

Rolle des humanen Apolipoprotein E im angeborenen Immunsystem

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)



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

von Diplom-Biologin
Susanne Ackermann geb. Vödisch

geboren am 16.09.1987 in Plauen

Gutachter:

1. Prof. Dr.Christine Skerka
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V., Hans-Knöll-
Institut
Beutenbergstraße 11a
07745 Jena

2. Prof. Dr. med. Andreas Habenicht
Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
Poliklinik, Klinikum der Universität München, Ludwig-Maximilian-Universität
München
Pettenkoferstraße 8a
80336 München

3. Prof. PhD MD Christoph J. Binder
Department of Laboratory Medicine, Medical University of Vienna & Center for
Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences
Lazarettgasse 14, AKH BT25.2
1090 Vienna
Austria

Datum der öffentlichen Disputation: 10.10.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung.....	IX
Summary.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Apolipoprotein E.....	1
1.1.1 Struktur und Funktion von ApoE.....	1
1.1.2 ApoE-assoziierte Erkrankungen.....	3
1.1.2.1 Bedeutung von Lipiden.....	4
1.1.2.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	4
1.1.2.3 Neurodegenerative Erkrankungen.....	5
1.1.2.4 Altersabhängige Makuladegeneration.....	6
1.1.2.5 Assoziation mit dem Komplementsystem.....	7
1.2 Das Komplementsystem.....	7
1.2.1 Die Aktivierung des Komplementsystems.....	9
1.2.1.1 Der klassische Weg des Komplementsystems.....	9
1.2.1.2 Der Lektin-Weg des Komplementsystems.....	11
1.2.1.3 Der alternative Weg des Komplementsystems.....	11
1.2.2 Die C3 und C5 Konvertase des Komplementsystems.....	12
1.2.3 Regulation des Komplementsystems.....	12
1.2.4 Rolle des Komplementsystems in der adaptiven Immunantwort.....	14
1.3 Ziel dieser Arbeit.....	15
2 Materialien und Methoden.....	17
2.1 Arbeitsmaterialien und Geräte.....	17
2.2 Chemikalien, Lösungsmittel und Puffer.....	17
2.3 Proteine, Lipide, Antikörper und Seren.....	18
2.4 Zelllinien, Stämme und Kultivierung.....	20
2.5 SDS-Gelelektrophorese.....	20
2.6 Silberfärbung.....	20
2.7 Western Blot.....	21

2.8	Biotinylierung von Proteinen.....	21
2.9	Herstellung Fluoreszenz-gekoppelter Proteine.....	21
2.10	Komplementassays.....	22
2.10.1	Hämolyseassay	22
2.10.2	E. coli Überlebensassay	23
2.10.3	Komplementaktivierungsassay.....	23
2.10.4	Komplement-Spaltungs-Assay.....	23
2.10.5	Kofaktor-Assay.....	23
2.11	Bindungsstudien	24
2.11.1	ELISA	24
2.11.2	Protein-Protein-Interaktion / einfacher ELISA.....	24
2.11.3	Analyse der Bindungsbedingungen und der Bindungsart	25
2.11.4	Kompetitionsassay.....	25
2.11.5	Transmissionselektronenmikroskopie.....	26
2.11.6	Schicht-Interferenz-Technologie	26
2.11.7	Mikroskala-Thermophorese	27
2.11.7.1	SD-Test.....	28
2.11.8	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	28
2.11.9	Durchflusszytometrie	29
2.12	Statistische Auswertung.....	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Einfluss von ApoE auf das Komplementsystem.....	30
3.2	Inhibitorischer Einfluss von ApoE auf den klassischen Weg des Komplementsystems	32
3.3	Einfluss von ApoE auf die Spaltung von C2, C4 und C4b	34
3.4	Bindung von ApoE an Proteine der initialen Phase des klassischen Komplementweges	36
3.5	Charakterisierung der Bindung von ApoE an den C1 Komplex	37
3.6	Calciumabhängigkeit der Bindung zwischen ApoE und C1q	42
3.7	Charakterisierung der Bindestelle von ApoE an C1q.....	42
3.7.1	Position der C1q-Bindungsstelle an ApoE	42
3.7.2	Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen ApoE und C1q.....	45
3.7.3	Bestimmung der Bindungsaffinität von ApoE 139-152 zu C1q	46
3.8	Charakterisierung der ApoE-Bindestelle an C1q	48
4	Diskussion.....	51
4.1	ApoE inhibiert den klassischen Weg des Komplementsystems	52
4.2	ApoE inhibiert die Initiation des klassischen Komplementweges.....	52

4.3	ApoE interagiert Calcium-abhängig mit C1q	54
4.4	ApoE interagiert in der Nähe seiner LDL-R Bindestelle mit C1q	55
4.5	ApoE bindet an die Collagen-ähnliche Struktur des C1q Moleküls	56
4.6	Wirkungsweise von ApoE auf den klassischen Komplementweg	58
4.7	Interaktion von ApoE mit C1q in vivo	60
4.8	Relevanz der Ergebnisse für ApoE assoziierte Erkrankungen	62
4.9	Fazit	64
	Literaturverzeichnis	XI
	Eigenständigkeitserklärung	XVII
	Konferenzbeiträge und Publikationen	XVIII
	Danksagung	XIX

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid beta
Abb.	Abbildung
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
ApoA	Apolipoprotein A
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE ^{-/-}	ApoE Knockout-Maus
ApoE3-KI	ApoE3 Knockin-Maus
ApoE4-KI	ApoE4 Knockin-Maus
APS	Adenosinphosphosulfat
AW	alternativer Weg
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CFU	Kolonie-formenden Einheiten
ChP	choroidaler Plexus
Coll	Collagen
CRP	C-reaktives Protein
CRT	Calreticulin
C1 INH	C1 Inhibitor
C1q ^{-/-}	C1q defizientes Serum
C4BP	C4b-bindendes Protein
DPBS	Dulbeccos PBS
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EfB	extrazelluläres, Fibrinogen-bindendes Protein
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
FACS	Durchflusszytometrie
FHL-1	Faktor H-ähnlichen Protein 1
g	Gramm
GVB ⁺⁺	Gelatine-Veronal-Puffer
h	Stunde
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFD	fettreiche Kost
HRP	Meerrettichperoxidase
k _a	Assoziationskonstante
K _D	Affinitätskonstante
k _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
KW	klassischer Weg
l	Liter
LDL	Lipoprotein geringer Dichte
LDL-R	LDL-Rezeptor

LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LW	Lektin-Weg
M	Molal
m	monoklonal
MASP-1	Mannose-assoziierte Serinprotease 1
MASP-2	Mannose-assoziierte Serinprotease 2
MBL	Mannose-bindendes Lektin
mLDL	Malondialdehyd-modifiziertes LDL
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MST	Mikroskala Thermophorese
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
ND	normale Kost
NHS	Normales humanes Serum
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p	polyklonal
Pa	Pascal
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS ⁺⁺	PBS mit Calcium und Magnesium
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TCC	Terminalen-Komplement-Komplex
u. a.	unter anderem
V	Volt
v	Volumen
Ve	Ventrikel
VLDL	Lipoprotein sehr geringer Dichte
Vnt	Vitronektin
w	Masse
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Apolipoprotein E.	2
Abb. 2: Einfluss des Aminosäureaustausches an Position 158 auf die LDL-R Bindestelle.....	3
Abb. 3: Das Komplementsystem.	9
Abb. 4: Struktur des C1q Moleküls und des C1 Komplexes.....	10
Abb. 5: ApoE Isoformen.	30
Abb. 6: Effekt von ApoE auf das Komplementsystem.	32
Abb. 7: ApoE inhibiert den klassischen Weg des Komplementsystems.....	34
Abb. 8: Spaltung von C2, C4 und C4b.	35
Abb. 9: Interaktion von ApoE mit Proteinen der initialen Phase des klassischen Komplementweges.	37
Abb. 10: Bindung von ApoE an C1 Komponenten.	38
Abb. 11: Interaktion von ApoE mit MBL.	39
Abb. 12: Interaktionsprofil der ApoE Formen mit C1q.....	41
Abb. 13: Bindung von ApoE und C1q an mLDL.....	41
Abb. 14: Einfluss von Calcium auf die ApoE-C1q-Bindung.	42
Abb. 15: Charakterisierung der C1q-Bindestelle an ApoE.....	43
Abb. 16: Bindung von ApoE an C1q und den LDL-R.	45
Abb. 17: Charakterisierung der Bindungsart zwischen ApoE und C1q.....	46
Abb. 18: Bestimmung der Affinität zwischen ApoE 139-152 und C1q.	48
Abb. 19: Charakterisierung der Bindestelle von ApoE an C1q..	49
Abb. 20: Bindung von ApoE und C1s ₂ C1r ₂ an C1q.	50
Abb. 21: ApoE 139-152 beinhaltet die Bindestelle für C1q und den LDL-R.	56
Abb. 22: Model der ApoE Interaktionsdomäne im C1q Molekül.	58
Abb. 23: Frühe Phase des klassischen Komplementweges.	59
Abb. 24: Lipidablagerung im ChP.	61
Abb. 25: Komplementdeposition im ChP.	62
Abb. 27: Doppelfunktion von ApoE.....	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Sequenzen der verwendeten ApoE Peptide.....	19
Tab. 2: Bindungscharakteristika der Interaktion von C1q mit ApoE Formen.....	40

