

**Die Funktion der Komplementproteine FHR-1 und FHR-3
bei der altersabhängigen Makuladegeneration –
ein Antikörper-basierter Ansatz**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nicole Schäfer
aus
Rodewisch

im Jahr
2019

**Die Funktion der Komplementproteine FHR-1 und FHR-3
bei der altersabhängigen Makuladegeneration –
ein Antikörper-basierter Ansatz**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nicole Schäfer
aus
Rodewisch

im Jahr
2019

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Herr

Betreuer: Prof. Dr. Herbert Jäggle

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2021

Teile dieser Arbeit wurden bereits in einem Open-Access peer-reviewed Journal veröffentlicht oder sind unter Begutachtung:

Schäfer N. *et al.* Complement Factor H-Related 3 induces inflammation and complosome activation in human RPE cells. *J. Neuroinflammation*. (2021, under Review)

Schäfer N *et al.* Properdin Modulates Complement Component Production in Stressed Human Primary Retinal Pigment Epithelium Cells. *Antioxidants*. 9(9):793. (2020).

Schäfer, N. *et al.* Complement Regulator FHR-3 Is Elevated either Locally or Systemically in a Selection of Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **7**, 1–16 (2016).

*"So remember to look up at the stars and not down at your feet!
Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist,
be curious! IT MATTERS THAT YOU DON'T JUST GIVE UP!"*

– Stephen Hawking

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das Komplementsystem..... | 1 |
| 1.2 | Faktor H-verwandte Proteine (FHRs)..... | 3 |
| 1.2.1 | FHR-1 und FHR-3 | 5 |
| 1.3 | Altersabhängige Makuladegeneration (AMD) | 6 |
| 1.3.1 | Systemische versus lokale Komplementaktivierung bei AMD | 7 |
| 1.4 | Das retinale Pigmentepithel (RPE)..... | 9 |
| 1.5 | Antikörper als Therapie komplement-assoziiertes Erkrankungen | 11 |
| 2 | Ziel der Arbeit | 13 |
| 3 | Material | 14 |
| 3.1 | Organismen und Zellen..... | 14 |
| 3.1.1 | Bakterienstämme | 14 |
| 3.1.2 | Eukaryotische Zellen..... | 14 |
| 3.1.3 | Mausstämme..... | 14 |
| 3.2 | Patientenproben | 15 |
| 3.3 | Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen..... | 15 |
| 3.4 | Oligonukleotide für qRT-PCR | 17 |
| 3.5 | Plasmide..... | 19 |
| 3.6 | Proteine | 21 |
| 3.7 | Antikörper | 22 |
| 3.8 | Enzyme und Substrate | 26 |
| 3.9 | Molekularmassen-Standards..... | 27 |
| 3.10 | Kit-Systeme..... | 27 |
| 3.11 | Chemikalien | 27 |
| 3.12 | Puffer und Lösungen | 31 |
| 3.13 | Medien | 33 |
| 3.13.1 | Bakterien-Nährmedien | 33 |
| 3.13.2 | Zellkultur-Medien für eukaryotische Zellen | 34 |
| 3.14 | Geräte | 35 |
| 3.15 | Software | 37 |
| 4 | Methoden | 39 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.1 | Molekularbiologie | 39 |
| 4.1.1 | Arbeiten mit <i>E. coli</i> -Bakterien | 39 |
| 4.1.2 | Klonierung variabler Antikörpersequenzen in spezifische Plasmide | 39 |
| 4.1.2.1 | Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA..... | 40 |
| 4.1.2.2 | Restriktion mittels Enzymen | 40 |
| 4.1.2.3 | <i>Tailing</i> | 41 |
| 4.1.2.4 | Ligation | 41 |
| 4.1.2.5 | Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i> - Bakterien | 42 |
| 4.1.2.6 | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 42 |
| 4.1.2.7 | Agarosegel-Elektrophorese | 43 |
| 4.1.2.8 | Extraktion und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen..... | 44 |
| 4.1.2.9 | Sequenzierung von DNA | 44 |
| 4.2 | Zellkultur | 44 |
| 4.2.1 | Kultivierung eukaryotischer Zellen | 44 |
| 4.2.1.1 | Suspensionszellen..... | 44 |
| 4.2.1.2 | Adhärente Zellen | 45 |
| 4.2.2 | Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit Plasmid-DNA | 45 |
| 4.3 | RNA-Analyse | 46 |
| 4.3.1 | cDNA Synthese..... | 46 |
| 4.3.2 | Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) | 46 |
| 4.4 | Proteinbiochemie/Proteomics | 46 |
| 4.4.1 | Herstellung von Proteinlysaten..... | 46 |
| 4.4.2 | Aufreinigung von Proteinen mittels <i>Strep</i> -Tactin Sepharose Säulen | 46 |
| 4.4.3 | Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE) | 47 |
| 4.4.4 | Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen | 47 |
| 4.4.5 | Silber-Färbung von Polyacrylamidgelen..... | 48 |
| 4.4.6 | Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)..... | 48 |
| 4.5 | Immunologie | 49 |
| 4.5.1 | Western Blot Analyse | 49 |
| 4.5.2 | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... | 49 |
| 4.5.2.1 | Indirekter ELISA zum Nachweis der Antikörperbindung | 49 |
| 4.5.2.2 | ELISA zur C3b und oxidativer Stressmarker Interaktion..... | 50 |
| 4.5.2.3 | Sandwich-ELISA zur Detektion von FHR-3 in humanem Serum | 50 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.5.3 | Durchflusszytometrie (FACS)..... | 50 |
| 4.5.4 | Immunhistologie | 51 |
| 4.5.5 | Antikörper-Isotypbestimmung..... | 52 |
| 4.5.6 | Biotinylierung von Antikörpern..... | 52 |
| 4.5.7 | Aufreinigung von Antikörpern mittels HiTrap Protein G HP Säulen | 52 |
| 4.5.8 | Immunpräzipitation | 53 |
| 4.5.9 | Hybridomtechnik | 53 |
| 4.5.9.1 | Immunisierung | 53 |
| 4.5.9.2 | Zellfusion | 54 |
| 4.5.9.3 | Screening von Antikörper-produzierenden Hybridomaklonen..... | 55 |
| 4.6 | Statistische Auswertung..... | 55 |
| 5 | Ergebnisse..... | 56 |
| 5.1 | Charakterisierung des anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2 und FHR-3..... | 56 |
| 5.1.1 | RETC-2 detektiert spezifisch humanes FHR-3..... | 56 |
| 5.1.2 | RETC-2 detektiert und quantifiziert FHR-3 in verschiedenen humanen Seren | 58 |
| 5.1.3 | RETC-2 detektiert FHR-3 in aktivierten Mikroglia/Makrophagen in einer alten, degenerierten humanen Retina | 60 |
| 5.1.4 | RETC-2 reduziert die molekulare Interaktion von FHR-3 mit C3b und oxidativen Stressepitopen | 62 |
| 5.2 | Generierung spezifischer Antikörper gegen humanes FHR-1..... | 66 |
| 5.2.1 | Charakterisierung der monoklonalen anti-FHR-1 Antikörper..... | 68 |
| 5.3 | Chimärisierung des anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2..... | 70 |
| 5.4 | Effekt von FHR-3 auf humane RPE Zellen..... | 73 |
| 5.4.1 | Optimierung der Kultivierung der ARPE-19 Zelllinie..... | 73 |
| 5.4.2 | Immunmodulatorischer Einfluss von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen | 77 |
| 5.4.3 | Aufnahme von FHR-3 durch alternde ARPE-19 Zellen | 78 |
| 5.4.3.1 | Regulation von EMT-Markern nach FHR-3 Behandlung..... | 79 |
| 5.4.3.2 | FHR-3 Regulation von C3 und CFB..... | 80 |
| 5.4.3.3 | FHR-3 Regulation von C3aR und CD11b | 88 |
| 5.4.3.4 | FHR-3 Regulation von Inflammationsmarker NLRP3, IL-1 β , IL-6, FoxP3 | 94 |
| 5.4.3.5 | FHR-3 Regulation von Toll-like Rezeptoren und Proteasom-Markern | 98 |
| 5.4.3.6 | Grafische Zusammenfassung des Effekts von FHR-3 auf ARPE-19 | 100 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.4.4 | RETC-2-ximab mildert den Effekt von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen | 101 |
| 5.4.5 | Wirkung von FHR-3 auf pRPE und iPSC-RPE Zellen | 102 |
| 6 | Diskussion | 105 |
| 6.1 | Zellkulturmodelle für <i>in vitro</i> Studien des RPE..... | 105 |
| 6.2 | Epithelial-mesenchymale Transition von ARPE-19 Zellen..... | 107 |
| 6.3 | Interaktion von FHR-3 mit Lipidperoxidationsprodukten | 108 |
| 6.4 | Immunmodulatorischer Einfluss von FHR-3 auf RPE Zellen..... | 109 |
| 6.5 | Instabilität von Hybridomaklonen | 114 |
| | Zusammenfassung | 117 |
| | Summary | 120 |
| | Anhang | 123 |
| | Literaturverzeichnis..... | 133 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 145 |
| | Abbildungsverzeichnis | 149 |
| | Tabellenverzeichnis..... | 153 |
| | Danksagung | I |
| | Selbständigkeitserklärung..... | II |

1 Einleitung

1.1 Das Komplementsystem

Der Begriff „Komplement“ wurde 1890 von Paul Ehrlich geprägt und wurde zunächst als hitzestabile Komponente von Blutplasma mit bakteriziden Eigenschaften und der Fähigkeit, Erythrozyten verschiedener Spezies zu lysieren, beschrieben ¹. Nur knapp 20 Jahre später fand man heraus, dass es sich um ein Multikomponenten-System handelt, dessen einzelne Bestandteile ab den 1960er Jahren isoliert und charakterisiert wurden.

Heute weiß man, dass das Komplementsystem Teil der humoralen Immunantwort ist, und eine essenzielle Brücke zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem bildet. Es agiert als eine erste Barriere gegen eingedrungene Viren, Bakterien und Pilze. Das komplexe Zusammenspiel aus über 40 Proteinen wird kaskadenartig, gezielt über inhibitorische und aktivierende Komplementfaktoren gesteuert, überwiegend in der Leber produziert und systemisch ins Blut sezerniert. Das Komplementsystem wirkt im Plasma, in Geweben oder innerhalb von Zellen, was erst kürzlich als „Complosome“ beschrieben wurde ^{2,3}. Zu den Hauptaufgaben gehören die Bekämpfung und Beseitigung von Pathogenen, geschädigten Zellen und körperfremden Stoffen. Dies geschieht entweder direkt über komplement-abhängige Zellyse durch den Membran-attackierenden Komplex (MAC), durch Opsonisierung oder durch Freisetzung von Anaphylatoxinen, um weitere Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen anzulocken ³⁻⁵.

Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei Signalwege passieren: (i) den Klassischen Weg über Antikörperbindung (grün, Abbildung 1), (ii) den Lektin Weg über Mannose-bindende-Lektine (gelb, Abbildung 1), oder (iii) den Alternativen Signalweg über spontane Hydrolyse des Hauptkomplementkomponenten C3, der permanent aktiv ist und die Umgebung auf komplement-aktivierte Oberflächen untersucht. Die drei Signalwege werden auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen aktiviert, die während der normalen zellulären Homöostase ständig im Körper erzeugt werden. Alle drei Wege führen über C3-Konvertasen und C5-Konvertasen zur Bildung des Membran-attackierenden-Komplexes (Abbildung 1) ³⁻⁵.

Der permanent aktive Alternative Signalweg wird durch spontane, oder Oberflächen-abhängige Hydrolyse von Komplementkomponent 3 (C3) zu C3(H₂O) aktiviert. Nach neuesten Erkenntnissen nimmt man an, dass C3(H₂O) insbesondere für Zell-Zell

Interaktionen und das intrazelluläre Komplementsystem eine wesentliche Rolle spielt⁶. C3(H₂O) bindet Komplementfaktor B (CFB) und wird von Komplementfaktor D (CFD) in seine aktiven Spaltprodukte Bb und Ba gespalten, um die lösliche C3-Konvertase (C3(H₂O)Bb) zu bilden. Diese spaltet wiederum C3 in C3a (Anaphylatoxin) und C3b (Opsonin). C3b lagert sich an pathogene Oberflächen an (Opsonisierung) und bindet CFB, der wieder von CFD gespalten wird. Bb lagert sich an C3b an und bildet die instabile Oberflächen-gebundene C3-Konvertase (C3bBb) des alternativen Signalweges. Diese wird erst durch den einzigen Positivregulator Properdin stabilisiert (C3bBbProperdin). Komplementfaktor H (FH), der Hauptnegativregulator des alternativen Weges, inaktiviert zusammen mit Komplementfaktor I (FI) die C3-Konvertase (negative Rückkopplung). Die positive Rückkopplung erfolgt durch die stabilisierte C3-Konvertase, die weitere C3-Moleküle spalten kann. Ein weiteres C3b-Molekül bindet die stabilisierte C3-Konvertase und formt die C5-Konvertase (C3bBbProperdinC3b) (blau, Abbildung 1). Diese Konvertase spaltet weitere C5-Proteine, in das Opsonin C5b und das Anaphylatoxin C5a, initiiert somit den terminalen Signalweg, und bildet durch Anlagerung weiterer Komplementproteine den Membran-attackierenden-Komplex (MAC) (orange, Abbildung 1). Sowohl die Anaphylatoxine C3a und C5a als auch die Opsonine binden an spezifische Komplementrezeptoren, um spezifische Effektorfunktionen auszulösen. Die Anaphylatoxine interagieren mit den Komplementrezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2, wohingegen C3-Opsonine (C3b, iC3b) mehrere verschiedene Rezeptoren binden, u. a. Komplementrezeptoren (CR3, CR1) und *cluster of differentiation* (CD46, CD55)^{3,4}.

In der letzten Dekade wurden dem Komplementsystem, neben den Serum-abgeleiteten Proteinen, immer mehr nicht-kanonische Funktionen zugeordnet⁷. Der Einfluss auf den Zell-Metabolismus^{8,9} und die Zellentwicklung und Zellregeneration¹⁰. Neueste Studien haben die Betrachtungsweise des Komplementsystems revolutionär geändert und nun den Fokus auf das lokale/zell-spezifische, intrazelluläre „Complosome“ gerichtet. Intrazelluläre C3 Expression und Aktivierung wurde bereits für verschiedene Zelltypen gezeigt, u. a. T-Zellen, Betazellen und RPE Zellen^{2,11–14}. Diese neuen Kenntnisse werden v. a. für Augenerkrankungen durch die Blut-Retina-Schranke eine bedeutende Rolle, im Hinblick auf lokale Therapieansätze, spielen.

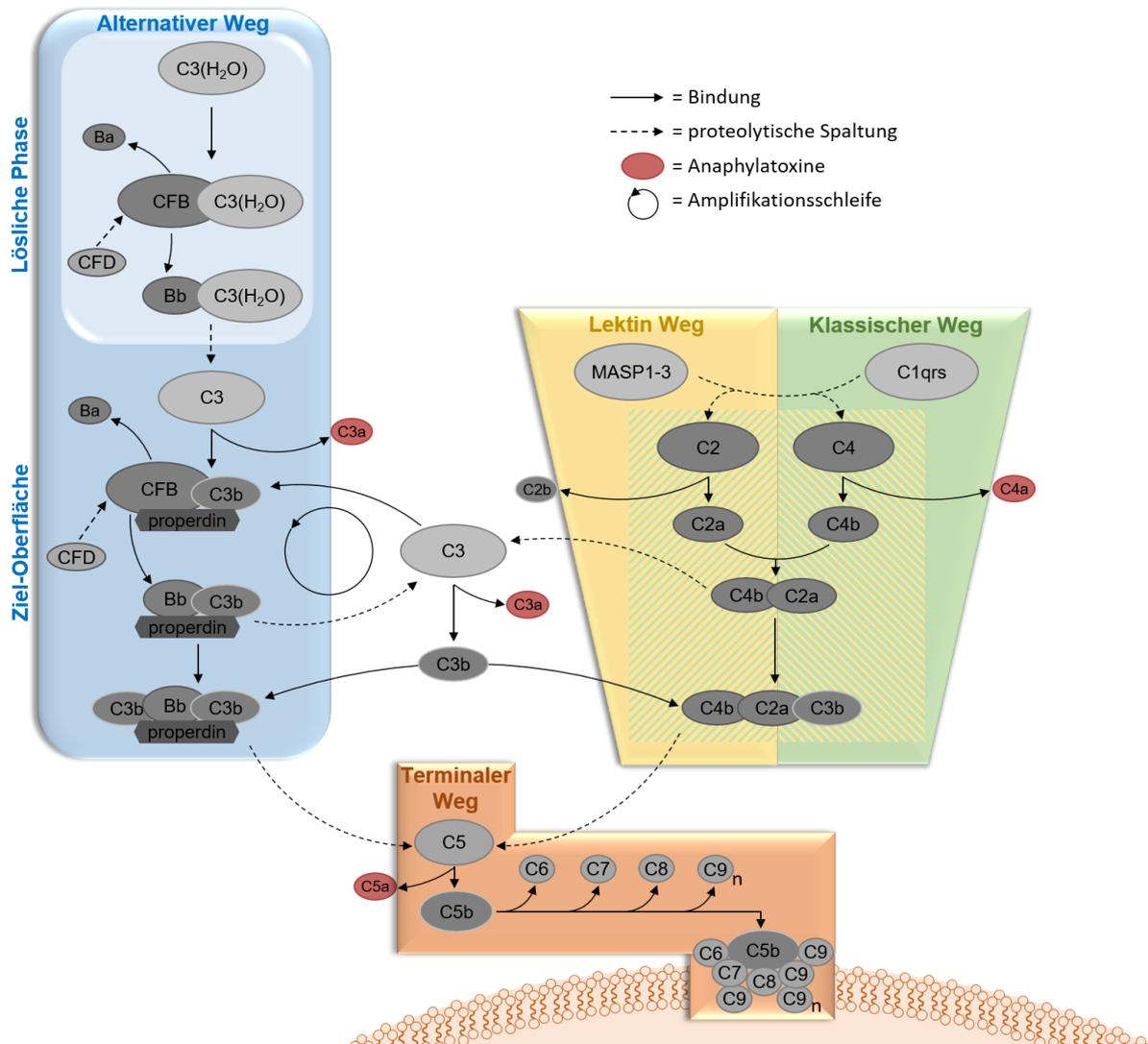


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aktivierungswege des Komplementsystems.

Das Komplementsystem kann über drei verschiedene Signalwege aktiviert werden: den alternativen Signalweg (blau), den Lektin-Weg (gelb) oder den klassischen Signalweg (grün). Alle drei Wege führen zur Bildung von C3-Konvertasen, die C3 in das Anaphylatoxin C3a (rot) und das Opsonin C3b spalten. Die Anlagerung eines weiteren C3b Moleküls an die C3-Konvertasen führt zur Bildung der C5-Konvertasen, die wiederum C5 in das Anaphylatoxin C5a (rot) und C5b spalten. C5b initiiert den terminalen Signalweg (orange), der zur Bildung des Membran-attackierenden Komplexes (MAC) führt, welcher durch Porenbildung die Lyse von Zellen bewirken kann. (Abbildung modifiziert aus Pouw und Kuijpers) ¹⁵.

1.2 Faktor H-verwandte Proteine (FHRs)

Die Faktor H-verwandten Proteine (FHRs) wurden vor 28 Jahren erstmals beschrieben und sind bis heute im Fokus der Forschung ^{16–20}. Sie bestehen aus einer Gruppe hochkonservierter Proteine. Neben dem Hauptnegativregulator des Komplementsystems FH gehören die Spleißvariante FHL-1 und FHR 1 – 5 zur Proteinfamilie. Sie bestehen aus konservierten Domänen, *short consensus repeat* (SCR) genannt, die z. T. eine hohe Aminosäuresequenzidentität zueinander und zu FH aufweisen (Abbildung 2).

Alle Proteine sind auf separaten Genen innerhalb des *regulation of complement activation* (RCA) – Gen-Clusters auf Chromosom 1q32 codiert.

Die Proteine werden hauptsächlich in der Leber synthetisiert, jedoch wurde gezeigt, dass verschiedene Zelltypen, u. a. Endothelzellen, Fibroblasten, und RPE Zellen, FH und/oder FHL-1 exprimieren^{12,14,21,22}. FH ist ein Inhibitor des alternativen Komplementweges und besitzt zwei grundlegende Aufgaben: (i) die N-terminale Komplementregulation durch Spaltung der C3-Konvertase über Cofaktor-Aktivität mit FI, und (ii) die C-terminale Oberflächenerkennung von Heparanstrukturen, C3b und oxidierten Phospholipiden^{23–25}. Die genaue Funktion der FHR-Proteine ist noch nicht eindeutig charakterisiert und teilweise umstritten, jedoch wird ihnen eine komplement-aktivierende Wirkung zugesprochen^{26–29}.

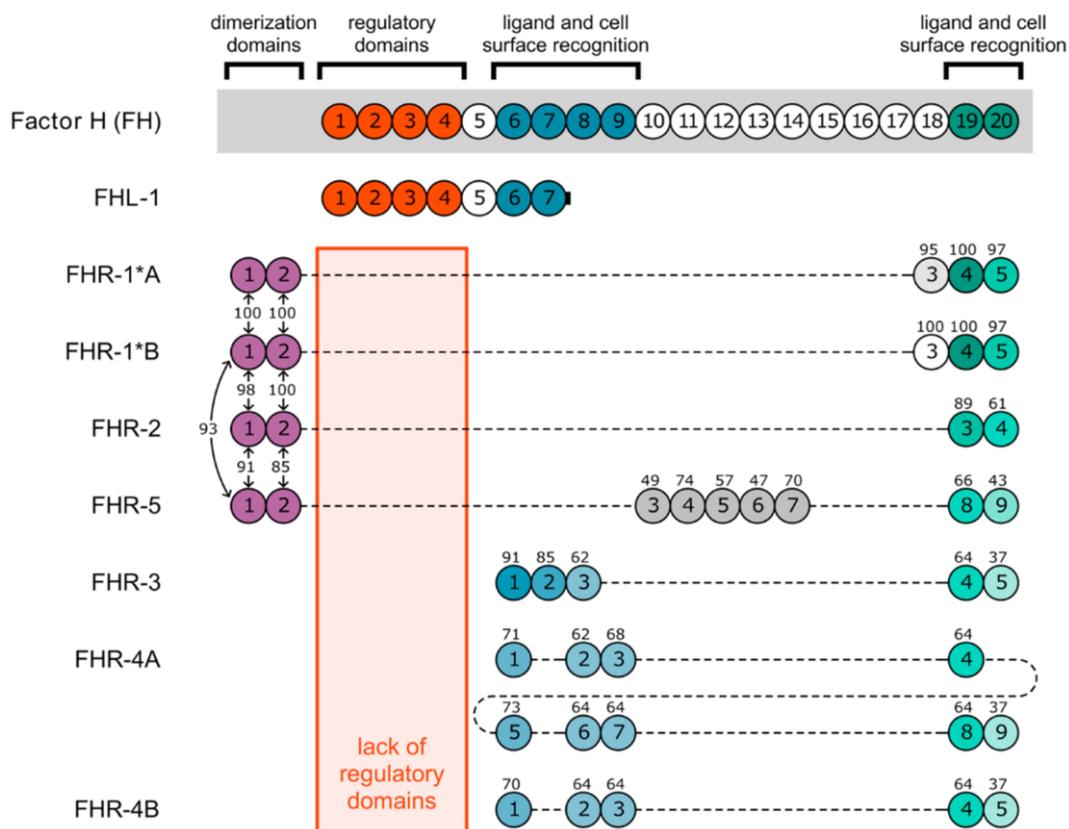


Abbildung 2: Schema der humanen FH-Proteinfamilie.

FH und die FH-verwandten Proteine sind aus Domänen, *short consensus repeats* (SCR), aufgebaut. FH besteht aus 20 SCRs, wobei SCR 1 – 4 die komplement-regulatorischen Domänen sind. Die Hauptbindungsstellen für C3-Aktivierungsprodukte, Heparin und anderer Liganden liegen in den SCR 6 – 9 und SCR 19 – 20. FHL-1 wird durch alternatives Spleißen aus dem *CFH*-Gen generiert und besteht aus sieben SCRs, die zu 100 % identisch mit FH sind. Den FHR-Proteinen fehlen die komplement-regulatorischen Domänen 1 – 4 aus FH, weisen zu den anderen FH SCR-Domänen jedoch unterschiedlich hohe Sequenzidentitäten auf. FHR-1, FHR-2 und FHR-5 beinhalten spezifische N-terminale Domänen, die die Homo- und Hetero-Oligomerisierung dieser Proteine vermitteln. SCR Domänen sind durch Kreise dargestellt, und die wichtigsten Bindungs- und Aktivierungsstellen sind farbig markiert. Die SCRs sind vertikal ausgerichtet, basierend auf der höchsten Sequenzähnlichkeit zueinander. Zahlen geben den

Prozentsatz der Aminosäuresequenzidentität zu den korrespondierenden FH-Domänen oder, im Falle der Dimerisierungs-Domänen, zueinander an. (Abbildung aus Cserhalmi et al.)³⁰.

1.2.1 FHR-1 und FHR-3

FHR-1 besteht aus fünf SCR-Domänen (Abbildung 2) und zirkuliert in zwei glykosylierten Formen im humanen Plasma, FHR-1 α (37 kDa) und FHR-1 β (43 kDa)^{31,32}. Es wurden zwei FHR-1 Varianten beschrieben, die sich in nur drei Aminosäuren in der SCR 3 unterscheiden: (i) die saure Form FHR-1*A, die mit der Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) assoziiert wird³³, und (ii) die basische Form FHR-1*B, die mit der Entstehung des atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS) assoziiert wird³⁴. Aufgrund der hohen Sequenzidentität der SCR 4 – 5 von FHR-1 mit SCR 19 – 20 von FH ist FHR-1 in der Lage verschiedene Liganden von FH zu binden, u. a. C3b und Heparin (Abbildung 1). FHR-1 ist das am häufigsten vorkommende Glykoprotein unter den FHRs mit einer Plasma-Konzentration zwischen 40 – 100 $\mu\text{g/ml}$ ^{31,35,36}. Die Funktionen von FHR-1 sind teilweise umstritten. Es wird u. a. vermutet, dass es die C5-Konvertase des alternativen Weges inhibiert (Abbildung 1), und mit FH um die Bindung an C3b konkurriert³¹. Diverse andere Studien konnten die inhibitorische Wirkung von FHR-1 jedoch nicht bestätigen, sondern detektierten einen komplement-aktivierende Einfluss des Glykoproteins^{27,37,38}.

FHR-3 besteht ebenfalls aus fünf SCR-Domänen, die hohe Sequenzidentitäten mit FH und insbesondere mit FHR-4 aufweisen (Abbildung 1). Es zirkuliert in vier glykosylierten Formen im humanen Plasma mit einem Molekulargewicht von 35 – 65 kDa^{39,40}. Aufgrund der hohen Aminosäuresequenzidentität (> 85 %) von SCR 1 – 2 von FHR-3 mit SCR 6 – 7 von FH, hat FHR-3 ähnliche Bindungseigenschaften wie FH an verschiedene Liganden, wie z. B. C3b (in C3d-Region) und Heparin⁴¹. FHR-3 liegt im Gegensatz zu FHR-1 nur in geringen Konzentrationen von durchschnittlich 0,81 $\mu\text{g/ml}$ im Plasma vor^{40,42}. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass es zwei genetische Varianten von FHR-3 gibt, *CFHR3*A* und *CFHR3*B*. Ein Polymorphismus im *CFHR3*B* Gen führte zu einem Aminosäureaustausch in SCR 4 von FHR-3, und wurde in erhöhten Konzentrationen im Serum von aHUS-Patienten detektiert⁴³. Ähnlich wie FHR-1, sind die Funktionen von FHR-3 in der Regulation des Komplementsystems noch nicht eindeutig aufgeklärt. Es wurde eine Cofaktor-Aktivität für die FI-vermittelte C3b-Inaktivierung für FHR-3 beschrieben, jedoch nur für hohe, nicht physiologische

FHR-3 Konzentrationen (bis zu 400 µg/ml). Wie für FHR-3 wurde ebenfalls eine FHR-3-FH Bindungskonkurrenz um C3b beschrieben ^{41,44}.

Die Deletion der Gene *CFHR3* und *CFHR1* ($\Delta CFHR3/1$) ist mittlerweile seit über zehn Jahren bekannt. Welchen proteinbiologischen Einfluss dies auf das Komplementsystem hat, ist immer noch Gegenstand der Forschung. Bekannt ist, dass diese Deletion gegensätzlich mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen assoziiert wird, denn sie gilt einerseits als Risikofaktor für die Entstehung von aHUS ⁴⁵ und andererseits hat sie einen protektiven Effekt auf die AMD-Pathogenese ^{44,46–51}.

1.3 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Genetisch bedingte und erworbene Makuladegenerationen führen zu schwerwiegenden, irreversiblen Visusbeeinträchtigungen bis hin zur Erblindung. Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache für zentralen Sehverlust bei über 50-Jährigen in den westlichen Industriestaaten. Infolge der zunehmenden Lebenserwartung wird die Zahl der Betroffenen und die damit verbundene gesellschaftliche Bedeutung dieser Erkrankung in den nächsten Jahren noch weiter zunehmen ⁵². AMD ist für 8, 7 % aller globalen Blindenregistrierungen verantwortlich, und es wird erwartet, dass bis 2020 über 196 Millionen Menschen weltweit an einer Form von AMD leiden werden. Die Erkrankung ist nicht nur eine emotionale Bürde für die Patienten, sondern auch eine große sozioökonomische Belastung ⁵³.

AMD wird in zwei Formen eingestuft, ein frühes meist asymptomatisches Stadium und ein spätes pathologisches Stadium. In der frühen Phase der Erkrankung kommt es zur Bildung gelber Ablagerungen (Drusen), die Lipide, Proteine und Komplementaktivierungsprodukte enthalten, und zur fehlerhaften Pigmentierung des retinalen Pigmentepithels (RPE). Wenn sich die Drusen in Anzahl, Größe, Eigenschaft und Lokalisation (in den Bereich der Makula) ändern, spricht man von fortgeschrittener AMD ^{54,55}.

Dieses fortgeschrittene, pathologische Stadium wird in zwei Formen unterschieden. Ein Großteil der AMD, ca. 85 – 90 % aller Fälle, bildet die „trockene“ AMD, in der es zur Atrophie des RPE und damit zum Absterben von Photorezeptorzellen und zur Ablösung der Netzhaut kommt (Abbildung 3d). In den übrigen 10 – 15 % der AMD-Fälle kommt es zur choroidalen Neovaskularisation (CNV), auch „feuchte“ AMD

genannt. Hier wachsen Blutgefäße vom Choroid, unterhalb der Blut-Retina-Schranke, in die RPE- und Photorezeptor-Schicht, im Bereich der Makula (Abbildung 3a, Stelle des schärfsten Sehens) ein (Abbildung 3c). Diese Neovaskularisation wird hauptsächlich durch eine übermäßige Produktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), insbesondere durch das RPE, verursacht. Seit ein paar Jahren kann die Progression der Erkrankung durch intravitreale Injektion von anti-VEGF Hemmern verlangsamt werden. Die „trockene“ Form der AMD ist bisher nicht behandelbar ⁵⁶.

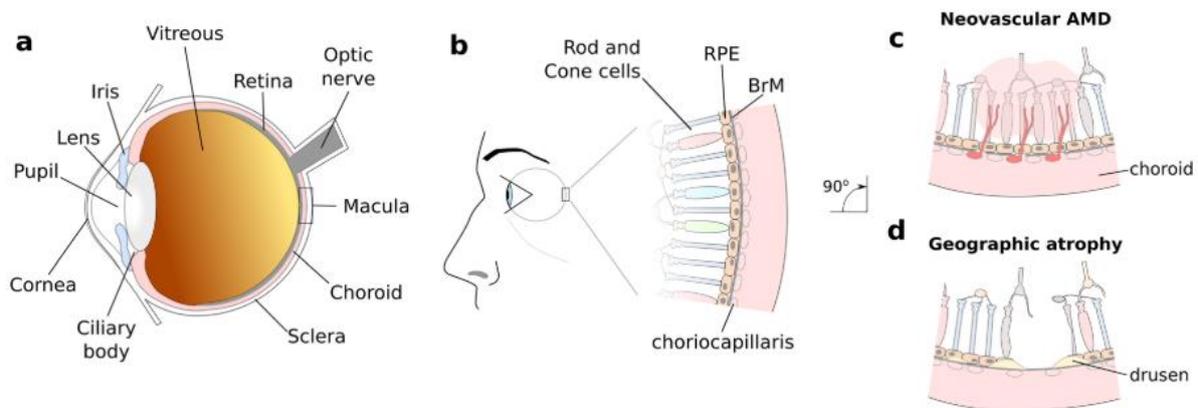


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gewebe des humanen Auges und den beiden AMD-Formen. (a) Aufbau des humanen Auges mit den wichtigsten Bestandteilen. (b) Bestandteile der Retina, die bei der AMD betroffen sind. Photorezeptoren („rod and cone cells“), RPE (retinales Pigmentepithel), BrM (Bruch-Membran), Choroid („choriocapillaris“). (c) Die eine späte Form der AMD mit invadierten Blutgefäßen wird neovaskuläre „feuchte“ AMD genannt. (d) Die andere späte Form der AMD, in der es zu Drusenbildung im Bereich der Makula und damit zur geographischen Atrophie kommt, wird auch als „trockene“ AMD bezeichnet. (Abbildung aus Clark und Bishop) ⁵⁵.

AMD ist eine multifaktorielle Erkrankung deren Pathogenese noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Es gibt jedoch bereits mehrere Belege dafür, dass eine Fehlfunktion des RPE, durch oxidativen Stress (wie z. B. Rauchen, Sonneneinstrahlung), Störung der Nährstoff- und Energieversorgung, sowie Fehlregulation des Komplementsystems, zur AMD-Entstehung beiträgt ^{55,57,58}.

1.3.1 Systemische versus lokale Komplementaktivierung bei AMD

Obwohl Alter, Rauchen und Ernährung eine Rolle bei der Entstehung der AMD spielen, liegt der Hauptrisikofaktor in Veränderungen der Gene. Seit über zehn Jahren ist bekannt, dass v. a. Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) in Genen der Komplementkaskade mit einem erhöhten Risiko für die AMD-Pathogenese einhergehen. Es gibt sowohl häufige als auch sehr seltene Varianten in den *CFH*,

CFHR3/CFHR1, *CFI*, *CFB*, *C3* und *C9* Genen, die unterschiedlich stark das Risiko an einer AMD zu erkranken, steigern ^{55,59,60}.

Jedoch ist die Verbindung zwischen AMD-assoziierten Komplement SNPs und Komplementprotein-Aktivierung bisher weitgehend unklar. Es wurde zwar in vereinzelten Studien gezeigt, dass SNPs in den Komplementgenen eine veränderte Komplementprotein-Expression zur Folge hatten, jedoch konnten diese Untersuchungen in vielen anderen Untersuchungen nicht reproduziert werden. Eine Veröffentlichung konnte u. a. einen Zusammenhang zwischen dem verbreiteten AMD-SNP im *CFH* Gen (Y402H) und einer erhöhten systemischen C3 Aktivierung in AMD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen feststellen ⁶¹. Diverse andere Veröffentlichungen konnten diese Daten nicht bestätigen ⁶²⁻⁶⁴.

Ein weiterer ungelöster Aspekt ist dabei ob das systemische oder das lokale, zell-spezifische Komplementsystem, oder beides zur AMD-Pathogenese beitragen. Man ist lange Zeit davon ausgegangen, dass eine Änderung in der systemischen Komplementkaskade eine Rolle in AMD spielen ^{62,64,65}. Im Plasma von AMD-Patienten wurden in mehreren Studien erhöhte Komplementaktivierungsprodukte gefunden, u. a. C3a, C3d und Ba (siehe Komplementkaskade Abbildung 1) ^{62,64}. Allerdings gab es auch kontroverse Studien, wie z. B. für den Komplementfaktor CFD. Eine Untersuchung belegte erhöhte CFD Konzentrationen im Plasma von AMD-Patienten ⁶⁶, und eine andere Studie zeigte verringerte CFD Werte im Plasma ⁶³. Eine 2014 veröffentlichte klinische Studie, zur systemischen Inhibition des Komplementkomponenten C5 mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, konnte das Fortschreiten der „trockenen“ atrophischen AMD nicht verlangsamen, was darauf hindeutete, dass ein systemischer Ansatz zur Bekämpfung der AMD ein ineffektiver Ansatz ist ⁶⁷.

Vielmehr ist in den letzten Jahren das lokale, zell-spezifische Komplementsystem in den Fokus der Forschung gerückt. Man konnte in T-Zellen zeigen, dass Komplementproteine neben ihren klassischen Funktionen in der Beseitigung und Opsonisierung von Pathogenen auch an der lokalen Regulation physiologischer Zellprozesse beteiligt sind ^{2,68-70}. Retinale Zelltypen (Müllerzellen, retinale Mikroglia, Neuronen, Endothelzellen, RPE Zellen) exprimieren und sezernieren lokal Komplementkomponenten, die sowohl im Alter als auch in retinaler Degeneration unterschiedlich reguliert werden, unabhängig vom systemischen Komplementsystem ^{12,14,71-73}. Eine Studie zeigte, dass humane RPE Zellen endogene

Komplementkomponenten exprimieren und nach oxidativem Stress unterschiedlich regulieren. Es wurde eine erhöhte Komplementrezeptor-Expression und eine Akkumulation von C3, FH und Properdin in gestressten RPE Zellen gezeigt ¹². In einem Mausmodell für akute Netzhautdegenerationen konnte eine zelltyp-spezifische Komplementregulation festgestellt werden. Degenerierte RPE Zellen exprimierten vermehrt C1, C3 und CFB im Vergleich zu gesunden Kontrollen ¹⁴. Diese neuesten Studien sollten in Zukunft genutzt werden, um neue lokale und zell-spezifische Therapieansätze für retinale Degenerationen wie der AMD zu entwickeln.

1.4 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Das RPE ist ein hoch-spezialisiertes, einschichtiges Epithelium hexagonaler Zellen, die im apikalen Bereich durch Melanosomen stark pigmentiert sind (Abbildung 4A). Es liegt polarisiert zwischen der neurosensorischen Retina (apikal) und dem Choroid (Aderhaut, basal) und bildet zusammen mit der Bruch-Membran die Blut-Retina-Schranke (Abbildung 1a). An der apikalen Seite befinden sich lange Mikrovilli, die einerseits zur Vergrößerung der Oberfläche beitragen und andererseits im direkten Kontakt mit den Außensegmenten der lichtempfindlichen Photorezeptoren stehen. Eine einzelne RPE Zelle kann zwischen 30 – 50 Photorezeptorzellen versorgen. An der basalen Seite ist das RPE fest mit der Bruch-Membran verbunden, um die Netzhaut vom systemischen Blutkreislauf vor Eindringen von Krankheitserregern und Toxinen abzugrenzen (Abbildung 4A) ^{74–76}.

Die polarisierte Struktur des RPE wird durch das intrazelluläre Zytoskelett, bestehend aus v. a. Aktin-Filamenten, und durch die interzellulären Wechselwirkungen über apikale Verbindungskomplexe (*tight junctions*, *adherens junctions*, *gap junctions*) wie z. B. das *tight junctions* Protein Zonula occludens-1 (ZO-1), aufrechterhalten (Abbildung 4B). Das intrazelluläre Netzwerk aus Aktin-Filamenten und assoziierten Proteinen kann durch Änderungen der zellulären Umgebung und interzellulären RPE-Interaktionen beeinflusst werden, und die RPE-Struktur verändern. Die engen Verbindungen (*tight junctions*) zwischen den RPE Zellen sind mit Aktin-Filamenten verbunden, wodurch eine Diffusionsbarriere gebildet wird, um den Interzellularraum zu verschließen (Abbildung 4B) ⁷⁷.

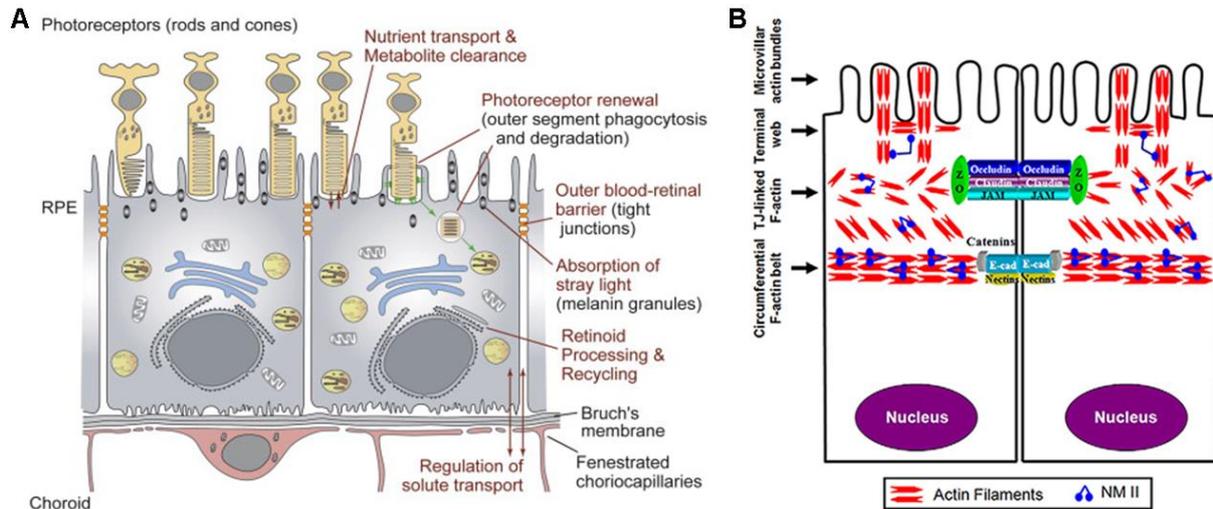


Abbildung 4: Aufbau und Struktur des retinalen Pigmentepithels (RPE).

(A) Schematische Darstellung des RPE mit *tight junctions* und generellen Funktionen. (Abbildung aus Lehmann et al.)⁷⁸. (B) Schematische Darstellung des RPE-Zytoskeletts mit Aktin-Filamenten und Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*, *adherens junctions*). (Abbildung aus Ivanov et al.)⁷⁹.

Durch seine Lage und die zell-spezifischen Eigenschaften, erfüllt das RPE vielfältige Aufgaben. Es hat eine Schlüsselfunktion im Sehzyklus bei der optischen Informationsübermittlung. Einerseits ist es dafür verantwortlich, dass all-*trans*-Retinaldehyd zu 11-*cis*-Retinaldehyd isomerisiert wird und es somit wieder in den visuellen Kreislauf einspeist wird, wozu die Photorezeptoren selbst nicht in der Lage sind⁸⁰. Und andererseits phagozytieren und degradieren sie äußere Photorezeptorsegmente, die freie Radikale sowie durch Photonen degenerierte Proteine und Lipide aufweisen. Diese werden im RPE verstoffwechselt, aufbereitet und wieder an die Photorezeptoren zurückgegeben. Die starke apikale Pigmentierung im RPE sorgt für die Absorption von Lichtenergie, die auf die Retina fokussiert wird⁷⁴. Eine weitere Aufgabe des RPE ist der transzelluläre Transport von Wasser, Elektrolyten und Metaboliten von der Retina zum Choroid, sowie von Glukose und vieler anderer Metabolite aus dem Blutkreislauf in die Netzhaut. Dies geschieht durch sekundäre Transportprozesse in Abhängigkeit der Natrium-Kalium-ATPase^{57,74,78}. Eine weitere essenzielle Aufgabe des RPE ist die Aufrechterhaltung des intraokularen Immunprivilegs. Einerseits reguliert das retinale Pigmentepithel zusammen mit der Bruch-Membran das selektive Eindringen von Komponenten des Immunsystems. Durch die selektive makromolekulare Permeabilität der Bruch-Membran können nur Proteine bis zu einer molekularen Masse von 60 kDa diffundieren^{81,82}. Andererseits ist das RPE selbst in der Lage immunsuppressive Faktoren, wie z. B. *transforming*

growth factor β (TGF- β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und diverse Interleukine zu sezernieren^{57,83}. Außerdem synthetisieren und exprimieren RPE Zellen Komplementproteine, -regulatoren und -rezeptoren, u. a. C3, CFB, FH, FI, Properdin, C3aR, C5aR1. Zellschäden wie z. B. oxidativer Stress oder starke Lichtexposition stören dieses präzise regulierte intrazelluläre Immunsystem und können zur Entstehung retinaler Degenerationen wie der AMD führen^{12,14,71,84–87}.

1.5 Antikörper als Therapie komplement-assoziiierter Erkrankungen

Derzeit befinden sich über 500 Antikörperkonstrukte in klinischen Studien und bereits über 60 Antikörper-basierte Medikamente sind zugelassen⁸⁸. Entsprechend den Erkenntnissen der letzten Jahre, dass das Komplementsystem nicht nur systemisch, sondern auch zell-spezifisch und intrazellulär eine bedeutende Rolle bei der Zell-Homöostase und Zell-Entwicklung spielt, können Antikörper-basierte Therapien zur spezifischen Blockade des Komplementsystems neue Aussichten auf Linderung schwerwiegender Autoimmunerkrankungen bieten.

Wichtige Aspekte bei der Entwicklung therapeutischer Antikörper sind einerseits die Beachtung der spezies-spezifischen Immunogenität der monoklonalen Antikörper. Murine Antikörper können den klassischen Weg des humanen Komplementsystems, Isotyp-abhängig, aktivieren^{89–92}. Daher werden diese Immunoglobuline moduliert, um den Anteil muriner Aminosäuresequenzen zu minimieren (Abbildung 5).

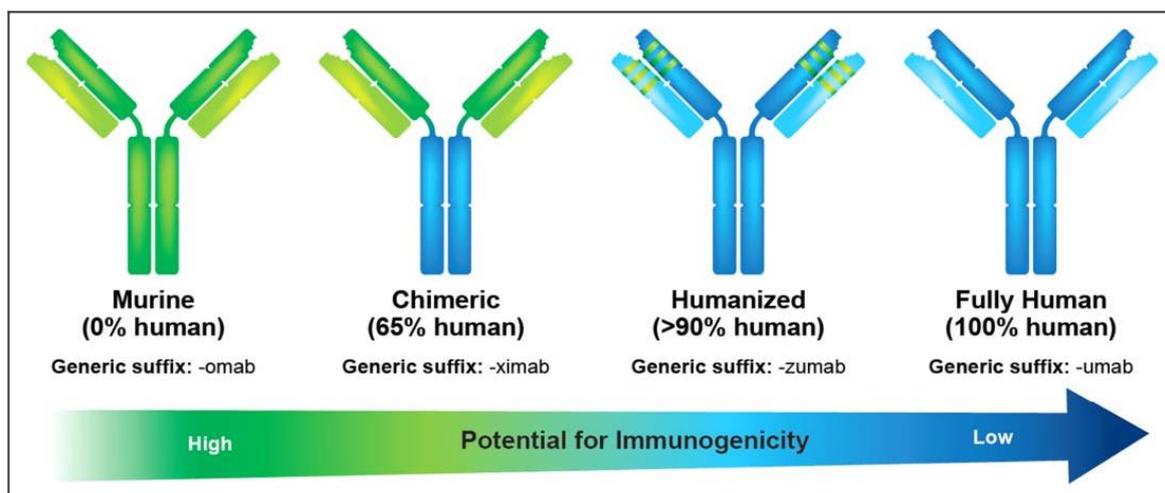


Abbildung 5: Immunogenitätspotenzial therapeutischer monoklonaler Antikörper.

Das Potenzial zur Aktivierung des humanen Immunsystems sinkt mit humaner Sequenzzunahme. Murine Sequenzen sind in grün dargestellt und humane Sequenzen in blau. (Abbildung aus Silberstein et al.)⁹³.

Andererseits sollen die therapeutischen Antikörper das Komplementsystem nur modulieren und nicht komplett inhibieren, um die körpereigene Immunabwehr nicht zu gefährden.

Therapeutische Antikörper, die das systemische Komplementsystem blockieren, sind bereits für einige Erkrankungen zugelassen. Ein humaner Antikörper gegen den Lektin-Weg, anti-MASP2, befindet sich derzeit in einer Phase 3 Studie zur Behandlung von aHUS und zeigt vielversprechende Ergebnisse ⁹⁴. Eculizumab ist ein humanisierter muriner anti-C5 Antikörper, der die Spaltung von C5 in C5b und C5a verhindert und somit den terminalen Komplementweg blockiert. Dieser Antikörper ist seit 2007 für die Behandlung von paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie (PNH), und anschließend auch für aHUS, zugelassen ⁹⁵.

Für das durch die Blut-Retina-Schranke abgegrenzte, immunprivilegierte Auge, gibt es bisher weniger erfolgreiche Therapieansätze. Ein in Phase 2 befindlicher humaner anti-C5 Antikörper (LFG316) soll zur Heilung von Uveitis, einer Entzündungserkrankung der Augenhaut, beitragen ⁹⁶. Dieser Antikörper wurde auch für die Behandlung der atrophischen AMD getestet, jedoch konnte bisher kein positiver Effekt erreicht werden ⁹⁵. Erfolgreiche Therapien gegen die Entstehung einer „trockenen“ AMD gibt es bisher leider noch nicht. Erst kürzlich verfehlte eine klinische Studie in Phase 3 die Zulassung nur knapp. Lampalizumab ist ein humanisiertes Antikörper-Fragment gegen humanen Komplementfaktor D (CFD). Er wurde zu Behandlung der „trockenen“ AMD entwickelt, jedoch konnten intravitreale Applikationen die Progression der Atrophie nicht stoppen ⁹⁷.

Aufgrund neuester Studien, dass Komplementproteine lokal im Auge produziert und reguliert werden, muss der Fokus von Antikörper-basierten Therapien auf dem lokalen und zell-spezifischen Komplementsystem liegen, um erfolgreich schwerwiegende Erkrankungen wie die AMD heilen zu können.

2 Ziel der Arbeit

Es ist mittlerweile seit über zehn Jahren durch umfangreiche genomweite-Assoziationsstudien bekannt, dass Genveränderungen innerhalb der Komplementkaskade – einer essenziellen Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem – stark mit der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) assoziiert werden^{60,98–102}. Dabei liegt der Fokus vor allem auf Polymorphismen, die in den Genen des Hauptnegativregulators Komplementfaktor H (*CFH*) und den *CFH*-verwandten Genen *CFHR3* und *CFHR1* liegen^{44,46–51}.

Basierend auf den Erkenntnissen, dass die Deletion der *CFHR3/1*-Gene einen protektiven Effekt auf die Entstehung der AMD hat, wird in dieser Arbeit hypothesiert, dass eine antikörperabhängige Inaktivierung von FHR-3, FHR-1 oder beiden Proteinen retinale Degenerationen beim Menschen mildern kann. Das Hauptziel des Projektes ist daher die Funktion von FHR-3 und FHR-1, mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAk), zu bestimmen und zu modulieren. Dabei sollte die Wirkung der Antikörper sowohl auf das systemische als auch auf das intraokulare Komplementsystem untersucht werden.

Dabei sollen folgende Schlüsselfragen untersucht werden:

1. Können monoklonale Antikörper spezifisch FHR-3 oder FHR-1 beeinflussen, ohne eine Wirkung auf FH oder die andern FH-verwandte Proteine zu haben?
2. Wie regulieren monoklonale Antikörper gegen FHR-3 oder FHR-1 das humane Komplementsystem *in vitro*?
3. Sind FHR-3 und 1 hauptsächlich an systemischen oder lokalen Vorgängen bei AMD-assozierten Prozessen beteiligt?
4. Haben FHR-3 oder 1 einen Einfluss auf retinale Pigmentepithelzellen (RPE), v. a. im Hinblick auf das intraokuläre Immunprivileg?

Die Beantwortung der Fragen wird innovative Einblicke in die noch nahezu unbekannt Funktion von FHR-3 und FHR-1 liefern. In dem aktuellen Projekt möchten wir einen Beitrag zum detaillierten Grundverständnis der molekularen Interaktion dieser Komplementsystemregulatoren bei der Pathologie von AMD leisten. Folgestudien werden es uns ermöglichen, die antikörperabhängige Manipulation von *CFHR1* und *3* im AMD-Tiermodell zu untersuchen.

3 Material

3.1 Organismen und Zellen

3.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* Stämme

| Stamm | Herkunft/Referenz |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> strain DH5α | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| <i>Escherichia coli</i> strain JM109 | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |

3.1.2 Eukaryotische Zellen

Tabelle 2: Verwendete eukaryotische Zellen

| Name | Spezies | Zelltyp | Herkunft/Referenz |
|--------------|---------------------|----------------------------------|--|
| ARPE-19 | <i>Homo sapiens</i> | Retinale Pigmentepithelzelllinie | ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland |
| HEK293T | <i>Homo sapiens</i> | Embryonale Nierenzellen | ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland |
| Hybridoma | <i>Mus musculus</i> | Hybridzellen | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| iPS-RPE | <i>Homo sapiens</i> | Stammzellen | Seba Almedawar, CRTD, Dresden, Deutschland |
| P3X63Ag8.653 | <i>Mus musculus</i> | B Lymphoblast, Myelomazelllinie | ATCC, Manassas, Virginia, USA |
| primäres RPE | <i>Homo sapiens</i> | Retinale Pigmentepithelzellen | Volker Enzmann, Inselspital Bern, Schweiz |

3.1.3 Mausstämme

Alle Experimente mit Tieren wurden nach den Richtlinien “Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research” durchgeführt ¹⁰³. Wildtyp-Mäuse (Balb/c, C57/BL6) wurden von Charles River bezogen (Tabelle 3). Die Tiere wurden im zentralen Tierlabor der Universität Regensburg gehalten. Intraperitoneale Immunisierungen und das Töten von Tieren zur Organentnahme, insb. Milz und

Thymus, wurden durch die Regierung der Oberpfalz, Abteilung Veterinärwesen, bewilligt (TVA 2532-2-190).

Tabelle 3: Verwendete Mausstämme

| Name | Genotyp | Herkunft/Referenz |
|---------|----------------|---|
| BALB/c | <i>wildtyp</i> | Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA |
| C57BL/6 | <i>wildtyp</i> | Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA |

3.2 Patientenproben

Alle humanen Blut- und Augenproben wurden unter der Zustimmung des lokalen Ethikrates und der Deklaration von Helsinki bezogen.

