

Aus der Stabsstelle HLA-Labor beim Ärztlichen Direktor
(Herr PD Dr. med. Thomas Klöss)
im Universitätsklinikum der Universität Halle-Wittenberg

**Komplementfaktoren I und H der Ratte: Identifizierung der
Primärstrukturen, Untersuchungen zur Expressionsregulation
und ihre Isolierung bzw. rekombinante Herstellung für
funktionelle *in-vitro* Studien**

Habilitationsschrift
(kumulatives Verfahren)
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat., rer. medic. habil.
vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität zu Halle-Wittenberg

von Gerald Schlaf
geboren am 16.09.1964 in Northeim

Gutachter:

1. **Prof. Dr. Peter F. Zipfel**; Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, -Hans-Knöll-Institut-, Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena
2. **Prof. Dr. Jörg Köhl**; Institut für Systemische Entzündungsforschung, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck
3. **Prof. Dr. Rainer Blasczyk**; Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover

Datum der Verteidigung: 24.05.2011

Dieser Arbeit liegen folgende Veröffentlichungen zu Grunde:

	Impact Faktor im Publikations- jahr
I Schlaf G , Rothermel E, Oppermann M, Schieferdecker HL, Jungermann K, Götze O <i>Rat complement factor I: molecular cloning, sequencing and expression in tissues and isolated cells</i> Immunology 98 (1999) 464-474	2,575
II Schlaf G , Demberg T, Koleva M, Jungermann K, Götze O <i>Complement factor I is upregulated in rat hepatocytes by interleukin-6 but not by interferon-gamma, interleukin-1beta, or tumor necrosis factor-alpha</i> Biol Chem 382 (2001) 1089-1094	2,606
III Schlaf G , Demberg T, Beisel N, Schieferdecker HL, Götze O <i>Expression and regulation of complement factors H and I in rat and human cells: some critical notes</i> Mol Immunol 38 (2001) 231-239	1,937
IV Schlaf G , Beisel N, Pollok-Kopp B, Schieferdecker HL, Demberg T, Götze O <i>Constitutive expression and regulation of rat complement factor H in primary cultures of hepatocytes, Kupffer cells, and two hepatoma cell lines</i> Lab Invest 82 (2002) 183-192	4,000
V Demberg T, Pollok-Kopp B, Gerke D, Götze O, Schlaf G <i>Rat complement factor H: molecular cloning, sequencing and quantification with a newly established ELISA</i> Scand J Immunol 56 (2002) 149-160	1,782
VI Schlaf G /Nitzki F, Heine I, Hardeland R, Schieferdecker HL, Götze O <i>C5a anaphylatoxin as a product of complement activation upregulates the complement inhibitory factor H in rat Kupffer cells</i> Eur J Immunol 34 (2004) 3257-3266	4,876
VII Demberg T, Heine I, Götze O, Altermann WW, Seliger B, Schlaf G <i>Recombinant generation of two fragments of the rat complement inhibitory factor H [FH(SCR1-7) and FH(SCR1-4)] and their structural and functional characterization in comparison to FH isolated from rat serum</i> Histology and Histopathology 21 (2006) 93-102	2,182

Inhaltsverzeichnis:	Seite
1 Einleitung	5
1.1 Angeborene Immunität	5
1.2 Komplementsystem	5
1.2.1 Klassischer Komplementaktivierungsweg	7
1.2.2 MBL-Komplementaktivierungsweg	8
1.2.3 Alternativer Komplementaktivierungsweg	9
1.3 Komplementregulatoren	11
1.3.1 Aufbau und Funktion des Faktor H (FH)	11
1.3.2 Aufbau und Funktion des Faktor I (FI)	13
2 Ergebnisse	17
2.1 Der Komplement-inhibitorische Faktor I der Ratte: Identifizierung seiner Primärstruktur und Untersuchungen zu seiner Expression in Geweben und isolierten primären und permanenten Zellen	17
2.2 Heraufregulation des Komplement-inhibitorischen Faktor I in Rattenhepatozyten und den Hepatomzelllinien H4IIE und FAO durch das proinflammatorische Zytokin IL-6 aber nicht durch Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β oder Interferon- γ	22
2.3 Der Komplement-inhibitorische Faktor H der Ratte: Seine Expression und Regulation in primären Kulturen von Hepatozyten, Kupfferzellen und zwei Hepatomzelllinien der Ratte (H4IIE und FAO)	26
2.4 Identifizierung der Primärstruktur des Ratten FH und Entwicklung eines spezifischen ELISA zu seiner Quantifizierung	29
2.5 Das Anaphylatoxin C5a als Produkt der Komplementaktivierung reguliert den Komplement-inhibitorischen FH in Kupfferzellen der Ratte herauf	36
2.6 Rekombinante Herstellung von FH-Fragmenten und ihre strukturelle Analyse im Vergleich zu immunaffinitätschromatographisch aus Rattenserum aufgereinigtem FH	39
2.7 Einsatz der rekombinant generierten bzw. aus Serum isolierten Komplement-inhibitorischen Faktoren H und I im Komplement-hämolysetest (CH ₅₀) des klassischen Weges	45
3 Diskussion	52
3.1 Der Komplement-inhibitorische Faktor I der Ratte: Analyse seiner Primärstruktur und Glykosylierung im Vergleich zum FI des Menschen und der Maus. Restriktion seiner Expression in Geweben und isolierten primären und permanenten Zellen.	52
3.2 Regulation des Komplement-inhibitorischen Faktor I durch proinflammatorische Zytokine	54
3.3 Regulation des Ratten FH durch proinflammatorische Zytokine und Lipopolysaccharide (LPS) in primären Zellen der Rattenleber. Vergleich der Regulation und Expression von FH primär kultivierter Hepatozyten mit Hepatomzelllinien	56
3.4 Unterschiede zwischen der unter der Patentnummer WO 9823638-A/1 publizierten und der in der eigenen Arbeitsgruppe identifizierten und publizierten Ratten FH cDNA Sequenz	59

b.w.

3.5	Negativer Einfluss auf die Komplementaktivierung über die Heraufregulation des dominierenden solublen Komplementinhibitors FH durch das potenteste Anaphylatoxin C5a	60
3.6	Historische und aktuelle Molekulargewichtsdifferenzen des FH(Short Consensus Repeat/SCR1-20) und seiner Varianten (SCR1-4 und SCR1-7) ergeben sich aus Untersuchungen unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen	61
3.7	Quantitative und stöchiometrische Betrachtungen zum funktionellen <i>in-vitro</i> Einsatz der isolierten FI und FH(SCR1-20) sowie der rekombinanten Ratten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4)	64
4	Zusammenfassung	68
5	Literaturverzeichnis	69
6	Erklärung	78
7	Thesen	79
7	Danksagungen	83

Verzeichnis der Abkürzungen:

AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
C1-INH	C1-Inhibitor
C4BP	C4-bindendes Protein
cDNA	komplementäre DNA
CH ₅₀ -Test	Komplementhämolysetest
CR	Complement Receptor
DAF	Decay Accelerating Factor
FB	Faktor B des Alternativen Aktivierungsweges
FH	Komplement-inhibitorischer Faktor H
FHL-1	Faktor H-like Protein
FI	Komplement-inhibitorischer Faktor I
FHR	Factor H-related Proteins
GCG	Genetic Computing Group
HC	Hepatozyten
HSC	Hepatic Stellate Cells/Hepatische Sternzellen
HUVEC	Humane Nabelschnurendothelzellen
iC3b	inaktiviertes C3b
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kB	Kilobasen
KC	Kupfferzellen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide (Endotoxine)
MAC	Membrane Attack Complex/Membranangriffskomplex
mAk	monoklonaler Antikörper
MASP	Mannan-aktivierte Serinprotease
MBL	Mannan-bindendes Lektin
MCP	Membrane Cofactor Protein
M _r	relatives Molekulargewicht
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
pAk	polyklonaler Antikörper
rRNA	ribosomale RNA
RCA	“Regulators of Complement Activation” Gencluster
SCR	Short Consensus Repeats
SDS	Sodium-/Natrium-Dodecylsulfat
SEC	Sinusoidale Endothelzellen der Leber
TCA	Trichloressigsäure
TLR	Toll-like Rezeptor
U	Unit (Aktivitätseinheit für Zytokine)

1 Einleitung

1.1 Angeborene Immunität

Die Bedeutung des angeborenen Immunsystems besteht darin, eine frühe unspezifische Immunantwort zu ermöglichen, die dem Organismus bereits während der ersten vier bis fünf Tage einer Infektion zur Verfügung steht. Dieser Zeitraum ist für eine Aktivierung der Lymphozyten nötig. Die angeborene Immunität enthält humorale und zelluläre Komponenten. Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort verfügt sie allerdings über kein „immunologisches Gedächtnis“. Zu den Komponenten der zellulären angeborenen Immunität gehören phagozytierende Zellen, die konservierte Oberflächenmoleküle von Bakterien, aber auch von anderen Mikroorganismen erkennen (Mustererkennung). Zu ihnen gehören z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten und die „Natural Killer“ (NK-) Zellen. Diese Zellen spielen bei der schnellen Beseitigung einer Infektion eine dominante Rolle. Die wichtigste Aufgabe der phagozytierenden Zellen, d.h. der primär phagozytischen Zellen (Makrophagen und ihre Derivate sowie neutrophile Leukozyten) ist die Aufnahme von mit Antikörpern markierten Krankheitserregern und deren Zerstörung in intrazellulären Vesikeln. Einige dieser sogenannten Effektorzellen der angeborenen Immunität verfügen auch über Rezeptoren für gebundene Komplementproteine. Auf diese Weise wird die Erkennung von Erregern verbessert, die mit Komplementproteinen markiert sind (Opsonisierung), so dass sich das zelluläre und das humorale System der angeborenen Immunität ergänzen.

1.2 Komplementsystem

Ein hoch effizientes Verteidigungssystem der humoralen angeborenen Resistenz ist neben unspezifischen löslichen Faktoren wie Lysozym oder Akutphaseproteinen das Komplementsystem. Es besteht aus etwa 30 Serumproteinen und verschiedenen Rezeptoren für diese Komponenten oder ihre Aktivierungsformen. Die Serumkomponenten des Komplementsystems umfassen etwa 10% des Gesamtserumproteins. Das System ist phylogenetisch wesentlich älter als die Systeme der adaptiven Immunantwort, die erstmalig bei den Vorstufen der Vertebraten auftreten. Zu den Funktionen des Komplementsystems gehören die sogenannte Opsonisierung von Pathogenen zur effektiveren Bekämpfung durch Phagozyten, die Initiation entzündlicher Reaktionen (z.B. Chemotaxis, Vasodilatation) durch die im Verlauf der Aktivierung entstehenden Anaphylatoxin-Spaltprodukte sowie die direkte Bekämpfung von Bakterien, Pilzen und Viren.

Die Nomenklatur des Komplementsystems geht auf die Reihenfolge der 1938 von Ueno identifizierten Bestandteile zurück. Die Relevanz dieses Systems für die Immunabwehr wird bei der Betrachtung von Patienten deutlich, die an genetischen Defekten einzelner Komplementkomponenten leiden. Patienten mit erblicher C3-Komplementdefizienz leiden verstärkt unter verschiedenen bakteriellen Infektionen. Personen, bei denen eine oder mehrere der terminalen Komponenten C5-C8 fehlen, entwickeln häufig Neisserien-bedingte Infektionen wie z.B. bakterielle Meningitiden. Ähnliches gilt für Personen, bei denen Komplement-inhibitorische Proteine in mutierter und damit funktionsloser Form vorliegen. Diese Komplementkontrollproteine (z.B. die inhibitorischen Komplementfaktoren H und I) sind wichtig, um die Homöostase dieses Systems aufrecht zu erhalten. Wie im Folgenden dargestellt wird, ist nur ein strikt durch diese Faktoren gegenreguliertes, d.h. in seiner Homöostase stabiles Komplementsystem in der Lage, effizient zu arbeiten.

Für die Aktivierung des Komplementsystems sind drei Aktivierungswege bekannt. Es handelt sich um den klassischen, den MBL-(Mannan-bindendes Lektin) und den alternativen Weg. Die Aktivierungswege werden entweder durch Pathogenoberflächen (alternativer und MBL-Weg) oder durch aktivierende Komponenten wie Antigen/Antikörper Immunkomplexe (klassischer Weg) initiiert. Alle drei Wege enden mit der Lyse bzw. Abtötung des Pathogens. Phylogenetisch betrachtet ist im Gegensatz zur Namensgebung, die sich nur auf die historische Reihenfolge seiner Entdeckung bezieht, der klassische Aktivierungsweg der jüngere. Da er durch Antigen/Antikörperkomplexe aktiviert wird, ist er sowohl Bestandteil der angeborenen als auch der phylogenetisch jüngeren adaptiven Immunantwort. Zusätzlich zur Eliminierung von Pathogenen liegt seine Aufgabe in der sogenannten Opsonisierung von Pathogenen, um ihre Erkennung durch Phagozyten zu erleichtern. Der erst 1998 entdeckte MBL-Weg wird durch Mannosereste auf Pathogenoberflächen aktiviert. In Analogie zum klassischen Weg besteht seine Aufgabe in der Eliminierung von Pathogenen mittels Lyse oder der Opsonisierung von Pathogenen. Die Existenz eines alternativen Aktivierungsweges gegenüber dem klassischen Weg wurde erstmalig von Pillemer und Mitarbeitern im Jahr 1954 beschrieben. Der alternative Weg der Komplementaktivierung gilt als der „aggressivste“ der drei bekannten Wege, da er durch viele Pathogenoberflächen aber auch durch künstliche Oberflächen wie z.B. Dialysemembranen und körpereigene Oberflächen aktiviert werden kann. Insbesondere aus diesem Grund ist seine effektive Gegenregulation durch Komplement-inhibitorische Faktoren notwendig. Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die drei Aktivierungswege und ihre Funktionen.

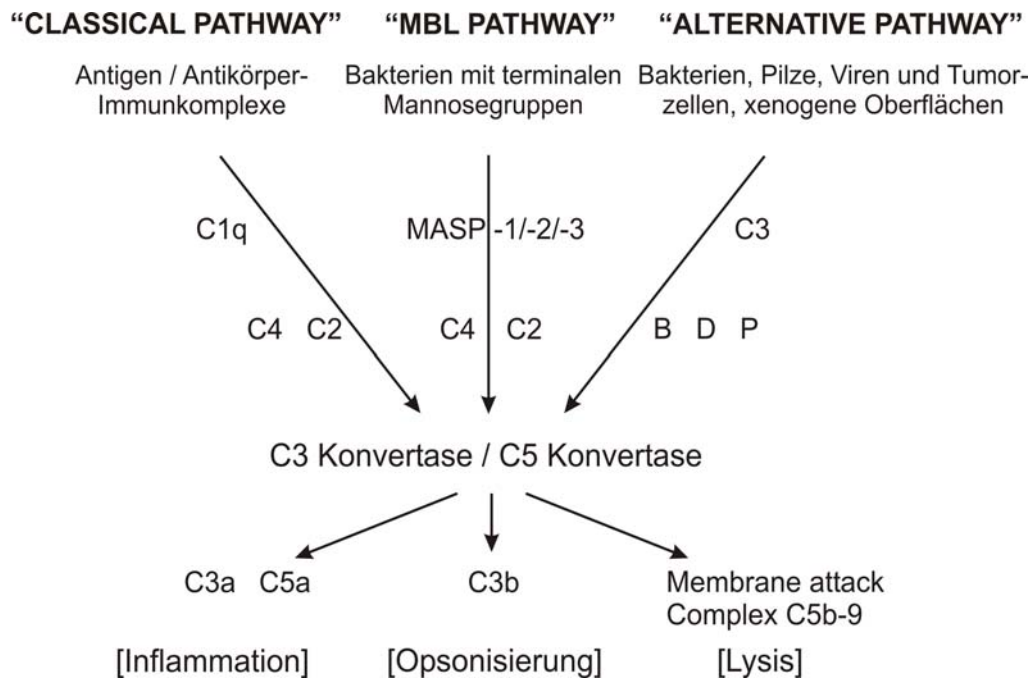


Abb. 1: Aktivierung und Funktion der drei bekannten Komplementwege.

1.2.1 Klassischer Komplementaktivierungsweg

Der klassische Aktivierungsweg als der phylogenetisch jüngere ist zugleich der zuerst entdeckte, worauf seine Namensgebung zurückzuführen ist. Er kann einerseits durch die direkte Bindung des C1q-Proteins an eine Pathogenoberfläche [z.B. gramnegative Bakterien (Clas und Loos, 1981; Loos, 1982) oder Viren (Cooper et al., 1976; Ebenbichler et al., 1991)] aktiviert werden. Typischer Weise wird seine Aktivierung jedoch durch die Bindung an einen Antigen/Antikörper-Komplex initialisiert. Damit stellt der klassische Weg evolutionär eine Verknüpfung zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Das C1q-Protein besteht aus sechs identischen Untereinheiten jeweils mit einer globulären und elongierten Domäne. Über die elongierten Strukturen erfolgt eine Komplexierung aus einem C1q und jeweils zwei C1r- und C1s-Proteinen, woraus sich der C1-Komplex (C1q[C1r:C1s]₂) zusammensetzt (Strang et al., 1982). Bei dem C1q-Protein handelt es sich um einen calciumabhängigen, zuckerbindenden Komplex, d.h. ein Lectin aus der Familie der Kollektine. Durch die Bindung von mehr als einem Kopf des C1q im C1-Komplex kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins C1q (Golan et al., 1982). Aus dieser C1q-Konformationsänderung resultiert eine autokatalytische Aktivierung des C1r-Proteins (Serinprotease) im C1-Komplex (Dodds et al., 1978). Das aktivierte C1r-Protein schneidet nun im benachbarten C1s ein Fragment heraus, wodurch das C1s-Protein zu einer aktiven Serinprotease modifiziert wird. Diese C1s-Serinprotease im C1-Verbund wirkt nun

enzymatisch auf die nächsten beiden Proteine der Komplementaktivierungskaskade, das C4 und das C2. Das C4 wird durch C1s in das große C4b-Fragment und das kleine C4a-Anaphylatoxin gespalten. Durch diese C4a-Abspaltung kann das C4b-Fragment auf aktivierenden Oberflächen mit seiner reaktiven Acylgruppe an Hydroxyl- oder Aminogruppen binden, was zu einer vermehrten Ablagerung von C4b in der Nähe von C1-Komplexen führt. Gebundenes C4b fungiert als C2-Akzeptor. C2 wird gebunden und durch die Serinprotease C1s gespalten. Das Anaphylatoxin C2a ist das abdiffundierende kleine Spaltfragment, während das große C2b-Fragment (wie auch das C1s eine Serinprotease) einen Komplex mit dem C4b-Fragment eingeht. Nach diesem Schritt ist die aktive C3-Konvertase des klassischen Komplementaktivierungsweges (C4b2b) entstanden. Die C3-Konvertase spaltet die C3-Komponente in das große Fragment C3b und das C3a-Anaphylatoxin, welches wegdiffundiert. Das C3b-Molekül bindet kovalent an der Stelle, an der es durch die C3-Konvertase entsteht, so dass etwa 240 C3b-Moleküle um einen C1-Komplex herum abgelagert werden (Ollert et al., 1994). Das C3b-Fragment geht einen Komplex mit der C3-Konvertase (C4b2b) ein, um als nächsten Komplex die aktive C5-Konvertase des klassischen Komplementweges zu bilden. Diese setzt sich aus den Komponenten C4b2b3b zusammen.

1.2.2 MBL-Komplementaktivierungsweg

Der Mannose-bindendes-Lektin (MBL) Weg verläuft zu einem großen Teil analog dem klassischen Aktivierungsweg, d.h. es werden ebenfalls die Komplementkomponenten C2, C3 und C4 verwendet. Unterschiedlich verläuft allerdings die Aktivierung, denn sie erfolgt nicht über Immunkomplexe. Ähnlich dem C1q handelt es sich bei dem MBL um ein sechsköpfiges Molekül, welches aus einem Komplex von MASP-Molekülen (Mannan-aktivierte-Serin-Proteasen) besteht (MASP-1, MASP-2, MASP-3). Die MASP-Moleküle ähneln als Serinproteasen in ihrem modulären Aufbau stark den C1r und C1s-Serinproteasen des klassischen Aktivierungsweges. Die Aktivierung des MBL-Weges erfolgt durch die Bindung an Mannose-haltige Proteine oder Kohlehydrate auf bakteriellen oder viralen Oberflächen (Epstein et al., 1996). Nach Aktivierung und Deposition von C4b fungiert dieses wie beim klassischen Weg als C2-Akzeptor, so dass die C2-Komponente durch die MASP-Moleküle gespalten wird. In Analogie zum klassischen Weg bildet sich mit dem C4b2b-Komplex die C3-Konvertase des MBL-Weges. Nach der Spaltung der C3-Komponente entsteht ebenfalls in Analogie zum klassischen Weg die aktive C5-Konvertase des MBL-Weges (C4b2b3b).

1.2.3 Alternativer Komplementaktivierungsweg

Der alternative Komplementaktivierungsweg (Abb. 2) unterscheidet sich deutlich sowohl vom klassischen als auch vom MBL-Weg. Weil er immer aktiv ist (Tickover-Hypothese) (Nicol und Lachmann, 1973) bedarf er keines besonderen Aktivierungsmechanismus. Allerdings ist seine „Standby-Aktivität“ sehr gering. Erst die Anwesenheit verschiedener aktivierender Oberflächen wie z.B. Zymosan, Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer Bakterien, Teichonsäuren Gram-positiver Bakterien und gewisse Oberflächenstrukturen von Säugerzellen sorgt für seine sprunghafte Aktivierung (Pangburn und Müller-Eberhardt, 1984). Die ständige minimale sogenannte „Tickover“-Aktivität basiert auf der Labilität einer sich im C3-Molekül befindenden Thioesterbindung (Nicol und Lachmann, 1973), die empfindlich für eine spontane Hydrolyse ist (Pangburn et al., 1981). Das aktivierte C3 (C_3H_2O) kann nun einen Komplex mit dem Faktor B eingehen, der während der Komplexbildung gespalten wird. Das kleine Ba-Fragment diffundiert davon, während die Komponente Bb in die vorläufige C3-Konvertase (C_3H_2OBb) eingeht (Pangburn et al., 1981). Bei diesem Komplex handelt es sich um eine sehr instabile C3-Konvertase in der flüssigen Phase. Diese kann nun das C3 in C3a und die labile C3b-Komponente spalten. Diese labile aktivierte Komponente wird in Abwesenheit aktivierender Oberflächen schnell hydrolysiert und katabolisiert. Auf aktivierenden Oberflächen lagert sich das C3b ab und bildet dort mit dem Faktor B einen Komplex. Dieser C3bB-Komplex ist das Substrat für eine weitere Spaltung durch Faktor D, so dass die C3-Konvertase C3bBb entsteht. Die Stabilität dieser Konvertase wird durch die Bindung von Properdin (P) erhöht. Die Halbwertszeit der C3-Konvertase des alternativen Weges C3bBb steigt von 1-2 min auf durchschnittlich 18 min im Komplex mit Properdin (C3bBbP) an (Fearon und Austen, 1975). Die C3-Konvertase spaltet nun weiteres C3, so dass sich nun neu generiertes C3b auf der Pathogenoberfläche ablagert, einen Komplex mit Faktor B eingeht und zu weiteren C3bBb-Konvertasekomplexen führen kann, wobei die Bb-Komponente die Serinprotease in diesem Komplex ist. Zwei Konvertasen spalten im Idealfall zwei weitere Moleküle C3, was zu weiteren C3-Konvertasen führen kann. So schaukelt sich der alternative Komplementaktivierungsweg in einer Kettenreaktion, dem sogenannten „Amplification Loop“ hoch. Dieser „Amplification Loop“ führt dazu, dass sich in sehr kurzer Zeit erhebliche Mengen an C3b auf der aktivierenden Oberfläche ablagern können.

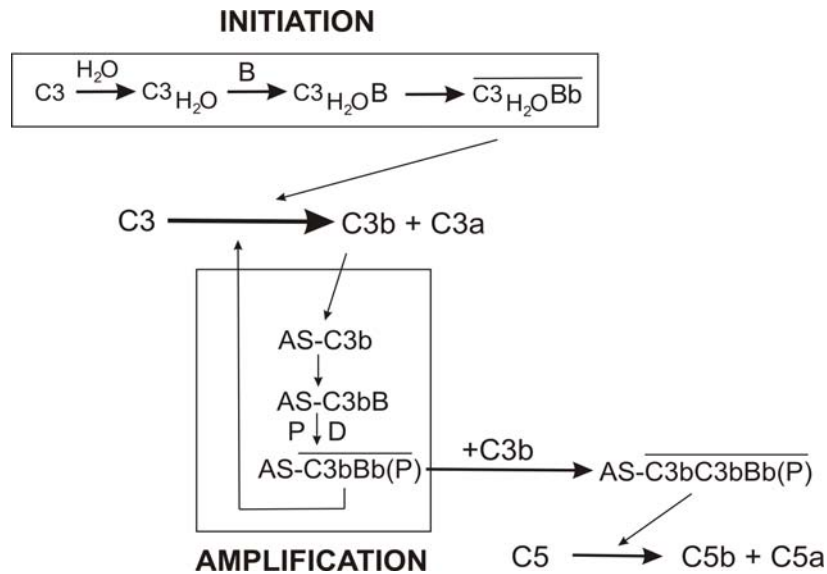


Abb. 2: Schematische Darstellung des alternativen Aktivierungsweges mit seinem „Amplification-Loop“ bis zur Bildung der C5 Konvertase. AS: Activating Surface (Zelloberfläche etc.), Überstrichen: aktive Konvertasen

Lagert sich ein weiteres C3b an den Komplex C3bBb(P) an, so entsteht als neuer Komplex die C5-Konvertase (C3bC3bBbP) des alternativen Komplementweges. Diese C5-Konvertase spaltet C5-Moleküle in das hoch potente Anaphylatoxin C5a und das große Fragment C5b, welches auf der Pathogenoberfläche abgelagert wird.

Mit der Ablagerung von C5b wird die terminale lytische Komplementsequenz (Terminal Pathway) eingeleitet. Dieser terminale Weg formt den sogenannten „Membrane Attack Komplex“ (MAC), bei dem alle drei Komplementaktivierungswege zusammen laufen. Die C5b-Komponente, die keine interne Thioesterbindung enthält, bindet ein C6-Molekül durch die Entfaltung eines hydrophoben Akzeptorbereiches für dieses Molekül (Müller-Eberhard, 1986). Der terminale Komplementweg beruht im Gegensatz zu den oben präsentierten enzymatischen Aktivierungsschritten nur auf Konformationsänderungen, die durch die Bindungen induziert werden. So ermöglicht die Bindung der C6-Komponente (Bildung des Komplexes C5bC6) die Bindung des C7-Moleküls, was wiederum eine Konformationsänderung des Komplexes (C5bC6C7) bewirkt. Nun wird ein C8-Molekül gebunden, welches mit seiner α -Kette in die Zellmembran des Pathogens eindringt. Durch die Bindung einer C9-Komponente startet eine C9-Polymerisationsreaktion, woraus eine Pore aus 10-16 C9-Molekülen entsteht. Diese Pore mit einem Durchmesser von etwa 10 nm und einer Länge von etwa 15 nm sorgt für einen schnellen Ein- und Ausstrom von Ionen und Proteinen, so dass das angegriffene Pathogen eliminiert wird.

1.3 Komplementregulatoren

Die wichtigste Aufgabe der Komplementregulatoren besteht darin, das eigene Gewebe vor der Zerstörung durch das potentiell autoaggressive Komplementsystem insbesondere des alternativen Aktivierungsweges zu bewahren. Eine weitere Aufgabe besteht darin, die Aktivierung des Komplementsystems so zu regulieren, dass es nicht zu einer überschießenden Aktivierung und somit zum vollständigen Verbrauch der Komponenten dieses Systems kommt. Darüber hinaus wird die Entstehung eines systemischen Schocks als Folge einer überschießenden Produktion von Anaphylatoxinen verhindert. Die Komplementregulatoren teilen sich in a) die membranständigen und b) die löslichen Regulatoren auf, wobei zu a) der CR1/CD35 (Komplementrezeptor 1), der CR2/CD21 (Komplementrezeptor 2), der DAF/CD55 (Decay Accelerating Factor), das Protectin/CD59, sowie das MCP (Membran Cofactor Protein) gehören. Zu b) gehören der Faktor H, Faktor I, das C4BP (C4-bindendes Protein), der C1-INH (C1-Inhibitor), das S-Protein (Site-specific Protein) und das Clusterin. Die meisten dieser Proteine sind genetisch im sogenannten RCA-Cluster, dem „Regulators of Complement Activation-Cluster“ organisiert. Die RCA-Gene liegen beim Menschen und bei der Maus auf Chromosom 1 (1q32) (Heiner-Suner et al., 1997; Hourcade et al., 1989), was als Hinweis für die Analogie dieser Genregionen in beiden Spezies gewertet werden kann. Der Komplementfaktor I hingegen liegt beim Menschen auf Chromosom 4 (4q25) (Goldberger et al., 1987) und bei der Maus auf Chromosom 3 (Minta et al., 1996). Sämtliche der im RCA-Cluster kodierten Regulatoren (CR1, CR2, DAF, FH, C4BP, MCP) verfügen über ein repetitives Sequenzmotiv von etwa 60 Aminosäure (AS) Länge, d.h. sie bestehen aus sogenannten „Short Consensus Repeats“ (SCR). Dieses Sequenzmotiv kann je nach Protein bis zu 20 (FH) oder 30 (CR1) Wiederholungen finden. Sowohl aus der großen Sequenzhomologie als auch aus der benachbarten genetischen Lokalisation wird geschlossen, dass die Gesamtheit dieser Proteine offensichtlich zum Zweck der Kontrolle des Komplementsystems entstanden ist (Hourcade et al., 1989).

1.3.1 Aufbau und Funktion des Faktor H (FH)

Bei dem Komplementinhibitor Faktor H (FH) handelt es sich um ein monomeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 155 kDa (DiScipio, 1992). Im humanen Faktor H liegt der Kohlenhydratanteil durch maximal sechs N-Glykosylierungspositionen (Ripoche et al., 1988a) bei etwa 9% des Gesamtgewichtes (Sim und DiScipio, 1982). Die Blutplasmakonzentration des FH liegt beim Menschen zwischen 200 und 600 µg/ml (Weiler et al., 1976; Whaley et al., 1978; Sim und DiScipio, 1982) und damit etwa 10-fach über der

des Faktor I (FI) (~ 40 µg/ml). Proteinsequenz- und cDNA-Sequenzanalysen zeigen, dass der FH bei Maus und Mensch aus 20 Modulen, den Short Consensus Repeats (SCR), besteht (Kristensen und Tack, 1986; Ripoche et al., 1988a). Jedes SCR besteht aus etwa 60 AS (Kristensen und Tack, 1986), von denen jeweils vier Cysteinreste sind, die innerhalb des FH-Proteins Disulfidbrücken zwischen dem 1. und dem 3. und dem 2. und dem 4. Cysteinrest einer Domäne ausbilden. Die Gesamtlänge der FH-cDNA und somit die Länge des primären Transskriptes umfasst bei der Maus (Kristensen und Tack, 1986) sowie beim Menschen (Ripoche et al., 1988a) etwa 4,4 kB. Das den FH kodierende Gen liegt im sogenannten RCA-Cluster (Regulators of Complement Activation), der beim Menschen auf dem langen Arm des ersten Chromosoms (1q32) liegt (Heiner-Suner et al., 1997). Das humane Vorläuferprotein besteht aus 1.234 AS (Ripoche et al., 1988a), das Protein der Maus aus 1.231 AS (Kristensen und Tack, 1986).

