

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.