3.3 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen

Tabelle 4: Eigens hergestellte Primer für PCR und Sequenzierungen (Metabion, Planegg, Deutschland)

| Name | Primer-Sequenz (5' - 3') | T _m [°C] |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------|
| pCAG-CFHR3-seq | fw: TCCAGAAGGGAGAGGAGCC | 62 |
| | rv: CCAGCCACCACCTTCTGATA | 60 |
| pEXPR-IBA | fw: GAGAACCCACTGCTTACTGGC | 63 |
| | rv: TAGAAGGCACAGTCGAGG | 56 |
| CFHR1 | fw: GAGATGGAGTAAGGGAAACCAG | 62 |
| | rv: GGAGTAACACTAAGAGGACACGGG | 67 |
| hCFHR1-short | fw: CCCTCCCAAATGCAGGTCCACTG | 68 |
| | rv: TTCAACATCCACTTGGACACA | 57 |
| CFHR3 | fw: CAATTATTGGTAATGTGTGCACCCTGAAC | 68 |
| | rv: GTGCAAGATGACGAACCTCGG | 63 |
| hCFHR3-short | fw: CAGTTACATGTACGGAGAAA | 54 |
| | rv: ATAGGTCCGTTGGCAAACA | 56 |
| pFuse-IgG4-HC-seq | fw: CGGCGCCTACCTGAGATCAC | 65 |
| | rv: GGAAGACCGATGGGCCCTTG | 65 |
| pFuse-LcKappa-seq | fw: GACCGGCGCCTACCTGAGAT | 65 |
| | rv: GATGAAGACAGATGGTGCAGCCA | 65 |

| | | |
|----------|-------------------------------------|----|
| Hc-269-5 | fw: GAATTCGCCACCATGCAGGTTACTCTGAAA | 71 |
| | rv: GCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC | 76 |
| Lc-269-5 | fw: ACCGGTGCCACCATGGATATTGTGATGACG | 73 |
| | rv: CGTACGTTTGATTTCCAACCTTGGTGCCTCC | 72 |
| Hc-1340 | fw: GAATTCGCCACCATGCAGGTGCAGCTGAAG | 75 |
| | rv: GCTAGCTGCAGAGACAGTGATCGGAGTCCC | 76 |
| Lc-1340 | fw: ACCGGTGCCACCATGGACATTCTGATGACC | 75 |
| | rv: CGTACGCCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC | 73 |
| Hc-51-9 | fw: GAATTCGCCACCATGGAGGTCCAGCTG | 73 |
| | rv: GCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC | 75 |
| Lc-51-9 | fw: ACCGGTGCCACCATGGACATTGTGATGA | 72 |
| | rv: CGTACGGTTTGATTTCCAGTTTGGTGCCTC | 72 |
| CFH_121 | fw: CAGATCCGTGTGTAATATCCCGA | 63 |
| | rv: TAAGAAGAGAGCCACCGGTCTCA | 65 |
| CFH_106 | fw: CCTTTGTTAGTAACTTTAGTTCGTCTT | 62 |
| | rv: GGAGTAGGAGACCAGCCATTC | 63 |
| CFH_570 | fw: AGTGGTGAGGAAAAATGTAGAATGT | 61 |
| | rv: CATCTCCATCTTTCTTAAATTCTGTGA | 62 |
| CFH_109 | fw: AGTCTACCTTGCTAACGGTTC | 59 |
| | rv: CCTTCTAGATTGTAGTACCTGTTGCT | 65 |
| CFH_618 | fw: GTGCATTCAGGGGCATATTC | 58 |
| | rv: CCTGAAGACACAAATCTCACTGG | 63 |
| C3_223_2 | fw: CTGGATGAAGAGGTACCCGC | 63 |
| | rv: CTTGGAACAGACCCCTGACA | 60 |
| C3_147 | fw: TTGCCTCTCCTAAGCCTGTG | 60 |
| | rv: GGCTAGGGTCTCACGAGG | 61 |
| C2_116 | fw: AGCACCATCTACACTTCGCC | 60 |
| | rv: CATGGCCCTTACCTCGACAT | 60 |
| C2_144 | fw: CAGGGGGAGATCAGAATCGTC | 63 |
| | rv: GTGGGGGCAGGGAAATTCTTT | 61 |
| CFI_141 | fw: ATCCACTGATACAAGCGCTCA | 59 |
| | rv: TTAAAATCGTCATGATGTTCAAAGC | 59 |
| CFI_100 | fw: CCTGCAGTGTGGTCTGTGAG | 63 |

| | | |
|----------|------------------------------------|----|
| | rv: CCAGTGCTACAAGGTGGGAA | 60 |
| ARMS_375 | fw: GCATTTCTAATATCAAATCAAAACATTCAT | 61 |
| | rv: CCTGGGGCTCTGTTTGAATTG | 61 |
| C9_623 | fw: TCTGTGACAATGGCAGACAACT | 60 |
| | rv: TTTATTCCCCACTCTCTGTTATCTT | 61 |

3.4 Oligonukleotide für qRT-PCR

Tabelle 5: Kommerzielle Primer für qRT-PCR (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)

| Primername | Bestellnummer | Gen |
|---------------|---------------|------------------|
| Hs_ARMS2_1_SG | QT00205429 | <i>ARMS2</i> |
| Hs_BEST1_1_SG | QT00023282 | <i>BEST1</i> |
| Hs_BF_1_SG | QT00012138 | <i>CFB</i> |
| Hs_C1QB_1_SG | QT00003493 | <i>C1QB</i> |
| Hs_C3_1_SG | QT00089698 | <i>C3</i> |
| Hs_C3AR1_1_SG | QT00090398 | <i>C3AR1</i> |
| Hs_C4A_1_SG | QT00237160 | <i>C4A</i> |
| Hs_C5_1_SG | QT00088011 | <i>C5</i> |
| Hs_C5AR2_1_SG | QT00243971 | <i>C5AR2</i> |
| Hs_C5R1_1_SG | QT00997766 | <i>C5AR1</i> |
| Hs_CD59_1_SG | QT00035952 | <i>CD59</i> |
| Hs_CFD_1_SG | QT00212191 | <i>CFD</i> |
| Hs_CFH_1_SG | QT00001624 | <i>CFH</i> |
| Hs_CFHR3_1_SG | QT00001631 | <i>CFHR3</i> |
| Hs_CFI_1_SG | QT00213794 | <i>CFI</i> |
| Hs_CFP_1_SG | QT00010514 | <i>CFP</i> |
| Hs_CST3_1_SG | QT00046438 | <i>CST3</i> |
| Hs_CTSB_1_SG | QT00088641 | <i>CTSB</i> |
| Hs_CTSD_1_SG | QT00020391 | <i>CTSD</i> |
| Hs_CTSL_1_SG | QT01664978 | <i>CTSL</i> |
| Hs_FOXP3_1_SG | QT00048286 | <i>FOXP3</i> |
| Hs_GAPDH_1_SG | QT00079247 | <i>GAPDH</i> |
| Hs_ITGAM_1_SG | QT00031500 | <i>CD11b/CR3</i> |
| Hs_MBL2_1_SG | QT01004227 | <i>MBL2</i> |

| | | |
|-------------------|------------|-----------------|
| Hs_MCP_1_SG | QT00073689 | <i>CD46</i> |
| Hs_NLRP3_1_SG | QT00029771 | <i>NLRP3</i> |
| Hs_RPE65_1_SG | QT00001351 | <i>RPE65</i> |
| Hs_SERPINB13_1_SG | QT00045983 | <i>SERPIB13</i> |
| Hs_SERPING1_1_SG | QT00053963 | <i>SERPING1</i> |
| Hs_TLR4_1_SG | QT00035238 | <i>TLR4</i> |

Tabelle 6: Eigens hergestellte Primer für qRT-PCR (Metabion, Planegg, Deutschland)

| Primername | Primersequenz 5' – 3' | Gen |
|---------------|--------------------------------|---------------|
| cdh1 | fw: ACAGGCTGGCTGAAAGTGAC | <i>CDH1</i> |
| | rv: CACGGCATGAGAATAGAGGAT | |
| col-la1 | fw: GGTGGTTTCTTGGTCGGT | <i>COL1A1</i> |
| | rv: ATGACGTGATCTGTGACGAG | |
| col-la2 | fw: GGTCCCTTGAAACCTTGAGG | <i>COL1A2</i> |
| | rv: TCGGTGGGAACCTTTGCTG | |
| htra1 | fw: TCCCAACAGTTTGCGCCATA | <i>HTRA1</i> |
| | rv: AACGGAAGCTTGCGAAACAA | |
| il-18 | fw: ACTGTAGAGATAATGCACCCCG | <i>IL18</i> |
| | rv: AGTTACAGCCATACCTCTAGGC | |
| il-1 β | fw: CTCGCCAGTGAAATGATGGCT | <i>IL1B</i> |
| | rv: GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT | |
| map-1 | fw: TGAAGGATGGGACGTGGAGT | <i>MAP1</i> |
| | rv: TGCTCTGACTTGAGTTCGCT | |
| masp-1 | fw: TGCAAAGGTTCCAGAGACC | <i>MASP1</i> |
| | rv: GCATAAGCCTTCTGGCAGGT | |
| masp-2 | fw: GCGGTTTCTACTGCTCCTGCC | <i>MASP2</i> |
| | rv: CGTGGGTATTCAGGGCTGCTGAGCTC | |
| masp-3 | fw: TGCCCAAGGAGTCTGGATGA | <i>MASP3</i> |
| | rv: CCCCCAATGATCCTCTTGACC | |
| mTOR | fw: TGCCAACACTATCTTCGGAACC | <i>MTOR</i> |
| | rv: GCTCGCTTCACCTCAAATTC | |
| mTORC1-raptor | fw: ACTGATGGAGTCCGAAATGC | <i>RAPTOR</i> |
| | rv: TCATCCGATCCTTCATCCTC | |
| mTORC2-rictor | fw: GGAAGCCTGTTGATGGTGAT | <i>RICTOR</i> |
| | rv: GGCAGCCTGTTTTATGGTGT | |

| | | |
|----------------|-------------------------------|--------------|
| PSMA7 | fw: CCTGGAAGGCCAATGCCATAG | <i>PSMA7</i> |
| | rv: TTTGCCACCTGACTGAACCACTTC | |
| PSMB5 | fw: CCATGATCTGTGGCTGGGATAAG | <i>PSMB5</i> |
| | rv: GGTCATAGGAATAGCCCCGATC | |
| PSMB8 | fw: CTGGAGGCGTTGTCAATATGTACC | <i>PSMB8</i> |
| | rv: GCAGCAGGTCACTGACATCTGTAC | |
| PSME1 | fw: CAGCCCCATGTGGGTGATTATC | <i>PSME1</i> |
| | rv: GCTTCTCGAAGTTCTTCAGGATGAT | |
| smap | fw: TACGTCCTGCACCGTAACAAG | <i>SMAP</i> |
| | rv: CAGCCATCTCAGCCCAACC | |
| tgf- β 1 | fw: CATAGCTGACTTCAAGATGTGGT | <i>TGFB1</i> |
| | rv: CCTAGTGAGACTTTGAACCGT | |
| tlr1 | fw: CTGTTTTTGTGGCCAGGGTC | <i>TLR1</i> |
| | rv: GGAACGTGGATGAGACCGTT | |
| tlr2 | fw: CTCGGAGTTCTCCCAGTGTT | <i>TLR2</i> |
| | rv: GGAAACTCGAGGCAGACCAA | |
| tlr3 | fw: GGCTAGCAGTCATCCAACAGAA | <i>TLR3</i> |
| | rv: TGAAGTTGGCGGCTGGTAAT | |
| tnf- α | fw: GCTGCACTTTGGAGTGATCG | <i>TNFA</i> |
| | rv: GGGTTTGCTACAACATGGGC | |
| vimentin | fw: TGTCCAAATCGATGTGGATGTTTC | <i>VIM</i> |
| | rv: TTGTACCATTCTTCTGCCTCCTG | |
| α -sma1 | fw: GCCTTGGTGTGTGACAATGG | <i>ACTA2</i> |
| | rv: AAAACAGCCCTGGGAGCAT | |

3.5 Plasmide

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

| Vektorname | Verwendung | Herkunft |
|----------------------|--|--|
| pCAG-CFHR3-STREP-II | Expression von humanem FHR-3 in HEK293T-Zellen | Christine Skerka, Hans-Knöll-Institut, Jena, Deutschland |
| pEXPR_CFHR1_STREP-II | Expression FHR-1 in HEK293-Zellen | Hergestellt während der Doktorarbeit |

| | | |
|-------------------|--|--|
| pEXPR-IBA103 | Expressionsvektor rekombinanter <i>Strep</i> -tag- II-Fusionsproteine | IBA GmbH, Göttingen, Deutschland |
| pFUSE2-CLlg-hk | Expressionsvektor chimärer Antikörper (leichte Kette (lc)) | Invivogen, San Diego, CA, USA |
| pFUSE-CHlg-hG4 | Expressionsvektor chimärer mAk (schwere Kette (hc) human IgG4) | Invivogen, San Diego, CA, USA |
| pFUSE-CHlg-hG4e1 | Expressionsvektor chimärer mAk (schwere Kette (hc) human IgG4 mit S228P Mutation) | Invivogen, San Diego, CA, USA |
| pFUSE-Hc-269-5 | Expression anti-FHR-3 269-5 chimärer mAk (hc) | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pFUSE-Hc4e1-269-5 | Expression anti-FHR-3 269-5 chimärer mAk (hc mit S228P Mutation) | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pFUSE-Hc4e1-51-9 | Expression anti-BSA 51-9 chimärer mAk (hc mit S228P Mutation) | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pFUSE-Hc-51-9 | Expression anti-BSA 51-9 chimärer mAk (hc) | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pFUSE-Lc-269-5 | Expression anti-FHR-3 269-5 chimärer mAk (lc) | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pFUSE-Lc-51-9 | Expression anti-BSA 51-9 chimärer mAk (lc) | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pGEM-T | Übergangsvektor | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| pGEM-T-269-5-Hc | Klonierung von 269-5-HC Sequenz | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pGEM-T-269-5-Lc | Klonierung von 269-5-LC Sequenz | Hergestellt während der Doktorarbeit |

| | | |
|----------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| pGEM-T-51-9-Hc | Klonierung von <i>51-9-HC</i> Sequenz | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pGEM-T-51-9-Lc | Klonierung von <i>51-9-LC</i> Sequenz | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| pGEM-T-CFHR1 | Klonierung von <i>CFHR1</i> | Hergestellt während der Doktorarbeit |

3.6 Proteine

Tabelle 8: Verwendete Proteine

| Proteinname | Spezies | Herkunft |
|---------------------------|---------------------|---|
| BSA (nativ) | <i>Bos taurus</i> | Uptima (#UP36859) |
| C2 (nativ) | <i>Homo sapiens</i> | Complement Technology (#A112) |
| C3a (nativ) | <i>Homo sapiens</i> | Hycult (#HC2127) |
| C3b (nativ) | <i>Homo sapiens</i> | Complement Technology (#A114) |
| C4b (nativ) | <i>Homo sapiens</i> | Complement Technology (#A108) |
| C5a (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | Hycult (#HC2102) |
| CR3 (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | R & D Systems (#4047-AM-050) |
| CTSL (nativ) | <i>Homo sapiens</i> | Merck (Calbiochem) (#219402) |
| CTSL (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | R & D Systems (#952-CY-010) |
| FH (nativ) | <i>Homo sapiens</i> | Complement Technology (#A137) |
| FHR-1 (nativ) | <i>Homo sapiens</i> | Agustín Tortajada Alonso, Complutense University (UCM), Madrid, Spanien |
| FHR-1-Strep (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| FHR-2 (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | Novoprotein (#C517) |
| FHR-3-Strep (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| FHR-4A (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | Diana Wouters, Sanquin, University of Amsterdam, Niederlande |

| | | |
|----------------------|---------------------|--|
| FHR-4B (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | Diana Wouters, Sanquin, University of Amsterdam, Niederlande |
| FHR-5 (rekombinant) | <i>Homo sapiens</i> | Novoprotein (#CC74) |
| Properdin (nativ) | <i>Homo sapiens</i> | Complement Technology (#A139) |
| TGF- β | <i>Homo sapiens</i> | R & D Systems (#DB100B) |

3.7 Antikörper

Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper

| Name | Typ | Spezies | Verdünnung | Gebrauch | Herkunft |
|---------------------------|-----|---------|---|-------------------|--|
| anti-BSA (51-9)-biotin | mAk | Maus | 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | ELISA WB | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| anti-BSA (51-9) | mAk | Maus | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 100 μg | ELISA WB IP | Hergestellt während der Masterarbeit |
| anti-Human IgG-biotin | pAk | Ziege | 1:10000 | ELISA | Sigma (#B3648) |
| C3 | mAk | Hase | 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | IHC | Abcam (#ab181147) |
| C3a des-Arg | mAk | Maus | 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | IHC | Hycult (#HM2074) |
| C3aR | pAk | Hase | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | IHC | Antibodies-online (#ABIN682213) |
| C3b- α | mAk | Maus | 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | IHC WB | Progen (#61019) |
| C5aR1 | mAk | Maus | 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | IHC | Hycult (#HM2094) |
| Calnexin | mAk | Maus | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | IHC | Thermo Fisher (#MA3-027) |
| Cathepsin L | mAk | Maus | 1:500 | IHC | Abcam (#ab6314) |
| CD11b | pAk | Ziege | 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | IHC | Biorbyt |

| | | | | | |
|-------------------|-----|-------|--------------------------------|-------------------|--|
| | | | | WB | (#orb19554) |
| CFB | pAk | Ziege | 2 µg/ml | IHC WB | Merck (Calbiochem) (#341272) |
| FH | pAk | Ziege | 5 µg/ml | WB | Merck (Calbiochem) (#341276) |
| FH | pAk | Ziege | 5 µg/ml | WB | Quidel (#A312) |
| FHR-1 | mAk | Maus | 10 µg/ml | WB | R&D Systems (#MAB4247) |
| FHR-1 | mAk | Maus | 5 µg/ml | IHC WB | Hycult (#HM2301) |
| FHR-1 (179) | mAk | Maus | 10 µg/ml 10 µg/ml 100 µg | IHC IP WB | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| FHR-1 (368) | mAk | Maus | 10 µg/ml 10 µg/ml 100 µg | IHC IP WB | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| FHR-1 (472) | mAk | Maus | 10 µg/ml 10 µg/ml 100 µg | IHC IP WB | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| FHR-1 (539) | mAk | Maus | 10 µg/ml 10 µg/ml 100 µg | IHC IP WB | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| FHR-1 (621) | mAk | Maus | 10 µg/ml 10 µg/ml 100 µg | IHC IP WB | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| FHR-3 (RETC-2) | mAk | Maus | 10 µg/ml 10 µg/ml 100 µg | ELISA WB IP | Hergestellt während der Masterarbeit |

| | | | | | |
|--------------------------|-----|-------|-----------|-------------|--|
| FHR-3 (RETC-2)-biotin | mAk | Maus | 10 µg/µl | ELISA WB | Hergestellt während der Doktorarbeit |
| FHR-3.4 | mAk | Maus | 0,3 µg/ml | ELISA | Diana Wouters, Sanquin, University of Amsterdam, Niederlande |
| Giantin | pAk | Schaf | 10 µg/ml | IHC | R&D Systems (#AF8159-SP) |
| GM130 | pAk | Schaf | 10 µg/ml | IHC | R&D Systems (#AF8199-SP) |
| GS-6 | mAk | Maus | 2 µg/ml | IHC | Merck (Calbiochem) (#MAB302) |
| Iba1 | pAk | Hase | 1 µg/ml | IHC | Wako Chemicals (#019-19741) |
| IgG4-biotin | mAk | Maus | 1:5000 | ELISA | Merck Millipore (#B3648) |
| Lamp1 | pAk | Hase | 10 µg/ml | IHC | Abcam (#ab24170) |
| NLRP3 | mAk | Maus | 5 µg/ml | IHC WB | AdipoGen (#AG-20B-0014) |
| Properdin | pAk | Ziege | 1:500 | ELISA | Complement Technology (#A239) |
| StrepMAB- classic | mAk | Maus | 1:400 | ELISA WB | IBA GmbH (#2-1507-001) |
| ZO-1 | pAk | Hase | 1:125 | IHC | Thermo Fisher (#61-7300) |

IHC = Immunhistochemie, WB = Western Blot, mAk = monoklonaler Antikörper, pAk = polyklonaler Antikörper

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper

| Antikörper | Spezies | Verdünnung | Gebrauch | Herkunft |
|-----------------------------|---------|---------------------|-------------|--|
| anti-Hase IgG Fcγ- POD | Ziege | 1:2500 – 1:10000 | WB ELISA | Jackson ImmunoResearch (#111-035-003) |
| anti-Hase IgG-488 | Esel | 1:500 | IHC | Jackson ImmunoResearch (#711-545-152) |
| anti-Human IgG (H+L)-POD | Ziege | 1:5000 | ELISA | Merck (Calbiochem) |
| anti-Maus IgG Fcγ- POD | Ziege | 1:2500 – 1:10000 | WB ELISA | Jackson ImmunoResearch (#115-035-164) |
| anti-Maus IgG-488 | Esel | 1:2000 | FACS IHC | Jackson ImmunoResearch (#715-545-150) |
| anti-Maus IgG-Cy3 | Esel | 1:500 | IHC | Jackson ImmunoResearch (#715-165-150) |
| anti-Schaf IgG-Cy3 | - | 1:500 | IHC | Eugen Kerkhoff, Uniklinikum Regensburg |
| anti-Schaf-IgG (H+L)-POD | Esel | 1:5000 | WB ELISA | Jackson ImmunoResearch (#713-035-147) |
| anti-Ziege IgG FCγ- POD | Hase | 1:2500 – 1:10000 | WB ELISA | Jackson ImmunoResearch (#305-035-003) |
| anti-Ziege IgG-Cy3 | Esel | 1:500 | IHC | Jackson ImmunoResearch (#705-165-147) |
| GAPDH-HRP | Hase | 1:1000 | WB | Cell signaling technology (#3683) |

| | | | | |
|---------------|------|---------|-------------|---|
| IgG-Alexa 488 | Maus | 1:2000 | FACS | Jackson ImmunoResearch (#715-545-150) |
| StrepMAB-HRP | Maus | 1:10000 | ELISA WB | IBA GmbH (#2-1509-001) |

3.8 Enzyme und Substrate

Tabelle 11: Verwendete Enzyme und Substrate

| Name | Herkunft und Bestellnummer |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Acti-stain 488 Phalloidin | Cytoskeleton (#PHDG1-A) |
| Agel | New England Biolabs (#RO552S) |
| BamHI | New England Biolabs (#R0136S) |
| EcoRI-HF | New England Biolabs (#R0101S) |
| EcoRV | New England Biolabs (#R0195S) |
| Fluoreszenz Eindeck-Medium (Dako) | Agilent (#S3203) |
| GoTaq DNA Polymerase | Promega (#M3005) |
| HindIII | New England Biolabs (#R0104S) |
| Hoechst 33342 | Thermo Fisher (#H1399) |
| NcoI | New England Biolabs (#R0193S) |
| NheI-HF | New England Biolabs (#R3131S) |
| OneTaq DNA-Polymerase | New England Biolabs (#M0480S) |
| pHrodo™ Green Conjugate | Thermo Fisher (#P35375) |
| pHrodo™ Red Conjugate | Thermo Fisher (#P35374) |
| Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase | New England Biolabs (#M0530L) |
| Proteinase K | Life Technologies |
| Streptavidin-HRPO | Jackson ImmunoResearch (#016-030-084) |
| Western Sure Premium | LI-COR (#926-95000) |
| XhoI | New England Biolabs (#R0146S) |

Tabelle 12: Verwendete magnetische Beads

| Name | Verwendung | Herkunft |
|-----------------------------------|------------|--|
| Dynabeads M-280 Tosylactivated | IP WB | (Invitrogen) Life Technologies (#14203) |

3.9 Molekularmassen-Standards

Tabelle 13: Verwendete Molekularmassen-Standards

| Name | Herkunft |
|--------------------------------------|-------------------------------|
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | (Fermentas) Thermo Fisher (#) |
| Proteinmarker IV | Peqlab (#27-2110) |
| Proteinmarker V | Peqlab (#27-2102) |
| Quick-load 2-log DNA ladder | New England Biolabs (#N0469S) |

3.10 Kit-Systeme

Tabelle 14: Verwendete Kit-Systeme

| Kitname | Herkunft/Referenz |
|--------------------------------------|---|
| Mouse IgG Library Primer Set | Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Mouse Isotyping Kit | AbD serotec, Kidlington, Oxford, Vereinigtes Königreich |
| NucleoBond XtraMidi | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland |
| NucleoSpin Gel and PCR Clean-up | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland |
| NucleoSpin Plasmid | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland |
| Nucleospin RNA (250) | MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland |
| pGEM-T Vector | Promega Corporation, Madison, WI, USA |
| pHrodo™ Red Microscale Labeling Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| QuantiTect Reverse Transcription Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Rotor-Gene SYBR® Green PCR Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| T4 DNA Ligase Kit | New England Biolabs, Ipswich, MA, USA |
| TransIT-LTI Transfektionsreagenz | Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA |
| Twin-Strep Kit | IBA GmbH, Göttingen, Deutschland |

3.11 Chemikalien

Tabelle 15: Verwendete Chemikalien

| Chemikaliename | Herkunft/Referenz |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) | Seramum, Heidesee, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Agarose (Biozym LE) | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Ampicillin Natriumsalz | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Azaserin Hypoxanthin (AH) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Bacto Agar | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt) | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| Bovines Serum Albumin - Fraktion V (BSA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Coomassie INSTANTBLUE | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| CutSmart-Puffer (10x) | New England Biolabs, Ipswich, MA, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| dNTP-Set, Natriumsalze (100 mM) | Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland |
| EGTA (Ethylenglycol-bis[2-aminoethylether-]N,N,N',N'-tetraessigsäure) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Elutionspuffer Twin-Strep | IBA GMBH, Göttingen, Deutschland |
| Essigsäure (100 %) | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Ethanol ≥99,8 % | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethylendiamintetraacetat Dinatrium Dihydrat Salz (EDTA) | (Titriplex) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Glutamin | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |

| | |
|--|--|
| Glycerin 99,5 % | Chemikalienlager der Universität Regensburg |
| Glycin | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Hypoxnathin-Aminopterin-Thymidin (HAT) | (Gibco) Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| Interleukin 6 (IL-6) | (Invitrogen) Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| Isopropanol | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Kaliumchlorid | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| L-Glutamin (200 mM) mit Penicillin/Streptomycin (100 x) | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |
| Luminol Natriumsalz | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Magermilchpulver | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Malondialdehyd (MDA) | Hölzel Diagnostika |
| Malondialdehyd Acetaldehyd (MAA) | Hölzel Diagnostika |
| Methanol | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Midori Green | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Natriumacetat-Trihydrat | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Natriumazid | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Natriumchlorid | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Natriumdodecylsulfat (SDS) ≥ 99 % | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydroxid | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Natrium-Pyruvat (100 mM) | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |
| Pepton aus Casein tryptisch verdaut | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Polyethylenglycol (PEG) 1500 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Regenerationspuffer Twin-Strep | IBA GMBH, Göttingen, Deutschland |
| Roti Quant | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Rotiphorese Gel 40 % Acrylamid/ Bisacrylamid | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Saccharose | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Salzsäure | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Salzsäure rauchend 37 % | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Affymetrix, Santa Clara, USA |
| Triton X-100 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Trypsin (0,5 %) - EDTA (0,2 %) 10x in PBS | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |

| | |
|---|--|
| Tween 20 | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid 30 % | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Xylencyanol | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| ω -(2-carboxyethyl)pyrrole (CEP)-BSA | S. Amslinger, Universität Regensburg, Institut für organische Chemie, Regensburg |

3.12 Puffer und Lösungen

Tabelle 16: Eigens hergestellte Puffer und Lösungen

| Puffer-/Lösungsname | Zusammensetzung | Menge |
|--|---|--|
| Bromphenolblaulösung | Bromphenolblau Glycerin 87 % H ₂ O _{dest} | 0,05 g 20 ml ad 50 ml |
| Coomassie-Färbelösung (short colloidal) für IP | Coomassie Brilliant Blue Ammoniumsulfat Phosphorsäure (89 %) Methanol (34 %) H ₂ O _{dest} | 1,32 g 340 g 44,9 ml 680 ml ad 2 l |
| Elutionspuffer (IgG-Aufreinigung) | Glycin HCl H ₂ O _{dest} | 0,75 g auf pH 2.7 ad 100 ml |
| <u>Erythrozytenlyse-Lösung:</u> Lösung A | Ammoniumchlorid H ₂ O _{Dest} Steril-filtrieren | 0,55 g 50 ml über 0,2 μ m Sieb |
| Lösung B | Tris-HCl (2 M) H ₂ O _{Dest} Steril-filtrieren | 4,25 ml 45,75 ml |

Material

| | | |
|---|--|---|
| → Vor Gebrauch: Lösung A + Lösung B mischen | (Verhältnis 10 : 1) | über 0,2 µm Sieb |
| FACS-PBS | 1 x PBS FCS NaN ₃ | 500 ml 2,5 % v/v 0,1 % w/v |
| Lämmli-Puffer 5x (nicht-reduziert) | Bromphenolblau Tris-HCl (pH 6,8) SDS Glycerin | 0,01 % w/v 60 mM 2 % w/v 10 % v/v |
| Lämmli-Puffer 5x (reduziert) | Bromphenolblau Tris-HCl (pH 6,8) β-Mercaptoethanol SDS Glycerin | 0,01 % w/v 60 mM 5 % v/v 2 % w/v 10 % v/v |
| Neutralisationspuffer (IgG-Aufreinigung) | Tris HCl H ₂ O _{dest} | 12,1 g Auf pH 9.0 ad 100 ml |
| PBS-Puffer 10x (pH 7.4) | NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ H ₂ O _{dest} | 80 g 2 g 14,4 g 2,4 g 1 l |
| Reinigungspuffer (IgG-Aufreinigung) | Essigsäure (98 %) H ₂ O _{dest} | 6,1 ml 93,9 ml |
| RIPA Puffer | fertige Lösung | rosa Elephant |
| Sammelgel-Puffer (pH 6.8) | Tris-HCl H ₂ O _{dest} | 0,5 M ad 200 ml |
| Saponin-Puffer | FACS-PBS Saponin | 50 ml 0,5 % w/v |
| SDS-Laufpuffer 10x | Tris-HCl Glycin SDS H ₂ O _{dest} | 25 mM 2 M 10 % w/v ad 5 l |

| | | |
|--------------------------|---|------------|
| <u>Silberfärbung:</u> | | |
| Lösung A | Essigsäure (100 %) | 10 % v/v |
| | Ethanol (100 %) | 30 % v/v |
| Lösung B | NaAc * 3H ₂ O | 6,8 % w/v |
| | Na ₂ S ₂ O ₃ * 5H ₂ O | 0,2 % w/v |
| | Glutaraldehyd (25 %) | 0,5 % v/v |
| | Ethanol | 30 % v/v |
| Lösung C | AgNO ₃ | 0,2 % w/v |
| | Formaldehyd (37 %) | 0,02 % v/v |
| Lösung D | Na ₂ CO ₃ | 2,5 % w/v |
| | Formaldehyd (37 %) | 0,01 % v/v |
| Lösung E | Glycin | 1 % v/v |
| Transfer-Puffer | Tris-HCl (1 M) | 25 ml |
| | Glycin | 14,4 g |
| | Methanol (20 %) | 200 ml |
| | H ₂ O _{dest} | ad 1 l |
| Trenngel-Puffer (pH 8.8) | Tris-HCl | 1,5 M |
| | H ₂ O _{dest} | ad 200 ml |

3.13 Medien

3.13.1 Bakterien-Nährmedien

Tabelle 17: Eigens hergestellte Bakterien-Nährmedien

| Medienname | Zusammensetzung | Menge |
|----------------|----------------------------------|-----------|
| Einfriermedium | Bakterienkultur | 825 µl |
| | Glycerin (99,5 %) | 175 µl |
| LB-Medium | Pepton/Trypton | 1 % w/v |
| | Hefeextrakt | 0,5 % w/v |
| | NaCl | 1 % w/v |
| | H ₂ O _{dest} | ad 1 l |
| LB-Agar | Pepton/Trypton | 1 % w/v |
| | Hefeextrakt | 0,5 % w/v |

| | | |
|------------|----------------------------------|-----------|
| | NaCl | 1 % w/v |
| | Bacto-Agar | 1,5 % w/v |
| | H ₂ O _{dest} | ad 1 l |
| SOC-Medium | Pepton/Trypton | 2 % w/v |
| | Hefeextrakt | 0,5 % w/v |
| | NaCl | 10 mM |
| | KCl | 2,5 mM |
| | Glukose | 20 mM |
| | H ₂ O _{dest} | ad 1 l |

3.13.2 Zellkultur-Medien für eukaryotische Zellen

Tabelle 18: Kommerzielle Kulturmedien für eukaryotische Zellen

| Medienname | Herkunft/Referenz |
|--------------------------------------|---|
| DMEM High Glucose Medium | (Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| DMEM-F12 Medium | (Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Dulbecco´s PBS | (Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Fötales Kälberserum (FCS) für Fusion | (Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Fötales Kälberserum (FCS) | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |
| OptiMEM Medium | (Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| RPMI 1640 | (Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |

Tabelle 19: Eigens hergestellte Kulturmedien für eukaryotische Zellen

| Medienname | Zusammensetzung | Menge |
|------------------------------------|--------------------|----------|
| Einfriermedium | FCS | 80 % v/v |
| | DMSO | 20 % v/v |
| Fusionsmedium (R20F ⁻) | RPMI 1640 (500 ml) | 400 ml |

| | | |
|--|--|---|
| | FCS (IgG-frei, steril) Glutamin β -ME IL-6 50 x AH/50 x HAT | 20 % v/v 1 % v/v 0,1 % v/v 0,25 % v/v 10 ml |
| HEK293T-Zellmedium | DMEM (500 ml) FCS Glutamin Pen/Strep | 450 ml 10 % v/v 1 % v/v 1 % v/v |
| Hybridomazellmedium (R20F ⁺) | RPMI 1640 (500 ml) FCS (IgG-frei, steril) Glutamin Pen/Strep β -ME IL-6 | 400 ml 20 % v/v 1 % v/v 1 % v/v 0,1 % v/v 0,25 % v/v |
| Myelomazellmedium (R10F ⁻) | RPMI 1640 (500 ml) FCS Glutamin β -Mercaptoethanol | 450 ml 10 % v/v 1 % v/v 0,1 % v/v |
| RPE-Zellmedium (alt) | DMEM-F12 (500 ml) FCS Pen/Strep | 475 ml 5 % v/v 1 % v/v |
| RPE-Zellmedium (optimiert) | DMEM high glucose (500 ml) FCS Pen/Strep Natrium-Pyruvat (100 mM) | 500 ml 1 % v/v 1 % v/v 1 mM |

3.14 Geräte

Tabelle 20: Verwendete Geräte und Materialien

| Geräte-/Materialname | Herkunft/Referenz |
|---|---|
| Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland |
| Autoklav V-150 | Systeme GmbH, Wettberg, Deutschland |
| BD FACSCalibur flow cytometer | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Brutschrank 37°C | Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland |
| CO ₂ -Inkubator | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| DS-11 Spektrophotometer | DeNovix Inc. |
| DynaMag™-2 Magnet | (Invitrogen) Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| Eclipse TE2000-S | Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland |
| Eismaschine AF 100 | Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA |
| Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN 3 | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Gelelektrophorese-Kämme | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Gravity flow Strep-Tactin Sepharose column | IBA GMBH, Göttingen, Deutschland |
| Greiner CELLSTAR 96-Kavitäten Platten | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| HiTrap Protein A HP column | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |
| HiTrap Protein G HP column | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |
| Konfokales Mikroskop VisiScope CSU-X1 | Visitron Systems, Puchheim, Deutschland |
| Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage | (Millipore) Merck Chemicals GmbH, Schwabach, Deutschland |
| Neubauer improved-Zählkammer | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Nunc-Immuno™ MaxiSorp™ 96-Kavitäten Platten | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Nunc-Immuno™ PolySorp™ 96-Kavitäten Platten | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| PD-10 Desalting Columns | GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |

| | |
|---|---|
| pH Meter | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| PVDF Membran | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland (Millipore) |
| SDS-PAGE Platten (0.5, 1.0, 1.5 mm) | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| SDS-PAGE Platten Mini Protean System Short Plates | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Sterilbank | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland |
| Strep-Tactin XT Superflow column | IBA GMBH, Göttingen, Deutschland |
| Thermocycler | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Thermomixer compact | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Transilluminator UST-30_M-8R | BioView Ltd., Billerica, MA, USA |
| Vakuumpumpe MZ 2 C | Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland |
| Varioscan Flash | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Wasserbad | GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland |
| Werkbank Heraguard | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge Biofuge pico (Tischzentrifuge) | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R (Falconzentrifuge) | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge Sigma 2-5, groß | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

3.15 Software

Tabelle 21: Software

| Software name | Herkunft/Referenz |
|---------------|---|
| AbDesigner | Trairak Pisitkun et al., Epithelial Systems Biology Laboratory, Bethesda, MD, USA |

| | |
|-----------------------------------|---|
| Adobe Illustrator CS6 | Adobe Systems GmbH, München Deutschland |
| Adobe Photoshop CS6 | Adobe Systems GmbH, München Deutschland |
| ApE - A Plasmid Editor | M.Wayne Davis, Department of Biology, University of Utah |
| BioEdit Sequence Alignment Editor | Tom Hall, Ibis Biosciences, An Abbott company, Carlsbad, CA , USA |
| BLAST | National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA |
| Chimera | UCSF, San Francisco, Ca, USA |
| GraphPad Prism 8 | Dr. Harvey Motulsky, La Jolla, CA, USA |
| Image Studio Lite | LI-COR Lincoln, Nebraska USA |
| ImageJ | National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA |
| Mendeley | Elsevier, London, Vereinigtes Königreich |
| Microsoft Office 2016 | Microsoft, Redmond, WA, USA |
| Primer3plus | Andreas Untergasser und Harm Nijveen, Boston, MA, USA |
| proABC | http://www.biocomputing.it/proABC |
| ROSIE | https://rosie.graylab.jhu.edu/antibody/submit |
| SnapGene Viewer | GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA |
| Vbase2 | Werner Mueller, Helmholtz Zentrum, Braunschweig, Deutschland |

4 Methoden

4.1 Molekularbiologie

4.1.1 Arbeiten mit *E. coli*-Bakterien

E. coli-Bakterien wurden in flüssigem LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Die Anzucht der Bakterien auf LB-Nährplatten erfolgte im Inkubator bei 37 °C.

Die Kurzzeitlagerung der *E. coli*-Bakterien erfolgte bei 4 °C. Für eine längerfristige Lagerung wichtiger Kolonien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 825 µl der Bakterienkultur mit 175 µl Glycerin (99,5 %) versetzt und bei -80 °C eingefroren.

4.1.2 Klonierung variabler Antikörpersequenzen in spezifische Plasmide

Um die variablen Antikörperregionen der schweren (V_H) und leichten (V_L) Kette, aus den cDNA-Sequenzen der monoklonalen Antikörper RETC-2 und anti-BSA 51-9, zu amplifizieren, wurden spezifische Oligonukleotid-Paare eines kommerziellen Kit-Systems verwendet (Mouse IgG Library Primer Set, Tabelle 14). Die Sequenzen für V_H und V_L wurden mittels Primerset 1 amplifiziert und die positiven Sequenzen im Agarosegel aufgereinigt und die DNA isoliert (4.1.2.8). Anschließend wurden die jeweiligen Sequenzen in den Übergangsvektor pGEM-T kloniert. Hierfür erfolgte zunächst die Polyadenylierung (*tailing*, 4.1.2.3) der cDNA-Sequenzen sowie des Vektors. Danach wurden die variablen Antikörpersequenzen in den Übergangsvektor ligiert und später über spezifische Oligonukleotide, mit enthaltenen Enzym-Sequenzen zur Klonierung in die Expressionsvektoren pFUSE2-CLIg-hk und pFUSE-CHlg-hG4e1 (3.5, Abbildung 6). Die Expressionsvektoren und die variablen Antikörperkonstrukte wurden über spezifische Enzyme gespalten (4.1.2.2) und anschließend ligiert (4.1.2.4). Die fertigen Expressionsvektor-Konstrukte, die sowohl konstante Regionen eines humanen IgG4 Antikörpers als auch die spezifischen murinen variablen Regionen enthalten (Abbildung 6), wurden in *E. coli JM109* transformiert (4.1.2.5) und die Vektoren final isoliert (4.1.2.1).

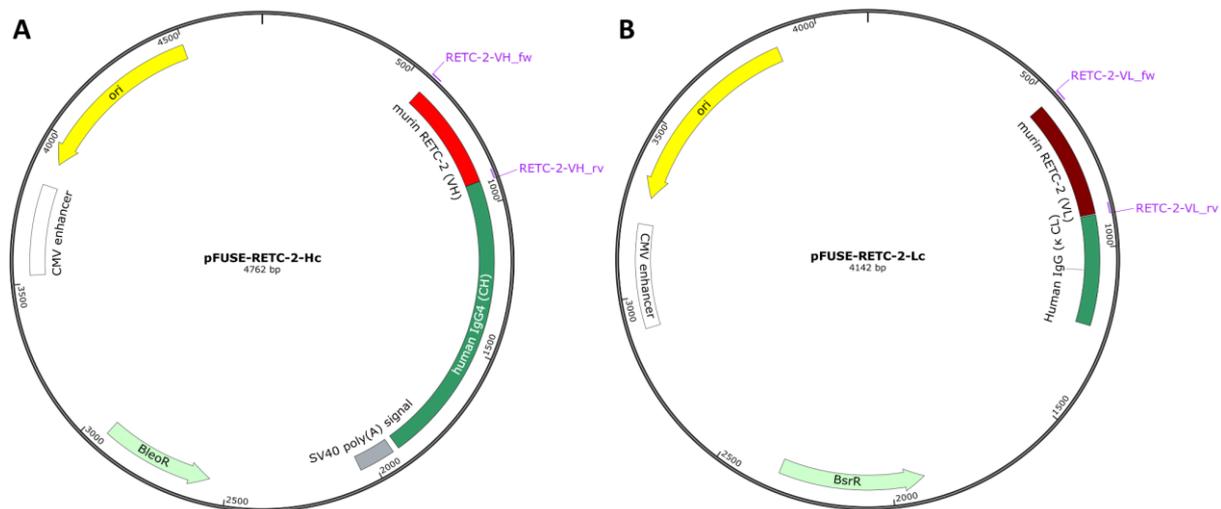


Abbildung 6: Vektorkonstrukte zur Chimärisierung von RETC-2.

(A) Vektorkonstrukt der schweren IgG-Kette enthält konstante Region des humanen IgG4 (C_H) und die spezifische variable Region des murinen mAk RETC-2 (V_H). **(B)** Vektorkonstrukt der leichten IgG-Kette enthält konstante humane IgG κ Region (C_L) und die spezifische variable Region des murinen mAk RETC-2 (V_L).

4.1.2.1 Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kit-Systemen gemäß Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt. Es wurde jeweils ein Klon gepickt, in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Für den 100 ml-Ansatz wurde der „NucleoBond XtraMidi Kit“ (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 200 µl Millipore H₂O eluiert. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte anschließend Spektrophotometer bei 260 nm.

4.1.2.2 Restriktion mittels Enzymen

Der Verdau der Expressionsvektoren pFUSE, sowohl für die schwereAntikörperkette als auch für die leichte Kette (Tabelle 7) und der cDNA-Fragmente von V_H und V_L erfolgte mit verschiedenen Enzymen (Tabelle 22). Der Verdau erfolgte für 2 h bei 37 °C und wurde anschließend über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (4.1.2.7) und aufgereinigt (4.1.2.8).

Tabelle 22: Restriktionsansätze für die Klonierung der schweren und leichten Antikörperketten.

| | pFUSE2-CLlg-hk | pFUSE-CHlg-hG4e1 |
|---|----------------|------------------|
| Plasmid-DNA / cDNA-variable Antikörpersequenz | 1 µg / 1 µg | 1 µg / 1 µg |
| CutSmart-Puffer (10x) | 2 µl | 2 µl |
| MluI | 0,2 µl | |
| NotI | 0,2 µl | |
| NcoI | | 0,2 µl |
| HindIII | | 0,2 µl |
| H ₂ O _{dest} | ad 20 µl | ad 20 µl |

4.1.2.3 Tailing

Für die Klonierung der variablen Antikörpersequenzen (V_H und V_L) in den Übergangsvektor pGEM-T mussten die Konstrukte zunächst polyadenyliert werden (Tabelle 23). Der Ansatz wurde anschließend für 20 min bei 70 °C inkubiert.

Tabelle 23: Tailing-Ansatz zur Klonierung der cDNA-Konstrukte in pGEM-T.

| Menge/Volumen | Komponenten |
|---------------|--------------------------------|
| 2 µl | DNA-Konstrukte |
| 2 µl | dATP (1 mM) |
| 2 µl | 5 x GoTaq Polymerasepuffer |
| 0,6 µl | MgCl ₂ (25 mM) |
| 1 µl | GoTaq Polymerase |
| 2,4 µl | destilliertes H ₂ O |

4.1.2.4 Ligation

Die Ligation der Vektorkonstrukte mit den cDNA-Sequenzen der variablen Antikörperregionen erfolgte über Nacht bei 4 °C (Tabelle 24, Tabelle 25).

Tabelle 24: Ligationsansatz der cDNA-Sequenzen der Antikörperkonstrukte in pGEM-T.

| Menge/Volumen | Komponenten |
|---------------|--------------------------------|
| 2 µl | Tailing-Ansatz |
| 1 µl | pGEM-T |
| 5 µl | 2 x Ligationspuffer |
| 1 µl | T4 Ligase |
| 1 µl | destilliertes H ₂ O |

Tabelle 25: Ligationsansatz der cDNA-Sequenzen der Antikörperkonstrukte in pFUSE.

| Menge/Volumen | Komponenten |
|---------------|--|
| 2 µl | cDNA V _H und V _L |
| 1 µl | pFUSE |
| 5 µl | 2 x Ligationspuffer |
| 1 µl | T4 Ligase |
| 1 µl | destilliertes H ₂ O |

4.1.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien

Für die Transformation wurde ein bereits chemisch kompetenter *E. coli*-Stamm *JM109* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die Bakterien (100 µl) wurden für 15 min auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Ligationsansatzes (4.1.2.4) transformiert. Die DNA und die *E. coli*-Zellen wurden durch kurzes, heftiges Bewegen gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C in einem vorgeheizten Wasserbad, und eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurde das Reaktionsgemisch für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten, inklusive Ampicillin, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um am nächsten Tag Einzelkolonien zu picken.

4.1.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die cDNA-Sequenzen der variablen Antikörperkonstrukte mit Hilfe des Mouse IgG Library Primer Set (Progen Kit-System, Tabelle 14) amplifiziert, um es später in den Zielvektor zu klonieren. Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm erfolgte nach Herstellerangaben. Um die cDNA-

Sequenzen von V_H und V_L mit spezifischen Restriktionsschnittstellen zu versehen, wurden die Konstrukte mittels spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 4) aus dem pGEM-T Vektor amplifiziert (Tabelle 26, Tabelle 27), und aus dem Agarosegel aufgereinigt (4.1.2.8).

Tabelle 26: PCR-Ansatz zur Vervielfältigung der spezifischen variablen cDNA-Konstrukte aus pGEM-T.

| Menge/Volumen | Komponenten |
|--------------------------|--------------------------------------|
| 1 µl | DNA |
| 5 µl | Phusion - Puffer |
| 0,5 µl | dNTP |
| 2 µl (1 µl fw + 1 µl rv) | Oligonukleotide |
| 0,75 µl | DMSO |
| 0,25 µl | Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase |
| 16 µl | destilliertes H ₂ O |

Tabelle 27: PCR-Programm zur Amplifikation der cDNA-Antikörperkonstrukte.

| Reaktionsschritt | Temperatur | Dauer | Anzahl der Zyklen |
|-------------------------------|------------|-------|-------------------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C | 2 min | 33 |
| Denaturierung | 94 °C | 30 s | |
| Annealing | 65 °C | 30 s | |
| Elongation | 72 °C | 30 s | |
| Denaturierung | 94 °C | 30 s | |
| Finale Elongation | 72 °C | 4 min | |
| Pause | 4 °C | ∞ min | |

4.1.2.7 Agarosegel-Elektrophorese

Zur Visualisierung der DNA-Fragmente (PCR-Produkte, Plasmide) wurden diese in 1 – 2 %igen-Agarosegelen in TBE-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine entsprechende DNA Leiter (Tabelle 13). Damit die aufgetrennten Proben auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht werden können, wurde den flüssigen Agarosegelen 7 µl Midori Green hinzugefügt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 30 – 60 min.

4.1.2.8 Extraktion und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente (4.1.2.7) wurden mittels Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten und mit Hilfe des „*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit*“ (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die aufgereinigten Proben wurden abschließend in 20 µl H₂O_{dest} eluiert und die DNA-Konzentration im Spektrophotometer gemessen.

4.1.2.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde von der Firma Geneart (Thermo Fisher Scientific, Regensburg, Deutschland) übernommen. Die Sequenzen wurden anschließend mit *ApE*, *SnapGene Viewer* und dem *BioEdit Sequence Alignment Editor* analysiert (Tabelle 21).

4.2 Zellkultur

4.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Arbeit mit eukaryotischen Zellen, sowohl mit Suspensionszellen (4.2.1.1), als auch mit adhärennten Zellen (4.2.1.2), erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden unter konstanten Bedingungen (37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre) in einem Feuchtinkubator kultiviert.

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte im Stickstofftank (-196 °C). Dafür wurden zunächst jeweils 800 µl Zellkultur mit 800 µl Einfriermedium (Tabelle 19) versetzt und in einer Box über Nacht bei -80 °C eingelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofflagerungstank überführt.

4.2.1.1 Suspensionszellen

Die Mausmyelomzelllinie P3X63Ag8.653 und eigens fusionierten Hybridomazellen (Tabelle 2) wurden in Zellkulturflaschen, mit einer Konzentration von 150.000 Zellen/ml, in speziellen Medien (Tabelle 19), kultiviert.

Die Zell-Ernte erfolgte mittels Zentrifugation für 8 Minuten bei 380 x g. Der Überstand wurde verworfen, oder zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingelagert. Das entstandene Zellpellet wurde in frischem Zellkultur-Medium suspendiert, die Zellen über eine

Neubauer improved-Zählkammer gezählt und auf eine bestimmte Zellzahl mit frischem Medium, zur weiteren Kultivierung, eingestellt.

4.2.1.2 Adhärente Zellen

ARPE-19

Humane ARPE-19 Zellen Passage 38 (P38) oder P25 (Tabelle 2) wurden für sechs Tage in Zellkulturflaschen in unterschiedlichen Medien kultiviert: (i) P38, RPE-Zellmedium (alt), und (ii) P25, RPE-Zellmedium (optimiert) (Tabelle 19). Die Zellen wurden anschließend trypsiniert und auf Maus-Laminin beschichtete Transwell-Filter, mit einer Konzentration von $1,6 \times 10^5$ Zellen/m², ausplattiert. Die Zellen wurden für sechs Wochen kultiviert, und alle drei Tage erfolgte ein apikaler und basaler Medienwechsel. Vor der Behandlung mit FHR-3 wurde das im Medium befindliche FCS innerhalb von drei Tagen auf 0 % reduziert. Anschließend wurden die Zellen für 2 h, 5 h, 12 h oder 24 h apikal mit rekombinantem FHR-3 (50 µg/ml) behandelt.

HEK293-T

Die humane embryonale Nierenzelllinie *HEK293-T* wurde für die Transfektions-Experimente verwendet (4.2.2). Die Zellen wurden für eine Woche in Zellkulturflaschen in speziellem Medium (Tabelle 19) kultiviert. *HEK293-T* wurden einmal passagiert, wenn sie eine Konfluenz von 80 – 90 % erreichten. Anschließend wurden sie für die Transfektion in 10 cm-Kulturschalen vereinzelt. Die Transfektion erfolgte, wenn die Zellen zwischen 50 – 70 % konfluent waren.

4.2.2 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mit Plasmid-DNA

Die pFUSE-Vektorkonstrukte (Abbildung 6) und die *CFHR3*-Expressionsvektorkonstrukte (Tabelle 7) wurden in unterschiedlichen Versuchen über Lipofektion, mittels *TransIT-LTI Transfektionsreagenz* (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA), in *HEK293-T*-Zellen transient eingebracht. Die Transfektion erfolgte in 10 cm-Schalen mit je 15 µg Plasmid-DNA gemäß Herstellerangaben. Die transfizierten Zellen wurden für 72 Stunden bei 37 °C kultiviert. Die sezernierten Proteine wurden aus dem Zellkulturüberstand mittels spezifischer Chromatographie-Säulen aufgereinigt (4.4.1, 4.5.7).

4.3 RNA-Analyse

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen erfolgte mittels *NucleoSpin RNA*-Kit (MACHEREY-NAGEL) nach Angaben des Herstellers (Tabelle 14). Die Zellen wurde mittels Lysepuffer mit enthaltenem β -Mercaptoethanol lysiert. Die RNA wurde anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, um einen Abbau der RNA zu vermeiden.

4.3.1 cDNA Synthese

Die Herstellung der cDNA aus der aufgereinigten mRNA (1 μg) erfolgte mit Hilfe des *QuantiTect®Reverse Transcription*-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers und wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Weiterverarbeitung gelagert.

4.3.2 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die Transkripte von verschiedenen Komplement- und Inflammations-assoziierten Markern (Tabelle 5, Tabelle 6) wurden mit Hilfe des *Rotor-Gene SYBR®Green PCR*-Kit nach Herstellerangaben, mittels SYBR Green Methode¹⁰⁴, in einem Rotor Gene Q 2plex Cycler (Qiagen) analysiert. Die Daten wurden mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet. Die Werte wurden auf einer linearen Skala mit logarithmisch transformierten Werten dargestellt, um die Zunahme und Abnahme der Expressionen gleichermaßen zu visualisieren.

4.4 Proteinbiochemie/Proteomics

4.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Nach der Behandlung wurden ARPE-19 Zellen im Transwell mittels RIPA Puffer (Sigma-Aldrich) inklusive Protease- und Phosphatase-Inhibitor (1 : 100, Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben gelöst und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

4.4.2 Aufreinigung von Proteinen mittels *Strep-Tactin* Sepharose Säulen

Die Aufreinigung der überexprimierten FHR-3 Proteine erfolgte mittels *Strep-Tactin* Sepharose Säulen (IBA GmbH). FHR-3 enthält einen C-terminaler *Strep*-Tag, der spezifisch an *Strep-Tactin*, einem technisch veränderten Streptavidin, bindet. Die Proteine können mit Hilfe von Desthiobiotin, aufgrund der kompetitiven Bindung zu *Strep-Tactin*, mild und hoch-spezifisch eluiert werden. Die Aufreinigung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

Der Zellkulturüberstand wurde vor der Aufreinigung für 8 Minuten bei 380 x g zentrifugiert und anschließend steriltrifert. Ein essenzieller Schritt bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins war die Einstellung des pH-Wertes auf 7.0 – 7.5, und die Zugabe von Biotin-Inhibitoren, um restliches Biotin aus dem Medium abzublocken.

4.4.3 Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden denaturierende 10 – 12 %-SDS-Gele verwendet, die aus Sammelgel und Trenngel zusammengesetzt waren (Tabelle 28 – 29).

Die Proteinproben wurden vor dem Gellauf mit 5x Lämmli-Puffer, je nach Versuch reduziert (alle Western Blots mit ARPE-19 Zellen) oder nicht-reduziert (Immunpräzipitation), versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Der Lauf erfolgte für 90 Minuten bei 40 mA/Gel.

Tabelle 28: Zusammensetzung Sammelgel und Trenngel, für zwei Mini-Gele

| Name | Komponenten | Menge/Volumen | |
|-----------------|----------------------------------|---------------|--------|
| | | 10 % | 12 % |
| Trenngel | H ₂ O _{dest} | 4,8 ml | 4,3 ml |
| | Trenngel-Puffer (pH 8.8) | 2,5 ml | 2,5 ml |
| | 10 % SDS | 100 µl | 100 µl |
| | Acrylamid/ Bisacrylamid | 2,5 ml | 3 ml |
| | 10 % APS | 100 µl | 100 µl |
| | TEMED | 10 µl | 10 µl |
| Sammelgel (4 %) | H ₂ O _{dest} | 3,05 ml | |
| | Sammelgel-Puffer (pH 6.8) | 1,25 ml | |
| | 10 % SDS | 50 µl | |
| | Acrylamid/ Bisacrylamid | 650 µl | |
| | 10 % APS | 25 µl | |
| | TEMED | 10 µl | |

4.4.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine unspezifisch mittels Coomassie Instant Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) detektiert. SDS-Gele wurden für 30

Minuten in Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert und konnten im Anschluss direkt visualisiert werden (Tabelle 16).

Bei der Short Colloidal Coomassie-Färbung (Tabelle 16), die für immunpräzipitierte Proteine verwendet wurde (4.5.8), wurden die Gele einmal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gespült und danach konnten die entsprechenden Banden für die Analyse über Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (4.4.6) ausgeschnitten werden. Die Nachweisgrenze dieser Coomassie-Färbung liegt bei ca. 2 – 12 ng Protein pro Gelbande ¹⁰⁵.

4.4.5 Silber-Färbung von Polyacrylamidgelen

Für die Silberfärbung müssen die verschiedenen Lösungen für jeden Ansatz frisch angesetzt werden (Tabelle 16). Zunächst wurden die SDS-Gele für 30 Minuten in Lösung A schüttelnd inkubiert und danach über Nacht in Lösung B geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ erfolgte die Inkubation für 20 Minuten in Lösung C. Die Färbung der Proteine wurde durch Zugabe von Lösung D eingeleitet, und dauerte je nach Sicht zwischen 1–20 Minuten (Lösung D nach ca. 1 Minute durch frische Lösung D ersetzt). Die Reaktion wurde abschließend mit Lösung E gestoppt (Tabelle 16).

