

Funktionelle Charakterisierung von Age-Related Maculopathy Susceptibility 2 – ARMS2

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



seit 1558

vorgelegt dem Rat der Biologischen-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe

Sven Micklisch

geboren am 28. Juli 1983 in Löbau

Gutachter:

1. **Prof. Dr. Christine Skerka**
Hans-Knöll-Institut Jena
Abteilung Infektionsbiologie
Beutenbergstr. 11a
07745 Jena

2. **Prof. Dr. Olaf Strauß**
Charité Universitätsmedizin Berlin
Experimentelle Ophthalmologie
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin

3. **Prof. Dr. Hortense Slevogt**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
ZIK Septomics
Albert-Einstein-Strasse 8
07745 Jena

Tag der öffentlichen Disputation: 1.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Zusammenfassung	X
Summary	XI
1 Einleitung	12
1.1 Das humane Immunsystem	12
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	12
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	13
1.2 Das Komplementsystem	13
1.2.1 Aktivierung des Komplementsystems	14
1.2.2 Die C3-Konvertase	15
1.2.3 Ausbildung des terminalen Komplementkomplex	16
1.2.4 Regulation der Komplementkaskade	17
1.2.5 Komplement assoziierte Autoimmunerkrankungen	19
1.3 Die Altersabhängige Makuladegeneration	22
1.3.1 AMD assoziierte Strukturen des Auges	23
1.3.2 Immunologie des Auges	27
1.3.3 Pathologie der AMD	28
1.3.4 Therapiemöglichkeiten	32
1.3.5 AMD und Komplement	33
1.4 Age-Related Maculopathy Susceptibility 2	35
2 Fragestellung	40
3 Material und Methoden	41
3.1 Materialien	41
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	41
3.1.2 Seren und Zellen	41
3.1.3 Antikörper und Antiseren	42
3.1.4 Aufgereinigte und rekombinante Proteine	42
3.1.5 Verwendete Stämme	42

3.2 Methoden.....	44
3.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	44
3.2.2 Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i>	44
3.2.3 Klonierung von <i>ARMS2</i>	44
3.2.4 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	45
3.2.5 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid DNA.....	45
3.2.6 Kryokonservierung von <i>E. coli</i> und <i>Pichia pastoris</i> Kulturen	46
3.2.7 Verdau von Plasmid DNA	46
3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese	46
3.2.9 Sequenzierung	46
3.2.10 <i>ARMS2</i> Testexpression	47
3.2.11 <i>ARMS2</i> Expression	47
3.2.12 Zellaufschluss von <i>Pichia pastoris</i>	47
3.2.13 Ni-NTA-Affinitätschromatographie	48
3.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.2.15 Western Blotting	49
3.2.16 Immunologischer Nachweis von Proteinen	49
3.2.17 Silberfärbung	50
3.2.18 MALDI TOF	50
3.2.19 Zellbindungsstudien.....	51
3.2.20 Heparansulfat Konkurrenz	51
3.2.21 C3b Ablagerungsassay.....	52
3.2.22 Properdin Ablagerungsassay.....	52
3.2.23 ELISA: Bestimmung der C3a und Ba Aktivierungsprodukte in der Flüssigphase	53
3.2.24 ELISA: Bindung von <i>ARMS2</i> an Komplementproteine	53
3.2.25 ELISA: Bindung von Properdin an <i>ARMS2</i>	53
3.2.26 ELISA: Rekrutierung von C3b über <i>ARMS2</i> gebundenes Properdin	54
3.2.27 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	54
3.2.28 <i>ARMS2</i> mRNA Expressionsstudien	55
3.3 Statistische Datenanalyse.....	56
4 Ergebnisse	57
4.1 Funktionelle Charakterisierung von <i>ARMS2</i>	57

4.1.1 Herstellung von rekombinanten ARMS2 und α -ARMS2 Antikörper	57
4.1.2 Heparansulfat vermittelt die Bindung von ARMS2 an Zelloberflächen	59
4.1.3 ARMS2 bindet an spät apoptotische und nekrotische Zelloberflächen	61
4.1.4 Bindung von ARMS2 an retinale Pigmentepithelzellen	63
4.1.5 Oberflächen gebundenes ARMS2 verstärkt die Komplementablagerung	65
4.1.6 Oberflächen gebundenes ARMS2 rekrutiert Properdin	71
4.2 Expression von ARMS2 in Phagozyten des angeborenen Immunsystems	75
5 Diskussion	77
5.1 Rekombinantes ARMS2	77
5.2 ARMS2 bindet an Zelloberflächen mittels Heparansulfat	78
5.3 ARMS2 bindet an veränderte, humane Zelloberflächen	79
5.4 ARMS2 verstärkt die Opsonisierung von Zelloberflächen	80
5.5 ARMS2 rekrutiert Properdin auf Zelloberflächen	81
5.6 ARMS2 Expression in Phagozyten des angeborenen Immunsystems	82
5.7 Mögliche ARMS2 Funktion im Kontext der AMD	82
Literaturverzeichnis	85
Eigenständigkeitserklärung	i
Lebenslauf	ii
Übersicht der Vorträge, Poster, Auszeichnungen und Publikationen	iii
Danksagung	v

Abkürzungen

<i>ABCA1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A, member 1</i>
aHUS	atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
<i>APOE</i>	<i>Apolipoprotein E</i>
ARMS2	Age-Related Maculopathy Susceptibility 2
BM	Bruch'sche Membran
BSA	Bovines Serum Albumin
C2	Komplementkomponente 2
C3	Komplementkomponente 3
C4BP	C4-bindendes Protein
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
<i>CETP</i>	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
<i>CFB</i>	<i>Complement Factor B</i>
<i>CFH</i>	<i>Complement Factor H</i>
<i>CFHR</i>	<i>Complement Factor H related</i>
<i>CFI</i>	<i>Complement Factor I</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
<i>COL10A1</i>	<i>Collagen alpha-1(X) chain</i>
<i>COL8A1</i>	<i>Collagen alpha-1(VIII) chain</i>
crlt	Kontrolle
CRP	C-reaktives Protein
Crry	Complement receptor 1 related protein y
DAF	Decay accelerating factor
DEAP-HUS	deficient for CFHR proteins and factor H autoantibody positive
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FHL-1	Factor H like 1 protein
FP	Properdin
<i>FRK</i>	<i>Fyn-related kinase</i>
hiHS	Hitze inaktiviertes, humanes Serum
HRP	Meerrettichperoxidase
HSA	Humanes Serum Albumin
<i>HTRA1</i>	<i>High-Temperature Requirement Factor A1</i>
IL-1 β	Interleukin 1 β
<i>LIPC</i>	<i>hepatic triglyceride lipase</i>
MCP	Membran cofactor protein
MPGN	membranoproliferative Glomerulonephritis
NHS	normales humanes Serum
<i>PLEKHA1</i>	<i>Pleckstrin Homology Domain-Containing A1</i>
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat

RPE	Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
SCR	Short consensus repeat
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCC	Terminaler Komplement Komplex
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
<i>TIMP3</i>	<i>Metalloproteinase inhibitor 3</i>
TNF- β	Tumor necrosis factor β
UTR	untranslatierter Bereich
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vn	Vitronektin
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Das Komplementsystem	16
Abbildung 2:	Anatomie des Auges	24
Abbildung 3:	Die Spätformen der AMD	30
Abbildung 4:	Überblick über die AMD assoziierten Gen-Loci innerhalb des humanen Genoms	32
Abbildung 5:	AMD assoziierter Genlokus auf Chromosom 10	35
Abbildung 6:	AMD assoziierte Mutationen innerhalb des 10q26 Genlokus	36
Abbildung 7:	InDel-Mutation innerhalb des <i>ARMS2</i> -Gens	37
Abbildung 8:	InDel-Mutation innerhalb der mRNA von <i>ARMS2</i>	37
Abbildung 9:	Entwicklung von <i>ARMS2</i> innerhalb der Primaten	38
Abbildung 10:	Nachweis von rekombinantem <i>ARMS2</i> .	58
Abbildung 11:	MALDI-Profil des aufgereinigten <i>ARMS2</i>	58
Abbildung 12:	<i>ARMS2</i> Bindung an CHO Zellen	59
Abbildung 13:	Visualisierte Bindung von <i>ARMS2</i> an CHO-K1 Zellen	60
Abbildung 14:	Kompetitions-Assay mit löslichem Heparansulfat	61
Abbildung 15:	Bindung von <i>ARMS2</i> an lebende, apoptotische und nekrotische T-Zellen	62
Abbildung 16:	<i>ARMS2</i> Bindung an Erythrozyten	63
Abbildung 17:	Bindung von <i>ARMS2</i> an die Zelllinie ARPE-19 sowie nativen RPE Zellen	64
Abbildung 18:	<i>ARMS2</i> verstärkt die Komplementablagerung auf Zelloberflächen	65
Abbildung 19:	Lösliches <i>ARMS2</i> verstärkt nicht die Komplementablagerung	66
Abbildung 20:	Lösliches <i>ARMS2</i> besitzt keinen Einfluss auf die C3-Konvertase der Flüssigphase	68
Abbildung 21:	Oberflächen gebundenes <i>ARMS2</i> verstärkt die Opsonisierung	69

Abbildung 22:	ARMS2 verstärkt die Opsonisierung von Oberflächen in Abhängigkeit eines aktiven Komplementsystems	70
Abbildung 23:	ARMS2 rekrutiert Properdin und verstärkt dadurch die C3b Ablagerung	72
Abbildung 24:	ARMS2 rekrutiert natives Properdin	73
Abbildung 25:	Kolokalisation von ARMS2 und Properdin auf Zelloberflächen	74
Abbildung 26:	ARMS2 Expression in Monozyten und Mikrogliazellen	75
Abbildung 27:	ARMS2 Sequenz-Alignment	76
Abbildung 28:	ARMS2 Homodimer	77
Abbildung 29:	Mögliches Heparansulfat-Bindemotiv in der ARMS2 Aminosäuresequenz	79
Abbildung 30:	Mögliche Komplement assoziierte Funktion von ARMS2	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Regulatoren der Flüssigphase	18
Tabelle 2:	Membrangebundene Regulatoren	19
Tabelle 3:	Verwendete Zelllinien	43
Tabelle 4:	Verwendete primäre Antikörper und Antiseren	43
Tabelle 5:	Zusammensetzung von Polyacrylamid-Gelen	49
Tabelle 6:	PCR Programm zur Amplifikation von cDNA	56
Tabelle 7:	verwendete Primer für die mRNA Expressionsstudien	56

Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Augenerkrankung des Menschen. Die AMD ist durch die Ausbildung von Drusen zwischen dem retinalen Pigmentepithel und der Bruch'schen Membran charakterisiert, was eine Degeneration angrenzender Pigmentepithelzellen und Photorezeptoren verursacht. Neben dem Alter, zählen verschiedene genetische Mutationen zu den größten Risikofaktoren für die Ausprägung einer AMD. Mutationen in Genen des Komplementsystems wie *CFH* (**Complement Factor H**), *CFB* (**Complement Factor B**), *C2*, *C3* sowie *CFI* (**Complement Factor I**), weisen auf die Bedeutung des angeborenen Immunsystems im Auge hin. Am stärksten assoziiert sind allerdings Mutationen in einem funktionell noch unbekanntem Gen auf Chromosomenabschnitt 10q26, welches als *ARMS2* (**Age-Related Maculopathy Susceptibility 2**) bezeichnet wurde. Drei AMD assoziierte Polymorphismen in *ARMS2* sind bekannt. Zum einen der rs2736911 Polymorphismus, welcher zu einem vorzeitigen *Translations-Stopp* an Aminosäureposition 38 führt und mit einem erhöhten AMD-Risiko in der chinesischen Bevölkerung assoziiert ist. Zum anderen der rs10490924 Polymorphismus, welcher zu einen Austausch eines Alanins durch ein Serin an Aminosäureposition 69 führt und mit einer InDel-Mutation in der 3' UTR gekoppelt ist. Letztere Mutation führt zur Instabilität des *ARMS2*-Transkriptes. Der rs10490924 Polymorphismus in Kombination mit der InDel-Mutation ist mit einem deutlich erhöhten AMD Erkrankungsrisiko in der kaukasischen und japanischen Bevölkerung assoziiert. In der vorliegenden Promotionsarbeit wird erstmals die Funktion von *ARMS2* beschrieben. Rekombinantes *ARMS2* Protein bindet an spät apoptotische und nekrotische humane Zelloberflächen, nicht aber an native, lebende Zellen. An Oberflächen gebunden, verstärkt *ARMS2* die Opsonisierung mit Komplement C3b über den Alternativen Aktivierungsweg. Dabei rekrutiert Oberflächen gebundenes *ARMS2* den Komplementaktivator Properdin, welcher die C3-Konvertase stabilisiert und somit die Komplementaktivität auf der Oberfläche verstärkt. Die Expression von nativem *ARMS2* wurde erstmals in humanen, phagozytierenden Zellen wie den Monozyten und speziellen Phagozyten im retinalen Raum, den Mikrogliazellen, identifiziert. Eine *ARMS2* Defizienz wie durch die AMD Risiko Haplotypen hervorgerufen, reduziert vermutlich die Opsonisierung und die Phagozytose absterbender Zellen in der Retina. Es kommt zu einer Akkumulation von Drusen und totem Zellmaterial, die dann eine stetige Komplementaktivierung und eine chronische Entzündungsreaktion induzieren. Die gewonnenen Ergebnisse verbessern das Verständnis über die Ursachen der AMD und werden helfen neue Komplement basierte Therapien zu entwickeln.

Summary

Age-related macular degeneration (AMD) is a heritable, progressive neurodegenerative disease and the leading cause of blindness in developed countries. AMD is characterized by the formation of drusen between the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. The progressive accumulation of drusen leads to the degeneration of photoreceptors and of pigmented epithelial cells. Beside age, genetic mutations represent the major risk factors for the development of AMD. Genome-wide linkage studies identified polymorphisms predominantly in complement genes such as *CFH* (**Complement Factor H**), *CFB* (**Complement Factor B**), *C2*, *C3* and *CFI* (**Complement Factor I**) to be associated with AMD, indicating the major impact of innate immunity in disease development. Strongly associated with AMD is a polymorphism in a gene on chromosome 10q26, that was named *ARMS2* (**Age-Related Susceptibility Maculopathy 2**) and which encodes a small protein with so far unclear functions. The *ARMS2* risk variant includes the rs10490924 polymorphism, which leads to an alanine – serine exchange at amino acid position 69 (A69S). This polymorphism is in strong linkage disequilibrium with an InDel-mutation in the 3'UTR, which contributes to *ARMS2* mRNA instability. Both mutations are associated with an increased risk of AMD development in Caucasian and Japanese populations. An additional rs2736911 polymorphism, which results in a premature stop codon at protein position 38 (R38Stop) was described to be associated as a risk factor in the Chinese population. The present work describes for the first time the function of the *ARMS2* protein. Recombinant *ARMS2* binds to late apoptotic and necrotic cell surfaces, but not to native, living cells. Attached to surfaces, *ARMS2* activates complement and increases C3b opsonization by the alternative pathway. Thereby surface attached *ARMS2* recruits the complement activator properdin, which stabilizes C3 convertases and enhances C3b opsonization on the cell surface. Furthermore, *ARMS2* expression is identified in human monocytes, as well as in microglia cells, the latter representing phagocytes in the retina. Thus low *ARMS2* levels as caused by the *ARMS2* risk haplotype likely reduce phagocytosis and clearance of dying cells in the retina. The ongoing accumulation of drusen and cell debris subsequently induces complement activation accompanied by a chronic inflammation. The results improve the understanding of AMD pathology and may help to develop a new complement-based therapy.

1 Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr krankheitsauslösender Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, mit denen unser Körper tagtäglich in Kontakt kommt. Neben der Bekämpfung von infektiösen Erregern, dient es auch der Beseitigung von körpereigenen, veränderten Strukturen, wie apoptotischem und nekrotischem Zellmaterial. Dies wird durch das Zusammenspiel eines komplexen Netzwerkes physikalischer, zellulärer und molekularer Faktoren gewährleistet, welche sich funktionell in zwei Bereiche unterteilen lassen: dem angeborenen- sowie dem adaptiven Immunsystem [1]. Beide Systeme sollen in den nächsten Kapiteln kurz charakterisiert werden.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem repräsentiert eine erste immunologische Verteidigungsreaktion und verfügt über physikalische Barrieren wie dem Epithel als auch biochemische Abwehrmechanismen mittels Lysozym, Komplement, Zytokine oder Akut-Phase-Proteine. Es reagiert unmittelbar auf Erreger, wodurch schwerwiegende Infektionen verhindert werden können. Mikroorganismen, welche die Epitheloberfläche durchdringen, werden durch die zelluläre Abwehr bekämpft. Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und Neutrophile, erkennen ein breites Spektrum von Oberflächenmolekülen eindringender Mikroorganismen und entfernen diese mittels Phagozytose aus dem Körper. Natürliche Killerzellen können zudem körpereigene, veränderte Zellen erkennen und abtöten, wobei auch hier Makrophagen an der Beseitigung apoptotischer Zellen beteiligt sind. Das angeborene Immunsystem reagiert auf unterschiedliche Erreger in einer ähnlichen Weise, allerdings reagieren Zellen des angeborenen Immunsystems schneller auf Neuinfektionen, wenn diese bereits zuvor an einer Abwehrreaktion beteiligt waren. Die Aktivierung der angeborenen Immunität ist zudem eine Voraussetzung für den Aufbau der adaptiven Immunreaktion [2, 3].

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Wenn Mikroorganismen die angeborene Immunreaktion überwinden, reagiert das adaptive Immunsystem spezifisch auf den eingedrungenen Erreger. Die Spezifität wird dabei durch den Kontakt von B- und T-Zellen mit ihrem jeweiligen Antigen vermittelt. Der Aufbau einer adaptiven Immunantwort beginnt in den Lymphknoten und benötigt mehrere Tage. Antigen präsentierte Zellen migrieren nach der Phagozytose des Erregers zu den lymphatischen Organen und präsentieren dort erregerspezifische Antigene auf ihren Oberflächen. Sobald eine naive B-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt und über eine aktivierte T-Helferzelle stimuliert wird, beginnt sie mit der Proliferation und erhöht ihre Affinität gegenüber dem Antigen. Zudem kann die aktivierte B-Zelle in eine Antikörper sezernierende Plasmazelle sowie langlebige Gedächtniszelle differenzieren [4].

Die Aktivierung von naiven T-Zellen erfolgt, ähnlich den B-Zellen, über den Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen. Die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren ermöglicht hierbei eine Differenzierung in drei unterschiedliche Richtungen. Zur ersten Gruppe zählen T-Helferzellen ($CD4^+$, $CD8^-$), welche die B-Zelldifferenzierung sowie Makrophagen-Aktivierung anregen. Zytotoxische T-Zellen ($CD4^-$, $CD8^+$) bilden die zweite Gruppe und können infizierte körpereigene Zellen erkennen als auch abtöten. Die letzte Gruppe umfasst regulatorische T-Zellen ($CD4^+$, $CD25^+$). Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der Regulation der Proliferation und Differenzierung anderer Lymphozyten. Dadurch trägt diese Gruppe wesentlich zur Inhibition der Immunantwort sowie der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz bei [5, 6].

1.2 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunität und wurde 1888 von George Henry Nuttall entdeckt, welcher einen Serumfaktor beschrieb, der in Kombination mit Antikörpern Bakterien angreifen konnte. Der erste experimentelle Nachweis wurde jedoch erst 1894 durch Jules Bordet erbracht. Der Forscher charakterisierte diesen Serumfaktor als eine hitzlabile Komponente, welche die Antikörperbindung auf bakteriellen Oberflächen komplementiert. Neben der Abwehr von Mikroorganismen besitzt das Komplementsystem noch viele weitere Funktionen. Diese Aufgaben umfassen; das Auslösen von Entzündungsreaktionen, die Unterstützung der Phagozytose von Erregern, Immunkomplexen und zellulären Debris sowie die Beseitigung von veränderten körpereigenen Zellen (z.B. nekrotische oder apoptotische Zellen) [7]. Des Weiteren spielt das Komplementsystem eine zentrale Rolle bei der Initiation der

adaptiven Immunantwort [8]. Es unterstützt außerdem die Regulation von neuronalen Entwicklungsprozessen sowie die Regeneration von Gewebe [9, 10].

Das Komplementsystem besteht aus über 60 Plasma- und membranständigen Proteinen. Lösliche Komplementkomponenten werden zum Großteil in der Leber, aber auch in vielen anderen Gewebetypen exprimiert und in die Blut- bzw. Lymphbahnen sekretiert [11]. Hierbei handelt es sich neben Regulatoren vor allem um inaktive Vorstufen der Komplementkomponenten (Zymogene). Die Aktivierung von Komplement erfolgt durch eine kaskadenartige, proteolytische Spaltung dieser inaktiven Vorstufen. Hierbei wird in der Regel das größere Fragment mit dem Zusatz „b“ sowie das kleinere Fragment mit dem Zusatz „a“ deklariert [12]. Die generierten Spaltprodukte besitzen unterschiedliche Effektor-Funktionen und sind physiologisch relevant. Aktivierte Komplementkomponenten differenzieren nicht zwischen körpereigenen- und körperfremden Strukturen. Eine Komplementablagerung auf körpereigenen Zellen wird mit Hilfe von löslichen- als auch membranständigen Regulatoren verhindert, welche inhibitorisch in die Kaskade eingreifen [13].

1.2.1 Aktivierung des Komplementsystems

Die Aktivierung des Komplementsystems wird über drei verschiedene Wege initiiert. Man unterscheidet zwischen dem klassischen Weg, welcher sich durch Immunkomplexe ausbildet sowie dem Lektin-Weg, dessen Aktivierung über mikrobielle Zuckerstrukturen initiiert wird. Im Gegensatz dazu beginnt der alternative Weg mit der spontanen Hydrolyse der Komplementkomponente C3, was als „tick over“-Mechanismus bezeichnet wird. Alle drei Wege führen zum Aufbau der C3-Konvertase, dem zentralen Enzymkomplex der Komplementkaskade [14].

Im klassischen Weg erfolgt die Komplementaktivierung über die Bindung des C1qrs Komplexes (766 kDa) an einen Immunkomplex aus Antigen und Antikörper. Die folgende Konformationsänderung im C1r₂C1s₂-Teil innerhalb des Komplexes induziert eine autokatalytische Enzymaktivität von C1r. Durch die C1r abhängige Aktivierung von C1s wird eine Serinproteaseaktivität generiert, welche das Molekül C4 (200 kDa) in das Opsonin C4b (190 kDa) und das Anaphylatoxin C4a (10 kDa) spaltet. Das aktive C4b bindet über eine freigesetzte, reaktive Thioestergruppe kovalent an Oberflächen und rekrutiert C2 (90 kDa), welches durch C1s in C2a (60 kDa) und C2b (30 kDa) gespalten wird. Zusammen bilden die Fragmente C4b und C2a die C3-Konvertase des klassischen Wegs (C4bC2a).

Der Lektin-Weg ist dem klassischen Weg funktionell ähnlich. Mannan bindendes Lektin (MBL, ~900 kDa) erkennt spezifische Zuckerstrukturen (z.B. Mannose) auf mikrobiellen Oberflächen, wobei die MBL assoziierten Serinproteasen 1 und 2 aktiviert werden. Beide Enzyme sind dem C1r sowie C1s homolog und spalten C4 als auch C2. Die Spaltprodukte C4b und C2a bilden wiederum die klassische C3-Konvertase C4bC2a aus.

Der alternative Weg der Komplementaktivierung erfolgt durch die spontane Hydrolyse von C3 (185 kDa). Das metastabile C3(H₂O) wird von Faktor B (93 kDa) gebunden und dieses durch die Protease Faktor D (24 kDa) in die Fragmente Bb (60 kDa) und Ba (33 kDa) gespalten. Das Spaltprodukt Bb bleibt am C3(H₂O) komplexiert und bildet eine C3-Konvertase C3(H₂O)Bb, welche weitere C3 Moleküle in C3b (175 kDa) und C3a (10 kDa) spaltet. C3b ist, ähnlich dem C4b, in der Lage durch seine reaktive Thioestergruppe an Oberflächen kovalent zu binden. Abgelagertes C3b wird sofort durch Faktor B gebunden und von Faktor D in Bb und Ba gespalten. Der ausgebildete C3bBb Komplex wird durch Properdin (53 kDa) stabilisiert. Zusammen bilden diese Komplementproteine eine stabile C3-Konvertase (C3bBbP) auf Oberflächen aus [15].

1.2.2 Die C3-Konvertase

Die C3-Konvertase ist das zentrale Element der Komplementkaskade. Die Assemblierung erfolgt entweder über den klassischen- sowie Lektin-Weg (C4bC2a) oder den alternativen Weg (C3bBb). Die Aufgabe der C3-Konvertase besteht in der Spaltung weiterer C3 Moleküle in C3b und C3a. Abgelagertes C3b bildet in der Folge zusätzliche C3-Konvertasen des alternativen Wegs aus, was zu einer Amplifikation der Komplementkaskade führt. Lagert sich C3b in der Nähe bestehender C3-Konvertasen ab, verursacht eine Bindung des Moleküls an den Komplex die Ausbildung der C5-Konvertase (C3bBbC3b oder C4bC2aC3b). Die C5-Konvertase besitzt eine Substratspezifität für das Komplementprotein C5 (190 kDa), welches in C5b (180 kDa) und C5a (10 kDa) gespalten wird. Abgelagertes C5b rekrutiert C6 sowie C7 (C5b-7) auf die Oberfläche, was zum Aufbau des terminalen Komplement Komplex (TCC) führt [16].

Durch die Spaltung von C3 und C5 werden die Anaphylatoxine C3a und C5a fortlaufend freigesetzt. Ihre Aufgabe besteht darin, phagozytierende Zellen (Monozyten, Makrophagen sowie Neutrophile) zu aktivieren und zum Ort der Entzündungsreaktion zu locken [17].

1.2.3 Ausbildung des terminalen Komplementkomplex

Das durch die C5-Konvertase gebildete C5b ist metastabil und wird durch die Bindung der Komplementkomponenten C6 und C7 auf der Zelloberfläche stabilisiert. Der ausgebildete C5b-7 Komplex wird durch Bindung von C8 in die Membran integriert und induziert eine Anlagerung von 10 bis 16 C9 Molekülen, welche eine porenförmige Struktur (C5b-9n) ausbilden. Die Pore ist für kleinere Moleküle durchlässig und führt zum Verlust des osmotischen Potentials sowie zum Absterben der angegriffenen Zelle [18].

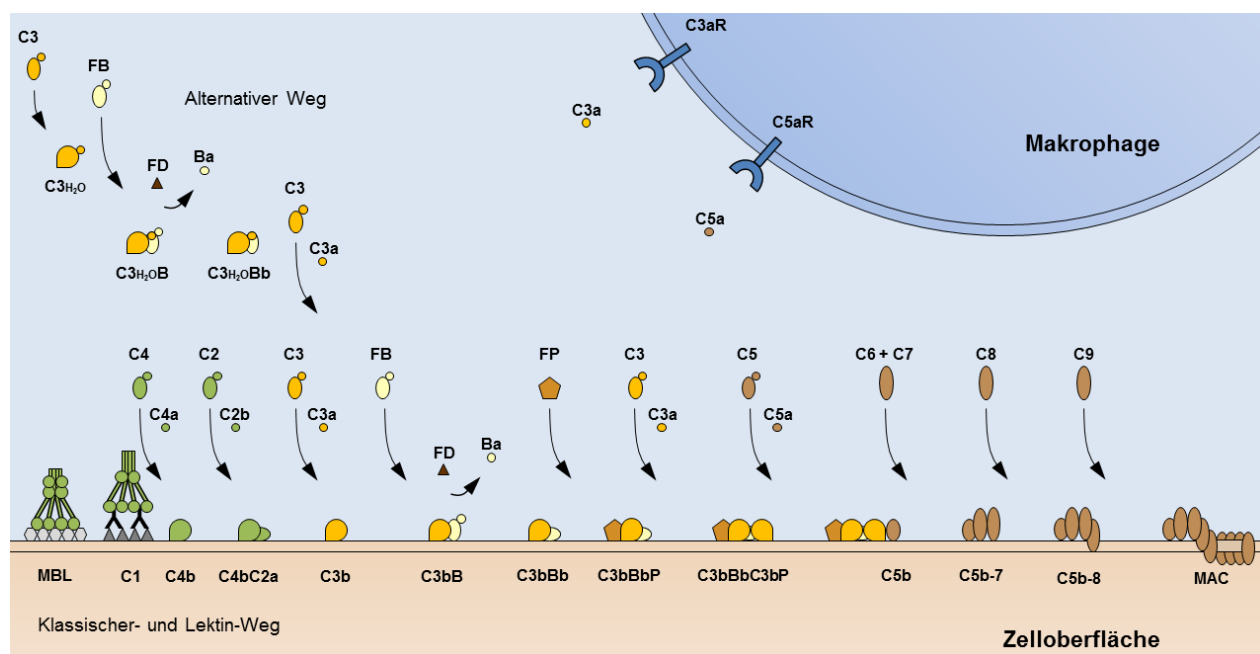


Abbildung 1: Das Komplementsystem

Die Komplementaktivierung kann über den klassischen-, Lektin- sowie alternativen Weg erfolgen. Die Bindung von MBL über mikrobielle Zuckerstrukturen (Lektin-Weg) oder C1 durch einen Antikörper-Antigen-Komplex induziert den Aufbau der klassischen Konvertase. Die autokatalytische Enzymaktivität von MBL sowie C1 spaltet C4 in C4b und C4a. Abgelagertes C4b vermittelt die Spaltung von C2 in C2a und C2b. Zusammen bilden die Komponenten C4bC2a die klassische C3-Konvertase aus. Die alternative Komplementaktivierung beginnt mit der spontanen Hydrolyse von C3 in C3(H₂O). Bindet Faktor B (FB) an C3(H₂O), erfolgt die Spaltung durch Faktor D (FD) in Bb und Ba. C3(H₂O)Bb bildet die C3-Konvertase der Flüssigphase. Beide C3-Konvertasen generieren aus C3 weiteres C3b, welches sich mittels einer aktiven Thioestergruppe auf Oberflächen ablagert. Faktor B bindet abgelagertes C3b und wird durch Faktor D gespalten. Bindet Properdin an C3bBb, führt dies zur Stabilisierung des Komplex (C3bBbP). Die C3-Konvertase spaltet weitere C3 Moleküle und sorgt so für eine vermehrte Ablagerung von C3b. Bindet abgelagertes C3b die C3-Konvertase, wird die C5-Konvertase (C3bBbC3bP) ausgebildet, welche C5 in C5b und C5a spaltet. C5b bindet C6 und C7. Der C5b-7 Komplex wird daraufhin mittels C8 in der Zellmembran verankert. Binden 10 bis 16 Moleküle C9 an den Komplex formieren diese eine lytische Pore, welche auch als „Membrane Attack Complex“ bezeichnet wird.

1.2.4 Regulation der Komplementkaskade

Komplement unterscheidet nicht zwischen körperfremden- und körpereigenen, gesunden Zellen. Generiertes C3b kann sich prinzipiell an allen Oberflächen ablagern und neue Konvertasen ausbilden. Um körpereigene Strukturen zu schützen, existiert eine Vielzahl von löslichen-, als auch Membran assoziierten Regulatoren (Tabellen 1 und 2). Dabei inhibieren diese Regulatoren die Komplementkaskade spezifisch auf verschiedenen Aktivierungsebenen [19].

Sowohl Lektin-, klassischer- als auch der alternative Weg führen zum Aufbau der C3-Konvertase, dem zentralen Element für die Amplifikation der enzymatischen Kaskade und der damit verbundenen Generierung von C3b. Da sich C3b über seine aktive Thioestergruppe auf allen Oberflächen ablagert und somit auch körpereigenes Gewebe schädigen könnte, ist eine Regulation der C3 Ebene auf Selbstoberflächen von besonderer Relevanz. Diese Aufgabe übernehmen die löslichen Regulatoren C4BP (Serumkonz. ~225 µg/ml) im klassischen- sowie Faktor H (Serumkonz. ~500 µg/ml) im alternativen Weg. Beide regulieren die C3 Spaltung sowohl in der Flüssigphase und auf Oberflächen. So verhindert Faktor H durch Bindung an C3b einen Faktor B vermittelten Aufbau der C3-Konvertasen. C4BP bindet, vergleichbar zu Faktor H, C4b und unterdrückt dadurch eine Assemblierung der klassischen C3-Konvertase durch C2a. Zusätzlich sind Faktor H und C4BP Kofaktoren für die Serinprotease Faktor I, welche C3b/C4b in die inaktiven Formen iC3b/iC4b spaltet. Auf Zelloberflächen wird die Kofaktor-Aktivität auch über die membranständigen Proteine CD35 und CD46 vermittelt. Haben sich bereits alternative- (C3bBb) bzw. klassische (C4bC2a) C3-Konvertasen ausgebildet, beschleunigen Faktor H und C4BP den Zerfall der C3-Konvertasen. Man spricht in diesem Fall von einer „decay accelerating activity“, welche auch Membran gebundene Regulatoren wie CR1 sowie DAF besitzen. Faktor H und C4BP inhibieren, zusätzlich zur Flüssigphase-Regulation, die Komplementaktivität auch auf Oberflächen. Dies ist insbesondere auf körpereigenen Strukturen ohne membranständige Regulatoren notwendig, wie der Basalmembran der Niere oder der Bruch'schen Membran im Auge [20]. Die Bindung an Zelloberflächen wird hierbei über Sialin-Säurereste oder Glykosaminoglykane (GAGs) vermittelt. Da Mikroorganismen keine vergleichbaren GAGs besitzen, unterdrücken Flüssigphase-Regulatoren durch diesen Mechanismus die Komplementaktivierung spezifisch auf körpereigenen Strukturen.