Zusammenfassung

Die Erforschung altersabhängiger Krankheiten nimmt in unserer stetig älter werdenden Gesellschaft eine immer wichtigere Rolle ein. Vor allem Erkrankungen, bei denen die genaue Pathogenese noch nicht hinreichend bekannt ist, wie Arteriosklerose, Demenz und altersabhängige Makuladegeneration (AMD), stehen im Fokus der Forschung. Ein auffallendes Merkmal all dieser Krankheiten ist ihre Assoziation mit dem Apolipoprotein E (ApoE). ApoE ist ein wichtiges Protein im Lipidmetabolismus. Dabei bindet ApoE sowohl an Lipide als auch an Lipid-Rezeptoren der Zelloberfläche. Drei Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4 unterscheiden sich lediglich durch eine bzw. zwei Aminosäuren. Träger der ApoE2 Isoform haben ein erhöhtes Risiko an AMD zu erkranken, Träger von ApoE4 an Demenz und Arteriosklerose. Die Ursache dafür ist noch nicht bekannt. Im Verlauf dieser Krankheiten findet sich das ApoE Molekül vor allem in den für die Erkrankungen charakteristischen Ablagerungen wieder. Diese bestehen zu einem großen Teil aus Lipiden, Amyloid beta sowie Zelltrümmern und bilden eine Aktivatoroberfläche für das Komplementsystem. Eine wichtige Rolle des Komplementsystems ist es körpereigene Abfallprodukte, wie tote und geschädigte Zellen oder auch modifizierte Lipide, mit Hilfe von Regulatoren antiinflammatorisch zu beseitigen. Im Falle der krankheitsbedingten Ablagerungen kommt es jedoch zu einer Überaktivierung des Komplementsystems, zu permanenter Inflammation und lokalen Schädigungen. Eine Assoziation der ApoE Isoformen mit dem Komplementsystem wurde bisher nicht untersucht.

Diese Promotionsarbeit zeigt erstmalig, dass ApoE den klassischen Weg des Komplementsystems auf Ebene der initialen Phase inhibiert. ApoE ist damit, neben dem C1 Inhibitor und Calreticulin, ein neuer Regulator dieses Weges. Alle ApoE Varianten binden mit der N-terminalen Domäne zwischen Aminosäure 139 und 152 an C1q. ApoE konkurriert dabei nicht mit dem C1s-C1r-C1r-C1s Tetramer um die Bindung an C1q, verhindert aber die proteolytische Spaltung von C2 und C4 durch den C1 Komplex. ApoE besitzt demnach eine Doppelfunktion: es agiert als Lipidtransportmolekül und gleichzeitig als ein Regulator des klassischen Komplementweges. Komplementaktivierende Oberflächen, wie oxidierte Lipide die C1q binden, können mit Hilfe von ApoE demnach antiinflammatorisch beseitigt werden.

Summary

Research on age-related diseases is playing an increasingly important role in our steadily aging society. The main focus of research is on diseases in which the exact pathogenesis is not sufficiently known, such as arteriosclerosis, dementia and age-related macular degeneration (AMD). A conspicuous feature of all these diseases is their association with the apolipoprotein E (ApoE). ApoE is an important protein in lipid metabolism. ApoE binds both lipids and lipid receptors on the cell surface. Three isoforms, ApoE2, ApoE3 and ApoE4 differ only by one or two amino acids. Carriers of the ApoE2 isoform have an increased risk to develop AMD where's the ApoE4 isoform is associated with a higher risk to develop dementia and arteriosclerosis. The cause of this is currently unknown. The ApoE molecule is found mainly in the deposits characteristic for the diseases. The deposits consist to a large extent of lipids, amyloid beta and cell debris, and form an activator surface for the complement system. An important role of the complement system is to eliminate body-borne waste products anti-inflammatorily, such as dead cells, damaged cells or modified lipids, with the help of regulators. However, in the case of the disease-related deposits, overactivation of the complement system, permanent inflammation and local damage occur. An association of the ApoE isoforms with the complement system has not yet been investigated.

For the first time, this thesis shows that ApoE inhibits the classical pathway of the complement system at the level of the initial phase. Thus, ApoE is a new regulator of this pathway, in addition to the C1 inhibitor and calreticulin. All ApoE isoforms bind to the N-terminal domain between amino acids 139 and 152 to C1q. ApoE does not compete with the C1s-C1r-C1r-C1s tetramer to bind to C1q, but prevents the proteolytic cleavage of C2 and C4 by the C1 complex. According to that, ApoE has a double function: it acts as a lipid transport molecule and at the same time as a regulator of the classical complement pathway. Complement-activating surfaces, such as oxidized lipids which bind C1q, can thus be eliminated anti-inflammatorily with the aid of ApoE.

1 Einleitung

1.1 Das Apolipoprotein E

Jede tierische Zelle benötigt Fette, wie Lipide und Cholesterin, für den Aufbau ihrer Zellwand und als Energielieferant. Dabei werden die Fette von den Zellen aus dem Blut aufgenommen. Um die Lipide und das Cholesterin im Plasma zu lösen und deren Akkumulation zu verhindern, besitzen Vertebraten einen bestimmten Transportmechanismus. Ein wichtiger Bestandteil dieses Mechanismus ist das Apolipoprotein E (ApoE). ApoE ist ein Lipidtransportprotein und bildet durch die Bindung an Lipide einen löslichen Lipidkomplex. ApoE ist außerdem ein Ligand der LDL-Rezeptorfamilie (LDL = „low density lipoprotein“; Lipoprotein geringer Dichte). ApoE-haltige Lipidkomplexe können über die Interaktion von ApoE mit membranständigen Rezeptoren von Zellen aufgenommen und im Anschluss verwertet bzw. abgebaut werden. Nahezu jeder Zelltyp, darunter Fibroblasten, Endothelzellen und Lymphoblasten, besitzt LDL-Rezeptoren (LDL-R) auf der Oberfläche [1]. ApoE wird vor allem in der Leber, aber auch von Zellen des zentralen Nervensystems, wie Mikrogliazellen und Astrozyten, von retinalen Pigmentepithelzellen des Auges, im Darm und von Makrophagen [2, 3] synthetisiert.

1.1.1 Struktur und Funktion von ApoE

Das *APOE* Gen befindet sich auf Chromosom 19 und kodiert für ein 299 Aminosäure-langes Glykoprotein. ApoE hat ein Molekulargewicht von ca. 37 kDA. Das Protein kann grob in einen N-terminalen 167 Aminosäure-langen und einen 94 Aminosäure-langen C-terminalen Bereich unterteilt werden. Verbunden werden die beiden Domänen durch eine flexible Struktur aus 38 Aminosäuren. Die N-terminale Domäne besitzt die Ligandenbinderegion (134-150). Die C-terminale Domäne (244-272) beinhaltet die Bindestelle für den Rezeptor [4] (Abb. 1).