4.4.6 Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Gel-basierte LC-MS/MS

Für die Analyse von immunpräzipitierten Proteinen wurden die gewünschten Banden aus dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel herausgeschnitten, und bei -20 °C eingelagert. Die Aufarbeitung der einzelnen Gelbanden und die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine wurde an der Universität Regensburg, Institut für funktionelle Genomik, Regensburg, mittels LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) und Ultimate 3000 nano-HPLC System (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig), durchgeführt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte abschließend über eine spezielle Software (Mascot), die Massenspektrometrie-Daten nutzt, um Proteine aus bekannten Datenbanken (UniProt) zu bestimmen ¹⁰⁶.

Nicht Gel-basierte LC-MS/MS

Für die Analyse von immunpräzipitierten Proteinen wurden die gewünschten Banden aus dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel herausgeschnitten, und bei -20 °C eingelagert. Die weitere Verarbeitung erfolgte von Stefanie Hauck im Helmholtz Zentrum München mittels nano-LC-MS/MS Analyse eines TripleTOF 5600+ Massenspektrometers (Sciex, Darmstadt).

4.5 Immunologie

4.5.1 Western Blot Analyse

Für die Western Blot Analyse wurden Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE, mittels Wet-Blot Verfahren, auf eine aktivierte PVDF-Membran übertragen. Der Protein-Transfer aus dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgte für 150 min bei 100 mA/Gel. Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde in 3 % BSA/PBS-T (PBS + 0,2 % Tween20) blockiert, und anschließend im Primärantikörper (Tabelle 9), verdünnt in 3 % BSA/PBS, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor der Inkubation im Sekundärantikörper für eine Stunde, wurde die Membran dreimal für je 15 min in PBS-T gewaschen. Dieser Waschschrift wurde nach der Inkubation im zweiten Antikörper wiederholt. Die Detektion der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz-Reaktion mit Hilfe des sensitiven WesternSure PREMIUM Substrates (LI-COR) (Tabelle 15). Die Blots wurden im Alpha Innotech FluorChem FC2 Imaging System visualisiert und anschließend über Image Studio Lite (LI-COR, Tabelle 21) quantifiziert.

4.5.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.5.2.1 Indirekter ELISA zum Nachweis der Antikörperbindung

96-Kavitäten *Nunc Immuno PolySorp*-Platten wurden mit 1–10 µg/ml Antigen in PBS beschichtet (50 µl/Kavität, über Nacht, 4 °C). Nach allen Inkubationsschritten folgten jeweils drei Waschschriffe mit ELISA-Waschpuffer (200 µl/Kavität). Die Platten wurden mit 2 % Magermilchpulver/PBS-T (MaMiPu) (200 µl/Kavitäten) für 60 min geblockt und danach für 60 min mit 50 µl/Kavität Probe (Hybridomüberstände, Primärantikörper) in 2 % MaMiPu inkubiert. Die anschließende Detektion erfolgte für 30 min mit Peroxidase-gekoppeltem anti-Maus IgG-Antikörper (1:5000, Tabelle 10) in 2 % MaMiPu. Nach einem letzten Waschschrift (6 x mit PBS-T) wurde der ELISA mit TMB (100 µl/Kavität) entwickelt und die Reaktion nach 15 – 30 Minuten mit 1 N HCl (100

µl/Kavität) gestoppt. Die Signale wurden bei einer Extinktion von 450 nm im *Varioscan Flash* ELISA-Reader gemessen.

4.5.2.2 ELISA zur C3b und oxidativer Stressmarker Interaktion

96-Kavitäten *Nunc Immuno PolySorp*-Platten wurden mit 10 µg/ml C3b, CEP, MDA oder MAA in PBS beschichtet (50 µl/Kavität, über Nacht, 4 °C). Die Blockierung erfolgte für eine Stunde mittels *Casein Diluent Blocker* (Senova GmbH). FHR-3 (10 µg/ml, 200 nM) und RETC-2 (100 µg/ml, 666 nM) wurden für eine Stunde in PBS vorinkubiert. Die Inkubation von FHR-3, FH (2,6 µg/ml, 16 nM) und FHR-3 mit RETC-2, auf den beschichteten Platten, erfolgte für 15 min. Für die Standardkurven wurden die Antigene für eine Stunde seriell verdünnt (FHR-3 0,7 – 1500 nM, FH 0,2 – 6451,6 nM in PBS). Die Bindung wurde entweder mit Maus anti-FH Antikörper (2,5 µg/ml in PBS) und anti-Maus IgG-POD (1:5000 in PBS), oder mit StrepMAB-HRP (1:40000 in PBS) detektiert (Tabelle 9). Die Entwicklung erfolgte mit TMB (100 µl/Kavität) und die Signale wurden bei einer Extinktion von 450 nm im *Varioscan Flash* ELISA-Reader gemessen.

4.5.2.3 Sandwich-ELISA zur Detektion von FHR-3 in humanem Serum

96-Kavitäten *Nunc Immuno MaxiSorp*-Platten wurden mit 10 µg/ml RETC-2 (mAk 269-5) in PBS beschichtet (über Nacht, 4 °C). Die Blockierung erfolgte für eine Stunde mittels 2 % MaMiPu. Human Serumproben (1:20, 1:40) und rekombinantes FHR-3 (1,4 – 1000 ng/µl), in 2 % MaMiPu, wurden für eine Stunde inkubiert. Die Detektion erfolgte für eine Stunde mittels Detektionsantikörper Maus anti-FHR-3.4 (0,3 µg/ml in 2 % MaMiPu, Tabelle 9) und Streptavidin-HRPO (1:5000 in 2 % MaMiPu, Tabelle 11). Die Entwicklung erfolgte mit TMB (100 µl/Kavität) und die Signale wurden bei einer Extinktion von 450 nm im *Varioscan Flash* ELISA-Reader gemessen.

4.5.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Überprüfung der Klonalität und der IgG-Produktion der generierten Hybridomazelllinien wurde eine intrazelluläre IgG-Färbung mit anschließender Analyse im Durchflusszytomer durchgeführt.

Dafür wurden 100 – 300 µl einer Zellsuspension (500.000 Zellen/ml) für 5 min bei 400 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 200 µl PBS gewaschen (5 Minuten, 400 x g, 4 °C). Die Zellen wurden mit 100 µl PBS

resuspendiert und mit 4 %-Formaldehydlösung (100 µl) für 20 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit PBS und FACS-PBS (Tabelle 16) gewaschen. Danach folgte die Permeabilisierung der Zellmembranen mittels Saponin-Puffer (150 µl, Tabelle 16), gefolgt von einer Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4 °C). Die Färbung erfolgte mittels Detektionsantikörper (anti-Maus Ig-Alexa 488, 1:2000 in Saponin-Puffer, Tabelle 10) für 30 min im Dunkeln. Anschließend wurden 150 µl Saponin-Puffer hinzugefügt, die Zellen abzentrifugiert (5 min, 400 x g, 4 °C) und das Pellet in 200 µl FACS-PBS aufgenommen. Danach wurden die Proben im *BD FACS Calibur flow cytometer* gemessen.

4.5.4 Immunhistologie

Humane Spenderretinae

Spenderaugen wurden in 4 % Paraformaldehyd für 48 h fixiert und die vorderen Segmente entfernt. Die Augen wurden in einem Sucrose-Gradienten (10 – 30 % für drei Tage) kältgeschützt und anschließend in Gefrierschnittmedium Neg-50 (Thermo Fisher) eingebettet. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte auf 25 µm dicken Schnitten. Die Schnitte wurden mit 3 % DMSO/0,3 % Triton-X-100/5 % Eseserum in PBS für eine Stunde blockiert. Die Primärantikörper (Tabelle 9) wurden über Nacht in Blockierlösung inkubiert und mittels Sekundärantikörper (Tabelle 10) in PBS für 30 min detektiert. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (1:1000, Thermo Fisher) visualisiert. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden mittels *VisiScope CSU-X1 Confocal System* (Visitron Systems) und einer *high-resolution sCMOS* Kamera ausgewertet.

ARPE-19 Zellen im Transwell

Nach der Behandlung wurden ARPE-19 Zellen im Transwell immunhistologisch gefärbt. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd (20 min) fixiert. Die fixierten Zellen wurden mittels PBS-T für 45 min permeabilisiert. Die Primärantikörper wurden über Nacht bei 4 °C in PBS inkubiert (Tabelle 9) und anschließend mittels fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern in PBS für 45 min detektiert (Tabelle 10). Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 (1:1000, Thermo Fisher) visualisiert. Die Zellen wurden mittels Dako Einbettmedium auf Objektträgern fixiert. Die Immunfluoreszenz-

Aufnahmen wurden mittels *VisiScope CSU-X1 Confocal System* (Visitron Systems) und einer *high-resolution sCMOS* Kamera ausgewertet.

4.5.5 Antikörper-Isotypbestimmung

Der Isotyp der generierten monoklonalen Antikörper wurde mit Hilfe des *Mouse Isotyping Kits* (AbD serotec) bestimmt. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

4.5.6 Biotinylierung von Antikörpern

Für die Biotinylierung wurden jeweils 500 µl Antikörperlösung (1 mg/ml in PBS) mit 50 µl Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) und 5 µl Biotin-NHS für eine Stunde schüttelnd inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl Natriumazid (NaN_3 , 10 %) gestoppt und die Lösung über spezifische *PD-10* Entsalzungssäulen (GE Healthcare) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die eluierten Fraktionen wurden im Spektrophotometer bei 280 nm gemessen.

4.5.7 Aufreinigung von Antikörpern mittels HiTrap Protein G HP Säulen

Der Überstand von Antikörper-produzierenden Hybridomazellen, oder der chimärisierten Antikörper wurde gesammelt und für die Aufreinigung über eine Protein G-Säule (*HiTrap Protein G HP Säule*) vorbereitet. Die Überstände wurden für 15 min bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert und anschließend steril-filtriert (0,45 µm), um Zell-Debris zu entfernen. Die Schläuche der Peristaltikpumpe wurden mit 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und 50 ml PBS gespült, und danach die *HiTrap Protein G HP-Säule* angeschlossen und mit 50 ml PBS gespült. Die Fließgeschwindigkeit wurde auf 5 ml/min eingestellt. Die Überstände wurden im nächsten Schritt durch die Säule gepumpt und anschließend die Säule mit 50 ml PBS gespült. Die Antikörper wurden mit 25 ml Elutionspuffer (Tabelle 16) von der Säule eluiert (25 x 1 ml Fraktionen). Die Fraktionen wurden mit jeweils 25 µl Neutralisationspuffer (Tabelle 16) versetzt, um den pH-Wert auf 7,0 einzustellen. Die IgG-Konzentration wurden mittels Spektrophotometer bei 280 nm gemessen, und die Fraktionen mit den höchsten gesammelt. Die Protein G-Säule wurde am Ende der Aufreinigung mit jeweils 50 ml PBS, $\text{H}_2\text{O}_{\text{Dest}}$ und Ethanol (20 %) gespült und danach mit Ethanol (20 %) gefüllt, verschlossen und bei 4 °C bis zur nächsten Verwendung gelagert. Die Antikörper wurden nach der Aufreinigung gegen

PBS dialysiert (über Nacht, 4 °C), mittels *Amicon Ultra-4* Zentrifugen-Filtereinheiten (Merck Millipore) nach Herstellerangaben eingeeengt und die Konzentration bestimmt.

4.5.8 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden 5 mg tosylaktivierte Dynabeads (Life Technologies), gemäß Herstellerangaben, an 100 µg monoklonale Antikörper gekoppelt. Danach wurde humanes Serum (NHS, 1,5 ml) für eine Stunde mit 50 µl Antikörper-gekoppelten Dynabeads inkubiert. Nach Waschen mit PBS-T wurden die präzipitierten Proteine mit 50 µl nicht-reduzierendem Lämmli-Puffer (1 x, Tabelle 16) eluiert, für 10 min bei 95 °C denaturiert, und in der SDS-PAGE eingesetzt (4.4.3).

4.5.9 Hybridomtechnik

4.5.9.1 Immunisierung

Die Mäuse wurden im Intervall mittels Antigene immunisiert (Anhang Tabelle 29). Die erste Applikation erfolgte intraperitoneal (i.p.) in komplettem Freundschem Adjuvans (FCA), um eine Immunantwort anzuregen. Die Folgeinjektion (i.p.) wurden in inkomplettem Freundschem Adjuvans (FIA) verabreicht. In den letzten drei Tagen vor der Fusion wurden pro Maus jeweils die Antigene (in PBS) als finale „Boosts“ appliziert. Den Tieren wurde vor der Immunisierung, jeweils elf Tage nach den Injektionen und am Tag der Fusion Blut abgenommen, um den Antikörpertiter zu bestimmen (Abbildung 7).

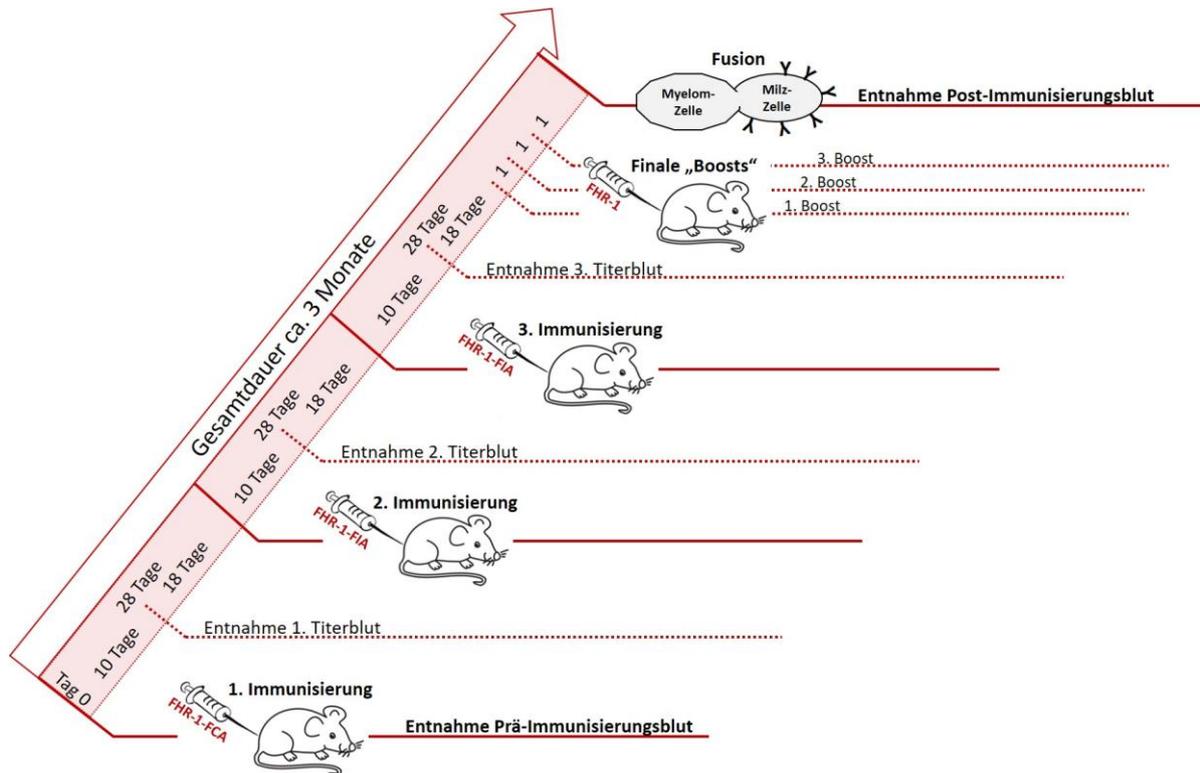


Abbildung 7: Maus-Immunisierungsschema zur Herstellung spezifischer FHR-1 mAk.

Die erste Immunisierung (Tag 0) erfolgte entweder mit spezifischen FHR-1 Peptiden gekoppelt an Trägerprotein BSA (50 µg), rekombinantem oder nativem FHR-1 (20 – 30 µg), jeweils in komplettem Freundschens Adjuvans (FHR-1-FCA). Alle weiteren Immunisierungen erfolgten in inkomplettem Freundschens Adjuvans (FHR-1-FIA). In den finalen „Boosts“ wurden Peptid-BSA oder FHR-1, ohne Adjuvans, injiziert. Anschließend wurde die Milz entnommen, die Milzzellen mit immortalen Myelomzellen fusioniert und die Antikörper-produzierenden Hybridomazellen selektiert und kultiviert.

4.5.9.2 Zellfusion

Zunächst wurden die für die Fusion benötigten Zellen vorbereitet. Zwei Balb/c Mäuse wurden durch zervikale Dislokation (genehmigt über TVA 2532-2-190, 3.1.3) getötet und die Thymi entnommen. Diese wurden in einem Sieb (212 µm) zerkleinert und die Zellsuspension in 20 ml PBS/1 %-Pen/Strep-Lösung aufgenommen. Die Thymozyten wurden für acht Minuten bei 380 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml R10F⁻ (Tabelle 18) resuspendiert. Die Zelldichte wurde über eine *Neubauer improved-Zählkammer* bestimmt.

Parallel dazu wurde die Milz einer immunisierten Maus (4.5.9.1) entnommen. Diese wurde ebenfalls in einem 212 µm Sieb zerkleinert und die Splenozyten in 20 ml PBS/1 %-Pen/Strep-Lösung aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (8 min, 380 x g) wurde das Pellet in 20 ml PBS/1 %-Pen/Strep-Lösung resuspendiert, durch ein 70 µm Sieb gefiltert und nochmals zentrifugiert (8 min, 380 x g). Danach wurden

die vorhandenen Erythrozyten über eine Erythrozytenlyse-Lösung (Tabelle 16) lysiert und die Zellsuspension nach vier Minuten mit 36 ml PBS/1 %-Pen/Strep-Lösung versetzt. Nach einem weiteren Filter- und Zentrifugationsschritt (70 μ m, 8 min, 380 x g) wurden die Splenozyten in 20 ml RPMI 1640 (Tabelle 18) aufgenommen und die Zelldichte bestimmt.

Im nächsten Schritt wurden die kultivierten Myelomazellen (Tabelle 2) präpariert. Dafür wurden zwischen 400 – 600 ml Zellsuspension zentrifugiert (8 min, 380 x g), das Zellpellet zweimal mit RPMI 1640 gewaschen und anschließend in 30 ml RPMI 1640 resuspendiert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte über eine *Neubauer improved-Zählkammer*.

Für die Fusion wurden 100×10^6 Splenozyten mit 50×10^6 Myelomazellen, mittels Polyethylenglycol (PEG) 1500, nach Standardprotokoll fusioniert ¹⁰⁷. Die Zellen wurden auf 50 – 60 96-Kavitäten Platten, in R20F⁻ (Tabelle 19) inklusive Thymozyten (100×10^6) als Fütterzellen, ausplattiert und für 18 Tage kultiviert. Am Tag sieben und acht nach der Fusion erfolgte jeweils ein Medien austausch (Entnahme von 100 μ l Überstand und Zugabe von 150 μ l frischem R20F⁻).

4.5.9.3 Screening von Antikörper-produzierenden Hybridomaklonen

An den Tagen 10, 11, 14 und 17 nach der Fusion wurden jeweils 50 μ l Hybridomaüberstand (nur aus Zellkulturkavitäten mit ca. 15 % Hybrioma-Wachstum) auf FHR-1 Bindung in einem indirekten ELISA (4.5.2.1) getestet. Positive Hybridomaklone wurden isoliert, am Folgetag nochmal im ELISA getestet und danach über eine serielle Verdünnungsreihe subkloniert, um Einzelklone zu erhalten. Die Stabilität und Klonalität der positiven Einzelklone wurde mittels intrazellulärer IgG-Färbung und anschließender Analyse im Durchflusszytomer (4.5.3) überprüft.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der mRNA Expressionsänderungen erfolgte mittels nicht-parametrischem two-tailed, unpaired t-test (Mann-Whitney test), und die Protein-Quantifizierung erfolgte entweder mittels Kruskal-Wallis test mit Dunn's multiple comparison (für Western Blot Auswertungen) oder mit nicht-parametrischem two-tailed, unpaired t-test (Mann-Whitney test) für ELISA Auswertungen. Es wurde die GraphPad Prism 8 Software (GraphPad Software Inc.) verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2 und FHR-3

5.1.1 RETC-2 detektiert spezifisch humanes FHR-3

Zu Beginn des Promotionsprojektes wurden die in der Masterarbeit generierten, spezifischen monoklonalen Antikörper gegen humanes FHR-3 (RETC-2, RETC-3, RETC-5, RETC-7) eingehend charakterisiert. Dabei wurde RETC-2 als affinster Antikörper (Abbildung 8C) und als hochspezifisch für FHR-3 nachgewiesen, der weder FH noch die anderen FH-verwandten Proteine FHR-1, FHR-2, FHR-4A, FHR-4B oder FHR-5 (Abbildung 8A, B) im ELISA detektiert. FHR-4A (Short Consensus Repeat (SCR)-Domäne 9) und FHR-4B (SCR5) weisen eine Sequenzidentität von 93 % zur FHR-3-Bindedomäne (SCR5) von RETC-2 auf. Obwohl sich das 11-Aminosäure-lange Epitop in der SCR5 von FHR-3 nur um zwei Aminosäuren zu den entsprechenden Domänen von FHR-4A und FHR-4B unterscheidet, detektierte der Antikörper RETC-2 hochspezifisch nur FHR-3 im Western Blot (Abbildung 8B) ⁴⁰.

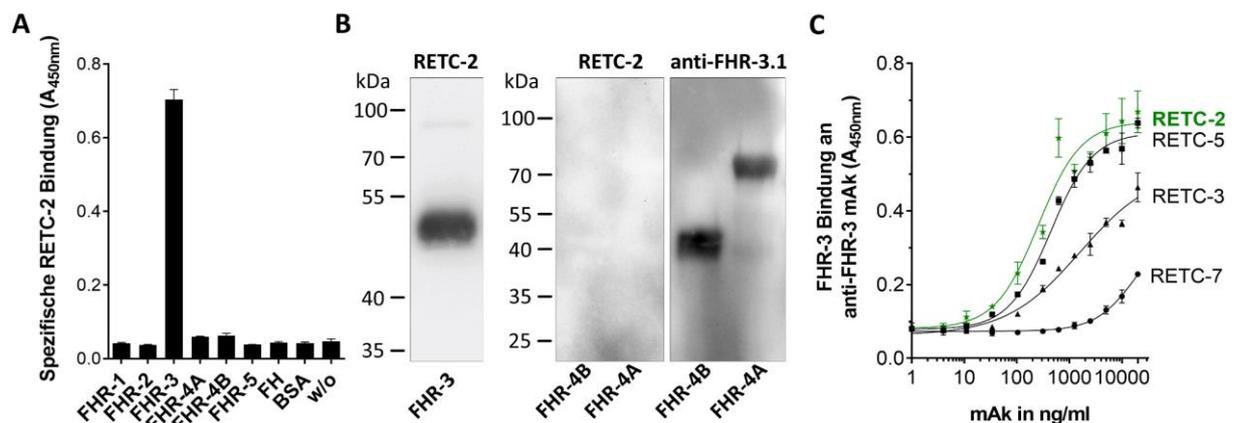


Abbildung 8: Der monoklonale Antikörper RETC-2 detektierte spezifisch rekombinantes humanes FHR-3.

(A) RETC-2 reagierte im ELISA ausschließlich mit rekombinantem humanem FHR-3, und nicht mit den anderen Proteinen der FH-Familie. **(B)** Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass RETC-2 spezifisch FHR-3 detektierte und nicht FHR-4A oder FHR-4B (93 % Sequenzidentität zu FHR-3), im Vergleich zu einem weiteren anti-FHR-3 Antikörper (anti-FHR-3.1). **(C)** RETC-2 zeigte die größte Bindungsstärke zu FHR-3 im ELISA, im Vergleich zu den anderen generierten anti-FHR-3 Antikörpern RETC-5, RETC-3 und RETC-7. mAk = monoklonaler Antikörper. (Abbildung aus Schäfer et al. 2016) ⁴⁰.

Die Spezifität des RETC-2 Antikörpers wurde durch Detektion von nativem FHR-3 aus humanem Serum (NHS) mittels Western Blot (Abbildung 9A) und Immunopräzipitations-Analysen (Abbildung 9B, C) bestätigt. Natives FHR-3 wurde im humanem Serum in seinen vier beschriebenen Glykoformen zwischen 35 – 65 kDa unter reduzierenden Bedingungen im Western Blot mittels RETC-2 detektiert

(Abbildung 9A, Pfeile) ^{16,34}. Durch Verwendung des RETC-2 Antikörpers für Immunpräzipitations-Analysen aus humanem Serum unter nicht-reduzierenden Bedingungen und anschließender Protein-Identifikation mittels Massenspektrometrie-Analyse (LC-MS/MS), konnten die Western Blot Ergebnisse bestätigt werden und eine zusätzliche Bande zwischen 90 – 100 kDa für FHR-3 detektiert werden (Abbildung 9B) ⁴⁰.

Da Maus-Antikörper, v. a. vom IgG-Subtyp IgG2b das Komplementsystem aktivieren und über ihren unspezifischen Fc-Teil Komplementproteine und Fc-Rezeptoren binden, wurde für die MS-Analyse zusätzlich eine IgG2b-Isotyp Kontrolle mitgeführt (Abbildung 9C) ^{89–92}. Mittels Massenspektrometrie-Analyse konnte somit zwischen spezifischer RETC-2 Fab-Interaktion und unspezifischer Fc-Protein-Interaktion unterschieden werden. RETC-2 und nicht die IgG2b-Isotypkontrolle detektierte spezifisch FHR-3 aus humanem Serum (Abbildung 9C, grüner Stern). Die konstanten, unspezifischen Fc-Teile, sowohl von RETC-2 als auch von der Isotypkontrolle, präzipitierten ca. 30 weitere Proteine, u. a. Komplementproteine (FH, FHR-5, C3, C5), Serum Albumin, Apolipoproteine, Keratine (siehe Schäfer et al. 2016, Supplement Tabelle S1) ⁴⁰.

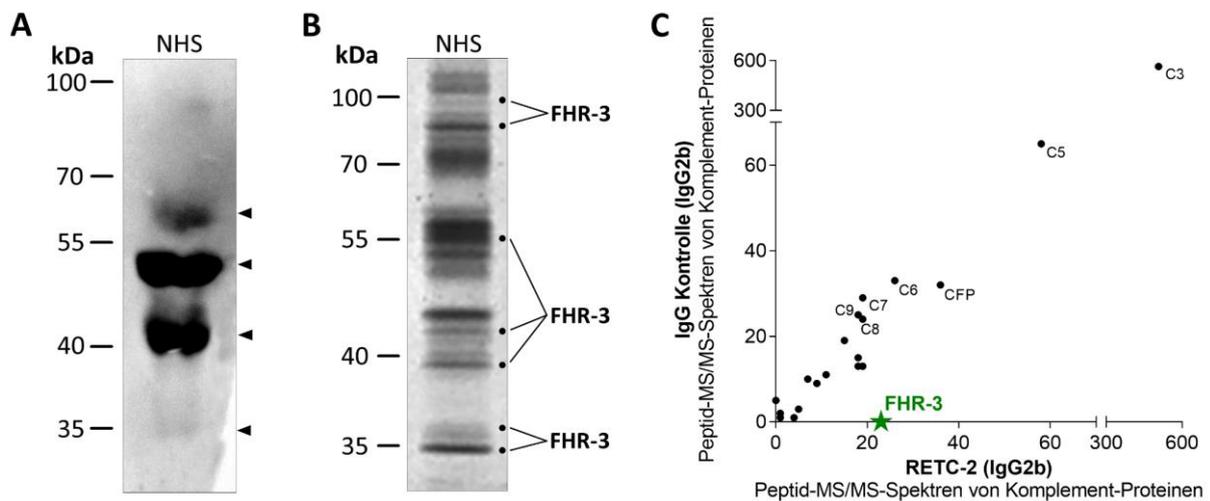


Abbildung 9: RETC-2 detektiert spezifisch natives FHR-3 zusammen mit anderen Komplementproteinen aus humanem Serum.

(A) Der anti-FHR-3 Antikörper detektiert FHR-3-Glykosylierungen in vier spezifischen Banden (Pfeile) aus reduziertem humanem Serum (NHS) im Western Blot. (B) Es wurden mehr als 30 Proteine aus nicht-reduziertem humanen Serum mittels RETC-2 immunpräzipitiert. Dargestellt ist ein Coomassie-Gel aller immunpräzipitierten Proteine. FHR-3 (Punkte) wurde mittels Massenspektrometrie-Analyse nachgewiesen. Die anderen Banden wurden als weitere Serumproteine detektiert (z. B. Albumin, Apolipoproteine, und weitere Komplementproteine). (C) Dargestellt sind die Ergebnisse der Massenspektrometrie-Analyse. Es wurden die detektierten Peptide des spezifischen anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2 gegen die Proteinfragmente der unspezifischen IgG-Isotypkontrolle aufgetragen (als Peptid-MS/MS-Spektren bezeichnet). RETC-2 präzipitierte spezifisch FHR-3 (grüner Stern) aus

humanem Serum, im Vergleich zur unspezifischen Isotypkontrolle. Andere Peptide wurden sowohl mit RETC-2 als auch mit Isotypkontrolle detektiert, und waren hauptsächlich weitere Komplementproteine (z. B. C3, C5, CFP). Die Massenspektrometrie-Analyse erfolgt anhand von zwei unabhängigen Versuchen sowohl gel-basiert als auch nicht-gel-basiert. (Abbildung aus Schäfer et al. 2016) ⁴⁰.

Mit diesen Ergebnissen konnte RETC-2 als hochspezifischer monoklonaler Antikörper zum Nachweis von humanem, nativem FHR-3 nachgewiesen werden. Jedoch interagiert der unspezifische Fc-Teil des Mausantikörpers mit Komplementproteinen im humanen Serum. Daher ist es notwendig RETC-2 zu humanisieren bzw. zu chimärisieren, wenn es für funktionelle Studien einsetzen zu können (5.3).

5.1.2 RETC-2 detektiert und quantifiziert FHR-3 in verschiedenen humanen Seren

Um FHR-3 in verschiedenen humanen Seren nachweisen zu können, wurde ein Sandwich-ELISA, mit RETC-2 als FHR-3-spezifischen Fängerantikörper und ein biotinylierter anti-FHR-3 Detektionsantikörper anti-FHR-3.4 (bereitgestellt von Pouw et al., detektiert FH und FHR-3)⁴², etabliert ⁴⁰. Zunächst erfolgte die Genotypisierung der *cfhr3*-Region aus Leukozyten gesunder humaner Blutspender, um Positiv- (P1, P2) und Negativ-Kontrollen (N1, N2) für die Spezifität des ELISA zu bestimmen (Abbildung 10C). Die FHR-3 Messung der Seren von den gesunden Positiv- und Negativ-Kontrollen sowohl im ELISA als auch im Western Blot ergab ein zum Genotyp übereinstimmendes Ergebnis, ohne falsch-positive oder falsch-negative Werte (Abbildung 10A, B). Neben den Kontroll-Seren wurden FHR-3 Konzentrationen ebenfalls in standardisierten Komplement-defiziente Seren mittels des spezifischen ELISA nachgewiesen (Abbildung 10A). Die Konzentration von FHR-3 variierte von 0,63 µg/ml im C3-depletierten Serum (C3 dpl) bis 1,69 µg/ml im C9-depletierten Serum (C9 dpl) (Abbildung 10D). Es wurde kein FHR-3 im FH-depletierten (FH dpl), IgG-depletierten (IgG dpl) und im Mausserum (MNS) detektiert. Diese Ergebnisse wurden mittels Western Blot bestätigt (Abbildung 10A, B). Danach erfolgte mit Hilfe des spezifischen ELISA die FHR-3 Quantifizierung in Seren verschiedener systemischer Autoimmunerkrankungen. In gesunden Kontrollseren konnte eine durchschnittliche FHR-3 Konzentration von $1,06 \pm 0,53$ µg/ml gemessen werden. In Seren von Patienten mit Systemischer Lupus Erythematosus (SLE, MW 4,14 µg/ml), Rheumatoider Arthritis (RA, MW 3,12 µg/ml) und Polymyalgia Rheumatica (PR, MW 3,37 µg/ml) wurden drei- bis vierfach signifikant erhöhte FHR-3 Konzentrationen nachgewiesen, wohingegen in

Patientenseren mit atypischem hämolytisch-urämischem Syndrom (aHUS, MW 1,6 µg/ml), choroidaler Neovaskularisation (CNV, MW 1,83 µg/ml), systemischer Sklerose (SSc, MW 1,92 µg/ml) und Kollagenosen (CTD, MW 1,76 µg/ml) nur ein leichter systemischer FHR-3 Anstieg detektiert werden konnte (Abbildung 10D, Supplement Tabelle S2 in Schäfer et al. 2016) ⁴⁰.

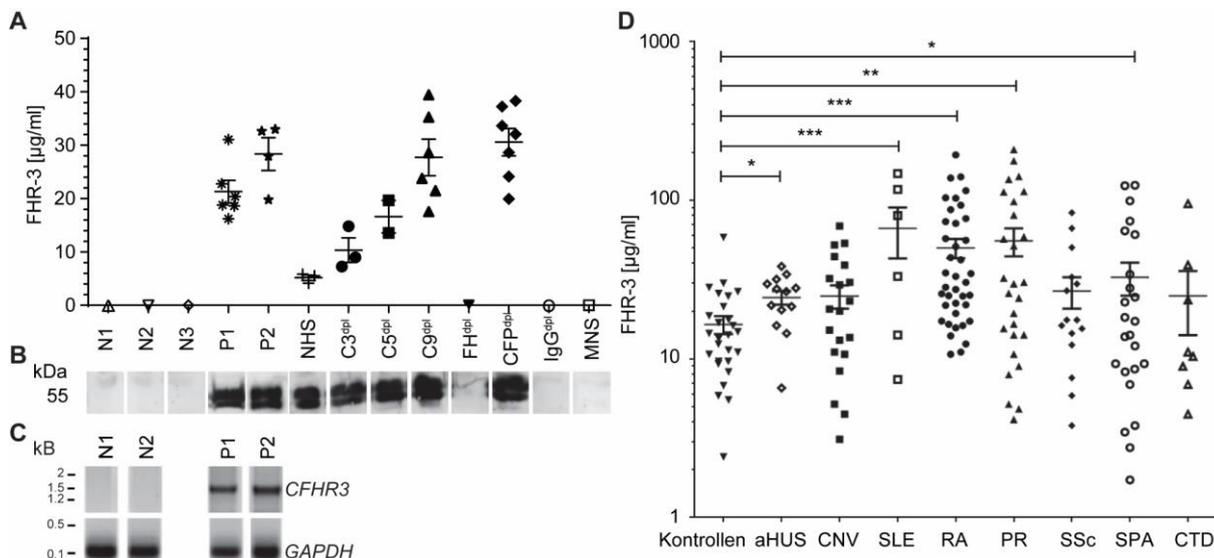


Abbildung 10: RETC-2 detektierte im spezifischen Immunoassay signifikant erhöhte FHR-3 Serumkonzentrationen von SLE, RA und PR Patienten.

(A) Die Validierung des etablierten sandwich ELISA zur spezifischen Detektion von FHR-3 erfolgte anhand von verschiedenen Seren und ergab ein reproduzierbares FHR-3 Detektionsmuster von 0,5 – 1,7 µg/ml. Technische Replikate wurden von der Standardkurve interpoliert (nicht gezeigt) und in µg/ml aufgetragen. (B) Im Western Blot konnte mittels anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 spezifisch FHR-3 (zwischen 50 – 55 kDa) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen aus dem (A) sandwich ELISA. (C) Zur Etablierung der FHR-3-positiven und FHR-3-defizienten Seren, erfolgte eine Genotypisierung dieser Proben, und stimmten mit den (A) sandwich ELISA-, und (B) Western Blot Ergebnissen überein. (D) In Systemische Lupus Erythematosus (SLE), Rheumatoide Arthritis (RA) und Polymyalgia Rheumatica (PR) Patienten konnte mittels des spezifischen Immunoassays eine significant drei- bis vierfach erhöhte FHR-3 Konzentration festgestellt werden im Vergleich zu Seren von gesunden Kontrollen. Alle anderen seren waren nur minimal signifiant erhöht. aHUS = atypisches hämolytisch-urämisches Syndrom; CNV = choroidale Neovaskularisation; SSc = systemische Sklerose; SpA = axiale Spondyloarthritis; CTD = Kollagenosen). Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Quantifizierungen. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.1 (two-tailed, unpaired t-test). (Abbildung aus Schäfer et al. 2016) ⁴⁰.

Mit diesen Ergebnissen konnte, mit Hilfe des generierten RETC-2 Antikörpers, spezifisch FHR-3 in verschiedenen humanen Seren nachgewiesen und quantifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass die FHR-3 Konzentrationen in systemischen Autoimmunerkrankungen wesentlich erhöht waren, im Vergleich zur organspezifischen Autoimmunerkrankung AMD (CNV, Abbildung 10D). Da

vorhergehende Studien jedoch zeigen konnte, dass eine Deletion von *CFHR3/CFHR1* protektiv für die Entstehung einer AMD ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob FHR-3 lokal in der Retina exprimiert wird, und somit die lokale Komplementhomöostase stören könnte, um das Fortschreiten der retinalen Degeneration zu bewirken^{40,46,108,109}.

5.1.3 RETC-2 detektiert FHR-3 in aktivierten Mikroglia/Makrophagen in einer alten, degenerierten humanen Retina

FHR-3 wurde lokal über Immunhistologie humaner Retinae mittels anti-FHR-3 Antikörper RETC-2, zusammen mit retinalen Makrophagen/Mikroglia Zellen mittels anti-Iba1 Antikörper, angefärbt (Abbildung 11)⁴⁰. In einer 92-jährigen Spender-Retina (rot, Abbildung 11A, B, E) konnten, im Vergleich zu einem 64-jährigen Spenderauge (rot, Abbildung 11E, F), eine größere Anzahl von inaktiven, aktivierten retinalen Makrophagen/Mikroglia Zellen nachgewiesen werden. FHR-3 war im 92-jährigen Spender co-lokalisiert mit den aktivierten retinalen Makrophagen/Mikroglia Zellen (Abbildung 11A Pfeile, B, C), wurde jedoch nicht in der jüngeren Spender-Retina in ruhenden Makrophagen/Mikroglia Zellen detektiert (Abbildung 11D). Die schwachen und ungleichmäßigen Autofluoreszenz-Signale des 92-jährigen RPE lassen auf eine lokale RPE Atrophie hindeuten, sowie einwandernde Makrophagen oder auswandernde aktivierte Mikroglia Zellen im Bereich der Bruch-Membran (Abbildung 11A, E, Sterne)⁴⁰.

Um die lokale FHR-3 Expression zu bestätigen, wurde die mRNA von verschiedenen retinalen Zelltypen separiert und die *CFHR3* Expression mittels qRT-PCR, sowohl in den retinalen Zelltypen als auch im RPE, einer RPE-Zelllinie ARPE-19 und der Leber (Positivkontrolle), untersucht (Anhang Abbildung S3 in Schäfer et al. 2016)⁴⁰. *CFHR3* wurde in Leberzellen und in 2 – 140-facher Transkriptmenge in retinalen Makrophagen/Mikroglia Zellen im Vergleich zu anderen retinalen Zelltypen. Im humanen RPE und den ARPE-19 Zellen wurden keine *CFHR3* Transkripte gemessen (Anhang Abbildung S3 in Schäfer et al. 2016)⁴⁰.

FHR-3 weist mit FH eine hohe Sequenzidentität mit dem Komplement-Negativregulator FH auf, und es konkurriert um die Bindung an den Komplement-Aktivierungsmarker C3b⁴¹. Aus diesem Grund wurden die humanen Spender-Retinae auf lokale FH Expression untersucht (Anhang Abbildung 48)⁴⁰. Wir konnten zeigen, dass FH lokal in Müllerzellen und Photorezeptor-Somata lokalisiert ist, sowohl in der

92-jährigen degenerierten Spender-Retina (Anhang Abbildung 48A – C Müllerzell-Stammfortsätze, Abbildung 48D – E Photorezeptor-Somata oder Müllerzellfortsätze), als auch im 64-jährigen gesunden Auge (Anhang Abbildung 48F – H hauptsächlich Müllerzellendfüße) ⁴⁰.

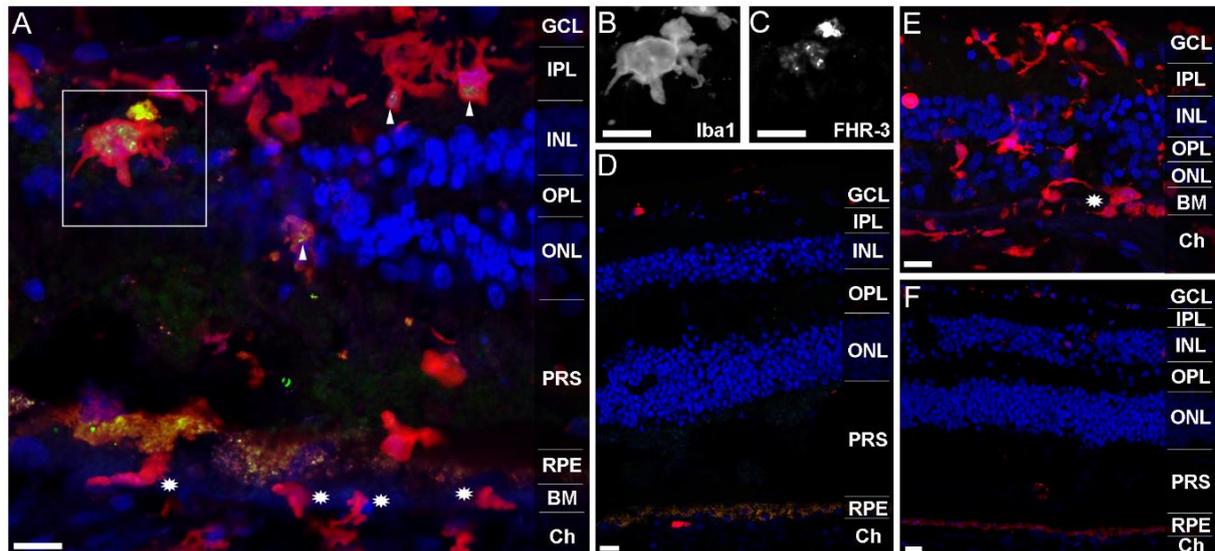


Abbildung 11: FHR-3 ist in der humanen Retina in aktivierten Mikroglia/Makrophagen lokalisiert.

FHR-3 (grün, A, D) wurde mittels anti-FHR-3 Antikörper RETC-2, zusammen mit Mikroglia/Makrophagen-Marker Ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1, rot, A, D, E, F), spezifisch angefärbt. **(A - C)** In einer 92-jährigen Spender-Retina (hS1) konnte FHR-3 in Mikroglia/Makrophagen co-lokalisiert werden (A, gelb, Pfeile und Rahmen). Eingerahmt in (A) dargestellt ist eine aktivierte Mikroglia Zelle mit vergrößertem Soma (B) und im Inneren co-lokalisiert mit FHR-3 (C). **(D)** In einem 64-jährigen Spenderauge (hS2) konnten keine aktivierten Mikroglia/Makrophagen und kein FHR-3 immunhistologisch detektiert werden. **(E - F)** Dargestellt sind (E) alte und (F) junge Retina gefärbt mit anti-Iba1 und einer Isotypkontrolle für anti-FHR-3, um die spezifische Färbung des anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2 sicherzustellen. Sterne in (A, E) indizieren einwandernde Makrophagen und/oder auswandernde Mikroglia Zellen. Retinale Schichten von oben nach unten: GCL Ganglionzellschicht, IPL innere plexiforme Schicht, INL innere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht, ONL äußere nukleäre Schicht, PRS Photorezeptoren, RPE retinales Pigmentepithel, BM Bruch-Membran, Ch Choroid. Maßstabsbalken entspricht 40 µm. (Abbildung aus Schäfer et al. 2016) ⁴⁰.

Zusammenfassend zu diesen Ergebnissen konnte mit Hilfe des anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2 gezeigt werden, dass (i) FHR-3 lokal in der entzündeten Retina in aktivierten humanen Makrophagen/Mikroglia Zellen exprimiert wird, (ii) FHR-3 und FH werden lokal in unterschiedlichen retinalen Zelltypen exprimiert, was auf eine unterschiedliche lokale Funktion von FH und FHR-3 hindeutet ⁴⁰.

5.1.4 RETC-2 reduziert die molekulare Interaktion von FHR-3 mit C3b und oxidativen Stressepitopen

Seit 1999 ist bekannt, dass FHR-3 an C3b bindet und mit FH um dessen Bindung konkurriert. FHR-3 Domänen 4 und 5 (SCR 4 – 5) interagieren mit dem C3d-Fragment in C3b und sind identisch mit der C3d Binderegion in SCR 19 von FH ^{41,110–112}. Da der generierte Antikörper RETC-2 in der SCR 5 von FHR-3 bindet, stellte sich die Frage, ob RETC-2 die lokale FHR-3-FH-C3b Bindung blockieren bzw. inhibieren kann. Dafür wurde ein kompetitiver ELISA etabliert, in dem C3b an Mikrotiterplatten immobilisiert und die jeweilige Bindung von FHR-3 und FH ausgewertet wurde ⁴⁰.

In Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnissen wurde eine konzentrationsabhängige Interaktion von C3b sowohl mit FHR-3 als auch mit FH detektiert (Abbildung 12A) ^{40,41,111}. Die FHR-3-C3b Bindung wurde durch zusätzliche Inkubation mit FH nicht gestört (Abbildung 12C). Jedoch inhibierte der anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 die Bindung von FHR-3 an C3b um 32 % (Abbildung 12C). Die geringe Inhibition von RETC-2 deutet entweder auf eine unzureichende Avidität von RETC-2 zu FHR-3 im Vergleich zur FHR-3-C3b Interaktion, oder darauf, dass die SCR 4 von FHR-3 ebenfalls an der FHR-3-C3b Bindung involviert ist (Abbildung 12C). Der konkurrierende Effekt von FHR-3 und FH an C3b, wie in vorangegangenen Studien beschrieben, konnte auch in diesen Experimenten bestimmt werden ^{40,44}. Ein molares Verhältnis von FHR-3 zu FH von 12 : 1 war notwendig, um die Bindung von FH an C3b durch FHR-3 signifikant zu inhibieren (Abbildung 12B, D). Dieser konkurrierende Effekt konnte durch Bindung von RETC-2 an FHR-3 gemildert werden und führte zu einer signifikanten Wiederherstellung der FH-C3b Interaktion um 29% (Abbildung 12D) ⁴⁰.

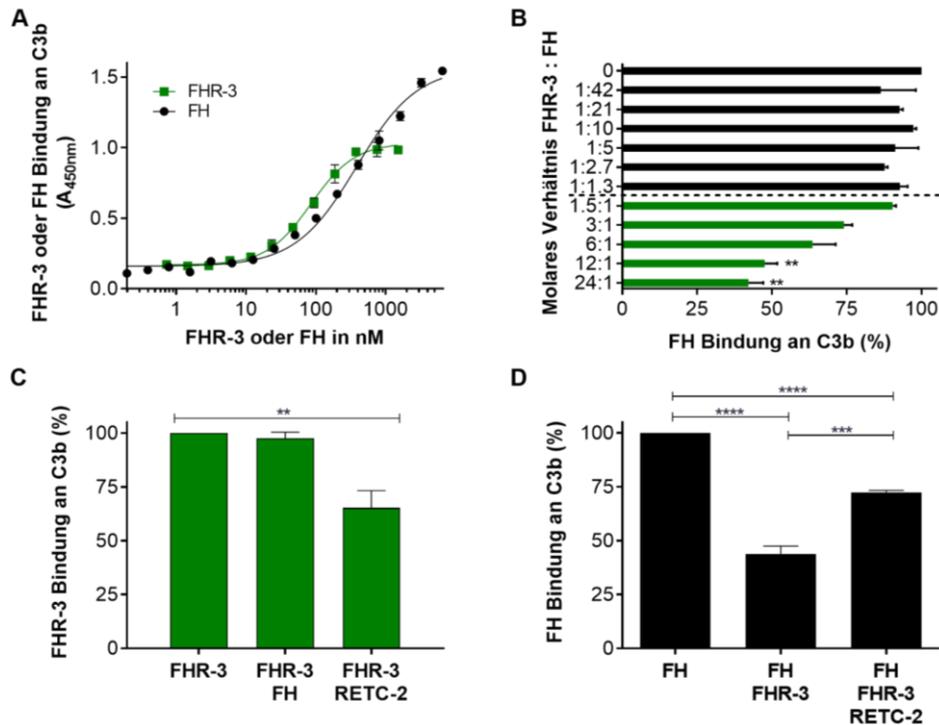


Abbildung 12: Anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 inhibiert die Bindung von FHR-3 an C3b, verringerte die konkurrierende Bindung von FHR-3 und FH an C3b und steigerte die FH-C3b-Komplementhomöostase.

(A) Standardkurve der FHR-3- (grün) und FH-Bindung (schwarz) an C3b im ELISA. (B) Dargestellt ist die konkurrierende Bindung von FHR-3 und FH an C3b. FHR-3 reduzierte konzentrationsabhängig die Bindung von FH an C3b. (C) Dargestellt ist die Bindung von FHR-3 an C3b. Diese Bindung konnte durch zusätzliche Zugabe von FH nicht reduziert werden, jedoch verringerte der anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 die Bindung von FHR-3 an C3b. (D) Dargestellt ist die Bindung von FH an C3b. Diese Bindung verringerte sich durch zusätzliche Zugabe von FHR-3. RETC-2 konnte diesen inhibitorischen Effekt teilweise wieder aufheben. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (One-way ANOVA mit Dunnett's multiple comparisons Test). (Abbildung aus Schäfer et al. 2016)⁴⁰.

Mit diesen Ergebnissen konnten vorherige Studien bestätigt werden, dass FHR-3 eine konkurrierende Wirkung auf die FH-C3b Interaktion hat und dass der generierte anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 diesen Effekt mildert und die *in vitro* FH-Homöostase teilweise wieder herstellen konnte^{40,41,111}.

FH bindet *in vivo* an alternde, gestresste oder geschädigte Zellen, u. a. über Interaktion mit oxidativen Stressepitopen (OSE) wie CEP (ω -carboxyethyl)pyrrole), MDA (Malondialdehyd) und MAA (Malondialdehyd-Acetaldehyd). Solche Zelloberflächen-Modifikationen durch oxidativen Stress sind involviert in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen, u. a. sind sie stark mit der Entstehung der AMD assoziiert. Man geht davon aus, dass FH die Interaktion der Lipid-Peroxidationsprodukte und der reaktiven Aldehyde mit weiteren pro-inflammatorischen Proteinen blockiert^{25,113–117}.

In den dargestellten Untersuchungen sollte mittels spezifisch etablierter ELISA festgestellt werden, ob FHR-3 ebenfalls an OSE bindet und mit FH um die Bindung konkurriert, da auch diese Epitope, wie die C3b-Interaktions-Domänen, in FH und FHR-3 konserviert sind (Abbildung 13). Die in verschiedenen Publikationen beschriebene Interaktion von FH mit OSEs konnte in den dargestellten Ergebnissen erfolgreich reproduziert werden, sowohl für das Lipid-Peroxidationsprodukt CEP (Abbildung 13A), als auch für die reaktiven Aldehyde MDA (Abbildung 13D) und MAA (Abbildung 13G) ^{25,114,115}. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass FHR-3 ebenfalls spezifisch, wenn auch weniger affin als FH, mit den oxidativen Stressepitopen interagiert (Abbildung 13A, D, G). Die FHR-3-OSE Bindung wurde durch zusätzliche Inkubation mit FH nicht gestört (Abbildung 13B, E, H). Der spezifische RETC-2 Antikörper inhibierte jedoch die Interaktion von FHR-3 mit CEP um 29 % (Abbildung 13B), mit MDA um 44 % (Abbildung 13E) und mit MAA um 24 % (Abbildung 13H). Diese Untersuchungen bewiesen außerdem erstmals, dass FHR-3 mit FH um die Bindung an den OSEs konkurriert (Abbildung 13C, F, I). Durch zusätzlich Inkubation mit FHR-3 verringerte sich die Bindung von FH mit CEP um 38 % (Abbildung 13C), mit MDA um 47 % (Abbildung 13F) und mit MAA um 28 % (Abbildung 13I). RETC-2 milderte durch FHR-3 Bindung die Beeinträchtigung der FH-OSE Interaktion. Die Bindung von FH an CEP konnte zu 47 % (Abbildung 13C) und die FH-MDA Interaktion zu 87 % (Abbildung 13F) wiederhergestellt werden. Dieser blockierende Effekt von RETC-2 konnte für die konkurrierende FHR-3-FH Bindung an MAA nicht nachgewiesen werden (Abbildung 13I), was durch eine starke FHR-3-MAA Interaktion und eine nicht-ausreichend anti-FHR-3 RETC-2 Konzentration erklärt werden könnte.

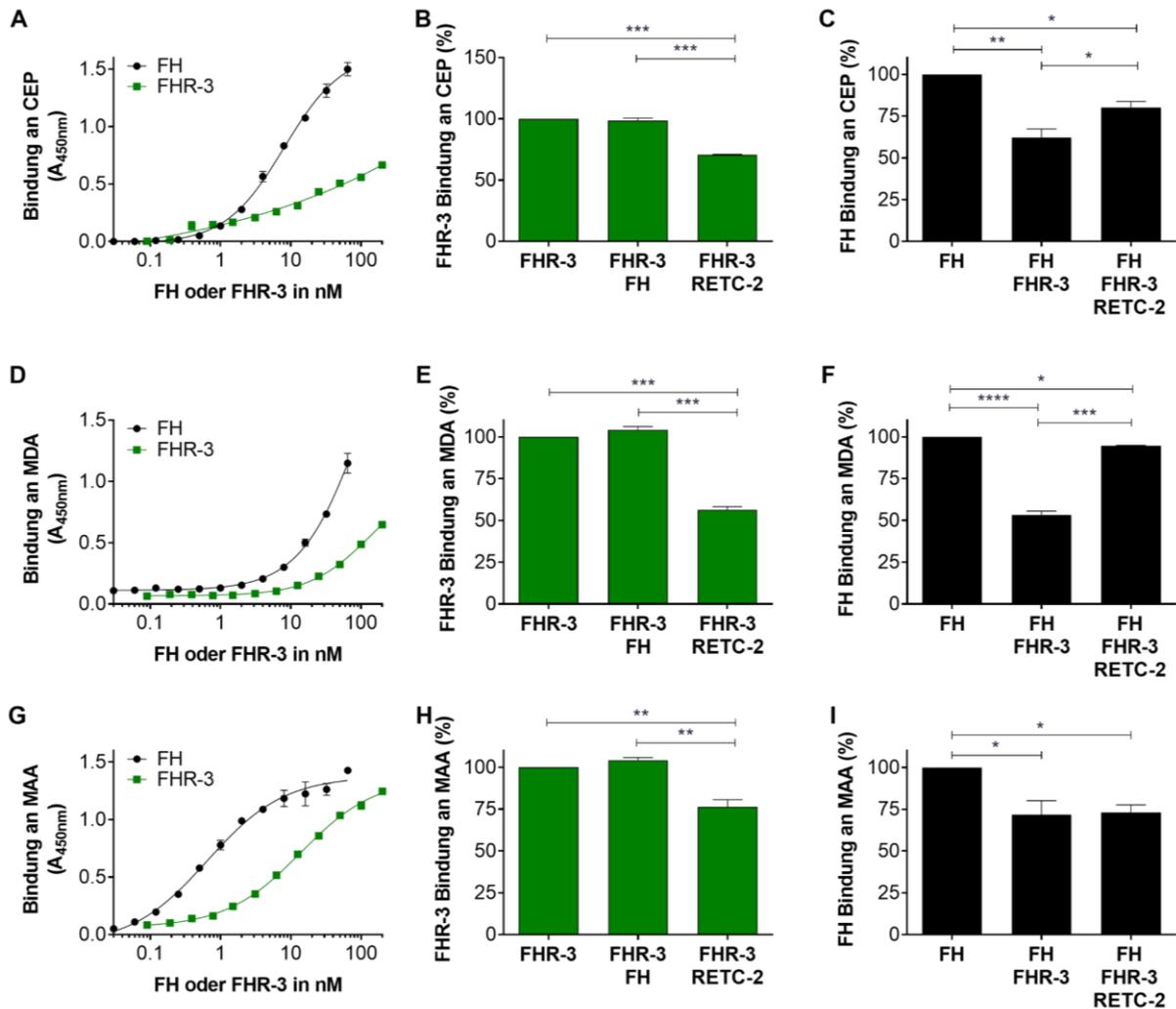


Abbildung 13: RETC-2 inhibiert die Bindung von FHR-3 an oxidative Stressepitope (OEs), verringerte die konkurrierende Bindung von FHR-3 und FH an diese OEs und steigerte die FH-OSE-Komplementhomöostase.

