

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Komplement-induzierte Kalziumsignale am retinalen Pigmentepithel vor dem Hintergrund der
altersbedingten Makuladegeneration

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Friedrich Huber

aus Frankenthal (Pfalz)

Datum der Promotion: 03.03.2023

Vorwort

Teile aus der Arbeit sind bereits publiziert worden (siehe Anteilserklärung, Kapitel 8):

(1) Andreas Genewsky, Ingmar Jost, Catharina Busch, Christian Huber, Julia Stindl, Christine Skerka, Peter F Zipfel, Bärbel Rohrer, Olaf Strauß. Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology*. 2015.

(2) Catharina Busch, Kunchithapautham, Christian Huber, Khava Asamalova, Christine Skerka, Gerhild Wildner, Bärbel Rohrer, Olaf Strauß. Anaphylatoxin signaling at the RPE: Ca²⁺ signals, activation of the AKT and PI3-kinase pathway and Foxo1/FoxP3 activation. *Frontiers in Immunology*. 2017.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Grafikverzeichnis.....	6
1. Abstract.....	11
2. Einleitung.....	12
2.1 Das retinale Pigmentepithel	12
2.1.1 Anatomie und Histologie.....	12
2.1.2 Funktionen.....	13
2.1.3 Kalzium-Stoffwechsel.....	16
2.2 Altersbedingte Makuladegeneration	17
2.2.1 Epidemiologie	17
2.2.2 Ätiologie u. Pathogenese.....	18
2.2.3 Risikofaktoren	21
2.2.4 Klinik und Diagnostik	21
2.2.5 Therapie.....	22
2.3 Das Komplementsystem	24
3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	30
4. Material und Methodik	31
4.1 Materialien	31
4.1.1 Geräte und Zubehör.....	31
4.1.2 Chemikalien, Kits und sonstige Materialien	32
4.1.3 Proteine und Seren	33
4.1.4 Medien, Lösungen und Puffer	33
4.1.5 ARPE-19-Zelllinie.....	34
4.2 Methodik	35

4.2.1 Zellkultur	35
4.2.2 Standardisiertes Humanserum.....	35
4.2.3 Ca ²⁺ -Imaging	36
4.3 Setup	38
4.4 Experimentelles Prozedere.....	39
4.4.1 Transfer der ARPE-19-Zellen auf Cover-Slips	39
4.4.2 Vorbehandlung der ARPE-19-Zellen.....	39
4.4.3 Abbildungsverfahren (Imaging).....	39
4.5 Datenerhebung und Statistik	43
5. Ergebnisse.....	44
5.1 Standardisiertes Humanserum führt zu Anstieg des freien intrazellulären Ca ²⁺	44
5.2 Einzelne Komplementfaktoren	46
5.2.1 Komplementfaktor C3.....	46
5.2.2 Komplementfaktor C5.....	49
5.2.3 Komplementfaktoren C3a + C5a	52
5.2.4 Komplementfaktoren C6/C7	53
5.3 Der terminale Komplex.....	55
5.4 Gesamtvergleich.....	56
5.4.1 depletierte Seren vs. standardisiertes Humanserum	56
5.4.2 C3-depletiertes Serum vs. C5-/C6-/C7-depletiertes Serum	57
5.4.3 C6-depletiertes Serum vs. C5/C7-depletiertes Serum.....	58
5.4.4 Anaphylatoxine vs. standardisiertes Humanserum.....	59
5.4.5 Anaphylatoxine (kombiniert vs. einzeln)	60
5.4.6 Terminaler Komplex vs. Anaphylatoxine.....	61

6. Diskussion	62
6.1 Aktives Komplement führt zu intrazellulärem Ca ²⁺ -Anstieg	62
6.2 Rolle der Anaphylatoxine C3a und C5a	65
6.2.1 Unterschiede der einzelnen Komponenten.....	65
6.2.2 Interaktionen C3a und C5a.....	68
6.3 Der terminale Komplex.....	70
6.4 Schlussfolgerungen und Ausblick	76
6.4.1 AMD hat inflammatorische Komponente	76
6.4.2 Wirkung am RPE: anti- vs. pro-inflammatorisch, Switch im Phänotyp	77
6.4.3 Wirkung auf das RPE: pro- vs. anti-angiogen.....	80
6.4.4 Therapieansätze AMD	81
7. Literaturverzeichnis	84
8. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	97
9. Lebenslauf	99
10. Publikationsliste	100
11. Danksagung	101

Abbildungs- und Grafikverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie und Histologie des Auges.....	12
Abbildung 2: Übersicht Funktionen des RPE.....	13
Abbildung 3: Übersicht Stimulation, Sekretion am RPE	15
Abbildung 4: Ca ²⁺ -Signalling am RPE	16
Abbildung 5: Übersichtsdarstellung Makula.....	17
Abbildung 6: histologisches Schnittbild Drusen/RPE.....	18
Abbildung 7: Frühstadium der AMD.....	19
Abbildung 8: Fundusfotographie geographische Atrophie.....	19
Abbildung 9: Fundusfotographie CNV	20
Abbildung 10: Fundusfotographie fibrovaskuläre Narbe.....	20
Abbildung 11: Übersichtsdarstellung Therapieansätze trockene AMD.....	23
Abbildung 12: Übersicht der drei Komplementwege.....	25
Abbildung 13: Modell des TCC	26
Abbildung 14: elektronenmikroskopische Rekonstruktion des TCC	26
Abbildung 15/16: Komplement-induzierte, Ca ²⁺ -abhängige VEGF-Sekretion am RPE	27
Abbildung 17: Modell Inflammasom-Aktivierung durch sublytic MAC.....	28
Abbildung 18: Lichtmikroskopie ARPE-19-Zellen.....	34
Abbildung 19: Struktur Fura-2 AM	36
Abbildung 20: Abhängigkeit Fluoreszenzintensität Fura-2 von der Anregungswellenlänge	37
Grafik 1: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS und hiNHS	44
Grafik 2: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS und C3depletiertes Serum.....	46
Grafik 3: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS, C3a und desarginiertes C3a	47

Grafik 4: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS und C5depletiertes Serum.....	49
Grafik 5: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS, C5a und desarginiertes C5a	50
Grafik 6: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS und C3a+C5a simultan	52
Grafik 7: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS und C6-/C7-depletiertes Serum	53
Grafik 8: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS und sC5b-9.....	55
Grafik 9: Ca ²⁺ -Anstiege durch NHS und depletierte Seren	56
Grafik 10: Ca ²⁺ -Anstiege durch depletierte Seren	57
Grafik 11: Ca ²⁺ -Anstiege durch C6-/C5- und C7-depletiertes Serum.....	58
Grafik 12: Vergleichende Darstellung der Ca ²⁺ -Anstiege.....	59
Grafik 13: Ca ²⁺ -Anstiege durch C3a, C5a und simultan C3a+C5a.....	60
Grafik 14: Ca ²⁺ -Anstiege durch sC5b-9, C5a und C3a.....	61
Abbildung 21: Ca ²⁺ -Anstieg in RPE-Zelle in Reaktion auf C5b-9.....	75

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AM	Acetoxymethyl Ester
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
AMP	Adenosinmonophosphat
ARMS2	Age-Related Maculopathy Susceptibility 2
ARPE-19	Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19
ATP	Adenosintriphosphat
Avg	average
C	Kohlenstoff
C3aR/C5aR	Komplementfaktor 3a/5a Rezeptor
Ca ²⁺	Kalzium
Cav1.3	Calcium channel, voltage-dependent
CF	Komplementfaktor
CD	Cluster of Differentiation
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CNV	chorioidale Neovaskularisation
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	Ca ²⁺ response element binding protein
CRALBP	Cellular retinaldehyde-binding protein
CRP	C-reaktives Protein
Cyt c	Cytochrom c
DAF	Decay Accelerating Factor
depl	depletiert
desArg	desarginiert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	dorsal root ganglion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erk	extracellular-signal regulated kinases
FasL	Fas Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor

FHL1	Four and a Half LIM Domains Protein 1
FOXO1	Forkhead box protein O1
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
Gas6	Growth-arrest-specific gene-6
H ₂ O	Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hi	hitzeinaktiviert
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IP3R	Inositoltrisphosphat-Rezeptor
IPE	Iris-Pigmentepithel
K ⁺	Kalium
Kir7.1	Inwardly rectifying Kalium-Kanal
Kv1.3	spannungsgesteuerter Kalium-Kanal
LPS	Lipopolysaccharide
MAC	Membranangriffskomplex
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MCU	mitochondrial calcium uniporter
Mg	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MV	Mikrovilli
Na ⁺	Natrium
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
NHS	Normal Human Serum
NLR	nucleotide oligomerization domain-like receptor
nM	Nanomolar
O ₃	Trioxid
OCT	Optische Kohärenztomographie
OS	outer segment
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate-buffered saline
(q)PCR	(quantitative) polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDT	Photodynamische Therapie

PEDF	Pigment epithelium-derived factor
PI3	Phosphoinositid-3
PIGF	placental growth factor
PMCA	plasma membrane Ca ²⁺ ATPase
PO ₄	Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	Retinales Pigmentepithel
RyR	Ryanodin-Rezeptor
SEM	standard error of the mean
src	sarcoma
SO ₄	Sulfat
TCC	Terminaler Complement Complex
TGF-beta	Transforming growth factor beta
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPV2	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 2
ug	Mikrogramm
uM	Mikromolar
UV	ultraviolett
VDAC	voltage-dependent anion channel
VDCC	voltage-dependent calcium channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Zfp36	Zinkfinger-Protein-36

1. Abstract

Einleitung: Das retinale Pigmentepithel (RPE) spielt als Interaktionspartner eine bedeutende Rolle für zahlreiche Zellfunktionen innerhalb des Immunsystems. Komplement kann am RPE Ca^{2+} -Signale induzieren, wobei ein fehlreguliertes Komplementsystem mit einem erhöhten AMD-Risiko einhergeht.

Methodik: Aufzeichnung von Ca^{2+} -Signalen und Analyse von Signalwegen mittels Ca^{2+} -Imaging an ARPE-19-Zellen; statistische Auswertung mithilfe von Microsoft Excel und GraphPad Prism 8.

Ergebnisse: Unterschiedliche Komponenten des Komplementsystems (u.a. C3a, C5a, terminaler Komplex) erzeugen ein individuelles und fein orchestriertes Ca^{2+} -Signal, Anzeichen einer lytischen Pore fehlen.

Schlussfolgerung: Spezifische, durch Komplement induzierte Signale können am RPE eine Veränderung des funktionellen Phänotyps auslösen. Es ist anzunehmen, dass das RPE sich so präzise seiner Umgebung anpassen und die AMD-Pathogenese damit maßgeblich beeinflussen kann.

Introduction: The retinal pigment epithelium (RPE) plays an important role as an interaction partner for numerous cell functions within the immune system. Complement components can induce Ca^{2+} - signals at the RPE whereby a dysregulated complement system is associated with an increased risk of AMD genesis.

Methods: Recording of Ca^{2+} -signals and analysis of signalling pathways using Ca^{2+} -imaging on ARPE-19 cells; statistical analysis using Microsoft Excel and GraphPad Prism 8.

Results: Different components of the complement system (including C3a, C5a, terminal complex) generate an individual and finely orchestrated Ca^{2+} -signal without any sign of a lytic pore.

Conclusion: Specific signals induced by complement can trigger a change in the functional phenotype of the RPE. It can be assumed that the RPE can adapt so precisely to its environment and thus significantly influence the AMD pathogenesis.

2. Einleitung

2.1 Das retinale Pigmentepithel

2.1.1 Anatomie und Histologie

Das retinale Pigmentepithel entwickelt sich als einschichtiges Epithel bereits in der 3. Schwangerschaftswoche aus der äußeren Wand des Augenbechers (1) und liegt fortan zwischen den Außensegmenten der Photorezeptoren der Retina und dem Endothel der Chorioidea. RPE-Zellen sind hexagonal und bilden eine über Tight-Junctions verbundene Einheit. Das RPE ist Teil der Blut-Retina-Schranke mit entsprechend hohem parazellulärem bzw. transepithelialelem Widerstand (2). RPE-Zellen interagieren nach apikal über eine Interphotorezeptormatrix durch eine Vielzahl von Zellfortsätzen und Mikrovilli mit Stäbchen bzw. Zapfen (3-6); nach basolateral bilden sie durch ihre Basalmembran eine der fünf Schichten der Bruch-Membran, welche wiederum direkt an die Chorioidea angrenzt (1, s. Abbildung 1).

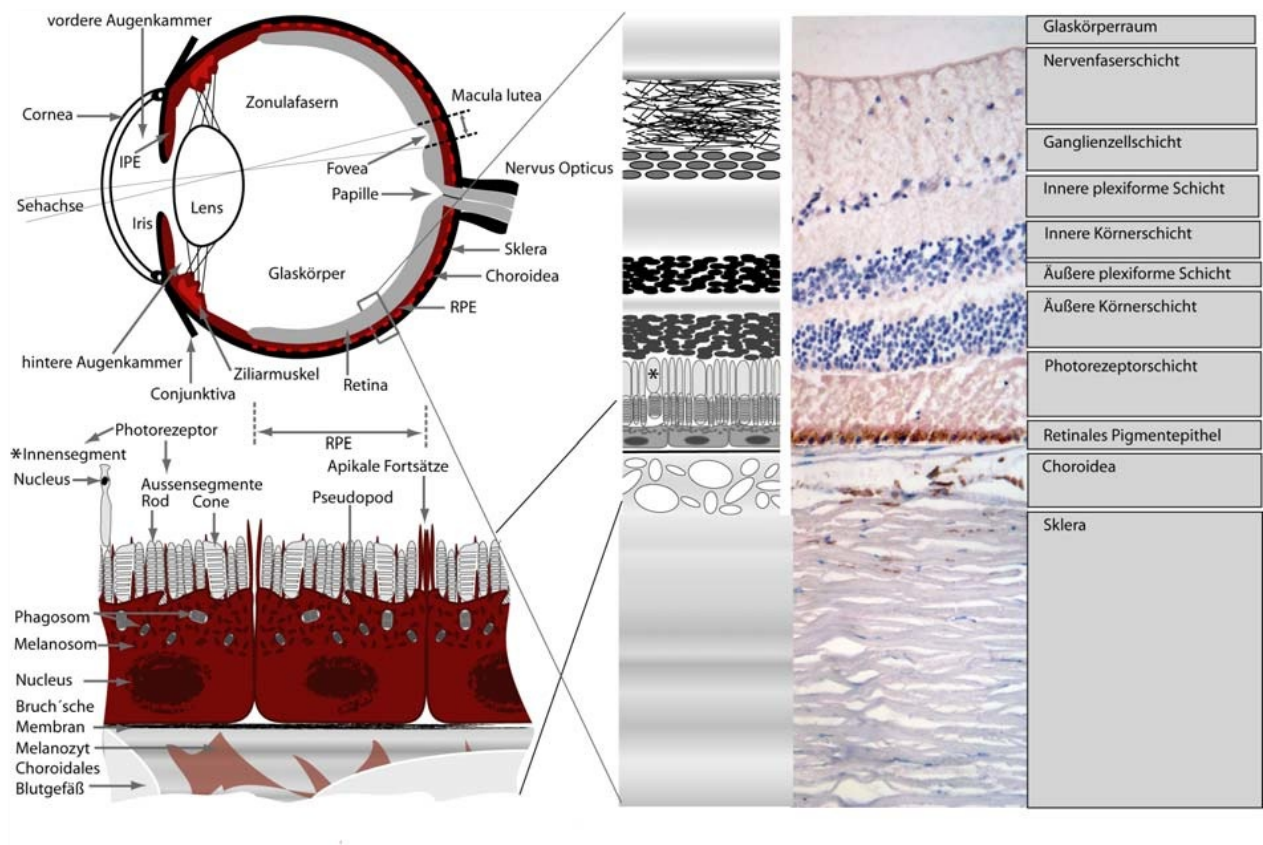


Abbildung 1: Anatomie und Histologie des Auges

oben links: Horizontalschnitt; rechts: Ausschnitt durch die Schichten der Retina mit RPE, Chorioidea und Sklera; unten links: Schemazeichnung der Interaktion von RPE mit den Außensegmenten der Photorezeptoren (9)

2.1.2 Funktionen

Durch eine Vielzahl an Funktionen ist die enge Interaktion zwischen RPE und Photorezeptoren essentiell für die visuelle Funktion (s. Abbildung 2).

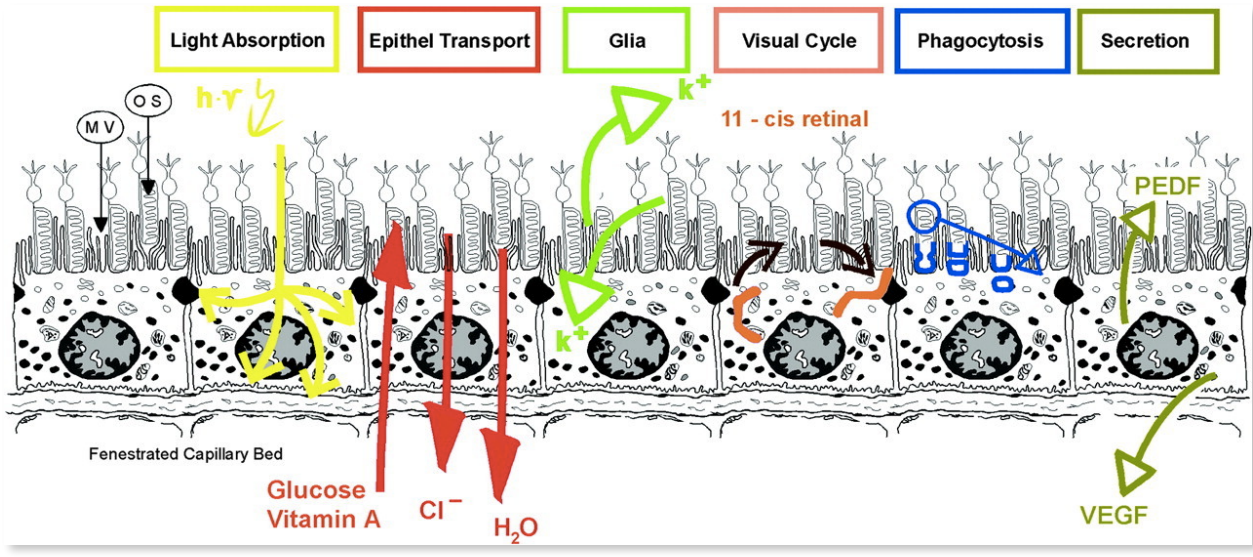


Abbildung 2: Übersicht Funktionen des RPE

(2)

So werden durch Lichtabsorption mittels hoher Melanosomendichte Streuungsphänomene des einfallenden Lichts minimiert, was die Qualität des optischen Systems deutlich steigert.

Strahlungsenergie und der hohe Sauerstoffgehalt in den chorioidalen Gefäßen führen über photooxidativen Stress allerdings auch zur Entstehung freier Sauerstoffradikale, die zahlreiche Zellstrukturen (u.a. mitochondriale DNA) schädigen können. Zellen des retinalen Pigmentepithels wirken diesen Vorgängen durch vielfältige Reparaturmechanismen (u.a. Ubiquitinierung bzw. Abbau im Proteasom, DNA-Reparatur durch Exzision von Basen), hohe Konzentrationen an Antioxidantien (u.a. Glutathion) und Melaninpigment in zytoplasmatischen Granula zur Lichtabsorption entgegen (2).

Defekte Proteine, Lipide oder toxische Substanzen entstehen durch Lichtschädigung und akkumulieren in den Außensegmenten der Photorezeptoren, welche dadurch ständig erneuert werden müssen. Die Interaktion zum retinalen Pigmentepithel spielt dabei eine wichtige Rolle. Durch feinregulierte Signalwege der Phagozytose werden verbrauchte Endstücke der Außensegmente von RPE-Zellen erkannt, gebunden, aufgenommen, verdaut und die Metabolite den Photorezeptoren wieder zur Verfügung gestellt (21, 22).

Des Weiteren bilden RPE-Zellen durch ihre enge Verknüpfung eine sehr selektiv permeable, dichte Barriere, die äußere Blut-Retina-Schranke. So können die, per Diffusion aus Gefäßen der Chorioidea ernährten, äußeren Schichten der Retina inklusive Innen- und Außensegmenten der Photorezeptoren, vor systemischen Einflüssen wie Krankheitserregern oder Toxinen geschützt werden (1).

Außerdem wird durch multiple transzelluläre Transportvorgänge ein extrem selektiver Substrataustausch ermöglicht. Einerseits werden Photorezeptoren so mit wichtigen Nährstoffen (u.a. Glukose, Retinal, Omega-3-Fettsäuren) versorgt (11,12), andererseits können durch den enormen Stoffwechselumsatz der Photorezeptoren sowie retinalen Neurone entstehendes Wasser und metabolische Endprodukte (u.a. Milchsäure) dem Blutkreislauf zurückgeführt und so auch Ionen- bzw. pH-Gleichgewichte erhalten werden (13,14,15,16).

Kalium, dessen Konzentration im subretinalen Spalt in engen Grenzen gehalten werden muss, um die Erregbarkeit bzw. Signaltransduktion von Photorezeptoren und nachgeschalteten Neuronen gewährleisten zu können, unterliegt lichtabhängigen Variationen (2,17). Durch Lichteinfall werden cGMP-abhängige Kationenkanäle im Photorezeptoraußensegment geschlossen und der zuvor als Dunkelstrom („dark current“) bezeichnete Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Außensegmente bzw. Abfluss von K^+ an den Innensegmente der Photorezeptoren verringert sich. Die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase führt zur weiteren Abnahme von K^+ im subretinalen Spalt. Diese Vorgänge erfordern besonders schnelle, spannungsabhängige Kompensationsmechanismen der RPE-Zellen (möglich u.a. durch Hyperpolarisation der apikalen Membran, Kir7.1-Kanäle) mit folgendem K^+ -Ausstrom zur Normalisierung der Konzentration, welche der alleinige transepitheliale Ionenaustausch nicht gewährleisten könnte (18).

Das retinale Pigmentepithel ist außerdem als Retinal/Retinol-Speicher am Sehzyklus beteiligt. In den Stäbchen der Retina entsteht durch Lichtreiz aus 11-cis Retinal als Bestandteil des Rhodopsins durch Konformationsänderung all-trans Retinal bzw. Meta-Rhodopsin II. Zur notwendigen enzymatischen Regenerierung wird all-trans Retinal ins RPE transportiert, zu 11-cis Retinal umgewandelt und anschließend in den Photorezeptoren mit Opsin wieder zu Rhodopsin verbunden (19,20).

Die enge Beziehung des retinalen Pigmentepithels zu seinen Nachbarstrukturen erfordert außerdem, dass RPE-Zellen weitreichend mit umgebenden Geweben und verschiedensten Zellen

(u.a. des Immunsystems) interagieren können. Sie sind daher zur Sekretion unterschiedlichster Wachstumsfaktoren und Signaltransmitter fähig, u.a. ATP, FGF, TGF-beta, IGF-1, Interleukine, TIMP, PEDF oder VEGF (2). Die sekretorische Funktion des retinalen Pigmentepithels trägt sowohl zur Erhaltung der strukturellen Integrität der Chorioidea (u.a. VEGF, PEDF, TIMP) als auch der Photorezeptoren (u.a. PEDF, FGF, ATP) bei (2,24,25) und kann durch Hypoxie, metabolischen Stress oder lokale Immunantworten angeregt werden.

Als Antwort auf lokale Immunreaktionen können RPE-Zellen immunmodulierende Faktoren wie IL-8, CFH, CD59, DAF oder MCP1 (26,27,28) sezernieren und passende Rezeptoren exprimieren (u.a. MHC-, Toll-like-, TNF-a-Rezeptoren, C3aR, C5aR) (29,30,31). Ferner hemmen RPE-Zellen die Aktivierung von CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen, Makrophagen, Monozyten und Mikroglia (2). So trägt das RPE nicht nur über die zuvor beschriebene Blut-Retina-Schranke als transepitheliale Barriere zum Immunprivileg des Auges bei, sondern ist auch zur Aktivierung und Suppression des Immunsystems fähig.

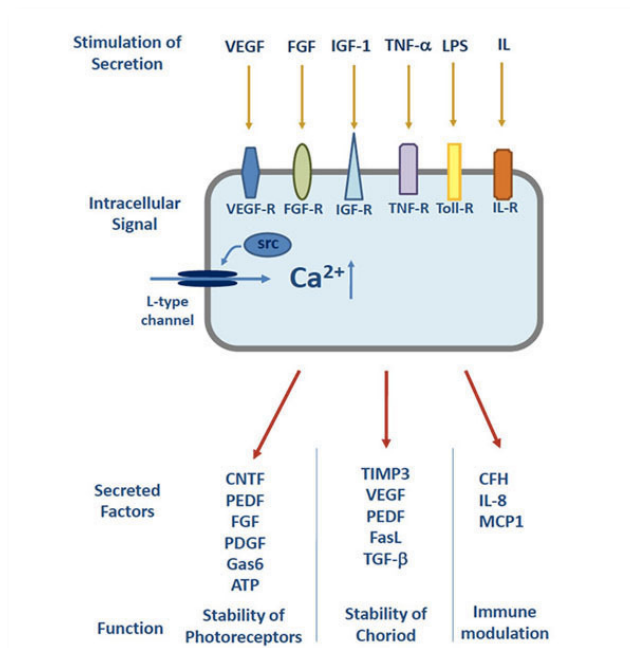


Abbildung 3: Übersicht Stimulation, Sekretion am RPE

(23)

2.1.3 Kalzium-Stoffwechsel

Nahezu alle Zellfunktionen (u.a. Proliferation, Apoptose, Sekretion, Genexpression, Kontraktion und Differenzierung) sind abhängig von Konzentrationsänderungen intrazellulären Ca^{2+} . Es bindet hochaffin an Proteine und kann dadurch Konformations- sowie letztlich Funktionsänderungen bewirken. Unter hohem Energieaufwand sind Zellen daher bestrebt, einen transmembranen Gradienten von 1:10 000 zu erhalten (73). Auch die zuvor beschriebene Fähigkeit des RPE, Faktoren zu sezernieren und Rezeptoren zu exprimieren, hängt ganz wesentlich von intrazellulärem Ca^{2+} als second-messenger ab (2,126, s. Abbildung 3). Möglich sind diese Interaktionen nur durch das Generieren einer Vielzahl spezifischer und hochdifferenzierter Ca^{2+} -Signale, welche einer ausführlicheren Darstellung bedürfen.

Das RPE exprimiert hierbei eine Reihe von verschiedenen Ionenkanälen (Ca^{2+} -leitende und Ca^{2+} -aktivierte Typen) sowie Iontentransporter (z.B. ATPasen). Spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (u.a. Cav1.3-Subtyp, Abhängigkeit von Tyrosinkinase-Aktivität) und durch Hitze oder IGF-1 aktivierbare TRPV2-Kanäle können die VEGF-Sekretion steigern (2,86,126). Die Deaktivierung der L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle erfolgt durch Hyperpolarisation der RPE-Zelle mittels gleichzeitig aktivierten und ebenso Tyrosinkinase-abhängigen Kv1.3-Kaliumkanälen bzw. maxi-K-Kanälen. Eine Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann durch Iontentransporter wie Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX-1) erreicht werden (2, s. Abbildung 4).

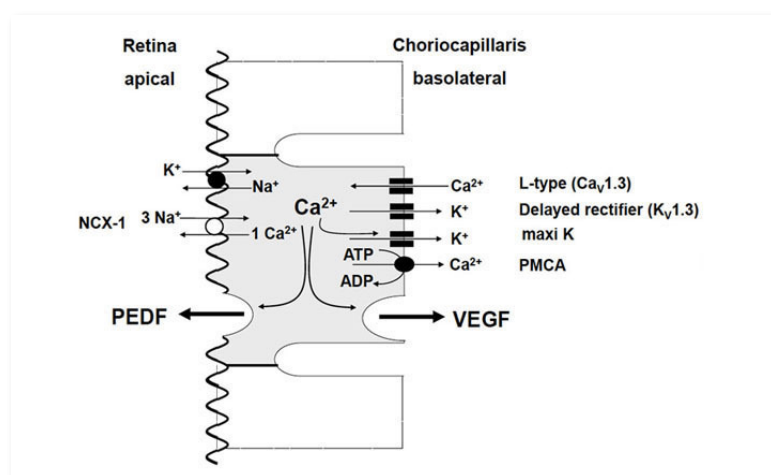


Abbildung 4: Ca^{2+} -Signalling am RPE

(2)

2.2 Altersbedingte Makuladegeneration

2.2.1 Epidemiologie

Die altersbedingte Makuladegeneration ist eine schwerwiegende, chronische Augenerkrankung im Bereich des schärfsten Sehens und stellt weltweit die dritthäufigste Erblindungsursache nach Katarakt und Glaukom dar (39). In Deutschland und anderen westlichen Industrienationen mit erhöhter Lebenserwartung ist sie mit ca. 30% für die meisten Neuerblindungen verantwortlich. Neben stark beeinträchtigter individueller Lebensqualität ist die Erkrankung auch aufgrund wachsender sozioökonomischer Belastung eine Herausforderung; weltweit wird von einer Vervierfachung betroffener Patienten bis ins Jahr 2050 ausgegangen (32,34). Unterschieden wird zwischen dem Frühstadium der altersbedingten Makulopathie und dem Spätstadium der altersbedingten Makuladegeneration. Letztere wiederum kann in die weitaus häufigere, nicht-exsudative („trockene“) AMD (ca. 85% der Fälle) mit der möglichen Spätfolge der geographischen Atrophie (ca. 35%) und die exsudative („feuchte“) AMD (10-15% der Fälle) eingeteilt werden (42).