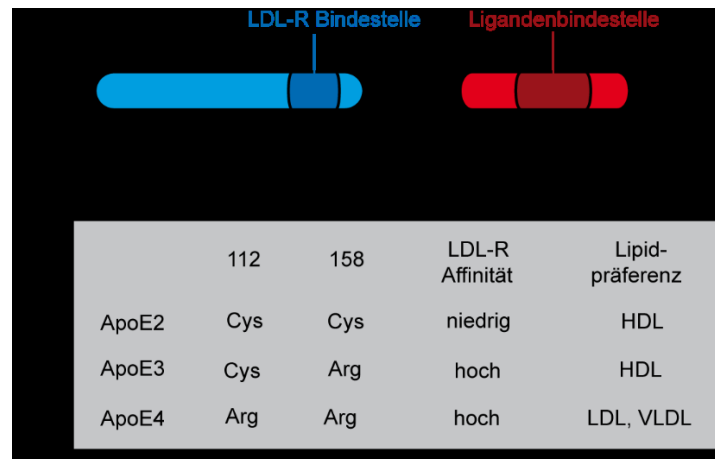


Abb. 1: Apolipoprotein E. Schematische, lineare Darstellung eines ApoE Moleküls. ApoE besteht aus einer N-terminalen (blau) und einer C-terminalen (rot) Domäne, welche durch einen flexiblen Bereich miteinander verbunden sind. Die Ligandenbindestelle liegt im C-terminalen Bereich (dunkelrot). Innerhalb der N-terminalen Domäne befindet sich die LDL-R Bindestelle (dunkelblau) und die beiden Aminosäureaustausche der drei Isoformen (Positionen 112 und 158). Der Aminosäureaustausch führt zu einer veränderten Affinität zum LDL-R und zu einer veränderten Präferenz für die Bindung an Lipide.

Beim Menschen kodiert das *APOE* Gen drei allelische Sequenzvarianten, APOE2, APOE3 und APOE4 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$). Daraus lassen sich sechs Genotypen, in absteigender Häufigkeit, ableiten: apoE3/apoE3, apoE3/apoE4, apoE2/apoE3, apoE4/apoE4, apoE2/apoE4 und apoE2/apoE2. Die drei ApoE Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 unterscheiden sich lediglich in zwei Aminosäurepositionen, 112 und 158. ApoE2 besitzt an beiden Stellen ein Cystein, ApoE4 ein Arginin. ApoE3 hat an Position 112 ein Cystein und an Position 158 ein Arginin. Dieser Aminosäureaustausch hat großen Einfluss auf die Interaktion von ApoE mit dessen Liganden und dessen Rezeptor [3, 5] (Abb. 1).

Das Arginin an Position 112 in ApoE4 führt zu einer strukturellen Veränderung der N-terminalen Domäne. Diese wiederum ist nun in der Lage über das Arginin an Position 61 eine Brückenbindung mit der Glutaminsäure an Position 255 auszubilden. Es entsteht dabei eine Interaktion der N-terminalen mit der C-terminalen Domäne. Essentiell für diese strukturelle Veränderung ist nicht das Arginin an sich, sondern dessen positive Ladung [6]. Der Aminosäureaustausch zu Cystein an Position 112 und 158 der ApoE4 Isoform führt im Vergleich zu ApoE2 und ApoE3 zu veränderten Bindungseigenschaften an Liganden. ApoE4 bevorzugt große Lipoproteinpartikel, wie Lipoproteine sehr geringer Dichte („*very low density lipoproteins*“ VLDL) und Lipoproteine geringer Dichte („*low density lipoproteins*“ LDL). ApoE2 und ApoE3 binden mit höherer Affinität an Lipoproteine höherer Dichte („*high density lipoproteins*“ HDL) [6-9]. Auch die Interaktion der ApoE Isoformen mit Amyloid beta

(A β) Peptiden unterscheiden sich. A β Peptide entstehen durch die enzymatische Spaltung des transmembranen Amyloid-Vorläuferproteins im Gehirn. Dabei entstehen Peptide mit einer Länge zwischen 37 und 43 Aminosäuren, wobei die meisten 38, 40 oder 42 Aminosäuren lang sind [10]. A β 42 gilt als besonders neurotoxisch, da es auf Grund seines stark hydrophoben Charakters schneller akkumuliert und zu Ablagerungen im Gehirn führt [11]. ApoE3 zeigt eine höhere Bindungsaffinität zu A β auf als ApoE4 [12, 13]. Außerdem weist die Bindung von ApoE3 an A β eine höhere pH-Wert Toleranz auf als die von ApoE4 an A β [14].

Im ApoE3 und im ApoE4 Protein befindet sich eine Salzbrücke zwischen dem Arginin an Position 158 und der Asparaginsäure an Position 154 (Abb. 2) [8]. Die ApoE2 Isoform besitzt ein Cystein an Position 158, welches nicht in der Lage ist eine Salzbrücke mit der Asparaginsäure an Position 154 auszubilden. Es entsteht jedoch eine Salzbrücke zwischen der Asparaginsäure 154 und dem Arginin an Position 150. Dies verändert die Konformation des Arginins 150 in Bezug auf die anderen basischen Aminosäurereste der LDL-R Bindestelle (136-150), was zu einer veränderten Interaktion von ApoE2 mit diesem Rezeptor führt [8, 15]. ApoE2 bindet 50 bis 100fach schlechter an den LDL-R als ApoE3 und ApoE4 [16].

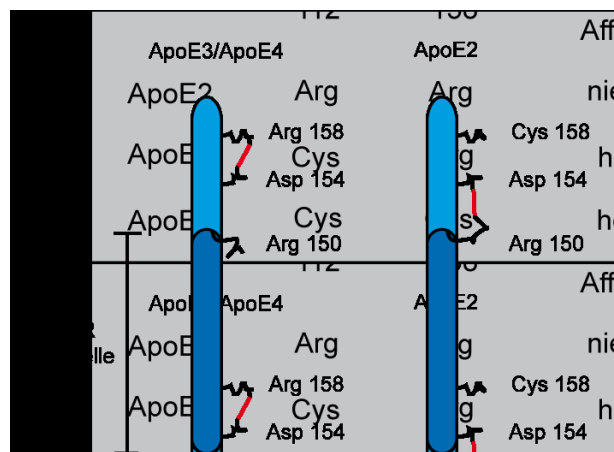


Abb. 2: Einfluss des Aminosäureaustausches an Position 158 auf die LDL-R Bindestelle. Schematischer Auszug der N-terminalen Domäne von ApoE (136-160). Der Aminosäureaustausch an Position 158 zwischen ApoE3 bzw. ApoE4 und ApoE2 führt zu einer veränderten Ausbildung an Salzbrücken (rot). Arginin 158 in ApoE3 und ApoE4 ist in der Lage eine Salzbrücke mit der Asparaginsäure 154 einzugehen. Dies ist für das Cystein 158 in ApoE2 nicht möglich. In diesem Fall entsteht eine Salzbrücke zwischen der Asparaginsäure 154 und dem Arginin 150, welches bereits Bestandteil der LDL-R Bindedomäne ist. Dies führt zu einer Konformationsänderung in der LDL-R Bindestelle und somit zu einer veränderten Bindungsaffinität von ApoE2 zu dessen Rezeptor im Vergleich zu ApoE3 und ApoE4.

1.1.2 ApoE-assozierte Erkrankungen

Durch seine tragende Rolle im Lipidmetabolismus und seine polymorphen Isoformen ist ApoE mit zahlreichen Krankheiten assoziiert, die einen Defekt im Transport oder dem Abbau

von Lipiden oder A β aufweisen. Um ein besseres Verständnis für das Zusammenspiel von ApoE, Lipiden und bestimmten Krankheiten herzustellen, soll an dieser Stelle kurz die Bedeutung von Lipiden angesprochen und eine Auswahl ApoE-assoziiierter Erkrankungen beschrieben werden.

1.1.2.1 Bedeutung von Lipiden

Lipide sind für den Körper essentiell. Sie sind u. a. am Aufbau der Zellmembran, Bildung bestimmter Hormone sowie an vielen Stoffwechselprozessen des Gehirns beteiligt. Um sie im Körper zu transportieren, gehen die wasserunlöslichen Lipide eine Verbindung mit wasserlöslichen Substanzen ein, es entstehen Lipoproteine. Diese werden auf Grund ihrer Zusammensetzung in VLDL und LDL bzw. HDL unterteilt [17]. VLDL hat dabei den größten Anteil an Lipiden (Cholesterin, Triglyceride und Phospholipide) und HDL den geringsten. Neben körpereigenen Lipiden aus der Leber nimmt der Körper zusätzliche Lipide mit der Nahrung auf. Die dabei überschüssig aufgenommenen Lipide müssen vom Körper abgebaut werden. Zu diesem Zweck werden große Lipidkomplexe zu kleineren umgeformt und mit Hilfe von Lipidtransportmolekülen, wie ApoE, von bestimmten Zellen aufgenommen und abgebaut. Cholesterin-reiches LDL und VLDL gelten im Vergleich zu HDL als schlechte Lipide, da sie bei erhöhtem Plasmalevel die Präferenz haben sich abzulagern [18]. Einhergehend mit der Ablagerung kommt es in den meisten Fällen zur Modifikation der Lipide, welche fatale Auswirkungen auf den Körper haben kann. Modifikationen wie die Oxidation von VLDL und LDL, oder Malondialdehyd-Gruppen an Lipiden, dienen im Normalfall physiologischen Prozessen, wie der Wundheilung, Immuntoleranz und der Blutgefäßerweiterung. Sie werden durch das angeborenen Immunsystem erkannt und ähnlich wie apoptotische Zellen antiinflammatorisch abgebaut. Akkumulieren jedoch modifizierter Lipide, so ist das Gleichgewicht gestört und es kommt zu einer chronischen Inflammation. Dies zieht eine Beschädigung benachbarter Zellen nach sich, was wiederum eine weitere Aktivierung des Immunsystems bedingt [19].