(A - C) CEP, (D - F) MDA, oder (G - I) MAA wurden an Mikrotiterplatten immobilisiert. Serielle Verdünnungen von FHR-3 und FH (0,005 – 10 $\mu\text{g/ml}$) wurden inkubiert und die Bindung mit spezifischen Antikörpern detektiert. Alle drei Lipid-Peroxidationsprodukte (A) CEP, (D) MDA, und (G) MAA interagierten mit FHR-3 und FH, konzentrationsabhängig. FH (schwarz) zeigte eine höhere Bindungsstärke als FHR-3 (grün) an die oxidativen Stressepitope. (D - F) Dargestellt ist die Bindung von FHR-3 an (D) CEP, (E) MDA, oder (F) MAA. Diese Bindung konnte durch zusätzliche Inkubation von FH nicht reduziert werden, jedoch verringerte der anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 signifikant die Bindung von FHR-3 an alle drei Peroxidationsprodukte. (G - I) Dargestellt ist die Bindung von FH an (C) CEP, (F) MDA, und (I) MAA. Diese Interaktion verringerte sich durch zusätzliche Inkubation von FHR-3 signifikant für (B) CEP, (E) MDA, und partiell für (H) MAA. RETC-2 konnte diesen inhibitorischen Effekt vollständig (F, MDA), teilweise (C, CEP), oder gar nicht (I, MAA) wieder aufheben. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (One-way ANOVA mit Dunnett's multiple comparisons Test).

Diese Untersuchungen beschreiben eine bisher noch unbekannte Bindung und konkurrierende Wirkung von FHR-3, zusammen mit der bereits bekannten FH-OSE-Interaktion, an oxidative Stressepitope ^{25,114,115}.

Es konnte zum ersten Mal eine mögliche lokale, retinale Funktion von FHR-3 gezeigt werden. Mit Hilfe des generierten RETC-2 Antikörpers wurde nachgewiesen, dass erhöhte FHR-3 Konzentrationen in systemischen Autoimmunerkrankungen, wie der RA und SLE, im Serum vorlagen, nicht aber in organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie der AMD (Abbildung 10). FHR-3 wurde durch RETC-2 lokal in retinalen Makrophagen/Mikroglia Zellen in einem entzündeten, alternden humanen Auge detektiert (Abbildung 11). *In vitro* Untersuchungen bestätigten eine konkurrierende Wirkung von FHR-3 mit FH um die Bindung sowohl an C3b (Abbildung 12), als auch an oxidative Stressepitope (Abbildung 13). Damit ist FHR-3 möglicherweise ein indirekter Aktivator des Komplementsystems, da es die negative FH-Regulation direkt beeinflusst. Der generierte spezifische monoklonale Antikörper RETC-2 inhibierte die Bindungskonkurrenz von FHR-3 und FH und bewirkte somit eine gesteigerte lokale FH-Homöostase (Abbildung 12, Abbildung 13). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob RETC-2 ein putativ neuer therapeutischer Ansatz zur Linderung spezifischer Autoimmunerkrankungen wie der AMD darstellen kann (Anhang Abbildung 49) ⁴⁰.

5.2 Generierung spezifischer Antikörper gegen humanes FHR-1

Da die Deletion beider Gene *CFHR3* und *CFHR1* protektiv für die Entstehung der AMD ist, wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass beide Proteine, sowohl FHR-1 als auch FHR-3 einen putativen lokalen Einfluss im humanen erkrankten Auge haben ^{44,46,109,118}. Eine lokale Funktion von FHR-3, durch Interaktion an C3b und oxidative Stressepitope, mithilfe des generierten anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2 konnte bereits belegt werden ⁴⁰. Es ist seit zehn Jahren bekannt, dass FHR-1 ebenfalls an C3b bindet und mit FH um dessen Bindung konkurriert ^{31,38}. Aus diesem Grund sollte ein monoklonaler Antikörper gegen humanes FHR-1 generiert werden.

Die Herstellung von spezifischen anti-FHR-1 Antikörpern ist durch die hohe Sequenzidentität von FHR-1 zu FH (SCR 3 – 5: 95 – 100 %), FHR-2 und FHR-5 (SCR 1 – 2: 92 – 100 %) (Einleitung Abbildung 2) erschwert ^{28,37}. Es existieren zwei FHR-1 Isoformen, (i) die saure FHR-1*A und (ii) die basische FHR-1*B Variante, die sich ausschließlich in der SCR 3 Domäne um drei Aminosäuren unterscheiden, wobei die FHR-1*A Isoform mit AMD und die FHR-1*B Isoform mit atypischem hämolytisch-urämischem Syndrom (aHUS) assoziiert wird (Abbildung 2) ^{33,34}. Die bisher einzigen kommerziellen monoklonalen Antikörper gegen humanes FHR-1 sind kreuzreaktiv mit

FH, FHR-2 und FHR-5 (Abbildung 14). Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Immunisierungsansätze verfolgt, um einen spezifischen Antikörper-Titer gegen humanes FHR-1 in Mäusen zu induzieren.

Im ersten Ansatz wurden drei immunogene FHR-1 Peptidkonjugate (Ure 3 – 5), die spezifisch für die FHR-1*A SCR 3 Domäne sind, generiert. Die Peptide wurden so gewählt, um die drei unterschiedlichen Aminosäuren von FHR-1*A und FHR-1*B zu targetieren. Ziel dieser Strategie war es, funktionell blockierende monoklonale anti-FHR-1 Antikörper zu generieren. Hierfür wurden insgesamt sechs Mäuse immunisiert. Davon wurden drei Mäuse für die Herstellung von anti-FHR-1 Antikörperproduzierenden Hybridomzellen, durch Fusion der murinen Milzzellen mit immortalen Myelomzellen (P3X), ausgewählt (Anhang Tabelle 29). Aus diesen Versuchen konnten acht Zelllinien isoliert werden, wovon fünf Hybridome (179, 368, 539, 621, 472) spezifisch FHR-1-Peptide im Screening-ELISA detektierten. Die Klone wurden kultiviert, die monoklonalen anti-FHR-1 Antikörper aus dem Überstand aufgereinigt, die Klonalität mittels Durchflusszytometrie bestimmt, und die Antikörper grundlegend charakterisiert (Abbildung 14, Abbildung 15).

Da die spezifischen anti-FHR-1 Peptid-Antikörper (Abbildung 14, Abbildung 15) nur die linearen Epitope im denaturierten FHR-1 erkannten, keine hohe Affinität zum nativen Protein aufwiesen, und teilweise mit anderen FHR-Proteinen kreuzreagierten, wurde in einer zweiten Immunisierungsstrategie rekombinant-hergestelltes FHR-1 (eigens hergestellt) in zwei Mäuse appliziert und beide fusioniert (Anhang Tabelle 29). Mit diesem Ansatz sollten Antikörper generiert werden, die spezifisch native FHR-1-Strukturepitope binden. Ein spezifischer polyklonaler anti-FHR-1 Antikörpertiter zeigte sich nur in der weiblichen, nicht aber in der männlichen Balb/c Maus. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche geschlechtsspezifische Immunantwort sein ^{119,120}. Nach der

Fusion und dem Screening von mehr als 1000 Hybridomklonen, konnten jedoch keine stabilen Hybridomzelllinien isoliert werden, die spezifisch anti-FHR-1 Antikörper produzierten (Anhang Tabelle 29).

In einer dritten und letzten Immunisierungsstrategie wurde einer weiteren weiblichen Balb/c Maus natives, aus humanem Serum-aufgereinigtes, FHR-1 appliziert (Anhang Tabelle 29). Mit dieser Strategie sollte die Variabilität der FHR-1-Strukturepitope erhöht werden, gegen die die Antikörper gerichtet sind. Dies kann durch mehrere

Faktoren erreicht werden. Zum einen weist Serum-aufgereinigtes FHR-1 eine native Proteinfaltung auf, im Gegensatz zu rekombinantem FHR-1, dessen tertiäre Struktur durch ein zusätzlich fusioniertes C-terminales Peptid (Strep-Tag) fehlgefaltet sein könnte. Zum anderen bildet natives FHR-1 sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit FHR-2 und FHR-5, wodurch wesentlich mehr Strukturepitope zur Verfügung stehen, um einen spezifischen monoklonalen Antikörper gegen FHR-1 generieren zu können. Die mit nativem FHR-1 immunisierte Maus wies am Tag der Fusion einen hohen finalen polyklonalen Antikörpertiter auf (1 : 10.000.000). Nach intensivem Screening von über 3000 Hybridomklonen, konnte jedoch keine stabile Zelllinie isoliert werden, die anti-FHR-1 Antikörper produziert (Anhang Tabelle 29).

Da monoklonale Antikörper gegen humanes FHR-1 aus der ersten Immunisierungsstrategie gewonnen werden konnten, und Aufgrund der Anzahl der gescheiterten weiteren Fusionen und des enormen Zeit- und Arbeitsaufwandes, wurden die generierten Peptid-Antikörper nachfolgend grundlegend charakterisiert.

5.2.1 Charakterisierung der monoklonalen anti-FHR-1 Antikörper

Die aus der ersten Immunisierungsstrategie hergestellten anti-FHR-1 Antikörper – 179, 368, 539, 621 und 472 – wurden aus Hybridoma-Überständen aufgereinigt und ihre Bindungseigenschaften grundlegend charakterisiert.

Der mAk 472 detektierte FHR-1, wies jedoch eine Kreuzreaktivität mit FHR-3 im ELISA auf. Die Klone 179, 368, 539 und 621 zeigten keine Reaktion mit rekombinant hergestelltem FHR-1 im ELISA (Abbildung 14A). Im Western Blot wurde FHR-1 unter reduzierten Bedingungen von den anti-FHR-1 Antikörpern 539, 621, 472 und den beiden kommerziellen monoklonalen anti-FHR-1 Antikörpern R&D und JHD-7 erkannt. MAk 179 und 368 detektierten FHR-1 sehr schwach (179) bis gar nicht (368) im Western Blot (Abbildung 14B).

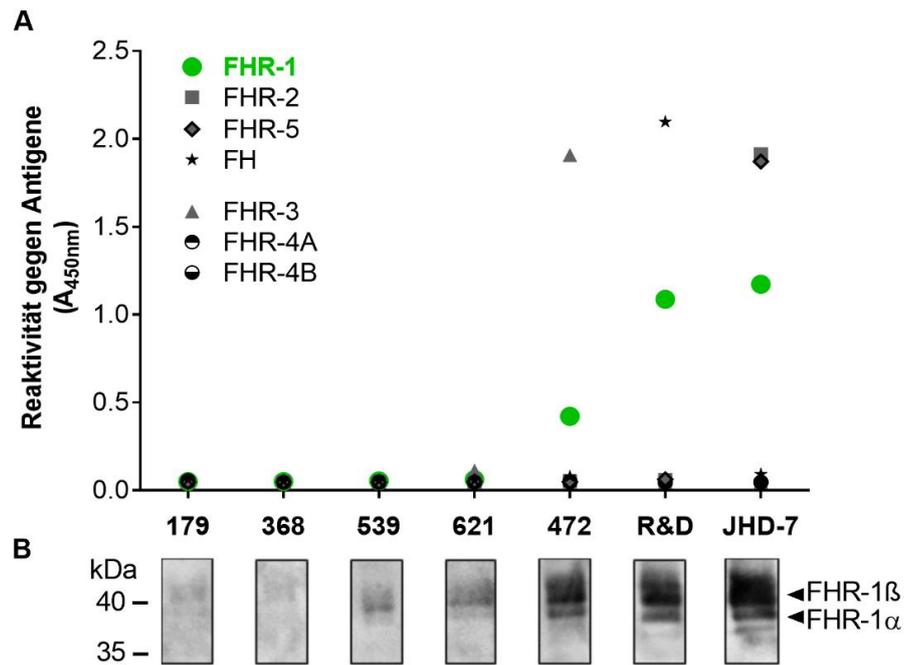


Abbildung 14: Nachweis auf spezifische Bindung der hergestellten anti-FHR-1 mAk.

(A) ELISA-Platten wurden mit verschiedenen rekombinanten Proteinen beschichtet: FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4A, FHR-4B, FHR-5, FH. Die Inkubation mit den unterschiedlichen anti-FHR-1 Antikörpern und die anschließende Detektion mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper zeigte, dass nur mAk 472 rekombinantes FHR-1 (grün) erkennt, aber kreuzreagiert mit FHR-3. Die kommerziellen Antikörper R&D und JHD-7 binden FHR-1 (grün), sowie FH, FHR-2 und FHR-5. (B) Western Blots mit denaturiertem FHR-1 ergaben eine spezifische Detektion der beiden FHR-1 Isoformen (FHR-1 α , FHR-1 β) mit allen hergestellten anti-FHR-1 mAk und den beiden kommerziellen Antikörpern R&D und JHD-7. mAk 179 und 368 detektierten FHR-1 nur sehr schwach. mAk = monoklonaler Antikörper.

Im nächsten Schritt wurden die anti-FHR-1 Antikörper an magnetische Beads gekoppelt und für eine Immunpräzipitation aus humanem Serum, und FHR-1 defizientem Serum genutzt. Die präzipitierten Proteine, gekoppelt an die anti-FHR-1 Antikörper, wurden anschließend im Western Blot unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Als Detektions-Antikörper wurde der, zunächst an Biotin-gekoppelte mAk 472 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass nur mAk 472 natives FHR-1 aus humanem Serum (NHS) präzipitiert. Der Antikörper detektierte beide FHR-1 Glykoformen, FHR-1 α und FHR-1 β zwischen 40 – 50 kDa. Im FHR-1 defizienten Serum (FHR-1 $^{-/-}$) konnte diese Doppelbande nicht visualisiert werden (Abbildung 15). Die unspezifische Bande bei 55 kDa entspricht der an die magnetischen Beads gekoppelten schweren Kette der Fängerantikörper (Abbildung 15). Eine anschließende Proteinidentifikation mittels gel-basierte Massenspektrometrie-Analyse ergab ein zum Western Blot übereinstimmendes Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

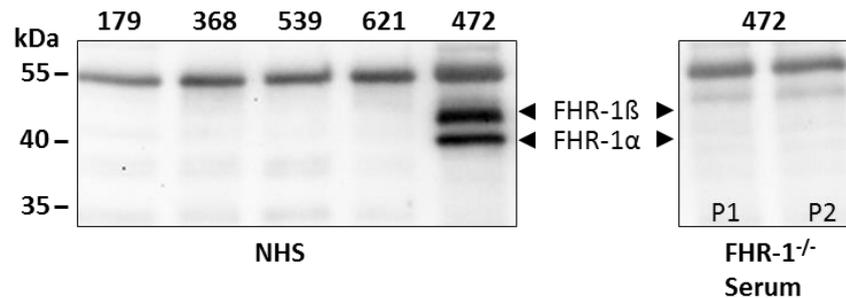


Abbildung 15: Der hergestellte anti-FHR-1 mAk 472 präzipitiert spezifisch FHR-1 aus humanem Serum.

Die hergestellten monoklonalen Antikörper gegen FHR-1 (Klone 179, 368, 539, 621 und 472) wurden zur Immunpräzipitation aus humanem Serum verwendet. Die Präzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit biotinyliertem anti-FHR-1 Antikörper 472 und Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin detektiert. MAK 472 präzipitierte Proteine zwischen 40 – 50 kDa aus humanem Serum (NHS), die dem Bandenmuster von FHR-1 entsprechen. Diese spezifische Doppelbande wurde in zwei verschiedenen FHR-1 defizienten Seren (FHR-1^{-/-} Serum: P1, P2) nicht erkannt. Die Bande bei 55 kDa entspricht der schweren Kette der murinen Fängerantikörper. mAk = monoklonaler Antikörper.

Da der murine anti-FHR-1 Antikörper 472 mit seinem unspezifischen Fc-Teil zahlreiche weitere Komplementkomponenten aus humanem Serum präzipitierte, wurde anschließend eine Isotyp-Bestimmung durchgeführt. MAK 472 ist ein muriner IgG2a Antikörper, und damit ein Immunoglobulin mit stark komplement-aktivierenden Eigenschaften (Anhang) ^{89–92}. Beide generierte Antikörper, sowohl mAk 472 vom IgG-Subtyp IgG2a (Anhang), als auch RETC-2 vom Subtyp IgG2b (Abbildung 9), sind stark Komplement-aktivierende Mausantikörper. Um sie für folgende funktionelle Studien einsetzen zu können, muss zunächst der unspezifische murine Fc-Teil entfernt bzw. modifiziert werden, was in der vorliegenden Arbeit anhand von zwei unterschiedlichen Methoden umgesetzt wurde.

5.3 Chimärisierung des anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2

Murine Antikörper können den klassischen Weg des humanen Komplementsystems, über spezifische Interaktion mit C1q, aktivieren. Diese Aktivierung ist Isotyp-abhängig, und wird v. a. durch IgG2a und IgG2b induziert ^{89–92}. Der murine anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 ist vom Isotyp IgG2b und somit stark immunreaktiv. Um den Antikörper für spätere *in vitro* analysen nutzen zu können, sollte der unspezifische Fc-Teil des Antikörpers modifiziert werden. Nachdem ein enzymatischen Verdau mittels Ficin oder Pepsin, zur Herstellung von Fab- und F(ab)₂-Fragmenten nicht erfolgreich war, wurde eine zweite Strategie verfolgt ¹²¹.

Hierbei wurden die murinen variablen RETC-2-Antikörperfragmente (variable leichte Kette V_L , variable schwere Kette V_H), mit den spezifischen FHR-3-Binderegionen (Abbildung 16A, *in situ* modellierte CDRs L1 – L3, H1 – H3)⁴⁰, in kommerzielle Vektorkonstrukte, mit enthaltenen konstanten Regionen (konstante leichte Kette C_L , konstante schwere Kette C_H) eines humanen IgG4 Antikörpers, kloniert (Abbildung 16A). Ein zweiter FHR-3-unspezifischer muriner Antikörper, der bovines Serum Albumin (BSA) detektiert, wurde parallel dazu als Kontroll-Antikörper konstruiert (Abbildung 16B). Die Antikörperplasmide wurden anschließend in humane embryonale Nierenzellen (HEK-293T) transient transfiziert, und die so entstandenen rekombinanten chimären Antikörper aus dem Zellkulturüberstand mittels Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

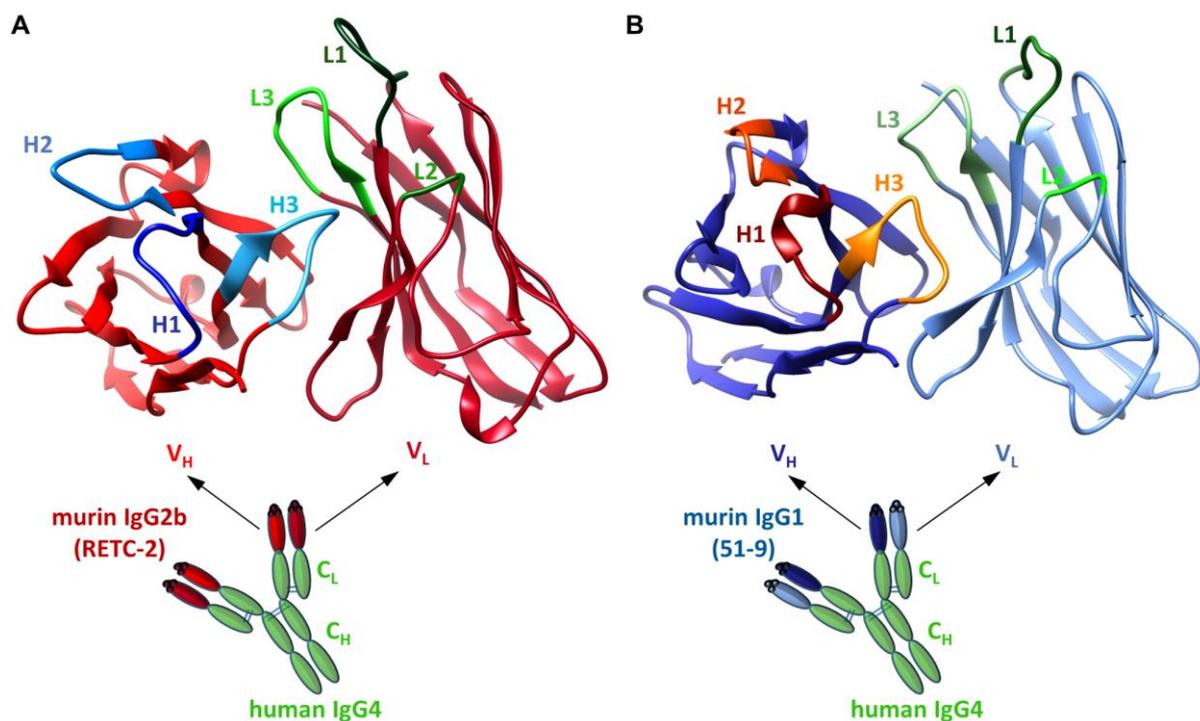


Abbildung 16: *In silico* Strukturanalysen verdeutlichen die Antigenbinderegionen der generierten chimären Antikörper RETC-2-ximab und Kontroll-IgG-ximab.

Die Strukturen der variablen schweren Kette (V_H) und der variablen leichten Kette (V_L) beider muriner Antikörper wurde mittels Rosetta Software zunächst berechnet und visualisiert und anschließend über die Chimera Software spezifisch modelliert. **(A)** Der variable Teil des murinen anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2 (rot) wurde molekularbiologisch mit der schweren Kette eines humanen IgG4 Antikörpers (grün) zusammengesetzt (RETC-2-ximab). Die Sekundärstrukturen der hypervariablen Regionen (CDR) von RETC-2 sind farblich dargestellt und setzen sich zusammen aus den drei CDRs von V_H (H1 – H3, blau) und den drei CDRs von V_L (L1 – L3, grün)⁴⁰. **(B)** Der variable Teil des murinen anti-BSA Kontroll-Antikörpers 51-9 (blau) wurde molekularbiologisch mit der schweren Kette eines humanen IgG4 Antikörpers (grün) zusammengesetzt (Kontroll-IgG-ximab). Die Sekundärstrukturen der hypervariablen Regionen (CDR) von 51-9 sind farblich dargestellt und setzen sich zusammen aus den drei CDRs von V_H (H1 – H3, rot - gelb) und den drei CDRs von V_L (L1 – L3, grün).

Die aufgereinigten chimären Antikörper wurden mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt, und anschließend mit Coomassie angefärbt. Beide Antikörper, RETC-2-ximab (Abbildung 17A 1, 3) und Kontroll-IgG-ximab (Abbildung 17A 2, 4) ergaben ein IgG-spezifisches Bandenmuster. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnten die chimärisierten Antikörper bei ca. 150 kDa visualisiert werden (Abbildung 17A 1, 2), wohingegen unter reduzierenden Bedingungen hauptsächlich die schweren Antikörperketten (55 kDa) und die leichten Antikörperketten (25 kDa) detektiert wurden (Abbildung 17A 3, 4). Im nächsten Schritt wurde RETC-2-ximab im Western Blot zur Detektion von rekombinantem FHR-3 (rFHR-3) eingesetzt. Hier konnte eine spezifische Interaktion anti-FHR-3 RETC-2-ximab an FHR-3 (50 kDa) festgestellt werden (Abbildung 17B). In einer letzten Untersuchung wurde RETC-2-ximab in einem etablierten Sandwich-ELISA als Fängerantikörper zur Detektion von FHR-3 (seriell 1 : 2 – verdünnt) eingesetzt⁴⁰. Eine spezifische Bindung konnte ab 0,8 µg/ml FHR-3 erzielt werden (Abbildung 17C).

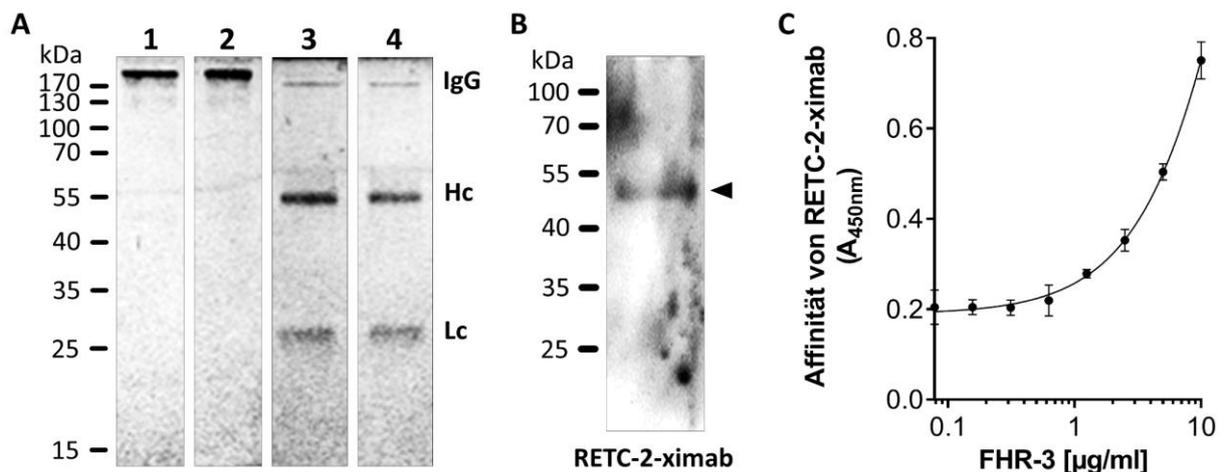


Abbildung 17: RETC-2-ximab interagiert spezifisch mit FHR-3.

Die rekombinant hergestellten chimären monoklonalen Antikörper, anti-FHR-3 RETC-2-ximab und anti-BSA Kontroll-ximab 51-9 (Kontroll-IgG-ximab), wurden grundlegend charakterisiert. **(A)** Die aufgereinigten chimären Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, unter nicht reduzierten Bedingungen (Spuren 1, 2) als auch unter reduzierten Bedingungen (Spuren 3, 4) und anschließend mit Coomassie angefärbt. Beide Antikörper, RETC-2-ximab (Spuren 1, 3) und Kontroll-IgG-ximab (Spuren 2, 4) ergaben ein IgG-spezifisches Bandenmuster, mit Gesamt-IgG bei ca. 150 kDa, schwere Antikörperketten (Hc) bei 55 kDa und leichte Antikörperketten (Lc) bei 25 kDa. **(B)** Rekombinantes FHR-3 wurde mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch den spezifischen anti-FHR-3 RETC-2-ximab im Western Blot spezifisch bei 50 kDa detektiert. **(C)** Der spezifische anti-FHR-3 RETC-2-ximab wurde im Sandwich-ELISA als Fängerantikörper zur Detektion von FHR-3 (seriell verdünnt) eingesetzt, als Detektionsantikörper diente ein weiterer spezifischer anti-FHR-3 Antikörper (anti-FHR-3.4^{40,42}). Eine spezifische Bindung von RETC-2-ximab an FHR-3 konnte bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml FHR-3 festgestellt werden. Die Messung erfolgte jeweils über Doppelbestimmungen.

Eine Untersuchung des RETC-2-ximab auf eine mögliche Rest-Aktivierung des Immunsystems war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es wurde jedoch mehrfach beschrieben, dass humane Antikörper des IgG4-Subtyps nicht an C1q binden und somit nicht zur unspezifischen Aktivierung des Komplementsystems führen können^{92,122,123}. Daher wurde der hergestellte RETC-2-ximab in dieser Arbeit für vorläufige RPE-Zellbasierten *in vitro*-Untersuchungen verwendet (5.4.4, Abbildung 45).

5.4 Effekt von FHR-3 auf humane RPE Zellen

Retinale Pigmentepithelzellen (RPE) sind pigmentierte Epithelzellen, die einen stabilen polarisierten Monolayer hexagonaler Zellen ausbilden. Das RPE hat einen essenziellen Einfluss auf das intraokulare Immunprivileg, da es Hauptbestandteil der Blut-Retina-Schranke ist, und einerseits in engem Kontakt mit den lichtsensitiven Photorezeptoren steht und andererseits direkt an das Choroid und damit dem systemischen Blutfluss angrenzt^{74-77,124,125}. Dieses komplexe intraretinale System ist bei degenerativen Netzhauterkrankungen wie der AMD, durch u. a. übermäßige Aktivierung des Komplementsystems, gestört und führt zu irreversiblen Visusbeeinträchtigungen. Neueste Studien zeigten, dass verschiedene retinale Zelltypen, darunter auch RPE Zellen, Komplementproteine lokal exprimieren und sezernieren, und diese durch unterschiedliche Stressatoren reguliert werden^{12,14,71-73}. Um die lokale Funktion von FHR-3, das in der degenerierten Retina von aktivierten Makrophagen/Mikrogliazellen produziert wird⁴⁰, weiter zu entschlüsseln, wurden humane RPE Zellen apikal mit rekombinantem FHR-3 unter Serum-freien Bedingungen behandelt. *CFHR3* mRNA wird in RPE Zellen nicht exprimiert⁴⁰. Für diese *in vitro* Untersuchungen wurde die ARPE-19 Zelllinie verwendet (5.4.1 – 5.4.4). Diese Daten wurden sowohl in primären humanen RPE (pRPE) als auch in humanen RPE aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-RPE) in ersten Untersuchungen verifiziert (5.4.5).

5.4.1 Optimierung der Kultivierung der ARPE-19 Zelllinie

ARPE-19 ist eine spontan entstandene Zelllinie mit hohem Teilungspotenzial, die von einem 19-jährigen männlichen Spender aus den USA stammt. Aufgrund der verhältnismäßig einfachen Kultivierbarkeit der ARPE-19, im Vergleich zu primären RPE Zellen, ist sie die am häufigsten genutzte Zelllinie für *in vitro* Studien des RPE^{126,127}. Die größte Herausforderung, den nativen RPE-spezifischen Phänotyp *in vitro*

aufrechtzuerhalten, ist dabei die korrekte Kultivierung dieser Zellen¹²⁸⁻¹³¹. In dieser Arbeit erfolgte eine eingehende Charakterisierung und Optimierung der ARPE-19 Kultivierung, um den für die nachfolgenden *in vitro* FHR-3-Versuche geeigneten Phänotyp zu gewährleisten.

ARPE-19 Zellen zweier verschiedener Passagen – alte ARPE-19 Passage 38 (P38) und junge ARPE-19 P25 – wurden unter zwei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen für drei Monate im Transwell kultiviert und auf ihren RPE-Phänotyp überprüft (Abbildung 18A – D). Es wurde einerseits ein herkömmlich verwendetes Medium mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS) verwendet (Abbildung 18A, B), und andererseits ein optimiertes Medium mit 1 % FCS und zusätzlich 1 mM Pyruvat (Abbildung 18C, D). Ein *in vivo*-ähnlicher RPE-Phänotyp, mit hexagonalen und pigmentierten Zellen, konnte ausschließlich in jungen ARPE-19 Zellen kultiviert in optimiertem Medium festgestellt werden (Abbildung 18D). Alle anderen kultivierten RPE-Zellen ergaben, bedingt durch Alter und/oder Kultivierungsbedingungen, einen Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp unter lichtmikroskopischer Begutachtung. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Kultivierung alter ARPE-19 Zellen (P38) und junger ARPE-19 (P25) in herkömmlichem Medium in einer Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Zelltyp (EMT) resultierte (Abbildung 18A – C)^{132,133}.

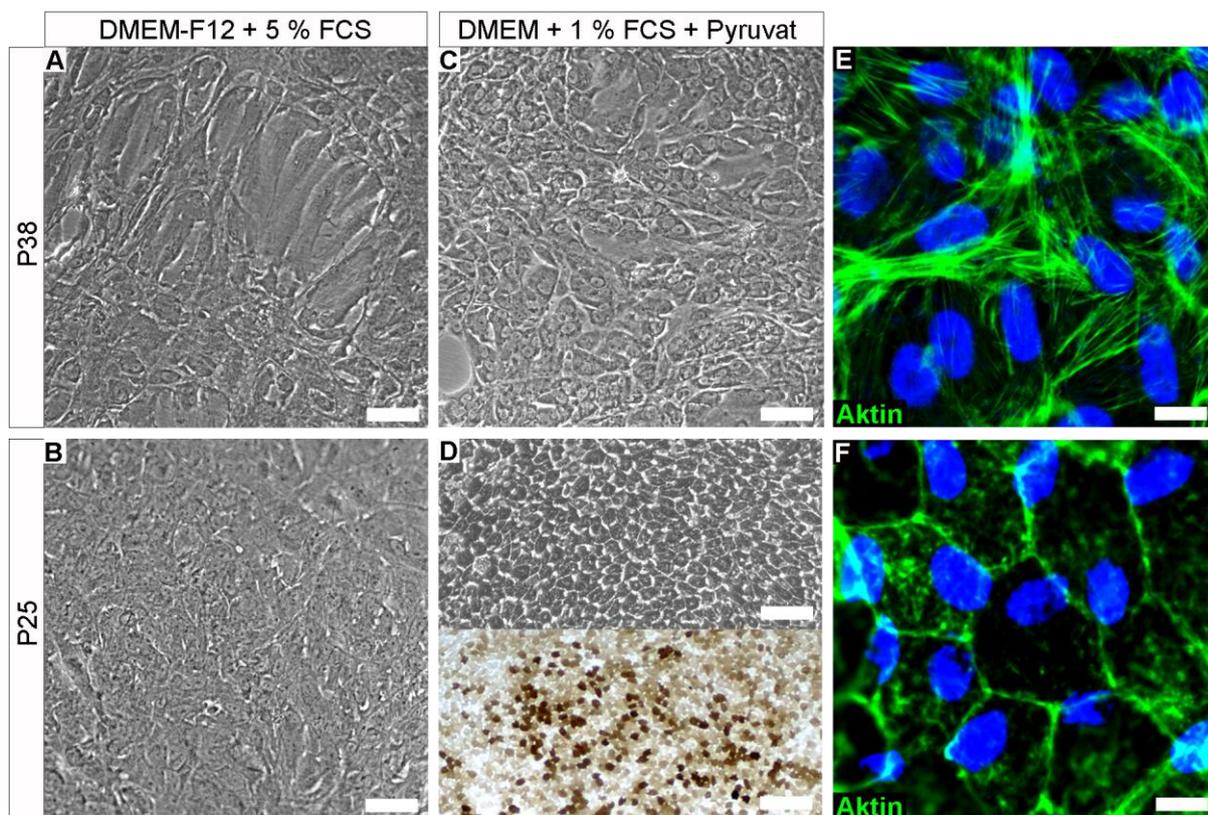


Abbildung 18: Langzeitkultivierung von ARPE-19 Zellen unterschiedlicher Passagen und Kultur-Medien.

ARPE-19 Zellen der Passagen 38 (P38, A, C, E) und 25 (P25, B, D, F) wurden nach 12 Wochen (A - D) bzw. 6 Wochen (E - F) in Kultur auf ihren Phänotyp überprüft. **(A)** Alternde (P38) und **(B)** junge (P25) ARPE-19 Zellen in herkömmlichem Medium (DMEM-12 + 5 % FCS) zeigten keine RPE-spezifische-, sondern eine Fibroblasten-ähnliche mesenchymale Differenzierung. **(C)** Alternde ARPE-19 Zellen in optimiertem Medium (DMEM + 1 % FCS + 1 mM Pyruvat) zeigten teilweise einen RPE-spezifischen Phänotyp, jedoch überwiegend mit Fibroblasten-ähnlicher Differenzierung. **(D)** Junge ARPE-19 Zellen in optimiertem Medium (DMEM + 1 % FCS + Pyruvat) ergaben einen RPE-spezifischen Phänotyp mit hexagonaler Anordnung und Pigmentierung. **(E)** Alternde ARPE-19 Zellen wurden für 6 Wochen im Transwell in herkömmlichem Medium kultiviert und anschließend mit fluoreszierendem Phalloidin (grün) angefärbt. Zu erkennen sind Aktin-Stressfasern. Zellkerne wurden mit Hoechst visualisiert (blau). **(F)** Junge ARPE-19 Zellen wurden für 6 Wochen im Transwell in optimiertem Medium kultiviert und anschließend mit fluoreszierendem Phalloidin (grün) angefärbt. Zu erkennen sind kompakte apikale F-Aktin Ringe und mikrovilläre Aktin-Bündel. Zellkerne wurden mit Hoechst visualisiert (blau). Vergrößerung 100-fach. Maßstabsbalken entspricht 40 µm.

Es konnte festgestellt werden, dass sich der RPE-Phänotyp nach sechs Wochen Kultivierung nicht weiter veränderte und die Zellen komplett differenziert vorlagen. Daher wurden für die folgenden *in vitro* Versuche alte ARPE-19 (P38) in herkömmlichem Medium (Abbildung 19E, Abbildung 20A, Abbildung 21) und junge ARPE-19 (P25) in optimiertem Medium (Abbildung 19F, Abbildung 20B, Abbildung 21) verwendet, um sowohl gesunde junge RPE Zellen als auch potenziell erkrankte alte RPE Zellen zu untersuchen. Zur Charakterisierung des RPE-Zelltyps, wurden ARPE-19 (P38 und P25) immunhistologisch auf Zytoskelett-Marker Aktin und *tight junction* Protein Zonula occludens 1 (ZO-1) Expression bestimmt. Alte ARPE-19 zeigten, neben der fibroblastenähnlichen Morphologie, eine mesenchymale Zell-Differenzierung, da keine apikalen Aktin-Ringe, sondern Stressfaser-ähnliche Formationen (Abbildung 18E) und schwach exprimierte ZO-1 Verbindungen (Abbildung 19A) zu erkennen waren. Junge ARPE-19 Zellen dagegen exprimierten RPE-zellspezifische kompakte apikale und mikrovilläre Aktin-Bündel (Abbildung 18F), stabile ZO-1 Verbindungen und hexagonal geformte Zellen mit starker Pigmentierung (Abbildung 19B – C). In vorhergehenden Studien konnte belegt werden, dass Aktin ein stabiler Zytoskelett-Marker ist, um die Barrierefunktion und jegliche zelluläre Umstrukturierung (u. a. Zellstress, Alter, Entzündungen) in ARPE-19 Zellen zu visualisieren ^{79,133–136}.

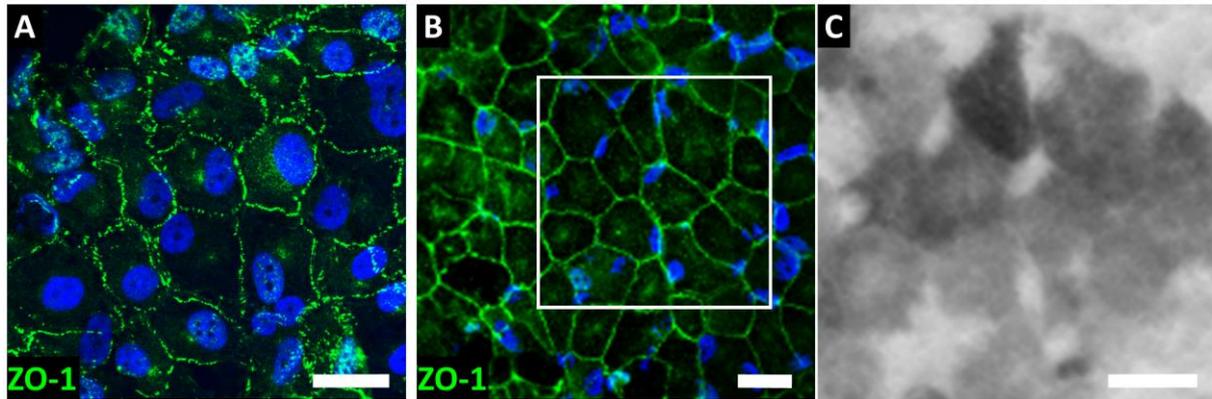


Abbildung 19: Das *tight junction* Protein ZO-1 wurde schwächer detektiert in alternden ARPE-19 Zellen im Vergleich zu jungen ARPE-19 Zellen.

ARPE-19 Zellen der Passage 38 (A) und Passage 25 (B - C) wurden für fünf Wochen auf Transwell Filter, in spezifischem Medium, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und das *tight junction* Protein ZO-1 immunhistologisch detektiert (grün). (A) alternde ARPE-19 (P38) zeigten eine schwache, aber bestehende ZO-1 Verbindung. (B) In jungen ARPE-19 (P25) Zellen konnte eine intakte und deutliche ZO-1 Färbung detektiert werden und (C) eine dunkle Pigmentierung im Durchlicht festgestellt werden. Vergrößerung 100-fach. Maßstabsbalken entspricht 40 μm . Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt.

Eine weitere Charakterisierung erfolgte mittels qRT-PCR. Die mRNA von alten und jungen ARPE-19 wurde auf typische mesenchymale Marker Vimentin (*VIM*, Abbildung 20A), α -Aktin (*ACTA2*, Abbildung 20B) und Kollagen Typ 1 (*COL1A1*, Abbildung 20C) untersucht. Die Ergebnisse aus den (Immun)-Histologie-Färbungen konnten auch auf RNA-Ebene bestätigt werden. ARPE-19 (P38) zeigten eine signifikant erhöhte mRNA Expression (Abbildung 20, grau) von allen drei getesteten mesenchymalen Markern im Vergleich zu jungen ARPE-19 (Abbildung 20, weiß). Verringerte ΔCT -Werte bedeuten eine erhöhte mRNA Expression mesenchymaler Marker (Abbildung 20, Pfeilrichtung zeigt die epithelial zu mesenchymaler Transition an).

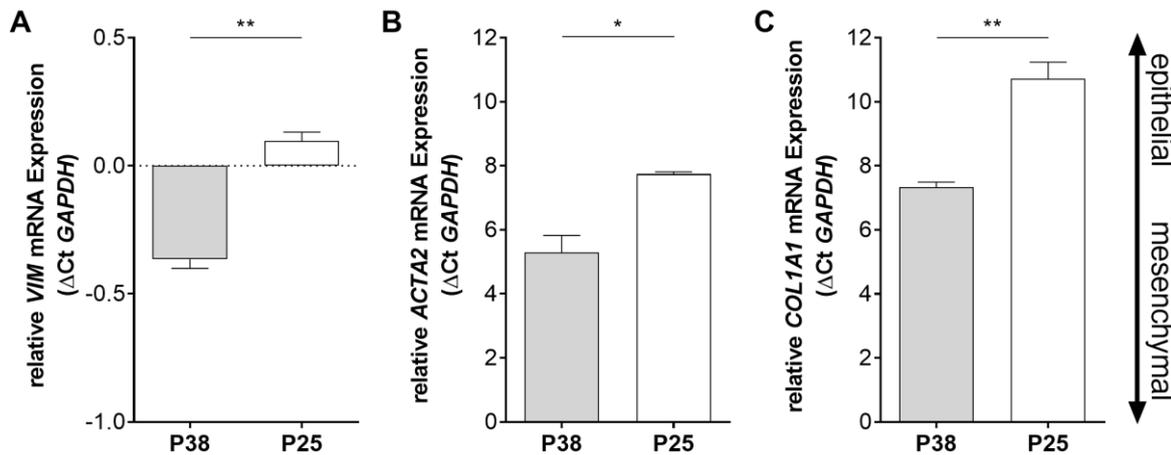


Abbildung 20: Die mRNA Expression von mesenchymalen Markern ist erhöht in alternden ARPE-19 Zellen (P38) im Vergleich zu jungen ARPE-19 Zellen (P25).

ARPE-19 Zellen (P38 und P25) exprimieren mesenchymale Marker. Die Transition ist in alternden ARPE-19 Zellen (P38, grau) im Vergleich zu jungen ARPE-19 Zellen (P25, weiß) sowohl für **(A)** Vimentin (*VIM*), **(B)** α -Aktin (*ACTA2*) und **(C)** Kollagen Typ 1 (*COL1A1*) signifikant vom epithelialen- zum mesenchymalen Phänotyp geändert (Pfeil). Dargestellt ist die relative mRNA Expression (CT-Werte normalisiert gegen *GAPDH*, $\Delta\text{Ct GAPDH}$, verringerte ΔCt -Werte = erhöhte mRNA Expression). Die Ergebnisse beinhalten je ein unabhängiger Versuch mit jeweils drei individuellen Einzelwerten. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test mit Welch's correction).

Mit der Optimierung und Charakterisierung der ARPE-19 Zellen konnte somit die Grundlage für die nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen geschaffen werden, um den lokalen Einfluss von FHR-3 sowohl auf gesunde als auch auf potenziell erkrankte RPE Zellen mit phänotypischer Veränderung zu bestimmen.

5.4.2 Immunmodulatorischer Einfluss von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen

Für die folgenden *in vitro* Versuche wurden alte ARPE-19 (P38, Abbildung 19E, Abbildung 20A, Abbildung 21) und junge ARPE-19 (P25, Abbildung 19F, Abbildung 20B, Abbildung 21) verwendet, um den Einfluss von FHR-3 sowohl auf junge gesunde RPE Zellen als auch auf alte potenziell erkrankte RPE Zellen zu untersuchen. Vor FHR-3 Inkubation wurden die Zellen innerhalb von drei Tagen auf 0 % FCS reduziert, um eine Kontamination mit systemischen Komplementkomponenten zu vermeiden. FCS-Entzug hatte dabei keinen Einfluss auf den Zell-Metabolismus oder die Monolayer-Formation der ARPE-19^{12,137,138}. Außerdem sollte damit sichergestellt werden, dass ein möglicher immunmodulatorischer Effekt von FHR-3 lokal von den RPE Zellen gesteuert wird. ARPE-19 wurden vor Versuchsbeginn auf die wichtigsten AMD-assoziierten Komplement-Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) genotypisiert,

und eine Heterozygotie für den bekanntesten *CFH* SNP (Y402H)^{44,49,51,60} und für einen C3 SNP^{60,139} festgestellt werden konnte (Anhang Tabelle 31). Nochmals wichtig zu erwähnen ist, dass ARPE-19 Zellen keine *CFHR3* mRNA exprimieren⁴⁰.

Alte ARPE-19 (P38) und junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden apikal mit rekombinantem FHR-3, zeitabhängig und unter Serum-freien Bedingungen, behandelt. Als Kontrollproteine wurden Zellen entweder mit FHR-1, Negativregulator FH oder Positivregulator FP (Properdin) behandelt.

5.4.3 Aufnahme von FHR-3 durch alternde ARPE-19 Zellen

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Negativregulator FH durch apoptotische ARPE-19 Zellen aufgenommen wird¹⁴⁰ und FHR-1 mit nekrotischen Endothelzellen interagiert¹⁴¹.

In ersten Zellversuchen in dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob apikal inkubiertes FHR-3 mit ARPE-19 Zellen interagiert. Als negatives Kontrollprotein wurde der Komplementaktivator Properdin apikal inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die apikalen und basalen Überstände in eigens etablierten Immunoassays auf verbliebenes FHR-3 und Properdin untersucht. Es wurde gezeigt, dass nur ca. 30 % FHR-3 apikal im Überstand verblieben, basal konnte kein FHR-3 detektiert werden (Anhang Abbildung 50A). Im Gegensatz dazu waren noch 92 % Properdin apikal im Überstand nachweisbar nach 24 Stunden Inkubation (Anhang Abbildung 50B).

Zur Bestätigung dieser Daten, wurden FHR-3 behandelte ARPE-19 Zellen fixiert, mit anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 immunhistologisch gefärbt und eine spezifische Interaktion festgestellt werden (Abbildung 21A – C). In einem zusätzlichen Versuch wurde rekombinantes FHR-3 mit einem kommerziellen pH-sensitiven Farbstoff markiert, um eine Internalisierung von FHR-3 durch ARPE-19 Zellen zu visualisieren. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass spezifisch FHR-3 von alternden ARPE-19 Zellen aufgenommen wurde (Abbildung 21D). Eine Bindung, jedoch keine Internalisierung von FHR-3 wurde in jungen ARPE-19 (P25) festgestellt (Daten nicht gezeigt).

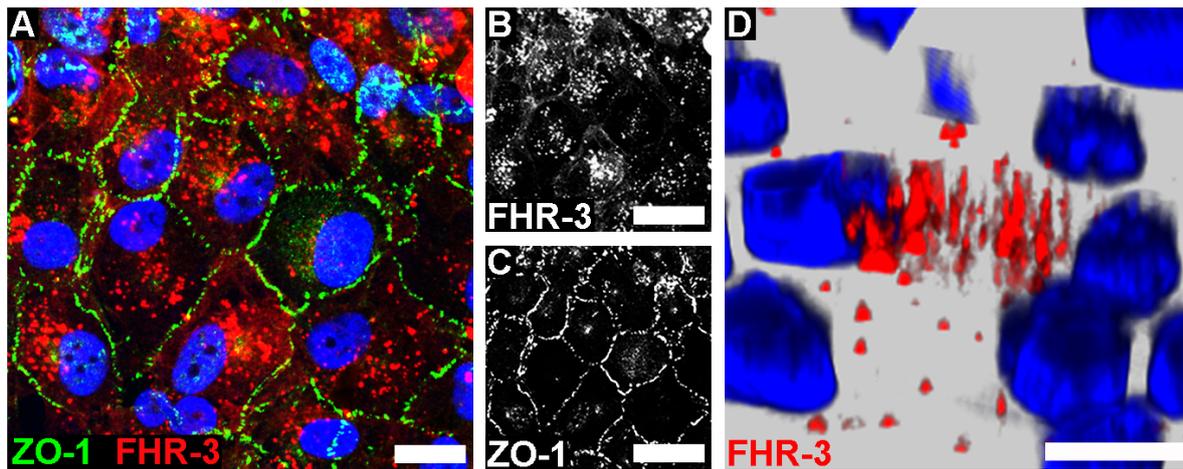


Abbildung 21: FHR-3 wird von ARPE-19 Zellen internalisiert.

ARPE-19 Zellen (P38), polarisiert im Transwell, wurden mit FHR-3 behandelt, anschließend fixiert und immunhistologisch ausgewertet. **(A)** FHR-3 wurde nach 2 h Inkubationszeit mittels anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 spezifisch detektiert (rot, **B**), Zell-Zell-Verbindungen wurden mit anti-ZO-1 Antikörper markiert (grün, **C**). Vergrößerung 100-fach. **(D)** FHR-3, markiert mit pH-sensitivem Farbstoff, wurde für 60 min apikal auf ARPE-19 inkubiert, die Zellen anschließend fixiert, FHR-3 (rot) immunhistologisch detektiert und die Aufnahme über 3D-Modellierung visualisiert. Vergrößerung 400-fach. Maßstabsbalken entspricht 40 μ m. Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt.

Zusammenfassend konnte in diesen Experimenten eine spezifische Interaktion von FHR-3 mit ARPE-19 Zellen (P38, P25) und eine Internalisierung von FHR-3 durch alternde ARPE-19 Zellen nachgewiesen werden.

5.4.3.1 Regulation von EMT-Markern nach FHR-3 Behandlung

Im Transwell kultivierte alte ARPE-19 Zellen (P38) unterlagen einer phänotypischen mesenchymalen Transition (Abbildung 18, Abbildung 19), was auch auf RNA-Ebene bestätigt werden konnte (Abbildung 20), im Vergleich zu jungen P25 ARPE-19 Zellen. Nach FHR-3 Behandlung konnte beobachtet werden, dass EMT-Marker *VIM*, *ACTA2* und *COL1A1* signifikant erhöht exprimiert waren in jungen ARPE-19 (P25) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 22). Dieser Effekt wurde in alten ARPE-19 Zellen nur für die *Vimentin* mRNA Expression beobachtet (Abbildung 22A).

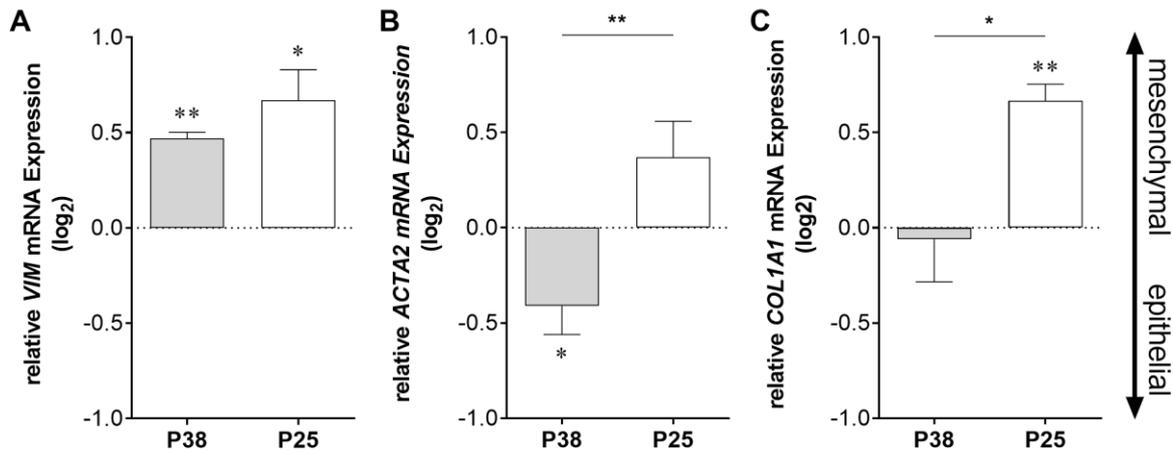


Abbildung 22: Die mRNA Expression von mesenchymalen Markern ist nach FHR-3 Behandlung gegensätzlich reguliert in alternden ARPE-19 Zellen (P38) im Vergleich zu jungen ARPE-19 Zellen (P25).

Die mRNA von ARPE-19 Zellen (P38 und P25) wurde 5 h und 24 h nach FHR-3 Behandlung auf Transkriptänderungen von mesenchymalen Markern untersucht. **(A)** Die Transition vom epithelialen- hin zum mesenchymalen Phänotyp (Pfeil) ist in alternden ARPE-19 Zellen (P38, grau) und in jungen ARPE-19 Zellen (P25, weiß) für Vimentin (*VIM*) signifikant erhöht. Die mRNA Expression von **(B)** α -Aktin (*ACTA2*) und **(C)** Kollagen Typ 1 (*COL1A1*) sind signifikant gegensätzlich reguliert in P38 und P25 ARPE-19 Zellen nach FHR-3 Behandlung. **(B)** α -Aktin mRNA ist signifikant erniedrigt in alten ARPE-19 und tendenziell erhöht in jungen ARPE-19 Zellen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. **(C)** Kollagen Typ 1 mRNA wird in alten ARPE-19 nicht reguliert, in jungen ARPE-19 aber signifikant vermehrt exprimiert nach FHR-3 Behandlung. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test mit Welch's correction).

5.4.3.2 FHR-3 Regulation von C3 und CFB

Komplementproteine, die die Komplementaktivität u. a. über Komplementrezeptoren modulieren können, werden lokal durch retinale Zelltypen^{14,71,84} und durch ARPE-19 Zellen exprimiert¹². In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass gebundenes und internalisiertes FHR-3, unabhängig von anderen extrazellulären Komplementregulatoren oder systemsichen Modulatoren, einen direkten Einfluss auf die Komplementexpression und -Sekretion von ARPE-19 Zellen hat.

Die mRNA Expression von der Hauptkomplementkomponente C3 wurde signifikant hochreguliert in alten ARPE-19 Zellen, zeitabhängig von 5 h nach 24 h FHR-3 Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Diese Expressionserhöhung konnte nach Inkubation von FHR-1, FH oder Properdin nicht detektiert werden (Abbildung 23A). In jungen ARPE-19 Zellen waren die C3 Transkripte nur 24 h nach FHR-3 Behandlung signifikant erhöht (Abbildung 23B).