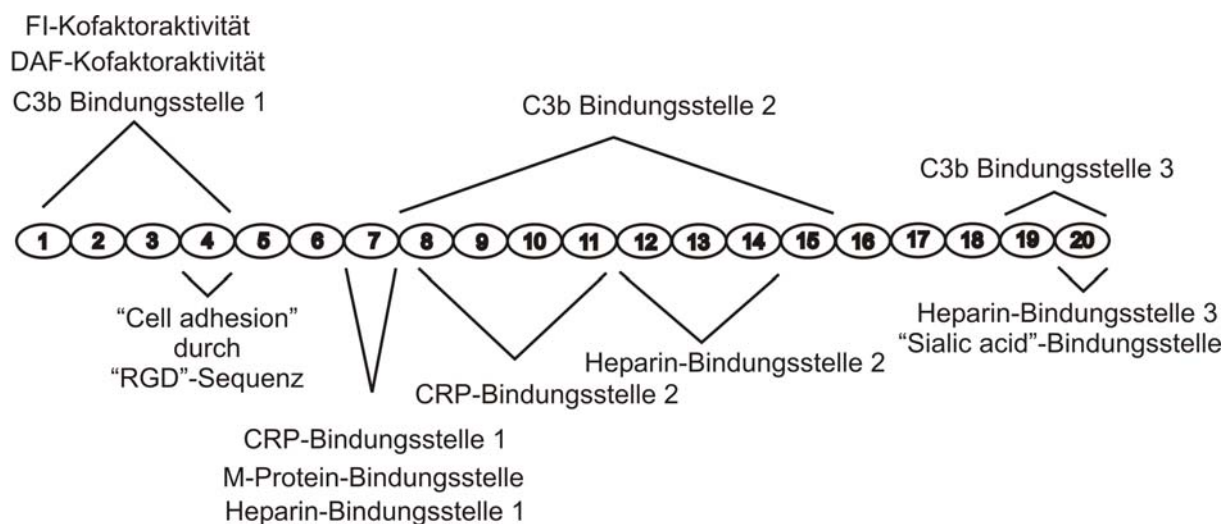


Abb. 3: Schematischer Aufbau des FH mit den Funktionen der einzelnen SCR innerhalb des Proteins.

Neben dem 4,4 kB umfassenden FH-Transskript existiert als verkürzte Spleißvariante das sogenannte FH like protein (FHL-1/Reconectin), das aus den ersten sieben der 20 SCR des Gesamt-FH besteht und im Plasma in einer Konzentration von 10-50 µg/ml vorliegt (McAleer et al., 1988; Friese et al., 1999). Darüberhinaus existieren die sogenannten „Factor H-related proteins“ (FHR), die teilweise homolog zum FH sind, allerdings nicht durch das FH-Gen kodiert werden (Skerka et al., 1992).

Funktionell reguliert der Faktor H in Verbindung mit dem Faktor I die weitere Aktivierung des Komplementsystems. Dies geschieht auf der Ebene der C3b-Komponente. Hier konkurriert der FH mit dem Faktor B (FB) um die Bindungsstelle am C3b (Kazatchkine et al., 1979; DiScipio, 1981). Die Bindungsaffinität zwischen FH und C3b liegt etwa 100-fach höher

als zwischen C3b und Faktor B (Fearon und Austen, 1977). Letztlich wird durch die Bindung des FH an das C3b-Protein die Bildung der C3-Konvertase des Alternativen Komplementaktivierungsweges verhindert. Nach der Bindung des FH kann der Faktor I mit deutlich erhöhter Effizienz das C3b zum inaktiven C3b (iC3b) inaktivieren (Abb. 4) (DiScipio, 1992). Da der Faktor B nicht kovalent an C3b bindet und nach seiner Spaltung in die Komponenten Bb und Ba durch den Faktor D in Verbindung mit C3b die aktive C3-Konvertase (C3bBb) des alternativen Aktivierungsweges bildet, wird auch an dieser Stelle der FH regulatorisch wirksam. Der FH kann die bereits aktive C3-Konvertase, d.h. den Komplex aus C3b und Bb durch die Verdrängung des Bb-Fragments inaktivieren (kompetitive Funktion) (Whaley and Ruddy, 1976; Weiler et al., 1976). Erneut wird durch das Schneiden der Serinprotease FI das im Komplex mit dem FH vorliegende C3b zu iC3b inaktiviert (Pangburn et al., 1977; Sim et al., 1981). Weitere Ebenen, auf denen der FH regulierend wirkt, sind die C5-Konvertasen des klassischen (C4b2b3b) und des alternativen Weges [(C3b)₂BbP], die C5 binden und es in C5a und C5b spalten. In diesen C5-Konvertasekomplexen bindet der FH ein C3b und löst es aus dem Komplex heraus („Decay Accelerating Activity“), wodurch die C5-Konvertase inaktiviert wird. Das durch FH gebundene C3b kann auch hier von der Serinprotease Faktor I inaktiviert werden.

1.3.2 Aufbau und Funktion des Faktor I (FI)

Die Aktivität des Komplementfaktors I (FI) wurde erstmalig unabhängig voneinander von Tamura und Nelson (1967) sowie Lachmann und Müller-Eberhardt (1968) beschrieben. Es handelt sich um eine hoch spezifische Serinprotease (Hsiung et al., 1982), die die α -Ketten der Komplementkomponenten C3b und C4b spaltet (Abb. 4) (Davis and Harrison, 1982). Aus diesem Grund war die Namensgebung zunächst auch „C3b/C4b-Inaktivator“ (C3b/C4b INA). Durch seine Aktivität verhindert der FI die Bildung der C3- und der C5-Konvertasen des alternativen und klassischen Aktivierungsweges, so dass auch die Formation des terminalen Membranangriffskomplexes unterbunden wird. Der wichtigste Ko-Faktor für den FI und damit essentiell für die Aktivität dieser Serinprotease ist der FH. Weitere Ko-Faktoren des FI sind der lösliche und der membrangebundene Komplementrezeptor 1 (CR1), das Membran-Kofaktor Protein (MCP) sowie das C4b Bindungsprotein (C4BP) (Fujita et al., 1978). Die Affinität des FI ist in Anwesenheit des FH um den Faktor 15 höher als ohne jeglichen Ko-Faktor (DiScipio, 1992).

Aufgereinigt wurde der humane FI erstmalig von Pangburn et al. (1977). Das aus Serum isolierte Glykoprotein läßt sich im SDS-Gel bei 88 kDa auftrennen; es besteht aus zwei

Polypeptidketten von jeweils 50 kDa und 38 kDa, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das humane Protein ist im Plasma in einer Konzentration von durchschnittlich 40 µg/ml aufzufinden (Sim et al., 1993). Der FI wird nicht durch im Blut zirkulierende Proteaseinhibitoren gehemmt; zudem besitzt er eine hohe Substratspezifität (Sim et al., 1993). Aufgrund von sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen (drei pro Kette) und einem Unterschied von 23 kDa zwischen der nach der Primärstruktur berechneten Größe und dem im Immunblot nachgewiesenen relativen Molekulargewicht, ist es wahrscheinlich, dass alle potentiellen Glykosylierungsstellen auch tatsächlich verzuckert sind. Der Kohlenhydratanteil wurde von Fearon (1977) und Pangburn et al. (1977) zunächst auf etwa 10% des Molekulargewichtes bestimmt. Später wurde dieser Wert auf 27% beim humanen FI korrigiert (Goldberger et al., 1984).

Das Gen, welches für den humanen FI kodiert, liegt auf dem vierten Chromosom (4q25) (Goldberger et al., 1987). Es umfasst 63 kB und enthält 13 Exons (Vyse et al., 1994). Die komplette Primärstruktur des Faktor I wurde durch die Sequenzierung von cDNA Klonen für das humane (Catterall et al., 1987; Goldberger et al., 1987), das Krallenfrosch- (Kunnath-Muglia et al., 1993) und das Mausprotein (Minta et al., 1996) ermittelt. Die mRNA für den humanen FI (~ 2,4 kB) kodiert für ein einkettiges Vorläuferpeptid mit 583 AS (Catterall et al., 1987; Goldberger et al., 1987), die der Maus für ein Peptid von 603 AS (Minta et al., 1996). Durch posttranslationale Modifikationen wird aus dem einkettigen Vorläuferprotein ein N-glykosyliertes, heterodimeres Protein mit 565 AS generiert. Dabei wird die beim humanen Protein 18 AS umfassende Leadersequenz abgeschnitten. Zusätzlich wird die aus vier AS (Arg-Arg-Lys-Arg) bestehende „Linker“-Sequenz durch das sogenannte „PACE“-Enzym (**P**aired **A**mino **A**cid **C**leaving **E**nzyme) herausgeschnitten (Wong et al., 1995), so dass das zweikettige aktive Enzym entsteht. Die nicht katalytische Schwereketten (50 kDa) besteht beim Menschen aus 318 AS (Catterall et al., 1987) und enthält die C3b-Bindungsstelle sowie verschiedene Domänen, die sich auch in anderen Komplementkomponenten wieder finden. Die katalytisch aktive Leichtkette des FI besteht aus 243 AS. Ihre Organisation ist der anderer Chymotrypsin-verwandter Serinproteasen (Catterall et al., 1987; Goldberger et al., 1987) ähnlich.

Die Wirkung des FI sei am Beispiel des Abbauweges der Komplementkomponente C3 dargestellt (Abb. 4). Nachdem die C3-Konvertase das C3 durch Abspaltung des C3a-Anaphylatoxins aktiviert hat, kann das C3b durch seine reaktive Thioestergruppe Zelloberflächenkohlenhydrate oder Immunaggregate binden und somit als Opsonin oder immunregulatorische Komponente fungieren. Das C3b-Molekül wird durch den FI auf der

α -Kette schnell gespalten, wodurch das kleine C3f-Molekül (~5 kDa) und das inaktivierte C3b-Molekül (iC3b) entstehen (Abb. 4). Die beiden Fragmente der aufgeschnittenen α -Kette (von 67 und 40 kDa) bleiben durch eine Disulfidbrücke verbunden. Das Ausschneiden der C3f-Komponente vollzieht der FI unter der Ko-Faktor Aktivität der Faktoren H, MCP und CR1. Nach dem Ausschneiden des C3f-Fragmentes wird eine dritte Schnittstelle auf der α -Kette des iC3b zugänglich. Hier schneidet der FI mit Unterstützung des Ko-Faktors CR1, so dass das C3dg-Fragment (~40 kDa) und das größere C3c-Fragment (145 kDa) entstehen. Die nach der Entfernung des C3dg-Fragmentes noch existierenden Bereiche der α -Kette (von 29 und 40 kDa) werden im C3c-Molekül immer noch durch die Disulfidbrücke zusammengehalten. Das entfernte C3dg-Fragment wird durch eine tryptische Spaltstelle in C3d und C3g geteilt.

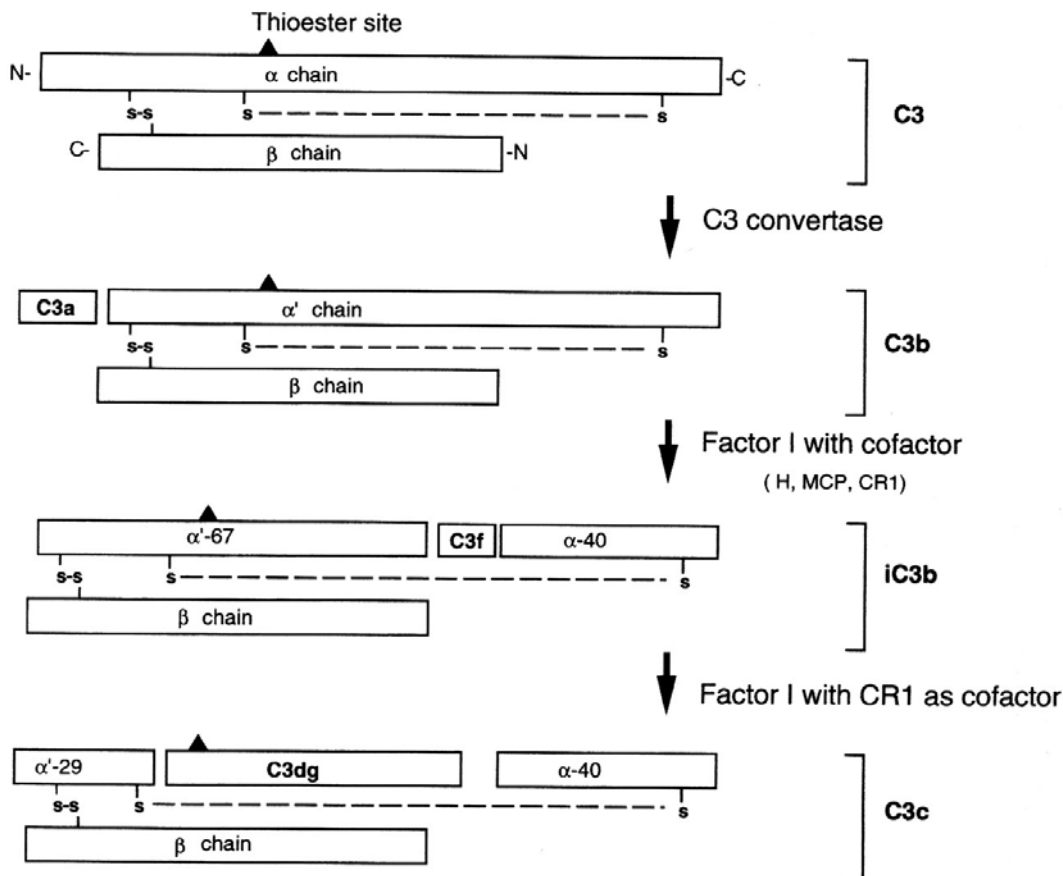


Abb. 4: Faktor I-vermittelte Degradation der Komplementkomponente C3

Die biologische Bedeutung des FI zeigt sich bei verschiedenen genetischen Defekten. Beispielsweise sind bei erblichem FI-Mangel chronisch entzündliche Darmerkrankungen häufiger zu beobachten (Gonzales-Rubio et al., 2001). Bei genetischem FI-Mangel ist der

alternative Komplementaktivierungsweg nicht reguliert, so dass es zu einem ständigen Verbrauch des C3 mit einer anschließenden Komplementdepletion kommt (Vyse et al., 1996). Bei Patienten mit FI-Mangel kommt es darüber hinaus zu einem ständigen Verbrauch der Komponenten B und H (Vyse et al., 1994; Vyse et al., 1996). Als Folge wird der sogenannte „Alternative Pathway Amplification Loop“ (Lachmann und Nicol, 1973) nicht unterbrochen, was zu einem permanenten Verbrauch an C3 über den alternativen Weg führt. Dies endet mit einem Verlust an Komplementaktivität und letztlich mit ständig wiederkehrenden Infektionen (Rasmussen, 1991; Ross und Densen, 1994; Amadei et al., 2001; Gonzales-Rubio et al., 2001, Ponce-Castro et al., 2008). Es sind Krankheitsverläufe bekannt, bei denen der erbliche FI-Mangel zu einer multisystemischen Vaskulitis mit z.T. tödlichem Ausgang führte (Solal-Celigny et al., 1982; Rasmussen et al., 1988; Vyse et al., 1994).

2 Ergebnisse

2.1 Der Komplement-inhibitorische Faktor I der Ratte: Identifizierung seiner Primärstruktur und Untersuchungen zu seiner Expression in Geweben und isolierten primären und permanenten Zellen

Die Aktivität des Komplement-inhibitorischen Faktors I wurde unabhängig voneinander von zwei Arbeitsgruppen beschrieben (Tamura und Nelson, 1967; Lachmann und Müller-Eberhardt, 1968). Es handelt sich um eine hoch spezifische Serinprotease, die die α -Ketten der Komplementkomponenten C3 und C4 spaltet (Davis and Harrison, 1982) und daher zunächst mit dem Namen C3b/C4b-Inaktivator (C3b/C4b-INA) versehen wurde. Während die Primärstrukturen des Menschen (Goldberger et al., 1987; Catterall et al., 1987) und der Maus (Minta et al., 1996) bereits bekannt waren, war die Identifizierung der cDNA Sequenz des Ratten FI noch nicht erfolgt. Seine Identifikation war jedoch eine Voraussetzung, um die beabsichtigten Expressions- und Regulationsuntersuchungen und insbesondere die geplante rekombinante Herstellung durchführen zu können, so dass sie an den Anfang der Untersuchungen gestellt wurde. Erstmals wurden mittels konventioneller RT-PCR umfangreiche Expressionsuntersuchungen durchgeführt, die die im Vorfeld hauptsächlich mittels funktioneller Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse zur Expression des FI (Whaley, 1980) in weiten Teilen nicht bestätigten. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die Expression des FI auf weitaus weniger Zellen als die des FH beschränkt ist.

Zur Herstellung einer Hybridisierungssonde wurden degenerierte Primer verwendet, die in Anlehnung an die publizierten cDNA-Sequenzen des Menschen (Goldberger et al., 1987; Catterall et al., 1987) und der Maus (Minta et al., 1996) ausgewählt worden waren. Mittels Amplifikation von aus Rattenleber gewonnener cDNA wurde eine Hybridisierungssonde generiert, deren partielle Sequenzierung ihre Identität als Teilsequenz des Ratten-FI bestätigte (80% Übereinstimmung mit der humanen cDNA bzw. 89% Übereinstimmung mit der cDNA Sequenz der Maus). Vier positive Klone, die FI-spezifische Inserts enthielten, wurden ausgewählt und für ihre komplette Sequenzierung in das jeweils korrespondierende Plasmid pTriplEx unter Verwendung von E.coli BM25.8 Zellen konvertiert. Das größte Insert umfasste dabei 2.234 Nukleotide. Dieses enthielt die gesamte kodierende Region von 1.812 Nukleotiden, an die sich ein Stop-Codon und eine 3' untranslatierte Region von 207 Nukleotiden anschloss (Originalarbeit I, Fig. 1). Diese 207 Nukleotide enthielten auch das Polyadenylierungssignal 170 Nukleotide hinter dem Stop-Codon sowie den Anfang des Poly-A Schwanzes. Die Nukleotidsequenz wurde unter der Zugangsnummer Y18965 bei der EMBL-Genbank eingereicht. Obwohl dieser Klon die gesamte kodierende Sequenz und die

3' untranslatierte Region lieferte, wurden zwei weitere Klone teilweise sequenziert, um unsichere Sequenzpassagen zu validieren. Diese Klone mit Inserts von 700- bzw. 1.350 Nukleotiden verifizierten insbesondere schwer aufzulösende Passagen der Nukleotidpositionen 523-676, 662-1343 und 1.284-1.840 (Originalarbeit I, Fig. 1), so dass die identifizierte Gesamtsequenz als sicher gelten kann. Ein Vergleich des kodierenden Bereiches der FI-Nukleotidsequenz der Ratte ergab eine Übereinstimmung von 78% mit der humanen (Goldberger et al., 1987; Catterall et al., 1987) und von 87% mit der murinen Sequenz (Minta et al., 1996) (Originalarbeit I, Fig. 1).

Nachfolgend wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der drei Spezies unter Verwendung des GCG-Programmes PILEUP so arrangiert, dass sich eine maximale Übereinstimmung ergab (Abb. 5). Die Übereinstimmung mit der AS-sequenz der Maus betrug 85%, die mit dem humanen Protein lediglich 69%. Wie auch die AS-sequenzen des humanen und des murinen Vorläuferproteins bestand die Ratten-FI Vorläuferform aus folgenden Abschnitten: 1. Leader-Sequenz, 2. Schwereketten, 3. Verbindungs-(Linker-)peptid, 4. katalytische Leichtkette. Ein AS-Sequenzvergleich dieser Abschnitte zeigte, dass die katalytische Leichtkette einen höheren Konservierungsgrad (88,5% zwischen Maus und Ratte, 73% zwischen Mensch und Ratte) aufwies als die Schwereketten (82% zwischen Maus und Ratte, 67% zwischen Mensch und Ratte). Das so genannte D-Segment (Pos. 299-335 in Abb. 5) dicht am Carboxyterminus der Schwereketten zeigte eine erheblich größere Übereinstimmung zwischen Ratte und Maus (27/37 AS) als zwischen Ratte und Mensch (10/37 AS). Dieses in Abb. 5 unterstrichene D-Segment (Diversitäts-Segment), das im Menschen 17 AS kürzer als in der Ratte und 16 AS kürzer als in der Maus ist, erklärte die Tatsache, dass die Schwereketten und auch die Gesamtsequenz der Ratte eine AS mehr als die Maussequenz enthält. Entsprechend Abb. 5 führte das Glycin an Position 316 zum einzigen zusätzlichen AS-Rest der Ratte (604 AS der Vorläuferform) im Vergleich zu 603 AS der Maus und 583 AS des humanen FI-Vorläuferproteins. Das Muster potentieller N-Glykosylierungsstellen zeigte teilweise Unterschiede zwischen den drei Spezies, obwohl die Anzahl der Positionen ähnlich war: 6 für das humane, 7 für das murine und 6 für das Vorläuferprotein der Ratte. Vier dieser potentiellen Glykosylierungsstellen waren in allen drei Spezies konserviert (Abb. 5): N₁₀₆, N₁₈₂, N₅₁₆ und N₅₅₈. N₁₁₆ war nur bei der Maus und in der Ratte, nicht aber in der humanen Sequenz zu finden, wohingegen die übrigen potentiellen N-Glykosylierungspositionen nur in einer der drei Spezies auftraten. Die entsprechend den Aminosäuresequenzen für die Schwereketten (38 kDa) und Leichtkette (28,5 kDa) berechneten Molekulargewichte zeigten im Vergleich zu den nach der Wanderungsstrecke im Immunblot kalkulierten relativen Molekulargewichten

von 50 kDa für die Schwer- und 38 kDa für die Leichtkette, dass vermutlich alle der sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen auch verzuckert sind. Daraus ergab sich ein Verzuckerungsanteil von mehr als 20% des Molekulargewichtes.

Abb. 5: Abgleich der Aminosäuresequenzen des Faktor I Vorläuferproteins aus Maus (FImouse), Ratte (Firat) und Mensch (FIhum) entsprechend dem PILEUP GCG-Programm

	1←LEADER SEQUENZ →← HEAVY CHAIN					50
FImouse	MKLAHLSLFL	LALHLSSRS	PSADLPQEE	LVDQKCLLQK	YTHRSCNKVF	
Firat	MKLALLLILL	LNPHLSSKN	TPASGQPQED	LVEQKCLLKN	YTHHSCDKVF	
FIhum	MKLLHVFLLF	LCFHLLRFCKV	TYTS...QED	LVEKKCLAKK	YTHLSCDKVF	
	51					100
FImouse	CQPWQRCIEG	TCICKLPYQC	PRAGTPVCAM	NGRSYPTYCH	QKSFECLEHPE	
Firat	CQPWQKCIEG	TCACKLPYQC	PKAGTPVCAT	NGRGYPTYCH	LKSFECLEHPE	
FIhum	CQPWQRCIEG	TCVCKLPYQC	PKNGTAVCAT	NRRSEPTYCQ	QKSLECLHPG	
	101					150
FImouse	IKFSHNGTCA	AEGKFNVSLI	YGRTKTEGLV	QVKLVDQDER	MFICKNSWSM	
Firat	IKFSNNGTCT	AEEKFNVSLI	YGSTDTEGIV	QVKLVDQDEK	MFICKNSWST	
FIhum	TKFLNNGTCT	AEGKFSVSLK	HGNTDSEGIV	EVKLVDQDKT	MFICKSSWSM	
	151					200
FImouse	AEANVACVDL	GFPLGVRDIQ	GSFNISGNLH	INDTECLHVH	CRGVETSLAE	
Firat	VEANVACFDL	GFPLGVRDIQ	GRFNIPVNHK	INSTECLHVR	CQGVETSLAE	
FIhum	REANVACLDL	GFQQGA.DTQ	RRFKLS.DLS	INSTECLHVH	CRGLETSLAE	
	201					250
FImouse	CAFTKRRTTEL	SNGLAGVVCY	KQDADFPTS	SFQCVNGKHI	PQEKACNGVN	
Firat	CTFTKKSSKA	PHGLAGVVCY	TQDADFPTSQ	SFQCVNGKRI	PQEKACDGVN	
FIhum	CTFTKRRTMG	YQDFADVVCY	TQKADSPMDD	FFQCVNGKYI	SQMKACDGIN	
	251					300
FImouse	DCGDQSDEL	CKGCRGNASL	CKSGVCIPDQ	YKCNGEVDCI	TGEDESRCEE	
Firat	DCGDQSDEL	CKGCRGQAF	CKSGVCIPNQ	RKCNGEVDCI	TGEDESGCEE	
FIhum	DCGDQSDEL	CKACQGKGFH	CKSGVCIPSQ	YQCNGEVDCI	TGEDEVGC..	
	301			HEAVY CHAIN		350
FImouse	<u>DRQQNIPKGL</u>	<u>ARSAQ.GEAE</u>	<u>IETEETEMLT</u>	<u>PGMDNERKRI</u>	<u>KSLLPKLSCG</u>	
Firat	<u>DKKNKIHKGL</u>	<u>ARSDQGGETE</u>	<u>IETEETEMLT</u>	<u>PDMDTERKRI</u>	<u>KSLLPKLSCG</u>	
FIhum	<u>.....</u>	<u>.....AGFAS</u>	<u>VAQEETEILT</u>	<u>ADMDAERRRI</u>	<u>KSLLPKLSCG</u>	
	351	→LIPEP←	LIGHT CHAIN			400
FImouse	VKRNTHTRRK	RVIGGKPANV	GDYPWQVAIK	DGQRITCGGI	YIGGCWILTA	
Firat	VKRNTHIRRK	RVVGGKPAEM	GDYPWQVAIK	DGDRITCGGI	YIGGCWILTA	
FIhum	VKNRMHIRRK	RIVGGKRAQL	GDLPWQVAIK	DASGITCGGI	YIGGCWILTA	
	401					450
FImouse	AHCVRPSRAH	SYQVWTALLD	WLKPN.SQLG	IQTVKRIVIH	EKYNGATFQN	
Firat	AHCVRPSRYR	NYQVWTSLLD	WLKPN.SQLA	VQGVSRVVVH	EKYNGATYQN	
FIhum	AHCLRASKTH	RYQIWTTVVD	WIHPDLKRIV	IEYVDRIIFH	ENYNAGTYQN	

```

451
FImouse DIALIEMKMH TGKKECELPN SVPACVPWSP YLFQPNDRCI ISGWGRGKDN
FIrat   DIALVEMKKH PGKKECELIN SVPACVPWSP YLFQPNDRCI ISGWGREKDN
FIhum   DIALIEMKGD GKKKDCELPR SIPACVPWSP YLFQPNDTCI VSGWGREKDN

501
FImouse QKVYSLRWGE VDLIGNCSQF YPDRYYEKEM QCAGTRDGS I DACKGDSGGP
FIrat   QKVYSLRWGE VDLIGNCSR F YPGRYYEKEM QCAGTSDGS I DACKGDSGGP
FIhum   ERVFSLQWGE VKLISNCSKF YGNRFYEKEM ECAGTYDGS I DACKGDSGGP

551
FImouse LVCEDTNVVT YVWGIVSWG E NCGKPEFPGV YTRVANYFDW ISYHVGRSLV
FIrat   LVCKDVNVVT YVWGIVSWG E NCGKPEFPGV YTRVASYFDW ISYYVGRPLV
FIhum   LVCMDANVVT YVWGVVSWG E NCGKPEFPGV YTKVANYFDW ISYHVGRPFI

601→
FImouse SQHNV*
FIrat   SQYNV*
FIhum   SQYNV*

```

Abb. 5: Die Aminosäuresequenzen wurden mit dem GCG-Programm PILEUP arrangiert. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen wurden nach der Formel N-Xaa-S/T ausfindig gemacht und sind kursiv und durch Fettdruck hervorgehoben. Unterstrichen ist das sogenannte Diversitäts Segment- (D-Segment) dargestellt.

Für Experimente zur Expression des FI wurden periphere Blutleukozyten aus der Ratte und dem Menschen isoliert. Die isolierten Zellpopulationen wurden auf ihre Homogenität mittels FACS-Analyse unter Verwendung spezifischer Antikörper untersucht. Monozyten aus der Ratte waren zu 86% homogen, die aus humanem Blut zu 90%. Granulozyten aus dem Pellet der Dichtegradientenzentrifugation erwiesen sich nach der sogenannten Gay'schen Lyse der Erythrozyten als nahezu homogen (>98%). Die B- und T-Zell Fraktionen beider Spezies zeigten einen B-Zell Anteil von etwa 20%, der T-Zell Anteil lag bei 87% (Ratte) bzw. 75% (Mensch). Damit waren alle Zelltypen in den entsprechenden Fraktionen ausreichend angereichert, um eine für den FI spezifische mRNA mittels RT-PCR selektiv nachzuweisen. Überraschend zeigte sich, dass periphere Blutzellen aus der Ratte und dem Menschen keine Faktor I Expression zeigten (Abb. 6). Auch Peritonealmakrophagen der Ratte, die im Gegensatz zu peripheren Blutmonozyten ausdifferenziertere Zellen repräsentieren, zeigten keine FI-spezifische mRNA (Abb. 6).

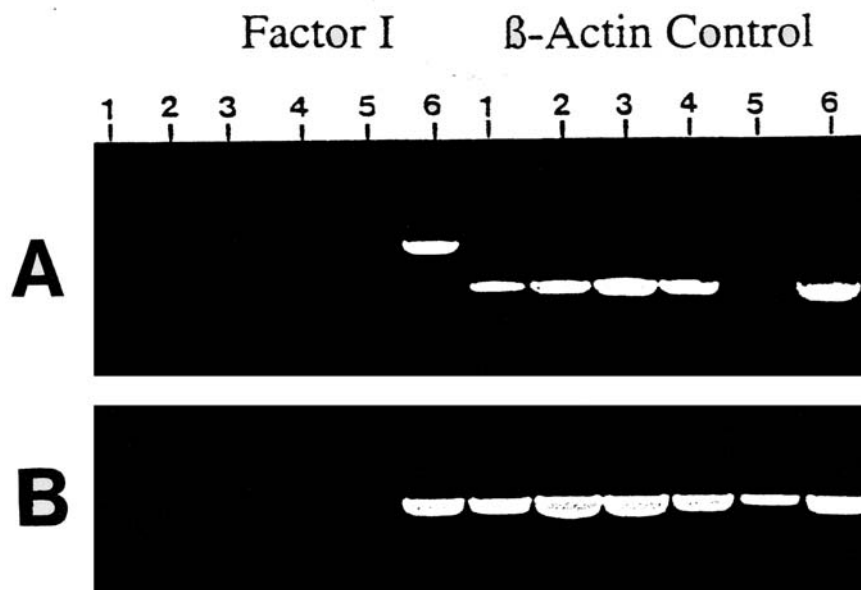


Abb. 6: Nachweis Faktor I-spezifischer und β -Aktin-spezifischer mRNA aus peripheren Blutzellen, Peritonealmakrophagen oder Hepatomzelllinien des Menschen (A) oder der Ratte (B). Keine FI-spezifische mRNA war in Leukozyten des peripheren Blutes (PBMNL) (1A, 1B), in der B/T Zellfraktion (2A, 2B), in Monozyten (3A, 3B) oder in Granulozyten (4A, 4B) nachweisbar. Auf Bahn 5A wurde keine DNA aufgetragen, auf Bahn 5B zeigten Peritonealmakrophagen der Ratte ebenfalls kein FI-spezifisches Amplifikat. FI-spezifische mRNA konnte dagegen in humanen HepG2 Zellen (6A) und in H4IIE Zellen der Ratte (6B) detektiert werden.

