaltet C1s
C1s	83 ?	1	34-80	12p13	Serin Protease Spaltet C4 und C2
C2	107	1	20-25	6p21.3	Ligand für C4b
C2a	73	1	--	--	Bestandteil d. C3 Konvertase; spaltet C3
C2b	34	1	----	---	nicht bekannt
C4	205	3 (α,β,γ)	200-600	6p21.3	
C4a	8.7	1	----	---	Anaphylatoxin
C4b	196	3 (α,β,γ)	----	---	Bindet an Aktivatoroberfläche; Ligand für C2; Bestandteil d. C3 Konvertase

Die Moleküle C1q, C1r, C1s, C4, C2 und C3 fungieren als Komponenten des klassischen Weges (KW; Tabelle 1.2). Die Komplementaktivierung über diesen Weg wird durch die Bindung von C1q an Antikörper-Antigen-Komplexe (antikörper-abhängiger Weg) oder an Aktivatoren bzw. Akzeptormoleküle (antikörper-unabhängiger Weg) und einer damit verbundenen Konformationsänderung im Molekül initiiert (Clas & Loos, 1981). C1q ist ein makromolekularer Komplex aus insgesamt 6 Kopien dreier unterschiedlicher Proteinketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Um die dreidimensionale Struktur des C1q Moleküls zu beschreiben hat sich der Vergleich des Komplexes mit einem „Blumenstrauß“ bewährt. Die N-terminalen Regionen der Proteinketten sind durch das Gly-X-Y-Motiv kollagenartig strukturiert und bilden den „Stiel“, während die C-terminalen 140 Aminosäuren den „globulären Kopf“ ausmachen (Calcott & Muller-Eberhard, 1972). Der gesamte C1 Komplex besteht aus C1q, das mit einem Tetramer aus je 2 Molekülen der Proenzyme C1s und C1r assoziiert ist (Loos *et al.*, 1980). Als Liganden für C1q und somit Aktivatoren des Komplement fungieren u.a. neben anionischen Makromolekülen wie z.B. DNA, bakterielles Lipopolysaccharin, Cardiolipin oder Mucopolysaccharide, auch kollagen-bindende Proteine wie C-reaktives Protein (CRP) oder das Fibronectin der extrazellulären Matrix. Während der lokalen Entzündungsreaktion bilden sich schwer lösliche Antikörperaggregate aus, die durch Komplement wieder solubisiert werden. Die Bindung von C1q an die Fc Anteile von IgM (C μ 3, C μ 5) und IgG (C γ 2) vermittelt diese wichtige biologische Funktion von Komplement.

Wird nun der klassische Weg des Komplement gestartet, folgt auf die Konformationsänderung und Aktivierung des C1q Moleküls, und sukzessive der Fragmente C1r und C1s die proteolytische Spaltung des C4 Proteins. Man nimmt an, dass das aktivierte C1q die Konformation des C1r Proteins beeinflusst, welches die erste proteolytische Spaltung der Kaskade vermittelt (Dodds *et al.*, 1978). In diesem Prozeß wird zunächst eines der C1r Moleküle des C1-Komplexes in einen reversiblen Übergangszustand

gebracht (C1r*), in dem die enzymatische Region des C1r* nun exponiert ist. C1r* spaltet das zweite C1r Molekül und bildet mit diesem verbunden das doppelsträngige C1r₂. Der C1s Dimer des Komplexes wird über diese Serin Esterase gespalten und somit aktiviert. Das resultierende C1s* ist nun in der Lage als zweite Serin Esterase die nächste Komponente in der Kaskade, das C4 Molekül, proteolytisch zu spalten (Matsumoto *et al.*, 1989). Als Produkte entstehen hierbei zwei Fragmente, das größere C4b Molekül, das die Bindungsstelle für das C2 Protein markiert, und das kleinere C4a, das als Anaphylatoxin in die Entzündungsreaktion eingreift. Der Komplex aus C4bC2 ist selbst nicht enzymatisch aktiv, C2 wird jedoch durch C1s* gespalten, und es bildet sich die klassische C3 Konvertase C4bC2a aus. Ein reaktiver Thioester in C4b ist in diesem Molekül exponiert und bindet hierüber kovalent an die Aktivatoroberfläche (Dodds *et al.*, 1996). Die Kaskade geht weiter, indem nun ein C3 Molekül durch diese Konvertase enzymatisch gespalten wird, wobei das größere Fragment C3b an das membrangebundene C4b des C4bC2a Komplexes gebunden bleibt und die C5 Konvertase des klassischen Weges C4bC3bC2a gebildet wird (Cooper, 1975).

Den Effektorproteinen des Komplement stehen eine Vielzahl von inhibitorisch wirksamen Proteinen gegenüber. Der klassische Weg wird durch die Proteine C1-Inhibitor und C4b-Binding Protein reguliert. Zusätzlich wirken auf Ebene des C3b die Regulatoren des alternativen Weges.

1.2.2 Lektin-Weg

Tabelle 1.3: Aktivierende Komponenten des Lektin Weges

	Mol. Gewicht [kDa]	Anzahl der Polypeptideinheiten	Plasmakonzentration [µg/ml]	Genlocus	Aktivität
MBL	32 x X	multimer	0-5	10q11.2-23	Bindung an Aktivatoren des LP-Initiation des LP
MASP-1	83	1	Nicht bekannt	3q27-28	Serin Protease Spaltet C1s

Ein zweiter Weg der Komplementaktivierung wird auf Ebene des C4 Moleküls eingeleitet (Tabelle 1.3), und dies geschieht Antikörper- und C1q-unabhängig mit Hilfe eines Serumlektins, dem Mannanbindenden Protein (MBP bzw. MB Lektin). MBP ist ein multimeres Protein bestehend aus kleinen, 32 kDa schweren Untereinheiten, die kollagenartige Regionen und C-typ Lektin Einheiten aufweisen. MBL ist das bisher einzige Mitglied der Kollektine (u.a. Lungen Surfactant Proteine SP-A, SP-D), dem Komplement-aktivierende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Malhotra *et al.*, 1994a). Indem MBL an Kohlenhydratreste bakterieller, retroviraler oder mitochondrialer Membranen bindet, kann es das Komplementsystem aktivieren und dadurch seine bakteriziden und neutralisierenden Eigenschaften entfalten. Ein Komplex aus MBP und C1s-ähnlichen Serin Proteasen (**MBP-assoziierte Serin Proteasen**, MASP-1; zusätzliche Varianten MASP-2, MASP-3, 19 kDa MASP), auch Ra-reaktiver Faktor genannt, bindet an die Polysaccharidketten Ra und R2, die exponiert auf der Zelloberfläche vieler Salmonella und E. coli Stämme liegen. MBL erkennt dabei spezifisch verschiedenste Kohlenhydratreste, v.a. N-acetylmannose-Amine, N-acetyl Glucosamine und Mannose (Malhotra *et al.*, 1994b). Der MBP-MASP

Komplex, der an einer bakteriellen Zelloberfläche gebunden ist, aktiviert die Komponenten C4 und C2 auf gleiche Weise wie für C1q-C1r2-C1s2 beschrieben.

1.2.3 Alternativer Weg

Tabelle 1.4: Aktivierende Komponenten des Alternativen Weges

	Mol. Gewicht [kDa]	Anzahl der Polypeptideinheiten	Plasmakonzentration [µg/ml]	Genlocus	Aktivität
C3	185	2 (α,β)	500-1200	19p13.2-.3	
C3a	9	1	----		Anaphylatoxin
C3b	175	2 (α,β)	----		Bindung an Aktivatoroberflächen; Ligand für Faktor B (FB) und CR1; Bestandteil der C3 und C5 Konvertasen;
Faktor B	93	1	140-400	6p21.3	Bindet an C3
Ba	33	1	--	--	Keine
Bb	60	1	----	---	Bestandteil der AW C3 und C5 Konvertasen
Faktor D	24	3 (α,β,γ)	1-5	6p21.3	Spaltet FB im C3bB Komplex
P	53-200	1-4	25	Xp11.4-.23	Stabilisiert die C3 Konvertase

Der alternative Weg (AW) der Komplementaktivierung ist ein selbst-induzierter, kontinuierlich ablaufender Prozeß, der in geringer Rate spontan und dabei zufällig im menschlichen Serum abläuft (Nicol & Lachmann, 1973). Er dient als natürliches Abwehrsystem gegen eine Vielzahl von Pathogenen und agiert bereits bevor es zur Bildung von Antikörper kommt. Komponenten des AW sind die Plasmaproteine C3, Faktor B (FB), Faktor D (FD) und Properdin (Tabelle 1.4). Als Auslöser für die Aktivierung des alternativen Weges gilt die spontane Hydrolyse eines internen Thioesters innerhalb des intakten C3 Moleküls (Pangburn *et al.*, 1981), die sog. „Tickover“-Aktivierung. Die Thioester-Bindung wird nucleophil von Wassermolekülen des Serums angegriffen, und das C3 Molekül in den metastabilen Zustand C3(H₂O) gebracht. Diese Konformationsänderung begünstigt die Bindung von Faktor B an das C3 Molekül, und in diesem Komplex kann Faktor B durch die Serin Protease Faktor D in zwei Fragmente gespalten werden (Muller-Eberhard & Gotze, 1972; Gotze & Muller-Eberhard, 1976). Das größere Bb Fragment (60 kDa) bleibt mit C3 assoziiert und der gemeinsame Komplex fungiert als initiale C3 Konvertase C3Bb des alternativen Weges (Fishelson *et al.*, 1984). In der flüssigen Phase wirkt das gebundene Fragment Bb als Serin Protease und spaltet natives C3 in die Fragmente C3b* (175 kDa) und das Anaphylatoxin C3a (9 kDa). Das C3b* hat eine metastabile Konformation in der flüssigen Phase, kann allerdings in diesem Zustand eine kovalente Esterbindung mit Hydroxy- oder Aminogruppen auf Zelloberflächen oder biologischen Partikeln eingehen. An diesem Punkt kommt die potente Amplifizierungsschleife des AW zum Tragen, die dazu führt, dass die attackierte Zellmembran mit einer Vielzahl von C3b Molekülen (Opsonisierung) und C3 Konvertasen besetzt wird. Simultan hierzu wird auch der klassische Weg der Komplementaktivierung gestartet. Im alternativen Weg, dient das erste membrangebundene C3b als Bindungsstelle für FB, welches wie oben erwähnt von FD gespalten wird. Dadurch entsteht an der Aktivatoroberfläche die eigentliche C3 Konvertase C3bBb des alternativen

Weges. Jedes membrangebundene C3b Molekül kann in diesen Kreislauf eine Vielzahl von Konvertasen einspeisen, während frisches FB aus dem Serum rekrutiert wird. Properdin stabilisiert den Enzymkomplex. Die C5 Convertase des AW setzt sich aus einem weiteren C3b und der C3 Konvertase zusammen und bildet den Komplex C3b₂Bb. Die Selbstinduktion der Aktivierung und in größerem Maße die Potenzierung der Kaskade auf Ebene des C3, machen insbesondere den AW zu einem wirkungsvollen Mechanismus der Immunantwort, der ohne negative Regulation auch autologe Zellen angreifen würde. Besonders auf Ebene des C3 finden sich deshalb inhibitorische Kontrollmechanismen, die eine Inaktivierung des C3b oder der AW C3 Konvertase zur Folge haben, die ausführlich an späterer Stelle behandelt werden. Verläuft der alternative Weg allerdings ungehindert und kommt es zur Bildung der C5 Konvertase, mündet auch er in die letzte Phase der Kaskade, die Bildung des terminalen Angriffskomplexes.

1.3 Komplement: Termination

Tabelle 1.5: Aktivierende Komponenten des Terminalen Angriffskomplexes

	Mol. Gewicht [kDa]	Anzahl der Polypeptideinheiten	Plasmakonzentration [µg/ml]	Genlocus	Aktivität
C5	192	2 (α,β)	75	9q34.3	Bindet an C3b der C5 Konvertasen
C5a	11.2	1	----	----	Anaphylatoxin
C5b	182	2 (α,β)	---	----	Bindet C6, C7
C6	120	1	45-70	5p13	Bindet C5, C7
C7	105	1	55-60	5p13	Bindet C6, C8; C5-7 Komplex bildet Pore in Aktivatormembran
C8	151	3 (α,β,γ)	80	1p32, 9q34.3 ???	Bindet C7, C9; Verstärkt Wirkung d. C5-7 Komplexes
C9	71	1	60	5p13	Bindet C8, Polymerisation; notwendiger Bestandteil des MAC zur Zellyse

Die Termination der Kaskade wird eingeleitet, wenn die klassische oder alternative C5 Konvertase das intakte C5 in die zwei Fragmente C5a (11,2 kDa) und C5b (182 kDa) gespalten hat. Komponenten des terminalen Weges sind die fünf Plasmaproteine C5, C6, C7, C8 und C9 (Tabelle 1.5). Beide C5 Konvertasen des klassischen und des alternativen Weges entstehen wahrscheinlich durch die Bindung eines zweiten C3b Moleküls an die jeweilige C3 Konvertase, C4b2a3b oder C3Bb3b (Isenman *et al.*, 1980; Takata *et al.*, 1987). An diesem zusätzlichen C3b lagert sich C5 an und wird in seine beiden Fragmente gespalten. Das dabei entstehende C5a ist das wirkungsvollste Anaphylatoxin des Komplement, welches zahlreiche biologische Funktionen übernimmt. Die letzten Schritte der Kaskade werden über distinkte Protein-Protein Interaktionen zwischen C5, C6, C7, C8 und C9 geleitet, die nicht enzymatisch vermittelt werden. Der als self-assembly bezeichnete Prozeß mündet in der Bildung des terminalen Membran-Angriffskomplexes (im Englischen: **M**embrane **A**ttack **C**omplex, MAC) aus den Komponenten C5b-9 (Muller-Eberhard, 1976; Podack *et al.*, 1976; Podack *et al.*, 1978; Podack *et al.*, 1979). Nur in einer begrenzten Phase nach seiner Aktivierung kann sich C5b mit C6 zu einem stabilen

Komplex verbinden (C5b-6). Wenn dieser Komplex mit dem C7 Molekül assoziiert, entsteht C5b-C7, das amphiphile Eigenschaften besitzt. Der Komplex aus C5b-C7 lagert sich in die hydrophilen Anteile der Phospholipid-Doppelmembran ein, kann dies allerdings weder an den Zellmembranen benachbarter autologer oder pathogener Zellen und bewirkt ebenso noch nicht, dass das Zytoplasma aus der Zelle austritt („Leakiness“). Für die Membraneinlagerung des C5b-7 Komplexes stehen nur einige Millisekunden zur Verfügung bevor er irreversibel zerfällt. Ist der Komplex aus C5b-7 erfolgreich stabilisiert, wird durch die folgende Assoziation mit einem C8 Molekül die Hydrophobizität des Gesamtkomplexes erhöht, und dieser kann sich weit in die Zellmembran einbohren. Die resultierenden Poren haben einen Durchmesser von 10 bis 15 Å. Dies ist bereits ausreichend für eine begrenzte Lyse gewisser Zelltypen. Die Bildung des C5b-C8 Komplexes geschieht auch in der löslichen Serumphase, doch ist das Molekül nur an der Membran gebunden funktionell aktiv und stellt dort gewissermaßen den Rezeptor für die Komponente C9 dar. Zunächst bindet ein C9 Molekül an den C5b-8 Komplex und daraufhin folgt die nicht-enzymatische Polymerisation von weiteren C9 Molekülen (Podack *et al.*, 1982). Der Mechanismus dieses Prozesses ist noch nicht eindeutig geklärt. Der resultierende MAC besteht aus bis zu 16 C9 Molekülen (poly-C9). Der gesamte Komplex C5b-8C9₁₆ erreicht einen Durchmesser von ca. 100 Å und geht wahrscheinlich durch beide Schichten der zellulären Doppelmembran. Man nimmt an, dass die ungebremste Diffusion von Ionen und Wasser durch diese Poren die osmotische Lyse der Zielzelle einleitet.

1.4 Regulation

Tabelle 1.6: Inhibitorisch wirksame Regulatoren der Komplementkaskade

	Mol. Gewicht [kDa]	Anzahl der Polypeptideinheiten	Plasmakonzentration [mg/l]	Genlocus	Inhibitorische Wirkung auf	Weg
C1 inh	71-105	1	200	11p11.2-q13	C1r, C1s	TW
C4bp	460-570	8 (7 α , 1 β)	250	1q32	C3 Konvertase C4b2a	KW
Faktor I	88	2	30-50	4q25	C3b, iC3b und C4b Benötigt Kofaktoren	KW,AW
DAF (CD 55)*, GPI verankert	70	1		1q32	Dissoziation der C3 Konvertasen	KW,AW
MCP (CD 46)*, transmembran	45-70	1		1q32	Kofaktor für FI	KW,AW
CR 1 (CD 35)*, transmembran	190-220	1		1q32	Dissoziation der C3 Konvertasen; Kofaktor für FI	KW,AW
FHL-1	155/42	1	10-50	1q32	Kofaktor für FI; Dissoziation der AW C3 Konvertase	AW
Faktor H	155	1	200-600	1q32	Wie FHL-1; Bindet C3b, C3c, C3d; Konkurriert mit FB um C3b	KW,AW
Clusterin (SG-P2)	80	2		8p21	C5-8	TW
S-Protein (Vitronectin)	77 n	2xn	240-550	17q11	C5-8	TW
HRF* C8-bind. Protein	65	nb		nb	C8;MAC	TW
Protektin* (CD 59), GPI verankert	18-23	1		11p13	MAC; C9	TW

*Membranprotein

Verschiedene Mechanismen der Regulation greifen in die Komplementkaskade ein, um zu gewährleisten, dass die Komponenten des C nicht übermäßig verbraucht werden, aber auch um körpereigene Zellen vor der Komplement-vermittelten Lyse zu schützen (sog. Bystander Lyse) bzw. ziellose inflammatorische Antworten zu verhindern. Der Vielzahl an negativ regulatorischen Proteinen, steht nur ein einziges Molekül entgegen, das stabilisierend auf die AW C3 Konvertase und somit positiv regulatorisch wirkt, das Properdin (Pillemer *et al.*, 1954). Properdin ist ein polymeres Molekül aus 53 kDa Untereinheiten, das in hohen Serumkonzentrationen von ca. 25 mg/l vorliegt.

Die bei weitem überwiegende Zahl inhibitorisch wirksamer Faktoren regulieren die Komplementkaskade auf unterschiedlichen Ebenen (Tabelle 1.6). Dies geschieht in der frühen Phase zum einen durch die Aktivität der Serumproteine C1q Inhibitor, Faktor I, C4bP, Faktor H und FHL-1 zum anderen durch Membranproteine der körpereigenen Zellen, wie DAF (CD 55), MCP (CD 46) und Complement-Rezeptor 1 (CR1; CD35). Ist der terminale Weg bereits eingeleitet, wirken auch hier lösliche Faktoren (S-

Protein bzw. Vitronectin; SP-40; Apolipoproteine J, AI und AII; SG-P 2 bzw. Clusterin; CD 59) und die GPI-verankerten Membranproteine Protektin (mCD 59) und HRF (C8-binding protein).

1.4.1 C1-Inhibitor, C4-Binding Protein und Faktor I vermittelte Inaktivierung des C4b

Der klassische und Lektin-Weg der Komplementaktivierung wird in der flüssigen Phase durch die Wirkungsweise des C1-Inhibitor (C1inh) und des C4-bindenden Proteins (C4bp) entscheidend beeinflusst.

Das Glycoprotein C1inh gehört zur Familie der Serin-Protease Inhibitor Familie (Serpine), und inaktiviert zusätzlich zu Komplement C1 auch die Proteine Plasmin, Killkrein und die Koagulationsfaktoren XIa und XIIa. An erster Stelle des klassischen Weges inaktiviert C1inh den aktiven C1 Komplex, indem es sich irreversibel an C1s und C1r anlagert und den Komplex destabilisiert (Arlaud *et al.*, 1979; He *et al.*, 1997). Auch die in geringer Rate stattfindende Autoaktivierung des C1 Komplexes wird somit wirkungsvoll von C1inh im Serum außer Kraft gesetzt.

C4bp ist ein je nach Grad der Glykosylierung 460-570 kDa schweres Glykoprotein, das sich sowohl frei im Serum als auch an Chylomikronen assoziiert findet. In der Tertiärstruktur ähnelt C4bp der Gestalt eines Oktopus, die einzige β -Kette ist C-terminal mit insgesamt acht α -Ketten assoziiert. Das C4bp ist im Serum in zwei weiteren funktionell aktiven Isoformen mit nur 6 α -Ketten oder gänzlich ohne β -Kette zu finden. Die einzelnen α -Ketten sind miteinander über Disulfidbrücken verbunden, die sich am C-terminus in den „Bridging“-Domänen befinden. Das restliche Molekül setzt sich aus homologen Domänen, den „short-consensus-repeats“ (SCRs), zusammen (Kirkitadze & Barlow, 2001). Auf die Struktur der SCR Domäne wird an anderer Stelle noch ausführlich eingegangen. C4bp ist Mitglied der Familie der „Regulators of Complement Activation“ (RCA) (Kristensen *et al.*, 1987; Hillarp *et al.*, 1993), die in einem Cluster auf Chromosom 1 codiert sind und als gemeinsame Struktureinheit die SCR Domänen aufweisen (vgl. Tabelle 1).

C4bp beschleunigt den Zerfall der klassischen C3 und C5 Konvertasen (sog. decay-accelerating activity). Es verhindert die Bildung neuer Konvertasen und hat Kofaktor Aktivität in der proteolytischen Spaltung des C4b durch Faktor I (s.u.) (Gigli *et al.*, 1979; Gigli *et al.*, 1985; Barnum & Dahlback, 1990). Darüberhinaus konnte eine wahrscheinlich physiologisch irrelevante Inaktivierung der AW Konvertasen durch C4bp nachgewiesen werden. C4bp inaktiviert die C3 und C5 Konvertasen des klassischen Weges (C4b2a und C4b2a3b) in einer Weise, die sich bei der Wirkung der Regulatoren CR1 (CD 35), DAF (CD 55), MCP (CD 46) und Faktor H auf Ebene des C3 wiederfindet. Auch auf Ebene des C4b wirken die Membranproteine CR1 und MCP als Kofaktor in der Faktor I vermittelten Inaktivierung der klassischen C3 Konvertase (Seya & Atkinson, 1989), während DAF ihren Zerfall beschleunigt (Nicholson-Weller *et al.*, 1982).

1.4.2 Drehscheibe C3: Faktor I vermittelte Inaktivierung und Zerfall der C3 Konvertasen

Auf Ebene von C3 treffen der klassische und der alternative Weg der Komplementaktivierung zusammen. Komplement C3 nimmt die Stellung als das zentrale Molekül der Komplementkaskade ein. C3b, das an eine Membran oder parikuläre Oberfläche gebunden ist, propagiert die Komplementkaskade, doch auch die proteolytischen Spaltprodukte des C3b wirken mannigfaltig in den Inflammationsprozeß ein. Die regulativen Mechanismen (Abb. 1.3), die an dieser Stelle greifen, entscheiden maßgeblich über das Schicksal der attackierten Zelle, indem entweder durch Opsonisierung (C3b/iC3b) phagozytotische Reaktionen überwiegen, durch Bildung der C5 Konvertasen der terminale Weg und die Zelllyse beschränkt wird, oder auf autologen Zellen, die Attacke des Komplement verhindert werden soll.

Das C3 Molekül liegt in sehr hohen Konzentrationen im menschlichen Serum vor (1 g/l). Das native C3 ist ein 185 kDa schweres Glycoprotein, dessen α -Kette (115 kDa) und β -Kette (75 kDa) über eine Disulfidbrücke verknüpft sind (Bokisch *et al.*, 1975; Nilsson *et al.*, 1975). Darüberhinaus befinden sich zwei weitere Disulfidbrücken innerhalb der α -Kette. Das intakte C3 Molekül wird zum einen durch die Aktivität der C3 Konvertasen des klassischen oder alternativen Weges, als auch durch Faktor I in Zusammenarbeit mit den Kofaktoren membrangebundenen CR1 MCP und dem löslichen Faktor H enzymatisch gespalten (Lambris *et al.*, 1996). In einem schrittweisen Abbau des C3b durch Faktor I entstehen die Spaltprodukte iC3b, C3c, C3dg und C3d (Fries *et al.*, 1985; Ganu *et al.*, 1989; Sim *et al.*, 1993a). Spezifische Komplementrezeptoren für das iC3b Molekül (CR1, CR2 (CD 11c/CD18), CR3 (CD 11b/CD18)) und das C3dg Fragment (CR2) vermitteln die inflammatorische und phagozytäre Funktion der Komplementkaskade und bilden ein Bindeglied zur angeborenen, zellulären Immunität des Menschen. So werden Zellen oder Partikel, die mit dem iC3b Molekül besetzt (opsonisiert) sind, von Phagozyten über die Rezeptoren CR 1 und CR3 gebunden. Die auf diese Weise aktivierten Phagozyten synthetisieren und sekretieren inflammatorisch wirksame Zytokine und Mediatoren. Die Phagozytose der iC3b opsonisierten Partikel wird auf Neutophilen und Monozyten/Makrophagen über die Liganden-Bindung an die Rezeptoren CR1 und CR3 induziert und vermittelt. Desweiteren ist der aktivierte CR3 (auch iC3b Rezeptor genannt) während inflammatorischer Prozesse verantwortlich für die Adhäsion der Leukozyten an aktivierten Endothelzellen und deren transendotheliale Migration. Eine besondere Bedeutung fällt dem CR 1 Rezeptor der Erythrozyten zu. Lösliche C3b-Immunkomplexe des peripheren Blutsystems werden von CR 1 an die Blutkörperchen gebunden und an den Ort der Beseitigung, die Leber, transportiert. Der CR 1 Rezeptor auf Membranen folliculärer dendritischer Zellen ist mitverantwortlich für die Präsentation der gebundenen Antigen-Antikörper Komplexe in den Reifungszentren lymphatischer Gewebe.

Die Folgen der Aktivierung der genannten C3 Rezeptoren auf Zellen des peripheren Blutsystems sind vielfältig und zu großen Teilen noch nicht eindeutig geklärt. In Lymphozyten wird über die Bindung des iC3b und C3dg an die Rezeptoren CR1 und CR2 die B-Zell-Differenzierung und Proliferation angetrieben. Die Wirkung der Rezeptor-Liganden-Interaktion auf einige T-Zell-Populationen ist allerdings unklar. Eine Rezeptor-vermittelte Beteiligung in Vorgängen der Signaltransduktion wird für die Rezeptoren CR1 und CR2 diskutiert.

Für die Inaktivierung des C3b und die weitere Spaltung des Moleküls benötigt die Serin Protease Faktor I für jeden dieser enzymatischen Teilschritte einen Kofaktor, wobei bei der Abspaltung des C3d vom C3dg Fragment ausschliesslich CR1 als Kofaktor aktiv ist (Fearon *et al.*, 1981; Dobson *et al.*, 1981; Perlmann *et al.*, 1981; Schneider *et al.*, 1981; Fearon, 1985; Vik & Fearon, 1985; Weiler, 1989). Die Faktor I vermittelte Inaktivierung des C3b, das sich in der flüssigen Phase befindet, kann allerdings nur mit Hilfe des Faktor H stattfinden (Farries *et al.*, 1990). Diese Kofaktor Aktivität ist auch für ein anderes Mitglied der Faktor H Familie, das Faktor H ähnliche Protein 1 (factor H like FHL-1), nachgewiesen worden (Misasi *et al.*, 1989).

Ein zweiter inhibitorischer Mechanismus bewirkt den raschen Zerfall der C3 Konvertase C3bBb des alternativen Weges. Diese als „Zerfall-beschleunigende-Aktivität (im Englischen: decay-accelerating activity)“ bezeichnete Funktion wird sowohl von den Membranproteinen CR1 und DAF (CD 55) als auch von Faktor H und FHL-1 ausgeübt (Weiler, 1989; Kuhn & Zipfel, 1996). Faktor H besitzt eine weitere Funktion, indem es als einziges der beschriebenen Regulatorproteine mit Faktor B um die Bindung an C3b konkurriert (Farries *et al.*, 1990), und somit ein kompetitiver Ligand in der Bildung der AW C3 Konvertase ist. Faktor B besitzt allerdings eine andere Bindungsstelle im C3b Molekül als Faktor H (Hourcade *et al.*, 2002).

Indem Faktor H bereits im Serum an C3b Moleküle oder die frühe C3 Konvertase C3Bb bindet, verhindert er die Ablagerung der aktivierten Moleküle auf der Zelloberfläche. Diese Eigenschaft macht Faktor H zum wichtigsten Regulator des alternativen Weges, der in einem frühen Stadium die Amplifizierungsschleife der Kaskade außer Kraft setzt. Da Faktor H die Inaktivierung des C3b fördert, greift es zudem in die Bildung der klassischen C5 Konvertase ein. Eine herausragende Rolle in der Komplementregulation übernimmt Faktor H vor allem dann, wenn membrangebundene Regulatoren wie CD35, CD46 oder CD55 fehlen. Dies trifft u.a. auf körpereigene Regionen wie z.B. der exponierten extrazellulären Matrix oder die flüssigkeitserfüllten Zwischenräume der Gelenke zu (Friese *et al.*, 2000). Hier kann das Fehlen der Faktor H vermittelten Komplementregulation gravierende Verletzungen des betroffenen Gewebes durch die ungehinderte Komplementaktivierung hervorrufen. Im umgekehrten Sinne steht die Wirkung von Faktor H im Dienste einiger humanpathologischer Mikroorganismen, die eine Strategie entwickelt haben, sich vor Komplement zu schützen, indem sie wirtseigenes Faktor H oder FHL-1 an ihre Membranoberfläche bzw. an Membranproteine binden (Ram *et al.*, 1999; Hellwage *et al.*, 2000; Kraiczy *et al.*, 2001b).

1.5 Faktor H Proteinfamilie

Als erstes Mitglied der Proteinfamilie wurde das Faktor H Protein, zu diesem Zeitpunkt als β 1H Globulin bezeichnet, aus humanem Serum isoliert (Nilsson & Muller-Eberhard, 1965), und später wurden seine Komplement regulatorischen Eigenschaften beschrieben (Weiler *et al.*, 1976; Whaley & Ruddy, 1976; Weiler *et al.*, 1978; Whaley *et al.*, 1979). Nach Analyse der primären Proteinstruktur (Kristensen *et al.*, 1986) wurde die cDNA Sequenz für Faktor H (Ripoche *et al.*, 1986) und später für das alternative Spliceprodukt des Faktor H Genes, FHL-1 (Sim *et al.*, 1993b) (Schwaeble *et al.*, 1987; Estaller *et al.*, 1991) aufgeklärt. Das Faktor H Gen liegt im RCA Cluster auf dem langen Arm des Chromosom 1 (Locus 1q3.2). Auch für die weiteren Mitglieder der Faktor H Proteinfamilie (Abb. 1.4) wurden mittlerweile die entsprechenden Gene oder partiellen Sequenzen auf Chromosom 1 (1q 3.1-3.2) lokalisiert (Zipfel *et al.*, 1999; Krushkal *et al.*, 2000; Male *et al.*, 2000; McRae *et al.*, 2002). Faktor H ist das am besten charakterisierte Mitglied dieser Familie aus Serumproteinen, zu der bis heute 5 weitere Proteine gezählt werden, die Faktor H verwandten Proteine (FHR) 1-5. Allen Faktor H Proteinen ist die strukturelle Eigenschaft gemein, ausschließlich aus SCR Domänen zu bestehen (Kristensen *et al.*, 1986; Zipfel *et al.*, 1999). Jedes SCR wird von ca. 60 Aminosäuren gebildet, und zwischen einigen SCRs herrscht bis zu 90% Sequenzhomologie (Barlow *et al.*, 1991). Hoch konservativ erhalten in ihrer Position und Bestandteil jedes SCRs sind 4 Cystein-Reste. Disulfidbrücken werden zwischen dem ersten und dritten bzw. dem zweiten und vierten Cystein eines SCRs ausgebildet. Dies bestimmt die räumliche Struktur jeder SCR Domäne und folglich die des gesamten Moleküls. Die strukturelle Homologie der SCR Domänen ist weiterhin durch das Auftreten und die Position der Aminosäuren Prolin, Glycin, Tyrosin und Tryptophan geprägt. Die primäre Aminosäuresequenz aller bekannten Faktor H Proteine weist mindestens eine putative Seite auf, an der das Molekül über eine posttranslationale N-Glykosylierung modifiziert werden könnte. Für Faktor H, FHR-1, FHR-2 (Skerka *et al.*, 1992; Zipfel & Skerka, 1994) und FHR-4 (Hellwage *et al.*, 1997b) wurden Kohlenhydratketten experimentell nachgewiesen. Das FHL-1 Protein scheint, obwohl es eine mögliche Glykosylierungsseite in SCR 4 enthält, nur in nicht modifizierter Form vorzukommen. Das FHR-1 Protein existiert in humanem Plasma in einfach und zweifach glykosilierter Form, das FHR-2 Protein in einfach und nicht glykosilierter Form (Zipfel & Skerka, 1994). Für Faktor H, FHR-3 und FHR-4 ist der genaue Grad der Glykosylierung und die distinkte Lokalisierung der Glykosylierungsseiten noch nicht geklärt.

1.5.1 Faktor H

Faktor H (FH) liegt in hohen Konzentrationen (500mg/l) im Serum vor und wird v.a. in Hepatozyten, aber auch in Kupferzellen der Leber gebildet (Schlaf *et al.*, 2002). FH hat ein Molekulargewicht von 150 kDa und besteht aus insgesamt 20 SCRs. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen scheint das Faktor H Protein eine flexible, perlenschnurartige Konformation einzugehen (DiScipio, 1992). Die Kofaktor und „decay-accelerating“ Aktivität wird von den N-terminalen Domänen 1-4 ausgeübt (Kuhn & Zipfel, 1996). Das Molekül hat insgesamt drei Bindungsstellen für den Liganden

C3b und seine Spaltprodukte C3c und C3d (Lambris *et al.*, 1988; Sharma & Pangburn, 1996; Jokiranta *et al.*, 2000; Jokiranta *et al.*, 2001). Bisher noch nicht geklärt ist, in welchem Maße diese Interaktion von jeder einzelnen Bindungsstelle geprägt wird. Es konnte allerdings nachgewiesen werden, dass Faktor H mithilfe der SCRs 1-4 intaktes C3b, der SCRs 6-10 das C3c Fragment und mit den SCRs 19-20 das C3d Derivat bindet (Jokiranta *et al.*, 2001). Darüber hinaus interagiert FH mit negativ geladenen Strukturen der zellulären Membranoberflächen bzw. Proteinen der extrazellulären Matrix, um seine Komplement regulatorische Funktion auszuüben. Auch für die Interaktion mit Polyanionen und experimentell nachgewiesen mit dem polymeren Heparin liegt eine Bindungsstelle N-terminal in SCR 7 (Blackmore *et al.*, 1996) und C-terminal in SCR 20 vor (Blackmore *et al.*, 1998). Eine dritte Bindungsstelle für Heparin liegt möglicherweise in den SCRs 12-14 (Pangburn *et al.*, 1991), die jedoch in anderen Studien (Blackmore *et al.*, 1998) nicht eindeutig bestätigt wurde. Die Bedeutung dieser Bindungsregionen für die Interaktion des Faktor H Moleküls mit Glycosaminoglycanen wird noch diskutiert. Das Vorkommen krankheitsassoziierter Punktmutationen innerhalb des C-terminalen SCR 20 ist allerdings indikativ dafür, dass dieser Domäne eine besondere Rolle für die Ausübung der komplement-regulatorischen Funktion zufällt.