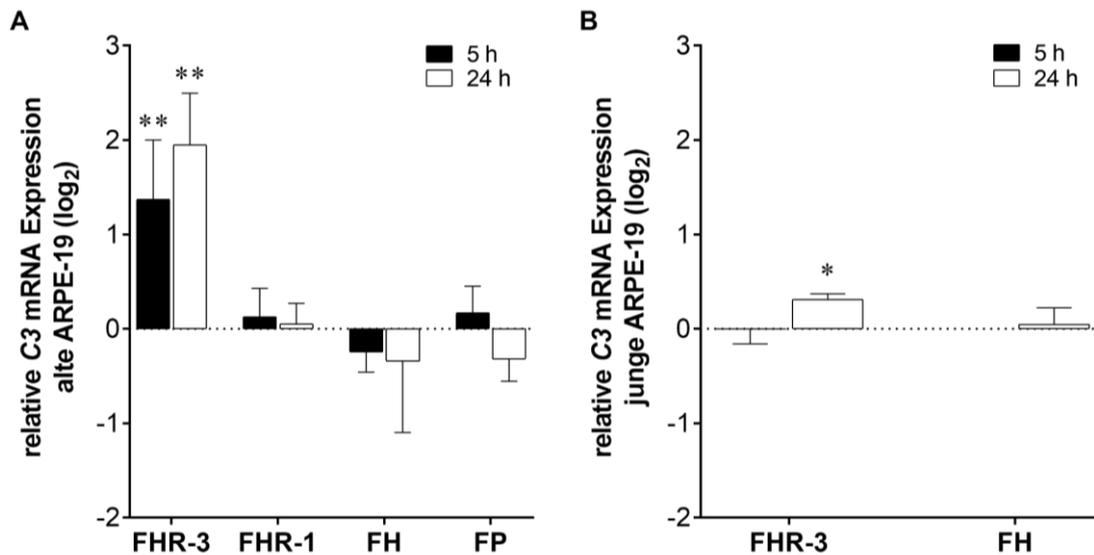


Abbildung 23: C3 mRNA Expressionssteigerung in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen.

Die mRNA von **(A)** alten ARPE-19 Zellen (P38) und **(B)** jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach sowohl FHR-3 Behandlung, als auch FHR-1, FH und FP Behandlung isoliert, mittels qPCR auf C3 Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. **(A)** Eine signifikant erhöhte Expression konnte in alternden ARPE-19 Zellen spezifisch und zeitabhängig nur nach FHR-3 Inkubation festgestellt werden. **(B)** In jungen ARPE-19 Zellen konnte eine signifikant erhöhte Expression 24 h nach FHR-3 Inkubation detektiert werden. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

Auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse über Western Blot (Abbildung 24, Abbildung 25), Immunhistologie (Abbildung 26) und ELISA (Abbildung 27) bestätigt werden. In Zelllysaten konnte ein zeitabhängiger signifikanter Anstieg von C3 (190 kDa) und Aktivierungsprodukt C3b (101 kDa), von 5 h nach 12 h FHR-3 Behandlung in alten ARPE-19 (Abbildung 24A, B) und von 5 h nach 24 h FHR-3 Inkubation in jungen ARPE-19 Zellen (Abbildung 25A, B), im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Anhang Abbildung 56) beobachtet werden. Das Inaktivierungsprodukt C3c (39 kDa) war im Verhältnis zu C3 sowohl in alten Zellen (Abbildung 24C) als auch in jungen ARPE-19 (Abbildung 25C) von 5 h nach 24 h tendenziell verringert exprimiert.

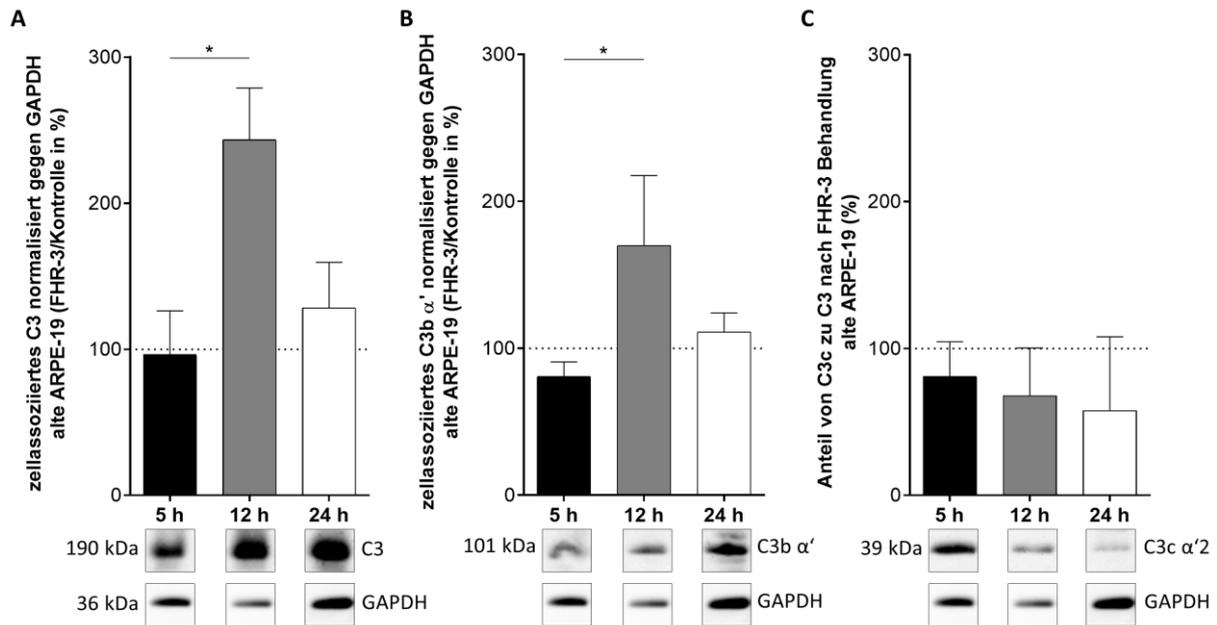


Abbildung 24: Zell-assoziiertes C3 und C3b sind erhöht und C3-Degradationsprodukt C3c ist erniedrigt in FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen.

Alte ARPE-19 Zellen (P38) wurden für 5 h, 12 h oder 24 h mit FHR-3 behandelt, die Zelllysate anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischem anti-C3 Antikörper im Western Blot detektiert. Es konnte eine signifikant erhöhte **(A)** C3 Proteinmenge und **(B)** C3b Proteinmenge von 5 h nach 12 h FHR-3 Inkubation detektiert werden. **(C)** In FHR-3 behandelten alten ARPE-19 Zellen lagen geringere C3c Proteine im Verhältnis zu C3 Proteinen vor, im Vergleich zu unbehandelten ARPE-19 Zellen. Die Quantifizierung der C3 Proteine erfolgte gegen GAPDH anhand von zwei unabhängigen Versuchen. *p < 0.05 (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test).

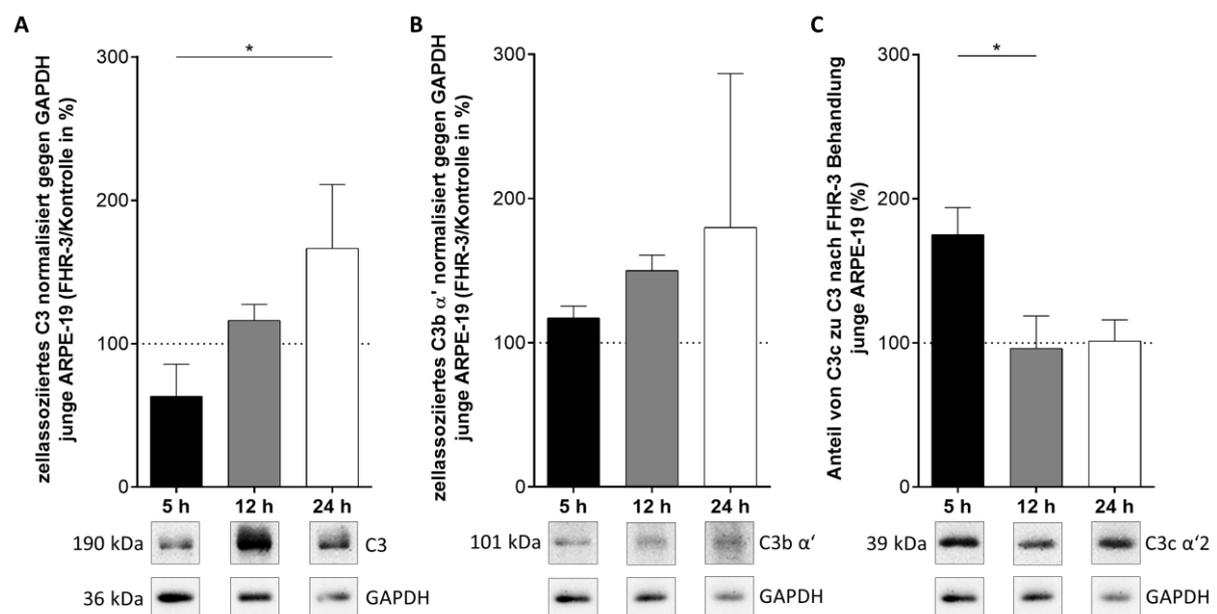


Abbildung 25: Zell-assoziiertes C3 und C3b sind zeitabhängig erhöht und C3-Degradationsprodukt C3c ist erniedrigt in FHR-3-behandelten jungen ARPE-19 Zellen.

Junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden für 5 h, 12 h oder 24 h mit FHR-3 behandelt, die Zelllysate anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischem anti-C3 Antikörper im Western Blot

detektiert. Es konnte eine zeitabhängige signifikant erhöhte **(A)** C3 Proteinmenge und **(B)** C3b Proteinmenge von 5 h nach 24 h FHR-3 Inkubation detektiert werden. **(C)** FHR-3 behandelte junge ARPE-19 Zellen zeigten nach 5 h einen erhöhten Anteil von C3c Proteinen zu C3 Proteinen, im Vergleich zu unbehandelten ARPE-19 Zellen. Dieser Effekt war nach 12 h Behandlung signifikant reduziert. Die Quantifizierung der C3 Proteine erfolgte gegen GAPDH anhand von zwei unabhängigen Versuchen. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test).

Immunhistologisch konnte C3 intrazellulär, co-lokalisiert mit Golgi-Marker GM130, detektiert werden (Abbildung 26A, B). Diese Co-Lokalisierung wurde vermehrt in FHR-3 behandelten ARPE-19 (Abbildung 26A), im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 26B) visualisiert. Außerdem konnte erstmals intrazelluläres Anaphylatoxin C3a, erhöht nach FHR-3 Behandlung, in ARPE-19 Zellen detektiert werden (Abbildung 26C – F). Überraschenderweise wurde C3a zeitabhängig nach FHR-3 Inkubation von 2 h intrazellulär nach 6 h an die Zellmembran transportiert (Abbildung 26C, E). Dieser Effekt konnte in unbehandelten ARPE-19 Zellen nicht festgestellt werden (Abbildung 26D, F).

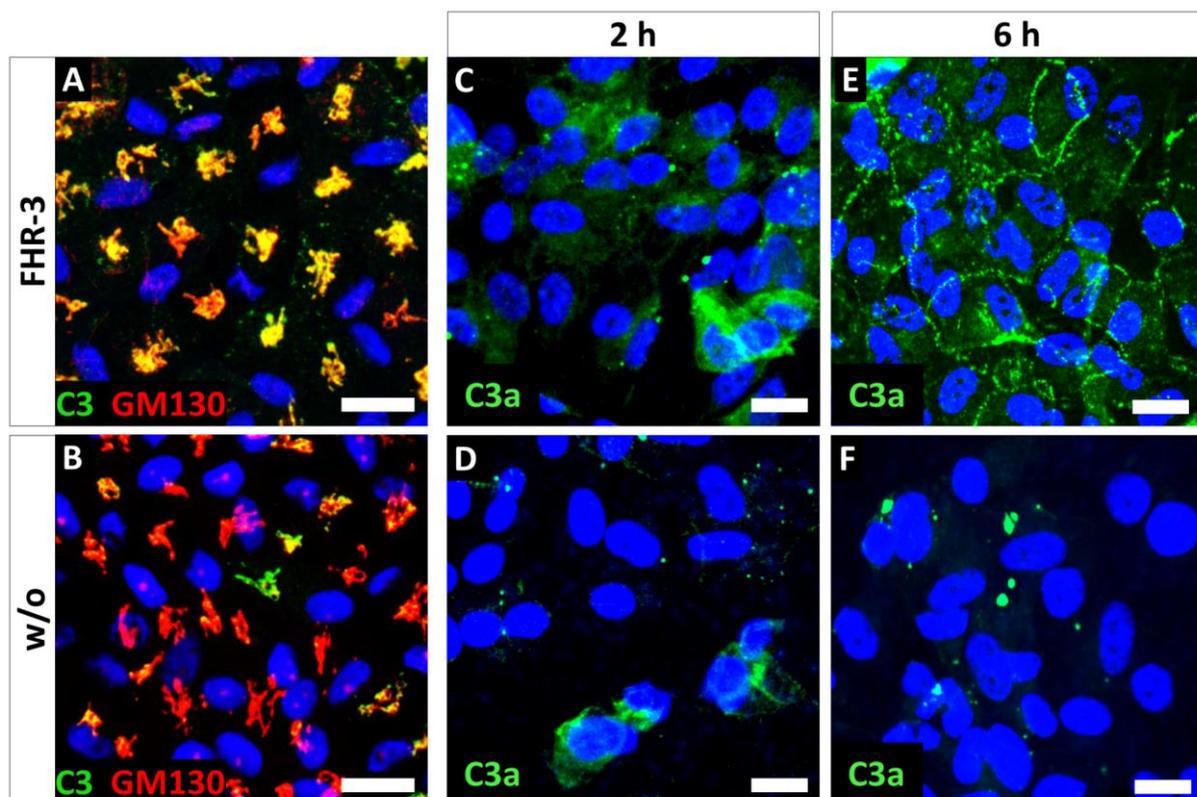


Abbildung 26: Erhöhte C3 und C3a Expression in Immunfärbungen von FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen. **(A - B)** ARPE-19 Zellen (P25) wurden nach 12 h FHR-3 Behandlung im Membraneinsatz fixiert und durch einen spezifischen anti-C3 Antikörper (grün) und einen Golgi-Marker (rot) angefärbt. Es konnte eine erhöhte intrazelluläre C3-Expression (grün), co-lokalisiert (gelb) mit Golgi (rot), in **(A)** FHR-3 behandelten Zellen im Vergleich zu **(B)** unbehandelten Zellen (w/o) visualisiert werden. Zellkerne wurden mittels Hoechst angefärbt. **(C - F)** ARPE-19 Zellen (P38) wurden 2 h und 6 h nach FHR-3 Behandlung im Membraneinsatz fixiert und mittels spezifischem anti-C3a Antikörper visualisiert (grün). **(C, E)** FHR-3 behandelte ARPE-19 Zellen weisen mehr C3a Protein auf als **(D, F)**

unbehandelte Zellen. C3a wurde zeitabhängig von (C) 2 h FHR-3 Behandlung nach (E) 6 h FHR-3 Behandlung zur Zellmembran transportiert. Zellkerne wurden mittels Hoechst angefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 40 μm .

Mittels kommerziellem Multiplex-ELISA wurde außerdem überprüft, ob C3 nach FHR-3 Behandlung von ARPE-19 Zellen in den Zellkulturüberstand sezerniert wird (Abbildung 27). Eine signifikant vermehrte C3 Sekretion konnte nur von alten ARPE-19 Zellen (Abbildung 27A), nicht aber jungen ARPE-19 (Abbildung 27B) detektiert werden. Zellen mit FH behandelt, zeigten keine veränderte C3 Sekretion im Vergleich zu unbehandelten RPE Zellen (Abbildung 27).

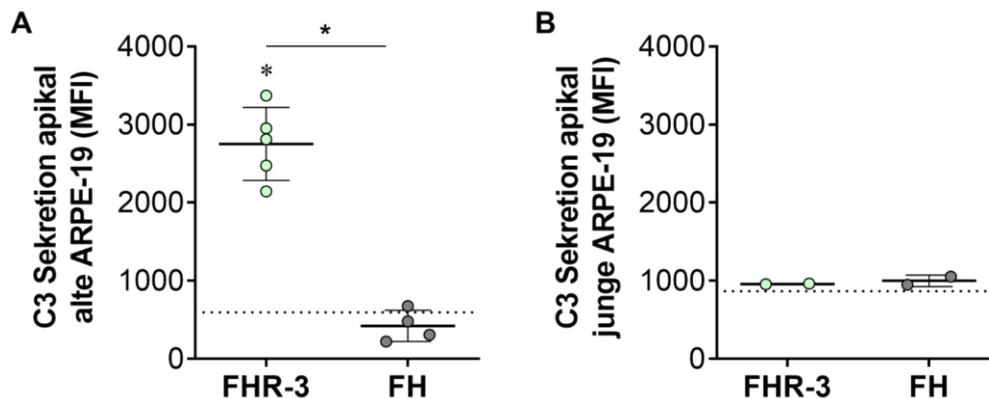


Abbildung 27: FHR-3 induzierte eine erhöhte C3 Sekretion in alternden ARPE-19 Zellen.

(A) Alte ARPE-19 Zellen (P38) und (B) junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden für 24 h entweder mit FHR-3 oder mit FH behandelt und die apikalen Überstände anschließend mittels Multiplex-ELISA untersucht. (A) C3 Proteine wurden signifikant vermehrt im Zellkulturüberstand von FHR-3-behandelten (grün) alternden ARPE-19 Zellen detektiert im Vergleich zu FH-behandelten Zellen (grau) und den unbehandelten Kontrollen (gepunktete Linie). (B) In jungen ARPE-19 Zellen konnte kein Unterschied in der C3 Sekretion zwischen FHR-3- (grün), FH- (grau), oder unbehandelten Zellen (gepunktete Linie) gemessen werden. MFI = Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten.

* $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, wurde untersucht, ob die erhöhten C3 Proteine, trotz FCS-Entzug, von RPE-Zell opsonisiertem bovinem C3b stammen (77 % identisch zu humanem C3). Im Western Blot (Anhang Abbildung 54A) und in den Immunfärbungen (Abbildung 54B) wurde, unter Verwendung von spezifischen monoklonalen anti-C3 Antikörpern (Anhang Abbildung 52), keine Kreuzreaktion von bovinem C3b im FCS detektiert. Die verwendeten anti-C3 mAk wurden im Western Blot auf spezifische Bindung an natives C3 und C3-Spaltprodukte charakterisiert (Abbildung 53).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals, zusammen mit einer kürzlich veröffentlichten Studie ¹², bestätigt werden, dass ARPE-19 Zellen C3 nicht nur lokal

exprimieren, sondern auch Zell-autonom aktivieren. Dies konnte bisher nur in T-Zellen beobachtet werden ⁹.

Neben C3 ist der Komplementfaktor B (CFB) eine Hauptkomponente im alternativen Komplementweg (Abbildung 1), eine übermäßige Expression von CFB kann somit zu einer erhöhten Komplementaktivität führen.

CFB Transkripte wurden in ARPE-19 Zellen zeitabhängig von 5 h nach 24 h FHR-3 Behandlung signifikant hochreguliert, im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 28), wobei der Effekt in alten ARPE-19 Zellen v. a. 24 h nach FHR-3 Inkubation (Abbildung 28A) deutlich stärker war als in jungen ARPE-19 (Abbildung 28B). Nach Behandlung mit den Kontrollproteinen konnte der Expressionsanstieg tendenziell nur 24 h nach Inkubation von FHR-1 in alten RPE Zellen (Abbildung 23A), und von FH in jungen ARPE-19 (Abbildung 23B) detektiert werden.

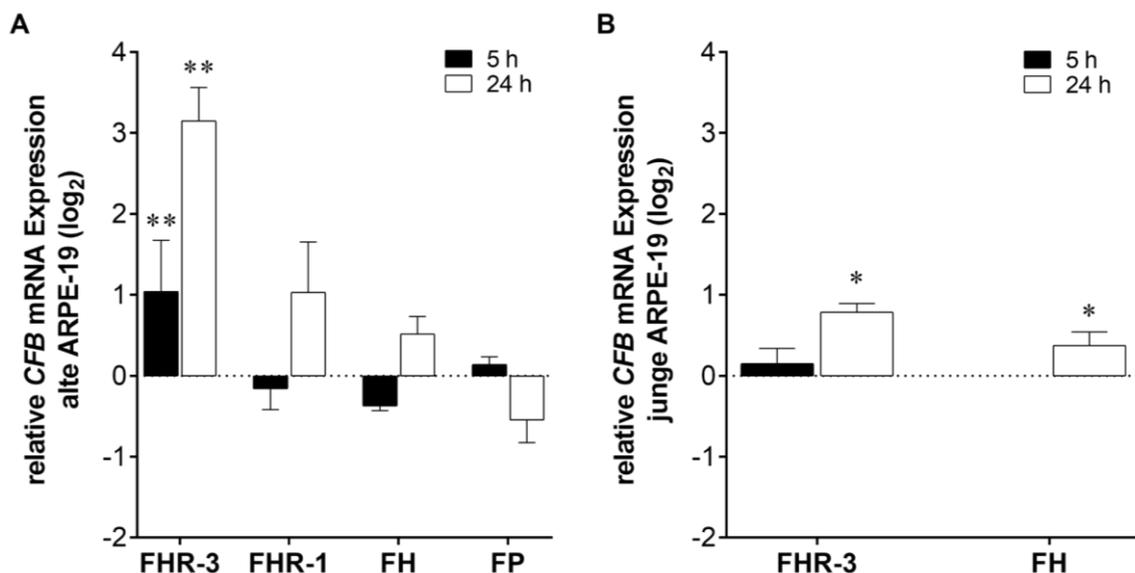


Abbildung 28: CFB mRNA Expressionsanstieg in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen.

Die mRNA von (A) alten ARPE-19 Zellen (P38) und (B) jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach sowohl FHR-3-Behandlung, als auch FHR-1, FH und FP-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf *CFB* Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. (A) Eine signifikant erhöhte Expression konnte in alternden ARPE-19 Zellen zeitabhängig nach FHR-3 Inkubation festgestellt werden. (B) In jungen ARPE-19 Zellen konnte eine signifikant erhöhte Expression 24 h nach FHR-3 Inkubation detektiert werden. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. **p < 0,01, *p < 0,05 (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

In Zelllysaten wurde vermehrt CFB Protein (95 kDa) nach FHR-3 Inkubation detektiert, im Vergleich zu unbehandelten ARPE-19 Zellen (Abbildung 29). Mittels Western Blot

und anschließender Quantifizierung konnte in ARPE-19 Zellen (P38) ein signifikanter, zeitabhängiger CFB Anstieg von 5 h nach 24 h apikaler FHR-3 Behandlung detektiert werden (Abbildung 29A), wohingegen in jungen ARPE-19 Zellen tendenziell weniger CFB nach 5 h Behandlung und signifikant mehr CFB nach 12 h FHR-3 Inkubation feststellbar war (Abbildung 29B). CFB Spaltprodukte Bb (60 kDa) und Ba (35 kDa) konnten in alten (P38) und jungen (P25) ARPE-19 Zellen sowohl nach FHR-3 Behandlung als auch unbehandelt detektiert werden (Anhang Abbildung 56), wurden aber nicht quantifiziert.

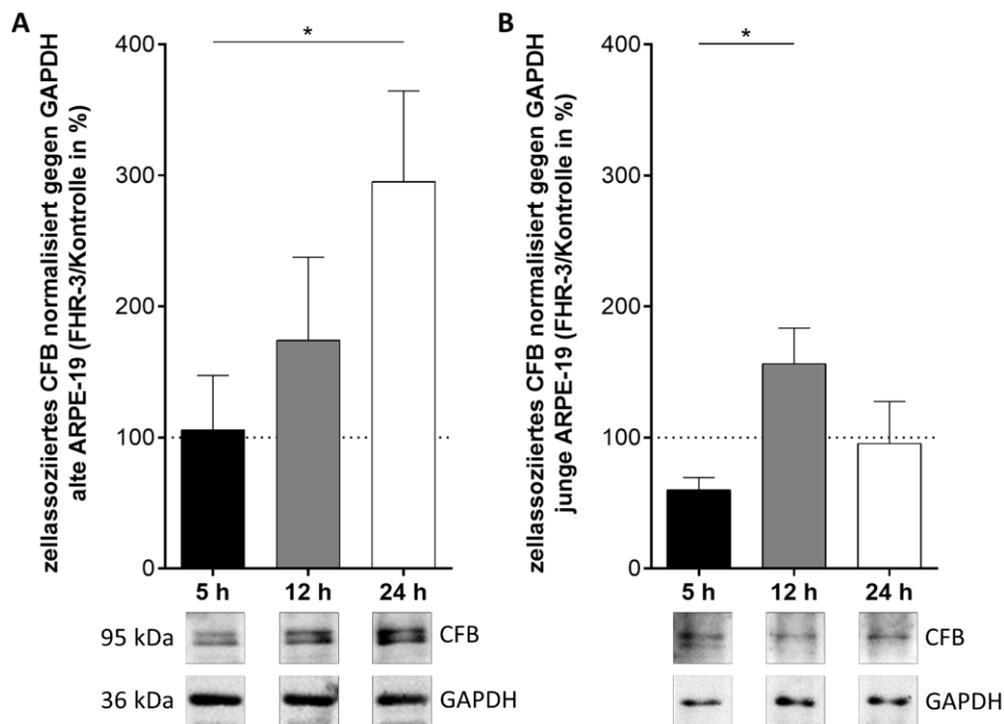


Abbildung 29: Zell-assoziiertes CFB ist zeitabhängig erhöht in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen unterschiedlicher Passagen.

(A) Alte (P38) und (B) junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden für 5 h, 12 h oder 24 h mit FHR-3 behandelt, die Zelllysate anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischem anti-CFB Antikörper im Western Blot detektiert. (A) In alternden Zellen konnte ein zeitabhängiger signifikanter Anstieg von CFB von 5 h nach 24 h FHR-3 Inkubation detektiert werden. (B) Junge ARPE-19 Zellen exprimierten signifikant mehr CFB 12 h nach FHR-3 Behandlung im Vergleich zu 5 h-behandelten Zellen, in denen tendenziell eine verminderte CFB Proteinmenge detektiert wurde. CFB Proteine wurden gegen GAPDH, anhand von zwei unabhängigen Versuchen, quantifiziert. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test).

Immunhistologisch konnte CFB vermehrt in FHR-3 behandelten alten (Abbildung 30A, B) und jungen ARPE-19 Zellen (Abbildung 30C, D) mittels spezifischem Antikörper visualisiert werden. Eine Co-Färbung mit Aktin-Marker Phalloidin zeigte, dass CFB in alten ARPE-19 Zellen mit Aktin-Stressfasern co-lokalisierte, sowohl nach FHR-3 Behandlung als auch in unbehandelten Zellen (Abbildung 30A, B). In jungen RPE

Zellen wurde CFB nur partiell nach FHR-3 Inkubation mit kompakten apikalen F-Aktin Ringen und strukturierte apikalen Aktin-Bündeln co-gefärbt (Abbildung 30C).

Diese Ergebnisse bestätigen nochmals, dass sich ARPE-19 der Passage 38 (P38) unter zellulärem Stress befinden, da seit Jahren bekannt ist, dass normale Epithelzellen eine Aktin-Polymerisation im Bereich der *tight junctions* aufweisen und direkt mit ZO-1 interagieren. Epithelialer Zellstress hingegen führt zur Depolymerisation und damit zu Aktin-Stressfasern^{79,142,143}.

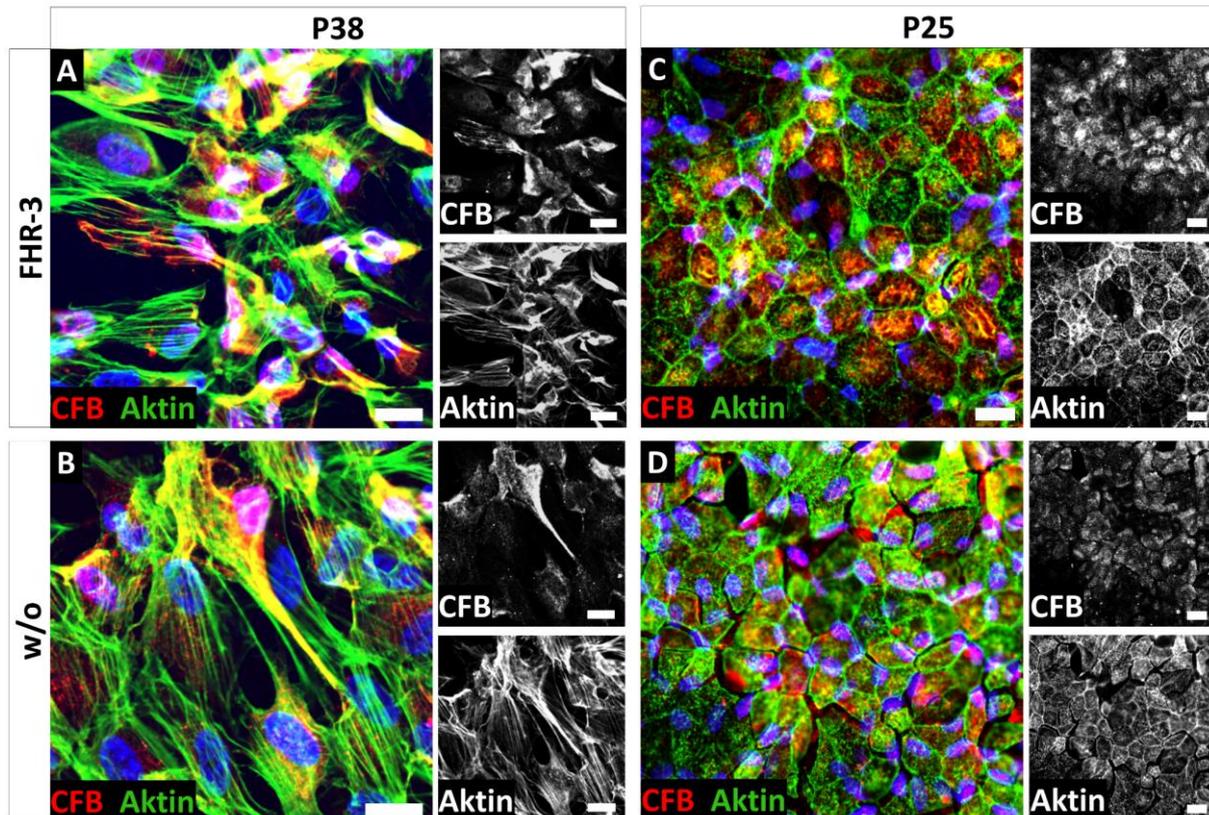


Abbildung 30: Erhöhte CFB Expression in Immunfärbungen von FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen und Co-Lokalisierung mit Aktin-Filamenten.

(A - B) Alte ARPE-19 Zellen der Passage 38, und (C - D) junge ARPE-19 Zellen der Passage 25 wurden nach 5 h FHR-3 Behandlung, oder unbehandelt, im Membraneinsatz fixiert und mittels spezifischem anti-CFB Antikörper (rot) und Phalloidin (grün), zur Visualisierung von Aktin-Filamenten, immunhistologisch gefärbt. (A - B) In alten ARPE-19 Zellen konnte CFB mit Aktin-Stressfasern co-lokalisiert (gelb) werden. Eine erhöhte CFB Expression konnte nach (A) FHR-3 Behandlung im Vergleich zur (B) unbehandelten Kontrolle (w/o) detektiert werden. (C - D) In jungen ARPE-19 Zellen konnte CFB zell-assoziiert visualisiert werden (rot). Die Co-Färbung mit Phalloidin ergab kompakte apikale F-Aktin Ringe und apikale mikrovilläre Aktin-Bündel (grün). Eine Co-Lokalisation von CFB und Aktin wurde partiell im apikalen Bereich der ARPE-19 Zellen detektiert (gelb). Eine erhöhte CFB Expression konnte nach (C) FHR-3 Behandlung im Vergleich zur (D) unbehandelten Kontrolle (w/o) detektiert werden. Zellkerne wurden mit Hoechst visualisiert. Maßstabsbalken entspricht 40 µm.

Mittels kommerziellem Multiplex-ELISA konnte gezeigt werden, dass alte ARPE-19 Zellen vermehrt CFB in den apikalen Zellkulturüberstand sezernieren nach FHR-3

Behandlung (Abbildung 31A). Eine tendenziell vermehrte CFB Sekretion konnte in jungen ARPE-19 nach FH detektiert werden (Abbildung 31B). Zellen mit FH behandelt, zeigten keine veränderte C3 Sekretion im Vergleich zu unbehandelten RPE Zellen (Abbildung 27).

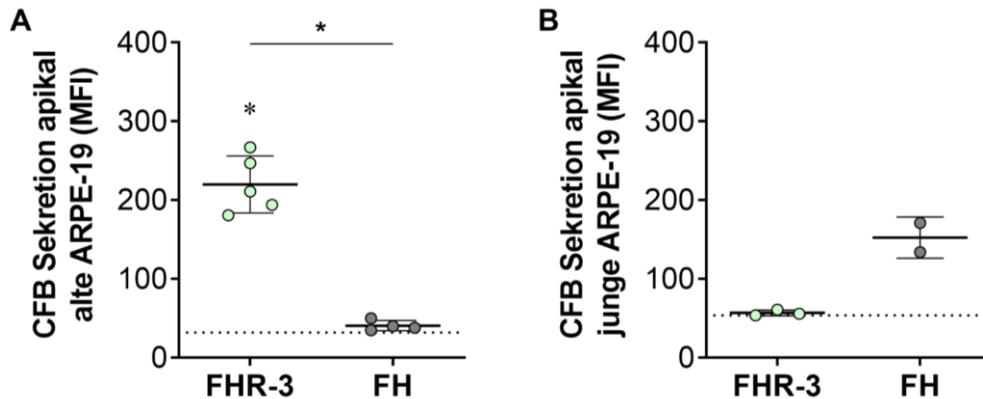


Abbildung 31: FHR-3 induzierte eine erhöhte CFB Sekretion in alternden ARPE-19 Zellen.

(A) Alte ARPE-19 Zellen (P38) und (B) junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden für 24 h entweder mit FHR-3 oder mit FH behandelt und die apikalen Überstände anschließend mittels Multiplex-ELISA untersucht. (A) Im apikalen Überstand von FHR-3-behandelten (grün) alten ARPE-19 Zellen konnte ein signifikanter Anstieg von CFB detektiert werden, im Vergleich zu FH-behandelten Zellen (grau) und zu den unbehandelten Kontrollen (gepunktete Linie). (B) In jungen ARPE-19 Zellen konnte kein Unterschied in der CFB Sekretion nach FHR-3-Behandlung (grün) gemessen werden. Jedoch wurde ein tendenzieller Anstieg von sezerniertem CFB nach FH-Behandlung (grau) detektiert, verglichen mit den unbehandelten Zellen (gepunktete Linie). MFI = Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten. * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur C3, sondern auch C3 Aktivierungsprodukte C3b und C3a vermehrt in ARPE-19 Zellen nach FHR-3 Behandlung exprimiert wurden (Abbildung 24 – Abbildung 26). ARPE-19 Zellen exprimieren die an C3b, iC3b und C3a-bindenden Komplementrezeptoren CD11b und C3aR^{12,73}. Im Folgenden wurde untersucht, ob CD11b und C3aR ebenfalls durch apikal inkubiertes FHR-3 in ARPE-19 Zellen beeinflusst wird.

5.4.3.3 FHR-3 Regulation von C3aR und CD11b

Auf RNA-Ebene konnten sowohl in jungen als auch in alten ARPE-19 Zellen signifikant weniger C3aR Transkripte 5 h nach FHR-3 Inkubation detektiert werden. Dieser Effekt reversierte sich 24 h nach FHR-3 Behandlung auf einen signifikanten Anstieg der C3aR mRNA Expression (Abbildung 32). In jungen ARPE-19 Zellen konnten zudem signifikant weniger C3aR Transkripte 24 h nach FH-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 32B).

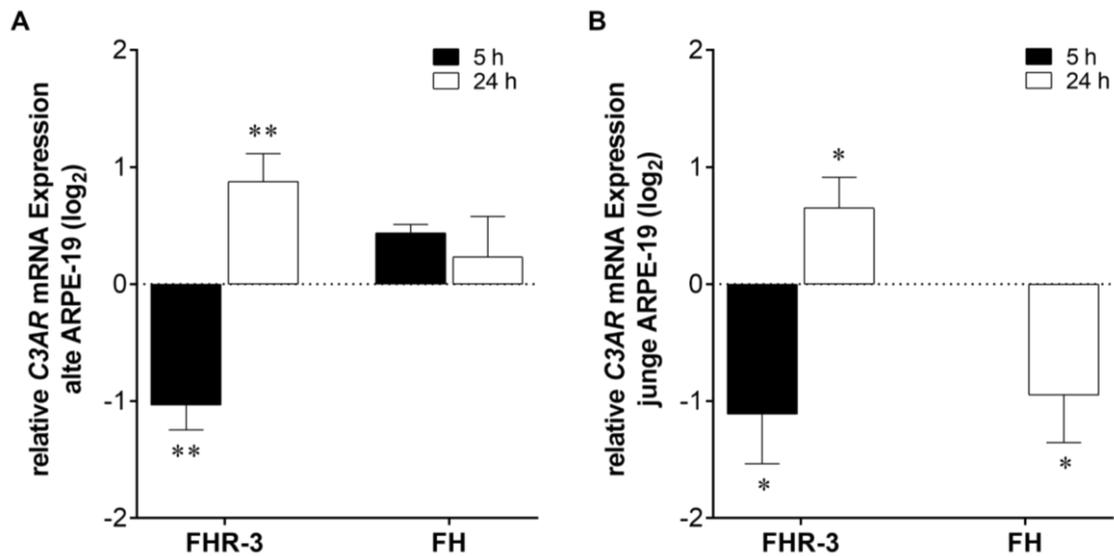


Abbildung 32: C3AR mRNA Expressionsänderung in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen.

Die mRNA von (A) alten ARPE-19 Zellen (P38) und (B) jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach sowohl FHR-3-Behandlung und FH-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf C3AR Transkriptänderungen untersucht und gegen GAPDH relativ quantifiziert. (A) Eine signifikant verringerte Expression konnte 5 h nach FHR-3 Inkubation gezeigt werden und 24 h nach FHR-3 Behandlung wurde signifikant mehr C3AR in ARPE-19 Zellen exprimiert. (B) In jungen ARPE-19 Zellen konnte das gleiche Transkriptionsmuster nach FHR-3 Behandlung detektiert werden wie bei alten ARPE-19 Zellen. Eine Inkubation für 24 h mit FH ergab signifikant weniger C3AR Transkripte. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

Auf Proteinebene konnte C3aR in Zelllysaten von ARPE-19 Zellen mittels Western Blot Analyse spezifisch detektiert werden (Abbildung 33, Anhang Abbildung 56). Dabei konnte kein einheitliches Expressionsmuster nach FHR-3 Behandlung in alten und jungen ARPE-19 Zellen festgestellt werden. Alte ARPE-19 (P38) exprimierten tendenziell weniger C3aR nach 5 h Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 33A), wohingegen junge RPE Zellen tendenziell weniger C3aR 12 h und 24 h nach FHR-3 Behandlung zeigten (Abbildung 33B).

Da C3aR mehrfach glykosyliert ist und für diese Analysen nur C3aR mit einem Molekulargewicht von 54 kDa quantifiziert wurde, ist eine Diskrepanz zwischen den RNA und Western Blot Ergebnissen möglich¹⁴⁴.

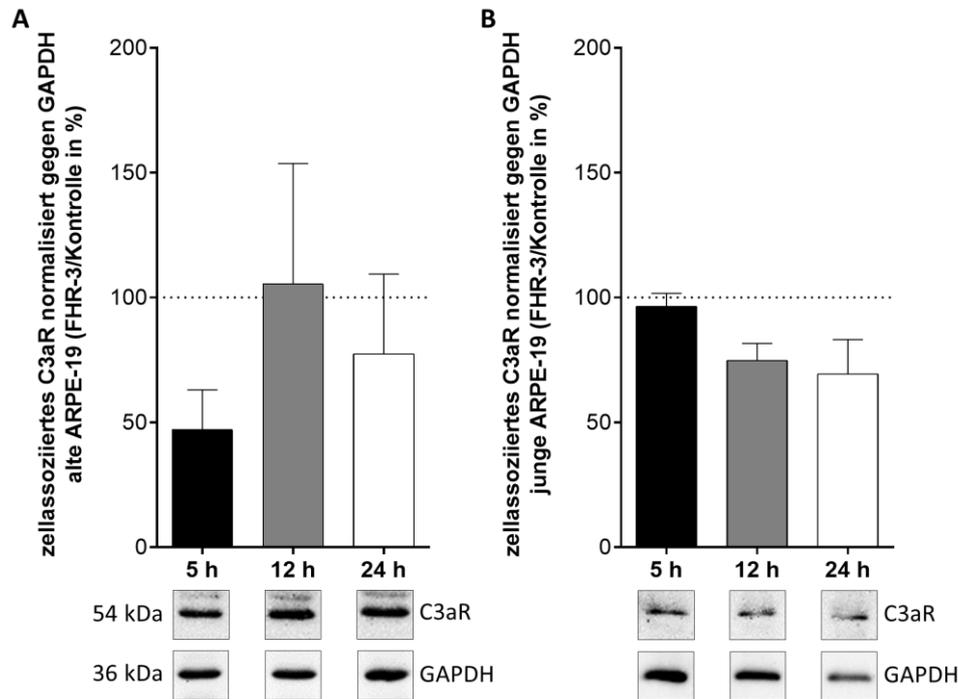


Abbildung 33: Zell-assoziiertes C3aR ist zeitabhängig vermindert exprimiert in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen unterschiedlicher Passagen.

(A) Alte (P38) und (B) junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden für 5 h, 12 h oder 24 h mit FHR-3 behandelt, die Zelllysate anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischem anti-C3aR Antikörper im Western Blot detektiert. (A) In alternden Zellen konnte eine verminderte C3aR Expression 5 h und 24 h nach FHR-3 Inkubation detektiert werden. (B) Junge ARPE-19 Zellen exprimierten zeitabhängig weniger C3aR Protein von 5 h nach 24 h FHR-3 Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. C3aR Proteine wurden gegen GAPDH, anhand von zwei unabhängigen Versuchen, quantifiziert. (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test).

In Immunfärbungen konnte eine verringerte C3aR Expression in 5 h FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen (P38), im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 34A, B). 12 h nach FHR-3 Inkubation war dieser Effekt nicht mehr sichtbar (Abbildung 34C, D). Junge ARPE-19 Zellen ergaben eine vermehrte C3aR Detektion 5 h nach Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 34E, F) und verringerte C3aR Proteine 12 h nach FHR-3 Inkubation (Abbildung 34G, H).

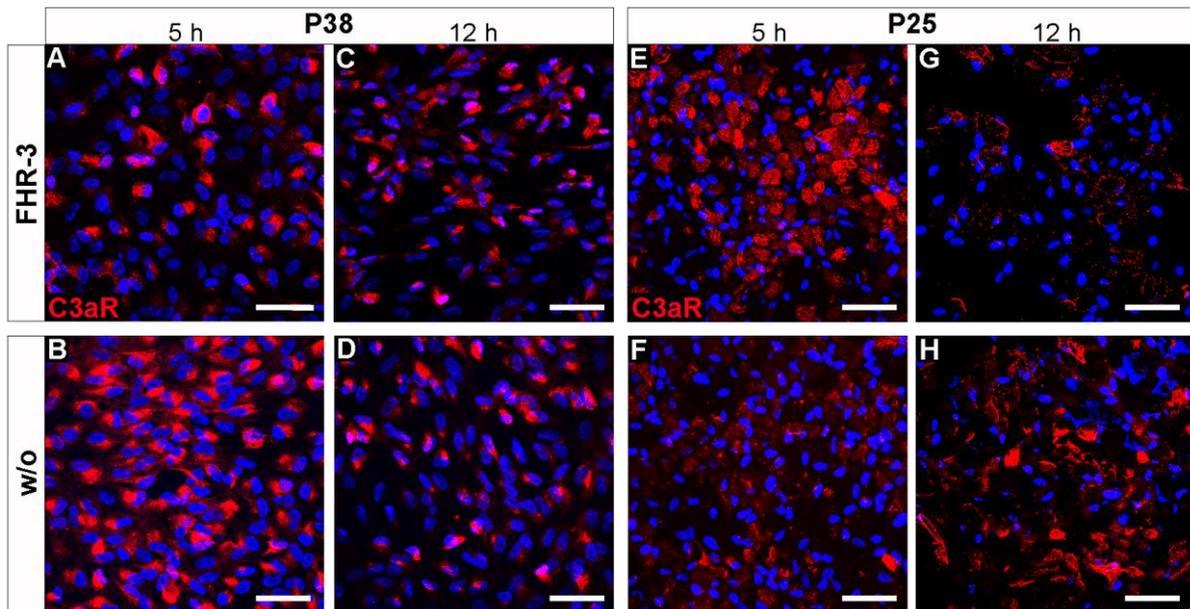


Abbildung 34: Veränderte C3aR Expression in Immunfärbungen von FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen unterschiedlicher Passagen.

(A - D) Alte ARPE-19 Zellen (P38), und (E - H) junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden 5 h und 12 h nach FHR-3 Behandlung, oder unbehandelt (w/o), im Membraneinsatz fixiert und mittels spezifischem anti-C3aR Antikörper (rot) immunhistologisch gefärbt. (A, B) Eine verringerte C3aR Expression konnte in FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen, im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden. (C, D) Nach 12 h FHR-3 Inkubation war dieser Effekt nicht mehr visualisierbar. Eine insgesamt geringere C3aR Expression wurde sowohl für behandelte als auch unbehandelte Zellen detektiert, verglichen mit den nach 5 h detektierten Proteinen (A, B). (E, F) In jungen ARPE-19 Zellen konnte 5 h nach FHR-3 Behandlung ein C3aR-Anstieg im Vergleich zu unbehandelten Zellen visualisiert werden, der (G, H) 12 h nach FHR-3 Inkubation genau gegenteilig detektiert werden konnte. Zellkerne wurden mit Hoechst visualisiert. Maßstabsbalken entspricht 40 μ m.

Der Komplementrezeptor CR3 ist ein Integrin bestehend aus zwei Untereinheiten, CD11b und CD18, die durch C3 Spaltprodukte C3b, iC3b, C3d und C3dg aktiviert werden. In dieser Arbeit wurde CD11b auf RNA- und Proteinebene detektiert.

CD11B mRNA war in ARPE-19 Zellen nur sehr schwach exprimiert und konnte nach 5 h und 24 h FHR-3 Inkubation signifikant erhöht exprimiert werden, mit maximal um das 32-fache in alten ARPE-19 Zellen (Abbildung 35A) und um das 8-fache in jungen ARPE-19 Zellen (Abbildung 35B). Nach FH Inkubation konnte kein *CD11B* in ARPE-19 detektiert werden (Abbildung 35).

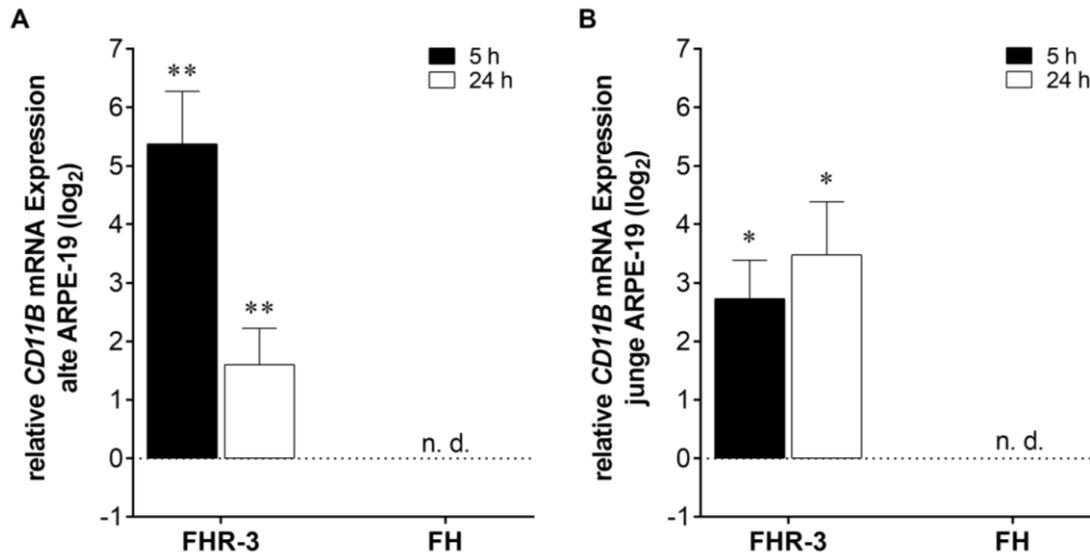


Abbildung 35: CD11B mRNA Expressionsanstieg in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen.

Die mRNA von (A) alten ARPE-19 Zellen (P38) und (B) jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach FHR-3-Behandlung und FH-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf *CD11B* Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. (A, B) Eine signifikant erhöhte Expression konnte in alternden ARPE-19 Zellen zeitabhängig nach FHR-3 Inkubation, sowohl in alternden als auch in jungen ARPE-19 Zellen, festgestellt werden. Nach FH-Behandlung konnte keine *CD11B* Expression detektiert werden. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

Mittels spezifischem anti-CD11b Antikörper konnte der Rezeptor sowohl im Western Blot (Abbildung 36) in alten (P38) und jungen (P25) ARPE-19 Zellen, als auch immunhistologisch in alten ARPE-19 nachgewiesen werden (Abbildung 37). Ein zeitabhängiger CD11b-Anstieg von 5 h bis 24 h FHR-3 Behandlung wurden in Zelllysaten (Abbildung 36A), und in fixierten P38-RPE Zellen (Abbildung 37A, C) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 37B, D) detektiert. Junge ARPE-19 Zellen zeigten keine signifikante Änderung der CD11b Expression im Western Blot (Abbildung 36B) und in Immunfärbungen (Daten nicht gezeigt).

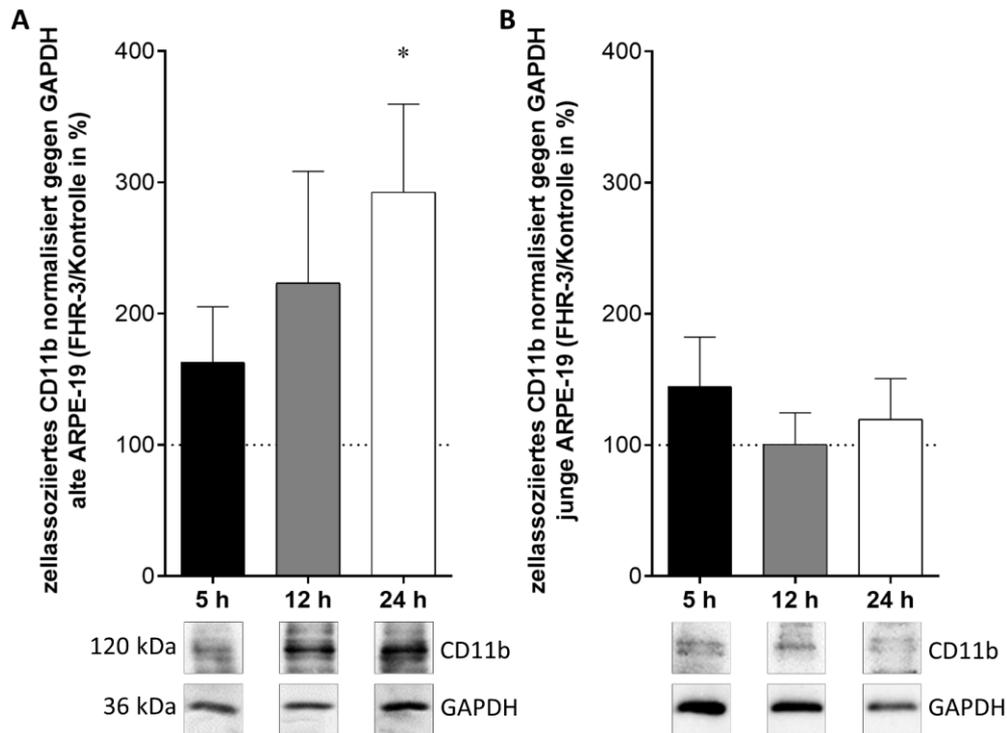


Abbildung 36: Zell-assoziiertes CD11b ist zeitabhängig erhöht in FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen. (A) Alte (P38) und (B) junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden für 5 h, 12 h oder 24 h mit FHR-3 behandelt, die Zelllysate anschließend mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischem anti-CD11b Antikörper im Western Blot detektiert. (A) In alternden Zellen konnte ein zeitabhängiger Anstieg von CFB von 5 h nach 24 h FHR-3 Inkubation detektiert werden. ARPE-19, für 24 h mit FHR-3 behandelt, exprimierten signifikant mehr CD11b im Vergleich zu unbehandelten Zellen. (B) In jungen ARPE-19 Zellen konnte ein tendenzieller Anstieg von CD11b nach 5 h FHR-3 Behandlung detektiert werden. CD11b Proteine wurden gegen GAPDH, anhand von zwei unabhängigen Versuche, quantifiziert. * $p < 0.05$ (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test).

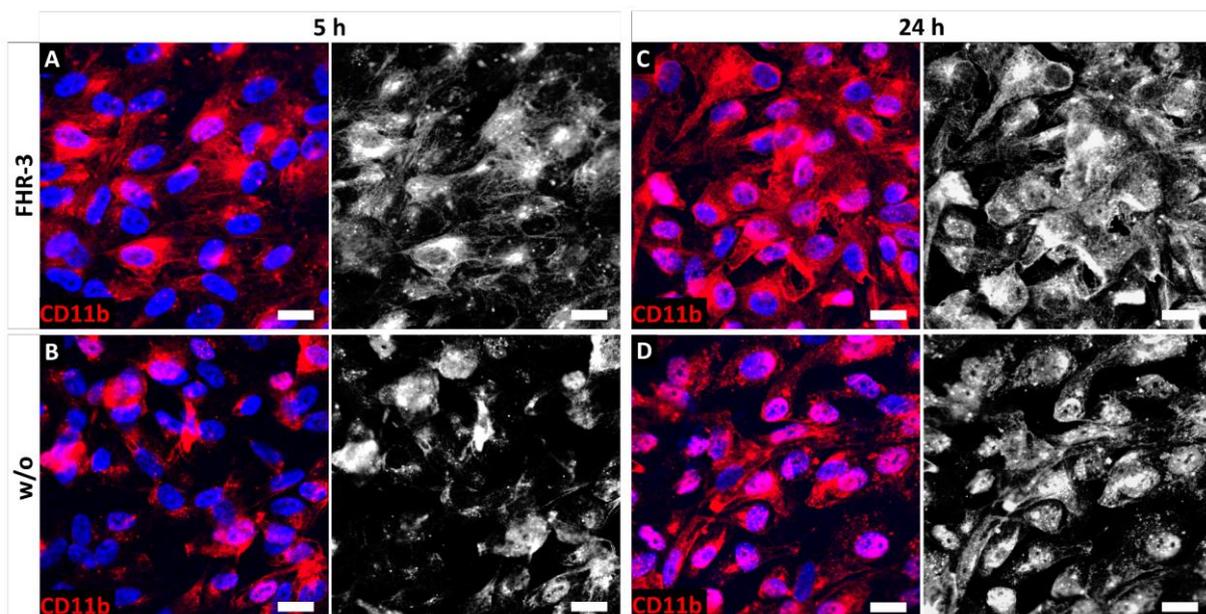


Abbildung 37: Zeitabhängiger Anstieg der CD11b Expression in Immunfärbungen von FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen.

Alte ARPE-19 Zellen (P38) wurden 5 h und 24 h nach FHR-3 Behandlung, oder unbehandelt (w/o), im Membraneinsatz fixiert und mittels spezifischem anti-CD11b Antikörper (rot) immunhistologisch gefärbt. Es konnte ein zeitabhängiger Anstieg der CD11b Expression von 5 h nach 24 h, sowohl in **(A, C)** FHR-3 behandelten Zellen, als auch in **(B, D)** unbehandelten (w/o) ARPE-19, detektiert werden. FHR-3 Inkubation für **(A - B)** 5 h und **(C - D)** 24 h führte zur vermehrten CD11b Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zellkerne wurden mit Hoechst visualisiert. Maßstabsbalken entspricht 40 µm.

Mit diesen Ergebnissen konnte erstmal gezeigt werden, dass endogenes FHR-3 einen direkten lokalen Komplement-aktivierenden Einfluss auf ARPE-19, sowohl auf junge gesunde RPE und v. a. auf alternde in EMT-befindliche Zellen, hat (Abbildung 44).