1.1.2.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Industriestaaten [20]. Arteriosklerose trägt zur Entwicklung einer Vielzahl dieser Erkrankungen, u. a. Schlaganfälle und Herzattacken, bei. Charakteristisch für Arteriosklerose ist die Ablagerung von Lipiden in

der Intima, der innersten Schicht von Arterien, und dass dadurch bedingte Vorhandensein von Plaques. Vor allem Cholesterin, LDL und VLDL neigen dazu sich abzulagern und anschließend modifiziert zu werden, z. B. durch Oxidation oder enzymatische sowie nichtenzymatische Spaltung [19]. Die Modifikation abgelagerter Lipide führt zur Rekrutierung und Einwanderung von Monocyten in die Intima. Makrophagen erkennen und binden über spezielle Scavenger-Rezeptoren oxidierte Lipide und phagozytieren diese [19, 21]. Es entstehen Makrophagen mit einer großen Anzahl von Lipidtropfen im Zytoplasma, sogenannte Schaumzellen. Die Akkumulation von Schaumzellen trägt zur Lipidablagerung und somit zur Entstehung arteriosklerotischer Plaques bei. Schaumzellen setzen u. a. Zytokine frei, wodurch neue Makrophagen rekrutiert werden [22]. Makrophagen, die Plaques bevölkern, besitzen eine verminderte Migrationsfähigkeit die zum Versagen der Entzündungsaflösung und zum weiteren Fortschreiten der Ausbildung und Manifestation der arteriosklerotischen Plaques führt [23]. Im Laufe der Plaquebildung kommt es vermehrt dazu, dass Schaumzellen apoptotisch werden, was zur Entstehung azellulärer, nekrotischer Strukturen führt, die sich aus Lipidüberresten und Zelltrümmern zusammensetzen [24]. Es entsteht eine Aktivatoroberfläche für zelluläre und humorale Immunreaktionen, welche schließlich eine chronische Inflammation induzieren. Kommt es zu einem Bruch bzw. Riss eines Plaques, wird eine Thrombusbildung ausgelöst, welche zu Schlaganfall und Herzinfarkt führen kann [19]. Die ApoE4 Variante ist mit einem erhöhten Risiko an Arteriosklerose zu erkranken verbunden. Dieses liegt vermutlich an der Präferenz von ApoE4 große, Cholesterin-reiche Lipidpartikel zu binden. Durch die hohe Präsenz von ApoE4 auf diesen Lipidkomplexen wird angenommen, dass die Lipase, welche große Lipidkomplexe in kleinere zerlegt, verdrängt wird. Dieses hat einen ansteigenden Cholesterin- und VLDL-Gehalt im Plasma zur Folge [25, 26]. Die Assoziation von ApoE mit Arteriosklerose zeigen vor allem ApoE Knockout-Mäuse. Diese Tiere weisen unter normaler Ernährung im Schnitt einen fünffach höheren Cholesteringehalt im Plasma auf. Des Weiteren kommt es zur Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen in mehreren Gefäßen [27, 28]

1.1.2.3 Neurodegenerative Erkrankungen

Besonders neurodegenerative Erkrankungen, wie Schlaganfälle, vaskuläre Demenz, Parkinson und Alzheimer [29-32] sind mit ApoE und dessen Isoformen assoziiert.

Die Alzheimer Erkrankung ist die im Alter am häufigsten auftretende Form von Demenz. Sie führt über einen fortschreitenden Verlust der kognitiven Hirnfunktionen zu Gedächtnisstörungen, Desorientierung sowie zur Beeinträchtigung des Urteilsvermögens und schließlich zum totalen Verlust des Gedächtnisses und der Persönlichkeit [33]. Charakteristisch für die Alzheimer Erkrankung ist vor allem das Auftreten extrazellulärer Plaques. Diese setzen sich zum größten Teil aus A β Peptiden zusammen. Auch die Akkumulation und Ablagerung von Lipiden gilt als pathologisches Merkmal für Alzheimer. Für bis zu 50 % aller Arten von Alzheimer stellt ApoE4 den größten genetischen Risikofaktor dar [3], besonders bei der spät auftretenden Form der Alzheimer Erkrankung [30]. ApoE4 und ApoE2/3 zeigen, ähnlich wie auch zu Lipidkomplexen, ein unterschiedliches Bindungsverhalten zu A β . Dieses könnte auch die Assoziation des schlechter bindenden ApoE4 Proteins an A β mit Alzheimer erklären. Die Bildung neurotoxischer A β Peptide wird außerdem durch das Vorhandensein bestimmter Lipide, wie Cholesterin, begünstigt [11]. Auch dieser Aspekt trägt vermutlich zur höheren Wahrscheinlichkeit von ApoE4 Trägern bei Alzheimer zu entwickeln, da ApoE4 einen erhöhten Cholesteringehalt im Körper bedingt (siehe 1.1.2.2). Der ApoE2 Variante wird eine protektive Wirkung vor Alzheimer nachgesagt [34]. Wie auch bei Arteriosklerose kommt es bei der Alzheimer Erkrankung zu Entzündungsreaktion am Ort der Ablagerung. Diese führen zur sterilen Inflammation und Schädigungen der Nervenzellen und somit vermutlich zum stetig fortschreitenden Gedächtnisverlust. Tiermodelle mit ApoE Knockout-Mäusen verdeutlichen die tragende Rolle von ApoE im Pathomechanismus der Alzheimer Erkrankung. So weisen ApoE Knockout-Mäuse z. B. Defizite in der Gedächtnisleitung sowie einen Höheren Cholesterin- und einen niedrigeren HDL-Gehalt im Plasma im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf [35].

1.1.2.4 Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache für den unheilbaren Verlust des Sehvermögens in den entwickelten Industriestaaten [36]. Charakteristisch für AMD ist das Auftreten sogenannter Drusen. Diese extrazelluläre Akkumulation von Zelltrümmern, Lipiden und A β , lagert sich zwischen der Bruch'schen Membran und den retinalen Epithelzellen an [37, 38]. Dieses führt zu einer Nährstoffunterversorgung der Photorezeptoren und damit einhergehend zur Degeneration der Makula. Im Gegensatz zur Arteriosklerose und der Alzheimer Krankheit ist die ApoE2

Variante ein Risikofaktor für die Ausbildung von AMD. ApoE4 hingegen wirkt protektiv [39]. Die Ursache hierfür ist noch unbekannt.

1.1.2.5 Assoziation mit dem Komplementsystem

Wie bereits kurz beschrieben (2.1.2.1) sind modifizierte Lipide sowie A β Aktivatoren des angeborenen Immunsystems [19, 40]. Sie werden normalerweise antiinflammatorisch beseitigt. Regulatoren helfen dabei die Zellhomöostase aufrecht zu erhalten. Akkumulieren jedoch modifizierte Lipide und A β , wie es für die ApoE-assoziierten Erkrankungen charakteristisch ist, verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Immunaktivierung und Regulation, wodurch sich eine chronische Inflammation entwickeln kann. Diese wird u. a. durch das Komplementsystem hervorgerufen. Initiator-moleküle, wie C1q, das C-reaktive Protein (CRP) oder IgM, binden an oxidierte bzw. Malondialdehyd-modifizierte Strukturen und aktivieren die Komplementkaskade. Ohne ausreichende Regulation führt diese Aktivierung zu starker Rekrutierung von Immunzellen, zur Ausschüttung von Effektormolekülen und zur Schädigung benachbarter Gewebe. Bestimmte Polymorphismen in Komplementregulatoren gelten außerdem als genetische Risikofaktoren für die Ausbildung ApoE-assoziiierter Erkrankungen. So ist beispielsweise ein Polymorphismus im Komplementregulator für Faktor H mit einem erhöhten Risiko an AMD zu erkranken verbunden [41]. Alle beschriebenen sowie eine Reihe anderer ApoE-assoziiierter Erkrankungen sind durch die Ablagerung von Komplementproteinen und einer damit verbundenen Komplementreaktion charakterisiert. Bis jetzt wurden diese beiden Merkmale der Erkrankungen separat voneinander als unabhängige, biologische Mechanismen betrachtet.