Neben der Inhibition auf C3 Ebene, besitzt das Komplementsystem weitere Regulatoren, welche an verschiedenen Stellen in die Komplementaktivierung eingreifen. So inhibiert die Carboxypeptidase N spezifisch die Anaphylatoxine C3a und C5a. Regulatoren wie Vitronektin, Clusterin oder CD59 inhibieren dagegen die Ausbildung des TCC [13, 21 - 23].

Komplementregulatoren spielen somit eine entscheidende Rolle, Entzündungsreaktionen durch Komplement zu steuern und auf körpereigenen Strukturen zu unterdrücken. Das Fehlen oder die funktionelle Einschränkung dieser Regulatoren kann somit zu starken Gewebsschädigungen mit schweren Erkrankungen führen.

Tabelle 1: Regulatoren der Flüssigphase

Regulator	Zielmolekül (Weg)	Funktion
Faktor H, FHL-1	C3b, C3d (alternativ)	Abbau der C3-Konvertase als Kofaktor
CFHR-1	C3b (alternativ)	Inhibition C5-Konvertase und TCC Formation
C4BP	C4 (klassisch, Lektin)	Abbau der C3-Konvertase als Kofaktor
C1 Inhibitor	C1r, C1s, MASP2 (klassisch, Lektin)	Inaktivierung des C1q Antigen Antikörper Komplexes
Carboxypeptidase N	C3a, C4a, C5a	Inaktivierung von Anaphylatoxinen
Clusterin	C7, C8, C9, TCC (terminal)	Inhibition des TCC
Vitronectin	C5bC7C7, TCC (terminal)	Inhibition des TCC
Properdin	C3, C3b, iC3b, C3bBb (alternativ)	Stabilisierung der C3-Konvertase

Tabelle 2: Membrangebundene Regulatoren

Rezeptor	Zielmolekül	Expression	Funktion
CR1 (CD35)	C3b, iC3b, C4b	Kernhaltige Zellen und Erythrozyten	Inhibition der C3-Konvertase
CR2 (CD21)	iC3b, C3d, C3dg	B-Zellen, dendritische Zellen	Regulation der B-Zell-Aktivierung, Bindung von Immunkomplexen
CR3 (CD11b/18)	iC3b, Faktor H	Leukozyten	Verstärkung der Phagozytose
CR4 (CD11c/18)	iC3b	Monozyten, Makrophagen	Verstärkung der Phagozytose
C3aR	C3a	Monozyten, Makrophagen, Eosinophile, T-Zellen	Proinflammatorische Signaltransduktion
C5aR (CD88)	C5a	Monozyten, Neutrophile, dendritische Zellen, T-Zellen	Proinflammatorische Signaltransduktion
MCP (CD46)	C3b, C4b	Kernhaltige Zellen	Abbau der C3-Konvertase als Kofaktor
DAF (CD55)	C4b2a, C3bBb	Kernhaltige Zellen und Erythrozyten	Inhibition der C3-Konvertase
Protectin (CD59)	C8, TCC	Kernhaltige Zellen	Inhibition des TCC

1.2.5 Komplement assoziierte Autoimmunerkrankungen

Eine der Hauptfunktionen des Komplementsystems ist die Beseitigung von Krankheitserregern und modifizierten (apoptotischen, nekrotischen) körpereigenen Zellen. Um eine Komplementaktivierung und Schädigung körpereigener Strukturen zu verhindern, wird die kaskadenartige Amplifikation von Komplement über eine Vielzahl von löslichen und membranassoziierten Regulatoren strikt reguliert. Die Beeinträchtigung der Funktion, aber auch der Verlust eines Regulators führt dabei zu einer Überaktivierung von Komplement und kann eine Schädigung körpereigener Zellen verursachen. Solche Defekte sind unter anderem mit den Nierenerkrankungen atypisches hämolytisch urämisches Syndrom (aHUS) sowie membranproliferative Glomerulonephritis (MPGN) assoziiert. Zum anderen ist eine eingeschränkte Komplementregulierung mit entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) als auch der Alzheimer-Krankheit assoziiert [24].

Hämolytisch Urämisches Syndrom (HUS)

Das hämolytisch urämische Syndrom wird durch das gleichzeitige Auftreten einer mikroangiopathischen, hämolytischen Anämie mit einer Thrombozytopenie sowie einem akuten Nierenversagen definiert und in zwei Erkrankungsformen unterschieden. 90 % aller Betroffenen leiden an einer typischen HUS. Hierbei schädigen bakterielle Gifte, wie das durch *E. coli* O157:H7 produzierten Shiga Toxin, das Darmepithel und werden vermutlich über Blutzellen wie Erythrozyten, Leukozyten aber auch Thrombozyten zu Gb3 (Globotriaosylceramid) Rezeptor exprimierenden Geweben, wie den Nieren, transportiert. An Nierenendothelzellen gebundenes Shiga Toxin verursacht eine thrombotische Mikroangiopathie und induziert eine starke Komplementaktivierung. Beide Vorgänge führen zu einem akuten Nierenversagen bei den betroffenen Personen [25, 26]. Die atypische Verlaufsform der HUS (aHUS) ist mit einem breiten Spektrum an Mutationen in Genen des Komplementsystems wie *CFH* (**Complement Factor H**), *CFI* (**Complement Factor I**), *CFB* (**Complement Factor B**) sowie *C3* und *MCP* assoziiert und tritt in 10% der Patienten auf [27, 28]. Auch in aHUS Betroffenen kommt es zu einer übermäßigen Komplementaktivierung. Viele aHUS Patienten weisen Mutationen im C-Terminus von Faktor H auf, welche die Bindungseigenschaften des Regulators auf körpereigenen Strukturen, wie dem Endothel, stark einschränken und in Folge dessen eine erhöhte Komplementaktivität sowie Schädigung des Nierengewebes verursacht [29]. Die (DEAP)-HUS „deficient for CFHR proteins and factor H autoantibody positive“ ist eine Sonderform der aHUS. ~10 % der aHUS Patienten weisen Antikörper gegen Faktor H auf, welche sich größtenteils gegen den C-Terminus von Faktor H richten. Viele dieser Patienten sind zudem homozygot defizient für die Gene *CFHR1/CFHR3*, was ein Risiko für die Generierung von Faktor H Autoantikörper darstellt. Auch hier führt die eingeschränkte Regulation von Faktor H auf körpereigenen Oberflächen zu einer Schädigung der Niere [30, 31].

Membranproliferative Glomerulonephritis (MPGN)

Die MPGN zählt zu den C3 Glomerulopathien (C3G) und wird in einen Ig-positiven sowie einen Ig-negativen Subtyp unterteilt [32, 33]. Die Ig-positive C3G ist die häufigste Erkrankungsform und mit Immunkomplexen aus IgG und IgM assoziiert. Dabei lagern sich diese Immunkomplexe zwischen Endothel sowie Basalmembran ab und induzieren eine Komplementaktivierung über den klassischen Weg. In ca. 15 % aller Betroffenen kommt es zusätzlich zu Komplementablagerungen in subendothelialen als auch subepithelialen Bereichen [34]. Die Ig-negative C3G ist mit einer Dysregulation des alternativen Wegs verbunden und führt zu Komplementablagerungen innerhalb der Basalmembran der Glomeruli (GBM) [35].

Sowohl der Ig-positive als auch der Ig-negative Subtyp können eine Präsenz von C3Nef aufweisen. Der Autoantikörper ist in ca. 30 % aller Patienten mit Ig-positiver- sowie in 80 % von Betroffenen mit Ig-negativer C3G nachweisbar. C3Nef wirkt hierbei stabilisierend auf die C3-Konvertase und führt bei betroffenen Patienten zu einem nachweisbar niedrigem C3 Serumniveau, bedingt durch die einhergehende Überaktivierung von Komplement im Plasma [36-38].

Alzheimer-Krankheit

24 Millionen Menschen leiden weltweit an der Alzheimer-Krankheit. Im Laufe der Erkrankung lässt sich bei betroffenen Individuen eine zunehmende Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten, unter anderem der Gedächtnisleistung, dem Lernen sowie dem Sprachvermögen beobachten. Der Verlauf dieser altersabhängigen, neurodegenerativen Erkrankung wird von einer Vielzahl von Risikofaktoren bestimmt [39]. Die wichtigsten Charakteristika umfassen das Auftreten von Amyloid- β -Protein (A β) beinhaltenden Plaques sowie intrazellulären Neurofibrillen im Gehirn der Patienten [40]. Der Nachweis der Komplementproteine C3b, C4a, C5 – C9 innerhalb amyloider Plaques von Patienten lieferte erste Hinweise für eine Assoziation zwischen dem Komplementsystem und der Alzheimer Erkrankung [41]. In post-mortem entnommenem Nervengewebe wurde zudem eine erhöhte mRNA Expression der Komplementproteine C1q, C3, C4 sowie C9 beobachtet [42]. Weiterhin zeigten *in vitro* Studien, dass der klassische Weg über C1q durch die Peptide A β 40 und A β 42 induziert wird, aber auch unabhängig von C1q, über die C4 Aktivierung mittels A β 42 und A β 28 [43]. Crry überexprimierende, transgene Mäuse zeigten zudem ein 2- bis 3-fach höheres Aufkommen von amyloiden Plaques. Deshalb wird vermutet, dass die Komplementaktivierung auch einen protektiven Effekt gegenüber entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit vermittelt [44].

Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis ist durch chronische Inflammationsprozesse in den Gelenken gekennzeichnet. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Schädigung der Gelenk-Schleimhäute, -knorpel sowie dem Knochengewebe und kann in der Folge zu schwerwiegenden Deformationen führen [45]. Die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis wird durch das Eindringen von Leukozyten und Makrophagen in die Gelenkschleimhäute begünstigt. So ist beschrieben, dass Immunzellen durch Komplementaktivierungsprodukte wie C3a und C5a sowie in späteren Stadien auch durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α , angezogen und aktiviert werden [46-48]. Die Beteiligung von Komplement an der Entstehung der rheumatoiden Arthritis ist auch in klinischen Studien bestätigt, da in ca. 70 % der untersuchten Patientenproben

Autoantikörper und Komplementablagerungen auftraten [49, 50]. Ausgehend von diesen Daten wurde ein Krankheitsmodell abgeleitet, in welchem sich Autoantikörper, die gegen Kollagen gerichtet sind, in den betroffenen Geweben ablagern und eine Komplementaktivierung über den klassischen- und später den alternativen Weg induzieren. Vermutlich wird eine ausreichende Regulation der Komplementaktivierung durch Faktor H und anderen membranständigen Komplementregulatoren nicht mehr erreicht. In Folge der fortlaufenden Komplementaktivierung sowie Produktion von Anaphylatoxinen wie C3a und C5a werden zunehmend Makrophagen sowie Leukozyten angelockt, deren Aktivierung eine verstärkte Gewebeschädigung und Inflammation zur Folge hat [51].

1.3 Die Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration ist die häufigste Erblindungserkrankung des Menschen. Die Anzahl an AMD Erkrankungen wird weltweit auf ca. 30 Millionen geschätzt [52, 53]. In Deutschland sind schätzungsweise 4,5 Millionen Menschen von dieser Form der Immunerkrankung betroffen [54].

Die Erkrankung kann in ein frühes- sowie spätes Stadium unterteilt werden. Dabei beträgt die Prävalenz der AMD Frühform 20 % in der Altersgruppe ≥ 65 Jahre und steigt in der Altersgruppe ≥ 75 Jahre auf ca. 35 % an. Die Ausbildung einer späten AMD ist mit einer Häufigkeit von 1 % in der Altersgruppe ≥ 65 Jahre sowie 5 % in der Altersgruppe ≥ 75 Jahre vertreten [55]. Wie die Prävalenzen zeigen, ist das Alter einer der größten exogenen Faktoren, welcher mit der AMD Entwicklung korreliert. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung wird daher mit einem Anstieg der Neuerkrankungen in den kommenden Jahrzehnten gerechnet [56]. Die AMD entwickelt sich somit zu einer zunehmenden finanziellen Belastung für die etablierten Gesundheitssysteme. Die Entwicklung an wirkungsvollen, bezahlbaren Therapiemöglichkeiten wird somit immer dringender.

Die AMD ist durch eine Degeneration der Makula, der zentralen Netzhautregion mit der höchsten Konzentration an Photorezeptoren, charakterisiert. Extrazelluläres Zellmaterial, sogenannte Drusen, lagern sich zunehmend zwischen dem retinalen Pigmentepithel und der Bruch'schen Membran ab und vermindern dadurch die Nährstoffversorgung der Photorezeptoren. Eine anhaltende Unterversorgung führt dabei zu einer Schädigung sowie dem Absterben dieser Zellen. Betroffene Individuen erleiden dadurch einen Verlust der Sehschärfe, Kontrastwahrnehmung sowie eine allmähliche, irreversible Erblindung [57]. Dieser sehr langsame Prozess ist im frühen Stadium schwer zu diagnostizieren, da der Beginn der Drusen-

Ablagerung Teil des natürlichen Alterungsprozesses ist. Mit Zunahme der Drusen-Zahl und Größe, entwickelt sich die AMD Spätform, welche in zwei klinische Ausprägungsformen unterteilt wird: der geographischen Atrophie und der neovaskulären AMD [58]. Die molekularen Prozesse, die eine AMD verursachen sind noch weitgehend unklar. Dennoch wurden folgende Faktoren mit der Entstehung einer AMD assoziiert [59, 60]:

- eine Dysfunktion in der Phagozytoseaktivität des retinalen Pigmentepitheliums
- eine Schädigung der Photorezeptoren durch photooxidative Reaktionen
- altersbedingte, physiologische Veränderung der Bruch'schen Membran
- chronische Entzündungsreaktionen durch eine Überaktivierung des Komplementsystems

An der Entwicklung wirksamer Therapieformen wird derzeit intensiv geforscht. Gegenwärtig existieren vielversprechende experimentelle Ansätze bei der Transplantation von Netzhautregionen sowie im Einsatz monoklonaler Antikörper [55]. Der momentane Mangel an erfolgreichen medikamentösen Therapiemöglichkeiten vor allem für das AMD Spätstadium mit geographischen Atrophien, rückt zunehmend präventive Maßnahmen in den Focus der Behandlung. Hierzu zählen z. B. die Einnahme antioxidativer Nahrungsergänzungsmittel wie Zink aber auch Vitamin C, E und der verringerte Konsum von Zigaretten [61, 62].

1.3.1 AMD assoziierte Strukturen des Auges

Das Auge ist eines der Sinnesorgane mit denen der Mensch seine Umwelt wahrnimmt. Die Funktion des Auges besteht darin, Licht über die Linse zu bündeln und durch den Glaskörper auf die Retina zu projizieren. Die Photorezeptoren der Retina wandeln das Licht in biochemische Signale um, welche über den Sehnerv in den visuellen Kortex unseres Gehirns geleitet werden. Am Prozess der Licht-Transduktion sind viele Strukturen des Auges in direkter oder indirekter Weise beteiligt. Mit zunehmendem Alter kommt es zu gravierenden Veränderungen dieser Gewebe, die auch mit der AMD einhergehen [63]. Die folgenden Abschnitte widmen sich daher der detaillierten Beschreibung jener anatomischen Strukturen, welche von der altersabhängigen Makuladegeneration betroffen sind.

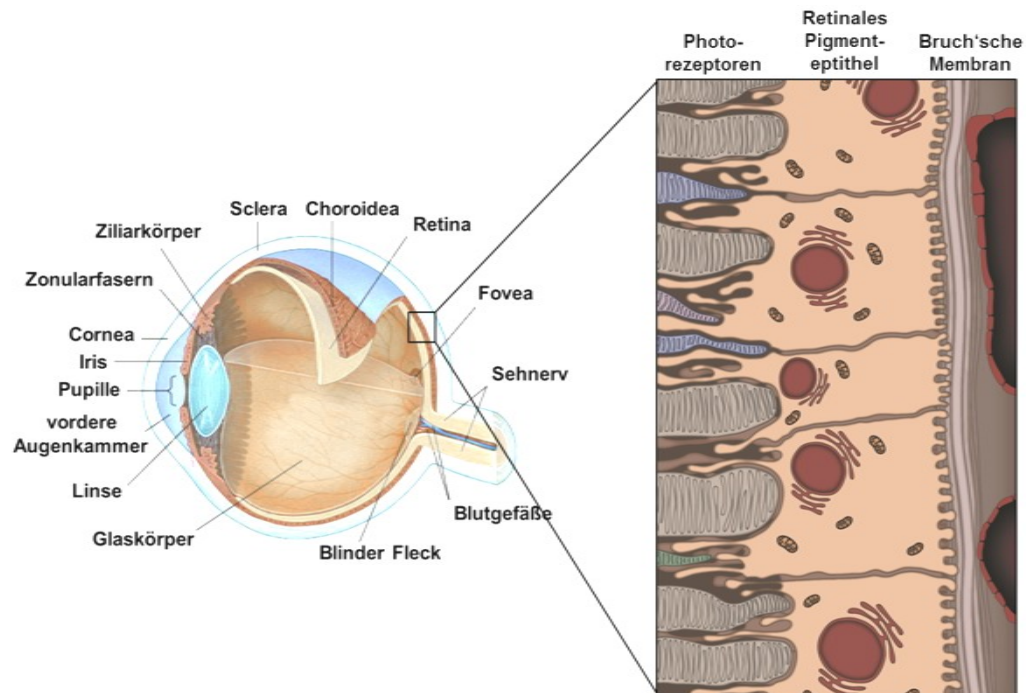


Abbildung 2: Anatomie des Auges

Das Auge ist von der Sklera umgeben. In der angrenzenden Choroidea befindet sich das Blutgefäßsystem, welches die inneren Strukturen der Retina mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Die Bruch'sche Membran und das RPE bilden eine Blut-Retina-Schranke aus. Die Retina besteht aus verschiedenen Schichten, dazu zählen neben dem RPE die Schicht der Photorezeptoren sowie der Ganglienzellen. Die Ganglienzellen bündeln sich im Sehnerv und leiten den sensorischen Input der Photorezeptoren in den visuellen Kortex. Die Fovea ist Teil der Makula und besitzt die höchste Dichte an Photorezeptoren, während der Blinde Fleck keine Sinneszellen aufweist, da hier die Dendriten der Ganglienzellen das Auge verlassen.

Quelle: Chader GJ, Taylor A, *Preface: The aging eye: normal changes, age-related diseases, and sight-saving approaches*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013, 54 (14): ORSF1-4, (modifiziert)

Die Retina

Die Retina unterteilt sich in fünf Schichten verschiedener Zelltypen. Die inneren Schichten bestehen aus einem Netzwerk von Neuronen mit unterschiedlichen Funktionen, deren Dendriten sich in die äußere plexiforme Schicht fortsetzen und Synapsen mit den Photorezeptoren ausbilden. Die Sinneszellen bilden die äußere Körnerschicht aus und umfassen zwei Typen von Rezeptoren, den Stäbchen und Zapfen. Die Verteilung der Photorezeptoren innerhalb der Retina ist nicht homogen. Die größte Dichte an Rezeptoren, insbesondere der Zapfen, befindet sich in der Fovea centralis, dem Zentrum der Makula. Diese anatomische Besonderheit der Makula ist für die Wahrnehmung von Farbkontrasten und dem Schärfesehen verantwortlich [64]. Das Absterben von Photorezeptoren, in Folge einer AMD bedingten Unterversorgung, ist irreversibel, da degenerierte Sinneszellen nicht mehr ersetzt werden. Dadurch führt der über Jahre fortschreitende Verlust funktionsfähiger Rezeptoren zu Einschränkungen der Lesefähigkeit, dem Erkennen von Gesichtern und kann in eine nahezu vollständige Erblindung münden [65].

Das retinale Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) bildet eine monozelluläre, bipolare Schicht. Die multifunktionalen Epithelzellen werden dabei in einen apikalen- sowie basalen Teil untergliedert. Der apikale Pol umgibt die äußeren Membransegmente der Photorezeptoren. Zu den Hauptfunktionen zählen die Phagozytose älterer Photorezeptorsegmente sowie das Recycling von Vitamin A als auch die Produktion von Antioxidantien [60, 66]. Der basale Pol des RPE ist durch eine dünne Membran gekennzeichnet, an welcher Bestandteile der extrazellulären Matrix (Kollagen, Laminin und Fibronectin) synthetisiert und an die angrenzende Bruch'sche Membran abgegeben werden [67].

Als Teil der Blut-Retina-Schranke, erfolgt die Nährstoff- als auch Sauerstoffversorgung der Photorezeptoren ausschließlich über das RPE. Somit ist die Integrität des RPE für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase essentiell. Mit zunehmendem Alter treten jedoch strukturelle und funktionelle Veränderungen auf, die den Metabolismus beeinträchtigen und abschwächen [68]. Zum einen führen Ansammlungen von zellulären Schäden, bedingt durch reaktive Sauerstoffspezies, zu einer oxidativen Stressreaktion der RPE Zellen [66]. Zum anderen resultieren Störungen im Abtransport und der Prozessierung von phagozytiertem Zellmaterial in einer exzessiven Lipofuszin-Akkumulation innerhalb der Epithelzellen als auch zu Ablagerungen (Drusen) zwischen dem RPE und der Bruch'schen Membran [69]. Die verstärkte Ausbildung von Drusen ist ein Merkmal der AMD. Drusen können zudem das Ablösen des RPE verursachen und verstärken [70].

Die aus dem veränderten Metabolismus resultierende Dysfunktion des RPE führt zu einer Unterversorgung der Photorezeptoren und einer zunehmenden Nekrose der betroffenen Gewebe. Die irreversible Schädigung der Zellen verursacht dabei AMD typische, pathologische Zustände [71].

Die Bruch'sche Membran

Die Bruch'sche Membran (BM) ist eine Struktur der extrazellulären Matrix und besteht hauptsächlich aus Kollagenen und Elastin. Die BM ist dabei in mehreren Schichten organisiert und trennt das RPE von den Blutgefäßen der Choroidea. Weiterhin fungiert die BM als physikalische und biochemische Barriere für hochmolekulare Stoffe aus dem Blut, ist jedoch permeabel für niedermolekulare Stoffe z.B. O₂, CO₂, Spurenelementen, Nährstoffen und Antioxidantien [72]. Zudem erfolgt der Abtransport von Abfallprodukten des RPEs über die BM zu den Blutgefäßen [73]. Dieses Diffusionspotential wird durch das Auftreten von altersbedingten, morphologischen und biochemischen Veränderungen innerhalb der BM beeinträchtigt [74]. Durch den eingeschränkten Abtransport akkumulieren Fettsäuren, Glyko- und Lipoproteine im subepithelalem Raum als auch innerhalb der Bruch'schen Membran, was eine zunehmende Verdickung der BM und einen Verlust der Elastizität verursacht. Die hohe Dichte an Photorezeptoren innerhalb der Makula führt hier zu einer größeren Akkumulation der Ablagerungen als in der Peripherie. Das eingeschränkte Diffusionspotential verstärkt eine bereits bestehende chronische Unterversorgung der Photorezeptoren und führt zum Funktionsverlust und dem Absterben der retinalen Zellen [75].

Die Choroidea

Die Choroidea besteht aus einem Netzwerk von Blutgefäßen und befindet sich zwischen der Sklera und dem retinalen Pigmentepithel. Eine optimale Verteilung der Blutgefäße gewährleistet die fortlaufende Versorgung der Retina mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die Dicke der Choriocapillaris als auch der kapillare Lumendurchmesser nehmen im Alter ab, was zu einer verringerten Durchblutung führt [76, 77]. Die kapillarischen Veränderungen vermindern, zusätzlich zur Verdickung der Bruch'schen Membran, die Versorgung der Photorezeptoren mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Abbauprodukten des RPE, wodurch die Ausbildung von Drusen und einer AMD begünstigt wird [78]. In der neovaskulären AMD Spätform führt der Mangel an Sauerstoff zur einer erhöhten Sekretion von VEGF, einem Wachstumshormon, was die Bildung neuer Blutgefäße induziert [79, 80]. Das unkontrollierte Einwachsen neuer Blutgefäße in die Retina geht mit einer Perforation der BM einher. Die hohe

Durchlässigkeit der neugebildeten Kapillaren führt zur Einblutung in den subretinalen Raum, was ein rapides Ablösen der Netzhaut verursacht [81].

1.3.2 Immunologie des Auges

Das Immunsystem bekämpft pathogene Organismen und beteiligt sich gleichzeitig an der Eliminierung körperfremder sowie veränderter, körpereigener Strukturen. Im ersten Fall bedarf es einer schnellen und effektiven Immunantwort, welche über Entzündungsreaktionen des angeborenen Immunsystems aber auch über Leukozyten der adaptiven Immunität vermittelt wird. Es existieren jedoch Bereiche im Körper wie dem zentralen Nervensystem (ZNS), der Reproduktionsorgane aber auch der Plazenta während einer Schwangerschaft, in denen eine Immunreaktion unerwünscht ist, da hier Entzündungen zu irreversiblen Zellschäden führen und ein einhergehender Funktionsverlust nicht kompensiert werden kann. Deshalb wird in diesen privilegierten Räumen die Generierung einer Immunreaktion durch eine Vielzahl von Mechanismen aktiv unterdrückt [82].

Das Auge als immunprivilegiertes Raum

Das Auge ist Teil des zentralen Nervensystems und besitzt somit die gleiche „immunprivilegierte“ Sonderstellung. Der eingeschränkte Zugang von Immunzellen wird dabei über zelluläre- sowie biochemische Barrieren gewährleistet. Eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs nimmt das retinale Pigmentepithel ein. Zum einen bildet es, zusammen mit der Bruch'schen Membran, eine Blut-Retina-Schranke aus und verhindert somit das Eindringen von Immunzellen [83]. Zum anderen ist die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD46, CD55 sowie CD59 verstärkt. Dadurch wird einer Aktivierung zirkulierender Immunzellen entgegen gewirkt und ein Schutz vor einer ungewollten Komplementaktivierung gewährleistet [84]. Die biochemische Barriere wird durch die kontinuierliche Sekretion von immunsuppressiven Molekülen aufrechterhalten. So vermittelt z.B. das antiinflammatorische Zytokin TNF- β einen zusätzlichen Schutz gegen die Aktivierung von Immunzellen. Dringen dennoch Immunzellen in den retinalen Raum vor, werden diese durch die Expression hoher Mengen an FAS-Ligand in eine gerichtete Apoptose geschickt. Diese Maßnahmen dienen dazu, das Eindringen von Makrophagen und Leukozyten in den immunprivilegierten Raum zu verhindern und irreversible Zellschädigungen durch eine entzündliche Immunreaktion zu unterdrücken [85, 86].

Mikrogliazellen – die Makrophagen des zentralen Nervensystems

Trotz zellulärer- und immunologischer Barrieren besitzt das Auge Mechanismen, um sich vor eindringenden Mikroorganismen zu schützen und apoptotisches Zellmaterial zu beseitigen. Dabei wird die Immunregulation und zelluläre Homöostase mittels aktiver Synthese von Komplement durch Zellen des ZNS, sowie Mikrogliazellen aufrechterhalten. Beide Faktoren sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems, wobei Mikrogliazellen ausschließlich im ZNS vorkommen [87]. Mikrogliazellen sind für die Beseitigung von apoptotischem und nekrotischem Zellmaterial entscheidend, aber darüber hinaus noch an einer Vielzahl weiterer neuronaler Prozesse beteiligt [88]. Im adulten Nervensystem befinden sich Mikrogliazellen meist im ruhenden Zustand und können durch Ereignisse wie Zellschädigungen, Infektionen, aber auch Entzündungsreaktionen aktiviert werden. Dabei verändern aktivierte Mikrogliazellen ihre Form zu einem amöboiden, Makrophagen ähnlichen Phänotyp und migrieren gezielt zum Ort des Ereignisses [89]. Im Gegensatz zu Makrophagen besitzen sie die Fähigkeit zur Proliferation [90]. Abhängig vom Aktivierungsweg können Mikrogliazellen in M1 und M2 Effektorzellen differenzieren. Während der proinflammatorische M1 Phänotyp durch die Expression von IL-1 β , IL-6, TNF- α sowie der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) charakterisiert ist, übt der M2 Typ eine antiinflammatorische, regenerative Funktion (Arginase 1, TGF- β 1, IL-10) aus und zeigt eine erhöhte Phagozytose-Aktivität [91, 92].

Dass Mikrogliazellen in retinale Prozesse involviert sind, wurde durch Studien mit Mäusen belegt. So führte die lichtinduzierte Schädigung von Photorezeptoren in der Maus zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen, welche die geschädigten Zellen phagozytierten [93]. Zudem zeigten Mikrogliazellen eine Anhäufung intrazellulärer Lipofuszin-Vesikel in 18 Monate alten Mäusen. Vermutlich wandern Mikrogliazellen in den Bereich des RPE ein und helfen bei der Beseitigung von Abbauprodukten, welche durch altersbedingte Veränderungen innerhalb des RPE akkumulieren [94].

1.3.3 Pathologie der AMD

Die Ausprägung einer altersabhängigen Makuladegeneration wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen genetische Dispositionen sowie altersbedingte Veränderungen der Retina aber auch individuelle Umwelteinflüsse, wie Rauchen und Ernährung [54]. Das Frühstadium der AMD verläuft asymptomatisch und ist mit einer zunehmenden Pigmentstörung der Retina sowie dem gehäuften Auftreten von Drusen assoziiert [95]. Drusen bestehen aus intra- sowie extrazellulärem Material und sind auf eine Funktionsstörung in der

Retina zurückzuführen. Der ineffiziente Abtransport von Photorezeptorsegmenten durch das RPE führt zu einer Anreicherung von Lipid- und Proteinaggregaten [96]. In AMD Patienten werden diese, auch als Lipofuszin bezeichneten Aggregate, über ihre charakteristische Autofluoreszenz in Augenhintergrunduntersuchungen sichtbar gemacht. Die hohe Anreicherung von intrazellulären Lipofuszin-Vesikeln innerhalb der RPE Zellen führt zu einer basalen Exozytose der Aggregate. Die über Jahre fortlaufende Sekretion von Lipofuszin-Aggregaten hat die Ausbildung von Drusen zwischen retinalem Pigmentepithel und Bruch'scher Membran zur Folge [69].

Zu Beginn einer AMD variieren Drusen stark in Form und Größe. Im weiteren Verlauf ist das Auftreten von großen, weichen Drusen vor allem im Bereich der Makula symptomatisch. Die kontinuierliche Akkumulation zwischen dem RPE und der BM führt zur Ausbildung einer Barriere, welche den Nährstofftransport und die Sauerstoffversorgung zwischen Choroidea und Photorezeptoren stark behindert [72]. Zudem kann eine altersbedingte Verdickung der BM diesen Prozess weiter verschlechtern [74]. Die mangelhafte Versorgung hat ein Absterben der Photorezeptoren zur Folge. Der Verlust der Sinneszellen ist irreversibel, da ausdifferenzierte Photorezeptorzellen über kein Regenerationspotential verfügen. Der Verlust der Photorezeptoren resultiert in einer zunehmenden Einschränkung des zentralen Sehvermögens und kann eine nahezu vollständige Erblindung verursachen [97].

Das fortgeschrittene Stadium der AMD wird in die geographische Atrophie und die neovaskuläre AMD differenziert. Beide Formen können sich einzeln entwickeln, sind aber auch oft gleichzeitig im Patienten anzutreffen.

Geographische Atrophie

Diese Spätform der AMD ist mit der Ausbildung sehr großer Drusen assoziiert. Die Zunahme der Drusengröße verursacht ein Ablösen retinaler Pigmentepithelzellen sowie eine verstärkte Unterversorgung der übergeordneten Sinneszellen. Die charakteristische Entwicklung von atrophischen Regionen hat ein großflächiges Absterben der Photorezeptoren zur Folge. Mit zunehmendem Alter vergrößern sich diese atrophischen Bereiche, wobei sie sich nicht auf die Makula beschränken. ~90 % aller AMD Patienten sind von dieser Spätform betroffen, allerdings führt es bei nur 10 % der Betroffenen zu einer vollständigen Erblindung [98, 99].

Choroidale Neovaskulation

Das Einwachsen neuer Blutgefäße kennzeichnet die Entwicklung der neovaskulären AMD und manifestiert sich in ~10 % der AMD Patienten. Die Neubildung von Blutgefäßen ist die direkte Folge einer unzureichenden Sauerstoffversorgung der Retina. Photorezeptoren und RPE der betroffenen Bereiche reagieren dabei auf den Sauerstoffmangel mit einer Überexpression an VEGF (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor). Die choroidalen Endothelzellen der Blutgefäße werden durch VEGF zu einer erhöhten Proliferation angeregt. Die neu gebildeten Blutgefäße durchbrechen die Bruch'sche Membran und setzen ihr Wachstum unterhalb des RPEs fort. Dabei führt die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwände zu einem permanenten Austreten von Gewebsflüssigkeit und Blut, was ein Ablösen des RPE bewirkt. Die Dysfunktion des RPE führt zu einer Mangelversorgung und Schädigung der Photorezeptoren, was in eine schnell voranschreitende Verschlechterung der Sehfähigkeit mündet und innerhalb von wenigen Monaten zur Erblindung führen kann [79-81].



Abbildung 3: Die Spätformen der AMD

A) Aufnahme der Retina eines gesunden Menschen. Klinisch wird die Makula als ein flächiger Bereich mit einem Durchmesser von ca. 4 mm definiert (äußerer Kreis), dessen Mittelpunkt die Fovea centralis (innerer Kreis) beinhaltet. An die Makula angrenzend bündeln sich die Dendriten der retinalen Ganglienzellen und bilden den Nervus opticus, welcher in den visuellen Kortex innerviert.

B) Bei einer AMD mit geographischer Atrophie bilden sich großflächige Drusen aus und führen zu atrophischen Regionen in der Makula. Die Unterversorgung der betroffenen Bereiche verursacht ein Absterben der Photorezeptoren und des RPEs.