Nach dem Ausschluss peripherer Blutleukozyten als extrahepatische Quelle des FI wurden isolierte Leberzellen der Ratte auf ihre Expression FI-spezifischer mRNA untersucht. Lediglich aus den parenchymalen Hepatozyten (HC) ließ sich FI-spezifische mRNA isolieren. Die nicht-parenchymalen Zelltypen [Kupfferzellen (KC), hepatische Sternzellen (HSC) und sinusoidale Endothelzellen (SEC)] zeigten keine Expression FI-spezifischer mRNA (Originalarbeit I, Fig. 5). In Übereinstimmung mit den primären HC ließ sich in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 und in den Rattenhepatomzelllinien H4IIE und FAO Faktor I-spezifische mRNA nachweisen, d.h. alle drei untersuchten aus Hepatozyten hervorgegangenen Hepatomzelllinien zeigen eine Expression von FI (Originalarbeit I, Fig. 5). Zusätzlich zu den Leberzellen wurden verschiedene Lymphomzelllinien aus dem Menschen auf die Expression FI-spezifischer mRNA untersucht. FI-spezifische mRNA konnte in keiner der untersuchten B-Zelllinien (WIL2-NS, Raji, Ramos) oder T-Zelllinien (Molt 4, Jurkat, HUT 102) unterschiedlicher Differenzierungsstadien sowie der humanen prämonozytischen Linie U937 ohne und nach Stimulation mit dibutyryl cAMP nachgewiesen werden. Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) hingegen zeigten ein deutliches FI-spezifisches Amplifikat (Originalarbeit I, Fig. 6).

2.2 Heraufregulation des Komplement-inhibitorischen Faktor I in Rattenhepatozyten und den Hepatomzelllinien H4IIE und FAO durch das proinflammatorische Zytokin IL-6 aber nicht durch Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β oder Interferon- γ

Nach der Identifizierung der Primärstruktur des Ratten-FI und Untersuchungen zu seiner Expression in verschiedenen Geweben und Zellen sollte untersucht werden, ob sein Expressionsniveau ähnlich wie für den Faktor H bekannt durch proinflammatorische Zytokine beeinflusst wird. Für den Faktor H war bekannt, dass seine Synthese in nahezu allen untersuchten Geweben, isolierten Zellen und Zelllinien durch das proinflammatorische Zytokin Interferon- γ heraufreguliert wird. Weil darüber hinaus publiziert worden war, dass der FI wie auch der FH in HUVEC durch IFN- γ heraufreguliert wird (Julen et al., 1992), galt dieses Zytokin zunächst als Favorit auch für eine Heraufregulation des FI in der Ratte. HUVEC waren zuvor in verschiedenen Studien als extrahepatische Quelle des Komplementfaktors I identifiziert worden (Ripoche et al., 1988b; Julen et al., 1992; Originalarbeit I/Schlaf et al., 1999b). Das Ziel dieser Studie bestand darin, die Hypothese zu untermauern, dass im Verlauf einer entzündlichen Situation eine exzessive Aktivierung des Komplementsystems durch eine Expressionserhöhung des inhibitorischen Komplementfaktors I verhindert wird, d.h. proinflammatorische Zytokine als Entzündungsmediatoren ein Überschiessen des Komplementsystems unterbinden, indem sie dessen Inhibitoren heraufregulieren.

Als erster Ansatz zur Untersuchung der Frage, welche der aufgeführten Zytokine die Expression des FI heraufregulieren, wurden diese in der höchsten vom Hersteller empfohlenen Konzentration (Aktivität) verwendet. Primäre HC der Ratte und die beiden Rattenhepatomzelllinien FAO und H4IIE wurden mit folgenden Aktivitäten der einzelnen Zytokine stimuliert: 200 U/ml rekombinantes humanes (rh) IL-6, 100 U/ml rekombinantes Ratten (rr) IL-1 β , 100 U/ml rr IFN- γ oder 200 U/ml rr TNF- α . Dabei zeigte lediglich IL-6 einen Effekt auf das Expressionsniveau des FI. Die PCR ergab ein deutlich verstärktes FI-spezifisches Amplifikat von 707 Nukleotiden nach 28 Zyklen. Auch die FI-spezifische mRNA der Hepatomzelllinien H4IIE und FAO, die den FI konstitutiv exprimierten, wurde jeweils durch IL-6 mit Aktivitäten von 100 U/ml bzw. 200 U/ml deutlich heraufreguliert (Abb. 7A).

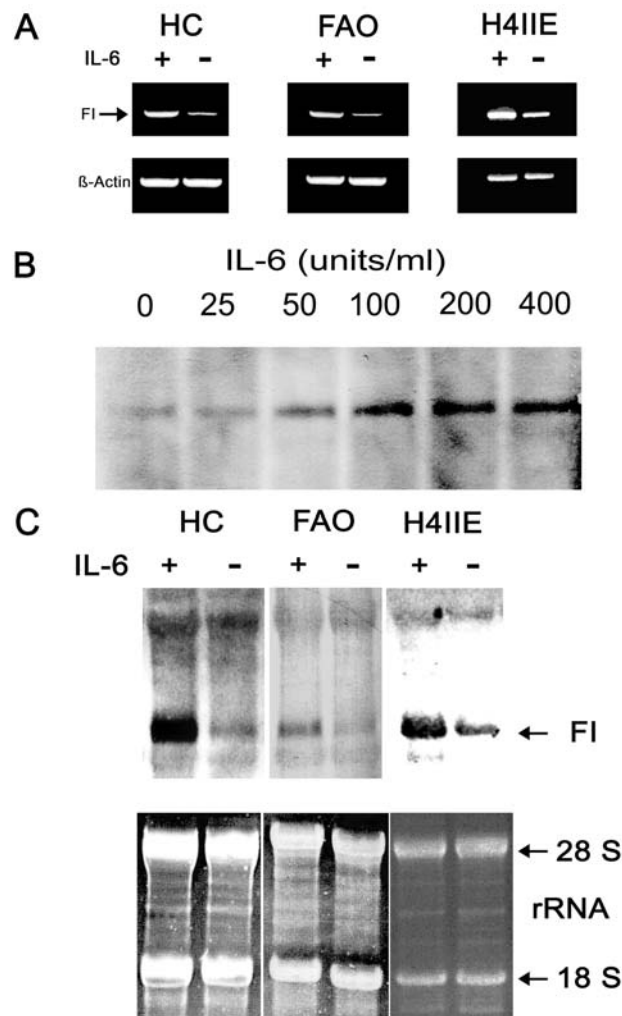


Abb. 7: Analyse der IL-6 –vermittelten Heraufregulation des FI mittels RT-PCR (A) oder Northern Blot Verfahren (B,C).

A) Untersuchung der Heraufregulation FI-spezifischer mRNA aus primären Rattenhepatozyten (HC) sowie den beiden Hepatomzelllinien FAO und H4IIE nach Stimulation der Zellen mit 200 U/ml IL-6 für 24h mittels RT-PCR. **B)** Dosis-Wirkungs-Beziehung der IL-6 –vermittelten Heraufregulation FI-spezifischer mRNA mittels Northern Blot Analyse. Die primären Rattenhepatozyten wurden mit den angegebenen IL-6-Aktivitäten für 24h stimuliert. **C)** Demonstration der Heraufregulation FI-spezifischer mRNA in primären Rattenhepatozyten und den beiden Rattenhepatomzelllinien FAO und H4IIE nach Stimulation der Zellen mit IL-6 (200 U/ml) für 24h mittels Northern Blot Analyse (oberes Bild). Die Gelfärbung der ribosomalen RNA (Biorad Radiant Stain) von 28S bzw. 18S (vor dem Transfer) zeigte, dass jeweils gleiche Mengen an Gesamt RNA aus den stimulierten bzw. nicht stimulierten Zellen aufgetragen worden waren.

Die Identität des Amplifikates als Teilsequenz des Ratten-FI wurde durch eine partielle Sequenzierung des PCR-Produktes verifiziert. Aufgrund der Analyse der β-Aktin Kontrollamplifikate konnte ausgeschlossen werden, dass die Expressionsunterschiede auf methodischen Ursachen wie z.B. der Umschreibung von mRNA in cDNA beruhten. Eine

Dosis-Effekt Beziehung wurde mittels Northern Blot Analyse von primären Rattenhepatozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die basale/konstitutive FI-Expression ab einer Aktivität von 50 U/ml anwuchs, um bei 100 U/ml ein Plateau zu erreichen, welches auch mit 200 bzw. 400 U/ml nicht weiter gesteigert werden konnte (Abb. 7B). Für einen direkten Assay zur Untersuchung der Expression von FI-mRNA wurden primäre HC sowie die beiden Hepatomzelllinien mittels Northern Blot Analyse untersucht. Erneut konnte gezeigt werden, dass IL-6 die Expression des FI heraufreguliert (Fig. 7C). Alle drei Zelltypen zeigten somit nach Stimulation mit IL-6 eine in ihrer Expression deutlich erhöhte FI-spezifische mRNA- Bande im Bereich von 2,3 kB (Pfeil). Die Gelfärbung der RNA vor dem Transfer auf die Nylonmembran (Biorad Radiant Stain) zeigte aufgrund der korrespondierenden Intensitäten der ribosomalen RNA-Banden (rRNA-Banden) von 28S (4,7 kB) bzw. 18S (1,9 kB) deutlich, dass identische Mengen an RNA (10 µg) aus stimulierten und unstimulierten Zellen auf das Agarosegel aufgetragen worden waren (Abb. 7C).

Um die Steigerung der FI-spezifischen mRNA exakter quantifizieren zu können, wurde die Methode der quantitativ-kompetitiven RT-PCR etabliert. Als Kompetitor diente ein externer Lambda-Standard mit einer Länge von 500 Nukleotiden, der 207 Nukleotide kürzer als das FI-spezifische Amplifikat war. Wurden nun gleiche Mengen an cDNA mit abnehmenden Mengen der Lambda-Kompetitor DNA (1:10 Verdünnungen) koamplifiziert, so konkurrierten beide entsprechend ihrem molaren Verhältnis um die verwendeten Primer. Das Äquilibrium aus Kompetitor-DNA und FI-spezifischer cDNA in den stimulierten Zellen verschob sich nach Stimulation mit IL-6 etwa um einen Faktor von 10, d.h. etwa 10-fach mehr Kompetitor wurde benötigt, um ein Äquilibrium beider Amplifikate zu ergeben (Originalarbeit II, Fig. 2). Das analoge Experiment unter Verwendung der Hepatomzelllinien FAO und H4IIE ergab sehr ähnliche Verschiebungen, d.h. eine Heraufregulationen der FI-mRNA in sehr ähnlichen Größenordnungen.

Unter Verwendung eines gegen ein Peptid aus der Ratten FI-Aminosäuresequenz (H2N-KNT-PASGQPQEDLVEC-COOH; Pos. 19-33 des Vorläuferproteins) generierten monoklonalen Antikörpers (mAb 6D11-G8) wurde der Nachweis einer erhöhten Synthese des FI auch auf der Ebene der Proteinsekretion erbracht. Dazu wurden Überstände von für 48h in FCS-freiem Medium kultivierten HC auf ihren Gesamtproteingehalt untersucht und gleiche Gesamtproteinmengen mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert. Anschließend wurden die Präzipitate im SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Proteintransfer mit dem oben erwähnten Antikörper im Immunblot nachgewiesen. Es zeigte sich, dass das im nicht reduzierenden Gel bei 88 kDa migrierende FI-Signal im Überstand IL-6 -stimulierter Zellen deutlich intensiver

ausfiel (Originalarbeit II, Fig. 3). Als Referenz wurden 3 μ l Rattenserum aufgetragen. Im Serum konnte eine deutliche FI-spezifische Bande im Bereich von 88 kDa nachgewiesen werden. Mit dieser Methode konnte semiquantitativ gezeigt werden, dass die IL-6-vermittelte Heraufregulation des FI auch auf der Ebene des sezernierten Proteins nachweisbar war. Sehr ähnliche Resultate zur Heraufregulation des FI-Proteins zeigten sich unter Verwendung der Hepatomzelllinien H4IIE und FAO in der Immunblotanalyse.

Die Zytokine, die keine Wirkung auf die Regulation des FI gezeigt hatten, wurden anschließend systematischer auf Rattenhepatozyten und den beiden Rattenhepatomzelllinien H4IIE und FAO untersucht. Die von den Herstellern empfohlenen Anwendungsaktivitäten der einzelnen Zytokine wurden verdoppelt, d.h. IL-1 β wurde in einer Konzentration von 20 ng/ml (200 U/ml), IFN- γ in einer Konzentration von 400 ng/ml (200 U/ml) und TNF- α in einer Konzentration von 10 ng/ml (400 U/ml) eingesetzt. Darüber hinaus wurden die drei Zytokine in diesen hohen Konzentrationen in Kombination zusammen mit oder ohne IL-6 (200 U/ml) verwendet. Mittels RT-PCR durchgeführte Versuche zeigten, dass die drei „negativen“ Zytokine auch in Kombination keinerlei Wirkung zeigten. Ebenso ließ sich der durch IL-6 vermittelte Effekt durch die Zugabe der „negativen“ Zytokine nicht steigern. Damit wurde belegt, dass die „negativen“ Zytokine keinerlei eigene Effekte und auch keine synergistische Steigerung des IL-6 Effektes bewirkten.

Weil IFN- γ keinerlei Effekt auf die Regulation des FI in HC und den Hepatomzelllinien H4IIE und FAO zeigte, wurde die zuvor publizierte IFN- γ –vermittelte Heraufregulation des FI in HUVEC (Julen et al., 1992) erneut untersucht. Auch in HUVEC ließ sich mittels RT-PCR eindeutig keine IFN- γ –vermittelte Heraufregulation des FI feststellen (Originalarbeit II, Fig. 4; Originalarbeit III, Fig. 3). Wie in HC regulierte nur IL-6 die Expression von FI-spezifischer mRNA herauf. Als Kontrolle für die Aktivität der verwendeten IFN- γ Probe wurde parallel eine Heraufregulation des FH (ebenfalls mittels RT-PCR) untersucht. In diesem Versuch zeigte die verwendete IFN- γ Probe eindeutig eine Heraufregulation FH-spezifischer mRNA [Amplifikat von 985 Bp] (Originalarbeit II, Fig. 4; Originalarbeit III, Fig. 3). Die β -Aktin spezifischen Amplifikate zeigten dagegen keine Veränderungen.

2.3 Der Komplement-inhibitorische Faktor H der Ratte: Seine Expression und Regulation in primären Kulturen von Hepatozyten, Kupfferzellen und zwei Hepatomzelllinien der Ratte (H4IIE und FAO)

Die Expression des FH ist weit weniger eingeschränkt als die des FI. Obwohl analog zum FI die Leber als primäres Expressionsorgan auch des FH definiert wurde (Zipfel und Skerka, 1994), sind als Orte der extrahepatischen Expression humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) (Brooimanns et al., 1989; Ripoche et al., 1988a), periphere Blutmonozyten (Whaley, 1980), verschiedene Zellen der Monozyten/Makrophagenserie (De Ceulaer et al., 1980), primäre Hautfibroblasten (Katz und Strunk, 1988), Fibroblasten-ähnliche L-Zellen (Munoz-Canoves et al., 1989), primäre Myoblasten und Rhabdomyosarcomzelllinien (Legoedec et al., 1995), Gliomzelllinien (Gasque et al., 1992) und glomeruläre Mesangialzellen (van den Dobbelsteen et al., 1994) identifiziert worden. Diese Zellen fungieren als lokale Quellen des FH, um Gewebsschädigungen zu unterdrücken, die auf lokale Komplementaktivierungen zurückzuführen sind. Als „Modelle“ zur Untersuchung einer hepatischen Synthese des FH und zur Untersuchung ihrer Regulation wurden verschiedene Hepatomzelllinien der Maus (+/+ Li) (Vik, 1996) und des Menschen, namentlich die Zelllinien Hep 3B (Luo und Vik, 1999; Schwaeble et al., 1991), HepG2 (Schwaeble et al., 1991; Lappin et al., 1992) sowie HepG3, HepG4 und H4 (Schwaeble et al., 1991) herangezogen.

In den Originalarbeiten III und IV (Schlaf et al., 2001b; Schlaf et al., 2002) wurde erstmalig das Expressions- und Regulationsmuster in primären HC und KC der Ratte sowie in den beiden Rattenhepatomzelllinien FAO und H4IIE untersucht. Analog zu den Untersuchungen der FI-Regulation in den Originalarbeiten II und III (Schlaf et al., 2001a und 2001b) wurden die proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ und zusätzlich das Endotoxin LPS auf ihren potentiellen Einfluß auf die Expression des FH in den aufgeführten primären Zellen und Zelllinien untersucht.

Zunächst wurde die konstitutive Expression des FH in Hepatozyten (HC) und Kupfferzellen (KC) untersucht. Eine konventionelle RT-PCR unter Verwendung gleicher Mengen an revers transskribierter mRNA zeigte, dass im Gegensatz zum FI, dessen spezifische mRNA nur in HC nachweisbar war, FH-spezifische mRNA in beiden Zelltypen detektierbar war (Abb. 9A), wobei KC eine erheblich stärkere Expression zeigten. Mittels quantitativ-kompetitiver PCR konnte der Unterschied auf etwa 10-fach festgelegt werden, d.h. das Equilibrium zwischen den Amplifikaten der FH-spezifischen cDNA und der DNA des Kompetitors zeigte bei dem

Vergleich von HC und KC eine Verschiebung um einen Faktor von annähernd 10 (Abb. 9B). Zu ihrer Identifizierung wurden die Amplifikate beider Faktoren partiell sequenziert.

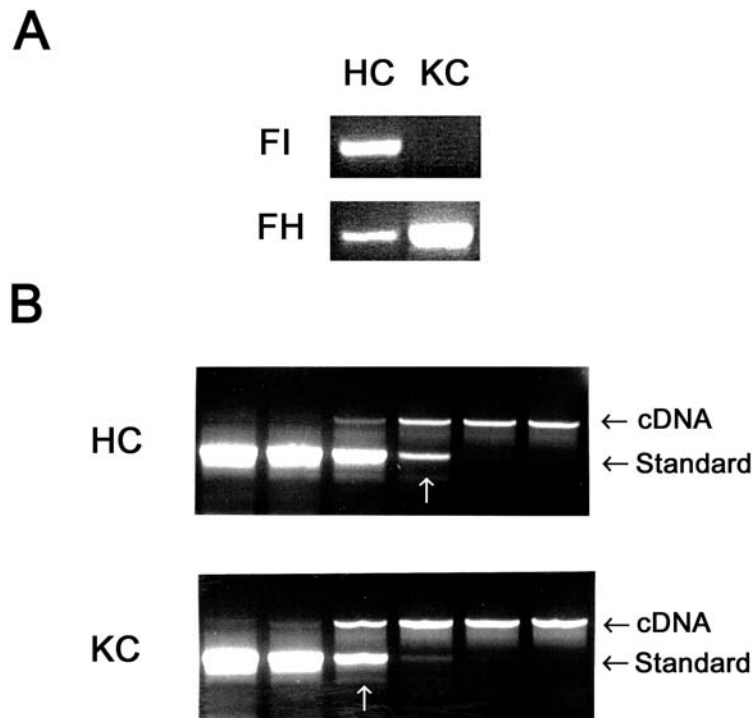


Abb. 9: Nachweis der konstitutiven Expression spezifischer mRNA für die Komplementfaktoren I (FI) und H (FH) in isolierten Hepatozyten (HC) und Kupferzellen (KC) in der RT-PCR
(A) Nachweis FI- und FH-spezifischer mRNA in isolierten HC und KC mittels RT-PCR. **(B)** Quantifizierung der konstitutiv exprimierten FH-spezifischen mRNA in HC und KC mittels quantitativ-kompetitiver PCR. Gleiche Mengen an cDNA aus HC oder KC wurden zusammen mit 10-fachen Verdünnungen eines externen λ -Standards (500 Nucleotide) koamplifiziert. Die weißen Pfeile geben die Verdünnungsstufen wieder, bei denen die Amplifikate etwa equimolar vorliegen. Die Expression FH-spezifischer mRNA in HC und KC unterscheidet sich somit um einen Faktor von etwa 10 (10-fach höhere Expression in KC).

Weil IFN- γ als effektiver Induktor der FH-Synthese in einigen primären Zellen und diversen transformierten Zelllinien bekannt war (Ripoche et al., 1988b; Brooimanns et al., 1989; Schwaeble et al., 1991 ; Vik, 1996; Luo und Vik, 1999), wurde dessen potentieller Einfluß auf die FH-Synthese auch in primären HC und den beiden Hepatomzelllinien FAO und H4IIE untersucht. Mittels konventioneller RT-PCR wurde herausgefunden, dass primäre HC ihre FH-spezifische mRNA nach Stimulation mit IFN- γ (100 U/ml) heraufregulierten, während die beiden Hepatomzelllinien FAO und H4IIE dieses Verhalten nicht zeigten. H4IIE-Zellen zeigten weder eine konstitutive noch eine induzierbare Synthese des FH, während FAO-Zellen eine stärkere konstitutive Expression als primäre HC zeigten, die im Gegensatz zu

primären HC allerdings nicht durch IFN- γ zu steigern war. Dieser Befund zeigte deutlich, dass beide Hepatomzelllinien (FAO und H4IIE) bezüglich der FH-Expression und Regulation die Physiologie primärer HC nicht repräsentieren (Originalarbeit IV, Fig. 2). Aufgrund dieses von primären HC abweichenden Verhaltens wurden alle weiteren Untersuchungen nur noch mit primären Zellen durchgeführt. In der Northern Blot Analyse konnte der Befund der Heraufregulation FH-spezifischer mRNA bestätigt werden. Während das gefärbte Agarosegel gleiche Intensitäten der 28S bzw. 18S ribosomalen RNA Banden zeigte, ließ sich das FH-spezifische mRNA Signal in den mit IFN- γ stimulierten Zellen deutlich steigern. Eine mittels quantitativ-kompetitiver PCR durchgeführte Quantifizierung der Heraufregulation FH-spezifischer cDNA (mRNA) nach Stimulation mit 100 U/ml IFN- γ ergab eine Heraufregulation um einen Faktor von etwa sieben, weil das Äquilibrium zwischen der DNA des Kompetitors, der in 1:10 Verdünnungen eingesetzt worden war, und der FH-spezifischen cDNA nach einer Verschiebung um eine Bahn nicht komplett erreicht wurde (Originalarbeit IV, Fig. 2).

Die Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von IFN- γ auf die Expressionserhöhung der FH-spezifischen cDNA (mRNA) zeigte nach einer Stimulation unter der Gabe von IFN- γ in Konzentrationen von 0, 10, 20, 50, 100 und 200 U/ml, dass ein Plateau der Expressionserhöhung FH-spezifischer cDNA bei 50 U/ml erreicht war (Originalarbeit IV, Fig. 3). Auch bei der halbquantitativen Untersuchung des sezernierten FH-Proteins im Immunblotverfahren zeigte sich eine analoge Dosis-Effekt Kurve (Originalarbeit IV, Fig. 3). Ein Anwachsen des Signals war bereits nach einer Stimulation mit einer Konzentration von 10 und 20 U/ml zu sehen. Eine Plateauintensität des halbquantitativen Immunblotsignals der für 72h mit den oben aufgeführten Konzentrationen von IFN- γ stimulierten HC wurde nach dem Auftrag gleicher Gesamtproteinmengen (je 30 μ g/Bahn) mit einer Konzentration von 50 U/ml und mehr erreicht (Originalarbeit IV, Fig. 3). Der Immunblot wurde mit dem für Ratten FH spezifischen, neu generierten monoklonalen Antikörper mAk 4-7D entwickelt, der in dem später etablierten Sandwich-ELISA als Fangantikörper eingesetzt wurde. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Publikation (Originalarbeit IV;/Schlaf et al., 2002) befand sich der für den ELISA benötigte polyklonale Detektionsantikörper (durch die Immunisierung eines Kaninchens mit immunaffinitätschromatographisch aus Rattenserum gereinigtem Faktor H) noch in der Entwicklung.

Die anderen untersuchten proinflammatorischen Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IL-6) zeigten auch in der jeweils doppelten von den Herstellern empfohlenen maximalen Konzentration keinen heraufregulierenden Effekt (Originalarbeit IV, Fig. 4). Lediglich IL-1 β zeigte in einer

Konzentration von 100 U/ml reproduzierbar eine Herabregulation FH-spezifischer mRNA sowohl in HC als auch in KC.

Ein zuvor beschriebener regulatorischer Effekt von LPS (1 µg/ml) (Minta, 1988), der eine etwa dreifache Steigerung des von der prämonozytischen Zelllinie U937 sezernierten FH bewirkte, war zum Zeitpunkt der Originalarbeit IV (Schlaf et al., 2002) als weitaus überphysiologisch für eine Rezeptor-vermittelte LPS-Signaltransduktion bekannt. Aus diesem Grund wurden für die vorliegende Arbeit LPS-Konzentrationen von 10 oder 1 ng/ml verwendet. Diese Konzentrationen reichten für die Erzeugung reproduzierbarer LPS-Effekte für eine Heraufregulation von FH-spezifischer mRNA und sezerniertem FH-Protein aus. Mittels RT-PCR Analysen konnte nachgewiesen werden, dass LPS (1 ng/ml) die basale Menge an FH-spezifischer mRNA in KC stärker heraufregulierte als IFN- γ (100 U/ml) (Originalarbeit IV, Fig. 5). Bereits die Verwendung von LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml führte zu keiner zusätzlichen Verstärkung des FH-Amplifikates. Die grundsätzliche Aktivierung der isolierten KC sowohl durch die Stimulation mit IFN- γ als auch mit LPS wurde durch die Heraufregulation der spezifischen mRNA für IL-6 und IL-1 β nachgewiesen. LPS bewirkte bereits in einer Konzentration von 1 ng/ml eine maximale Heraufregulation der mRNA-Spezies beider Zytokine. In primären HC hingegen zeigte LPS bis zu einer Konzentration von 2 µg/ml keine Wirkung auf die Regulation von FH-spezifischer mRNA; lediglich IFN- γ (als Positivkontrolle) zeigte seine bekannte die FH-spezifische mRNA heraufregulierende Wirkung. Dieser Befund unterstützte auch die durch eine andere Arbeit (Koleva/Schlaf et al., 2002) gewonnene Erkenntnis, dass LPS ganz offensichtlich grundsätzlich keine Wirkung auf HC der Ratte zeigt.

Die Effekte der Heraufregulation FH-spezifischer mRNA wurden anschließend durch den halbquantitativen Nachweis des FH im Immunblot dargestellt. Jeweils 30 µg Gesamtprotein aus Überständen von nicht stimulierten KC oder von KC, die mit IFN- γ (100 U/ml) oder LPS (1 ng/ml) stimuliert worden waren, wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das FH-spezifische Immunblotsignal beider stimulierter Ansätze zeigte eine eindeutige Steigerung im Vergleich zu dem aus dem Überstand nicht stimulierter Zellen gewonnenen Immunblotsignal (Originalarbeit IV, Fig. 6).

2.4 Identifizierung der Primärstruktur des Ratten FH und Entwicklung eines spezifischen ELISA zu seiner Quantifizierung

Bereits erste durchgeführte Polymerasekettenreaktionen zur Gewinnung von Teilamplifikaten des Ratten FH und die nachfolgende Sequenzierung zur Überprüfung der Nukleotidentität

zeigten teilweise gravierende Abweichungen von der unter der EMBL-Zugangsnummer A 91883 im Januar 2000 eingereichten Nukleotidsequenz des Ratten FH, die aus der zuvor erteilten Patentnummer WO 9823638-A/1 hervorgegangen war (beide Nummern waren W. Schwaeble und R.B. Sim zugeteilt worden). Wiederholungen der PCRs unter der Verwendung so genannter „Proof Reading Polymerasen“, die für eine sehr geringe Fehlerquote beim Einbau der Nukleotide bekannt sind, bestätigten die Diskrepanzen aus der Patentschrift von Schwaeble/Sim und unserer Gruppe. Weil ein Ziel unserer Arbeiten die rekombinante Herstellung von funktionellen Fragmenten des Ratten FH war, war es wichtig, auf eine solide cDNA Sequenz zurückgreifen zu können. So wurde der Entschluß gefasst, die cDNA-Sequenz des Ratten FH erneut in voller Länge aus einer cDNA Bank zu isolieren.

Für die Generierung von zwei FH-spezifischen Hybridisierungssonden zum Screening derselben cDNA-Gesamtleberbank, die auch für die Identifizierung der FI-cDNA der Ratte Verwendung fand, wurden degenerierte Primer angefertigt. Zu diesem Zweck waren die publizierten Sequenzen des Menschen und der Maus auf korrespondierende Nukleotide untersucht worden, um aus diesen konservierten Bereichen Primer zur Generierung einer Sonde anzufertigen. Nicht übereinstimmende Einzelnukleotide wurden durch den Einbau sogenannter „Wobbles“ angepasst, so dass Sonden mittels degenerierter Primer erzeugt werden konnten. Durch Verwendung von zwei Primerkombinationen wurden zwei Sonden generiert, die 1.003 Bp (FH2) bzw. zur Identifizierung des 5' Bereiches der FH-spezifischen cDNA 428 Bp (FH1) umfassten. Die degenerierten Primer wurden entsprechend den cDNA Sequenzen der Maus (Kristensen und Tack, 1986) und des Menschen (Ripoche et al., 1988a) ausgewählt (Originalarbeit V / Demberg et al., 2002). Die Identität der generierten Sonden als Teil der FH-Sequenz wurde durch Nukleotidsequenzierungen validiert. Mittels der Sonde FH2 (1.003 Bp) konnten zehn positive Klone „gefischt“ werden, die FH-spezifische Inserts enthielten. Diese wurden in das korrespondierende Plasmid pTriplEx nach Einschleusung in BM 25.8 Zellen konvertiert. Auf diese Weise wurden alle Nukleotide zwischen den Positionen 1028 und dem Beginn des Poly-A Schwanzes unter Verwendung der pTriplEx-spezifischen Primer λ TriplEx 5' und λ TriplEx 3' sequenziert. Weil es sich bei der verwendeten cDNA Bank um eine „oligo-dt –geprimte“ Bank handelte, wurde eine zweite Sonde generiert, die die Positionen 78-505 umfasste (Sonde FH1) (Originalarbeit V, Fig. 1). Mit dieser wurde in vielen Versuchen lediglich ein positiver Klon identifiziert, der allerdings die gesamte fehlende kodierende 5'-Sequenz und 23 Nukleotide des 5'- untranslatierten Bereiches enthielt. Als Resultat ergab sich, dass die Gesamtsequenz 4.240 Nukleotide umfasste, wobei der offene Leserahmen aus 3.708 Nukleotiden bestand. An diesen schloss

sich ein Stop-Codon und eine 3' untranslatierte Region aus 478 Nukleotiden an, die dem Poly-A Schwanz vorausging (Originalarbeit V, Fig. 1).