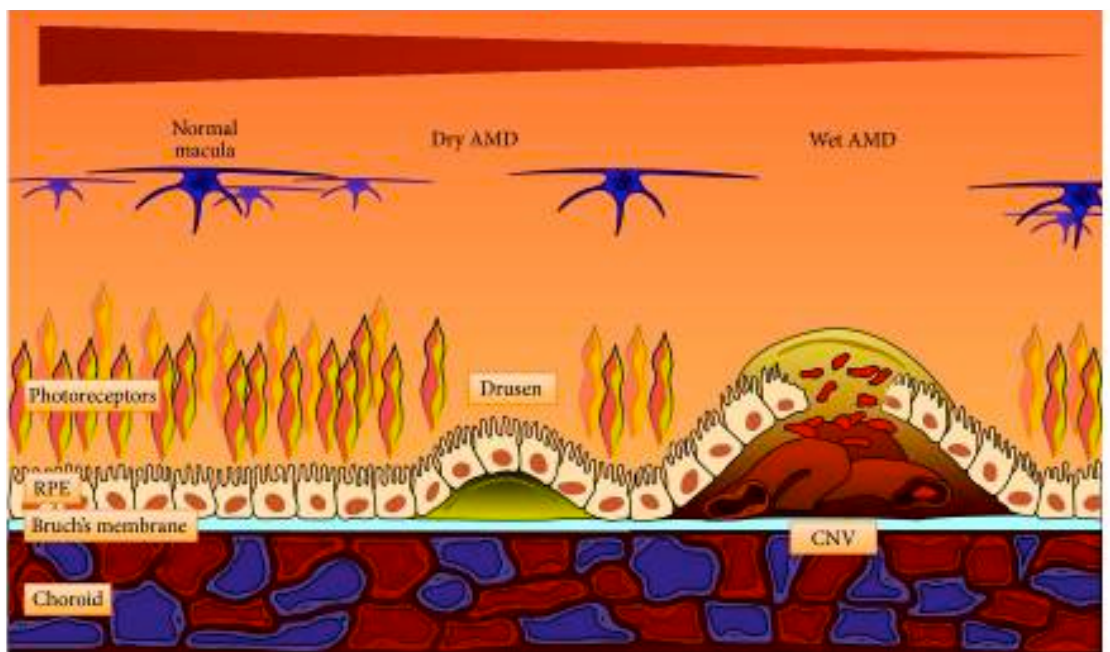


Abbildung 5: Übersichtsdarstellung Makula physiologisch, „trockene“ u. „feuchte“ AMD (von links nach rechts) (33)

2.2.2 Ätiologie u. Pathogenese

Die exakte Ätiologie dieser multifaktoriellen Erkrankung konnte bis dato nicht hinreichend entschlüsselt werden. Grundlage für die Entstehung scheint jedoch eine fortschreitende Degeneration der in Kapitel 2.1.2 erläuterten anatomisch-funktionellen Einheit aus Neuroretina, retinalem Pigmentepithel, Bruch' scher Membran und Choriokapillaris zu sein (34,36). Die Macula lutea (insbesondere Fovea centralis) weist die höchste Dichte an Photorezeptoren auf, hierhin wird der Großteil des einfallenden Lichts gebündelt (35). Durch besonders hohen photooxidativen Stress inklusive Bildung freier Sauerstoffradikale (s. Kapitel 2.1.2) sind die Zellstrukturen hier ständigen Belastungen ausgesetzt. Im Alter nachlassende Kompensationsmechanismen führen zu zunehmenden Ablagerungsprozessen im Bereich des RPE (36). So sammelt sich das Alterspigment Lipofuszin bzw. sein Bestandteil A2E dabei im Zytoplasma der RPE-Zellen an und es entstehen vermehrt freie Sauerstoffradikale (2,37).

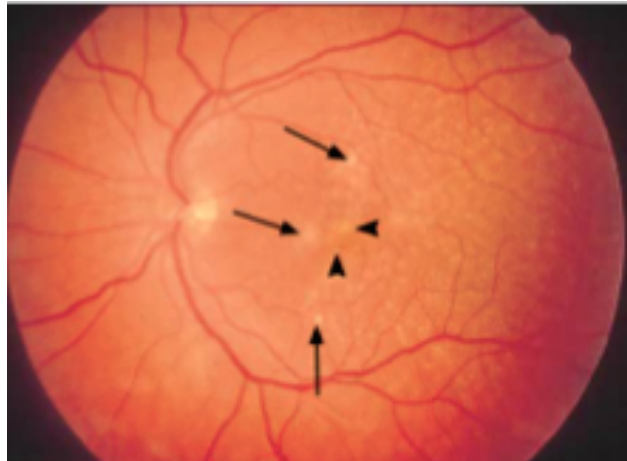
Eine nachlassende Immunsuppression führt zur zunehmenden Akkumulation von Monozyten in der äußeren Netzhaut (131). Extrazellulär verbleibende Protein- (u.a. CRP, IgG, Komplementfaktoren) und Lipidablagerungen, die aktiv vom metabolisch überstrapazierten RPE ausgeschieden werden und sich zwischen RPE und Bruch-Membran befinden, werden als „Drusen“ bezeichnet (38,82, s. Abbildung 6). Im Verlauf des Lebens kann dadurch eine Diffusionsbarriere entstehen. Zusätzlich kommt es ganz unabhängig davon zu einer Verdickung der Bruch-Membran, ebenso verdünnt sich im Alter die darunterliegende Choriokapillaris (39,52).



Abbildung 6: histologisches Schnittbild Drusen/RPE

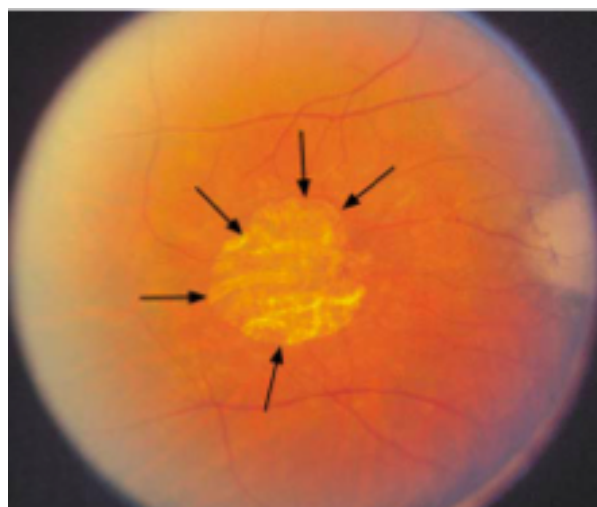
Drusen (Sternchen) unterhalb des RPE (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 400fache Vergrößerung) (34)

Einzelne kleine („harte“) Drusen ($<63\ \mu\text{m}$) werden zunächst unter dem Begriff der „pigmentepithelialen Dysfunktion“ zusammengefasst und können bei bis zu 95% der älteren Bevölkerung beobachtet werden (34, s. Abbildung 7). Frühstadien der AMD sind durch größere ($63\text{-}125\ \mu\text{m}$) Drusen gekennzeichnet; große ($>125\ \mu\text{m}$) Drusen in Verbindung mit Pigmentverschiebungen charakterisieren das Intermediärstadium (40).



*Abbildung 7: Frühstadium der AMD
größere Drusen (Pfeile), Pigmentverklumpungen (Pfeilspitzen) (34)*

Durch Konfluenz von Drusen und Ausdünnung der Choriokapillaris (52) kann es zum Zelluntergang im RPE mit irreversibler Degeneration von Photorezeptoren kommen. Die Ränder der Atrophiezonen erscheinen hyperpigmentiert. Dieses Spätstadium der trockenen Form der AMD wird als geographische Atrophie (s. Abbildung 8) bezeichnet.



*Abbildung 8: Fundusfotographie geographische Atrophie
(34)*

Größere, konfluierende Areale („weicher“) Drusen gehen mit einem erhöhten Risiko der Entstehung chorioidaler Neovaskularisationen (CNV, „feuchte“ AMD) einher (46). Hypoxische Verhältnisse führen dabei zur vermehrten Sekretion proangiogener Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF, FGF, TGF- β). Die daraufhin neugebildeten, krankhaften Gefäße entstammen der Choriokapillaris, durchbrechen die Bruch-Membran, wachsen bis unter das RPE und sind durch eine gesteigerte Permeabilität mit Austritt von Blutbestandteilen bzw. Gewebsflüssigkeit gekennzeichnet (41). Letztendlich führen diese pathologischen Prozesse zur exsudativen Makulopathie mit (sub-) retinalem Ödem, Blutungen und Exsudaten (s. Abbildung 9). Durch eine anhaltende seröse Abhebung von Retina und RPE können dabei die zugehörigen Zellen irreversibel degenerieren, Spätfolge ist die Fibrosierung bzw. Narbenbildung (34,40, s. Abbildung 10).



Abbildung 9: Fundusfotographie CNV
zentrale Neovaskularisation (Sternchen) umgeben von subretinalen Blutungen (34)



Abbildung 10: Fundusfotographie fibrovaskuläre Narbe
zentrale Fibrose (Pfeilspitze), subretinale Flüssigkeit (Sternchen) u. Lipidexsudate (Pfeile) (34)

2.2.3 Risikofaktoren

Degenerative Veränderungen der Retina kommen im höheren Lebensalter sehr häufig vor. Dennoch entwickelt nur ein Teil der Betroffenen pathologische Veränderungen im Sinne einer AMD. Es muss also Faktoren geben, die die Krankheitsentstehung beeinflussen bzw. zu bestimmten Krankheitsverläufen prädisponieren.

Die Entdeckung des Complementfaktor H-Polymorphismus Y402H, welcher zur Überaktivität des alternativen Komplementweges bzw. bis zur 7-fachen relativen Risikoerhöhung (homozygote Träger) der AMD-Entstehung führt, konnte im Jahr 2005 erstmals den Verdacht einer genetischen Komponente bestätigen (47). Weitere Polymorphismen in Genen von Komplementkomponenten (CFI,C2,C3,C7,CFB) (48,49) sowie im ARMS2- und HTRA1-Gen (50) beeinflussen das AMD-Risiko.

Andere mehr oder weniger stark etablierte Faktoren sind erhöhte Lichtexposition (u.a. nach Cataract-OP), Ernährungsgewohnheiten (geringe Aufnahme an u.a. Lutein, Zeaxanthin, Vitamin C/E, Zink) oder ethnische Herkunft (51,53,54,55).

Ungeklärt bleibt allerdings bis heute, welche Faktoren in der weiteren Progression der Erkrankung bestimmend sind und somit auch eine wichtige Rolle hinsichtlich des Verlaufs spielen.

2.2.4 Klinik und Diagnostik

Oft bemerken Patienten im Frühstadium der Erkrankung keine oder schwer zuzuordnende Symptome wie leichte Visusreduktion bzw. abnehmendes Kontrast- oder Farbsehen, wodurch die Diagnose häufig nebenbefundlich gestellt wird. Bei der nicht-exsudativen Form der AMD kann es je nach Fortschreiten über eine langsam progrediente Verschlechterung des zentralen Sehvermögens zum Zentralskotom mit vollständigem Verlust der Lesefähigkeit kommen.

Ein deutlich akuterer Auftreten von verzerrtem Sehen (sog. Metamorphopsien), Schwierigkeiten beim Lesen und dem Erkennen von Gesichtern mit ebenfalls starkem Abfall der zentralen Sehschärfe kennzeichnen das exsudative Stadium der AMD.

Das Befallsmuster der Erkrankung sorgt für ein meist erhaltenes peripheres Sehen und verbleibende räumliche Orientierung. Neben Visusprüfung (Fern- und Nahvisus) bietet vor allem

die klinische Funduskopie gute diagnostische Möglichkeiten. Die optische Kohärenztomographie (OCT) erlaubt den einfachen Nachweis sub- und intraretinaler Flüssigkeit bzw. einer RPE-Abhebung und wird heutzutage als vordergründiges (Verlaufs-) Diagnostikum genutzt. Eine weitere Differenzierung der Erkrankung bzw. Abgrenzung zu möglichen Differentialdiagnosen ist durch Fluoreszenz-, Indozyanin-Grün- bzw. OCT-Angiografie möglich. Fensterdefekte in Atrophie-Bereichen erscheinen dabei als Hyperfluoreszenzen; ein randständiges Kapillarnetz mit folgendem Austritt von Fluoreszein (Leckage) charakterisiert die Darstellung der exsudativen AMD. Die selbstständige, monokulare Prüfung durch den Patienten mittels Amsler-Gitter ist eine einfache und wichtige Möglichkeit der Früherkennung des exsudativen Stadiums bzw. des Eintretens einer Verschlechterung.

2.2.5 Therapie

Es existieren derzeit (noch) keine wirksamen Behandlungsmöglichkeiten einer Atrophie des RPE bzw. der Photorezeptoren und somit der trockenen AMD. Verschiedenste experimentelle und klinische Therapieansätze basieren dabei unter anderem auf Verminderung von oxidativem Stress durch Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln (u.a. b-Karotin, Vitamin C/E, Zink, Lutein, Zeaxanthin), Reduzierung toxischer Abbauprodukte, Modulation des Sehzyklus, Neuroprotektion oder Unterdrückung bzw. Modulation der Immunantwort (42).

Vielversprechende Ansätze zeigen hierbei vor allem Wirkstoffe, die durch lokale Steuerung der Komplementkaskade (Inhibition u.a. der Komplementfaktoren D, C3, C5) Einfluss auf die Immunantwort nehmen können. (56, s. Abbildung 11)

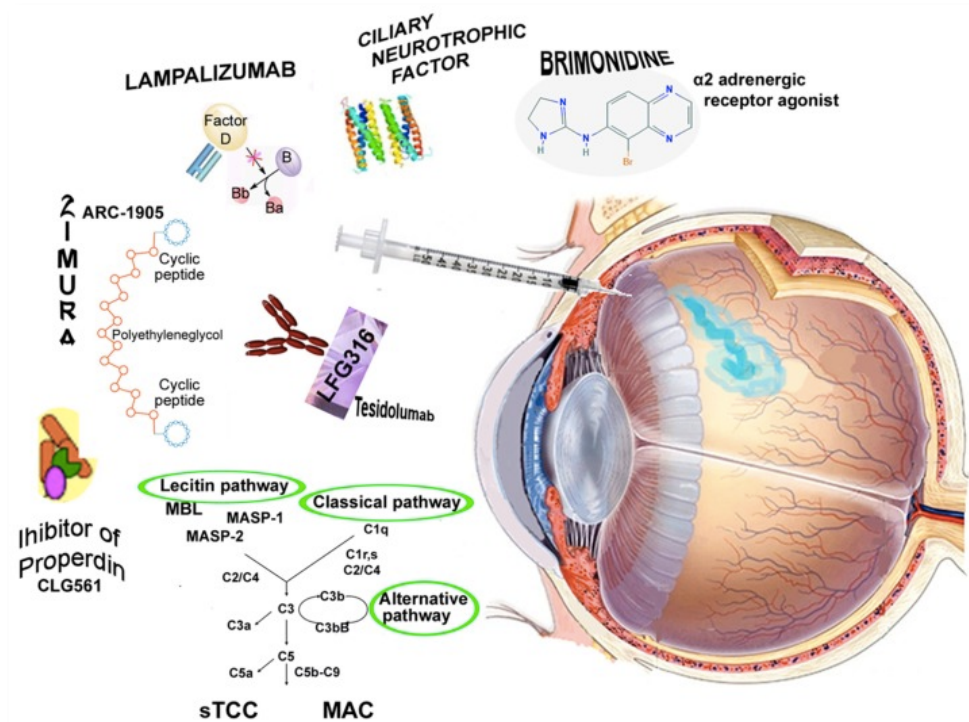


Abbildung 11: Übersichtsdarstellung Therapieansätze trockene AMD (56)

Therapie der Wahl für Patienten mit exsudativer AMD ist die häufig monatliche, mindestens dreimalige intravitreale Applikation von VEGF-Inhibitoren (42). Derzeit angewendete Wirkstoffe sind Bevacizumab (monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A - „off-label-use“), Ranibizumab (Antikörperfragment gegen VEGF-A) und Aflibercept (humanes, rekombinantes Fusionsprotein, VEGF-A-/PIGF-Inhibitor). Vielversprechende Ansätze einer länger anhaltenden Wirkung zeigt Brolicizumab (Antikörperfragment gegen VEGF-A) (7).

Andere, z.T. frühere Therapieverfahren der 1. Wahl wie photodynamische Therapie, Argonlaserkoagulation, chirurgische CNV-Membran-Extraktion, Makulatranslokation, Pigmentepithel-Aderhaut-Translokation oder transpupilläre Thermotherapie finden im heutigen Zeitalter der anti-VEGF-Therapie keine breite Anwendung mehr (10,75).

2.3 Das Komplementsystem

Da es vielfältige Hinweise auf eine gewichtige Rolle von (Para-) Inflammation und dabei insbesondere des Komplementsystems hinsichtlich der AMD-Entstehung gibt, soll das humane Komplementsystem in diesem Kapitel detailliert vorgestellt werden.

Das menschliche Komplementsystem als Teil der angeborenen Immunantwort besteht aus mehr als 60 löslichen und membrangebundenen Proteinen, die unter ständiger Kontrolle komplex miteinander interagieren (89). Jules Bordet beschrieb es vor über 100 Jahren als hitzeempfindlichen Bestandteil des Blutplasmas; der deutsche Arzt und Nobelpreisträger Paul Ehrlich führte um 1890 die Bezeichnung „Komplement“ ein (57), welches die aus Antigen-Antikörper bestehende zelluläre Immunantwort ergänzen („komplementieren“) konnte. Wichtige Funktionen des Komplementsystems sind die Identifizierung und Markierung (Opsonisierung) pathogener Strukturen (z.B. nekrotische/ apoptotische Zellen, Bakterien, Pilze), um deren Entfernung durch Phagozyten zu ermöglichen (58). Außerdem können mittels proinflammatorischer Mediatoren (Anaphylatoxine) Entzündungsprozesse stimuliert werden und Zellen durch zielgerichtete Bildung des terminalen Komplementkomplexes zerstört werden (59,89).

Durch Verstärkung der B-Zell-Antwort sowie indirekte (über Aktivierung von Makrophagen) Induzierung einer T-Zell-Antwort nimmt das Komplementsystem überdies auch Einfluss auf die adaptive Immunantwort (59).

Neu beschriebene Funktionen des Komplementsystems sind Prozesse in der Regeneration von Geweben bzw. in der Embryonalentwicklung sowie die Kontrolle physiologischer Hirnfunktionen (z.B. Lernen, durch Kontrolle der Mikroglia) (8).

Die Aktivierung des Komplementsystems kann dabei über drei unterschiedliche Wege erfolgen; den alternativen-, den klassischen- und den Lektinweg (s. Abbildung 12).

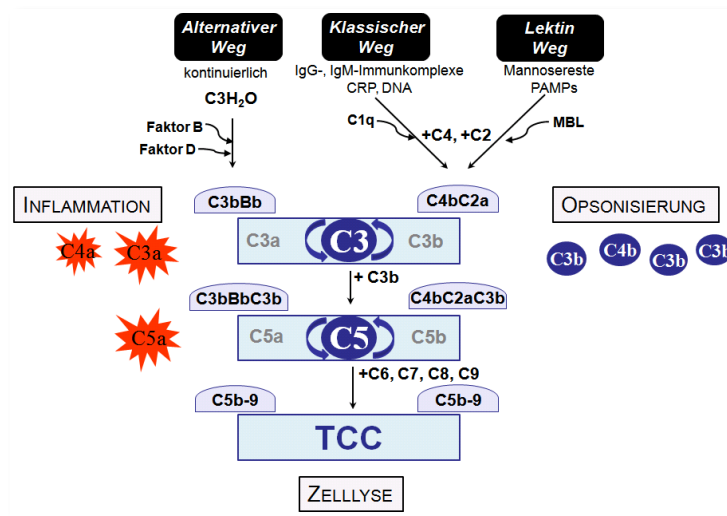


Abbildung 12: Übersicht der drei Komplementwege
Komplementkaskaden alternativer-, klassischer- und Lektin-Weg (79)

Grundsätzlich verlaufen die Komplementwege in vier untereinander recht ähnlichen Hauptschritten. Nach unterschiedlicher initialer Aktivierung erfolgt über die Bildung von C3-Konvertase (mit Spaltung von C3) und C5-Konvertase (mit Spaltung von C5) die Formation des TCC.

Klassischer Weg und Lektinweg bedürfen dabei spezifischer Aktivatoren; ersterer wird über C1q durch Antigen-Antikörper (IgG, IgM)-Komplexe oder antikörperunabhängig durch körpereigene Zellen, DNA sowie CRP (60), letzterer über Mannose-bindendes-Lektin durch Mannosestrukturen auf mikrobiellen Oberflächen aktiviert (61).

Aufgrund seiner herausragenden Bedeutung u.a. in der AMD-Genese (66) und unserer experimentellen in-vitro-Bedingungen, wird hier nur der alternative Aktivierungsweg ausführlicher dargestellt. Dieser ist im Gegensatz zu den anderen beiden Wegen kontinuierlich aktiv, bedarf somit keiner speziellen Initiatoren, sondern einer ständigen Hemmung durch Inhibitorproteine. Zellen ohne entsprechende regulatorische Proteine auf ihrer Oberfläche werden folglich erkannt und entfernt (62). Ursache der Aktivierung ist eine in geringem Maße ablaufende Hydrolyse der zentralen Komplementkomponente C3 mit resultierender Konformationsänderung. Es entsteht C3(H₂O), welches bei Bindung an eine pathogene

Oberfläche durch Anlagerung des Faktors B (CFB) und Spaltung in Ba und Bb durch Faktor D (CFD) die initiale C3-Konvertase C3(H₂O)Bb bilden kann (63). Bb generiert durch seine intrinsische Proteaseaktivität durch Spaltung von C3 fortlaufend weiter C3b. Als Folge verbinden sich C3b und Bb zur, durch Properdin (Faktor P) stabilisierten, C3-Konvertase des alternativen Signalweges C3bBb (63). Beide Konvertasen spalten C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b, welches sich an Zelloberflächen anlagert (Opsonisierung) und so Phagozytose ermöglicht. Letztendlich bewirkt die stetige Spaltung von C3-Molekülen eine fortwährende, sich selbst unterhaltende und verstärkende Aktivierung des alternativen Signalweges (sog. „amplification loop“). Zusätzlich kann C3b sowohl die C3-Konvertase C4bC2a des klassischen- und des Lektinweges sowie C3bBb binden. Es entsteht als weiteres proteolytisches Enzym die C5-Konvertase (C3bBbC3b des alternativen Weges), welche C5 in das Anaphylatoxin C5a und C5b spaltet. C5b kann, aufgrund einer nun freien Bindungsstelle, C6 und C7 anlagern und somit den C5b-7-Komplex bilden, der sich in die Phospholipidmembran der Zielzelle einlagert. Durch Rekrutierung von C8 und mit Hilfe der Polymerisation multipler C9-Moleküle entsteht der terminale Komplement- bzw. Membranangriffskomplex (TCC bzw. MAC, s. Abbildungen 13 u. 14), welcher durch Bildung einer transmembranen Pore, die auch Makromoleküle permeieren lässt, zum Zusammenbruch des transmembranen Gradienten und damit zur Lyse der Zelle führen kann (64).

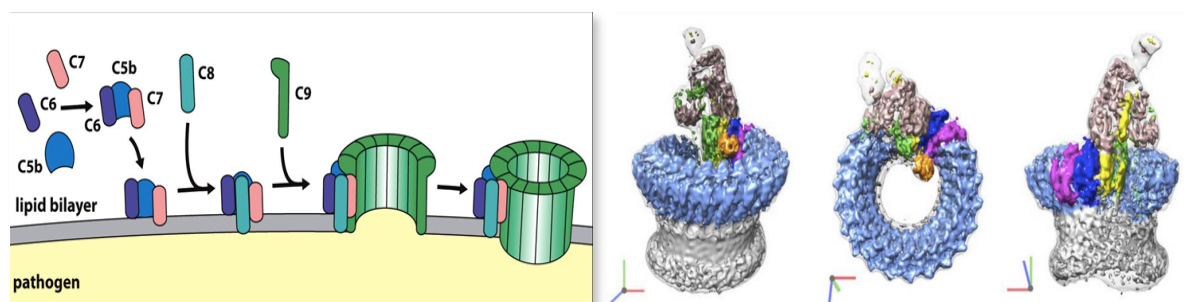


Abbildung 13: Modell des TCC

Bildung und Anlagerung an der Zellmembran eines Pathogens (links, 137)

Abbildung 14: elektronenmikroskopische Rekonstruktion des TCC

Komplementproteine C5b (braun), C6 (grün), C7 (gelb), C8 α (magenta), C8 β (dunkelblau), C8 γ (orange) and C9 (hellblau) (rechts, 80)

Diese antipathogene, zelldestruktive Wirkung des TCC ist jedoch nicht definitiv. So können, insbesondere an kernhaltigen Zellen, über Ca^{2+} als second-messenger, der Zellzyklus stimuliert und Metabolite der Arachidonsäure oder Sauerstoffradikale gebildet werden (65).

In-vitro-Experimente mit standardisiertem Humanserum als Komplementquelle zeigen, dass an RPE-Zellen endogen exprimierte Ionenkanäle, darunter der Ca^{2+} -abhängige maxiK-Kanal, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle des L-Typs Cav1.3 oder Kv1.3-Kaliumkanäle (vgl. Kap. 2.1.2) aktiviert werden und das RPE somit spezifisch auf Komplement reagieren kann. Ein Ergebnis ist dabei der erhöhte Schutz gegenüber oxidativem Stress (88).

Sogenannte sublytische Konzentrationen des MAC („sublytic“ MAC) können an bestimmten Zellen (z.B. RPE) zur Anregung intrazellulärer Signalkaskaden (1. via Ras/Erk \rightarrow Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern; 2. via Src \rightarrow Membrandepolarisation \rightarrow Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle = VDCC) mit folgender Sekretion von VEGF führen (84,123, s. Abbildungen 15 und 16).

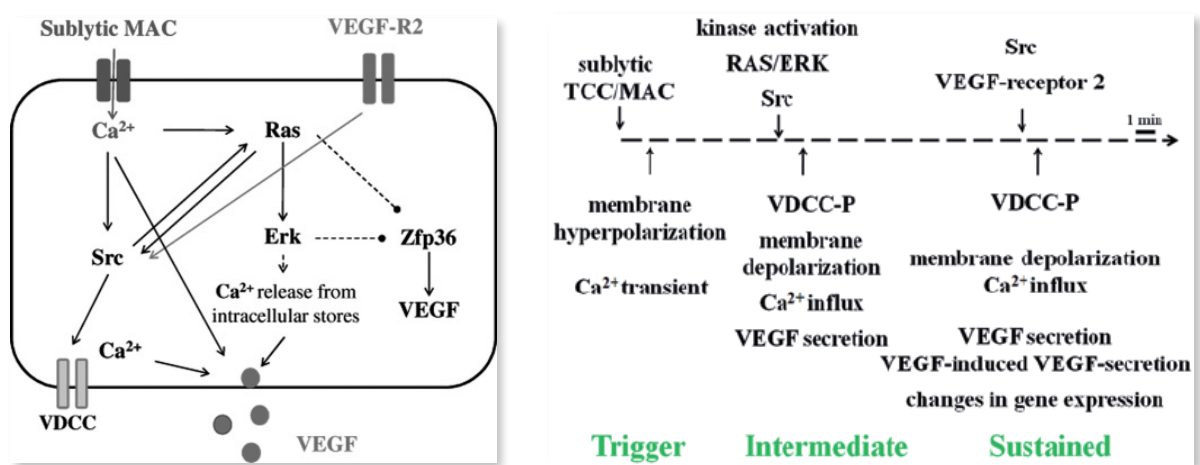


Abbildung 15/16: Komplement-induzierte, Ca^{2+} -abhängige VEGF-Sekretion am RPE (84,123)

Ebenso wie die Komplementproteine sind Inflammasome (zytosolische Proteinkomplexe) Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Sie stellen zentrale Mediatoren der Entzündungsreaktion dar, die durch eine Vielzahl von Molekülen koordiniert werden. Auch Inflammasome können durch „sublytic MAC“ Ca^{2+} -abhängig aktiviert werden (120, s. Abbildung 17). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung erfolgt dabei hauptsächlich durch Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (u.a. über den Inositol-1,4,5-Triphosphat- und Ryanodin-Rezeptor).