C) Die neovaskuläre AMD ist durch das Einwachsen neuer Blutgefäße unterhalb des RPE gekennzeichnet. Die hohe Durchlässigkeit der neugebildeten Kapillaren führt zu einem permanenten Austreten von Gewebsflüssigkeit und Blut in den subretinalen Raum. Die zunehmende Flüssigkeitsansammlung verursacht dabei das rapide Ablösen des RPEs und die Degeneration der Retina.

Quellen:

Coleman HR, et al., *Age-related macular degeneration*. Lancet. 2008, 372 (9652): 1835-45
 Stuart L. Fine, et al., *Age-related macular degeneration*. N Engl J Med. 2010 Jan 28;342(7):483-92

Risikofaktoren

AMD ist sowohl mit einem breiten Spektrum an genetischen Dispositionen als auch einer großen Zahl an nicht genetischer Faktoren assoziiert. So können das Alter und der Konsum von Zigaretten sowie von bestimmten Nahrungsmitteln einen erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausüben [54]. Der gewichtigste Risikofaktor stellt jedoch eine genetisch positive Familienanamnese dar. So zeigten Familien- und Zwillingsstudien, dass Personen ein 2-fach höheres Erkrankungsrisiko für eine frühe AMD, sowie ein über 4-fach erhöhtes Risiko für eine späte Form der AMD aufweisen, wenn bereits ein Verwandter ersten Grades an einer der Spätformen der AMD erkrankte [100].

Der Zusammenhang zwischen vererblichen Risikofaktoren und der altersabhängigen Makuladegeneration wurde im Jahr 2005 durch mehrere genetische Kopplungsanalysen gezeigt. Erstmals wurden Polymorphismen in *CFH* im Chromosomenabschnitt 1q32 sowie in den Genen *ARMS2/HTRA1* (**Age-Related Maculopathy Susceptibility 2 / High-Temperature Requirement Factor A1**) im Chromosomenabschnitt 10q26 als Risikofaktoren für eine AMD identifiziert [101-104]. Zudem ermittelten genomweite Assoziationsstudien weitere genetische Polymorphismen im Komplementsystem, welche die Ausprägung und den Verlauf der AMD beeinflussen [105, 106]. Um die Identifikation neuer genetischer Risikovarianten zu beschleunigen, wurden die Datensätze von 18 Forschergruppen, welche im Jahr 2010 das „AMD Gen Konsortium“ gründeten, in einer Metastudie zusammengefasst und 2013 veröffentlicht. Mit Hilfe der Datensätze von über 17100 Patienten mit einer AMD Spätform sowie mehr als 60000 gesunden Kontrollen, wurden in 19 chromosomalen Regionen AMD assoziierte Genvarianten ermittelt. Der chromosomale Locus 10q26 korrelierte am stärksten mit der AMD-Erkrankung. Zudem zeigte die Studie, dass Genmutationen des Komplementsystems signifikant zum Erkrankungsrisiko beitragen. Neben *CFI*, *CFB*, *C2* sowie *C3*, ist *CFH* der größte Risikofaktor aller Komplementgene für die AMD. Zusätzlich zum Komplementsystem wurden noch weitere Genvariationen anderer Signal- und Stoffwechselwege ermittelt, welche zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko beitragen. Zu diesen Risikokandidaten zählen unter anderem Gene des Lipidstoffwechsel (*APOE*, *ABCA1*, *LIPC*, *CETP*) und der Extrazellulären Matrix (*TIMP3*, *COL8A1*, *FRK/COL10A1*) [107].

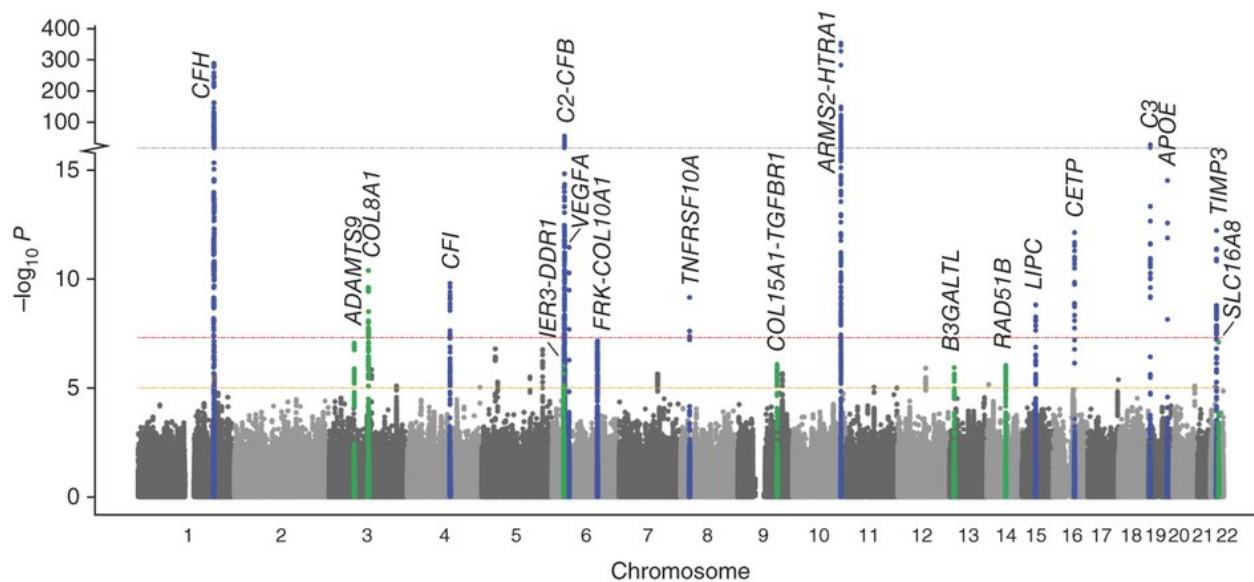


Abbildung 4: Überblick über die AMD assoziierten Gen-Loci innerhalb des humanen Genoms

19 chromosomale Loci wurden als AMD-Risikofaktoren in einer Metaanalyse von 18 genetischen Studien identifiziert. Mutationen im 10q26 Locus mit *ARMS2/HTRA1* zeigten die stärkste Korrelation mit der AMD. Genvariationen in *CFH*, *CFI*, *CFB/C2* sowie *C3*, welche ebenfalls eine hohe Korrelation mit der AMD aufweisen, belegen die Assoziation des Komplementsystems mit dieser Krankheit.

Quelle: Fritsche LG, et al., *Seven new loci associated with age-related macular degeneration*. Nat Genet. 2013, 45 (4): 433-9

1.3.4 Therapiemöglichkeiten

AMD Betroffene entwickeln mit zunehmendem Alter die AMD Spätformen der geographischen Atrophie sowie die Neovaskuläre AMD. Während die Neovaskuläre AMD durch das Verabreichen von α -VEGF monoklonalen Antikörpern sowie mittels Lasertherapie behandelt werden kann, existieren noch keine zuverlässigen Therapien für die Behandlung von geographischen Atrophien [108]. Eine Reihe von vielversprechenden Ansätzen, welche sich noch im experimentellen Stadium befinden, stellen eine Behandlung der geographischen Atrophien in Aussicht. So ist es gelungen den Sehverlust durch Transplantation von fremd- wie auch eigenem Retinagewebe zu kompensieren; mit der Gefahr, dass sich der transplantierte Bereich nach der Operation ablöst. Andere Ansätze basieren auf der Verschiebung der Makula in gesunde Regionen der Retina [55, 109]. Bei der Entwicklung pharmazeutisch wirksamer Stoffe ist das synthetische Peptid Compstatin ein vielversprechender Kandidat. Compstatin besitzt die Fähigkeit durch Bindung von C3b, den Aufbau der C3-Konvertase zu inhibieren. Jedoch sind noch weitere klinische Studien erforderlich [110].

1.3.5 AMD und Komplement

Das Auge zählt zu den immunprivilegierten Organen im menschlichen Körper und besteht aus hochkomplexen Geweben, welche im ausdifferenzierten Zustand die Fähigkeit zur Regeneration verloren haben [111]. Somit sind Zellschädigungen, in Folge von Entzündungsreaktionen oder durch Immuneffektorzellen, irreversibel und verursachen einen Funktionsverlust der betroffenen Gewebe. Um die Strukturen des Auges vor einer ungewünschten Immunreaktion zu schützen, wird der Zutritt von Immunzellen in das Auge durch die Blut-Retina-Schranke unterbunden [83]. Dennoch existieren Mechanismen, welche die Bekämpfung von Mikroorganismen sowie die Beseitigung von apoptotischen Zellmaterial gewährleisten. So sind die Gewebe des Auges, wie das RPE, in der Lage Komplementproteine zu synthetisieren und dadurch eine Opsonisierung von Ablagerungen aber auch Mikroorganismen sicherzustellen [87]. Zum anderen können Mikrogliazellen, das durch Komplement opsonisierte Material schneller aufnehmen und beseitigen [88]. Um körpereigene, intakte Gewebe gegen Komplement, vor allem durch den alternativen Aktivierungsweg zu schützen, exprimieren RPE Zellen membranständige Komplementrezeptoren, wie CD46, CD55 und CD59, aber auch lösliche Regulatoren wie Faktor H [84].

Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Vielzahl physiologischer Veränderungen innerhalb des Pigmentepithels. So führt der ineffektive Metabolismus der RPE Zellen zu einer Ablagerung von unprozessiertem Photorezeptor-Material sowie Proteinaggregaten zwischen der Pigmentepithelschicht und der Bruch'schen Membran, wobei die übermäßige Ausbildung von Drusen die Entwicklung einer frühen AMD begünstigen [69]. Immunhistochemische Untersuchungen und Proteomanalysen von Drusen aus AMD Patienten konnten eine Vielzahl von Komplementproteinen identifizieren. Neben dem Aktivierungsprodukt C3b sowie dessen inaktiver Form iC3b wurden auch Komponenten des TCC sowie die Regulatoren Faktor H, Clusterin aber auch Vitronektin in Drusen nachgewiesen [112-114]. Drusen repräsentieren somit Oberflächen für eine Komplement vermittelte Entzündungsreaktion. Die Komplementaktivierung auf Drusen-Oberflächen führt dabei zur Generierung der Entzündungsmarker C3a sowie C5a, welche Mikrogliazellen anlocken und zur Phagozytose anregen [115, 116]. Vermutlich unterstützt die Opsonisierung des abgelagerten Materials mittels C3b/iC3b die schnellere Phagozytose durch aktivierte Mikrogliazellen [116]. Somit sind das Komplementsystem und aktivierte Mikrogliazellen entscheidende Faktoren, welche die altersbedingte Dysfunktion des RPEs kompensieren und eine Akkumulation von Drusen verhindern.

In AMD Patienten führen das gehäufte Auftreten von Drusen sowie deren kontinuierliche Vergrößerung zu einer Degeneration des darüber liegenden RPEs. Wird das angehäufte,

modifizierte Material nicht effektiv entfernt, verursacht es eine permanente Komplementaktivierung, welche in eine chronische Entzündung mündet und vermutlich das RPE weiter schädigt sowie die Ausbildung von Drusen verstärkt [117, 118]. Untersuchungen von degenerierten ARPE-19 Zellen zeigten zudem eine verminderte Expression der membranständigen Komplementregulatoren CD46, CD55 und CD59 [119]. Damit das RPE dennoch vor einer Komplement vermittelten Entzündungsreaktion geschützt wird, ist die Oberflächen spezifische Schutzfunktion durch Faktor H von großer Bedeutung. Faktor H reguliert dabei auf mehreren Ebenen der Komplementaktivierung. So kann Faktor H abgelagertes C3b direkt binden, aber auch über Heparansulfat auf Zelloberflächen rekrutiert werden [120]. Die Bindung von Faktor H an apoptotische und nekrotische Zellen wird zudem über mCRP vermittelt [121]. Gebundenes C3b wird anschließend durch die Faktor H vermittelte Kofaktor-Aktivität für Faktor I inaktiviert. Weiterhin beschleunigt Faktor H den Zerfall ausgebildeter C3-Konvertasen [120]. Mutationen im *CFH* Gen, welche diese Komplementregulatorischen Funktionen einschränken, hätten somit besonders schwerwiegende Folgen.

Der durch genetische Kopplungsanalysen identifizierte Polymorphismus in *CFH* gehört zu den größten Risikofaktoren der AMD und unterstreicht die große Bedeutung von Faktor H bei der Immunregulation im Auge [101, 102]. Die starke Assoziation ist auf einen SNP an Nukleotidposition 1277 zurückzuführen. Die Mutation verursacht eine Aminosäuresubstitution eines Tyrosins (Y) durch ein Histidin (H) an Position 402 des Faktor H Proteins. Heterozygot betroffene Patienten weisen ein 4,6-fach erhöhtes Risiko und homozygote Träger ein 7,4-fach stärkeres Risiko auf, an einer AMD zu erkranken [122]. Der Y402H Polymorphismus betrifft dabei eine Heparin-Bindedomäne in SCR7 des Proteins und umfasst auch das alternative Spleißprodukt FHL-1, welches die SCRs 1-7 umfasst. In Folge des Aminosäureaustauschs innerhalb der Heparin-Bindedomäne besitzt mutiertes Faktor H eine verringerte Bindungseigenschaft gegenüber Heparansulfat, mCRP sowie oxidierten Lipiden. Die verminderte Rekrutierung durch diese Moleküle führt zu einem ineffektiven Schutz der RPE Zellen, sodass diese einer übermäßigen Komplementaktivierung ausgesetzt sind. Weiterhin ist die regulatorische Funktion auf apoptotischen Zellen eingeschränkt. Die ineffiziente Regulierung der Komplementaktivierung führt zu einer chronischen Inflammation sowie einer fortlaufenden Degeneration des betroffenen retinalen Epithels. Beides sind phänotypische Merkmale der altersabhängigen Makuladegeneration [123, 124].

1.4 Age-Related Maculopathy Susceptibility 2

In genomweiten Kopplungsstudien wurden die chromosomalen Loci 1q32 und 10q26 wiederholt mit der altersabhängigen Makuladegeneration assoziiert [101-104]. Der 10q26 Locus beinhaltet dabei die AMD-Risikokandidaten-Gene *PLEKHA1* (*Pleckstrin Homology Domain-Containing A1*), *ARMS2* (*Age-Related Maculopathy Susceptibility 2*) sowie *HTRA1* (*High-Temperature Requirement Factor A1*). Die Identifikation von AMD assoziierten Genmutationen innerhalb dieses Locus ist bis heute schwierig, da sich die Gene aufgrund ihrer unmittelbaren Nähe zu einander in einem Kopplungs-Ungleichgewicht befinden (Abbildung 5). Kanda et al. versuchten 2007 dieses Kopplungs-Ungleichgewicht mit Hilfe von umfangreichen Fall-Kontroll-Studien aufzulösen, wobei die Gruppe den Polymorphismus rs10490924 im *ARMS2*-Gen als größten AMD-Risikofaktor beschrieb (Abbildung 6) [125-127].

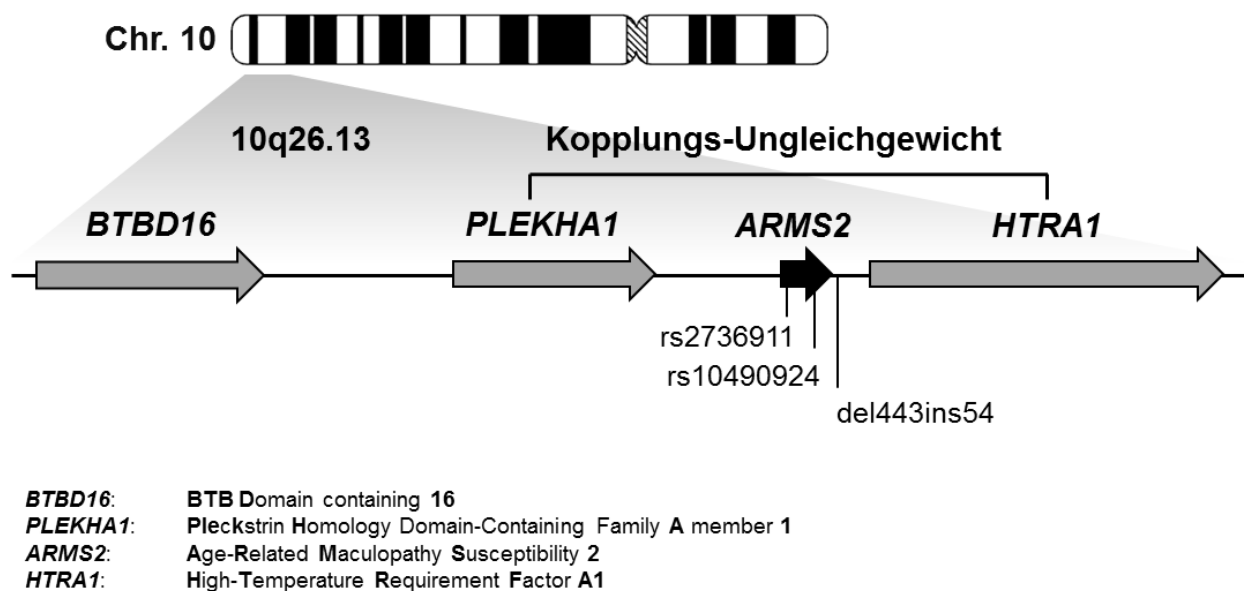


Abbildung 5: AMD assoziierter Genlokus auf Chromosom 10

Der 10q26 Locus umfasst die Gene *PLEKHA1*, *ARMS2* und *HTRA1*. AMD assoziierte Mutationen von *ARMS2* sind an ihren jeweiligen Positionen markiert. Der Polymorphismus rs2736911 beschreibt eine „nonsense“-Mutation, in welcher ein Arginin (Arg, R) durch ein Stopp an Position 38 ersetzt wird. Diese Mutation ist mit einem AMD-Erkrankungsrisiko in der chinesischen Bevölkerung assoziiert. Der Polymorphismus rs10490924 ist durch einen Alanin (Ala, A) – Serin (Ser, S) Aminosäureaustausch an Position 69 charakterisiert. Die InDel-Mutation del443ins54 führt zu einer Deletion in der 3'UTR von *ARMS2*, welche durch AU reiche Elemente ersetzt wird. Beide Mutationen sind miteinander gekoppelt und tragen zum höchsten AMD-Erkrankungsrisiko in der kaukasischen sowie japanischen Bevölkerung bei.

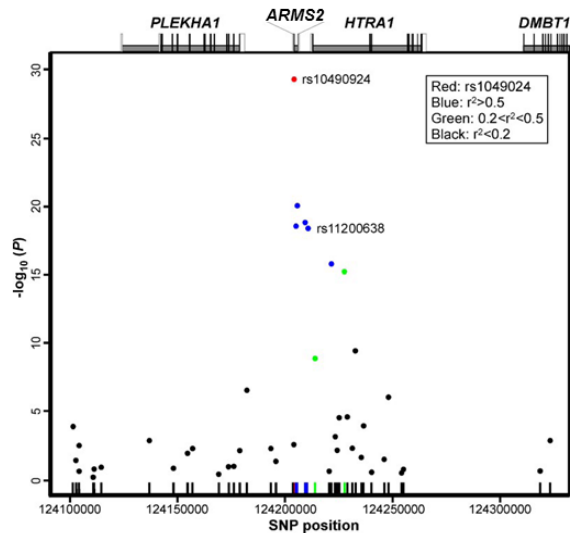


Abbildung 6: AMD assoziierte Mutationen innerhalb des 10q26 Genlokus

Genetische Kopplungsstudie mit 466 AMD Patienten und 280 Kontrollen westeuropäischer Abstammung. Der A69S Polymorphismus (rs10490924) in Exon 1 von *ARMS2* zeigt die stärkste Korrelation mit der AMD.

Quelle: Kanda A, et al., *A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104 (41): 16227-32

Der rs10490924 Polymorphismus führt zu einer Aminosäuresubstitution eines Alanins (Ala, A) durch ein Serin (Ser, S) an Position 69 in Exon 1 von *ARMS2*. Im Jahr 2008 beschrieben Fritsche et al. ein Kopplungsungleichgewicht zwischen diesem Polymorphismus und einer InDel-Mutation (del443ins54) innerhalb der 3'UTR des *ARMS2*-Gens. Die heterozygote Form wies ein 2,9-fach und die homozygote Form ein 8,1-fach erhöhtes AMD Erkrankungsrisiko auf. Weiterhin zeigte die Gruppe, dass homozygote Träger dieser Risikovariante kein *ARMS2* Protein in Plazentagewebe exprimierten (Abbildung 8). Die verminderte Proteinexpression wurde auf eine instabile *ARMS2* mRNA zurückgeführt, wobei die InDel-Mutation zu einem beschleunigten Abbau der mRNA führt [128, 129]. Die InDel-Mutation wurde 2010 durch Wang et al. mit Hilfe von Sequenz-Analysen bestätigt und die Charakterisierung erweitert. Die Gruppe beschrieb zwei InDel-Ereignisse, welche in einem Abstand von 17 bp zu einander liegen. Das erste InDel-Ereignis umfasst eine 9 bp Deletion, die durch ein 10 bp Insert ersetzt wurde. Die zweite 417 bp große Deletion beinhaltet ein 27 bp Insert (Abbildung 7). Die Forscher bestätigten zwar, dass die InDel-Mutationen das AMD-Risiko erhöht, fanden jedoch keine Auswirkung auf die Stabilität der *ARMS2* mRNA [130].

Der rs2736911 Polymorphismus ist eine weitere Mutation im *ARMS2*-Gen, welcher an Aminosäureposition 38 ein Arginin (Arg, R) durch ein Stopp (R38X) ersetzt. Studien zeigten, dass dieser vorzeitige Translations-Stopp eine verringerte Protein-Expression verursacht [129, 131]. Obwohl diese „Nonsense“-Mutation, ähnlich der InDel-Mutation, zu einer geringeren *ARMS2* Expression führt, zeigte der R38X Polymorphismus in mehreren genetischen Studien keine Assoziation mit der AMD [127, 131, 132].

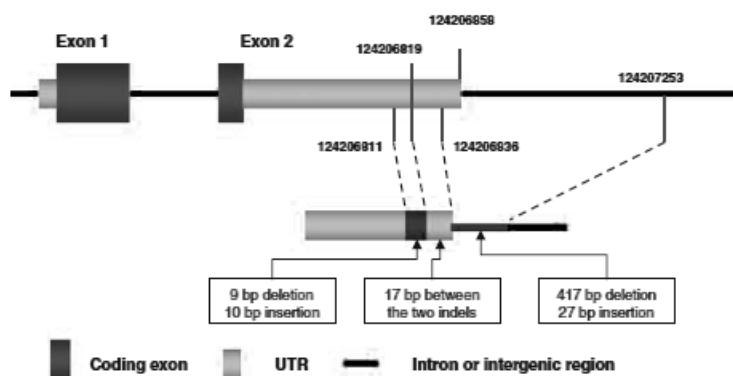


Abbildung 7: InDel-Mutation innerhalb des ARMS2-Gens

Die InDel-Mutation del443ins54 ist am Ende der 3'UTR des ARMS2-Gens lokalisiert. Das erste InDel-Ereignis umfasst eine 9 bp Deletion sowie ein 10 bp Insert. Die zweite 417 bp große Deletion beinhaltet ein 27 bp Insert. Die InDel-Mutation verursacht einen beschleunigten Abbau der ARMS2 mRNA.

Quelle: Wang G, et al., *Analysis of the indel at the ARMS2 3'UTR in age-related macular degeneration*. Hum Genet. 2010, 127 (5): 595-602

Allerdings konnten Liang et al. für dieselben R38X-, A69S- sowie InDel-Mutationen eine signifikante AMD-Assoziation in Han Chinesen beobachten [133]. 2013 fassten Yu et al. 20 Datensätzen von beschriebenen AMD Kohorten in einer Metaanalyse zusammen. Dabei zeigte sich, dass der R38X-Polymorphismus mit einem erhöhten AMD Risiko in der chinesischen Bevölkerung assoziiert ist, jedoch nicht in der kaukasischen oder japanischen Population. Im Gegensatz dazu sind der A69S-Polymorphismus sowie die InDel-Mutation mit einem erhöhten AMD Risiko ausschließlich in der kaukasischen und japanischen Bevölkerung assoziiert [134]. Die bislang publizierten genetischen Studien bestätigen die Relevanz der A69S- und InDel-Mutationen, sind aber widersprüchlich hinsichtlich der R38X-Mutation.

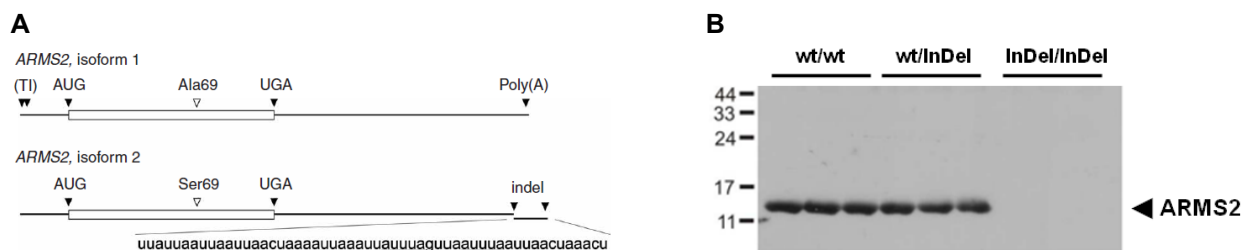


Abbildung 8: InDel-Mutation innerhalb der mRNA von ARMS2

A) ARMS2 Isoform 1 (wt) zeigt das protektive mRNA Transkript mit der Aminosäure Alanin an Position 69 im Exon 1 (Ala69). In der ARMS2 Isoform 2 (InDel) kommt es aufgrund einer Aminosäuresubstitution zu einem Austausch des Alanins durch ein Serin (Ser69). Zusätzlich ist eine InDel-Mutation am Ende der 3'UTR des Transkripts lokalisiert. Die Insert-Sequenz beinhaltet zwei AUUUA Elemente. **B)** Immunologischer Nachweis der ARMS2 Proteinexpression in Plazentagewebe. Homozygote Träger (wt/wt) des ARMS2-Wildtyps als auch heterozygote (wt/InDel) Träger der ARMS2-Risikovariante exprimieren das ARMS2 Protein. Individuen, homozygot für die ARMS2-Risikovariante (InDel/InDel) zeigen keine nachweisbare ARMS2 Proteinexpression.

Quelle: Fritsche LG, et al., *Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA*. Nat Genet. 2008, 40 (7): 892-6

Das *ARMS2*-Gen erscheint erstmals mit der Abspaltung der höheren Primaten vor ca. 65 Mio. Jahren. Das Exon 1 und 2 umfassende *ARMS2*-Gen entstand jedoch erst mit der Abspaltung der Neuweltaffen vor ca. 40 bis 50 Millionen Jahren. Darüber hinaus weist das *ARMS2*-Gen keine Homologien zu Genomsequenzen anderer Tiere auf. Genetische Untersuchungen in Rhesusaffen zeigten, dass der 10q26 Locus auch in dieser Spezies ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung eines AMD ähnlichen Phänotyps darstellt. Hierfür sind jedoch andere Polymorphismen (rs124204321 / rs124210709) verantwortlich als im humanen *ARMS2* Gen [135, 136].

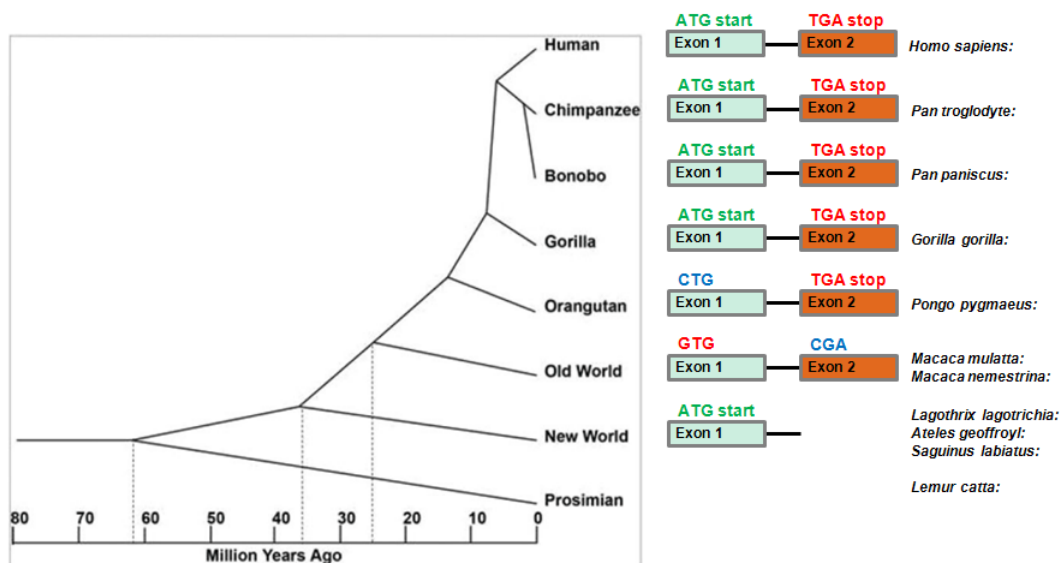


Abbildung 9: Entwicklung von *ARMS2* innerhalb der Primaten

Das *ARMS2*-Gen tritt erstmals vor ca. 65 Mio. Jahren mit der Abspaltung der höheren Primaten in Erscheinung, während das Exon 1 und 2 umfassende *ARMS2*-Gen erst mit der Abspaltung der Neuweltaffen auftritt.

Quelle: Francis PJ, et al., *Rhesus monkeys and humans share common susceptibility genes for age-related macular disease*. Hum Mol Genet. 2008, 17 (17): 2673-80

Die Expression von *ARMS2* wurde bisher wiederholt in der Retina und Plazenta nachgewiesen, welche beide interessanterweise immunprivilegierte Räume im Menschen sind [125, 128, 129, 131]. Immunhistochemische Untersuchungen über die intra- sowie extrazelluläre Lokalisation des *ARMS2* Proteins sind jedoch bisher sehr inkonsistent und Gegenstand aktueller Forschung [128, 137, 138]. Zudem ist die Funktion von *ARMS2* größtenteils unbekannt. Kortvely et al. fanden mittels Yeast-Two-Hybrid-Screenings Hinweise auf eine Interaktion zwischen *ARMS2* und Fibulin, einem Protein der Extrazellulären Matrix.

Zudem demonstrierte die Gruppe *in vitro* eine Sezernierung von rekombinatem ARMS2. Da ARMS2 kein Signalpeptid für eine klassische Sekretion besitzt, wird ein alternativer Transport von ARMS2 in das Endoplasmatische Retikulum angenommen [138].

Die bisherigen Daten lassen deshalb vermuten, dass ARMS2 von Zellen in der Retina exprimiert als auch sezerniert wird, mit Molekülen der extrazelluläre Matrix interagiert und dadurch eine Funktion auf Oberflächenstrukturen ausübt. Mutationen innerhalb des *ARMS2*-Gens, welche zu einer verringerten *ARMS2* Expression führen, könnten somit zu einem Verlust der *ARMS2* Funktion auf diesen Oberflächen führen.

2 Fragestellung

Die Altersabhängige Makuladegeneration ist eine häufig auftretende multifaktorielle Erblindungserkrankung im höheren Lebensalter. Genvarianten verschiedener Signal- sowie Stoffwechselwege erhöhen das Risiko eine AMD zu entwickeln. Viele genetische Studien belegen vor allem eine Assoziation des Komplementsystems mit der AMD, insbesondere durch den Polymorphismus rs1061170 im *CFH*-Gen, der den zweitgrößten Risikofaktor für eine AMD-Entwicklung darstellt. Während die Forschung der letzten Jahre zu einem besseren Verständnis der Funktion des Regulators Faktor H sowie der Rolle des Komplementsystems in der AMD beitrug, ist der Einfluss eines zweiten Risiko-Gens im Chromosomenabschnitt 10q26, welches noch stärker mit der AMD assoziiert ist, zurzeit unbekannt. Diese Tatsache ist auf die weitgehend unbekannt Funktion dieses Risiko-Gens, welches als "*Age-Related Maculopathy Susceptibility 2*" (*ARMS2*) benannt wurde, zurück zu führen. Mutationen innerhalb des *ARMS2*-Gens umfassen dabei den Polymorphismus rs2736911, welcher zu einem vorzeitigen Translations-Stopp an Aminosäureposition 38 führt und mit einem erhöhten AMD-Risiko in der chinesischen Bevölkerung assoziiert wurde. Weiterhin führt der Polymorphismus rs10490924 zu einem Austausch eines Alanins durch ein Serin an Aminosäureposition 69 und ist mit einer InDel-Mutation in der 3' UTR gekoppelt, welche zur Instabilität des *ARMS2*-Transkriptes führt. Der rs10490924 Polymorphismus ist mit einem deutlich erhöhten Erkrankungsrisiko in der kaukasischen und japanischen Bevölkerung assoziiert.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion von *ARMS2* zu identifizieren. Da die AMD eine Komplement assoziierte Erkrankung ist, wird eine Rolle von *ARMS2* im Komplementsystem vermutet. Um diese Hypothese zu überprüfen soll *ARMS2* rekombinant hergestellt, auf eine Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix von Zellen untersucht, sowie ein Einfluss auf die Komplementaktivierung getestet werden. Zudem soll über die Interaktion mit Komponenten des Komplementsystems der genaue Wirkmechanismus von *ARMS2* aufgeklärt werden. Weiterhin ist es von großem Interesse herauszufinden, ob *ARMS2* in Immunzellen exprimiert wird.

Die Ergebnisse sollen helfen, aufzuklären, inwiefern eine *ARMS2* Defizienz zur Entwicklung einer AMD beiträgt. Weiterhin wird von den Ergebnissen ein besseres Verständnis der Rolle von Komplement in der AMD erwartet, um neue Komplement basierte Therapien zu entwickeln.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, in der besten verfügbaren Qualität von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. In der Zellkultur wurden RPMI 1640, DMEM, DMEM-F12, DPBS, L-Glutamin von Lonza (Verviers, Belgien) sowie Accutase von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) und Fetal Bovine Serum von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) verwendet.