1.2 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunantwort, welche die erste Stufe zur Abwehr von körperfremden Zellen und veränderten eigenen Zellen darstellt. Es besteht aus über 30 plasma- und zellgebundenen Proteinen, welche zum Großteil in der Leber produziert und ins Blut sezerniert werden. Entdeckt wurde das Komplementsystem 1895 durch Jules Bordet als hitzelabiler Teil des Immunsystems. Bordet stellte fest, dass Mikroorganismen durch den Kontakt mit Serum lysiert werden können, dies jedoch nicht mehr der Fall war, wenn das Serum zuvor hitzebehandelt wurde. Eine Lyse vermittelt durch hitzestabile Antikörper konnte somit ausgeschlossen werden [42]. Diese Entdeckung galt als

Komplementierung der adaptiven Immunantwort und führte zur Namensgebung des Komplementsystems. Das Komplementsystem erkennt zum einen infektiöse Mikroorganismen, markiert sie zur Phagozytose und führt zur Zellyse und Inflammation. Es kommt außerdem zur Bildung von Anaphylatoxinen, welche chemotaktisch Immunzellen zum Ort der Komplementaktivierung rekrutieren und die Zellen aktivieren. Zum anderen werden apoptotische und nekrotische Zellen sowie Zelltrümmer antiinflammatorisch beseitigt und so die zelluläre Integrität und Gewebshomöostase aufrechterhalten.

Das Komplementsystem spielt auch eine bedeutende Rolle als Bindeglied der angeborenen zur adaptiven Immunantwort. Durch Opsonisierung werden Pathogene für Antigen-präsentierende Zellen markiert. Diese wiederum generieren nach der Aufnahme und Sezernierung der Mikroorganismen Pathogen-spezifische Antikörper, welche sie auf ihrer Oberfläche zur Aktivierung von B- und T-Lymphozyten bereitstellen. Außerdem besitzen einige Komplementproteine kostimulatorische Funktionen für B-Lymphozyten.

Das Komplementsystem ist eine kaskadenartig aufgebaute Reaktionskette. Viele seiner Proteine wirken als Proteasen, welche als Zymogene vorliegen und erst durch eine Spaltungsreaktion in ihre aktive Form übergehen. Nach der Aktivierung des Komplementsystems kommt es zu einer enzymatischen Kettenreaktion wobei aktivierte Proteasen wiederum inaktive Proteine spalten und somit aktivieren. Auf diese Weise entsteht eine Amplifikation des Signals mit jeder enzymatischen Spaltung. Dadurch kommt es zu einer schnellen und starken Immunantwort.

Das Komplementsystem kann über drei verschiedene Wege aktiviert werden, den alternativen Weg (AW), den klassischen Weg (KW) und den Lektin-Weg (LW). Sie unterscheiden sich durch den Auslöser der Komplementreaktion und durch ihre initialen Moleküle. Letztendlich generieren sie jedoch die gleichen Effektormoleküle und führen zur Opsonisierung, Inflammation und Lyse (Abb. 3).

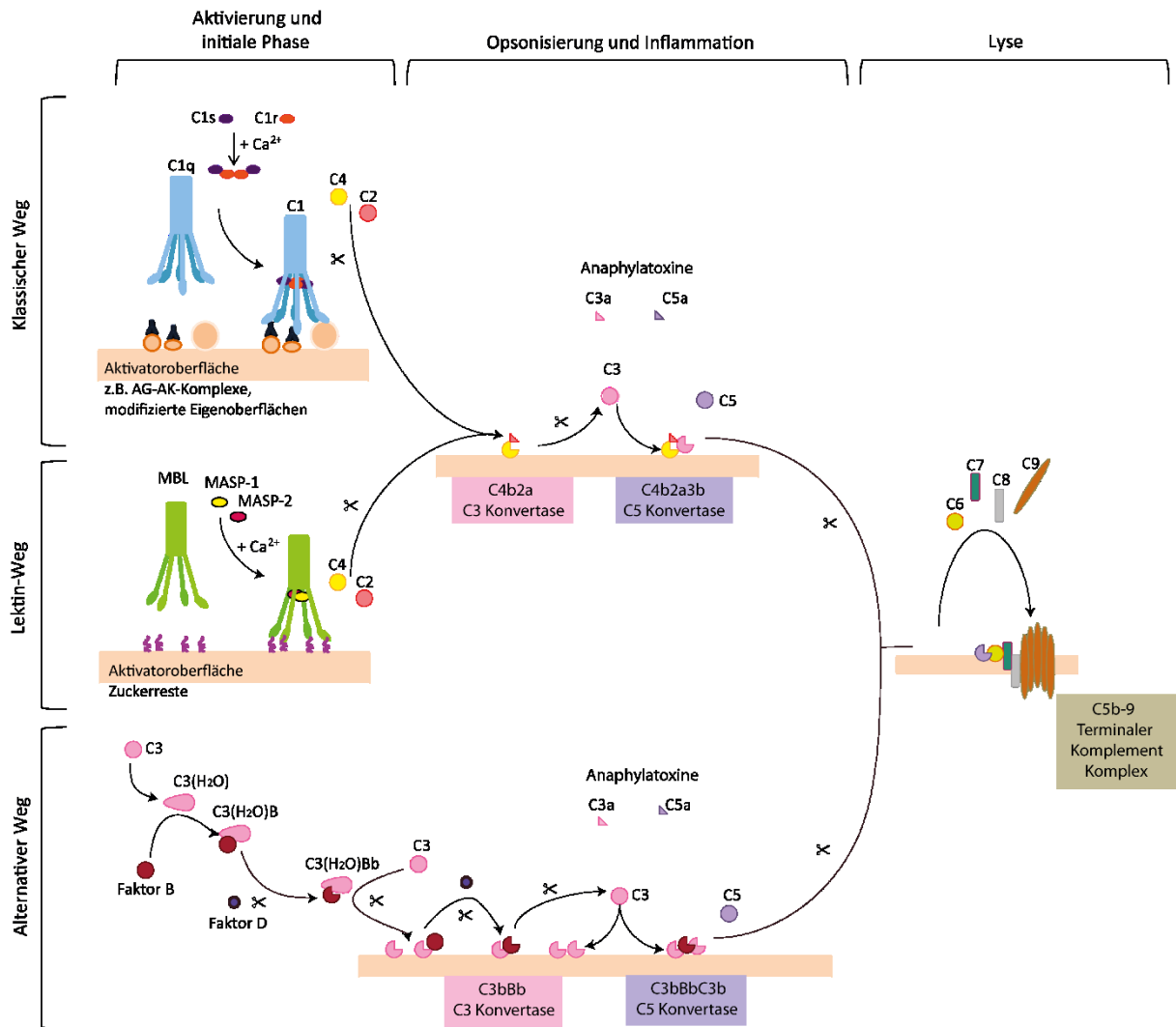


Abb. 3: Das Komplementsystem. Schematische Darstellung des kaskadenartig aufgebauten Komplementsystems. Das Komplementsystem kann über drei Wege aktiviert werden, den klassischen (KW), den Lektin- (LW) und den alternativen (AW) Weg. Der KW wird über Antigen-Antikörper-Komplexe (AG-AK-Komplexe) sowie durch die Erkennung modifizierter Eigenoberflächen aktiviert. Zuckerreste auf pathogenen Oberflächen führen zur Initiierung des LW. Beide Wege münden in die Bildung der C3 (C4b2a) und C5 (C4b2a3b) Konvertase. Der AW wird durch die spontane Hydrolyse eines C3 Moleküls aktiviert. Über die Bildung einer kurzlebigen C3 Konvertase [C3(H₂O)Bb] in der Flüssigphase kommt es zur Generierung der membrangebundenen C3 (C3bBb) und C5 (C3bBbC3b) Konvertase des AW. Neben den Konvertasen entsteht nach Aktivierung des Komplementsystems außerdem C3b, was membrangebundenen Zellen opsonisiert und zur Phagozytose markiert sowie die Anaphylatoxine C3a und C5a, welche Immunzellen rekrutieren und aktivieren und so zur Inflammation beitragen. Am Ende der Komplementkaskade steht die Bildung des terminalen Komplementkomplexes C5b-9. Er führt durch die Formierung einer Pore zur Lyse der Zelle.