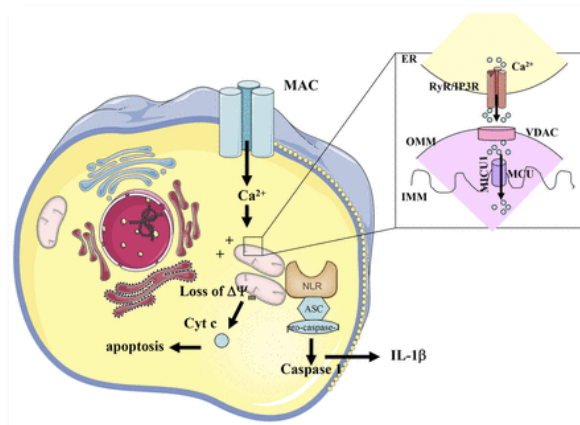


Abbildung 17: Modell Inflammasom-Aktivierung durch sublytic MAC (120)

Die im Verlauf der Komplementaktivierung entstehenden Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a ziehen Makrophagen und Monozyten an bzw. aktivieren sie. So wird durch die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ sowie Interleukinen die Inflammation gefördert (67).

Die Stimulation der Endothelzellen durch Anaphylatoxine führt über Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen zur Zusammenlagerung von Leukozyten. Adhärenente Leukozyten können nun die vermehrt permeablen Gefäße (Wirkung von Histamin aus Mastzellen) durchwandern, um im Gewebe Infektionen zu bekämpfen (68,69).

Das Komplementsystem und seine Mediatoren bedürfen, u.a. im immunprivilegierten Augeninneren, ständiger Kontrolle und Regulierung, um eine ausreichende, aber nicht überschießende Immunantwort sicherzustellen. Zentrale Ansatzpunkte der Steuerung sind dabei die C3- bzw. C5-Konvertase sowie die Bildung des TCC. Die zuvor erwähnten inhibitorischen Proteine kommen membrangebunden (MCP/CD46, DAF/CD55, CD59) oder in löslicher (CFH, FHL1) Form vor, können vom RPE exprimiert werden (vgl. Kap. 2.1.2) und führen zu

verminderter Bildung, erhöhtem Zerfall bzw. Inaktivierung der C3-Konvertase (CFH, DAF, FHL1, MCP). CFH mit Polymorphismen mit AMD-Risikoassoziation besitzen eine schlechtere Affinität zu C3 und können die C3-Konvertase entsprechend weniger in ihrer Funktion hemmen. Die Zusammenlagerung von C9-Molekülen bzw. die Bildung des TCC kann durch Wirkung von CD59 verhindert werden (89).

3. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Hypothese: Das RPE interagiert spezifisch (u.a. über Ca^{2+} als second messenger) mit Komponenten des Komplementsystems, wodurch es zu einer Änderung des funktionellen Phänotyps kommen kann, der pro-angiogen, pro-inflammatorisch und somit auch relevant im Kontext der AMD-Entstehung ist.

Folgenden Fragen wurde in der Arbeit zur Prüfung der Hypothese nachgegangen:

1. Fähigkeit aktiven Komplements, charakteristische Ca^{2+} -Antworten zu induzieren
2. Anteile der Anaphylatoxine und des terminalen Komplexes an einem Ca^{2+} -Signal
3. Interaktionen und Wirkmechanismen der Komponenten des Komplementsystems in Bezug auf intrazelluläres Ca^{2+}

Aus den Ergebnissen ergaben sich wiederum folgende Implikationen:

Effekte der Komplementfaktoren über Ca^{2+} hinaus auf Funktionen des retinalen Pigmentepithels (Proteinsynthese, Expression Transkriptionsfaktoren, Genexpression, Sekretion Wachstumsfaktoren bzw. Interleukine) im Kontext eines pro-inflammatorischen, pro-angiogenen Umfeldes (76-78) sowie ein durch Komplement induzierter, möglicher Switch im Phänotyp des RPE.

Das AMD-Risiko steigt durch eine vermehrte Komplementaktivierung (Gen-Polymorphismen von Komplement-Komponenten, Komplementproteine in Drusen (82)). Eine verminderte inhibitorische Kontrolle über den alternativen Signalweg (Bildung von C3a, C5a, terminaler C5b-9-Komplex) scheint über VEGF zur exsudativen AMD führen zu können (83-85).

Da Bildung und Sekretion von VEGF Ca^{2+} -abhängig (TRPV2- u. L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (86,126)) im RPE stattfindet, wird im Ausblick diskutiert, inwiefern das RPE eine aktive Rolle bei Prozessen der Immunmodulation bzw. der AMD-Genese spielen kann.

Folglich setze ich mich abschließend auch mit möglichen komplement-basierten Therapieansätzen auseinander.

4. Material und Methodik

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte und Zubehör

Autoklav (Systec GmbH, Wetzlar)

Brutschrank (Heraeus Instruments, Osterode)

Doppelspatel, flach (Bochem Instrumente GmbH, Weilburg)

Einmal-Wägeschalen 41x41x8mm (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)

Einweg-Transferpipetten (Sarstedt, Nümbrecht)

Eppendorf-Cups 0,2/ 1,5/ 2ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Falconröhrchen 15/ 50ml (Corning Science México S.A. de C.V.)

Feinwaage (Sartorius AG, Göttingen)

Glas-Coverslips 15mm Durchmesser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Glastrichter (Duran, Mainz)

Glasbecher 500ml (Merck, Darmstadt)

Heißluftsterilisator (Melag Medizintechnik GmbH, Berlin)

Integra Pipetboy (Integra Biosciences Group, CH-Zizers)

Kühlschrank (Bosch, Stuttgart)

Kühltruhen -20°C; -80°C (Liebherr, Bulle, Schweiz)

Laborflasche, Weithals 1000ml (Duran, Mainz)

6- und 12-Lochplatten für Zellkulturen (Corning Incorporated, NY, USA)

Magnetplatte, Magnetrührer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Mikroskop DM IRB (Leica, Wetzlar)

Petrischalen 4cm; 10cm; 14cm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

pH-Meter (SI Analytics, Mainz)

Pipettenspitzen (10-1000ul) (Sarstedt, Nümbrecht)

Plattenzentrifuge (Heraeus Instruments, Osterode)

Spatellöffel (Bochem Instrumente GmbH, Weilburg)

Sterilbank (Kendro Laboratory Products, Hanau)

Sterilfilter Porengröße 0,45/ 0,22 um (Munktell, Heidelberg)

Tubes 50ml (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen)

Wasserbad (Köttermann Labortechnik, Uetze)

Zellkultur-Flaschen 25cm² (Corning Incorporated, NY, USA)

4.1.2 Chemikalien, Kits und sonstige Materialien

Accutase (PAA, Pasching, Österreich)

Calciumchlorid (Merck, Darmstadt)

D(+)-Glucose (Monohydrat) (Merck, Darmstadt)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich Life Science, Steinheim)

DMEM/ Ham's F12 Flüssigmedium (BioConcept, Allschwill-CH)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (gibco by life technologies, Carlsbad, USA)

Ethanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Fetales Kälberserum (gibco by life technologies, Carlsbad, USA)

Fura-2, AM (Thermofischer, Waltham, USA)

HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)

Magnesiumchlorid x 6H₂O (Merck, Darmstadt)

Magnesiumsulfat 1-hydr. (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Natriumbikarbonat 7,5% (w/v) (Merck, Darmstadt)

Natriumchlorid (NaCl) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) (Merck, Darmstadt)

Penicillin/ Streptomycin (gibco by life technologies, Carlsbad, USA)

Propanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Standardisiertes Human Serum (NHS, Complement Technology, Tyler, Texas USA)

TRIS (Tris(hydroxymethyl)- aminomethan) (Merck, Darmstadt)

Trypsin-EDTA (gibco by life technologies, Carlsbad, USA)

4.1.3 Proteine und Seren

- C3-,C5-,C6-,C7-depletiertes Serum (25%)
- C3a-, C5a humanes Complement-Protein (350nM bzw. 260-350nM)
- C3a-, C5a desArg humanes Complement-Protein (384nM bzw. 357nM)
- sC5b-9 Complex humanes Complement-Protein (60nM)

- Hersteller Complement Technology, Inc. (Tyler, Texas, USA)
- in Klammern Angabe der verwendeten Konzentrationen während Ca²⁺-Imaging
- Puffern der Proteine nach Herstellerangaben in PBS-Lösung bzw. 10mM HEPES/120mM NaCl-Lösung
- Herstellung der entsprechenden Konzentrationen durch Verdünnung in Pufferlösung bzw. Extrazellulär-Lösung (s.u.)

4.1.4 Medien, Lösungen und Puffer

Zellkulturmedien

ARPE-19-Proliferationsmedium (500ml)

421,7 ml DMEM/ Ham's F12

5 ml Penicillin/Streptomycin (100X)

50 ml fetales bovines Serum

23,3 ml Natriumbikarbonat-Lösung 7,5% w/v

ARPE-19 serumfreies Medium (500ml)

471,7 ml DMEM/ Ham's F12

5 ml Penicillin/ Streptomycin (100X)

23,3 ml Natriumbikarbonat-Lösung 7,5% w/v

Extrazellulär-Lösung

136 mmol/L NaCl

5,8 mmol/L KCl

0,41 mmol/L MgSO₄

0,48 mmol/L MgCl₂ 1xH₂O

0,95 mmol/L CaCl₂ 2xH₂O

4,17 mmol/L NaHCO₃

1,1 mmol/L NaH₂PO₄ 1xH₂O

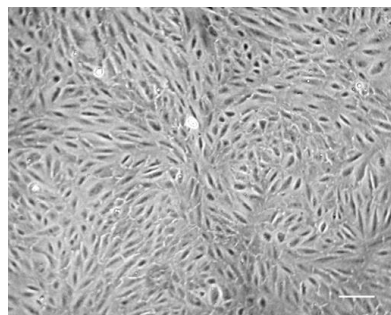
25 mmol/L HEPES

11,1 mmol/L Glucose

Im Anschluss erfolgten eine Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 mittels TRIS-Base (0,5 mol/L) und eine Sterilfiltration der Lösung.

4.1.5 ARPE-19-Zelllinie

ARPE-19 ist eine spontan gewachsene, humane retinale Pigmentepithel-Zelllinie. Sie wurde 1986 aus den Augen eines 19-jährigen Mannes gewonnen, der bei einem Motorradunfall ums Leben kam. Die RPE-Zellen sind diploid und in der Lage, durch Tight-Junctions verknüpfte epitheliale Monoschichten zu bilden. Die Expression der RPE-Antigene CRALBP und RPE65 zeigt, dass die genannte Zelllinie über funktionelle Eigenschaften der RPE-Zellen in vivo verfügt. Zusammenfassend eignet sich die ARPE-19-Zelllinie daher für in-vitro-Experimente retinalen Pigmentepithels (71,72). Die verwendete Zelllinie entstammt LGC Standards/ ATCC, Deutschland (CRL-2302 TM, LOT 58280268).



*Abbildung 18: Lichtmikroskopie ARPE-19-Zellen
hohe Konfluenz, Glas-Coverslip, weißer Balken = 50µm (70)*

4.2 Methodik

4.2.1 Zellkultur

Das Arbeiten mit der Zelllinie ARPE-19 erfolgte stets unter Beachtung und Einhaltung steriler Verhältnisse an einer sterilen Werkbank. Es wurden autoklavierte Materialien und Lösungen verwendet. Kontaminierte Materialien und Lösungen wurden umgehend per Autoklav entsorgt. Die Kultivierung der Zellen fand in einem Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ statt. Alle Medien und Lösungen zur Behandlung der Zellen wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellen befanden sich in einer Zellkulturflasche (25cm²) und wurden jeden fünften Tag bzw. bei 90% Konfluenz passagiert. Hierbei wurden nach dem Absaugen des Mediums die Zellen mit 5 ml sterilem PBS vorsichtig gewaschen, um Zellreste und verbliebenes Medium zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen verwendete ich 3-5 ml Trypsin/EDTA (0,025% Trypsin, 0,01% EDTA in PBS), welches für fünf Minuten bei 37°C im Zellkulturschrank einwirkte. Das Ablösen der ARPE-19-Zellen konnte am Mikroskop anhand ihrer typischen kugelförmigen Abrundung und gesteigerten Beweglichkeit während des Schwenkens der Zellkulturflasche kontrolliert werden. Die Trypsinwirkung wurde durch Zugabe von 7ml FCS-haltigem Medium abgestoppt. Noch anhaftende Zellen wurden mittels Pipettenstrahl abgespült. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50-ml Falconröhrchen überführt und bei 800 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zell-Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Ein zuvor mit 5ml Medium befülltes Kulturbehältnis wurde in einem adäquaten Verhältnis mit ARPE-19-Zellen beimpft (72).

4.2.2 Standardisiertes Humanserum

Alle Experimente wurden mit käuflich zu erwerbendem standardisiertem Humanserum durchgeführt, welches zu diesem Zwecke aliquotiert und bei -20 °C gelagert wurde. Durch Verdünnung mit extrazellulärer Lösung erfolgten alle Messungen bei einer Konzentration von 25%. Hitzeinaktivierung des Serums erfolgte durch 45-minütiges Inkubieren unter Heißluft bei 56 °C.

4.2.3 Ca²⁺-Imaging

Non-invasive Methoden zur Analyse des intrazellulären Ca²⁺-Signals und einhergehender Regulationsmechanismen spielen eine große Rolle, um Zellfunktionen besser verstehen zu können. Die Entwicklung geeigneter Fluoreszenzmikroskope und Ca²⁺-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe lieferte hierbei überhaupt erst die technischen Möglichkeiten. Im Rahmen unserer Experimente verwendeten wir den Farbstoff Fura-2, welcher Chelatkomplexe mit Ca²⁺-Kationen bildet.

Er besitzt, im Vergleich zu anderen Farbstoffen wie beispielsweise Quin-2, den Vorteil einer ca. 30-fach stärkeren Fluoreszenz. Zusätzlich bindet Fura-2 selektiver an Ca²⁺ als an andere im Zytosol befindliche Ionen wie z.B. Magnesium, Zink oder Eisen (74), wobei gleichzeitige Wechselwirkungen mit anderen zellulären Vorgängen minimal sind. Nachteilig ist die Abpufferung von Ca²⁺ durch Fura-2, welche bei hohen Konzentrationen in einer signifikanten Reduzierung des gemessenen Peaks des Ca²⁺-Transienten resultieren kann. Selbige Effekte bestehen allerdings auch bei anderen Farbstoffen wie Indo-1. Weiterhin erlaubt die stark erhöhte Fluoreszenz den Einsatz niedrigerer Konzentrationen des Farbstoffs.

Eine Bindung an Acetoxymethylester (AM) ermöglicht Fura-2 die passive Diffusion in die Zelle. Innerhalb der Zelle spalten endogene Esterasen das AM ab. Fura-2 wird somit wieder reaktiviert und am Austritt aus der Zelle gehindert (73,74).

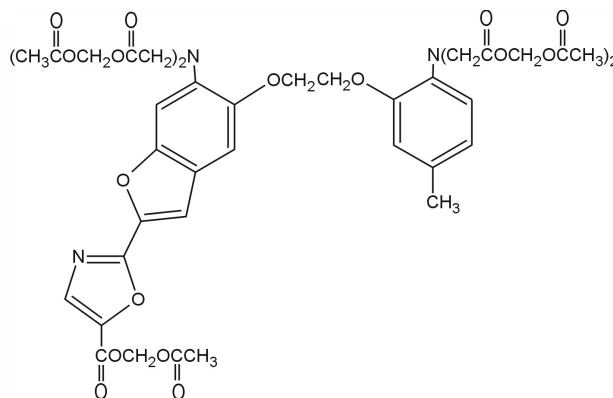


Abbildung 19: Struktur Fura-2 AM

(81)

Das Grundprinzip der Durchführung unserer Experimente besteht darin, dass Fura-2 als Ca^{2+} -sensitiver Farbstoff durch UV-Licht (250 bis 450 nm) angeregt werden und im sichtbaren Bereich fluoreszieren kann. Anregungswellenlängen von $\lambda_{\text{ex}}= 340$ und $\lambda_{\text{ex}}= 380$ nm erzeugen hierbei eine größtmögliche Ca^{2+} -abhängige Änderung der Fluoreszenzintensitäten; bei $\lambda_{\text{ex}}= 360$ nm ist die Fluoreszenz unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration (sog. isobestischer Punkt).

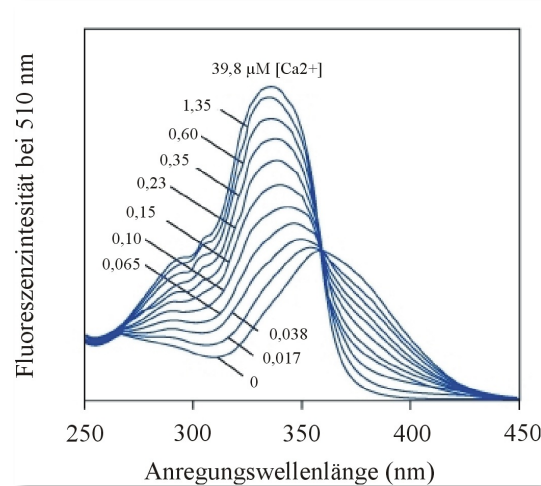


Abbildung 20: Abhängigkeit Fluoreszenzintensität Fura-2 von der Anregungswellenlänge
Zahlen zu den Kurven geben die jeweilige freie Ca^{2+} -Konzentration an (96)

Aus dem Quotienten (Ratio, R) der beiden resultierenden Fluoreszenzintensitäten (340 u. 380 nm) kann nun mithilfe folgender Formel der intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) errechnet werden, wobei mit steigendem intrazellulärem Ca^{2+} die angeregte Fluoreszenz bei 340 nm ansteigt und bei 380 nm abnimmt (antiparalleles Verhalten); die optimale Emissionswellenlänge liegt bei 510 nm.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times B \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

R = Ratio = Quotient beider Fluoreszenz-Intensitäten (340 und 380 nm)

R_{\min} = Fluoreszenzverhältnis in Ca^{2+} -freier Lösung

R_{\max} = Fluoreszenzverhältnis bei gesättigten Ca^{2+} -Konzentrationen

K_D = Dissoziationskonstante von Fura-2 (224nM)

B = Fluoreszenz-Quotient von Ca^{2+} -freier und Ca^{2+} -gesättigter Fura-2-Form bei 380nm.

(73,74)

Dabei kann unter folgenden Bedingungen die „Fura-Ratio-Methode“ angewendet und auf eine zeitaufwendige Kalibrierung des Fura-Signals verzichtet werden:

1. Beladung der RPE-Zellen
2. ausreichende Basisfluoreszenzen
3. stabile Baseline (s.u.)

Diese Methode ist weniger anfällig für Artefakte (u.a. ungenügende Verteilung, Konzentrationsunterschiede von Fura-2) und ermöglicht eine Messung von Konzentrationsunterschieden. Darstellungen von Absolutwerten des intrazellulären Ca^{2+} sind damit nicht möglich (73,74).

4.3 Setup

Das verwendete Setup beinhaltet ein konventionelles Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 40 CFL Inversionsmikroskop; Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) welches eine bis zu 200-fache Vergrößerung zulässt und eine Perfusions- bzw. Badkammer, worin sich die ARPE-19-Zellen befinden. Daran angebaut ist ein Polychromator (Visichrome High Speed Polychromator System; Visitron Systems, Puchheim/ Deutschland), welcher mittels einer Xenon-Lampe Licht jeglicher gewünschter Wellenlänge erzeugen kann. Ein dichroitischer Filter im Strahlengang zwischen Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung, dem Objektiv und der hochempfindlichen Kamera ermöglichte die gleichzeitige Fluoreszenzmessung und Anregung. Die Digitalisierung und Verarbeitung des Signals erfolgte an einem angeschlossenen Computersystem durch eine hochauflösende Kamera (CCD camera; CoolSNAP EZ, Photometrics) bzw. die MetaFluor Fluorescence Ratio Imaging Software (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland). Zeitgleich wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 340 bzw. 380 nm sowie die resultierende Ratio (R) in Microsoft Excel aufgezeichnet und berechnet.

4.4 Experimentelles Prozedere

4.4.1 Transfer der ARPE-19-Zellen auf Cover-Slips

Zuerst wurden Coverslips mit einer Pinzette auf Multiwell Zellkulturplatten (12-well, 1 Coverslip/Well) verteilt, welche mit 1 ml Proliferationsmedium befüllt wurden. Ich beimpfte im Anschluss jedes Well mit exakt einem Tropfen der in 4.2.1 beschriebenen Zellsuspension, um für die folgenden Messversuche eine optimale Zelldichte zu erreichen. Bis zur Durchführung weiterer Schritte erfolgte die Überführung der Zellkulturplatten in den CO₂-Inkubator.

4.4.2 Vorbehandlung der ARPE-19-Zellen

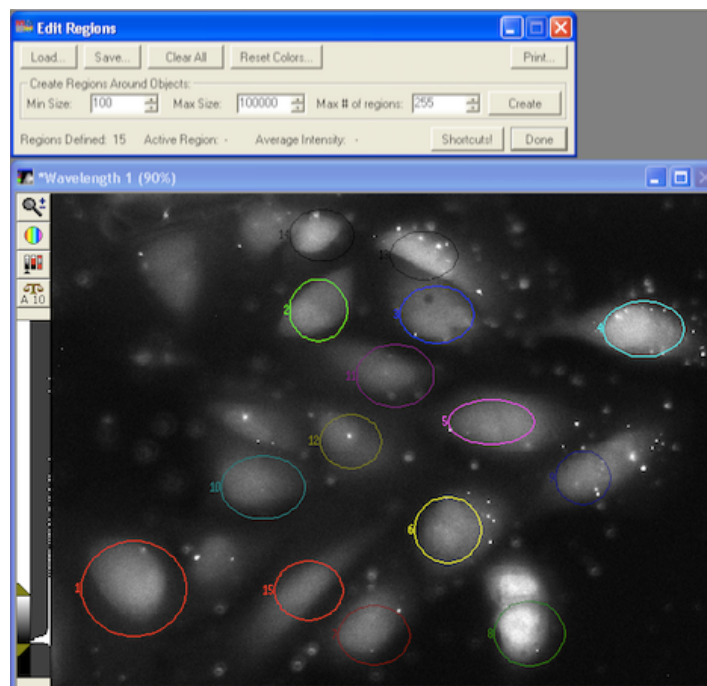
Um den Einfluss nicht abschätzbarer Wirkungen von Wachstumsfaktoren des fetalen Kälberserums auf ARPE-19-Zellen im Proliferationsmedium zu minimieren, erfolgte 24 Stunden vor Durchführung des Ca²⁺-Imagings ein Mediumwechsel zum Zwecke serumfreier Bedingungen.

4.4.3 Abbildungsverfahren (Imaging)

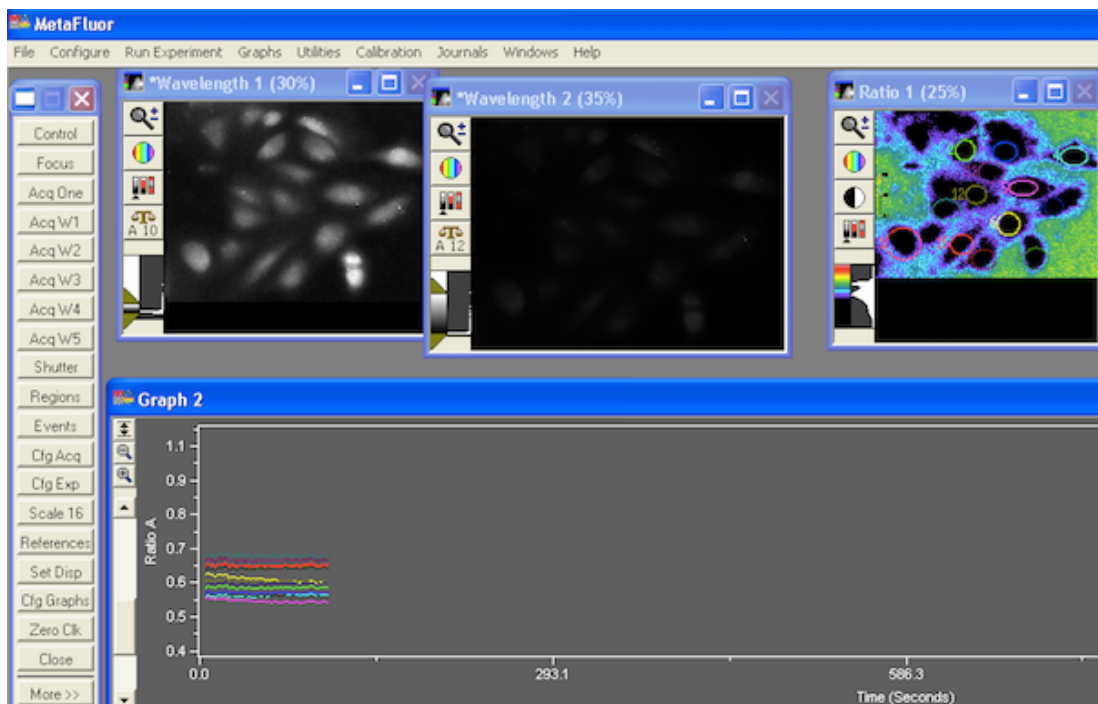
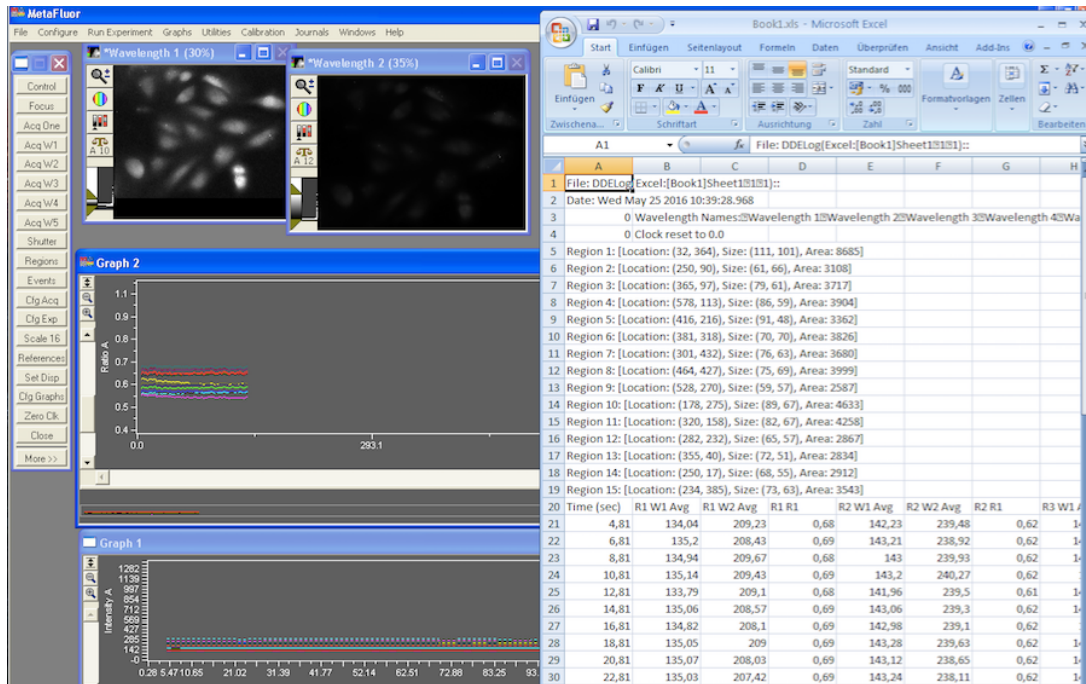
Alle Experimente fanden bei Raumtemperatur und maximaler Dunkelheit statt.

1. Beladen der Zellen mit Fura-2/AM: Die den Coverslips anhaftenden ARPE-19-Zellen werden 45 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ mit 2µM Fura-2/AM (in DMSO-Stammlösung) inkubiert.
2. Das Coverslip wird aus der Zellkulturplatte entnommen, zum Zwecke der Entfernung extrazellulär verbliebener Fura-2-Reste gründlich gespült und unter der Perfusionskammer befestigt, die Zugabe der unter 4.1.4 beschriebenen extrazellulären Lösung sollte schnellstmöglich erfolgen.