Die Interaktion des Faktor H mit anderen Molekülen ist nicht auf die Bindung an das C3 Protein oder Heparin beschränkt. Obwohl im Einzelnen noch wenig über die Funktion und physiologische Bedeutung der nachgewiesenen Bindung bekannt ist, sind Adrenomedullin (Pio *et al.*, 2001), das Integrin CD 11b/CD 18 auf polymorphonuclearer Leukocytes (PMNs)(DiScipio *et al.*, 1998), das L-Selektin humaner Leukozyten (Malhotra *et al.*, 1999), das Sialoprotein der Knochen und Osteopontin (Fedarko *et al.*, 2000), sowie das akute Phase C reaktives Protein (CRP) (Mold *et al.*, 1999) weitere Liganden des Faktor H Proteins.

1.5.2 FHL-1

Als einzigem weiteren Mitglied der Faktor H Familie wurde neben Faktor H dem FHL-1 Protein eine Komplement regulatorische Aktivität nachgewiesen. FHL-1 ist das Proteinprodukt eines 1.8 kb Transkripts des Faktor H Genes (Schwaeble *et al.*, 1987; Estaller *et al.*, 1991; Sim *et al.*, 1993b), das am C-terminalen SCR 7 vier zusätzliche Aminosäuren trägt (Fontaine *et al.*, 1989). Im humanen Serum unterscheidet sich die Proteinkonzentration des FHL-1 um ein zehnfaches von der des Faktor H. Wie in Faktor H, vermitteln auch in FHL-1 die SCRs 1-4 eine Kofaktorfunktion in der Faktor I-abhängigen Inaktivierung des C3b und den Zerfall der AP C3 Konvertase (Misasi *et al.*, 1989; Kuhn *et al.*, 1995; Kuhn & Zipfel, 1996). FHL-1 interagiert mit Heparin über eine Bindungsstelle an SCR 7 (Blackmore *et al.*, 1998), es bindet an autologe Zellen über das RGD-Motiv in SCR 4 (Hellwage *et al.*, 1997a), und auch FHL-1 wird von verschiedenen Mikroorganismen für die Immunevasion benutzt, wie beispielsweise für *Borrelia burgdorferi* Stämme gezeigt wurde (Kraiczky *et al.*, 2001b).

1.5.3 Die Faktor H verwandten Proteine 1-5

Bis heute sind insgesamt fünf FHR Proteine beschrieben worden (Timmann *et al.*, 1991; Skerka *et al.*, 1992; Zipfel & Skerka, 1994; McRae *et al.*, 2001; McRae *et al.*, 2002). Erst vor kurzem wurde das FHR-5

Protein als Bestandteil pathologischer glomerulärer Immunglobulin-Ablagerungen entdeckt (McRae *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2002). Die FHR Proteine sind aus 4, 5 und 9 SCR Domänen aufgebaut, die v.a. im C-terminalen Bereich fast deckungsgleiche Sequenzhomologien zu den SCRs 19-20 von Faktor H aufweisen (Zipfel *et al.*, 1999; Male *et al.*, 2001). Über die biologische Funktion der FHRs ist wenig bekannt. Eine Interaktion mit C3d wurde für die FHRs 3 und 4 gezeigt, mit C3b für das FHR-5 Protein. Das FHR-3 Protein bindet an Heparin und ist ein Ligand für das M6 Protein auf der Membranoberfläche von *Streptococcus pyogenes*. Alle FHR Proteine kommen als frei gelöste Proteine im humanen Plasma vor, die FHR 1, FHR 2 und FHR 4 Proteine sind zusätzlich Bestandteil von Lipoprotein Partikeln (Skerka *et al.*, 1997).

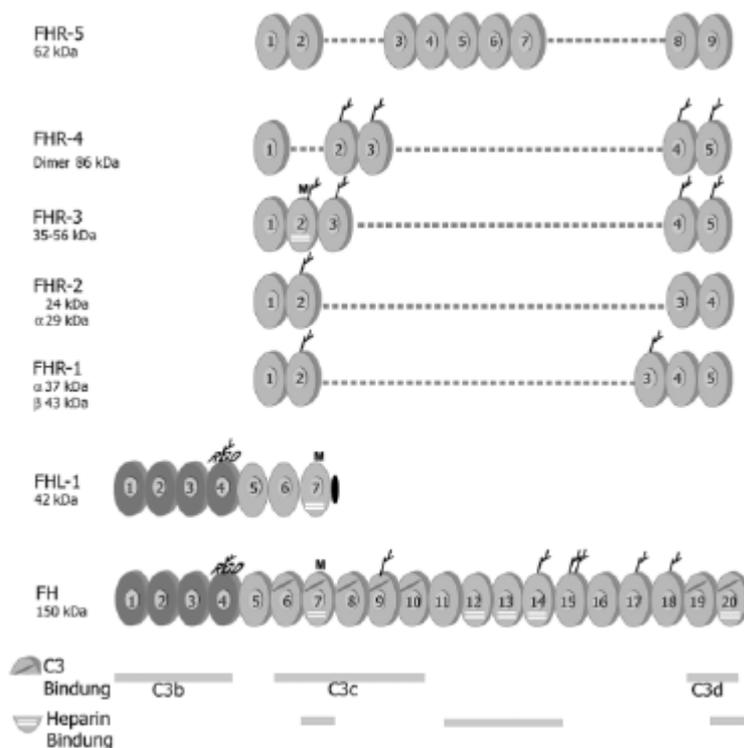


Abb . 1.3: Die Faktor H Proteinfamilie

Die Mitglieder der Faktor H Familie sind in einer schematischen Darstellung der Domänenstruktur wiedergegeben. Einzelne SCR Domänen sind als Oval dargestellt, die vertikale Anordnung richtet sich nach übereinstimmender Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Familienmitgliedern. Die C-terminalen Faktor H Domänen SCRs 19 und 20 teilen eine übereinstimmende Sequenz von 60-100% mit den Proteinen FHR-1 bis FHR-5. Regionen, an denen eine Addition von Kohlehydraten stattfinden kann, sind durch ein Strichsymbol gekennzeichnet. Das berechnete Molekulargewicht für die unterschiedlich glykosilierten Formen der Proteine FHR-1 und FHR-2 ist angemerkt. Die Kofaktor Funktion für das Faktor H Protein und FHL-1 liegen in den N-terminalen SCRs 1-4 (dunkle Ovale), die Lage des RGD (Arginin-Glycin-Asparagin)-Motivs und die Bindung des SCR 7 an das M Protein (M) des Erregers *Streptococcus pyogenes* ist gekennzeichnet. In Faktor H sind die funktionellen Regionen für die Bindung des C3 Moleküls und des Heparins am unteren Bildrand hervorgehoben. Die Bindung an Heparin wird vom SCR 7 des FHL-1 Proteins und vom SCR 2 des FHR-3 Proteins vermittelt.

1.6 Komplement und Krankheit

In diesem Kapitel werden beispielhaft einige Aspekte krankheitsassoziierter Komplementstörungen aufgegriffen werden. Ein besonderer Schwerpunkt wird zudem auf die Beteiligung des Faktor H in das Krankheitsgeschehen gelegt. Auch die Mitwirkung des Komplementsystems bzw. des Faktor H und FHL-1 in der Pathogenese maligner Tumore (Junnikkala *et al.*, 2000; Jurianz *et al.*, 2001) sowie in rheumatoiden Gelenkerkrankungen (Friese *et al.*, 2000) (Moulds *et al.*, 1992) sei hier vollständigshalber erwähnt.

1.6.1 Komplement und Infektion: Strategien der Immunevasion

Eine wirkungsvolle Strategie verschiedener Erreger besteht darin, sich vor der Komplement vermittelten Lyse zu schützen, indem sie die wirtsspezifischen löslichen Regulatoren des Komplement, insbesondere FH, an ihre Oberfläche binden. Dieser der Immunevasion dienende Mechanismus wird von diversen bakteriellen Mikroorganismen (Streptococcen, *Neisseria spec.*), Viren (Vaccina Virus VV, HIV), niederen Pilzen (*Candida albicans*) und humanen Parasiten (*Onchocerca volvulus*) ausgeübt. Die Zahl der identifizierten Erreger, die C4 bP, Faktor H und FHL-1 an sich binden, zeigt in ihrer Vielfalt die Bedeutung dieser immunevasiven Strategie für die Organismen auf. Beispielsweise werden Faktor H und FHL-1 über das SCR 7 an die M Proteine von *Streptococcus pyogenes* (Blackmore *et al.*, 1998; Kotarsky *et al.*, 1998) arretiert und ebenso an das Beta Protein von Gruppe B Streptococcus Stämmen (Areschoug *et al.*, 2002). Auch das Protein PspC, das auf der Membranoberfläche von *Streptococcus pneumoniae* exprimiert ist, bindet Faktor H (Dave *et al.*, 2001) über dessen SCRs 8-11 (Jarva *et al.*, 2002). *Neisseria gonorrhoeae* Stämme benutzen entweder Sialursäurereste ihrer Membranen oder das Porin 1 A, um Faktor H zu binden (Ram *et al.*, 1998; Ram *et al.*, 1999). Das OSP E (Outer-surface Protein E) serumresistenter *Borrelia burgdorferi* Stämme ist der Ligand für die SCRs 15-20 des Faktor H (Hellwage *et al.*, 2001), während FHL-1 über seine SCRs 5-7 an Membranproteine der Spirochäten bindet (Kraiczky *et al.*, 2001b; Kraiczky *et al.*, 2001c). Diese Organismen exprimieren eine Vielzahl an Faktor H Liganden auf ihrer Membranoberfläche (Kraiczky *et al.*, 2001a; Alitalo *et al.*, 2002). Beide Proteine haben ebenso (einen) noch nicht weiter definierten Liganden auf *Candida albicans* (Meri *et al.*, 2002a). Diese Strategie der Immunevasion wird auch von höheren Organismen genutzt: so wurde die Bindung von Faktor H an Mikrofillarien des parasitären Nematoden *Onchocerca volvulus* nachgewiesen (Meri *et al.*, 2002b). Die Komplement regulatorische Eigenschaft des arretierten Faktor H bleibt erhalten, verleiht die beobachtete Serumresistenz klinischer Isolate und dient den Mikroorganismen als effektiver Schutz gegen die zytotoxische Aktivität des Komplementsystems (Kraiczky *et al.*, 2001c; Jarva *et al.*, 2002; Alitalo *et al.*, 2002; Meri *et al.*, 2002a; Meri *et al.*, 2002b). Auch das serumlösliche C4bp, welches inhibitorisch auf die klassische C3 Konvertase wirkt, wird ebenso wie Faktor H von einer Vielzahl an Mikroorganismen in den Dienst der Immunevasion gestellt (Morfeldt *et al.*, 2001; Blom *et al.*, 2001; Ram *et al.*, 2001; Berggard *et al.*, 2002). Von einigen Mikroorganismen ist bekannt, dass sie Komplement regulatorische Wirtsproteine auf ihrer Membran exprimieren. Dazu gehört das virale VCP (Vaccina Control Protein), dessen C-

terminale SCR Domänen die Kofaktor Funktionen für die Faktor I vermittelte Inaktivierung des C3b und des C4b übernehmen, aber auch die decay-accelerating Aktivität an beiden C3 Konvertasen ausüben (McKenzie *et al.*, 1992; Sahu *et al.*, 1998).

Einige Stämmen des Coxsackie B (CB) Virus scheinen sich das wirtseigene, membranverankerte DAF (CD 55) als Rezeptor zu Nutze zu machen, um somit die Infektion der Wirtszelle zu erleichtern (Shieh & Bergelson, 2002).

1.6.2 Genetisch bedingte Komplementerkrankungen

Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts gelang es, die genetischen Ursachen für Komplement-assoziierte Immunsuffizienzen und die Ausprägung immunologischer Symptome in verschiedenen Krankheitsbildern zu begreifen. Insbesondere Untersuchungen an Zuchttieren, v.a. Schweinen, aber auch an Menschen, deren Serum in einer der Komplementkomponenten defizient war, machten eine Eigenschaft deutlich, die bei genetisch bedingten Veränderungen des Komplement zu beobachten ist. Obwohl die betroffenen Individuen im allgemeinen gesund erscheinen, leiden sie doch häufig an einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheiten bzw. Symptomen. Bestätigt hat sich ein heterozygot, rezessiver Erbgang für die meisten der Komplement-assoziierten Krankheiten. Im allgemeinen, bewirkt das Fehlen oder die Fehlfunktion einer Komplementkomponente eine erhöhte Anfälligkeit des Organismus gegenüber Infektionen mit pyogenen Erregern.

1.6.3 Serumproteine des Klassischen und des Lektin Weges

Genetisch bedingte Störungen in Komponenten des klassischen Lektin oder des alternativen Weges bzw. des Terminalen Weges zeigen teilweise eine ähnliche, pathologische Merkmalsausprägung. So sind Veränderungen, die die klassischen Komponenten C1q, C1r, C1s, C4, C2 betreffen, mit dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) Syndrom assoziiert. SLE ist eine schubweise verlaufende, chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung und betrifft zahlreiche Organe. Die Ausbildung von Immunkomplex-Krankheiten wird durch ein genetisch bedingtes Fehlen in den klassischen Komponenten begünstigt. In Fällen, in denen der klassische Regulator C1inh betroffen ist, leiden viele Patienten unter hereditären Angiodem aber auch SLE (Alsenz *et al.*, 1987; Alsenz *et al.*, 1989; Whaley *et al.*, 1996; Topaloglu *et al.*, 1996). In der erworbenen Form der C1q inh Defizienz verhindern zirkulierende Autoantikörper gegen das C1q Protein die Bildung des C1s-C1-inh Komplexes (He *et al.*, 1998). Der familiären Form der Krankheit liegt ungewöhnlicherweise ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde. Das SLE Syndrom ist durch wiederkehrende edemische Episoden im subkutanen Gewebe der Haut und anderer Organe gekennzeichnet. In dem häufigeren Typ 1, sind noch geringe Mengen des C1q inh im Plasma der Patienten nachweisbar, während in der Typ II Ausprägung funktionell inaktives Protein gebildet wird. Das registrierte Vorkommen von fehlenden oder nicht funktionellen Komplementproteinen variiert stark in der Zahl, je nachdem welche Komponente betroffen ist. Es sind mittlerweile Hunderte von Fällen bekannt, in denen Mutationen im C1inh Gen krankheitsrelevant sind, während bisher in

lediglich einem Patienten mit Angiodem und Hinweisen auf eine Autoimmunerkrankung gezeigt wurde, dass er in dem Regulator C4bp defizient ist (Trapp *et al.*, 1987).

Das MBL Gen ist ein häufiges Ziel für insgesamt drei vererbte Punktmutationen, von denen zwei das funktionell wichtige Glycin des Gly-X-Y Motives verändern (sog. Codon 54 und Codon 57 Mutation) und somit die Polymersisation der MBL Moleküle negativ beeinflussen (Turner, 1998; Gabolde *et al.*, 1999). Dieser Polymorphismus wird in diversen ethnischen Gruppen häufig beobachtet. Eine dritte Punktmutation, die in sehr geringer Rate vorkommt, bewirkt den Austausch eines Argininrestes mit einem Cystein (sog. Codon 52 Mutation). Eine Assoziation der beschriebenen Polymorphismen, mit einem erhöhten Risiko an bakteriellen Infektionen zu erkranken, ist für Individuen beschrieben, deren Immunsystem aufgrund chemotherapeutischer Medikation oder nach transplantativen Eingriffen bereits geschwächt wurde (Turner, 1998; Neth *et al.*, 2001; Peterslund *et al.*, 2001; Mullighan *et al.*, 2002).

1.6.4 Serumproteine des alternativen Weges und C3

Sowohl für fast alle löslichen Komponenten des alternativen Weges als auch für C3 und die Proteine C5, C6, C7 und C8 gilt, dass ihr Fehlen oder eine genetisch bedingte Funktionsstörung des Proteins eine gravierende, erhöhte Infektionsanfälligkeit mit dem pyogenen Organismus, z.B. *Neisseria sp.*, zur Folge hat. Dieses systemische Krankheitsbild wurde u.a. bei komplettem Fehlen des Faktor D (Hiemstra *et al.*, 1989) oder auch bei x-chromosomal vererbten Properdin Mutationen beobachtet (Fijen *et al.*, 1999). Auch Individuen, die eine Defizienz an C3 Protein aufweisen (Katz *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1995), leiden an immer wiederkehrenden *Neisseria*-Infektionen, oder in einigen Fällen an SLE, Erkrankungen der Niere oder autoimmunen Symptomen (Hazlewood *et al.*, 1992; Halma *et al.*, 1992; Prodeus *et al.*, 1997; Fischer *et al.*, 1997; Walport *et al.*, 1997; Whaley & Schwaeble, 1997). Eine genetisch bedingte Veränderung in Faktor I manifestiert sich pathologisch ähnlich (Balow & Austin, III, 1988; Amadei *et al.*, 2001). Das vollständige Fehlen des Serum Faktor H wurde bis heute bei insgesamt 29 Individuen aus 12 Familien (Ault *et al.*, 1997; Ault, 2000) und in Schweinen (Hogasen *et al.*, 1995; Hegasy & Zipfel, 2000) beobachtet. In den betroffenen Individuen treten schwere Schädigungen des Nierengewebes auf. Die Nierenglomeruli zeigen massive Ablagerungen von Immunkomplexen, die eine Verletzung des Gewebes fördern. Für diese als Membranoglomerulonephritis-Typ II (MPGN) bezeichnete Krankheit, macht man heute die unkontrollierte C3 Aktivierung aufgrund des fehlenden Regulators FH verantwortlich, und dies wurde im Mausmodell bestätigt (Pickering *et al.*, 2002). Die molekularen Grundlagen des Syndroms sind allerdings bei weitem noch nicht geklärt. So wurde in genetischen Familienstudien auch für die Typ III MPGN Erkrankung die Assoziation mit einem noch nicht definiertem Gen in der RCA Region auf Chromosom 1q (3.1-3.2) beschrieben (Neary *et al.*, 2002). Eine weitere Ursache für die beobachtete Hypokomplementie in manchen MPGN Patienten ist das Auftreten eines Autoantikörpers, dem C3 Nephritischen Faktor (C3NeF), der die initiale AW C3 Konvertase stabilisiert und somit eine konstante Aktivierung des alternativen Weges bewirkt (West *et al.*, 2001; Jelezarova *et al.*, 2001). Punktmutationen im Faktor H Gen, die in ihrer Ausprägung nicht zum vollständigen Verlust des Proteins führen, wurden in Patienten identifiziert, die an der atypischen Form

des hämolytisch urämisches Syndroms (HUS) leiden (Noris *et al.*, 1999; Warwicker *et al.*, 1999). Die Beteiligung von Faktor H Defekten an der Entstehung des HUS wird an anderer Stelle eingehend beschrieben (siehe 1.6.7).

1.6.5 Proteine des Terminalen Weges

Wiederkehrende, lebensbedrohliche Infektionen mit Meningococcus oder Gonococcus Arten als auch Schädigungen der Niere sind bei Fehlen der TW Komponenten in Menschen und Tiermodellen beschrieben (Leenaerts *et al.*, 1995; Fernie *et al.*, 1995; Fernie *et al.*, 1996; Wurzner *et al.*, 1996; van Dixhoorn *et al.*, 1997; Hobart *et al.*, 1997; O'Hara *et al.*, 1998). Pathologische Auswirkungen, die auf das vollständige Fehlen des C9 Proteins begründet sind, wurden noch nicht eindeutig charakterisiert (Hobart *et al.*, 1997).

1.6.6 Zelluläre Komplement- Regulatoren und Rezeptoren

Die Regulatoren DAF (CD 55) und Protektin (CD 59) sind in der Paroxysmalen nocturalen Hämoglobinurie, wie viele andere GPI verankerte Proteine, bei dieser Krankheit nicht auf den Membranen der Zellen zu finden (Hall & Rosse, 1996; Jin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 1999). In dieser erworbenen Krankheitsform der hämatopoetischen Stammzellen ist die Fähigkeit zur Synthese des GPI-Ankers gänzlich verloren gegangen (Nagarajan *et al.*, 1995; Rosse & Ware, 1995). Die Krankheit ist durch wiederkehrende Komplement-vermittelte hämolytische Episoden gekennzeichnet. Eine Mutation in der β -Kette des CD 18 betrifft die Komplementrezeptoren LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18), indem der Heterodimer des Rezeptors nicht mehr gebildet werden kann. Das verursachte LAD (leucocyte adhesion deficiency, aus dem Englischen) Syndrom äußert sich in vielen Patienten in schweren und wiederkehrenden Infektionen mit pyogenen Erregern.

Die Untersuchung genetisch bedingter Funktionsstörungen von C Proteinen hat viel für das moderne Verständnis der Rolle und Wirkungsweise von Komplement im menschlichen Organismus beigetragen. So nimmt man heute an, dass das Krankheitsbild in SLE auf eine Fehlfunktion bei der Beseitigung von Immunkomplex-Aggregaten zurückzuführen ist, und dass das Fehlen jeglicher Komponenten des klassischen Wegs oder der C3 Aktivierung, der Auslöser dafür ist. Die ungehinderte Ablagerung großer Ag-AK Aggregate in der Niere und an den Gefäßwänden der Haut, den Muskeln und anderer Gewebe würde demnach Verletzungen der betroffenen Regionen hervorrufen, die durch weitere inflammatorische Reaktionen amplifiziert werden. Die biologische Bedeutung von Komplement und aller drei Aktivierungswege, den menschlichen Organismus vor humanpathogenen Mikroorganismen zu schützen, wird v.a. dann deutlich, wenn man sich die starke Anfälligkeit der betroffenen Individuen für teilweise lebensbedrohliche, mikrobielle Infektionen vor Augen führt.

Weitreichende Erkenntnisse hat man sich von Untersuchungen am Mausmodell erhofft, in denen auch Gene regulatorischer Komplementproteine ausgeschaltet werden (Knock out). Beispielsweise wurde in diesem Modell eindeutig der Zusammenhang zwischen der unkontrollierten C Aktivierung aufgrund eines Faktor H Gen-Knock Out und der Entwicklung des MPGN gezeigt (Pickering *et al.*, 2002).

1.6.7 Hämolytisch Urämisches Syndrom und Faktor H

HUS ist gekennzeichnet durch Verletzungen kleiner Gefäße des Nierenepithels (Mikroangiopathie), anemischer Erythrozytopenie (fragmentierte Blutkörperchen) und einer massiven Verringerung Blutthrombozyten (Thrombozytopenie). In schweren Fällen führen die Schädigungen der Niere zu akutem Nierenversagen. Generell kann HUS in zwei Grundformen eingeteilt werden, zum einen in den sog. Diarrhoe assoziierten Typ (D+), zum anderen in die sporadische, atypische Form (D-) des HUS (Kaplan & Drummond, 1978). Als einer der ersten Schritte in der Pathogenese des HUS gelten Veränderungen am Nierenendothelium, die eine Exposition der subendothelialen Basalmembran hervorrufen und einen lokal begrenzten prothrombotischen Zustand generieren. Obwohl auch hier detaillierte Kenntnisse über die molekularen Zusammenhänge fehlen, beruhen die primären Schädigungen des Nierenendothels in der D+ Form auf einer vorangegangenen Infektion der Patienten mit Enterotoxin (Shigella-Toxin-artig, Stx) produzierenden Bakterien (Kaplan *et al.*, 2001), wie Shigella dysenteria und enterohemorrhagischen E.coli Stämmen (E.coli H0157). HUS Fälle, in denen bakterielle Enterotoxine nicht nachgewiesen werden können, werden dem atypischen Typ zugeordnet. In dieser äußerst heterogenen Patientengruppe ist der auslösende Faktor für die beobachteten Endothelschäden unklar. Daraus resultiert die diffuse Klassifizierung in dieser HUS Form. Denn als primäre Auslöser des atypischen HUS gelten u.a. chemotherapeutische Medikamente, Schwangerschaft oder transplantative Eingriffe (Trachtman & Kaplan, 2001). Lange wurde über einen möglichen Gendefekt diskutiert, der betroffene Individuen anfällig für die Ausprägung eines atypischen HUS machen könnte. Erschwerend für die Suche dieser genetischen Grundlage ist nicht nur die teilweise diffuse Klassifizierung des HUS, sondern auch die Schwierigkeiten dieses Syndrom aufgrund der überlappenden klinischen Merkmalsausprägung, von der sog. Thrombozytisch Thrombozytoseh Purpura (TTP) zu unterscheiden. Im TTP überwiegen jedoch Schädigungen neuronaler Gewebe. Eine Assoziation des TTP mit Störungen im Blutgerinnungssystem, v.a. Defekten in der von-Willebrand-Faktor (vWf) Serin Protease (ADAMTS13), und somit die Identifizierung eines Markergenes für das TTP ist bisher noch nicht eindeutig (Remuzzi *et al.*, 2002a; Galbusera *et al.*, 2002). HUS assoziierte Störungen im Komplementsystem waren durch die beobachteten erniedrigten C3 Serumspiegel in einigen Patienten bereits indikativ, doch erst 1998/99 gelang es in Familienstudien von Warwicker *et al.* und Noris *et al.* Mutationen im Faktor H Gen mit dem Syndrom zu verbinden und den Verbrauch an intaktem C3 auf die ungehinderte C3 Aktivierung zurückzuführen. In der atypischen Form des HUS zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit und anderer Studien, dass Mutationen im Faktor H Gen in einer Untergruppe der Patienten mit der Krankheit assoziiert werden können (Noris *et al.*, 1999; Warwicker *et al.*, 1999; Caprioli *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2001; Zipfel *et al.*, 2001; Perez-Caballero *et al.*, 2001a). Eine Bezeichnung als FH assoziiertes HUS wurde für diese Form mittlerweile vorgeschlagen (Caprioli *et al.*, 2001). Im allgemeinen wird in der familiären Form des FH assoziierten HUS ein heterozygot, rezessiver Erbgang angenommen. Eine Ausnahme findet sich in einer gut untersuchten Beduinen Familie, in der die

24 bp Deletion in Exon 23 in Homozygotie vorliegt (Caprioli *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2001). Die bisher identifizierten Faktor H Mutationen beinhalten Frameshift-Mutationen, die zu vorzeitigen Stop Codons führen, Missense-Mutationen oder Deletionen. Weit häufiger finden sich jedoch Punktmutationen, die zur Substitution einzelner Aminosäuren führen. In den genannten Familienstudien wurde zudem eine Häufung der HUS assoziierten Punktmutationen in Exon 23 beobachtet, das für die C-terminale Domäne SCR 20 codiert. Hier liegen die erstbeschriebenen Punktmutationen, die zu dem Austausch R1210C und R1215G führen (Warwicker *et al.*, 1999; Caprioli *et al.*, 2001). Neben weiteren Punktmutationen in Exon 23, die bisher lediglich in einzelnen Patienten identifiziert wurden, ist die Substitution R1210C mittlerweile an fünf, der R1215G an drei und ein R1215Q Austausch an einem Patienten in unabhängigen Studien beschrieben worden (Warwicker *et al.*, 1998; Furlan *et al.*, 1998; Caprioli *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2001; Perez-Caballero *et al.*, 2001a). Aus diesen Untersuchungen geht eine andere Mutationshäufung hervor, die die Aminosäure Valin an Position 1197 der primären Faktor H Sequenz betrifft. In drei Fällen führt die Punktmutation zu einer Substitution des Valin 1197 mit Alanin, in einem Fall ist der Patient heterozygot für diese Mutation und das Faktor H Gen des zweiten Allels ist nicht mehr vorhanden (Null-Allel). Eine funktionelle Ausprägung der genannten Faktor H Mutationen wurde bisher noch nicht gezeigt. Darüberhinaus bleibt die physiologische Konsequenz für die Regulation des Komplement, die sich aus mutierten Faktor H Formen ergibt, und ihre Ausprägung in dieser Form des HUS noch ungeklärt.

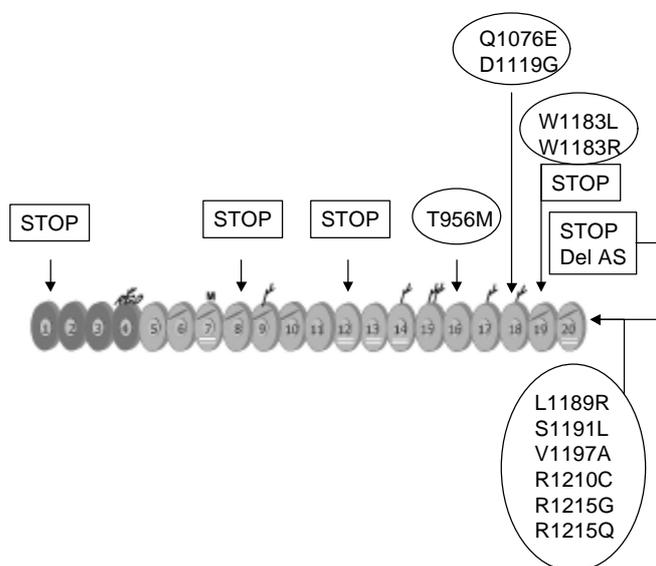


Abb.1.4: Übersicht der bekannten HUS assoziierten-Faktor H Mutationen

Die bekannten Deletionen, Missense und Punktmutationen im Faktor H Gen sind in der schematischen Darstellung des Proteins (vgl. Abb. 1.4) in ihrer Konsequenz wiedergegeben. Das wiederholte Vorkommen einzelner Mutationen ist in der Grafik nicht berücksichtigt. Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch in der Transkription führen, sind ebenso dargestellt (STOP) wie der Verlust einzelner Aminosäuren (Del AS).

1.7 Zielsetzung

Die inhibitorischen, Komplement-regulativen Eigenschaften des Faktor H beruhen zum einen auf der Interaktion des Proteins mit dem zentralen Komplement Molekül C3 als auch maßgeblich auf seiner Fähigkeit an negativ geladene Moleküle zu binden, die auf autologen Zellmembranen exponiert sind oder Bestandteil der extrazellulären Matrix sind. Bisher noch nicht geklärt ist allerdings, in welcher Form die beschriebenen funktionellen Eigenschaften des Moleküls von jeder einzelnen der bereits identifizierten Bindungsregionen abhängt. Indikativ für eine besondere Bedeutung des C-terminus für die Funktionsausübung des Faktor H war zu Beginn der vorliegenden Studie das Auftreten von zwei Faktor H Mutationen, die sich auf das C-terminale SCR 20 des Moleküls auswirken und in Patienten mit Hämolytisch Urämischem Syndrom beobachtet wurden.

Insgesamt elf monoklonale Antikörper (mAK) wurden bezüglich ihrer Bindung an das Faktor H Protein charakterisiert. Damit sollten nützliche Werkzeuge entwickelt werden, die ihren Nutzen in späteren Funktionsanalysen und Untersuchungen des Faktor H in Patientenserum fanden.

Unter Verwendung der mAK sollte in Bindungsstudien erstmals experimentell untersucht werden, ob dem C-Terminus des Faktor H eine besondere Bedeutung für die Ausübung seiner bindenden Eigenschaften an das C3b Molekül und an Heparin zufällt. In Studien am Serum Faktor H von HUS Patienten sollte eine mögliche Assoziation von Faktor H Defekten mit dem Syndrom geklärt werden. Dies geschah mithilfe von Western Blot Analysen des Serums der Patienten um Veränderungen im Faktor H Protein identifizieren zu können. Die Bedeutung der beschriebenen Punktmutationen, die zu den Substitutionen R1210C und R1215G in SCR 20 des Faktor H führen, sollte anhand von funktionellen Studien mithilfe rekombinanter Faktor H Proteine ermittelt werden.

In diesen Untersuchungen sollte erstmals experimentell die funktionelle Relevanz von Faktor H Defekten für die Pathogenese des Syndroms aufgedeckt werden und darüber hinaus neue Erkenntnisse über die funktionellen Eigenschaften des Faktor H Moleküls gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Allgemein. Die nicht gesondert aufgeführten, verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden im Reinheitsgrad zur Analyse von den Firmen Biomol (Hamburg), Merck (Darmstadt), Amersham Biosciences (Freiburg), Sigma (Sigma-Aldrich Vertriebs-GmbH, Dreisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen. Für Klonierungen wurden verwendet: Taq-Polymerase, Restriktionsenzyme und dNTP-Mix der Fa. Amersham Biosciences (Freiburg); pCR[®]2.1 TOPO TA-Vektor und Sequenzierungsprimer rM13 (Reverse Primer) und fM13 (-20) (Forward Primer) der Fa. Invitrogen (Karlsruhe); PBSV-8 HIS Vektor, (Kuhn & Zipfel, 1995); Site-directed-Mutagenese Kit (Stratagene Europe, Amsterdam NL); Oligonucleotidprimer für die Mutagenese und Sequenzierungsprimer für den PBSV-8-HIS Vektor hergestellt durch die Fa. GeneScan (Big Biotech, Freiburg); 1:1 Markermix der Marker λ Hind III und ϕ X174 Hae III RF-DNA (Eurogentec Deutschland). Als Längenstandard für Proteine in der SDS-PAGE wurde Benchmark[™] (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Puffer und andere wässrige Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt und ggf. bei 121 °C und 2×10^5 Pa 20 min. autoklaviert. PCR Reaktionen wurden in 0.2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym, Hamburg), Reaktionen in Volumina bis zu 2 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg) mit einem Fassungsvermögen von 1,5 bzw. 2 ml durchgeführt. Für die Zellkultur wurden Kulturflaschen, Zellschaber, Pipetten, Sterilfiltereinheiten und LabTekII Kammern von Nalge-Nunc-International/Life Technologies[®] (Nunc[™] Brand Products) und Falconröhrchen von Greiner verwendet. Zentrifugationen erfolgten in Eppendorf-Tischzentrifugen (Modell 5415C) oder Beckman CPKR Zentrifugen. Photometrische Messungen wurden an einem Eppendorf-Biophotometer durchgeführt. Die PCR Reaktionen wurden in dem Gene-Amp-PCR-System 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) durchgeführt. Verwendete Kleingeräte waren: Thermoblock (Thermomixer 5436, Eppendorf); Heizmagnetrührer IKAMAG[®]RET-GS und Whirlgerät IKA-VIBRO-FIX VF2 (Jahnke & Kunkel GmbH & Co. KG); Rollenmischgerät RM 5 (Tamel-Rollenmischer, Karl Hecht Assistent GmbH); Schüttelgeräte (Unimax 2010, Heidolph); Gelrockner (SlabGel Dryer SG 4050, Savant) und Gelrocknungsrahmen (Roth GmbH). Für die Gelelektrophorese verwendete Geräte und Materialien waren: Netzgeräte der Fa. Consort (Turnhout, Belgien), Biometra GmbH (Göttingen) und Amersham Biosciences (Freiburg); Zubehör für Protein- oder DNA-Gele sowie Blottingapparaturen der Fa. Biometra GmbH; DotBlot-Apparatur, WhatmanBlotting Papier und Protran Blotmembran der Fa. Schleicher und Schüll (Dassel)

Antikörper. Als Primäntisera wurden polyklonales Ziege-anti-human-FH-Antiserum (Calbiochem, San Diego, Ca.), polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen den N-Terminus (anti-SCRs 1-4) und C-Terminus (anti-SCRs 19-20) des humanen Faktor H Proteins verwendet. Desweiteren standen insgesamt 11 monoklonale Mausantikörper (E22, B22, D10, E20, C21, L04, H04, T13, L20, E14 und C18) zur

Verfügung, die in ELISA basierten Untersuchungen eine Spezifität gegenüber humanen Faktor H zeigen. Sieben mAK (E22, B22, C21, H04, T13, L20 and C18) sind der IgG 1 Unterklasse zugeordnet, ein mAK (E20) ist vom IgG2a und einer (E14) vom IgA Typ. Die Antikörperklasse der mAK D10 und L04 ist nicht bekannt. Alle mAK wurden an der Universität Göttingen, Institut für Immunologie (Arbeitsgruppe M. Oppermann, Leitung O. Götze) generiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Bindungsstellen innerhalb des Faktor H Moleküls für neun der mAK auf Ebene einzelner SCR Domänen identifiziert. Als Sekundärantikörper dienten: HRP-konjugiertes Schwein-anti-Kanninchen, Ziege-anti-Maus und Kanninchen-anti-Ziege Antiserum (Dako), Alexa-Fluor 488 konjugiertes Ziege-anti-Maus und Esel-anti-Ziege Antiserum (Molecular Probes), FITC konjugiertes Ziege-anti-Maus (F_{ab} Fragment) Antiserum (Dako).