1.2.1 Die Aktivierung des Komplementsystems

1.2.1.1 Der klassische Weg des Komplementsystems

Das initiale Molekül des KW ist das C1q (Abb. 3). Es ist in der Lage sowohl mikrobielle, als auch modifizierte Eigenoberflächen zu erkennen. Im Falle von Erregern bindet C1q entweder an Antigen-Antikörper-Komplexe, direkt an die Zelloberfläche durch die Erkennung spezieller Proteine der Zellwand oder über CRP, welches Polycholinreste in bakteriellen Polysacchariden erkennt. Das Akutphasenprotein CRP ist außerdem in der Lage apoptotische

Zellen sowie modifizierte Lipide [43, 44] zu binden und über C1q den KW zu aktivieren. C1q kann jedoch auch direkt an veränderte, körpereigene Oberflächen und Moleküle binden. Dazu gehören apoptotische Zellen, Zelltrümmer und Blebs, modifizierte Lipide und A β [40, 45-51]. C1q ist ein 460 kDa großes Protein, welches vorwiegend von Makrophagen und dendritischen Zellen produziert wird [52, 53]. Seine Tulpenstrauß-ähnliche Struktur bekommt das Molekül durch seine hexamere Anordnung von sechs Polypeptidketten aus je drei homologen Ketten (A, B und C) (Abb. 4A). Diese sechs Polypeptidketten sind N-terminal über Disulfidbrücken zwischen den C-Ketten miteinander assoziiert (Stiel des Tulpenstraußes) und spalten sich Richtung C-Terminus auf [54]. Jede Polypeptidkette besitzt am C-Terminus jeweils eine globuläre Domäne mit der C1q sein Zielmolekül erkennt und bindet. Der globulären Erkennungsdomäne schließt sich eine Collagen-ähnliche Struktur an, welche in die Polymerisierungsdomäne übergeht.

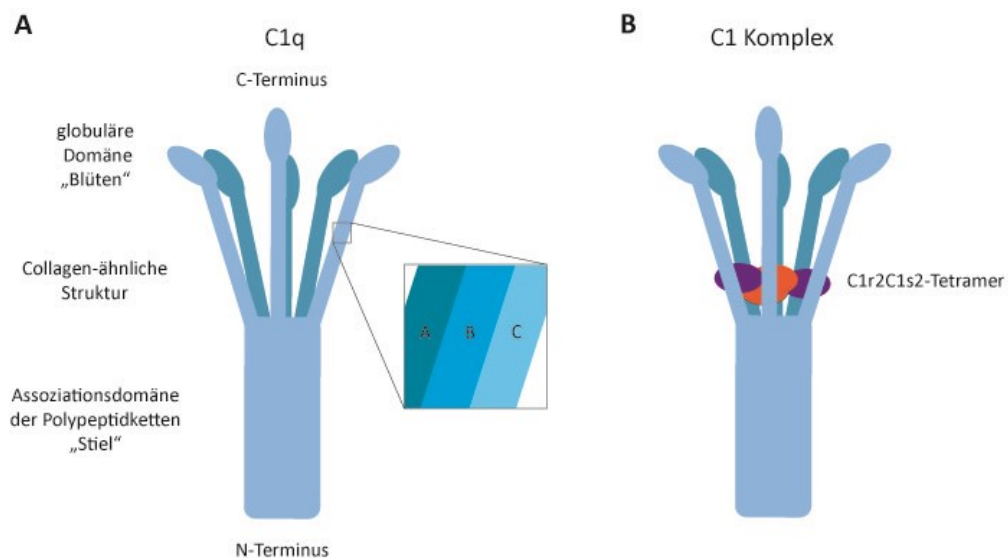


Abb. 4: Struktur des C1q Moleküls und des C1 Komplexes. (A) Schematische Darstellung des Tulpenstrauß-ähnlichen C1q Proteins. C1q setzt sich aus sechs Polypeptidketten zusammen, welche wiederum aus drei Einzelsträngen (A, B und C) bestehen. C-terminal bildet jede Polypeptidkette eine globuläre Domäne, gefolgt von einer Collagen-ähnlichen Struktur. N-terminal laufen die Polypeptidketten zu einem Strang zusammen. (B) Schematische Darstellung des C1 Komplexes. Der C1 Komplex besteht aus einem C1q Protein (blau), zwei C1r (lila) und zwei C1s (orange) Proteasen. Die C1r und C1s Moleküle binden als Tetramer (C1r-C1s-C1s-C1r) an die Collagen-ähnliche Struktur von C1q.

C1q ist Teil des C1 Komplexes. Dieser setzt sich aus einem C1q und jeweils zwei C1r und C1s Molekülen zusammen (Abb. 4B). C1r und C1s sind Serinproteasen, welche Calcium-abhängig ein C1s-C1r-C1r-C1s Tetramer bilden und an die Collagen-ähnliche Struktur des C1q Moleküls binden. Durch die Zusammenlagerung der Zymogene C1s und C1r mit C1q kommt es zur Bildung eines inaktiven C1 Komplexes. Nachdem C1q sein Zielmolekül gebunden hat, findet eine Konformationsänderung im C1q Molekül statt, die zur autoreaktiven Spaltung und

Aktivierung der C1r Protease führt, welche wiederum die inaktive C1s Protease schneidet und aktiviert. C1s ist nun in der Lage C4 in C4b und das Anaphylatoxin C4a zu spalten. C4b bindet über eine reaktive Thioestergruppe an die Komplement-aktivierende Oberfläche. Ein weiteres Komplementprotein, C2, wird nach der Bindung an C4b ebenfalls durch C1s geschnitten [55]. Es entsteht C2a und C2b. C2a verbleibt gebunden an C4b und bildet somit die C3 Konvertase, C4b2a, des KW [54] (Abb. 3).

1.2.1.2 Der Lektin-Weg des Komplementsystems

Der LW wird über die Bindung der Initiator-moleküle Mannose-bindendes Lektin (MBL) und Ficoline an deren Zielmolekül aktiviert. MBL bindet an Mannose-Reste und andere Zucker, welche auf vielen mikrobiellen Oberflächen zu finden sind (Abb. 3). Auf körpereigenen Zellen ist Mannose durch andere Zuckergruppen überdeckt und kann somit nicht zu einer Komplementaktivierung führen. Auch Ficoline, welche beim Menschen in L-, M- und H-Ficoline unterteilt werden, binden an Saccharide auf der Oberfläche von Erregern und aktivieren den LW. MBL sowie die Ficoline sind dem C1q Molekül strukturell sehr ähnlich. Auch sie binden inaktive Proteasen, in dem Fall die Mannose-assoziierte Serinprotease 1 (MASP-1) und die Mannose-assoziierte Serinprotease 2 (MASP-2). MASP-2 ist vergleichbar mit C1r und C1s. Nachdem MBL bzw. die Ficoline an deren Aktivatoroberfläche gebunden haben, kommt es zur Autokatalyse und Aktivierung von MASP-2. Dies führt zur Spaltung von C4 und C2 und letztendlich zur Generierung der C3 Konvertase C4b2a [54, 56] (Abb. 3). MASP-1 ist näher verwandt mit Thrombin und Trypsin als mit C1r und C1s und spielt somit eher in der Blutgerinnungskaskade eine Rolle. MASP-1 ist in der Lage den Koagulationsfaktor XIII sowie Fibrinogen und Prothrombin zu spalten [57, 58].

1.2.1.3 Der alternative Weg des Komplementsystems

Der AW wird spontan durch die Hydrolyse von C3 zu C3(H₂O) angeschaltet (Abb. 3). Hydrolysiertes C3 rekrutiert und bindet Faktor B, welches durch die Plasmaprotease Faktor D in Ba und Bb gespalten wird. Der daraus verbleibende Flüssigphasekomplex, C3(H₂OBb), bildet die kurzlebige C3 Konvertase des AW [59]. Sie ist in der Lage C3 in C3a und C3b zu spalten. Der Großteil des generierten C3b wird durch Hydrolyse inaktiviert. Der andere Teil jedoch bindet über seine reaktiven Thioestergruppen an fremde Oberflächen. So gebundenes C3b ist nun in der Lage Faktor B zu binden und dessen Spaltung durch Faktor D

zu ermöglichen. Es entsteht dabei die Oberflächen-gebundene C3 Konvertase des AW, C3bBb [60] (Abb. 3).