Ein Vergleich der in der Originalarbeit V (Demberg et al., 2002) vorliegenden cDNA Sequenz (EMBL-Zugangsnummer AJ320522) ergab eine Übereinstimmung von 74% mit der humanen FH cDNA (Ripoche et al., 1988a) und von 87% mit der murinen FH cDNA (Kristensen und Tack, 1986). Das translatierte Produkt der Ratte umfasste 1.236 AS inklusive der Leader-Sequenz. Die Translationsprodukte aus Mensch und Maus umfassen 1.236 AS bzw. 1.231 AS. Die aus den cDNA-Sequenzen abgeleiteten translatierten Produkte aus den drei Spezies Ratte, Mensch und Maus wurden mit dem GCG-Programm PILEUP so arrangiert, dass sich die höchste Sequenzhomologie ergab (Abb. 10). Entsprechend den Erwartungen zeigte das Mausprotein im Vergleich zum Rattenprotein die höchste Übereinstimmung auf Aminosäureebene (81,5%), während das humane Protein lediglich 63% an identischen AS aufwies. Entsprechend der Sequenzfolge N-Xaa-S/T (wobei Xaa kein Prolin sein darf) zeigte der FH der Ratte fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen (in Abb. 10 durch ein *N* dargestellt) im Vergleich zu fünf potentiellen N-Glykosylierungspositionen im FH der Maus und neun in der humanen AS-Sequenz. Die Konservierung dieser potentiellen N-Glykosylierungspositionen in den drei Spezies war nicht hoch. Lediglich eine Position (N₈₀₂) war in allen drei Spezies konserviert. Zwei Positionen (N₇₇₄ und N₁₀₆₄) waren in Ratte und Maus konserviert aber in der humanen Sequenz nicht vorhanden. Die restlichen N-Glykosylierungspositionen konnten lediglich in einer der drei Spezies gefunden werden (Abb. 10). Das Glykosylierungsmuster variiert offensichtlich stark innerhalb der untersuchten Spezies, insbesondere weil die beiden Glykosylierungspositionen im SCR 15 der humanen Sequenz, die als glykosyliert identifiziert worden sind (Sim und DiScipio, 1982), in der Ratte und Maus gar nicht existieren. Ein Oligosaccharidanteil von 3 kDa an jeder der fünf potentiellen Glykosylierungspositionen würde allerdings die Differenz zwischen dem nach der cDNA vorausgesagten Molekulargewicht (140,3 kDa) und dem relativen Molekulargewicht des immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten und im SDS-Gel aufgetrennten FH (155 kDa) erklären. Das relative Molekulargewicht von 155 kDa wurde neben der Silberfärbung des FH im SDS-Gel auch mittels Immunblotanalyse durch den selbst generierten monoklonalen anti Ratten-FH Antikörper (mAk) 6-9F untermauert. Die resultierende auf die Glykosylierung zurückzuführende Molekulargewichtsdifferenz von 9,5% bewegt sich somit dicht an der Differenz von 9,3%, die für den humanen FH bestimmt worden ist (Sim und DiScipio, 1982). Die sogenannten Leadersequenzen (die ersten 18AS) des murinen und Ratten FH sind mit Ausnahme der Position 17 identisch. Im Vergleich mit

der humanen Leadersequenz weisen beide Signalpeptide (aus der Ratte und der Maus) jeweils 11 Übereinstimmungen auf. Ein weiterer Unterschied liegt in der carboxyterminalen Sequenz des humanen FH, der aus zwei zusätzlichen basischen AS (K-R) besteht, die in Ratte und Maus nicht aufzufinden sind.

Abb. 10 : Abgleich der Aminosäuresequenzen des Faktor H aus den Spezies Ratte, Maus und Mensch entsprechend dem PILEUP GCG-Programm

	1←LEADER SEQUENCE→←-	SCR1	50
FH Ratte	MRLSARIWL ILWTVCAED CKGPPPRENS	EILSGSWSEQ	LYSEGQTQATY
FH Maus	MRLSARIWL ILWTVCAED CKGPPPRENS	EILSGSWSEQ	LYPEGTQATY
FH Mensch	MRL LAKIICL MLWAI CVAED CNELPPRNT	EIL TGSWS DQ	TY PEGTQ AI Y
	51	SCR1	→←- SCR2 100
FH Ratte	KCRPGYRTLK TIVKVCKNGE WVPSNPSRIC	RKRPCGHPGD	TPFGSFRLLAV
FH Maus	KCRPGYRTLK TIVKVCKNG K WV ASNPSRIC	R K PCGHPGD	TPFGSFRLLAV
FH Mensch	KCRPGY SLG NVIMVCR KGE WV AL NPLR KC	Q KR PCG HPGD	TPFG TFTL TG
	101	SCR2	→←- 150
FH Ratte	GSEFEFGAKV VYTCDEGYQL LGEIDYRECD	ADGWTNDIPI	CEVVKCLPVT
FH Maus	GS Q FEFGAKV VYTC D GYQL LGEIDYRE C G	ADGW I NDI P L	CEVVKCLPVT
FH Mensch	GNVFEY G VKA VYTC NE GYQL LGE I NYRECD	T DGWTNDIPI	CEVVKCLPVT
	151	SCR3	200
FH Ratte	ELENGRIVSG AAEPDQEYFF GQVVRFECS	GFKIEGQKEM	HCSENGLWSN
FH Maus	ELENGRIVSG AAETDQEYFF GQVVRFECS	GFKIEG HKEI	HCSENGLWSN
FH Mensch	APEN GKIV SS AMEPDR EY HF GQ AVR FV CNS	G YKIEG DE EM	H CSDD G FWSK
	201 →←-	SCR4	250
FH Ratte	EKPQCVEISC LPPRVENGDG IYLKPVYKEN	ERFQYKCKQG	FVYKERGDAV
FH Maus	E KPR CVEILC TP PRVENGDG I NVKPVYKEN	ER YH YKCK HG	YV PKERGDAV
FH Mensch	E KPK CVEISC KSPDVI NGSP I S QKI IYKEN	ERFQYK CNM G	YE YSERGDAV
	251 SCR4 →←-	SCR5	300
FH Ratte	CTGSGWNPQP SCEEMTCLTP YIPNGIYTPH	RIKHRIDDEI	RYECKNGLYP
FH Maus	CTGSG SS QP F CEE KRC SPP YILNGIYTPH	RI I HR S DDEI	RYE CNY G F YP
FH Mensch	CT ESG WR LP S CEE K SCDNP YIPNG DY SPL	RIKH R TGDEI	TY Q CR NG F YP
	301 SCR5 →←-	SCR6	350
FH Ratte	ATRSPVSKCT ITGWIPAPRC SLKPCDFPQF	KHGRLYYEES	RRPYFPVPIG
FH Maus	VTG STVSKCT PT GWIP V PRC TL KPC EF PQF	K Y GRLYYEES	L RP N FPV S IG
FH Mensch	AT R G N TAKCT S TGWIPAPRC TL KPCD Y PDI	K H G GLY HENM	RR PYFPV AV G
	351 SCR6 →←-	SCR7	400
FH Ratte	KEYSYYCDNG FTTPSQSYWD YLRCTVNGWE	PEVPCLRQCI	FHYVEYGESL
FH Maus	NK YSYKCDNG F SP PS GYSWD YLRCT A Q G WE	PEV P C V R K CV	FHY V EN G DS A
FH Mensch	K YYSYCD EH F ET PS G S YWD H I H CT Q D G WS	P AV P CL R K C Y	F P Y LE N G Y N Q
	401 SCR7 →←-	450	
FH Ratte	YWQRRYIEGQ SAKVQCHSGY SLPNGQDTIL	CTENGWSPPP	KCVRIKTCSV
FH Maus	Y W E K V Y V Q G Q S L K V Q C Y NGY S L Q NGQDT M T	CTENGWSPPP	K C I R I K T C S A
FH Mensch	N H R G K F V Q G K S I D V A CH P GY A L P K A Q T T V T	C M E NG W S P T P	R C I R V K T C S K
	451	SCR8	500
FH Ratte	SDIEIENGFF SESDYTYALN RKTRYRCKQG	YVTNTGEISG	IITCLQDGWS
FH Maus	SDI H DN G FL S ES S S I YALN R E T S Y RCKQG	YVTNTGEISG	S I T CL Q NGWS
FH Mensch	S S I DIENG F I S ES Q YTYAL K E K A K Y Q C KL G	Y V T A D G E T S G	S I R C G K D GWS

	501	→←		SCR9			550
FH Ratte	PRP	SCIK	MPV	FEN	AMTK	N N NTWFKLND	KLDY
FH Maus	PQP	SCIK	MPV	FENS	SITK	N T RTWFKLND	KLDY
FH Mensch	AQP	TCIK	IPV	FMN	ARTK	N D FTWFKLND	TLDY
	551		SCR9	→←		SCR10	600
FH Ratte	ITCTYD	GWSS	TPSCY	ERECS	IPLLH	QDLVV	FPREV
FH Maus	ITCTY	YGWSD	TPSCY	ERECS	VPTL	DRKLVV	SPRKE
FH Mensch	IVCGY	NGWSD	LPI	CYERE	CE	LPKIDVHLVP	DRKKD
	601		SCR10	→←		SCR11	650
FH Ratte	HR.VG	ADLVQ	CYHFG	WSPNF	PTCEG	QVKSC	DQPLE
FH Maus	HR.VG	PDSVQ	CYHFG	WSPGF	PTCKG	QVASC	APPLE
FH Mensch	FTIVG	PNSVQ	CYHFG	LSPDL	PICKE	QVQSC	GPPPE
	651			SCR11	→←	SCR12	700
FH Ratte	HGDV	VEYDCK	PRFL	LKGP	PNK	IQCVD	GKWTT
FH Maus	HGEV	VKYDCK	PRFL	LKGP	PNK	IQCVD	GWTT
FH Mensch	HSEV	VEYYCN	PRFL	MKGP	PNK	IQCVD	GEWTT
	701			SCR12		→←	750
FH Ratte	SVKLS	VPPYH	HGDS	VFE	TCT	ETFT	MIGHAV
FH Maus	SAKCS	VPPYH	HGDS	VFE	ICE	ENFT	MIGHGS
FH Mensch	WAQLS	SPPYY	YGDS	VEF	MCS	ESFT	MIGHRS
	751			SCR13			800
FH Ratte	EKCK	KPKSTG	IDAI	HPN	KNE	FNH	MSVSYR
FH Maus	EKCR	VLKSTG	IEAI	KPK	LTE	FTH	MSMDYK
FH Mensch	KKCK	SSNLII	LEEHL	LKN	KKE	FDHNS	NIRYR
	801	→←		SCR14			850
FH Ratte	PNCTR	NEKRF	CPPPP	QIP	NA	QVIET	TVKYL
FH Maus	PNCT	.SKTS	CPPPP	QIP	NT	QVIET	TVKYL
FH Mensch	VNCS	MAQIQL	CPPPP	QIP	NS	HMMT	TTLNYR
	851		SCR14	→←		SCR15	900
FH Ratte	MVCKH	GWRQS	LPRCT	EKIP	IPC	SQPPK	IEHGS
FH Maus	MVCKD	GWRQS	LPRCI	EKIP	IPC	SQPP	TIEHGS
FH Mensch	ITCKD	GWRQS	IPLC	VEKIP	IPC	SQPP	QIEHGT
	901			SCR15	→←	SCR16	950
FH Ratte	HGTT	FSYVCD	DGFR	ISE	ENR	VTCNM	GKWSS
FH Maus	HGTT	FSYVCD	DGFR	IPE	ENR	ITCY	MGWST
FH Mensch	HGT	KLSYTCE	GGFR	ISE	ENE	TTCY	MGWSS
	951			SCR16	→←		1000
FH Ratte	SHELE	SYQYG	EEV	TYN	CSE	FGID	GPAFIK
FH Maus	SLELE	SYQHG	EEV	TYH	CSTG	FGID	GPAFII
FH Mensch	AHMS	DSYQYG	EEV	TYK	CFEG	FGID	GPAIAK
	1001			SCR17			1050
FH Ratte	PTFEI	AKPTE	KKKKS	YSR	SGE	QVTF	RCP
FH Maus	PTVK	NAIIRG	KSKKS	YSR	TGE	QVTF	RQSPY
FH Mensch	PSFEN	AIPMG	EKKD	VYK	A	QVTY	TATYY
	1051	→←		SCR18			1100
FH Ratte	CKDNS	CVNPP	HVP	NATIL	TR	HKTK	YPSGDK
FH Maus	CKDNS	CVDPP	HVP	NATIV	TR	TKNK	YLHGDR
FH Mensch	CRDT	SCVNPP	TVQ	NAYI	VS	QMSK	YPSGER

	1101	SCR18	→←-	SCR19		1150
FH Ratte	KTGFWTEPPK	CKDSTGKCGP	PPPIDNGDIT	SLSLPVYAPL	SSVEYQCQNY	
FH Maus	ENGIWTEKPK	CRDSTGKCGP	PPPIDNGDIT	SLSLPVYEPL	SSVEYQCQKY	
FH Mensch	LNGNWTEPPQ	CKDSTGKCGP	PPPIDNGDIT	SFPLSVYAPA	SSVEYQCQNL	
	1151	SCR19	→←-	SCR20		1200
FH Ratte	YLLKGNKIVT	CRNGKWSQPP	TCLHACVIPE	DIMEKHNIVL	RWRENAKIYS	
FH Maus	YLLKGKKTIT	CTNGKWEPP	TCLHACVIPE	NIMESHNIIL	KWRHTEKIYS	
FH Mensch	YQLEGNKRIT	CRNGQWEPP	KCLHPCVISR	EIMENYNIAL	RWTAKQKLYS	
	1200	SCR20		1240		
FH Ratte	QSGENIEFMC	KPGYRKFRGS	PPFRTKCIEG	HINYPTCV~~		
FH Maus	HSGEDIEFGC	KYGYKARDS	PPFRTKCLNG	TINYPTCV~~		
FH Mensch	RTGESVEFVC	KRGYRLSSRS	HTLRRTCWDG	KLEYPTCAKR		

Abb. 10: Die FH-Aminosäuresequenzen aus den Spezies Ratte, Maus und Mensch wurden mit dem GCG-Programm PILEUP arrangiert. SCR 1-20: Short Consensus Repeats 1-20. Die potentiellen N-Glykosylierungsstellen wurden nach der Formel N-Xaa-S/T ausfindig gemacht und sind kursiv und durch Fettdruck hervorgehoben. Abweichungen von der Aminosäuresequenz der Ratte in den Spezies Maus und Mensch sind farblich hervorgehoben.

Für die Quantifizierung des FH der Ratte wurde ein Sandwich-ELISA etabliert. Ein zu diesem Zweck neu generierter monoklonaler Antikörper (mAk 4-7D) fand als Fangantikörper Verwendung. Dieser wurde durch die Immunisierung von BALB/c Mäusen mit konventionell-chromatographisch aus Rattenserum gereinigtem FH, der in Anlehnung an die von Daha und van Es (1982) entwickelte Reinigungsmethode isoliert worden war, hergestellt. Als Detektionsantikörper fand ein polyklonaler Ak aus dem Kaninchen Verwendung, der durch die Immunisierung mit immunaffinitätschromatographisch aufgereinigtem FH (ebenfalls aus Rattenserum) gewonnen worden war. Der für die Immunaffinitätschromatographie verwendete Antikörper war ebenfalls der anti-Ratten FH mAk 4-7D. Als Sekundärantikörper des Sandwich-ELISA diente ein Peroxydase-konjugierter anti-Fc Kaninchen IgG Antikörper. Der ELISA wurde mit immunaffinitätschromatographisch gereinigtem FH geeicht. Selbst in der äußerst sensitiven Silberfärbung waren außer der FH-Bande im Molekulargewichtsbereich von 155 kDa keine anderen Proteine detektierbar (Originalarbeit V, Fig. 3).

Wie in Abbildung 11 dargestellt zeigte die Eichkurve in der halblogarithmischen Darstellung einen linearen Bereich zwischen 1 und 20 ng/ml. Das Detektionslimit dieses ELISA lag bei 500 pg/ml (doppelter Hintergrundwert). Die „within-day“ Variationskoeffizienten wurden zu 1,9% für hohe (16 ng/ml) und 4,9% für niedrige (2 ng/ml) Konzentrationen bestimmt. Die „day-to-day“ Variationskoeffizienten wurden zu 4,5% für hohe (16 ng/ml) und 11,5% für niedrige (2 ng/ml) Konzentrationen berechnet. Aufgrund dieser Parameter erwies sich der

ELISA als ausreichend empfindlich und zuverlässig, um den FH-Gehalt im Rattenserum und in den Überständen isolierter Zellen der Rattenleber zu quantifizieren.

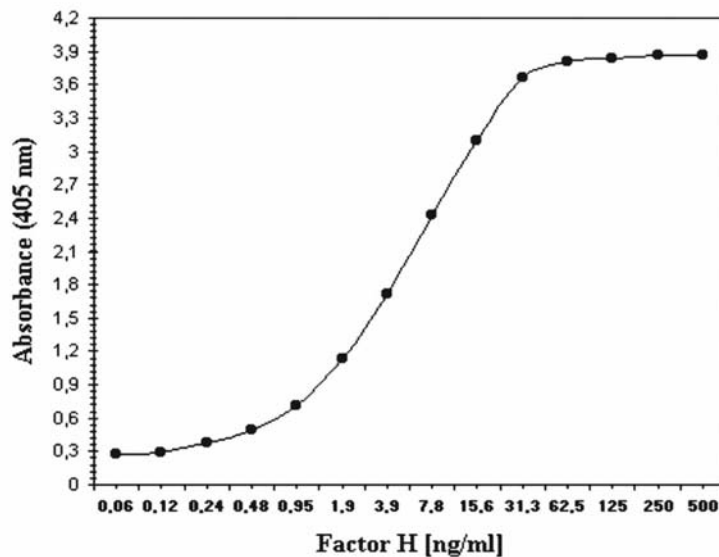


Abb. 11: Eichkurve des Ratten FH-Sandwich ELISA. Der mAk 4-7D aus der Maus wurde als Fangantikörper, ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (aufgereinigte IgG-Fraktion) als Detektionsantikörper verwendet. Immunaffinitätschromatographisch aus Serum gereinigter Ratten FH fand als Standard Verwendung.

Mit Hilfe des neu etablierten Sandwich-ELISA wurde die FH-Konzentration im Serum normaler Ratten mit einem Alter von 6-18 Monaten untersucht. Die Ratten gehörten zu den Stämmen LOU und LEWIS. Als Durchschnittskonzentration wurden $238 \pm 21 \mu\text{g}$ [Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) von 11 Ratten] gemessen. Diese Durchschnittskonzentration lag etwas unter den Konzentrationen, die für humanes Serum publiziert worden waren und sich im Bereich von $300 \mu\text{g/ml}$ (Sim und DiScipio, 1982; Whaley et al., 1978) oder zwischen 450 und $600 \mu\text{g/ml}$ (Weiler et al., 1976) bewegten. Die in dieser Arbeit (Originalarbeit V/ Demberg et al., 2002) erhobenen Daten zur FH-Konzentration im Rattenserum bewegten sich fast exakt im Bereich der von Daha und van Ess (1982) erhobenen, die mittels eines Radialimmundiffusionsassays eine Konzentration von $244 \pm 36 \mu\text{g/ml}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) bestimmt hatten. Diese Daten waren mit 20 Ratten des Stammes Wistar erhoben worden, die etwa 4 Monate alt waren. Der von Daha und van Ess (1982) etablierte Assay war mit konventionell gereinigtem Ratten FH geeicht worden.

Anwendung fand der in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelte Sandwich-ELISA retrospektiv auch in Untersuchungen zur Heraufregulation der $\text{IFN-}\gamma$ -vermittelten FH-Expression in primär kultivierten Hepatozyten der Ratte. Der in der vorausgegangenen Studie (Originalarbeit IV/Schlaf et al., 2002) auf Ebene der mRNA-Expression erhobene Befund

einer etwa sechs-fachen Heraufregulation, wurde nun auch hinsichtlich der Proteinexpression quantitativ darstellbar. Die FH-Konzentration im Überstand von primären HC wurde durch IFN- γ in sechs unabhängigen Experimenten um einen Faktor von 2,8 +/- 0,53 (Mittelwert +/- SD) heraufreguliert.

2.5 Das Anaphylatoxin C5a als Produkt der Komplementaktivierung reguliert den Komplement-inhibitorischen FH in Kupfferzellen der Ratte herauf

In den vorausgegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Komplement-inhibitorischen Faktoren H und I durch proinflammatorische Zytokine heraufreguliert werden, so dass die Homöostase dieses auf eine strikte Regulation angewiesenen Systems auch unter entzündlichen Bedingungen aufrecht erhalten wird. Da LPS über den alternativen Weg der Komplementaktivierung ein potenter Aktivator dieses Systems ist und damit das wirksamste der Anaphylatoxine, das C5a-Anaphylatoxin generiert, andererseits aber die Expression des FH in KC der Ratte direkt heraufreguliert, war es das Ziel der vorliegenden Studie (Originalarbeit VI/ Schlaf/Nitzki et al., 2004) herauszufinden, ob eine exzessive Aktivierung dieses Systems auch durch eine C5a-vermittelte Heraufregulation des inhibitorischen FH in der Ratte verhindert wird. Aufgrund ihrer Verfügbarkeit wurden diese Untersuchungen unter Verwendung von KC aus der Ratte durchgeführt. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Originalarbeit VI gezeigt werden, dass C5a die Expression des FH in KC heraufreguliert. Auf diese Weise ergibt sich der Mechanismus einer negativen Rückkopplung durch den Einfluss einer inflammatorischen Komplementkomponente (C5a) auf die Expression einer inhibitorischen (FH).

Weil die KC aus dem Gewebsverband mittels einer Kombination der Enzyme Kollagenase/Pronase isoliert wurden, wurde in einem ersten Versuch die Reexpressionskinetik der Oberflächenmoleküle anhand des Nachweises des C5a-Rezeptors (C5aR) untersucht. Mit Hilfe des gegen den C5aR der Ratte gerichteten mAk R63 (Schlaf et al., 1999a; Rothermel et al., 2000; Schlaf et al., 2003) wurden aus diesem Grund FACS-Analysen nach verschiedenen Kultivierungszeiträumen durchgeführt. Es zeigte sich, dass für die komplette Reexpression des C5aR auf KC 48h benötigt wurden (Originalarbeit VI, Fig. 1), so dass die im folgenden verwendeten KC vor der Stimulation mit dem rekombinant hergestellten C5a-Liganden (Rothermel et al., 1997a) zunächst für 48h ohne Stimulus kultiviert wurden.

Wie zunächst mittels konventioneller PCR gezeigt werden konnte, nahm die FH-spezifische mRNA zeit- und dosisabhängig zu. Kupfferzellen, die mit 100 nM C5a (1 µg/ml) stimuliert wurden, zeigten eine leichte Heraufregulation der FH-mRNA nach 9h und eine deutliche Heraufregulation nach 24h, während der Gehalt an FH-spezifischer mRNA in nicht stimulierten Zellen nur unwesentlichen Schwankungen unterlag (Originalarbeit VI, Fig. 2A). Der C5a-Effekt ging nach 48h auf das Niveau nicht stimulierter Zellen zurück, so dass im folgenden alle Experimente zur Detektion FH-spezifischer mRNA mit Zellen durchgeführt wurden, die für 24h stimuliert worden waren.

Erste Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit wurden mit Hilfe eines Assays durchgeführt, der die Freisetzung des lysosomalen Enzyms N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGA) bestimmte. Dieser äußerst sensitive funktionelle Nachweis diente einerseits dem Zweck, die Aktivität der rekombinant in E.coli hergestellten C5a-Charge (Rothermel et al., 1997a) zu testen und andererseits, um für die KC eine Dosis-Wirkungskurve zu erhalten. In diesem NAGA-Assay wurde ab einer Stimulationskonzentration von 20 nM C5a ein Plateau erreicht (Originalarbeit VI, Fig. 2B). Wie ebenfalls mittels konventioneller RT-PCR gezeigt werden konnte, war das FH-spezifische Amplifikat leicht verstärkt, nachdem die KC mit 10 nM C5a stimuliert worden waren. Die maximale Intensität des FH-Amplifikates wurde mit einer Konzentration von 100 nM C5a erreicht. Konzentrationen von 250 nM bzw. 500 nM C5a führten zu keiner weiteren Steigerung der Intensität des Amplifikates (Originalarbeit VI, Fig. 2C). Weil bekannt ist, dass das C5a-Molekül aufgrund seines kationischen Charakters eine starke Neigung zur Adhärenz an Kunststoffoberflächen aufweist und außerdem keine Kenntnisse zu seiner Halbwertszeit unter den Kulturbedingungen der KC vorliegen, wurde für alle folgenden Experimente eine Stimulationskonzentration von 100 nM (1 µg/ml) gewählt.

Für einen direkten Nachweis zur Heraufregulation der FH-spezifischen mRNA wurde das Northern Blot Verfahren verwendet. Die Zellen wurden nach 48-stündiger Kultivierung zur Reexpression der Rezeptoren für 24h mit 100 nM C5a stimuliert oder ohne dieses Stimulans kultiviert. Auch in diesem Versuch zeigte sich deutlich die Heraufregulation der FH-spezifischen mRNA Bande von etwa 4,4 kB (Originalarbeit VI, Fig. 3). Die Kontrollfärbung der im Agarosegel aufgetrennten poly(A)-RNA erbrachte durch die Färbung der nur in geringen Mengen vorhandenen ribosomalen RNA-Banden von 28S (4,7 kB) bzw. 18S (1,9 kB) den Nachweis, dass gleiche Mengen an RNA aufgetragen worden waren.

Um den auf der Ebene der mRNA-Expression nachgewiesenen Effekt auch auf der Ebene der Proteinexpression zeigen zu können, wurden KC nach ihrer initialen Kultivierung von 48h für weitere 48h mit 100 nM C5a stimuliert oder als Kontrollen für denselben Zeitraum ohne

Stimulans kultiviert. Aus sechs unabhängigen KC-Präparationen wurden 4×10^6 Zellen/Petrischale (3 cm Durchmesser) in einem Mediumvolumen von 2 ml ausplattiert. Es zeigte sich, dass die C5a-abhängige Zunahme in den Überständen der KC bei $32 \pm 7\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) lag (Originalarbeit VI, Table 1). In späteren Versuchen wurde das Überstandvolumen auf 1 ml reduziert, was dazu führte, dass die FH-Konzentration um $80 \pm 19\%$ zunahm.

Um die Spezifität der C5a-vermittelten Heraufregulation des FH zu untermauern, wurde der für die Stimulation eingesetzte Ligand mit einem 10-fach molaren Überschuss des neutralisierenden mAk 6-9F (Rothermel et al., 2000) für 1h bei RT vorinkubiert. Es zeigte sich, dass das Signal der FH-mRNA in der RT-PCR der Intensität des Signals nicht stimulierter Kontrollzellen entsprach, während das durch ungeblocktes C5a erzeugte FH-Signal deutlich stärker war (Originalarbeit VI, Fig. 5). Der gleiche Effekt war auf der Ebene des sezernierten FH-Proteins in den Überständen von KC zu finden. Von sechs ursprünglichen Stimulationsserien (Originalarbeit VI, Tab.1) stand für vier eine so große Anzahl an isolierten KC zur Verfügung, dass sie zusätzlich mit dem durch den mAk 6-9F blockierten C5a-Liganden stimuliert wurden (Originalarbeit VI, Tab. 2 und Tab. 1 in dieser Habilitationsschrift). Im Gegensatz zu den KC, die mit dem nicht blockierten Liganden inkubiert worden waren und die einen Zuwachs an FH-Protein zwischen 21% und 38% aufwiesen, zeigten die mit dem blockierten Liganden stimulierten KC keine signifikante Änderung (-3% bis +6%) im FH-Proteingehalt ihres Überstandes (Tabelle 1). Diese mit dem blockierenden mAK 6-9F durchgeführten Experimente zeigten deutlich, dass der Heraufregulation des FH auf der Ebene der mRNA und des Proteins ein C5a-spezifischer Mechanismus zugrunde liegt.

Tabelle 1: Nachweis des sezernierten FH-Proteins im Überstand von KC

		FH-Konzentration [ng/ml]				Zuwachs [%] (Kontrolle = 100%)
		individuelle Werte			MW \pm SD	
Serie 1	Kontrolle	312	388	347	349 \pm 38	100%
	+ C5a/6-9F	345	321	348	338 \pm 15	- 3%
	+ C5a	440	519	483	481 \pm 40	+ 38%
Serie 2	Kontrolle	256	261	271	263 \pm 8	100%
	+ C5a/6-9F	263	279	289	277 \pm 13	+ 5%
	+ C5a	352	318	340	337 \pm 17	+ 28%

Serie 3	Kontrolle	364	305	329	333 ± 30	100%
	+ C5a/6-9F	332	339	316	329 ± 12	+ 1%
	+ C5a	391	411	406	403 ± 10	+ 21%
Serie 4	Kontrolle	229	254	247	243 ± 13	100%
	+ C5a/6-9F	271	236	267	258 ± 19	+ 6%
	+ C5a	325	306	321	317 ± 10	+ 30%

Tabelle 1: Nachweis des sezernierten FH-Proteins im Überstand von KC nach ihrer Stimulation mit 100 nM C5a für 48h bzw. nach ihrer Stimulation mit 100 nM C5a, das mit einem 10-fachen molaren Überschuss des inhibitorischen mAk 6-9F präinkubiert worden war. Der Nachweis wurde mit dem neu etablierten Ratten FH-spezifischen ELISA geführt (Originalarbeit V/Demberg et al., 2002).

In vorausgegangenen Untersuchungen war gezeigt worden, dass LPS die Expression des FH in der prämonozytischen Zelllinie U937 (Minta, 1988) und in KC (Originalarbeit IV/Schlaf et al., 2002) heraufreguliert. Weil der C5a-Ligand rekombinant in *E. coli* hergestellt worden war (Rothermel et al., 1997a), bestand zumindest eine theoretische Wahrscheinlichkeit, dass sich in ihm Endotoxinkontaminationen befinden, die ausreichen, um die FH-Expression zu beeinflussen. Um einen durch LPS vermittelten Effekt auszuschließen, wurde der sogenannte Limulus Assay, dessen **Nachweisgrenze bei 3 pg/ml** liegt, mit negativem Ergebnis durchgeführt. Eine LPS-Beteiligung an der FH-spezifischen Heraufregulation konnte somit grundsätzlich ausgeschlossen werden.