Humanes Serum. Im Rahmen der DFG geförderten Kooperation mit der klinischen Gruppe um Prof. Neumann (Universitätsklinikum Freiburg) wurde ein deutschlandweites Register für HUS Fälle erstellt. An zahlreichen klinischen Einrichtungen wurden Blutproben von gesunden Individuen und HUS Patienten in Standard-Monovetten entnommen, und zur FH Analyse an unsere Arbeitsgruppe verschickt. Aus den Proben wurde Citrat oder EDTA-Serum durch Zentrifugation (3000g, 15 min.) gewonnen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Desweiteren standen Serumproben von HUS Patienten zur Verfügung, die am Mario Negri Institut in Bergamo (Italien) registriert und in einer umfangreichen Mutationsstudie bereits auf genetische Defekte im FH Gen untersucht worden waren. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Analysen für zwei Patienten (F106 und F34) durch funktionelle Studien an dem Patientenserum und rekombinant gewonnenen FH Mutanten erweitert. Beide Patienten sind heterozygot für einen einzelnen Nucleotidaustausch in Exon 23 des FH Genes (SCR 20 im nativen Protein), der in Patient F106 zu einer Substitution von Arginin in ein Cystein führt (R1210C), bei Patient F34 den Argininrest an Position 1215 der Aminosäuresequenz mit einem Glycinrest ersetzt (Noris *et al.*, 1999; Caprioli *et al.*, 2001).

Allgemein verwendete Puffer, Medien und Lösungen. Die nicht gesondert aufgeführten verwendeten Zusammensetzungen der Puffer, Medien und Lösungen waren DNA-Probenpuffer nach Sambrook *et al.* (1989; 0,25 % (w/v) Bromphenol, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerol in H_2O), PBS-Puffer verändert nach Manniatis (1989; 3,3 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 6,7 mM Na_2HPO_4 , 145 mM NaCl, pH 7,2), SDS-Elektrophoresepuffer nach Manniatis (1989; 3,04 g Trisbase, 1,0 g SDS, 14,4 g Glycerin ad 1 l ddH_2O), SDS-Probenpuffer nach Manniatis (1989, 5x; 125 mM Trisbase, 5 % SDS, 50 % Glycerin, 1 mg Bromphenolblau, 40 mg Orange G ad 100 ml ddH_2O , pH 6,8), TBE nach Manniatis (1989; 1 M Tris, 1 M Borsäure, 25 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (Titriplex[®]III), pH 8,0); LB-(Luria-Bertani)-Medium (10 g tryptisch verdautes Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l ddH_2O), bei der Herstellung von LB-Nährböden mit einem Zusatz von 15 g Kobel-Agar (Difco, Detroit, USA); für Amicillin-Selektion (LB-Amp-Medien) mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin. Den Nährmedien für die Insekten- u. Mammaliazellkultur wurden FKS (Fa.

PAA) und Penicillin, Streptomycin, Fungizone und L-Glutamin der Fa. BioWhittaker Europe (Apen, Deutschland) zugesetzt.

Text- und Bildverarbeitung. Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Windows 98 und Windows NT Betriebssystem mithilfe des Microsoft Word 2000 Professional Programmes erstellt. Eingescannte SDS-Gele und Proteinblots wurden mithilfe der Adobe Photoshop 5.0 Ltd Edition und der Microsoft Powerpoint 2000 Professional Software für die Erstellung der graphischen Abbildungen bearbeitet. Die referierte Literatur wurde mithilfe der RefManager 9.0 Software katalogisiert.

2.2 Methoden

Molekularbiologische und proteinchemische Standardmethoden richten sich im allgemeinen nach den Verfahren, die in den Sammlungen „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausuble *et al.*, 1994), „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols of Immunology“ (Coligan *et al.*, 1994) beschrieben sind.

2.2.1 Zellbiologische Arbeiten

Insektenzellkultur. Rekombinante Faktor H Proteine wurden mithilfe des Baculovirus-Expressionssystem in Sf9 Insektenzellen (Intestinalzellen von *Spodoptera frugiperda*; Invitrogen) exprimiert (Kuhn & Zipfel, 1995). Die Sf9 Zellen wurden bei 27°C in Insect-X-Press™ Medium (BioWhittaker Europe, Apen) in adherenter Kultur gehalten. Das Kulturmedium war mit 4% fötales Kälberserum (FKS), Penicillin (100u/ml), Streptomycin (100µg/ml) und Fungizon (250ng/ml) angereichert. Zur Expression rekombinanter Proteine und Gewinnung von Virusstocklösungen wurden die Insektenzellen in FKS-freiem Kulturmedium mit rekombinanten Viren bei einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 5-7 infiziert. Rekombinante Faktor H Fragmente wurden mit dem Überstand der infizierten Zellen nach einer Inkubation von 3-5 Tagen gewonnen oder der mit Viren angereicherte Überstand (Virenstock) nach 5-8 Tagen.

Mammaliazellkultur. Adherente Kulturen humaner Endothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC; American Type Culture Collection) wurden bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Medium (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) unter Zusatz von 10% FKS, Penicillin (100u/ml), Streptomycin (100µg/ml), Fungizone (250ng/ml) und L-Glutamin (1x) in 140 mm Zellkulturflaschen (Nunc) gehalten. Die Zellen wurden mithilfe einer sterilen 0.01% EDTA/PBS Lösung von der Oberfläche der Kulturflaschen abgelöst. Die HUVEC erhielten mind. 24h vor ihrer Verwendung in Immunfluoreszenz oder FACS Analysen FKS-freies DMEM-Medium (Fa. Invitrogen, Karlsruhe).

2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Klonierung der Faktor H Deletionsmutanten, Plasmidaufreinigung, DNA-Sequenzierung. Faktor H Plasmide, die kodierende cDNA Sequenzen für diverse Faktor H Fragmente in dem Expressionsvektor PBSV-8-HIS enthalten, wurden für die vorliegende Arbeit bereitgestellt. Die Generierung und Klonierung

der Faktor H Deletionsmutanten FH SCRs 1-2, SCRs 1-3, SCRs 1-4, SCRs 1-5, SCRs 1-6, SCRs 1-7, SCRs 8-11, SCRs 11-15, SCRs 8-20, SCRs 15-20, SCRs 15-18 und SCRs 19-20 ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Kuhn *et al.*, 1995; Prodingler *et al.*, 1998; Hellwage *et al.*, 1999). Die Transformation der kompetenten *Escherichia coli* Stämme DH5 α mit rekombinantem Plasmid erfolgte nach Standardmethoden (Dagert & Ehrlich, 2001). Der XL1 Blue E. coli Stamm wurde kompetent erworben (Stratagene Europe, Amsterdam NL). Plasmid DNA wurde mithilfe der alkalischen Lyse im MiniPrep-Kit-Verfahren (Qiagen GmbH, Hilden) gewonnen. Für alle in der Arbeit erfolgten Subklonierungen wurde der pCR[®]2.1-TOPO TA Vektor benutzt, bevor durch Restriktionsverdau oder durch PCR die Zielsequenzen in den Expressionsvektor PBSV-8HIS inseriert wurden. PCR Ansätze wurden mithilfe des „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. Der Gesamt-DNA-Gehalt wurde photometrisch bei 260nm bestimmt. Ligationen in den PBSV-8-HIS Expressionsvektor erfolgten mithilfe der T4 Ligase (Roche GmbH, Deutschland). Für Subklonierungen von PCR-Produkten in den „TOPO TA Cloning Vektor pCR[®]2.1-TOPO“ wurden mit dem „TOPO TA Cloning[®] Kit“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers 1 μ l PCR-Produkt und 1 μ l Vektor für 5 min bei RT (22-23°C) ligiert. Das Ergebnis der Ligation wurde elektrophoretisch überprüft. Allgemein wurden zur Kontrolle des Klonierungserfolges die DNA-Proben, vor oder nach einem Restriktionsverdau, elektrophoretisch in 1% Agarosegelen getrennt und die DNA nach der „Cycle-Sequenzierungs“-Methode mit dem „PRISM[™] Kit, das „BigDye Terminator“ mit „AmpliTaq[®]-Polymerase, FS“ enthält, überprüft. Für die Subklonierungsprodukte im pCR[®]2.1-TOPO-Vektors wurden die Sequenzierungsprimer M 13 Reverse Primer (Invitrogen) und M 13 (-20) Forward Primer (Invitrogen) verwendet. Die Echtheit der Faktor H Sequenz der PBSV-8-HIS Klone wurde mit vektorspezifischen Primerpaaren überprüft:

Forward:

PBSV-8-HIS (+269 polh) 5` TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTT 3`

Reverse:

PBSV-8-HIS (-44polh) 5` TTCCATCCAACGACAAGCTTCA 3`

Für den Reaktionsansatz der Kettenabbruchsreaktion wurden 1 μ g DNA, 4 μ l „BigDye Ready-Reaction-Mix“ (beinhaltet „AmpliTaq[®]-Polymerase, FS“, thermostabile Pyrophosphatase, dNTP, dITP, BigDye-markierte ddNTP), 10 pmol Primer mit HPLC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l gebracht. Die Kettenabbruchsreaktion („BigDye-Terminator“-Reaktion) erfolgte im Gene-Amp-PCR-System 9600 (Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) in 25 Zyklen, die jeweils aus 10 sec Denaturierung bei 94°C, 5 sec Hybridisierung bei 50°C und 4 min Extension bei 60°C bestanden. Die Reaktionsprodukte wurden mit 80 μ l HPLC-H₂O in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, durch Zugabe von 10 μ l 3M NaAc (pH 4,6) und 250 μ l absolutem Ethanol gefällt und sofort für 15 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 250 μ l 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15 min bei 14000 rpm und RT). Nach vollständigem Entfernen des Alkohols wurde das Pellet für 10 min im Thermoblocker bei 37°C getrocknet und anschließend bei -20

°C eingefroren. Alle Sequenzvergleiche mit der humanen Faktor H cDNA Sequenz (Weis *et al.*, 1987; Ripoche *et al.*, 1988) wurden über das Blast-Verfahren (Altschul *et al.*, 2003) durchgeführt. Die humane cDNA Sequenz für Faktor H ist unter der Medline „Accesion“ Nummer NM_000186 GI:4504374 aufgeführt.

2.2.3 Klonierung der Faktor H HUS-Mutanten

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren drei Faktor H Punktmutationen in HUS Patienten beschrieben, die jeweils zu einem einzelnen Aminosäure Austausch in SCR 20 führen. Eine ursprünglich von Ying (Ying *et al.*, 1999) beschriebene Punktmutation in Exon 23 des Faktor H Genes, wurde kurz darauf korrigiert und als Mutation des FHR-1 Genes identifiziert (Buddles *et al.*, 2000). Die zweite Substitution betrifft einen Argininrest an Position 1210 in SCR 20 des Faktor H, der aufgrund der vorliegenden Punktmutation in Exon 23 (3701C/T) durch ein Cystein ersetzt ist. Diese Mutation wurde bisher bereits in 5 HUS Patienten, die nicht miteinander verwandt sind und aus unterschiedlichen Regionen stammen, identifiziert (Warwicker *et al.*, 1999; Caprioli *et al.*, 2001; Galbusera *et al.*, 2002). Die dritte Punktmutation (3716C/G Transition) betrifft den Argininrest an Position 1215, das durch Glycin substituiert wird (Warwicker *et al.*, 1998). Diese Mutation konnte in 2 weiteren HUS Patienten nachgewiesen werden, ebenso wie ein Arg1215Glu Austausch (Caprioli *et al.*, 2001). Die erwähnten Substitutionen R1210C und R1215G wurden mithilfe der site-directed-Mutagenese in ein FH Fragment, bestehend aus den SCRs 8-20, inseriert.

Site-directed-Mutagenese. Es wurden spezifische Faktor H Primer hergestellt, die die Nucleotid Substitutionen für R1210C oder R1215G beinhalten. Für die Mutagenese PCR wurden jeweils 125 ng der einzelnen Primer verwendet. Die Oligonucleotidsequenzen waren wie folgt:

Vorwärts:

F-R1210C 5' CGTCTTTCATCA TGT TCTCACACATTGCGAACAAC 3',

F-R1215G 5' CGTTCTCACACATTG GGA ACAACATGTTGGGATGGG 3',

Revers:

R-R1210C 5' CGCAATGTGTGAGAACATATGATGAAAGACGATATCC 3',

R-R1215G 5' CAGTTTCCCATCCCAACATGTTGT TCC CAATGTGTG 3'

Als Template für die Mutagenese-PCR, die zur Generierung der mutierten FH Sequenz diente, wurde ein Konstrukt aus der FH Sequenz für die SCRs 8-20 und dem TA Klonierungsvektor verwendet. Nach 14 Zyklen (30 s Denaturierung bei 95 °C, 60 s Annealing bei 55 °C, 15 min Extension bei 68 °C) wurde die methylierte Template DNA mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut (1h, 37°C). Anschließend wurden XL1-Blue superkompetente Zellen mit je 1-3µl des verdauten PCR Ansatzes transformiert und auf Agarmedium ausplattiert. Die Selektion positiver Transformanten wurde durch eine erworbene Ampizillinresistenz vermittelt. Die Plasmid DNA der Übernachtskulturen ampizillinresistenter Klone wurde isoliert und mithilfe einer Kontrollrestriktion mit den Endonucleasen PST I und Sma I auf die Insertion der FH Sequenz überprüft. Bei entsprechendem Restriktionsmuster wurde das FH Insert mithilfe

der TA-Vektor spezifischen Primer M13 forward und reverse sequenziert. Plasmid DNA, die die mutierte Sequenz enthielt, diente als PCR-Template für die Umklonierung in den Expressionsvektor PBSV-8-His. Auch hier wurden die vektorspezifischen Primer zur Amplifizierung der mutierten Sequenz verwendet. Die PCR wurde nach 25 Zyklen (30 s Denaturierung bei 95 °C, 60 s Annealing bei 52 °C, 1.5 min Extension bei 72 °C) beendet, und die generierte DNA gereinigt (PCR Purification Kit, Quiagen). Über einen Restriktionsverdau mit PST I und Sma I wurden die mutierten FH Sequenzen anschließend in den Expressionsvektor PBSV-8-HIS umkloniert. Die Echtheit der Faktor H Sequenz wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft.

2.2.4 BaculoSystem zur Expression rekombinanter Proteine in der Insektenzellkultur

Die Sf9 Insektenzellen wurden zunächst mit der linearisierten BaculoGold™-DNA (Pharmingen Europe) und dem Expressionsvektor PBSV-8-HIS, der die codierenden Sequenzen für die SCRs 8-20 oder eine der mutierten Sequenzen enthielt, kotransfiziert (Kuhn & Zipfel, 1995). Um die homologe Rekombination zwischen dem linearisierten Baculo-Konstrukt und dem Vektor zu gewährleisten, wird die Faktor H DNA im PBSV-8-HIS Vektor von der viralen Polyhedrin-Sequenz flankiert. Die Kotransfektion mit 2µg Plasmid DNA und 2.5µg Baculo-DNA erfolgte über 4-5h in Petrischalen, bei einer Konfluenz der Insektenzellen von ca. 80%. Der erste Transfektionsüberstand wurde nach 4-5 Tagen geerntet und zur Infektion neuer Insektenzellen benutzt. So wurde innerhalb von 2-3 Wochen der Virustiter angereichert und der erhaltene Viren-Stock konnte für die Proteinexpression verwendet werden. Der Expressionsvektor PBSV-8-HIS ist mit der Signalpeptidsequenz des FH Genes als auch mit einem poly-Histidin-Schwanz (C-Terminus des Zielproteins) ausgestattet. Dies hat zur Folge, dass die rekombinanten Proteine von den Insektenzellen sekretiert werden und über die zusätzlichen acht C-terminalen Histidin-Reste aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden können.

2.2.4 Proteinchemische Standardmethoden

SDS-PAGE, Silberfärbung (Heukeshoven & Dernick, 2001) und Western Blotting (Kuhn *et al.*, 1995). Dieses Verfahren diente zur Kontrolle der Insektenzell-Expression rekombinanter Faktor H Proteine, zur Überprüfung der Proteinpräparationen nach vorangegangener Affinitätschromatographie als auch der Charakterisierung der Faktor H Bindungsstelle von insgesamt elf monoklonalen Antikörpern. Hierfür wurden Zellkulturüberstände oder aufgereinigte Proteinfractionen in 10-12% SDS-Gelen unter nicht reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt. Die elektrophoretische Auftrennung humanen Serums (je 1µl Serum gelöst in PBS pH 7.2), die für die Analyse der mAK Reaktivität als auch für die Untersuchungen an HUS-Patientenmaterial erfolgte, wurde in 5-10% SDS-Gelen durchgeführt. Die Proteinbanden wurden entweder mit Silbernitrat (1g/ml AgNo₃) angefärbt oder über ein Halb-Trocken Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran, Schleicher und Schüll) gebロットet. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mit 3% BSA/PBS geblockt (30 min., Raumtemperatur), bevor die Inkubation mit Primärantikörper über Nacht bei 4 °C erfolgte. Für vergleichende Studien wurde das Antigen (humanes Serum oder rekombinante Faktor H Fragmente) in

größere Geltaschen geladen, und nach dem Transfer auf die Nitrozellulose-Membran wurde diese in einzelne Streifen geschnitten. Jeder Streifen wurde daraufhin mit einem individuellen AK inkubiert. Die verwendeten polyklonalen FH-Antisera sind zum einen gegen das gesamte FH Molekül (Ziege anti-human FH, Calbiochem), das FHR-4 Protein (Kanninchen-anti-FHR-4) als auch gegen den n-terminalen Teil und die c-terminalen SCRs 19-20 (Kanninchen anti-1-4 bzw. 19-20) des Faktor H Proteins gerichtet und wurden in Verdünnungen von 1:1000-1:3000 eingesetzt. Monoklonale Maus-Antikörper wurden 1:100-1:10000 in Blockpuffer verdünnt. Die Inkubation der Membran mit den HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte für 2 h bei RT, bevor die Proteinbanden nach Zugabe der Peroxidase Substrate 0.3 % (w/v) 4-chloro-1-naphthol und 1 % (v/v) Wasserstoffperoxid angefärbt wurden.

Dot Blotting und SDS-PAGE mit modifizierten Proben. Im Dot Blotting Verfahren wurden 100-250 µl des Kulturüberstandes der Insektenzellen, die Faktor H Fragmente exprimieren und sekretieren, durch den angelegten Vakuumdruck in der Dot Blotting Kammer (Schleicher und Schüll) auf eine Nitrozellulose Membran gespottet. Zur Detektion der Faktor H Proteine wurde mit der Membran, wie für das Western Blotting beschrieben, verfahren.

Für die Analyse der Faktor H Proteine in Patientenseren erfolgte eine elektrophoretische Trennung im SDS-PAGE Verfahren auch unter reduzierenden Bedingungen. Die Reduktion der Cysteine in 30-40 µl der aufgereinigten Serumproben erfolgte für 5 min bei 95 ° C in einer PBS-Lösung mit 0.1 M DTT (Endkonzentration 0.05 M) und 0.5 % SDS (Endkonzentration 0.25 %). Für eine Reduktion der Cysteine in den unbehandelten, nicht aufgereinigten Serumproben wurde eine 1:10 Verdünnung von 1-2 µl des Serums in 8-9 µl PBS benutzt. Eine zusätzliche Beseitigung der N-gekoppelten Kohlehydratketten von den Faktor H Proteinen, erfolgte über Nacht bei 30° C. Die reduzierte Probe wurde dafür in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit in einer PBS-Lösung aus Proteinase Inhibitoren (Tabletten, Fa. Sigma), Triton X 100 (Endkonzentration 0.01%) und dem Enzym Glykosidase F (Fa. Amersham-Pharmacia, Endkonzentration 0.5 %) verdünnt. Die Enzymaktivität der Glykosidase F wurde für 3 min bei 99 °C inhibiert, bevor die Proben elektrophoretisch getrennt wurden.

Ni-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung rekombinanter FH Proteine. Alle FH Proteine die mit Hilfe des Expressionsvektors PBSV-8-HIS in Insektenzellen produziert wurden, sind am C-terminus mit insgesamt acht Histidin-Resten ausgestattet. Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus dem Zellkulturüberstand mittels Ni-Chelat-Chromatographie erfolgte im Batch-Verfahren (Kuhn & Zipfel, 1995). Die Nickel-Agarose (Invitrogen) wurde zunächst mit 5M Ni-SO₄ Lösung beladen und daraufhin mit 5mM Imidazol/Tris-HCl äquilibriert. Die Bindung der Proteine erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach mehreren Waschschritten mit ansteigender Imidazolkonzentration (30 mM und 60 mM) wurde mit 500 mM Imidazol/Tris-HCl eluiert. Die Aufreinigung der rekombinanten HUS-Mutanten erfolgte bei 4 °C und höherer Stringenz des Äquilibrierungspuffers, der bereits 60mM Imidazol enthält.

Probenaufarbeitung: Dialyse, Konzentration und Proteinbestimmung. Für weiterführende Untersuchungen wurden Ni-aufgereinigte Proteine und Proteinproben, die in funktionellen Studien (siehe dort) eingesetzt wurden, in einen physiologischen Puffer (1x PBS) oder den entsprechenden

Bindungspuffer umdialysiert werden. Die Proteine wurden entweder mit Hilfe eines Dialyseschlauches (Spectra-Por, Roth VertriebsGmbH) unter mehrfachem Austausch des Dialysepuffers, oder bei geringen Probenmengen im Säulenverfahren (PD-10-Säulen, Amersham Biosciences) entsalzt. Wenn nötig, wurde das Probenvolumen mit Hilfe von Zentrifugations-Säulen (Millipore) eingengt. Insbesondere für die funktionellen Studien war die Bestimmung des Proteingehalts der Proben erforderlich. Der Gesamtproteingehalt wurde photometrisch bei 280 nm oder über die Bradfordreaktion bestimmt. Zu vergleichende Proteinproben wurden zusätzlich elektrophoretisch getrennt und die Bandenstärken als Maß des spezifischen Proteingehaltes im silbergefärbten Gel semiquantitativ bestimmt.

Analyse monoklonaler AK: Epitope Mapping: Pepscan Technique™

Für die drei mAK L20, E14 und C18 wurde die distinkte Bindungsstelle innerhalb der SCRs 19 und 20 auf die Ebene der Aminosäuresequenz eingegrenzt. Dies geschah über einen Fest-Phasen-Assay, der sog. "epitope mapping technique" der Fa. Pepscan Systems (Niederlande). Die Peptidsynthese und das eigentliche lineare Screening der Antikörper-Oligopeptid-Bindung wurden von Pepscan System durchgeführt. Es wurden 123 Peptide mit einer Länge von 12 Aminosäuren entsprechend der Faktor H Sequenz für die SCRs 19 und 20 synthetisiert, die jeweils um eine Aminosäure progressieren. Cystein Reste wurden durch Serin ersetzt, um unspezifische Reaktionen zu minimieren. Die Bindung der Antikörper an die Peptide wurde photometrisch ermittelt.

2.2.5 Funktionelle Studien

Oberflächen Plasmon Resonanz Studien. Eine sensitive Messung von Protein-Protein-Interaktionen erfolgte mithilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik (engl. surface plasmon resonance) unter Verwendung eines Biacore 3000 Biosensors (Biacore AB, Freiburg) in Zusammenarbeit mit Dr. J. Hellwage (NWG Molekulare Immunbiologie, Hans-Knöll-Institut, Jena). Diese Technik wurde zum einen für die Untersuchung der inhibitorischen Wirkung monoklonaler Antikörper (mAK), die im N-Terminus (mAK B22) oder im C-Terminus (mAKs L20, E14, C18) des FH Moleküls binden, auf die Bindungskapazität von FH an C3b verwendet, zum anderen wurden die Interaktion des Wildtyp Faktor H Fragmentes SCRs 8-20 und der beiden HUS Mutanten (R1210C und R1215G) mit immobilisiertem C3b und C3d analysiert. Für beide Untersuchungen wurden die C3-Fragmente C3b oder C3d über eine Standard-Amin-Kopplungsmethode auf einem Sensor (Carboxymethylierter Dextran Chip CM5, Biacore AB) immobilisiert (Jokiranta *et al.*, 2001). Zunächst wurden zwei Flußzellen durch Injektion einer Mischung von *N*-hydroxyl-succinimid und *N*-ethyl-*N'*-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid (NHS-EDC) aktiviert und C3b oder C3d (50 µg/ml, dialysiert gegen 10mM Na-Acetat-Puffer, pH 5.5) in die erste Zelle injiziert bis eine Menge von circa 4000 Resonanzeinheiten immobilisiert war. Freie reaktive Gruppen wurden durch Zugabe von Ethanolamin/HCl inaktiviert. Die Referenzzelle wurde auf die gleiche Weise vorbereitet, wobei der Kopplungspuffer kein Protein enthielt. Die Flußzellen wurden sorgfältig zunächst mit 2 M NaCl in 10 mM Acetat Puffer, pH 4.6 und später mit PBS (75 mM NaCl), pH 7.4 (Laufpuffer) durch kontinuierlichen Pufferfluss gewaschen.

Interaktion der monoklonalen Antikörper B22, L20, E14 und C18 mit FH. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsstelle des mAK B22 auf das N-terminale SCR 5 eingegrenzt, mAK L20 bindet in SCR 19, während E14 und C18 sich ein Epitop in SCR 20 teilen (siehe 3. Ergebnisse). Die Relevanz der C-terminalen C3b-Bindungsstelle für die Interaktion des FH mit C3b sollte in diesem kompetitiven Experiment näher bestimmt werden. Für die Messungen, wurden FH und die mAK zunächst gegen den Laufpuffer dialysiert. Die Bindung von FH (Calbiochem, 25 µg/ml) an immobilisiertem C3b wurde als Kontrolle allein oder nach Präinkubation (5 min., RT) des FH mit unterschiedlichen Konzentrationen der mAK B22, L20, E14 und C18 gemessen. Die Injektion des FH oder der FH-Immunglobulinkomplexe in die Messzelle bzw. Kontrollzelle erfolgte bei einer Flußrate von 5µl/min bei Raumtemperatur. FH hatte in der flüssigen Phase eine Endkonzentration von 25 µg/ml, die mAK wurden in äquimolaren Mengen oder im molaren Verhältnis von 1:5, 1:10 oder 1:20 eingesetzt.

Interaktion von FH Proteinen mit C3b und C3d. Um den Effekt der zwei Aminosäure-Substitutionen in SCR 20, die in HUS Patienten beschrieben sind, auf die Bindungskapazität des FH an C3b und C3d zu untersuchen, wurden die rekombinanten FH Proteine FH 8-20, FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G zunächst gegen den Laufpuffer dialysiert und als Liganden jeweils in die Messzelle mit C3b/C3d oder die Kontrollzelle bei einer Flußrate von 5µl/min bei Raumtemperatur injiziert. Dabei wurden Endkonzentrationen von 20-30 ng FH Protein in der flüssigen Phase erreicht. Die Bindungsinteraktion mit C3b/C3d wurde für jeden Liganden mindestens zweimal gemessen.

Heparin-Chromatographie. Eine der bekannten Eigenschaften von FH ist die Bindung an Polyanionen. Die Bindungseigenschaften an immobilisiertes Heparin wurde mithilfe des ÄKTAPrime Systems (Amersham-Pharmacia Biotech) zum einen für Serum FH des HUS Patienten F106, der heterozygot für den Aminosäureaustausch Arg/Cys an Position 1210 in SCR 20 ist (Caprioli *et al.*, 2001), und zum anderen für die rekombinanten FH Proteine FH 8-20, FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G untersucht. Vor jedem Versuch, wurde die ÄKTAPrime Apparatur gründlich mit 70% Ethanol, destilliertem Wasser und zuletzt mit dem entsprechenden Laufpuffer gespült. Die 1ml Heparinsäulen (HiTrap, Amersham-Pharmacia Biotech) wurden auf den jeweiligen Startpuffer äquilibriert.

Heparin-Chromatographie von Serum FH. Für diese Analyse wurden je 400µl Serum, eines gesunden Individuums oder des HUS Patienten F106 zunächst mit 4 ml des Startpuffers (50 mM NaCl in PBS) verdünnt und bei einer Flußrate von 0.5 ml/min auf die Heparinsäule geladen. Die Durchflussfraktion wurde aufgefangen und wieder auf die Säule nachgeladen. Dies wurde dreimal wiederholt. Nachdem intensiv mit Startpuffer gewaschen wurde (50 ml), wurden die gebundenen Proteine durch einen ansteigenden Salzgradienten, 100 mM-1 M NaCl, von der Säule eluiert. Der Gradient erstreckte sich über 15 ml bei einer Flußrate von 1 ml/min, während dessen Fraktionen von je 300 µl gesammelt wurden, die anschließend durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert wurden.

Heparin-Chromatographie mit den rekombinanten Proteinen FH 8-20, FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G. 5-10 ml Kulturüberstand der infizierten Insektenzellen, die rekombinantes FH 8-20 im Wildtyp oder mit einer der beiden Mutationen (FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G) exprimieren, wurde in 0.5x PBS (Startpuffer, 75 mM NaCl) verdünnt und bei einer Flußrate von 1ml/min auf die Heparinsäule geladen. Nach längerem Waschen der Säule mit 100ml Startpuffer, erfolgte noch ein kurzer Waschschrift mit 1% des Elutionspuffers (500mM NaCl in PBS). Daraufhin wurden die gebundenen Proteine mithilfe eines ansteigenden Salzgradienten von 100-500 mM NaCl in PBS von der Säule gelöst. Die gesammelten Fraktionen (je 500µl) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und das SDS-Gel entweder mit Silber gefärbt oder im Western Verfahren geblottet. Ein genauer Vergleich der individuellen Elutionsprofile aller drei Proteine erfolgte mithilfe der Prime View Software (Amersham-Pharmacia Biotech). Über die Nutzung der „Overlay“-Funktion konnten die einzelnen Profile folienartig übereinander geschichtet visualisiert werden. Die Heparin-Bindungsexperimente wurden mindestens viermal für jedes Protein wiederholt, wobei sich jeweils identische Elutionsprofile ergaben.

Festphasen-Assay zur Analyse der kompetitiven Wirkung der mAK L20, E14 und C18 auf die Bindung von FH an Heparin.

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass die mAK L20 in SCR 19 und E14 bzw. C18 in SCR 20 von FH binden. In diesem C-terminalen Bereich liegt eine der drei bekannten Heparin-Bindungsstellen von FH. Mithilfe eines Festphasen-Assays wurde untersucht, ob die mAK die Bindung des FH an seinen Liganden modifizieren können. Zu diesem Zweck wurde polymeres Heparan-Natriumsalz (80 ng/µg pro Ansatz) in Bikarbonatpuffer (Kapseln, Fa. Sigma) verdünnt und an den Napfoberflächen einer Mikrotiterplatte (Nunc, Maxisorp) immobilisiert. Die Bindung erfolgte über Nacht bei 4 °C. Daraufhin wurden die Nöpfe mit PBS/0.05 % Tween (PBST) mehrfach gewaschen und mit 1 % BSA/PBST für 15 min. bei Raumtemperatur blockiert. FH (0.3 µg/ml) wurde mit einem 5 fachen molaren Überschuss der mAK T13, L20, E14 oder C18 für 15 min. bei RT präinkubiert, bevor die Bindung mit FH alleine oder den FH-Immunglobulinkomplexen erfolgte. Als Kontrollen diente zum einen mAK T13, der in den SCRs 15-18 bindet, in denen keine Bindungsstelle des FH für Heparin liegt, zum anderen wurde entweder FH oder mAK durch PBST ersetzt. Nach einer Inkubation für 1 h bei RT, wurde intensiv mit PBST gespült und gebundener FH durch Zugabe von polyklonalem Ziege-anti-FH Antiserum (1:3000 verdünnt in PBST) nach weiteren Waschsritten gefolgt durch Inkubation mit dem HRP-konjugiertem Sekundärintiserum (Kanninchen-anti-Ziege 1:10000 verdünnt in PBST) detektiert. Es folgte die Zugabe der HRP-Substrate Sigma-Fast TMOPD und Wasserstoffperoxid. Die Farbreaktion wurde mit 3 M Schwefelsäure nach 2.5 min gestoppt. Die optische Dichte der Präzipitate wurde photometrisch (Dynatech ElisaReader) ermittelt. Die Ergebnisse aus insgesamt fünf unabhängigen Versuchen wurden mit der Microsoft Excel Software ausgewertet.

Zellbindungsstudien: Bindung von FH an humane Endothelzellen (HUVEC)

Die Bindung von rekombinantem FH 8-20, FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G an die Oberfläche von HUVEC wurde im Immunfluoreszenz-Nachweis und mittels FACS an vitalen Zellen analysiert. Die Bindung der rekombinanten Proteine erfolgte unter Niedrigsalz-Bedingungen, und Proteinverdünnungen wurden in einem 1:1 (v/v) Gemisch des PBS Puffers mit destilliertem Wasser (0.5x PBS) hergestellt.