1.2.2 Die C3 und C5 Konvertase des Komplementsystems

Die Funktion der C3 Konvertasen des KW und LW, C4b2a, sowie des AW, C3bBb, besteht darin, das Komplementprotein C3 in C3a und C3b zu spalten (Abb. 3). C3b hat drei Funktionen. Wie bereits beschrieben, bindet es, genau wie C3(H₂O), Faktor B und bildet somit die Plattform für die langlebige C3 Konvertase des AW, C3bBb. Zum anderen bindet es an fremde oder als verändert erkannte Oberflächen und opsonisiert sie für die Aufnahme und Eliminierung durch Phagozyten. Außerdem bindet es zurück an die C3 Konvertase und formt somit die C5 Konvertase C4b2a3b des KW und LW und C3bBb3b des AW. Diese spaltet C5 in C5a und C5b. C5a ist, wie C3a, ein Anaphylatoxin und wirkt proinflammatorisch. Anaphylatoxine modulieren die erworbene und die angeborenen Immunantwort und spielen eine wichtige Rolle im Zell-*Homing* und der Geweberegeneration. C5b bildet mit C6, C7, C8 und mehreren C9 Molekülen den sogenannten Terminalen-Komplement-Komplex (TCC) (Abb. 3). Er lagert sich über die Bindung von C5b-7 an die Zelloberfläche von Mikroorganismen an. Dort führt der TCC durch die Penetration der Lipid-Doppelschicht durch C8 und der Bildung einer ca. 10 nm großen Pore durch die C9 Moleküle zur Lyse der Zelle [60, 61].

1.2.3 Regulation des Komplementsystems

Um eine permanente Aktivierung des Komplementsystems zu verhindern und so körpereigene Zellen zu schützen, muss dieser Teil des angeborenen Immunsystems reguliert werden. Lediglich geschädigte, körpereigene Zellen und fremde Organismen sollen opsonisiert und entfernt werden. Um dieses zu gewährleisten, verfügt das Komplementsystem über zahlreiche, wirtseigene Regulationsfaktoren. Sie können entweder membrangebunden oder in der Flüssigphase vorliegen. Im Folgenden sollen einige Beispiele für Regulatoren auf unterschiedlichen Ebenen des Komplementsystems genannt werden.

Der C1-Inhibitor (C1 INH) ist ein Regulator der initialen Phase des KW und LW. Als Serinproteaseinhibitor inaktiviert er C1r, C1s und MASP-2 und führt somit dazu, dass keine C3 Konvertase gebildet wird. Dabei bindet er reversibel oder irreversibel an C1r, C1s und MASP-2 und kann sogar zur Spaltung der initialen Molekülkomplexe führen [62, 63].

Um die C3 Konvertase des Komplementsystems zu regulieren, verfügt der Körper über spezielle Serinproteasen, welche Komponenten der C3 Konvertase inaktivieren. Faktor I, in Kombination mit dessen Kofaktor Faktor H oder dem Faktor H-ähnlichen Protein 1 (FHL-1), spaltet C3b in iC3b [64]. iC3b kann zwar als Opsonin noch interagieren, ist jedoch für den Aufbau einer C3 Konvertase des AW unbrauchbar. In Kombination mit dem C4b-bindenden Protein (C4BP) ist Faktor I außerdem in der Lage C4b in dessen Fragmente C4c und C4d zu spalten [65]. Die Generierung der C3 Konvertase des KW und LW ist somit verhindert.

Faktor H, FHL-1 und C4BP besitzen außerdem eine destabilisierende Wirkung auf die C3 Konvertase. Faktor H und FHL-1 binden dabei über C3b an die C3 Konvertase des AW und führen zur Dissoziation von Bb [54, 66]. C4BP interagiert mit dem C4b Molekül der C3 Konvertase des KW und LW und führt zur Dissoziation von C2a [54, 67].

Alle bisher genannten Regulatoren sind Proteine der Flüssigphase, die aber an Oberflächen binden. Es gibt jedoch auch membranständige Komplementregulatoren, wie z. B. CD46, CD55 und CD35. CD46 ist ein Membrankofaktorprotein für Faktor I zur Spaltung von C3b und C4b. CD55 beschleunigt den Zerfall der C3 Konvertase, indem es die Dissoziation von C4b und C2a bzw. C3b und FB initiiert. CD35 wirkt sowohl als Kofaktor für Faktor I, als auch als Beschleuniger für den Zerfall der C3 Konvertasen [68].

Vitronektin (Vnt) ist ein Regulator auf Ebene des TCC. Es reguliert das Komplementsystem sowohl in der Flüssigphase, als auch membrangebunden an Zellen. Vnt bindet C5b-7 und verhindert die Einlagerung dieses Komplexes in der Zellmembran. Es kann außerdem mit C9 interagieren, was zur Blockade der C9-Polymerisierung führt. Sowohl die Bindung an C5b-7, als auch an C9 verhindern den Aufbau einer Pore und schützen somit die Zelle vor Lyse [68].

Der einzige bis jetzt beschriebene Stabilisator des Komplementsystems ist Properdin. Es bindet an C3bB und C3bBb über C3b und stabilisiert dabei die C3 Konvertase des AW. Properdin erkennt und bindet außerdem mikrobielle Oberflächen über negativ geladene Moleküle, apoptotische und nekrotische sowie maligne Zellen. Dort wirkt es als Plattform zur Bildung der C3 Konvertase des AW über die Rekrutierung von C3b [69, 70].

1.2.4 Rolle des Komplementsystems in der adaptiven Immunantwort

Das Komplementsystem spielt nicht nur eine Rolle als Teil der angeborenen Immunantwort, sondern ist auch stark vernetzt mit dem adaptiven Zweig des Immunsystems. Im Folgenden sollen einige Beispiele dafür genannt werden.

Das Komplementsystem ist in der Lage durch die Generierung von C3b und C4b fremde oder geschädigte Zellen zu opsonisieren und so für Phagozyten zu markieren. Phagozyten erkennen dabei die Komplementkomponenten über spezielle Rezeptoren. Diese Rezeptoren können in sechs Gruppen, CR1-CR4 sowie die C5a- und C3a Rezeptoren, unterteilt werden. CR1-CR4 erkennen und binden Opsonine, wohingegen der C5a und der C3a Rezeptor mit Anaphylatoxinen interagiert. CR1 beispielsweise wird von Erythrozyten, Leukozyten, glomerulären Podozyten, follikulären dendritischen Zellen [71] sowie Makrophagen und Neutrophilen [60] exprimiert und bindet C3b und C4b. Dabei spielt er eine Rolle in der Beseitigung von Immunkomplexen und einer Erhöhung der Phagozytoserate [72]. Ein auf B-Zellen exprimierter Rezeptor ist CR2. Er bindet u. a. das C3b Spaltprodukt C3d. C3d wirkt unterstützend für die B-Zellaktivierung, indem es den Schwellenwert für eine Aktivierung um das 1000 bis 10000fache herabsetzt [60]. Neben der Generierung von Opsoninen, entstehen auch die Anaphylatoxine C3a und C5a bei einer Komplementreaktion. Auch sie besitzen u. a. Rezeptoren auf B-Zellen. Die Interaktion von C3a mit dem von B-Zellen exprimiertem C3a Rezeptor führt z. B. zu einer negativ regulierten polyklonalen Immunantwort sowie zur Verringerung der TNF- α und IL-6 Produktion. C5a hingegen hat einen positiven Effekt auf die Rekrutierung und Migration von Immunzellen, wie B-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen, zum Ort der Komplementaktivierung [73]. C5a und C3a sind außerdem in der Lage Mastzellen zu aktivieren. Dabei entlassen diese, vor allem in der Submucosa von Darm und Atemwegen vorkommenden Zellen, Histamine und TNF- α , was zur Gefäßerweiterung führt. C3a und C5a spielen auch eine Rolle bei der T-Zell Polarisierung. In Mäusen wurde gezeigt, dass die Expression von C3a und C5a Rezeptoren einen entscheidenden Einfluss auf die Th1 Induktion hat [74, 75].

Über die Funktion und Wirkungsweise des löslichen Spaltproduktes von C4, C4a, ist bis jetzt noch weniger bekannt. Auch wenn noch kein Rezeptor für C4a entdeckt wurde, so scheint es doch einen Effekt auf Makrophagen und Neutrophile zu haben [76].