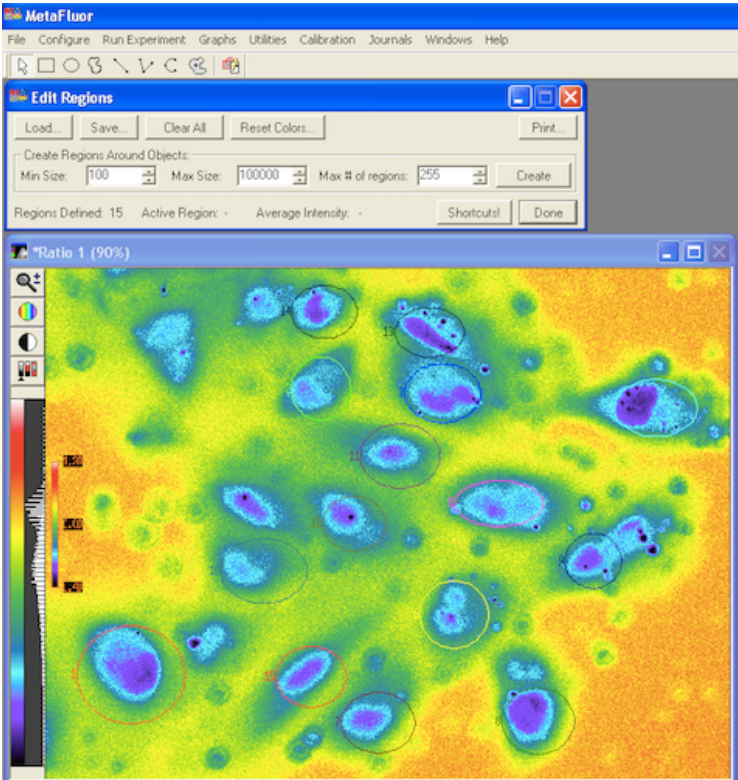
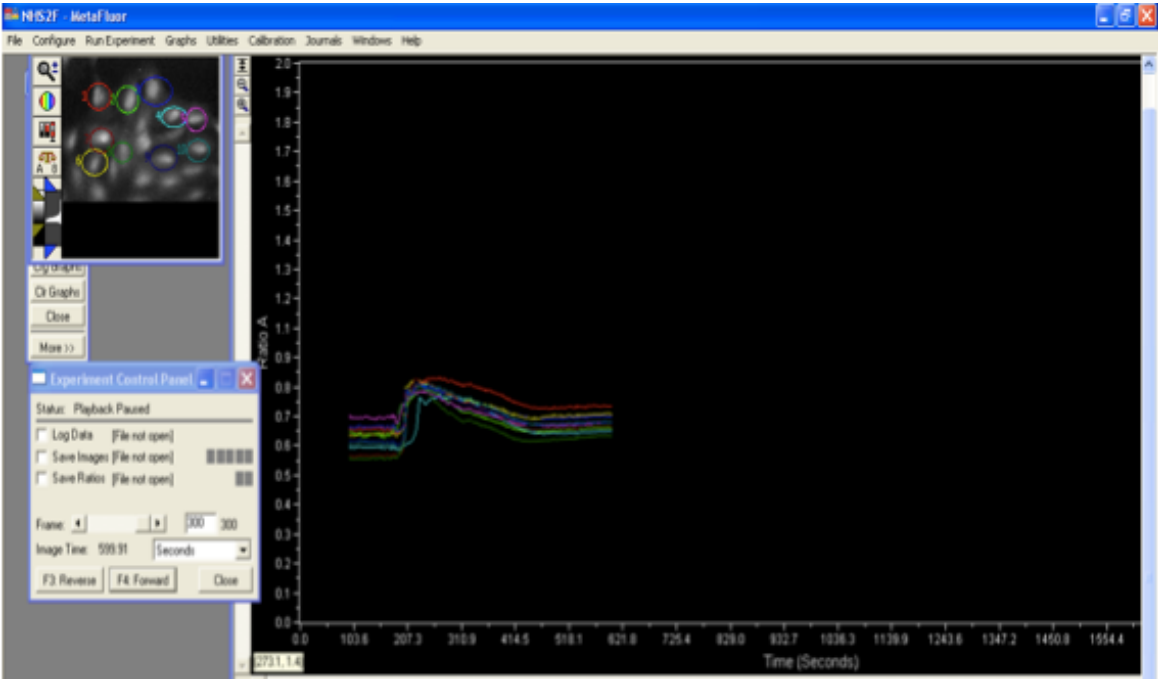
- Ein mit mittelgroßen Zellen ausreichend dicht beimpfter, gleichmäßig beladener Abschnitt des Coverslips wird bei 200-facher Vergrößerung nach Zugabe von Immersionsöl unter dem Mikroskop aufgesucht.
- Mithilfe der angeschlossenen Software werden nun manuell Areale/Zellen (=Region) markiert.



- Start der Messung: Die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitäten von Fura-2 erfolgt alle 2 Sekunden bei 340 (=W1 Avg) und 380 nm (=W2 Avg); der Quotient (R1, Ratio) aus beiden Fluoreszenzintensitäten wird ebenso berechnet und abgebildet, eine stabile Baseline (Ratio/R konstant bei 0,66) soll zuvor abgewartet werden.



6. Applikation Serum/ Reagenzien in entsprechender Konzentration nach 3 Minuten unter fortlaufender Aufzeichnung; Aufzeichnung für weitere 6 Minuten.



4.5 Datenerhebung und Statistik

1. Aufzeichnung der Rohdaten in Excel-Tabelle (vgl. Kap. 4.3 und 4.4.3)

Date: Sun Feb 1 2015 11:11:38.234													
Region 1: [Location: (11, 307), Size: (70, 77), Area: 4188]													
Region 2: [Location: (87, 67), Size: (105, 81), Area: 6591]													
Region 3: [Location: (264, 87), Size: (84, 61), Area: 3956]													
Region 4: [Location: (352, 139), Size: (104, 77), Area: 6200]													
Region 5: [Location: (336, 214), Size: (75, 91), Area: 5299]													
Region 6: [Location: (206, 248), Size: (66, 63), Area: 3208]													
Region 7: [Location: (241, 192), Size: (73, 59), Area: 3313]													
Region 8: [Location: (176, 150), Size: (51, 47), Area: 1855]													
Region 9: [Location: (188, 374), Size: (58, 54), Area: 2410]													
Region 10: [Location: (264, 382), Size: (60, 76), Area: 3516]													
Region 11: [Location: (342, 396), Size: (59, 62), Area: 2814]													
Region 12: [Location: (158, 471), Size: (71, 47), Area: 2583]													
Time (sec)	R1 W1 Avg	R1 W2 Avg	R1 R1	R2 W1 Avg	R2 W2 Avg	R2 R1	R3 W1 Avg	R3 W2 Avg	R3 R1	R4 W1 Avg	R4 W2 Avg	R4 R1	
5,35	132,93	202,16	0,68	142,43	222,7	0,66	139,14	213,74	0,66	138,67	214,65	0,67	
7,35	132,88	201,83	0,68	142,4	222,68	0,66	139,09	213,67	0,66	138,43	214,35	0,67	
9,35	133,2	202,24	0,68	142,67	222,95	0,66	139,5	213,92	0,67	138,83	214,65	0,67	
11,35	133,22	202,28	0,68	142,54	222,94	0,66	139,33	213,88	0,66	138,73	214,61	0,67	
13,35	133,2	201,89	0,68	142,65	222,47	0,67	139,33	213,5	0,67	138,86	214,46	0,67	
15,35	132,23	202,09	0,67	141,53	222,8	0,66	138,29	213,73	0,66	137,76	214,62	0,66	
17,35	132,29	202,41	0,67	141,69	223,1	0,66	138,44	213,87	0,66	137,9	214,89	0,66	
19,35	133,13	201,55	0,68	142,58	221,82	0,67	139,45	212,64	0,67	138,77	213,83	0,67	
21,35	132,48	202,13	0,68	141,64	222,89	0,66	138,48	213,81	0,66	137,86	214,85	0,66	
23,35	133,16	201,99	0,68	142,52	222,64	0,66	139,28	213,49	0,67	138,63	214,61	0,67	
25,35	133,25	202,4	0,68	142,71	222,97	0,66	139,43	213,87	0,67	138,85	214,95	0,67	
27,35	133,04	202,36	0,68	142,52	223	0,66	139,26	213,92	0,66	138,54	214,83	0,66	
29,35	132,23	201,45	0,68	141,59	221,91	0,66	138,52	212,88	0,66	137,9	213,79	0,67	
31,35	132,97	201,31	0,68	142,41	222,06	0,67	139,3	213,08	0,67	138,69	213,67	0,67	
33,35	132,69	202,01	0,68	142,21	222,86	0,66	138,97	213,97	0,66	138,32	214,62	0,66	
35,35	133,24	202,15	0,68	142,8	223,28	0,66	139,62	214,81	0,66	138,95	215,11	0,67	
37,35	132,88	202,26	0,68	142,5	223,35	0,66	139,37	214,75	0,66	138,73	215,05	0,67	
39,35	133,02	202,07	0,68	142,64	223,27	0,66	139,59	214,58	0,66	138,83	215,11	0,67	
41,35	132,37	201,92	0,68	141,86	223,12	0,66	138,7	214,47	0,66	138,08	214,74	0,66	

2. Datenbearbeitung

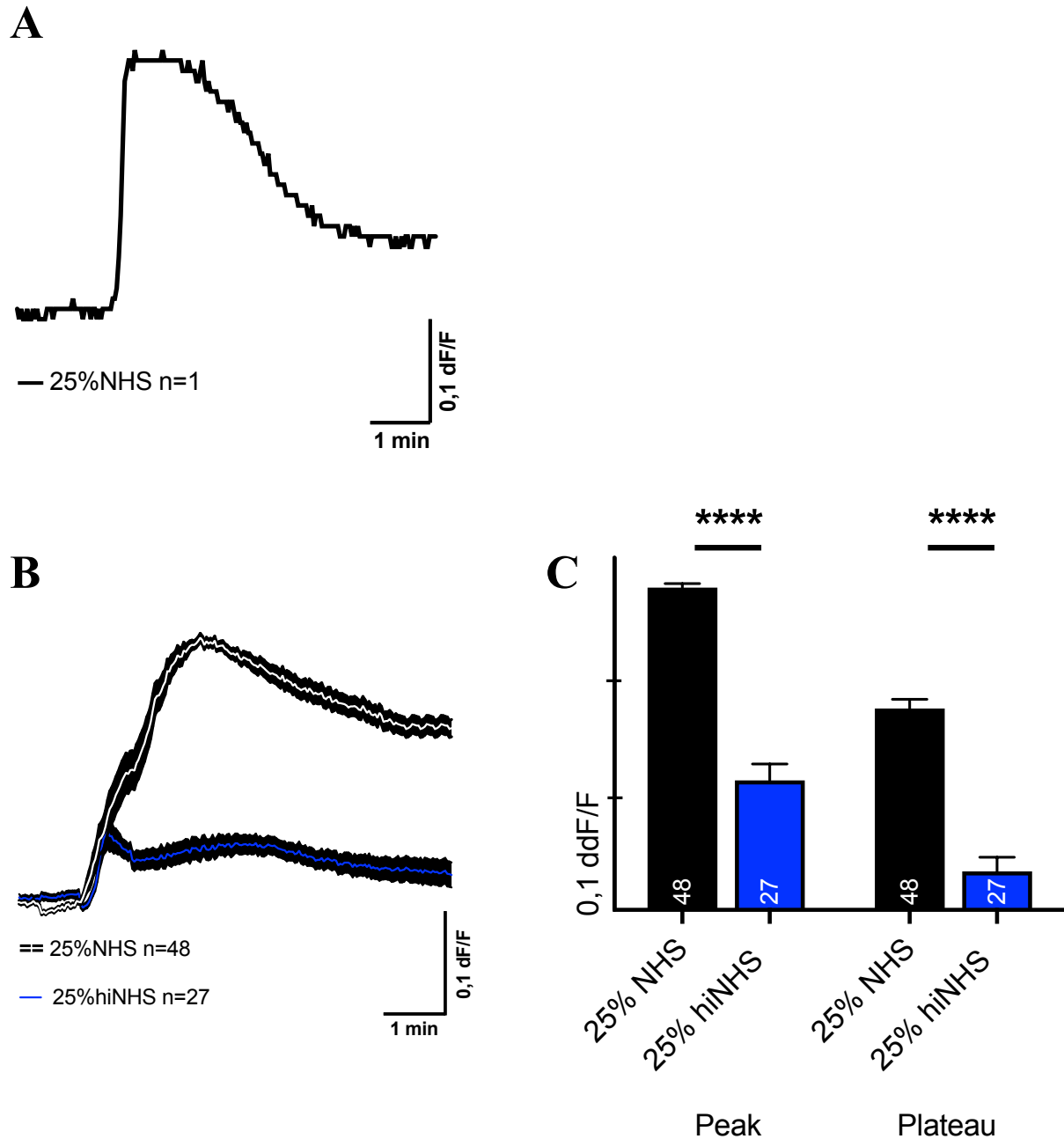
- Zur Vereinfachung der Darstellung und für die weitere Auswertung wurden nur Daten eine Minute vor Zugabe des Serums/der Reagenzien übernommen
- Definition Baseline: durchschnittlicher Quotient (Ratio) in Minute 1
- Definition Peak: Maximal erreichter Quotient (Ratio) für jede einzelne Zelle
- Definition Plateauphase: Quotient (Ratio) 6 Minuten nach Zugabe des Serums/der Reagenzien
- Es wurden ausschließlich Zellen mit Reaktionsverhalten in die Auswertung übernommen

3. Statistische Auswertung GraphPad Prism 8

- Daten sind Mittelwerte +/- SEM
- n-Zahl: jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt, wobei während eines Experiments mindestens 3 Zellen gemessen wurden
- Berechnung der statistischen Signifikanz mittels Mann-Whitney-U-Test
- Definition statistisches Signifikanzniveau:
- * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001; „ns“ = kein signifikanter Unterschied

5. Ergebnisse

5.1 Standardisiertes Humanserum führt zu Anstieg des freien intrazellulären Ca^{2+}



Grafik 1: Ca^{2+} -Anstiege durch NHS und hiNHS

(Konzentration jeweils 25%, Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 340$ und $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm); jeweils vier unabhängige Experimente:

(**A**, **B**) Darstellung der Messung einer einzelnen bzw. aller ausgewerteter Zellen ($n =$ Anzahl der Zellen, Mittelwerte \pm SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (**C**) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte \pm SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

In einem ersten Experiment wurden ARPE-19-Zellen mit 25% NHS als Komplementquelle stimuliert.

Es zeigte sich eine zweigeteilte Ca^{2+} -Antwort bestehend aus einem initialen Gipfel (= Peak; Mittelwert: 0,94 +/-0,004) und einer folgenden Plateauphase (Mittelwert: 0,83 +/- 0,01). Ersterer besteht in einem rapiden Konzentrationsanstieg, letztere ist durch eine relativ gleichbleibende, konstant hohe Ca^{2+} -Konzentration gekennzeichnet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ARPE-19-Zellen infolge der Stimulation durch NHS charakteristische Ca^{2+} -Veränderungen zeigten.

Hitzeinaktivierung von 25% NHS führte zu einer stark reduzierten Antwort; Peak (Mittelwert: 0,76 +/- 0,01) sowie Plateau (Mittelwert: 0,68 +/- 0,01) waren hoch signifikant vermindert.

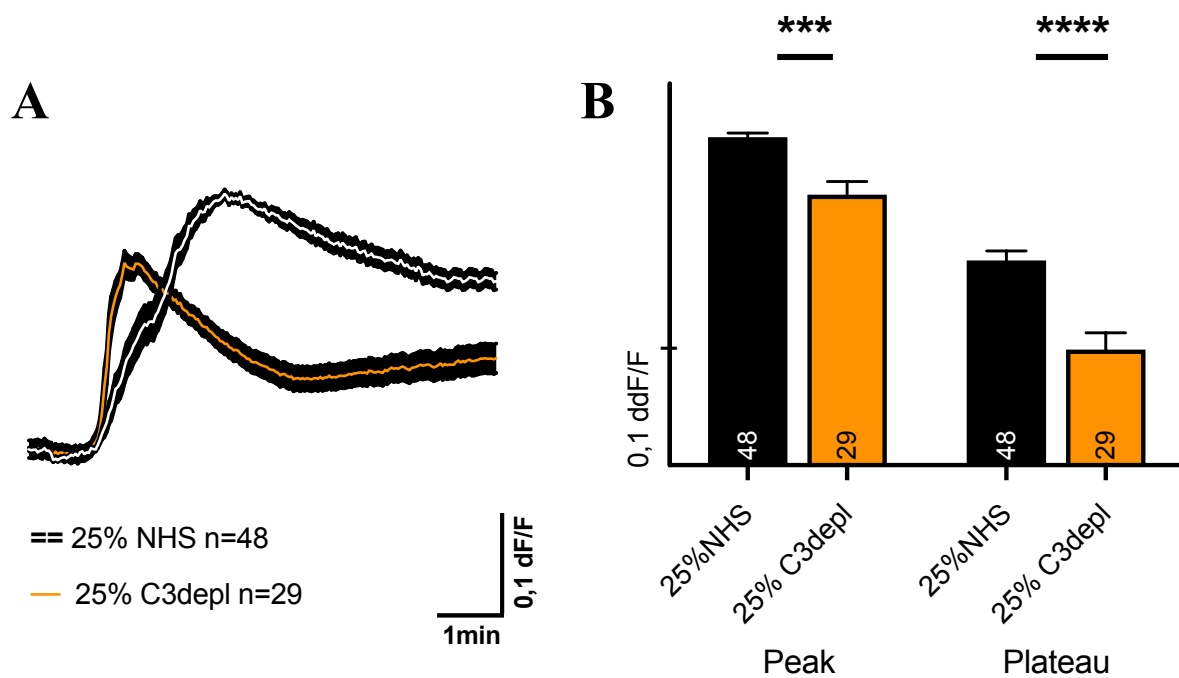
5.2 Einzelne Komplementfaktoren

Komponenten des Komplementsystems kommen in hoher Konzentration innerhalb des Serums vor, sind jedoch nicht seine einzigen hitzelablen Bestandteile. Wachstumsfaktoren, Chemo-, Zytokine und andere Proteine könnten somit ebenfalls zu den beobachteten Veränderungen geführt haben.

Es ist daher notwendig, die einzelnen Faktoren der Komplementkaskade des alternativen Signalwegs und ihre Auswirkungen auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel genauer zu untersuchen.

5.2.1 Komplementfaktor C3

C3depletiertes Serum

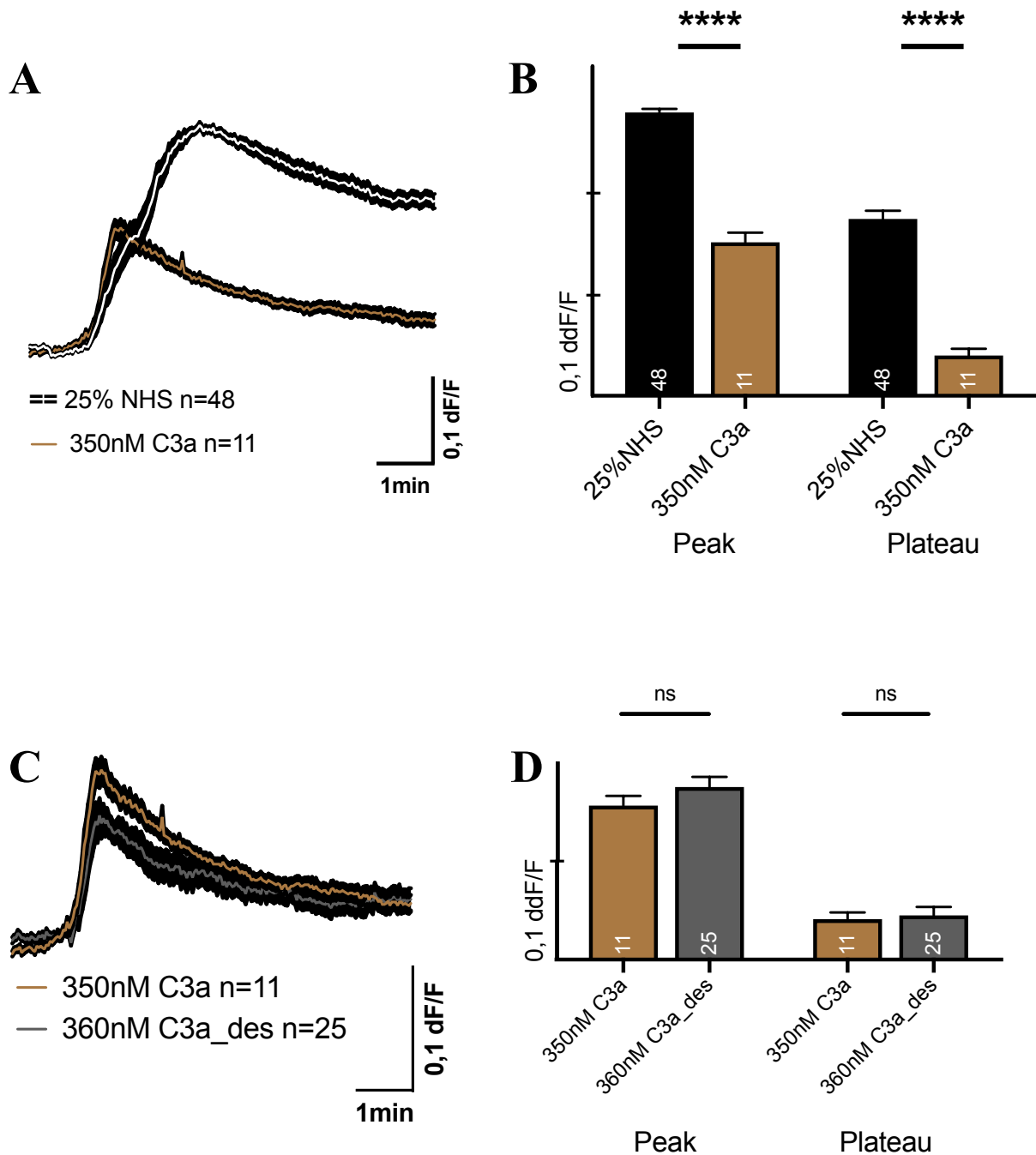


Grafik 2: Ca^{2+} -Anstiege durch NHS und C3depletiertes Serum

(Konzentration jeweils 25%, Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 340$ und $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm); jeweils vier unabhängige Experimente:

(A) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte \pm SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (B) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte \pm SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

(Desarginierter) Komplementfaktor C3a



Grafik 3: Ca²⁺-Anstiege durch NHS, C3a und desarginiertes C3a

(Konzentrationen: 25%, 350nM, 360nM; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}=340$ und $\lambda_{ex}=380$ nm), jeweils 1-4 unabhängige Experimente:

(A,C) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (B,D) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

Um die Abhängigkeit des Ca^{2+} -Signals von Aktivierungsvorgängen des Komplementsystems nachzuweisen, bietet sich die Untersuchung mittels Komplement depletierter Seren an. Durch Entfernung eines Komplementproteins könnte der Ablauf der Komplementkaskade an exakt einem Punkt unterbrochen werden.

Zellen, welche mit Serum ohne Komplementfaktor C3 stimuliert wurden, zeigten hierbei eine im Vergleich zu standardisiertem Humanserum deutlich reduzierte Reaktion. Peak (Mittelwert: 0,89 +/- 0,01) und Plateauphase (Mittelwert: 0,75 +/- 0,02) waren stark vermindert.

Neben dem Entfernen einzelner Faktoren können gezielt Bestandteile des Komplementsystems extrahiert und angereichert werden.

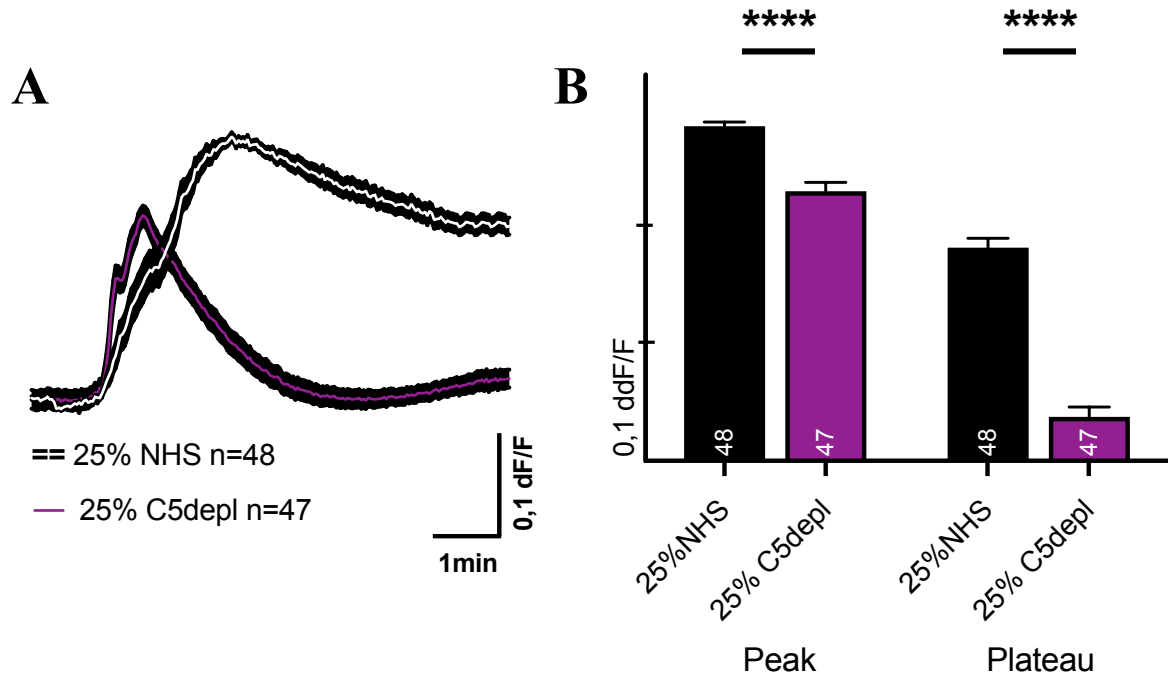
Der Komplementfaktor C3a konnte eine Veränderung des freien intrazellulären Ca^{2+} auslösen. Kennzeichnend waren ein schnelles Erreichen eines kurzen Peaks (Mittelwert: 0,80 +/- 0,01) und eine somit kaum vorhandene Plateauphase (Mittelwert: 0,69 +/- 0,007).

Desarginiertes, durch Entfernung der C-terminalen Aminosäure „abgeschwächtes“, C3a entsteht physiologisch innerhalb von Minuten nach Bildung des entsprechenden Komplementfaktors. Da es durchaus noch biologische bzw. stimulatorische Aktivität (1-10%, Quelle Comptech) besitzt, soll auch seine Wirkung auf den Ca^{2+} -Haushalt genauer betrachtet werden.

Hierbei zeigte sich eine dem Reaktionsverhalten durch C3a ähnelnde Signalantwort. Peak (Mittelwert: 0,82 +/- 0,01) und Plateauphase (Mittelwert: 0,69 +/- 0,01) unterschieden sich zu C3a nicht signifikant, Messungen mit desarginiertem C3a waren besser reproduzierbar.