2.6 Rekombinante Herstellung von FH-Fragmenten und ihre strukturelle Analyse im Vergleich zu immunaffinitätschromatographisch aus Rattenserum aufgereinigtem FH

Nach der Identifikation der bisher nicht bekannten cDNA-Sequenz des Ratten FH (siehe 2.4) sollten von diesem Faktor verkürzte aber funktionell aktive Varianten, die die ersten vier bis sieben Module (SCR) enthalten, rekombinant erzeugt werden (Abb. 12). Darüber hinaus sollte eine strukturelle und funktionelle Analyse dieser rekombinant erzeugten Varianten erfolgen. Neben dem Faktor H sollte zunächst auch der Ratten FI rekombinant hergestellt und anschließend funktionell analysiert werden. Die rekombinante Herstellung des FI verlief allerdings nicht erfolgreich, weshalb zur Austestung eines potentiellen funktionellen Synergismus beider Faktoren nur immunaffinitätschromatographisch aus Rattenserum isolierter FI verwendet wurde. Beide Faktoren sollten schließlich *in-vitro* in Kombination

eingesetzt werden, um herauszufinden, ob aus dem kombinatorischen Einsatz beider Faktoren ein synergistischer Effekt resultiert, der die Verwendung der einzelnen Faktoren zur Inhibition der Komplementkaskade in stark verringerten Mengen zulässt.

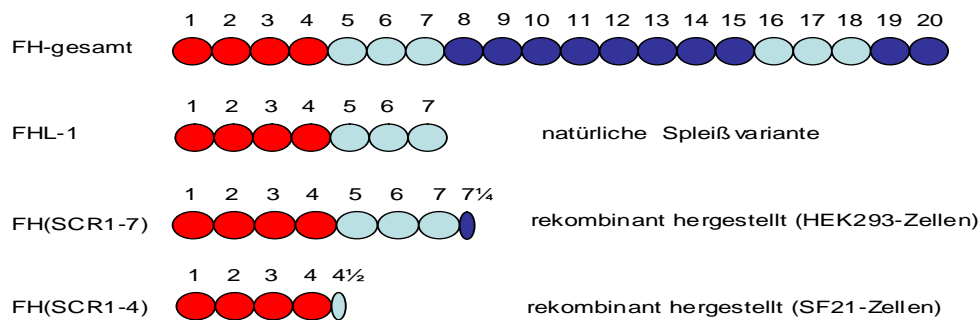


Abb. 12:
Schematische Darstellung des FH-gesamt und seiner natürlichen Spleißvariante FHL-1 im Vergleich zu den rekombinant hergestellten

Varianten SCR(1-7) und SCR(1-4). Rote SCR(1-4): Kofaktoraktivität für FI, „Decay Accelerating Activity, C3b-bindende Position I; dunkelblaue SCR(8-15): C3b-bindende Position II; dunkelblaue SCR(19-20): C3b-bindende Position III

Zur Generierung von rekombinantem FH (SCR1-7) wurden HEK293-Zellen transfiziert. Von vereinzelt Transfektionsklonen wurde nach konfluentem Wachstum der Zellen 500 µl Überstand (≈100 µg Gesamtprotein nach der Bestimmung im Lowry Assay) mit TCA präzipitiert und in der Immunblotanalyse mit dem polyklonalen anti-Ratten FH Antikörper analysiert. Das aus den einzelnen Aminosäuren errechnete theoretische Molekulargewicht lag bei 54 kDa. Die HEK293-Zellklone, die in dieser und einer weiteren Durchmusterung ein deutliches FH(SCR1-7) Immunblotsignal bei 50 kDa zeigten, wurden für die weitere Zellkultur ausgewählt und expandiert.

Das FH(SCR1-7) Protein wurde aus den Überständen der expandierten HEK293-Zellen mittels einer Streptactin-Affinitätssäule aufgereinigt. Von den gesammelten 1 ml-Elutionsfraktionen wurden jeweils 100 µl für die Immunblotanalyse und 500 µl für die Gesamtproteinanalyse mittels Coomassieblau Färbung mit TCA präzipitiert und im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 13). Erwartungsgemäß wurde der rekombinante FH(SCR1-7) im vorausgesagten Molekulargewichtsbereich von 54 kDa aufgetrennt. Die Fraktionen E5-E9 wurden vereinigt und für ihre weitere Verwendung dialysiert und ankonzentriert.

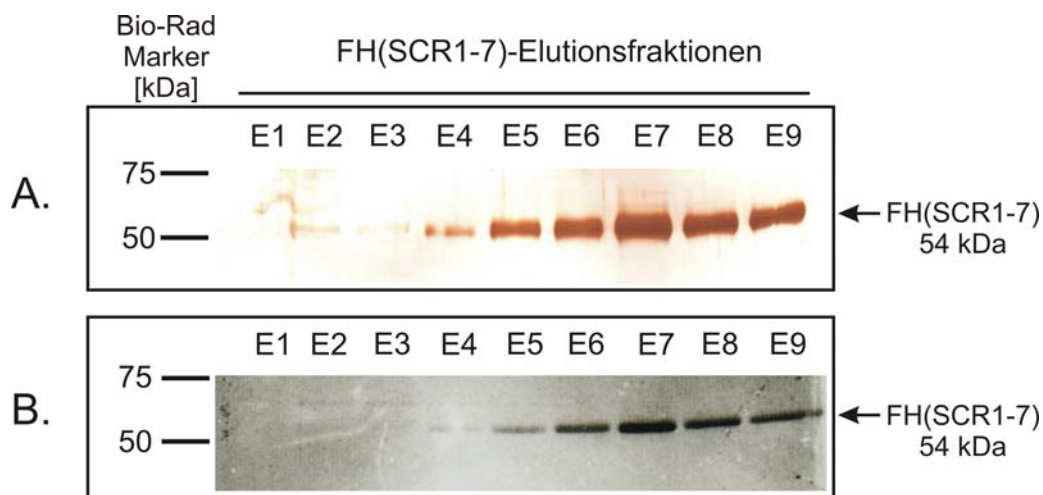


Abb. 13: Untersuchung der Elutionsfraktionen des FH(SCR1-7) aus HEK293-Kulturüberstand nach der StrepTag Affinitätschromatographie im Immunblot (A) mit korrespondierender Coomassieblau-Färbung (B). Teilbild A zeigt den Immunblot der Elutionsfraktionen, von denen jeweils 100 µl mit TCA gefällt und im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden. Der FH(SCR1-7)-Nachweis erfolgte mit einem Kaninchen anti-FH pAK, gefolgt von einem Peroxidase-konjugierten Esel anti-Kaninchen Sekundärantikörper. Teilbild B zeigt das korrespondierende Coomassieblau-gefärbte Gel, für das jeweils 500 µl der jeweiligen Elutionsfraktion mit TCA gefällt worden waren.

Um Gewissheit zur Identität des rekombinanten FH(SCR1-7) zu erhalten, wurde das Protein über den Edmann-Abbau in der Abteilung Biochemie II der Universität Göttingen ansequenziert. So konnten durch die partielle Bestimmung der Proteinsequenz zusätzlich Rückschlüsse auf die korrekte Prozessierung des FH(SCR1-7) in der Weise gezogen werden, dass Aufschluss über eine korrekte Entfernung der Leadersequenz vermittelt wurde. Mit dem Sequenzierergebnis (Abb.14) konnte eindeutig belegt werden, dass es sich bei den ansequenzierten Proteinbanden tatsächlich um den FH(SCR1-7) handelte. Bei den 12 identifizierten Aminosäureresten handelte es sich um die ersten 12 AS (EDCKGPPPRENS) des sezernierten FH(SCR1-7), die anhand der unserer cDNA-Bank entnommenen und publizierten Sequenz (Originalartikel V/Demberg et al., 2002) (siehe 2.4) eindeutig identifiziert werden konnten.

```

1←LEADER SEQUENCE→←                               SCR1                               50
MRLSARI IWL  ILWTVCV AED  CKGPPPRENS  EILSGSWSEQ LYSEGTQATY

51                               SCR1                               →←                               SCR2                               100
KCRPGYRTL G  TIVKVCKNGE  WVPSNPSRIC  RKRPCGHPGD  TPFGSFRLAV

```

Abb. 14: Ergebnis der N-terminalen Proteinansequenzierung des FH(SCR1-7).

Die identifizierte Sequenz EDCKGPPPRENS (Fettdruck) gibt die auf die Leader-Sequenz folgenden 12 AS wieder. Es wurde auf diese Weise nachgewiesen, dass der FH(SCR1-7) unter Entfernung des Signalpeptides (Leadersequenz) korrekt prozessiert wird.

Weitere Untersuchungen mit Hilfe der PAS-Färbung zeigten in dem mittels SDS-PAGE aufgetrennten rekombinanten FH(SCR1-7) keine nachweisbare Glykosylierung, so dass die entsprechend der Primärstruktur getroffene Voraussage einer nicht vorhandenen N-Glykosylierung bestätigt wurde. Darüberhinaus konnte jetzt auch eine O-Glykosylierung des FH(SCR1-7) ausgeschlossen werden.

Neben der Expression des FH(SCR1-7) in HEK293 Mammalier-Zellen, die durch eine relativ geringe Ausbeute charakterisiert war, wurde alternativ der Ansatz verfolgt, die ersten vier Domänen des Ratten FH mittels Baculovirus System in SF21-Zellen zu exprimieren. Im Gegensatz zu den HEK293-Zellen sollte das baculovirale Expressionssystem höhere Ausbeuten liefern. Die Expressionseffizienz in den SF21-Zellen wurde von dem Insektenzell-spezifischen Polyhedrin-Promotor bestimmt. Das Maximum der Proteinexpression sollte etwa 60h nach der Infektion der Zellen erreicht sein. Durch den Polyhedrin-Promotor ist es im Extremfall möglich, dass der Anteil des exprimierten Proteins auf bis zu 30% des in der Zelle enthaltenen Gesamtproteins anwächst. Durch die natürliche Leader-Sequenz, die in den Vektor inkloniert worden war, sollte der FH(SCR1-4) aus den SF21-Zellen ausgeschleust werden.

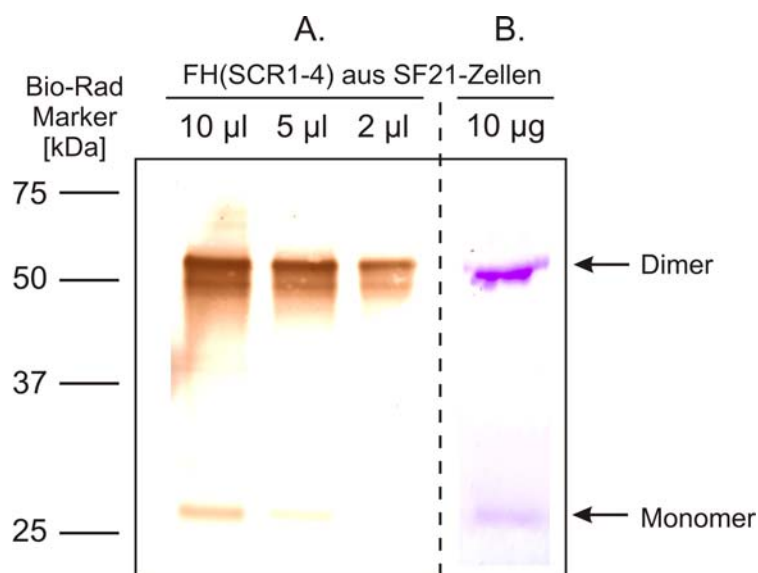


Abb. 15: Nachweis des mittels Nickel-Chelat Chromatographie aufgereinigten FH(SCR1-4) aus SF21-Zellen im Immunblot. Teilbild A: Auf ein SDS-Gel wurden 10 µl, 5 µl und 2 µl des aufgereinigten FH(SCR1-4) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem Kaninchen anti-FH pAK. Die Dominanz des Dimers (oberer Pfeil) ist deutlich zu sehen. Lediglich bei einem Auftrag von 10 µl ist das Monomer (unterer Pfeil) zu erkennen. Teilbild B: Es wurden 10 µg des aufgereinigten FH(SCR1-4) in einem 10%igen SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend Coomassieblau-gefärbt. Wie im Immunblot überwiegt das Dimer gegenüber dem nur schwach sichtbaren Monomer auch in der Coomassieblau-Färbung.

Zu Beginn der Experimente war die Funktionalität der Leader-Sequenz in SF21-Zellen unbekannt. Da auch die Ausbeute nicht vorhersehbar war, wurden für die erste Überstandsmusterung relativ große Volumina von 2 ml des jeweiligen SF21-Zellkulturüberstandes etwa 52h nach Infektion der Zellen mit TCA gefällt und im Immunblot auf die Expression des FH(SCR1-4) untersucht. Immunblotsignale traten sowohl im Bereich von 28 kDa als auch im Bereich von 56 kDa auf, wobei beide Banden gleichermaßen durch den selbst generierten polyklonalen Kaninchen anti-FH Ak (anti-FH pAk) erkannt werden. Bei der leichteren Bande mit einem relativen Molekulargewicht von 28 kDa handelte es sich um das FH(SCR1-4) Monomer, bei der im Molekulargewichtsbereich von 56 kDa auftretenden Bande um das SCR(1-4) Dimer. Die beobachtete Dimerisierung war offensichtlich auf ein bekanntes Aggregationsphänomen, das durch den für die Reinigung angehängten 6 Histidin-Tag (HIS-Tag) hervorgerufen wird, zurück zu führen.

Da Insektenzellen im Vergleich zu Säugerzellen ein anderes Glykosylierungsmuster der in ihnen exprimierten Proteine zeigen können, wurde der FH(SCR1-4) wie zuvor der FH(SCR1-7) in der PAS-Färbung untersucht. Analog zu dem in HEK293-Zellen hergestellten FH(SCR1-7) konnte auch bei dem in den SF21-Zellen hergestellten FH(SCR1-4) keine Verzuckerung festgestellt werden, was auch der Nicht-Nachweisbarkeit von N-Glykosylierungsstellen in den ersten vier SCR des Ratten FH (siehe Abb. 10) entsprach.

Durch wiederholte Analysen der FH-Varianten (SCR1-4, SCR1-7 und SCR1-20) in Immunblotassays war auffällig, dass in Abhängigkeit von einer Reduktion eine erhebliche Größendifferenz zwischen dem nach der Primärstruktur berechneten und dem im Immunblot angezeigten relativen Molekulargewicht (M_r) bestand. Deshalb wurden die unter beiden Bedingungen in einem 10%igen SDS-Gel parallel aufgetrennten Proteine auf ihr relatives Molekulargewicht untersucht (Abb. 15). Der FH(SCR1-20) zeigte unter reduzierenden Bedingungen (red.) das in der Literatur beschriebene rel. Molekulargewicht von ca. 155 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen (n. red.) wies er lediglich ein M_r von rund 125 kDa auf. Der Unterschied betrug 30 kDa und lag somit bei etwa einem Fünftel des Molekulargewichtes. Ein ähnliches Bild ergab sich für den FH(SCR1-7), der unter reduzierenden Bedingungen das theoretisch erwartete Molekulargewicht von 54 kDa erreichte, unter nicht reduzierenden Bedingungen aber nur mit einem M_r von 43 kDa detektiert wurde. Damit lag die Differenz im relativen Molekulargewicht bei 11 kDa und analog zum FH(SCR1-20) bei ebenfalls einem Fünftel des M_r . Der in SF21-Zellen rekombinant hergestellte FH(SCR1-4) zeigte unter nicht reduzierenden Bedingungen

aufgrund des bereits beschriebenen Phänomens eine starke Tendenz zur Dimerisierung. Das Dimer mit einem M_r von etwa 55 kDa zeigte sich im Immunblot als die dominierende Bande. Das nur schwach zu erkennende Monomer besaß unter nicht reduzierenden Bedingungen ein M_r von etwa 28 kDa bei einem berechneten Molekulargewicht von 36 kDa. Dieses ließ sich ebenfalls nur unter reduzierenden Bedingungen detektieren. Der Molekulargewichtsunterschied des Monomers lag bei etwa 8 kDa und betrug somit mehr als ein Fünftel des theoretischen Molekulargewichtes. Unter reduzierenden Bedingungen war zudem die Dimerisierung vollständig aufgehoben. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die entsprechend der Primärstruktur berechneten Molekulargewichte im SDS-Gel nur erreicht wurden, wenn die isolierten FH-Fragmente bzw. das Gesamtprotein unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt wurden (Abb. 16).

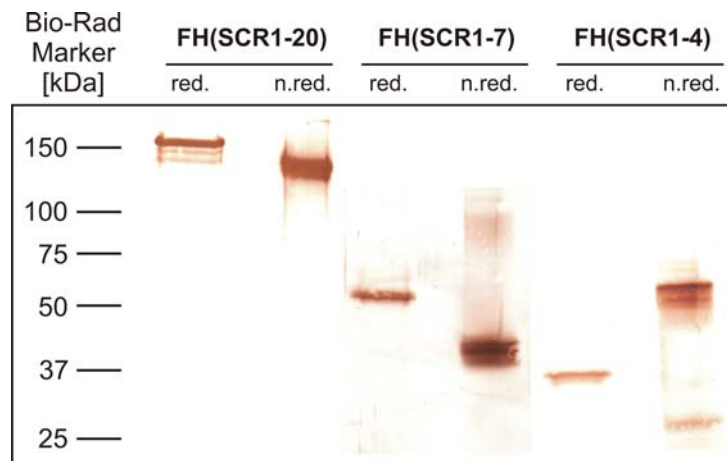


Abb. 16: Größenvergleich des FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen im Immunblot. In einem 10%igen SDS-Gel wurden parallel je 1 μg FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf eine NC-Membran transferiert. Die Detektion der Faktoren FH(SCR1-20), FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) erfolgte mit dem Kaninchen-anti FH pAK.

Wie der Ratten Faktor H wurde auch der Faktor I der Ratte nach der Koppelung des selbst generierten Maus anti-FI mAk 15F11-2 an CNBr-aktivierte Sepharose immunaffinitätschromatographisch aus Rattenserum aufgereinigt. Aus den Elutionsfraktionen der Aufreinigung wurde vor der Dialyse des FI jeweils ein Aliquot von 10 μl entnommen und im SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Reinheit des FI wurde mittels Silberfärbung dokumentiert. Neben dem FI waren keine weiteren Proteine in der Silberfärbung sichtbar, so dass zusätzlich zu dem FH auch der FI immunaffinitätschromatographisch zur Homogenität aufgereinigt werden konnte.

Um auch den aus Serum aufgereinigten FI bezüglich seiner Glykosylierung zu untersuchen, wurde dieser wie auch die Fragmente des FH in der PAS-Färbung untersucht. In den vorangegangenen Untersuchungen (Originalarbeit I/Schlaf et al., 1999b) konnten sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen und ein hoher Glykosylierungsanteil von etwa 25% aus der Primärstruktur und dem relativen Molekulargewicht im Immunblot abgeleitet werden. Von den potentiellen N-Glykosylierungsstellen befinden sich vier auf der Schwere- und zwei auf der Leichtkette (Abb. 5). Um diese aus der Primärstruktur (Schlaf et al., 1999b) abgeleiteten Daten zu bestätigen, wurde der FI in der PAS-Färbung sowohl nach Auftrennung unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen auf seine Glykosylierung untersucht. Als Positivkontrolle diente erneut die Meerrettichperoxidase (HRP) mit einem Molekulargewicht von 47 kDa. Die Analysen des humanen FI, für die verschiedene Untersuchungen (Goldberger et al., 1984; Ullman et al., 1998) eine sehr komplexe Glykosylierung nahe legten, wurden durch die PAS-Färbung bestätigt. Während das Gesamtprotein unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Bande bei etwa 88 kDa zeigte, trat auf der Höhe von 49 kDa ein Abbruchfragment auf. Dieses Fragment der Schwere- und Leichtkette war auch unter reduzierenden Bedingungen zu sehen, unter denen sowohl die Leichtkette (etwa 38 kDa) als auch die Schwere- und Leichtkette (etwa 55 kDa) als verzuckert identifiziert werden konnten. Als Ursache für die Entstehung dieses Fragmentes können z.B. eine limitierte Proteolyse im Serum oder eine hitzeempfindliche Peptidbindung, die durch das Aufkochen vor dem Auftrag auf das SDS-Gel zerstört wird, angeführt werden. Der aus der PAS-Färbung abgeleitete Glykosylierungsbefund repräsentierte die beschriebenen sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen des Ratten FI, von denen zwei auf die Schwere- und vier auf die Leichtkette liegen (Originalarbeit I/Schlaf et al., 1999b). Nicht untersucht wurde die Frage, ob die in der PAS-Färbung deutlich sichtbare Glykosylierung zusätzlich auf vorhandene O-Glykosylierungen zurückzuführen sein kann.

2.7 Einsatz der rekombinant generierten bzw. aus Serum isolierten Komplement-inhibitorischen Faktoren H und I im Komplement-hämolysetest (CH₅₀) des klassischen Weges

Bei dem sogenannten CH₅₀-Test handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die lytische Aktivität des in einem Testserum vorhandenen Komplementsystems quantifiziert werden kann. Lysiert werden in diesem Testsystem mit Antikörpern beladene Schafserthrozyten; das freigesetzte Hämoglobin wird bei 405 nm und 650 nm photometrisch vermessen. Das aus einer 1:20 Vorverdünnung entnommene Serumvolumen, das zu einer 50%igen Lyse des maximal möglichen Wertes führt, ist *per definitionem* der CH₅₀-Wert. Die eigentliche

Testreihe bestand daraus, die komplementabhängige 50%-ige Lyse der Erythrozyten durch die Zugabe von FH(gesamt),FH(SCR1-7),FH(SCR1-4) und FI (einzeln und in verschiedenen Kombinationen) zu inhibieren, um auf diese Weise ihre Komplement-inhibitorische Aktivität funktionell und quantitativ zu bestimmen. Der CH_{50} -Test zur funktionellen Austestung der Komplementinhibitoren ist allerdings von vielen Variablen abhängig, die in jedem Versuch neu austitriert werden müssen. Bei den Variablen handelt es sich zum einen um die mit Antikörpern beladenen Erythrozyten, zum anderen um die lytische Aktivität der verwendeten individuellen Seren. Um einen repräsentativen Ausgangswert für die Inhibitionsversuche zu erhalten, wurden mehrere Chargen Rattenserum ausgetestet. Zum Vergleich wurde immer ein Kontrollwert mit humanem Serum aus dem diagnostischen Labor der Abteilung Immunologie erhoben. Dennoch kam es vor, dass ein Serum, welches in einem Test eine halbmaximale d.h 50%ige Lyse nach Zugabe von 10 μ l Serum zeigte, im nächsten Test unter Verwendung anderer Erythrozyten eine 50%ige Lyse erst nach Zugabe von 15 μ l Serumvolumen zeigte. Für die immunologische Diagnostik wäre mit dem Austitrieren des CH_{50} -Wertes der Test abgeschlossen gewesen. Für die hier vorzunehmenden Untersuchungen zur funktionellen Potenz der Komplementinhibitoren war der CH_{50} -Wert allerdings nur der Ausgangswert für die weiteren Messungen.

Es stellte sich zu Beginn der Versuche heraus, dass grundsätzlich keine Daten zur Funktion der immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH und FI sowie der rekombinant erzeugten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) in der Variation des Alternative Pathway CH_{50} - (AP CH_{50} -) Tests, der den alternativen Weg der Komplementaktivierung repräsentiert, erhoben werden konnte, denn die Anpassung des für humanes Serum entwickelten Tests an Rattenserum ließ sich generell nicht durchführen. Obwohl sich erwartungsgemäß mit humanem Serum ein AP CH_{50} -Wert einstellen ließ, konnte dieser durch die Zugabe inhibitorischer Faktoren aus der Spezies Ratte nicht moduliert werden, so dass von Modulationen des den alternativen Aktivierungsweg simulierenden Komplementlysetests grundsätzlich abgesehen werden musste.

Nachdem für den CH_{50} -Test mehrere Rattenserum auf ihre halbmaximale Lyse austitriert worden waren, wurden drei den Mittelwert der lytischen Aktivitäten repräsentierende Seren zu einer Charge vereinigt, um für alle folgenden Inhibitionsversuche den Ausgangsserumpool zu bilden. Für die folgenden Inhibitionsversuche wurden der immunaffinitätschromatographisch aufgereinigte FH(SCR1-20), der in HEK293 Zellen hergestellte FH(SCR1-7) sowie der in SF21-Zellen (Baculovirus System) hergestellte FH(SCR1-4) verwendet. Für die Vergleichbarkeit der inhibitorischen Funktion wurden mindestens drei

CH₅₀-Inhibitionstests parallel mit unterschiedlichen Chargen der entsprechenden FH-Variante (SCR1-4, SCR1-7 oder SCR1-20), allerdings mit derselben Erythrozytencharge durchgeführt. Aus Platzgründen wird an dieser Stelle allerdings für alle FH-Varianten nur jeweils eine repräsentative Versuchsreihe aufgeführt. Abbildung 17 zeigt die Mittelwerte der Inhibitionsverläufe verschiedener Chargen (n=4) von immunaffinitätschromatographisch aufgereinigtem FH auf die Komplement-vermittelte Hämolyse mit einer Erythrozytenpräparation. Der halbmaximale relative Hämolysegrad (CH₅₀-Wert) lag ohne die Zugabe des FH bei 0,15. Nach einer Zugabe von 1,5 µg (absolut) FH(SCR1-20) trat bereits eine mehr als 50%ige Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse ein, wodurch der OD405/650 Quotient auf einen Durchschnittswert von etwa 0,07 sank. Nach einer Zugabe von 3 µg (abs.) war bereits eine 70%ige Hemmung erreicht. Nach einer Zugabe von 6 bzw. 12 µg zeichnete sich die asymptotische Annäherung der Durchschnittsverlaufskurve an eine Basislinie parallel zur X-Achse ab. Eine völlige Inhibition der Erythrozytenlyse konnte auch durch weitere Zugaben an FH(SCR1-20) nicht erreicht werden. Weil das System nach einer Zugabe von mehr als 12 µg FH aufgrund des zusätzlichen Volumens den Pufferbereich, in dem der Assay arbeitet, verließ, konnten weitere Daten aufgrund großer Messwertschwankungen nur vereinzelt und nicht immer reproduzierbar gewonnen werden. Deshalb sind die Graphen der Abbildungen 18 und 19 auch auf die Zugabe von etwa 7 µg des entsprechenden Inhibitors begrenzt. Deutlich wurde jedoch bereits in Abbildung 17, dass die Basislinie grundsätzlich nicht die Abszisse erreichte, sondern etwa bei 0,02 lag und damit etwa 13% des Ausgangswertes (0,15) betrug.

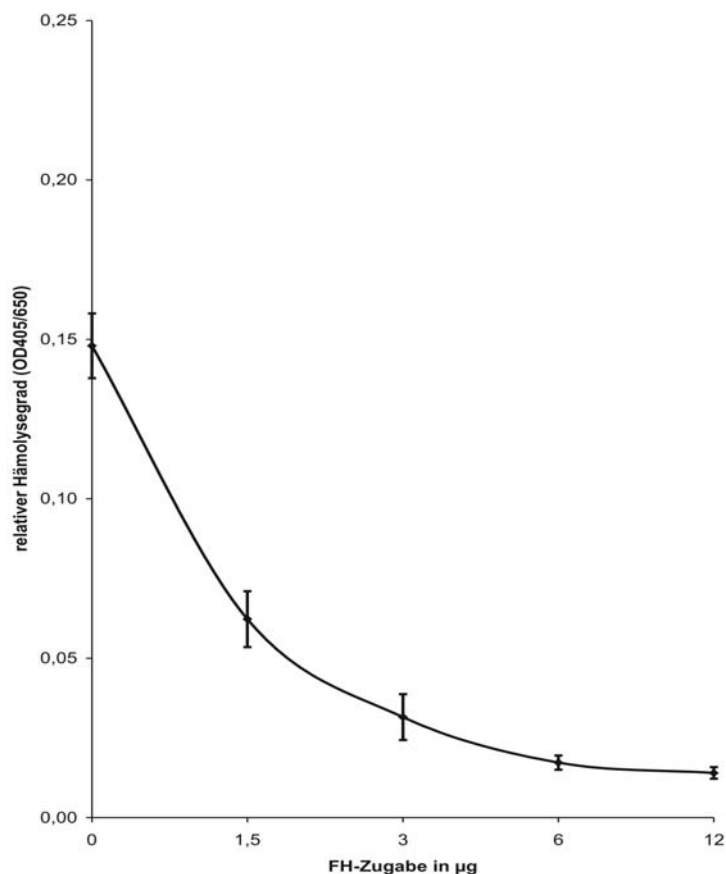


Abb. 17: Inhibition der Lyse im CH₅₀-Test durch den immunaffinitätschromatographisch gereinigten FH.

Für den nachfolgend verwendeten, in HEK293 Zellen rekombinant hergestellten FH(SCR1-7) gilt, dass in 1µg FH(SCR1-7) etwa dreimal mehr Moleküle (18,5 pmol) enthalten sind als in 1µg FH(SCR1-20) (6,1 pmol). Der relative Hämolysegrad vor der Zugabe des FH(SCR1-7) lag bei etwa 0,20. Eine Halbierung dieses Wertes (d.h. eine 50%ige Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse) wurde nach einer Zugabe von etwa 2 µg abs. erreicht (Abb. 18). Da in 2 µg FH(SCR1-7) die etwa dreifache Molekülmenge (37 pmol) enthalten ist, musste dieser Inhibitionswert mit dem Wert verglichen werden, der mit 6 µg (abs.) FH(SCR1-20) (38 pmol) durchschnittlich erzielt wurde. In den mit dem FH(SCR1-20) durchgeführten Tests wurde mit dem Einsatz von 6 µg eine Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse von etwa 80% erreicht (Abb. 17). Dies bedeutete für den FH(SCR1-7) aus den HEK293 Zellen, dass er nur etwa die halbe Aktivität des aus Rattenserum gereinigten FH(SCR1-20) besaß. Eine asymptotische Annäherung an den hypothetischen Basiswert (Parallele zur Abszisse) wurde auch nach Zugabe der versuchstechnisch maximal möglichen Menge von 7,2 µg absolut (133 pmol) des FH(SCR1-7) nicht erreicht.