Immunfluoreszenz-Nachweis der Bindung rekombianter FH Proteine. Die Endothelzellen wurden zunächst in Zellkulturflaschen gehalten, bevor sie in Nunc Chamber Slide™ (LabTek II, Nalgen-Nunc International) Kammern umgesetzt wurden. Bei 80-90% Konfluenz des Monolayers, wurde das FKS-haltige RPMI-Medium durch serumfreies DMEM-Medium ersetzt. Nach ca. 24h wurde das Medium entfernt und die Kammern mit den Endothelzellen nochmals gründlich durch Spülen mit PBS von verbliebenen Kulturmedium befreit. Die Bindungsstudien wurden an unfixierten und Paraformaldehyd-fixierten Zellen durchgeführt. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd in PBS (30 min., 4°C). Dieser Schritt gewährleistete eine sehr gute Adhärenz der Zellen. Auch die weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei 4°C. Die Kammern wurden mehrfach mit PBS gespült, bevor freie Bindungsstellen mit 1% BSA/PBS (Blockpuffer) für die Dauer von 30 min. abgesättigt wurden. Die Inkubation der Endothelzellen mit rekombinanten Proteinen (FH 8-20, FH 8-20/R1210C, FH 8-20/R1215G) erfolgte für 3 h. Die Proteine waren zuvor über Ni-Chelat-Chromatographie aus Kulturüberstand der Insektenzellen aufgereinigt, entsalzt (0.5% PBS) und einkonzentriert worden. Die Reinheit der Proben und der Proteingehalt wurden im silbergefärbten SDS-Gel überprüft und identische Proteinnengen für die Bindungsversuche eingesetzt. Die Proteine wurden in 0.5% PBS in einer Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen in einem Gesamtvolumen von 200µl verdünnt. Als Kontrolle für die Bindung wurden auch die Fragmente FH SCRs 15-20 (Positivkontrolle) und FH SCRs 8-11 (Negativkontrolle) in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Daraufhin wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und mit den Primärantikörpern über Nacht inkubiert. Die Antikörper, polyklonales anti-FH Antiserum (Calbiochem) und mAK T13, der innerhalb der SCRs 15-18 von Faktor H bindet, wurden 1: 100 in Blockpuffer verdünnt (Endkonzentration 1.5 µg pro Kammer). Überschüssiger Primärantikörper wurde durch mehrmaliges Spülen mit PBS aus den Kammern entfernt, bevor die Inkubation mit Alexa-fluor-488 konjugiertem Esel-anti-Ziege oder Ziege-anti-Maus-Antiserum (Molecular Probes, Niederlande) bei RT erfolgte. Nach 1.5-2 h wurden die Zellen gründlich gewaschen, die Zellkerne für 2 min. mit Propidiumiodid (0.5 µg/ml) angefärbt und die Kammern daraufhin mit PBS und destilliertem Wasser gereinigt. Nach Entfernen der Plastikkammern wurde das Präparat in einem Fluoreszenz konservierenden Flüssigmedium (Molecular Probes) eingedeckelt. Die Fluoreszenzmarkierung der Endothelzellen wurde unter den entsprechenden Filtereinstellungen im Olympus BX51 Mikroskop (Olympus Optical, Tokio, Japan) überprüft. Die digitalen Aufnahmen (Olympus ColorView Kamera) waren durch die Hersteller Software (Soft Imaging System, Münster) unterstützt.

FACS-Analyse. HUVEC wurden vor ihrer Verwendung ca. 24 h in FKS freiem Medium gehalten, mithilfe von 0.01 % EDTA/PBS von der Kulturflaschenoberfläche gelöst und daraufhin zweimal mit PBS gespült. Die Gesamtzellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Je 5×10^5 Zellen wurden auf 1.5 ml Plastikgefäße verteilt und für 15 min. mit 1 % BSA/0.5x PBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Im Doppelansatz wurden die Zellen daraufhin mit 100µl rekombinanten FH 8-20, FH 8-20/R1210C oder FH 8-20/R1215G, in Kontrollen mit 0.5x PBS oder FH SCRs 8-11 für 30-60 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. FH 8-20 wurde in 0.5x PBS zu Endkonzentrationen von 2.5, 5, 10 und 20 µg verdünnt, beide FH 8-20 Mutanten wurden in einer Konzentration von 5 µg eingesetzt. Nachdem die Zellen mehrfach mit 0.5x PBS gewaschen wurden, wurden sie mit je 1 µg mAK T13 (in Blockpuffer) für 30 min. auf Eis inkubiert. In einem weiteren Kontrollansatz wurde auf den Primärantikörper verzichtet. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers (FITC konjugiertes F(ab)₂ Fragment Ziege-anti-Maus Antiserum, 1: 100 verdünnt in Blockpuffer) wurden die Zellen gründlich mit 0.5x PBS gewaschen. Die Inkubation erfolgte für 30 min. auf Eis, daraufhin wurden die Zellen mit 0.5x PBS gewaschen und die Fluoreszenzintensität der markierten HUVEC im Fluoreszenz-aktiviertem Zellsortierer (FACScan®, Becton-Dickinson, Mountain View, CA) gemessen. Es wurden 10.000 Ereignisse im Vorwärts und Seitwärts Fenster (Scatter) gezählt. Die Bindungsversuche wurden mit unterschiedlichen Präparationen der Faktor H Proteine in mind. drei voneinander unabhängigen Experimenten wiederholt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Die monoklonalen Antikörper (mAK) wurden entwickelt und charakterisiert, um nützliche Werkzeuge zum einen für die Analyse des Faktor H Proteins von HUS Patienten zu erhalten, und des Weiteren um funktionelle Studien an normalen und mutierten Faktor H Proteinformen durchzuführen. Die elf mAK (Maus-anti-humanem Faktor H) wurden in Western Blot Experimenten zunächst auf ihre Reaktivität mit Faktor H Proteinen des normalen humanen Serums getestet. Daraufhin wurden ihre Bindungsstellen innerhalb des Faktor H Moleküls mithilfe von rekombinanten Faktor H Fragmenten auf die Ebene einzelner SCR Domänen ermittelt. Über eine Peptid basierte Analyse wurden für drei mAK distinkte Aminosäuresequenzen innerhalb der SCRs 19 und 20 identifiziert, die die Hauptepitope dieser Antikörper innerhalb des C-Terminus von Faktor H repräsentieren.

3.1.1 Reaktivität mit humanen Serum

Normales humanes Serum wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, und die Proteine wurden im Western Blot Verfahren auf Nitrozellulose transferiert. Die Reaktivität der elf mAKs mit Faktor H und Mitgliedern der Faktor H Proteinfamilie wurde getestet und durch den Einsatz polyklonaler Antiseren, die gegen den N-Terminus (Kanninchen-anti-1-4) bzw. C-Terminus (Kanninchen-anti-19-20) von Faktor H, das gesamte Faktor H Molekül (Ziege-anti-human FH) oder gegen das FHR-4 Protein (Kanninchen anti-human FHR-4) gerichtet sind (Abb. 3.1, Spuren 12-15), überprüft.

Die 150 kDa Bande des Faktor H wurde von allen mAK detektiert, allerdings ist die Reaktivität der mAK D10, C21 und L04 mit Faktor H vergleichbar gering. Die mAK B22 und T13 reagierten ausschließlich mit Faktor H, während die restlichen Antikörper zusätzliche Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts erkannten. Zum einen wurde eine Bande von ca. 88 kDa mit den mAK E22, D10, E20, C21, L04 und H04 gefärbt (Abb. 3.1, Spuren 1 und 3-7), zum anderen erkannten die mAK L20, E14 und C18 (Abb. 3.1, Spuren 9-11) die zwei unterschiedlich glykosilierten Formen des FHR-1 Proteins (43 und 37 kDa Banden). Die polyklonalen Kontrollantiseren detektierten desweiteren die 42 kDa Bande des FHL-1 Proteins, sowie die beiden Formen des FHR-2 Proteins und das FHR-4 Protein.

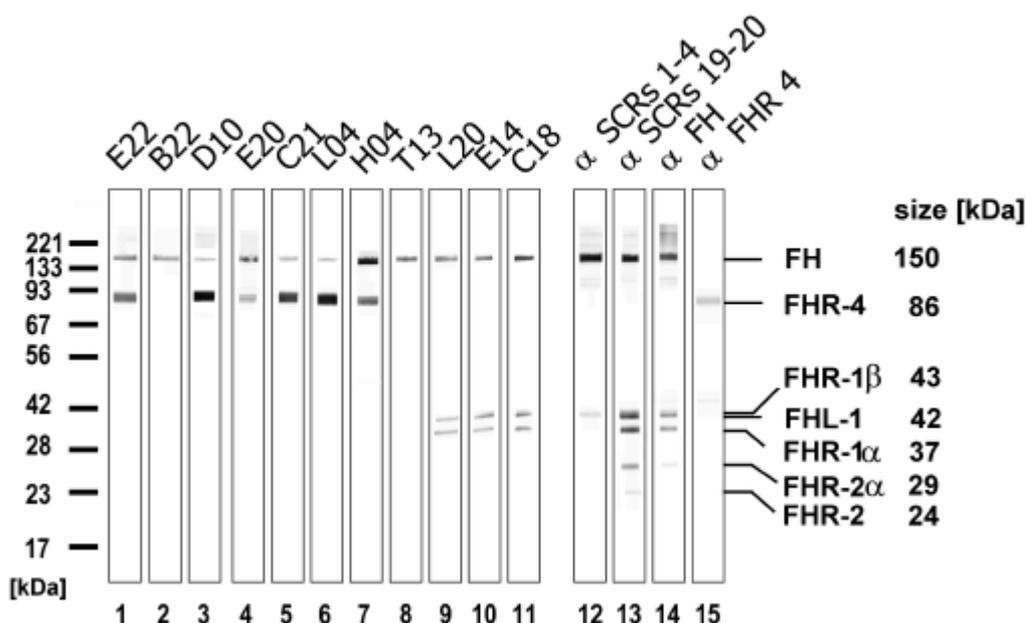


Abb. 3.1: Reaktivität der mAK mit normalem, humanem Serum (NHS)

Humanes Serum wurde in 10%igen SDS-Gelen elektrophoretisch getrennt. Faktor H Proteine wurden im Western Blot Verfahren mit den mAK (Spuren 1-11) und verschiedenen polyklonalen Kontrollantiseren (Spuren 12-15) detektiert. Die Größen der Markerproteine sind auf der linken Bildseite gezeigt, die Position und Mobilität der detektierbaren Faktor H Proteine auf der rechten Bildseite. Das 150 kDa Faktor H Protein wird mit Ausnahme des FHR-4 spezifischen Antiserums von allen verwendeten Antikörpern erkannt. Die FHR-3 und FHR-5 Proteine sind unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachweisbar.

3.1.2 Identifizierung der Faktor H Bindungsstelle: Gruppen

Ihre unterschiedliche Reaktivität mit humanem Serum wies darauf hin, dass die einzelnen mAK an verschiedenen Regionen innerhalb des Faktor H Proteins binden. Um die einzelnen Bindungsstellen besser einzugrenzen, wurden die mAK auf ihre Reaktivität mit einer Reihe von Faktor H Deletionmutanten getestet. In diesen Untersuchungen zeigten die mAK D10, E20 und C21 eine überaus geringe Bindungsaffinität und aus diesem Grunde wurde auf die Identifizierung distinkter Domänen innerhalb des Faktor H im weiteren verzichtet. Zunächst wurden zwei rekombinante Faktor H Proteine, die zusammen die gesamte Länge des Faktor H Moleküls umspannen, in den Western Blot Analysen benutzt. Hierbei handelt es sich um Fragmente, die die Faktor H Domänen SCRs 1-7 bzw. SCRs 8-20 repräsentieren. Während zwei mAK, die Antikörper E22 und B22, mit dem N-Terminalen Bereich des Faktor H reagierten, detektierten die übrigen acht Antikörper das Faktor H Fragment aus den SCRs 8-20. Für eine präzisere Eingrenzung wurden in folgenden Dot Blot und Western Blot Analysen (Abb. 3.2 und 3.3) kleinere Fragmente der N-terminalen Region (SCRs 1-2, SCRs 1-3, SCRs 1-4, SCRs 1-5, SCRs 1-6 und SCRs 3-5), der mittleren Region (SCRs 8-11 und SCRs 11-15) und der C-terminalen Region (SCRs 15-20, SCRs 15-18 und SCRs 19-20) des Faktor H Proteins, benutzt.

Die Ergebnisse aus diesen Experimenten ließen eine Einteilung der elf mAK in drei Hauptgruppen zu (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Reaktivität der mAK mit den Faktor H Fragmenten in Dot Blot und Western Blot Analysen: Gruppeneinteilung

		1-7	8-20	1-2	1-3	1-4	1-5	1-6	3-5	8-11	11-15	15-20
Gruppe I	E22	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	B22	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

		1-7	8-20	8-11	11-15	15-20	15-18	19-20
Gruppe II	L04	-	+	+	+	-	-	-
	H04	-	+	-	+	+	+	
	T13	-	+	-	-	+	+	-

		1-7	8-20	8-11	11-15	15-20	15-18	19-20
Gruppe III	L20	-	+	-	-	+	-	+
	E14	-	+	-	-	+	-	+
	C18	-	+	-	-	+	-	+

+ Reaktivität beobachtet - keine Reaktivität

Gruppe I. Die mAK E22 und B22 binden innerhalb der N-terminalen Region des Faktor H Moleküls und bilden damit eine eigenständige Gruppe. Beide Antikörper reagierten mit den SCRs 1-7, aber nicht mit den Faktor H Fragmenten SCRs 8-20 oder den Unterfragmenten, die die SCRs 8-11, SCRs 11-15 und SCRs 15-20 des Faktor H Proteins repräsentieren.

Beide Antikörper erkannten zudem die Faktor H Fragmente SCRs 1-5, SCRs 1-6 and SCRs 3-5. Allerdings binden die mAK E22 und B22 an verschiedenen SCR Domänen, wobei die Bindestelle des mAK E22 innerhalb oder nahe des SCR 3 liegt, der alle Fragmente erkannte, die dieses SCR beinhalten (Abb. 3.2 A , Spuren 2-5), während mAK B22 mit Fragmenten reagierte, in denen SCR 5 erhalten ist (Abb. 3.2 B , Spuren 4 und 5). Das polyklonale anti-Faktor H Antiserum detektierte alle trunkierten Faktor H Proteine mit ähnlicher Intensität (Abb. 3.2 C).

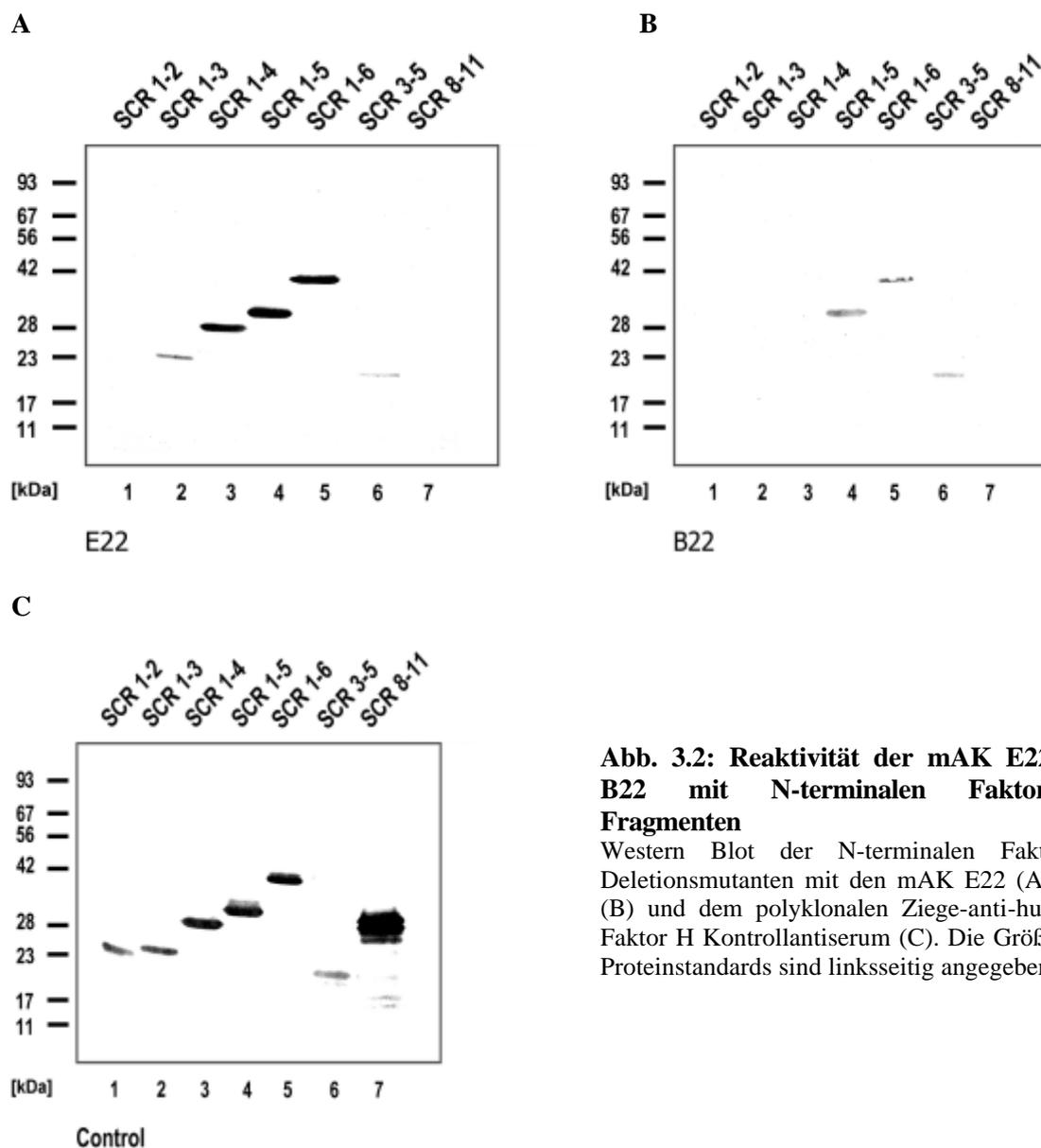


Abb. 3.2: Reaktivität der mAK E22 und B22 mit N-terminalen Faktor H Fragmenten

Western Blot der N-terminalen Faktor H Deletionsmutanten mit den mAK E22 (A), B22 (B) und dem polyklonalen Ziege-anti-humanen Faktor H Kontrollantiserum (C). Die Größen des Proteinstandards sind linksseitig angegeben.

Gruppe II. Die mAK L04, H04 und T13 binden innerhalb der mittleren Region des Faktor H Moleküls. Alle Antikörper dieser Gruppe reagierten mit dem Faktor H Fragment SCRs 8-20, aber nicht mit den N-terminalen (SCRs 1-7) oder den am äußersten C-Terminus gelegenen Domänen (SCRs 19-20). In Dot Blot Experimenten reagierten die mAK L04 und H04 mit den Faktor H Fragmenten SCRs 8-11 und SCRs 11-15 (Abb. 3.3 A). MAK H04 erkannte zusätzlich die Faktor H Fragmente SCRs 15-20 und SCRs 15-18. MAK T13 reagierte ausschließlich mit dieser Region (Abb. 3.3 A, Spuren 4 und 5). Diese Ergebnisse wurden für mAK T13 im Western Blot bestätigt (Abb. 3.3 D, Spuren 1 und 2), während eine Detektion der SCRs 8-11 und SCRs 11-15 durch den mAK L04 in diesem System nicht nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt). MAK H04 reagierte mit den SCRs 11-15, SCRs 15-20 und SCRs 15-18, erkannte allerdings nicht - wie im Dot Blot Verfahren gezeigt - das Fragment aus den SCRs 8-11 (Abb. 3.3 B).

Gruppe III. Die abschließende dritte Gruppe wird von den mAK L20, E14 und C18 gebildet, die in den C-terminalen SCRs 19-20 von Faktor H binden. Diese Antikörper reagierten in Dot Blot (Abb. 3.3 C) und

Western Blot Experimenten (Abb. 3.3 D) entsprechend mit den Fragmenten SCR 8-20 (Daten nicht gezeigt) und SCR 15-20.

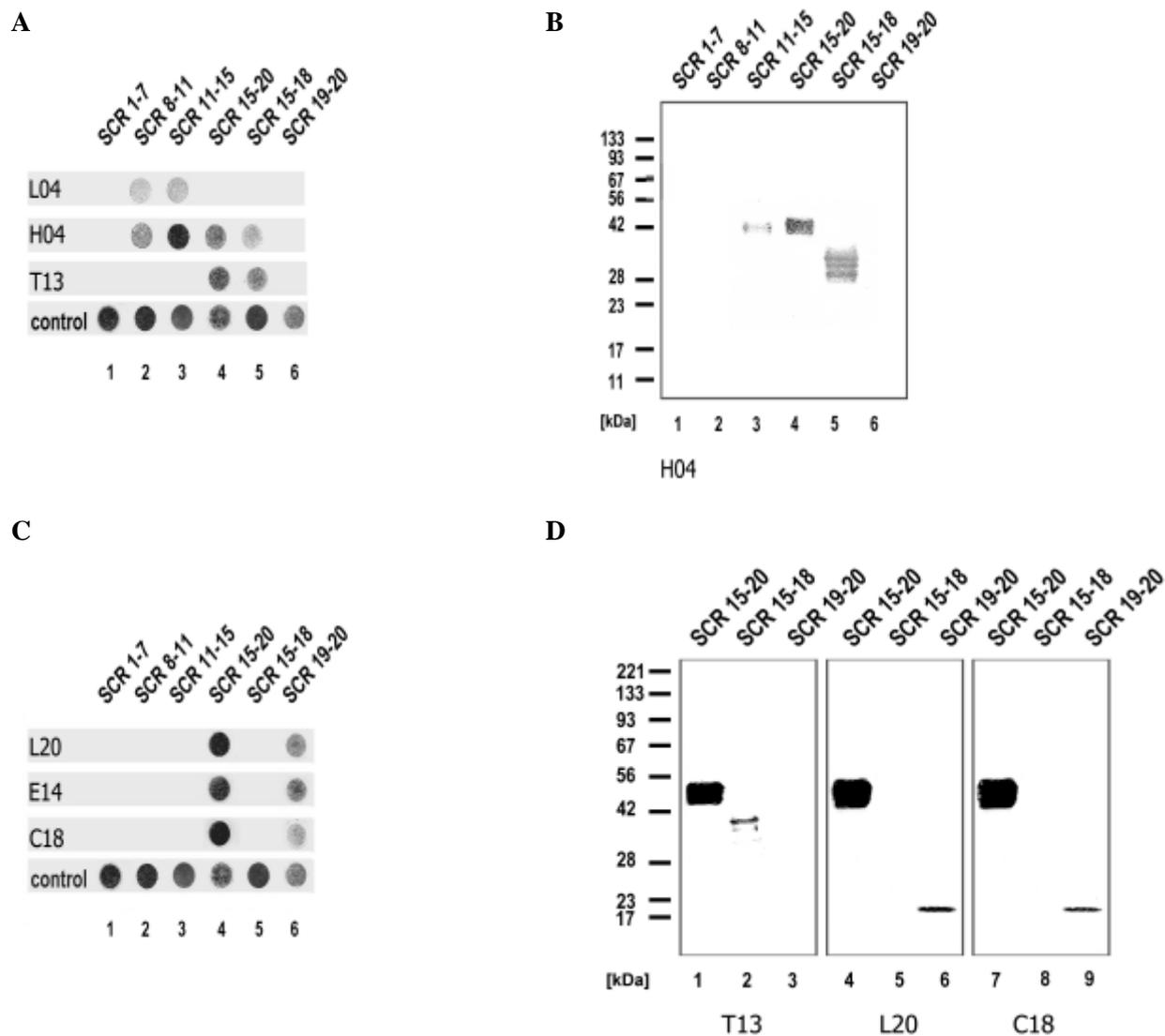


Abb. 3.3: Reaktivität der Gruppe II und Gruppe III mAK mit Faktor H Fragmenten

In A) und C) sind die Ergebnisse der Dot Blot Analyse für die Gruppen II und III AK sowie für das Kontrollantiserum (Ziege anti-human FH) dargestellt; in B) und D) die Reaktivität der mAK H04, T13, L20 und C18 nach Western Blotting der Faktor H Fragmente. Die Größen des Proteinstandards sind linksseitig angegeben.

3.1.3 Epitopanalyse der Gruppe III Antikörper

Für die funktionellen Untersuchungen der C-terminalen Domänen des Faktor H waren die Gruppe III Antikörper von besonderem Interesse. Die Faktor H Bindung der Gruppe III AK wurde mithilfe eines linearen Peptidscan weiter charakterisiert. Es wurden distinkte Sequenzbereiche innerhalb der SCRs 19 und 20 ermittelt, in denen die Epitope für die mAK L20, E14 und C18 liegen (Abb. 3.4). Als positive Reaktivität wurden für die Auswertung Werte der optischen Dichte von über 2000 zugelassen. Eine Reaktivität des mAK L20 wurde ausschließlich für einen Peptidbereich nachgewiesen, der in Folge die Aminosäuresequenz DITSFPLSVYAP (Position D1126 – P1137 in SCR 19 von Faktor H) ergibt und das lineare Epitop dieses Antikörpers repräsentiert. Die mAK E14 und C18 teilen sich ein Hauptepitop in SCR 20, das sich aus der Sequenz RTGESVEFVCKR (R1192-R1203 der Faktor H AS-Sequenz) zusammensetzt. MAK E14 reagierte zusätzlich mit der Sequenz STGKCGPPPID in SCR 19, allerdings mit geringerer Intensität.

SCR 19

Start: Position 1102

DSTGKCGPPPIDNGDITSFPLSVYAPASSVEYQCQNLYQLEGNK**R**ITCRNGQWSEPPKCL

L20

SCR 20

Start: Position 1165

HPCVISREIMENYNIALRW**TAKQ**KL**YS**RTGESVEFVCK**R**GYRLSS**R**SHTL**R**TTTCWDGKLEYP**TCAKR**
E14 und C18 R1210C R1215G

Abb. 3.4: Hauptepitope der mAK L20, E14 und C18 in den SCRs 19 und 20

Das Hauptepitop für den mAK L20 in SCR 19, sowie das gemeinsame Epitop der mAK E14 und C18 in SCR 20 sind grau unterlegt in der dargestellten Aminosäuresequenz des Faktor H C-Terminus. Die zweite Bindungsstelle des mAK E14 in SCR 19 ist unterstrichen. Positiv geladene Aminosäuren (Arginin und Lysin) sind optisch hervorgehoben. Die Argininreste an den Positionen 1210 und 1215, die Ziel der beschriebenen Substitutionen R1210C und R1215G sind, sind durch die Buchstabengröße angedeutet.

3.2 Untersuchungen des Faktor H in Serum von Patienten mit Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS): HUS Register

3.2.1 Identifizierung von Faktor H Mutationen

Im Rahmen einer Kooperation mit der klinischen Arbeitsgruppe (AG) von Prof. Neumann (Universitätsklinik Freiburg, Nephrologie) wurde ein deutschlandweites Register für HUS Fälle erstellt, dessen wichtigstes Ziel in der Identifizierung von Faktor H Defekten in den Patienten und der Klärung einer Assoziation von Faktor H Mutationen mit dem Syndrom lag. Das Register umfasst 122 Patienten, die an der atypischen Form des HUS erkrankt sind. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden im Western Blot Verfahren Serumproben der Patienten auf Besonderheiten im Faktor H Protein und anderer Mitglieder der Proteinfamilie untersucht. Serum von gesunden Individuen (n = 100) oder von HUS Patienten wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt und im Western Blot Verfahren auf eine Nitrozellulose Membran transferiert. Die Detektion der Faktor H Proteine erfolgte im Allgemeinen mit polyklonalem anti-Faktor H Antiserum (Abb. 3.5).

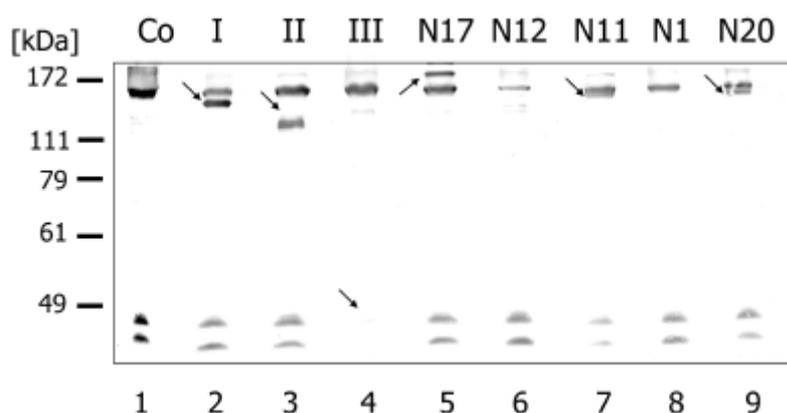


Abb. 3.5: Auffälligkeiten im Faktor H Protein in HUS Patienten: Eine Übersicht

Humanes Serum der gesunden Kontrolle (Spur 1) und von HUS Patienten (Spuren 2-9) wurde im 10% igen SDS-Gel getrennt. Faktor H Proteine wurden nach dem Western Blotting Transfer mit polyklonalem Antiserum (Ziege-anti-human FH) detektiert. Unter den hier dargestellten Trennbedingungen werden das 150 kDa Faktor H Protein und beide Formen des FHR-1 Proteins detektiert (siehe Kontrolle, Spur 1). In genetischen Analysen waren Faktor H Mutationen in den Patienten N17, N12, N11, N1 und N20 identifiziert worden, nicht aber in den Patienten I-III. In allen Patienten ist das 150 kDa Faktor H Protein nachzuweisen, im Serum des Patienten N12 (Spur 6) allerdings mit geringer Intensität. Im Serum des Patienten III fehlen beide Formen des FHR-1 Proteins (siehe Pfeil, Spur 4). Im Serum der Patienten I, II, N17, N11 und N20 treten zusätzliche Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht auf, die in der Abb. durch Pfeile markiert sind. Die Größen des Proteinstandards sind linksseitig angegeben.

Bei 8 % (9/122) der untersuchten Patienten waren in der Western Blot Analyse des Patientenserums Veränderungen im Faktor H Protein festzustellen. Bei diesen Patienten wurden zusätzliche Banden mit den verwendeten anti-Faktor H Antiseren identifiziert, in einigen Patienten war ein geringer Faktor H Gehalt auffallend. Die Charakterisierung abnormaler Faktor H Formen wird im folgenden beispielhaft für drei Patienten des Registers, Patient N1, N11 und N20 dargestellt.

3.2.2 Patient N 11: Die differentielle Reaktivität der mAK identifiziert einen Faktor H Defekt im C-terminalen SCR 20 des Patienten Proteins

Die genetischen Analysen an Patient N11 ergaben, dass eine Punktmutation (Position A3032G in der Faktor H Sequenz) in einem Allel des Faktor H Genes zu der Substitution des Threonin in Alanin (T987A) innerhalb des SCR 17 führt (AG Neumann). In Western Blot Analysen des Patientenserums wurde ein Defekt im C-Terminus des Faktor H Proteins identifiziert. Hier ist zusätzlich zum normalen 150 kDa Faktor H Protein, eine Bande auf Höhe von 145 kDa zu beobachten (vgl. Abb. 3.5), die mit polyklonalem anti-Faktor H Antiserum reagiert. Zur weiteren Charakterisierung dieser Bande wurde die Reihe der mAK zur Detektion im Western Blot des Serums eingesetzt. Wie zuvor gezeigt, binden die individuellen mAK an unterschiedlichen SCR Domänen des Faktor H Moleküls. Alle polyklonalen Antiseren, die gegen das gesamte Faktor H Molekül, den N-terminalen oder den C-terminalen Bereich gerichtet sind (Abb. 3.6 B, Spuren 1-3), sowie der Gruppe I mAK B22, der Gruppe II mAK T13 und der Gruppe III AK L20 detektierten diese abnormale 145 kDa Bande zusätzlich zum Faktor H Protein (Abb. 3.6 A und B). Im Gegensatz hierzu, reagieren die Gruppe III AK E14 und C18 mit der Wildtyp Bande (Abb. 3.6 B, Spuren 7 und 8) und nicht mit der abnormalen 145 kDa Bande. Diese fehlende Reaktivität zeigt einem Verlust des Hauptepitopes der beiden mAk, welches innerhalb des SCR 20 liegt, und identifizieren einen Faktor H Defekt der diese Domäne betrifft.

A

B

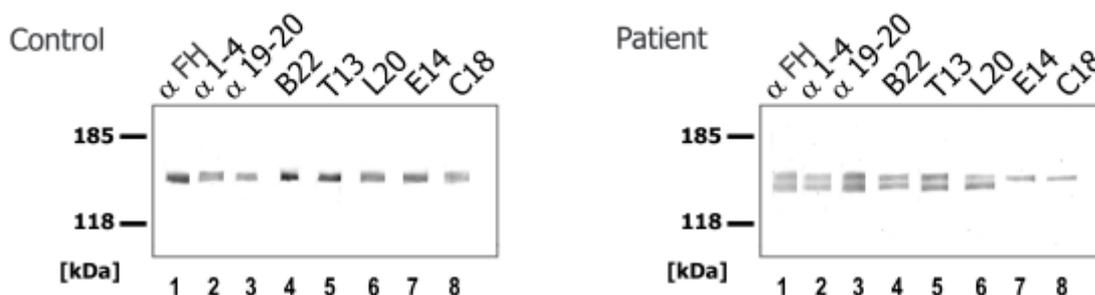


Abb. 3.6: Patient N11: Differentielle Reaktivität der mAK E14 und C18 mit der 145 kDa Bande Humanes Serum der gesunden Kontrolle (A, control) und des Patienten N 11 (B, Patient) wurde in einem 10% igen SDS-Gel getrennt. Nach dem Blotting der Proteine auf eine Nitrozellulose Membran wurde diese in einzelne Streifen geschnitten. Die Inkubation der Streifen erfolgte in polyklonalen Antiseren, die das gesamte Faktor H Molekül (α -FH, Spur 1), den N-Terminus (α -1-4, Spur 2) und den C-Terminus (α -19-20, Spur 3) detektieren und mit den mAK B22 (SCR 5), T13 (SCRs 15-18), L20 (SCR 19) als auch den mAK E14 und C18, die innerhalb des C-terminalen SCR 20 binden (Spuren 4-8). In A) und B) zeigt der Bildausschnitt die Reaktivität der verwendeten Antiseren mit der 150 kDa Faktor H Proteins (in B) die obere Bande). B) Die abnormale 145 kDa Bande, die im Serum des Patienten N11 auftritt, wird nicht von den mAK E14 und C18 (Spuren 7 und 8) erkannt. Die Größen des Proteinstandards sind linksseitig angegeben.