5.2.2 Komplementfaktor C5

C5-depletiertes Serum

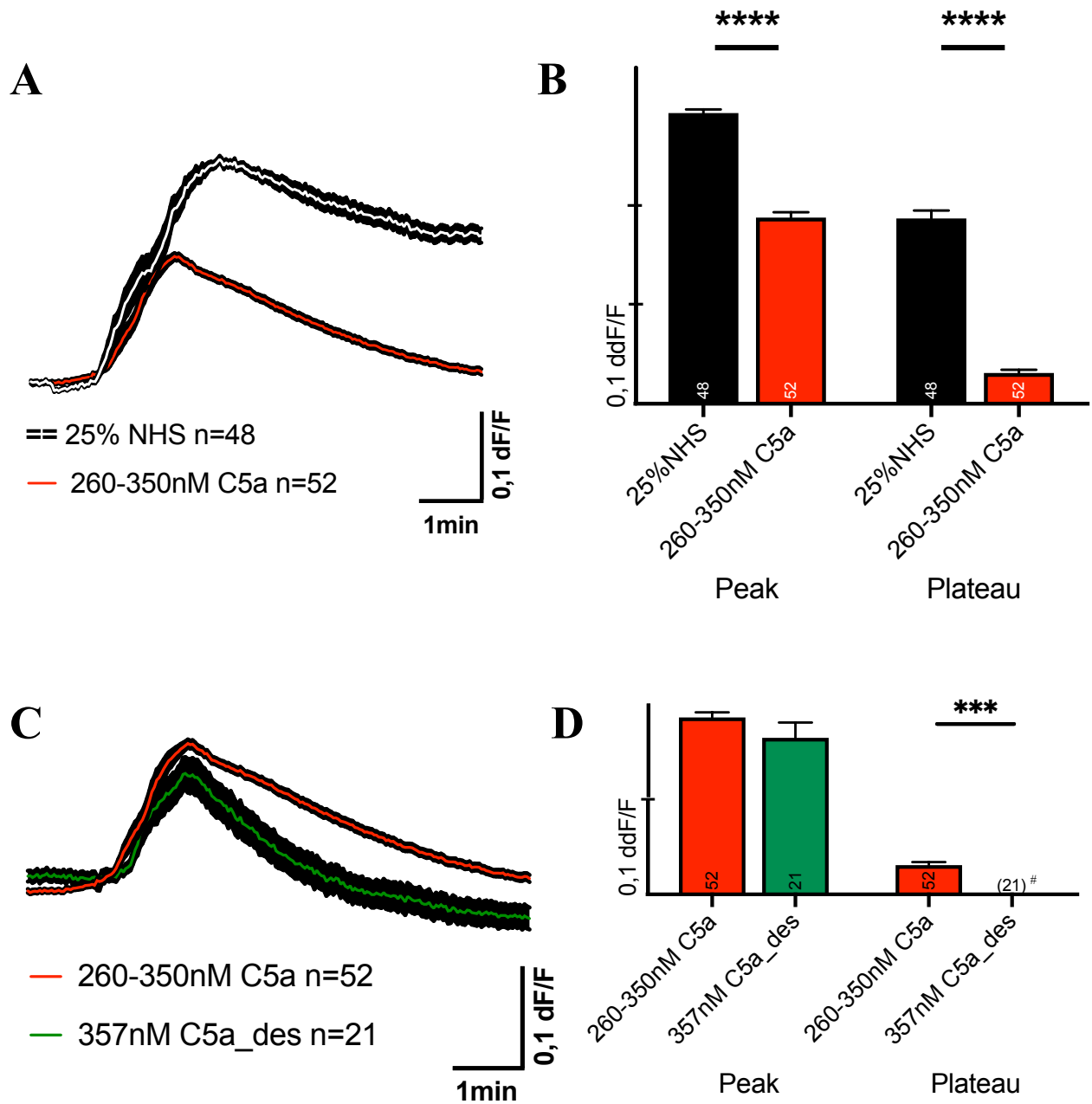


Grafik 4: Ca^{2+} -Anstiege durch NHS und C5depletiertes Serum

(Konzentration jeweils 25%, Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 340$ und $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm); jeweils 4-6 unabhängige Experimente:

(**A**) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (**B**) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

(Desarginierter) Komplementfaktor C5a



Grafik 5: Ca²⁺-Anstiege durch NHS, C5a und desarginiertes C5a

(Konzentrationen: 25%, 260-350nM, 357nM; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}=340$ und $\lambda_{ex}=380$ nm), jeweils 3-5 unabhängige Experimente:

(A,C) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (B,D) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

: unterhalb der Ausgangs-Baseline

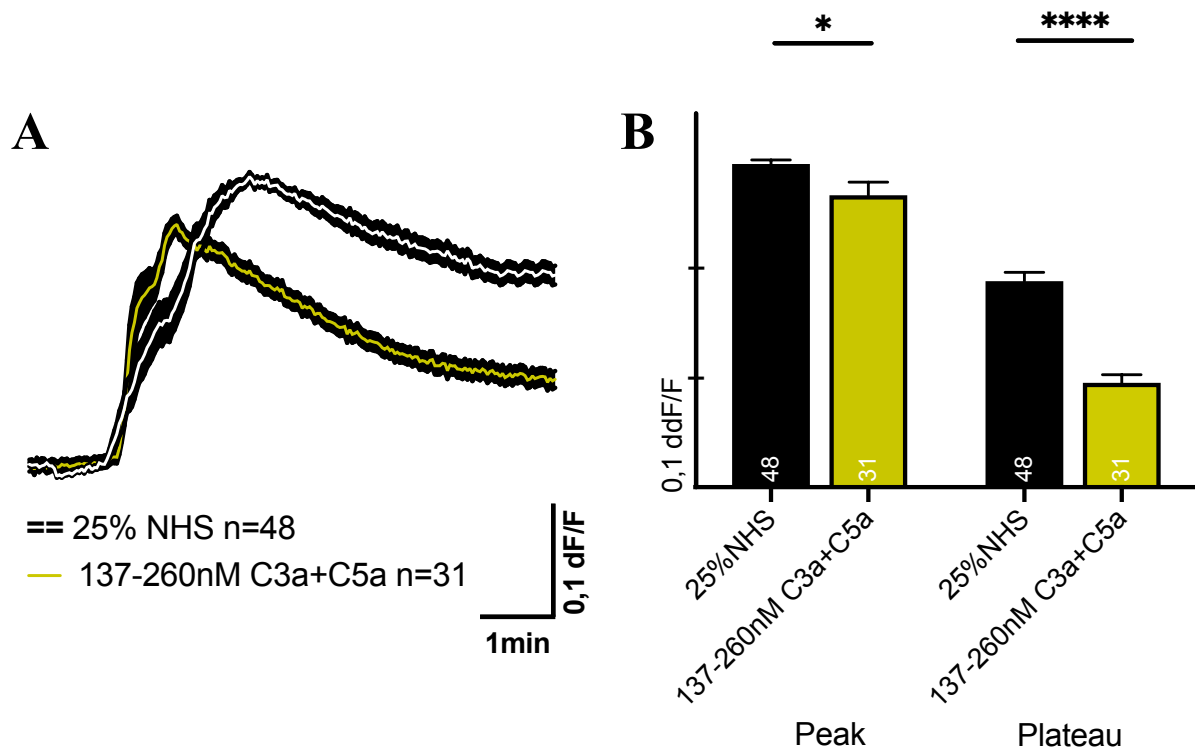
Dem weiteren Reaktionsablauf der Komplementkaskade folgend wurde anschließend Serum ohne Komplementfaktor C5 untersucht. Ich wollte somit Untersuchungsbedingungen schaffen, die sowohl die Bildung als auch die Wirkung von C5a, C5b und resultierend sC5b-9 verhindern. Zusammenfassend war insbesondere die Plateauphase auf ein Minimum reduziert (Mittelwert: 0,68 +/- 0,01). Der initiale Peak (Mittelwert: 0,88 +/- 0,01) erreichte nicht das Niveau des Anstiegs durch NHS, war jedoch vergleichend zum verstrichenen Plateau bedeutend geringer vermindert.

Untersuchte man nun wiederum die Veränderungen nach alleiniger Gabe des Anaphylatoxins C5a, ergab sich ähnlich den Versuchen mit C3a ein steiler, kurzer Peak (Mittelwert: 0,83 +/- 0,01) mit geringer Plateauphase (Mittelwert: 0,67 +/- 0,003).

Wie desarginiertes C3a (s. Kapitel 5.2.1) entsteht nach Bildung von C5a eine entsprechende desarginierte Form des Anaphylatoxins. Es besitzt ebenso noch biologische bzw. stimulatorische Aktivität (1-10% Quelle Comptech, s.o.).

Hierbei zeigte sich eine dem Reaktionsverhalten durch C5a ähnelnde, wenn auch verminderte, Signalantwort. Sowohl ausgelöster Peak (Mittelwert: 0,81 +/- 0,02; statistisch nicht signifikant) als auch Plateauphase (Mittelwert: 0,63 +/- 0,01) waren im Vergleich reduziert.

5.2.3 Komplementfaktoren C3a + C5a



Grafik 6: Ca²⁺-Anstiege durch NHS und C3a+C5a simultan

(Konzentrationen: 25%, 137-260nM; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}= 340$ und $\lambda_{ex}= 380$ nm); jeweils 3-4 unabhängige Experimente:

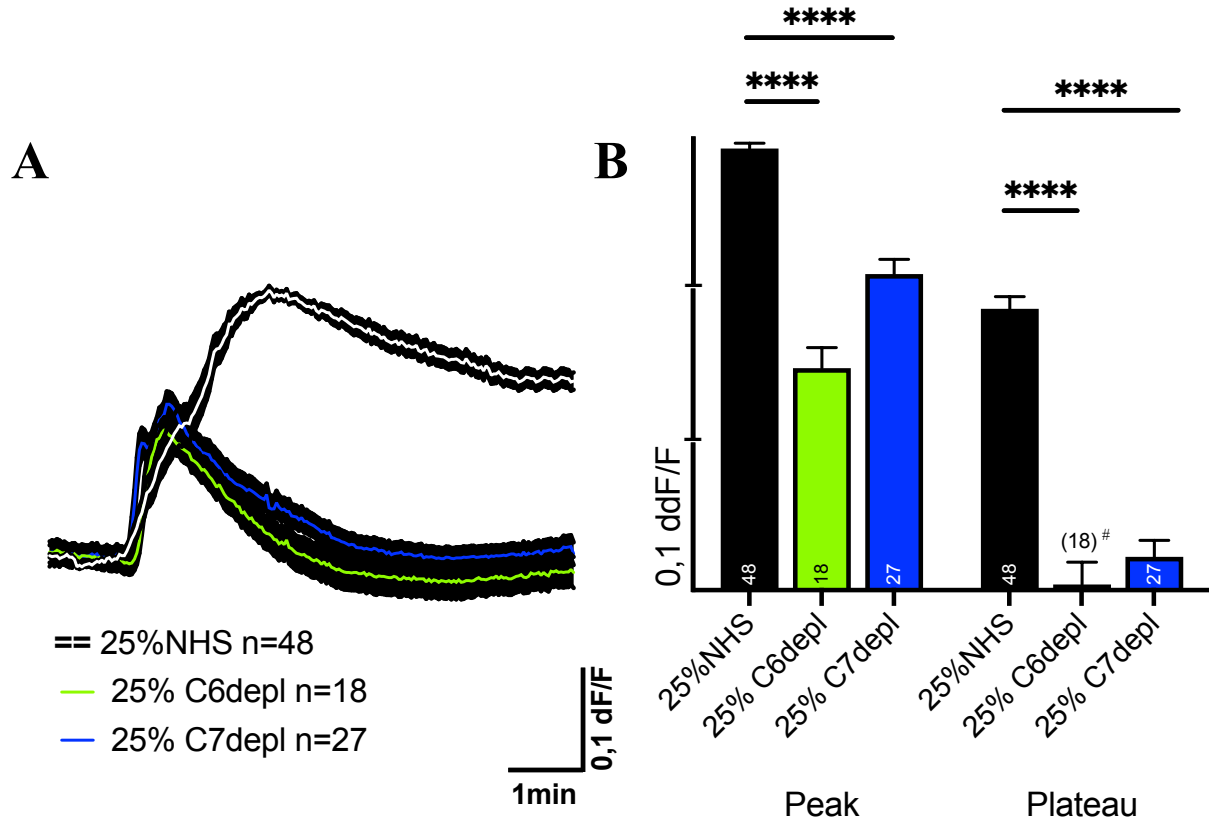
(A) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (B) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

Da im Ablauf der Komplementkaskade C3a und C5a in kurzem Zeitabstand folgend aktiv werden und zu Ca²⁺-Veränderungen führen, galt unser Interesse der Frage, ob beide Komplementfaktoren nicht nur unabhängig voneinander wirken, sondern gegebenenfalls miteinander interagieren. Zu diesem Zwecke wurden C3a und C5a simultan appliziert.

Es zeigte sich ebenfalls eine zweigeteilte Signalantwort bestehend aus Peak (Mittelwert: 0,91 +/- 0,01) und Plateau (Mittelwert: 0,74 +/- 0,01). Im Vergleich zu Messungen mit 25% NHS waren die Veränderungen signifikant reduziert. Hierbei war insbesondere die Plateauphase betroffen.

Weitere vergleichende Darstellungen und Auswertungen sind unter Kapitel 5.4 zusammengefasst.

5.2.4 Komplementfaktoren C6/C7 C6- und C7-depletiertes Serum



Grafik 7: Ca²⁺-Anstiege durch NHS und C6-/C7-depletiertes Serum

(Konzentrationen jeweils 25%; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}= 340$ und $\lambda_{ex}= 380$ nm); jeweils 4-5 unabhängige Experimente:

(A) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (B) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

: unterhalb der Ausgangs-Baseline

Abschließend wurde die Rolle des terminalen Komplexes untersucht. Somit sollte auch dargestellt werden, welche Bedeutung er am, durch standardisiertes Humanserum ausgelöst, gesamten Ca^{2+} -Signal besitzt.

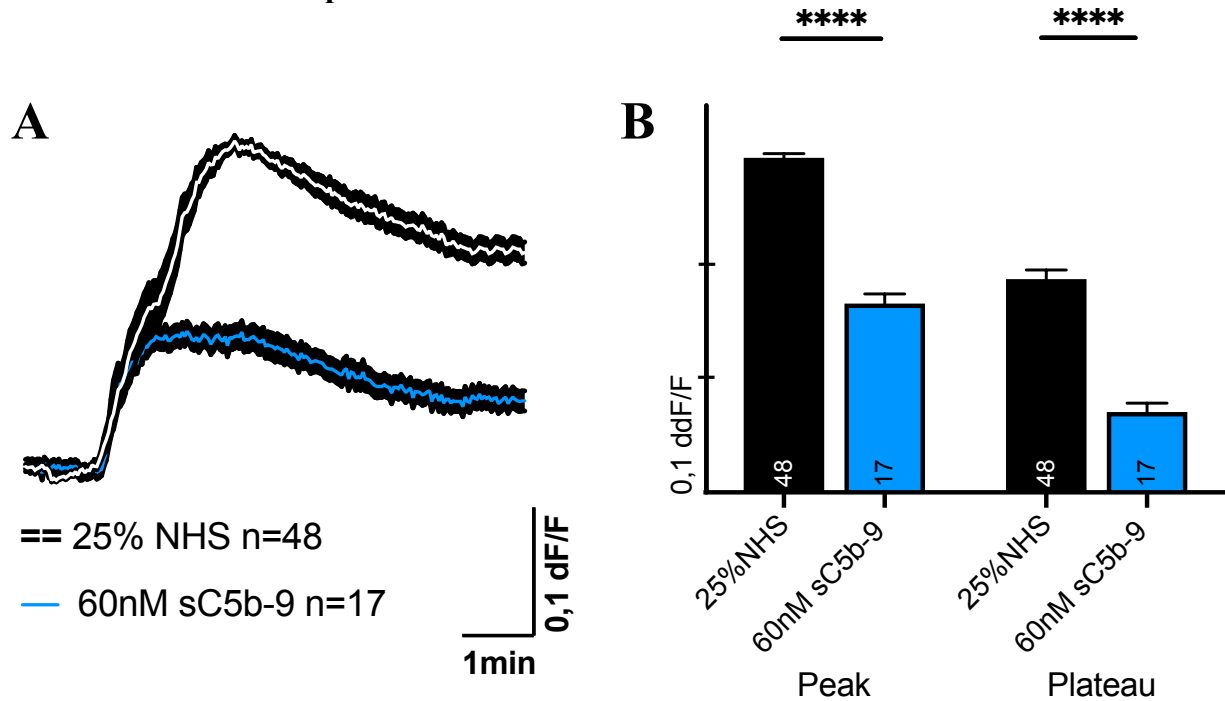
Mittels C6- bzw. C7-Depletion des Serums wurde eine Unterbrechung der Bildung des TCC bzw. des löslichen C5b-9-Komplexes nach Abspaltung des „Ankers“ C5b von C5 und vor Rekrutierung der Komplementfaktoren C6 bzw. C7 simuliert.

Sowohl ohne Komplementfaktor C6 als auch ohne C7 war das Ca^{2+} -Plateau (C6: Mittelwert: 0,64 +/- 0,02; C7: Mittelwert: 0,66 +/- 0,01) nahezu aufgehoben.

Der initiale Peak für C6- (Mittelwert: 0,79 +/- 0,01) bzw. C7-depletieretes Serum (Mittelwert: 0,85 +/- 0,01) war ebenso hoch signifikant reduziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Komponenten des sC5b-9-Komplexes eine große, wenn nicht sogar die wichtigste Rolle bei Veränderungen des freien intrazellulären Ca^{2+} , und hierbei vor allem im Bereich der Plateauphase, spielen.

5.3 Der terminale Komplex



Grafik 8: Ca²⁺-Anstiege durch NHS und sC5b-9

(Konzentrationen: 25%, 60nM; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen λ_{ex} = 340 und λ_{ex} = 380 nm); jeweils 2-4 unabhängige Experimente:

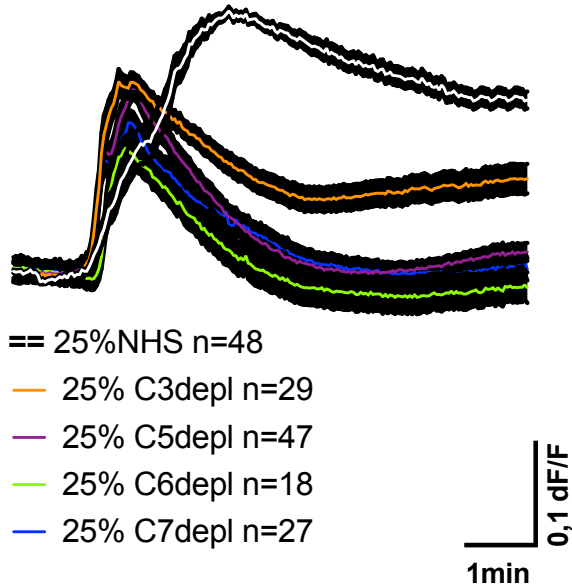
(A) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (B) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

Die Frage, ob der sC5b-9-Komplex, ähnlich wie die Anaphylatoxine C3a und C5a, zu einer eigenständigen Induktion eines Ca²⁺-Signals fähig ist und somit auch ohne vorherigen Ablauf der Komplementkaskade zu Veränderungen führen kann, soll in diesem Kapitel beantwortet werden. Ich stimulierte dabei ARPE-19-Zellen ausschließlich mit sC5b-9.

Interessanterweise traten hierbei Ca²⁺-Signale auf, welche nach Erreichen eines flachen Peaks (Mittelwert: 0,81 +/- 0,01) in eine relativ stetige Plateauphase (Mittelwert: 0,71 +/- 0,01) übergingen. Im Verhältnis zu den durch 25% NHS ausgelösten Veränderungen waren diese hoch signifikant vermindert. Abermals fanden wir eindeutige Hinweise darauf, dass sC5b-9 eine signifikante Bedeutung am durch Komplement veränderten Ca²⁺-Haushalt besitzt. Anzeichen einer Porenbildung durch den Membranangriffskomplex mit resultierender Lyse der Zellen konnten auch hier nicht beobachtet werden.

5.4 Gesamtvergleich

5.4.1 depletierte Seren vs. standardisiertes Humanserum



Grafik 9: Ca²⁺-Anstiege durch NHS und depletierte Seren

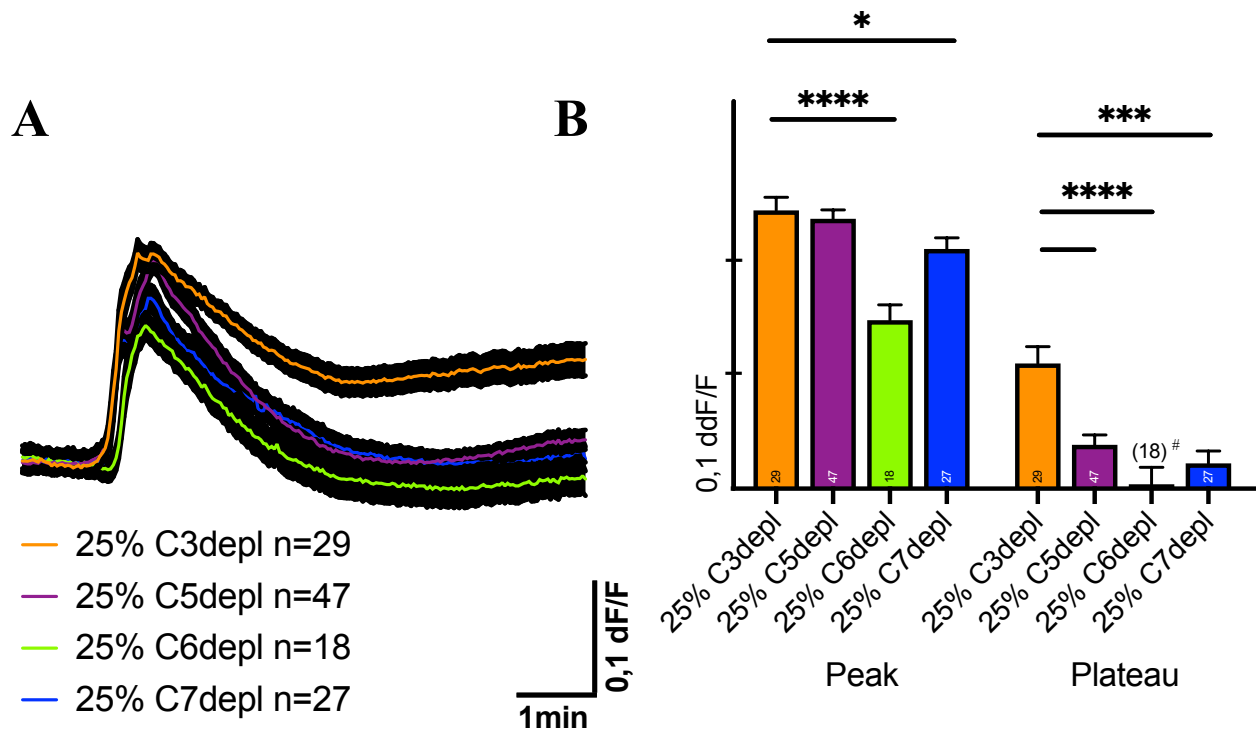
(Konzentration jeweils 25%; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}= 340$ und $\lambda_{ex}= 380$ nm im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F). Daten sind Mittelwerte +/- SEM. Die Anzahl der in jeweils 4-6 unabhängigen Experimenten ausgewerteten Zellen ist unter „n“ dargestellt.

Das letzte Kapitel des Ergebnisteils befasst sich nun mit umfassender vergleichender Darstellung der einzelnen Komplementfaktoren untereinander. Hier sollen insbesondere die genauen Bedeutungen der Anaphylatoxine C3a bzw. C5a sowie des terminalen Komplexes mitsamt seiner Einzelbestandteile dargestellt werden.

Grafik 9 stellt noch einmal zusammenfassend dar, wie sich Ca²⁺-Signale Komplement depletierter Seren und standardisierten Humanserums (Konzentration jeweils 25%) grundsätzlich voneinander unterscheiden.

Auffällig ist hierbei die deutlich verminderte Signalantwort durch Depletion einzelner Faktoren insbesondere im Bereich der Plateauphase.

5.4.2 C3-depletiertes Serum vs. C5-/C6-/C7-depletiertes Serum



Grafik 10: Ca²⁺-Anstiege durch depletierte Seren

(Konzentration jeweils 25%; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex} = 340$ und $\lambda_{ex} = 380$ nm); jeweils 4-6 unabhängige Experimente:

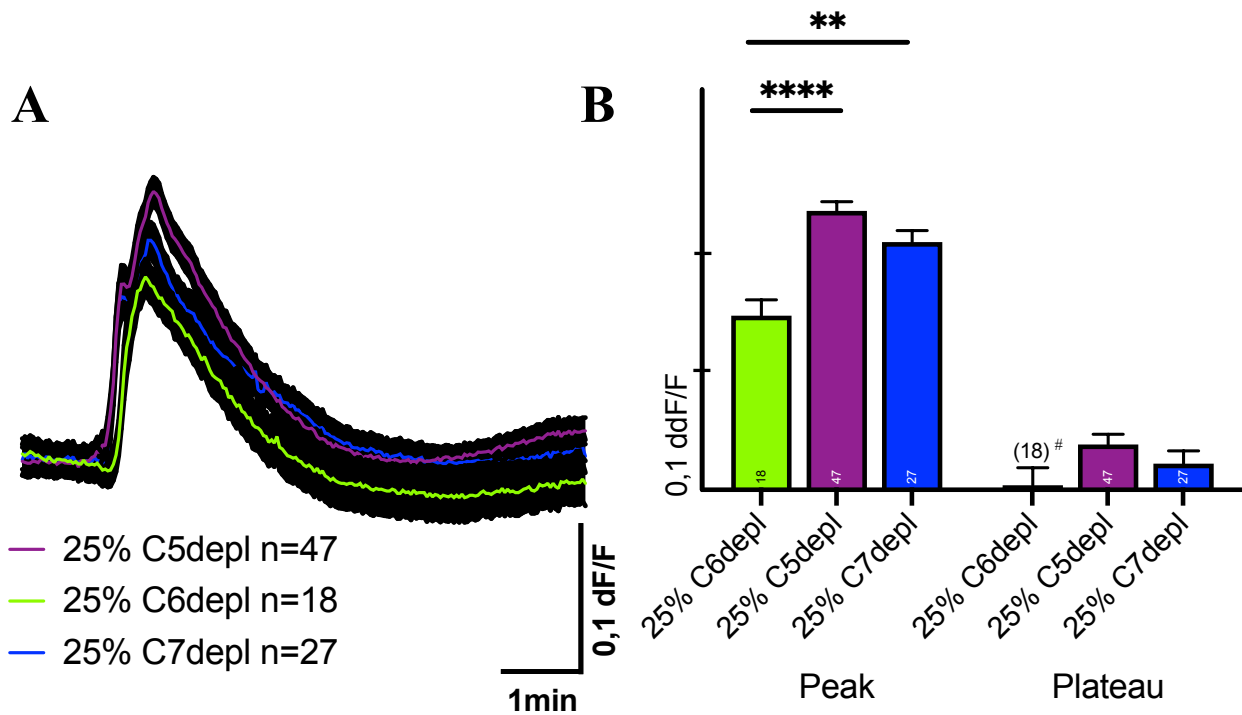
(**A**) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (**B**) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

[#]: unterhalb der Ausgangs-Baseline

Allerdings unterscheiden sich depletierte Seren nicht nur von standardisiertem Humanserum, sondern auch untereinander.

Dabei fällt zuerst die stark erhöhte Plateauphase der Messungen mit Serum ohne Komplementfaktor C3 auf, welche sich vergleichend zu den anderen depletierten Seren hoch signifikant unterscheidet. Wo Depletion der Faktoren C5, C6, und C7 zu kaum vorhandenem Plateau führt, ist C3 depletiertes Serum in diesem Bereich zur Auslösung eines deutlich erhöhten Signals fähig. Im Bereich des Peaks unterscheiden sich die depletierten Seren (Ausnahme: C3- und C6-depletiert) deutlich weniger bei allenfalls geringer statistischer Signifikanz.

5.4.3 C6-depletiertes Serum vs. C5/C7-depletiertes Serum



Grafik 11: Ca²⁺-Anstiege durch C6-/C5- und C7-depletiertes Serum

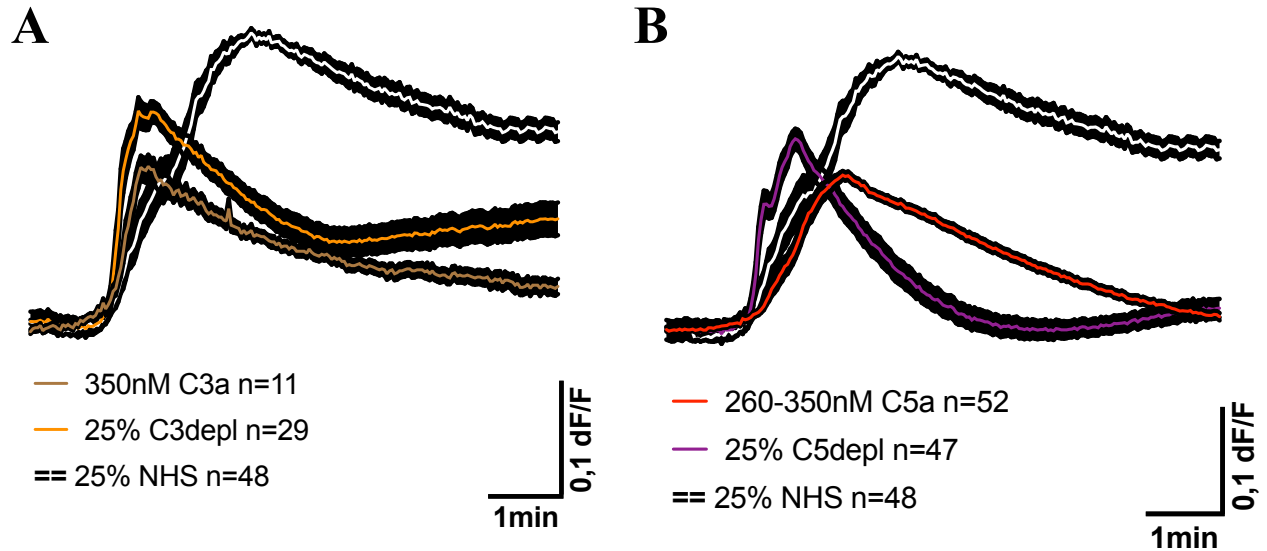
(Konzentration jeweils 25%; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}= 340$ und $\lambda_{ex}= 380$ nm); jeweils 4-6 unabhängige Experimente:

(A) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (B) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

#: unterhalb der Ausgangs-Baseline

Vergleicht man die einzelnen Bestandteile des terminalen Komplexes untereinander, so ist unter den depletierten Seren vor allem die Messreihe mit Serum ohne Komplementfaktor C6 auffällig. Hierbei ist der ausgelöste Peak im Vergleich deutlich niedriger. Zwischen C5- bzw. C7-Depletion des Serums ergaben sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede.

5.4.4 Anaphylatoxine vs. standardisiertes Humanserum



Grafik 12: Vergleichende Darstellung der Ca^{2+} -Anstiege

(Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{ex}} = 340$ und $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F). Daten sind Mittelwerte \pm SEM. Die Anzahl der in jeweils 1-6 unabhängigen Experimenten ausgewerteten Zellen ist unter „n“ dargestellt.