3.1.2 Seren und Zellen

Normales humanes Serum (NHS) wurde von gesunden Spendern gewonnen und gepoolt. Faktor P depletiertes Serum (FP Δ HS) wurde von Complement Technology (Tyler, USA) bezogen. Alle Seren lagerten bis zur Verwendung bei -80 °C. Die Herstellung von Komplement inaktiviertem Serum (hiHS) erfolgte durch Inkubation bei 56 °C für 30 min.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3 gelistet und wurden von ATCC (Vanassas, USA) erworben sowie nach Herstellerangaben kultiviert. Für Bindungsstudien verwendete Schaf- und Kaninchen Erythrozyten stammten von Fiebig-Nährstofftechnik (Idstein, Deutschland). Die Isolation von humanen Erythrozyten, T-Zellen als auch Monozyten erfolgte aus Blutproben gesunder Spender (Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Jena). Aus Stammzellen differenzierte Mikrogliazellen wurden von Prof. Thomas Langmann (Institut für Experimentelle Immunologie des Auges, Uniklinik Köln) bereitgestellt. Für die Differenzierung von humanen Mikrogliazellen wurden Fibroblasten aus der Haut isoliert und reprogrammiert (Beutner, 2010; Roy, 2011). Der Mikroglia-Phänotyp wurde auf die Expression der Markerproteine CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD32, CD36, CD45, CD206, CX3CR1 und TREM2 im Durchflusszytometer untersucht. Humane, native RPE Zellen wurden von Innoprot (Derio - Bizkaia, Spanien) bezogen. Für die Kultivierung von nativen RPE Zellen wurde das Epithelial Cell Medium Kit (Innoprot) verwendet.

3.1.3 Antikörper und Antiseren

In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper und Antiseren sind in Tabelle 4 aufgeführt. Der immunologische Nachweis von immobilisierten Proteinen auf Zellulose-Membranen oder im ELISA erfolgte durch HRP gekoppelte Sekundärantikörper der Firma Dako Denmark (Glostrup, Dänemark). Für die durchflusszytometrischen Analysen und konfokaler Laserscanning Mikroskopie wurden Fluoreszenz gekoppelte Antikörper von Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Mit Hilfe von rekombinantem ARMS2 wurde ein spezifisches Antiserum generiert. Die Immunisierung eines Kaninchens sowie die Gewinnung des ARMS2 Antiserum erfolgte durch die Firma Davids Biotechnologie (Regensburg, Deutschland). Die Aufreinigung der Antikörper aus dem Serum erfolgte über eine Affinitätschromatographie nach Herstellerangaben. Hierfür wurde eine HiTrap Protein A HP 1 ml Säule (GE Healthcare, Freiburg Deutschland) und das Äkta FPLC System (GE Healthcare) genutzt. Wenn nicht explizit anders erwähnt, wurde dieser Kaninchen α -ARMS2 polyklonale Antikörper zur Detektion von ARMS2 verwendet.

3.1.4 Aufgereinigte und rekombinante Proteine

In Bindungsstudien verwendete Plasmaproteine: Faktor H, Properdin, C3, C3b, C3d, C3c, iC3b und Faktor B wurden von Complement Technology (Tyler, USA) bezogen. Humanes Serum Albumin (HSA) wurde von Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland, USA) und Bovine Serum Albumin (BSA) von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Eingesetztes rekombinantes Vitronektin wurde von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland) hergestellt.

3.1.5 Verwendete Stämme

Escherichia coli:

Der Bakterienstamm DH5 α (Life Technologies GmbH, Darmstadt Deutschland) wurde für die Vermehrung von Plasmiden eingesetzt.

Pichia pastoris:

Der Hefestamm X33 (Life Technologies GmbH) diente der Klonierung sowie Protein Expression.

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	ATCC No.	Spezies	Zelltyp
THP-1	TIB-202	Human	Monozyten
ARPE-19	CRL-2302	Human	Retinale Pigmentepithelzellen
CHO-K1	CCL-61	Hamster	Eierstockzellen
pgsA-745	CRL-2242	Hamster	Eierstockzellen
pgsD-677	CRL-2244	Hamster	Eierstockzellen
RAW 264.7	TIB-71	Maus	Monozyten

Tabelle 4: Verwendete primäre Antikörper und Antiseren

Name	Spezifität	Firma (Standort)
Kaninchen ARMS2 Antiserum	ARMS2 n-terminal, polyklonal	CovaLab (Cambridge, Großbritannien)
Kaninchen Vitronektin Antiserum	Vitronectin, polyklonal	Complement Technology (Tyler, USA)
Ziege Properdin Antiserum	Properdin, polyklonal	Complement Technology (Tyler, USA)
Maus α -penta-His Antikörper	His-tag, monoklonal	QiaGen (Hilden, Deutschland)
Maus α -C3b Antikörper	C3b, monoklonal	Fitzgerald Industries (Acton, USA)
Maus α -C3d Antikörper	C3d, monoklonal	CalBioChem (Darmstadt, Deutschland)
Maus α -Properdin Antikörper	Properdin, monoklonal	CalBioChem (Darmstadt, Deutschland)
Ziege Faktor H Antiserum	Faktor H, polyklonal	Complement Technology (Tyler, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Zellen wurden in LB Medium (1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl) oder LB Agar (LB Medium, 1,5 % (w/v) Agar) bei 37 °C kultiviert.

3.2.2 Kultivierung von *Pichia pastoris*

Pichia pastoris wurde in YPD Medium (2 % (w/v) Glucose, 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt) oder YPD Agar (YPD Medium, 1,5 % (w/v) Agar) bei 30 °C kultiviert. Für Übernachtskulturen wurde BMGY Medium (1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 1 % (v/v) Glycerin, 1,34 % (w/v) YNB, 100 mM K₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄, 0,4 µg/ml Biotin) sowie für die Expression von rekombinanten ARMS2 BMMY Medium (1% (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Pepton, 2 % (v/v) Methanol, 1,34 % (w/v) YNB, 100 mM K₂HPO₄, 100 mM KH₂PO₄, 0,4 µg/ml Biotin) verwendet.

3.2.3 Klonierung von *ARMS2*

Für die Klonierung wurde ein Codon optimiertes *ARMS2* DNA Konstrukt (Life Technologies GmbH, Darmstadt Deutschland) in den pMKT Vektor ligiert. Das Insert beinhaltete neben der *ARMS2* kodierenden DNA Sequenz, eine Enterokinase-Schnittstelle sowie Schnittsequenzen für die Restriktionsendonukleasen EcoRI (5' Ende) und XbaI (3' Ende). Der pMKT-*ARMS2* Vektor wurde zunächst für die Transformation (Kapitel 3.2.5) von chemisch-kompetenten *E. coli* Zellen (Kapitel 3.2.4) eingesetzt. Das Antibiotikaresistenzgen ermöglichte die Selektion von positiven Transformanten gegen 100 µg/ml Kanamycin (Roth, Darmstadt Deutschland). Für die Klonierung von *ARMS2* in den Expressionsvektor pPICZB wurde das pMKT-*ARMS2* Plasmid mittels HiSpeed Plasmid Maxi Kit (QiaGen, Hilden Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt und beide Vektoren durch die Endonukleasen EcoRI und XbaI (New England Biolabs, Frankfurt Deutschland) verdaut. Die geschnittenen Produkte wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Freiburg Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Ligation des *ARMS2* Insert in den pPICZB Expressionsvektor erfolgte unter Verwendung des Quick Ligation Kit (New England Biolabs) nach Herstellerangaben. Der Ligationsansatz wurde direkt in

chemisch-kompetente *E. coli* Zellen transformiert (Kapitel 3.2.5) und positive Transformanten gegen 50 µg/ml Zeocin (Life Technologies GmbH, Darmstadt Deutschland) selektioniert. Anschließend wurde das pPICZB-ARMS2 Plasmid, wie beschrieben, isoliert und die Ligation durch eine Sequenzierung mit den Sequenzierprimern 5' AOX1 (5'-GACTGGTTCCA ATTGACAAGC-3') und 3' AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') überprüft (Kapitel 3.2.9). Für die rekombinante Integration von ARMS2 in das *Pichia pastoris* Genom wurde der pPICZB-ARMS2 Expressionsvektor mit der Endonuklease SacI (New England Biolabs) verdaut und über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Extraktion des linearisierten pPICZB-ARMS2 Vektors aus dem Gel erfolgte die Transformation von chemisch-kompetenten *Pichia pastoris* Zellen mit dem Vektor unter Verwendung des Pichia EasyComp Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt Deutschland) nach Herstellerangaben. Transformierte Zellen wuchsen auf einer YPD Agar Platte versetzt mit 100 µg/ml Zeocin. Die rekombinante Integration von ARMS2 in das Genom von *Pichia pastoris* wurde über eine Testexpression ermittelt (Kapitel 3.2.10).

3.2.4 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Eine *E. coli* Bakterienkultur wurde in 200 ml LB Medium bei 37 °C, 180 rpm im Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific Co. Inc, Edison USA) inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von ~0,6 wurde die Kultur auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (3300 x g, 10 min, 4 °C) und das Zellpellet in 100 ml Lösung 1 (100 mM MgCl₂, 5 mM TRIS, 4 °C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (3300 x g, 10 min, 4 °C) wurden die Zellen wieder in Lösung 1 aufgenommen und 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (3300 x g, 10 min, 4 °C) erfolgte die Resuspension der Zellen in 2 ml Lösung 2 (100 mM CaCl₂, 5 mM TRIS, 15 % (w/v) Glycerin, 4 °C). Aliquotierte kompetente Zellen wurden bei -80°C gelagert.

3.2.5 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen mit Plasmid DNA

Chemisch-kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Plasmid DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 37 °C für 2 min erwärmt, erneut auf Eis abgekühlt und in 950 µl LB Medium (37 °C) aufgenommen. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die Zellen auf LB Agar Platten ausgestrichen und kultiviert. Positive Transformanten wurden durch den Einsatz von plasmidspezifischen Antibiotika selektioniert.

3.2.6 Kryokonservierung von *E. coli* und *Pichia pastoris* Kulturen

Für die Langzeitlagerung von transformierten als auch nicht transformierten *E. coli* sowie *Pichia pastoris* Zellen wurden kryokonservierungsfähige Kulturen hergestellt. Hierfür wurden 750 µl einer Übernachtskultur mit 250 µl einer 87 % Glycerinlösung vermischt und bei -80 °C gelagert.

3.2.7 Verdau von Plasmid DNA

Für den Verdau von Plasmid DNA wurden Enzyme, Puffer sowie BSA von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Für die Klonierung des *ARMS2* Inserts wurden die Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI genutzt. Die Linearisierung des PICZB-*ARMS2* Vektors erfolgte mit Hilfe der Endonuklease SacI.

3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA und PCR Produkte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 1 % (w/v) Agarose in TAE Puffer (40 mM TRIS, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) unter Wärmezufuhr gelöst. Der Ansatz wurde in einen Gelschlitten (Bio-Rad GmbH, München Deutschland) gegossen und mit 0,05 % (v/v) SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies GmbH, Darmstadt Deutschland) versetzt. DNA Proben wurden nach Zugabe von Ladepuffer (50 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Bromphenolblau, pH 8,0) aufgetragen und in einer Wide Mini-Sub® cell GT (Bio-Rad GmbH, München Deutschland) Gelelektrophoresekammer bei 110 bis 200 mA mit TAE Laufpuffer aufgetrennt. Die Migration der DNA im Gel wurde mit Hilfe des Bio Imaging Systems, GENE Genius (Merck, Darmstadt Deutschland) analysiert.

3.2.9 Sequenzierung

PCR Produkte als auch Plasmid DNA wurden nach der Didesoxymethode nach Sanger et al. (1977) mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) sequenziert. Für die Sequenzierreaktionen wurde das Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte im ABI PRISM® 3130x Genetic Analyzer (Life Technologies GmbH) und die erhaltenen Sequenzen wurden mittels CloneManager Software analysiert.

3.2.10 ARMS2 Testexpression

Die Expression von rekombinanten ARMS2 in *Pichia pastoris* wurde in einer Testexpression untersucht. Hierfür wurden selektionierte *Pichia pastoris* Zellen in 10 ml BMGY Medium bei 30 °C, 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 2 bis 6 wurden die Kulturen bei 3000 x g für 10 min zentrifugiert, das Zellpellet in 25 ml BMMY Medium aufgenommen und erneut bei 30 °C, 180 rpm inkubiert. Für die kontinuierliche Expression wurde dem Medium 2 % (v/v) Methanol in einem Anstand von 24 h zugegeben. Nach 72 h wurden Proben entnommen, mit 4x RotiLoad 1 versetzt und bei 95 °C für 10 min verkocht. Das Zell-Lysat wurde mittels SDS PAGE (Kapitel 3.2.14) aufgetrennt, im Western Blot Verfahren auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert (Kapitel 3.2.15) und rekombinantes ARMS2 mit einem Maus α -penta-His Antikörper nachgewiesen.

3.2.11 ARMS2 Expression

Eine transformierte *Pichia pastoris* Kultur wurde in 800 ml BMGY Medium aufgenommen, auf vier 500 ml Rundkolben verteilt und bei 30 °C, 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 6 wurde die Vorkultur bei 3000 x g für 10 min zentrifugiert, in 4800 ml BMMY Medium resuspendiert sowie auf 16 1 L Schikanekolben verteilt. Während der Inkubation bei 30 °C, 180 rpm erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 2 % (v/v) Methanol im Abstand von 24 h. Nach 3 Tagen wurden die Zellen bei 3000 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C gelagert.

3.2.12 Zellaufschluss von *Pichia pastoris*

Das Pellet der Expressionskultur wurde in Puffer A1 (10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Imidazol, 1 M NaCl, 2 % (v/v) Nonidet P-40, 20 % (v/v) Glycerin; pH 7,0) resuspendiert und mit Glasbeads (\varnothing 0,25 – 0,5 mm) versetzt. Die Inhibition der Proteasen erfolgte durch Zugabe von complete EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Deutschland) Proteaseinhibitor. Benzonase (Merck, Darmstadt Deutschland) gewährleistete den Verdau von DNA. Der Zellaufschluss erfolgte in der FastPrep[®]-24 (MP Biomedicals, Heidelberg Deutschland) bei 4 m/s für 60 Sekunden. Das erhaltene Lysat wurde anschließend bei 5000 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein 50 ml Oak Ridge Centrifuge Tubes (Nalge Company, Rochester USA) überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 20000 x g, 4 °C für 1 h, wurde das

Proteinextrakt mittels 22 µm Whatman Filtermembran (GE Healthcare, Freiburg Deutschland) filtriert und für eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Kapitel 3.2.13) verwendet.

3.2.13 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Rekombinantes ARMS2 wurde über das Äkta FPLC System (GE Healthcare, Freiburg Deutschland) unter Verwendung von HisTrap™ HP Säulen (GE Healthcare) bei 4 °C aufgereinigt. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 5 Säulenvolumen (SV) Puffer A1 wurde das ARMS2-Proteinextrakt (Kapitel 3.2.12) geladen und die Säule anschließend mit Puffer A1 gespült. Nach einem weiteren Waschschrift mit 20 % (v/v) Puffer B1 (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 500 mM Imidazol, 1 M NaCl, 2 % (v/v) Nonidet P-40, 20 % (v/v) Glycerin; pH 7,0), wurden die Puffer A1 sowie B1 durch die Puffer A2 (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl; pH 7,0) und B2 (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl; pH 7,0) ausgetauscht. Im Anschluss erfolgte ein zusätzlicher Waschschrift mit 5 SV Puffer A2 sowie mit 20 % (v/v) Puffer B2. Immobilisiertes ARMS2 Protein wurde durch 100 % (v/v) Puffer B2 von der Säule eluiert und fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt sowie durch Silberfärbung auf Reinheit als auch Proteingehalt überprüft. ARMS2 Proteinfractionen wurden über Centricon Plus-20 Konzentratoren (Millipore, Dundee Großbritannien) eingeeengt und in einem Phosphatpuffer (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl; pH 7,0) umgepuffert. Die Proteinkonzentration wurde mittels NanoDrop ND 1000 (PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen Deutschland) und BCA ELISA Kit (Fisher Scientific GmbH, Schwerte Deutschland) nach Herstellerangaben bestimmt.

3.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mit Hilfe des diskontinuierlichen Gelelektrophorese-Verfahrens unter reduzierenden sowie nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Homogene Polyacrylamid-Gele, welche sich aus einem 4 % Sammelgel und einem 10 bis 15 % Trenngel zusammensetzten (Tabelle 5) wurden im Gelgießsystem MiniProtean® III (Bio-Rad, München Deutschland) hergestellt. Für die Gelelektrophorese wurden die Proben, wenn nicht anders erwähnt, mit einem 2x reduzierenden Probenpuffer (50 mM TRIS-HCL, 1,6 % (w/v) SDS, 7 % (v/v) Glycerin, 8 M Harnstoff, 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,016 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8) 1:2 verdünnt und 10 min bei 80 °C erhitzt. Die SDS-PAGE erfolgte in einer Mini PROTEAN®

Tetra Cell Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad) bei 120 V für 60 min unter Verwendung eines SDS-Laufpuffers (50 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Als Größenstandard wurde „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fisher Scientific GmbH, Schwerte Deutschland) verwendet.

Tabelle 5: Zusammensetzung von Polyacrylamid-Gelen

Lösungen und Puffer	Sammelgel		Trenngel	
	4%	10%	12%	15%
Rothiphorese® Gel 30	325 µl	2,5 ml	3 ml	3,75 ml
Sammelgelpuffer (0,5 M TRIS-HCL, 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8)	625 µl			
Trenngelpuffer (1,5 M TRIS-HCL, 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8)		3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
ddH ₂ O	1500 µl	3,125 ml	2,625 ml	1,875 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	12,5 µl	25 µl	25 µl	25 µl
TEMED	2,5 µl	7,5 µl	7,5 µl	7,5 µl

3.2.15 Western Blotting

Mittels Western Blot Verfahren erfolgte der Transfer von aufgetrennten Proteinen (SDS-PAGE) auf Nitrocellulose-Membranen (GE Healthcare, Freiburg Deutschland). Hierfür wurden Polyacrylamid-Gele sowie Protran Nitrocellulose-Membranen mit Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol, 25 mM TRIS, 20 mM Glycin) inkubiert und anschließend in eine Fastblot B44 Transferkammer (GE Healthcare) platziert. Der Transfer von Proteinen auf die Membran erfolgte bei 47 mA, für 60 min.

3.2.16 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den Nachweis von immobilisierten Proteinen wurden zunächst freie Bindungsstellen der Nitrocellulose-Membran mit Blocklösung (3 % (w/v) Milchpulver, 1 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween-20, 1 x Roti-Block in DPBS) für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blocklösung) über Nacht bei 4 °C, gefolgt von mehrmaligem Waschen für 10 min mit Waschlösung (0,05 % (v/v) Tween-20 in DPBS). Danach wurde die Membran mit einem sekundären HRP gekoppelten Antikörper für 1 h bei RT inkubiert

und erneut mit Waschlösung gewaschen. Die Detektion mit Hilfe eines Chemiluminescence Detections kit for HRP (Applichem, Darmstadt Deutschland) erfolgte nach Herstellerangaben. Chemolumineszenzen wurden über das DNR Bioimaging System (DNR, Jahnsdorf Deutschland) aufgenommen und erstellte Aufnahmen mit der TotalLab Software analysiert.

3.2.17 Silberfärbung

Im Polyacrylamid-Gel getrennte Proteine wurden mit einer Fixierlösung (30 % (v/v) Ethanol, 30 % (v/v) Essigsäure) für 30 min bei RT inkubiert und anschließend zweimal für 10 min mit 20 % Ethanol gespült. Nach dem Waschen wurde das Gel mit 0,2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ für 1 min sensibilisiert. Nach zweimaligem kurzem Waschen mit ddH_2O erfolgte die Zugabe der Silberlösung (0,2 % (w/v) Silbernitrat) für 30 min. Nach weiterem mehrmaligem Waschen mit ddH_2O wurde Entwicklerlösung (0,015 % (v/v) Formaldehyd, 3 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,001 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) zugegeben und die Färbereaktion durch Zugabe von Fixierlösung gestoppt.

3.2.18 MALDI TOF

Rekombinantes ARMS2 wurde für die massenspektrometrische Analyse mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.2.14) aufgetrennt und mit Coomassie Blau (Fisher Scientific GmbH, Schwerte Deutschland) nach Herstellerangaben gefärbt. Nach zweimaligen Spülen mit ddH_2O für jeweils 10 min wurden die zu analysierenden Proteinbanden aus dem Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und mit Waschlösung (25 mM NH_4HCO_3 , 50 % (v/v) Acetonitril) gespült. Nach 15 min wurden die Gel-Partikel in Acetonitril aufgenommen und in einer Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg Deutschland) bei 56 °C getrocknet. Die Reduktion und Alkylierung der Proteine erfolgte durch Inkubation mit Reduktionslösung (10 mM Dithiothreitol, 50 mM NH_4HCO_3) für 45 min bei 56 °C. Danach wurden die Gel-Partikel auf RT abgekühlt und mit Iodacetamid-Lösung (55 mM Iodacetamid, 50 mM NH_4HCO_3) für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Waschlösung für jeweils 15 min wurden die Gel-Partikel erneut in Acetonitril aufgenommen. Der enzymatische Verdau der Proteine erfolgte durch die Inkubation mit Trypsin-Lösung (200 ng Trypsin (Promega, Mannheim Deutschland) in 25 mM NH_4HCO_3 über Nacht bei 37 °C. Anschließend wurden die generierten Peptide durch Inkubation für 1 h mit Elutionslösung (0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in Acetonitril) extrahiert und gelöste Peptide 1:2 in NTA Matrix (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ α -Cyano-4-hydroxymethylsäure, 50 % (v/v) Acetonitril) aufgenommen sowie auf einem MTP AnchorChip 800/384 (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig Deutschland)

immobilisiert. Die Messung erfolgte im Ultraflex I Massenspektrometer (Bruker Daltonik) und erhaltene Spektren wurden mit BioTools 3.2 Software analysiert.

3.2.19 Zellbindungsstudien

In ARMS2 Bindungsassays wurden die Zelllinien ARPE-19, CHO-K1 sowie deren Mutanten pgsD-677 und pgsA-745 eingesetzt. Ebenso wurde die Bindung von ARMS2 an Erythrozyten aus dem Schaf, Kaninchen und Menschen als auch an humane, native RPE Zellen gemessen. Weiterhin wurden native humane T-Zellen von gesunden Spendern genutzt. Die Isolation der Immunzellen aus dem Blut erfolgte mit Hilfe des MACS T-Cell Isolation Kit II human (Miltenyi Biotec).

Rekombinantes ARMS2 oder Vitronektin (10, 100 und 500 nM) wurde in Assaypuffer (1 % (w/v) BSA in DPBS) verdünnt und mit lebenden, nekrotischen (1 h bei 65 °C) oder apoptotischen (0,4 µg/ml Staurosporin für 24 h) Zellen ($\sim 1 \times 10^6$) für 1 h auf Eis inkubiert. Nachdem ungebundenes Protein von den Zellen durch Waschen mit Assaypuffer entfernt wurde, erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (1:200 in Assaypuffer) sowie einen spezifischen Alexa-647 oder Alexa-488 konjugierten Sekundärantikörper (1:400 in TRIS-Ca²⁺ Puffer: 1 % (w/v) BSA, 140 mM NaCl, 10 mM TRIS, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂; pH 7,4) für 1 h auf Eis. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen der Zellen entfernt. Die Differenzierung von lebenden, nekrotischen und spät apoptotischen Zellen erfolgte über die Färbung mit PI sowie Pacific Blue konjugiertem Annexin V (Life Technologies, Darmstadt Deutschland). Fluoreszenzsignale wurden im LSR II Durchflusszytometer (BD, Heidelberg Deutschland) gemessen und mit der FlowJo Software (Tree Star) ausgewertet.

3.2.20 Heparansulfat Competition

Die ARMS2 Bindung an sulfonierte Glykosaminoglykane wurde mit Hilfe von Wettbewerbsassays untersucht. Für die Inhibition der ARMS2 Bindung an Heparinbeads wurden 1×10^7 Beads zusammen mit 400 nM Protein sowie ansteigenden Konzentrationen Heparansulfat in Assaypuffer (1 % (w/v) BSA in DPBS) für 1 h auf Eis inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen der Beads mit Assaypuffer entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Kaninchen α -ARMS2 polyklonalen Antikörper (1:200 in Assaypuffer) sowie einem spezifischen Alexa-488 konjugierten Sekundärantikörper (1:400 in Assaypuffer) für 1 h

auf Eis. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen der Beads entfernt und die Bindung im Durchflusszytometer wie unter Kapitel 3.2.19 beschrieben untersucht.

3.2.21 C3b Ablagerungsassay

CHO-K1 sowie pgsA-745 Zellen ($\sim 1 \times 10^6$) wurden mit 20 % NHS, oder hiHS in Mg^{2+} EGTA Puffer (1 % (w/v) BSA, 20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, pH 7,4) für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Mg^{2+} EGTA Puffer, erfolgte die Zugabe eines Maus α -C3b monoklonalen Primärantikörpers (1:100 in Mg^{2+} EGTA Puffer) sowie eines spezifischen Alexa-647 konjugierten Sekundärantikörpers (1:200 in Mg^{2+} EGTA Puffer) für 1 h auf Eis. Ungebundener Antikörper wurde jeweils durch Waschen mit Mg^{2+} EGTA Puffer entfernt und die C3b Ablagerung durchflusszytometrisch bestimmt (Kapitel 3.2.19). NHS allein wurde normalisiert und als 100 % C3b Ablagerung definiert. Der Einfluss von ARMS2 sowie den Kontrollproteinen Faktor H und HSA auf die C3b Ablagerung wurde untersucht, indem ansteigende Konzentrationen (10 – 500 nM) der Proteine entweder mit Zellen (1 h auf Eis) oder Serum (15 min bei 37 °C) vorinkubiert wurden.

3.2.22 Properdin Ablagerungsassay

CHO-K1 Zellen ($\sim 1 \times 10^6$) wurden mit 500 nM Protein für 1 h auf Eis inkubiert und ungebundenes Protein durch Waschen der Zellen entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 % NHS oder 20 % $FP\Delta$ HS, in Mg^{2+} EGTA Puffer (1 % (w/v) BSA, 20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, pH 7,4) oder EDTA Puffer (1 % (w/v) BSA, 20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) für 45 min bei 37 °C. Zudem wurde die Bindung von 100 nM aufgereinigten Properdin (in 1 % (w/v) BSA, DPBS) durch Inkubation für 1 h bei RT untersucht. Nach dem Waschen von ungebundenem Protein wurden die Zellen mit einem Maus α -Properdin monoklonalen Primärantikörper (1:200 in Assaypuffer) sowie einem spezifischen Alexa-647 konjugierten Sekundärantikörper (1:400 in Assaypuffer) für 1 h auf Eis inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde jeweils durch Waschen entfernt und die Messung sowie Analyse der Bindung erfolgte im Durchflusszytometer wie unter Kapitel 3.2.19 beschrieben.

3.2.23 ELISA: Bestimmung der C3a und Ba Aktivierungsprodukte in der Flüssigphase

ARMS2 wurde zusammen mit 20 % NHS in HEPES EGTA Puffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl₂ 10 mM EGTA; pH 7,4) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die generierten Spaltprodukte C3a sowie Ba wurden mit einem C3a- und Ba MircoVUE ELISA Kit (QuiDel Corp., San Diego USA) nach Herstellerangaben bestimmt und die Absorption im Multiscan Ascent ELISA-Reader (Fisher Scientific GmbH, Schwerte Deutschland) bei 540 nm bestimmt.

3.2.24 ELISA: Bindung von ARMS2 an Komplementproteine

Die Plasmaproteine Properdin, Faktor B, C3 sowie die Spaltprodukte C3b, iC3b, C3c, C3d als auch HSA wurden mit jeweils 10 µg/ml in DPBS auf einer MediSorp Mikrotiterplatte (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland) über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nach dem Waschen mit DPBS, 0,05 % (v/v) Tween-20 wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation mit Blocking Buffer I (AppliChem, Darmstadt Deutschland) für 2 h bei RT abgesättigt. Nach erneutem Waschen der Wells erfolgte eine Inkubation mit 5 µg/ml ARMS2 (verdünnt in DPBS, 2 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween-20) für 1 h bei RT. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurden die Wells mehrmals gewaschen, gefolgt von der Zugabe eines Kaninchen α-ARMS2 polyklonalen Antikörpers (1:1000 in CrossDown Buffer, AppliChem) sowie eines geeigneten HRP gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 in CrossDown Buffer) für jeweils 1 h bei RT. Die Detektion der Bindung wurde durch eine Färbereaktion mittels Entwicklerlösung (Dako, Hamburg Deutschland) ermöglicht und durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption wurde im Multiscan Ascent ELISA-Reader (Fisher Scientific GmbH) bei 492 nm gemessen.

3.2.25 ELISA: Bindung von Properdin an ARMS2

Rekombinantes ARMS2 und HSA (10 µg/ml) wurden auf einer MaxiSorp Mikrotiterplatte (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland) über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nach dem Waschen mit DPBS + 0,05 % (v/v) Tween-20 wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation mit Blocklösung (5 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween-20 in DPBS) für 2 h bei RT abgesättigt, die Wells erneut gewaschen und mit ansteigenden Mengen Properdin (12,5 – 100 nM), verdünnt in Assaypuffer (2 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween-20 in DPBS) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Properdin durch Waschen mit Assaypuffer entfernt, gefolgt von der Zugabe eines Ziege α-Properdin Primärantiserums (1:1000 in Assaypuffer) sowie einem

spezifischen HRP gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 in Assaypuffer) für 1 h bei RT. Die Färbereaktion sowie die Messung der Absorption erfolgte wie unter Kapitel 3.2.24 beschrieben.

3.2.26 ELISA: Rekrutierung von C3b über ARMS2 gebundenes Properdin

Rekombinantes ARMS2 wurde immobilisiert (Kapitel 3.2.25) sowie nach dem Blocken von freien Bindungsstellen mit 100 nM Properdin inkubiert und die Wells mit Assaypuffer (2 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween-20 in DPBS) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit ansteigenden Mengen C3b (4 – 12 nM, verdünnt in Assaypuffer) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen mit Assaypuffer wurde ungebundenes C3b entfernt und die Wells anschließend mit einem Maus monoklonalen α -C3d Primärantikörper (1:1000 in Assaypuffer) sowie einem spezifischen HRP gekoppelten Sekundärantikörpers (1:1000 in Assaypuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Die Färbereaktion sowie die Messung der Absorption erfolgte wie unter Kapitel 3.2.24 beschrieben.

3.2.27 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bindung von ARMS2 auf ARPE-19 Zellen

ARPE-19 Zellen ($\sim 5 \times 10^3$) wurden pro Well in einem Kammerobjektträger (Chamber Slide System, Nunc) nach Herstellerangaben kultiviert. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium entfernt sowie die adhärenen Zellen mit Assaypuffer (1 % (w/v) BSA in DPBS) gewaschen und mit 20 μ g ARMS2 für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellen wurden nach erneutem mehrmaligem Waschen durch Zugabe von 3 % Paraformaldehydlösung fixiert. Nach einer Inkubation für 15 min bei RT wurde überschüssige Fixierlösung entfernt und anschließend unspezifische Bindestellen auf den Zellen durch Inkubation mit Assaypuffer für 1 h bei RT geblockt. Gebundenes ARMS2 wurde mittels Kaninchen α -ARMS2 polyklonalen Antikörper (1:200 in Assaypuffer) sowie eines spezifischen Alexa-488 konjugierten Sekundärantikörper (1:400 in Assaypuffer) detektiert. DNA wurde durch DAPI (Sigma-Aldrich) als auch die Zellmembran mittels Texas Red - Weizenkeimagglutinin (Life Technologies) angefärbt. Die Visualisierung der Proben erfolgte im LSM 710 Meta (Zeiss) und die Auswertung der Aufnahmen mittels Analysesoftware Zen 2009 (Zeiss).

Bindung von ARMS2 und Properdin auf CHO-K1 Zellen

CHO-K1 Zellen ($\sim 1 \times 10^5$) wurden mit 10 μg ARMS2 oder Properdin in RPMI Medium inkubiert. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen mit RPMI Medium gewaschen und anschließend auf einen Kammerobjektträger (Chamber Slide System, Nunc) gebracht. Nach 1 h Inkubation erfolgte die Fixierung adhärenter Zellen mit 3 % Paraformaldehydlösung für 15 min. Oberflächen gebundenes Protein wurde mittels Kaninchen α -ARMS2 polyklonalen Antikörper (1:100) sowie Maus α -Properdin monoklonaler Antikörper (1:100) als auch Alexa-488 oder Alexa-647 konjugierter Sekundärantikörper (1:200) in RPMI Medium + 1 % BSA detektiert. DNA wurde über DAPI (Sigma-Aldrich) gefärbt. Die Visualisierung des gebundenen Proteins erfolgte im LSM 710 Meta (Zeiss) und die Auswertung der Aufnahmen mittels Analysesoftware Zen 2009 (Zeiss). Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT.

Kolokalisation von ARMS2 und Properdin auf CHO-K1 Zellen

Für die Kolokalisation von ARMS2 und Properdin wurden CHO-K1 Zellen ($\sim 1 \times 10^5$) mit 10 μg ARMS2 in RPMI Medium für eine 1 h inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen der Zellen mit RPMI Medium entfernt und die ARMS2 beladenen Zellen mit 10 μg Properdin in RPMI Medium für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen, wurden die Zellen auf einen Kammerobjektträger (Chamber Slide System, Nunc) gebracht und für 1 h bei RT inkubiert. Adhärente Zellen wurden mit 3 % Paraformaldehydlösung für 15 min fixiert. Für die Kolokalisation wurden Kaninchen α -ARMS2 polyklonalen Antikörper (1:100) sowie Maus α -Properdin monoklonaler Antikörper (1:100) als auch Alexa-488 oder Alexa-647 konjugierter Sekundärantikörper (1:200) in RPMI Medium + 1 % BSA verwendet. DNA wurde mit DAPI (Sigma-Aldrich) gefärbt. Die Visualisierung sowie Analyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT.