3.2.3 Patient N 1 und N 20: Ein Defekt in SCR 19 führt zu einer Faktor H Doppelbande im Serum des Patienten N 20

Die Patienten N1 und N20 haben eine identische Faktor H Mutation und sind heterozygot für eine Punktmutation (Position C80T) in Exon 1, das für das Signalpeptid des nativen Faktor H codiert (AG Neumann). Patient N20 trägt zudem eine Punktmutation (T3474G) in Exon 22, die zu einem Austausch der Aminosäure Valin zu einem Glycinrest innerhalb des SCRs 19 führt (AG Neumann). In Western Blot Analysen des Serums beider Patienten, tritt das Faktor H Protein bei Patient N20 als Doppelbande (Abb. 3.7, Spur 3) auf. Das Faktor H Protein des Patienten N1 ist unverändert (Abb. 3.7, Spur 2). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ursache der Faktor H Doppelbande in Patient N20, in dem Defekt des C-terminalen SCR 19 liegt. Dies wird durch die Western Blot Analyse des Serums der Eltern des Patienten N20 bestätigt. Das Faktor H Protein des Vaters zeigt kein auffälliges Laufverhalten, während im Serum der Mutter eine identische Doppelbande des Faktor H Proteins zu sehen ist (Abb. 3.7, Spuren 4 und 5). Die genetischen Untersuchungen an den Eltern ergaben, dass die Mutation in Exon 1 von dem Vater des Kindes, die Mutation in Exon 22 von der Mutter vererbt wurde (AG Neumann).

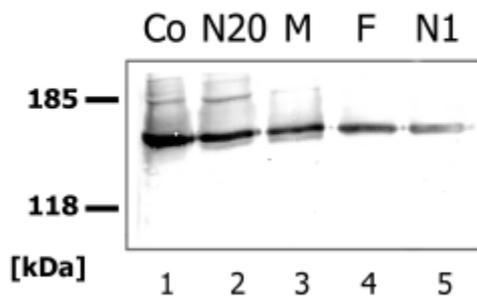


Abb. 3.7: Patient N1 und N20: Identifizierung einer Faktor H Doppelbande im serum des Patienten N 20 und der Mutter des Patienten

Serum der gesunden Kontrolle (co, Spur 1), des Patienten N 20 (Spur, 2), der Mutter (M, Spur 3) und des Vaters (F, Spur 4) des Patienten als auch des Patienten N1 (Spur 5) wurde in einem 8% igen SDS-Gel getrennt. Nach dem Western Blotting erfolgte die Detektion der Proteine mit polyklonalem Antiserum (Ziege-anti human FH). Das 150 kDa Faktor H Protein ist in allen Seren nachzuweisen (Spuren 1-5). In Patient N 20 und der Mutter des Patienten (Spuren 2 und 3) ist eine zusätzliche Bande zu sehen. Die Größen des Proteinstandards sind linksseitig angegeben.

3.3 Untersuchungen einer abnormalen Faktor H Isoform im Serum des Patienten F106

In Analysen am Serum eines italienischen HUS Patienten (F106), der heterozygot für eine Substitution R1210C in SCR 20 des Faktor H Proteins ist (Caprioli *et al.*, 2001), wurde erstmals die Relevanz der Faktor H Mutation in diesem Patienten für eine der Funktionen des Proteins, die Bindung an Heparin, ermittelt. Diesen heparinchromatographischen Untersuchungen ging die Charakterisierung des Patientenserums und der identifizierten, abnormalen Faktor H Proteinform in Western Blot Analysen voraus.

3.3.1 Detektion eines ungewöhnlichen Faktor H Bandenmusters im Serum von Patient F106

Das Serum der italienischen Patienten F106 und F34, die beide heterozygot für eine Punktmutation in Exon 23 sind, wurde elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die 150 kDa Bande des normalen Faktor H wird in beiden Patienten und in der gesunden Kontrolle durch das Antiserum (Ziege-anti-FH) detektiert (Abb. 3.8, Spuren 1-3). Im Serum von Patient F106 erscheint eine zusätzliche Bande bei 175 kDa (Abb. 3.8, Spur 2), die in dieser Stärke weder bei Patient F34 noch im Serum der gesunden Kontrolle zu sehen ist (Abb. 3.8, Spur 1 und 3). In Patienten F106 ist das Arginin an Position 1210 durch ein Cystein substituiert (R1210C), und in Patient F34 ist ein Argininrest an Position 1215 durch Glycin ersetzt (R1215G). In Patient R16 (Caprioli *et al.*, 2001; Galbusera *et al.*, 2002) sowie einer Patientin der eigenen HUS-Studie (Patient N17, vgl. Abb. 3.4) ist ein identische 175 kDa Bande zu erkennen.

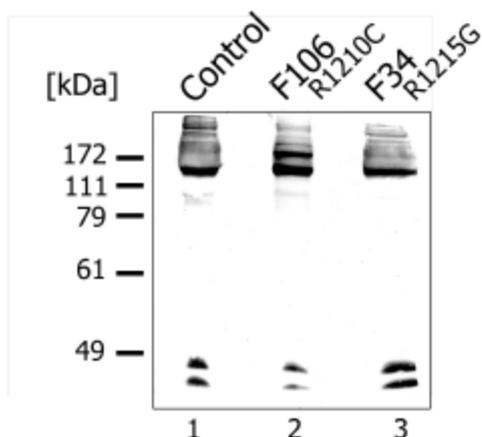


Abb. 3.8: Identifizierung einer 175 kDa Bande im Serum des Patienten F106

Das Serum der gesunden Kontrolle (control, Spur 1), des Patienten F106 (Spur 2) und des Patienten F34 (Spur 3) wurde in einem 10% igen SDS-Gel getrennt. Nach dem Western Blotting erfolgte die Detektion der Proteine mit polyklonalem Antiserum (Ziege-anti human FH). Das 150 kDa Faktor H Protein ist in allen Seren nachzuweisen (Spuren 1-3). In Patient F106 ist eine zusätzliche Bande auf Höhe von 175 kDa zu sehen. Die Größen des Proteinstandards sind linksseitig angegeben.

3.3.2 Charakterisierung der 175 kDa Faktor H Isoform

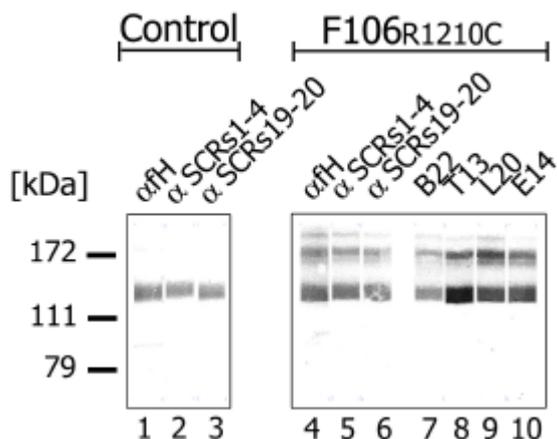
Eine Reihe polyklonaler Antiseren und die mAK wurden zur Detektion in den Western Blot Analysen des Serums von Patient F106 eingesetzt. Alle polyklonalen Antiseren, die spezifisch für das gesamte Faktor H Molekül (anti-FH), die N-terminale (anti-1-4) oder die C-terminale (anti-19-20) Region sind, als auch die verwendeten mAK reagierten mit Faktor H der gesunden Kontrolle und des Patienten (Abb. 3.9 A). Die Reaktivität der polyklonalen Antiseren und der mAK B22, mAK T13 und der Gruppe III AK L20 und E14 mit dem 175 kDa Protein des Patienten zeigt, dass es sich bei diesem Protein tatsächlich um eine Form des Faktor H handelt.

Die Konformation des Faktor H Moleküls ist in starkem Maß abhängig von der korrekten Disulfidbrückenbildung zwischen den insgesamt vier Cysteinen, die konserviert in jedem SCR vorkommen und strukturbildend für die Domänen sind. Das native Faktor H Protein ist zudem Gegenstand posttranslationaler Prozessierung und wird an mehreren putativen Stellen innerhalb des Moleküls durch N-Glykosylierung modifiziert (Kuhn & Zipfel, 1995).

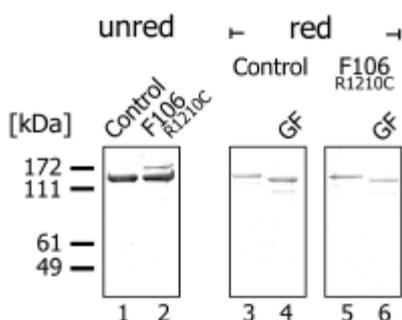
Das Serum oder aufgereinigte Serumfraktionen, die durch Heparinchromatographie gewonnen wurden, wurden aus diesem Grunde unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Ebenso wurde mit den Proben verfahren, deren N-gekoppelte Kohlehydratketten nach Reduktion der Proteine mit dem Enzym N-Glykosidase F beseitigt worden waren. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen detektiert das polyklonale Antiserum (Ziege anti-FH) zusätzlich zur normalen 150 kDa Bande des Faktor H die 175 kDa Isoform im Serum des Patienten F106 im Western Blot (Abb. 3.9 B, Spur 2). Beide Banden sind auch im silbergefärbten Gel (Abb. 3.9 C, Spur 2) zu erkennen. Unter reduzierenden Bedingungen werden die Disulfidbrücken des Wildtyp-Faktor H Moleküls gebrochen. Dies äußert sich in einer Verringerung der Protein Mobilität. Durch das weitere Entfernen der N-gekoppelten Kohlehydratketten wird die Gesamtmasse des Proteins verringert, und so ist ein erneuter Anstieg in der Gelmobilität zu erkennen (Abb 3.9 B und C, Spur 4). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wird die Konformation des Faktor H Moleküls stark verändert und somit ist die Reaktivität des spezifischen Antiserums im Western Blot gegenüber den reduzierten Proteinen herabgesetzt. Im silbergefärbten Gel wird deutlich, dass vergleichbare Mengen an Kontroll- bzw. Patientenserum für diese Versuche eingesetzt wurden.

Der Vergleich zwischen den reduzierten und deglykosylierten Serumproben der gesunden Kontrolle und des Patienten F106 (Abb 3.9 B und C, Spuren 5 und 6) zeigt, dass die 175 kDa Isoform bereits durch die reduzierende Behandlung verloren geht bzw. mit dem Wildtyp Faktor H Protein in eine Bande übergeht. Das Wildtyp-Faktor H Protein und die Faktor H Isoform erreichen nach der Reduktion der Disulfidbrücken eine identische Gelmobilität.

A



B



C

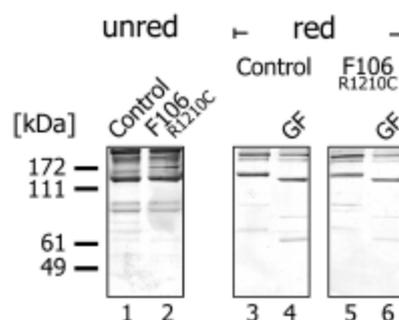


Abb. 3.9: Charakterisierung der 175 kDa Isoform des Patienten F106

Das Serum der gesunden Kontrolle (Control) und des Patienten F106 wurde in A)-C) in 10% igen SDS-Gelen getrennt.

A) Im Western Blot des Serums der Kontrolle (Spuren 1-3) und des Patienten F106 (Spuren 4-10) wurde das Faktor H Protein mit den verwendeten polyklonalen Antiseren (Spuren 1-6) detektiert. Im Serum des Patienten wurde die 175 kDa Isoform mit diesen AK und den mAK (Spuren 7-10) nachgewiesen.

A) und B) : In B) ist der Western Blot bei Detektion mit polyklonalem Antiserum und in C) das silbergefärbte Gel, nach der Reduktion (red) und Glykosidase F (GF) Behandlung der Serumproben der gesunden Kontrolle (Spuren 3 und 4) und des Patienten (Spuren 5 und 6) dargestellt. In beiden Abbildungen ist auch das nicht-reduzierte Serum (Spuren 1 und 2, unred) gezeigt. In den reduzierten Proben des Patienten F106 ist die 175 kDa Isoform nicht mehr zu erkennen (Spur 5), und die resultierende Bande des Faktor H Proteins liegt auf gleicher Höhe wie in der Kontrolle (Spur 3). In beiden Proben resultiert eine folgende Beseitigung der N-gekoppelten Kohlehydratreste in einer Faktor H Bande, die aufgrund des geringeren Molekulargewichtes unterhalb der reduzierten Bande verläuft. Im silbergefärbten Gel (Spuren 1-6) sind mehrere niedermolekulare Banden zu erkennen, die nicht vom Faktor H spezifischen Antiserum erkannt werden. Zwischen der gesunden Kontrolle und dem Patienten ist kein Unterschied bezüglich des Bandenmusters festzustellen. Die Größen des Proteinstandards sind jeweils linksseitig angegeben.

3.3.3 Heparinchromatographie mit Serum des Patienten F106

Das Wildtyp-Faktor H Protein und die veränderte Isoform des Patienten F106 lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Gelmobilität unterscheiden. Deshalb konnte eine funktionelle Untersuchung der Heparinbindung des Faktor H Proteins direkt mit Serum des Patienten stattfinden. Das Serum eines gesunden Individuums oder des Patienten F106 wurde im chromatographischen Verfahren auf HiTrap-Heparinsäulen geladen und die gebundenen Proteine durch einen linearen Anstieg der Natriumchloridkonzentration eluiert. Es wurden einzelne Fraktionen (500µl) gesammelt und mithilfe der SDS-PAGE mit anschließendem Western Blotting Verfahren analysiert. Das Faktor H Protein der gesunden Kontrolle eluierte bei einer Salzkonzentration von 200mM NaCl und erreichte in Fraktion 41 (Abb. 3.10 A) seinen höchsten Stand. Ein ähnliches Elutionsprofil zeigte das Wildtyp 150 kDa Faktor H Protein (Abb. 3.10 B, untere Bande) in Patient F106. Im Gegensatz dazu, begann die 175 kDa Isoform bereits in Fraktion 29 zu eluieren und erreichte die höchste Proteinkonzentration in Fraktion 35 (Abb. 3.10 B, obere Bande siehe Pfeil).

Dieses Experiment zeigt einen ersten, funktionellen Unterschied zwischen der Wildtyp und aberranten Faktor H Form auf, und läßt vermuten, dass die Heparinbindung des mutierten Faktor H Proteins verändert ist.

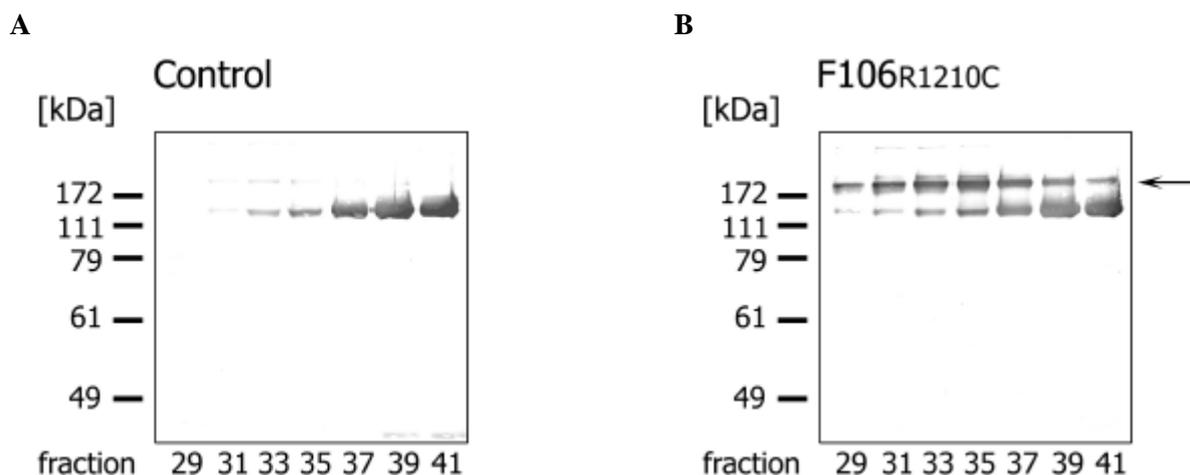


Abb. 3.10 Western Blot der Elutionsfraktionen nach heparin-chromatographischer Trennung des Serums

Die Serumfraktionen (fraction) der gesunden Kontrolle (A, Control) und des Patienten F106 (B) in 10% igen SDS-Gelen getrennt. Nach dem Western Blotting erfolgte die Detektion der Proteine mit polyklonalem Antiserum (Ziegenanti human FH). In der gesunden Kontrolle und im Patienten ist das 150 kDa Faktor H Protein als starke Bande in den Fraktionen 37-41 zu erkennen. B) In Patient F106 ist die zusätzliche 175 kDa Bande (Pfeil) bereits in Fraktion 29 zu sehen und erreicht das stärkste Signal in Fraktion 35. Die Größen des Proteinstandards sind linksseitig angegeben.

3.4. Funktionelle Untersuchungen des C-Terminus mithilfe der mAK

Im Rahmen einer vorangegangenen Studie wurden die beschriebenen monoklonalen Antikörper generiert, und in einer Fest-Phasen-Analyse der Effekt der einzelnen AK auf die C3b-Bindung des Faktor H getestet (Elke Brand, 1993). In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Gruppe I AK E22 und B22 ein geringes Inhibitionspotential (4 und 11%) für die FH-C3b Bindung haben, die Gruppe II AK L04, H04 und T13 blockierten zu 52, 65 und 55%, während alle Gruppe III AK diese Funktion komplett verhinderten. In den SCRs 19-20 liegt die C-terminale C3d Bindungsstelle von Faktor H. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde diese Eigenschaft mithilfe der sensitiveren Plasmon Resonanz Technik (Biacore) untersucht.

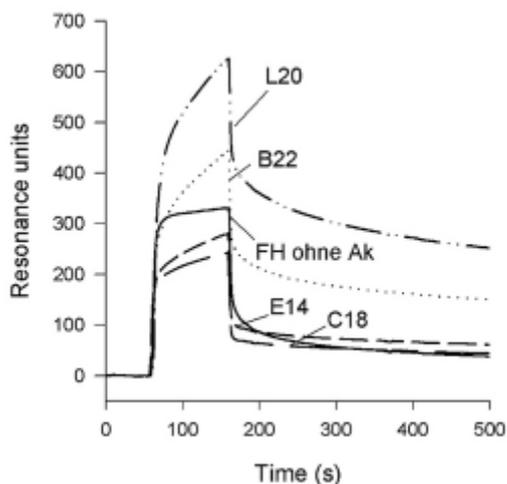
3.4.1 Die Faktor H Bindung an C3b wird durch die mAK E14 und C18 blockiert

Vor der Zugabe in die Flußzelle wurde Faktor H zunächst mit den mAK B22, L20, E14 oder C18 in einem molaren Verhältnis von 1:1, 1:5 und 1:10 präinkubiert. Die Kontrolle ohne Faktor H Protein zeigte keinen Bindungsanstieg und wurde als Basislinie dargestellt. Die Bindung von Faktor H an die C3b Moleküle, die auf der Chipoberfläche kovalent gebunden sind, wurde durch die mAK E14 und C18 dosisabhängig inhibiert (Abb. 3.11 siehe folgende Seite, A und B). Die Gruppe I mAK B22 zeigte keinen blockierenden Effekt und mAK L20 erhöhte selbst bei 20fachem Überschuß die Faktor H Bindung an C3b (Abb. 3.11 C). Dieser additive Effekt kann auf einer Aggregation der Faktor H Moleküle durch die quervernetzende Bindung des Antikörpers L20 zurückgeführt werden.

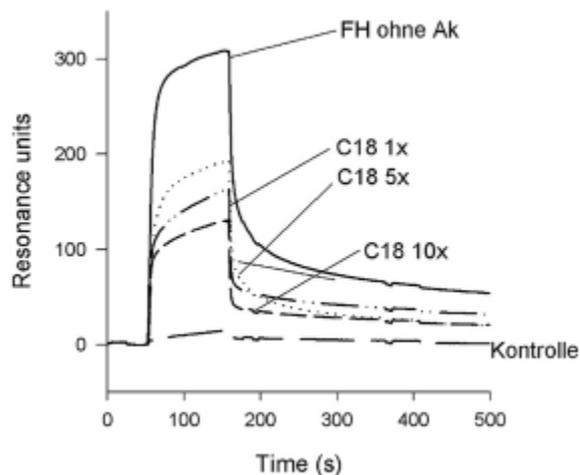
3.4.2 Die Faktor H Bindung an Heparin wird durch die mAK E14 und C18 blockiert

SCR 20 vermittelt die C-terminale Bindung von Faktor H an Heparin und aus diesem Grunde wurde durch eine neu etablierte Fest-Phasen-Analyse der Effekt der Gruppe III AK auf diese zweite, essentielle Funktion des Faktor H untersucht. Faktor H wurde mit dem fünffachen Überschuß der mAK B22, T13, L20, E14 oder C18 präinkubiert, bevor Faktor H oder die Faktor H-AK-Lösung an gebundenes Heparin gebunden wurde. In Kontrollen wurde Faktor H oder die mAK durch Puffer ersetzt. Für jeden Ansatz wurden die Werte ($n = 4$) der optischen Dichte (OD) gemittelt. Die Berechnung der Wirkung der mAK auf die Faktor H Bindung an Heparin erfolgte über das Verhältnis $(OD \text{ Faktor H} / OD \text{ Faktor H} + \text{mAK}) \times 100$. Die Antikörper B22, T13 und L20 zeigten einen geringen inhibitorischen Effekt (81-89% Bindung), während die mAK E14 und C18 die Bindung von Faktor H an Heparin vollständig blockierten (Abb. 3.12 siehe folgende Seite). Dieser Effekt ist dosisabhängig (Werte nicht gezeigt) und bei einem geringen molaren Überschuß an mAK (1:2) wird ihre inhibitorische Wirkung aufgehoben.

A



B



C

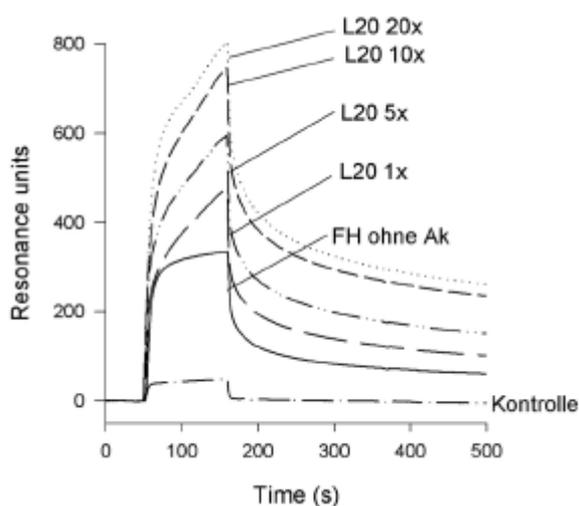


Abb. 3.11: Faktor H-C3d Bindung

In A) sind die Ergebnisse der Resonanzstudie mit allen verwendeten mAK (fünffacher Überschuss zu FH), in B) und C) der dosisabhängige Effekt für die mAK C 18 und L20 dargestellt. Die Injektion des Faktor H (FH ohne AK) und der Faktor H-Antikörperlösung in die Flusszelle ist in dem Anstieg der Resonanzantwort (RU) ersichtlich. Nach Stop der Injektion (bei 180 s) ist die Dissoziation der gebildeten FH-C3d Komplexe durch eine Abnahme der Resonanz gekennzeichnet. A) Die mAK E 14 und C18 blockieren die FH Bindung an C3d. Die mAK B22 und L20 zeigen einen additiven Effekt. B) mAK C18 blockiert die FH Bindung (FH ohne AK) bei einem molaren Überschuss von 5 und 10, als auch bei einfacher Molarität zu Faktor H. C) mAK L20 inhibiert selbst bei einem 20 fachen molaren Überschuss nicht, bewirkt dagegen eine höhere Resonanzantwort im Vergleich zur normalen Faktor H Bindung (FH ohne AK).

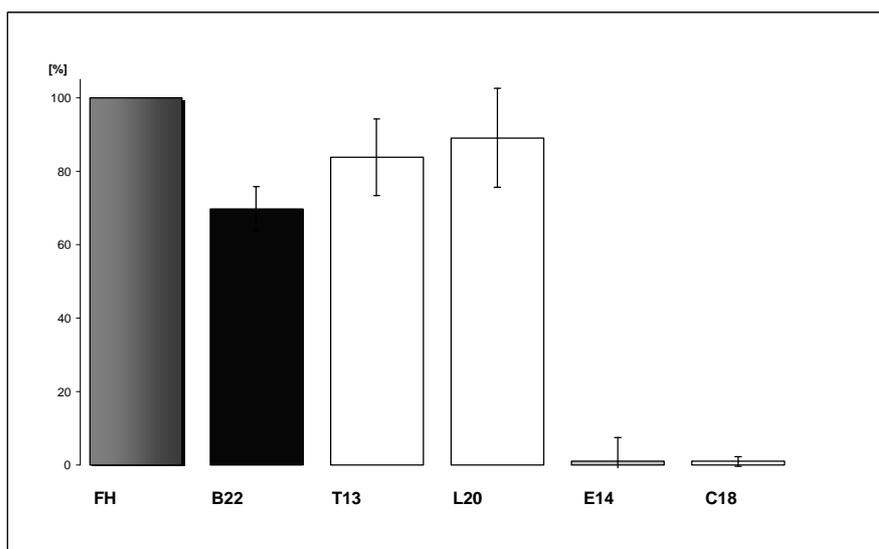


Abb. 3.12: Faktor H -Heparinbindung

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse des Festphasen Assays im prozentualen Verhältnis der FH-Bindung (100%) an. Die Bindung des Faktor H an Heparin (FH) wird durch die mAK B22, T13 und L20 geringfügig reduziert. Die mAK E14 und C18 verhindern diese vollständig. Die mittlere Standardabweichung der gemessenen Einzelwerte (n=4) der Optische Dichte ist durch die Hebellinien in den Balken angegeben.

3.5. Funktionelle Untersuchungen HUS assoziierter Faktor H Mutationen

3.5.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Faktor H Proteine mit den Mutationen R1210C und R1215G

Die rekombinanten Proteine FH 8-20/Wildtyp und die HUS-assoziierten Mutationen FH 8-20/R1210C bzw. FH 8-20/R1215G wurden mithilfe des Baculosystems in Insektenzellen exprimiert und sekretiert. Die FH Proteine wurden über die zusätzlichen 8 Histidinreste, die der Expressionsvektor PBSV-8-His an den C-Terminus der Zielproteine zufügt, mittels Ni-Chelat-Chromatographie aus dem Insektenzell-Kulturüberstand aufgereinigt. Die Proben wurden entsalzt und in dem für nachfolgende Experimente erforderlichen Puffer aufgenommen. Für die vergleichenden, funktionellen Studien wurde die Reinheit der Proben als auch die Konzentration der Proteine FH 8-20/Wildtyp, FH 8-20/ R1210C und FH 8-20/R1215G im silbergefärbten SDS-Gel überprüft (Abb. 3.13). Als Standard zur Quantifizierung dienten unterschiedliche Verdünnungen von Faktor H.

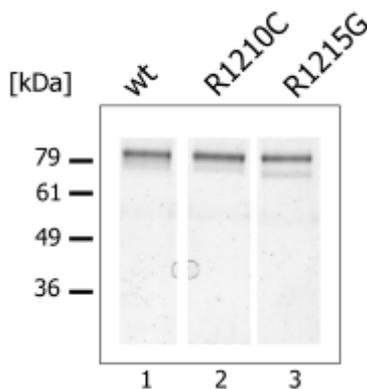


Abb. 3.13 Rekombinante Expression der R1210C und R1215G Mutation

Die Reinheit der Präparationen der Proteine FH 8-20 (Spur 1), FH 8-20/R1210C (Spur 2) und FH 8-20/R1215G (Spur 3) ist in der Silberfärbung des SDS-Geles dargestellt. Die Größen des Proteinstandards sind linksseitig angegeben.

3.5.2 Die Bindung der rekombinanten, mutierten Faktor H Fragmente an das C3d Molekül ist reduziert

In Biosensor-Experimenten zur Untersuchung der C3d-Bindung wurden die rekombinanten Faktor H Proteine in der flüssigen Phase zugegeben. Das FH 8-20 Wildtyp Protein zeigte eine starke Bindung an C3d, während die Interaktion der beiden mutierten Proteine FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G stark reduziert war (Abb. 3.14). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die C3d-Bindung durch den jeweils einzelnen Aminosäure-Austausch innerhalb des SCRs 20 nachhaltig beeinflusst wird, der zudem für beide HUS-assoziierten Mutationen in Nähe der Hauptepitope der inhibitorischen mAK E14 und C18 liegt.

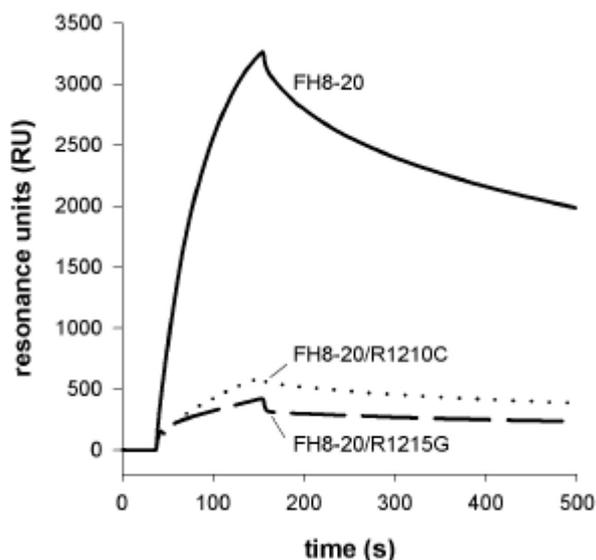


Abb. 3.14: Die C3d Bindung der rekombinanten Proteine FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G ist reduziert

Im dargestellten Ergebnis der Resonanzstudie erreicht die Bindung des injizierten Wildtyp-Proteins (FH 8-20) einen Höhepunkt bei ca. 3200 RU. Die Dissoziation des FH-C3d Bindungskomplexes ist im Abfall der Kurve ersichtlich, der nach dem Stop der Injektion bei 150 s und dem Spülen mit Pufferlösung einsetzt. Der Komplex zerfällt dabei sehr langsam, und die Kurve erreicht im gezeigten Zeitabschnitt nicht die Basislinie (Grundwert). Die Injektion der mutierten Faktor H Fragmente bewirkt kaum einen Anstieg in der Resonanz. Der Kurvenverlauf in beiden Proben zeigt eine extrem geringe Dissoziationsrate der gebildeten Bindungskomplexe. Nach dem Stop der Injektion fallen beide Kurven annähernd auf den Wert der Basislinie zurück.

3.5.3 Die Bindung der rekombinanten, mutierten Faktor H Fragmente an Heparin ist reduziert

Die Bindung der rekombinanten Faktor H Proteine an Heparin wurde für die Analysen an Patientenserum mittels affinitätschromatischer Trennung im ÄktaPrime-System untersucht. Der Kulturüberstand der Insektenzellen, der entweder FH 8-20/Wildtyp Protein oder die mutierten Proteine enthielt, wurde auf die Heparin-HiTrap-Säulen geladen. Proteine, die an die Heparin Matrix gebunden sind, wurden durch den graduellen Anstieg der NaCl-Konzentration von der Säule eluiert. Die graphische Darstellung (Abb. 3.15 A) der Elutionsprofile der drei Proteine zeigt den identischen Verlauf der elektrolytischen Leitfähigkeit (NaCl [mS]) und die Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente. Da identische Proteinmengen für diese Experimente verwendet wurden, stehen Elutionsprofil sowie die Stärke der Elutionsfraktionen im direkten Verhältnis zur Bindungsaffinität der drei Faktor H Proteine für die Heparin-Matrix. Es wurden Protein-Fractionen während der Elution gesammelt, die mithilfe von SDS-PAGE mit anschließendem Western Blotting auf die Anwesenheit der Faktor H Proteine untersucht wurden (Abb. 3.15 B). Das FH 8-20/R1210C Protein befand sich überwiegend in den Fraktionen 34-36, das FH 8-20/R1215G Protein in den Fraktionen 35-37 und das Wildtyp Protein FH 8-20 in den späteren Fraktionen 36-38. Die Reinheit der Elutionsfraktionen wurde im silbergefärbten SDS-Gel überprüft (Abb. 3.15 C).

Die beiden mutierten FH Proteine haben im Vergleich zum Wildtyp Protein eine geringere Affinität zu Heparin und darüberhinaus ist ersichtlich, dass sich der R1210C Austausch für diese Funktion gravierender bemerkbar macht als die nur fünf Aminosäuren davon entfernte R1215G Substitution.

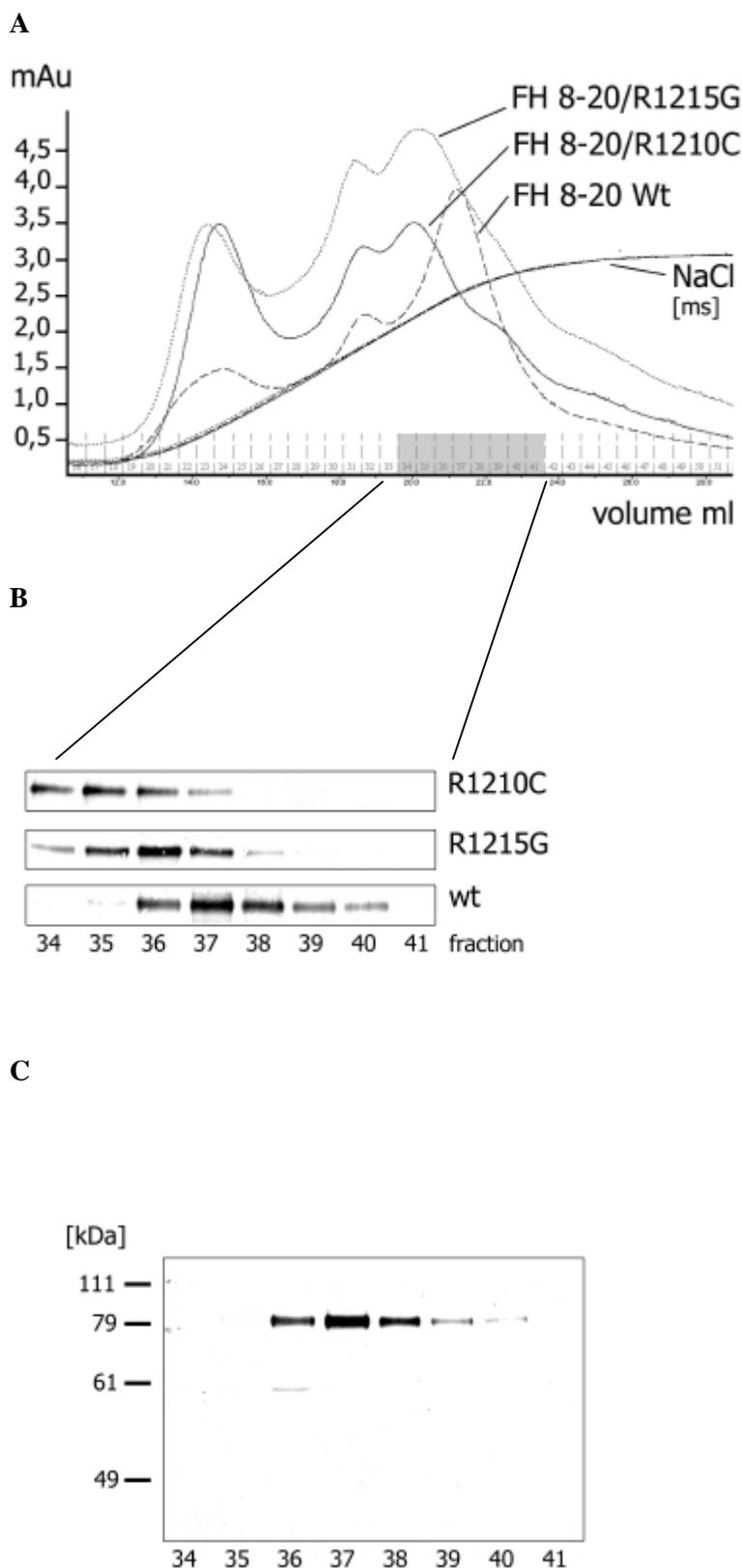


Abb. 3.15 Heparin-Bindung der rekombinanten FH Proteine

Kulturüberstand der Insektenzellen wurde mithilfe des ÄktaPrime Systems auf eine Heparinmatrix geladen.