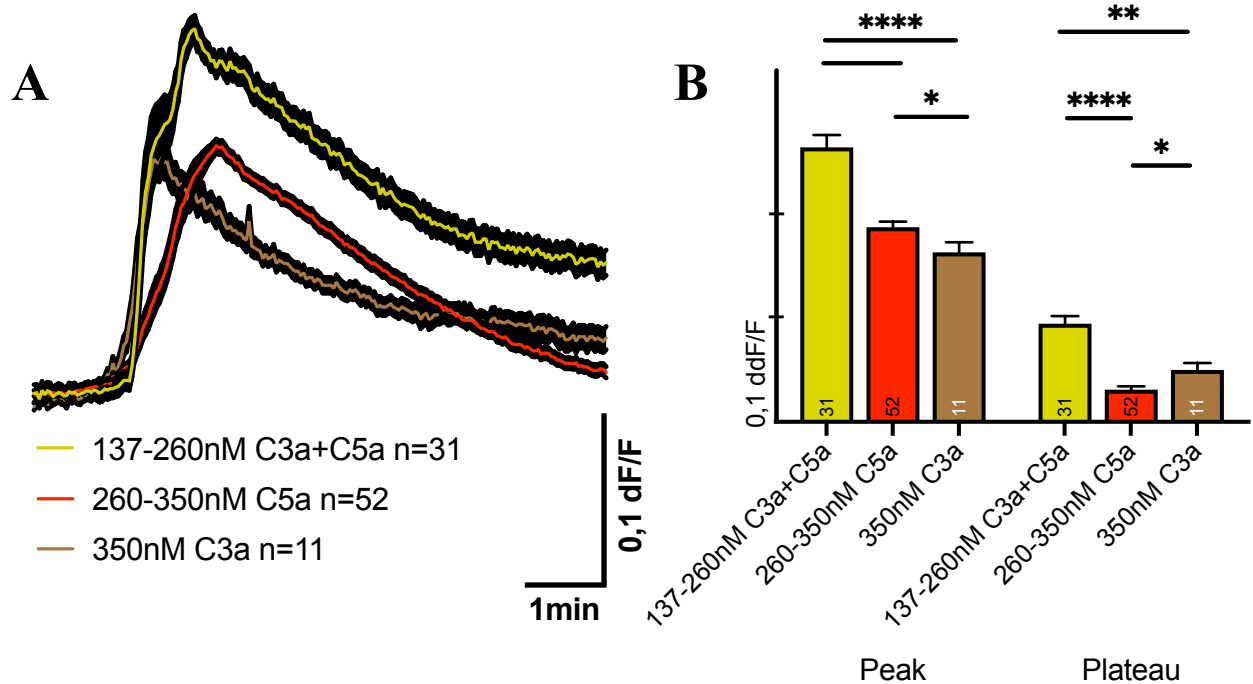
(A) C3a (350nM), 25% C3 depletiertes Serum und 25% NHS bzw. **(B)** C5a (260-350nM), 25% C5 depletiertes Serum und 25% NHS

Stellt man jeweils für die Komplementfaktoren C3(a) und C5(a) die Ca^{2+} -Signale depletierter Seren bzw. der Einzelkomponenten vergleichend zu NHS gegenüber, so fallen folgende Dinge auf:

Im Bereich des Peaks würde eine Addition zu einer im Vergleich zu NHS erhöhten Antwort führen. Dies betont abermals, dass die beiden Anaphylatoxine den größten Anteil am NHS Ca^{2+} -Signal des Peaks bewirken.

Im weiteren Verlauf bis zum letztendlichen Erreichen der Plateauphase stellt sich diesbezüglich trotz Addition der beiden Messkurven eine verbleibende Restdifferenz dar. Es müssen somit andere, nicht sofort ersichtliche Faktoren und Einflüsse vorhanden sein, die die vollständige Reaktion durch standardisiertes Humanserum ermöglichen.

5.4.5 Anaphylatoxine (kombiniert vs. einzeln)



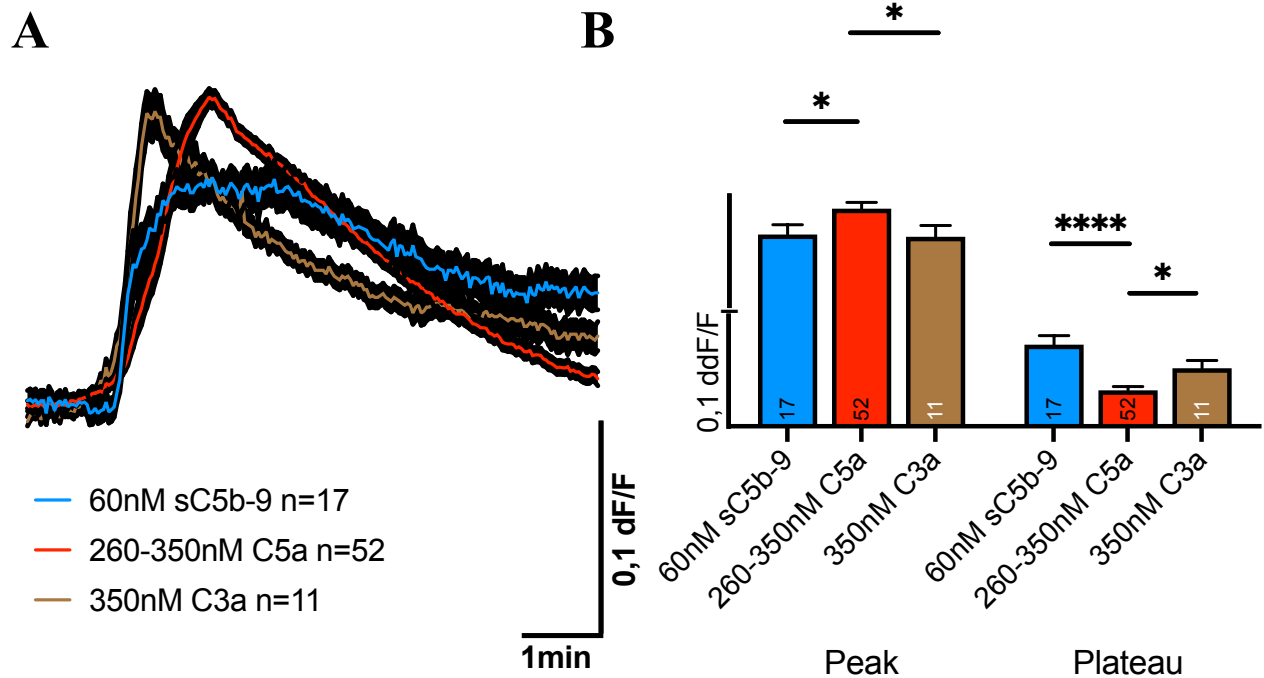
Grafik 13: Ca²⁺-Anstiege durch C3a, C5a und simultan C3a+C5a

(Konzentrationen: 350nM, 260-350nM, 137-260nM; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}=340$ und $\lambda_{ex}=380$ nm); jeweils 1-5 unabhängige Experimente: **(A)** Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) **(B)** Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

Hinweise darauf lassen sich nach Auswertung der Messungen mit simultaner Applikation von C5a und C3a vermuten. Messungen mit C3a alleine waren nicht gut reproduzierbar, sodass in dieser Arbeit lediglich Daten aus einer einzigen erfolgreichen Messung verwendet und ausgewertet werden konnten. Die Veränderungen durch C5a sind im Bereich des Peaks vergleichend zu C3a signifikant erhöht und waren darüberhinaus deutlich besser wiederholbar.

Durch simultane Gabe der Anaphylatoxine C3a und C5a war dennoch eine im Vergleich zu den jeweiligen Einzelkomponenten signifikant erhöhte Reaktion zu beobachten. Diese Differenz betrifft sowohl Peak als auch Plateauphase. Die vollständige durch standardisiertes Humanserum induzierte Antwort wurde, vor allem im Bereich der Plateauphase, auch durch die gleichzeitige Applikation der Anaphylatoxine nicht erreicht.

5.4.6 Terminaler Komplex vs. Anaphylatoxine



Grafik 14: Ca²⁺-Anstiege durch sC5b-9, C5a und C3a

(Konzentrationen: 60nM, 260-350nM, 350nM; Abbildung als Fluoreszenzverhältnis (Ratio) der beiden Anregungswellenlängen $\lambda_{ex}=340$ und $\lambda_{ex}=380$ nm); jeweils 1-5 unabhängige Experimente:

(A) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (n = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM) im zeitlichen Verlauf, Absolutwerte (dF/F) (B) Darstellung der Messung aller ausgewerteter Zellen (Zahl innerhalb der Säule = Anzahl der Zellen, Mittelwerte +/-SEM), Differenz zur Baseline (ddF/F).

Vergleicht man abschließend die Reaktionskinetiken der Komplementfaktoren C5a/C3a und sC5b-9, ergibt sich folgendes Bild:

Sowohl Anaphylatoxine als auch der terminale Komplex scheinen initial und auch mit weiterem Fortschreiten der Reaktion von wichtiger Bedeutung zu sein. Es lässt sich allerdings erkennen, dass die Anaphylatoxine hierbei vor allem eine große Rolle im Bereich des Peaks spielen; wohingegen die stets anhaltende Bildung von sC5b-9 Veränderungen bewirkt, welche zu einem dauerhaften Plateau führen können.

6. Diskussion

6.1 Aktives Komplement führt zu intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg

Standardisiertes Humanserum als Komplementquelle führt an Zellen des retinalen Pigmentepithels zu reproduzierbaren und im zeitlichen Verlauf fein orchestrierten Veränderungen des intrazellulären Ca^{2+} bestehend aus initialem Peak und stetiger Plateauphase.

Diese sind als physiologische Reaktion zu werten. Im gesamten Verlauf der Exposition blieben die ARPE-19-Zellen intakt. Es fanden sich keine Anzeichen einer unspezifischen Pore und somit eines Einbaus des Membranangriffskomplexes mit resultierender Zellyse.

Zipfel et al. (2009) zeigten, dass die einmalige Aktivierung der Komplementkaskade ausreichend sei, um Effektorproteine bis hin zur unausweichlichen Bildung des terminalen Komplexes mitsamt dessen Einbau in die Zellmembran zu generieren (89).

In meinen Experimenten würde dies allerdings in einer ungehinderten Wasser- und Elektrolytverschiebung zwischen extra- bzw. intrazellulär und dem Versagen sämtlicher Mechanismen der Gegenregulation der Zelle resultieren. Ca^{2+} , dessen transmembraner Gradient bei 1:10.000 liegt und in engen Grenzen gehalten werden muss, würde unkontrolliert nach intrazellulär strömen und zytotoxisch wirken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, wie auch in direkten Vorgängerarbeiten, keine dieser genannten Anzeichen einer unspezifischen Pore durch dauerhaften Einbau des Membranangriffskomplexes mit resultierender Zytolyse der RPE-Zellen zu finden waren (88). Des Weiteren ist diese Beobachtung im Einklang mit Untersuchungen aktiven Komplements an anderen Zellen bzw. Geweben wie Mastzellen, Erythrozyten, Leukozyten oder Fibroblasten oder glatter Muskulatur, welche den Nachweis endogen exprimierter Ionenkanäle bzw. transienter Ca^{2+} -Ströme ohne Lyse erbrachten (90-93,98,99,102-105).

Am RPE selbst wurde bisher wenig untersucht, welche Ca^{2+} -Veränderungen das Komplementsystem verursacht und welche Funktionen der RPE-Zellen dadurch angeregt werden können. Entsprechende vergleichende Arbeiten werden in den folgenden Kapiteln beschrieben und interpretiert.

Um die Signale des standardisierten Humanserums besser aktiven Komponenten des Komplements zuordnen zu können, führte ich selbige Messversuche mit hitzeinaktiviertem Serum durch. Ursprünglich wurde das Komplementsystem als hitzelabiler Bestandteil des

Serums beschrieben; Enzymkaskaden und die Komplementbindungskapazität werden durch Hitzeinaktivierung verhindert. Es resultierte eine nahezu aufgehobene Reaktion. Das durchgeführte Prozedere der Hitzeinaktivierung ist etabliert und als Negativkontrolle mit entsprechendem Ergebnis vielfach durchgeführt worden (88,106,112).

Da jedoch auch andere hitzelabile Substanzen innerhalb des Serums (z.B. Wachstumsfaktoren, Chemo- oder Zytokine) mit möglichen Effekten auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel vorkommen könnten, wurden außerdem Komplement depletierte Seren verwendet, da so der Anteil von Komplement am gesamten Ca^{2+} -Signal besser untersucht werden kann.

Zusammenfassend führten sämtliche Depletionen (Komplementfaktoren C3,C5,C6 oder C7) vergleichend mit vollständigem Serum zu stark signifikant verringerten Antworten.

In der Literatur lassen sich dazu vergleichbare Arbeiten finden. So führen C5- oder C7-Depletion des Serums an ARPE-19-, primären RPE- und Lungenepithelzellen nicht zur Zytolyse, auch wird vergleichend kein adäquater intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg erreicht (88,106,120).

Sowohl hitzeinaktivierte als auch depletierte Seren belegen, dass die NHS evozierten Antworten im Wesentlichen auf die Wirkung aktiver Komplementproteine zurückzuführen sind.

C3-depletiertes Serum unterschied sich bezüglich Ca^{2+} -Reaktion allerdings nicht nur von standardisiertem Humanserum, sondern auch von den anderen depletierten Seren.

Die beabsichtigte vollständige Unterbrechung der Komplementkaskade vor Bildung der Komplementfaktoren C3a bzw. C3b war nicht zu erreichen. Durch vom Hersteller bestätigte Vorgänge während des Depletionsprozesses konnten sich durch spontanen Zerfall C3a, C3b, C5a, sC5b-9 und weitere Bestandteile des Komplementsystems bilden. Eine sich durch den „amplification loop“ verstärkende Reaktionskaskade könnte so aufrechterhalten werden. Es resultierte ein verbleibendes Signal, dass vor allem durch eine erhöhte Plateauphase auffiel.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass Ca^{2+} -Signale (oder andere Zellfunktionen) durch Komplementfaktoren abseits der C3-Kaskade hervorgerufen werden. Dieser Gedanke würde damit einhergehen, dass Veränderungen nicht ausschließlich von einem strikten kaskadenartigen Durchlauf der Komplementwege abhängig sind. Hinweise darauf zeigen sich in Arbeiten von Amara et al. und Huber-Lang et al., die eine C3-unabhängige Aktivierung von C5a nachweisen. Die Serinproteasen Plasmin und Thrombin sind dabei in der Lage, die Funktion der eigentlichen C5-Konvertase einzunehmen (100,115,128).

Obwohl der Einfluss spontan generierter Komplementkomponenten während des Depletionsprozesses nicht ausgeschlossen werden kann, lassen sich doch im Vergleich der C5-, C6- und C7-depletierten Seren einige signifikante Schlussfolgerungen ziehen. Die ausgelösten Signale waren allesamt durch eine, neben abgeschwächtem Peak, nahezu vollständig aufgehobene Plateauphase gekennzeichnet.

Bereits hier wird erkennbar, dass an der Aktivierung von Ionenkanälen bzw. Ca^{2+} -Signalen am retinalen Pigmentepithel mehrere unterschiedliche Komponenten aktiven Komplements beteiligt sind. Der Ablauf der Komplementkaskade mit Bildung und Zusammenspiel von Effektorproteinen wie C3a, C4a, C5a bis hin zum temporären Wirken des terminalen Komplexes (sC5b-9) scheint für Ca^{2+} -bezogene Effekte verantwortlich zu sein.

6.2 Rolle der Anaphylatoxine C3a und C5a

6.2.1 Unterschiede der einzelnen Komponenten

Um die an der Kaskade beteiligten Komplementfaktoren besser gewichten zu können, wurden die Antworten der beiden potenten Anaphylatoxine C3a und C5a untersucht.

Es ist bekannt, dass die verwendeten ARPE-19-Zellen an ihrer Zelloberfläche beide Anaphylatoxin-Rezeptoren C3aR und C5aR exprimieren und unsere verwendeten Konzentrationen (C3a: 137-260nM, C5a: 260-350nM) um den jeweiligen Sättigungsbereich liegen (132,136).

Bereits Messungen mit C3- bzw. C5-depletiertem Serum ergaben den eindeutigen Nachweis, dass C3a und C5a eine bedeutende Rolle am Ca^{2+} -Signal spielen, denn vergleichend zu vollständigem Serum waren die Veränderungen deutlich abgeschwächt. Hierbei war nach C3- und C5-Depletion insbesondere die Antwort im Bereich der Plateauphase stark signifikant geringer.

Ein weiterer Aspekt ist, dass das C3a-Experiment nicht umgekehrte Ergebnisse zur Messung mit C3-depletiertem Serum zeigt. Messungen mit C3a alleine können zeigen, dass noch andere Komplementkomponenten aus der Kaskade benötigt werden, um das vollständige Ca^{2+} -Signal durch NHS bzw. die optimale Antwort zu erreichen.

Andererseits kann es beim Prozess des Depletierens dazu kommen, dass die Kaskade in ein neues und bisher unbekanntes Gleichgewicht kommt, da aus einem balancierten Geflecht ein Komplementfaktor entfernt wird. So könnte ein neues Gleichgewicht an Reaktionsprodukten mit veränderter Ca^{2+} -Antwort entstehen.

Funktionelle Daten zu C3a- bzw. C5a-Signalling und somit auch der funktionelle Nachweis der Anaphylatoxin-Rezeptoren am retinalen Pigmentepithel existierten bis dahin nicht.

Erstmalig konnte folglich gezeigt werden, dass beide Anaphylatoxine in Form des isolierten Proteins eine Erhöhung des freien intrazellulären Ca^{2+} an RPE-Zellen induzieren konnten. Die Reaktionskinetiken waren hierbei untereinander recht ähnlich und von einem rapiden Erreichen eines Peaks mit kaum vorhandener Plateauphase gekennzeichnet. Vergleichend zu vollständigem Serum waren sämtliche Anteile des Signals hoch signifikant kleiner. Dieser Unterschied betrifft sowohl Peak als auch Plateauphase, wenngleich die Veränderungen im Bereich der Plateauphase

noch stärker reduziert waren. Die größere Bedeutung der Anaphylatoxine für den Ca^{2+} -Peak wird hier ersichtlich.

Des Weiteren war der durch C5a ausgelöste initiale Peak signifikant größer als der durch C3a, was diesbezüglich passend zu Messungen mit C5- bzw. C3-depletiertem Serum ist, denn hier war der Peak durch C3-depletiertes Serum (nicht signifikant) größer.

Wie bereits diskutiert, war durch C3-Depletion kein vollständiger Wirkungsverlust zu erreichen (C3-unabhängige Aktivierung von C5a, neues Reaktionsgleichgewicht, amplification loop, Spaltprodukte während Depletionsprozess).

In der Literatur lassen sich zahlreiche Nachweise finden, die Ca^{2+} -Signalling induziert durch beide Komplementkomponenten C3a und C5a bestätigen können. An Mikroglia von Mäusen konnten Veränderungen gezeigt werden, deren Reaktionskinetik (kurzer, steiler Peak, keine Plateauphase) sowohl für C3a als auch für C5a vergleichbar zu meinen Messungen war (97). Ebenfalls ähnlich waren durch beide Anaphylatoxine induzierte Ca^{2+} -Signale an Spinalganglienzellen („DRG neurons“) von Mäusen (107). An aktivierten Mastzellen der Maus sowie menschlichen dendritischen Zellen führte nur C5a zur Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} . C3a war hierzu nicht fähig, obwohl jeweils beide Anaphylatoxin-Rezeptoren exprimiert waren (108,109). Ca^{2+} -Signale induziert durch beide Anaphylatoxine waren ebenso an neutrophilen und eosinophilen Leukozyten nachweisbar, wobei C5a eine größere Wirkung als C3a besitzt, da es neben intrazellulärem auch extrazelluläres Ca^{2+} mobilisieren kann (110,111). Vergleichende Studien, welche den durch Anaphylatoxine veränderten Ca^{2+} -Haushalt am retinalen Pigmentepithel beschreiben, sind nicht existent.

Zusammenfassend scheint der Einfluss von C5a auf intrazelluläres Ca^{2+} stärker zu sein, was sich mit den beobachteten Veränderungen (C5a >C3a) dieser Arbeit decken würde. Anzumerken ist außerdem, dass Messungen mit C5a deutlich besser reproduzierbar waren. Dies könnte Rückschlüsse auf einen stärkeren Effekt von C5a zulassen. Der möglichen Schlussfolgerung, ob C5a generell eine potentere Wirkung als C3a am retinalen Pigmentepithel besitzt (nicht ausschließlich in Bezug auf intrazelluläres Ca^{2+}) und welche Konsequenzen daraus gezogen werden könnten, wird in Kapitel 6.4 nachgegangen.

Von großem Interesse ist außerdem, welche exakten Signalwege zum beschriebenen Ca^{2+} -Signal innerhalb der RPE-Zelle führen.

Die diesbezüglich noch detailliertere Untersuchung war nicht Bestandteil der angefertigten Arbeit und bietet Anreiz zur weiteren Vertiefung. Aufgrund der Reaktionskinetik (kurzer, steiler Peak und geringe Plateauphase) der dargestellten Signale und dank Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe bzw. direkter Vorgängerarbeiten lassen sich dennoch einige Schlussfolgerungen ziehen.

So scheinen die Anaphylatoxine C3a und C5a hauptsächlich für den Ca^{2+} -Peak verantwortlich zu sein. Durch simultane Applikation entsprechender Blocker konnte gezeigt werden, dass Komplement induzierte Ca^{2+} -Signale im Bereich des Peaks (88) durch Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (via Ca^{2+} -ATPasen), TRPV-Kanäle, Maxi-K-Kanäle und teilweise Ryanodin-Rezeptor-abhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle ausgelöst werden.

Auch die „abgeschwächte“ desarginierte Form des Anaphylatoxins C5a kann Ca^{2+} -Signale an RPE-Zellen bewirken. Diese waren zwar gegenüber C5a kleiner (signifikant im Plateaubereich), im Reaktionsverhalten (kurzer Peak, kein Plateau) jedoch ähnlich. Da C5a auch nach Entfernung seiner C-terminalen Aminosäure 1-10 % (Quelle: Hersteller Comptech) seiner biologischen bzw. stimulatorischen Aktivität beibehält und zusätzlich eine stabilere Konfiguration mit verzögertem Wirkungsverlust (101) besitzt, sind die beobachteten Ergebnisse mit einer Hypothese der Stimulation des C5a-Rezeptors und nachfolgendem Ca^{2+} -Anstieg vereinbar.

In der Literatur werden mögliche (inflammatorische) Effekte von desarginiertem C5a kontrovers diskutiert. Es finden sich Hinweise auf fehlende Stimulation des C5aR an Mastzellen (114), allerdings ist eine mögliche Wirkung über den C5a- sowie den C5L2-Rezeptor (kritisch) bekannt (117). Reis et al. zeigen an humanen Leukozyten eine über den C5aR stattfindende Aktivierung durch desarginiertes C5a (116).

An RPE-Zellen wurde bisher allerdings nur die Expression des C5a-Rezeptors nachgewiesen, mögliche Auswirkungen von desarginiertem C5a auf intrazelluläres Ca^{2+} sind bisher weder am retinalen Pigmentepithel noch an anderen Zellen dargestellt worden.

6.2.2 Interaktionen C3a und C5a

Festzuhalten bleibt, dass Ca^{2+} -Signale durch C3a oder (desarginiertes) C5a alleine bei weitem nicht das Ausmaß von vollständigem Humanserum erreichen konnten. Deutlich näher an der Physiologie erscheint sowieso ein entweder zeitgleiches bzw. nur gering zeitlich versetztes Wirken beider Anaphylatoxine an RPE-Zellen. Folglich wurden C3a und C5a simultan appliziert. Es resultierte wie bei den Einzel-Applikationen zuvor eine Signalantwort bestehend aus steilem Peak und geringer Plateauphase. Dies betont abermals, dass die beiden Anaphylatoxine den größten Anteil am NHS Ca^{2+} Signal im Bereich des Peaks bewirken.

In meinen Messungen waren die Veränderungen durch die kombinierte Gabe von C3a und C5a vergleichend zur alleinigen Gabe von C3a bzw. C5a jeweils signifikant erhöht.

Würde man die Amplituden der C3a- und C5a induzierten Ca^{2+} -Anstiege addieren, ergäbe sich für beide Peaks eine im Vergleich zu NHS sogar erhöhte Antwort. Dies lässt sich möglicherweise durch die teils hohen Konzentrationen von C3a (137-260 nM) bzw. C5a (260-350 nM) erklären. Die genauen Wirkkonzentrationen am C5a- bzw. C3a-Rezeptor des RPE sind in vivo jedoch technisch nicht messbar (u.a. Bruch-Membran, richtiger Zeitpunkt der Messung). Wir orientierten uns daher für unsere Messungen an den jeweiligen Dissoziationskonstanten bzw. Rezeptorbindungsaffinitäten (132,136) und strebten Konzentrationen um den Sättigungsbereich an.

Ergebnisse anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe zeigen ein durch die simultane Gabe beider Anaphylatoxine im Vergleich zur alleinigen Gabe von C5a nicht statistisch signifikant größeres Ca^{2+} -Signal. Die induzierten Ca^{2+} -Veränderungen durch C3a alleine sind hingegen signifikant kleiner als diejenigen einer kombinierten Gabe beider Anaphylatoxine.

Es wäre denkbar, dass beide Anaphylatoxine nicht einfach additive Auswirkungen haben, sondern eher synergistisch über ihre Rezeptoren interagieren. Hinweise darauf liefern die Ergebnisse einer aufeinanderfolgenden, zeitversetzten Gabe von C3a und C5a aus unserer Arbeitsgruppe. Hierbei wird zuerst C3a appliziert; folgend wird nach Erreichen eines stabilen Ca^{2+} -Plateaus C5a hinzugegeben.

Interessanterweise führt die Gabe von C5a unter diesen Umständen zur Verringerung, und nicht zum weiteren Anstieg, des zuvor erreichten Ca^{2+} -Signals. Man könnte somit schlussfolgern, dass die anhaltende Aktivierung des C3a-Rezeptors dazu führt, eine spätere Wirkung über den C5a-Rezeptor einzudämmen bzw. zu verhindern. Diese Interaktion kann auf zwei verschiedene Ebenen stattfinden: Dimerbildung der Rezeptoren oder eine Kommunikation der dem aktivierten Rezeptor nachgeschalteten Signalwege.

Auch die kombinierte Applikation von C3a und C5a konnte nicht das komplette Ca^{2+} -Signal durch standardisiertes Humanserum reproduzieren. Insbesondere im Bereich der Plateauphase müssen somit weitere Bestandteile aktiven Komplements wirken.

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben wird die durch C3a und C5a ausgelöste Antwort im Bereich des Peaks unter anderem durch Mobilisierung intrazellulären Ca^{2+} ausgelöst.

An Immunzellen führt hauptsächlich die Aktivierung der Metabolite des PI3K/Akt-Signalwegs zur Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher. Wie Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, scheint dieser Signalweg an RPE-Zellen durch C5a, vor allem im Bereich der Peak-Phase, aktivierbar zu sein.

L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle spielen eine größere Rolle im Bereich der Plateauphase; dabei strömt extrazelluläres Ca^{2+} nach intrazellulär. Durch C3a und C5a induzierte Ca^{2+} -Signale sind durch Gabe eines entsprechenden L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Blockers (Nifedipin) gar nicht bis wenig signifikant beeinflussbar; dies gilt insbesondere für die Plateauphase. Ebenso an der Plateauphase beteiligt sind TRP-Kanäle (Wirkung über PI3K); C5a könnte somit über diesen Signalweg wirken.

Inwiefern beide Anaphylatoxine (einzeln oder in Wechselwirkung miteinander) nicht nur Einfluss auf intrazelluläres Ca^{2+} nehmen, sondern über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auch die Genexpression bzw. Sekretion verändern könnten, wird ausführlich in Kapitel 6.4 diskutiert.

6.3 Der terminale Komplex

Finales Produkt der Enzymkaskade des Komplementsystems ist der terminale Komplex bzw. lösliche C5b-9-Komplex (sC5b-9) oder „sublytic MAC“. Die Bildung einer nichtselektiven, durchlässigen Pore durch den terminalen Komplex an ARPE-19-Zellen konnte in dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Vielmehr ergaben sich vielfältige Hinweise auf einen anderen, nicht zelldestruktiven Wirkmechanismus des terminalen Komplementkomplexes. Dass die Anlagerung der Komplementfaktoren C5b, C6, C7, C8 bzw. C9 an die Zellmembran eine signifikante Rolle in Bezug auf intrazelluläres Ca^{2+} spielt, konnte dabei in unterschiedlichen Experimenten gezeigt werden.

So waren durch Serum induzierte Ca^{2+} -Signale ohne direkt am terminalen Komplex beteiligte Komplementfaktoren (C5, C6 oder C7) stark signifikant kleiner, dies betrifft insbesondere die Plateauphase. Wie zuvor beschrieben bestand vergleichend ein Unterschied zu Messungen mit C3-depletiertem Serum.

Interessanterweise fanden sich allerdings auch Unterschiede durch die Entfernung unterschiedlicher Bestandteile des terminalen Komplexes. Ohne Komplementfaktor C6 waren die Ca^{2+} -Signale signifikant kleiner. Im Vergleich zu C5- bzw. C7-depletierten Seren lag diese Differenz im Bereich des Peaks, wo sich die Ca^{2+} -Antworten hoch signifikant unterschieden. Die Plateauphase zeigte sich durch C6-Depletion jeweils nicht signifikant unterschiedlich.

Die letztendliche Bildung und Aktivierung des terminalen Komplexes erfolgt schrittweise (89). So könnte man vermuten, dass während des Vorgangs der C5-Depletion (vgl. C3-Depletion s.o.) zumindest ausreichend C5a entstehen kann, was Rückschlüsse auf den hierbei verbleibenden Peak liefern würde. Die Ca^{2+} -Antworten durch C5- bzw. C7-Depletion des Serums unterscheiden sich dagegen nicht signifikant, was die Bedeutung des Komplementfaktors C6 erneut unterstreicht.