3.2.28 ARMS2 mRNA Expressionsstudien

Gesamt-RNA wurde aus THP-1, Stammzellen induzierte Mikrogliazellen (1×10^6 , stimuliert mit 400 ng PMA für 24 h oder nicht stimuliert) sowie nativen Monozyten und RAW 264.7 Zellen (1×10^6 , nicht stimuliert) unter Verwendung des PAXgeneTM Blood RNA Kit (QiaGen, Hilden Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Für die cDNA Synthese wurden 20 ng der isolierten RNA eingesetzt und das QuantiTect[®] Reverse Transcription kit (QiaGen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Amplifikation spezifischer *ARMS2* und *ACTIN* cDNA erfolgte

durch zwei aufeinanderfolgende PCRs (Tabelle 6 und 7) mittels Phusion PCR Kit (New England Biolabs, Frankfurt Deutschland) in 1 x GC Puffer. Die PCR Produkte wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.8) aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und sequenziert (Kapitel 3.2.9).

Tabelle 6: PCR Programm zur Amplifikation von cDNA

	<i>ARMS2</i>		<i>ACTIN</i>		
	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	
Denaturierung	60 s	96 °C	60 s	96 °C	35 Zyklen
Annealing	30 s	69 °C	30 s	60 °C	
Synthese	60 s	72 °C	120 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	96 °C	30 s	96 °C	
Extension	480 s	72 °C	480 s	72 °C	
Ende		4 °C		4 °C	

Tabelle 7: verwendete Primer für die mRNA Expression

Name	Sequenz
ARMS2 - fwd	5'-TCGGTGGTTCCTGTGTCCTTCATT-3'
ARMS2 - rev	5'-TCACCTTGCTGCAGTGTGGATGAT-3'
Actin - fwd	5'-ACCAACTGGGACGACAT-3'
Actin - rev	5'-CTAGAAGCATTGCGGTG-3'

3.3 Statistische Datenanalyse

Die Berechnung von Signifikanzen zwischen zwei Messwert-Gruppen erfolgte durch den ungepaarten t-Test, wobei p-Werte mit $p < 0,05$ als statistisch signifikant (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$) gekennzeichnet wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Charakterisierung von ARMS2

4.1.1 Herstellung von rekombinanten ARMS2 und α -ARMS2 Antikörper

Für die Charakterisierung von ARMS2 wurde das Protein im eukaryontischen Expressionssystem *Pichia pastoris* rekombinant exprimiert und über einen c-terminal fusionierten 6x His-Tag mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Eluiertes, rekombinantes ARMS2 wurde unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteingröße sowie Reinheit durch Silberfärbung überprüft. Reduziertes ARMS2 zeigte eine Mobilität von ~16 kDa (Abbildung 10 A).

Für den immunologischen Nachweis von rekombinanten ARMS2 wurde das durch SDS-PAGE aufgetrennte Protein im Western Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und anschließend mit einem Maus α -penta-His monoklonalen Antikörper oder mit Kaninchen ARMS2 Antiserum inkubiert. Rekombinantes ARMS2 wurde von beiden, dem Maus α -penta-His monoklonalen Antikörper am c-terminalen 6x His-Tag als auch durch das Kaninchen ARMS2 Antiserum, welches in der n-terminalen ARMS2-Sequenz bindet, detektiert. Das rekombinante ARMS2 zeigte unter reduzierenden Bedingungen im Immun-Blot, wie in der Silberfärbung, eine vergleichbare Mobilität von ~16 kDa (Abbildung 10 A).

Aufgereinigtes ARMS2 wurde für die Immunisierung eines Kaninchens genutzt. Das generierte Kaninchen ARMS2 Antiserum detektierte das reduzierte rekombinante ARMS2 gleichermaßen als ~16 kDa Protein. Unter nicht reduzierenden Bedingungen detektierte das Kaninchen ARMS2 Antiserum zwei Proteinbanden mit ~16 kDa sowie ~32 kDa (Abbildung 10 A).

Eine Aufreinigung des Antikörpers aus dem generierten ARMS2 Antiserum erfolgte mittels Protein A – Affinitätschromatographie. Der aufgereinigte ARMS2 polyklonale Antikörper wurde anschließend auf seine Spezifität im ELISA überprüft und mit ARMS2 Antiserum als auch Präimmunserum verglichen. Aufgereinigter ARMS2 polyklonaler Antikörper zeigte eine vergleichbare Spezifität wie das Kaninchen ARMS2 Antiserum. Das Präimmunserum detektierte kein rekombinantes ARMS2. (Abbildung 10 B).

Die Identität des rekombinanten ARMS2 wurde zusätzlich mittels Massenspektrometrie analysiert. Das rekombinante Protein zeigte eine Sequenzhomologie von 97,2 % mit humanem ARMS2 (Abbildung 11).

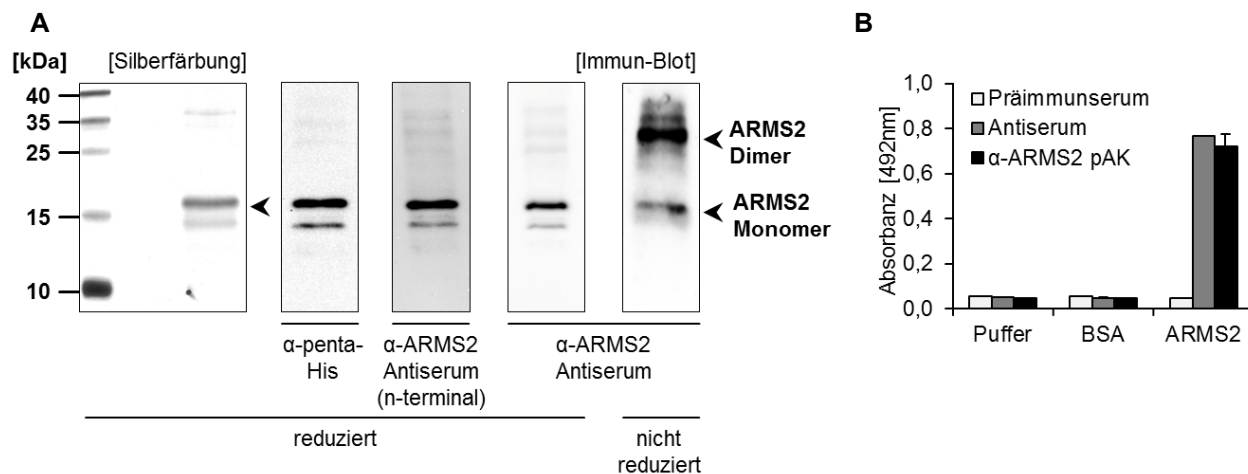


Abbildung 10: Nachweis von rekombinantem ARMS2

A) Aufgereinigtes, rekombinantes ARMS2 wurde mittels SDS-PAGE unter reduzierten Bedingungen aufgetrennt und durch Silberfärbung (links) auf Proteingröße und Reinheit überprüft. Im immunologischen Nachweis (rechts) wurde reduziertes, rekombinantes ARMS2 durch einen Maus α-penta-His monoklonalen Antikörper (c-terminal) sowie einem Kaninchen ARMS2 Antiserum (n-terminal) als auch eigens generiertes Kaninchen ARMS2 Antiserum detektiert und zeigte eine Mobilität von ~16 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen detektierte das Kaninchen ARMS2 Antiserum zwei Proteinbanden mit einer Mobilität von ~16 kDa (Monomer) und ~32 kDa (vermutliches Homodimer). **B)** Immobilisiertes ARMS2 wurde sowohl durch das generierte Kaninchen ARMS2 Antiserum als auch aufgereinigten Antikörper (α-ARMS2 pAK) im ELISA detektiert. Das Präimmuns serum zeigte keine Spezifität für rekombinantes ARMS2.

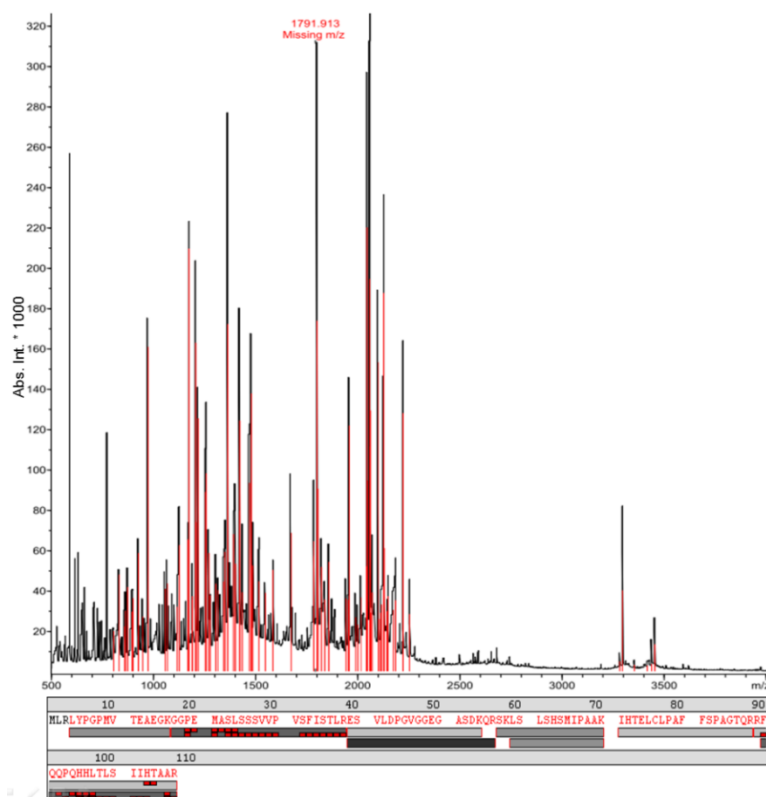


Abbildung 11: MALDI-Profil des aufgereinigten ARMS2

Das MS-Spektrogramm zeigt eine Übereinstimmung der generierten Peptide (schwarz) mit den vorhergesagten ARMS2-Peptiden (rot). Das MALDI-Profil zeigt eine 97,2 % Homologie des rekombinanten Proteins mit der humanen ARMS2 Aminosäure-Sequenz. Die durch den Trypsin-Verdau generierten Peptide sind in der Aminosäuresequenz grau hervorgehoben.

4.1.2 Heparansulfat vermittelt die Bindung von ARMS2 an Zelloberflächen

Auf Grund der beschriebenen Interaktion von ARMS2 mit Komponenten der Extrazellulären Matrix [138] sollte untersucht werden, ob ARMS2 an Zelloberflächen bindet. Hierfür wurde rekombinantes ARMS2 und Vitronektin in ansteigenden Mengen (10 – 500 nM) mit Zellen der Zelllinie CHO (Chinese Hamster Ovary) inkubiert und die Bindung im Durchflusszytometer bestimmt. Dabei wurde eine dosisabhängige Bindung von rekombinantem ARMS2 an den Wildtyp CHO-K1 gemessen. Im Gegensatz dazu band ARMS2 nicht an die Heparansulfat (HS) defiziente CHO Mutante pgsD-677 oder die GAG defiziente CHO Mutante pgsA-745. Der Komplementregulator Vitronektin band an alle CHO Zelllinien dosisabhängig. Dabei zeigte Vitronektin die höchste Bindung an den CHO-K1 Wildtyp, zudem eine intermediäre Bindung an die pgsD-677 Mutante sowie eine niedrige Bindung an pgsA-745 Zellen (Abbildung 12).

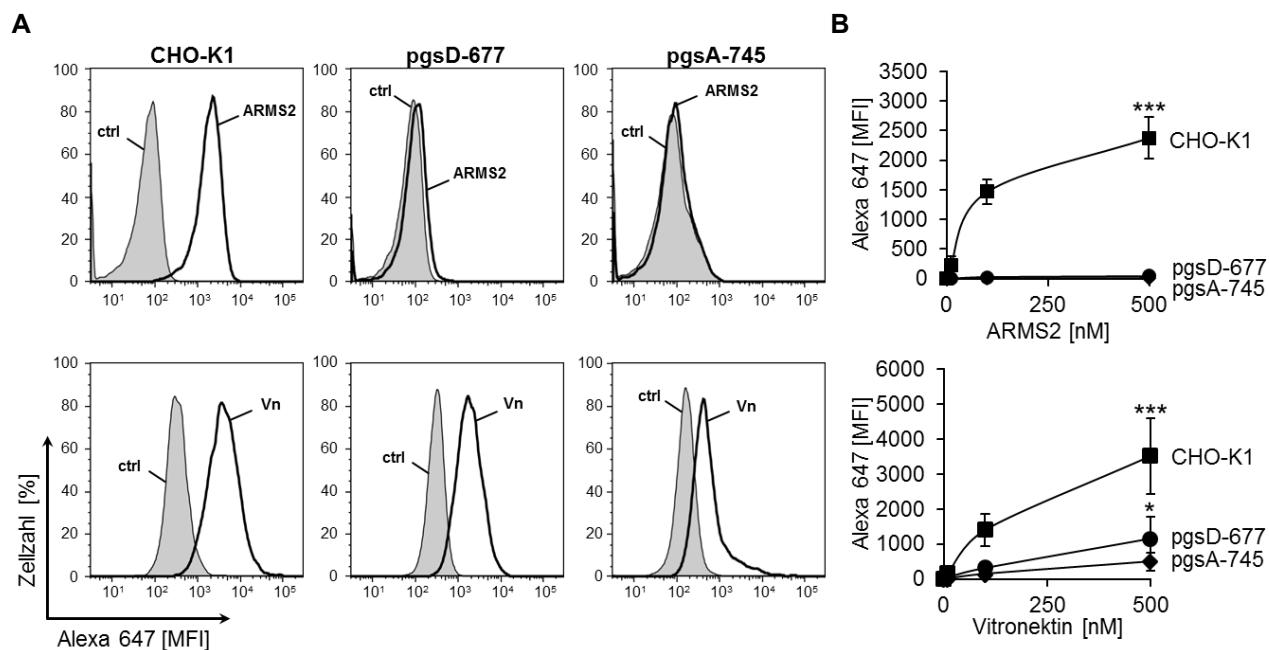


Abbildung 12: ARMS2 Bindung an CHO Zellen

A) ARMS2 bindet an den CHO-K1 Wildtyp, aber nicht an die CHO Mutanten pgsD-677 und pgsA-745. Dargestellt ist die Bindung von 500 nM ARMS2 (obere Reihe) und Vitronektin (Vn, untere Reihe) im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme). Die einzelnen Abbildungen zeigen jeweils ein repräsentatives Bindungsprofil von drei unabhängigen Versuchen. **B)** Dosisabhängige Proteinbindung von ARMS2 und Vitronektin an die CHO Zelllinien. ARMS2 zeigte eine dosisabhängige Bindung an den Wildtyp CHO-K1, jedoch nicht an die Mutanten pgsD-677 (defizient für Heparansulfat) sowie pgsA-475 (defizient für GAGs). Eine dosisabhängige Bindung von Vitronektin wurde sowohl an den Wildtyp als auch an beide Mutanten gemessen. Vergleichend zeigte Vitronektin eine hohe Bindung an den Wildtyp CHO-K1 sowie eine intermediäre Bindung für die CHO Mutante pgsD-677. Die geringste Bindung wurde für die CHO Mutante pgsA-745 ermittelt. Die Graphen repräsentieren um den Hintergrund (ctrl) bereinigte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

Die Bindung von ARMS2 an CHO-K1 Zellen wurde mittels Konfokalmikroskopie visualisiert. In den Aufnahmen wurde ARMS2 auf der Zelloberfläche des CHO Wildtyps detektiert. CHO-K1 Zellen, welche nicht mit ARMS2 inkubiert wurden, zeigten kein spezifisches Fluoreszenzsignal (Abbildung 13).

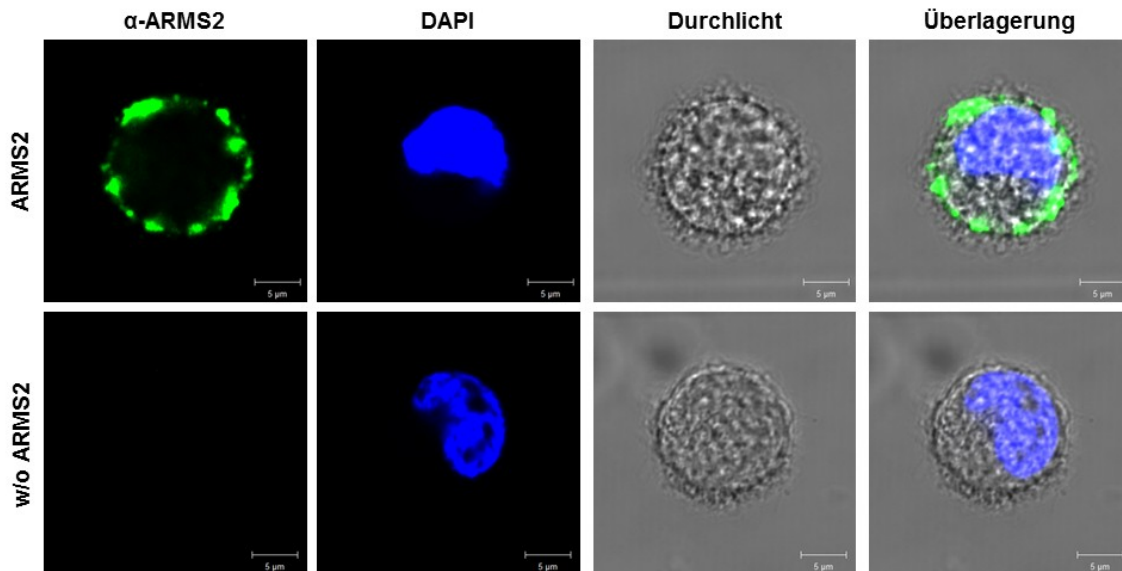


Abbildung 13: Visualisierte Bindung von ARMS2 an CHO-K1 Zellen

ARMS2 bindet an die Zelloberfläche von CHO-K1 Zellen. Die Bindung von ARMS2 (obere Reihe) wurde mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie visualisiert. Gebundenes ARMS2 wurde mittels Kaninchen ARMS2 polyklonalen Antikörper (α -ARMS2) auf der Oberfläche der Zellen detektiert. CHO Zellen ohne ARMS2 (w/o ARMS2, untere Reihe) zeigten kein spezifisches Fluoreszenzsignal. Die DNA der Zellkerne wurde mittels DAPI (blau) markiert und die Zelle in einer Durchlicht-Aufnahme dargestellt. Die Überlagerung aller Aufnahmen zeigt die Lokalisation von ARMS2 auf der Zelloberfläche. (Maßstabsanzeige = 5 μ m)

Die Ergebnisse zeigen, dass ARMS2 an Zelloberflächen bindet und mit Heparansulfat, eine Komponente der extrazellulären Matrix, interagiert. Die spezifische Bindung von ARMS2 an Heparansulfat wurde mit einem Kompetitions-Assay überprüft. Hierfür wurde zuerst rekombinantes ARMS2 und Vitronektin in ansteigenden Mengen (10 – 500 nM) an Heparinbeads gebunden und mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. ARMS2 als auch Vitronektin zeigten eine dosisabhängige Bindung (Abbildung 14 A, B). Anschließend wurde die Bindung von rekombinantem ARMS2 und Vitronektin (jeweils 400 nM) mit ansteigenden Mengen löslichem Heparansulfat kompetitiert. Lösliches Heparansulfat inhibierte dosisabhängig die Bindung von ARMS2 (ca. 70 %) als auch Vitronektin (ca. 80 %) an die Heparinbeads, was auf eine spezifische Interaktion von ARMS2 mit Heparansulfat hinweist (Abbildung 14 C).

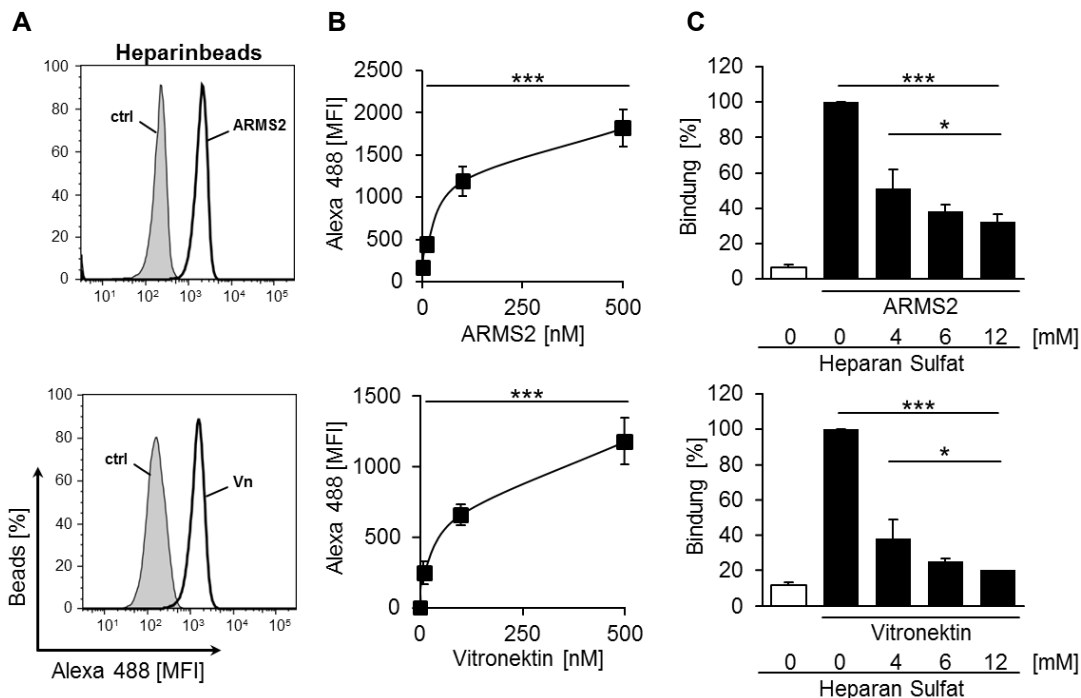


Abbildung 14: Kompetitions-Assay mit löslichem Heparansulfat

A) ARMS2 (obere Reihe) als auch Vitronektin (Vn, untere Reihe) binden Heparinbeads. Die Histogramme zeigen die Bindung von 500 nM Protein (schwarz) im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllt).

B) Sowohl ARMS2 als auch Vitronektin banden dosisabhängig an Heparinbeads. Die Graphen repräsentieren um den Hintergrund (ctrl) bereinigte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen.

C) Im Kompetitions-Assay inhibierte die Zugabe von löslichem Heparansulfat (0 – 12 mM) die Bindung von ARMS2 und Vitronektin (jeweils 400 nM) an die Heparinbeads (schwarze Balken). Das Diagramm zeigt normalisierte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. MFI Werte der Proteinbindung an Heparinbeads ohne zusätzliches Heparansulfat wurden als 100 % Bindung definiert. Weiterhin ist die Antikörper-Kontrolle (weißer Balken) im Vergleich dargestellt (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

4.1.3 ARMS2 bindet an spät apoptotische und nekrotische Zelloberflächen

Heparansulfat wird von einer Vielzahl von humanen Zellen exprimiert und ist über die kovalente Bindung an ein Kernprotein (Heparansulfat-Proteoglykan) auf den Zelloberflächen verankert. Heparansulfate weisen extrem vielfältige Sulfonierungsmuster auf und besitzen dadurch eine große strukturelle Diversität. Die Funktionen umfassen unter anderem die zelluläre Signaltransduktion, Wundheilungsprozesse und das Aufrechterhalten der zellulären Homöostase [139]. Da ARMS2 mittels Heparansulfat an CHO Zellen bindet, war es von Interesse die Bindung an humane Zelloberflächen zu untersuchen. Apoptotische und nekrotische Zelloberflächen wurden in den Assay mit einbezogen, da bei einer AMD nekrotische RPE Zellen sowie apoptotische Photorezeptoren auftreten [65, 72]. Native, humane T-Zellen

wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert und die Bindung von rekombinantem ARMS2 (10 – 500 nM) an lebende, apoptotische (0,4 µg/ml Staurosporin für 24 h) sowie nekrotische (1 h bei 65 °C) Oberflächen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Selektion der jeweiligen morphologischen Stadien erfolgte mittels Annexin V – Pacific Blue und Propidiumiodid (PI). ARMS2 band dosisabhängig an spät apoptotische und nekrotische T-Zellen (Annexin V positiv, PI positiv) jedoch nicht an lebende- (Annexin V negativ, PI negativ) sowie früh apoptotische (Annexin V positiv, PI negativ) T-Zellen (Abbildung 15).

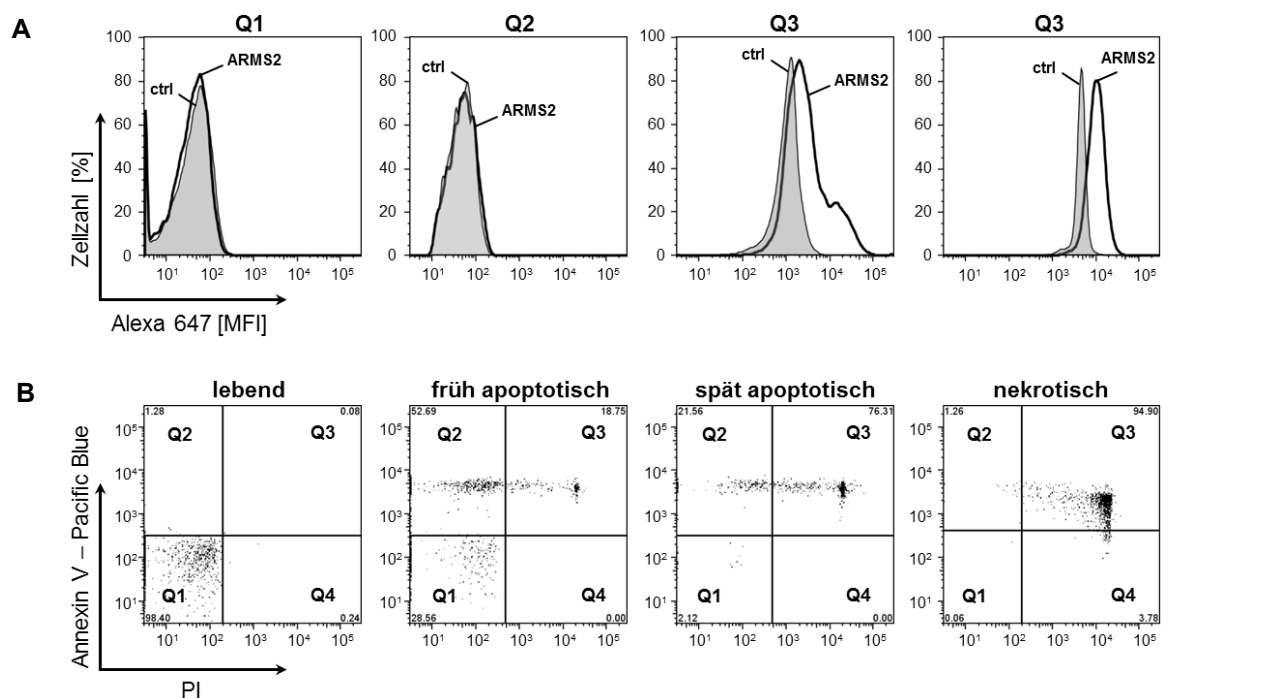
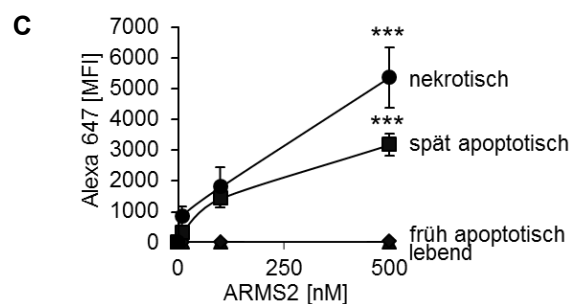


Abbildung 15: Bindung von ARMS2 an lebende, apoptotische und nekrotische T-Zellen

A) ARMS2 bindet spät apoptotische und nekrotische Zelloberflächen. Dargestellt ist die Bindung von 500 nM ARMS2 (schwarze Linie) im Vergleich zur dazugehörigen Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme). **B)** Annexin V - Pacific Blue und Propidiumiodid (PI) Färbung von nativen humanen T-Zellen. Lebende Zellen (Q1) zeigten keine Färbung für Annexin V - Pacific Blue als auch PI. Früh apoptotische Zellen (Q2) werden durch Annexin V - Pacific Blue markiert, sind jedoch undurchlässig für PI. Spät apoptotische als auch nekrotische Zellen (Q3) werden sowohl durch Annexin V – Pacific Blue als auch PI gefärbt. **C)** Dosisabhängige Bindung von ARMS2 an die verschiedenen Oberflächen. ARMS2 band dosisabhängig an spät apoptotische und nekrotische T-Zellen, jedoch nicht an lebende oder früh apoptotische Zellen. Die Graphen repräsentieren um den Hintergrund (ctrl) bereinigte Medianwerte ±SD von drei unabhängigen Versuchen (***p ≤ 0,001).



Um die favorisierte Bindung von ARMS2 an veränderte Zelloberflächen zu bestätigen, wurde die Bindung von ARMS2 an Erythrozyten untersucht. Hierfür wurde rekombinantes ARMS2 (10 – 500 nM) mit Kaninchen-, Schaf- als auch humanen Erythrozyten inkubiert und gebundenes ARMS2 im Durchflusszytometer bestimmt. ARMS2 band keine der verwendeten Erythrozyten, jedoch an CHO-K1 Zellen (Abbildung 16).

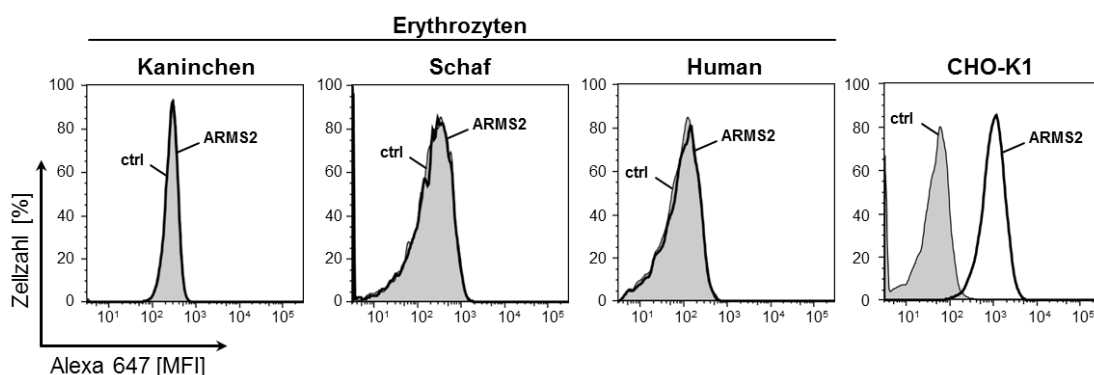


Abbildung 16: ARMS2 Bindung an Erythrozyten

ARMS2 bindet an den CHO Wildtyp (CHO-K1) jedoch nicht an Erythrozyten der verschiedenen Spezies. Die Bindung von ARMS2 an Kaninchen-, Schaf- und humane Erythrozyten sowie CHO-K1 Zellen wurde im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Bindung von 500 nM ARMS2 (schwarze Linie) im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme).

4.1.4 Bindung von ARMS2 an retinale Pigmentepithelzellen

Retinale Pigmentepithelzellen können im Verlauf der AMD degenerieren und absterben [60]. Daher war es von Interesse die Bindung von ARMS2 an RPE Zellen zu untersuchen. Hierfür wurde rekombinantes ARMS2 in ansteigenden Mengen (10 - 500 nM) mit immortalisierten ARPE-19 Zellen inkubiert. Zusätzlich wurde die Bindung von 500 nM rekombinanten ARMS2 an humane, native RPE Zellen untersucht und die Bindung im Durchflusszytometer analysiert. ARMS2 band dosisabhängig an ARPE-19 Zellen (Abbildung 17 A, B). Weiterhin band ARMS2 an nekrotische RPE Zellen, jedoch nicht an lebende RPE Zellen (Abbildung 17 C). Oberflächen gebundenes ARMS2 wurde zudem auf ARPE-19 Zellen mittels Konfokalmikroskopie visualisiert. Das ARMS2 Protein zeigte dabei eine gleichmäßige Bindung an die gesamte Oberfläche der ARPE-19 Zellen (Abbildung 17 D).