A) Überlagerte Darstellung der Elutionsprofile nach Bindung des Kulturüberstands mit den Proteinen FH 8-20 Wt, FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G. Der Verlauf der Elution ist als Maß des Spülvolumens (ml) angegeben. Der Kurvenanstieg der optischen Dichte (mAu bei 280 nm) repräsentiert die Elution der Proteine, die an die Heparinmatrix gebunden haben. Neben den Faktor H Proteinen, befinden sich im Kulturüberstand der Insektenzellen noch weitere Proteine, die heparinbindende Eigenschaften besitzen und bei einem Anstieg der Salzkonzentration ebenso eluiert werden. Dies resultiert in unterschiedlichen Maximalwerten der einzelnen Kurven. Die Erhöhung der Salzkonzentration ist durch die Kurve der Leitfähigkeit (NaCl ms) angegeben. Der Verlauf der Kurven in allen drei Experimenten identisch. Die Elutionsfraktionen, die in B) und C) nach SDS-PAGE gezeigt werden, sind grau hinterlegt.

B) Western Blot der Elutionsfraktionen 34-41. Die stärkste Reaktivität mit dem polyklonalen Antiserum ist für das FH 8-20/R1210C Protein in Fraktion 34, FH 8-20/R1215G Protein in Fraktion 36, und für das Wildtyp (wt) Protein in Fraktion 37 zu sehen.

C) Im silbergefärbten Gel der Elutionsfraktionen 34-41 des Wildtyp Proteins wird die Reinheit des Proteins nach der chromatographischen Trennung deutlich.

3.5.4 Die Bindung der rekombinanten, mutierten Faktor H Fragmente an Endothelzellen ist reduziert: Immunfluoreszenz und FACS Analysen

Für eine weiterführende Charakterisierung der rekombinanten Faktor H Mutationen wurden Bindungsstudien an Endothelzellen (HUVEC) mittels Immunfluoreszenz und FACS Analysen durchgeführt.

Immunofluoreszenz. Die HUVEC Zellen wurden in Kammer-Objektträgern (Nunc Chamberslides) für zwei Tage kultiviert und vor den Experimenten mindestens 24 h in FKS-freiem Medium gehalten. Das Monolayer der Zellen war ca. 90 % konfluent, bevor sie mit den aufgereinigten (Ni-Chelatchromatography) und in Bindungspuffer dialysierten Proteine FH 8-20, FH 8-20/R1210C oder FH 8-20/R1215G inkubiert wurden. Die Versuche wurden sowohl an unfixierten als auch an Paraformaldehyd fixierten Zellen durchgeführt. Zur Detektion der FH Proteine wurden mAK T13, polyklonales anti-Faktor H Antiserum und Alexa-Flour-konjugierte Sekundäntisera verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit Propidiumiodid. In allen durchgeführten Experimenten war die Bindung des Wildtyp-Proteins an die Endothelzellen im Vergleich zu den mutierten Proteinen FH 8-20/R1210C oder FH 8-20/R1215G am stärksten (Abb. 3.16). Gebundenes Wildtyp-Protein konnte zudem selbst bei hohen Verdünnungen (1:100) im Immunofluoreszenznachweis detektiert werden. Einen deutlichen Unterschied in der Bindung an die Endothelzellen wurde für die Proteine FH 8-20/R1210C oder FH 8-20/R1215G mit dieser Methode nicht gesehen.

FACS-Analyse. Eine quantitative Untersuchung der Bindung der rekombinanten Faktor H Proteine an die Endothelzellen erfolgte durch die FACS-Analyse. Die Bindung des rekombinanten FH 8-20 Wildtyp-Proteins an die HUVEC war dosisabhängig (Abb. 3.17 A). Die eingesetzten Proteinmengen von 2.5, 5, 10 and 20 µg ergaben im Mittel die Fluoreszenzwerte von 16.2, 22.6, 40.6 oder 45.7. Die beiden mutierten Proteine zeigten eine geringere Affinität für die HUVEC Oberfläche (Abb. 3.17 B). Im Vergleich zum Wildtyp Protein waren die Fluoreszenzwerte (im Mittel) für das FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G Protein auf 59.2 % bzw. 73.5 % gesunken.

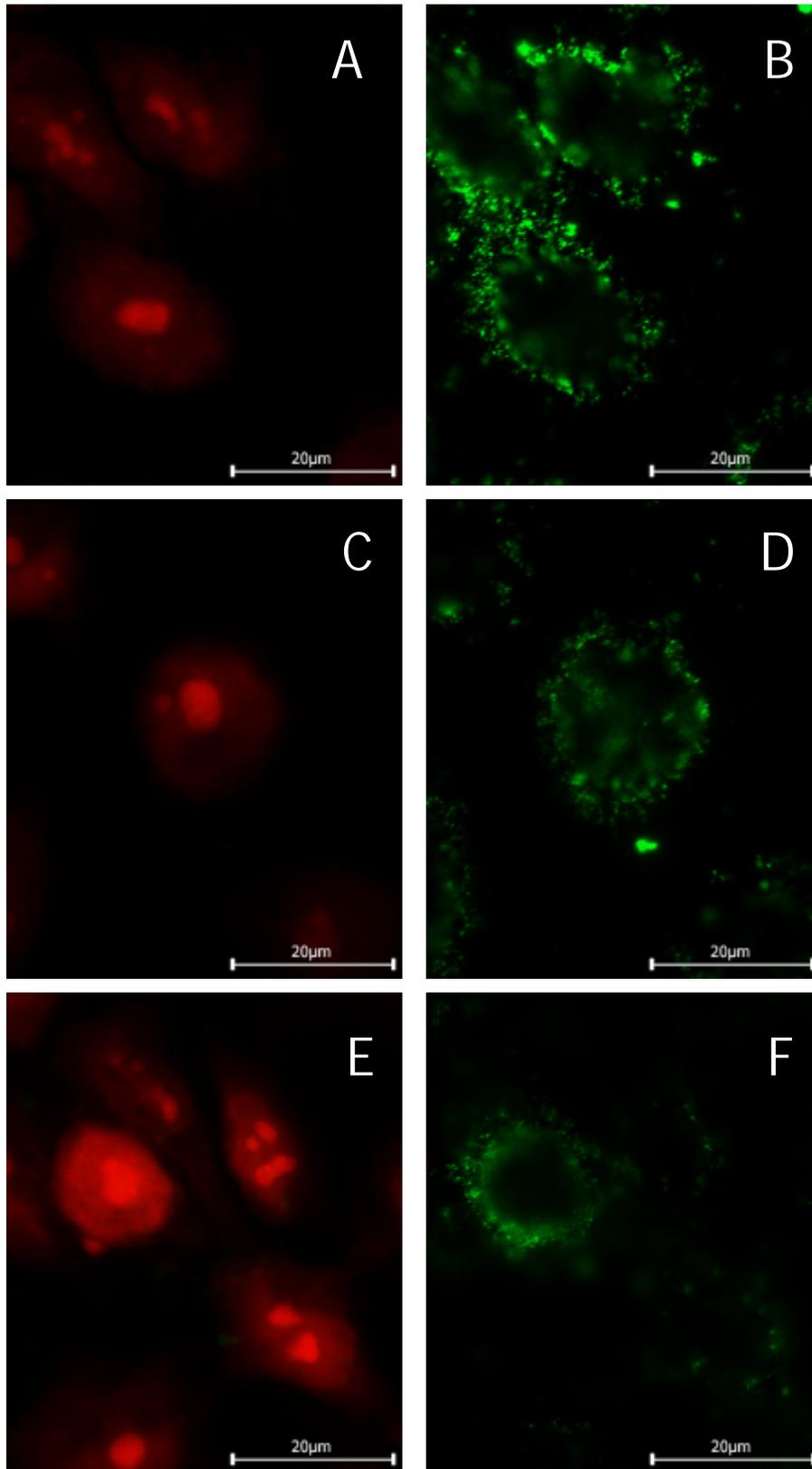
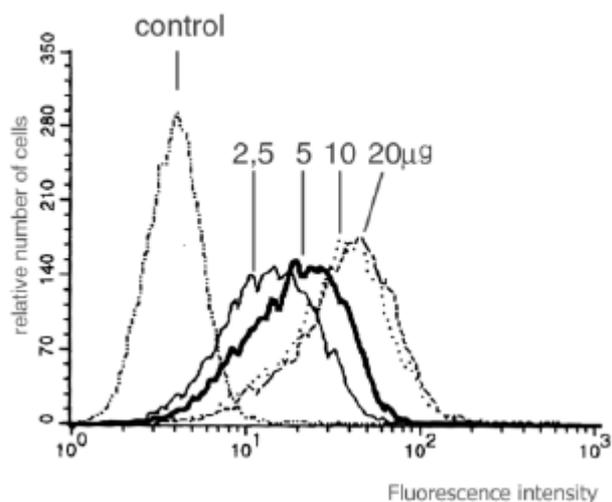


Abb. 3.16: Immunfluoreszenznachweis zur Bindung der rekombinanten Faktor H Proteine an die Oberfläche von Endothelzellen

Die Kernfärbung mit Propidiumiodid (Abb. 3.16 A,C und E) und die detektierte Färbung der gebundenen Proteine im Immunfluoreszenznachweis (Abb. 3.16 B,D und F) ist hier für die Bindungsexperimente an fixierten HUVEC dargestellt. Der verwendete Primärantikörper mAK T13 wurde mit einem Alexa-Fluor-konjugiertem Sekundärantikörper nachgewiesen. Man sieht eine stärkere Bindung des Wildtyp Proteins (B) an die Oberfläche der Endothelzellen im Vergleich zu den Proteinen FH 8-20/R1210C (D) und FH 8-20/R1215G (F). Der Vergrößerungsfaktor von 1: 80 000 für die einzelnen Aufnahmen ist durch einen Balken am unteren Bildrand (Länge des Balkens = 20 µm) angedeutet.

A



B

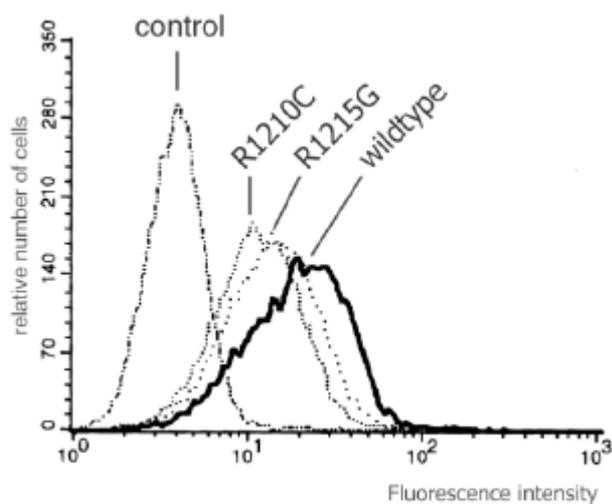


Abb. 3.17 : FACS Analyse der Bindung der rekombinanten Faktor H Proteine an die Oberfläche von Endothelzellen

A) Die Bindung des Wildtyp Proteins FH 8-20 an die Endothelzellen zeigt einen dosisabhängigen Effekt, der in dem dargestellten Experiment eine Sättigung bei 10-20 μ g des Proteins erreicht. Der Anstieg des Fluoreszenzsignales (Fluorescence Intensity) repräsentiert diese Bindung. In der dargestellten Kontrolle (control) wurde das FH 8-20 Protein durch Puffer ersetzt. Das erhaltene Fluoreszenzsignal wird durch die unspezifische Bindung des mAK T13 und des Sekundärantiserums verursacht.

B) Die Bindung der Proteine FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G ist im Vergleich zum Wildtyp Protein reduziert. Es wurde jeweils 5 μ g des Proteins für die Bindungsanalyse eingesetzt.

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine besondere Bedeutung des C-Terminus von Faktor H in seinen zentralen Funktionen, der Bindung an das C3b Molekül und der Interaktion mit polyanionischen Molekülen, und geben erstmals einen experimentellen Hinweis auf die physiologische Bedeutung von Faktor H Gendefekten, und ihrer Rolle in dieser Form des Hämolytisch Urämischen Syndroms.

Die Charakterisierung der Faktor H Bindungsstellen von insgesamt elf monoklonalen Antikörpern, sowie die Eingrenzung distinkter Epitope innerhalb der SCRs 19 und 20 für drei dieser mAK, erwies sich als wertvolle Grundlage für spätere Funktionsanalysen.

4.1 Ein Faktor H Assoziiertes HUS ist in einer Untergruppe der Patienten festzustellen

In bisher fünf, voneinander unabhängigen Mutationsstudien an Patienten mit HUS und der ähnlichen mikroangiopatischen Erkrankung TTP, wurden bis heute weltweit 18 Index-Fälle beschrieben, in denen eine Mutation des Faktor H Gens in familiären oder sporadischen HUS Patienten nachgewiesen ist (Warwicker *et al.*, 1998; Buddles *et al.*, 2000; Caprioli *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2001; Perez-Caballero *et al.*, 2001b). Die insgesamt 16 Mutationen resultieren in nur einem Fall in der kompletten Deletion des Faktor H Gens, in vier Fällen in einer Verschiebung des Nukleotid-Leserahmens (Frameshift) und in 11 Fällen in Nukleotid-Substitutionen (Missense). Die Mutationen sind in den Exons 2, 8, 19, 20, 21, 22 und 23 lokalisiert. Die Mutationen in den Exons 2 und 8 sowie je eine der Mutationen der Exons 22 und 23 führen zum vorzeitigen Abbruch der Translation. Unter den beschriebenen Mutationen, kommt es zu einer auffälligen Häufung innerhalb des Exons 23, das für das C-Terminale SCR 20 codiert. Mit einer Ausnahme trägt jeweils nur ein Allel der betroffenen Patienten die Faktor H Mutation (Heterozygotie). In dieser Form des atypischen, familiären HUS, sind die Mitglieder der betroffenen Familie homozygot für eine 24 bp Deletion in Exon 23, die zu einem Verlust der letzten acht Aminosäuren in SCR 20 führt (Warwicker *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2001). Die Existenz von Faktor H Defekten in einer Untergruppe der Patienten und eine Assoziation mit dem Syndrom wurde durch die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit bestätigt. Diese Befunde unterstützen die von Caprioli *et al.* (2001) vorgeschlagene Nomenklatur als FH-assoziierte Form des HUS.

In Untersuchungen an insgesamt 122 Patienten, die in einem ersten, deutschen Register für HUS Fälle erfaßt werden, wurden molekulargenetische Mutationsanalysen (AG Neumann, Freiburg) mit eigenen proteinchemischen Serumanalysen verbunden. Die Ergebnisse der Studie (siehe Tabelle 4.1) belegen die Notwendigkeit, Faktor H Analysen auf DNA und Proteinebene durchzuführen und diese in indizierten Fällen auf RNA-Ebene zu erweitern.

Bei 30% der untersuchten Patienten, die heterozygot für eine (bei Patient N20 zwei) Punktmutation im Faktor H Gen sind, wurde eine eindeutige Veränderungen auf Proteinebene nachgewiesen. In drei weiteren Patienten erscheint der Faktor H Gehalt erniedrigt. Interessanterweise war bei drei Patienten, die ein auffälliges Faktor H Bandenmuster im Western Blot des Serum Faktor H zeigen, keine zugrundeliegende Mutation festgestellt worden. In den durchgeführten SSCP Analysen (AG Prof. Neumann) wurden exonspezifische Oligonukleotide verwendet, die an den Exon-Intron Grenzen der einzelnen SCR codierenden Regionen des Faktor H Genes binden. Mögliche Mutationen, die in intronischen Sequenzbereichen liegen, können durch diese Methode nicht erfaßt werden. An diesen Patienten, als auch bei Patient N11, werden möglicherweise die Ergebnisse aus RT-PCR Analysen Aufschluß über die Integrität der Faktor H Transkription (RT-PCR) geben können. Im Serum von Patient N11 wurde eine zusätzliche 145 kDa Faktor H Isoform nachgewiesen, die sich jedoch nicht mit den C-Terminus spezifischen mAK E14 und C18 detektieren läßt. Die Ursache für die fehlende Reaktivität dieser mAK scheint in einem wahrscheinlich vollständigen Verlust des SCR 20 zu liegen. Die benachbarten SCRs sind nicht beeinflusst, wie die positive Reaktivität der mAK L20 (SCR 19) und T13 (SCRs 15-18) beweist. Es ist unwahrscheinlich, daß die identifizierte Punktmutation (3135A/T), die sich in dem einzelnen Aminosäureaustausch T987A in SCR 17 äußert, an diesem Phänotyp beteiligt ist. Exon 23 des Patienten Faktor H Gens, das für das C-terminale SCR 20 codiert, wurde mittlerweile, ohne Erfolg, von drei verschiedenen Arbeitsgruppen in SSCP-Analysen auf eine mögliche Mutation untersucht. Einiges spricht dafür, daß ein Defekt im Prozessieren der nativen Faktor H RNA vorliegt, und die Ursache hierfür könnte, wie für andere genetisch bedingte Erkrankungen gezeigt (Cartegni *et al.*, 2002), in einer intronischen Mutation liegen, die Silencer oder Enhancer Kontroll-Element betrifft. Die Faktor H Doppelbande, die im Serum des Patienten N20 nachgewiesen wurde, ist auf die vom Vater weitergegebene Punktmutation zurückzuführen, die sich auf Proteinebene in dem Austausch eines Valinrestes mit der Aminosäure Glycin (V1142G) in SCR 19 äußert. Eine vergleichende Analyse des Serum Faktor H des Patienten N1, der heterozygot für eine Punktmutation in der Signalpeptidsequenz ist (C80T), und des Patienten N20, der für diese Mutation (compound) heterozygot ist, konnte dies klar zeigen. Die Mutter des Patienten N20, die die Mutation des Signalpeptides vererbte, als auch Patient N1 haben eine normale Faktor H Bande, die in ihrem Gehalt etwas gering erscheint, während Patient N20 und der Vater eine Faktor H Doppelbande aufweisen.

In Patient N17 ist die molekulare Grundlage für die Existenz der hochmolekularen 175 kDa Faktor H Isoform klar von der gemeinsamen, bereits beschrieben (Caprioli *et al.*, 2001; Galbusera *et al.*, 2002) und in dieser Arbeit funktionell untersuchten C3701T Transition in Patient F106 abzuleiten.

Eine mögliche Relevanz der identifizierten Faktor H Mutationen und der phänotypischen Veränderungen für die Ausprägung des HUS in diesen Patienten werden zukünftige funktionelle Untersuchungen am Patientenserum, wie in dieser Arbeit für Patient F106 vorgestellt, erbringen.

Neben Punktmutationen, die zu einem einzelnen Aminosäureaustausch in zentralen und C-terminalen SCRs des Faktor H Proteins führen, wurde in einem Patienten die Deletion (Patient N18) eines Nukleotidtripletts und in zwei Patienten die Addition zusätzlicher Nukleotide (Patient N6 und Patient

N16) identifiziert. In diesen Patienten wurde keine Auffälligkeiten in der Faktor H Western Blot-Analyse festgestellt. In welchem Maße sich diese Mutationen auf Ebene des Faktor H Proteines auswirken, bleibt unklar.

Im Gegensatz hierzu, ist die Expression eines verkürzten Faktor H Proteins bei Patient N3 durch den vorzeitigen Abbruch der Transkription aufgrund der identifizierten Missense Mutation anzunehmen. Der Abbruch erfolgt auf Höhe des SCR 12, doch im Serum des Patienten ist kein Faktor H Molekül mit verringertem Molekulargewicht nachzuweisen. Dieser Umstand kann in einer erheblich verringerten Halbwertszeit des verkürzten Proteins oder einer vollständigen Blockierung der Sekretion liegen. Im Serum des Patienten wird unabhängig davon lediglich von einem Allel funktionell aktives Faktor H Protein gebildet, daß die Komplement regulierenden Eigenschaften von Faktor H besitzt und ausüben kann.

Die beobachtete Häufung HUS assoziierter Punktmutationen innerhalb des C-Terminus von Faktor H wurde durch die Mutationsanalysen der AG Neumann teilweise bestätigt. In 6 Patienten (6/20) wurde eine Mutation in den Exons 22 und 23 identifiziert, der weitaus größere Teil in dieser Patientengruppe ist allerdings heterozygot für Mutationen entlang des Faktor H Genes in Sequenzbereichen die für die SCRs 11, 12, 14, 15, 16, 17 und 18 kodieren.

Aus der neuen Klassifizierung des Faktor H assoziierten HUS ergibt sich auch eine direkte klinische Konsequenz. Obwohl die Zahl erneuter (rekurrenter) HUS Erkrankungen in atypischen Fällen sehr hoch ist, gehört zur üblichen Behandlungsstrategie bei schweren HUS Fällen, bei geeignetem immunologischen Bild eine Transplantation der Niere durchzuführen. Dies erscheint bei einem zugrundeliegenden Faktor H Defekt zwecklos und würde in dieser Patientengruppe die Rekurrenz des Syndroms erklären. Da der größte Anteil des serumlöslichen Faktor H in der Leber gebildet wird, wurde nun erstmals erfolgreich zusätzlich zur Spenderniere, partiell neues Lebergewebe in einen jungen Patienten transplantiert (Remuzzi *et al.*, 2002b).

Tabelle 4.1 HUS Register: Zusammenfassung der Geno- und Phänotypischen Veränderungen der untersuchten Patienten

Patient Nr.	Mutation* SSCP Analyse	AS Ausprägung	C3 Protein**	Faktor H Protein Western Blot Analyse
1	C80T	L3F Signalpeptid	Nb	normal bis erniedrigt
2	T1963G	C630W in SCR 11	Nb	Normal
3	C2214G	S714 Stop in SCR 12	Nb	normal bis erniedrigt
4	G2576T	V835L in SCR 14	Nb	Normal
5	G2621A	E850L in SCR 15	Nb	Normal
6	2309 + 8 T/A (Intron)	SCR16	Nb	Normal
7-10	G3007T	W978C in SCR 16	In Patient N 7 erniedrigt	normal bis erniedrigt
11	A3032G	T987A in SCR 17	Nb	zusätzliche Bande bei 145 kDa u. starke 175 kDa Bande
12	T3200C	C1043R in 17	erniedrigt	Erniedrigt
13	C3299G	Q1076E in SCR18	Nb	Normal
14	T3497G	Y1142D in SCR 19	erniedrigt	Normal
15	T3542C	W1157R in SCR 19	erniedrigt	Normal
16	3566 + 1G/A	Splicing Defekt	Nb	Normal
17	A3135T und C3701T	Y1021F in SCR 17 und R1210C in SCR 20	Nb	hochmolekulare Bande bei 175 kDa
18	3719-3721 del ACA	T 1216 in SCR 20	erniedrigt	Erniedrigt
19	C3749CT	P1226S in SCR 20	Nb	Erniedrigt
20	C80G und T3474G	L3F Signalpeptid und V1142G in SCR 19	Nb	Doppelbande FH

* Daten der SSCP-Analyse der AG Neumann ** Quantitative C3 Proteinbestimmung der klinischen Gruppen, Nb nicht bekannt

4.2 Die hochmolekulare Faktor H Isoform im Serum des Patienten F106 repräsentiert den Phänotyp der Substitution R1210C in SCR 20

Die Charakterisierung der Faktor H Proteine im Serum des Patienten F 106 der an der familiären Form des atypischen HUS (Caprioli *et al.*, 2001)leidet, erbrachte erstmalig einen sichtbaren Beweis für die molekulare Konsequenz die sich aus dem einzelnen Aminosäureaustausch in SCR 20 für das Faktor H Protein ergibt.

In Western Blot Analysen an Serum des Patienten F106, der heterozygot für die beschriebene Mutation C3701T (Position in der primären FH-Nukleotidsequenz) in Exon 23 ist , wird eine 175 kDa Bande von allen verfügbaren Antiseren und mAK`s detektiert. Diese Bande wurde ebenso in Patient N17 nachgewiesen, der eine identische Mutation im Faktor H Gen aufweist. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei diesem Molekül um eine Isoform des Faktor H Proteins handelt, die auf die identifizierte Mutation zurückzuführen ist. Die elektrophoretische Auftrennung des Patientenserums oder aufgereinigter Fraktionen des Serums resultierte unter reduzierenden Trennbedingungen in dem Verlust der abnormalen Bande und führte zu einem gleichen Bandenmuster wie in der gesunden Kontrolle. Eine mögliche Auswirkung der zugrundeliegenden Mutation auf die Konformation des betroffenen SCR 20 ist naheliegend. Aufgrund der cysteinreichen Primärstruktur jeder SCR Domäne, die im Wesentlichen durch die Ausbildung der konservierten Disulfidbrücken geprägt ist, ist ein Einfluß des zusätzlichen, fünften Cysteinrestes auf die Struktur der Domäne und eventuell des gesamten mutierten Proteins wahrscheinlich. Allerdings ist der Unterschied von etwa 25 kDa, der sich im Vergleich der Mobilität zwischen normalem Faktor H (150 kDa) und der Faktor H Isoform ergibt, möglicherweise nicht allein durch eine Änderung der Sekundärstruktur in dem mutierten Protein zu erklären. Die Beteiligung eines zweiten Proteins, das mit dem mutierten Faktor H einen stabilen Dimer bildet könnte eine Ursache hierfür sein, die jedoch einer experimentellen Klärung bedarf.

Die enzymatische Deglykosylierung der reduzierten Proben des Patienten und der gesunden Kontrollperson ergab ein identisches Proteinprofil. Ein Unterschied in der posttranslationalen Modifizierung ist demzufolge für die Faktor H Isoform des Patienten nicht anzunehmen.

Die vorliegende Studie führt erstmals einen experimentellen Nachweis für die Beeinträchtigung der Faktor H Funktion durch zwei HUS-assoziierte Punktmutationen im C-Terminus des Moleküls. Die besondere Bedeutung des C-terminalen SCR 20 für die Bindung des Faktor H an den Liganden C3 als auch an Heparin wurde durch die Ergebnisse kompetitiver Analysen, unter Verwendung spezifischer mAK, gezeigt.

4.3 Die Interaktion des Faktor H Proteins mit dem C3 Molekül ist abhängig von der Integrität der C-terminalen Faktor H Domäne SCR 20

Faktor H hat insgesamt drei Bindungsstellen für das intakte C3b Molekül bzw. seine Spaltprodukte C3c und C3d, und diese wurden innerhalb der N-terminalen SCRs 1-4, der zentralen SCRs 6-10 und der C-terminalen SCRs 19-20 lokalisiert. Die Blockierung des SCR 20, durch die kompetitive Bindung der spezifischen mAK E14 und C18, führte in den vorgestellten Resonanzstudien zu einem kompletten Verlust der Faktor H Bindung an den immobilisierten Liganden C3b. Die Blockierung des N-terminalen SCR 5 mit dem mAK B22 zeigte keine inhibitorische Wirkung, wie aus vorangegangenen Studien zu erwarten war (Brandt, 1993). MAK L20, dessen lineares Hauptepitop innerhalb des SCR 19 liegt, konnte selbst bei 20 fachem molarem Überschuss keine Reduktion der Faktor H-C3b Bindung erreichen. Mit diesem Antikörper wurden im Gegenteil erhöhte Resonanzantworten erreicht und dieser additive Effekt lässt sich auf die quervernetzenden Eigenschaften der Immunglobuline zurückführen. Die Struktur eines Antikörpers ist durch die Existenz von zwei Antigenbindungsstellen gekennzeichnet. Jedes Antikörpermolekül kann maximal zwei Antigenmoleküle binden und dieser Umstand führt in den dargestellten Experimenten zu einer lokal erhöhten Faktor H Konzentration in der Messzelle. Dieses Phänomen ist ein weiterer Nachweis dafür, dass die C-terminale Bindungsstelle nicht in dem Epitop des Antikörpers liegt und somit wahrscheinlich auch nicht in SCR 19.

Der vollständige Verlust der C3b Bindung aufgrund der Blockierung des C-terminalen SCR 20 zeigt deutlich, daß der Kontakt des Faktor H Moleküls mit oberflächen-gebundenem C3b von dieser Domäne abhängig ist und von keiner der beiden anderen C3 bindenden Region übernommen werden kann. In der natürlichen Konformation des nativen Faktor H Moleküls könnte dies eine Maskierung der N-terminalen und zentralen Bindungsstellen und eine freie Zugänglichkeit des C-Terminus bedeuten. Das gemeinsame Hauptepitop der blockierenden mAK E14 und C18 wurde auf den Sequenzbereich RTGESVEFVCKR (R1192-R1203 der Faktor H AS-Sequenz) eingegrenzt. Innerhalb oder in geringer Nähe zu dieser Region muss die C3b Bindungsstelle des SCR 20 vermutet werden. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse aus den Bindungsexperimenten zu den HUS assoziierten Faktor H Mutationen gestützt. In Resonanzstudien mit den rekombinanten Faktor H Proteinen FH 8-20 Wildtyp, FH 8-20/R1210C und FH 8-20/R1215G wurde gezeigt, daß ein einzelner Aminosäureaustausch innerhalb des C-terminalen SCR 20 in der Nähe des mAK Hauptepitopes zu einem erheblichen Verlust der Faktor H-C3b Bindung führt. Allerdings ist die strukturelle Integrität jedes SCRs abhängig von der korrekten Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen den insgesamt vier konservierten Cysteinresten. Der blockierende Effekt der R1210C Mutation, die zu einem zusätzlichen fünften Cystein innerhalb des SCR 20 führt, könnte somit auf Störungen der SCR Konformation zurückzuführen sein und muß nicht zwangsläufig in der Position der Mutation begründet sein. Eine strukturelle Veränderungen dieser Auswirkung ist für die Substitution des Arginines an Position 1215 mit einem Glycinrest eher unwahrscheinlich und kann als Indiz dafür gewertet werden, dass diese Aminosäure an der Bindung des C3b Moleküls beteiligt ist.

Die Substitutionen R1210C und R1215G sind mehrfach und in unabhängigen Studien in HUS Patienten identifiziert worden und mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird erstmals ein Beweis für die funktionelle Konsequenz der Mutationen erbracht. Es bleibt allerdings offen, ob die C3-Bindung des mutierten Faktor H Proteins, das sich frei gelöst im Serum der Patienten befindet, herabgesetzt ist und folglich die Funktion als Kofaktor für die Faktor I vermittelte Inaktivierung des C3b Moleküls in der flüssigen Phase beeinträchtigt wird. Zukünftige Studien an rekombinanten, gesamten Faktor H Proteinen, die in einem alternativen Expressionssystem generiert werden, als auch an aufgereinigten, mutierten Faktor H Proteinen der Patienten könnten diese offenen Fragen klären.

4.4 Die Interaktion des Faktor H Proteins mit Heparin ist abhängig von der Integrität der C-terminalen Faktor H Domäne SCR 20

Die Eigenschaft von Faktor H Glykosaminoglykane (GAG), beispielsweise Heparinsulphate und Sialursäuren, auf der Oberfläche autologer Zellen oder als Bestandteil der extrazellulären Matrix zu erkennen und zu binden, ist der entscheidende Faktor für die sog. Diskriminierung zwischen Selbst und Nichtselbst bzw. Aktivatoren und Nicht-Aktivatoren des Komplement (Meri & Pangburn, 1990; Blackmore *et al.*, 1996). Diese Eigenschaft wurde zunächst alleine dem C3 Molekül zugesprochen (Pangburn *et al.*, 1980), doch wahrscheinlicher ist, daß ein Zusammenspiel beider Moleküle notwendig ist, um die Komplementaktivierung auf Nicht-Aktivator Oberflächen zu steuern. Zu den Liganden des Faktor H zählen Sialursäuren, die sich in hoher Dichte auf den Membranen aktivierender Zellen und im experimentellen System auf Schaf-Erythrozyten (E_s) befinden. Die Interaktion des Faktor H Proteins mit polyanionischen Strukturen der Zelloberfläche und dem C3b Molekül wird über mehrere Regionen, die sich entlang des Faktor H Proteins verteilt befinden, vermittelt (Pangburn *et al.*, 2000). Zudem wurde eine komplexe Beteiligung verschiedener Bereiche innerhalb des Faktor H Moleküls beobachtet, die von der Natur der aktivierenden Oberfläche abhängig ist. Ein genauer Mechanismus für die diskriminierende Eigenschaft des Faktor H, als auch die Lokalisation der funktionellen Domänen und ihre Bedeutung für die regulatorischen Funktionen des Faktor H Moleküls ist noch nicht aufgeklärt. Der N-Terminus des Faktor H Moleküls ist für die Bindung an Sialinsäuren allerdings nicht ausreichend (Sharma & Pangburn, 1996). In Bindungsstudien wurde unter Verwendung von Faktor H Deletionsmutanten diese Funktion auf die SCRs 16-20 eingegrenzt (Pangburn *et al.*, 2000). Es bleibt weiterhin ungeklärt, ob das Faktor H Molekül mit identischen Aminosäuren an das polymere Glykosaminoglykan Heparin bindet. Diese Interaktion wurde für das SCR 7 (Blackmore *et al.*, 1996) und das C-terminale SCR 20 (Blackmore *et al.*, 1998) nachgewiesen. Eine putative dritte Bindungsstelle liegt innerhalb der zentralen SCRs 12-14 (Pangburn *et al.*, 1991). Eine Bindung des Faktor H an negativ geladene Strukturen wird wahrscheinlich innerhalb der Domänen über die Aminosäuren Arginin und Lysin vermittelt, die eine positive Partielle Ladung tragen. Die Fähigkeit des Faktor H Proteins an Glykosaminoglykane, beispielsweise Heparinsulphate, zu binden ist von herausragender Bedeutung für die Selbst-Erkennung und Regulation

der Komplementaktivierung in extrazellulären Kompartimenten humaner Gewebe. In diesen Räumen liegt die Kontrolle der Komplementaktivierung vollständig in der Hand löslicher Regulatoren.

Eine Schädigung des Nierenendothels wird gemeinhin als erster Schritt in der Pathogenese des HUS gesehen. Eine direkte Folge der Endothelzellschädigung ist die Exposition der subendothelialen Basalmembran, die komplement aktivierend wirkt. Unter diesem Aspekt fällt den beobachteten Funktionsstörungen, die durch Blockierung der C-terminalen Faktor H Domäne als auch in mutierten Faktor H Proteinen nachgewiesen wurde, eine wichtige physiologische Relevanz zu. Eine wirksame Faktor H vermittelte Regulation der Komplementaktivierung auf diesen Oberflächen kann wahrscheinlich nur dann stattfinden, wenn die Bindung des Moleküls an die exponierte Basalmembran und generell an Proteine der extrazellulären Matrix erfolgreich ist.