5.4.3.4 FHR-3 Regulation von Inflammationsmarker NLRP3, IL-1 β , IL-6, FoxP3

NLRP3 Inflammasom-Aktivierung gilt als zusätzlicher Risikofaktor für die Entstehung der AMD^{145,146}. Die Aktivierung von NLRP3 läuft innerhalb der Zelle in zwei Schritten ab. Der erste Schritt, als *priming* bezeichnet, beschreibt die Hochregulierung der Genexpression von *NLRP3* und *pro-IL1B*. Und der zweite Prozess beschreibt die Aktivierung des NLRP3. Hier erfolgt die Translation und der Zusammenbau des Inflammasoms¹⁴⁷. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Anaphylatoxine C3a und C5a und oxidativer Stress zum *priming* des NLRP3 und zur Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in ARPE-19 Zellen führt^{12,148-150}.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde gezeigt, dass *NLRP3* mRNA in alternden ARPE-19 Zellen signifikant erhöht exprimiert wurde 5 h nach FHR-3 Behandlung, und nach 24 h eine signifikante Herunterregulierung der Transkriptmenge zu detektieren war. Inkubation mit FHR-1, FH oder FP ergab keine Regulierung der *NLRP3* Transkripte (Abbildung 38A). In jungen RPE Zellen erzeugte die FHR-3 Inkubation eine zeitabhängig signifikante Erniedrigung der *NLRP3* mRNA (Abbildung 38B).

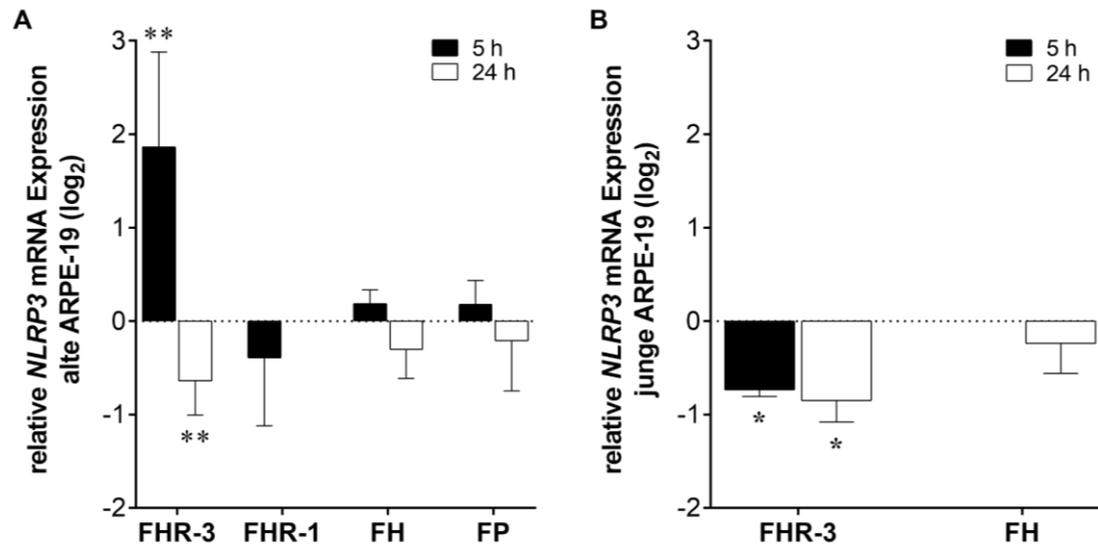


Abbildung 38: Zeitabhängige *NLRP3* mRNA Expressionsänderung in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen. Die mRNA von (A) alten ARPE-19 Zellen (P38) und (B) jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach sowohl FHR-3-Behandlung, als auch FHR-1, FH und FP-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf *NLRP3* Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. (A) In alternden ARPE-19 Zellen wurde eine signifikant erhöhte Expression 5 h nach FHR-3 Inkubation und signifikant weniger Transkripte 24 h nach Behandlung festgestellt. (B) In jungen ARPE-19 Zellen wurde zeitabhängig signifikant weniger *NLRP3* exprimiert nach FHR-3 Inkubation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

Die mRNA Transkripte für pro-*IL1B* wurden in alten und in jungen ARPE-19 Zellen nach 5 h und nach 24 h FHR-3 Inkubation signifikant hochreguliert (Abbildung 39). Dieser Effekt konnte für pro-*IL18* mRNA nicht detektiert werden in behandelten ARPE-19 Zellen. Hier konnte eine geringe Erniedrigung von pro-*IL18* bestimmt werden (Abbildung 39). Eine vermehrte Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 (Abbildung 40A) und IL-18 (Abbildung 40B) konnte nach FHR-3 Behandlung von alten ARPE-19 (P38) detektiert werden. Junge ARPE-19 (P25) zeigten keine Sekretionsänderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 40). Es konnte keine vermehrte IL-1 β Sekretion bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

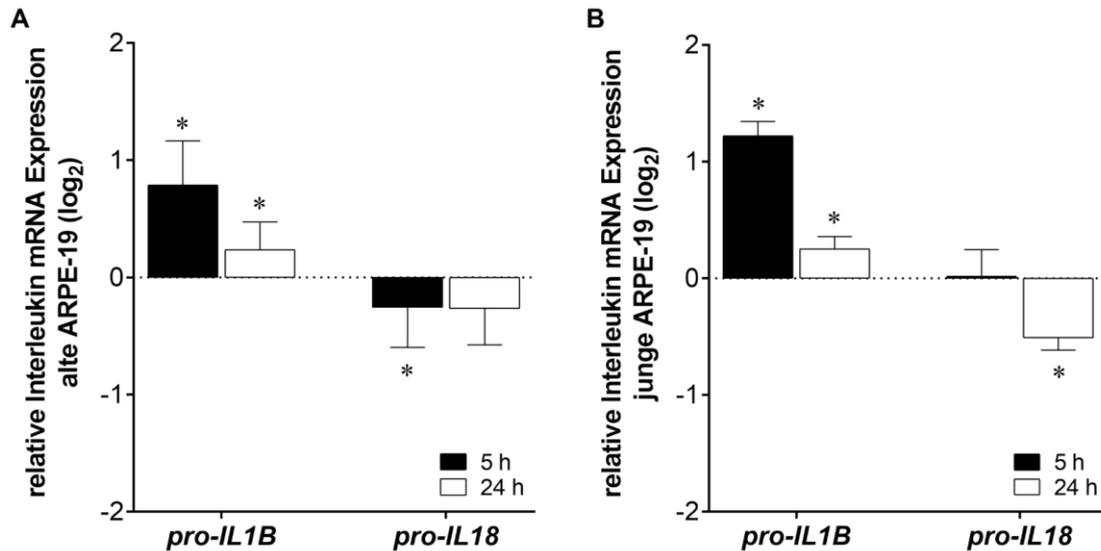


Abbildung 39: mRNA Expressionsänderung von pro-IL1B und pro-IL18 in FHR-3-behandelten ARPE-19.

Die mRNA von (A) alten ARPE-19 Zellen (P38) und (B) jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach FHR-3-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf pro-IL1B und pro-IL18 Transkriptänderungen untersucht und gegen GAPDH relativ quantifiziert. Sowohl (A) alte ARPE-19 als auch (B) junge Zellen exprimierten signifikant mehr pro-IL1B mRNA 5 h und 24 h nach FHR-3 Inkubation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dagegen wurde in (A) alten ARPE-19 (nach 5 h) und in (B) jungen Zellen (nach 24 h) signifikant weniger pro-IL18 mRNA nach FHR-3 Inkubation exprimiert. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

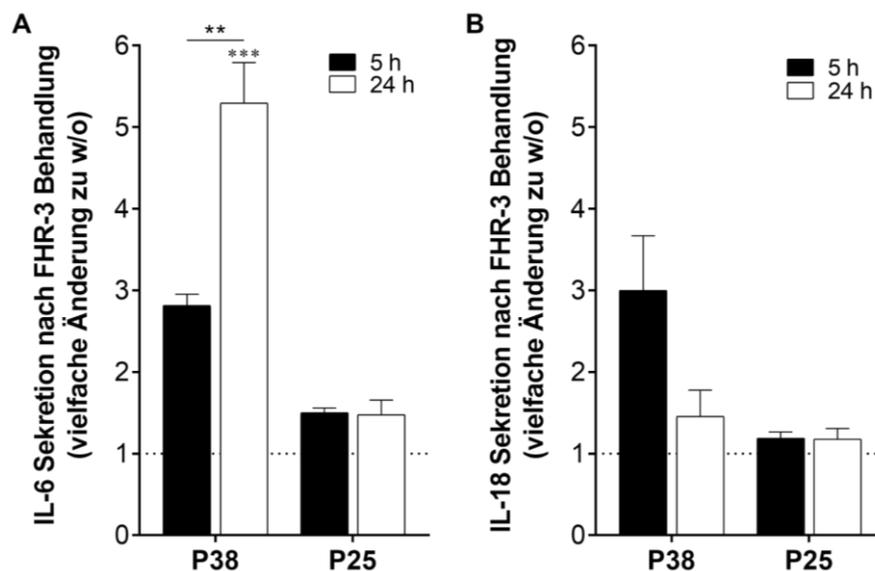


Abbildung 40: FHR-3 induzierte die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in alternden ARPE-19 Zellen.

Alte ARPE-19 Zellen (P38) und junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden für 5 h und 24 h mit FHR-3 behandelt und die apikalen Überstände anschließend mittels Multiplex-ELISA untersucht. (A) IL-6 wurde zeitabhängig signifikant vermehrt in den apikalen Überstand von FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen sezerniert, im Vergleich zu unbehandelten P38-Zellen. In jungen ARPE-19 wurde dieser Effekt nicht detektiert. (B) IL-18 wurde nach 5 h vermehrt in den apikalen Überstand von FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen sezerniert. In P25-Zellen konnte

keine vermehrte Sekretion bestimmt werden, verglichen mit den unbehandelten Zellen (gepunktete Linie). Dargestellt ist die vielfache Änderung der Sekretion zu unbehandelten ARPE-19 Zellen (w/o). $^{**}p < 0.01$ (two-tailed, unpaired t-test mit Welch's correction).

FOXP3 ist ein Inflammations-assoziiertes Transkriptionsfaktor, der in anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen fördert, und erst kürzlich in ARPE-19 Zellen beschrieben wurde ^{12,73,151,152}. In dieser Arbeit wurde die mRNA Expression von *FOXP3* auf FHR-3-behandelte ARPE-19 Zellen bestimmt. Sie resultierte in einer signifikanten Erniedrigung von *FOXP3*, sowohl in alten (Abbildung 41A) als auch in jungen ARPE-19 Zellen (Abbildung 41B).

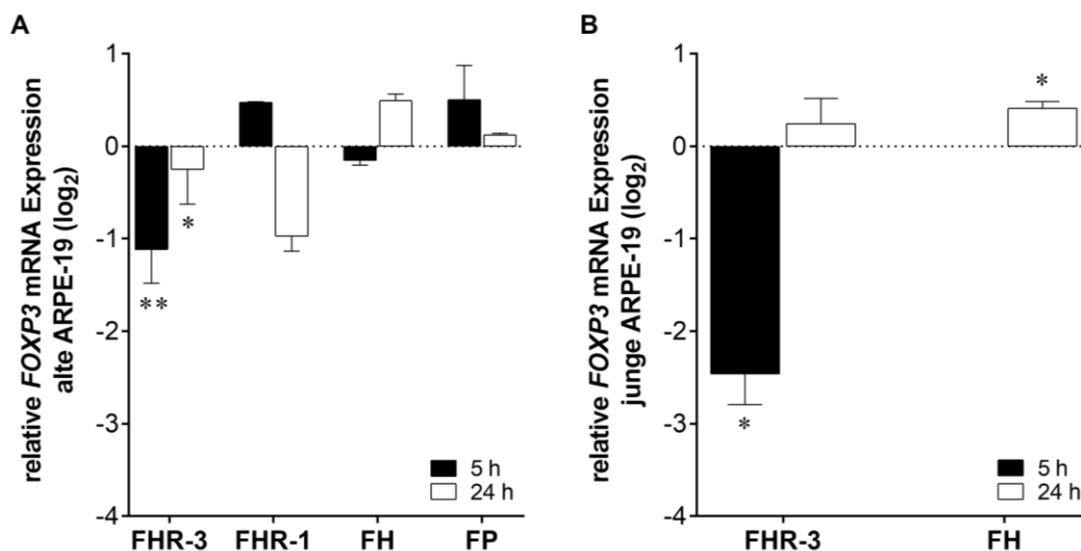


Abbildung 41: Verringerte *FOXP3* mRNA Expression in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen.

Die mRNA von (A) alten ARPE-19 Zellen (P38) und (B) jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach sowohl FHR-3-Behandlung, als auch FHR-1, FH und FP-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf *FOXP3* Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. (A) In alternden ARPE-19 Zellen wurde signifikant weniger *FOXP3* exprimiert, sowohl nach 5 h als auch nach 24 h FHR-3 Inkubation. (B) Junge ARPE-19 Zellen exprimierten signifikant weniger *FOXP3* nach 5 h FHR-3 Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

Diese Ergebnisse belegten, dass FHR-3 sowohl auf RNA-Ebene ein Priming des NLRP3 Inflammasoms als auch eine Aktivierung von NLRP3 durch erhöhte Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen induzierte, wobei alternde ARPE-19 Zellen empfänglicher auf dieses endogene Protein reagierten. Eine zusätzliche Regulation des Transkriptionsfaktors *FOXP3* bestätigte den pro-inflammatorischen Effekt von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen.

5.4.3.5 FHR-3 Regulation von Toll-like Rezeptoren und Proteasom-Markern

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind durchgehend in der Retina exprimiert, mit den höchsten Expressionen von TLR1 und TLR3 in RPE Zellen¹⁵³. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TLRs RPE Zellen vor oxidativen Stress schützen und eine Fehlfunktion bestimmter TLRs mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer AMD einhergeht^{154,155}.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass *TLR1* und *TLR3* in ARPE-19 Zellen exprimiert sind (Abbildung 42). In ersten qPCR Analysen konnte herausgefunden werden, dass die *TLR1* mRNA Expression in alten und jungen ARPE-19 nach 5 h und 24 h FHR-3 Inkubation signifikant erniedrigt war im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 42). FHR-3 erniedrigte die *TLR3* Expression 5 h stark in alten ARPE-19 (Abbildung 42A) und schwach in jungen ARPE-19 Zellen (Abbildung 42B), und steigerte in alternden RPE Zellen die Expression nach 24 h FHR-3 Behandlung (Abbildung 42A). Um genauere Erkenntnisse auf den Einfluss der Toll-like Rezeptoren, in Abhängigkeit von FHR-3, in ARPE-19 Zellen zu erhalten, müssen weitere Untersuchungen auf Proteinebene erfolgen.

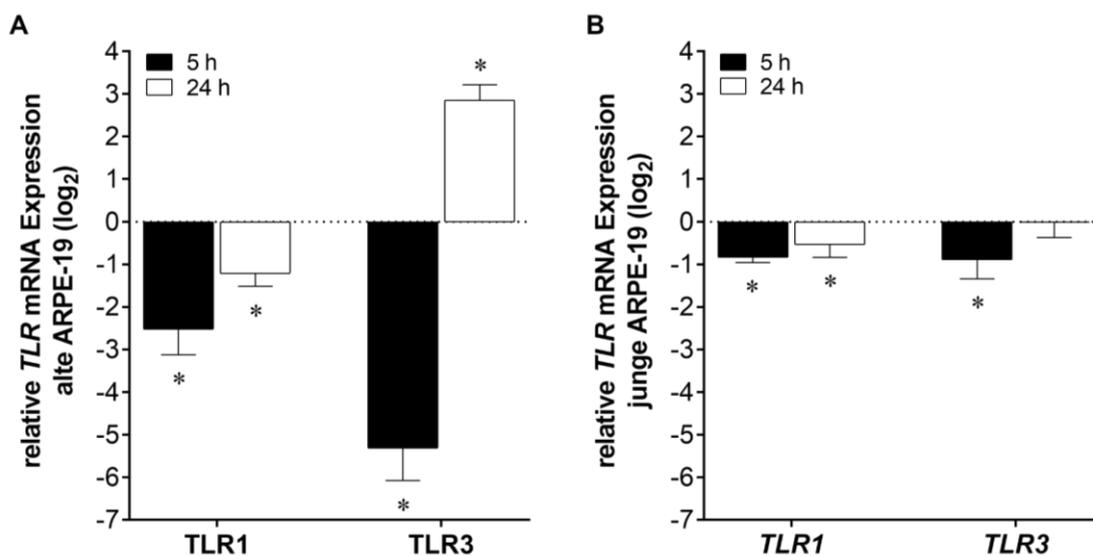


Abbildung 42: Verringerte TLR mRNA Expression in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen.

Die mRNA von (A) alten ARPE-19 Zellen (P38) und (B) jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach FHR-3-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf *TLR1* und *TLR3* Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. (A) In alternden ARPE-19 Zellen wurde signifikant weniger *TLR1* und *TLR3* exprimiert nach 5 h FHR-3 Inkubation. Nach 24 h FHR-3 Behandlung wurden weniger *TLR1* und mehr *TLR3* Transkripte detektiert. (B) In jungen ARPE-19 Zellen wurde signifikant weniger *TLR1* und *TLR3* exprimiert, sowohl nach 5 h als auch nach 24 h FHR-3 Inkubation. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. **p < 0.01, *p < 0.05 (two-tailed, unpaired t-test, Mann-Whitney test).

Eine Beeinträchtigung des Ubiquitin-Proteasom Signalweges in RPE Zellen behindert den RPE-Metabolismus negativ und führt zu einer gesteigerten Expression von Inflammation-assoziierten Genen^{156–158}. In dieser Arbeit sollten abschließend Hinweise gefunden werden, ob FHR-3 einen Einfluss auf diesen Signalweg hat. Es wurden verschiedene Komponenten einer Untereinheit des 26S-Proteasoms (*PSME7*, *PSMA1*, *PSMB5*, *PSMB8*) auf RNA-Ebene untersucht. Alte und junge ARPE-19 Zellen, die für 5 h mit FHR-3 inkubiert wurden, zeigten eine signifikant verringerte Expression der Proteasom-Marker. 24 h nach FHR-3 Behandlung lagen mehr Proteasom-Transkripte vor als in unbehandelten Zellen (Abbildung 43). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass FHR-3 zu einer kurzzeitigen Proteasom-Inhibition und damit zu einem gestörten Proteinabbau führt.

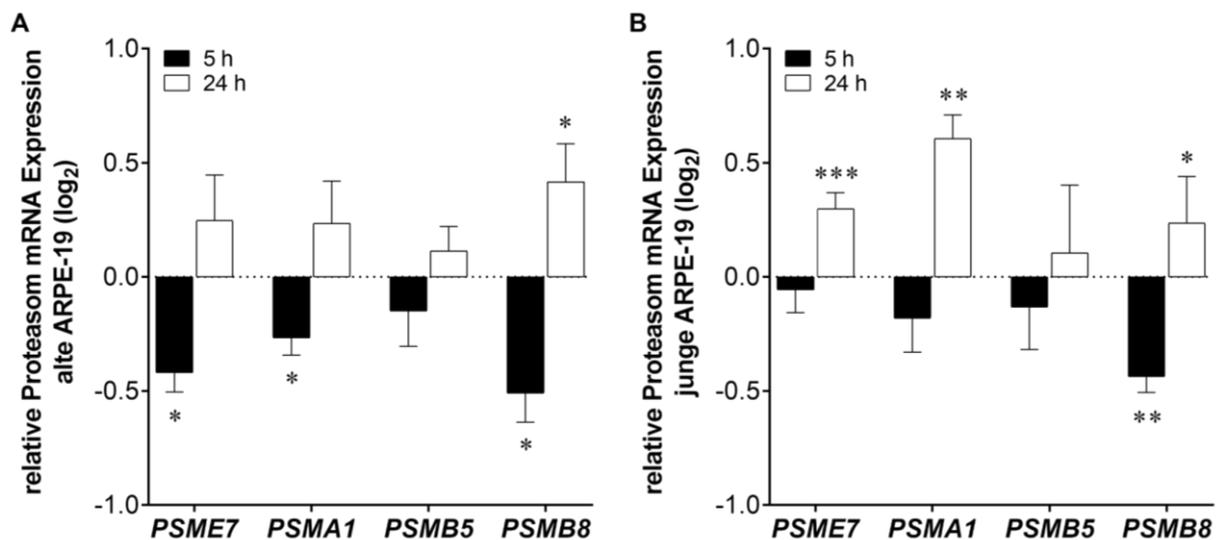


Abbildung 43: Die mRNA von Proteasom-Markern ist zeitabhängig herunterreguliert in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen.

Die mRNA von **(A)** alten ARPE-19 Zellen (P38) und **(B)** jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurde 5 h und 24 h nach FHR-3-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf Proteasom (*PSME7*, *PSMA1*, *PSMB5*, *PSMB8*) Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. **(A)** In alten ARPE-19 Zellen wurde nach 5 h FHR-3 Inkubation signifikant weniger *PSME7*, *PSMA1* und *PSMB8* mRNA exprimiert, und nach 24 h Behandlung wurde signifikant mehr *PSMB8* RNA detektiert. **(B)** Junge ARPE-19 Zellen exprimierten signifikant weniger *PSMB8* und tendenziell weniger *PSME7*, *PSMA1* und *PSMB5* nach 5 h FHR-3 Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach 24 h Behandlung wurden signifikant mehr *PSME7*, *PSMA1* und *PSMB8* Transkripte bestimmt. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von (A) drei und (B) zwei unabhängigen Quantifizierungen. ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05 (two-tailed, unpaired t-test, mit Welch's correction).

5.4.3.6 Grafische Zusammenfassung des Effekts von FHR-3 auf ARPE-19

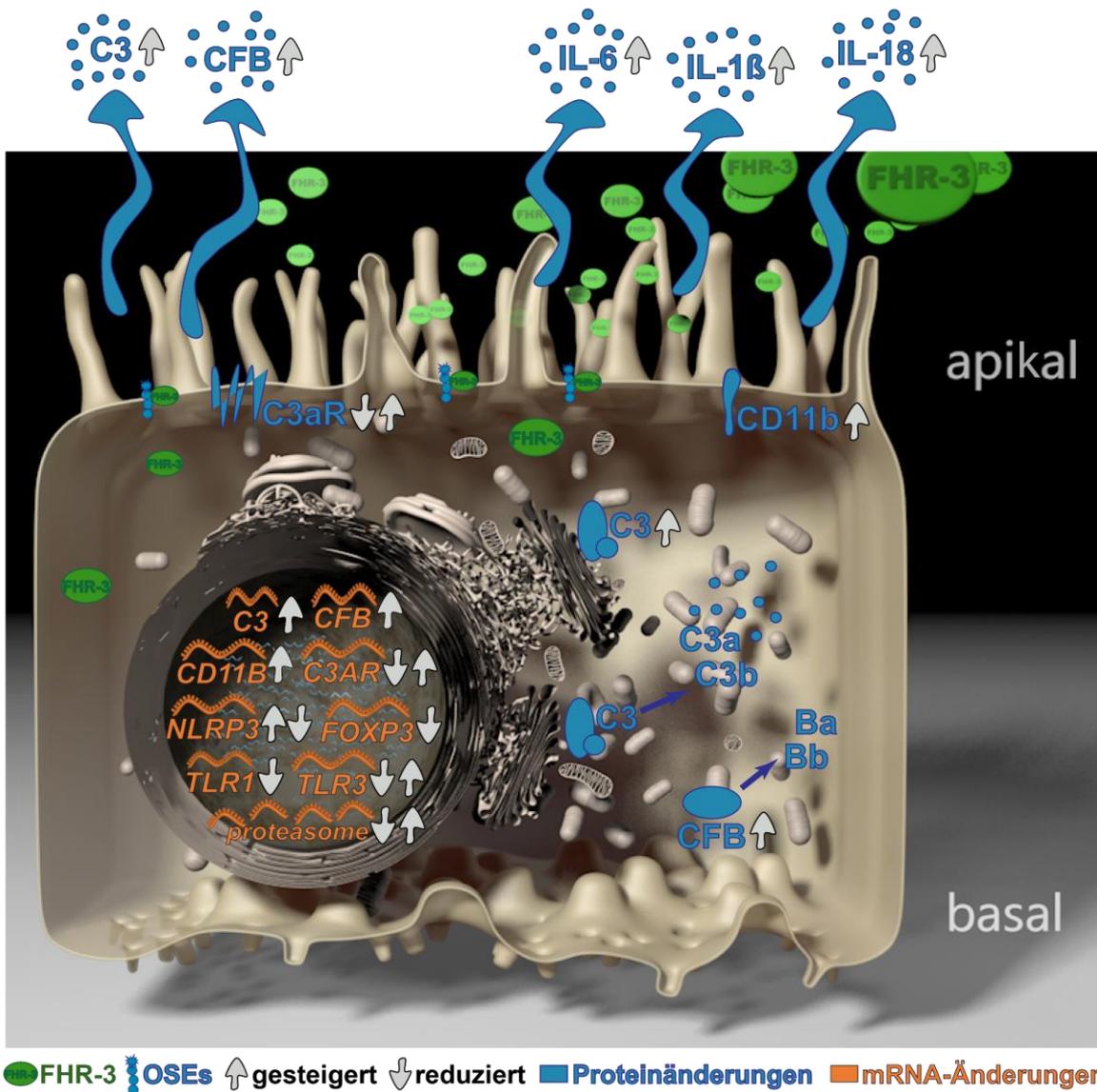


Abbildung 44: Schematische Zusammenfassung zum immunmodulatorischen Einfluss von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen.

5.4.4 RETC-2-ximab mildert den Effekt von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen

Um einen therapeutischen Effekt des eigens hergestellten, chimärisierten anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2-ximab (5.3) auf die komplementaktivierende Wirkung von FHR-3 in RPE Zellen zu untersuchen, wurden erste *in vitro* Studien mit kultivierten ARPE-19 Zellen verschiedener Passagen durchgeführt. ARPE-19 Zellen wurden apikal für 24 h mit FHR-3 und RETC-2-ximab oder mit FHR-3 und einer spezifischen Antikörper-Isotypkontrolle Kontroll-IgG-ximab (5.3) behandelt. Anschließend wurde die mRNA-Expression, der nach FHR-3 Behandlung erhöhten *C3*, *CFB* und *C3AR* Transkriptmenge über qPCR Analysen detektiert (Abbildung 45).

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von *C3* signifikant um 27 % verringerte nach FHR-3 und RETC-2-ximab Behandlung, in alten ARPE-19 (P38) Zellen (Abbildung 45A). Die Expression von *CFB* wurde durch RETC-2-ximab signifikant um 48 % in den alternden Zellen verringert (Abbildung 45B). Die *C3AR* mRNA Expression wurde als einzige sowohl von alternden (um 21 %) als auch von jungen ARPE-19 Zellen (um 33 %) gemindert.

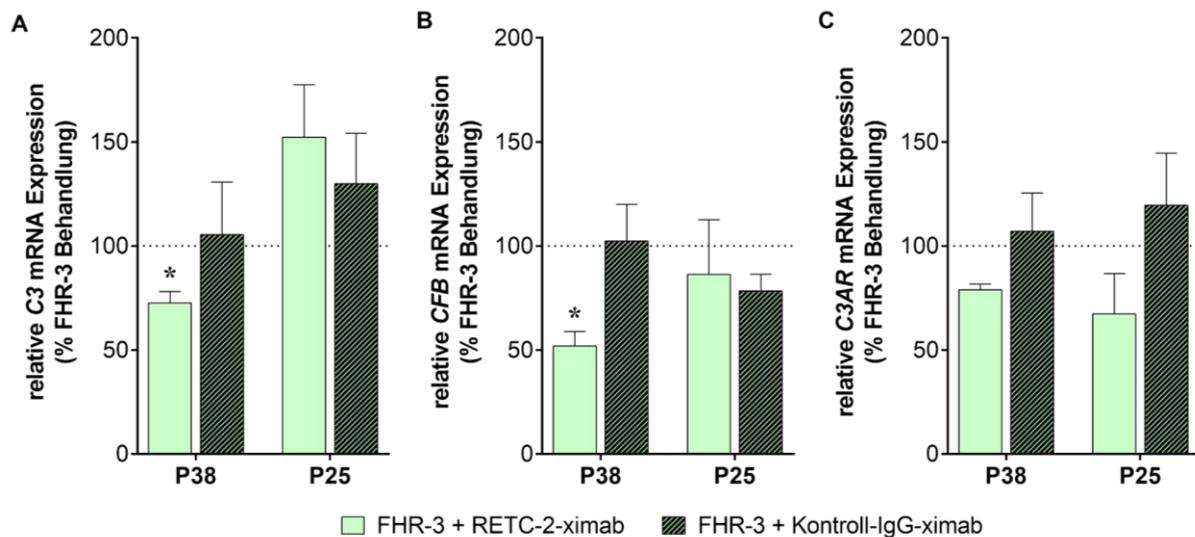


Abbildung 45: RETC-2-ximab mildert den Effekt von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen.

Alte ARPE-19 (P38) und junge ARPE-19 Zellen (P25) wurden entweder mit FHR-3, FHR-3 mit RETC-2-ximab oder FHR-3 mit Kontroll-IgG-ximab behandelt, die RNA isoliert, mittels qPCR auf (A) *C3*, (B) *CFB*, und (C) *C3AR* Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. RETC-2-ximab (grün) milderte in den alten ARPE-19 Zellen signifikant (A) die *C3* Expression, (B) die *CFB* Expression, und tendenziell (C) die *C3aR* Expression, im Vergleich zum unspezifischen Kontroll-IgG-ximab (grün-gestreift) und zur FHR-3 Behandlung (gepunktete Linie). In den jungen ARPE-19 Zellen (P25) konnte der inhibitorische Effekt von RETC-2-ximab tendenziell nur für die (C) *C3AR* mRNA Expression detektiert werden. Dargestellt ist die relative RNA Expression zu FHR-3 behandelten Zellen (gepunktete Linie) in %. Ausgewertet wurden die Mittelwerte von zwei unabhängigen Quantifizierungen. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test mit Welch's correction).

5.4.5 Wirkung von FHR-3 auf pRPE und iPSC-RPE Zellen

In Kooperation mit zwei verschiedenen Arbeitsgruppen aus Bern (Volker Enzmann, Inselspital Bern, Schweiz) und Dresden (Seba Almedawar, CRTD Dresden) konnte der komplementaktivierende Effekt von FHR-3 auf primäre humane RPE Zellen (pRPE) und humane RPE Zellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-RPE) im Rahmen dieser Doktorarbeit auf RNA-Ebene bestätigt werden (Abbildung 46). Zunächst wurden die Zellen von pRPE aus zwei verschiedenen humanen Spendern mit einem Durchschnittsalter von 80 Jahren (pRPE (135), pRPE (27)) und iPS-RPE eines Spenders (Alter unbekannt) auf AMD-assoziierte Komplement-SNPs untersucht. Die pRPE Zellen weisen diverse heterozygote Komplement-SNPs auf und die iPS-RPE Zellen ergaben drei *CFH* AMD-Risiko SNPs und einem *CFI* AMD-Risiko SNP, was bei der Interpretation der nachfolgenden Ergebnisse zu beachten ist (Anhang Tabelle 31).

Nachfolgende qPCR Analysen bestätigten die Ergebnisse der ARPE-19 Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass *C3* (Abbildung 46A), *CFB* (Abbildung 46B) und *CD11B* (Abbildung 47B) Transkripte nach 24 h FHR-3 Behandlung erhöht exprimiert waren in pRPE und iPS-RPE Zellen. Eine entgegengesetzte Expression, im Vergleich zu den ARPE-19 Daten, konnte für die *C3AR* mRNA Expression bestimmt werden. Hier waren die Transkripte tendenziell runterreguliert nach FHR-3 Behandlung in pRPE Zellen und es konnte keine *C3AR* mRNA in iPS-RPE Zellen mittels qRT-PCR detektiert werden (Abbildung 47A).

Da die Anzahl der pRPE und iPS-RPE Zellen für diese Versuche limitiert war, konnten keine Proteinanalysen durchgeführt werden. Diese vorläufigen Untersuchungen bestätigen jedoch die mit der ARPE-19 Zelllinie erhaltenen Ergebnisse und deuten weiterhin darauf hin, dass lokales FHR-3 einen komplementaktivierenden und pro-inflammatorischen Einfluss auf RPE Zellen hat.

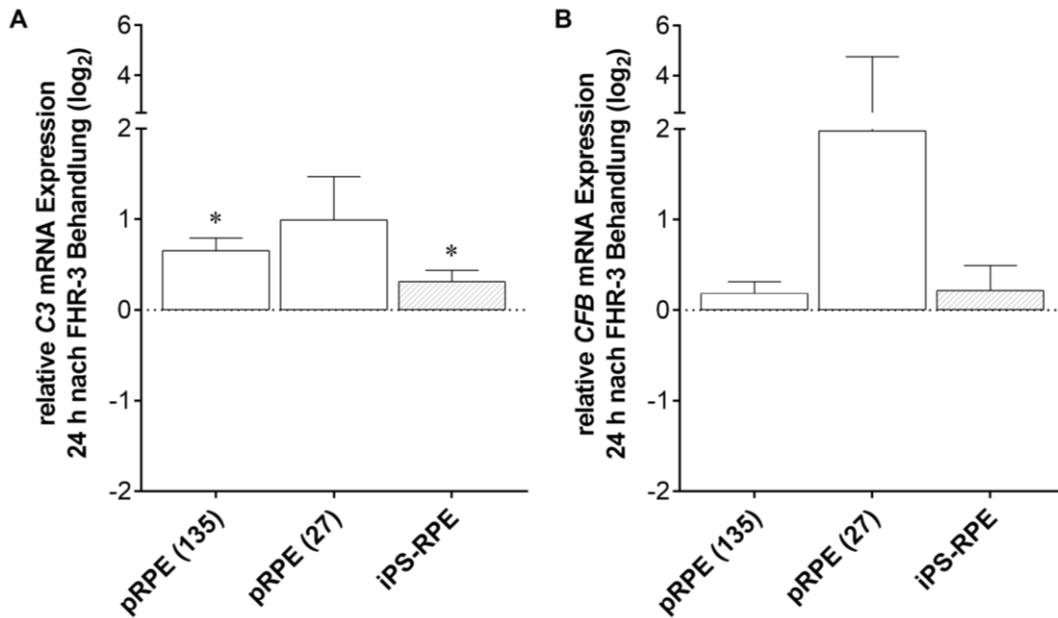


Abbildung 46: Erhöhte C3 und CFB mRNA Expression in FHR-3-behandelten pRPE und iPS-RPE Zellen.

Die mRNA von primären RPE Zellen von zwei verschiedenen humanen Spendern (pRPE (135), pRPE (27)) und RPE Zellen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-RPE) wurde 24 h nach FHR-3-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf **(A)** C3 und **(B)** CFB Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. **(A)** Eine signifikant erhöhte C3 Expression konnte in pRPE (135) und in iPS-RPE Zellen, und ein tendenzieller mRNA Anstieg in pRPE (27) Zellen nach FHR-3 Inkubation detektiert werden. **(B)** CFB Transkripte waren in allen drei RPE-Zellpopulationen tendenziell erhöht 24 h nach FHR-3 Behandlung. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils einem Versuch mit Triplikaten. *p < 0.05 (two-tailed, unpaired t-test mit Welch's correction).

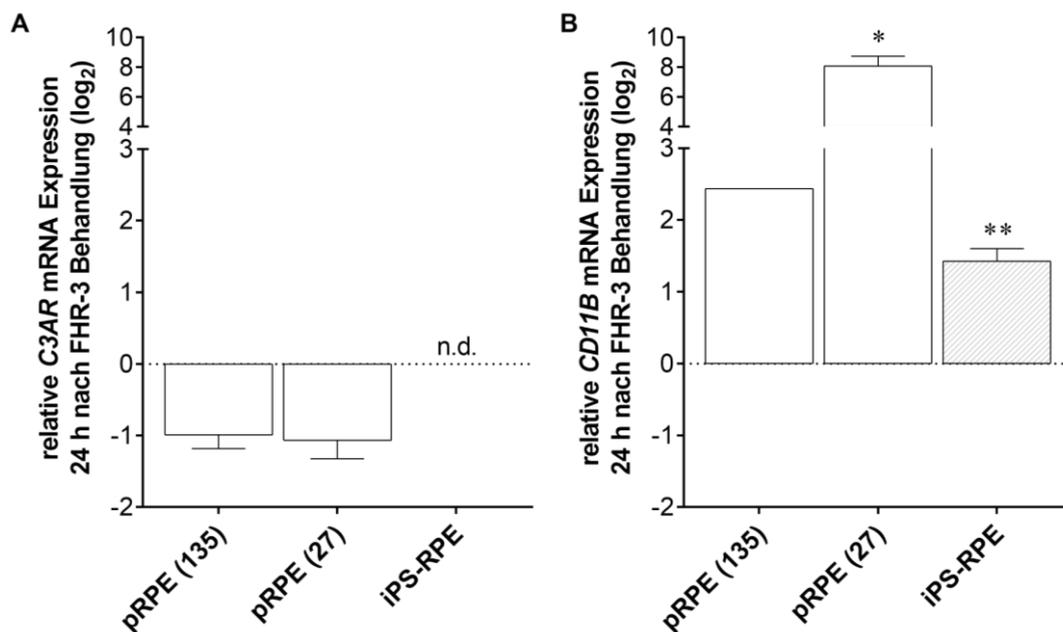


Abbildung 47: Verminderte C3AR und erhöhte CD11B mRNA Expression in FHR-3-behandelten pRPE und iPS-RPE Zellen.

Die mRNA von primären RPE Zellen von zwei verschiedenen humanen Spendern (pRPE (135), pRPE (27)) und RPE Zellen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-RPE) wurde 24 h nach FHR-3-Behandlung isoliert, mittels qPCR auf **(A)** *C3AR* und **(B)** *CD11B* Transkriptänderungen untersucht und gegen *GAPDH* relativ quantifiziert. **(A)** *C3AR* Expression war in allen drei RPE-Zellpopulationen tendenziell verringert nach FHR-3 Behandlung. **(B)** Signifikant erhöhte *CD11B* Transkripte konnte in pRPE (127) und in iPS-RPE Zellen, und tendenziell in pRPE (135) Zellen nach FHR-3 Inkubation detektiert werden. Die vielfache Expressionsänderung (zur unbehandelten Kontrolle, gepunktete Linie) wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils einem Versuch mit Triplikaten. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (two-tailed, unpaired t-test mit Welch's correction).

6 Diskussion

Komplementproteine, und deren Regulatoren werden hauptsächlich in der Leber synthetisiert und danach in den Blutkreislauf abgegeben, um sie an Gewebe zu liefern, die Komplement-Abwehrmechanismen benötigen.

Trotz der seit 14 Jahren bekannten Tatsache, dass die Deletion der Gene für *CFHR3* und *CFHR1* ($\Delta CFHR3/1$) mit einem protektiven Effekt für die Entwicklung einer AMD einhergeht, ist über die proteinbiologische lokale Funktion von FHR-3 und FHR-1 noch sehr wenig bekannt. Daher sollte diese Doktorarbeit, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, Aufschluss über systemische und intraokulare Aufgaben dieser beiden Komplementregulatoren geben.

In der Arbeit konnte erstmals eine putative lokale Funktion von FHR-3, mit Hilfe des spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAk) RETC-2, im degenerierten Auge beschrieben werden. Ein komplementaktivierender und pro-inflammatorischer Effekt auf humane RPE Zellen konnte für FHR-3, nicht aber für FHR-1, über *in vitro* Studien mit ARPE-19, pRPE und iPS-RPE Zellen bestimmt werden. Dieser Einfluss war abhängig vom RPE-Phänotyp, und am folgenreichsten in RPE-Zellen, die eine Transition vom epithelialen zum mesenchymalen Typ aufwiesen. Zusätzlich konnte ein hoch-spezifischer mAk gegen FHR-3, RETC-2, hergestellt und erfolgreich chimärisiert werden, der *in vitro* funktionsinhibierende Eigenschaften aufwies und ein putativ neuer Therapieansatz von FHR-3-abhängigen Autoimmunerkrankungen darstellen könnte.

6.1 Zellkulturmodelle für *in vitro* Studien des RPE

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde ein pro-inflammatorischer Effekt des Komplementregulators FHR-3 auf RPE-Zellen erstmalig beschrieben. Die hauptsächlich verwendeten RPE-Zellen sind die ARPE-19. Sie ist eine nach selektiver Trypsinierung, spontan entstandene Zelllinie mit hohem Teilungspotenzial, die von einem 19-jährigen männlichen Spender aus den USA stammt^{126,127}. ARPE-19 Zellen sind in der Lage ein einschichtiges, polarisiertes Epithel auf Filtermembranen auszubilden und RPE-spezifische Zellmarker wie CRALBP und RPE65 zu exprimieren. Ein wichtiger Vorteil zur Verwendung der ARPE-19 Zellen für *in vitro* Untersuchungen, im Vergleich zu humanen Primärzellen, ist die Verfügbarkeit und die vergleichsweise einfache Kultivierbarkeit^{126,127}. Wie in der Arbeit dargestellt, können die ARPE-19 unter geeigneten Kulturbedingungen, eine starke Pigmentierung, sowie

stabile *tight junctions* und Aktin-Filamente ausbilden (5.4.1, Abbildung 18, Abbildung 19) ^{128,130,131}.

Eine fehlerhafte Kultivierung dieser RPE-Zelllinie führt zu signifikanten Genexpressionsdifferenzen ^{159,160} und zur Umwandlung vom epithelialen Phänotyp hin zum mesenchymalen Zell-Phänotyp ^{132,133}. Dieser Prozess wird als Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet, und kann u. a. bereits auf RNA-Ebene durch Expression spezifischer EMT-Marker detektiert werden (Abbildung 20) und änderte sich spezifisch nach FHR-3 Behandlung (Abbildung 22).

In der Nutzung der ARPE-19 Zelllinie gibt es jedoch einige Limitationen. Sie weisen zum einen nur einen geringen messbaren transepithelialen Widerstand (TER) auf ($< 50 \text{ Ohm/cm}^2$), im Vergleich zu primären Zellen ($> 200 \text{ Ohm/cm}^2$), was auf eine bessere Barrierefunktion von primär-kultivierten RPE-Zellen hindeutet. Zum anderen sind spezifische RPE-Zellmarker und intrazelluläre *tight junctions* im Vergleich zu primären Zellen nur gering exprimiert ^{127,161}. Es existieren weitere humane RPE-Zelllinien, wie z. B. D407 ¹⁶² und hTERT-RPE ¹⁶³, welche aber noch nicht ausreichend charakterisiert wurden und für *in vitro* Versuche kaum eingesetzt werden. Ein weiterer Nachteil zur Verwendung von Zelllinien, insbesondere der am häufigsten verwendeten ARPE-19 ist, dass sie mittlerweile seit einigen Jahren in Kultur gehalten werden (d. h. der RPE-Phänotyp mit steigender Passage abnimmt), und dadurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass es u. a. durch Zellstress zur Veränderung des Zell-Phänotyps (EMT) kommen kann. Des Weiteren nimmt die Wachstumsrate der Zellen mit der Dauer der Kultur zu ¹³². Daher versucht man immer häufiger adulte primäre RPE-zellen (pRPE) ¹⁶⁴, fötale humane RPE Zellen (fhRPE) ^{127,165,166}, und RPE-Zellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-RPE) ^{167–172} in Kultur zu bringen und diese für *in vitro*-Studien zu verwenden. Man geht bei diesen Zellen davon aus, dass sie die Funktion widerspiegeln, dies sie in ihrer physiologischen Umgebung aufweisen.

Die Kultivierung von pRPE und fhRPE Zellen und die Verwendung dieser Zellen für *in vitro* Versuche erweist sich bisher jedoch als schwierig, da zum einen der Kultivierungsaufwand im Vergleich zu ARPE-19 Zellen enorm ist, aufgrund von Kontaminationsgefahr mit anderen Zelltypen und der geringen Zellausbeute. Und zum anderen ist die Verfügbarkeit von humanen Spenderaugen limitiert, was die Planung von *in vitro* Untersuchungen erheblich erschwert ^{127,164–166}. Eine Alternative zu pRPE und fhRPE Zellen bietet daher die 2006 von Takahashi und Yamanaka entwickelte Methodik zur Generierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS)

^{173,174}. Es gibt bereits diverse Protokolle zu Differenzierung von RPE-Zellen aus iPS, die den Vorteil haben, dass man Patienten- (Gen-)spezifisch Zellen aus leicht zugänglichem, zellulärem Material, wie z. B. humane Fibroblasten, gewinnen und kultivieren kann. Durch asymmetrische Zellteilung sind sie in der Lage unbegrenzt und spontan in RPE Zellen zu differenzieren, wenn im Kulturmedium ein spezifischer Wachstumsfaktor (FGF) entzogen wird ^{167–169}. Die Kultivierung von iPS-RPE zur Nutzung als *in vitro* Zellkulturmodell scheint daher das derzeit größte Potenzial darzustellen. Jedoch ist auch hier die Verfügbarkeit von humanem Material limitiert, und dadurch die Planung von *in vitro* Experimenten erschwert. Ein größeres Potenzial erzielten die iPS-RPE Zellen in klinischen Studien für Transplantations-Therapien ¹⁷⁵. Wie in der vorliegenden Arbeit auf RNA-Ebene dargestellt, hat FHR-3 einen vergleichbaren Effekt auf pRPE und iPS-RPE Zellen (Abbildung 46, Abbildung 47). Daher bieten Zelllinien, wie die ARPE-19, viele Vorteile für erste biochemische und molekularbiologische Studien, da sie Untersuchungen an einer Reinkultur unter experimentellen Bedingungen zulassen und eine grenzenlose und immer gleichwertige Anzahl an Zellen für *in vitro* Experimente darstellen ^{176,177}. Ein weiterer Vorteil von Zellkulturmodellen liegt darin, dass sie einen repräsentativen Ersatz für *in vivo* Studien an Tiermodellen darstellen, die oft mit hohen Kosten, ethischen Bedenken, sowie der häufig fehlenden Übertragbarkeit auf den Menschen verbunden sind (Hahne et al. 2012).

6.2 Epithelial-mesenchymale Transition von ARPE-19 Zellen

EMT ist ein biologischer Prozess, der es polarisierten Epithelzellen ermöglicht, durch verschiedene biochemische Prozesse, einen mesenchymalen Phänotyp anzunehmen. Das erlaubt u. a. eine Migration der Zellen, eine erhöhte Resistenz gegen Apoptose und eine vermehrte Produktion von Extrazellulärmatrix (ECM)-Proteinen wie z. B. Kollagene und Laminine. Es können verschiedene molekulare Prozesse zur EMT-Initiierung führen wie z. B. i) RNA-Expressionsänderungen in ECM-Genen, ii) Umorganisation zytoskelettaler Proteine und iii) Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Das EMT-Programm wird u. a. aktiviert während der Embryogenese, Wundheilung, Gewebeneubildung und der Metastasierung ¹³².

In dieser Arbeit erfolgte eine Optimierung der ARPE-19 Zelllinie, wobei zwei verschiedene ARPE-19 Zell-Passagen (P), P38 und P25, in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen, charakterisiert wurden (5.4.1). Es wurde gezeigt, dass alte

ARPE-19 (P38) im Vergleich zu jungen ARPE-19 (P25) eine Transition zum mesenchymalen Phänotyp aktivierten. Einerseits wurde eine phänotypische Änderung von hexagonalen RPE-Zellen zu Fibroblasten-ähnlichen, spindelförmigen Zellen festgestellt (Abbildung 18A, D). Und andererseits konnte eine Umstrukturierung von Aktin-Filamenten (Abbildung 18E – F), eine verringerte *tight junction* Protein ZO-1 Expression (Abbildung 19A – B) und eine erhöhte mRNA Expression mesenchymaler-Marker (Abbildung 20) detektiert werden. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass RPE-Zellen unter Stressbedingungen und in AMD-Patienten ihre Barrierefunktion verlieren und sich in den mesenchymalen Phänotyp umwandeln^{133,178–181}. Eine Transition von RPE Zellen bei der trockenen AMD, wurde bereits mehrfach beschrieben. Diese RPE-Zellen begeben sich nicht zwangsweise in Apoptose, sondern können z. T. in den subretinalen Raum migrieren^{180–183}. Ohlmann et al. Zeigten, dass murine RPE Zellen durch Stimulation mit *transforming growth factor-β* (TGF-β), ein potenzieller EMT-Auslöser in RPE Zellen, zum mesenchymalen Zelltyp transdifferenzierten und es dadurch zum Verlust von Choriokapillaren und dadurch zur Apoptose von Photorezeptoren kam¹⁷⁸. In dieser Doktorarbeit sollte der Effekt von FHR-3 auf RPE Zellen festgestellt werden, da gezeigt werden konnte, dass FHR-3 lokal von retinalen Makrophagen/Mikroglia Zellen in einer alten, degenerierten Netzhaut exprimiert wird (Abbildung 11). Aus diesem Grund wurden für die *in vitro* Versuche sowohl in EMT-befindliche alte ARPE-19 Zellen (P38) als auch junge gesunde Zellen (P25) herangezogen.

Wie hier eindeutig beschrieben werden konnte, ist eine der größten Einschränkungen der ARPE-19 Zellen der Verlust des RPE-Phänotyps mit zunehmenden Passagen^{126,128}. Da diese Zelllinie in der Forschung die am häufigsten genutzte RPE-Zelle darstellt, ist eine eingehende Charakterisierung und eine optimale Kultivierung der ARPE-19 Zellen essenziell zur korrekten Planung und Durchführung von *in vitro* Untersuchungen, um falsch-positive Resultate zu vermeiden.

6.3 Interaktion von FHR-3 mit Lipidperoxidationsprodukten

Die Netzhaut ist das Organ mit dem größten Sauerstoffverbrauch. Daher ist eine präzise Regulation der Sauerstoffversorgung essenziell für den retinalen Zell-Metabolismus^{184,185}. Durch Oxidation von Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure (DHA), einem wichtigen Bestandteil von Phospholipiden in der Retina, entstehen Lipidperoxidationsprodukte wie u. a. CEP, MDA und MAA. Diese lagern sich vermehrt

in Retinae von AMD-Patienten in den Drusen ab, im Bereich zwischen dem RPE und der Bruch-Membran, und gelten daher als Risikofaktoren für die Entstehung der AMD^{185–190}. Es ist bekannt, dass FH an MDA-Epitope bindet und die proinflammatorische Wirkung der oxidativen Stressprodukte im Auge inhibiert^{114,115,191}.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels eigens etablierten Immunoassays einerseits die bekannte Interaktion von FH mit CEP, MDA und MAA reproduziert werden und andererseits konnte erstmals eine spezifische Bindung von FHR-3 mit den Lipidperoxidationsprodukten festgestellt werden (Abbildung 13). In der Literatur ist beschrieben, dass FH mit FHR-3 um die Bindung an C3b konkurriert und damit die komplementinhibierende Wirkung von FH unterbunden wird^{40,41,110,111,192}. Eine Bindungskonkurrenz an Peroxidationsprodukte wurde vorher noch nicht beschrieben. In dieser Arbeit konnte erstmals bestätigt werden, dass FHR-3 mit FH nicht nur um die Bindung an C3b konkurriert (Abbildung 12C, D), sondern auch die Interaktion von FH an CEP (Abbildung 13C), MDA (Abbildung 13F) und MAA (Abbildung 13I) signifikant inhibiert. Die Interaktion weiterer FHR-Proteine mit Lipidperoxidationsprodukten wurde in zwei verschiedenen Publikationen untersucht. Imscher et al. fanden erst kürzlich eine spezifische Bindung von FHR-1 an MDA-Epitope nekrotischer Endothelzellen. Dies führte zu einer gesteigerten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine in Monozyten¹⁴¹. Für FHR-5 wurde vor einem Jahr eine Interaktion von FHR-5 mit MAA beschrieben. Rudnick et al. zeigten, dass FHR-5 mit FH um die Bindung an MAA konkurrierte und die inhibitorische Wirkung von FH verhinderte. Weiterhin bewiesen sie, dass MAA-gebundenes FHR-5 in der Lage war das humane Komplementsystem *in vitro* zu aktivieren¹⁹³.

Ein pro-inflammatorischer Effekt von FHR-3 auf RPE Zellen konnte in dieser Arbeit ebenfalls beschrieben werden (5.4.2, 5.4.5), die dafür verantwortlichen Interaktionspartner und Signalwege konnten im Rahmen der Doktorarbeit jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden und sollten zur vollständigen lokalen Funktionsaufklärung von FHR-3 in weiterführenden Studien untersucht werden.

6.4 Immunmodulatorischer Einfluss von FHR-3 auf RPE Zellen

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass humanes FHR-3 mit alternden, EMT-transdifferenzierten ARPE-19 Zellen interagiert und internalisiert wird (Abbildung 21, Anhang Abbildung 50). Diese endogene, Serumfreie FHR-3 Interaktion löste eine komplement-aktivierende (5.4.3.2, 5.4.5), pro-

inflammatorische (5.4.3.4, 5.4.3.5) Reaktion in den RPE Zellen aus. Eine Internalisierung weiterer FH-verwandter Proteine durch RPE Zellen wurde von Martin et al. gezeigt. Sie fanden heraus, dass apoptotische ARPE-19 Zellen spezifisch FH aufnehmen und dies zu einer gesteigerten Inaktivierung von C3 führte ¹⁴⁰. Ein ähnlicher Effekt konnte in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Hier führte die FHR-3 Interaktion mit ARPE-19 Zellen jedoch zu einer Steigerung des aktivierten C3 Spaltproduktes C3b (Abbildung 24, Abbildung 25). In der Arbeit von Martin et al. ist kritisch zu beachten, dass diese Versuche mit nicht-polarisierten ARPE-19 Zellen durchgeführt wurden. Eigens durchgeführte Studien mit unterschiedlich kultivierten ARPE-19 Zellen, ergab drastische Komplement-Genexpressionsänderungen (Daten nicht gezeigt). Für FHR-1 und FHR-5 konnte zwar keine Internalisierung in RPE-Zellen festgestellt werden, jedoch zeigten Irmischer et al. und Rudnick et al., dass FHR-1 und FHR-5 mit nekrotischen Endothelzellen, über Bindung an oxidativen Stressprodukten, interagiert (diskutiert in 6.3) ^{141,193}.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass oxidativer Stress – ein Hauptrisikofaktor retinaler Degenerationen – zum Anstieg von endogenem C3, in ARPE-19 Zellen führt ¹². In Korrelation mit den vorliegenden Ergebnissen, dass FHR-3 Behandlung mit einer vermehrten Zell-assoziierten C3 Expression einhergeht (Abbildung 26), konnte dieser C3-akkumulierende Effekt in zwei weiteren Studien, für H₂O₂ (Wasserstoffperoxid)- und Zigarettenrauch-induzierten oxidativen Stress in ARPE-19 Zellen, belegt werden ^{12,194}. Allerdings führte oxidativer Stress nicht zum C3 mRNA Expressionsanstieg (Abbildung 23) und zur erhöhten C3 Sekretion (Abbildung 27) in alternden ARPE-19 Zellen, wie es mit FHR-3 Inkubation belegt werden konnte ¹². Cho et al. fanden heraus, dass C3, über Bindung von *TWIST1* (twist basic helix–loop–helix transcription factor 1) an den C3 Promotor, in Tumorzellen erhöht exprimiert ist ¹⁹⁵. *TWIST1* ist ein wichtiger Transkriptionsfaktors, der die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) fördert ¹⁹⁶. In Tumorzellen führt demnach eine erhöhte C3 Expression, durch Inhibierung von E-Cadherin über C3a, zu EMT ¹⁹⁵. In jungen ARPE-19 Zellen (P25) führte eine FHR-3 Inkubation zu einer gesteigerten mRNA Expression mesenchymaler Marker im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 22). Es könnte sein, dass der FHR-3 induzierte C3 Expressionsanstieg und C3a Akkumulation in den gesunden ARPE-19 Zellen eine Transdifferenzierung zum mesenchymalen Phänotyp auslöste.