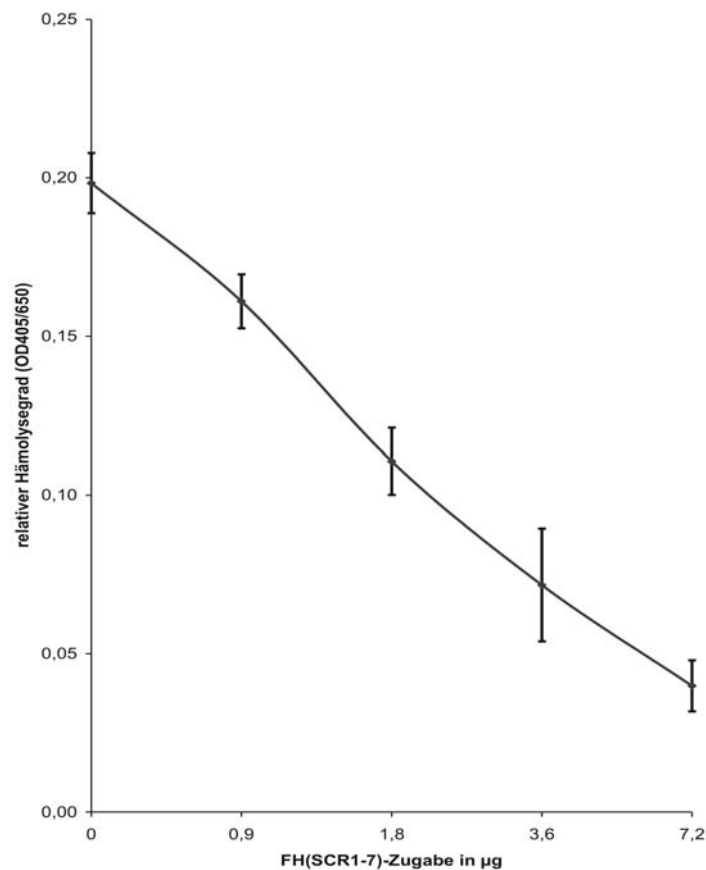


Abb. 18: Inhibition der Lyse im CH₅₀-Test durch den in HEK293-Zellen hergestellten FH(SCR1-7).

Der aus dem Überstand von SF21-Zellen gewonnene FH(SCR1-4) wurde im CH₅₀-Test in einer Konzentration von 85 µg/ml eingesetzt. Der Verlauf des Graphen dieser Versuchsreihe (Abb. 19) (n=3) ähnelt stark dem Graphenverlauf in Abb. 18. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in 1 µg des FH(SCR1-4) etwa 1,5x so viele Moleküle (28 pmol) vorliegen wie in 1 µg des FH(SCR1-7) (18,5 pmol). Der Ausgangswert [ohne Zugabe des FH(SCR1-4)] lag mit 0,18 geringfügig niedriger als der Ausgangswert für den Test mit dem FH(SCR1-7). Der FH(SCR1-4) hemmte nach einer Zugabe von 1,7 µg absolut (47,6 pmol) die Komplement-vermittelte Erythrozytenlyse um 50% (Abb. 19). Auch in dieser Versuchsreihe war die Tendenz des Graphen, sich asymptotisch einer Parallelgeraden zur X-Achse zu nähern, zu erkennen. Nach der maximal möglichen Zugabe von 6,8 µg (abs.) (190 pmol) wurde die Komplement-vermittelte Lyse um weitere 30% verringert, so dass sich eine Gesamteinhibition von etwa 75% ergab (Abb. 19). Im Vergleich mit dem FH(SCR1-7) ergab sich eine etwas verringerte molare Aktivität des FH(SCR1-4) Fragmentes.

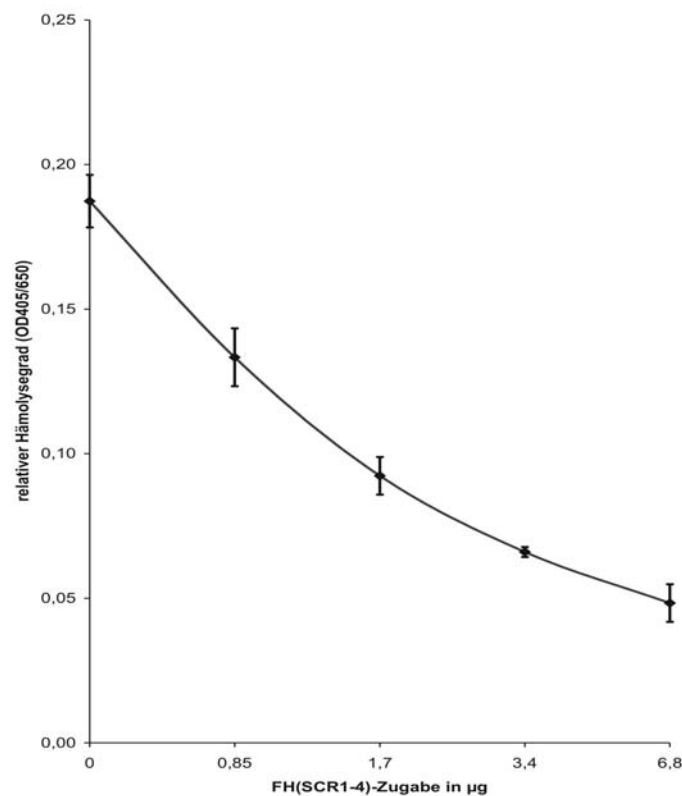


Abb. 19: Inhibition der Lyse im CH₅₀-Test durch den in SF21-Insektenzellen hergestellten FH(SCR1-4).

Für die funktionelle Austestung des aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch gewonnenen FI wurde derselbe Rattenserumpool verwendet, die auch für die Austestung der verschiedenen FH-Varianten verwendet wurde. Für die Vergleichbarkeit der inhibitorischen Funktion des Ratten FI in der Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse im CH₅₀-Test wurden drei CH₅₀-Tests parallel mit derselben Erythrozytencharge durchgeführt. Wie in Abb. 20 dargestellt liegt der Ausgangswert des Graphen (n=3) bei etwa 0,17 und damit im Bereich des zuvor durchgeführten CH₅₀-Tests. Nach einer Zugabe von 2,7 µg FI absolut (30 pmol) wurde eine Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse um etwa 50% erreicht. Eine Verdoppelung des FI von 5,3 µg absolut (59 pmol) auf 10,6 µg FI (abs.) (120 pmol) halbierte den die relative Lyse anzeigenden Quotienten von etwa 0,07 auf etwa 0,03 annähernd. Durch eine weitere Erhöhung der FI-Zugabe von 10,6 µg abs. (120 pmol) auf die technisch maximal mögliche Menge von 21,2 µg abs. (240 pmol) nahm der den relativen Hämolysegrad anzeigende Extinktionswert trotz der Verdoppelung der zugesetzten Menge nur von 0,04 auf 0,03 ab. Damit lag in diesem Assay der unter „maximaler“ Reduktion des Komplementsystems erreichte Basiswert des CH₅₀-Tests bei etwa 17% des Ausgangswertes.

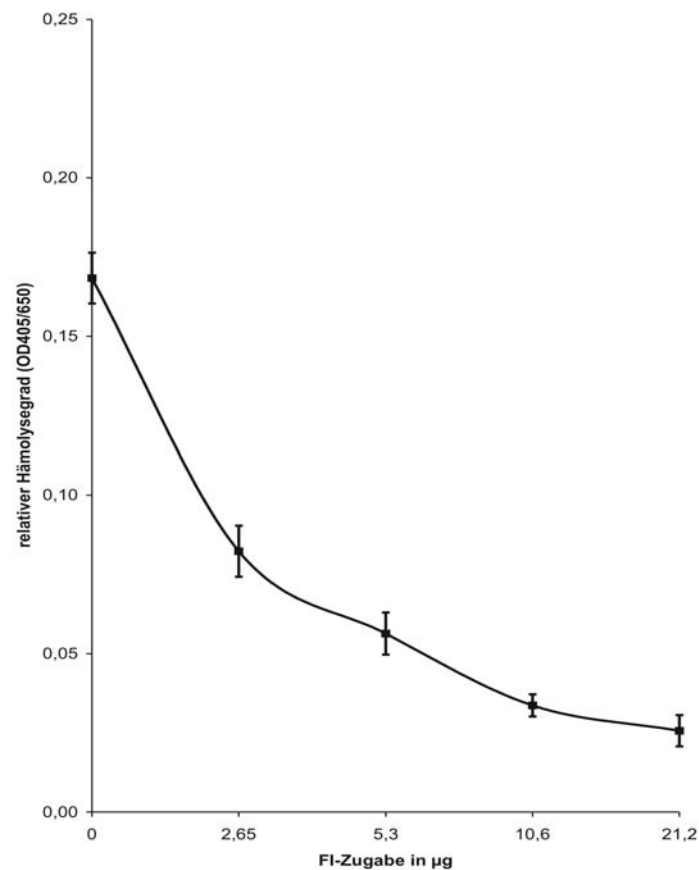


Abb. 20: Inhibition der Lyse im CH₅₀-Test durch den aus Rattenserum immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FI.

Neben der Austestung der einzelnen Faktoren/Faktorfragmente [FH(SCR1-20), FH(SCR1-7), FH(SCR1-4) und FI] auf ihre Komplement-inhibitorische Funktion im CH₅₀-Test galt es auch zu untersuchen, ob sich aus der Verwendung beider Faktoren (H und I) in Kombination ein synergistischer Effekt ergibt. Zu Beginn stand als wichtige Arbeitshypothese im Raum, dass im Vergleich zu der mit nur einem Faktor erreichten Inhibition dieselbe inhibitorische Wirkung durch einen erheblich reduzierten Einsatz der einzelnen Faktoren in Kombination bewirkt werden kann. Allerdings zeigten die durchgeführten Experimente keinen synergistischen Effekt beider Faktoren in Kombination, unabhängig davon, welcher der beiden Faktoren für die initiale 50%ige Inhibition der Lyse vorgelegt und welcher Faktor für die weitere Inhibition ergänzt wurde, so dass sich diese Hypothese über den gewählten experimentellen Ansatz nicht verifizieren ließ.

3 Diskussion

3.1 Der Komplement-inhibitorische Faktor I der Ratte: Analyse seiner Primärstruktur und Glykosylierung im Vergleich zum FI des Menschen und der Maus. Restriktion seiner Expression in Geweben und isolierten primären und permanenten Zellen

In der vorliegenden Originalarbeit I wurden die cDNA Sequenz des bisher unbekanntes Ratten FI (EMBL-Genbank Zugriffsnummer Y18965) und das Arrangement der Primärstrukturen aus den Spezies Ratte, Maus und Mensch nach dem GCG-Programm PILEUP präsentiert. Wie erwartet zeigte die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete AS-sequenz eine höhere Identität mit der Maus (87%) als mit der publizierten humanen AS-sequenz (78%). Das Sequenz-arrangement der Primärstrukturen von Ratte, Maus und Mensch zeigte, dass die Ratten- im Vergleich zur Mausequenz drei zusätzliche Nukleotide und damit ein zusätzliches Glyzin an Position 316 im sogenannten D-Segment vor dem Carboxylterminus der Schwerekettenkette enthält. Die größere Länge des Ratten FI mit 604 AS und des Mäuse FI mit 603 AS im Vergleich zum humanen FI mit 583 AS ist in erster Linie das Resultat eines Verlustes von 17 bzw. 16 AS (im Vergleich zur Ratten- bzw. Mausequenz) im nur wenig konservierten D-Segment des humanen FI. Der grundsätzliche Aufbau der Vorläuferform des Ratten FI unterscheidet sich jedoch nicht von dem der Maus und dem des Menschen. Sie alle bestehen aus folgenden Komponenten: Signalpeptid, Schwerekettenkette, Linkerpeptid und Leichtkettenkette. Das Linkerpeptid mit der Sequenz RRKR erwies sich als in allen drei Spezies vollständig konserviert.

Ein überdurchschnittlich hoher Glykosylierungsanteil von etwa 25% des Ratten FI konnte aus dem Unterschied abgeleitet werden, der sich einerseits aus der Wanderungstrecke im SDS-Gel und andererseits aus dem nach der Primärstruktur vorausgesagten Molekulargewicht ergab. So zeigte die Schwerekettenkette (50 kDa) diesbezüglich einen Molekulargewichtsunterschied von 12,6 kDa (25,2%) zur berechneten Primärstruktur von 37,4 kDa, die Leichtkettenkette (38 kDa) eine Differenz von 9 kDa (25%) im Vergleich zu dem aus der Primärstruktur abgeleiteten Molekulargewicht (29,3 kDa). Aus diesem Grund entsprechen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Glykosylierungsdaten von etwa 25% auch eher den von Goldberger et al. (1984) für den humanen FI erhobenen (27% Glykosylierungsanteil) als denen von Pangburn et al. (1977), die zuvor einen Glykosylierungsanteil des humanen FI von lediglich 10,7% beschrieben hatten.

Im Gegensatz zu Publikationen, die die Leber als Hauptsyntheseort des FI bezeichneten, deren Daten aber nur auf Expressionsuntersuchungen in verschiedenen humanen

Hepatomzelllinien (HepG2, Hep3B, NPLC-KC) beruhen (Goldberger et al., 1984), konnte in der Originalarbeit I erstmalig die Expression in primären Leberzellen gezeigt werden. Nur Hepatozyten exprimieren den FI im Gegensatz zu den nicht parenchymatischen Kupfferzellen (KC) und den hepatischen Sternzellen (HSC). Die vorhandenen Untersuchungen zur extrahepatischen Produktion des FI wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls mittels RT-PCR reevaluiert. Die von Whaley (1980) mittels eines komplexen funktionellen und indirekten Assays beschriebene FI-Biosynthese in humanen peripheren Monozyten konnte mittels RT-PCR nicht bestätigt werden. Allerdings gab Whaley in der Diskussion seiner eigenen Arbeit bereits zu bedenken, dass der funktionelle Effekt auch auf andere Enzyme/Hydrolasen, die im Überstand von Monozyten vorhanden sind, zurückzuführen sein könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte der FI auch in isolierten Peritonealmakrophagen und der Prämonozytenzelllinie U937 nicht nachgewiesen werden. Lambris et al. (1980) berichteten von der Synthese des FI in B-Zellen und der Burkittlymphom-Zelllinie Raji als Antwort auf einen FH-Stimulus. Auch diese aufgrund der äußerst geringen und funktionell nachgewiesenen FI-Konzentrationen methodisch sehr zweifelhaften Untersuchungen ließen sich in der vorliegenden Arbeit mittels RT-PCR Nachweis nicht bestätigen. Ein entsprechend den Studien von Lambris und Mitarbeitern zu fordernder Mechanismus einer permanenten physiologischen Aktivierung durch Faktor H kann zudem auch nicht als sinnvoll angesehen werden (siehe Originalarbeit I, Diskussion). Eine weitere Publikation derselben Arbeitsgruppe (Vetvicka et al., 1993) wies FI-spezifische mRNA in der Prämonozyten-Zelllinie U937 und der B-Zelllinie Raji nach. Darüber hinaus wurde FI in den Zellkulturüberständen der B-Zelllinien Wil-2, Daudi, U698M und der T-Zelllinie 8402 in sehr geringen Konzentrationen von 4 ng/ml und weniger nachgewiesen. Diese Resultate stehen in eindeutigem Gegensatz zu den in der vorliegenden Originalarbeit I (Schlaf et al., 1999b) erhobenen Daten, denn weder in Raji-Zellen noch in U937-Zellen konnte FI-spezifische mRNA nachgewiesen werden. Der von Vetvicka et al. (1993) verwendete ELISA zur Detektion des FI bewegte sich nach Angabe der Autoren zudem in einem Arbeitsbereich zwischen 7,5 ng und 500 ng/ml. Die vermessenen FI-Konzentrationen von ≤ 4 ng/ml stellen somit gerade einmal die Hälfte des unteren Detektionslimits dar und könnten damit eher als unspezifisches Hintergrundsignal zu deuten sein. Bestätigt werden konnte jedoch die FI-Expression in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC), ein Aspekt, der deutlich für die in der Originalarbeit I gewählte spezifische und sensitive Methode des Nachweises von FI-mRNA mittels RT-PCR spricht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die für den FI beschriebenen Synthesorte durch die vorliegende Arbeit stark eingeschränkt wurden, d.h. sich auf primäre

Hepatozyten (als postulierter Hauptsyntheseort) und HUVEC sowie einige Hepatomzelllinien beschränken. Damit zeigt der FI ein deutlich stärker eingeschränktes Expressionsspektrum als der Faktor H. Der in der Originalarbeit I (Schlaf et al., 1999b) erhobene Befund, dass periphere Blutzellen den FI nicht konstitutiv exprimieren, wurde durch jüngere Untersuchungen von C. Gonzales-Rubio und M. Lopez-Trascasa (persönliche Mitteilungen aus den Jahren 2002 und 2003) bestätigt. Die spanische Arbeitsgruppe um M. Lopez-Trascasa, die eine erbliche FI-Defizienz in einer Familien-Fallstudie molekular aufklären wollte, konnte aus peripheren Blutzellen auch mittels des äußerst sensitiven „Nested-PCR“ Verfahrens kein FI-spezifisches Amplifikat herstellen. Erst die Verwendung von Fibroblasten als tatsächliche Quelle der mRNA ergab FI-spezifische Amplifikate, die zur Aufklärung der funktionellen Defizienz verwendet werden konnten. Die entsprechende Studie wurde später unter der Autorenschaft von Ponce-Castro et al. (2008) veröffentlicht. In der Tat wurde für diese Studie Faktor I-spezifische mRNA aus Fibroblasten und nicht aus peripheren Blutleukozyten gewonnen.

3.2 Regulation des Komplement-inhibitorischen Faktor I durch proinflammatorische Zytokine

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das proinflammatorische Zytokin IL-6, nicht aber IL-1 β , TNF- α oder IFN- γ die Expression von FI-spezifischer mRNA und die Synthese von FI im Überstand primärer HC der Ratte sowie der Rattenhepatomzelllinien FAO und H4IIE heraufregulieren. Die relative Übereinstimmung der Heraufregulationen auf der Ebene der mRNA und des Proteins legen nahe, dass kein gegenregulierender Kontrollmechanismus auf der Ebene der Translation greift.

Zur Expressionsregulation des FI existierten nur sehr wenige Untersuchungen. Julen et al. (1992) publizierten die Heraufregulation FI-spezifischer mRNA in HUVEC als Antwort auf einen IFN- γ Stimulus. Die grundsätzliche Expression des FI in HUVEC, die zuerst von Ripoche et al. (1988b) nachgewiesen worden war, konnte in späteren Untersuchungen und auch in den eigenen Arbeiten reproduziert werden (Julen et al., 1992; Schlaf et al., 1999b). Aus diesem Grund war das von der Arbeitsgruppe um Julen und Mitarbeiter als Stimulans beschriebene Zytokin IFN- γ auch zunächst der Hauptkandidat für die Heraufregulation des FI in Hepatozyten. Allerdings zeigte IFN- γ in den eigenen Originalarbeiten II und III (Schlaf et al., 2001a; Schlaf et al., 2001b) weder in HUVEC noch in HC oder Hepatomzelllinien (FAO und H4IIE) irgendeinen Effekt auf die Expressionsrate des FI. Auch in HUVEC zeigte sich in den eigenen Arbeiten lediglich eine IL-6 –vermittelte Heraufregulation des FI. Damit

entsprechen die Daten der eigenen Arbeiten den Befunden von Legoedec et al. (1995), die nachwiesen, dass sowohl IFN- γ als auch IL-1 β keinen Effekt auf die Regulation des FI in primären Myoblasten und den beiden Rhabdomyosarcomzelllinien CRL 1558 und HTB 153 zeigen. Die in den eigenen Arbeiten erhobenen Daten korrespondierten teilweise mit den von Minta et al. (1998) erhobenen, die den 5'-flankierenden Bereich des humanen FI-Genes in HepG2 Zellen charakterisierten. Mittels eines Chloramphenicol Acetyltransferase Assays (CAT-Assays) und einer Transfektion des Promotorkonstruktes in HepG2 Zellen hatten Minta und Mitarbeiter eine Heraufregulation der FI-Aktivität durch (Phorbol 12-Myristin 13-Acetat) PMA und IL-6, allerdings nicht durch IL-1 β herausgefunden. Ein durch IFN- γ vermittelter Effekt wurde von Minta und Mitarbeitern weder gezeigt noch diskutiert. Allerdings stimmte die von Minta und Mitarbeitern beschriebene Erhöhung der CAT-Aktivität durch IL-6 um einen Faktor von 6,8 relativ gut mit den Daten der eigenen Originalarbeit II (Schlaf et al., 2001a) überein, die eine etwa 10-fache Heraufregulation der FI-mRNA in HC zeigten. Die in den eigenen Arbeiten erhobenen Daten zur Regulation des FI wurden zusätzlich gestützt durch die von Vogel et al. (2000) präsentierte Studie, nach der ebenfalls nur IL-6, keineswegs aber TNF- α oder IFN- γ eine Heraufregulation des FI in humanen HC bewirken. Unter Berücksichtigung sämtlicher Daten muss deshalb der Schluss gezogen werden, dass der von Julen und Mitarbeitern postulierte IFN- γ -Effekt eher auf methodischen Unzulänglichkeiten beruhte. Diese führten in ihrer Northern Blot Analyse weder einen Kontrollblot mit einem „Housekeeping-Gen“ als Parallelansatz noch zeigten sie mittels Gelfärbung, dass identische Mengen an Gesamt-RNA aus nicht stimulierten und stimulierten Zellen aufgetragen worden waren. Interessanter Weise wurden in einer jüngeren Studie humane Keratinozyten als Syntheseort des Faktor I identifiziert (Timar et al., 2007). In dieser wurde der aus der Sicht der vorliegenden Publikationen (Originalarbeiten II und III) eher überraschende Nachweis geführt, dass IFN- γ als einziges der untersuchten Zytokine (IL-1 β , IL-6, TGF- β , TNF- α und IFN- γ) die Synthese des humanen FI heraufreguliert. Dabei ergab sich eine große Diskrepanz zwischen der Heraufregulation auf der Ebene der mRNA Expression (168-fach) und einer nur 1,5-fachen Aktivitätssteigerung. Allerdings zeigt der Dosis-/Antwortverlauf der Studie von Timar und Mitarbeitern den beschriebenen geringen Aktivitätsanstieg erst ab einer „Konzentration“ von 250 U/ml. Interessant wäre die Aufnahme einer Dosis-/Verlaufskurve auch für die Expressionssteigerung der FI-spezifischen mRNA gewesen. Leider werden diesbezüglich nur Daten präsentiert, die von mit 1.000 U/ml IFN- γ stimulierten Keratinozyten, d.h. mit einer stark überphysiologischen Konzentration dieses Zytokins gewonnen wurden. Ob IFN- γ , dessen Einfluß auf HUVEC und Hepatozyten aus Mensch und

Ratte eindeutig auszuschließen war (Vogel et al., 2000; Schlaf et al., 2001a und 2001b), aufgrund der jüngeren Arbeit von Timar et al. (2007) wieder in den Kreis der für den Faktor I regulationsrelevanten Zytokine aufgenommen werden muss, sollte durch weitere Studien unter Verwendung physiologischer Konzentrationen belegt werden.

Als Quintessenz der in den vorliegenden Originalarbeiten II und III (Schlaf et al., 2001a und 2001b) erhobenen Befunde lässt sich zeigen, dass ein Entzündungsmediator (das proinflammatorische Zytokin IL-6) das Niveau der Komplementhomöostase unter entzündlichen Bedingungen neu einstellt. Auf diese Weise trägt IL-6 dazu bei, auch unter entzündlichen Bedingungen die Balance zwischen Aktivierung und Inhibition beizubehalten und damit eine unkontrollierte Aktivierung des Komplementsystems zu verhindern.

3.3 Regulation des Ratten FH durch proinflammatorische Zytokine und Lipopolysaccharide (LPS) in primären Zellen der Rattenleber. Vergleich der Regulation und Expression von FH primär kultivierter Hepatozyten mit Hepatomzelllinien

Die Leber ist sowohl als Hauptquelle der Komplementkomponenten des aktivierten Systems bekannt als auch der löslichen Komplementinhibitoren, die im Serum aufzufinden sind. In diesem Kontext wurde postuliert, dass in Analogie zum Faktor I auch der Komplementinhibitorische Faktor H hauptsächlich in der Leber produziert wird, obwohl experimentelle Beweise unter Verwendung primärer Leberzellen vor der vorliegenden Originalarbeit IV (Schlaf et al., 2002) nicht beschrieben worden waren. Viele Hepatomzelllinien humanen oder murinen Ursprunges wie z.B. die Linien Hep3b (Luo und Vik, 1999; Schwaeble et al., 1991), HepG2 (Lappin et al., 1992; Schwaeble et al., 1991), HepG4 (Schwaeble et al., 1991), H4 (Schwaeble et al., 1991), HUH7 (Frieze et al., 1999), +/+ Li (Vik, 1996) wurden auf die Expression des FH untersucht. In den meisten dieser Hepatomzelllinien (HepG2, HepG3 und H4) konnte eine FH-Expression nicht nachgewiesen werden. Dagegen verlief der Nachweis in der humanen Hepatomzelllinie HUH7 (Frieze et al., 1999) und der murinen +/+ Li Zelllinie (Vik, 1996) auch ohne Stimulation dieser Zellen positiv. Die Befunde zu einer möglichen Zytokin-vermittelten Induktion des FH verhielten sich kontrovers. Für die Hepatomzelllinien HepG2, HepG3, HepG4 und H4 wurde nachgewiesen, dass eine Induktion durch IFN- γ nicht möglich ist (Lappin et al., 1992; Schwaeble et al., 1991). Im Gegensatz hierzu zeigten Luo und Vik (1999), dass Hep3b Zellen, die den FH nicht konstitutiv exprimieren, durch IFN- γ zu einer Expression des FH gebracht werden konnten. Die einzige humane Hepatomzelllinie, die den FH konstitutiv exprimierte (HUH 7), zeigte eine IFN- γ –abhängige Heraufregulation

dieses Moleküls (Friese et al., 1999) und entsprach mit dieser Eigenschaft der murinen +/- Li-Zelllinie (Vik, 1996). Dieses sehr unterschiedliche Expressions-/Regulationsverhalten der unterschiedlichen Hepatomzelllinien veranlasste uns zu den Untersuchungen an primär kultivierten Hepatocyten (HC) und Kupfferzellen (KC) der Ratte. In der vorliegenden Arbeit erwies sich einmal mehr, dass Hepatomzelllinien die Physiologie von nicht malignen Hepatozyten nicht repräsentieren müssen. Die in der Originalarbeit IV (Schlaf et al., 2002) erstmalig auf ihre FH-Expression untersuchten Ratten-Hepatomzelllinien FAO und H4IIE zeigten ein komplett anderes Expressions- und Regulationsverhalten als primäre HC der Ratte. So entsprachen die H4IIE Zellen aus der Ratte den meisten humanen Hepatomzelllinien, bei denen der FH weder konstitutiv exprimiert wurde noch durch die Zytokine IL-6, IL-1 β , TNF- α oder IFN- γ induzierbar war. Die andere untersuchte Zelllinie FAO zeigte eine höhere konstitutive Expression der FH-spezifischen mRNA als primäre HC; allerdings konnte diese basale Expression nicht durch die hier verwendeten vier Zytokine gesteigert werden. Die in der Originalarbeit IV (Schlaf et al., 2002) für den Faktor H erhobenen Daten bestätigen insofern nicht die den Faktor I betreffenden Daten der Originalarbeit II (Schlaf et al., 2001a), in der alle durch IL-6 bewirkten regulatorischen Eigenschaften sowohl an primären HC als auch an den beiden Linien FAO und H4IIE zu beobachten waren. Ein Vergleich beider Untersuchungen (Originalarbeiten II und IV; Schlaf et al., 2001a und 2002) zeigt einmal mehr, dass transformierte Zellen in Bezug auf die Expression eines beliebigen Proteins die Physiologie der entsprechenden Wildtypzellen repräsentieren können aber keineswegs repräsentieren müssen. Ihre Verwendung als Ersatz/Modell einer primären Zelle und physiologische Rückschlüsse auf eine solche müssen deshalb ständig kritisch hinterfragt werden.

In der Untersuchung der basalen Expression in primären KC und HC zeigte sich, dass KC einen unerwartet hohen Gehalt an FH-spezifischer mRNA aufwiesen. Aus RT-PCR Analysen unter Verwendung gleicher Mengen isolierter mRNA muss deshalb der Schluss gezogen werden, dass KC eine bedeutende Quelle für den FH darstellen, zeigte doch die quantitativ-kompetitive PCR in KC einen etwa 10-fach höheren Gehalt an FH-spezifischer mRNA als in HC. Dennoch fällt die Einschätzung schwer, ob die gesamte Kupfferzellpopulation in der Leber insgesamt mehr FH synthetisiert als die Gesamtzahl der Hepatozyten, bilden doch die HC einen Anteil von 65% aller Leberzellen und KC lediglich 7%. Die Befunde der quantitativ-kompetitiven PCR legen zumindest nahe, dass die geringere Anzahl an KC durch eine höhere FH-Syntheseleistung dieses Zelltyps ausgeglichen wird. Obwohl die konstitutive Expression der FH-spezifischen mRNA in KC erheblich höher als in HC ist, erwies sie sich

zusätzlich als durch IFN- γ heraufregulierbar. Dieser IFN- γ Effekt, der in HC und KC beobachtet werden konnte, war nicht unerwartet, weil er zuvor bereits für verschiedene primäre Zellen und Tumorzelllinien aus Mensch und Maus beobachtet worden war. Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass (in Analogie zum proinflammatorischen Zytokin IL-6 für die FI-Regulation) IFN- γ durch die Heraufregulation des FH die Balance zwischen der Aktivierung und der Inaktivierung des Komplementsystems aufrechterhält und so zur Homöostase dieses Systems auch unter entzündlichen Bedingungen beiträgt.

Als interessant erwiesen sich die Unterschiede in der LPS-vermittelten Heraufregulation des FH in HC gegenüber KC. Unsere Daten zur LPS-vermittelten Heraufregulation des FH in KC wurden von Minta (1988) unterstützt, der eine etwa dreifache Heraufregulation des sezernierten FH in der prämonozytischen Zelllinie U937 beschrieben hatte. Dabei verwendete er LPS in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$, d.h. in einer Konzentration, die nach späteren Erkenntnissen als erheblich zu hoch für ein spezifisches Rezeptor-vermitteltes Signal z.B. über den LPS-Rezeptor (CD 14) und den Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) (Kopp und Medzhitov, 1999) gelten muss. Eine derart überhöhte Konzentration, die in der Literatur oft aufzufinden ist, kann zu unspezifischen Effekten führen (Wright, 2000). Aus diesem Grund wurde in den eigenen Studien LPS lediglich in einer Konzentration von 1 bzw. 10 ng/ml eingesetzt. Schon mit LPS in einer Konzentration von 1 ng/ml wurde die FH-spezifische mRNA etwa 8-fach heraufreguliert. Durch LPS-Konzentrationen $> 1 \text{ ng/ml}$ ließ sich dieser Effekt nicht steigern. Im Gegensatz zu KC zeigte LPS auf HC selbst in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ keine Wirkung, was uns zu der Entwicklung der Hypothese veranlasste, dass LPS generell keine Wirkung auf HC der Ratte ausüben kann. Diese Hypothese wurde durch eine weitere Studie untermauert, in der gezeigt werden konnte, dass LPS die Expressionsinduktion des Rezeptors für das Anaphylatoxin C5a (C5aR) auf HC nicht direkt, sondern nur indirekt über das aus den KC freigesetzte IL-6 bewirkt (Schieferdecker et al., 2000; Koleva/Schlaf et al., 2002). Bereits bei einer LPS-Konzentration von 0,1 ng/ml zeigten die KC als anerkannten Indikator ihrer Aktivierung eine deutliche bis maximale Heraufregulation an sezerniertem IL-6 und IL-1 β . Weitergehende Untersuchungen (Vortrag auf der 3. International Conference on Innate Immunity, Hersonissos-Kreta, 2004) zur Klärung der offensichtlich nicht vorhandenen Möglichkeit von Rattenhepatozyten, direkt auf einen LPS-Stimulus zu antworten, zeigten, dass diese Zellen höchstwahrscheinlich nicht über das GPI-verankerte CD14-Molekül (mCD14/LPS Rezeptor), aber eindeutig nicht über den TLR4 verfügen. Offensichtlich liegt der LPS-Rezeptor in HC der Ratte nur in seiner löslichen d.h sezernierten Form (sCD14) vor.