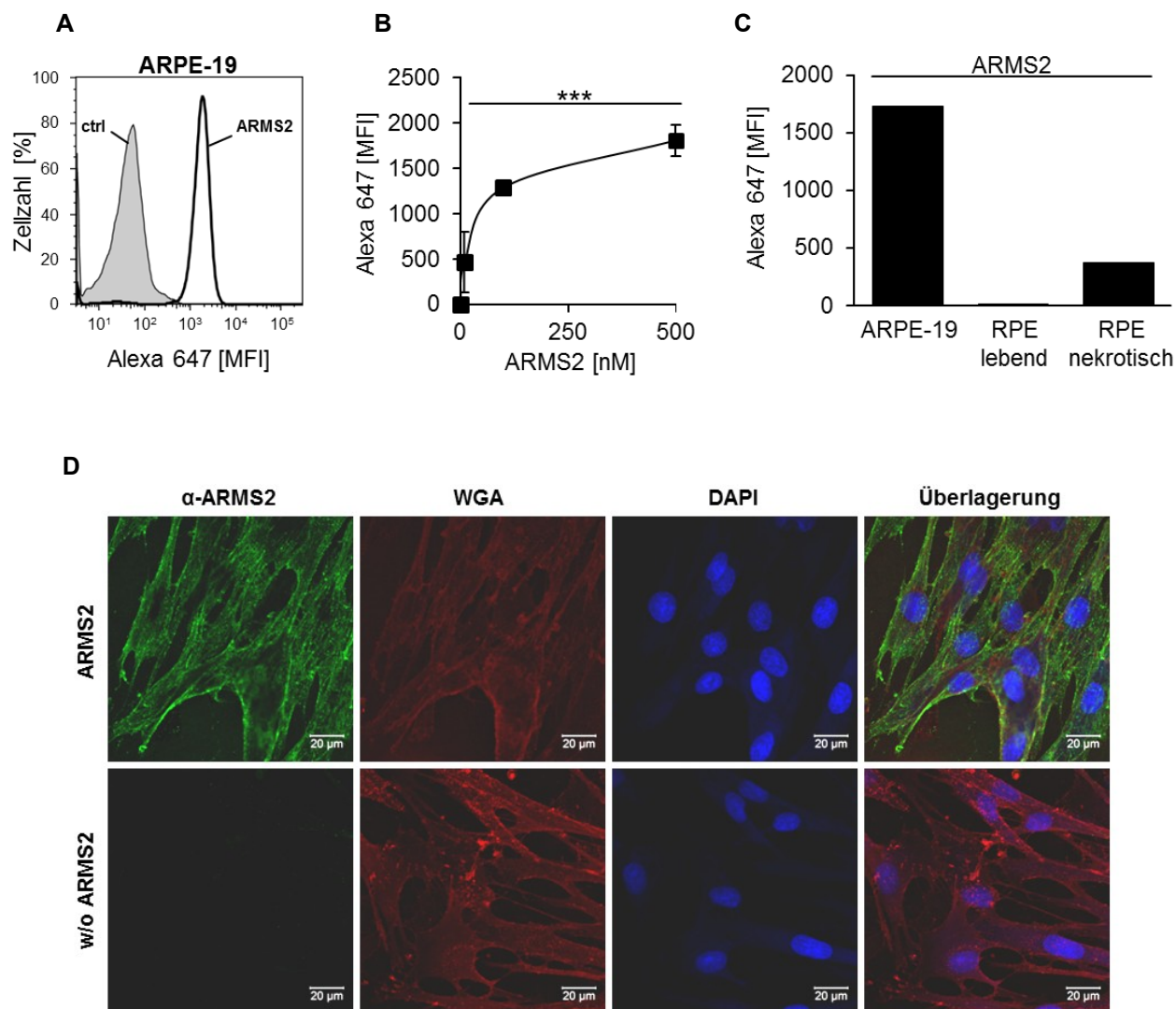


Abbildung 17: Bindung von ARMS2 an die Zelllinie ARPE-19 sowie nativen RPE Zellen

ARMS2 bindet die Zelllinie ARPE-19 sowie nekrotische RPE Zellen. Die Bindung von ARMS2 an lebende RPE Zellen war dagegen reduziert. **A)** Dargestellt ist die Bindung von 500 nM ARMS2 (schwarze Linie) an ARPE-19 Zellen im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefülltes Histogramm). **B)** ARMS2 bindet dosisabhängig an ARPE-19 Zellen. Der Graph repräsentiert um den Hintergrund (ctrl) bereinigte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen ($***p \leq 0,001$). **C)** Vergleichende Bindung von ARMS2 an die Zelllinie ARPE-19 sowie native RPE Zellen. ARMS2 bindet ARPE-19 Zellen sowie nekrotische RPE Zellen. Die Bindung an lebende RPE war reduziert. **D)** Die Bindung von ARMS2 an ARPE-19 Zellen wurde mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. ARMS2 bindet gleichmäßig an die ARPE-19 Zelloberfläche. Hierfür wurden Zellen mit oder ohne (w/o) ARMS2 inkubiert und die Bindung mit einem Kaninchen ARMS2 polyklonalen Antikörper sowie einem Alexa-488 sekundären Antikörper (grün) detektiert. Die Zellmembran der ARPE-19 Zellen wurde mit WGA-TR (rot) sowie DNA mit DAPI (blau) markiert. Der Kaninchen ARMS2 polyklonalen Antikörper zeigte mit Zellen ohne ARMS2 keine Kreuzreaktion. (Maßstabsanzeige = 20 μ m)

4.1.5 Oberflächen gebundenes ARMS2 verstärkt die Komplementablagerung

Auf Grund der bedeutenden Rolle des Komplementsystems in der Immunregulation im Auge sowie der bereits dokumentierten Assoziation mit der AMD, insbesondere des alternativen Aktivierungswegs, wird eine Rolle von ARMS2 im Komplementsystem vermutet. Um eine mögliche regulatorische Funktion von ARMS2 im alternativen Aktivierungsweg zu untersuchen, wurde Mg^{2+} EGTA-Puffer verwendet und ansteigende Mengen ARMS2 (100 – 750 nM) in 20 % NHS gegeben sowie mit CHO-K1 Zellen inkubiert. Der Grad der Komplementaktivierung erfolgte durch Messung der Ablagerung von C3b als auch TCC auf den CHO-K1 Zellen im Durchflusszytometer. ARMS2 erhöhte dosisabhängig die C3b Ablagerungen (~250 %) auf den Zellen. Der Regulator Faktor H inhibierte die C3b Ablagerung dosisabhängig (~50 %). HSA beeinflusste die Ablagerung von C3b nicht (Abbildung 18 A, B). Die ARMS2 vermittelte Verstärkung der Komplementaktivierung zeigte sich auch durch eine erhöhte Ablagerung des TCC (Abbildung 18 C).

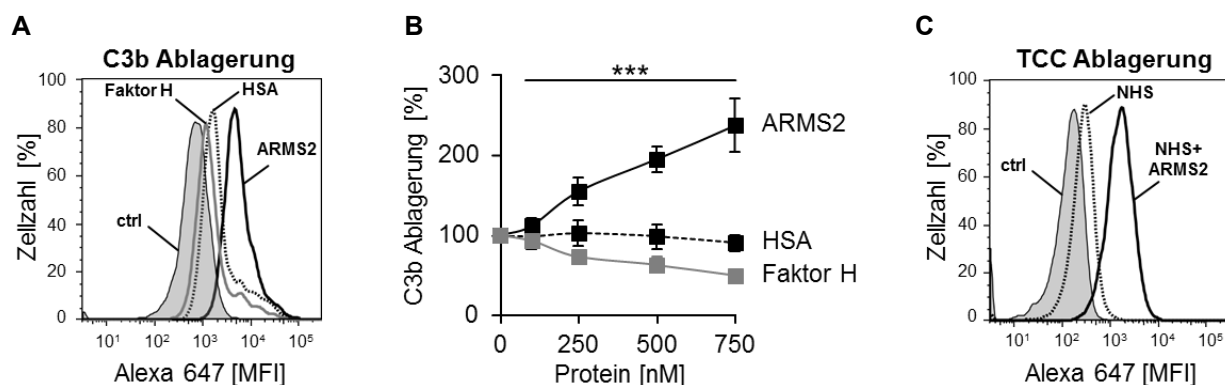


Abbildung 18: ARMS2 verstärkt die Komplementablagerung auf Zelloberflächen

A) ARMS2 verstärkt die C3b Deposition auf CHO-K1 Zellen. ARMS2, Faktor H sowie HSA wurden zusammen mit 20 % NHS (in Mg^{2+} EGTA Puffer) und CHO-K1 Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Komplementaktivierung des Alternativen Wegs durch die C3b Ablagerung auf den Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist die C3b Ablagerung durch 750 nM ARMS2 (schwarze Linie), HSA (schwarze, gestrichelte Linie) sowie Faktor H (graue Linie) im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme) eines repräsentativen Versuchs. **B)** Dosisabhängige C3b Ablagerung durch die ansteigenden Mengen der jeweiligen Proteine. ARMS2 verstärkte die C3b Ablagerung um ~250 %. Faktor H inhibierte die C3b Ablagerung um ~50 %. HSA beeinflusste die C3b Ablagerung nicht. Der Graph zeigt normalisierte Medianwerte \pm SD von sieben unabhängigen Versuchen. Die C3b Ablagerung auf Zellen ohne zusätzliches Protein wurde als 100 % definiert. (***) $p \leq 0,001$ für ARMS2 und Faktor H). **C)** ARMS2 führt zu einer erhöhten Ablagerung des TCC. Dargestellt ist die TCC Ablagerung durch NHS (schwarze, gestrichelte Linie) sowie NHS + 500 nM ARMS2 (schwarze Linie) im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme) eines repräsentativen Versuchs.

ARMS2 bindet mittels Heparansulfat an veränderte Zelloberflächen. Es sollte daher überprüft werden, ob Oberflächen gebundenes oder lösliches ARMS2, die C3b Ablagerung verstärkt. Hierfür wurde rekombinantes ARMS2 in ansteigenden Mengen (100 – 750 nM) mit 20 % NHS, verdünnt in Mg^{2+} EGTA-Puffer, sowie GAG defizienten pgsA-745 Zellen inkubiert und die C3b Ablagerung auf den Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die ARMS2 vermittelte Verstärkung der C3b Ablagerung auf CHO-K1 Zellen ließ sich nicht auf der GAG defizienten CHO Mutante pgsA-745 beobachten. Faktor H inhibierte dagegen die C3b Ablagerung dosisabhängig (~75 %). Auch auf pgsA-745 zeigte HSA erneut keinen Einfluss auf die C3b Ablagerung (Abbildung 19 A, B). Zudem erfolgte eine zeitabhängige Messung der C3b Ablagerung, um den Einfluss von ARMS2 auf die C3-Konvertase zu untersuchen. Hierfür wurden 500 nM rekombinantes ARMS2 mit 20 % NHS und pgsA-745 Zellen inkubiert und die Komplementreaktion zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. Anschließend erfolgte die Messung der C3b Ablagerung im Durchflusszytometer.

Auf den pgsA-745 Zellen ließ sich eine zunehmende C3b Ablagerung beobachten, welche von ARMS2 nicht verstärkt wurde und die Ergebnisse der dosisabhängigen Messung bestätigte (Abbildung 19 C, D). Dies zeigt, dass lösliches ARMS2 die Komplementaktivität nicht beeinflusst. Folglich ist ARMS2 ein Oberflächen abhängiger Mediator des Komplementsystems.

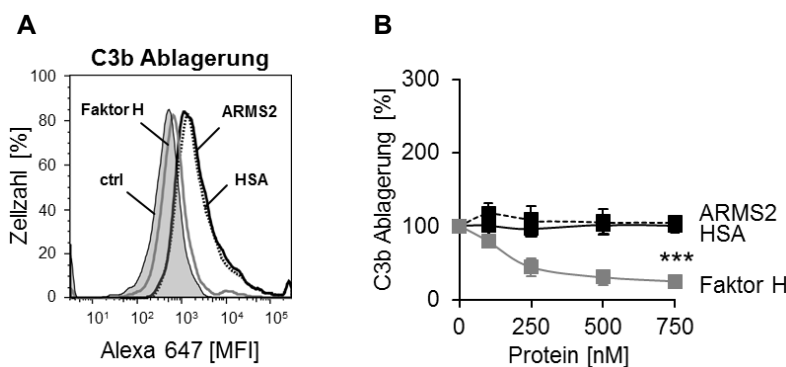
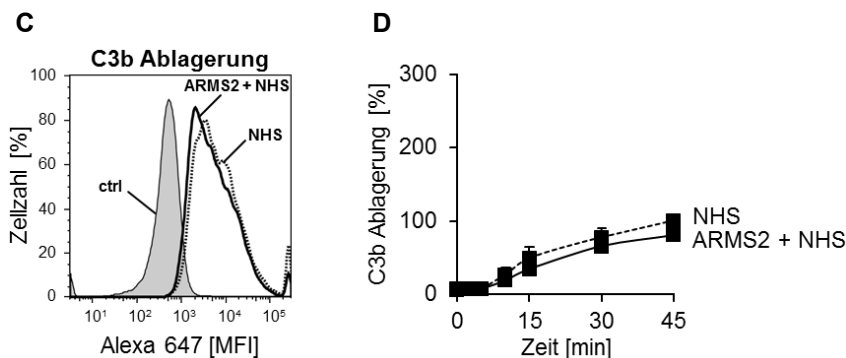


Abbildung 19: Lösliches ARMS2 verstärkt nicht die Komplementablagerung

A) ARMS2 verstärkt nicht die C3b Ablagerung auf GAG defizienten pgsA-745 Zellen. ARMS2, Faktor H sowie HSA wurden zusammen mit 20 % NHS und pgsA-745 Zellen inkubiert. Komplement wurde über den Alternativen Weg (Mg^{2+} EGTA Puffer) aktiviert und die C3b Ablagerung im Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist die C3b Ablagerung in Gegenwart von 750 nM ARMS2 (schwarze Linie), HSA (schwarze, gestrichelte Linie) sowie Faktor H (graue Linie) im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme) eines repräsentativen Versuchs. **B)** C3b Ablagerung auf pgsA-745 durch ansteigende Mengen der jeweiligen Proteine. ARMS2 und HSA beeinflussten die C3b Ablagerung nicht. Faktor H inhibierte die C3b Ablagerung um ~75 %. Der Graph zeigt normalisierte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. Die C3b Ablagerung auf Zellen ohne zusätzliches Protein wurde als 100 % definiert. (***) $p \leq 0,001$ für Faktor H).



C) C3b Ablagerung auf pgsA-745 Zellen durch 500 nM ARMS2 (schwarze Linie) im Vergleich zu NHS allein (schwarze, gestrichelte Linie) nach 45 min mit Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme) eines repräsentativen Versuchs. **D)** Zeitabhängige C3b Ablagerung durch NHS allein (gestrichelte Linie) sowie nach Zugabe von 500 nM ARMS2 (durchgezogene Linie). NHS allein zeigte eine zeitabhängige, zunehmende C3b Ablagerung auf den pgsA-745 Zellen, welche durch die Zugabe von ARMS2 nicht signifikant verstärkt wurde. Der Graph zeigt normalisierte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. Die C3b Ablagerung auf den Zellen nach 45 min durch 20 % NHS allein wurde als 100 % definiert.

Um den Einfluss von löslichem ARMS2 auf die C3-Konvertase der Flüssigphase überprüfen, wurde rekombinates ARMS2 dosisabhängig (100 – 750 nM) mit 20 % NHS inkubiert und die Komplementaktivität im Alternativen Weg (Mg^{2+} EGTA Puffer) durch Bestimmung der Anaphylatoxine C3a sowie Ba im ELISA verfolgt. Hierbei kommt es, aufgrund der spontanen Hydrolyse von C3, zur Ausbildung von löslichen C3-Konvertasen ($C3_{H2O}Bb$), die weitere C3 Moleküle in C3b sowie C3a spalten. Das Aktivierungsprodukt C3b wird dabei durch Faktor B gebunden und mittels Faktor D in Bb und Ba gespalten, wobei das Bb Fragment am C3b Molekül assoziiert bleibt und eine weitere C3-Konvertase ($C3bBb$) ausbildet. Lösliches ARMS2 zeigte keinen Einfluss auf die Produktion von C3a oder Ba in NHS. Auch das Kontrollprotein HSA beeinflusste die Anaphylatoxin-Produktion nicht signifikant. Faktor H inhibierte dagegen die C3a- und Ba Generierung. (Abbildung 20 A, B). Um den Einfluss von ARMS2 auf die C3-Konvertase zu untersuchen, erfolgte eine zeitabhängige Bestimmung der Komplementaktivität im Serum. ARMS2, HSA und Faktor H (jeweils 500 nM) wurden mit 20 % NHS inkubiert und die Komplementaktivität im Alternativen Weg (Mg^{2+} EGTA Puffer) durch Messung der Anaphylatoxine C3a sowie Ba an verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Lösliches ARMS2 zeigte eine zeitabhängige Zunahme von C3a und Ba Spaltprodukten, verstärkte jedoch nicht signifikant die Komplementaktivität im Vergleich zur Kontrolle HSA. Faktor H inhibierte dagegen den Anstieg an C3a- und Ba Spaltprodukten (Abbildung 20 C, D). Diese Ergebnisse zeigen, dass ARMS2 keine Komplement aktivierende Funktion in der Flüssigphase besitzt.

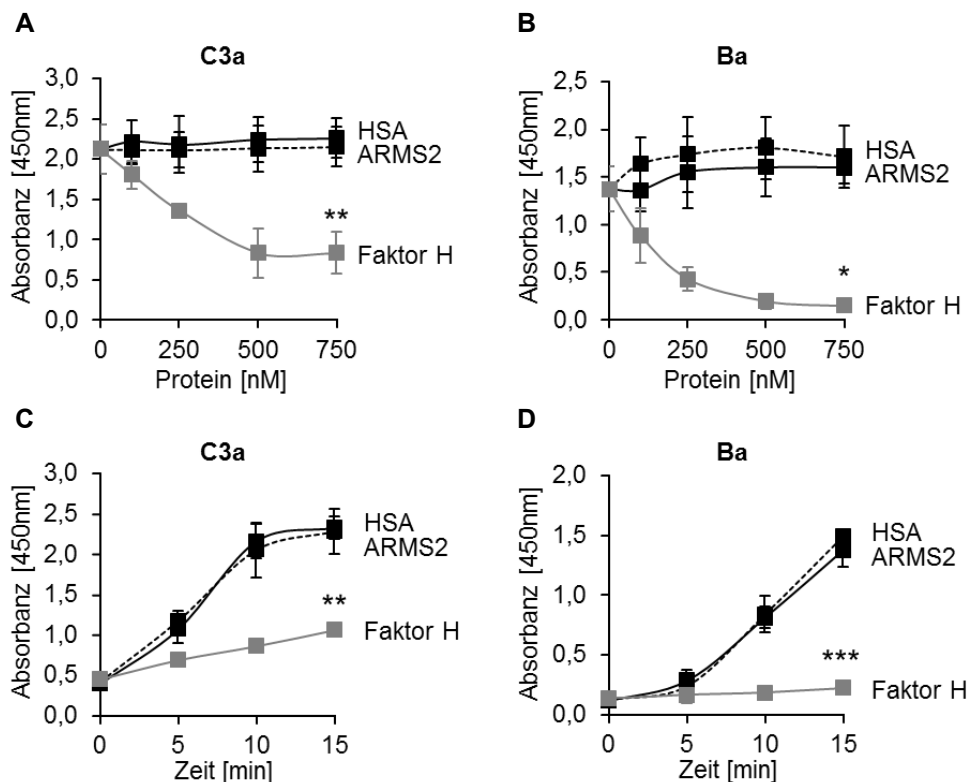


Abbildung 20: Lösliches ARMS2 besitzt keinen Einfluss auf die C3-Konvertase der Flüssigphase

Lösliches ARMS2 verstärkt nicht die Generierung der Spaltprodukte C3a und Ba. ARMS2, HSA und Faktor H wurden jeweils mit 20 % NHS inkubiert und die Spaltprodukte C3a (**A**) sowie Ba (**B**) als Marker für die Komplementaktivierung der Flüssigphase im ELISA gemessen. ARMS2 (schwarze Linie) als auch HSA (schwarze, gestichelte Linie) zeigten trotz dosisabhängiger Mengen, konstante Niveaus an C3a und Ba. Im Vergleich dazu inhibierte der Regulator Faktor H (graue Linie) sowohl die Menge an generiertem C3a als auch Ba signifikant. Für die zeitabhängige Messung der Komplementaktivität im Alternativen Weg wurden 500 nM des jeweiligen Proteins mit 20 % NHS inkubiert und die Generierung der Spaltprodukte C3a (**C**) sowie Ba (**D**) zu verschiedenen Zeitpunkten im ELISA ermittelt. ARMS2 (schwarze Linie) und HSA (schwarze, gestichelte Linie) zeigten einen zeitabhängigen Anstieg C3a- und Ba Spaltprodukten. Die Inkubation mit löslichem ARMS2 führte zu keiner zusätzlichen Verstärkung der Komplementaktivierung. Dagegen inhibierte Faktor H (graue Linie) signifikant den Anstieg der generierten Spaltprodukte. Die Graphen repräsentieren jeweils die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ für Faktor H)

Um den Einfluss von Oberflächen gebundenem ARMS2 zu untersuchen, wurde der Assay modifiziert und CHO-K1 Zellen zuerst mit rekombinanten ARMS2 (100 - 750 nM) beladen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 20 % NHS inkubiert. Die Komplementaktivität wurde durch abgelagertes C3b im Durchflusszytometer analysiert. Oberflächen gebundenes ARMS2 erhöhte die Menge an abgelagertem C3b (~450 % für 750nM ARMS2). Der Einfluss von ARMS2 auf die C3-Konvertaseaktivität auf der Zelloberfläche

bestätigte sich in einer zeitabhängigen Messung. Faktor H als auch HSA hatten keinen Einfluss auf die C3b Ablagerung (Abbildung 21).

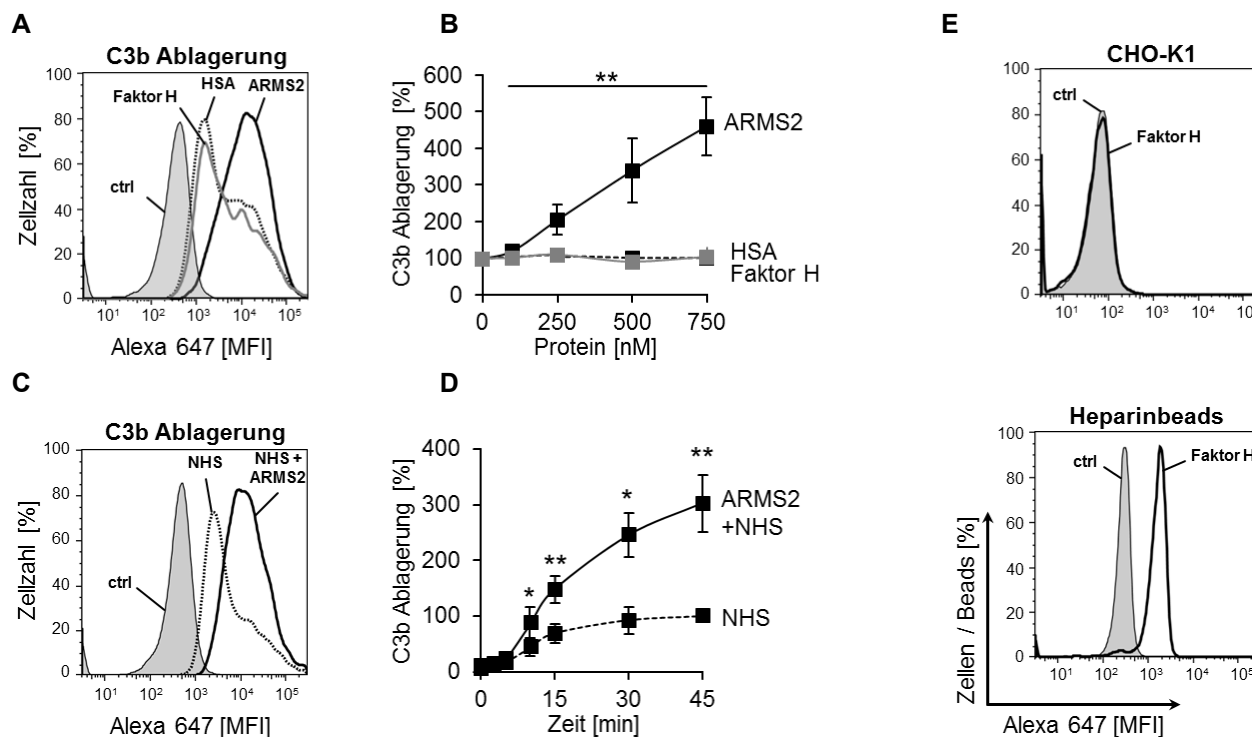


Abbildung 21: Oberflächen gebundenes ARMS2 verstärkt die Opsonisierung

A) Auf CHO-K1 Zellen gebundenes ARMS2 verstärkt die C3b Ablagerung im Alternativen Weg. ARMS2, Faktor H sowie HSA wurden auf CHO-K1 gebunden, lösliche Proteine entfernt und die Zellen mit 20 % NHS in Mg^{2+} EGTA Puffer inkubiert. Dargestellt ist die C3b Ablagerung durch 750 nM ARMS2 (schwarze Linie), HSA (schwarze, gestrichelte Linie) sowie Faktor H (graue Linie) im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme) eines repräsentativen Versuchs. **B)** Dosisabhängige C3b Ablagerung durch die jeweiligen Proteine. ARMS2 verstärkte die C3b Ablagerung auf CHO-K1 um bis zu ~450 %. Faktor H und HSA beeinflussten die C3b Ablagerung nicht. Der Graph zeigt normalisierte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. Die C3b Ablagerung auf Zellen ohne gebundenes Protein wurde als 100 % definiert. **C)** C3b Ablagerung auf CHO-K1 Zellen durch 500 nM ARMS2 (schwarze Linie) im Vergleich zu NHS allein (schwarze, gestrichelte Linie) nach 45 min und Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme) eines repräsentativen Versuchs. **D)** Zeitabhängige C3b Ablagerung durch gebundenes ARMS2 (durchgezogene Linie) sowie NHS allein (gestrichelte Linie). NHS allein zeigt eine über die Zeit zunehmende C3b Ablagerung, welche durch Oberflächen gebundenes ARMS2 verstärkt wurde. Der Graph zeigt normalisierte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. Die C3b Ablagerung auf den Zellen nach 45 min durch 20 % NHS allein wurde als 100 % definiert. **E)** Bindung von 500 nM Faktor H an CHO-K1 Zellen und Heparinbeads. Faktor H band nicht an CHO-K1 Zellen, jedoch wurde eine Bindung an Heparinbeads im Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist die Bindung von 500 nM Faktor H (schwarze Linie) im Vergleich zur Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme) eines repräsentativen Versuchs. (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$)

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Opsonisierung durch ARMS2 tatsächlich ein aktives Komplementsystem voraussetzt, wurde der Aktivierungs-Assay mit inaktivem Serum wiederholt. Rekombinantes ARMS2 wurde in ansteigenden Mengen (100 – 750 nM) in 20 % Hitze inaktivierten humanen Serum (hiHS) oder unbehandelten, normalen humanes Serum (NHS) gegeben und mit CHO-K1 Zellen inkubiert. Der Einsatz von Mg^{2+} HEPES EGTA Puffer gewährleistete eine Komplementaktivierung ausschließlich über den Alternativen Weg. Die C3b Ablagerung auf den Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. ARMS2 verstärkte die C3b Ablagerung dosisabhängig in Gegenwart von normalem, humanen Serum. ARMS2 verstärkte die C3b Ablagerung nicht, wenn Hitze inaktiviertes humanes Serum verwendet wurde und bestätigt damit die Annahme, dass ARMS2 ein aktives Komplementsystem benötigt, um die Opsonisierung auf Oberflächen zu verstärken (Abbildung 19 A, B).

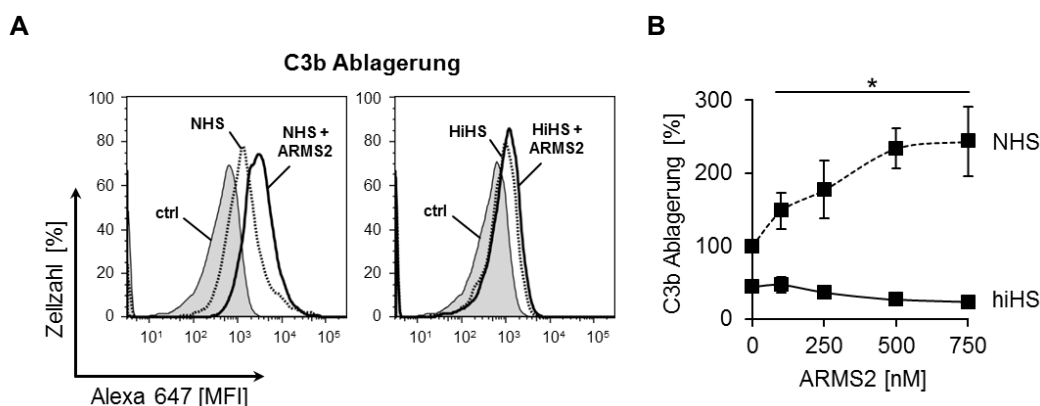


Abbildung 22: ARMS2 verstärkt die Opsonisierung von Oberflächen in Abhängigkeit eines aktiven Komplementsystems

A) ARMS2 verstärkt die C3b Ablagerung auf CHO-K1 Zellen in Gegenwart von normalen, humanen Serum (NHS), jedoch nicht wenn Hitze inaktives humanes Serum (hiHS) verwendet wurde. Dargestellt ist die C3b Ablagerung durch 750 nM ARMS2 für normales humanes Serum (NHS + ARMS2, schwarze Linie, linkes Histogramm) sowie Hitze inaktiviertes, humanes Serum (hiHS + ARMS2, schwarze Linie, mittleres Histogramm) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle des verwendeten Serums ohne zusätzliches ARMS2 (NHS / hiHS, gestichelte Linie) und der Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefüllte Histogramme) eines repräsentativen Versuchs. **B)** Vergleichende C3b Ablagerung durch ARMS2 der verwendeten Seren. Ansteigende Mengen ARMS2 verstärkten die C3b Ablagerung auf CHO-K1 in Gegenwart von NHS signifikant um ~250 %. ARMS2, welches mit hiHS inkubiert wurde, konnte die C3b Ablagerung auf CHO-K1 Zellen nicht erhöhen. Der Graph zeigt normalisierte Medianwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. Die C3b Ablagerung durch 20 % NHS auf den Zellen ohne zusätzlichem Protein wurde als 100 % definiert. (* $p \leq 0,05$)

4.1.6 Oberflächen gebundenes ARMS2 rekrutiert Properdin

Oberflächen gebundenes ARMS2 verstärkt die C3b Ablagerung und beschleunigt so die Oponisierung. Um diese Funktion detaillierter zu verstehen, wurde die Interaktion von ARMS2 mit den beteiligten Komplementkomponenten untersucht. Hierfür wurden die Komplementproteine Properdin, Faktor B, C3 sowie die C3 Fragmente C3b, iC3b, C3c und C3d auf ELISA Oberflächen immobilisiert und mit rekombinanten ARMS2 inkubiert. ARMS2 band ausschließlich immobilisiertes Properdin und keine anderen Komplementproteine oder C3 Fragmente (Abbildung 23 A). Da nur Oberflächen gebundenes ARMS2 die C3b Deposition verstärkt, wurde überprüft, ob Properdin an immobilisiertes ARMS2 bindet. Hierfür wurde rekombinantes ARMS2 auf eine ELISA Oberfläche gecoatet und mit ansteigenden Mengen Properdin (12,5 – 100 nM) inkubiert. Immobilisiertes ARMS2 wurde dabei dosisabhängig von Properdin gebunden (Abbildung 23 B). Um zu untersuchen, ob immobilisiertes ARMS2 mittels Properdin auch C3b rekrutiert, wurde Properdin an immobilisiertes ARMS2 gebunden und mit ansteigenden Mengen C3b (4 – 16 nM) inkubiert. ARMS2 gebundenes Properdin band C3b und die Bindung war dosisabhängig. Diese Interaktion wurde nicht beobachtet, wenn ARMS2 ohne Properdin mit C3b inkubiert wurde. Immobilisiertes HSA band kein Properdin und zeigte keine signifikante C3b Bindung (Abbildung 23 C).

Da Properdin alleine oder über abgelagertes C3b an Oberflächen bindet [140], wurde überprüft, ob Oberflächen gebundenes ARMS2 ohne C3b, aufgereinigtes sowie natives Properdin rekrutiert. Hierfür wurden CHO-K1 Zellen mit rekombinanten ARMS2 beladen und mit aufgereinigtem Properdin inkubiert. Die Bindung von Properdin an die Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. ARMS2, gebunden an CHO-K1 Zellen, rekrutierte aufgereinigtes Properdin (Abbildung 23 D). Wurde rekombinantes ARMS2 an CHO-K1 Zellen gebunden und mit 20 % NHS inkubiert, ließ sich eine Rekrutierung von Properdin im Alternativen Aktivierungswegs (Mg^{2+} EGTA Puffer) als auch unabhängig von einer Komplementaktivierung (EDTA Puffer) beobachten. Oberflächen gebundenes ARMS2 rekrutierte kein Properdin, wenn Properdin depletiertes, humanes Serum (FP Δ HS) verwendet wurde. HSA beeinflusste die Properdin Ablagerung nicht (Abbildung 24). Die Ergebnisse zeigen, dass Oberflächen gebundenes ARMS2 Properdin rekrutiert und so die C3-Konvertase-Aktivität verstärkt.