Eine erhöhte C3a Akkumulation und eine zeitabhängige Umverteilung von C3a zur Zellmembran, konnte in FHR-3 behandelten ARPE-19 Zellen detektiert werden (Abbildung 26). Neben der seit über 100 Jahren bekannten klassischen Funktion des Komplementsystems als Teil des humoralen Immunsystems, wurden diesem System in der letzten Dekade immer mehr nichtkanonische Aufgaben zugeordnet, u. a. der Einfluss auf den Zell-Metabolismus ^{8,9} und die Zellentwicklung und –Regeneration ¹⁰. Für ruhende T-Zellen wurde erst kürzlich beschrieben, dass intrazelluläres, lysosomales C3a zur Aktivierung des C3a Rezeptors C3aR führte und damit essenziell zum Überleben der T-Zellen war ⁹. In Monozyten dagegen wurde von Asgari et al. beschrieben, dass C3a zur Aktivierung von C3aR und damit zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β führte ¹⁹⁷. FHR-3 wurde bisher noch nicht als Priming-Faktor des NLRP3 Inflammasoms in RPE Zellen beschrieben. Hier konnte bestätigt werden, dass FHR-3 Inkubation die C3aR-Expression auf RNA und Protein-Ebene (Abbildung 32, Abbildung 33) in alternden ARPE-19 Zellen steigerte, Priming und Aktivierung des retinalen NLRP3 durch erhöhte *IL1B* und *NLRP3* RNA-Expression (Abbildung 38, Abbildung 39) förderte und zur gesteigerten Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-18 führte (Abbildung 40B). Während der fortgeschrittenen AMD konnte eine Hochregulation von NLRP3 in RPE-Zellen detektiert werden und damit verbunden eine vermehrte Sekretion von IL-1 β , was das Fortschreiten der degenerativen Augenerkrankung förderte ¹⁴⁵. Brandstetter et al. zeigten, dass das Priming des retinalen NLRP3 Inflammasoms den, durch oxidativen Stress-verursachten, RPE-Zelltod erhöhte ^{148,198}. In humanen RPE Zellen von AMD-Spenderretinae konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von NLRP3 festgestellt werden ¹⁹⁹. Neben IL-8 wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass das pro-inflammatorische Zytokine IL-6 nach FHR-3 Behandlung signifikant vermehrt in den Zellkulturüberstand von ARPE-19 sezerniert wurde (Abbildung 40A). Es ist bereits bekannt, dass IL-6 eine wichtige Rolle während der intraokularen Inflammation spielt. Im Kammerwasser von AMD Patienten wurde IL-6 erhöht detektiert ²⁰⁰, und in einem Makuladegenerations-Mausmodell sezernierten RPE Zellen vermehrt IL-6 nach erhöhter Anaphylatoxin C3a Stimulation im Vergleich zu gesunden Mäusen ²⁰¹. Eine IL-6 Hochregulation konnte erst kürzlich mit der Inhibition des Proteasoms in RPE Zellen in Verbindung gebracht werden, was in der vorliegenden Doktorarbeit ebenfalls gezeigt werden konnte in FHR-3 behandelten ARPE-19 Zellen (Abbildung 43) ²⁰².

FOXP3, ein Inflammations-assoziiertes Transkriptionsfaktor, fördert in anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen^{151,152}. Busch et al. belegten kürzlich erstmals, dass *FOXP3* in ARPE-19 Zellen exprimiert wird und das C5a mit der Aktivierung von *FOXP3* einhergeht⁷³. In neuesten Untersuchungen wurde festgestellt, dass oxidativer Stress in ARPE-19 Zellen zur erhöhten Expression von *FOXP3* führt und zur gesteigerten Sekretion von pro-angiogenetischen Faktoren¹². In der vorliegenden Doktorarbeit konnte ebenfalls *FOXP3* mRNA in alten und jungen ARPE-19 Zellen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit FHR-3 führte zu einer verringerten mRNA Expression, was zu dem pro-inflammatorischen Effekt von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen passen könnte (Abbildung 41). Die genaue Rolle von *FOXP3* in RPE Zellen ist jedoch nicht bekannt und muss noch eindeutig bestimmt werden.

Neben der FHR-3 induzierten Regulation von C3aR konnte außerdem der Komplementrezeptor 3 (CR3, Untereinheit CD11b) in ARPE-19 Zellen detektiert werden. Die Inkubation mit FHR-3 führte zu einer vielfachen Expressionssteigerung von CD11b, sowohl auf RNA-Ebene (Abbildung 35) als auch auf Protein-Ebene (Abbildung 36, Abbildung 37). Außer kürzlich von Trakkides et al. ebenfalls gezeigt¹², wurde eine CR3 Expression bisher hauptsächlich in Verbindung mit Makrophagen gebracht²⁰³. CR3 bindet abgelagertes iC3b und C3d und verursacht dadurch die Phagozytose und Zerstörung von Fremdzellen²⁰⁴. CR3 Expression wurde in humanen primären RPE Zellen mit NLRP3 Inflammasom-Aktivierung assoziiert²⁰⁵. Die FHR-3 induzierten pro-inflammatorischen Effekte auf ARPE-19 Zellen korrelieren mit den Daten aus der Literatur und zeigen, dass CR3 an der Inflammations-Regulation in ARPE-19 Zellen beteiligt ist. Genauere Funktionen zu diesem Rezeptor sind über RPE Zellen bisher nicht beschrieben. Es konnte jedoch bereits untersucht werden, dass FHR-1, FH und FHL-1 an CR3 binden^{206–209}. Eine Bindung von FHR-3 an CR3 bzw. eine Co-Lokalisation konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Um zu testen, ob CR3 direkt an den inflammatorischen Prozessen in RPE Zellen beteiligt ist, könnte in weiterführenden Studien ein CR3-Knockdown vorgenommen werden.

Zwischen den kultivierten jungen ARPE-19 (P25) und alten ARPE-19 Zellen kam es außerdem zu einer Umstrukturierung von Aktin-Filamenten (Abbildung 18). Intakte junge RPE Zellen bilden sowohl einen apikalen F-Aktin Ring, als auch mikrovilläre Aktin-Bündel aus⁷⁹. Jaumouillé et al. untersuchten in einer neu veröffentlichten Studie, ob eine Interaktion von Aktin mit CR3 die Phagozytose von Makrophagen fördert. Sie

konnten zeigen, dass es bei CR3-vermittelter Phagozytose zu Aktin-Vorwölbungen kommt, die zur Phagosomen-Formation beitragen ²¹⁰. Da es in alternden, degenerierten RPE Zellen zur verringerten Phagozytose von Photorezeptorzellen kommt und damit zum Absterben der Photorezeptorzellen, könnte in RPE Zellen ebenfalls eine direkte Verbindung zwischen CR3 und Aktin-vermittelter Phagozytose bestehen.

Eine Fehlfunktion von bestimmten Toll-like Rezeptoren (TLR) wird mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer AMD assoziiert ^{154,155}. In RPE Zellen sind hauptsächlich TLR1 und TLR3 exprimiert ¹⁵³. In der vorliegenden Arbeit konnte die mRNA Expression von *TLR1* und *TLR3* bestätigt werden (Abbildung 42). Wenn ARPE-19 Zellen mit FHR-3 inkubiert wurden, konnte eine verringerte *TLR1* Expression (Abbildung 42), und für *TLR3* eine zeitabhängige Regulation detektiert werden. Nach 5 h FHR-3 Inkubation konnten weniger TLR3 Transkripte festgestellt werden und nach 24 h FHR-3 Behandlung wurde signifikant mehr TLR3 exprimiert (Abbildung 42). Patel et al. belegten, dass eine TLR3-Aktivierung oxidativ-gestresster RPE Zellen vor dem Zelltod schützt, wohingegen eine TLR3-Aktivierung in nicht gestressten RPE Zellen zu einer verringerten Zell-Viabilität führte ¹⁵⁴. In einer weiteren Studie konnte dargestellt werden, dass eine TLR3-Defizienz in einer Induktion der Pro-Inflammation in Mäusen resultierte ²¹¹. Eine Interaktion von TLRs mit Komplementrezeptoren wurde in B Zellen beschrieben, ob eine Interaktion in RPE Zellen vorliegt ist bisher jedoch nicht bekannt ²¹². In nachfolgenden Studien könnte eine Interaktion von TLR3 mit CR3 oder C3aR untersucht werden, um die molekularen Mechanismen zur Immunregulation des RPE weiter aufzuklären.

In einer letzten Untersuchung wurde gezeigt, dass FHR-3 Behandlung zur Inhibition von Proteasom-Komponenten in ARPE-19 führt (Abbildung 43). Es ist bekannt, dass RPE Zellen einen aktiven Ubiquitin-Proteasom Signalweg haben, jedoch nur geringe Mengen an endogenem Ubiquitin zur Verfügung haben. Das macht RPE Zellen anfälliger für zelluläre Stressoren. Die Proteolyse über diesen Signalweg ist neben der lysosomalen Proteolyse ein essenzieller Mechanismus zum Abbau von ungewollten Proteinen oder Partikeln. Daher ist eine korrekte Regulierung des Proteasoms wichtig für die Aufrechterhaltung des Zell-Metabolismus ²¹³. Studien von Liu et al. ergaben, dass oxidativer Stress die Proteasom-Aktivität in RPE Zellen

verminderte¹⁵⁶. In einer anderen Studie konnte ein Effekt von C3a auf die Proteasom-Aktivität in RPE Zellen detektiert werden. Hier führte C3a zur Inhibition von Proteasom-Untereinheiten¹⁵⁷. Und in einer dritten Untersuchung von Carvalho et al. konnte ebenfalls gezeigt werden, dass C3a eine verringerten Expression von Proteasom-Komponenten in Maus RPE Zellen induzierte¹⁵⁸.

6.5 Instabilität von Hybridomaklonen

Die Hybridomatechnik, eingeführt durch Köhler und Milstein, gehört seit mittlerweile über 40 Jahren zu einem der wichtigsten biologischen und medizinischen Werkzeuge, wenn es um Protein-Interaktionen und Protein-spezifische Therapien geht²¹⁴.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs Fusionen durchgeführt, um einen spezifischen monoklonalen Antikörper (mAk) gegen FHR-1 zu generieren (Anhang Tabelle 29). Davon konnten anhand von zwei Versuchen positive Hybridomaklone isoliert, und fünf spezifische mAk generiert werden, um sie auf ihre FHR-1 Spezifität zu testen (5.2, Anhang Tabelle 30). Eine Fusion scheiterte aufgrund fehlender Antikörperentwicklung. Für diesen Versuch wurde eine männliche Maus verwendet, wobei sich herausstellte, dass es sich hierbei um eine geschlechtsspezifische Immunantwort handelte^{119,120}. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Immunisierungen ausschließlich weibliche Mäuse verwendet.

In den beiden letzten Versuchen wurden erfolgreich 2000 Hybridomaklone generiert und ca. 30 Klone auf FHR-1 Bindung gescreent, jedoch konnte entweder keiner dieser antikörperproduzierenden Klone in Zellkultur vermehrt und vereinzelt werden, oder die Klone verloren nach Vereinzlung ihre antikörperproduzierenden Eigenschaften. Diese Tücken während der Hybridoma-Generierung wurden bereits in mehreren Studien beschrieben und kann verschiedene Gründe haben. Murine Hybridomzellen sind kurz nach der Fusion der antikörperproduzierenden Splenozyten mit den immortalen Myelomazellen instabil, aber wiederholtes Klonen und Vereinzlung der Zellen erzeugt normalerweise stabile Zellklone. Es kann vorkommen, dass Mutationen oder ein Verlust von Chromosomen in den Hybridomaklonen, ähnlich wie bei der Myelomazelllinie P3-X63-Ag8.653, zum Ausfall der Antikörperproduktion führt^{215,216}. Kessler et al. Konnten zeigen, dass die Hybridom-Stabilität stark von den Zellkulturbedingungen, insbesondere vom Kulturmedium, abhängt. Langzeit-Kultivierung von Hybridomen in Medium mit fötalem Kälberserum (FCS) im Vergleich zu Serum-freien Medium führte sowohl zum Verlust der Antikörperproduktion als auch

zum Verlust der Chromosomen und damit zur Instabilität der Klone ²¹⁷. Da im Serum zahlreiche Hormone, Wachstumsfaktoren und andere Nährstoffe vorhanden sind, ist eine FCS-freie Kultivierung jedoch nicht für jede Hybridoma-Zellkultur geeignet und muss für jeden Versuch separat getestet werden ²¹⁸. Ein anderer Grund für den Verlust der Antikörperproduzierenden Zellen könnte sein, dass die jeweiligen Klone aus zwei verschiedenen Subpopulationen bestanden, einerseits aus Antikörper-produzierenden Klonen und zum anderen aus Zellen ohne Antikörperproduktion. Diese Klone ohne Antikörperproduktion hätten dann vermutlich die andere Population überwachsen und somit zum kontinuierlichen Verlust der antikörpergenerierenden Klone geführt ²¹⁹. Lee et al. Beschreiben eine Methode, die zu einer gesteigerten Antikörperstabilität und Antikörperproduktivität führen soll. Hierbei wurden Hybridomazellen in Gel-beads immobilisiert, was einerseits zu einer verbesserten Zellkulturumgebung mit verringertem FCS-Bedarf, durch die kompakte Zelldichte, führen sollte. Und andererseits führte die Immobilisierung der Zellen zu einer verringerten Zellteilung und damit zu einer Minimierung chromosomaler Veränderungen in den Hybridomaklonen ²¹⁸.

Da es in der vorliegenden Arbeit in wiederholten Versuchen zum Verlust der Antikörperstabilität kam, ist außerdem zu überdenken, ob die verwendeten Myelomazellen für die Fusion geeignet sind. Ein Chromosomenverlust in den Myelomzellen kann ebenfalls Auswirkungen auf die Antikörperproduktivität der generierten Hybridomzellen haben. Daher sollte in weiterführenden Versuchen, neben der Zellkulturoptimierung, eine andere Myelomzelllinie in Erwägung gezogen werden, um hoch-spezifische monoklonale Antikörper gegen FHR-1 generieren zu können.

Für diese Arbeit könnte die Hypothese gestellt werden, dass FHR-3 an TLR-3 oder C3aR bindet, über Vesikel in ARPE-19 Zellen aufgenommen wird und dadurch intrazelluläre Signalwege hochreguliert werden, die zur Komplementaktivierung und zur NLRP3 Aktivierung führen. Es bleiben offene Fragen, die durch das Promotionsprojekt entstanden sind: Über welche Rezeptoren interagiert FHR-3 mit ARPE-19 Zellen? Wie findet die Internalisierung von FHR-3 statt? Welche intrazellulären Signalwege werden durch FHR-3 in den RPE Zellen ausgelöst?

Es gibt mittlerweile immer mehr Studien, die belegen, dass Komplementkomponenten lokal in retinalen Zelltypen ^{14,71,84} und in ARPE-19 Zellen ^{12,194} exprimiert und reguliert

werden. Wenn man bedenkt, dass RPE Zellen hauptsächlich am intraokularen Immunprivileg beteiligt sind und diese bei retinalen Degenerationen geschädigt sind, und basierend auf den hier vorgelegten Ergebnissen einer endogenen, FHR-3-induzierten lokalen Komplement- und Inflammations-Aktivierung von RPE Zellen, sollte der Fokus in Zukunft noch mehr auf der lokalen und nicht der systemischen Komplement-Forschung liegen, um die Pathomechanismen schwerwiegender Augenerkrankungen wie der AMD aufzuklären und neue Therapieoptionen zu finden

55.

Zusammenfassung

Das humane Komplementsystem ist ein essentieller Teil der angeborenen Immunität, das aus einem präzise regulierten Zusammenspiel von über 40 löslichen und Membran-gebundenen Proteinen besteht³⁻⁵. Der wichtigste Negativregulator des Komplementsystems ist Faktor H (FH). Seit über zehn Jahren ist ein Polymorphismus in den *CFH*-verwandten Genen *CFHR3* und *CFHR1* beschrieben, der eine Deletion dieser Gene ($\Delta CFHR3/1$) verursacht und mit einem protektiven Effekt auf die Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) assoziiert wird^{44,46}. Bei der AMD handelt es sich um eine multifaktorielle senile Netzhauterkrankung, die zu einer hochgradigen Sehbehinderung bis hin zur Erblindung führen kann^{220,221}.

Die Pathomechanismen der AMD, und inwiefern die Komplementproteine FHR-3 und FHR-1 in die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung involviert sind, sind bisher nicht eindeutig geklärt.

Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, die Funktion von FHR-3 und FHR-1, mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAk), zu bestimmen und zu modulieren. Dabei sollte die Wirkung der Antikörper sowohl auf das systemische als auch auf das intraokulare Komplementsystem untersucht werden. Die Funktionsaufklärung von FHR-3 und FHR-1, in Bezug auf die AMD-Pathogenese, sollte damit bedeutend vorangetrieben werden und im besten Fall ein putativer lokaler Antikörper-basierter Therapieansatz für die Bekämpfung retinaler Degenerationserkrankungen geliefert werden.

Zunächst wurden die in der Masterarbeit generierten monoklonalen Antikörper, die ein Peptid in der fünften C-terminalen Domäne (SCR 5) von FHR-3 targetieren, eingehend charakterisiert. Dabei konnte ein Antikörper, RETC-2, als hochspezifisch für humanes FHR-3 ausgewählt werden. RETC-2 detektierte sowohl eigens hergestelltes, rekombinantes FHR-3 als auch natives FHR-3 aus humanem Serum. Mit Hilfe von RETC-2 konnte FHR-3 in Seren verschiedener Autoimmunerkrankungen quantifiziert werden, und eine signifikante Steigerung dieses Proteins in rheumatischen Autoimmunerkrankungen festgestellt werden. Ein systemischer Einfluss von FHR-3 auf die AMD wurde nicht beobachtet. RETC-2 färbte jedoch lokal exprimiertes FHR-3 in Makrophagen/Mikroglia Zellen einer 92-jährigen degenerierten humanen Retina. Da es in der alternden und entzündeten Retina zur Ablagerung von Komplementproteinen und Peroxidationsprodukten kommt, wurde der lokale Effekt von FHR-3 und die

blockierende Wirkung von RETC-2 analysiert. FHR-3 konkurrierte mit dem Komplement-Negativregulator FH um die Bindung sowohl an C3b, als auch an oxidative Stressepitope CEP (ω -carboxyethyl)pyrrole), MDA (Malondialdehyd) und MAA (Malondialdehyd-Acetaldehyd). FHR-3 wirkt damit als indirekter Aktivator des Komplementsystems, indem es die FH-Funktion negativ beeinflusst. RETC-2 blockierte diese Interaktion und führte zu einer verbesserten FH-Homöostase *in vitro*.

Im nächsten Projekt dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen humanes FHR-1 hergestellt. Es konnten fünf Klone isoliert werden, die spezifisch ein immunogenes Peptid in der SCR 3 Domäne von FHR-1 targetierten. Davon detektierte ein Klon, 472, sowohl eigens hergestelltes rekombinantes FHR-1 als auch natives FHR-1 aus humanem Serum. MAk 472 kreuz-reagierte jedoch mit rekombinantem FHR-3 im ELISA. Eine Immunpräzipitation des anti-FHR-1 Antikörpers 472 aus humanem Serum und anschließender Massenspektrometrie-Analyse bestätigte die spezifische Interaktion von FHR-1 mit dem mAk 472.

Da die vielversprechenden Ergebnisse des anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2 auf eine lokale Wirkung von FHR-3 im humanen Auge hindeuteten, konzentrierten sich die nachfolgenden Versuche hauptsächlich auf diesen Antikörper und den intraokularen Effekt seines spezifischen Antigens.

Aufgrund der immunreaktiven und komplement-aktivierenden Eigenschaften des murinen IgG2b Fc-Teils von RETC-2, erfolgte die Chimärisierung des FHR-3-bindenden Antikörpers. Hierbei wurden zunächst die variablen Antikörperregionen von RETC-2 amplifiziert und in kommerzielle Vektorkonstrukte, die nicht komplement-aktivierende humane IgG4 konstante Antikörperregionen exprimieren, kloniert. Anschließend wurde der chimärisierte Antikörper RETC-2-ximab über Co-Transfektion in HEK293T-Zellen exprimiert und mittels Protein G Affinitätschromatografie aufgereinigt. Eine spezifische Bindung von RETC-2-ximab an FHR-3 wurde über ELISA und Western Blot erfolgreich getestet.

Ein umfangreiches Projekt dieser Arbeit befasste sich mit dem putativen Effekt von FHR-3 auf humane RPE Zellen. RPE Zellen exprimieren kein *CFHR3*. Zunächst wurde die Kultivierung der RPE-Zelllinie ARPE-19 optimiert. Es zeigte sich, dass sich alternde ARPE-19 Zellen der Passage 38 (P38) im Vergleich zu jungen ARPE-19 Zellen (P25) in epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) befanden. Sie exprimierten einerseits *tight junctions* schwächer und keine kompakten apikalen F-Aktin Ringe. Zum anderen

waren mesenchymale Marker-Gene Vimentin, α -Aktin und Kollagen Typ 1 signifikant hochreguliert in alternden ARPE-19 Zellen.

Sowohl alternde als auch junge ARPE-19 wurden apikal mit rekombinatem FHR-3, unter Serum-freien Bedingungen, inkubiert. Dabei wurde festgestellt, dass FHR-3 von alternden ARPE-19 (P38) aufgenommen wird. Es zeigte sich, dass FHR-3 einen komplement-aktivierenden und pro-inflammatorischen Effekt auf ARPE-19 Zellen auslöste, stärker ausgeprägt in den alternden Zellen.

Komplementkomponenten C3 (inklusive aktivierte Spaltprodukte), CFB und Komplementrezeptoren C3aR und CD11b wurden sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene erhöht exprimiert und sekretiert. Dieser Effekt war FHR-3-spezifisch und wurde nicht durch Behandlung der Zellen mit FHR-1, FH oder Properdin detektiert.

In alternden ARPE-19 Zellen führte die FHR-3 Behandlung zum Priming des NLRP3-Inflammasoms, da die Genexpression von sowohl *NLRP3* als auch von pro-*IL1B* signifikant hochreguliert wurde. Die mRNA Expression von Toll-like Rezeptoren 1 und 3 (*TLR1*, *TLR3*), die einen protektiven Effekt auf RPE Zellen haben, erniedrigte sich signifikant in jungen und alternden ARPE-19 Zellen nach FHR-3 Inkubation. FHR-3 induzierte außerdem die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-18 in alternden ARPE-19. Des Weiteren veranlasste FHR-3 in ARPE-19 eine zeitabhängig verringerte Genexpression von Proteasom-Untereinheiten. Anschließend wurde in ersten Untersuchungen gezeigt, dass der hergestellte chimäre anti-FHR-3 Antikörper RETC-2-ximab den komplement-aktivierenden FHR-3 Effekt partiell mildern konnte auf RNA Ebene.

Im letzten Teil dieser Arbeit konnten erste Ergebnisse gesammelt werden, die den komplement-aktivierenden Einfluss von FHR-3 auch auf RPE Zellen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-RPE), und auf humane primäre RPE Zellen (pRPE) bestätigten.

Zusammenfassend liefert diese Doktorarbeit neue Einblicke in die putative Funktion von FHR-3 im degenerierten, alternden Auge, insbesondere im Hinblick auf das endogene, intrazelluläre Komplementsystem in RPE Zellen. Mit RETC-2-ximab kann ein neuartiger FHR-3-blockierender lokaler Therapieansatz, v. a. im Hinblick auf die AMD-Pathogenese, geliefert werden.

Summary

The human complement system is an essential part of innate immunity, consisting of a precisely regulated interaction of more than 40 soluble and membrane-bound proteins. The main negative regulator of the complement system is complement factor H (FH) ³⁻⁵. Since ten years, a polymorphism has been described in the *CFH*-related genes *CFHR3* and *CFHR1* inducing a gene deletion (Δ CFHR3/1), which is associated with a protective effect for the development of age-related macular degeneration (AMD) ^{44,46}. AMD is a multifactorial senile retinal disease that can lead to severe visual impairment and blindness ^{220,221}.

The pathomechanisms of AMD and the extent to which the complement proteins FHR-3 and FHR-1 are involved in the development and course of the disease are not completely understood.

Therefore, the aim of this PhD thesis was to determine and modulate the function of FHR-3 and FHR-1 by using specific monoclonal antibodies (mAb). Hereby, the effect of the antibodies on both the systemic and intraocular complement systems should be investigated. This work could offer a novel antibody-based treatment option for the inflammatory processes in retinal diseases such as AMD.

First, the monoclonal antibodies generated in the master thesis, targeting a peptide in the fifth C-terminal domain (SCR 5) of FHR-3, were fully characterized. RETC-2 was selected as highly specific for human FHR-3. RETC-2 detected both recombinant FHR-3 and native FHR-3 from human serum. Using this antibody, FHR-3 could be quantified in sera of various autoimmune diseases showing a significant increase of the target protein rheumatic autoimmune diseases. A systemic influence of FHR-3 on AMD was not observed. However, RETC-2 stained locally expressed FHR-3 in macrophage/microglia cells of a 92-year-old degenerated human retina. Since complement proteins and peroxidation products are deposited in the aged retina, the local effect of FHR-3 and the inhibitory effect of RETC-2 were analyzed. FHR-3 competed with FH for binding to both C3b and oxidative stress epitopes CEP (ω -carboxyethyl)pyrrole, MDA (malondialdehyde) and MAA (malondialdehyde acetaldehyde). Thus, FHR-3 acts as an indirect activator of the complement system by impairing FH function. RETC-2 inhibited these interaction and improved FH homeostasis *in vitro*.

In the next project of this work, monoclonal antibodies against human FHR-1 were generated. Five clones were isolated that specifically targeted an immunogenic peptide in the SCR 3 domain of FHR-1. Of these, one clone 472 detected both recombinant FHR-1 and native FHR-1 from human serum. However, mAb 472 cross reacted with recombinant human FHR-3 in ELISA. Immunoprecipitation from human serum using mAb 472 and subsequent mass spectrometry analysis confirmed the specific interaction of FHR-1 with mAb 472.

Since the promising results of the anti-FHR-3 antibody RETC-2 indicated a local effect of FHR-3 in the human eye, following experiments focused mainly on that antibody and the intraocular effect of its specific antigen.

In a next step, chimerization of the FHR-3-binding antibody was performed due to the immunoreactive and complement activating properties of the murine IgG2b Fc part of RETC-2. First, the variable antibody regions of RETC-2 were amplified and cloned into commercial vector constructs expressing non-complement activating human IgG4 constant antibody regions. Subsequently, the chimerized antibody RETC-2-ximab was expressed by co-transfection in HEK293T cells and purified using protein G affinity chromatography. ELISA and Western blot successfully tested a specific binding of RETC-2-ximab to FHR-3.

The last substantial project of this work dealt with the putative effect of FHR-3 on human RPE cells. RPE cells do not express *CFHR3*. First, the cultivation of the RPE cell line ARPE-19 was optimized. Evidence showed that aging ARPE-19 cells of passage 38 (P38) were in epithelial-mesenchymal transition (EMT) compared to young ARPE-19 cells (P25). On the one hand, tight junctions were weaker expressed and no compact apical F-actin rings could be detected. On the other hand, mesenchymal marker genes for vimentin, α -actin and type I collagen were significantly upregulated in aging ARPE-19 cells.

Both ageing and young ARPE-19 were apically incubated with recombinant FHR-3 under serum-free conditions. FHR-3 was found to be ingested by ageing ARPE-19 cells. FHR-3 was shown to trigger a complement activating and pro-inflammatory effect on ARPE-19 cells, especially in senescent cells.

Increased expression and secretion of complement components C3 (including activated cleavage products), CFB and complement receptors C3aR and CD11b were

observed at both mRNA and protein levels. While this effect was FHR-3 specific, it was not detected by treating the cells with FHR-1, FH or Properdin.

In senescent ARPE-19, FHR-3 treatment triggered priming of the NLRP3 inflammasome due to upregulated gene expression of both *NLRP3* and *pro-IL1B*. Additionally, mRNA expression of toll-like receptors 1 and 3 (*TLR1*, *TLR3*) were significantly reduced in juvenile and senile ARPE-19 cells following FHR-3 incubation. FHR-3 also induced secretion of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-18 in ageing ARPE-19. Furthermore, FHR-3 caused time-dependently decreased gene expression of proteasome subunits in ARPE-19. Thereafter, initial studies showed that the chimeric anti-FHR-3 antibody RETC-2-ximab could partially attenuate the complement activating FHR-3 effect on RNA level.

The last part of this work showed preliminary results confirming the complement-activating impact of FHR-3 even on RPE cells from human induced pluripotent stem cells (iPS-RPE), and on human primary RPE cells (pRPE).

In summary, this PhD thesis provides new insights into the putative function of FHR-3 in the degenerated elderly eye, especially concerning the endogenous intracellular complement system in RPE cells. RETC-2-ximab can potentially offer a novel FHR-3-blocking therapy strategy, especially with regard to AMD pathogenesis or other autoimmune diseases.

Anhang

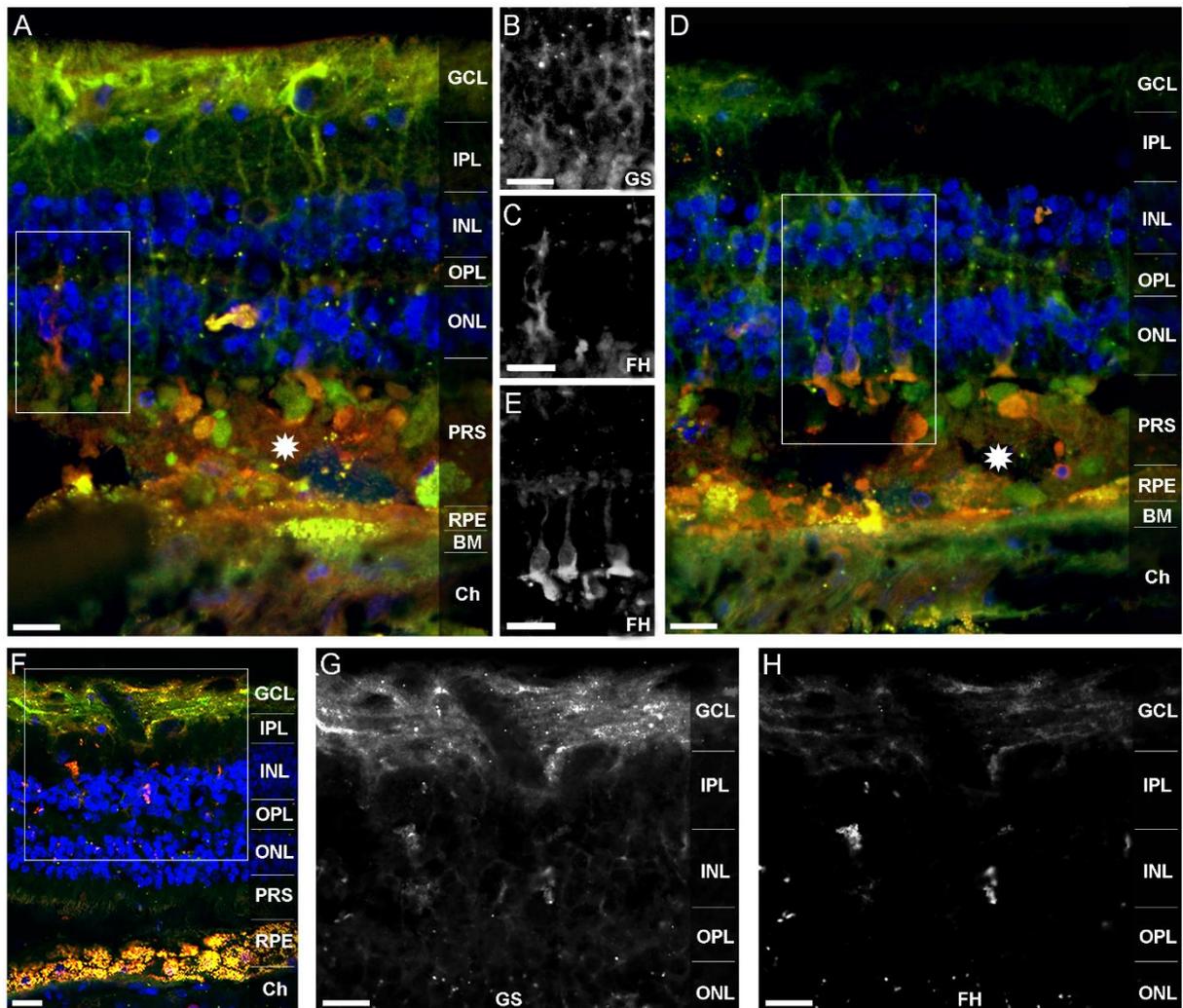


Abbildung 48: FH ist in der humanen Retina in Müllerzellen und Photorezeptor-Segmenten lokalisiert.

FH (grün, A, D, F) wurde zusammen mit Müllerzell-/Photorezeptor-Marker Glutaminsynthetase (GS, rot, A, D, F) spezifisch angefärbt. **(A - D)** In einem 92-jährigen Spenderauge (hS1) konnte FH mit den äußeren Stammfortsätzen von Müllerzellen gefärbt werden (A - C). Im subretinalen Raum wurde FH, co-lokalisiert mit Photorezeptor-Somata oder mit Müllerzellfortsätzen, die Photorezeptor-Somata umhüllen, immunhistologisch detektiert (D - E). **(F - H)** In einer 64-jährigen Spender-Retina (hS2) wurde FH hauptsächlich in den inneren Müllerzell-Segmenten und den Müllerzell-Endfüßen lokalisiert. Retinale Schichten von oben nach unten: GCL Ganglionzellschicht, IPL innere plexiforme Schicht, INL innere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht, ONL äußere nukleäre Schicht, PRS Photorezeptoren, RPE retinales Pigmentepithel, BM Bruch-Membran, Ch Choroid. Maßstabsbalken entspricht 40 μm . (Abbildung aus Schäfer et al. 2016) ⁴⁰.

Tabelle 29: Immunisierungsschema zur Herstellung eines spezifischen monoklonalen anti-FHR-1 Antikörpers

| Mäuse | Tag | Antigen | Dosis/Adjuvans |
|--|-----|--------------------------|--|
| 2 x Balb/c (weiblich) #5226 #5227 | 0 | FHR-1-Peptid 1 (Ure5) | 50 µg/FCA |
| | 29 | | 50 µg/FIA |
| | 56 | | 50 µg/FIA |
| | 85 | | 50 µg/FIA |
| | 115 | | 50 µg/- |
| | 116 | | 50 µg/- |
| | 117 | | 50 µg/- |
| | 118 | | 1. Fusion (#5226), mAk 472 |
| 2 x Balb/c (weiblich) #5228 #5230 | 0 | FHR-1-Peptid 2 (Ure3) | 50 µg/FCA |
| | 29 | | 50 µg/FIA |
| | 56 | | 50 µg/FIA |
| | 85 | | 50 µg/FIA |
| | 139 | | 50 µg/- |
| | 140 | | 50 µg/- |
| | 141 | | 50 µg/- |
| | 142 | | 2. Fusion (#5228), 666 Klone, keiner FHR-1 positiv |
| 2 x Balb/c (weiblich) #5229 #5231 | 0 | FHR-1-Peptid 2 (Ure4) | 50 µg/FCA |
| | 29 | | 50 µg/FIA |
| | 56 | | 50 µg/FIA |
| | 85 | | 50 µg/FIA |
| | 141 | | 50 µg/FIA |
| | 158 | | 50 µg/FIA |
| | 167 | | 50 µg/- |
| | 168 | | 50 µg/- |
| | 169 | | 50 µg/- |
| | 170 | | 3. Fusion (#5229), 1094 Klone, mAk 179, 368, 539, 621 |

| | | | |
|--|-----|--------------------------------|---|
| | | | |
| 1 x Balb/c (weiblich) | 0 | FHR-1 (rekombinant) | 20 µg/FCA |
| | 21 | | 25 µg/FIA |
| | 42 | | 25 µg/FIA |
| | 69 | | 25 µg/- |
| | 70 | | 25 µg/- |
| | 71 | | 25 µg/- |
| | 72 | 4. Fusion, kontaminiert | |
| | | | |
| 1 x Balb/c (männlich) | 0 | FHR-1 (rekombinant) | 25 µg/FCA |
| | 34 | | 30 µg/FIA |
| | 57 | | 30 µg/FIA |
| | 83 | | 25 µg/FIA |
| Keine Antikörpertiter-Entwicklung | | | |
| | | | |
| 1 x Balb/c (weiblich) | 0 | FHR-1 (rekombinant) | 30 µg/FCA |
| | 26 | | 25 µg/FIA |
| | 82 | | 25 µg/FIA |
| | 110 | | 25 µg/FIA |
| | 140 | | 25 µg/FIA |
| | 166 | FHR-1 (nativ) | 30 µg/FIA |
| | 194 | | 25 µg/FIA |
| | 213 | | 5 µg/- |
| | 214 | | 10 µg/- |
| | 215 | | 10 µg/- |
| | 216 | | 5. Fusion, 1300 Klone, alle positiven Klone nicht stabil |

FCA = komplettes Freund-Adjuvans; FIA = inkomplettes Freund-Adjuvans

Tabelle 30: Zusammenfassung der Charakterisierung der hergestellten mAk gegen FHR-1.

| mAk | Spezifität | Isotyp | ELISA | | | Western Blot/ IP-NHS | | IHC- hRetina |
|-----|-----------------------------|--------|--------|-------|-------|-------------------------|-----|-----------------|
| | | | Peptid | FHR-1 | FHR-3 | FHR-1 | MS | |
| 472 | Peptid 1 (Ure5) SCR 3 | IgG2a | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | - |
| 179 | Peptid 2 (Ure4) SCR 3 | n. b. | ++ | - | - | + | - | n. b. |
| 368 | | n. b. | ++ | - | - | + | - | n. b. |
| 539 | | n. b. | ++ | - | - | ++ | - | n. b. |
| 621 | | n. b. | ++ | - | - | ++ | - | n. b. |

mAk = monoklonaler Antikörper; AS = Aminosäure; NHS = humanes Serum; n.b. = nicht bestimmt; IP-NHS = Immunpräzipitation aus humanem Serum, MS = Massenspektrometrie-Analyse IHC hRetina = Immunhistochemie humane Retina, - = negatives Ergebnis, + = positives Ergebnis

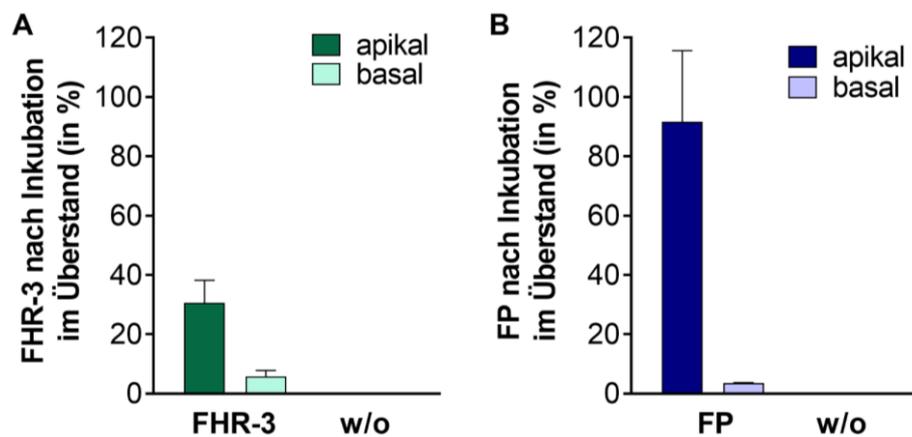


Abbildung 50: FHR-3 wird apikal von ARPE-19 Zellen aufgenommen im Gegensatz zu Properdin.

ARPE-19 Zellen wurden im Transwell kultiviert und anschließend für 24 h entweder mit (A) FHR-3 oder (B) Properdin inkubiert. Die Analyse der apikalen und basalen Überstände erfolgte mittels spezifischer ELISA. (A) Im apikalen Überstand konnten nur noch 30 % des inkubierten FHR-3 nachgewiesen werden. (B) Es wurden noch 92 % des apikal inkubierten Properdin im Überstand nachgewiesen. Ausgewertet wurden die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen mit je Duplikaten und gegen die jeweilige Standardkurve interpoliert.

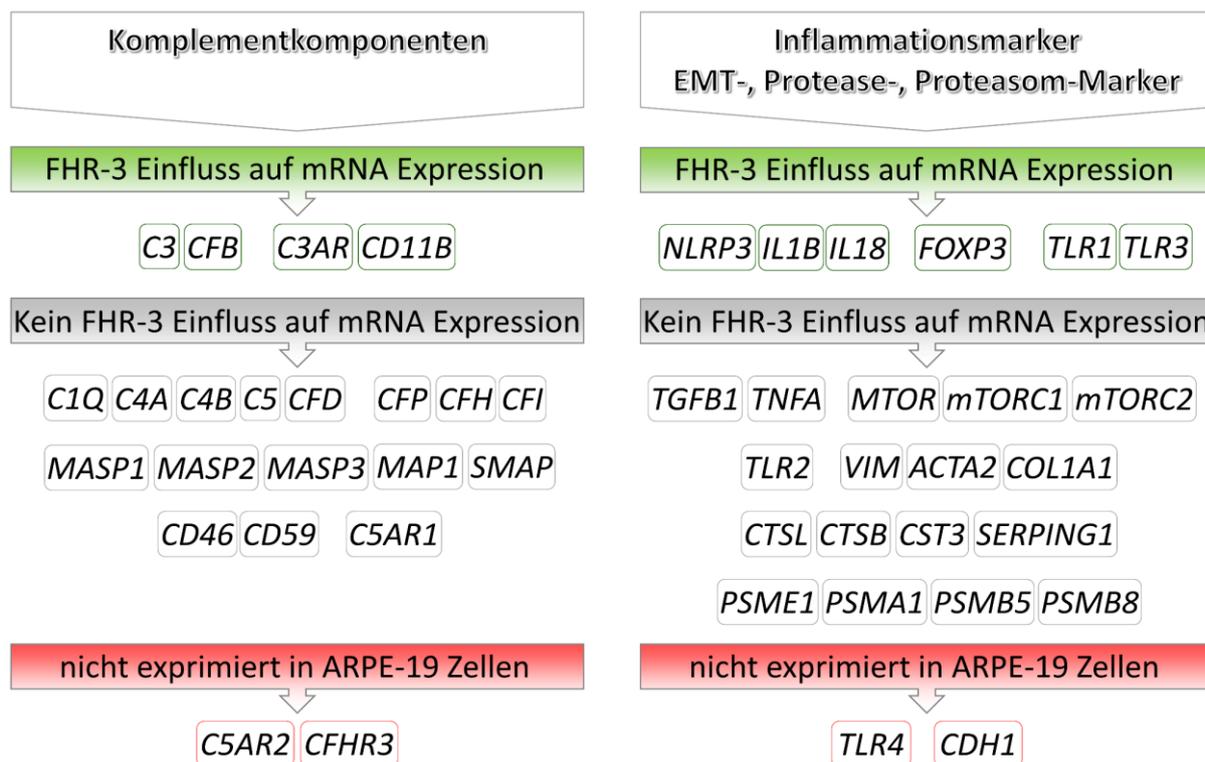


Abbildung 51: Übersicht der untersuchten Gene in ARPE-19 Zellen und der Einfluss von FHR-3 auf deren Expression.

In grün dargestellt sind alle Transkripte, die aufgrund von FHR-3 in ihrer Expression verändert wurden. In grau dargestellt sind alle Gene, deren RNA Expression mit von FHR-3 beeinflusst wurde und in rot sind alle Gene ersichtlich, die in ARPE-19 Zellen auf RNA-Ebene nicht exprimiert werden.

Tabelle 31: Genotypisierung aller verwendeten RPE Zellen auf AMD-assoziierte Komplement-SNPs.

| Gen | SNP ID | ARPE-19 | pRPE (135) | pRPE (27) | iPSC-RPE | hS 1 | hS 2 |
|-------------|-------------|---------|------------|-----------|----------|------|------|
| CFH | rs121913059 | C | C | C | C | C | C |
| CFH (Y402H) | rs1061170 | CT | CT | CT | C | CT | T |
| CFH | rs570618 | G | GT | GT | T | GT | GT |
| CFH | rs10922109 | A | AC | AC | C | AC | AC |
| CFHR3/CFHR1 | rs61818925 | G | G | G | G | G | G |
| C3 | rs2230199 | CG | C | C | C | C | C |
| C3 | rs147859257 | T | T | T | T | T | T |
| C2/CFB | rs116503776 | G | GA | G | G | G | G |
| C2/CFB | rs144629244 | C | C | C | C | C | C |
| CFI | rs141853578 | C | C | C | C | C | C |
| CFI | rs10033900 | T | TC | TC | C | TC | C |
| ARMS2 | rs3750846 | A | A | AG | A | A | G |
| C9 | rs62358361 | G | G | G | G | G | G |

non-AMD Risiko
 heterozygot
 AMD Risiko

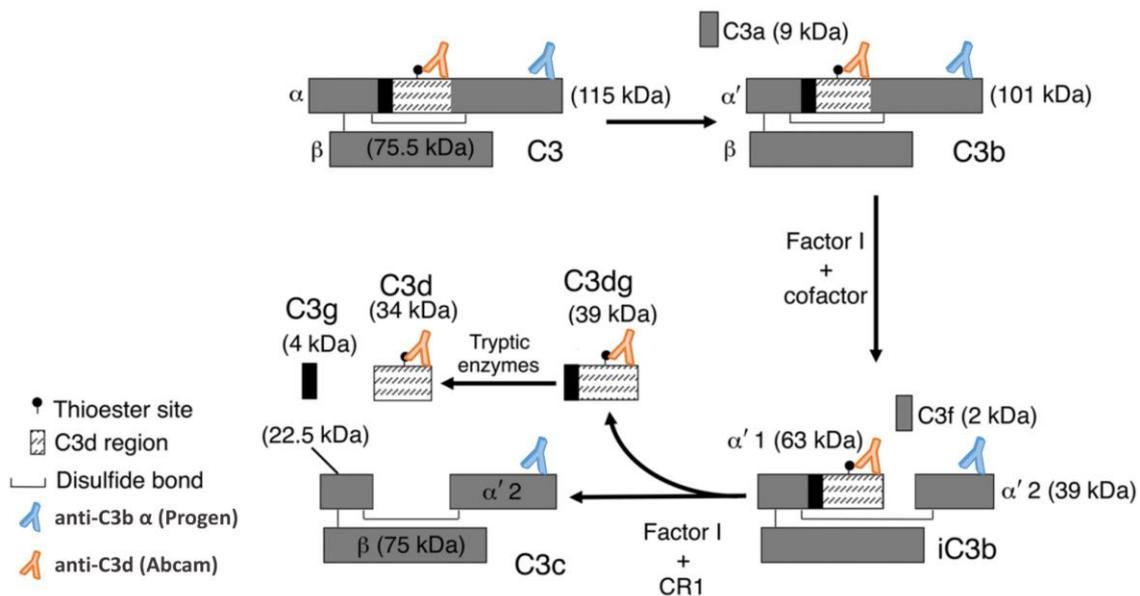


Abbildung 52: C3-Fragmentierung während der Aktivierung des Komplementsystems inklusive Binderegionen der spezifischen monoklonalen anti-C3 Antikörper.

Dargestellt ist die Metabolisierung von C3 während der Aktivierung des Komplementsystems. Die in der Arbeit verwendeten anti-C3 Antikörper detektieren jeweils spezifische C3-Fragmente. Der anti-C3b α Antikörper (blau, Progen) bindet an den C-Terminus der C3 α -Kette (verwendet für Western Blots) und der anti-C3d Antikörper (orange, Ancam) erkennt spezifisch C3d in der C3 α -Kette (verwendet für Immunhistologie). (Abbildung modifiziert nach Thurman et al. 2013)²²².

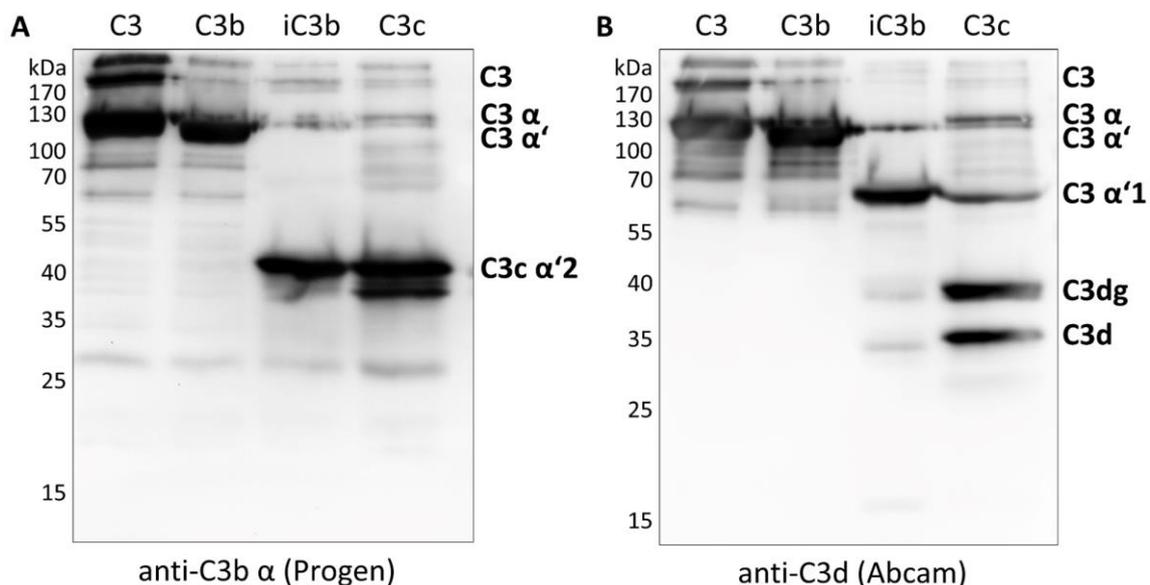


Abbildung 53: Detektion der verwendeten anti-C3 Antikörper auf natives C3 und C3-Spaltprodukte.

Es wurden je 5 μ g der nativen C3-Proteine (C3, C3b, iC3b, C3c) mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit **(A)** anti-C3b α Antikörper (Progen) oder **(B)** anti-C3d Antikörper (Abcam) im Western Blot detektiert. Die detektierbaren C3-Fragmente der spezifischen Antikörper sind im Anhang Abbildung 52 ersichtlich. **(B)** Im nativen C3c Protein detektierte der Antikörper noch Reste von C3dg (39 kDa) und C3d (34 kDa), was mit den Herstellerangaben übereinstimmt (Reinheit ca. 85 %).

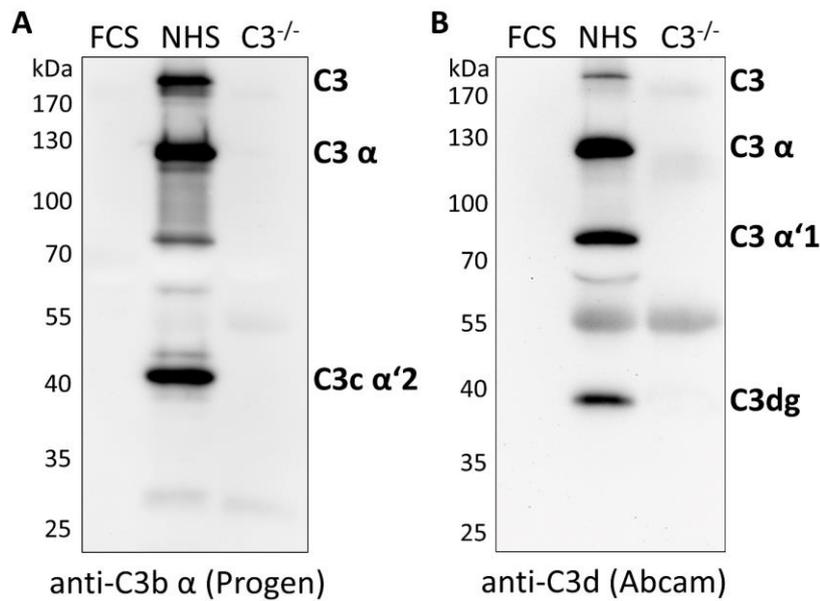


Abbildung 54: Spezifische Detektion der verwendeten anti-C3 Antikörper auf verschiedenen Seren.

Es wurden je 10 μ g bovines Serum (FCS), humanes Serum (NHS) und C3-depletiertes Serum (C3^{-/-}) mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit **(A)** anti-C3b α Antikörper (Progen) oder **(B)** anti-C3d Antikörper (Abcam) im Western Blot detektiert. Beide Antikörper reagierten spezifisch nur mit humanem Serum und ergaben kein falsch-positives Signal im FCS oder C3-depletierten Serum. Die detektierbaren C3-Fragmente der spezifischen Antikörper sind im Anhang Abbildung 52 ersichtlich.

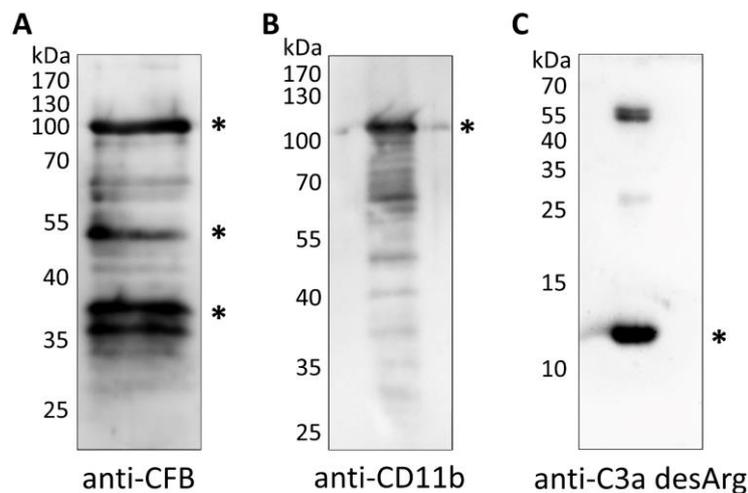


Abbildung 55: Detektion der verwendeten Antikörper von nativem humanen CFB, CD11b und C3a.

Es wurden je 5 μ g **(A)** natives CFB **(B)** nativer Komplementrezeptor 3 (CR3; Untereinheit CD11b) **(C)** natives C3a mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit den in der Arbeit verwendeten Antikörpern detektiert. **(A)** Der anti-CFB Antikörper detektierte (Sterne) intaktes CFB (95 kDa), sowie die Spaltprodukte Bb (60 kDa) und Ba (35 kDa). **(B)** CD11b wurde bei 115 kDa (Stern), zusammen mit weiteren Spaltprodukten, erkannt. **(C)** Der spezifische anti-C3a desArg Antikörper erkannte C3a im Western Blot zwischen 10 – 15 kDa (Stern).

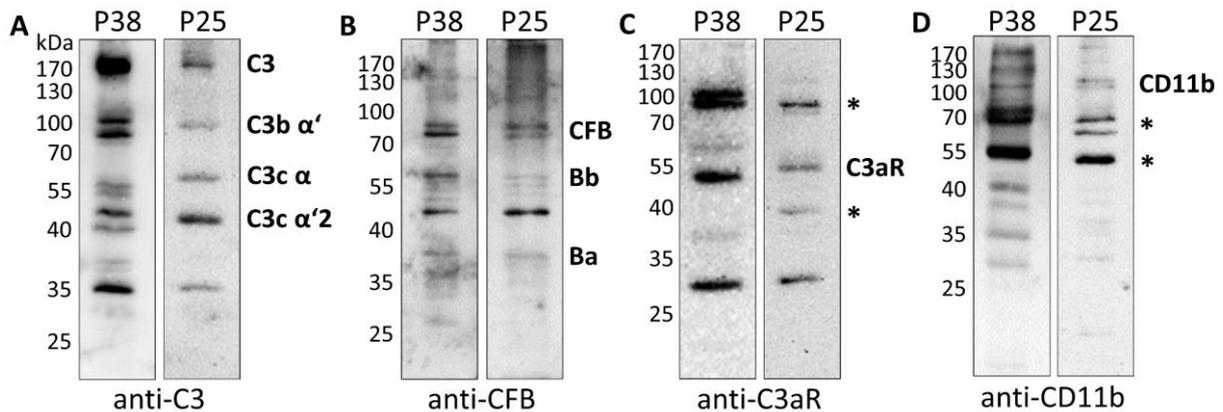


Abbildung 56: Detektion von endogenem C3, CFB, C3aR und CD11b in unbehandelten ARPE-19 Zellen verschiedener Passagen.

Zelllysate von alten (P38) und jungen ARPE-19 Zellen (P25) wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. **(A)** Der anti-C3b α' Antikörper detektierte intaktes C3 (190 kDa), C3b (101 kDa), und C3c Fragmente (61 kDa, 39 kDa), stärker exprimiert in ARPE-19 (P38) als in jungen ARPE-19 Zellen (P25). **(B)** Der anti-CFB Antikörper detektierte intaktes CFB (95 kDa), sowie die Spaltprodukte Bb (60 kDa) und Ba (35 kDa) in ARPE-19 Zellen. **(C)** C3aR (54 kDa) und C3aR Glykosylierungen (40 – 100 kDa) konnten mittels spezifischem Antikörper in alten (P38) und jungen (P25) ARPE-19 nachgewiesen werden. **(D)** Die Untereinheit CD11b (120 kDa) von Komplementrezeptor 3 (CR3) und Spaltprodukte (Sterne) konnte in alten ARPE-19 Zellen spezifisch und in jungen ARPE-19 (P25) nur schwach detektiert werden.