3.4 Unterschiede zwischen der unter der Patentnummer WO 9823638-A/1 publizierten und der in der eigenen Arbeitsgruppe identifizierten und publizierten Ratten FH cDNA Sequenz

Die cDNA-Sequenz des FH der Ratte ist erstmalig in der vorliegenden Originalarbeit V (Demberg et al., 2002) publiziert worden. Allerdings fand sich bereits zuvor in der EMBL-Nukleotidsequenzbank unter der Zugangsnummer A 91883 ein Eintrag vom Januar 2000, der von einem Patent unter der Patentnummer WO 9823638-A/1 von W. Schwaeble und R.B. Sim abgeleitet und eingereicht worden war. Ein Vergleich dieser patentierten Sequenz mit Teilamplifikaten des FH, die in unserer Arbeitsgruppe mittels sogenannter „Proof Reading Polymerasen“ zu verschiedenen Zwecken generiert worden waren, zeigte bereits mehrere Unterschiede. Aus diesem Grund wurde der Entschluss gefasst, die gesamte cDNA Sequenz des Ratten FH unter Verwendung einer cDNA-Bank neu zu bestimmen. Als Resultat ergab sich eine vollständige Übereinstimmung zwischen den Nukleotidsequenzen der in der eigenen Arbeitsgruppe generierten Amplifikate mit den aus der cDNA-Bank identifizierten Sequenzen. Damit war belegt, dass die Sequenzunterschiede nicht auf methodischen Fehlern der eigenen Arbeitsgruppe beruhten. Die hauptsächlichen Diskrepanzen sollen an dieser Stelle kurz aufgeführt werden: Eine Übersetzung der patentierten cDNA Sequenz von Schwaeble und Sim mittels des GCG-Programmes „Translate“ ergäbe an AS-Position 194 ein Stop-Codon (TAA), während die in der vorliegenden Originalarbeit V (Demberg et al., 2002) erhobene Sequenz und die Sequenz der Maus (Kristensen und Tack, 1986) eindeutig ein Glutamat [E] (kodiert durch ein GAA) ergaben. Allerdings wurden aus den von Schwaeble und Sim erhobenen Nukleotidsequenzen keine translatierten AS-Sequenzen abgeleitet und in der EMBL- oder Swiss Prot- Bank niedergelegt. Neben 11 weiteren Unterschieden, die einzelne AS betreffen und die über die Gesamtsequenz verteilt sind, wurden in der Originalarbeit V zwei Bereiche von 6 bzw. 11 AS aufgefunden, die sich komplett von den „korrespondierenden“ Sequenzen von Schwaeble und Sim unterscheiden. Es handelt sich zum einen um den Bereich der AS 804-810 (Abb. 10) und zum anderen um den Bereich der AS 1.093-1.104 (Abb. 10). Darüber hinaus weist die in der Originalarbeit V abgeleitete AS-Sequenz der Region 804-810 zwei zusätzliche AS im Vergleich zu der Sequenz von Schwaeble und Sim auf, so dass die Gesamtlänge der eigenen AS-Sequenz 1.236 AS (Demberg et al., 2002) im Gegensatz zu den 1.234 AS der Sequenz von Schwaeble und Sim umfasst, wenn das Stop-Codon (TAA) an Position 194 als Aminosäure betrachtet wird. Um diese abweichenden Befunde zu untermauern, wurden die beiden „kontroversen Regionen“ aus drei verschiedenen cDNA-Klonen sequenziert. In jedem Fall entsprach das Resultat der in

Abb. 10 dargelegten Sequenz, so dass die von Schwaeble und Sim erhobene Sequenz mit großer Wahrscheinlichkeit fehlerhaft ist.

3.5 Negativer Einfluss auf die Komplementaktivierung über die Heraufregulation des dominierenden solublen Komplementinhibitors FH durch das potenteste Anaphylatoxin C5a

In der Originalarbeit VI (Schlaf/Nitzki et al., 2004) wurde der Einfluss untersucht, den das potenteste Anaphylatoxin C5a auf die Expression des Komplement-inhibitorischen FH ausübt. Das Anaphylatoxin C5a entsteht im Zuge der Aktivierung bei allen drei Komplementwegen. In der Originalarbeit IV (Schlaf et al., 2002) wurde die basale Expression und Regulation des FH in primären HC und KC aus der Rattenleber untersucht, wobei eine unerwartet hohe Expression FH-spezifischer mRNA in KC nachgewiesen wurde. Weil der Nachweis FH-spezifischer mRNA in KC etwa 10-fach höher als in HC ausfiel, wie mittels quantitativ-kompetitiver PCR nachgewiesen werden konnte, ist zu folgern, dass KC in der normalen Rattenleber eine herausragende Quelle für den FH darstellen, obwohl HC 65% der Leberzellen und KC lediglich 7% der Leberzellen betragen. Trotzdem repräsentieren die KC mit 80%-90% der Gewebsmakrophagen die größte Makrophagenpopulation im Körper (Kuiper et al., 1994), so dass sie auch durchaus für systemische Effekte verantwortlich sein können. Die konstitutive Expression des FH in KC und HC wurde durch IFN- γ heraufreguliert (Originalarbeit IV; Schlaf et al., 2002). Dieser Effekt war nicht unerwartet, weil dieses Phänomen zuvor für HUVEC und verschiedene andere Zelltypen beschrieben worden war (Ripoche et al., 1988b; Munoz-Canoves et al., 1989; Lappin et al., 1992; Friese et al., 1999; Schlaf et al., 2001b). In der Originalarbeit VI (Schlaf/Nitzki et al., 2004) konnte eine Beteiligung von IFN- γ allerdings eindeutig ausgeschlossen werden, da sich dieses Zytokin weder auf der Ebene der mRNA noch auf der Ebene des Proteins nachweisen ließ. Erstmals wurde hingegen eine direkte negative Rückkopplung auf die Aktivierung des Komplementsystems in Form einer C5a-vermittelten Heraufregulation des Komplement-inhibitorischen Faktor H beschrieben. Dieser direkte Effekt von C5a repräsentiert höchstwahrscheinlich einen zusätzlichen Mechanismus in dem hoch komplexen Netzwerk aus Komplementaktivierung und Komplementinhibition, um letztlich die Homöostase dieses Systems auch während seiner Aktivierung d.h. unter „entzündlichen Bedingungen“ beizubehalten und ein „Überschießen“ zu verhindern. Mit einer 2- bis 3-fachen Zunahme FH-spezifischer mRNA und einer Zunahme des FH-Proteins im Überstand von KC von 32% (frühere Versuche) bzw. 80% (spätere Versuche nach Reduktion des KC-Überstandes

von 2 auf 1 ml) repräsentiert dieser C5a-vermittelte Mechanismus einen signifikanten aber keinen exzessiven Effekt.

3.6 Historische und aktuelle Molekulargewichtsdifferenzen des FH(Short Consensus Repeat/SCR1-20) und seiner Varianten (SCR1-4 und SCR1-7) ergeben sich aus Untersuchungen unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen

Das rekombinant hergestellte Protein FH(SCR1-7) enthielt die ersten sieben SCR und nachfolgend die ersten 12 AS des achten SCR entsprechend der Ratten FH cDNA-Sequenz (Originalarbeit VII/Demberg et al., 2006). Das für dieses Protein kodierende cDNA-Amplifikat umfasste 1.362 Bp, was einer Größe von 454 AS entsprach. Es zeigte sich, dass das errechnete Molekulargewicht (in Abhängigkeit von dem Glykosylierungsanteil zwischen 50,7 kDa und 53,7 kDa) dem M_r von etwa 54 kDa entsprach, das der FH(SCR1-7) unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel zeigte. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde der FH(SCR1-7) nur mit einem M_r von etwa 43 kDa detektiert (Abb. 16).

Für den FH(SCR1-20), d.h. das Gesamtprotein wurden in der Literatur zwei Molekulargewichte angegeben. Diese liegen bei 150 kDa (Whaley und Ruddy, 1976) bzw. 155 kDa (Sim und DiScipio, 1982) und sind auf die Bestimmung des Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten zurückzuführen. Wird dieser Wert auf die Anzahl der SCR, die das rekombinante Protein enthält, bezogen, so ergibt sich für den FH(SCR1-7) ein Molekulargewicht von etwa 52,5 kDa (wenn FH(SCR1-20)=150 kDa) oder von 54,3 kDa (wenn FH(SCR1-20)=155 kDa). Da sich das mittels SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen ermittelte relative Molekulargewicht (Abb. 16) mit der hier aufgeführten Berechnung von etwa 54 kDa fast deckte, konnte das seinerzeit von Schwaeble et al. (1987) postulierte Molekulargewicht von 43 kDa für das humane Faktor H like protein (FHL-1), der als Spleißvariante des FH(SCR1-20) ebenfalls aus den ersten sieben SCR des Gesamt-FH besteht, nicht zutreffen. Entsprechend den unter Abb. 16 in Abschnitt 2.6 aufgeführten Untersuchungen scheint bei Schwaeble und Mitarbeitern der M_r -Bestimmung das Laufverhalten im SDS-Gel unter **nicht reduzierenden** Bedingungen zugrunde zu liegen. Unterstützt wird die These, dass ein M_r von 43 kDa im SDS-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen das tatsächliche Molekulargewicht des FH(SCR1-7) nicht repräsentiert, auch durch die Angaben von Ripoché et al. (1988a) und Zipfel und Skerka (1999) zum errechneten Molekulargewicht des FHL-1/Reconnectin Moleküls. In beiden Arbeiten wird für das humane FHL-1(SCR1-7) ein theoretisches d.h. errechnetes Molekulargewicht von 49 kDa (ohne

Glykosylierung) angegeben. Wird aufgrund der im SCR 4 des humanen FHL-1 vorhandenen N-Glykosylierungsstelle noch eine Glykosylierung von 3 kDa hinzuaddiert, so ergibt sich ein Molekulargewicht von > 50 kDa. Die Molekulargewichtsdifferenz gegenüber dem FHL-1(SCR1-7) aus den Publikationen von Schwaeble et al. (1987) und derselben Arbeitsgruppe unter der Autorenschaft von Estaller et al. (1991), angegeben mit 43 kDa, beträgt somit fast 9 kDa, d.h. nahezu $1/5$ des Gesamtgewichtes. Diese Daten werden durch die Ergebnisse der Originalarbeit VII (Demberg et al., 2006) untermauert, denn nur unter reduzierenden Bedingungen wurde der FH(SCR1-7) bei etwa 54 kDa und damit im Bereich des errechneten Molekulargewichtes aufgetrennt.

Der rekombinant hergestellte FH(SCR1-4) umfasst 276 Aminosäuren ohne Leader-Sequenz (aber inkl. HIS-Tag). Das daraus resultierende Molekulargewicht beläuft sich auf rund 34 kDa. Das von Sim und DiScipio (1982) und Alsenz et al. (1984) beschriebene tryptische FH-Fragment, welches die SCR1-5 enthält, zeigte mit einer angegebenen Größe von 34 kDa unter nicht reduzierenden Bedingungen bzw. 38 kDa unter reduzierenden Bedingungen (Alsenz et al., 1984) wie auch der rekombinante FH(SCR1-4) ebenfalls Unterschiede in der Auftrennung im SDS-Gel, die ebenso offensichtlich im Zusammenhang mit der Benutzung eines reduzierenden Agenzes stehen. In Originalarbeit VII (Demberg et al., 2006) wurde der FH(SCR1-4) unter nicht reduzierenden Bedingungen bei 28 kDa, unter reduzierenden Bedingungen hingegen im berechneten Molekulargewichtsbereich von 36 kDa aufgetrennt. Damit betrug der Unterschied mit etwa 8 kDa sogar mehr als $1/5$ seines Molekulargewichtes. Dem Gesamt-FH(SCR1-20), der in Originalarbeit VII im Immunblot unter reduzierenden Bedingungen mit einem relativen Molekulargewicht von 155 kDa detektiert wurde, wurde in der Publikation von Sim und DiScipio (1982) über die Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten ein Molekulargewicht zwischen 154,5-156,5 kDa zugeordnet. Sim und DiScipio (1982) zeigten darüberhinaus, dass der von ihnen aufgereinigte FH im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen ein um etwa 20 kDa erhöhtes relatives Molekulargewicht aufwies als unter nicht reduzierenden Bedingungen. Damit wurden die in der Originalarbeit VII detailliert und systematisch beschriebenen Beobachtungen bereits von Sim und DiScipio (1982) allerdings nur als Abbildung eines SDS-Gels dargestellt. Leider fand dieses Phänomen in jener Publikation keinerlei weitere Beachtung und Diskussion. Die unterschiedlichen Größen des FH(SCR1-20) sowie seiner Fragmente, des FH(SCR1-7) und des FH (SCR1-4) unter nicht reduzierenden und reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel sind ganz offensichtlich auf die internen Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten I und III sowie II und IV in den jeweiligen SCR zurückzuführen. Unter nicht-reduzierenden

Bedingungen nimmt das Protein ganz offensichtlich eine kondensiertere Konformation ein, wohingegen unter reduzierenden Bedingungen (d.h. unter Spaltung der Disulfidbrücken) das Protein eine ausladendere Konformation einzunehmen und auf diese Weise der Wanderung im SDS-Gel einen höheren Widerstand entgegenzusetzen scheint. Diese Hypothese wird durch die in Abb. 20 gezeigte spezielle Struktur eines SCR (in diesem Fall der SCR4 des humanen FH) (Zipfel und Skerka, 1999) unterstützt. Zipfel und Skerka (1999) übertrugen damit das von Janatova et al. (1989) ursprünglich für das C4b-bindende Protein entwickelte „Konformationsmodell“, das auf die Disulfidbrückenbildungen innerhalb eines SCR zurückzuführen ist, auf den FH bzw. seine verkürzte Spleißvariante (FHL-1).

Sowohl die in Originalarbeit VII als auch die von Sim und DiScipio (1982) durchgeführten Auftrennungen des FH im SDS-Gel stehen in Kontrast zu den von Daha und van Es (1982) erhobenen Molekulargewichtsbestimmungen, die für den von ihnen chromatographisch aufgereinigten FH keinen Unterschied im relativen Molekulargewicht unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen feststellen konnten. Eine Erklärung für diesen gegenüber den Daten der eigenen Arbeitsgruppe und gegenüber den Daten von Sim und DiScipio (1982) abweichenden Befund kann an dieser Stelle nicht geliefert werden.

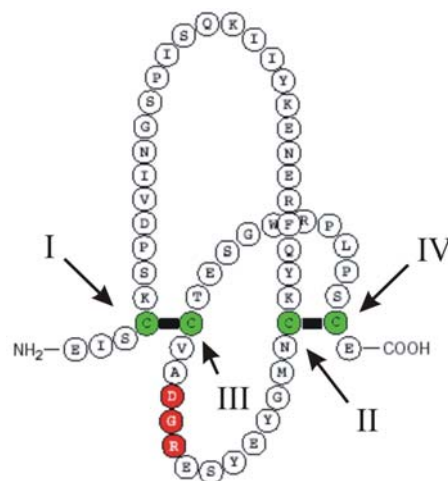


Abb. 21: Schematische Darstellung der von Zipfel und Skerka vorgeschlagenen Struktur für den SCR 4 des FHL-1/Reconectin und des FH

Die Cysteine sind grün und durch römischen Zahlen markiert. Rot ist die RGD-Sequenz für die Zelladhäsion gekennzeichnet.

3.7 Quantitative und stöchiometrische Betrachtungen zum funktionellen *in-vitro* Einsatz der isolierten FI und FH(SCR1-20) sowie der rekombinanten Ratten FH(SCR1-7) und FH (SCR1-4)

Der Ratten FH lässt sich generell sowohl in Insektenzellen als auch in Säugerzellen rekombinant herstellen. Die bereits erwähnte Tatsache, dass die Glykosylierung für die Funktion des FH nicht essentiell ist (Jouvin et al., 1984) wurde durch die Analyse der Primärstrukturen aus den Spezies Maus, Mensch und Ratte (Abb. 10) mit dem sich ergebenden geringen Konservierungsgrad der N-Glykosylierungspositionen bestätigt. Aus diesem Grund ergab sich kein Argument gegen eine Expression des FH in SF21-Zellen mittels Baculovirussystem. Außerdem waren mit diesem Expressionssystem bereits der Gesamt-FH bzw. verschiedene verkürzte und Deletionsvarianten in Insektenzellen von verschiedenen Arbeitsgruppen hergestellt worden (Sharma und Pangburn, 1994; Kühn und Zipfel, 1995; Pangburn et al., 2000; Hellwage et al., 2002). Die in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführte rekombinante Expression in Säugerzellen allerdings ist in der Literatur nur für eine transiente Transfektion in COS-Zellen beschrieben worden (Estaller et al., 1991). Über die resultierenden Ausbeuten an FH(SCR1-20) und FH(SCR1-7) wurden keine Aussagen gemacht. Anhand von in der entsprechenden Publikation abgebildeten vergleichenden Immunblotsignalen aus Zellkulturüberständen und Serumproben kann jedoch die vorsichtige Abschätzung gewagt werden, dass sich eine Ausbeute von etwa 550 ng/ml ergibt. Diese relativ geringen Ausbeuten an rekombinant exprimiertem Gesamt-FH entsprechen in etwa den in der eigenen Arbeitsgruppe erhaltenen durchschnittlichen Ausbeuten von 600 ng FH(SCR1-7)/ml aus dem Überstand der HEK293-Zellen.

In verschiedenen Publikationen (Gordon et al., 1995; Sharma und Pangburn, 1996; Pangburn et al., 2000) wurde gezeigt, dass die für den FI existierende Kofaktoraktivität des FH nur in den ersten vier SCR enthalten ist. Die restlichen SCR5-20 des FH enthalten zwei weitere C3b-bindende Bereiche (SCR8-15 und SCR19-20), die allerdings keine Kofaktorfunktion aufweisen (FH-Schema siehe Abb. 3 und Abb. 12). Ihre Funktion liegt unter anderem in der Inhibition der Komplementkaskade durch die Bindung von C3b auf körpereigenen Zellen, um diese vor einem Komplementangriff zu schützen (Sharma und Pangburn, 1996; Pangburn et al., 2000). Die Deletion der SCR1-5 erniedrigte die C3b-Bindung 6-fach im Vergleich zum FH(SCR1-20) (Sharma und Pangburn, 1996). FH-Mutanten, bei denen die SCR6-10 bzw. die SCR16-20 deletiert worden waren, zeigten ebenfalls jeweils einen etwa 6-fachen Bindungsverlust im Vergleich zum FH(SCR1-20) (Sharma und Pangburn, 1996). Insgesamt

kann aus den Daten der Gruppe um Pangburn gefolgert werden, dass der FH(SCR1-20) über drei „gleichberechtigte“ C3b-Bindungsstellen verfügt.

In nahezu sämtlichen Literaturangaben wird die Aktivität des FH(SCR1-20) in erster Linie auf den alternativen Komplementaktivierungsweg bezogen. Der FH kann die Bildung der aktiven C3-Konvertase (C3bBb) unter Verdrängung der Komponente Bb verhindern (kompetitive Funktion) (Weiler et al., 1976; Whaley und Ruddy, 1976). Auf der Ebene der C5-Konvertase des alternativen Weges (C3b)₂BbP wirkt der FH über seine sogenannte „Decay Accelerating Activity“, über die in Analogie zur kompetitiven Funktion, d.h. ebenfalls durch die Bindung des FH an C3b, dieser Komplex zum Zerfall geführt wird. Als dritte den klassischen und den alternativen Aktivierungsweg betreffende Funktion wirkt der FH als Kofaktor für die Faktor I-vermittelte Spaltung und damit die Inaktivierung der Komplementkomponente C3b. Die weitere Funktion, dass der FH die Bildung der C5-Konvertase des klassischen Weges (C4b2b3b) durch seine Bindung an das C3b-Molekül ebenfalls inhibieren kann, wird in der Literatur mit sehr wenigen Ausnahmen (Liszewski et al., 1996; Giannakis et al., 2001) nicht erwähnt. Die Relevanz dieser Funktion des FH wird jedoch anhand des in Originalarbeit VII (Demberg et al., 2006) gezeigten inhibitorischen Effektes für den Komplementhämolysetest (CH₅₀-Test) des klassischen Weges deutlich.

Für die nachfolgend dargelegten Kalkulationen wurde für den Faktor I im Rattenserum in Analogie zum humanen Serum eine durchschnittliche Konzentration von 40 µg/ml zu Grunde gelegt. Nach dieser Kalkulation waren initial 40 ng FI im Serumvolumen des miniaturisierten CH₅₀-Tests vorhanden. Daraus ergab sich für eine 50%ige Hemmung des CH₅₀-Wertes eine 67-fache, für die Reduktion auf einen nicht mehr zu drückenden Basiswert eine etwa 260-fache molare Erhöhung des in der Serumprobe vorhandenen FI.

Mit Hilfe des in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelten ELISA wurde die Konzentration des FH im verwendeten Rattenserumpool auf 700 µg/ml bestimmt, d.h. 700 ng FH(SCR1-20) absolut (4,27 pmol) waren im für den CH₅₀-Test verwendeten Serumvolumen vorhanden. Eine 50%ige Hemmung entstand bei einer 2,6-fachen molaren Erhöhung dieses Wertes, eine Reduktion auf den Basiswert durch eine etwa 12-fache Erhöhung des molaren FH(SCR1-20) Gehaltes (Originalarbeit VII, Table 1). Für die rekombinanten Varianten ergaben sich diesbezüglich die ebenfalls in Tabelle 1 der Originalarbeit VII aufgeführten Werte, wobei die Basiswerte der kompletten Inhibition über eine Extrapolation der entsprechenden Inhibitionsgraphen gewonnen wurden. Dies war unumgänglich, weil in den meisten Fällen aufgrund der begrenzten Volumenkapazität der entwickelten Miniaturversion des CH₅₀-Tests der Basiswert nicht komplett erreicht wurde. Für den FH(SCR1-7) ergab sich eine 7,9-fache

molare Zunahme für die 50%ige und eine 37,8-fache molare Zunahme für die maximale Inhibition. Die korrespondierenden Inhibitionswerte für den FH(SCR1-4) zeigten sich in einer 10,6-fachen molaren Erhöhung (50%ige Inhibition) und einer 50,7-fachen molaren Erhöhung (maximale Inhibition).

Gemessen an der Erhöhung der entsprechenden Faktormengen im Serum erwies sich sowohl die Zugabe des FH(SCR1-20) als auch seiner Varianten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) als effektiver als die Zugabe des FI. Die Inhibition durch Zusatz des immunaffinitätschromatographisch gewonnenen FI war aufgrund der erforderlichen Menge dagegen eher ernüchternd. Hierbei handelte es sich um einen unerwarteten Befund, weil aufgrund theoretischer Überlegungen zu Beginn der Inhibitionsassays davon auszugehen war, dass ein in 10-fach geringerer Konzentration vorliegender Komplementinhibitor auch durch eine entsprechend geringere Konzentrationserhöhung bereits einen deutlichen Effekt zeigt. Bezüglich der beschriebenen FH-Funktionen ist zu spekulieren, dass der direkte inhibitorische Einfluss dieses Faktors durch die Bindung des C3b und die nachfolgende Inhibition der C5-Konvertase des klassischen Weges (C4b2b3b) erheblich wichtiger ist als sein Einfluss auf die Inhibition des klassischen Komplementaktivierungsweges als Kofaktor des FI. Diese Spekulation wird durch den gemeinsamen Einsatz beider Faktoren untermauert. Als Nettoeffekt des gemeinsamen Einsatzes beider Faktoren im Hämolysetest konnte der postulierte Synergismus nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen von DiScipio (1992) hatten einen solchen Synergismus zunächst nahegelegt. Der Nutzen, FI und FH in Kombination zur Komplementinhibition zu verwenden, ließ sich theoretisch aus seinen Untersuchungen ableiten, die gezeigt hatten, dass die Affinität von humanem FI für C3b in Gegenwart des FH um das 15-fache gesteigert wird.

Zum Erreichen desselben Inhibitionsmaßes im CH_{50} -Test wurden absolute Mengen beider Faktoren in vergleichbaren Größenordnungen verwendet. Allerdings ist der FH aufgrund seiner im Vergleich zum FI etwa 10-fach höheren Serumkonzentration immunaffinitätschromatographisch mit erheblich geringerem Aufwand aufzureinigen. Die rekombinante Expression des FH(SCR1-4) mittels Baculovirussystem führte darüber hinaus zu vergleichsweise guten Ausbeuten, so dass sich der alleinige Einsatz des FH (in den Varianten SCR1-4 und SCR 1-20) für weiterführende (z.B. in-vivo) Versuche anbietet.

Bereits in der Einleitung (Abb. 3 in 1.3.1) wurde erwähnt, dass der FH(SCR1-20) über drei Bindungsstellen für die Komponente C3b verfügt. Die Studien von Sharma und Pangburn (1996) und Pangburn et al. (2000) legen nahe, dass alle drei Bindungsstellen tatsächlich durch C3b belegt werden. Aus den Inhibitionsdaten der Komplementhämolyseassays zum molaren

Einsatz der FH-Varianten ergeben sich für die 50%ige bzw. maximale Inhibition folgende Werte, wenn die entsprechenden Quotienten gebildet werden (**Tabelle 2**):

Quotient der Komponenten	50%ige Inhibition	maximale Inhibition (Basiswert)
Quotient pmolFH(SCR1-7)/ pmolFH(SCR1-20)	3,2 (35,7/11)	3,3 (170/51,7)
Quotient pmolFH(SCR1-4)/ pmolFH(SCR1-20)	4,3 (48/11)	4,4 (228/51,7)

Eine Mittelwertbildung der vier Quotienten ergibt einen Wert von etwa 3,8 und steht somit für eine mehr als 3-fach höhere molare Aktivität des FH(SCR1-20), der im Vergleich zu den jeweils nur eine Bindungsstelle enthaltenden FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) drei Bindungsstellen für das C3b-Molekül besitzt. Aufgrund der nachgewiesenen mehr als 3-fach höheren Aktivität des FH(SCR1-20) im Vergleich zu den beiden rekombinanten Varianten, legen auch die in dieser Arbeit durchgeführten Hämolyseexperimente nahe, dass der FH(SCR1-20) für die von ihm ausgehende Inhibition des Komplementsystems tatsächlich alle drei C3b-Bindungsstellen verwendet.

4 Zusammenfassung

Die wichtigste Aufgabe der untersuchten Komplementregulatoren Faktor I (FI) und Faktor H (FH) besteht darin, körpereigenes Gewebe vor der Zerstörung durch das potentiell autoaggressive Komplementsystem zu bewahren sowie eine überschießende Aktivierung und den sich daraus ergebenden vollständigen Verbrauch der Komponenten dieses Systems zu verhindern. Zusätzlich soll ein systemischer Schock durch freigesetzte Anaphylatoxine vermieden werden. Das Komplementsystem ist zudem an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt, so dass rekombinant erzeugte bzw. aus Serum isolierte Faktoren I und H neue Zugänge zu einer *in-vitro* bzw. einer *in-vivo* Modulation dieses Systems eröffneten. Das Konzept, beide Faktoren in Kombination zu verwenden, wurde aus Untersuchungen deutlich, die eine 15-fache Affinitätssteigerung des humanen FI für C3b in Gegenwart von FH zeigten.

In den vorliegenden Arbeiten wurde die cDNA beider Faktoren aus der Ratte kloniert und sequenziert. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur Expression beider Faktoren in und außerhalb der Leber durchgeführt. Es zeigte sich, dass beide Faktoren hinsichtlich ihrer Expression und Regulation gravierende Unterschiede aufweisen, wobei der FI in erheblich weniger Ursprungsgeweben/-zellen exprimiert wird. Während Interferon-gamma die FH-Expression heraufregulierte, hatte dieses proinflammatorische Zytokin auf die FI-Expression keinen Einfluss. Diesbezüglich war allein Interleukin-6 aktiv. Interessanter Weise regulierte das potenteste Anaphylatoxin C5a in Kupffer-Zellen der Ratte die FH-Expression direkt herauf. Funktionell aktive Fragmente des FH [FH(SCR1-4) und FH(SCR1-7)] wurden rekombinant generiert und ihre Aktivität immunaffinitätschromatographisch aus Rattenserum isolierten FH (SCR1-20) und FI durch funktionelle *in-vitro* Untersuchungen in einem Komplementhämolysetest gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass die molare Aktivität des über drei C3b-Bindungsstellen verfügenden FH(SCR1-20) etwa 3,8-fach über der Aktivität der jeweils nur eine C3b-Bindungsstelle tragenden FH(SCR1-4) und FH(SCR1-7) – Fragmente lag. Der postulierte funktionelle Synergismus beider Faktoren zeigte sich jedoch nicht.