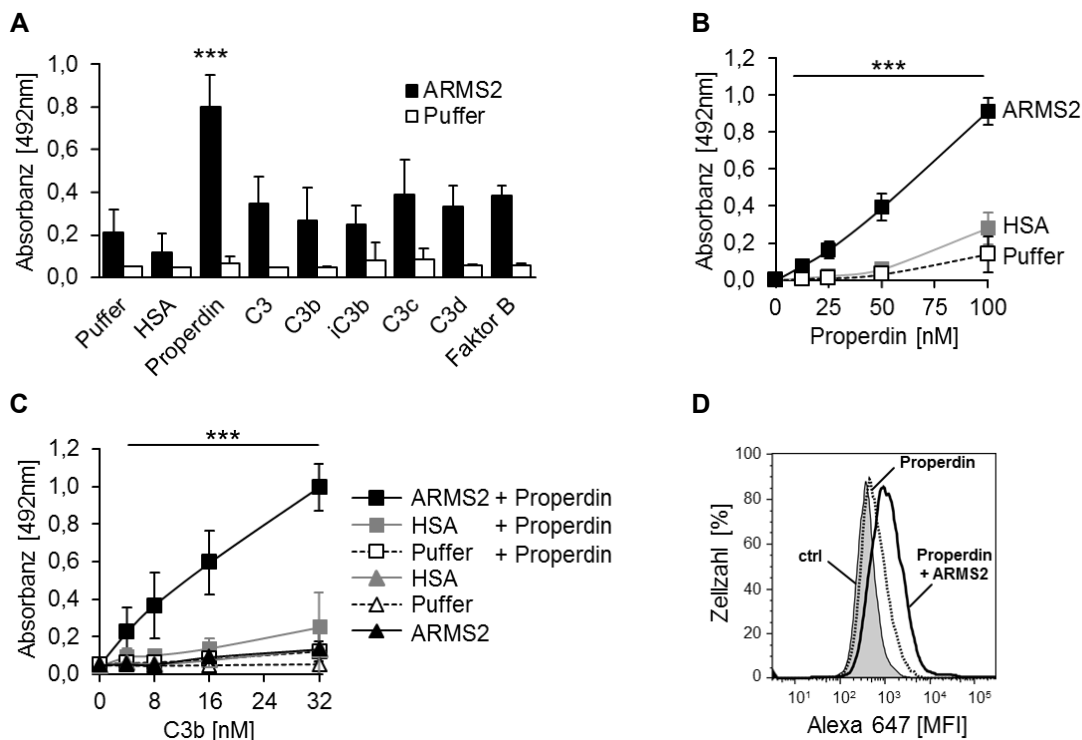


Abbildung 23: ARMS2 rekrutiert Properdin und verstärkt dadurch die C3b Ablagerung

A) ARMS2 (schwarz) bindet an immobilisiertes Properdin, jedoch nicht an Faktor B, C3 oder die Fragmente C3b, iC3b, C3c und C3d. **B)** Immobilisiertes ARMS2 (schwarz) wurde durch Properdin dosisabhängig gebunden. Properdin band nicht an HSA (grau). **C)** Durch ARMS2 rekrutiertes Properdin band C3b dosisabhängig. Keine C3b Bindung wurde für ARMS2 allein, sowie HSA mit und ohne Properdin gemessen. Die Daten (A, B und C) repräsentieren Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen ($***p \leq 0,001$ für ARMS2). **D)** ARMS2 beladene CHO-K1 Zellen wiesen eine verstärkte Properdin Bindung (schwarzes Histogramm) auf. Im Vergleich wurde die Bindung von Properdin an unbehandelte Zellen (schwarze, gestricheltes Histogramm), sowie die Antikörper-Kontrolle (ctrl, grau gefülltes Histogramm) dargestellt. Die Darstellung zeigt einen repräsentativen Versuch.

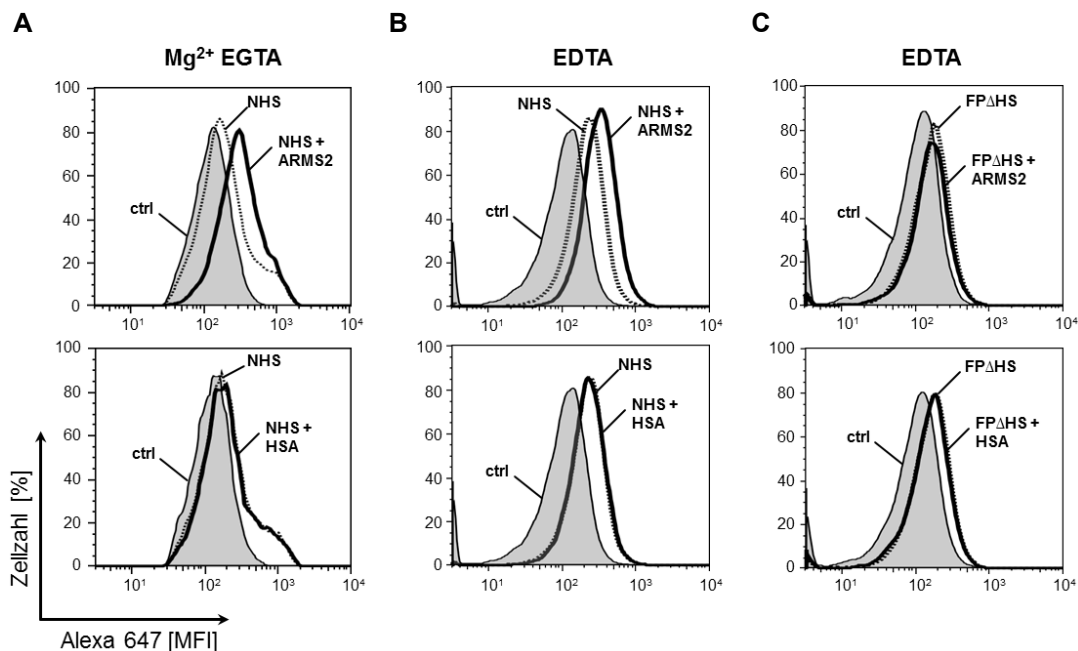


Abbildung 24: ARMS2 rekrutiert natives Properdin

A) Oberflächen gebundenes ARMS2 (obere Reihe) verstärkt die Rekrutierung von Properdin auf CHO-K1 Zellen. ARMS2 beladene CHO-K1 Zellen sowie unbehandelte Zellen wurden mit 20 % NHS inkubiert. Für die Aktivierung des Alternativen Wegs wurde Mg^{2+} EGTA Puffer verwendet und die Properdin Bindung im Durchflusszytometer bestimmt. Oberflächen gebundenes ARMS2 (NHS + ARMS2, schwarze Linie) erhöhte die Properdin Ablagerung auf CHO-K1 Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle (NHS, schwarze, gestrichelte Linie). HSA (untere Reihe) hatte keinen Einfluss auf die Properdin Bindung. **B)** ARMS2 beladene CHO-K1 Zellen sowie unbehandelte Zellen wurden mit 20 % NHS in EDTA Puffer inkubiert, um eine Komplementaktivierung zu blockieren. ARMS2 verstärkte die Bindung von Properdin an die Zellen (NHS + ARMS2, schwarze Linie) gegenüber der Kontrolle (NHS, schwarze, gestrichelte Linie). HSA verstärkte nicht die Properdin Ablagerung. **C)** ARMS2 beladene CHO-K1 Zellen sowie unbehandelte Zellen wurden mit 20 % $FP\Delta HS$ in EDTA Puffer inkubiert. Auf Zelloberflächen mit ARMS2 ($FP\Delta HS$ + ARMS2, schwarze Linie, obere Darstellung) also auch HSA ($FP\Delta HS$ + ARMS2, schwarze Linie, untere Darstellung) wurde kein Properdin gegenüber unbehandelten CHO-K1 Zellen detektiert ($FP\Delta HS$, schwarze gestrichelte Linie). Die Abbildungen A, B und C zeigen die Histogramme eines repräsentativen Versuchs. Die Antikörper-Kontrolle (ctrl) ist als grau gefülltes Histogramm dargestellt.

Die Bindung von Properdin an ARMS2 beladene CHO-K1 Zellen wurde mittels Konfokalmikroskopie visualisiert. CHO-K1 Zellen wurden mit rekombinantem ARMS2 sowie Properdin inkubiert und die Bindung der Proteine an die Zelloberfläche, allein oder zusammen, mit spezifischen Antikörper nachgewiesen. Eine Kolokalisation zwischen ARMS2 und Properdin wurde auf den Oberflächen der CHO-K1 Zellen detektiert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Oberflächen gebundenes ARMS2, Properdin rekrutiert.

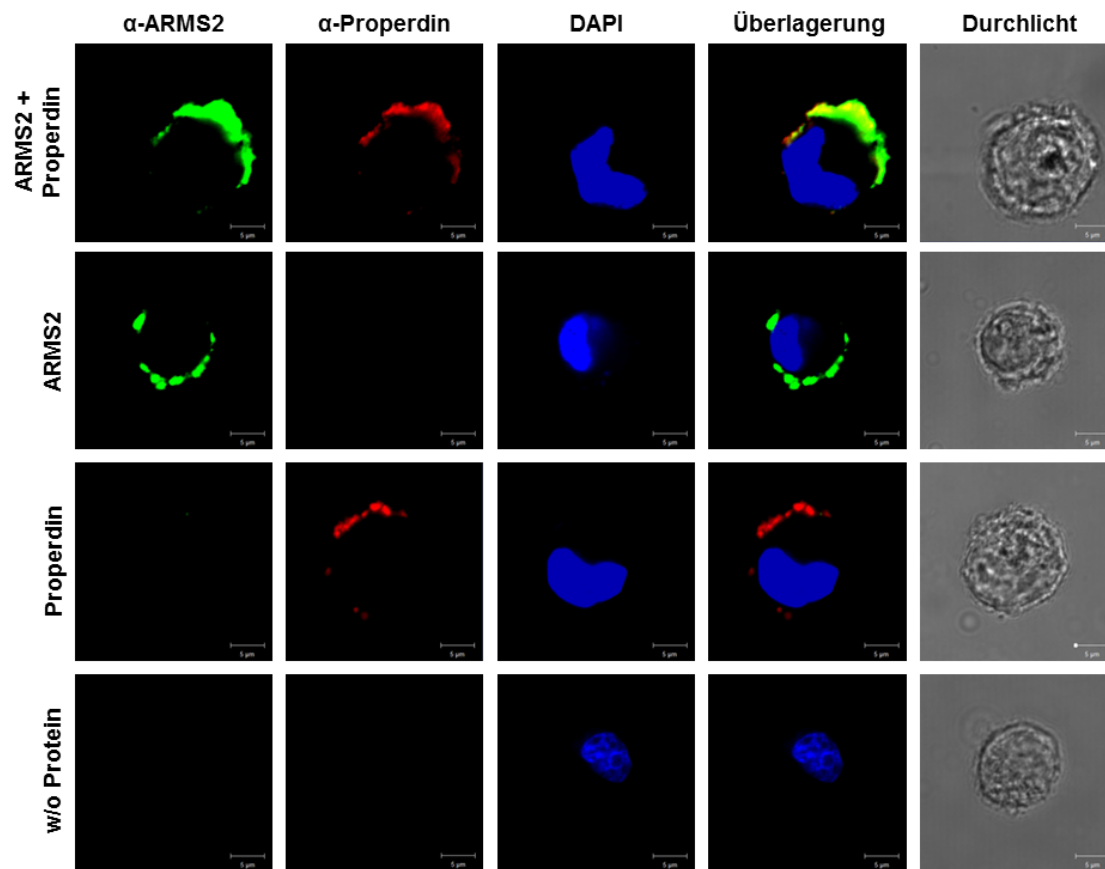


Abbildung 25: Kolokalisation von ARMS2 und Properdin auf Zelloberflächen

ARMS2 rekrutiert Properdin auf CHO-K1 Zellen. ARMS2 und Properdin wurden mit CHO-K1 Zellen inkubiert und die Bindung der Proteine durch spezifische Antikörper mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie visualisiert. Die Überlagerung zeigt eine Kolokalisation zwischen ARMS2 (grün) und Properdin (rot). CHO-K1 Zellen, welche mit rekombinanten ARMS2 oder Properdin allein inkubiert wurden, zeigten ein spezifisches Fluoreszenzsignal. Keine Fluoreszenz-Signal wiesen CHO-K1 Zellen auf, welche ohne ARMS2 und Properdin (w/o Protein) mikroskopiert wurden. Die DNA der Zellkerne wurde mittels DAPI (blau) markiert und die Zelle in einer Durchlichtaufnahme dargestellt. (Maßstabsanzeige = 5 μ m)

4.2 Expression von *ARMS2* in Phagozyten des angeborenen Immunsystems

Die Opsonisierung von apoptotischem wie nekrotischem Zellmaterial beschleunigt die Aufnahme durch phagozytierende Immunzellen [141]. Properdin, der einzig bekannte Aktivator des Komplementsystems, verstärkt diesen Effekt [142]. Um eine schnelle Phagozytose von apoptotischen Zellmaterial zu gewährleisten, sind viele Immunzellen in der Lage, eigenständig Properdin zu exprimieren [143]. Da gebundenes *ARMS2*, Properdin auf Oberflächen rekrutiert wurde untersucht, ob phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems *ARMS2* exprimieren. Isolierte Gesamt-RNA aus Zellen der Zelllinien THP-1, RAW 264.7, sowie aus Stammzellen induzierten Mikrogliazellen als auch aus dem Blut isolierte Monozyten wurde in cDNA umgeschrieben und die *ARMS2* Expression mittels PCR analysiert. Eine *ARMS2* Expression wurde in stimulierten wie nicht stimulierten THP-1, Mikrogliazellen sowie nativen Monozyten nachgewiesen, jedoch nicht in RAW 264.7 Monozyten aus der Maus (Abbildung 26). Die *ARMS2* Identität des generierten PCR-Produkts wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz des PCR-Produkts beinhaltet dabei ausschließlich Exon 1 und 2 von *ARMS2*, wodurch eine Amplifikation von genomischer DNA ausgeschlossen wurde (Abbildung 27). Das ubiquitär exprimierte *Actin* wurde in allen untersuchten Zellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *ARMS2* durch phagozytierende Immunzellen des Blutkreislaufs als auch der Retina exprimiert wird.

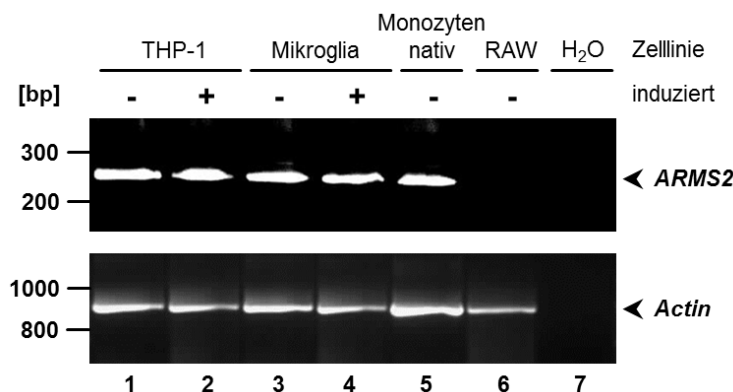


Abbildung 26: *ARMS2* Expression in Monozyten und Mikrogliazellen

Das *ARMS2* PCR Produkt (~250 bp, obere Darstellung) wird sowohl in THP-1 Zellen (Linie 1, 2) sowie Mikrogliazellen (Linie 3, 4) als auch nativen Monozyten (Linie 5) exprimiert. Die Maus-Monozyten Zelllinie RAW 264.7 (RAW, Linie 6) zeigt keine *ARMS2* Expression. Das ubiquitär exprimierte *ACTIN* Gen wurde zur Kontrolle der cDNA Synthese (~900 bp, untere Darstellung) genutzt und in allen Zelllinien amplifiziert.

ARMS2 genomisch	TTATGTCCCT	GTACCCTACA	TGCTGCGCCT	ATACCCAGGA	CCGATGGTAA	CTGAGGCGGA
ARMS2 cDNA			A TGCTGCGCCT	ATACCCAGGA	CCGATGGTAA	CTGAGGCGGA
PCR Produkt						
						fwd Primer
ARMS2 genomisch	GGGGAAAGGA	GGGCCTGAGA	TGGCAAGTCT	GTCCTCCTCG	GTGGTTCCTG	TGTCCTTCAT
ARMS2 cDNA	GGGGAAAGGA	GGGCCTGAGA	TGGCAAGTCT	GTCCTCCTCG	GTGGTTCCTG	TGTCCTTCAT
PCR Produkt						TCCTG TGTCYTTCA
ARMS2 genomisch	TTCCACTCTG	CGAGAGTCTG	TGCTGGACCC	TGGAGTTGGT	GGAGAAGGAG	CCAGTGACAA
ARMS2 cDNA	TTCCACTCTG	CGAGAGTCTG	TGCTGGACCC	TGGAGTTGGT	GGAGAAGGAG	CCAGTGACAA
PCR Produkt	TTCCACTCTG	CGAGAGTCTG	TGCTGGACCC	TGGAGTTGGT	GGAGAAGGAG	CCAGTGACAA
ARMS2 genomisch	GCAGAGGAGC	AAACTGTCTT	TATCACACTC	CATGATCCCA	GCTGCTAAAA	TCCACACTGA
ARMS2 cDNA	GCAGAGGAGC	AAACTGTCTT	TATCACACTC	CATGATCCCA	GCTGCTAAAA	TCCACACTGA
PCR Produkt	GCAGAGGAGC	AAACTGTCTT	TATCACACTC	CATGATCCCA	GCTGCTAAAA	TCCACACTGA
ARMS2 genomisch	GCTCTGCTTA	CCAGCCTTCT	TCTCTCCTGC	TGGAACCCAG	AGGAGGTTCC	AGCAGCCTCA
ARMS2 cDNA	GCTCTGCTTA	CCAGCCTTCT	TCTCTCCTGC	TGGAACCCAG	AGGAGGTTCC	AGCAGCCTCA
PCR Produkt	GCTCTGCTTA	CCAGCCTTCT	TCTCTCCTGC	TGGAACCCAG	AGGAGGTTCC	AGCAGCCTCA
ARMS2 genomisch	GCACCACCTG	ACACTGGTAA	GAAATGCAGA	TGATCAGGCC	TTA[...]GA	CATATTACTA
ARMS2 cDNA	GCACCACCTG	ACACTG				INTRON
PCR Produkt	GCACCACCTG	ACACTG				
						rev Primer
ARMS2 genomisch	AATCTATTTT	TTTTTCAGTC	TATCATCCAC	ACTGCAGCAA	GGTGATTCTG	CCAAAACATA
ARMS2 cDNA			TC TATCATCCAC	ACTGCAGCAA	GGTGA	
PCR Produkt			TC TATCATCCAC	ACTGCAGCAA	GGT	

Abbildung 27: ARMS2 Sequenz-Alignment

Das ARMS2 PCR Produkt umfasst die Sequenz des ersten sowie zweiten Exons, was eine spezifische Amplifikation der cDNA demonstriert. Das Alignment zeigt einen Ausschnitt des ARMS2 Gens (erste Reihe, ARMS2 genomisch) sowie ARMS2 cDNA (zweite Reihe) und das ARMS2 PCR Produkt (rot, dritte Reihe). Die Intronsequenz ist blau markiert. Primersequenzen in grün dargestellt.

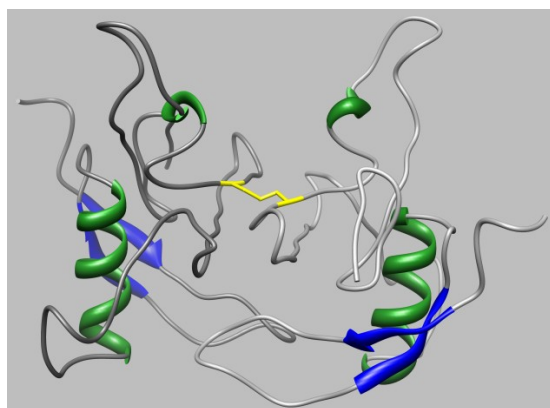
5 Diskussion

Die Altersabhängige Makuladegeneration ist mit exogenen Risikofaktoren wie dem Alter und vor allem mit Polymorphismen von Genen verschiedener Signal- sowie Stoffwechselwege verbunden. Risikovarianten von *CFI* (*Complement Factor I*), *CFB* (*Complement Factor B*), *C2*, *C3* sowie *CFH* (*Complement Factor H*) zeigen, dass die AMD vor allem eine Komplement assoziierte Erkrankung ist. Am stärksten mit der AMD assoziiert sind Risikovarianten des "Age-Related Maculopathy Susceptibility 2" (*ARMS2*) Gens im Chromosomenabschnitt 10q26. Allerdings ist die Funktion des *ARMS2* Proteins noch völlig unbekannt [107].

Die vorliegende Arbeit identifiziert *ARMS2* als Oberflächen bindendes Molekül speziell von apoptotischen und nekrotischen humanen Zellen, wo es den Komplementaktivator Properdin rekrutiert und dadurch die Opsonisierung mit C3b verstärkt.

5.1 Rekombinantes *ARMS2*

Rekombinantes *ARMS2*, das im eukaryontischen Expressionssystem *Pichia pastoris* hergestellt und mittels c-terminal fusionierten 6x His-Tag aufgereinigt wurde, zeigt unter reduzierenden Bedingungen eine Mobilität von ~16 kDa, sowie unter nicht reduzierenden Bedingungen eine zweite Proteinbande mit ~32 kDa. Vermutlich bildet *ARMS2* Homodimere aus. Eine theoretische Modellberechnung der Struktur von *ARMS2* unterstützt die Dimer-Formation, welche sich durch eine Disulfidbrücke über das an Aminosäureposition 76 lokalisierte Cystein ausbilden könnte (Abbildung 28). Natives *ARMS2* wurde bisher nur mittels Immunpräzipitation aus Gewebezellen wie der Plazenta gezeigt. Dabei wurden nur *ARMS2* Monomere von 12 kDa detektiert [128].



```

1 MLRLYPGP10 MVTEAEGKGGPEMASL20 SSSV30 PVVSFISTLRESVLDPGVGGEGAS
DKQRSKLSLSHSMIPAAKIHTEL70 CLPAFF80 SPAGTQRRFQQPQHHLTSLIIHTAAR

```

Abbildung 28: *ARMS2* Homodimer

Hypothetische Struktur eines *ARMS2* Homodimers, welches über eine Disulfidbrücke zweier Monomere gebildet wird. Die Aminosäure Cystein ist in gelb markiert. Aminosäuren für die Ausbildung von α -Helices sind grün, für β -Faltblattstrukturen blau dargestellt.

5.2 ARMS2 bindet an Zelloberflächen mittels Heparansulfat

ARMS2 bindet an CHO-K1 Zellen, jedoch nicht an die Heparansulfat defiziente CHO Mutante pgsD-677, sowie die Glykosaminoglykan (GAG) defiziente CHO Mutante pgsA-745. Daraus wurde geschlossen, dass ARMS2 über Heparansulfat an den CHO-K1 Wildtyp bindet. Die spezifische Interaktion zwischen ARMS2 und Heparansulfat belegen Konkurrenz-Assays, in denen die Bindung von ARMS2 an Heparinbeads durch Zugabe von löslichem Heparansulfat dosisabhängig inhibiert werden konnte. Lösliches Heparansulfat band dabei die Heparin-Bindedomäne von ARMS2, so dass eine Bindung an immobilisiertes Heparin auf den Beads blockiert war. Die ARMS2 Bindungsstudien zeigen erstmalig, dass ARMS2 an Zelloberflächen bindet. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme von Kortvely et al., dass ARMS2 extrazellulär ist und an Komponenten der Extrazellulären Matrix bindet [138]. Die Bindung von ARMS2 an Zelloberflächen wird dabei über Heparansulfat vermittelt.

Die Sekretion von ARMS2 wurde bisher nur *in-vitro* beschrieben. So konnten Kortvely et al. in HEK Zellen überexprimiertes ARMS2 auf Zelloberflächen und im Kulturüberstand nachweisen. Außerdem lokalisierte die Gruppe rekombinantes ARMS2 im ER von ARPE-19 Zellen. Aufgrund eines fehlenden Signalpeptides wird daher eine nicht klassische Sekretion von ARMS2 vermutet [138].

Heparansulfate sind polyanionische Oberflächenmoleküle und zählen zur Gruppe der Glykosaminoglykane (GAGs). Heparansulfate bestehen dabei aus linearen Polysacchariden, welche über ein sogenanntes „Core-Protein“ (Heparansulfat-Proteoglykane) in der Zellmembran verankert sind. Aufgrund ihrer großen Diversität an Sulfonierungsmustern interagieren Heparansulfate mit verschiedenen extrazellulären Signalproteinen und sind dadurch an zellulären Prozessen beteiligt [139]. Proteine, die Heparansulfate binden, besitzen eine oder mehrere Heparin-Bindedomänen, welche sich aus einem Cluster der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin zusammensetzen. Eine große Heterogenität an Heparin-Bindemotiven ermöglicht die Bindung von Proteinen an spezifische Sulfonierungsmuster [144]. Auch in der ARMS2 Aminosäuresequenz konnte ein solcher Cluster (Aminosäureposition 53 - 59) identifiziert werden, welcher vermutlich die Bindung an Zelloberflächen über Heparansulfat vermittelt. Das ARMS2-Bindemotiv setzt sich dabei aus zwei Lysinen und einem Arginin zusammen und entspricht der verbreiteten Consensus-Sequenz XBXBXB (B = basische AS, X = nicht basische AS) (Abbildung 29).

1 10 20 30 40 50
 MLRLYPGPMVTEAEGKGGPEMASLSSSVVPVSFISTLRESVLDPGVGGEGAS
 60 70 80 90 100
 DKQRSKLSLSHSMIPAAKIHTELCLPAFFSPAGTQRRFQQPQHHLTLSIIHTAAR
 XBXBXB

Abbildung 29: Mögliches Heparansulfat-Bindemotiv in der ARMS2 Aminosäuresequenz

Das ARMS2 Protein besteht aus einer Sequenz von 107 Aminosäuren (AS). Arginine (Arg, R) sowie Lysine (Lys, K) sind in rot hervorgehoben. Cluster aus Argininen und Lysin sind charakteristisch für Heparin-Bindemotive. Ein solches Motiv könnten die AS 53-59 beinhalten, welche der Consensus-Sequenz XBXBXB (B = K, R; X = nicht basische Aminosäuren) entspricht [144].

5.3 ARMS2 bindet an veränderte, humane Zelloberflächen

ARMS2 bindet an spät apoptotische- und nekrotische T-Zellen sowie nekrotische RPE Zellen, aber auch an Zellen der immortalisierten Zelllinie ARPE-19. ARMS2 bindet jedoch nicht an native RPE Zellen, lebende oder früh apoptotische T-Zellen als auch humane Erythrozyten. Demnach bindet ARMS2 nicht an intakte aber an veränderte, humane Zelloberflächen. Dieses spezifische Bindungsverhalten deutet darauf hin, dass ARMS2 Heparansulfatmuster insbesondere auf toten Zellen erkennt.

Die Degeneration von RPE-Zellen und Photorezeptoren ist ein spezifisches Merkmal der AMD [65, 72]. Das Absterben dieser Zellen führt dabei zu einer Anhäufung von totem Zellmaterial, an welchem sich ARMS2 ablagern könnte. Da die beschriebenen Risikovarianten von *ARMS2* zu einer verringerten Protein-Expression führen und mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sind, ist es wahrscheinlich, dass ARMS2 eine protektive Funktion auf den degenerierten Oberflächen ausübt. Die Akkumulation von toten Zellen führt dabei zu einer permanenten Komplementaktivierung, da die Expression von membranständigen Regulatoren auf nekrotischen Oberflächen vermindert ist [119]. Um dennoch eine Komplementaktivierung effektiv zu regulieren, ist der Flüssigphaseregulator Faktor H von Bedeutung [120]. Da die funktionelle Relevanz durch Mutationen in Faktor H auf nekrotischen Zellen beschrieben ist [122 - 124], wurde eine Rolle von ARMS2 im Komplementsystem vermutet.

5.4 ARMS2 verstärkt die Opsonisierung von Zelloberflächen

ARMS2 verstärkt die C3b Ablagerung auf CHO-K1 Zellen. Dieser Effekt wurde nicht auf GAG defizienten CHO Mutanten (pgsA-745) beobachtet, an die ARMS2 nicht bindet und zeigt, dass Oberflächen gebundenem ARMS2 für die Verstärkung verantwortlich ist. Auch wenn CHO-K1 Zellen zuerst mit ARMS2 beladen und die Komplementaktivität in aktivem Serum über die Zeit verfolgt wurde, war die C3b Ablagerung signifikant verstärkt. Im Serum gelöstes ARMS2, ohne Zellen, beeinflusste die Komplementaktivität nicht. Die Produktion der Anaphylatoxine C3a und Ba blieb durch lösliches ARMS2 unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen erstmals eine ARMS2 Proteinfunktion: ARMS2 bindet an spezifische Oberflächen und verstärkt die C3b Generierung und Deposition. Für diese Funktion benötigt ARMS2 ein aktives Komplementsystem, da dieser Effekt nicht in Hitze inaktivem Serum beobachtet wurde.

Die Komplement vermittelte Opsonisierung von veränderten, körpereigenen Zellen dient vor allem der effektiven Beseitigung durch phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten und Makrophagen [141]. Hierbei kommt es zur Ablagerung von C3(H₂O), C3b, Properdin sowie IgM, was zur Ausbildung von C3-Konvertasen des alternativen- und klassischen Aktivierungswegs führt [141, 142]. Beide Wege amplifizieren die Komplementkaskade über C3 und vermitteln so eine Deposition von C3b auf die Oberfläche. Die Opsonisierung mit C3b erleichtert das Erkennen und Aufnehmen der veränderten Zellen durch CR3 exprimierende Phagozyten [141].

Im alternden Auge fallen permanent apoptotische Zellen und körpereigenes Zellmaterial an, welches schnellstmöglich aus dem retinalen Raum entfernt werden muss, um eine Ablagerung auf der Basalmembran zu verhindern [59]. Vermutlich sind aktivierte Mikrogliazellen als auch ein strikt reguliertes Komplementsystem essentiell für die Beseitigung und Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase. Eine eingeschränkte Beseitigung führt dabei zur Akkumulation der toten Zellen. Drusen als auch akkumuliertes, totes Zellmaterial, was sich an der Bruch'schen Membran ablagert, stellt eine Diffusionsbarriere dar und verursacht eine zunehmende Unterversorgung der RPE Zellen sowie Photorezeptoren mit Sauerstoff und Nährstoffen [72]. Außerdem bewirkt die Akkumulation an degeneriertem Zellmaterial ein Ablösen des RPEs, was die Versorgung der Photorezeptoren weiter vermindert [70]. Verbleibendes Zellmaterial verursacht eine permanente Komplementaktivierung und chronische Entzündungsprozesse, die langfristig auch umliegende intakte Zellen schädigen [117, 118].

Es kann daher angenommen werden, dass ARMS2 die Opsonisierung von spät apoptotischen und nekrotischen Oberflächen in der Retina unterstützt, um deren effiziente Phagozytose zu

verstärken und so die retinale Homöostase aufrechterhält. Die verstärkte Opsonisierung von degenerierten Zellen durch ARMS2 würde auch eine gleichzeitige Komplementregulation auf Ebene der C3- und C5-Konvertase erfordern. Vermutlich übernimmt Faktor H diese Regulation, da gezeigt ist, dass Faktor H an apoptotische- und nekrotische Zellen über Heparansulfat und oxidierte Lipide bindet [124]. Gleichzeitig wirkt Faktor H antiinflammatorisch und verstärkt unabhängig die Phagozytose [121].

5.5 ARMS2 rekrutiert Properdin auf Zelloberflächen

Da Oberflächen gebundenes ARMS2 die Opsonisierung verstärkt, wurde zunächst eine Interaktion von ARMS2 mit Komplementkomponenten der C3-Konvertase vermutet. Bindungsstudien zeigten eine Interaktion von ARMS2 mit dem Komplementaktivator Properdin, jedoch nicht mit Faktor B, C3 oder den C3-Fragmenten C3b, iC3b, C3c und C3d. Die Interaktion von ARMS2 mit Properdin ist spezifisch und konnte auch auf CHO-K1 Zellen beobachtet werden. Zudem rekrutiert Oberflächen gebundenes ARMS2 auch natives Properdin aus Komplement aktivem- und inaktivem Serum. Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass ARMS2 den Komplementaktivator Properdin auf Zelloberflächen rekrutiert und dadurch die Komplementaktivität auf C3 Ebene moduliert. ARMS2 verstärkte die Opsonisierung mittels C3b nur über rekrutiertes Properdin, da Oberflächen gebundenes ARMS2 ohne Properdin kein C3b bindet.

Properdin ist als Stabilisator der C3-Konvertase bekannt. Für die Ausbildung von C3-Konvertasen muss sich das Aktivierungsprodukt C3b mittels seiner aktiven Thioestergruppe kovalent auf Oberflächen ablagern. Bindet Faktor B an C3b, wird durch die Faktor D vermittelte Spaltung in Bb und Ba eine C3-Konvertase (C3bBb) ausgebildet, welche weitere C3 Moleküle spaltet und C3b generiert. Werden C3-Konvertasen durch Properdin gebunden, verlängert sich ihre Halbwertszeit um das 10-fache [140]. Properdin ist der einzig bekannte Aktivator des Komplementsystems und vermag nicht nur die C3-Konvertase zu stabilisieren, sondern bindet auch unabhängig von abgelagertem C3b an apoptotische als auch nekrotische Zelloberflächen. Dabei fungiert freie DNA als Ligand für die Bindung [142, 146]. Oberflächen gebundenes Properdin wiederum dient als Ausgangspunkt für die Komplementablagerung, da es C3b bindet und eine „Plattform“ für die Assemblierung von C3-Konvertasen des Alternativen Aktivierungswegs bildet [145]. Ablagertes C3b und Properdin unterstützten dabei Phagozytose von apoptotischem wie nekrotischem Zellmaterial [142].

Oberflächen gebundenes ARMS2 verstärkt deutlich die Ablagerung von Properdin und dadurch auch die Opsonisierung der Oberfläche mittels C3b. Deshalb kann angenommen werden, dass ARMS2 die Beseitigung von abgestorbenen Zellen oder Zellmaterial durch Phagozyten beschleunigt.

5.6 ARMS2 Expression in Phagozyten des angeborenen Immunsystems

Humane Monozyten als auch aus Stammzellen differenzierte humane Mikrogliazellen exprimieren konstitutiv *ARMS2*. Eine Stimulation mit PMA zeigte keinen Einfluss auf die Expressionsrate. Die Expression von *ARMS2* ist bislang nur in den Geweben der Retina sowie Plazenta wiederholt gezeigt [125, 128, 129]. In dieser Arbeit wurden erstmals Monozyten als auch Mikrogliazellen, letztere sind spezialisierte Phagozyten im immunprivilegierten retinalen Raum, als *ARMS2* exprimierende Zellen identifiziert. Die *ARMS2* Expression in Mikrogliazellen zeigt, dass *ARMS2* im Auge exprimiert wird und seine Funktion dort ausübt. Deshalb kann angenommen werden, dass ARMS2 die Opsonisierung und Phagozytose von Zellmaterial in der Retina verstärkt.