Festzuhalten bleibt, dass die Unterbrechung der Komplementkaskade vor abschließender Bildung des terminalen Komplexes gelungen war und verbleibende Ca^{2+} -Signale im Bereich des Peaks besonders den zuvor gebildeten Anaphylatoxinen (C3a, C5a) zuzuschreiben sind.

Des Weiteren scheint der Komplementfaktor C6 eine Sonderstellung zu besitzen und einen stärkeren Einfluss auf intrazelluläres Ca^{2+} am RPE zu haben. Weshalb die Interaktion zwischen

C5b und C7 durch C6 diese besondere Bedeutung besitzt und wodurch genau sie resultiert, ist augenblicklich völlig unklar und Gegenstand zukünftiger Arbeiten. Im bisher akzeptierten Modell fungiert bei der Bildung des terminalen Komplexes C5b als Initiator und C7 letztendlich als „Anker in der Membran“ (119) der Zielzelle. In der Literatur gibt es Hinweise auf in der Zellmembran von Endothelzellen selbst exprimiertes C7 (118), welches C5b6 und die weiter folgenden Komponenten binden kann und so die TCC-Formation an Blutgefäßen ermöglicht. Man könnte auch spekulieren, dass C6 selbst einen eigenen (bisher unbekannt) Effekt auf intrazelluläres Ca^{2+} besitzt. Zukünftige Experimente mit künstlichen Heteromeren werden dabei helfen, diese Interaktionen der einzelnen Komplementproteine innerhalb des TCC besser verstehen zu können.

Um nicht nur indirekte Hinweise auf die Wirkung des terminalen Komplexes zu erhalten, stimulierte ich RPE-Zellen mittels ausschließlicher Applikation des löslichen C5b-9-Komplexes (60nM). Es zeigten sich hierbei Ca^{2+} -Signale, welche durch einen vergleichsweise niedrigen Peak und eine stetige Plateauphase gekennzeichnet waren. Vergleichend zur Ca^{2+} -Antwort des standardisierten Humanserums zeigten sich diese hoch signifikant geringer.

Die Plateauphase des terminalen Komplex unterscheidet sich von Signalen durch die Anaphylatoxine C3a bzw. C5a, welche eine wichtigere Rolle im Bereich des initialen Peaks zu spielen scheinen und eine weniger andauernde Ca^{2+} -Veränderung erzeugen.

Die größere Bedeutung des löslichen C5b-9-Komplexes im Bereich der Plateauphase zeigt sich ebenso bereits in den Messung mit C3-depletiertem Serum. Vergleichend zu C5-, C6- und C7-Depletion fällt hier eine signifikant erhöhte Plateauphase auf. Es ist denkbar, dass dieser Effekt durch Einwirken vor allem des Komplementfaktors C5a und auch sC5b-9 entsteht.

Durch die Beobachtung, dass sC5b-9 im Wesentlichen eine Plateauphase als Ca^{2+} -Signal erzeugt, lässt sich unter Vorbehalt vermuten, dass sich der terminale Komplex im Gegensatz zu Messungen mit den anderen depletierten Seren zumindest teilweise bilden konnte (u.a. „amplification loop“) und zur Induktion der Ca^{2+} -Veränderungen fähig war. Dies würde insbesondere die erhöhte andauernde Plateauphase erklären.

Auch nach direkter Applikation des löslichen C5b-9-Komplexes zeigten sich keine Anzeichen destrukturierter RPE-Zellen durch Einbau einer lytischen Pore.

Verschiedene Autoren sprechen, wie bereits in Kap. 2.3 erläutert, von möglichen sublytischen Konzentrationen des Membranangriffskomplexes, die an unterschiedlichen Zellarten zum Anstieg intrazellulären Ca^{2+} führen können.

Die Arbeitsgruppe um Rohrer beschreibt im Kontext der VEGF-Sekretion an RPE-Zellen durch „sublytic MAC“ getriggerte intrazelluläre Signalwege. Über vorübergehenden Einbau des MAC soll es zum Ca^{2+} -Einstrom bzw. zur Membrandepolarisation kommen. So werden die Signalmoleküle Erk/Ras und Src aktiviert. Erhöhte Src-Aktivität bewirkt dabei (ausgelöst durch spannungsabhängige Kalziumkanäle = VDCC) eine gesteigerte VEGF-Sekretion (84,123). Als Komplementquelle wurde hierbei vollständiges NHS verwendet; die Ergebnisse sind also nicht für den terminalen Komplex spezifisch. Ebenso wurden, im Gegensatz zur eigenen Arbeit, keine direkten Ca^{2+} -Signale aufgezeichnet.

An humanen Lungenepithelzellen kann die durch das Komplementsystem ausgelöste intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung zur Aktivierung von Inflammasomen führen. Als „sublytisch“ gelten dabei TCC-Applikationen, die zu weniger als 5% Zelltod führen. Triantafilou et al. konnten mittels Durchflusszytometrie zeigen, dass es zum Ca^{2+} -Anstieg im Zytosol kommt. Die Autoren gehen ebenso von einem kurzfristigen Einbau des TCC in die Zellmembran der Zielzelle aus. Der Ca^{2+} -Anstieg resultiert zumindest teilweise auch durch Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (IP3- und Ryanodinrezeptor vermittelt).

Die beschriebenen Ca^{2+} -Effekte sind spezifischer dem Komplementsystem bzw. dem terminalen Komplex zuzuschreiben, da sich vergleichend zu NHS signifikante Unterschiede bei C5-, C7- und C9-depletierten bzw. zu anti-CD59 Seren zeigten (120).

Wiedmer et al. führen an, dass C5b-9 an Blutplättchen Ca^{2+} -abhängig die Sekretion von alpha-Granula induzieren kann. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde, vergleichbar zu den Messungen in meiner Arbeit, mittels Fluoreszenzintensitäten eines geeigneten Farbstoffs (Indo-1) aufgezeichnet. Der Fluoreszenzanstieg war dabei abhängig von der Konzentration extrazellulären Ca^{2+} . Nach dem „Andocken“ von C5b-9 an der Zelloberfläche soll es zur gesteigerten Permeabilität der Zellmembran und folglich zu einem Ca^{2+} -Einstrom kommen. Zeichen einer Zellyse (z.B. durch Austreten von Fluoreszenzfarbstoff aus der Zelle) oder Kalziumanstiege durch Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zeigten sich nicht (121).

Grundsätzlich könnte die Existenz eines sublytischen Membranangriffskomplexes jedoch kritisch hinterfragt und diskutiert werden.

Der in der Literatur verwendete Begriff geht davon aus, dass sich der terminale Komplex bildet, es zumindest kurzfristig bzw. teilweise zum Einbau einer Pore in die Zellmembran kommt und so eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung resultiert.

In einem Ca^{2+} -Experiment würde jedoch selbst ein nur kurzer Einbau einer (sub-)lytischen Pore zum exzessiven, unkontrollierten Ca^{2+} -Anstieg führen.

Der alternative Komplementweg ist, u.a. an RPE-Zellen, spontan und kontinuierlich aktiv. Ein wiederkehrender Einbau einer Pore in körpereigene, gesunde Zellen in vivo würde zur unregulierten Zellzerstörung führen. Es existieren daher Schutzmechanismen des RPE vor übermäßig aktivem Komplementsystem.

Inhibitoren des TCC (v.a. CD59) kommen am retinalen Pigmentepithel membrangebunden vor, können an die Komplementkomponenten C8 und C9 binden und so die Generierung des terminalen Komplexes verhindern, bevor es zu Bildung sowie Einbau einer Pore kommt. Körperfremde Zellen (z.B. Krankheitskeime) ohne diese Oberflächeninhibitoren werden hingegen erkannt und durch den TCC bzw. den Einbau einer lytischen Pore bekämpft.

Durch schnell einsetzende Mechanismen der Endo- und Exozytose könnten in der Zellmembran verankerte C5b-9-Komplexe entfernt werden (122); bei AMD-Patienten und Rauchern sind diese Mechanismen der Gegenregulation eingeschränkt (39,52,122). Ein stabiles Ca^{2+} -Signal ohne Nachweis zerstörter Zellen, wie es in dieser Arbeit gezeigt wird, wäre dabei meiner Ansicht nach nicht erklär- bzw. vorstellbar.

Morgan et al. zeigten an Leukozyten, dass durch intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung der „MAC“ wieder von der Zelloberfläche entfernt werden kann (98). Es wird argumentiert, dass so ein erhöhtes Zellüberleben resultiert und eine Lyse der Zellen erst bei unzureichender Kompensation (Erreichen einer „kritischen Schwelle“) erfolgt.

Tan et al. konnten durch Komplement induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhungen an RPE-Zellen nachweisen, wodurch CD59 beschleunigt wieder zur Verfügung gestellt und Prozesse der Exozytose stimuliert werden (129). Überraschenderweise waren diese beschriebenen Effekte durch C9-depletiertes Serum nicht auslösbar und scheinen daher abhängig vom TCC (v.a. C9) selbst zu sein.

Zusammenfassend wird in der Literatur von einer Art Wettlauf zwischen Einbau und Entnahme des TCC aus der Membran der Zelle ausgegangen. Als bestimmende Faktoren für den Ausgang (sublytisch vs. lytisch) werden Konzentration, Expositionsdauer und Abwehrmechanismen der Zielzelle diskutiert.

Die Daten meiner Arbeit, die durch den terminalen Komplex induzierte Ca^{2+} -Veränderungen beschreiben, ließen sich ebenso durch eine bisher weniger gut bekannte Rolle des terminalen Komplexes erklären, die die Aktivierung endogen exprimierter Ionenkanäle involviert.

Ähnlich wie in Kapitel 6.2.1 bereits für die Anaphylatoxine C3a und C5a beschrieben, wurden diesbezüglich keine weiteren vertiefenderen Untersuchungen durchgeführt. Anhand der Reaktionskinetik (flacher Peak und beständige Plateauphase) und dank Messungen direkter Vorgänger können dennoch wichtige Schlussfolgerungen hinsichtlich Ca^{2+} -Signalling gezogen werden.

Der terminale Komplex scheint, wie an vielen Stellen in dieser Arbeit beschrieben, hauptsächlich für die Plateauphase verantwortlich zu sein.

Mittels Applikation entsprechender Blocker konnte bereits gezeigt werden, dass Komplement induzierte Ca^{2+} -Signale im Bereich dieser Plateauphase (vgl. Kap. 2.3/2.4 und 6.2.2, 88) zu großen Teilen durch Aktivierung Ryanodin-Rezeptor-abhängiger L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle (Cav1.3-Subtyp) entstehen.

Eine spannungsabhängige Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen führt zum Ca^{2+} -Einstrom von extra- nach intrazellulär und zu einem länger anhaltenden, stabilen Ca^{2+} -Signal.

In der Literatur findet sich eine vergleichbare Arbeit zu Untersuchungen am retinalen Pigmentepithel bisher nur ein einziges Mal. Li et al. (124) differenzierten zuerst zwischen lytischer und sublytischer ($< 20 \text{ ug/ml}$) Konzentration des von Rattenserum stammendem löslichen C5b-9-Komplexes. Die Exposition von primären RPE-Zellen mit ausreichend geringen Konzentrationen des sC5b-9 resultierte in einer biphasischen Ca^{2+} -Antwort bestehend aus Peak nach 4 Minuten und einer 6 Minuten andauernden Plateauphase (s. Abbildung 21). Beide klassifizierenden Parameter sowie insbesondere die Darstellung der Reaktionskinetik sind dabei eindeutig mit unseren Ergebnissen vereinbar.

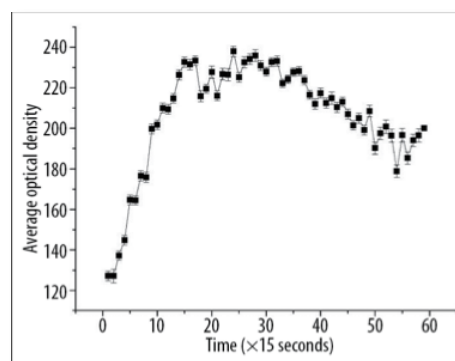


Abbildung 21: Ca^{2+} -Anstieg in RPE-Zelle in Reaktion auf C5b-9 (124)

Die Autoren gehen auch hier davon aus, dass sich mit Einbau von C5b-9 in die Zellmembran transmembrane Kanäle bilden, was rein abhängig von der Konzentration zu Zellyse oder geordnetem Ca^{2+} -Signal führen kann.

Im anschließenden Kapitel wird u.a. diskutiert, welche Funktionen am RPE (auch im Krankheitskontext der AMD) durch ein solches, länger anhaltendes Ca^{2+} -Signal mit stabiler Plateauphase angeregt werden könnten.

6.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

6.4.1 AMD hat inflammatorische Komponente

Grundlage der AMD-Entstehung scheinen Degenerationsprozesse im Bereich Neuroretina, RPE, Bruch-Membran und Choriokapillaris zu sein. Ein degeneriertes RPE könnte seine Schutzfunktion aufgrund fehlender Fähigkeit zur Sekretion der o.g. Oberflächeninhibitoren, aber auch seine immunmodulatorische Kompetenz, nicht mehr ausreichend erfüllen.

Die große Bedeutung einer inflammatorischen Komponente der AMD wurde in der angefertigten Arbeit dargestellt (u.a. Komplement-Gene mit Risiko-Assoziation, Komplementproteine in Drusen, Monozyten-Akkumulation in der äußeren Netzhaut).

Hinsichtlich des Komplementsystems soll weiter ausgeführt werden, welche Rolle dabei die Anaphylatoxine C3a und C5a sowie der terminale Komplex spielen (könnten).

C5a scheint insgesamt vergleichend zu C3a eine potentere Wirkung zu besitzen. Durch Inkubation von ARPE-19- bzw. primären RPE-Zellen mit standardisiertem Humanserum als Komplementquelle konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eingeleitet wird (112). Dabei wird ausschließlich der C5a-Rezeptor hochreguliert, der C3a-Rezeptor des RPE dagegen wurde in Reaktion darauf nicht vermehrt exprimiert (112).

Unsere Arbeitsgruppe konnte nach Prä-Stimulation der ARPE-19-Zellen mit standardisiertem Humanserum ebenso eine durch NHS induzierte Hochregulierung der C3aR-Expression nachweisen.

Cortright et al. zeigen, dass an ARPE-19-Zellen die VEGF-Expression ausschließlich durch C5a gesteigert werden kann, obwohl beide Rezeptoren exprimiert werden (127).

In einer Arbeit von Ramos de Carvalho et al. führte C3a, und nicht C5a an humanen RPE-Zellen zur verminderten Proteasomen-Aktivität; im Mausmodell war das Immunoproteasom hingegen vermehrt aktiv und scheint eine Rolle bei der Entwicklung einer RPE-Atrophie zu spielen (113).

Insgesamt könnte man daher erwägen, dass der Komplementfaktor C3a (bzw. die C3-Konvertase) eine eher regenerative, protektive Rolle spielt, wohingegen C5a (bzw. die C5-Konvertase) (pro-) inflammatorische Antworten einleitet. Vermehrte Nachweise hierzu finden sich auch in der aktuelleren Literatur (94,128,135). Der Vergleich der Ca²⁺-Amplituden zwischen den beiden Anaphylatoxinen könnte daher im Sinne einer potenteren Wirkung unerheblich sein.

6.4.2 Wirkung am RPE: anti- vs. pro-inflammatorisch, Switch im Phänotyp

Die Wirkung von C3a und C5a ist in einem dynamischen System nicht als rein additiv anzunehmen, Hinweise darauf liefern die Ergebnisse einer zeitversetzten Gabe beider Anaphylatoxine.

Gut vereinbar mit einer protektiven, regenerativen Wirkung von C3a ist dabei die Überlegung, dass eine anhaltende Aktivierung des C3a-Rezeptors dazu führen könnte, eine folgende Wirkung über den C5a-Rezeptor (teilweise) zu unterdrücken.

Diese interagierende Wirkung von C3a und C5a gilt darüberhinaus nicht nur in Bezug auf intrazelluläres Ca^{2+} . Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe zeigen, dass es auch auf Proteinebene ähnliche Hinweise nicht einfacher additiver Effekte der beiden Anaphylatoxine gibt: Im Western Blot sind die Akt- und Cav1.3- Ca^{2+} -Kanal-Phosphorylierung durch simultane Gabe von C3a und C5a vergleichend zur alleinigen Gabe signifikant geringer.

Im immunprivilegierten, gesunden Auge soll gleichzeitig eine geregelte Immunabwehr bei ausreichender Immunsuppression gegeben sein. Dies wird hauptsächlich durch die Interaktion zwischen einem lokalem Komplementsystem und dem RPE erreicht. So kann das RPE, vergleichbar mit einer Immunzelle, präzise auf unterschiedliche „Aktivitätslevel“ des Komplementsystems reagieren.

Interessanterweise exprimieren RPE-Zellen, ähnlich wie T-Zellen, die Transkriptionsfaktoren FoxP3 und FOXO1. Die beiden Anaphylatoxine C3a und C5a bewirken jeweils eine erhöhte Aktivierung und so wohl auch langfristige Funktionsveränderungen. Dabei zeigte sich, dass die ausgelösten Veränderungen durch C5a größer als durch C3a sind. Die kombinierte Gabe von C3a und C5a führte zur weiteren Erhöhung der FOXO1-Phosphorylierung, FoxP3 war dadurch hingegen nicht vermehrt phosphoryliert. Alle genannten Effekte der vermehrten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sind Ca^{2+} -abhängig, da auch CREB (Ca^{2+} response element binding protein) aktiviert wurde.

Auf mRNA-Ebene zeigt sich eine ausschließlich durch die gemeinsame Applikation von C3a und C5a reduzierte C3-Expression, andere Gene (C5, C3aR, C5aR) waren in der qPCR durch beide Anaphylatoxine einzeln oder gemeinsam nicht verändert nachweisbar.

Die Sekretion von IL-8 und VEGF ist nur durch eine kombinierte Gabe von C3a und C5a verändert, sie ist erhöht nachweisbar und scheint stark abhängig von der Aktivität der PI3-

Kinase. C3a oder C5a alleine führen nicht zu Veränderungen im Sekretionsverhalten der genannten Faktoren.

In der angefertigten Arbeit wurden ausschließlich Ca^{2+} -Signale untersucht; die Effekte des TCC auf Protein-, Genexpressions- und Sekretionsebene werden Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

RPE-Zellen reagieren, wie zuvor beschrieben, spezifisch und vielfältig auf Umgebungseinflüsse (u.a. Komplementproteine des TCC); eine wichtige Rolle spielen dabei intrazelluläre Ca^{2+} -Veränderungen.

In in-vitro-Experimenten, in denen o.g. Messungen mit NHS an NHS-vorbehandelten RPE-Zellen (= Prästimulation für 24h) durchgeführt wurden, zeigten sich folgende Effekte:

1. Ca^{2+} -Imaging: signifikant erhöhte Plateauphase
2. Genexpression: Hochregulation der C3aR-Expression, Herunterregulation CFH-Expression

Dies zeigt, dass sich das RPE sehr gezielt auf eine weitere, ggf. zu erwartende, verstärkte Komplement-Exposition vorbereiten kann. Es wird durch ansteigendes Ca^{2+} und erhöhte C3aR-, C5aR- bzw. geringere CFH-Expression „sensitiver“ gegenüber seiner Umgebung.

Insgesamt bestätigt sich, dass das RPE nicht passiv aktiviertem Komplement ausgesetzt ist, sondern aktiv mit den einzelnen Komponenten interagiert. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Komplementproteine bei AMD-Patienten auch im Blut erhöht nachweisbar sind (39), sodass eine Adaptation des RPE auch diesbezüglich sinnvoll erscheint.

Dabei bildet es zum einen eine Art Verteidigungslinie: So werden eine übermäßige Anlagerung des TCC bzw. eine Lyse der Zelle verhindert, in Wechselwirkung mit C3a entsteht ein protektives, regeneratives Umfeld, RPE-Zellen tragen zum Immunprivileg des Auges bei und werden durch Komplementbestandteile überlebensfähiger gegenüber oxidativem Stress (88).

Zum anderen scheint ein „shift“ der Komplementkaskade mit zunehmender Aktivität von C5a und des TCC (pro-) inflammatorische bzw. pro-angiogene (u.a. Sekretion IL-8, VEGF) Prozesse fördern zu können.

Im Bereich der Plateauphase der Ca^{2+} -Antwort findet eine durch den TCC induzierte, länger anhaltende, Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen statt.

Man könnte spekulieren, dass gerade durch ein solches konstanteres Ca^{2+} -Signal mittel- bis langfristig auch ein Switch im Phänotyp zwischen anti- zu pro-inflammatorisch zumindest begünstigt oder eingeleitet wird.

Eine vermehrte Aktivität von C5a bzw. des TCC führt zu einer gesteigerten Phosphorylierung der porenbildenden Cav1.3.-Untereinheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals (88,123) und so auch zur erhöhten VEGF-Sekretion (86).

6.4.3 Wirkung auf das RPE: pro- vs. anti-angiogen

VEGF spielt als wichtigster Angiogenese-Faktor (PIGF, PDGF u.a.) primär eine wichtige Rolle für die Gefäßphysiologie (z.B. Embryogenese) und trägt über Stickstoffmonoxid (Vasodilatation, Gefäßpermeabilität -> chorioidale Sauerstoffversorgung der äußeren Netzhaut) zur Zell- und Gewebe-Erhaltung bei. Pathologien, welche zu Hypoxie und Inflammation führen, sind mit erhöhter VEGF-Expression und krankhafter Neovaskularisation assoziiert.

Cortright et al. zeigen (s.o.), dass die VEGF-Expression an ARPE-19-Zellen ausschließlich durch C5a gesteigert wird (127), wohingegen Nozaki et al. im Mausmodell bzw. an primären RPE-Zellen eine durch C3a und C5a induzierte VEGF-Erhöhung nachweisen. Des Weiteren war an entsprechenden double-knock-out-Mäusen die Ausbildung einer CNV signifikant geringer ausgeprägt (83). Vermehrt finden sich allerdings auch Modelle, die auf eine regenerative Wirkung von C3a hinweisen (135).

Oxidativer Stress führt an RPE-Zellen über Blockade von CD55, CD59 und CFH zur gesteigerten Aktivität des Komplementsystems, wodurch Ca^{2+} -abhängig erhöhte VEGF-Level resultieren (87).

In dieser Arbeit wurde bereits vielfach die durch den „sublytic MAC“ induzierte VEGF-Expression beschrieben. Hierbei wurde u.a. gezeigt, dass nicht die basale, stetige, sondern die stimulierte, angeregte Freisetzung von VEGF gesteigert wird (84,123).

Komponenten des Immunsystems spielen eine bedeutende Rolle in der VEGF-abhängigen Angiogenese. Über Makrophagen können C3 und C5a dabei im Mausmodell auch anti-angiogen wirken und retinale Neovaskularisationen reduzieren; ein Fehlen von Complementfaktor B führte zur vermehrten Gefäßneubildung.

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in ihrer Funktion von pro-inflammatorisch, anti-angiogen (M1-Makrophagen) zu pro-angiogen (M2-Makrophagen) übergehen und somit im AMD-Tiermodell eine erhöhte CNV-Genese begünstigen können (60).

Eine Reduktion von Monozyten in der äußeren Netzhaut vermindert auch die Größe chorioidaler Neovaskularisationen (131)

6.4.4 Therapieansätze AMD

Im abschließenden Kapitel werden Therapieüberlegungen und -ansätze hinsichtlich der AMD diskutiert, die im Zusammenhang mit einer Beeinflussung des Komplementsystems stehen.

Grundlage der aktuellen Therapie ist die wiederholte intravitreale Injektion von anti-VEGF-Wirkstoffen, welche unter Berücksichtigung einiger Überlegungen als zu starres, eindimensionales Konzept erscheint.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits ausführlich dargestellt, scheinen Komplementproteine (v.a. C5a und TCC) in vitro oder am Tiermodell über erhöhtes VEGF zur pathologischen Angiogenese beitragen zu können. Es existieren zahlreiche laborexperimentelle bzw. erste klinische Therapieversuche. Zum größten Teil geht es, mangels bisher zugelassener Wirkstoffe, um die Entwicklung einer besseren Behandlung der geographischen Atrophie.

Lampalizumab (Antigen-bindendes Antikörperfragment gegen CFD) galt unter zahlreichen Kandidaten, die an Komplementproteinen ansetzen, lange Zeit als sehr vielversprechend, war allerdings in Phase III-Studien bezüglich Progredienz einer geographischen Atrophie einer Scheinbehandlung nicht überlegen (134).

In Bezug auf die exsudative AMD führte die intravitreale Injektion eines C5a-Inhibitors am Mausmodell zum Rückgang von Neovaskularisationen bzw. einer Gefäßleckage (133). Ebenso am Mausmodell konnte durch einen intravenös applizierten, CFH-basierten Inhibitor die Größe der entstandenen CNV verkleinert werden (125). Vorteil könnte die direktere Wirkung an der Choriokapillaris sein; trotz systemischer Gabe müsste eine lokale Wirkung sichergestellt werden. Problematisch, und bei bisherigen Therapeutika nicht ausreichend berücksichtigt, könnte sein, dass Komplementproteine jeweils unterschiedliche, teils auch gegensätzliche, Effekte auf VEGF-abhängige Angiogenese besitzen (vgl. Kap. 6.4.3).

Darüberhinaus kann sich die Wirkung der Komplementproteine konzentrationsabhängig stark unterscheiden (u.a. C3a) (135). Eine geringgradige Immunaktivität wird als vorteilhaft angesehen, da degenerierte Zellen bzw. Pathogene kontinuierlich entfernt werden müssen. Daher erscheint eine strikte Blockade einzelner Komponenten des Komplementsystems in Anbetracht komplexer, vielfältiger Interaktionen (v.a. des Faktors C3a, ggf. konzentrationsabhängig) als nicht ideal, da so regeneratives Potenzial der Anaphylatoxine nicht genutzt werden kann.

Da VEGF auch sehr wichtige physiologische Funktionen zur Erhaltung der Homöostase des Auges einnimmt (u.a. Neuroprotektion), kann eine anti-VEGF-Therapie trotz gutem Ansprechen mittel- bis langfristig zu zunehmender Zellatrophie bzw. Sehverschlechterung führen (130).

VEGF könnte, in Abhängigkeit von intrazellulärem Ca^{2+} bzw. der Aktivität der Komplementproteine, erst ab einem bestimmten Konzentrationslevel pathologische Veränderungen verursachen und davor gefäßprotektive Eigenschaften besitzen.

Von Bedeutung scheint daher ein optimal dosiertes, gleichzeitig modulierendes Eingreifen in den Komplement- bzw. VEGF-Stoffwechsel zu sein.

Bisher weniger untersucht ist, welche Auswirkungen Komplementproteine am Entstehungsort pathologischer Neovaskularisationen selbst, der Choriokapillaris, besitzen. Hierzu gibt es Überlegungen, dass sich der TCC dort, aufgrund fehlender Oberflächeninhibitoren, im Verlauf des Lebens zunehmend anlagert, zur Lyse der Zellen bzw. Atrophie des Gewebes führt und die AMD-Genese so primär verursacht (52).

Letztendlich sind die bisherigen Therapieversuche bzgl. AMD, welche die Beeinflussung der Komplementkaskade als Ansatz verfolgten, als eher enttäuschend zu werten. Meiner Meinung nach sind dazu folgende Überlegungen wichtig:

Die beiden Konvertaselevel (C3- und C5-Ebene) und ihre spezifischen Reaktionsprodukte besitzen nicht alle die gleichen, verstärkenden Effekte von Entzündung.

Wir wissen darüberhinaus nicht, auf welchem Konvertaselevel die AMD läuft. Smith et al. (95) beschreiben, dass es Typen von Komplement-abhängigen Nierenerkrankungen gibt, die ausschließlich auf der C3-Ebene ablaufen; andere wiederum sind auf die C5-Ebene übergegangen. Für die diesbezügliche Behandlung der AMD wäre das Wissen über die Art der Konvertase-Aktivierung von großer Wichtigkeit.

Den bisherigen Therapieversuchen lag die Idee zugrunde, dass die Komplementkaskade strikt und unaufhaltsam von A nach B abläuft. Die Antagonisierung eines Komplementfaktors hat aber, wie in dieser Arbeit gezeigt (vgl. Kap. XY), nicht einfach eine Unterbrechung der Kaskade zur Folge. Vielmehr kommt es zur Verschiebung der Zusammensetzung restlicher, aktiver Komplementfaktoren und somit zum veränderten Ablauf der Komplementkaskade.

Die Wirkung der Komplementproteine könnte auch abhängig vom Aktivitätszustand der Zielzellen sein. So könnte bei Patienten ein RPE existieren, das teilweise in der Schutzfunktion ist und parallel dazu bereits den „Switch“ vollzogen hat.

Darüberhinaus ist es so, dass bei Patienten das Komplementsystem bereits seit Jahrzehnten wirkt und ein neues immunologisches „Environment“ erzeugt hat. Zellen haben damit einhergehend ihren Phänotyp bereits geändert (RPE-Zellen, Immunzellen etc.) und das pro-inflammatorische Level ist wahrscheinlich nicht mehr umzukehren. Ein sinnvollerer Ansatzpunkt könnte dann sein, zu verstehen, welche Zelländerungen eingetreten sind und ob diese umgekehrt werden können (ggf. unabhängig vom Komplementsystem).