Aus dem in der Arbeit etablierten Festphasen-Assay ging deutlich hervor, dass die Bindung des nativen Faktor H Moleküls an Heparin durch die Blockierung des C-terminalen SCR 20 mit den Gruppe III mAK E14 und C18 vollständig aufgehoben wird. Die mAK L20 (Gruppe III, SCR 19), T13 (Gruppe II, SCRs 15-18) und der Gruppe I mAK B22 zeigten kaum Wirkung auf die Heparinbindung des Faktor H. Das gemeinsame Hauptepitop RTGESVEFVCKR (R1192-R1203 der vollständigen Faktor H AS-Sequenz) der beiden blockierenden Antikörper endet mit den basischen Aminosäuren K1202 und R1203. Laut einem computerunterstütztem Bindungsmodell sollen diese beiden Seitenketten zusammen mit vier nachfolgenden Aminosäuren die einen basischen Bereich bilden, der die Heparinbindung der Domäne vermittelt (Perkins & Goodship, 2002) und mit den eigenen experimentellen Daten scheint die Region innerhalb des SCR 20 bestätigt. Die Faktor H- Bindung der mAK E14 und C18 an das ermittelte Epitop innerhalb des SCR 20 ist sehr spezifisch, wie ein Sequenzvergleich zu den anderen Mitgliedern der Faktor H Familie verdeutlicht.

Besonders im C-terminalen SCR 20 herrscht die höchste Sequenzhomologie zwischen Faktor H und den Faktor H verwandten Proteinen (FHR 1-4) und um so erstaunlicher ist es, dass beide Aminosäuren (K1202 und R1213) zusammen lediglich in der AS-Sequenz des FHR-1 konserviert sind. Die ersten drei Positionen der ermittelten Epitopsequenz (RTG) sind in den Proteinen FHR-1 und FHR-2 enthalten. Ein Vergleich des gesamten Hauptepitops zeigt, dass die Sequenz des FHR-1 sich in einer Position (RTGESAEFVCKR), des FHR-2 Protein in 3 (RTGDIVEFVCKS) und der Proteine FHR-3 und FHR-4 in 5 Positionen (KTGDTIEFMCKL) von der Faktor H Sequenz des Hauptepitopes unterscheidet. Die Reaktivität der beiden Antikörper mit dem Faktor H Protein und beiden FHR-1 Formen, die in der Western Blot Analyse des humanen Serums gezeigt wurde, deutet auf eine hohe Spezifität der mAK für das ermittelte Hauptepitop hin. Dies gilt ebenso für mAK L20 dessen Bindungsstelle innerhalb des SCR 19, zu 100% mit dem FHR-1 Protein übereinstimmt, und in den Proteinen FHR-2, FHR-3 und FHR-4 lediglich in einer und je drei Positionen abweicht. Die hohe Spezifität der Antikörperbindung wurde in Dot Blot und Western Blot Analysen mit den rekombinanten FHR-3 und FHR-4 Proteinen überprüft (Daten nicht gezeigt). Keiner der drei mAK detektierte diese Proteine.

Wie gezeigt, geht die Fähigkeit des Faktor H Proteins an Heparin zu binden durch eine Blockierung des SCR 20 vollständig verloren. Weder die gesicherte N-terminale Bindungsstelle innerhalb des SCR 7,

noch die putative dritte funktionelle Region innerhalb der SCRs 12-14 kann die Bindung an Heparin, die über den C-Terminus des Moleküls vermittelt wird, ersetzen.

Wie bereits erwähnt ist die Bindung des Faktor H an polyanionische Strukturen eine entscheidende Eigenschaft für die diskriminierende und Komplement regulatorische Funktion des Moleküls. Die Bedeutung der HUS-assoziierten Mutationen R1210C und R1215G für die Heparinbindung des Faktor H wurde deshalb im chromatographischen Verfahren untersucht. In der vorgestellten Heparinchromatographie des Serums von Patient F106, gelang es erstmals direkt im Patientenmaterial eine Störung in dieser Faktor H Funktion zu zeigen. Die Bindung der hochmolekularen Faktor H Isoform, die den R1210C Austausch im mutierten Protein repräsentiert, hatte eine geringere Affinität zur Heparinmatrix als natives Faktor H des Patienten oder das der gesunden Kontrolle. Die Mutation wirkte sich ebenso störend auf die Bindung des rekombinanten Proteins FH 8-20/R1210C an Heparin aus. Das Arginin an dieser Position wurde als vierte, putativ wichtige Aminosäure der basischen Region innerhalb des SCR 20, für die Vermittlung der C-terminalen Heparinbindung des Faktor H vorgeschlagen (Perkins & Goodship, 2002). Diese Einschätzung deckt sich hervorragend mit den dargestellten Beobachtungen und zeigt erstmals experimentell den inhibitorischen Einfluß auf die Heparinbindung für diese HUS-assoziierten Punktmutation. Zu einem geringeren Grad wirkte sich die zweite, rekombinant exprimierte Mutation aus. Die Bindung des FH 8-20/R1215G Proteins an die Heparinmatrix war im Vergleich zum Wildtyp Protein reduziert, aber nicht im gleichem Maße wie für das FH 8-20/R1210C Protein beschrieben. Ob sich dieser Unterschied auf die biochemischen Eigenschaften der substituierenden Aminosäure zurückführen läßt, oder auf die Position des Aminosäureaustausches bleibt unklar.

Der hervorgerufene Funktionsverlust der durch die blockierenden mAK E14 und C18 im Faktor H Molekül zu beobachten ist, als auch die Inhibition bzw. Reduktion der C3b- und Heparinbindung der mutierten Faktor H Proteine impliziert, dass beide Interaktionen maßgeblich über eine möglicherweise überlappende Region innerhalb des SCR 20 vermittelt werden.

Eine solche Beeinträchtigung der Faktor H Funktion kann im Nierenepithel der betroffenen Patienten einen erheblichen Einfluß auf das Krankheitsgeschehen haben. Für die rekombinanten Faktor H Proteine wurden deshalb Bindungsstudien an humanen Endothelzellen durchgeführt. In Immunfluoreszenz und FACS Analysen wurde eine Reduktion in der Bindung an die Oberfläche der Zellen klar gezeigt. Auch in diesen Experimenten wirkte sich die Substitution R1210C am gravierendsten aus.

4.5 Thrombotische Mikroangiopathie

Als einer der auslösenden Faktoren thrombotischer Mikroangiopathien (TMA), Merkmale des HUS als auch der TTP, gilt die Aktivierung ruhender renaler Endothelzellen (EZ) und der daraus resultierende Wechsel vom antithrombotischen zu einem prothrombotischen, anti-fibrinolytischen Zustand in einer lokal begrenzten Umgebung. Die TMA ist durch Thrombozytopenie, mikroangiopathische hämolytische Anämie, neurologische Defekte, Nierenschädigungen und variablen Schädigungen an anderen Organen gekennzeichnet. Über die primären Ursachen der initialen Endothelschädigung in arteriellen Gefäßen der betroffenen Organe, die zur pathologischen Entwicklung eines TMA führen, herrscht allerdings noch Unklarheit. Neben der fast identischen

Merkmalsausprägungen beider Krankheiten, ist dies wohl der entscheidende Faktor, weshalb bis heute bei der Klassifizierung der TMA Erkrankungen im allgemeinen und des TTP und HUS im speziellen kein Konsens erreicht wurde. Im allgemeinen wird eine TMA im Erwachsenenalter, die zusätzlich von gravierenden neuronalen Schädigungen in den Patienten begleitet wird, als TTP diagnostiziert. Eine TMA in Kindern, die besonders unter renalen Schädigungen leiden, wird mit dem HUS assoziiert. Oft wird HUS nach dem Alter der Patienten, in ein Kindheits-HUS und Erwachsenen HUS eingeteilt, da die endemische Form der Erkrankungen vor allem im Kindesalter eintritt. Diese Diarrhö (D+) assoziierte Form wird zu fast 90% der Fälle durch eine initiale Infektion mit E.coli 0157:H7 Stämmen ausgelöst. Nach eigenen Ergebnissen, die aus der Serumanalyse des Faktor H bei über 200 Kindern und Jugendlichen, die an der atypischen, D- Form erkrankt sind, gewonnen wurden, scheint diese Einteilung unglücklich gewählt. Da die Faktor H Mutationsanalysen für diese Patienten noch nicht abgeschlossen sind, wurden die Resultate dieser Studie in der vorliegenden Arbeit nicht vorgestellt. In den durchgeführten Western Blot Analysen der Patientenserum wurden in mehreren Fällen abnormale Faktor H Formen identifiziert und eine Häufung von FHR-1 Defizienzen (10%) festgestellt. Dies steht im Einklang mit den vorgestellten Ergebnissen an erwachsenen HUS Patienten und eine allgemeine, alters-unabhängige Einteilung als FH-assoziiertes HUS in diesen Fällen erscheint von Vorteil. Die Häufung eines kompletten Verlustes an FHR-1, welches bisher als natürlicher Polymorphismus in unterschiedlichen Ethnien betrachtet wird, ist auffallend und deutet auf eine Beteiligung im Krankheitsmechanismus hin. Wenig ist über die funktionellen Eigenschaften des FHR-1 Proteins bekannt und so würden zukünftige Untersuchungen an diesen Patienten eventuell zur Charakterisierung des Proteins beitragen.

Wie bereits erwähnt, ist die differentielle Diagnose der TMA Erkrankungen HUS und TTP schwierig und oft wird deshalb zur Symptombeschreibung der Begriff HUS/TTP gewählt. Die Suche nach genetischen Markern, die bei Erfolg eine bessere Klassifizierung des HUS und eine Differenzierung des HUS/TTP erlauben würde, führte zur Identifizierung der beschriebenen Faktor H Mutationen in Patienten mit atypischen HUS. Generell werden alle HUS Fälle in denen vorangegangene Infektion mit Verotoxin

auszuschließen ist, dieser sporadischen, rekurrenten oder familiär auftretenden Form zugeordnet. Als potentieller Marker für HUS/TTP und eine mögliche Ursache für die thrombotische Erkrankung, wurden schon seit längerem Störungen im Blutgerinnungssystem postuliert. Ein Auftreten von serumgelösten „ungewöhnlich großen“ vWf Molekülen (unusually large vWF, ul vWf) wurde in diesen Arbeiten mit dem HUS/TPP assoziiert (Baker & Moake, 2000), allerdings konnte dies in neueren Studien nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu, scheint ein genetischer Defekt in der vWf-Protease ADAMST13 als auch die Existenz abnormaler, fragmentierter vWF Moleküle, tatsächlich mit familiären und rekurrenten Formen des TTP assoziiert zu sein (Furlan *et al.*, 1998; Galbusera *et al.*, 2002). Die physiologische Bedeutung der beobachteten vWF Abnormalitäten und ihre Auswirkung auf die krankheitsauslösende, pathologische Thrombusbildung in den Gefäßen der betroffenen Organe muss noch geklärt werden. Dieses Charakteristikum eignet sich leider nicht für eine Unterscheidung beider Erkrankungen, denn ungewöhnliche vWF Fragmente wurden ebenso in atypischen HUS Fällen identifiziert (Furlan *et al.*, 1998; Galbusera *et al.*, 2002).

Durch intensive Forschungen an der klassischen, D+ Form des HUS wurden neue Modelle für die Wirkungsweise der bakteriellen Enterotoxine (Verotoxin Vt oder ShigaToxin Stx) und ihrer Beteiligung an der Pathogenese des Syndroms entwickelt. Man nimmt an, daß das bakterielle Toxin über einen noch ungeklärten Translokationsmechanismus über Zellen des Darmepithels in das Blutgefäßsystem des humanen Wirtes gelangt. Ein Transport zum Nierengewebe findet möglicherweise auf dem Rücken von PMN's statt. Im Nierengewebe angekommen gilt ein direkter, schädigender Einfluß auf das Nierenepithel als wahrscheinlich. Die Toxin-Moleküle binden über ihre B-Untereinheiten an spezifische Glycolipidrezeptoren (Gb3 Rezeptor) der EZ und daraufhin erfolgt eine rezeptor-vermittelte Endozytose der zytotoxischen A-Untereinheit des Stx oder Vt-1 (Valdivieso-Garcia *et al.*, 1996). Das internalisierte Toxin-Molekül hemmt die Proteinsynthese auf Ebene der Translation und induziert den programmierten Zelltod (Apoptose) der betroffenen Zellen (van de Kar *et al.*, 1992; Kaye *et al.*, 1993). Die Bindung der Toxine ist hier allerdings nicht auf die EZ beschränkt. In Anwesenheit von Stx wurde die Bindung und Aktivierung von Thrombozyten an EZ, und eine Aggregation der EZ-Thrombozyten-Komplexe in Immunfluoreszenz Studien nachgewiesen (Karpman *et al.*, 1910). Die aggregative Wirkung des Stx würde die Bildung der Mikrothrombosen und als Konsequenz die Schädigung weiter Regionen im Nierenendothels erklären.

Dieselben Autoren haben in einer neueren Studie die Bindung des Faktor H Proteins an Thrombozyten nachgewiesen (Karpman *et al.*, 1910). Im Zusammenhang mit HUS fällt dieser neuen Funktion des Faktor H eine mögliche Bedeutung bezüglich der Bildung der krankheitsrelevanten Mikrothrombosen zu. Leider bleiben Überlegungen zu einer potentiellen Funktion des Faktor H in der Blutgerinnung spekulativ, mithilfe weiterer Forschungen könnten allerdings neue Krankheitsmechanismen abgeleitet werden.

4.6 Implikationen für eine physiologische Bedeutung der Faktor H Mutationen in der Pathogenese des HUS

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben erstmals experimentell Aufschluss über die mögliche Beteiligung der HUS-assoziierten Faktor H Mutationen in dem Krankheitsgeschehen. Eine Störung des Komplementsystems wurde durch die beobachteten geringen C3 Serumwerte in einigen HUS Patienten bereits früh postuliert, aber erst durch die Studien der letzten Jahre wurde ein Defekt in der Komplementaktivierung als Ursache postuliert. Die Aktivierung des alternativen Weges, der durch die spontane Hydrolyse des C3 Moleküls initiiert wird, ist ein seltenes Ereignis. Ungehindert führt die Amplifizierungsschleife des Weges zu einem raschen Verlauf der Kaskade, zur Bildung der C3 Konvertasen und zur Einleitung des lytischen Weges. Besonders zwei Eigenschaften des Faktor H Proteins machen es zu dem wichtigsten Regulator des alternativen Weges. Denn die Aktivierung des alternativen Weges erfolgt im Serum und wird dort lediglich über die Kofaktor Funktionen des Faktor H Proteins und des FHL-1 inhibiert. Eine zweite Funktion, die nur von Faktor H ausgeübt wird, ist die Konkurrenz mit Faktor B um die Bindung an das membrangebundene C3b Molekül. Womöglich ist in dieser Eigenschaft einer der Gründe zu sehen, warum eine frühe Regulation der Kaskade im Falle einer Faktor H Fehlfunktion nicht von dem FHL-1 Protein aufgefangen wird. Da im extrazellulären Raum membrangebundene Regulatoren fehlen, ist in diesem Kompartiment die Wirkung des serumlöslichen Faktor H Proteins entscheidend. Wie in Schweinen (Hogasen *et al.*, 1995) und im Mausmodell (Pickering *et al.*, 2002) gezeigt, führt ein vollständige Fehlen des Faktor H zu massiven Schädigungen der Nierenglomeruli und zur Entwicklung der Membrano-proliferativen Glomerulonephritis (MPGN). Diese Erkrankung wurde auch im Menschen mit einem totalen Verlust des Faktor H assoziiert (Ault *et al.*, 1997). Das vollständige Fehlen der Faktor H Funktion geht demnach mit einer Schädigung der fenestrierten Membran des glomerulären Endotheliums einher, während die Schwächung der Faktor H Funktion, die in dem vorherrschenden heterozygoten Erbgang der HUS Mutationen begründet wäre, zu den in der TMA beschriebenen Schädigungen der arteriellen Gefäße führen würde. Eine mögliche Ursache für die Ausprägung der unterschiedlichen Krankheitsbilder mag in der Beschaffenheit der angegriffenen Gewebeabschnitte liegen. Wenn eine Fenestration der Gefäße, wie sie in allen Gefäßen der Niere vorkommt, für eine Komplement-vermittelte Schädigung prädestiniert, dann kann der vollständige Verlust der Faktor H Funktion dazu führen, dass der für die Druckfiltration spezialisierte Nierenglomerulus einer ungerichteten Attacke am meisten ausgesetzt ist. Ein genauer Krankheitsmechanismus ist für beide Nierenschädigungen unklar und so bleiben diese Äußerungen spekulativ.

Die vorliegende Arbeit kann viele Fragen zur Pathogenese des HUS nicht klären. Aus den Ergebnissen der Arbeit läßt sich dennoch ein erstes wenn auch unvollständiges Modell für die Beteiligung des Komplement und den Einfluß von Faktor H Funktionsstörungen für das Syndrom ableiten.

Faktor H Mutationen im C-Terminus des Moleküls können, wie die dargestellten Untersuchungen zeigen, zu einer reduzierten Bindung an das C3b Molekül und an Heparin führen. Das mutierte Faktor H Protein wäre somit in seiner regulativen Funktion stark gestört. Liegt die Mutation, wie in den meisten dokumentierten HUS Patienten in Heterozygotie vor, wird lediglich vom gesunden Allel funktionell aktives Faktor H Protein gebildet. An Geweben, in denen eine akute inflammatorische Reaktion stattfindet, ist die lokale Konzentration des funktionell aktiven Faktor H Proteins wahrscheinlich nicht ausreichend, um die Aktivierung der Komplementkaskade zu inhibieren. Das verbliebene, funktionell aktive Faktor H Protein kann die rasche Amplifizierung der Kaskade nicht verhindern.

In HUS Patienten, in denen die Faktor H Funktion beeinträchtigt ist, findet dieses Szenario möglicherweise am exponierten und Komplement-aktivierenden Subendothelium der primär geschädigten Niere statt.

Eine Beteiligung des Komplementsystems bei der Entstehung der mikroangiopathischen Gefäßverletzungen und in der Pathogenese des HUS hätte somit seine Ursache in einer unvollständigen Regulation des Faktor H Proteins.

Literatur

- Alitalo, A., Meri, T., Lankinen, H., Seppala, I., Lahdenne, P., Hefty, P. S., Akins, D., & Meri, S. (2002). - Complement inhibitor factor H binding to lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs. - *J Immunol* 2002 Oct 1;169(7):3847-53. :3847-53., -53.
- Alsenz, J., Bork, K., & Loos, M. (1987). Autoantibody-mediated acquired deficiency of C1 inhibitor. *N.Engl.J.Med.* **316**, 1360-1366.
- Alsenz, J., Lambris, J. D., Bork, K., & Loos, M. (1989). Acquired C1 inhibitor (C1-INH) deficiency type II. Replacement therapy with C1-INH and analysis of patients' C1-INH and anti-C1-INH autoantibodies. *J.Clin.Invest* **83**, 1794-1799.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (2003). - Basic local alignment search tool. - *J Mol Biol* 1990 Oct 5;215(3):403-10. :403-10., -10.
- Amadei, N., Baracho, G. V., Nudelman, V., Bastos, W., Florido, M. P., & Isaac, L. (2001). Inherited complete factor I deficiency associated with systemic lupus erythematosus, higher susceptibility to infection and low levels of factor H. *Scand.J.Immunol.* **53**, 615-621.
- Arlaud, G. J., Reboul, A., Sim, R. B., & Colomb, M. G. (1979). Interaction of C1-inhibitor with the C1r and C1s subcomponents in human C1. *Biochim.Biophys.Acta* **576**, 151-162.
- Ault, B. H. (2000). Factor H and the pathogenesis of renal diseases. *Pediatr.Nephrol.* **14**, 1045-1053.
- Ault, B. H., Schmidt, B. Z., Fowler, N. L., Kashtan, C. E., Ahmed, A. E., Vogt, B. A., & Colten, H. R. (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.
- Baker, K. R. & Moake, J. L. (2000). Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *Curr.Opin.Pediatr.* **12**, 23-28.
- Balow, J. E. & Austin, H. A., III (1988). Renal disease in systemic lupus erythematosus. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* **14**, 117-133.
- Barlow, P. N., Baron, M., Norman, D. G., Day, A. J., Willis, A. C., Sim, R. B., & Campbell, I. D. (1991). Secondary structure of a complement control protein module by two-dimensional 1H NMR. *Biochemistry* **30**, 997-1004.
- Barnum, S. R. & Dahlback, B. (1990). C4b-binding protein, a regulatory component of the classical pathway of complement, is an acute-phase protein and is elevated in systemic lupus erythematosus. *Complement Inflamm.* **7**, 71-77.

- Berggard, K., Johnsson, E., Morfeldt, E., Persson, J., Stalhammar-Carlemalm, M., & Lindahl, G. (2002). - Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in *Streptococcus pyogenes*. - *Mol Microbiol* 2001 Oct;42(2):539-51. :539-51., - 51.
- Blackmore, T. K., Hellwege, J., Sadlon, T. A., Higgs, N., Zipfel, P. F., Ward, H. M., & Gordon, D. L. (1998). Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J.Immunol.* **160**, 3342-3348.
- Blackmore, T. K., Sadlon, T. A., Ward, H. M., Lublin, D. M., & Gordon, D. L. (1996). Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J.Immunol.* **157**, 5422-5427.
- Blom, A. M., Rytönen, A., Vasquez, P., Lindahl, G., Dahlback, B., & Jonsson, A. B. (2001). - A novel interaction between type IV pili of *Neisseria gonorrhoeae* and the human complement regulator C4B-binding protein. - *J Immunol* 2001 Jun 1;166(11):6764-70. :6764-70., -70.
- Bokisch, V. A., Dierich, M. P., & Muller-Eberhard, H. J. (1975). Third component of complement (C3): structural properties in relation to functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**, 1989-1993.
- Bokisch, V. A., Muller-Eberhard, H. J., & Cochrane, C. G. (1969). Isolation of a fragment (C3a) of the third component of human complement containing anaphylatoxin and chemotactic activity and description of an anaphylatoxin inactivator of human serum. *J.Exp.Med.* **129**, 1109-1130.
- Brandt, E. (1993). Dissertation in der Abt. Immunologie (Prof. O. Götze): Charaktersistierung funktionell relevanter Epitope auf Faktor H des Komplementsystems mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Fachbereich Medizin der Georg-August-Universität Göttingen
- Buddles, M. R., Donne, R. L., Richards, A., Goodship, J., & Goodship, T. H. (2000). Complement factor H gene mutation associated with autosomal recessive atypical hemolytic uremic syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* **66**, 1721-1722.
- Calcott, M. A. & Muller-Eberhard, H. J. (1972). C1q protein of human complement. *Biochemistry* **11**, 3443-3450.
- Caprioli, J., Bettinaglio, P., Zipfel, P. F., Amadei, B., Daina, E., Gamba, S., Skerka, C., Marziliano, N., Remuzzi, G., & Noris, M. (2001). The Molecular Basis of Familial Hemolytic Uremic Syndrome: Mutation Analysis of Factor H Gene Reveals a Hot Spot in Short Consensus Repeat 20. *J.Am.Soc.Nephrol.* **12**, 297-307.
- Cartegni, L., Chew, S. L., & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev.Genet* **3**, 285-298.
- Carter, R. H., Spycher, M. O., Ng, Y. C., Hoffman, R., & Fearon, D. T. (1988). Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J.Immunol.* **141**, 457-463.

Clas, F. & Loos, M. (1981). - Antibody-independent binding of the first component of complement (C1) and its subcomponent C1q to the S and R forms of *Salmonella minnesota*. - *Infect Immun* 1981 Mar;31(3):1138-44. :1138-44., -44.

Cole, J. L., Housley, G. A., Jr., Dykman, T. R., MacDermott, R. P., & Atkinson, J. P. (1985). Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 859-863.

Collard, C. D., Bukusoglu, C., Agah, A., Colgan, S. P., Reenstra, W. R., Morgan, B. P., & Stahl, G. L. (1999). Hypoxia-induced expression of complement receptor type 1 (CR1, CD35) in human vascular endothelial cells. *Am.J.Physiol* **276**, C450-C458.

Current Protocols in Molecular Biology (1995).edited F. M. Ausubel et al.
John Wiley Sons, Inc.

Current protocols in immunology (1994).edited by John E. Coligan et al.
John Wiley Sons, Inc.

Cooper, N. R. (1975). Enzymatic activity of the second component of complement. *Biochemistry* **14**, 4245-4251.

Dagert, M. & Ehrlich, S. D. (2001). - Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. - *Gene* 1979 May;6(1):23-8. :23-8., -8.

Damerau, B., Grunefeld, E., & Vogt, W. (1978). Chemotactic effects of the complement-derived peptides C3a, C3ai and C5a (classical anaphylatoxin) on rabbit and guinea-pig polymorphonuclear leukocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **305**, 181-184.

Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M. K., & McDaniel, L. S. (2001). PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect.Immun.* **69**, 3435-3437.

Davies, A., Simmons, D. L., Hale, G., Harrison, R. A., Tighe, H., Lachmann, P. J., & Waldmann, H. (1989). CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J.Exp.Med.* **170**, 637-654.

Devine, D. V. & Rosse, W. F. (1987). Regulation of the activity of platelet-bound C3 convertase of the alternative pathway of complement by platelet factor H. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 5873-5877.

DiScipio, R. G. (1992). Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. *J.Immunol.* **149**, 2592-2599.

DiScipio, R. G., Daffern, P. J., Schraufstatter, I. U., & Sriramarao, P. (1998). Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J.Immunol.* **160**, 4057-4066.

- Dobson, N. J., Lambris, J. D., & Ross, G. D. (1981). Characteristics of isolated erythrocyte complement receptor type one (CR1, C4b-C3b receptor) and CR1-specific antibodies. *J.Immunol.* **126**, 693-698.
- Dodds, A. W., Ren, X. D., Willis, A. C., & Law, S. K. (1996). The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature* **379**, 177-179.
- Dodds, A. W., Sim, R. B., Porter, R. R., & Kerr, M. A. (1978). Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates. *Biochem.J.* **175**, 383-390.
- Estaller, C., Schwaeble, W., Dierich, M., & Weiss, E. H. (1991). Human complement factor H: two factor H proteins are derived from alternatively spliced transcripts. *Eur.J.Immunol.* **21**, 799-802.
- Farries, T. C., Seya, T., Harrison, R. A., & Atkinson, J. P. (1990). Competition for binding sites on C3b by CR1, CR2, MCP, factor B and Factor H. *Complement Inflamm.* **7**, 30-41.
- Fearon, D. T. (1985). Human complement receptors for C3b (CR1) and C3d (CR2). *J.Invest Dermatol.* **85**, 53s-57s.
- Fearon, D. T., Kaneko, I., & Thomson, G. G. (1981). Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *J.Exp.Med.* **153**, 1615-1628.
- Fernie, B. A., Orren, A., Wurznner, R., Jones, A. M., Potter, P. C., Lachmann, P. J., & Hobart, M. J. (1995). Complement component C6 and C7 haplotypes associated with deficiencies of C6. *Ann.Hum.Genet.* **59** (Pt 2), 183-195.
- Fernie, B. A., Wurznner, R., Orren, A., Morgan, B. P., Potter, P. C., Platonov, A. E., Vershinina, I. V., Shipulin, G. A., Lachmann, P. J., & Hobart, M. J. (1996). Molecular bases of combined subtotal deficiencies of C6 and C7: their effects in combination with other C6 and C7 deficiencies. *J.Immunol.* **157**, 3648-3657.
- Fijen, C. A., van den, B. R., Schipper, M., Mannens, M., Schlesinger, M., Nordin, F. G., Dankert, J., Daha, M. R., Sjöholm, A. G., Truedsson, L., & Kuijper, E. J. (1999). Properdin deficiency: molecular basis and disease association. *Mol.Immunol.* **36**, 863-867.
- Fischer, M. B., Prodeus, A. P., Nicholson-Weller, A., Ma, M., Murrow, J., Reid, R. R., Warren, H. B., Lage, A. L., Moore, F. D., Rosen, F. S., & Carroll, M. C. (1997). Increased susceptibility to endotoxin shock in complement C3- and C4-deficient mice is corrected by C1 inhibitor replacement. *J.Immunol.* **159**, 976-982.
- Fishelson, Z., Pangburn, M. K., & Muller-Eberhard, H. J. (1984). Characterization of the initial C3 convertase of the alternative pathway of human complement. *J.Immunol.* **132**, 1430-1434.
- Fontaine, M., Demares, M. J., Koistinen, V., Day, A. J., Davrinche, C., Sim, R. B., & Ripoché, J. (1989). Truncated forms of human complement factor H. *Biochem.J.* **258**, 927-930.

- Fries, L. F., Prince, G. M., Gaither, T. A., & Frank, M. M. (1985). Factor I co-factor activity of CR1 overcomes the protective effect of IgG on covalently bound C3b residues. *J.Immunol.* **135**, 2673-2679.
- Friese, M. A., Hellwage, J., Jokiranta, T. S., Meri, S., Muller-Quernheim, H. J., Peter, H. H., Eibel, H., & Zipfel, P. F. (2000). Different regulation of factor H and FHL-1/reconectin by inflammatory mediators and expression of the two proteins in rheumatoid arthritis (RA). *Clin.Exp.Immunol.* **121**, 406-415.
- Furlan, M., Robles, R., Galbusera, M., Remuzzi, G., Kyrle, P. A., Brenner, B., Krause, M., Scharrer, I., Aumann, V., Mittler, U., Solenthaler, M., & Lammle, B. (1998). von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N.Engl.J.Med.* **339**, 1578-1584.
- Gabolde, M., Muralitharan, S., & Besmond, C. (1999). - Genotyping of the three major allelic variants of the human mannose-binding lectin gene by denaturing gradient gel electrophoresis. - *Hum Mutat* 1999;14(1):80-3. :**80-3.**, -3.
- Galbusera, M., Noris, M., Rossi, C., Orisio, S., Caprioli, J., Ruggeri, Z. M., Amadei, B., Ruggenti, P., Vasile, B., Casari, G., & Remuzzi, G. (2002). - Increased fragmentation of von Willebrand factor, due to abnormal cleavage of the subunit, parallels disease activity in recurrent hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura and discloses predisposition in families. The Italian Registry of Familial and Recurrent HUS/TTP. - *Blood* 1999 Jul 15;94(2):610-20. :**610-20.**, -20.
- Ganu, V. S., Muller-Eberhard, H. J., & Hugli, T. E. (1989). Factor C3f is a spasmogenic fragment released from C3b by factors I and H: the heptadeca-peptide C3f was synthesized and characterized. *Mol.Immunol.* **26**, 939-948.
- Gigli, I., Fujita, T., & Nussenzweig, V. (1979). Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 6596-6600.
- Gigli, I., Sorvillo, J., & Halbwachs-Mecarelli, L. (1985). Regulation and deregulation of the fluid-phase classical pathway C3 convertase. *J.Immunol.* **135**, 440-444.
- Gotze, O. & Muller-Eberhard, H. J. (1976). The alternative pathway of complement activation. *Adv.Immunol.* **24**, 1-35.
- Hall, S. E. & Rosse, W. F. (1996). - The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. - *Blood* 1996 Jun 15;87(12):5332-40. :**5332-40.**, -40.
- Halma, C., Daha, M. R., Camps, J. A., Evers-Schouten, J. H., Pauwels, E. K., & Van, E. (1992). Deficiency of complement component C3 is associated with accelerated removal of soluble 123I-labelled aggregates of IgG from the circulation. *Clin.Exp.Immunol.* **90**, 394-400.
- Haribabu, B., Richardson, R. M., Verghese, M. W., Barr, A. J., Zhelev, D. V., & Snyderman, R. (2002). - Function and regulation of chemoattractant receptors. - *Immunol Res* 2000;22(2-3):271-9. :**271-9.**, -9.

- Hazlewood, M. A., Kumararatne, D. S., Webster, A. D., Goodall, M., Bird, P., & Daha, M. (1992). An association between homozygous C3 deficiency and low levels of anti-pneumococcal capsular polysaccharide antibodies. *Clin.Exp.Immunol.* **87**, 404-409.
- He, S., Sim, R. B., & Whaley, K. (1997). A secondary C1s interaction site on C1-inhibitor is essential for formation of a stable enzyme-inhibitor complex. *FEBS Lett.* **405**, 42-46.
- He, S., Sim, R. B., & Whaley, K. (1998). Mechanism of action of anti-C1-inhibitor autoantibodies: prevention of the formation of stable C1s-C1-inh complexes. *Mol.Med.* **4**, 119-128.
- Hegasy, G. & Zipfel, P. F. Porcine Complement Regulator Factor H and its use. EP 02003482.3. 2000. European Patent Office.
Ref Type: Patent
- Hellwage, J., Jokiranta, T. S., Koistinen, V., Vaarala, O., Meri, S., & Zipfel, P. F. (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**, 345-352.
- Hellwage, J., Kuhn, S., & Zipfel, P. F. (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 (Pt 2)**, 321-327.
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkila, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppala, I. J., & Meri, S. (2001). The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J.Biol.Chem.* **276**, 8427-8435.
- Hellwage, J., Skerka, C., & Zipfel, P. F. (1997b). Biochemical and functional characterization of the factor-H-related protein 4 (FHR-4). *Immunopharmacology* **38**, 149-157.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (2001). - Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. - *Electrophoresis* 1988 *Jan;9(1):28-32. :28-32., -32.*
- Hiemstra, P. S., Langeler, E., Compier, B., Keepers, Y., Leijh, P. C., van den Barselaar, M. T., Overbosch, D., & Daha, M. R. (1989). Complete and partial deficiencies of complement factor D in a Dutch family. *J.Clin.Invest* **84**, 1957-1961.
- Hillarp, A., Pardo-Manuel, F., Ruiz, R. R., Rodriguez, D. C., & Dahlback, B. (1993). The human C4b-binding protein beta-chain gene. *J Biol Chem* **268**, 15017-15023.
- Hobart, M. J., Fernie, B. A., Wurzner, R., Oldroyd, R. G., Harrison, R. A., Joysey, V., & Lachmann, P. J. (1997). Difficulties in the ascertainment of C9 deficiency: lessons to be drawn from a compound heterozygote C9-deficient subject. *Clin.Exp.Immunol.* **108** , 500-506.