5.7 Mögliche ARMS2 Funktion im Kontext der AMD

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist es gelungen, ARMS2 als ein Komplement assoziiertes Protein zu charakterisieren. ARMS2 übt vermutlich einen protektiven Effekt aus, indem ARMS2 die Phagozytose durch eine verstärkte Opsonisierung von Abbauprodukten und abgestorbenen Zellen unterstützt. Dabei wird ARMS2 von aktivierten Mikrogliazellen, welche den subretinalen Raum ständig abtasten, exprimiert und vermutlich sezerniert. Gleichzeitig ist eine Sekretion von Properdin vorstellbar, da Properdin von Phagozyten, wie Monozyten und dendritischen Zellen, exprimiert und sezerniert wird. Die Expression von Properdin ermöglicht Immunzellen, Komplement lokal über den Alternativen Weg zu aktivieren [143].

Im Auge könnte ARMS2 bei der Bereinigung von degenerierten Zellen beteiligt sein, welche aufgrund altersbedingter physiologischer Veränderungen gehäuft auftreten. Dabei bindet ARMS2 mittels Heparansulfat an apoptotische und nekrotische Zelloberflächen, um Properdin zu rekrutieren. Rekrutiertes Properdin verstärkt die C3-Konvertaseaktivität des Alternativen Wegs. Die damit verbundene erhöhte Opsonisierung durch C3b dient vermutlich einer effektiven Beseitigung des degenerierten Zellmaterials. Da *ARMS2* Risikovarianten in AMD Patienten zu verringerten Proteinmengen von *ARMS2* führen und so zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko

beitragen [128], ist es wahrscheinlich, dass ARMS2 eine protektive Funktion gegenüber der AMD ausübt. Es ist daher vorstellbar, dass ARMS2 an der Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase, insbesondere der Makula, beteiligt ist und eine ARMS2 Defizienz mit einer zunehmenden Akkumulation an abgestorbenen Zellen einhergeht. Das akkumulierte Zellmaterial repräsentiert dabei eine Oberfläche, auf der Komplement kontinuierlich aktiviert wird und so zu chronischen Entzündungsprozessen führt, welche in den Spätformen der AMD beschrieben sind. Die verstärkende Opsonisierung mit C3b durch Oberflächen gebundenes ARMS2 macht gleichzeitig eine Komplementregulation notwendig, um eine Ausbildung des TCC zu verhindern und eine durch Entzündungsmarker vermittelte Inflammation zu unterdrücken. Die Regulation von Komplement ist notwendig, damit eine Freisetzung von potentiell gefährlichen Auto-Antigenen verhindert wird [141]. Da die Expression von membranständigen Regulatoren auf nekrotischen Zellen reduziert ist, muss eine Regulation der C3 Ebene durch Faktor H erfolgen [119]. Faktor H kann dabei über Heparansulfat, oxidierte Lipide oder mittels mCRP an degenerierte Zellen binden und dort gezielt seine Funktion ausüben [124]. So ist Faktor H in der Lage, ausgebildete C3-Konvertasen zu destabilisieren und dient außerdem als Co-Faktor für die Faktor I vermittelte C3b Inaktivierung (iC3b). Abgelagertes iC3b wird ähnlich dem C3b durch CR3 exprimierende Phagozyten erkannt, bildet jedoch keinen Ausgangspunkt für den Aufbau des TCC. Durch die Faktor H vermittelte Inaktivierung von abgelagertem C3b wird eine nicht inflammatorische Beseitigung der degenerierten Zellen gewährleistet [120, 147].

Die in dieser Arbeit beschriebene Proteinfunktion bietet einen neuen Erklärungsansatz für die AMD: ARMS2 verstärkt die Opsonisierung von apoptotischem sowie nekrotischen Zellen im retinalen Raum und sorgt damit für eine schnelle Bereinigung des Zellmaterials. Die gleichzeitige Aktivierung des Komplementsystems wird vermutlich über Komplementregulatoren wie Faktor H begrenzt (Abbildung 30). Dieses Modell könnte erklären, warum Mutationen im *ARMS2*- und *CFH* Gen signifikant mit der Entwicklung einer AMD assoziiert sind.

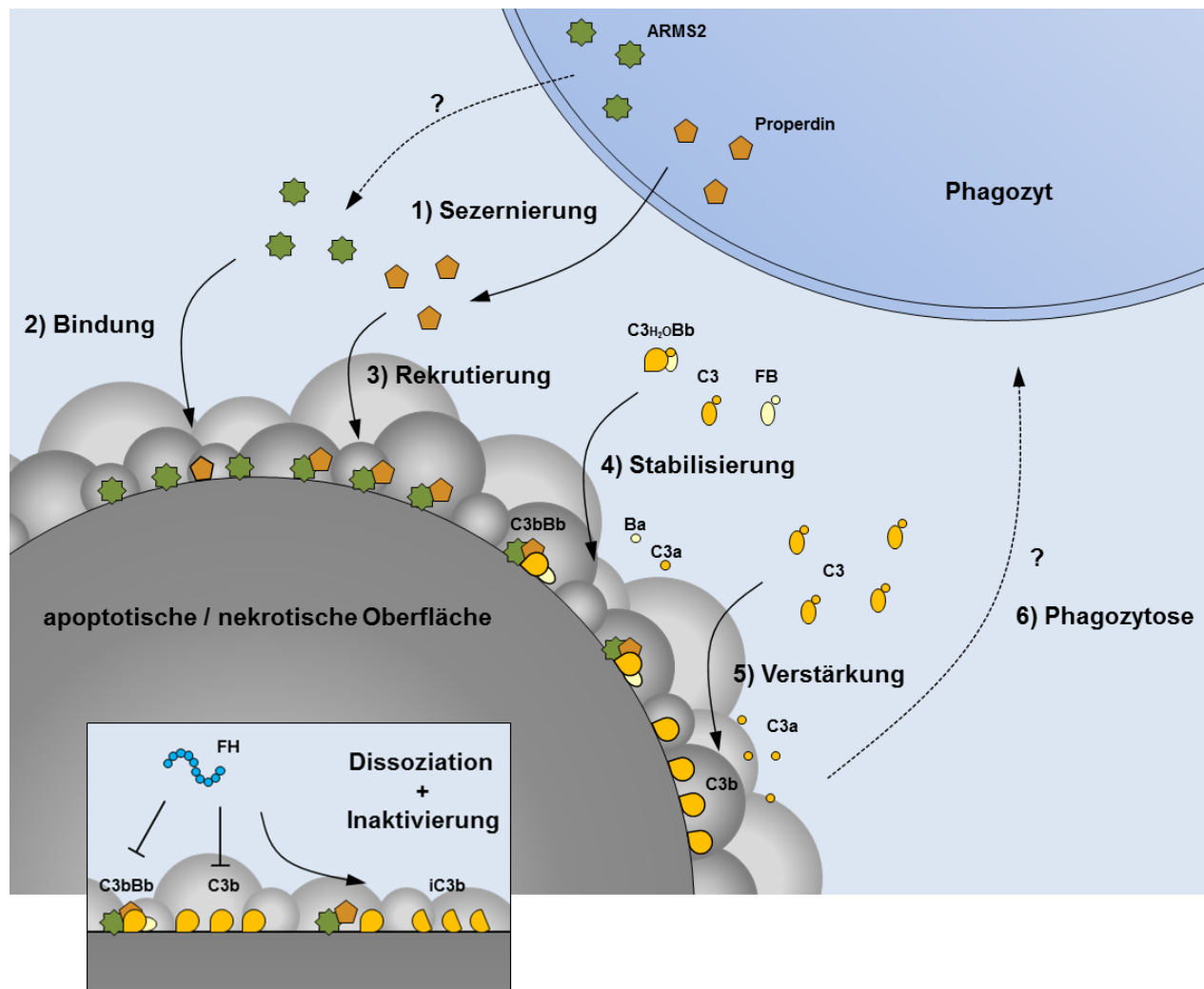


Abbildung 30: Mögliche Komplement assoziierte Funktion von ARMS2

Phagozyten, welche an der Beseitigung von apoptotischen und nekrotischen Zellen beteiligt sind, exprimieren ARMS2. Das ARMS2 Protein wird anschließend über einen bislang unbekanntem nicht klassischen Sekretionsweg sezerniert (1). Sekretiertes ARMS2 bindet mittels Heparansulfat an apoptotische und nekrotische Oberflächen (2) und rekrutiert Properdin (3). Dieses dient als Ausgangspunkt für eine Komplementaktivierung, indem C3-Konvertasen aufgebaut und stabilisiert werden (4). Ausgebildete C3-Konvertasen spalten weitere C3 Moleküle, um mehr C3b abzulagern (5). Die verstärkte Opsonisierung von veränderten Zellen unterstützt die Phagozytose (6) durch die involvierten Immunzellen. Faktor H gewährleistet die nicht inflammatorische Beseitigung der degenerierten Zellen, indem die aufgebauten C3-Konvertasen destabilisiert und abgelagertes C3b inaktiviert (iC3b) wird.

Literaturverzeichnis

1. Huston, David P. MD, *The Biology of the Immune System*. Journal of the American Medical Association 1997, **278** (22): 1804-1814
2. Medzhitov R, Janeway C Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol Rev. 2000, 173: 89-97
3. Netea MG, *Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence*. Eur J Clin Invest 2013, **43** (8): 881–884
4. Tucker W. LeBien and Thomas F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood. 2008, **112** (5): 1570-80
5. K. Schepers, R. Arens and T. N. M. Schumacher, *Dissection of cytotoxic and helper T cell responses*. Cell. Mol. Life Sci. 2005, **62**: 2695–2710
6. Talal A. Chatila, *Molecular Mechanisms of Regulatory T-Cell Development*. Chem Immunol Allergy. 2008, **94**: 16-28
7. Zipfel PF, Hallström T, Riesbeck K., *Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes: tipping the balance*. Mol Immunol. 2013, 56 (3): 152-160
8. Morgan BP, et al., *Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses*. Immunol Lett. 2005. **97** (2): 171-9
9. Stephan AH, Barres BA, Stevens B, *The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease*. Annu Rev Neurosci. 2012, **35**: 369-89
10. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Ahn BJ, Fang S, Parsa AT, *The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration*. Inflamm Res. 2010, 59 (11): 897-905
11. Walport MJ, *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001, **344** (14): 1058-66
12. Walport MJ, *Complement. Second of two parts*. N Engl J Med, 2001, **344** (15): 1140-4
13. Zipfel PF, Skerka C, *Complement regulators and inhibitory proteins*. Nat Rev Immunol. 2009, **10**: 729-40
14. Degn SE, Thiel S, *Humoral pattern recognition and the complement system*. Scand J Immunol. 2013, **78** (2): 181-93
15. Dunkelberger JR, Song WC, *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. Cell Res. 2010 **20** (1): 34-50
16. Markiewski MM, Lambris JD, *The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight*. Am J Pathol. 2007, **171** (3): 715-27
17. Klos A, et al., *The role of the anaphylatoxins in health and disease*. Mol Immunol. 2009 **46** (14): 2753-66

18. Hadders MA et al., *Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9*. Cell Rep. 2012, 29 (3): 200-7
19. Noris M, Remuzzi G, *Overview of complement activation and regulation*. Semin Nephrol. 2013, **33** (6): 479-92
20. Clark SJ, Bishop PN, Day AJ, *Complement factor H and age-related macular degeneration: the role of glycosaminoglycan recognition in disease pathology*. Biochem Soc Trans. 2010, 38 (5): 1342-8
21. Trouw LA, et al., *C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack*. J Biol Chem. 2007, 282 (39): 28540-8
22. Holers VM, *Complement and its receptors: new insights into human disease*. Annu Rev Immunol. 2014, **32**: 433-59
23. Schvartz I, Seger D, Shaltiel S, *Vitronectin*. Int J Biochem Cell Biol. 1999, **31** (5): 539-44
24. de Cordoba SR, Tortajada A, Harris CL, Morgan BP, *Complement dysregulation and disease: from genes and proteins to diagnostics and drugs*. Immunobiology. 2012, **217** (11): 1034-46
25. Karpman D, Sartz L, Johnson S, *Pathophysiology of typical hemolytic uremic syndrome*. Semin Thromb Hemost. 2010, **36** (6): 575-85
26. Keir LS, Marks SD, Kim JJ, *Shigatoxin-associated hemolytic uremic syndrome: current molecular mechanisms and future therapies*. Drug Des Devel Ther. 2012, 6: 195-208
27. Bresin E, et al., *Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype*. J Am Soc Nephrol. 2013, 24 (3): 475-86
28. Kavanagh D, Goodship TH, Richards A, *Atypical hemolytic uremic syndrome*. Semin Nephrol. 2013, 33 (6): 508-30
29. Pérez-Caballero D et al., *Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome*. Am J Hum Genet, 2001, **68** (2): 478-84
30. Zipfel PF, et al., *DEAP-HUS: deficiency of CFHR plasma proteins and autoantibody-positive form of hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol. 2010, **25** (10): 2009-19
31. Skerka C, et al., *Autoantibodies in haemolytic uraemic syndrome (HUS)*. Thromb Haemost. 2009, **101** (2): 227-32
32. Bomback AS, Appel GB, *Pathogenesis of the C3 glomerulopathies and reclassification of MPGN*. Nat Rev Nephrol. 2012, **8** (11): 634-42
33. Rabasco-Ruiz C, et al., *C3 glomerulopathies: A new perspective on glomerular diseases*. Nefrologia. 2013, 33 (2): 164-70
34. Alchi B, Jayne D, *Membranoproliferative glomerulonephritis*. Pediatr Nephrol. 2010, **25** (8): 1409-18

35. Appel GB, et al., *Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease): an update*. J Am Soc Nephrol. 2005, **16** (5): 1392-403
36. Nakopoulou L, *Membranoproliferative glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant. 2001, **16** (6): 71-3
37. Appel GB, *Membranoproliferative glomerulonephritis: Mechanisms and Treatment*. Contrib Nephrol. 2013, **181**: 163–174
38. Servais A, et al., *Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3glomerulopathies*. Kidney Int. 2012, 82 (4): 454-64
39. Kolev MV, et al., *Implication of Complement System and its Regulators in Alzheimer's Disease*. Curr Neuropharmacol. 2009, **7** (1): 1-8
40. Armstrong RA, *The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease*. Folia Neuropathol 2009, 47 (4): 289-299
41. Aiyaz M, et al., *Complement activation as a biomarker for Alzheimer's disease*. Immunobiology 2012, **217**: 204-215
42. Shen Y, et al., *Neuronal expression of mRNAs for complement proteins of the classical pathway in Alzheimer brain*. Brain Res. 1997, 769 (2): 391-5
43. Kishore U, et al., *Modular organization of the carboxyl terminal, globular head region of human C1q A, B, and C chains*. J Immunol. 2003, 171 (2): 812-20
44. Wyss-Coray T, et al., *Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99 (16): 10837-42
45. Deane KD, *Can rheumatoid arthritis be prevented?* Best Pract Res Clin Rheumatol. 2013, **27** (4): 467-85
46. Davignon JL, et al., *Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford). 2013, **52** (4): 590-8
47. Piccoli AK, et al., *Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis*. Rev Bras Reumatol. 2011, 51 (5): 503-10
48. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW, *Rheumatoid arthritis*. Lancet. 2010, **376** (9746): 1094-108
49. da Mota LM, dos Santos Neto LL, de Carvalho JF, *Autoantibodies and other serological markers in rheumatoid arthritis: predictors of disease activity?* Clin Rheumatol. 2009, 28 (10): 1127-34
50. Ballanti E, et al., *Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors*. Autoimmun Rev. 2011, **10** (10): 617-23
51. Okroj M, et al., *Rheumatoid arthritis and the complement system*. Ann Med. 2007, **39** (7): 517-30
52. Fernández-Robredo P, et al., *Current Treatment Limitations in Age-Related Macular Degeneration and Future Approaches Based on Cell Therapy and Tissue Engineering*. J Ophthalmol. 2014, **2014**: 510285

53. Pascolini D, et al., *2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies*. Ophthalmic Epidemiol. 2004, 11 (2): 67-115
54. Diezel M, Farwick A, Hense HW, *Genetik und Risikofaktoren der exsudativen AMD*. Ophthalmologe 2010, **107**: 1103-1108
55. Kirchhof B, *Die altersabhängige Makuladegeneration*. Deutsches Ärzteblatt 2000, **97** (12): 1458-62
56. Knauer C, Pfeiffer N, *Erbblindung in Deutschland – heute und 2030*. Ophthalmologe 2006, **103**: 735-741
57. Ding X, Patel M, Chan CC, *Molecular pathology of age-related macular degeneration*. Prog Retin Eye Res. 2009, 28 (1): 1-18
58. Lim LS, et al., *Age-related macular degeneration*. Lancet. 2012, **379** (9827): 1728-38
59. Ehrlich R, et al., *Age-related macular degeneration and the aging eye*. Clin Interv Aging. 2008, **3** (3): 473-82
60. Kaarniranta K, et al., *Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration*. Autophagy. 2013, 9 (7): 973-84
61. Age-Related Eye Disease Study Research Group., *A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8*. Arch Ophthalmol. 2001, **119** (10): 1417-36
62. Velilla S, et al., *Smoking and Age-Related Macular Degeneration: Review and Update*. J Ophthalmol. 2013, **2013**: 895147
63. Grossniklaus HE, et al., *Anatomic alterations in aging and age-related diseases of the eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013, 54 (14): ORSF23-7
64. Lamb TD, *Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina*. Prog Retin Eye Res. 2013, **36**: 52-119
65. Dunaief JL, *The role of apoptosis in age-related macular degeneration*. Arch Ophthalmol. 2002, 120 (11): 1435-42
66. Plafker SM, O'Mealey GB, Szweda LI, *Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium*. Int Rev Cell Mol Biol. 2012, **298**: 135-77
67. Kay P, Yang YC, Paraoan L, *Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration*. J Cell Mol Med. 2013, 17 (7): 833-43
68. Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO, *Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions*. Prog Retin Eye Res. 2013, 34: 19-48
69. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ, *Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review*. Eye (Lond). 1995, 9 (6): 763-71

70. Bird AC, *Pathogenesis of retinal pigment epithelial detachment in the elderly; the relevance of Bruch's membrane change*. Eye (Lond). 1991, 5 (1): 1-12
71. Jackson GR, Owsley C, Curcio CA, *Photoreceptor degeneration and dysfunction in aging and age-related maculopathy*. Ageing Res Rev. 2002, 1 (3): 381-96
72. Bhutto I, Luttj G, *Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor / retinal pigmentepithelium / Bruch's membrane / choriocapillaris complex*. Mol Aspects Med. 2012, 33 (4): 295-317
73. Booij JC, et al., *The dynamic nature of Bruch's membrane*. Prog Retin Eye Res. 2010, 29 (1): 1-18
74. Starita C, et al., *Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease*. Exp Eye Res. 1996, 62 (5): 565-72
75. Curcio CA, et al. *The oil spill in ageing Bruch membrane*. Br J Ophthalmol. 2011, 95 (12): 1638-45
76. Ramrattan RS, et al., *Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994, 35 (6): 2857-64
77. Grunwald JE, Hariprasad SM, DuPont J, *Effect of aging on foveolar choroidal circulation*. Arch Ophthalmol. 1998, 116 (2): 150-4
78. Mullins RF, et al., *Choriocapillaris vascular dropout related to density of drusen in human eyes with early age-related maculardegeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011, 52 (3): 1606-12
79. Kliffen M, et al., *Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy*. Br J Ophthalmol. 1997, 81 (2): 154-62.
80. Veritti D, Sarao V, Lanzetta P, *Neovascular age-related macular degeneration*. Ophthalmologica. 2012, 227 (1): 11-20
81. Steel DH, Sandhu SS, *Submacular haemorrhages associated with neovascular age-related macular degeneration*. Br J Ophthalmol. 2011, 95 (8): 1051-7
82. Kaplan HJ, Niederkorn JY, *Regional immunity and immune privilege*. Chem Immunol Allergy. 2007, 92: 11-26
83. Perez VL, et al., *The eye: A window to the soul of the immune system*. J Autoimmun. 2013, 45: 7-14
84. Anderson DH, et al., *The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited*. Prog Retin Eye Res. 2010, 29 (2): 95-112
85. Holtkamp GM, et al., *Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes*. Prog Retin Eye Res. 2001, 20 (1): 29-48
86. Griffith TS, et.al., *Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege*. Science. 1995, 270 (5239): 1189-92
87. Shastri A, Bonifati DM, Kishore U, *Innate immunity and neuroinflammation*. Mediators Inflamm. 2013, 2013: 342931

88. Langmann T, *Microglia activation in retinal degeneration*. J Leukoc Biol. 2007, **81** (6): 1345-51
89. Garden GA, Möller T, *Microglia biology in health and disease*. J Neuroimmune Pharmacol 2006, **1** (2): 127-37
90. Czeh M, Gressens P, Kaindl AM, *The yin and yang of microglia*. Dev Neurosci. 2011, **33** (3-4): 199-209
91. Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ, *Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice*. J Neurosci Res. 2013, **91** (9): 1143-51
92. Boche D, Perry VH, Nicoll JA, *Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain*. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013, **39** (1): 3-18
93. Karlstetter M, Ebert S, Langmann T, *Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models*. Immunobiology. 2010, **215** (9-10): 685-91
94. Xu H, et al., *Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse*. Glia. 2007, **55** (11): 1189-98
95. Green WR, et al., *Histopathology of age-related macular degeneration*. Mol Vis. 1999, **5**: 27
96. Wang L, et al., *Abundant lipid and protein components of drusen*. PLoS One. 2010, **5** (4): 10329
97. Curcio CA, Medeiros NE, Millican CL, *Photoreceptor loss in age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1996, **37** (7): 1236-49
98. Borrelli E, Bocci V, *Visual Improvement Following Ozonotherapy in Dry Age Related Macular Degeneration; a Review*. Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol. 2013, **2** (2): 47-51
99. Göbel AP, et al. *Imaging geographic atrophy in age-related macular degeneration*. Ophthalmologica. 2011, **226** (4): 182-90
100. Klaver CC, *Genetic risk of age-related maculopathy: Population-based familial aggregation study*. Arch Ophthalmol. 1998, **116** (12): 1646-51
101. Edwards AO, et al., *Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration*. Science. 2005, **308** (5720): 421-4
102. Klein RJ, et al., *Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration*. Science. 2005, **308** (5720): 385-9
103. Jakobsdottir J, et al., *Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26*. Am J Hum Genet. 2005, **77** (3): 389-407
104. Rivera A, et al., *Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk*. Hum Mol Genet. 2005, **14** (21): 3227-36
105. Gold B, et al., *Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration*. Nat Genet. 2006, **38** (4): 458-62

106. Yates JR, et al., *Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration*. N Engl J Med. 2007, **357** (6): 553-61
107. Fritsche LG, et al., *Seven new loci associated with age-related macular degeneration*. Nat Genet. 2013, 45 (4): 433-9
108. Rosenfeld PJ, et al., *Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration*. N Engl J Med. 2006, **355** (14): 1419-31
109. Schmitz-Valckenberg S, et al., *Therapy approaches for geographic atrophy*. Ophthalmologe. 2010, **107** (11): 1016-9
110. Ricklin D, Lambris JD, *Compstatin: a complement inhibitor on its way to clinical application*. Adv Exp Med Biol. 2008, **632**: 273-92
111. Benhar I, London A, Schwartz M, *The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye*. Front Immunol. 2012, 3: 296
112. Johnson LV, et al., *Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration*. Exp Eye Res. 2001, **73** (6): 887-96
113. Crabb JW, et al., *Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99 (23): 14682-7
114. Hageman GS, et al., *A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005, 102 (20): 7227-32
115. Nozaki M, et al., *Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006, **103** (7): 2328-33
116. Xu H, Chen M, Forrester JV, *Para-inflammation in the aging retina*. Prog Retin Eye Res. 2009, 28 (5): 348-68
117. Hageman GS, et al., *An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration*. Prog Retin Eye Res. 2001, 20 (6): 705-32
118. Buschini E, et al., *Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina*. Prog Neurobiol. 2011, **95** (1): 14-25
119. Thurman JM, et al., *Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury*. J Biol Chem. 2009, **284** (25): 16939-47
120. Pangburn MK, *Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement*. Immunopharmacology. 2000, 49 (1-2): 149-57
121. Mihlan M, et al., *Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H*. Cell Death Differ. 2009, 16 (12): 1630-40
122. Ratnapriya R, Chew EY, *Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update*. Clin Genet. 2013, **84** (2): 160-6

123. Clark SJ, et al., *Impaired binding of the age-related macular degeneration-associated complement factor H 402H allotype to Bruch's membrane in human retina*. J Biol Chem. 2010, **285** (39): 30192-202
124. Weismann D, et al., *Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress*. Nature. 2011, **478** (7367): 76-81
125. Kanda A, et al., *A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, **104** (41): 16227-32
126. Li M, et al., *CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration*. Nat Genet. 2006, **38** (9): 1049-54
127. Gotoh N, et al., *ARMS2 (LOC387715) variants in Japanese patients with exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy*. Am J Ophthalmol. 2009, **147** (6): 1037-41
128. Fritsche LG, et al., *Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA*. Nat Genet. 2008, **40** (7): 892-6
129. Friedrich U, et al., *Risk- and non-risk-associated variants at the 10q26 AMD locus influence ARMS2 mRNA expression but exclude pathogenic effects due to protein deficiency*. Hum Mol Genet. 2011, **20** (7): 1387-99
130. Wang G, et al., *Analysis of the indel at the ARMS2 3'UTR in age-related macular degeneration*. Hum Genet. 2010, **127** (5): 595-602
131. Yang Z, et al., *Genetic and functional dissection of HTRA1 and LOC387715 in age-related macular degeneration*. PLoS Genet. 2010, **6** (2): e1000836
132. Allikmets R, Dean M, *Bringing age-related macular degeneration into focus*. Nat Genet. 2008, **40** (7): 820-1
133. Liang XY, et al., *Differentiation of exudative age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in the ARMS2/HTRA1 locus*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012, **53** (6): 3175-82
134. Yu W, et al., *Cumulative association between age-related macular degeneration and less studied genetic variants in PLEKHA1/ARMS2/HTRA1: a meta and gene-cluster analysis*. Mol Biol Rep. 2013, **40** (10): 5551-61
135. Francis PJ, et al., *Rhesus monkeys and humans share common susceptibility genes for age-related macular disease*. Hum Mol Genet. 2008, **17** (17): 2673-80
136. Pahl L, et al., *Characterization of the 10q26-orthologue in rhesus monkeys corroborates a functional connection between ARMS2 and HTRA1*. Exp Eye Res. 2012, **98**: 75-8
137. Wang G, et al., *Localization of age-related macular degeneration-associated ARMS2 in cytosol, not mitochondria*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009, **50** (7): 3084-90

138. Kortvely E, et al., *ARMS2 is a constituent of the extracellular matrix providing a link between familial and sporadic age-related macular degenerations*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010, **51** (1): 79-88
139. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD., *Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology*. Nature 2007, 446 (7139): 1030-7
140. Hourcade DE., *The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement*. J Biol Chem. 2006, **281** (4): 2128-32
141. Peng Y, et al., *Innate and adaptive immune response to apoptotic cells*. J Autoimmun. 2007, (4): 303-9
142. Kemper C, et al., *The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2008, 105 (26): 9023-8
143. Cortes C, et al., *Local release of properdin in the cellular microenvironment: role in pattern recognition and amplification of the alternative pathway of complement*. Front Immunol. 2013, 3: 412
144. Muñoz EM, Linhardt RJ. *Heparin-binding domains in vascular biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004, (9): 1549-57
145. Spitzer D, et al., *Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly*. J Immunol. 2007, 179 (4): 2600-8
146. Xu W, et al., *Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation*. J Immunol. 2008, 180 (11): 7613-21
147. Amarilyo G, et al., *iC3b-opsonized apoptotic cells mediate a distinct anti-inflammatory response and transcriptional NF-kappaB-dependent blockade*. Eur J Immunol. 2010,40 (3): 699-709

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist und ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe sowie alle benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und verwendete Quellen vermerkt habe.

Alle Personen, die mich bei der Auswahl des Materials sowie bei der Herstellung der Manuskripte unterstützt haben, sind von mir benannt.

Ich habe keinen Promotionsberater in Anspruch genommen. Dritte Personen haben keine unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht. Ebenso wenig wurde die Abhandlung als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Jena, den 21. Juni 2014

Sven Micklisch

Lebenslauf

Persönliches

Sven Micklisch
geboren am 28. Juli 1983
in Löbau
deutsch
ledig



Studium

03/2010 – dato Promotionsstudium

Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.
Infektionsbiologie bei PD Dr. Christine Skerka
Hans-Knöll-Institut, Jena

11/2010 – 10/2013 Promotionsstipendium der ProRetina e.V.

10/2004 – 02/2010 Studium der Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Abschluss: Diplom, Gesamtnote: 1,1

Diplomarbeit: „Funktionelle Charakterisierung von krankheitsassoziierten Proteinen bei der Altersabhängigen Makuladegeneration“ (1,1)

Hauptfach: Genetik (1,3)

Nebenfächer: Neurobiologie (1,3)
Immunbiologie (1,0)

Bundeswehr

05/2003 – 05/2004 Freiwilliger zusätzlicher Wehrdienst

08/2002 – 05/2003 Grundwehrdienst

Schulische Ausbildung

08/1994 – 06/2002 Maria-Sibylla-Merian Gymnasium, Herrnhut
Allgemeine Hochschulreife (2,9)

Übersicht der Vorträge, Poster, Auszeichnungen und Publikationen

Vorträge:

ProRetina Forschungskolloquium, April 2014 Potsdam, Deutschland

Titel: *“ARMS2 is expressed in macrophages and anchors complement on apoptotic cells to enhance opsonization”*

Poster-Präsentationen:

ProRetina Forschungskolloquium, April 2011 Potsdam, Deutschland

Titel: *“Expression of recombinant ARMS2 in Pichia pastoris”*

XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research, Juli 2012 Berlin, Deutschland

Titel: *“Recombinant ARMS2 recognizes cell-surface via glycosaminoglycans”*

ProRetina Forschungskolloquium, März 2013 Potsdam, Deutschland

Titel: *“Expression of recombinant ARMS2 and binding to self-cell-surfaces via glycosaminoglycans”*

14th European Complement Meeting in human diseases, August 2013 Jena, Deutschland

Titel: *“Expression of recombinant ARMS2 and binding to self-cell-surfaces via glycosaminoglycans”*

ProRetina Forschungskolloquium, April 2014 Potsdam, Deutschland

Titel: *“ARMS2 is expressed in macrophages and anchors complement on apoptotic cells to enhance opsonization”*
ausgezeichnet mit einem Posterpreis

Auszeichnungen:

Promotionsstipendium vergeben durch die ProRetina e.V., 2010

Publikationen:

Gropp K, Weber N, Reuter M, **Micklisch S**, Kopka I, Hallström T, Skerka C:

β_2 -glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator

Blood. 2011 Sep 8;118(10):2774-83

Skerka C, Zipfel PF, Müller D, **Micklisch S**, Riedl M, Zimmerhackl LB, Hofer J:

The autoimmune disease DEAP-hemolytic uremic syndrome

Seminars in thrombosis and hemostasis. 2010 Sep;36(6):625-32

Eingereichte Manuskripte:

Micklisch S, Jacob S, Lin Y, von der Heide M, Karlstetter M, Dahse HM, Schmölz L, Alene M, Grassmann F, Neumann H, Lorkowski S, Weber B HW, Jousen A, Langmann T, Zipfel PF, Skerka C:

Age-related maculopathy susceptibility protein 2 (ARMS2) anchors complement on apoptotic cells

Danksagung

Ich möchte mich bei allen für die Unterstützung und Zusammenarbeit, die ich während meines Promotionsstudiums erhalten habe, bedanken.

Mein Dank gilt hierbei **PD Dr. Christine Skerka** und **Prof. Dr. Peter Zipfel**, welche mich stets fachlich unterstützten und motivierten. Insbesondere danke ich **PD Dr. Christine Skerka** für die intensiven Diskussionen und Anregungen, um das Projekt stets weiter voranzubringen. Weiterhin bedanke ich mich für die zahlreichen Möglichkeiten an nationalen- und internationalen Konferenzen teilnehmen zu dürfen, um meine Ergebnisse mit anderen Wissenschaftlern zu diskutieren sowie meinen eigenen wissenschaftlichen Horizont zu erweitern.

Bei der **ProRetina e.V.** bedanke ich mich für die Auszeichnung mit einem Promotionsstipendium und für die vielen Gelegenheiten den Fortschritt meiner Arbeit präsentieren zu dürfen.

Ich bedanke mich bei **allen Mitarbeitern der Abteilung Infektionsbiologie** für die sehr gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Besonders danke ich **Dr. Hans-Martin Dahse, Monika von der Heide, Dr. Malik Reza, Dr. Prasad Dasari** und **Andrea Hartmann** für die wissenschaftliche Unterstützung während meines Promotionsstudiums.

Meinen Eltern danke ich für Engagement während meines gesamten Studiums und meiner schulischen Ausbildung.

Ein herzlicher Dank geht auch an all meine Freunde. Insbesondere danke ich **Steven, Franziska, Markus, Hea-Reung, Hannes, Tanja, Maria, Felix, Stefan, Thomas, Torsten, Katrin, Katja, Christian, Frank** und **Pierre** die stets für mich da waren und mir immer einen guten Ausgleich zum Laboralltag boten.