Zusammenfassend müssen alle bisherigen Therapieansätze als zu grobe oder zu späte Eingriffe in den VEGF-Stoffwechsel bzw. das Komplement-System gewertet werden. Ein noch präziseres, besseres Verständnis der Rolle der jeweiligen Bestandteile des Komplement-Systems, v.a. in der komplexen Krankheitsentstehung der AMD, würde hier entscheidend helfen, geeignetere Targets zu finden.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Sachsenweger M, Klauß V, Nasemann J. Duale Reihe Augenheilkunde. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2002.
- (2) Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*. 2005 Jul 1;85(3):845-81.
- (3) Gonzalez-Fernandez F, Healy JI. Early expression of the gene for interphotoreceptor retinoid-binding protein during photoreceptor differentiation suggests a critical role for the interphotoreceptor matrix in retinal development. *J Cell Biol*. 1990 Dec 11;111(6):2775–84.
- (4) Hollyfield JG. Hyaluronan and the functional organization of the interphotoreceptor matrix. *IOVS*. 1999 Nov;40(12):2767–9.
- (5) Pepperberg DR, Okajima TL, Wiggert B, Ripps H, Crouch RK, Chader GJ. Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP). Molecular biology and physiological role in the visual cycle of rhodopsin. *Mol Neurobiol*. 1993 Spring;7(1):61–85.
- (6) Uehara F, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM. Light-evoked changes in the interphotoreceptor matrix. *Science*. 1990 Jun 29;248(4963):1633–6.
- (7) Nguyen QD, Das A, Do DV, Dugel PU, Gomes A, Holz FG, Koh A, Pan CK, Sepah YJ, Patel N, MacLeod H, Maurer P. Brolocizumab: Evolution through Preclinical and Clinical Studies and the Implications for the Management of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2020 Jan 17;S0161-6420(20):30041-5.
- (8) Schraufstatter IU, Khaldoyanidi SK, DiScipio RG. Complement activation in the context of stem cells and tissue repair. *World J Stem Cells*. 2015 Sep 26;7(8):1090–1108.
- (9) Karl MO. Zur Phagozytose durch Retinale Pigmentepithelzellen [Dissertation]. Universität Hamburg; 2006.
- (10) Verma L, Tewari HK, Nainiwal S, Ravindranathan J. Transpupillary thermotherapy in subfoveal choroidal neovascular membrane secondary to age-related macular degeneration. *Indian J Ophthalmol*. 2004 Mar;52(1):35-40.
- (11) Ban Y, Rizzolo LJ. Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000 May 11;121(1):89-95.

- (12) Bazan NG, Gordon WC, Rodriguez de Turco EB. Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv Exp Med Biol.* 1992;318:295–306.
- (13) Tsuboi S. Measurement of the volume flow and hydraulic conductivity across the isolated dog retinal pigment epithelium. *IOVS.* 1987 Nov;28(11):1776-82.
- (14) Strauss O. Transport mechanisms of the retinal pigment epithelium to maintain of visual function. *Heat Mass Transfer.* 2014 Mar;50:303–313.
- (15) Adler AJ, Southwick RE. Distribution of glucose and lactate in the interphotoreceptor matrix. *Ophthalmic Res.* 1992;24(4):243-52.
- (16) Hamann S, Kiilgaard JF, la Cour M, Prause JU, Zeuthen T. Cotransport of H⁺, lactate, and H₂O in porcine retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2003;76(4):493–504.
- (17) Steinberg RH, Linsenmeier RA, Griff ER. Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.* 1983;23(11):1315–23.
- (18) la Cour M. The retinal pigment epithelium controls the potassium activity in the subretinal space. *Acta Ophthalmol Suppl.* 1985;173:9–10.
- (19) Okada T, Ernst OP, Palczewski K, Hofmann KP. Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(5):318–24.
- (20) Baehr W, Wu SM, Bird AC, Palczewski K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res.* 2003;43(28):2957–8.
- (21) Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda).* 2010 Feb;25(1):8-15.
- (22) Hall MO, Abrams T. Kinetic studies of rod outer segment binding and ingestion by cultured rat RPE cells. *Exp Eye Res.* 1987;45(6):907–22.
- (23) Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet].* Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. *Anatomy and Physiology of the Retina.* Verfügbar auf: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52778/>

- (24) Cayouette M, Smith SB, Becerra SP, Gravel C. Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiol Dis.* 1999;6(6):523–32.
- (25) Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(1):1–29.
- (26) Relvas LJ, Bouffieux C, Marcet B, Communi D, Makhoul M, Horckmans M, Blero D, Bruyns C, Caspers L, Boeynaems JM, Willermain F. Extracellular nucleotides and interleukin-8 production by ARPE cells: potential role of danger signals in blood-retinal barrier activation. *IOVS.* 2009;50(3):1241–6.
- (27) Kim YH, He S, Kase S, Kitamura M, Ryan SJ, Hinton DR. Regulated secretion of complement factor H by RPE and its role in RPE migration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;247(5):651–9.
- (28) Austin BA, Liu B, Li Z, Nussenblatt RB. Biologically active fibronectin fragments stimulate release of MCP-1 and catabolic cytokines from murine retinal pigment epithelium. *IOVS.* 2009;50(6):2896–2902.
- (29) Liversidge J, McKay D, Mullen G, Forrester JV. Retinal pigment epithelial cells modulate lymphocyte function at the blood-retina barrier by autocrine PGE2 and membrane-bound mechanisms. *Cell Immunol.* 1993;149(2):315–30.
- (30) Kindzelskii AL, Elner VM, Elner SG, Yang D, Hughes BA, Petty HR. Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments. *J Gen Physiol.* 2004;124(2):139–49.
- (31) Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *IOVS.* 1999 Aug;40(9):1891–8.
- (32) Velez-Montoya R, Oliver SC, Olson JL, Fine SL, Quiroz-Mercado H, Mandava N. Current knowledge and trends in age-related macular degeneration: genetics, epidemiology, and prevention. *Retina.* 2014;34(3):423–441.
- (33) Fanjul-Moles ML, López-Riquelme GO. Relationship between Oxidative Stress, Circadian Rhythms, and AMD. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7420637.

- (34) Fine SL, Berger JW, Maguire MG, Ho AC. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2000;342(7):483–92.
- (35) Bone RA, Gibert JC, Mukherjee A. Light distributions on the retina: relevance to macular pigment photoprotection. *Acta Biochim Pol.* 2012;59(1):91–96.
- (36) Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med.* 2010;10(9):802–23.
- (37) Delori FC, Goger DG, Dorey CK. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *IOVS.* 2001;42(8):1855–66.
- (38) Bird AC. Doyne Lecture. Pathogenesis of retinal pigment epithelial detachment in the elderly; the relevance of Bruch's membrane change. *Eye (Lond).* 1991;5 (Pt 1):1–12.
- (39) Kijlstra A, Berendschot TT. Age-related macular degeneration: a complementopathy?. *Ophthalmic Res.* 2015;54(2):64–73.
- (40) Ferris FL 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2013;120(4):844–51.
- (41) Arias L, Armadá F, Donate J, Garcia-Arumi J, Giralt J, Pazos B, Piñero A, Martínez F, Mondéjar JJ, Ortega I, Zlateva G, Buggage R. Delay in treating age-related macular degeneration in Spain is associated with progressive vision loss. *Eye (Lond).* 2009;23(2):326–33.
- (42) Nowak JZ. AMD--the retinal disease with an unprecised etiopathogenesis: in search of effective therapeutics. *Acta Pol Pharm.* 2014;71(6):900–16.
- (43) Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology.* 2002;109(10):1767–79.
- (44) Christen WG, Glynn RJ, Manson JE, Ajani UA, Buring JE. A prospective study of cigarette smoking and risk of age-related macular degeneration in men. *JAMA.* 1996;276(14):1147–51.
- (45) Mitchell P, Wang JJ, Foran S, Smith W. Five-year incidence of age-related maculopathy lesions: the Blue Mountains Eye Study [veröffentlichte Korrektur in *Ophthalmology* 2002 Sep; 109(9):1588]. *Ophthalmology.* 2002;109(6):1092–7.

- (46) Bressler SB, Maguire MG, Bressler NM, Fine SL. Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration. The Macular Photocoagulation Study Group. *Arch Ophthalmol*. 1990;108(10):1442-7.
- (47) Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385-9.
- (48) Fritsche LG, Fariss RN, Stambolian D, Abecasis GR, Curcio CA, Swaroop A. Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2014;15:151-71.
- (49) Gorin MB. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol Aspects Med*. 2012;33(4):467-86.
- (50) Andreoli MT, Morrison MA, Kim BJ, Chen L, Adams SM, Miller JW, DeAngelis MM, Kim IK. Comprehensive analysis of complement factor H and LOC387715/ARMS2/HTRA1 variants with respect to phenotype in advanced age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2009;148(6):869-74.
- (51) Symes RJ, Cuthbertson FM. Blue-blocking intraocular implants should be used routinely during phacoemulsification surgery – Yes. *Eye (Lond)*. 2012 Nov; 26(11): 1397-9.
- (52) Whitmore SS, Sohn EH, Chirco KR, Drack AV, Stone EM, Tucker BA, Mullins RF. Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: implications for pathophysiology and therapy. *Prog Retin Eye Res*. 2015 Mar;45:1-29.
- (53) Evans JR, Lawrenson JG. Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Nov 14;11:CD000254.
- (54) AREDS2 Research Group, Chew EY, Clemons T, SanGiovanni JP, Danis R, Domalpally A, McBee W, Sperduto R, Ferris FL. The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2): study design and baseline characteristics (AREDS2 report number 1). *Ophthalmology*. 2012;119(11): 2282-9.

- (55) Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Wong TY, Cotch MF, Liu K, Burke G, Saad MF, Jacobs DR Jr. Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ophthalmology*. 2006 Mar;113(3):373–80.
- (56) Nebbioso M, Lambiase A, Cerini A, Limoli PG, La Cava M, Greco A. Therapeutic Approaches with Intravitreal Injections in Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: Current Drugs and Potential Molecules. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 4;20(7):1693.
- (57) Ehrlich P. Zur Theorie der Lysin Wirkung. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 1899;1:6–9.
- (58) Brown EJ. Complement receptors and phagocytosis. *Curr Opin Immunol*. 1991 Feb;3(1):76–82.
- (59) Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010 Jan;20(1):34–50.
- (60) Ziccardi RJ. The first component of human complement (C1): activation and control. *Springer Semin Immunopathol*. 1983;6(2-3):213–30.
- (61) Ohta M, Okada M, Yamashina I, Kawasaki T. The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J Biol Chem*. 1990 Feb 5;265(4):1980–4.
- (62) Zipfel PF, Mihlan M, Skerka C. The alternative pathway of complement: a pattern recognition system. *Adv Exp Med Biol*. 2007;598:80–92.
- (63) Müller-Eberhard HJ. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:321–47.
- (64) Hadders MA, Beringer DX, Gros P. Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science*. 2007 Sep 14;317(5844):1552–4.
- (65) Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J*. 1989 Nov 15;264(1):1–14.
- (66) Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1305–10.

- (67) Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, Videm V, Lappegård KT, Köhl J, Lambris JD. Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation [veröffentlichte Korrektur in Blood 2002 Oct 15;100(8):2691]. *Blood*. 2002;100(5):1869–77.
- (68) DiScipio RG, Daffern PJ, Jagels MA, Broide DH, Sriramarao P. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):1127–36.
- (69) Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Köhl J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol*. 2009 Sep;46(14):2753–66.
- (70) Luo Y, Zhuo Y, Fukuhara M, Rizzolo LJ. Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Aug;47(8):3644–55.
- (71) Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*. 1996 Feb;62(2):155–69.
- (72) Börncke F. Funktionelle Charakterisierung der mit altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) assoziierten Komplementfaktor-H-Variante Y402H [Dissertation]. Universität Göttingen; 2011.
- (73) Strauss O. Ca²⁺-imaging techniques to analyze Ca²⁺ signaling in cells and to monitor neuronal activity in the retina. *Methods Mol Biol*. 2013;935:297–308.
- (74) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3440–50.
- (75) Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy. *Pharmacol Rep*. 2006 May-Jun;58(3):353–63.
- (76) van Lookeren Campagne M, Strauss EC, Yaspan BL. Age-related macular degeneration: Complement in action. *Immunobiology*. 2016 Jun;221(6):733–9.
- (77) Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2016 May;73(9):1765–86.
- (78) Rodrigues EB. Inflammation in dry age-related macular degeneration. *Ophthalmologica*. 2007;221(3):143–52.

- (79) Lauer N. Die Rolle des Komplementsystems bei Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration [Dissertation]. Universität Jena; 2011.
- (80) Serna M, Giles JL, Morgan BP, Bubeck D. Structural basis of complement membrane attack complex formation. *Nat Commun.* 2016 Feb 4;7:10587.
- (81) Putzier I. Methoden zur Untersuchung Kalzium-aktivierter Chloridkanäle in somatosensorischen Neuronen der Ratte [Diplomarbeit]. Universität Köln; 2000.
- (82) Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol.* 2002 Sep;134(3):411–31.
- (83) Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Feb 14;103(7):2328–33.
- (84) Kunchithapautham K, Rohrer B. Sublytic membrane-attack-complex (MAC) activation alters regulated rather than constitutive vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in retinal pigment epithelium monolayers. *J Biol Chem.* 2011 Jul 8;286(27):23717–24.
- (85) Kunchithapautham K, Bandyopadhyay M, Dahrouj M, Thurman JM, Rohrer B. Sublytic membrane-attack-complex activation and VEGF secretion in retinal pigment epithelial cells. *Adv Exp Med Biol.* 2012;723:23–30.
- (86) Rosenthal R, Heimann H, Agostini H, Martin G, Hansen LL, Strauss O. Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. *Mol Vis.* 2007 Mar 27;13:443–56.
- (87) Thurman JM, Renner B, Kunchithapautham K, Ferreira VP, Pangburn MK, Ablonczy Z, Tomlinson S, Holers VM, Rohrer B. Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury. *J Biol Chem.* 2009 Jun 19;284(25):16939–47.
- (88) Genewsky A, Jost I, Busch C, Huber C, Stindl J, Skerka C, Zipfel PF, Rohrer B, Strauß O. Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflugers Arch.* 2015 Oct;467(10):2179–91.
- (89) Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol.* 2009 Oct;9(10):729–40.

- (90) Campbell AK, Daw RA, Hallett MB, Luzio JP. Direct measurement of the increase in intracellular free calcium ion concentration in response to the action of complement. *Biochem J.* 1981 Feb 15;194(2):551–60.
- (91) Carney DF, Lang TJ, Shin ML. Multiple signal messengers generated by terminal complement complexes and their role in terminal complement complex elimination. *J Immunol.* 1990 Jul 15;145(2):623–9.
- (92) Halperin JA, Brugnara C, Nicholson-Weller A. Ca^{2+} -activated K^{+} efflux limits complement-mediated lysis of human erythrocytes. *J Clin Invest.* 1989 May;83(5):1466–71.
- (93) Halperin JA, Nicholson-Weller A, Brugnara C, Tosteson DC. Complement induces a transient increase in membrane permeability in unlysed erythrocytes. *J Clin Invest.* 1988 Aug 1;82(2):594-600.
- (94) Markiewski MM, Mastellos D, Tudoran R, DeAngelis RA, Strey CW, Franchini S, Wetsel RA, Erdei A, Lambris JD. C3a and C3b activation products of the third component of complement (C3) are critical for normal liver recovery after toxic injury. *J Immunol.* 2004 Jul 15;173(2):747–54.
- (95) Smith RJH, Appel GB, Blom AM, Cook HT, D'Agati VD, Fakhouri F, Fremeaux-Bacchi V, Józsi M, Kavanagh D, Lambris JD, Noris M, Pickering MC, Remuzzi G, de Córdoba SR, Sethi S, Van der Vlag J, Zipfel PF, Nester CM. C3 glomerulopathy - understanding a rare complement-driven renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Mar;15(3):129–43.
- (96) Haugland RP. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* 9. Auflage. Molecular Probes; 2002.
- (97) Möller T, Nolte C, Burger R, Verkhratsky A, Kettenmann H. Mechanisms of C5a and C3a Complement Fragment-Induced $[Ca^{2+}]_i$ Signaling in Mouse Microglia. *J Neurosci.* 1997 Jan 15; 17(2): 615–24.
- (98) Morgan BP, Campbell AK. The recovery of human polymorphonuclear leucocytes from sublytic complement attack is mediated by changes in intracellular free calcium. *Biochem J.* 1985 Oct 1;231(1):205–8.
- (99) Newsholme P, Adogu AA, Soos MA, Hales CN. Complement-induced Ca^{2+} influx in cultured fibroblasts is decreased by the calcium-channel antagonist nifedipine or by some bivalent inorganic cations. *Biochem J.* 1993 Nov 1;295(3):773–9.

- (100) Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:71–9.
- (101) Schatz-Jakobsen JA, Yatime L, Larsen C, Petersen SV, Klos A, Andersen GR. Structural and functional characterization of human and murine C5a anaphylatoxins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2014 Jun;70(6):1704–17.
- (102) Oiki S, Ueda S, Okada Y. Increases in cytosolic free Ca²⁺ induced by ATP, complement and beta-lipoprotein in mouse L fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Oct 15;132(1):290–8.
- (103) Park CC, Shin ML, Simard JM. The complement membrane attack complex and the bystander effect in cerebral vasospasm. *J Neurosurg.* 1997 Aug;87(2):294–300.
- (104) Seeger W, Suttorp N, Hellwig A, Bhakdi. Non cytolytic terminal complement complexes may serve as calcium gates to elicit leukotriene B₄ generation in human polymorpho nuclear leukocytes. *J Immunol.* 1986 Aug 15, 137 (4) 1286-93
- (105) Tegla CA, Cudrici C, Rozycka M, Soloviova K, Ito T, Singh AK, Khan A, Azimzadeh P, Andrian-Albescu M, Khan A, Niculescu F, Rus V, Judge SI, Rus H. C5b-9-activated, Kv1.3channels mediate oligodendrocyte cell cycle activation and dedifferentiation. *Exp Mol Pathol.* 2011 Aug; 91(1): 335–45.
- (106) Yang P, Baciu P, Kerrigan BC, Etheridge M, Sung E, Toimil BA, Berchuck JE, Jaffe GJ. Retinal pigment epithelial cell death by the alternative complement cascade: role of membrane regulatory proteins, calcium, PKC, and oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 May 6;55(5):3012–21.
- (107) Jang JH, Clark JD, Li X, Yorek MS, Usachev YM, Brennan TJ. Nociceptive sensitization by complement C5a and C3a in mouse. *Pain.* 2010 Feb;148(2):343–52.
- (108) Soruri A, Grigat J, Kiafard Z, Zwirner J. Mast cell activation is characterized by upregulation of a functional anaphylatoxin C5a receptor. *BMC Immunol.* 2008 Jun 17;9:29.
- (109) Gutzmer R, Köther B, Zwirner J, Dijkstra D, Purwar R, Wittmann M, Werfel T. Human plasmacytoid dendritic cells express receptors for anaphylatoxins C3a and C5a and are chemoattracted to C3a and C5a. *J Invest Dermatol.* 2006 Nov;126(11):2422–9.

- (110) Norgauer J, Dobos G, Kownatzki E, Dahinden C, Burger R, Kupper R, Gierschik P. Complement fragment C3a stimulates Ca²⁺ influx in neutrophils via a pertussis-toxin-sensitive G protein. *European Journal of Biochemistry*. 1993 Oct;217(1):289-94.
- (111) Elsner J, Oppermann M, Czech W, Dobos G, Schöpf E, Norgauer J, Kapp A. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur J Immunol*. 1994 Mar;24(3):518-22.
- (112) Brandstetter C, Holz FG, Krohne TU. Complement Component C5a Primes Retinal Pigment Epithelial Cells for Inflammasome Activation by Lipofuscin-mediated Photooxidative Damage. *J Biol Chem*. 2015 Dec 25;290(52):31189-98.
- (113) Ramos de Carvalho JE, Klaassen I, Vogels IM, Schipper-Krom S, van Noorden CJ, Reits E, Gorgels TG, Bergen AA, Schlingemann RO. Complement factor C3a alters proteasome function in human RPE cells and in an animal model of age-related RPE degeneration. *IOVS*. 2013 Oct 3;54(10):6489-6501.
- (114) Werfel T, Oppermann M, Butterfield JH, Begemann G, Elsner J, Götze O, Zwirner J. The human mast cell line HMC-1 expresses C5a receptors and responds to C5a but not to C5a(desArg). *Scand J Immunol*. 1996 Jul;44(1):30-6.
- (115) Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, Lambris JD, Warner RL, Flierl MA, Hoesel LM, Gebhard F, Younger JG, Drouin SM, Wetsel RA, Ward PA. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):682-7.
- (116) Reis ES, Chen H, Sfyroera G, Monk PN, Köhl J, Ricklin D, Lambris JD. C5a receptor-dependent cell activation by physiological concentrations of desarginated C5a: insights from a novel label-free cellular assay. *J Immunol*. 2012 Nov 15;189(10):4797-4805.
- (117) Cain SA, Monk PN. The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem*. 2002 Mar 1;277(9):7165-9.
- (118) Bossi F, Rizzi L, Bulla R, Debeus A, Tripodo C, Picotti P, Betto E, Macor P, Pucillo C, Würzner R, Tedesco F. C7 is expressed on endothelial cells as a trap for the assembling terminal complement complex and may exert anti-inflammatory function. *Blood*. 2009 Apr 9;113(15):3640-8.

- (119) Lueck K, Busch M, Moss SE, Greenwood J, Kasper M, Lommatzsch A, Pauleikhoff D, Wasmuth S. Complement Stimulates Retinal Pigment Epithelial Cells to Undergo Pro-Inflammatory Changes. *Ophthalmic Res.* 2015 Oct 27;54(4):195-203.
- (120) Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan BP. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci.* 2013 Apr 23;126(Pt 13):2903-13.
- (121) Wiedmer T, Ando B, Sims PJ. Complement C5b-9-stimulated platelet secretion is associated with a Ca²⁺-initiated activation of cellular protein kinases. *J Biol Chem.* 1987 Oct 5;262(28):13674-81.
- (122) Lakkaraju A, Toops KA, Xu J. Should I stay or should I go? Trafficking of sub-lytic MAC in the retinal pigment epithelium. *Adv Exp Med Biol.* 2014;801:267-74.
- (123) Rohrer B, Kunchithapautham K, Genewsky A, Strauß O. Prolonged SRC kinase activation, a mechanism to turn transient, sublytic complement activation into a sustained pathological condition in retinal pigment epithelium cells. *Adv Exp Med Biol.* 2014;801:221-7.
- (124) Li W, Chen S, Ma M, Qian J, Ma X. Complement 5b-9 complex-induced alterations in human RPE cell physiology. *Med Sci Monit.* 2010 Jan;16(1):17-23.
- (125) Rohrer B, Coughlin B, Bandyopadhyay M, Holers VM. Systemic human CR2-targeted complement alternative pathway inhibitor ameliorates mouse laser-induced choroidal neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2012 Aug;28(4):402-9.
- (126) Cordeiro S, Seyler S, Stindl J, Milenkovic VM, Strauss O. Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *IOVS.* 2010 Nov;51(11):6001-8.
- (127) Cortright DN, Meade R, Waters SM, Chenard BL, Krause JE. C5a, but not C3a, increases VEGF secretion in ARPE-19 human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res.* 2009 Jan;34(1):57-61.
- (128) Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol.* 2014 Dec;14(12):811-20.
- (129) Tan LX, Toops KA, Lakkaraju A. Protective responses to sublytic complement in the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016 Aug 2;113(31):8789-94.

- (130) Sene A, Chin-Yee D, Apte RS. Seeing through VEGF: innate and adaptive immunity in pathological angiogenesis in the eye. *Trends Mol Med*. 2015 Jan;21(1):43-51.
- (131) Sennlaub F. Inflammation and angiogenesis in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica*. 2014 Aug 20; 92(253):0-0.
- (132) Hu LA, Zhou T, Hamman BD, Liu Q. A homogeneous G protein-coupled receptor ligand binding assay based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer. *Assay Drug Dev Technol*. 2008 Aug;6(4):543-50.
- (133) Brockmann C, Brockmann T, Dege S, Busch C, Kociok N, Vater A, Klussmann S, Strauß O, Jousen AM. Intravitreal inhibition of complement C5a reduces choroidal neovascularization in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015 Oct;253(10):1695-1704.
- (134) Wu J, Sun X. Complement system and age-related macular degeneration: drugs and challenges. *Drug Des Devel Ther*. 2019 Jul 19;13:2413-25.
- (135) Haynes T, Luz-Madrigal A, Reis ES, Echeverri Ruiz NP, Grajales-Esquivel E, Tzekou A, Tsonis PA, Lambris JD, Del Rio-Tsonis K. Complement anaphylatoxin C3a is a potent inducer of embryonic chick retina regeneration. *Nat Commun*. 2013;4:2312.
- (136) Legler DF, Loetscher M, Jones SA, Dahinden CA, Arock M, Moser B. Expression of high- and low-affinity receptors for C3a on the human mast cell line, HMC-1. *Eur J Immunol*. 1996 Apr;26(4):753-758.
- (137) Parham P. *The immune System*. 3. Auflage. Garland Science; 2009 Okt 19.

8. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

„Ich, Christian Friedrich Huber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Komplement-induzierte Kalziumsignale am retinalen Pigmentepithel vor dem Hintergrund der altersbedingten Makuladegeneration“ („Complement-induced calcium signals on the retinal pigment epithelium against the background of age-related macular degeneration“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

22.03.2021

(Unterschrift)

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Christian Friedrich Huber hatte folgenden Anteil an folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Andreas Genewsky, Ingmar Jost, Catharina Busch, Christian Huber, Julia Stindl, Christine Skerka, Peter F Zipfel, Bärbel Rohrer, Olaf Strauß. Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. Pflügers Archiv, European Journal of Physiology. 2015.

Beitrag im Einzelnen:

Aus meinen Messungen und statistischen Auswertungen sind die Abbildungen 7 A-C entstanden.

Publikation 2:

Catharina Busch, Kunchithapautham, Christian Huber, Khava Asamalova, Christine Skerka, Gerhild Wildner, Bärbel Rohrer, Olaf Strauß. Anaphylatoxin signaling at the RPE: Ca²⁺ signals, activation of the AKT and PI3-kinase pathway and Foxo1/FoxP3 activation. Frontiers in Immunology. 2017.

Beitrag im Einzelnen:

Aus meinen Messungen und statistischen Auswertungen sind die Abbildungen 1E, 2A-D, 3A-H entstanden.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

9. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

10. Publikationsliste

(1) Andreas Genewsky, Ingmar Jost, Catharina Busch, Christian Huber, Julia Stindl, Christine Skerka, Peter F Zipfel, Bärbel Rohrer, Olaf Strauß. Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflügers Archiv, European Journal of Physiology*. 2015.

(2) Catharina Busch, Kunchithapautham, Christian Huber, Khava Asamalova, Christine Skerka, Gerhild Wildner, Bärbel Rohrer, Olaf Strauß. Anaphylatoxin signaling at the RPE: Ca²⁺ signals, activation of the AKT and PI3-kinase pathway and Foxo1/FoxP3 activation. *Frontiers in Immunology*. 2017.

11. Danksagung

Ganz besonders und ausdrücklich möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Olaf Strauß bedanken, der mich an einem sehr spannenden Thema arbeiten lassen und mich dabei über die vielen Jahre im Labor sowie danach als ständig verfügbarer Ansprechpartner aus der Ferne so tatkräftig unterstützt hat. Frau Universitätsprofessorin Antonia Jousen danke ich dafür, dass sie mir zu Beginn diesen großartigen Kontakt hergestellt hatte.

Im gesamten Labor-Team habe ich mich jederzeit sehr gut betreut und aufgehoben gefühlt, vielen Dank dafür! Im Speziellen wäre das Gelingen dieser Dissertation ohne den gemeinsamen Austausch mit Frau Dr. med. Nadine Reichhart und Frau Dr. med. Catharina Busch und die Anleitung durch Frau Gabriele Fels nicht möglich gewesen.

Aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen bin ich dankbar dafür, dass ich in meiner klinischen und wissenschaftlichen Arbeit gefördert wurde und ich mich so mit ihnen und durch sie beruflich und persönlich stetig weiterentwickeln konnte.

Ich bin sehr glücklich, Menschen um mich zu haben, die mich prägen und in meinem Leben weit über die Promotion hinaus bedingungslos unterstützen.

Meine allergrößte Wertschätzung gilt dabei meinen Eltern, die mir meinen Lebensweg in jeglicher Hinsicht ermöglicht haben, mich durchgehend motivieren und mir ein tolles Vorbild sind. Meinen Brüdern, meinen Freunden und meiner Partnerin möchte ich dafür danken, dass sie für mich da sind und ich mich auch in schwierigen Zeiten voll und ganz auf sie verlassen kann. Meiner Partnerin Anna Maria verdanke ich zusätzlich, dass sie mir viel Motivation und den Willen zur stetigen Verbesserung gibt.

Vielen Dank!