- Hogasen, K., Jansen, J. H., Mollnes, T. E., Hovdenes, J., & Harboe, M. (1995). Hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II is caused by factor H deficiency. *J.Clin.Invest* **95**, 1054-1061.
- Hourcade, D. E., Mitchell, L., Kuttner-Kondo, L. A., Atkinson, J. P., & Medof, M. E. (2002). Decay-accelerating factor (DAF), complement receptor 1 (CR1), and factor H dissociate the complement AP C3 convertase (C3bBb) via sites on the type A domain of Bb. *J.Biol.Chem.* **277**, 1107-1112.
- Isenman, D. E., Podack, E. R., & Cooper, N. R. (1980). The interaction of C5 with C3b in free solution: a sufficient condition for cleavage by a fluid phase C3/C5 convertase. *J Immunol* **124**, 326-331.
- Jarva, H., Janulczyk, R., Hellwage, J., Zipfel, P. F., Bjorck, L., & Meri, S. (2002). Streptococcus pneumoniae Evades Complement Attack and Opsonophagocytosis by Expressing the pspC Locus-Encoded Hic Protein That Binds to Short Consensus Repeats 8-11 of Factor H. *J.Immunol.* **168**, 1886-1894.
- Jelesarova, E., Schlumberger, M., Sadallah, S., Spath, P. J., Schifferli, J. A., & Lutz, H. U. (2001). A C3 convertase assay for nephritic factor functional activity. *J.Immunol.Methods* **251**, 45-52.
- Jin, J. Y., Tooze, J. A., Marsh, J. C., & Gordon-Smith, E. C. (1997). - Glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-linked protein deficiency on the platelets of patients with aplastic anaemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: two distinct patterns correlating with expression on neutrophils. - *Br J Haematol* 1997 Mar;96(3):493-6. :**493-6**. , -6.
- Jokiranta, T. S., Hellwage, J., Koistinen, V., Zipfel, P. F., & Meri, S. (2000). Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J.Biol.Chem.* **275**, 27657-27662.
- Jokiranta, T. S., Westin, J., Nilsson, U. R., Nilsson, B., Hellwage, J., Lofas, S., Gordon, D. L., Ekdahl, K. N., & Meri, S. (2001). Complement C3b interactions studied with surface plasmon resonance technique. *Int.Immunopharmacol.* **1**, 495-506.
- Junnikkala, S., Jokiranta, T. S., Friese, M. A., Jarva, H., Zipfel, P. F., & Meri, S. (2000). Exceptional resistance of human H2 glioblastoma cells to complement-mediated killing by expression and utilization of factor H and factor H-like protein 1. *J.Immunol.* **164**, 6075-6081.
- Juriansz, K., Ziegler, S., Donin, N., Reiter, Y., Fishelson, Z., & Kirschfink, M. (2001). K562 erythroleukemic cells are equipped with multiple mechanisms of resistance to lysis by complement. *Int.J.Cancer* **93**, 848-854.
- Kaplan, B. S. & Drummond, K. N. (1978). The hemolytic-uremic syndrome is a syndrome. *N Engl J Med* **298**, 964-966.
- Kaplan, B. S., Meyers, K. E., & Leonard, M. B. (2001). Glomerular epithelial cell arachidonate metabolism in Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* **60**, 1199-1200.

- Karpman, D., Papadopoulou, D., Nilsson, K., Sjogren, A. C., Mikaelsson, C., & Lethagen, S. (1910). - Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. - *Blood* 2001 May 15;97(10):3100-8. :3100-8., -8.
- Katz, Y., Singer, L., Wetsel, R. A., Schlesinger, M., & Fishelson, Z. (1994). Inherited complement C3 deficiency: a defect in C3 secretion. *Eur.J.Immunol.* **24**, 1517-1522.
- Katz, Y., Wetsel, R. A., Schlesinger, M., & Fishelson, Z. (1995). Compound heterozygous complement C3 deficiency. *Immunology* **84**, 5-7.
- Kawaguchi, K., Wada, H., Mori, A., Takemoto, Y., Kakishita, E., & Kanamaru, A. (1999). - Detection of GPI-anchored protein-deficient cells in patients with aplastic anaemia and evidence for clonal expansion during the clinical course. - *Br J Haematol* 1999 Apr;105(1):80-4. :80-4., -4.
- Kaye, S. A., Louise, C. B., Boyd, B., Lingwood, C. A., & Obrig, T. G. (1993). Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun* **61**, 3886-3891.
- Kinoshita, T., Medof, M. E., Silber, R., & Nussenzweig, V. (1985). Distribution of decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J.Exp.Med.* **162**, 75-92.
- Kirkitadze, M. D. & Barlow, P. N. (2001). Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation. *Immunol.Rev.* **180**, 146-161.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V., & Zipfel, P. F. (2001a). Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect.Immun.* **69**, 7800-7809.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., & Zipfel, P. F. (2001b). Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur.J.Immunol.* **31**, 1674-1684.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P. F., & Brade, V. (2001c). Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int.Immunopharmacol.* **1**, 393-401.
- Kristensen, T., D'Eustachio, P., Ogata, R. T., Chung, L. P., Reid, K. B., & Tack, B. F. (1987). The superfamily of C3b/C4b-binding proteins. *Fed.Proc.* **46**, 2463-2469.
- Kristensen, T., Wetsel, R. A., & Tack, B. F. (1986). Structural analysis of human complement protein H: homology with C4b binding protein, beta 2-glycoprotein I, and the Ba fragment of B2. *J.Immunol.* **136**, 3407-3411.
- Krushkal, J., Bat, O., & Gigli, I. (2000). Evolutionary relationships among proteins encoded by the regulator of complement activation gene cluster. *Mol.Biol.Evol.* **17**, 1718-1730.

Kuhn, S., Skerka, C., & Zipfel, P. F. (1995). Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J.Immunol.* **155**, 5663-5670.

Kuhn, S. & Zipfel, P. F. (1995). The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins. *Gene* **162**, 225-229.

Kuhn, S. & Zipfel, P. F. (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.

Lambris, J. D., Avila, D., Becherer, J. D., & Muller-Eberhard, H. J. (1988). A discontinuous factor H binding site in the third component of complement as delineated by synthetic peptides. *J.Biol.Chem.* **263**, 12147-12150.

Lambris, J. D., Lao, Z., Oglesby, T. J., Atkinson, J. P., Hack, C. E., & Becherer, J. D. (1996). Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *J.Immunol.* **156**, 4821-4832.

Leenaerts, P. L., Hall, B. M., Van Damme, B. J., Daha, M. R., & Vanrenterghem, Y. F. (1995). Active Heymann nephritis in complement component C6 deficient rats. *Kidney Int.* **47**, 1604-1614.

Lehto, T., Morgan, B. P., & Meri, S. (1997). Binding of human and rat CD59 to the terminal complement complexes. *Immunology* **90**, 121-128.

Loos, M., Laurell, A. B., Sjöholm, A. G., Martensson, U., & Berkel, A. I. (1980). - Immunochemical and functional analysis of a complete C1q deficiency in man: evidence that C1r and C1s are in the native form, and that they reassociate with purified C1q to form macromolecular C1. - *J Immunol* 1980 *Jan;124(1):59-63.* :**59-63.**, -63.

Lowell, C. A., Klickstein, L. B., Carter, R. H., Mitchell, J. A., Fearon, D. T., & Ahearn, J. M. (1989). Mapping of the Epstein-Barr virus and C3dg binding sites to a common domain on complement receptor type 2. *J.Exp.Med.* **170**, 1931-1946.

Male, D. A., Ormsby, R. J., Ranganathan, S., Giannakis, E., & Gordon, D. L. (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, R., Haurum, J. S., Thiel, S., & Sim, R. B. (1994a). Binding of human collectins (SP-A and MBP) to influenza virus. *Biochem.J.* **304** (Pt 2), 455-461.

Malhotra, R., Lu, J., Holmskov, U., & Sim, R. B. (1994b). Collectins, collectin receptors and the lectin pathway of complement activation. *Clin.Exp.Immunol.* **97 Suppl 2**, 4-9.

Malhotra, R., Ward, M., Sim, R. B., & Bird, M. I. (1999). Identification of human complement Factor H as a ligand for L-selectin. *Biochem.J.* **341** (Pt 1), 61-69.

- Matsumoto, M., Nagaki, K., Kitamura, H., Kuramitsu, S., Nagasawa, S., & Seya, T. (1989). - Probing the C4-binding site on C1s with monoclonal antibodies. Evidence for a C4/C4b-binding site on the gamma-domain. - *J Immunol* 1989 Apr 15;142(8):2743-50. :2743-50., -50.
- McKenzie, R., Kotwal, G. J., Moss, B., Hammer, C. H., & Frank, M. M. (1992). - Regulation of complement activity by vaccinia virus complement-control protein. - *J Infect Dis* 1992 Dec;166(6):1245-50. :1245-50., -50.
- McRae, J. L., Cowan, P. J., Power, D. A., Mitchelhill, K. I., Kemp, B. E., Morgan, B. P., & Murphy, B. F. (2001). Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *J.Biol.Chem.* **276**, 6747-6754.
- McRae, J. L., Murphy, B. E., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Crawford, J., & Cowan, P. J. (2002). - Location and structure of the human FHR-5 gene. - *Genetica* 2002 Mar;114(2):157-61. :157-61., -61.
- Meri, S., Morgan, B. P., Davies, A., Daniels, R. H., Olavesen, M. G., Waldmann, H., & Lachmann, P. J. (1990). Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* **71**, 1-9.
- Meri, S. & Pangburn, M. K. (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., Waldmann, H., & Lachmann, P. J. (1991). Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. *Lab Invest* **65**, 532-537.
- Meri, T., Hartmann, A., Lenk, D., Eck, R., Wurzner, R., Hellwege, J., Meri, S., & Zipfel, P. F. (2002a). - The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. - *Infect Immun* 2002 Sep;70(9):5185-92. :5185-92., -92.
- Meri, T., Jokiranta, T. S., Hellwege, J., Bialonski, A., Zipfel, P. F., & Meri, S. (2002b). - *Onchocerca volvulus* microfilariae avoid complement attack by direct binding of factor H. - *J Infect Dis* 2002 Jun 15;185(12):1786-93. :1786-93., -93.
- Misasi, R., Huemer, H. P., Schwaeble, W., Solder, E., Larcher, C., & Dierich, M. P. (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.
- J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning.A Laboratory Manual*; 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Mold, C., Gewurz, H., & Du Clos, T. W. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* **42**, 23-30.

- Mollnes, T. E., Brekke, O. L., Fung, M., Fure, H., Christiansen, D., Bergseth, G., Videm, V., Lappgard, K. T., Kohl, J., & Lambris, J. D. (2002). - Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. - *Blood* 2002 Sep 1;100(5):1869-77. :**1869-77.**, -77.
- Morfeldt, E., Berggard, K., Persson, J., Drakenberg, T., Johnsson, E., Lindahl, E., Linse, S., & Lindahl, G. (2001). - Isolated hypervariable regions derived from streptococcal M proteins specifically bind human C4b-binding protein: implications for antigenic variation. - *J Immunol* 2001 Oct 1;167(7):3870-7. :**3870-7.**, -7.
- Moulds, J. M., Krych, M., Holers, V. M., Liszewski, M. K., & Atkinson, J. P. (1992). Genetics of the complement system and rheumatic diseases. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* **18**, 893-914.
- Muller-Eberhard, H. J. (1976). Initiation of membrane attack by complement: assembly and control of C3 and C5 convertase. pp. 229-41. In: Reich, E., et al., ed. *Proteases and biological control*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory., 1975. W3.C162N.v.2 1975.
- Muller-Eberhard, H. J. & Gotze, O. (1972). C3 proactivator convertase and its mode of action. *J.Exp.Med.* **135**, 1003-1008.
- Mullighan, C. G., Heatley, S., Doherty, K., Szabo, F., Grigg, A., Hughes, T. P., Schwarzer, A. P., Szer, J., Tait, B. D., Bik, T. L., & Bardy, P. G. (2002). - Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. - *Blood* 2002 May 15;99(10):3524-9. :**3524-9.**, -9.
- Murphy, B., Georgiou, T., Machet, D., Hill, P., & McRae, J. (2002). Factor H-related protein-5: A novel component of human glomerular immune deposits. *Am.J.Kidney Dis.* **39**, 24-27.
- Murphy, B. F., Saunders, J. R., O'Bryan, M. K., Kirszbaum, L., Walker, I. D., & D'Apice, A. J. (1989). SP-40,40 is an inhibitor of C5b-6-initiated haemolysis. *Int.Immunol.* **1**, 551-554.
- Nagarajan, S., Brodsky, R. A., Young, N. S., & Medof, M. E. (1995). - Genetic defects underlying paroxysmal nocturnal hemoglobinuria that arises out of aplastic anemia. - *Blood* 1995 Dec 15;86(12):4656-61. :**4656-61.**, -61.
- Neary, J. J., Conlon, P. J., Croke, D., Dorman, A., Keogan, M., Zhang, F. Y., Vance, J. M., Pericak-Vance, M. A., Scott, W. K., & Winn, M. P. (2002). - Linkage of a Gene Causing Familial Membranoproliferative Glomerulonephritis Type III to Chromosome 1. - *J Am Soc Nephrol* 2002 Aug;13(8):2052-7. :**2052-7.**, -7.
- Neth, O., Hann, I., Turner, M. W., & Klein, N. J. (2001). - Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. - *Lancet* 2001 Aug 25;358(9282):614-8. :**614-8.**, -8.
- Nicholson-Weller, A., Burge, J., Fearon, D. T., Weller, P. F., & Austen, K. F. (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. & Lachmann, P. J. (1973). The alternate pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF). *Immunology* **24**, 259-275.

Nilsson, U. R., Mandle, R. J., Jr., & McConnell-Mapes, J. A. (1975). Human C3 and C5: subunit structure and modifications by trypsin and C42- C423. *J.Immunol.* **114**, 815-822.

Nilsson, U. R. & Muller-Eberhard, H. J. (1965). Isolation of β 1H globulin from human serum and its characterization as the fifth component of complement. *J.Exp.Med.* **122**, 277-298.

Noris, M., Ruggerenti, P., Perna, A., Orisio, S., Caprioli, J., Skerka, C., Vasile, B., Zipfel, P. F., & Remuzzi, G. (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'Hara, A. M., Fernie, B. A., Moran, A. P., Williams, Y. E., Connaughton, J. J., Orren, A., & Hobart, M. J. (1998). C7 deficiency in an Irish family: a deletion defect which is predominant in the Irish. *Clin.Exp.Immunol.* **114**, 355-361.

Pangburn, M. K., Atkinson, M. A., & Meri, S. (1991). Localization of the heparin-binding site on complement factor H. *J.Biol.Chem.* **266**, 16847-16853.

Pangburn, M. K., Morrison, D. C., Schreiber, R. D., & Muller-Eberhard, H. J. (1980). Activation of the alternative complement pathway: recognition of surface structures on activators by bound C3b. *J.Immunol.* **124**, 977-982.

Pangburn, M. K., Pangburn, K. L., Koistinen, V., Meri, S., & Sharma, A. K. (2000). Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: interactions among factor H, C3b, and target in the alternative pathway of human complement. *J.Immunol.* **164**, 4742-4751.

Pangburn, M. K., Schreiber, R. D., & Muller-Eberhard, H. J. (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.

Perez-Caballero, D., Gonzalez-Rubio, C., Gallardo, M. E., Vera, M., Lopez-Trascasa, M., Rodriguez, D. C., & Sanchez-Corral, P. (2001a). Clustering of Missense Mutations in the C-Terminal Region of Factor H in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* **68**, 478-484.

Perkins, S. J. & Goodship, T. H. (2002). - Molecular modelling of the C-terminal domains of factor H of human complement: a correlation between haemolytic uraemic syndrome and a predicted heparin binding site. - *J Mol Biol* 2002 Feb 15;316(2):217-24. :**217-24**. , -24.

Perlmann, H., Perlmann, P., Schreiber, R. D., & Muller-Eberhard, H. J. (1981). Interaction of target cell-bound C3bi and C3d with human lymphocyte receptors. Enhancement of antibody-mediated cellular cytotoxicity. *J.Exp.Med.* **153**, 1592-1603.

- Peterslund, N. A., Koch, C., Jensenius, J. C., & Thiel, S. (2001). - Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. - *Lancet* 2001 Aug 25;358(9282):637-8. :**637-8.**, -8.
- Pickering, M. C., Cook, H. T., Warren, J., Bygrave, A. E., Moss, J., Walport, M. J., & Botto, M. (2002). - Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. - *Nat Genet* 2002 Aug;31(4):424-8. :**424-8.**, -8.
- Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I. H., Ross, O. A., Todd, E. W., & Wardlaw, A. C. (1954). The properdin system and immunity. Demonstration of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* **120**, 279.
- Pio, R., Elsasser, T. H., Martinez, A., & Cuttitta, F. (2001). - Identification, characterization, and physiological actions of factor H as an adrenomedullin binding protein present in human plasma. - *Microsc Res Tech* 2002 Apr 1;57(1):23-7. :**23-7.**, -7.
- Podack, E. R., Biesecker, G., Kolb, W. P., & Muller-Eberhard, H. J. (1978). The C5b-6 complex: reaction with C7, C8, C9. *J.Immunol.* **121**, 484-490.
- Podack, E. R., Biesecker, G., & Muller-Eberhard, H. J. (1979). Membrane attack complex of complement: generation of high-affinity phospholipid binding sites by fusion of five hydrophilic plasma proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 897-901.
- Podack, E. R., Kolb, W. P., & Muller-Eberhard, H. J. (1976). The C5b-9 complex: subunit composition of the classical and alternative pathway-generated complex. *J.Immunol.* **116**, 1431-1434.
- Podack, E. R., Preissner, K. T., & Muller-Eberhard, H. J. (1984). Inhibition of C9 polymerization within the SC5b-9 complex of complement by S-protein. *Acta Pathol.Microbiol.Immunol.Scand.Suppl* **284**, 89-96.
- Podack, E. R., Tschoop, J., & Muller-Eberhard, H. J. (1982). Molecular organization of C9 within the membrane attack complex of complement. Induction of circular C9 polymerization by the C5b-8 assembly. *J.Exp.Med.* **156**, 268-282.
- Prodeus, A. P., Zhou, X., Maurer, M., Galli, S. J., & Carroll, M. C. (1997). Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* **390**, 172-175.
- Prodinger, W. M., Hellwage, J., Spruth, M., Dierich, M. P., & Zipfel, P. F. (1998). The C-terminus of factor H: monoclonal antibodies inhibit heparin binding and identify epitopes common to factor H and factor H-related proteins. *Biochem.J.* **331** (Pt 1), 41-47.
- Ram, S., Cullinane, M., Blom, A. M., Gulati, S., McQuillen, D. P., Boden, R., Monks, B. G., O'Connell, C., Elkins, C., Pangburn, M. K., Dahlback, B., & Rice, P. A. (2001). - C4bp binding to porin mediates stable serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. - *Int Immunopharmacol* 2001 Mar;1(3):423-32. :**423-32.**, -32.

- Ram, S., Mackinnon, F. G., Gulati, S., McQuillen, D. P., Vogel, U., Frosch, M., Elkins, C., Guttormsen, H. K., Wetzler, L. M., Oppermann, M., Pangburn, M. K., & Rice, P. A. (1999). The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol.Immunol.* **36**, 915-928.
- Ram, S., Sharma, A. K., Simpson, S. D., Gulati, S., McQuillen, D. P., Pangburn, M. K., & Rice, P. A. (1998). A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J.Exp.Med.* **187**, 743-752.
- Remuzzi, G., Galbusera, M., Noris, M., Canciani, M. T., Daina, E., Bresin, E., Contaretti, S., Caprioli, J., Gamba, S., Ruggenti, P., Perico, N., & Mannucci, P. M. (2002a). - von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. - *Blood* 2002 Aug 1;100(3):778-85. :**778-85.**, -85.
- Remuzzi, G., Ruggenti, P., Codazzi, D., Noris, M., Caprioli, J., Locatelli, G., & Gridelli, B. (2002b). Combined kidney and liver transplantation for familial haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **359**, 1671-1672.
- Richards, A., Buddles, M. R., Donne, R. L., Kaplan, B. S., Kirk, E., Venning, M. C., Tielemans, C. L., Goodship, J. A., & Goodship, T. H. (2001). Factor H Mutations in Hemolytic Uremic Syndrome Cluster in Exons 18-20, a Domain Important for Host Cell Recognition. *Am.J.Hum.Genet.* **68**, 485-490.
- Ripoche, J., Day, A. J., Harris, T. J., & Sim, R. B. (1988). The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem.J.* **249**, 593-602.
- Ripoche, J., Day, A. J., Willis, A. C., Belt, K. T., Campbell, R. D., & Sim, R. B. (1986). Partial characterization of human complement factor H by protein and cDNA sequencing: homology with other complement and non-complement proteins. *Biosci.Rep.* **6**, 65-72.
- Ross, G. D., Cain, J. A., Myones, B. L., Newman, S. L., & Lachmann, P. J. (1987). Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for beta- glucans. *Complement* **4**, 61-74.
- Rosse, W. F. & Ware, R. E. (1995). - The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. - *Blood* 1995 Nov 1;86(9):3277-86. :**3277-86.**, -86.
- Sahu, A., Isaacs, S. N., Soulika, A. M., & Lambris, J. D. (1998). Interaction of vaccinia virus complement control protein with human complement proteins: factor I-mediated degradation of C3b to iC3b1 inactivates the alternative complement pathway. *J.Immunol.* **160**, 5596-5604.
- Schifferli, J. A., Ng, Y. C., & Peters, D. K. (1986). The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N.Engl.J.Med.* **315**, 488-495.
- Schlaf, G., Beisel, N., Pollok-Kopp, B., Schieferdecker, H., Demberg, T., & Gotze, O. (2002). Constitutive Expression and Regulation of Rat Complement Factor H in Primary Cultures of Hepatocytes, Kupffer Cells, and Two Hepatoma Cell Lines. *Lab Invest* **82**, 183-192.

- Schneider, R. J., Kulczycki, A., Jr., Law, S. K., & Atkinson, J. P. (1981). Isolation of a biologically active macrophage receptor for the third component of complement. *Nature* **290**, 789-792.
- Schraufstatter, I. U., Trieu, K., Sikora, L., Sriramarao, P., & DiScipio, R. (2002). - Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. - *J Immunol* 2002 Aug 15;169(4):2102-10. :**2102-10**, -10.
- Schwaeble, W., Zwirner, J., Schulz, T. F., Linke, R. P., Dierich, M. P., & Weiss, E. H. (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. & Atkinson, J. P. (1989). Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem.J.* **264**, 581-588.
- Sharma, A. K. & Pangburn, M. K. (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.
- Shieh, J. T. & Bergelson, J. M. (2002). - Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. - *J Virol* 2002 Sep;76(18):9474-80. :**9474-80**, -80.
- Sim, R. B., Day, A. J., Moffatt, B. E., & Fontaine, M. (1993a). Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Methods Enzymol.* **223**, 13-35.
- Sim, R. B., Kolble, K., McAleer, M. A., Dominguez, O., & Dee, V. M. (1993b). Genetics and deficiencies of the soluble regulatory proteins of the complement system. *Int.Rev.Immunol.* **10**, 65-86.
- Skerka, C., Hellwage, J., Weber, W., Tilkorn, A., Buck, F., Marti, T., Kampen, E., Beisiegel, U., & Zipfel, P. F. (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., Timmann, C., Horstmann, R. D., & Zipfel, P. F. (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.
- Takata, Y., Kinoshita, T., Kozono, H., Takeda, J., Tanaka, E., Hong, K., & Inoue, K. (1987). Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. *J Exp Med* **165**, 1494-1507.
- Tedder, T. F., Weis, J. J., Clement, L. T., Fearon, D. T., & Cooper, M. D. (1986). The role of receptors for complement in the induction of polyclonal B-cell proliferation and differentiation. *J.Clin.Immunol.* **6**, 65-73.

- Timmann, C., Leippe, M., & Horstmann, R. D. (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.
- Topaloglu, R., Bakkaloglu, A., Slingsby, J. H., Mihatsch, M. J., Pascual, M., Norsworthy, P., Morley, B. J., Saatci, U., Schifferli, J. A., & Walport, M. J. (1996). Molecular basis of hereditary C1q deficiency associated with SLE and IgA nephropathy in a Turkish family. *Kidney Int.* **50**, 635-642.
- Trachtman, H. & Kaplan, B. S. (2001). HUS or not HUS? *Pediatr.Nephrol* **16**, 686.
- Trapp, R. G., Fletcher, M., Forristal, J., & West, C. D. (1987). - C4 binding protein deficiency in a patient with atypical Behcet's disease. - *J Rheumatol* 1987 Feb;14(1):135-8. :**135-8.**, -8.
- Turner, M. W. (1998). - Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. - *Immunobiology* 1998 Aug;199(2):327-39. :**327-39.**, -39.
- Valdivieso-Garcia, A., MacLeod, D. L., Clarke, R. C., Gyles, C. L., Lingwood, C., Boyd, B., & Durette, A. (1996). Comparative cytotoxicity of purified Shiga-like toxin-IIe on porcine and bovine aortic endothelial and human colonic adenocarcinoma cells. *J Med Microbiol* **45**, 331-337.
- van de Kar, N. C., Monnens, L. A., Karmali, M. A., & Van Hinsbergh, V. W. (1992). Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* **80**, 2755-2764.
- van Dixhoorn, M. G., Timmerman, J. J., Gijlswijk-Janssen, D. J., Muizert, Y., Verweij, C., DiScipio, R. G., & Daha, M. R. (1997). Characterization of complement C6 deficiency in a PVG/c rat strain. *Clin.Exp.Immunol.* **109**, 387-396.
- Vik, D. P. & Fearon, D. T. (1985). Neutrophils express a receptor for iC3b, C3dg, and C3d that is distinct from CR1, CR2, and CR3. *J.Immunol.* **134**, 2571-2579.
- Walport, M. J. (2001). Complement. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* **344**, 1058-1066.
- Walport, M. J., Davies, K. A., Morley, B. J., & Botto, M. (1997). Complement deficiency and autoimmunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **815**, 267-281.
- Wang, L., Uchikawa, M., Tsuneyama, H., Tokunaga, K., Tadokoro, K., & Juji, T. (1998). - Molecular cloning and characterization of decay-accelerating factor deficiency in Cromer blood group Inab phenotype. - *Blood* 1998 Jan 15;91(2):680-4. :**680-4.**, -4.
- Ward, P. A., Cochrane, C. G., & Muller-Eberhard, H. J. (1966). Further studies on the chemotactic factor of complement and its formation in vivo. *Immunology* **11**, 141-153.

- Warheit, D. B., George, G., Hill, L. H., Snyderman, R., & Brody, A. R. (1985). Inhaled asbestos activates a complement-dependent chemoattractant for macrophages. *Lab Invest* **52**, 505-514.
- Warwicker, P., Donne, R. L., Goodship, J. A., Goodship, T. H., Howie, A. J., Kumararatne, D. S., Thompson, R. A., & Taylor, C. M. (1999). Familial relapsing haemolytic uraemic syndrome and complement factor H deficiency. *Nephrol.Dial.Transplant.* **14**, 1229-1233.
- Warwicker, P., Goodship, T. H., Donne, R. L., Pirson, Y., Nicholls, A., Ward, R. M., Turnpenney, P., & Goodship, J. A. (1998). Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* **53**, 836-844.
- Weiler, J. M. (1989). Regulation of C5 convertase activity by properdin, factors B and H. *Immunol.Res.* **8**, 305-315.
- Weiler, J. M., Daha, M. R., Austen, K. F., & Fearon, D. T. (1976). Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73** , 3268-3272.
- Weiler, J. M., Yurt, R. W., Fearon, D. T., & Austen, K. F. (1978). Modulation of the formation of the amplification convertase of complement, C3b, Bb, by native and commercial heparin. *J.Exp.Med.* **147**, 409-421.
- Weis, J. H., Morton, C. C., Bruns, G. A., Weis, J. J., Klickstein, L. B., Wong, W. W., & Fearon, D. T. (1987). A complement receptor locus: genes encoding C3b/C4b receptor and C3d/Epstein-Barr virus receptor map to 1q32. *J.Immunol.* **138**, 312-315.
- Weis, J. J., Tedder, T. F., & Fearon, D. T. (1984). Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**, 881-885.
- West, C. D., Witte, D. P., & McAdams, A. J. (2001). Composition of nephritic factor-generated glomerular deposits in membranoproliferative glomerulonephritis type 2. *Am.J.Kidney Dis.* **37**, 1120-1130.
- Whaley, K. & Ruddy, S. (1976). Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J.Exp.Med.* **144**, 1147-1163.
- Whaley, K., Schur, P. H., & Ruddy, S. (1979). Relative importance of C3b inactivator and beta 1H globulin in the modulation of the properdin amplification loop in systemic lupus erythematosus. *Clin.Exp.Immunol.* **36**, 408-414.
- Whaley, K. & Schwaeble, W. (1997). Complement and complement deficiencies. *Semin.Liver Dis.* **17**, 297-310.
- Whaley, K., Sim, R. B., & He, S. (1996). Autoimmune C1-inhibitor deficiency. *Clin.Exp.Immunol.* **106** , 423-426.

Wojta, J., Kaun, C., Zorn, G., Ghannadan, M., Hauswirth, A. W., Sperr, W. R., Fritsch, G., Printz, D., Binder, B. R., Schatzl, G., Zwirner, J., Maurer, G., Huber, K., & Valent, P. (2002). - C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. - *Blood* 2002 Jul 15;100(2):517-23. :517-23., -23.

Wurzner, R., Platonov, A. E., Beloborodov, V. B., Pereverzev, A. I., Vershinina, I. V., Fernie, B. A., Hobart, M. J., Lachmann, P. J., & Orren, A. (1996). How partial C7 deficiency with chronic and recurrent bacterial infections can mimic total C7 deficiency: temporary restoration of host C7 levels following plasma transfusion. *Immunology* **88**, 407-411.

Ying, L., Katz, Y., Schlesinger, M., Carmi, R., Shalev, H., Haider, N., Beck, G., Sheffield, V. C., & Landau, D. (1999). Complement factor H gene mutation associated with autosomal recessive atypical hemolytic uremic syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* **65**, 1538-1546.

Zipfel, P. F., Jokiranta, T. S., Hellwege, J., Koistinen, V., & Meri, S. (1999). The factor H protein family. *Immunopharmacology* **42**, 53-60.

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

Zipfel, P. F., Skerka, C., Caprioli, J., Manuelian, T., Neumann, H. H., Noris, M., & Remuzzi, G. (2001). Complement factor H and hemolytic uremic syndrome. *Int.Immunopharmacol.* **1** , 461-468.

Aus der vorliegenden Doktorarbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

Bereits erschienen:

P.F. Zipfel, C. Skerka, J. Caprioli, T. Manuelian, H.P.H. Neumann, M. Noris, G. Remuzzi.

Complement factor H and hemolytic uremic syndrome

International Immunopharmacology 2001;1:461-468

H.P.H. Neumann, R.D. Munk, T. Manuelian, P.F. Zipfel.

Familiäres hämolytisch-urämisches Syndrom

Medizinische Genetik 2000;12:203-206

Zur Revision eingereicht (JCI):

T. Manuelian, J. Hellwage, S. Meri, J. Caprioli, M. Noris, H.P.H. Neumann, G. Remuzzi und P.F. Zipfel.

Factor H Gene Mutations in Hemolytic Uremic Syndrome: Single Amino Acid Exchanges Reduce Binding Affinity to C3b, Heparin and Surface Attachment to Endothelial Cells

In Vorbereitung:

T. Manuelian, E. Brand, J. Hellwage, O. Götze, M. Oppermann und P. F. Zipfel.

Generation of monoclonal antibodies which interfere Factor H binding to C3b and heparin binding and which select factor H mutations in patients with factor H associated Haemolytic uremic syndrome

Zum Vortrag ausgewählte Kongressbeiträge und in Abstract-Form erschienen sind:

T. Manuelian, J. Hellwage, S. Meri, J. Caprioli, M. Noris, H.P.H. Neumann, G. Remuzzi und P.F. Zipfel, 2002. Factor H Gene Mutations in Hemolytic Uremic Syndrome: Reduced protein interactions reveal a role for microvascular damage and thrombus formation.

XIX. Internationaler Komplement Workshop in Palermo, 22-26.09.2002,

International Immunopharmacology 2 (9), 1219-1402

Manuelian, T., Caprioli, J., Noris, M., Remuzzi, G. and Zipfel, P. F., 2001. Characterization of mutated factor H in serum of patients suffering from atypical form of hemolytic uremic syndrome (HUS).

8. Europäischen Meeting on Complement and Human Diseases. Strassburg, Molecular Immunology 38, 77-131

Aus der Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern:

zur Publikation freigegeben

G. A. Hegasy, T. Manuelian, K. Hogasen, J. H. Jansen, P. F. Zipfel.

The Molecular Basis for Hereditary Porcine Membrano- Proliferative Glomerulonephritis Type II: Point Mutations in the Factor H Coding Sequence Block Protein Secretion. Am J Pathology

S. Junnikkala, J. Hakulinen, H. Jarva, T. Manuelian, L. Bjorge, R. Butzow, P.F. Zipfel, S. Meri. Secretion of soluble complement inhibitors factor H and factor H-like protein (FHL-1) by ovarian tumour cells.

British Journal of Cancer

Eingereicht (J Exp Med):

M. A. Friese, T. Manuelian, S. Junnikkala, J. Hellwage, S. Meri, H. H. Peter, D.L. Gordon, H. Eibel, and P. F. Zipfel. "Release of Endogenous Anti-Inflammatory Mediators Protects Synovial Fibroblasts during Rheumatoid Arthritis".

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Peter Zipfel für die Betreuung dieser Doktorarbeit , die Unterstützung die ich erhielt, sowie für die anregenden Diskussionen.

Dr. Jens Hellwage für die technische Unterstützung an der Biacore 2000

Dr. Misi Jozsi für die technische Unterstützung am FACS

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppen in Freiburg, Bergamo und Helsinki bedanke ich mich für die gute und effektive Kooperation.

Mein Dank gilt den namentlich nicht erwähnten Kollegen am BNI in Hamburg und am HKI in Jena die mich auf die eine oder andere Weise unterstützt haben. Eva Kampen, Alexandra Bialonski und Manuel Friese für ihre Unterstützung und für die nette Arbeitsatmosphäre in unserer Arbeitsgruppe am BNI; Guido Hegasy, für hilfreiche Tips, die nicht nur den Laboralltag betreffen; Gerlinde Heckrot und Sandra Majno, die mir die Eingewöhnung am neuen Arbeitsort erleichtert haben; Misi Joszi, Heiko Richter und Stefan Heinen dafür, dass die gemeinsamen Monate im Labor so angenehm waren.

Nina Nehmann, allen Freunden und Gefährten aus alten und neuen Zeiten, Jörg Paustian, meiner Familie und meinen Eltern für die persönliche Unterstützung, die ich seit Jahren erhalte.

Lebenslauf

Tamara Manuelian, geboren 1970 in München

Wissenschaftlicher Werdegang

- | | |
|---------------------|---|
| Feb 1991-Juni 1991 | Citrus College, Glendora, Kalifornien:
einsemestriges Studium mit Hauptfach Biologie |
| Okt 1991 | Aufnahme des Biologiestudiums an der TH Darmstadt |
| Apr 1994-Sept 1994 | einsemestriges Praktikum bei Prof. Iain Wilkie,
Caledonian University of Glasgow |
| Apr 1995-März 1998 | Fortsetzung des Biologiestudiums an der
Universität Hamburg
Hauptfach: Zoologie

Diplomarbeit unter Anleitung von Dr. Angela Köhler-
Günther in der Biologischen Anstalt Helgoland,
Hamburg

Abschluß Diplom im März 1998 |
| April 1999-Dez 2002 | Promotion unter Anleitung von Prof. Peter F. Zipfel im
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg
und am Hans-Knöll-Institut für Naturstoffforschung in
Jena |