5 Literaturverzeichnis

Alsensz J, Lambris JD, Schulz TF, Dierich MP (1984) Localization of the complement component C3b –binding site and the cofactor activity for factor I in the 38 kDa tryptic fragment of factor H. *Biochem J* 244, 389-398

Amadei N, Baracho GV, Nudelman V, Bastos W, Florido MP, Isaac L (2001) Inherited complement factor I deficiency associated with systemic lupus erythematosus, higher susceptibility to infection and low levels of factor H. *Scand J Immunol* 53, 615-621

Brooimanns, RA, Hiemstra PS, van der Ark AA, Sim RB, van Es LA, Daha MR (1989) Biosynthesis of complement factor H by human umbilical vein endothelial cells. Regulation by T-cell growth factor and IFN-gamma. *J Immunol* 142, 2024-2030

Catterall CF, Lyons A, Sim RB, Day AJ, Harris TJ (1987) Characterization of primary amino acid sequence of human complement control protein factor I from analysis of cDNA clones. *Biochem J* 242, 849-856

Clas F, Loos M (1981) Antibody-independent binding of the first component of complement (C1) and its subcomponent C1q to the S and R forms of salmonella minesota. *Infect Immun* 31, 1138-1144

Cooper NR, Jensen FC, Welsh RM, Oldstone MBA (1976) Lysis of RNA tumor viruses by human serum: direct antibody-independent triggering of the classical complement pathway. *J Exp Med* 144, 970-984

Daha MR, van Ess LA (1982) Isolation, characterization and mechanism of action of rat β 1H. *J Immunol* 128, 1839-1843

Davis AE, Harrison RA (1982) Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry* 31, 3195-3199

De Ceulaer C, Papazglou S, Whaley K (1980) Increased biosynthesis of complement components by cultured monocytes, synovial fluid macrophages and synovial membrane cells from patients with rheumatoid arthritis. *Immunology* 41, 37-43

Demberg T, Pollok-Kopp B, Gerke D, Götze O, Schlaf G (2002) Rat complement factor H: molecular cloning, sequencing and quantification with a newly established ELISA. *Scand J Immunol* 56, 149-160

Demberg T, Heine I, Götze O, Altermann WW, Seliger B, Schlaf G (2006) Recombinant generation of two fragments of the rat inhibitory factor H [FH(SCR1-7) and FH(SCR1-4)] and their structural and functional characterization in comparison to FH isolated from rat serum. *Histol Histopathol* 21, 93-102

DiScipio RG (1981) The binding of human complement proteins C5, Factor B, β 1H and properdin to the complement fragment C3b on zymosan. *Biochem J* 199, 485-496

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

Dodds AW, Sim RB, Porter RR, Kerr MA (1978) Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregates. *Biochem J* 175, 383-390

Ebenbichler CF, Thielens NM, Vornhagen R, Marschang P, Arlaud GJ, Dierich MP (1991) Human immunodeficiency virus type 1 activates the classical pathway of complement by direct C1 binding through specific sites in the transmembrane glycoprotein gp41. *J Exp Med* 174, 1417-1424

Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, Ezekowitz RA (1996) The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8, 29-35

Estaller C, Koistinen V, Schwaeble W, Dierich MP, Weiss EH (1991) Cloning of the 1.4 kB mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150 kDa molecule. *J Immunol* 146, 3190-3196

Fearon DT, Austen KF (1975) Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* 142, 856-863

Fearon DT, Austen KF (1977) Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 1683-1687

Friese MA, Hellwage J, Jokiranta S, Meri S, Peter HH, Eibel H, Zipfel PF (1999) FHL-1/reconectin and factor H: two human complement regulators which are encoded by the same gene are differently expressed and regulated. *Mol Immunol* 36, 809-818

Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V (1978) Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b inactivator. *J Exp Med* 166, 1221-1228

Giannakis E, Male DA, Ormsby RJ, Mold C, Jokiranta TS, Ranganathan S, Gordon DL (2001) Multiple ligand binding sites on domain seven of human complement factor H. *Int Immunopharmacol* 1, 422-443

Gasque P, Julien N, Ischenko AM, Picot C, Mauger C, Chauzy C, Ripoche J, Fontaine M (1992) Expression of complement components of the alternative pathway by glioma cell lines. *J Immunol* 149, 1381-1387

Golan MD, Burger R, Loos M (1982) Conformational changes in C1q after binding to immune complexes. Detection of neoantigens with monoclonal antibodies. *J Immunol* 129, 445-447

Goldberger G, Arnaout MA, Aden D, Kay R, Ritz M, Colten HR (1984) Biosynthesis and postsynthetic processing of human C3b/C4b inactivator (factor I) in three hepatoma cell lines. *J Biol Chem* 259, 6492-6497

Goldberger G, Bruns GAP, Ritz M, Edge MD, Kwiatkowski DJ (1987) Human complement factor I: Analysis of cDNA-derived primary structure and assignment of its gene to chromosome 4. *J Biol Chem* 262, 10065-10071

Gonzales-Rubio C, Ferreira-Cerdan A, Ponce IM, Arpa J, Fontan G, Lopez-Trascasa M (2001) Complement factor I deficiency associated with recurrent meningitis coinciding with menstruation. *Arch Neurol* 58, 1923-1928

Gordon DL, Kaufman RM, Blackmore TK, Kwong J, Lublin DM (1995) Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J Immunol* 155, 348-356

Heiner-Suner D, Diaz-Guillen MA, de Villena FP, Robledo M, Benitez J, Rodriguez de Cordoba S (1997) A high-resolution map of the regulator of the complement activation gene cluster on 1q32 that integrates new genes and markers. *Immunogenetics* 45, 422-427

Hellwege J, Jokiranta TS, Friese MA, Wolk TU, Kampen E, Zipfel PF, Meri S (2002) Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H. *J Immunol* 169, 6935-6944

Hourcade D, Holers VM, Atkinson JP (1989) The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol* 45, 381-416

Hsiung ML, Barclay AM, Gagnon J, Brandon MR, Porter RR (1982) The C3b inactivator is a serine protease. *Mol Immunol* 19, 1376 (Abstract)

Janatova J, Reid KB, Willis AC (1989) Disulfide bonds are localized within the short consensus repeat units of complement regulatory proteins. C4b-binding protein. *Biochemistry* 28, 4754-4761

Jouvin MH, Kazatchkine MD, Cahour A, Bernard N (1984) Lysine residues, but not carbohydrates, are required for regulatory function of H on the amplification C3 convertase of complement. *J Immunol* 133, 3250-3254

Julen N, Dauchel H, Lemercier C, Sim RB, Fontaine M, Ripoché J (1992) In vitro biosynthesis of complement factor I by human endothelial cells. *Eur J Immunol* 22, 213-217

Katz Y, Strunk RC (1988) Synthesis and regulation of complement protein factor in human skin fibroblasts. *J Immunol* 141, 559-563

Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF (1979) Human alternative complement pathway: membrane associated sialic acid regulates the competition between B and β 1H for cell-bound C3b. *J Immunol* 122, 75-81

Koleva M/Schlaf G, Landmann R, Götze O, Jungermann K, Schieferdecker HL (2002) Induction of anaphylatoxin C5a receptors in rat hepatocytes by lipopolysaccharide in vivo: Mediation by interleukin-6 from Kupffer cells. *Gastroenterology* 122, 697-708

Kopp EB und Medzhitov R (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 11, 13-18

Kristensen T, Tack BF (1986) Murine protein H is comprised of 20 repeating units, 61 amino acids in length. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 3963-3967

- Kühn S, Zipfel PF** (1995) The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins. *Gene* 162, 225-229
- Kuiper J, Bakkeren HF, Biessen EA, van Berkel TJ** (1994) Characterization of the interaction of galactose-exporting particles with rat Kupffer cells. *Biochem J* 299, 285-290
- Kunnath-Muglia LM, Chang GH, Sim RG, Day AJ, Ezekowitz RAB** (1993) Characterization of *Xenopus laevis* complement factor I structure – conservation of modular structure except for an unusual insert not present in human factor I. *Mol Immunol* 30, 1249-1256
- Labarca C, Paigen K** (1980) A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102, 344-352
- Lachmann PJ, Müller-Eberhard HJ** (1968) The demonstration in human serum of “conglutininogen activating factor” and its effect on the third component of complement. *J Immunol* 100, 691-698
- Lachmann PJ, Nicol P** (1973) Reaction mechanism of the alternative pathway of complement fixation. *Lancet* 1, 465-467
- Lambris JD, Dobson NJ, Ross GD** (1980) Release of endogeneous C3b inactivator from lymphocytes in response to triggering membrane receptors for β 1H globulin. *J Exp Med* 152, 1625-1644
- Lappin DF, Guc D, Hill A, McShane T, Whaley K** (1992) Effect of interferon-gamma on complement gene expression in different cell types. *Biochem J* 281, 437-442
- Legoedec J, Gasque P, Jeanne J-F, Fontaine M** (1995) Expression of the alternative pathway by human myoblasts in vitro: biosynthesis of C3, factor B, factor H and factor I. *Eur J Immunol* 25, 3460-3466
- Liszewski M, Farries T, Lublin D, Rooney I, Atkinson J** (1996) Control of the complement system 61, 201-281
- Loos M** (1982) Antibody-independent activation of C1, the first component of complement. *Ann Immunol (Inst. Pasteur)* 133C, 165-179
- Luo W, Vik DP** (1999) Regulation of complement factor H in a human liver cell line by interferon- γ . *Scand J Immunol* 49, 487-494
- McAleer MA, Ripoche J, Day AJ, Sim RB** (1988) Alternative splicing in factor H, a member of the RCA gene family. *Genome* 30, 136 (Abstract)
- Minta JO** (1988) Regulation of complement factor H synthesis in U937 cells by phorbol myristate acetate, lipopolysaccharide and IL-1. *J Immunol* 141, 1630-1635
- Minta JO, Wong MJ, Kozak CA, Kunnath-Muglia LM, Goldberger G** (1996) cDNA cloning, sequencing and chromosomal assignment of the gene for the mouse complement factor I (C3b/C4b inactivator), identification of species specific divergent segment in factor I. *Mol Immunol* 33, 101-112

Minta JO, Fung M, Turner S, Eren R, Zemach I, Ritz M, Goldberger G (1998) Cloning and characterization of the promoter for the human complement factor I (C3b/C4b inactivator). *Gene* 208, 17-24

Müller-Eberhard HJ (1986) The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol* 4, 503-528

Munoz-Canoves P, Tack BF, Vik DP (1989) Analysis of complement factor H mRNA expression: dexamethasone and IFN- γ increase in the level of H in L cells. *Biochemistry* 28, 9891-9897

Nicol AE, Lachmann PJ (1973) The alternative pathway of complement activation. The role of C3 and its inactivator (KAF). *Immunology* 24, 259-275

Ollert MW, Kadlec JV, David K, Petrella EC, Bredehorst R, Vogel CW (1994) Antibody-mediated complement activation of nucleated cells. A quantitative analysis of the individual reaction steps. *J Immunol* 153, 2213-2221

Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ (1984) The alternative pathway of complement. *Semin Immunopathol* 7, 163-192

Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization and demonstration of an absolute requirement for the serum protein β 1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med* 146, 257-270

Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ (1981) Formation of the initial C3-convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* 154, 856-867

Pangburn MK, Pangburn KLW, Koistinen V, Meri S, Sharma AK (2000) Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: Interaction among factor H, C3b, and target in the alternative pathway of human complement. *J Immunol* 164, 4742-4751

Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Ross OA, Todd EW, Wardlaw EW (1954) The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* 120, 279-285

Ponce-Castro IM, Gonzales-Rubio C, Delgado-Cervino EM, Abarrategui-Garrido C, Fontan G, Sanchez-Corral P, Lopez-Trascasa M (2008) Molecular characterization of complement factor I deficiency in two Spanish families. *Mol Immunol* 45, 2764-2771

Rasmussen JM (1991) Inherited deficiencies of complement proteins with special reference to congenital deficiency of the regulatory protein factor I. *APMIS Suppl* 22, 1-48

Rasmussen JM, Teisner B, Jepsen HH, Svehag SE, Knudsen F, Kirstein H, Buhl M (1988) Three cases of factor I deficiency: the effect of treatment with plasma. *Clin Exp Immunol* 74, 131-136

Ripoche J, Day AJ, Harris TJR, Sim RB (1988a) The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem J* 249, 593-602

Ripoche J, Mitchell JA, Erdei A, Madin C, Moffat B, Mokoena T, Gordon S, Sim RB (1988b) Interferon- γ induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cell in culture. *J Exp Med* 168, 1917-1922

Ross SC, Densen P (1984) Complement deficiency states and infection: epidemiology, pathogenesis and consequences of neisserial and other infections in an immune deficiency. *Medicine* 63, 243-273

Rothermel E, Rolf O, Götze O, Zwirner J (1997a) Nucleotide and corrected amino acid sequence of the functional recombinant rat anaphylatoxin C5a. *Biochim Biophys Acta* 1351, 9-12

Rothermel E, Zwirner J, Vogt T, Rabini S, Götze O (1997b) Molecular cloning and expression of the functional rat C5a receptor. *Mol Immunol* 34, 877-886

Rothermel E, Götze O, Zahn S, Schlaf G (2000) Analysis of the tissue distribution of the rat C5a receptor and inhibition of C5a-mediated effects through the use of two monoclonal antibodies. *Scand J Immunol* 52, 401-410

Schieferdecker HL, Schlaf G, Koleva M, Götze O, Jungermann K (2000) Induction of functional C5a receptors on hepatocytes by in vivo treatment of rats with IL-6. *J Immunol* 164, 5448-5453

Schlaf G, Schieferdecker HL, Rothermel E, Jungermann K, Götze O (1999a) Differential expression of the C5a receptor on the main cell types of rat liver as demonstrated with a novel monoclonal antibody and by C5a anaphylatoxin-induced Ca^{2+} release. *Lab Invest* 79, 1287-1297

Schlaf G, Rothermel E, Oppermann M, Schieferdecker HL, Jungermann K, Götze O (1999b) Rat complement factor I: Molecular cloning, sequencing and expression in tissues and isolated cells. *Immunology* 98, 464-474

Schlaf G, Demberg T, Koleva M, Jungermann K, Götze O (2001a) Complement factor I is upregulated in rat hepatocytes by interleukin-6 but not by interferon- γ , interleukin-1 β or tumor necrosis factor- α . *Biol Chem* 382, 1089-1094

Schlaf G, Demberg T, Beisel N, Schieferdecker HL, Götze O (2001b) Expression and regulation of complement factors H and I in the rat: some critical notes. *Mol Immunol* 38, 231-239

Schlaf G, Beisel N, Pollok-Kopp B, Schieferdecker HL, Demberg T, Götze O (2002) Constitutive expression and regulation of rat complement factor H in primary cultures of hepatocytes, Kupffer cells, and two hepatoma cell lines. *Lab Invest* 183, 183-192

Schlaf G, Schmitz M, Rothermel E, Jungermann K, Schieferdecker HL, Götze O (2003) Expression and induction of anaphylatoxin C5a receptors in the rat liver. *Histol Histopathol* 18, 299-308

Schlaf G/Nitzki F, Heine I, Hardeland R, Schieferdecker HL, Götze O (2004) C5a anaphylatoxin as a product of complement activation up-regulates the complement inhibitory factor H in rat Kupffer cells. *Eur J Immunol* 34, 3257-3266

Schwaeble W, Zwirner J, Schulz TF, Linke RP, Dierich MP, Weiss EH (1987) Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver. *Eur J Immunol* 17, 1485-1489

Schwaeble W, Schwaiger H, Brooimanns RA, Barbieri A, Most J, Hirsch-Kauffmann M, Tiefenthaler M, Lappin DF, Daha MR, Whaley K (1991) Human complement factor H. Tissue specificity in the expression of three different mRNA species. *Eur J Biochem* 198, 399-404

Sharma AK, Pangburn MK (1994) Biological active recombinant human complement factor H: synthesis and secretion by the baculovirus system. *Gene* 143, 301-302

Sharma AK, Pangburn MK (1996) Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10996-11001

Sim RB, DiScipio RG (1982) Purification and structural studies on the complement system control protein β 1H (Factor H). *Biochem J* 205, 285-293

Sim RB, Day AJ, Moffat BE, Fontaine M (1993) Complement factor I and cofactors in control of complement system convertase enzymes. *Meth Enzymology* 223, 13-35

Skerka C, Timmann C, Horstmann RD, Zipfel PF (1992) Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H. *J Immunol* 148, 3313-3318

Solal-Celigny P, Laviolette J, Hebert J, Atkins PC, Sirois M, Brun G, Lehner-Netsch G, Delage JM (1982) C3b inactivator deficiency with immune complex manifestations. *Clin Exp Immunol* 47, 197-205

Strang CJ, Siegel RC, Phillips ML, Poon PH, Schumaker VN (1982) Ultrastructure of the first component of complement: Electron microscopy of the crosslinked complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 586-590

Tamura N, Nelson RA (1967) Three naturally occurring inhibitors of components of complement in guinea pig and rabbit serum. *J Immunol* 99, 582-589

Timar KT, Junikkala S, Dallos A, Jarva H, Bhuiyan ZA, Meri S, Bos JD, Ashgar SS (2007) Human keratinocytes produce the complement inhibitor factor I: Synthesis is regulated by interferon- γ . *Mol Immunol* 44, 2943-2949

Ueno S (1938) Studien über die Komponenten des Komplements. Band I und II

Ullman CG, Chamberlain D, Ansari A, Emery VC, Haris PE, Sim RB, Perkins SJ (1988) Human complement factor I: its expression by insect cells and its biochemical and structural characterization. *Mol Immunol* 35, 503-512

van den Dobbelsteen MEA, Verhasselt V, Kaashoek J, Timmermann JJ, Schroeijers WE, Verweig CL, van der Woude FJ, van Es LA, Daha MR (1994) Regulation of C3 and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma. *Clin Exp Immunol* 95, 173-180

Veerhuis R, van Es LA, Daha MR (1985) In vivo modulation of rat complement activities by infusion of anti-H antibodies. *Immunobiology* 170, 133-145

Vetvicka V, Reed W, Hoover ML, Ross GD (1993) Complement factors H and I synthesized by B cell lines function to generate a growth factor activity from C3. *J Immunol* 150, 4052-4060

Vik DP (1996) Regulation of expression of the complement factor H gene in a murine liver cell line by interferon-gamma. *Scand J Immunol* 44, 215-222

Vogel H, Halme J, Kirschfink M (2000) Expression of soluble and membrane-bound complement regulatory proteins by human hepatocytes. *Immunopharmacology* 49, 63 (Abstract)

Vyse TJ, Späth PJ, Davis KA, Morley BJ, Phillippe P, Athanassiou P, Giles CM, Walport MJ (1994) Hereditary complement factor I deficiency. *Quart J Med* 87, 385-402

Vyse TJ, Bartok I, Theodoridis EL, Davis KA, Walport MJ, Morley BJ (1996) The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J Clin Invest* 97, 925-933

Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT (1976) Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein β 1H. *Proc Natl Acad Sci USA* 73, 3268-3272

Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh Jr. HC, Carson GR, Concino MF, Boyle MP, Roux KH, Weisfeld ML, Fearon DT (1990) Soluble complement receptor type 1: In vivo inhibition of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 249, 146-151

Whaley K (1980) Biosynthesis of the complement components and regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* 151, 501-516

Whaley K, Ruddy S (1976) Modulation of the alternative complement pathway by beta1H globulin. *J Exp Med* 144, 1147-1163

Whaley K, Widener H, Ruddy S (1978) In: Clinical aspects of the complement system. Stuttgart: Georg-Thieme Verlag, 99-112

Williams SA und Vik DP (1997) Characterization of the 5' flanking region of the human complement factor H gene. *Scand J Immunol* 45, 7-15

Wong MJ, Goldberger G, Isenmann DE, Minta JO (1995) Processing of human factor I in COS-1 cells co-transfected with factor I and paired basic amino acid cleaving enzyme (PACE) cDNA. *Mol Immunol* 32, 379-387

Wright SD (2000) Guest lecture. Innate Immunity and inflammatory disease. XVIIIth International Complement Workshop, July 2000, Salt Lake City (USA)

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

Zipfel PF, Skerka C (1999) FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today* 20, 135-140

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Gerald Schlaf

Thesen

1. Die Aufgaben der Komplement-inhibitorischen Faktoren H (FH) und I (FI) bestehen darin, das eigene Gewebe vor der Zerstörung durch das potentiell autoaggressive Komplementsystem insbesondere des alternativen Aktivierungsweges zu bewahren. Weitere Aufgaben liegen darin, die Aktivierung des Komplementsystems so zu regulieren, dass es nicht zu einer überschießenden Aktivierung und somit zu einem vollständigen Verbrauch der Komponenten dieses Systems kommt. Zusätzlich wird durch die Inhibitoren die Entstehung eines systemischen Schocks als Folge einer überschießenden Produktion von Komplementspaltprodukten (Anaphylatoxinen) verhindert.

2. Die Nukleotidsequenz des vorher nicht identifizierten Faktor I der Ratte wurde unter der Zugangsnummer Y18965 bei der EMBL-Genbank eingereicht. Der kodierende Bereich der FI-Nukleotidsequenz ergab eine Übereinstimmung von 78% mit der humanen und von 87% mit der murinen Sequenz. Das Arrangement der abgeleiteten AS-Sequenz über das GCG-PILEUP Programm ergab eine Übereinstimmung von 69% mit dem Menschen bzw. 85% mit der Maus. In Übereinstimmung mit den AS-Sequenzen aus Mensch und Maus bestand auch das Ratten-FI Vorläuferprotein aus den Abschnitten 1. Leader-Sequenz, 2. Schwerekette, 3. Verbindungspeptid (Linker) und 4. katalytische Leichtkette. In Analogie zu den Proteinen aus Mensch und Maus ergab sich ein Verzuckerungsanteil von ca. 25% des Molekulargewichtes.

3. Experimente zur Expression des FI in Ratte und Mensch führten zu dem Ergebnis, dass periphere Blutzellen (B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten) sowie Peritonealmakrophagen keinen FI exprimieren. Von den untersuchten Leberzellen Hepatozyten (HC), Kupfferzellen (KC), Hepatische Sternzellen/Itozellen (HSC) und Sinusoidale Endothelzellen (SEC) exprimierten nur die HC FI-spezifische mRNA. Verschiedene Lymphomzelllinien (B- und T-Zelllinien) unterschiedlicher Differenzierungsstadien zeigten ebenfalls keine Expression FI-spezifischer mRNA, Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) hingegen ein deutliches FI-spezifisches Amplifikat.

4. Untersuchungen zur Zytokin-vermittelten Regulation des Ratten-FI ergaben, dass lediglich IL-6, aber nicht IL-1 β , TNF- α oder IFN- γ die FI-Expression in Rattenhepatozyten sowie den Rattenhepatomzelllinien H4IIE und FAO heraufregulieren. Gleiche Ergebnisse ergaben sich für HUVEC. Das zuvor für IFN- γ in HUVEC beschriebene FI-regulatorische Potential konnte

nicht bestätigt werden. IFN- γ zeigte in den untersuchten Zellen und Zelllinien keinen Einfluss auf das Expressionsniveau des FI.

5. Im Vergleich zu dem Komplement-inhibitorischen FH zeigte sich, dass die Expression des FI eingeschränkter ist, d.h. eine erheblich geringere Anzahl von FI-exprimierenden extrahepatischen Zellen identifiziert wurde. Bezüglich der hepatischen Expression war FH-spezifische mRNA zusätzlich zu den HC auch in den KC (mit einem höheren Expressionsniveau), allerdings nicht in den HSC und SEC nachweisbar. Damit zeigte sich auch die hepatische Expression für den FI stärker restringiert.

6. Von den untersuchten proinflammatorischen Zytokinen IL-6, TNF- α , IL-1 β und IFN- γ regulierte nur IFN- γ die FH-Expression in HC und KC herauf. Zusätzlich regulierte Endotoxin (LPS) die FH-Expression in den KC herauf. Dieser Einfluss zeigte sich nicht für HC. In Verbindung mit anderen Publikationen unserer Gruppe liegt der Schluss nahe, dass LPS generell keine direkte Wirkung auf HC der Ratte zeigt, sondern die KC als Folge einer Aktivierung mit LPS Zytokine (z.B. IL-6 und IL-1 β) ausschütten, die die interzelluläre Signalgebung zwischen beiden Zelltypen vermitteln.

7. Unter der Zugangsnummer AJ320522 wurde die cDNA-Sequenz des Ratten-FH in der EMBL-Bank hinterlegt. Auf der Nukleotidebene ergab sich eine Übereinstimmung von 87% mit der murinen und 74% mit der humanen Nukleotidsequenz. Die zuvor unter der Patentnummer WO9823638-A/1 hinterlegte aber nicht publizierte und translatierte Nukleotidsequenz erwies sich in einigen Bereichen als stark diskrepant (u.a. durch fehlerhaft identifizierte Stop-Codons). Das Arrangement mit dem Programm PILEUP ergab auf der Ebene des translatierten FH eine Übereinstimmung von 81,5% (Ratte-Maus) und 63% (Ratte-Mensch). Die-N-Glykosylierungspositionen waren zwischen den Spezies nur in geringem Maß konserviert, so dass ein funktioneller Einfluss des ca. 10% vom Molekulargewicht betragenden Glykosylierungsanteils unwahrscheinlich ist.

8. Zur Quantifizierung des Ratten-FH wurde nach der Generierung von monoklonalen Antikörpern ein Sandwich-ELISA mit folgenden Validierungsparametern etabliert. Detektionslimit: 500 pg/ml; „Within-Day“-Variationskoeffizient: 1,9% für hohe (16 ng/ml) und 4,9% für niedrige (2 ng/ml) Konzentrationen; „Day-to-Day“-Variationskoeffizient: 4,5% für hohe (16 ng/ml) und 11,5% für niedrige (2 ng/ml) Konzentrationen. Auch gegen den

Ratten-FI wurden monoklonale Antikörper generiert. Die monoklonalen Antikörper erlaubten die immunaffinitätschromatographische Aufreinigung beider Proteine in funktionell aktiver Form aus Rattenserum.

9. Die Homöostase des Komplementsystems wird u.a. dadurch aufrecht erhalten, dass proinflammatorische Zytokine als Entzündungsmediatoren ein Überschiessen dieses Systems verhindern, indem sie dessen Inhibitoren heraufregulieren. Diese Funktion erfüllt IL-6 für den FI und IFN- γ für den FH. Zusätzlich reguliert das potenteste der Komplementspaltprodukte, das Anaphylatoxin C5a, die Expression des FH in KC der Ratte direkt herauf. Es ergibt sich der Mechanismus einer negativen Rückkopplung durch den Einfluss einer inflammatorischen Komponente (C5a) auf die Expression einer inhibitorischen (FH).

10. Mit Hilfe selbst generierter monoklonaler AK (mAk) wurden beide Inhibitoren (FI und FH) aus Rattenserum zur Homogenität und funktionell aktiv aufgereinigt. Beide Faktoren wurden einzeln und in Kombination funktionell in einem *in vitro* Komplementhämolysetest (CH₅₀-Test) zur Simulation des Klassischen Komplementaktivierungsweges ausgetestet. Der CH₅₀-Assay zur Simulation des Alternativen Komplementaktivierungsweges (APCH₅₀-Test) konnte mit Rattenserum grundsätzlich nicht etabliert werden, so dass nur die Inhibition des klassischen Aktivierungsweges untersucht wurde.

11. Die initiale Arbeitshypothese, dass der FI als in 10-fach geringerer Serumkonzentration auftretender inhibitorischer Faktor als der FH das Komplementsystem mit geringeren Konzentrationen effektiv inhibiert, ließ sich nicht verifizieren. Ebenso wenig ließ sich die Hypothese verifizieren, dass beide Faktoren, in Kombination eingesetzt, durch funktionelle Synergismen in erheblich verringerten Einzelkonzentrationen eingesetzt werden können. Weil es zudem in Übereinstimmung mit allen bisherigen Versuchen nicht gelang, den FI rekombinant herzustellen und seine immunaffinitätschromatographisch durchgeführte Aufreinigung aus Serum aufgrund seiner geringen Serumkonzentration mühsam war, wurden die weiterführenden systematischen Inhibitionsversuche nur mit dem FH(SCR1-20) und seinen beiden rekombinanten Fragmenten FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) fortgesetzt.

12. Zusätzlich zu dem immunaffinitätschromatographisch aufgereinigten FH(SCR1-20) wurden zwei FH-Fragmente rekombinant und funktionell aktiv exprimiert. Zum einen handelte es sich um den baculoviral in SF21-Zellen hergestellten FH(SCR1-4), zum anderen

um den in HEK293 Zellen generierten FH(SCR1-7). Beide Fragmente zeigten im CH_{50} -Test ihre Komplement-inhibitorische Potenz, wobei sie drei- bis vierfach weniger aktiv waren als der immunaffinitätschromatographisch aufgereinigte FH(SCR1-20). Diese Aktivität korreliert näherungsweise mit der Anzahl der C3b-Bindungsstellen, von denen der FH(SCR1-20) drei und die rekombinant hergestellten Fragmente jeweils nur eine besitzen. Diese vergleichenden Inhibitionsdaten legen nahe, dass der FH(SCR1-20) seine drei vorhandenen C3b-Bindungsstellen tatsächlich „verwendet“.

13. Strukturelle Untersuchungen des FH(SCR1-20) und seiner Fragmente FH(SCR1-7) und FH(SCR1-4) zeigten, dass das aus der Primärstruktur errechnete Molekulargewicht nur dem relativen Molekulargewicht (M_r) im SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen entspricht. Ableitungen des relativen Molekulargewichtes aus der Auftrennung unter nicht reduzierenden Bedingungen ergaben ein um mindestens 20% verringertes M_r . Diese Differenzen sind offensichtlich auf in den einzelnen SCR liegende Disulfidbrücken (jeweils zwischen den Cysteinresten I und III sowie II und IV) zurückzuführen, die dem Protein unter nicht reduzierenden Bedingungen eine kondensiertere Form und damit weniger Widerstand bei der Gelaufrennung verleihen.

Danksagungen

Meinen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle dem ehemaligen Direktor der Abteilung Immunologie, Herrn Prof. Dr. Otto Götze, aussprechen. Herr Prof. Götze hat mich während meiner Zeit in der Abteilung Immunologie nach seinen besten Möglichkeiten durch wertvolle Ratschläge unterstützt und gefördert und damit sehr zum Erfolg der Arbeiten beigetragen, die letztlich zur Fertigstellung dieser Habilitationsschrift geführt haben. Wie kaum ein anderer Abteilungsleiter hat Herr Götze durch seine Kompetenz, Toleranz und Fairness ein fruchtbares und sehr angenehmes Arbeitsklima geschaffen, unter welchem ich die Abteilung Immunologie als berufliches Zuhause erleben durfte.

Herrn Prof. Dr. Jungermann danke ich für seine exzellent ausgeübte Funktion als Sprecher des SFB 402 „Molekulare und Zelluläre Hepatogastroenterologie“ über drei Förderungsperioden. Engagiert und selbstlos hat er sich auch für die Projekte eingesetzt, die nicht aus seinem Institut in den Sonderforschungsbereich eingingen, und damit die Möglichkeit zu fruchtbaren und erfolgreichen Kooperationen unter anderem der Teilprojekte B4 und B5 geschaffen, die sich durch große Fairness und praktizierte Kooperativität auszeichneten. Leider ist Herr Jungermann im Mai 2002 zu früh verstorben, um die vierte und letzte Förderungsperiode „seines“ sehr erfolgreichen SFB noch zu erleben.

Herrn Prof. Dr. Matthias Girndt danke ich herzlich für seine sofortige Bereitschaft, trotz meiner nicht in seiner Klinik liegenden Anstellung das Votum Informativum zu meiner Person in der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther Universität zu übernehmen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Finanzierung meiner SFB Post-Doc Drittmittelstelle über einen Zeitraum von sechs und für die Finanzierung der dieser Schrift zugrunde liegenden Arbeiten über sieben Jahre.

Ein großer Teil der dieser Schrift zugrunde liegenden Ergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Biochemie I erzielt. Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Henrike Schieferdecker als enger Kooperationspartnerin (von 1998 bis 2003) und Antragspartnerin (ab 2004). Ohne sie wäre vieles nicht möglich gewesen.

Meinen ehemaligen Kollegen, Diplomanden und Doktoranden aus der Abteilung Immunologie möchte ich ebenfalls danken, namentlich Nadine Beisel, Matthias Schmitz, Frauke Nitzki, Ines Heine, Gabi Sonntag, Malte Sgodda und Beatrix Pollok-Kopp, insbesondere aber Thorsten Demberg, mit dem mich eine lange Zusammenarbeit – von seiner Diplomarbeit bis zum ersten Post-Doc Jahr – verbindet. Auch aufgrund des Spaßes und der Albernheiten im Labor möchte ich keinen meiner Tage in der Abteilung Immunologie missen.