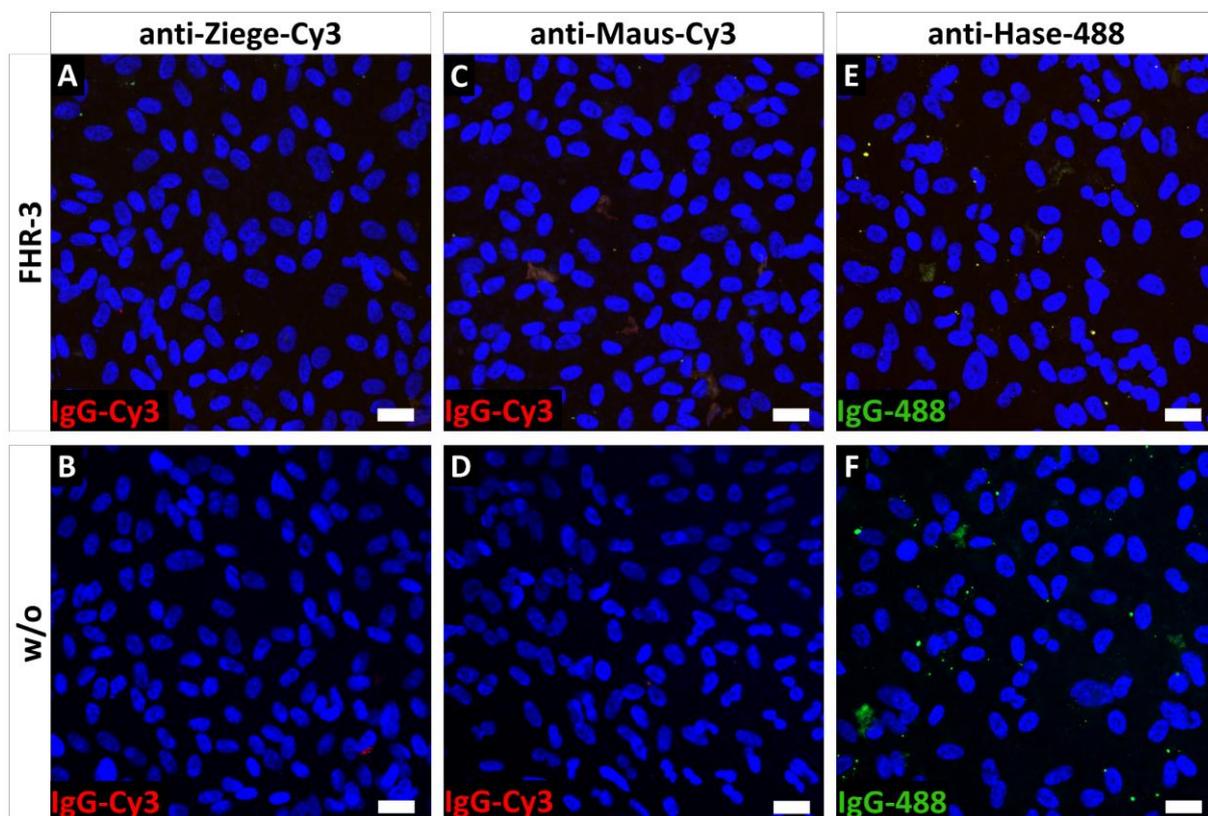


Abbildung 57: Immunhistologische Sekundär-Antikörper Kontrollen auf ARPE-19 Zellen.

Exemplarisch dargestellt sind alte ARPE-19 Zellen (P38) nach FHR-3 Behandlung (**A, C, E**), oder unbehandelt (w/o; **B, D, F**), die im Membraneinsatz fixiert wurden und mittels Spezies-spezifischen, fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern - (**A, B**) anti-Ziege IgG-Cy3 (rot), (**C, D**) anti-Maus IgG-Cy3 (rot), (**E, F**) anti-Hase IgG-Alexa Fluor 488 (grün) - immunhistologisch gefärbt wurden. Zellkerne wurden mit Hoechst visualisiert. Maßstabsbalken entspricht 40 µm.

Literaturverzeichnis

1. Buchner, H. Über die bakterientödtende Wirkung des zellenfreien Blutserums. *Cent. Bakter. Parasit.* **5**, 817–823 (1889).
2. Kolev, M., Le Friec, G. & Kemper, C. Complement - tapping into new sites and effector systems. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 811–820 (2014).
3. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* **6**, 262 (2015).
4. Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front. Immunol.* **6**, 257 (2015).
5. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* **11**, 785–97 (2010).
6. Ekdahl, K. N. *et al.* Is generation of C3(H₂O) necessary for activation of the alternative pathway in real life? *Mol. Immunol.* **114**, 353–361 (2019).
7. Jiménez-Reinoso, A., Marin, A. V. & Regueiro, J. R. Complement in basic processes of the cell. *Mol. Immunol.* **84**, 10–16 (2017).
8. Kolev, M. *et al.* Complement Regulates Nutrient Influx and Metabolic Reprogramming during Th1 Cell Responses. *Immunity* **42**, 1033–1047 (2015).
9. Liszewski, M. K. *et al.* Intracellular Complement Activation Sustains T Cell Homeostasis and Mediates Effector Differentiation. *Immunity* **39**, 1143–1157 (2013).
10. Mastellos, D. C., DeAngelis, R. A. & Lambris, J. D. Complement-triggered pathways orchestrate regenerative responses throughout phylogenesis. *Semin. Immunol.* **25**, 29–38 (2013).
11. King, B. C., Renström, E. & Blom, A. M. ---Intracellular cytosolic complement component C3 regulates cytoprotective autophagy in pancreatic beta cells by interaction with ATG16L1. *Autophagy* **15**, 919–921 (2019).
12. Trakkides, T.-O. *et al.* Oxidative Stress Increases Endogenous Complement-Dependent Inflammatory and Angiogenic Responses in Retinal Pigment Epithelial Cells Independently of Exogenous Complement Sources. *Antioxidants* **8**, 548 (2019).
13. Grosche, A. & Pauly, D. Das Komplementsystem im Auge-wer macht was? *Ophthalmol. Nachrichten* **114**, 5–6 (2016).
14. Pauly, D. *et al.* Cell type-specific complement expression from healthy and diseased retinae. *bioRxiv* 413088 (2018). doi:10.1101/413088
15. Pouw, R. B. & Kuijpers, T. (Taco W. *Setting the scale: the balance between complement factor H and its related proteins in health and disease.* ([uitgever niet vastgesteld], 2018).
16. Zipfel, P. F. & Skerka, C. Complement factor H and related proteins: an expanding family of complement-regulatory proteins? *Immunol. Today* **15**, 121–126 (1994).
17. Skerka, C., Kühn, S., Günther, K., Lingelbach, K. & Zipfel, P. F. A novel short consensus repeat-containing molecule is related to human complement factor H. *J. Biol. Chem.* **268**, 2904–8 (1993).
18. Skerka, C., Timmann, C., Horstmann, R. D. & Zipfel, P. F. Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H. Evidence for a family of factor H-related genes. *J. Immunol.* **148**, 3313–8 (1992).

19. Estaller, C., Koistinen, V., Schwaeble, W., Dierich, M. P. & Weiss, E. H. 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**, 3190–6 (1991).
20. Skerka, C., Horstmann, R. D. & Zipfel, P. F. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *J. Biol. Chem.* **266**, 12015–20 (1991).
21. Clark, S. J. *et al.* Identification of factor H-like protein 1 as the predominant complement regulator in Bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration. *J. Immunol.* **193**, 4962–70 (2014).
22. Katz, Y. & Strunk, R. C. Synthesis and regulation of complement protein factor H in human skin fibroblasts. *J. Immunol.* **141**, 559–63 (1988).
23. Rodríguez de Córdoba, S., Esparza-Gordillo, J., Goicoechea de Jorge, E., Lopez-Trascasa, M. & Sánchez-Corral, P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol. Immunol.* **41**, 355–67 (2004).
24. Oppermann, M. *et al.* The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clin. Exp. Immunol.* **144**, 342–52 (2006).
25. Makou, E., Herbert, A. P. & Barlow, P. N. Functional anatomy of complement factor H. *Biochemistry* **52**, 3949–62 (2013).
26. Józsi, M., Tortajada, A., Uzonyi, B., Goicoechea de Jorge, E. & Rodríguez de Córdoba, S. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol.* **36**, 374–384 (2015).
27. Csincsi, Á. I. *et al.* FHR-1 Binds to C-Reactive Protein and Enhances Rather than Inhibits Complement Activation. *J. Immunol.* **199**, 292–303 (2017).
28. Tortajada, A., Uzonyi, B. & Jorge, E. G. De. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. **36**, (2015).
29. Józsi, M., Schneider, A. E., Kárpáti, É. & Sándor, N. Complement factor H family proteins in their non-canonical role as modulators of cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1–10 (2018). doi:10.1016/j.semcd.2017.12.018
30. Cserhalmi, M., Papp, A., Brandus, B., Uzonyi, B. & Józsi, M. Regulation of regulators: Role of the complement factor H-related proteins. *Semin. Immunol.* 101341 (2019). doi:10.1016/j.smim.2019.101341
31. Heinen, S. *et al.* Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* **114**, 2439–47 (2009).
32. Cserhalmi, M., Papp, A., Brandus, B., Uzonyi, B. & Józsi, M. Seminars in Immunology Regulation of regulators : Role of the complement factor H-related proteins. *Semin. Immunol.* 101341 (2019). doi:10.1016/j.smim.2019.101341
33. Martínez-Barricarte, R. *et al.* Relevance of Complement Factor H-Related 1 (*CFHR1*) Genotypes in Age-Related Macular Degeneration. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **53**, 1087 (2012).
34. Abarrategui-Garrido, C., Martínez-Barricarte, R., López-Trascasa, M., de Córdoba, S. R. & Sánchez-Corral, P. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* **114**, 4261–71 (2009).
35. Tortajada, A. *et al.* Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney Int.* **92**, 953–963 (2017).
36. van Beek, A. E. *et al.* Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and

- Heterodimers, while FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma. *Front. Immunol.* **8**, 1328 (2017).
37. Goicoechea de Jorge, E. *et al.* Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 4685–90 (2013).
 38. Strobel, S. *et al.* Factor H-related protein 1 neutralizes anti-factor H autoantibodies in autoimmune hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* **80**, 397–404 (2011).
 39. Skerka, C., Chen, Q., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol. Immunol.* **56**, 170–80 (2013).
 40. Schäfer, N. *et al.* Complement Regulator FHR-3 Is Elevated either Locally or Systemically in a Selection of Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **7**, 1–16 (2016).
 41. Hellwage, J. *et al.* Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* **462**, 345–352 (1999).
 42. Pouw, R. B. *et al.* Complement Factor H-Related Protein 3 Serum Levels Are Low Compared to Factor H and Mainly Determined by Gene Copy Number Variation in CFHR3. *PLoS One* **11**, e0152164 (2016).
 43. Pouw, R. B. *et al.* High Complement Factor H-Related (FHR)-3 Levels Are Associated With the Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome-Risk Allele CFHR3*B. *Front. Immunol.* **9**, 848 (2018).
 44. Fritsche, L. G. *et al.* An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum. Mol. Genet.* **19**, 4694–704 (2010).
 45. Zipfel, P. F. *et al.* Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet.* **3**, e41 (2007).
 46. Hughes, A. E. *et al.* A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* **38**, 1173–7 (2006).
 47. Klein, R. J. *et al.* Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* **308**, 385–9 (2005).
 48. Edwards, A. O. *et al.* Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration. *Science (80-.)*. **308**, (2005).
 49. Haines, J. L. *et al.* Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration. *Science (80-.)*. **308**, (2005).
 50. Hageman, G. S. *et al.* From The Cover: A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 7227–7232 (2005).
 51. Zarepari, S. *et al.* Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* **77**, 149–53 (2005).
 52. Klein, R. & Klein, B. E. K. The Prevalence of Age-Related Eye Diseases and Visual Impairment in Aging: Current Estimates. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **54**, ORSF5 (2013).
 53. Wong, W. L. *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Heal.* **2**, e106–e116 (2014).
 54. Ferris, F. L. *et al.* Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **120**, 844–51 (2013).

55. Clark, S. J. & Bishop, P. N. The eye as a complement dysregulation hotspot. *Semin. Immunopathol.* 1–10 (2017). doi:10.1007/s00281-017-0649-6
56. Bhutto, I. & Lutty, G. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol. Aspects Med.* **33**, 295–317 (2012).
57. Ao, J., Wood, J. P., Chidlow, G., Gillies, M. C. & Casson, R. J. Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photobiomodulation as a potential therapy? *Clin. Experiment. Ophthalmol.* **46**, 670–686 (2018).
58. Shaw, P. X. *et al.* Oxidative stress, innate immunity, and age-related macular degeneration. *AIMS Mol. Sci.* **3**, 196–221 (2016).
59. Schramm, E. C. *et al.* Genetic variants in the complement system predisposing to age-related macular degeneration: A review. *Mol. Immunol.* (2014). doi:10.1016/j.molimm.2014.06.032
60. Fritsche, L. G. *et al.* A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat. Genet.* **48**, 134–143 (2016).
61. Smailhodzic, D. *et al.* Risk Alleles in CFH and ARMS2 Are Independently Associated with Systemic Complement Activation in Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **119**, 339–346 (2012).
62. Sivaprasad, S. *et al.* Estimation of Systemic Complement C3 Activity in Age-Related Macular Degeneration. *Arch. Ophthalmol.* **125**, 515 (2007).
63. Silva, A. S. *et al.* Plasma levels of complement proteins from the alternative pathway in patients with age-related macular degeneration are independent of Complement Factor H Tyr⁴⁰²His polymorphism. *Mol. Vis.* **18**, 2288–99 (2012).
64. Scholl, H. P. N. *et al.* Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One* **3**, e2593 (2008).
65. Reynolds, R. *et al.* Plasma Complement Components and Activation Fragments: Associations with Age-Related Macular Degeneration Genotypes and Phenotypes. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **50**, 5818 (2009).
66. Stanton, C. M. *et al.* Complement Factor D in Age-Related Macular Degeneration. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **52**, 8828 (2011).
67. Yehoshua, Z. *et al.* Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: the COMPLETE study. *Ophthalmology* **121**, 693–701 (2014).
68. West, E. E. & Kemper, C. Complement and T Cell Metabolism: Food for Thought. *Immunometabolism* **1**, e190006 (2019).
69. Kolev, M. & Kemper, C. Keeping It All Going—Complement Meets Metabolism. *Front. Immunol.* **8**, 1 (2017).
70. Kolev, M., Le Friec, G. & Kemper, C. The role of complement in CD4+ T cell homeostasis and effector functions. *Semin. Immunol.* **25**, 12–19 (2013).
71. Schäfer, N., Grosche, A., Schmitt, S. I., Braunger, B. M. & Pauly, D. Complement Components Showed a Time-Dependent Local Expression Pattern in Constant and Acute White Light-Induced Photoreceptor Damage. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 197 (2017).
72. Genewsky, A. *et al.* Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflugers Arch.* (2014). doi:10.1007/s00424-014-1656-2
73. Busch, C. *et al.* Anaphylatoxins Activate Ca²⁺, Akt/PI3-Kinase, and FOXO1/FoxP3 in the Retinal Pigment Epithelium. *Front. Immunol.* **8**, 703 (2017).
74. Strauss, O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol. Rev.* **85**,

- 845–881 (2005).
75. Chiba, C. The retinal pigment epithelium: An important player of retinal disorders and regeneration. *Exp. Eye Res.* **123**, 107–114 (2014).
 76. R. Sparrow, J., Hicks, D. & P. Hamel, C. The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. *Curr. Mol. Med.* **10**, 802–823 (2010).
 77. Bonilha, V. L. Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Exp. Eye Res.* **126**, 38–45 (2014).
 78. Lehmann, G. L., Benedicto, I. & Rodriguez-Boulan, E. Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: Past, present and future. *Exp. Eye Res.* **126**, 5–15 (2014).
 79. Ivanov, A. I., Parkos, C. A. & Nusrat, A. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *Am. J. Pathol.* **177**, 512–24 (2010).
 80. Baehr, W., Wu, S. M., Bird, A. C. & Palczewski, K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res.* **43**, 2957–2958 (2003).
 81. Moore, D. J. & Clover, G. M. The effect of age on the macromolecular permeability of human Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 2970–5 (2001).
 82. Clark, S. J., McHarg, S., Tilakaratna, V., Brace, N. & Bishop, P. N. Bruch's Membrane Compartmentalizes Complement Regulation in the Eye with Implications for Therapeutic Design in Age-Related Macular Degeneration. *Front. Immunol.* **8**, 1778 (2017).
 83. Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z. & Streilein, J. W. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **11**, 91–105 (2003).
 84. Anderson, D. H. *et al.* The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog. Retin. Eye Res.* **29**, 95–112 (2010).
 85. Gallenkamp, J. *et al.* A novel multiplex detection array revealed systemic complement activation in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **9**, 3001–3013 (2018).
 86. Luo, C., Zhao, J., Madden, A., Chen, M. & Xu, H. Complement expression in retinal pigment epithelial cells is modulated by activated macrophages. *Exp. Eye Res.* **112**, 93–101 (2013).
 87. Luo, C., Chen, M. & Xu, H. Complement gene expression and regulation in mouse retina and retinal pigment epithelium/choroid. *Mol. Vis.* **17**, 1588–97 (2011).
 88. Volz, C. & Pauly, D. Antibody therapies in age-related macular degeneration and challenges. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **minor revi**, (2015).
 89. Seino, J. *et al.* Activation of human complement by mouse and mouse/human chimeric monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **94**, 291–6 (1993).
 90. Stewart, W. W., Johnson, A., Stewart, M. W., Whaley, K. & Kerr, M. A. The activation of C3 and C4 in human serum by immune complexes containing mouse monoclonal antibodies of different isotype and affinity: effects on solubilisation. *Mol. Immunol.* **25**, 1355–61 (1988).
 91. Koolwijk, P., Boott, J. H. A., Griep, R. & Bast, B. J. E. G. Binding of the human complement subcomponent C1q to hybrid mouse monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **28**, 567–576 (1991).
 92. Lilienthal, G.-M. *et al.* Potential of Murine IgG1 and Human IgG4 to Inhibit the Classical Complement and Fcγ Receptor Activation Pathways. *Front. Immunol.* **9**, 958 (2018).

93. Silberstein, S., Lenz, R. & Xu, C. Therapeutic Monoclonal Antibodies: What Headache Specialists Need to Know. *Headache J. Head Face Pain* **55**, 1171–1182 (2015).
94. Harris, C. L., Pouw, R. B., Kavanagh, D., Sun, R. & Ricklin, D. Developments in anti-complement therapy; from disease to clinical trial. *Mol. Immunol.* 1–31 (2018). doi:10.1016/j.molimm.2018.06.008
95. Volz, C. & Pauly, D. Antibody therapies and their challenges in the treatment of age-related macular degeneration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **95**, 158–172 (2015).
96. Copland, D. A. *et al.* Systemic and local anti-C5 therapy reduces the disease severity in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin. Exp. Immunol.* **159**, 303–314 (2010).
97. Holz, F. G. *et al.* Efficacy and Safety of Lampalizumab for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol.* **136**, 666 (2018).
98. Fritsche, L. G. *et al.* Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming Together. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **15**, 151–171 (2014).
99. Black, J. R. M. & Clark, S. J. Age-related macular degeneration: genome-wide association studies to translation. *Genet. Med.* **18**, 283–289 (2016).
100. Chen, M. & Xu, H. Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. *J. Leukoc. Biol.* **98**, 713–725 (2015).
101. Ambati, J., Atkinson, J. P. & Gelfand, B. D. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 438–451 (2013).
102. Knickelbein, J. E., Chan, C.-C., Sen, H. N., Ferris, F. L. & Nussenblatt, R. B. Inflammatory Mechanisms of Age-related Macular Degeneration. *Int. Ophthalmol. Clin.* **55**, 63–78 (2015).
103. Russell, W. M. S. & Burch, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique: Preface.* (Methuen & Co, 1959).
104. Woo, T. H. *et al.* Identification of *Leptospira biflexa* by real-time homogeneous detection of rapid cycle PCR product. *J. Microbiol. Methods* **35**, 23–30 (1999).
105. Dyballa, N. & Metzger, S. Quantitative Methods in Proteomics. **893**, 47–59 (2012).
106. Thomas, A. *et al.* Changes in the hepatic mitochondrial and membrane proteome in mice fed a non-alcoholic steatohepatitis inducing diet. *J. Proteomics* **80**, 107–22 (2013).
107. Harlow, E. & Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual.* (CSHL Press, 1988).
108. Hageman, G. S. *et al.* Extended haplotypes in the complement factor H (CFH) and CFH-related (CFHR) family of genes protect against age-related macular degeneration: Characterization, ethnic distribution and evolutionary implications. *Ann. Med.* **38**, 592–604 (2006).
109. Spencer, K. L. *et al.* Deletion of CFHR3 and CFHR1 genes in age-related macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 971–7 (2008).
110. Buhlmann, D. *et al.* FHR3 Blocks C3d-Mediated Coactivation of Human B Cells. *J. Immunol.* (2016). doi:10.4049/jimmunol.1600053
111. Caesar, J. J. E. *et al.* Competition between antagonistic complement factors for a single protein on *N. meningitidis* rules disease susceptibility. *Elife* **3**, (2014).
112. Jokiranta, T. S., Hellwage, J., Koistinen, V., Zipfel, P. F. & Meri, S. Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J. Biol. Chem.* **275**, 27657–62 (2000).
113. Pujol-Lereis, L. M., Schäfer, N., Kuhn, L. B., Rohrer, B. & Pauly, D. Interrelation Between Oxidative Stress and Complement Activation in Models of Age-Related Macular Degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **854**, 87–93 (2016).

114. Weismann, D. *et al.* Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* **478**, 76–81 (2011).
115. Hyvärinen, S., Uchida, K., Varjosalo, M., Jokela, R. & Jokiranta, T. S. Recognition of Malondialdehyde-modified Proteins by the C Terminus of Complement Factor H Is Mediated via the Polyanion Binding Site and Impaired by Mutations Found in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Biol. Chem.* **289**, 4295–4306 (2014).
116. Shaw, P. X. *et al.* Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 13757–13762 (2012).
117. Schutt, F., Bergmann, M., Holz, F. G. & Kopitz, J. Proteins Modified by Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, or Advanced Glycation End Products in Lipofuscin of Human Retinal Pigment Epithelium. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **44**, 3663 (2003).
118. Raychaudhuri, S. *et al.* Associations of CFHR1-CFHR3 deletion and a CFH SNP to age-related macular degeneration are not independent. *Nat. Genet.* **42**, 553–5; author reply 555-6 (2010).
119. Klein, S. L., Jedlicka, A. & Pekosz, A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 338–349 (2010).
120. Flanagan, K. L. *et al.* Sex differences in the vaccine-specific and non-targeted effects of vaccines. *Vaccine* **29**, 2349–2354 (2011).
121. Parham, P. On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice. *J. Immunol.* **131**, 2895–902 (1983).
122. Diebolder, C. A. *et al.* Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* **343**, 1260–3 (2014).
123. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Divergent Immunoglobulin G Subclass Activity Through Selective Fc Receptor Binding. *Science (80-.).* **310**, 1510–1512 (2005).
124. Strauß, O. Pharmacology of the retinal pigment epithelium, the interface between retina and body system. *Eur. J. Pharmacol.* **787**, 84–93 (2016).
125. Fuhrmann, S., Zou, C. & Levine, E. M. Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis. *Exp. Eye Res.* **123**, 141–150 (2014).
126. Dunn, K. C., Aotaki-Keen, A. E., Putkey, F. R. & Hjelmeland, L. M. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp. Eye Res.* **62**, 155–69 (1996).
127. Ablonczy, Z. *et al.* Human Retinal Pigment Epithelium Cells as Functional Models for the RPE In Vivo. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **52**, 8614 (2011).
128. Ahmado, A. *et al.* Induction of Differentiation by Pyruvate and DMEM in the Human Retinal Pigment Epithelium Cell Line ARPE-19. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 7148–7159 (2011).
129. Hu, J. & Bok, D. A cell culture medium that supports the differentiation of human retinal pigment epithelium into functionally polarized monolayers. *Mol. Vis.* **7**, 14–9 (2001).
130. Samuel, W. *et al.* Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells. *Mol. Vis.* **23**, 60–89 (2017).
131. Luo, Y., Zhuo, Y., Fukuhara, M. & Rizzolo, L. J. Effects of Culture Conditions on Heterogeneity and the Apical Junctional Complex of the ARPE-19 Cell Line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 3644–3655 (2006).
132. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–8 (2009).
133. Grisanti, S. & Guidry, C. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells

- from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 391–405 (1995).
134. Rizzolo, L. J. Barrier properties of cultured retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* **126**, 16–26 (2014).
 135. Ivanov, A. I., McCall, I. C., Parkos, C. A. & Nusrat, A. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2639–51 (2004).
 136. Pelaseyed, T. & Bretscher, A. Regulation of actin-based apical structures on epithelial cells. *J. Cell Sci.* **131**, jcs221853 (2018).
 137. Thurman, J. M. *et al.* Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury. *J. Biol. Chem.* **284**, 16939–47 (2009).
 138. Ablonczy, Z. & Crosson, C. E. VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp. Eye Res.* **85**, 762–771 (2007).
 139. Scholl, H. P. N. *et al.* CFH, C3 and ARMS2 are significant risk loci for susceptibility but not for disease progression of geographic atrophy due to AMD. *PLoS One* **4**, e7418 (2009).
 140. Martin, M. *et al.* Factor H uptake regulates intracellular C3 activation during apoptosis and decreases the inflammatory potential of nucleosomes. *Cell Death Differ.* **23**, 903–911 (2016).
 141. Irmischer, S. *et al.* Serum FHR1 binding to necrotic-type cells activates monocytic inflammasome and marks necrotic sites in vasculopathies. *Nat. Commun.* **10**, 2961 (2019).
 142. Shen, L. & Turner, J. R. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3919–36 (2005).
 143. Odenwald, M. A. *et al.* ZO-1 interactions with F-actin and occludin direct epithelial polarization and single lumen specification in 3D culture. *J. Cell Sci.* **130**, 243–259 (2017).
 144. Mizuno, M., Blanchin, S., Gasque, P., Nishikawa, K. & Matsuo, S. High Levels of Complement C3a Receptor in the Glomeruli in Lupus Nephritis. *Am. J. Kidney Dis.* **49**, 598–606 (2007).
 145. Tseng, W. A. *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation in Retinal Pigment Epithelial Cells by Lysosomal Destabilization: Implications for Age-Related Macular Degeneration. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **54**, 110 (2013).
 146. Gao, J. *et al.* NLRP3 inflammasome: activation and regulation in age-related macular degeneration. *Mediators Inflamm.* **2015**, 690243 (2015).
 147. Rathinam, V. A. K., Vanaja, S. K. & Fitzgerald, K. A. Regulation of inflammasome signaling. *Nat. Immunol.* **13**, 333–342 (2012).
 148. Brandstetter, C., Patt, J., Holz, F. G. & Krohne, T. U. Inflammasome priming increases retinal pigment epithelial cell susceptibility to lipofuscin phototoxicity by changing the cell death mechanism from apoptosis to pyroptosis. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **161**, 177–183 (2016).
 149. Hess, C. & Kemper, C. Complement-Mediated Regulation of Metabolism and Basic Cellular Processes. *Immunity* **45**, 240–254 (2016).
 150. Brandstetter, C., Holz, F. G. & Krohne, T. U. Complement Component C5a Primes Retinal Pigment Epithelial Cells for Inflammasome Activation by Lipofuscin-mediated Photooxidative Damage. *J. Biol. Chem.* **290**, 31189–98 (2015).
 151. Le Friec, G., Köhl, J. & Kemper, C. A complement a day keeps the Fox(p3) away. *Nat. Immunol.* **14**, 110–112 (2013).
 152. Himmel, M. E. *et al.* Human CD4+FOXP3+ regulatory T cells produce CXCL8

- and recruit neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **41**, 306–312 (2011).
153. Kumar, M. V., Nagineni, C. N., Chin, M. S., Hooks, J. J. & Detrick, B. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J. Neuroimmunol.* **153**, 7–15 (2004).
 154. Patel, A. K. & Hackam, A. S. Toll-like receptor 3 (TLR3) protects retinal pigmented epithelium (RPE) cells from oxidative stress through a STAT3-dependent mechanism. *Mol. Immunol.* **54**, 122–31 (2013).
 155. Yang, Z. *et al.* Toll-like Receptor 3 and Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1456–1463 (2008).
 156. Liu, Z. *et al.* Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway in RPE alters the expression of inflammation related genes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **801**, 237–50 (2014).
 157. Fernandez-Godino, R. & Pierce, E. A. C3a triggers formation of sub-retinal pigment epithelium deposits via the ubiquitin proteasome pathway. *Sci. Rep.* **8**, 9679 (2018).
 158. Ramos de Carvalho, J. E. *et al.* Complement Factor C3a Alters Proteasome Function in Human RPE Cells and in an Animal Model of Age-Related RPE Degeneration. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **54**, 6489 (2013).
 159. Cai, H. & Del Priore, L. V. Gene expression profile of cultured adult compared to immortalized human RPE. *Mol. Vis.* **12**, 1–14 (2006).
 160. Tian, J. *et al.* The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions. *Br. J. Ophthalmol.* **89**, 1510–1517 (2005).
 161. Aruta, C. *et al.* In vitro differentiation of retinal pigment epithelium from adult retinal stem cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* **24**, 233–240 (2011).
 162. Kigasawa, K., Soushi, S., Tanaka, Y. & Obazawa, H. Morphologic and chromosomal study of a human retinal pigment epithelial cell line. *Jpn. J. Ophthalmol.* **38**, 10–5 (1994).
 163. Rambhatla, L., Chiu, C.-P., Glickman, R. D. & Rowe-Rendleman, C. In vitro differentiation capacity of telomerase immortalized human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1622–30 (2002).
 164. Blenkinsop, T. A., Salero, E., Stern, J. H. & Temple, S. The Culture and Maintenance of Functional Retinal Pigment Epithelial Monolayers from Adult Human Eye. 45–65 (2012). doi:10.1007/978-1-62703-125-7_4
 165. Kannan, R., Sreekumar, P. G. & Hinton, D. R. VEGF and PEDF secretion in ARPE-19 and fhRPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 9047 (2011).
 166. Sonoda, S. *et al.* A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat. Protoc.* **4**, 662–673 (2009).
 167. Brandl, C. Generation of Functional Retinal Pigment Epithelium from Human Induced Pluripotent Stem Cells. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1834**, 87–94 (2019).
 168. Brandl, C. *et al.* In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). *Neuromolecular Med.* **16**, 551–64 (2014).
 169. Zhu, Y. *et al.* Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS One* **8**, e54552 (2013).
 170. Parvini, M. *et al.* Human Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium in Retinal Treatment: from Bench to Bedside. *Mol. Neurobiol.* **50**, 597–612 (2014).
 171. Buchholz, D. E. *et al.* Derivation of Functional Retinal Pigmented Epithelium from

- Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells* **27**, 2427–2434 (2009).
172. Hirami, Y. *et al.* Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci. Lett.* **458**, 126–131 (2009).
173. Takahashi, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
174. Takahashi, K. & Yamanaka, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 183–193 (2016).
175. Schwartz, S. D. *et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* **379**, 713–720 (2012).
176. Alge, C. S. *et al.* Comparative Proteome Analysis of Native Differentiated and Cultured Dedifferentiated Human RPE Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **44**, 3629 (2003).
177. Alge, C. S., Hauck, S. M., Priglinger, S. G., Kampik, A. & Ueffing, M. Differential Protein Profiling of Primary versus Immortalized Human RPE Cells Identifies Expression Patterns Associated with Cytoskeletal Remodeling and Cell Survival. *J. Proteome Res.* **5**, 862–878 (2006).
178. Ohlmann, A., Scholz, M., Koch, M. & Tamm, E. R. Epithelial-mesenchymal transition of the retinal pigment epithelium causes choriocapillaris atrophy. *Histochem. Cell Biol.* **146**, 769–780 (2016).
179. Radeke, M. J. *et al.* Restoration of mesenchymal retinal pigmented epithelial cells by TGF β pathway inhibitors: implications for age-related macular degeneration. *Genome Med.* **7**, 58 (2015).
180. Guidry, C., Medeiros, N. E. & Curcio, C. A. Phenotypic variation of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 267–73 (2002).
181. Ghosh, S. *et al.* A Role for β A3/A1-Crystallin in Type 2 EMT of RPE Cells Occurring in Dry Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59**, AMD104–AMD113 (2018).
182. Sarks, J. P., Sarks, S. H. & Killingsworth, M. C. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye* **2**, 552–577 (1988).
183. Zanzottera, E. C., Messinger, J. D., Ach, T., Smith, R. T. & Curcio, C. A. Subducted and Melanotic Cells in Advanced Age-Related Macular Degeneration Are Derived From Retinal Pigment Epithelium. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **56**, 3269 (2015).
184. Yu, D.-Y. & Cringle, S. J. Oxygen Distribution and Consumption within the Retina in Vascularised and Avascular Retinas and in Animal Models of Retinal Disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **20**, 175–208 (2001).
185. Nita, M. & Grzybowski, A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–23 (2016).
186. Yamada, Y. *et al.* Oxidized low density lipoproteins induce a pathologic response by retinal pigmented epithelial cells. *J. Neurochem.* **105**, 1187–1197 (2008).
187. Hollyfield, J. G. *et al.* Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat. Med.* **14**, 194–8 (2008).
188. Gu, X. *et al.* Carboxyethylpyrrole Protein Adducts and Autoantibodies, Biomarkers for Age-related Macular Degeneration. *J. Biol. Chem.* **278**, 42027–42035 (2003).
189. Lu, L. *et al.* Synthesis and structural characterization of carboxyethylpyrrole-modified proteins: mediators of age-related macular degeneration. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 7548–61 (2009).

190. Ye, F. *et al.* Malondialdehyde induces autophagy dysfunction and VEGF secretion in the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Free Radic. Biol. Med.* **94**, 121–134 (2016).
191. Borrás, C. *et al.* CFH exerts anti-oxidant effects on retinal pigment epithelial cells independently from protecting against membrane attack complex. *Sci. Rep.* **9**, 13873 (2019).
192. Jokiranta, T. S. Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J. Biol. Chem.* (2000). doi:10.1074/jbc.M002903200
193. Rudnick, R. B. *et al.* FHR5 Binds to Laminins, Uses Separate C3b and Surface-Binding Sites, and Activates Complement on Malondialdehyde-Acetaldehyde Surfaces. *J. Immunol.* **200**, 2280–2290 (2018).
194. Kunchithapautham, K., Atkinson, C. & Rohrer, B. Smoke exposure causes endoplasmic reticulum stress and lipid accumulation in retinal pigment epithelium through oxidative stress and complement activation. *J. Biol. Chem.* **289**, 14534–46 (2014).
195. Cho, M. S. *et al.* Complement Component 3 Is Regulated by TWIST1 and Mediates Epithelial–Mesenchymal Transition. *J. Immunol.* **196**, 1412–1418 (2016).
196. Yang, J. *et al.* Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell* **117**, 927–939 (2004).
197. Asgari, E. *et al.* C3a modulates IL-1 β secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood* **122**, 3473–3482 (2013).
198. Brandstetter, C., Mohr, L. K. M., Latz, E., Holz, F. G. & Krohne, T. U. Light induces NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via lipofuscin-mediated photooxidative damage. *J. Mol. Med. (Berl.)* **93**, 905–16 (2015).
199. Doyle, S. L. *et al.* NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components. *Nat. Med.* **18**, 791–798 (2012).
200. Jonas, J. B., Tao, Y., Neumaier, M. & Findeisen, P. Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* **90**, e381–e388 (2012).
201. Fernandez-Godino, R., Garland, D. L. & Pierce, E. A. A local complement response by RPE causes early-stage macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 5555–5569 (2015).
202. Qin, T. & Gao, S. Inhibition of Proteasome Activity Upregulates IL-6 Expression in RPE Cells through the Activation of P38 MAPKs. *J. Ophthalmol.* **2018**, 5392432 (2018).
203. Wagner, C. *et al.* The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: activation-dependent up-regulation and regulatory function. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1173–80 (2001).
204. Vorup-Jensen, T. & Jensen, R. K. Structural Immunology of Complement Receptors 3 and 4. *Front. Immunol.* **9**, 2716 (2018).
205. Bian, Z.-M., Field, M. G., Elnér, S. G., Kahlenberg, J. M. & Elnér, V. M. Distinct CD40L receptors mediate inflammasome activation and secretion of IL-1 β and MCP-1 in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **170**, 29–39 (2018).
206. Losse, J., Zipfel, P. F. & Józsi, M. Factor H and factor H-related protein 1 bind to human neutrophils via complement receptor 3, mediate attachment to *Candida albicans*, and enhance neutrophil antimicrobial activity. *J. Immunol.* **184**, 912–21

- (2010).
207. Mayadas, T. N. & Cullere, X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.* **26**, 388–95 (2005).
 208. Avery, V. M. & Gordon, D. L. Characterization of factor H binding to human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* **151**, 5545–53 (1993).
 209. DiScipio, R. G., Daffern, P. J., Schraufstatter, I. U. & Sriramarao, P. Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* **137**, 15–27 (1998).
 210. Jaumouillé, V., Cartagena-Rivera, A. X. & Waterman, C. M. Coupling of β 2 integrins to actin by a mechanosensitive molecular clutch drives complement receptor-mediated phagocytosis. *Nat. Cell Biol.* **21**, 1357–1369 (2019).
 211. Jannuzzi, G. P. *et al.* TLR3 Is a Negative Regulator of Immune Responses Against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 426 (2019).
 212. Kremlitzka, M., Mácsik-Valent, B. & Erdei, A. Regulation of B cell functions by Toll-like receptors and complement. *Immunol. Lett.* **178**, 37–44 (2016).
 213. Zhang, X. *et al.* The Proteasome: A Target of Oxidative Damage in Cultured Human Retina Pigment Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **49**, 3622 (2008).
 214. KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
 215. Kearney, J. F., Radbruch, a, Liesegang, B. & Rajewsky, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* **123**, 1548–1550 (1979).
 216. Yelton, D. E., Margulies, D. H., Diamond, B. & Scharff, M. D. Plasmacytomas and Hybridomas. in *Monoclonal Antibodies* 3–17 (Springer US, 1980). doi:10.1007/978-1-4615-7505-4_1
 217. Kessler, N., Aymard, M. & Bertrand, S. Stability of a murine hybridoma is dependent on the clonal line and culture media. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim. J. Soc. Vitr. Biol.* **29**, 203–207 (1993).
 218. Lee, G. M. & Palsson, B. O. Immobilization can improve the stability of hybridoma antibody productivity in serum-free media. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1049–1055 (1990).
 219. Frame, K. K. & Hu, W.-S. The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 469–476 (1990).
 220. Weber, B. H. F. *et al.* The role of the complement system in age-related macular degeneration. *Dtsch. Arztebl. Int.* **111**, 133–8 (2014).
 221. Morohoshi, K., Goodwin, A. M., Ohbayashi, M. & Ono, S. J. Autoimmunity in retinal degeneration: Autoimmune retinopathy and age-related macular degeneration. *J. Autoimmun.* **33**, 247–254 (2009).
 222. Thurman, J. M. *et al.* Detection of complement activation using monoclonal antibodies against C3d. *J. Clin. Invest.* **123**, 2218–2230 (2013).

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| μ | Mikro |
| °C | Grad Celsius |
| A | Ampere |
| AH | Azaserine/Hypoxanthine |
| Ak | Antikörper |
| AMD | Altersbedingte Makuladegeneration |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ |
| AS | Aminosäure |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| ca. | circa |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CDR | Complementarity determining region |
| CEP | ω-carboxyethyl)pyrrole |
| C _H | konstante Domäne der schweren Kette von IgG |
| C _L | konstante Domäne der leichten Kette von IgG |
| CNV | choroidale Neovaskularisation |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid) |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| ECM | Extrazellulärmatrix |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| et al. | und andere |
| Fab | Antigen-bindendes Fragment (engl.: fragment antigen binding) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------------------|---|
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FCA | Freund's complete adjuvant |
| FCS | Fötales Kälberserum (engl. fetal calf serum) |
| FH | Faktor H |
| FHR (1 – 5) | Faktor H-verwandte Proteine (1 – 5) |
| FP | Faktor P (Properdin) |
| FIA | Freund's incomplete adjuvant |
| fw | Forward |
| g | Gramm |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| h | Stunde |
| HAT | Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O _{dest} | Destilliertes Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| Hc | schwere Kette von IgG |
| HCl | Salzsäure |
| HRP | Meerrettichperoxidase (engl. Horse radish peroxidase) |
| IgG | Immunoglobulin G |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| IL-18 | Interleukin 18 |
| IS | Immunisierung |
| i.p. | intraperitoneal |
| k | Kilo |
| Kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| KLH | Keyhole Limpet Hemocyanin |
| l | Liter |
| LB | lysogeny broth |
| Lc | leichte Kette von IgG |
| mA | Milliampere |
| MAA | Malondialdehyd-Acetaldehyd |
| MAC | Membran-attackierenden Komplex |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MDA | Malondialdehyd |
| MgSO ₄ | Magnesiumsulfat |
| MNS | Mausserum |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| MM | Mastermix |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| n | Nano |
| N | Normalität (= Äquivalenzkonzentration) |
| Na | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NLRP3 | <i>nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing pyrin receptor 3</i> |
| OD | Optische Dichte |
| P | Passage |
| pAk | polyklonaler Antikörper |
| PAGE | Polyacrylamidgel Elektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PNH | paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie |
| POD | Peroxidase |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| rcf | relative centrifugal force (relative Zentrifugalkraft) |
| RETC | RE gensburg T herapy C omplement ⁴⁰ , RE tina T herapy C omplement |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| rv | Reverse |
| s | Sekunde |
| SA-POD | Streptavidin-Peroxidase |

| | |
|----------------|--|
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SNP | Einzelnukleotidpolymorphismus |
| spez. | spezifisch |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TGF- β | <i>transforming growth factor β</i> |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| T _m | Schmelztemperatur |
| U | Unit(s) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| u. a. | unter anderem |
| ü. N. | über Nacht |
| V | Volt |
| V _H | variable Domäne der schweren Kette von IgG |
| V _L | variable Domäne der leichten Kette von IgG |
| v. a. | vor allem |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| W | Watt |
| WB | Western Blot |
| WT | Wildtyp |
| z. B. | zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aktivierungswege des Komplementsystems. | 3 |
| Abbildung 2: Schema der humanen FH-Proteinfamilie. | 4 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gewebe des humanen Auges und den beiden AMD-Formen. | 7 |
| Abbildung 4: Aufbau und Struktur des retinalen Pigmentepithels (RPE). | 10 |
| Abbildung 5: Immunogenitätspotenzial therapeutischer monoklonaler Antikörper.... | 11 |
| Abbildung 6: Vektorkonstrukte zur Chimärisierung von RETC-2. | 40 |
| Abbildung 7: Maus-Immunisierungsschema zur Herstellung spezifischer FHR-1 mAk. | 54 |
| Abbildung 8: Der monoklonale Antikörper RETC-2 detektierte spezifisch rekombinantes humanes FHR-3. | 56 |
| Abbildung 9: RETC-2 detektiert spezifisch natives FHR-3 zusammen mit anderen Komplementproteinen aus humanem Serum. | 57 |
| Abbildung 10: RETC-2 detektierte im spezifischen Immunoassay signifikant erhöhte FHR-3 Serum-Konzentrationen von SLE, RA und PR Patienten. | 59 |
| Abbildung 11: FHR-3 ist in der humanen Retina in aktivierten Mikroglia/Makrophagen lokalisiert. | 61 |
| Abbildung 12: Anti-FHR-3 Antikörper RETC-2 inhibiert die Bindung von FHR-3 an C3b, verringerte die konkurrierende Bindung von FHR-3 und FH an C3b und steigerte die FH-C3b-Komplementhomöostase. | 63 |
| Abbildung 13: RETC-2 inhibiert die Bindung von FHR-3 an oxidative Stressepitope (OSEs), verringerte die konkurrierende Bindung von FHR-3 und FH an diese OSEs und steigerte die FH-OSE-Komplementhomöostase. | 65 |
| Abbildung 14: Nachweis auf spezifische Bindung der hergestellten anti-FHR-1 mAk. | 69 |
| Abbildung 15: Der hergestellte anti-FHR-1 mAk 472 präzipitiert spezifisch FHR-1 aus humanem Serum. | 70 |
| Abbildung 16: <i>In silico</i> Strukturanalysen verdeutlichen die Antigenbinderegionen der generierten chimären Antikörper RETC-2-ximab und Kontroll-IgG-ximab. | 71 |
| Abbildung 17: RETC-2-ximab interagiert spezifisch mit FHR-3. | 72 |
| Abbildung 18: Langzeitkultivierung von ARPE-19 Zellen unterschiedlicher Passagen und Kultur-Medien. | 74 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 19: Das <i>tight junction</i> Protein ZO-1 wurde schwächer detektiert in alternden ARPE-19 Zellen im Vergleich zu jungen ARPE-19 Zellen. | 76 |
| Abbildung 20: Die mRNA Expression von mesenchymalen Markern ist erhöht in alternden ARPE-19 Zellen (P38) im Vergleich zu jungen ARPE-19 Zellen (P25)..... | 77 |
| Abbildung 21: FHR-3 wird von ARPE-19 Zellen internalisiert. | 79 |
| Abbildung 22: Die mRNA Expression von mesenchymalen Markern ist nach FHR-3 Behandlung gegensätzlich reguliert in alternden ARPE-19 Zellen (P38) im Vergleich zu jungen ARPE-19 Zellen (P25)..... | 80 |
| Abbildung 23: C3 mRNA Expressionssteigerung in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen..... | 81 |
| Abbildung 24: Zell-assoziiertes C3 und C3b sind erhöht und C3-Degradationsprodukt C3c ist erniedrigt in FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen. | 82 |
| Abbildung 25: Zell-assoziiertes C3 und C3b sind zeitabhängig erhöht und C3-Degradationsprodukt C3c ist erniedrigt in FHR-3-behandelten jungen ARPE-19 Zellen. | 82 |
| Abbildung 26: Erhöhte C3 und C3a Expression in Immunfärbungen von FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen. | 83 |
| Abbildung 27: FHR-3 induzierte eine erhöhte C3 Sekretion in alternden ARPE-19 Zellen..... | 84 |
| Abbildung 28: <i>CFB</i> mRNA Expressionsanstieg in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen..... | 85 |
| Abbildung 29: Zell-assoziiertes <i>CFB</i> ist zeitabhängig erhöht in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen unterschiedlicher Passagen. | 86 |
| Abbildung 30: Erhöhte <i>CFB</i> Expression in Immunfärbungen von FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen und Co-Lokalisierung mit Aktin-Filamenten..... | 87 |
| Abbildung 31: FHR-3 induzierte eine erhöhte <i>CFB</i> Sekretion in alternden ARPE-19 Zellen..... | 88 |
| Abbildung 32: <i>C3AR</i> mRNA Expressionsänderung in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen..... | 89 |
| Abbildung 33: Zell-assoziiertes <i>C3aR</i> ist zeitabhängig vermindert exprimiert in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen unterschiedlicher Passagen. | 90 |
| Abbildung 34: Veränderte <i>C3aR</i> Expression in Immunfärbungen von FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen unterschiedlicher Passagen. | 91 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 35: <i>CD11B</i> mRNA Expressionsanstieg in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen..... | 92 |
| Abbildung 36: Zell-assoziiertes CD11b ist zeitabhängig erhöht in FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen. | 93 |
| Abbildung 37: Zeitabhängiger Anstieg der CD11b Expression in Immunfärbungen von FHR-3-behandelten alten ARPE-19 Zellen..... | 93 |
| Abbildung 38: Zeitabhängige <i>NLRP3</i> mRNA Expressionsänderung in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen. | 95 |
| Abbildung 39: mRNA Expressionsänderung von <i>pro-IL1B</i> und <i>pro-IL18</i> in FHR-3-behandelten ARPE-19..... | 96 |
| Abbildung 40: FHR-3 induzierte die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in alternden ARPE-19 Zellen. | 96 |
| Abbildung 41: Verringerte <i>FOXP3</i> mRNA Expression in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen..... | 97 |
| Abbildung 42: Verringerte <i>TLR</i> mRNA Expression in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen..... | 98 |
| Abbildung 43: Die mRNA von Proteasom-Markern ist zeitabhängig herunterreguliert in FHR-3-behandelten ARPE-19 Zellen. | 99 |
| Abbildung 44: Schematische Zusammenfassung zum immunmodulatorischen Einfluss von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen..... | 100 |
| Abbildung 45: RETC-2-ximab mildert den Effekt von FHR-3 auf ARPE-19 Zellen. | 101 |
| Abbildung 46: Erhöhte <i>C3</i> und <i>CFB</i> mRNA Expression in FHR-3-behandelten pRPE und iPS-RPE Zellen..... | 103 |
| Abbildung 47: Verminderte <i>C3AR</i> und erhöhte <i>CD11B</i> mRNA Expression in FHR-3-behandelten pRPE und iPS-RPE Zellen..... | 103 |
| Abbildung 48: FH ist in der humanen Retina in Müllerzellen und Photorezeptor-Segmenten lokalisiert. | 123 |
| Abbildung 49: Putative Rolle von FHR-3 bei retinaler Degeneration und das therapeutische Potenzial des anti-FHR-3 Antikörpers RETC-2. | 124 |
| Abbildung 50: FHR-3 wird apikal von ARPE-19 Zellen aufgenommen im Gegensatz zu Properdin..... | 127 |
| Abbildung 51: Übersicht der untersuchten Gene in ARPE-19 Zellen und der Einfluss von FHR-3 auf deren Expression. | 128 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 52: C3-Fragmentierung während der Aktivierung des Komplementsystems inklusive Binderegionen der spezifischen monoklonalen anti-C3 Antikörper..... | 129 |
| Abbildung 53: Detektion der verwendeten anti-C3 Antikörper auf natives C3 und C3-Spaltprodukte. | 129 |
| Abbildung 54: Spezifische Detektion der verwendeten anti-C3 Antikörper auf verschiedene Seren..... | 130 |
| Abbildung 55: Detektion der verwendeten Antikörper von nativem humanen CFB, CD11b und C3a..... | 130 |
| Abbildung 56: Detektion von endogenem C3, CFB, C3aR und CD11b in unbehandelten ARPE-19 Zellen verschiedener Passagen..... | 131 |
| Abbildung 57: Immunhistologische Sekundär-Antikörper Kontrollen auf ARPE-19 Zellen..... | 131 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete <i>E. coli</i> Stämme..... | 14 |
| Tabelle 2: Verwendete eukaryotische Zellen..... | 14 |
| Tabelle 3: Verwendete Mausstämmе..... | 15 |
| Tabelle 4: Eigens hergestellte Primer für PCR und Sequenzierungen (Metabion, Planegg, Deutschland)..... | 15 |
| Tabelle 5: Kommerzielle Primer für qRT-PCR (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden, Deutschland)..... | 17 |
| Tabelle 6: Eigens hergestellte Primer für qRT-PCR (Metabion, Planegg, Deutschland)..... | 18 |
| Tabelle 7: Verwendete Plasmide..... | 19 |
| Tabelle 8: Verwendete Proteine..... | 21 |
| Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper..... | 22 |
| Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper..... | 25 |
| Tabelle 11: Verwendete Enzyme und Substrate..... | 26 |
| Tabelle 12: Verwendete magnetische Beads..... | 26 |
| Tabelle 13: Verwendete Molekularmassen-Standards..... | 27 |
| Tabelle 14: Verwendete Kit-Systeme..... | 27 |
| Tabelle 15: Verwendete Chemikalien..... | 27 |
| Tabelle 16: Eigens hergestellte Puffer und Lösungen..... | 31 |
| Tabelle 17: Eigens hergestellte Bakterien-Nährmedien..... | 33 |
| Tabelle 18: Kommerzielle Kulturmedien für eukaryotische Zellen..... | 34 |
| Tabelle 19: Eigens hergestellte Kulturmedien für eukaryotische Zellen..... | 34 |
| Tabelle 20: Verwendete Geräte und Materialien..... | 35 |
| Tabelle 21: Software..... | 37 |
| Tabelle 22: Restriktionsansätze für die Klonierung der schweren und leichten Antikörperketten..... | 41 |
| Tabelle 23: <i>Tailing</i> -Ansatz zur Klonierung der cDNA-Konstrukte in pGEM-T..... | 41 |
| Tabelle 24: Ligationsansatz der cDNA-Sequenzen der Antikörperkonstrukte in pGEM-T..... | 42 |
| Tabelle 25: Ligationsansatz der cDNA-Sequenzen der Antikörperkonstrukte in pFUSE..... | 42 |
| Tabelle 26: PCR-Ansatz zur Vervielfältigung der spezifischen variablen cDNA-Konstrukte aus pGEM-T..... | 43 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 27: PCR-Programm zur Amplifikation der cDNA-Antikörperkonstrukte..... | 43 |
| Tabelle 28: Zusammensetzung Sammelgel und Trenngel, für zwei Mini-Gele..... | 47 |
| Tabelle 29: Immunisierungsschema zur Herstellung eines spezifischen monoklonalen anti-FHR-1 Antikörpers..... | 125 |
| Tabelle 30: Zusammenfassung der Charakterisierung der hergestellten mAk gegen FHR-1..... | 127 |
| Tabelle 31: Genotypisierung aller verwendeten RPE Zellen auf AMD-assoziierte Komplement-SNPs..... | 128 |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Frau **Dr. Diana Pauly**, die mir die Möglichkeit gegeben hat die Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich danke dir für so vieles: Danke für deine unermüdliche Unterstützung, für die intensiven und hilfreichen Diskussionen. Danke für die Teilnahme an den internationalen Kongressen, v. a. für die unvergesslichen Momente, und die spannende und lehrreiche Zeit. Und vor allem danke ich dir für dein Vertrauen und für deine Freundschaft!

Bei Herrn **Prof. Herbert Jäggle** bedanke ich mich ganz herzlich für die Betreuung der Doktorarbeit sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

Ich bedanke mich bei Herrn **Prof. Martin Fleck** für die Übernahme der Mentorenschaft während meiner Doktorarbeit, und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt auch Frau **Prof. Katja Hanack**, die mich als weitere Mentorin durch die Doktorarbeit begleitet hat und mir hilfreiche Tipps für die Antikörperherstellung während den jährlichen Kolloquien gegeben hat.

Ich danke Herrn **Prof. Horst Helbig** für die Möglichkeit in seiner Klinik die Arbeit zu erstellen, und für die Bereitstellung der Laborräume.

Ein großes Dankeschön an alle Kooperationspartner, v. a. an Frau **Prof. Antje Grosche**, Herrn **Prof. Volker Enzmann**, Frau **Martina Toelge** und Herrn **Dr. Agustín Tortajada**.

Einen besonderen Dank widme ich außerdem der **Maloch-Stiftung** für die jahrelange finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

Ich danke euch liebes Laborteam, **Andrea**, **Elfriede** und **Renate**, für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die humorvollen Stunden im Labor, insbesondere bei Renate: Danke, dass du so oft mein 2. Paar Hände und mein 2. Kopf warst!

Bei **meinen Eltern** und **meiner Schwester** bedanke ich mich von Herzen, dass ihr immer hinter meinen Entscheidungen standet, und mir stets Mut gemacht habt, v. a. du meine liebe **Mutti**!

Für die einzigartige und jahrelange Freundschaft und Unterstützung danke ich **Sabine**, **Richard**, **Antje** und meinen **BI07-Mädels**.

Mein herzlichster Dank gilt aber **Tina**, die mich vor allem in den letzten verrückten Monaten unermüdlich unterstützt und aufgebaut hat. Danke für dich! Ich liebe Dich!

Selbständigkeitserklärung

“Ich, Nicole Schäfer, geboren am 16.08.1987 in Rodewisch, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.



Regensburg, 27.11.2019

Nicole Schäfer