1.3 Ziel dieser Arbeit

Steigender Wohlstand, verbesserte Hygiene, eine gesündere Lebensweise und nicht zuletzt der medizinische Fortschritt haben dazu geführt, dass die Menschheit immer älter wird. Lag die durchschnittliche, weltweite Lebenserwartung in den 90er Jahren noch bei 65,3 Jahren, so ist sie innerhalb von 23 Jahren um ca. 10 % auf 71,5 Jahre gestiegen. In Deutschland betrug die durchschnittliche Lebenserwartung 2013 sogar 80,68 Jahre. Mit fortschreitenden Lebensjahren nimmt jedoch auch das Risiko zu, an altersabhängigen Leiden zu erkranken. Zu den im Alter häufig auftretenden Krankheiten zählen AMD, Demenz und Arteriosklerose. Der Pathomechanismus bei allen Erkrankungen ist nicht ausreichend geklärt und eine Therapie nur ungenügend oder gar nicht vorhanden. Interessanterweise sind genetische Varianten des *APOE* Gens mit allen drei Erkrankungen assoziiert. ApoE bindet Lipide, erhöht dabei ihre Löslichkeit und ermöglicht ihre Aufnahme über Rezeptoren in die Zelle. Die drei Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4, unterscheiden sich nur in maximal zwei Aminosäuren. Träger der ApoE2 Isoform haben ein erhöhtes Risiko an AMD zu erkranken, wohingegen das Vorhandensein der ApoE4 Isoform die Wahrscheinlichkeit an Demenz und Arteriosklerose zu erkranken erhöht. Ein weiteres Charakteristikum dieser Krankheiten sind extrazelluläre Ablagerungen, die sich u. a. aus Zelltrümmern, Lipiden und A β zusammensetzen. Akkumulationen dieser Art bilden Aktivatoroberflächen für einen bedeutenden Zweig der angeborenen Immunantwort, dem Komplementsystem. Diese erklären auch das Vorkommen einer Vielzahl von Komplementproteinen in den krankheitsbedingten Ablagerungen. Neben seiner Funktion zur Abwehr von Mikroorganismen, spielt das Komplementsystem auch eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Zelltrümmer sowie geschädigte und tote Zellen werden mittels Opsonisierung mit C3b schneller phagozytiert. Komplementregulatoren sorgen dabei für eine antiinflammatorische Beseitigung. Eine permanente und weniger kontrollierte Komplementaktivierung, wie sie bei dem Auftreten oben genannter extrazellulärer Ablagerungen auftreten, führt zur Infiltration von Immunzellen, zur sterilen Inflammation und der Schädigung von Zellen.

Trotz des gemeinsamen Auftretens in Plaques oder Drusen wurden bis dato die ApoE Isoformen als Serumproteine außerhalb des Komplementsystems betrachtet. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob ApoE eine Funktion im Komplementsystem wahrnimmt. Dazu wurde getestet, ob ApoE eine regulatorische Wirkung auf einen oder mehrere Wege

(KW, AW oder LW) des Komplementsystems hat. Außerdem wurde der Wirkungsmechanismus von ApoE im Komplementsystem genauer untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen helfen, die beobachtete Assoziation von ApoE und dem Komplementsystem mit bestimmten, im Alter häufig auftretenden, Krankheiten besser zu verstehen und neu zu bewerten. Außerdem können die Ergebnisse ganz neue Therapieansätze ermöglichen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Arbeitsmaterialien und Geräte

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden Pipetten der Firma Brandt, Pipettenspitzen, Petrischalen und Reaktionsgefäße in den Größen 0,5 ml bis 50 ml der Firma Greiner bio-one sowie 96 Well Mikrotiterplatten von Sarstedt und Nunc verwendet. Für Zellkulturarbeiten wurden sterile Flaschen von Sarstedt, 24 Well Patten von Thermo Scientific und Pipetten von Greiner bio-one eingesetzt. Außerdem wurden ein Thermomixer comfort und eine Tischzentrifuge 5415 D von Eppendorf, der Schüttler Vortex-Genie 2 von Scientific Industries, ein Taumelrollenmischgerät RM5 von Karl Hecht GmbH, ein Magnetrührer RCT basic von IKA Werke und eine Feinwaage von Sartorius genutzt. Inkubationsschritte bei 37 °C und 30 °C wurden in Brutschränken der Firmen Memmert, Heraeus und New Brunswick Scientific durchgeführt. Für steriles Arbeiten wurden Laminarboxen von Thermo Scientific und Heraeus verwendet. Zur kolorimetrischen Messung von 96 Well Mikrotiterproben wurde das Tecan Safire2 Spektrometer genutzt. Für die Aufnahme fluoreszenzbasierter Bilder von Zellen oder Partikeln wurden die Laser-Scanning-Mikroskope (LSM) LSM 710 und LSM 510 von Zeiss verwendet. Außerdem wurden hierzu Objektträger und Deckgläschen von Roth genutzt. Alle weiteren Geräte die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind an bestimmter Stelle vermerkt.

2.2 Chemikalien, Lösungsmittel und Puffer

Wenn nicht weiter gekennzeichnet, wurden alle Chemikalien von den Firmen Applichem, Carl Roth, General Electrics Healthcare, Invitrogen, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen. Um sterile Lösungen und Medien zu gewährleisten würden diese für 20 min bei 121 °C und einem Druck von 2×10^5 Pa autoklaviert. Als Grundlage für Lösungen und Medien wurde stets doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Mikrogliazellen wurden in einem Kulturmedium bestehend aus DMEM/F12 (LONZA), 1 % (v/v) N2 Supplement (Thermo Fischer Scientific), 6 % (v/v) L-Glutamin (Gibco), 8,5 % (v/v) D-Glukose (Sigma-Aldrich), 1,4 % (v/v) Gentamycin (Lonza) und 10 % (v/v) FKS (PAA Laboratories) angezüchtet. Für die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde das „Lysogeny broth media“ (LB-Medium) verwendet. Es beinhaltet 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und wurde auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Zur Anzucht von *E. coli* auf Festmedium wurde 0,5 % (w/v) Agarose zum Flüssigmedium zugegeben und dieses in Petrischalen ausgegallert.

Für die Herstellung 10%iger Polyacrylamidgele wurde zunächst ein Sammelgel aus folgenden Inhaltsstoffen, 25 % (v/v) Sammelgelpuffer (0,5 M Tris Base, 4 % [w/v] Natriumdodecylsulfat [„sodium dodecyl sulfate“, SDS], ad 100 ml ddH₂O, pH 6,8), 10 % (w/v) Acrylamid, 0,03 % (w/v) Adenosinphosphosulfat (APS) und 0,04 % (w/v) TEMED gegossen. Dieses wurde nach Aushärtung mit Trenngel bestehend aus 25 % (v/v) Trenngelpuffer (1,5 M Tris Base, 4 % [w/v] SDS, ad 100 ml ddH₂O, pH 8,8), 3,9 % (w/v) Acrylamid, 0,05 % (w/v) APS und 0,1 % (w/v) TEMED überschichtet. Für die Gelelektrophorese wurde ein Laufpuffer aus 2,5 mM Tris Base, 19 mM Glyzin und 0,1 % (w/v) SDS verwendet. Für einen anschließenden Western Blot der Gele auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein Western-Transfer-Puffer bestehend aus 25 mM Tris HCl, 190 mM Glyzin, 20 % (v/v) Methanol und 0,1 % (w/v) SDS mit einem pH-Wert von 8,3 genutzt. Im Falle einer Silberfärbung der Gele wurden folgende Lösungen verwendet: Fixierlösung (30 % [v/v] Ethanol, 30 % [v/v] Essigsäure), Spüllösung (20 % [v/v] Ethanol), Sensibilisierungslösung (1,26 mM Natriumthiosulfat), Silbernitratlösung (11,77 mM Silbernitrat), Entwicklerlösung (265,49 mM Natriumcarbonat, 0,026 % [v/v] Formaldehyd, 5,19 % [v/v] Sensibilisierungslösung), Stopplösung (0,4 M Tris Base, 2,5 % [v/v] Essigsäure). Zum Waschen von „Enzyme Linked Immunosorbent Assays“ (ELISA) und Western Blots wurde ein Waschpuffer aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) II (0,14 M Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,8 mM Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,4) und 0,05 % (v/v) Tween-20 sowie zum Absättigen der freien Bindestellen ein Blockpuffer bestehend aus PBS II, 5 % (w/v) Milchpulver und 2 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) genutzt. Beim Aufarbeiten der Mikrogliazellen für LSM-Aufnahmen wurde für alle Schritte ein Puffer aus PBS II, versetzt mit 1 % (w/v) BSA, verwendet. Zur Untersuchung der Mikrogliazellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie („fluorescence-activated cell sorting“, FACS) wurde ein FACS-Puffer bestehend aus PBS II mit 2 % (w/v) BSA genutzt. Für immunbiologische Versuche wurden folgende Puffer verwendet: DPBS (LONZA), PBS II, DPBS mit Calcium und Magnesium (PBS⁺⁺) (LONZA), Gelatine-Veronal-Puffer (GVB⁺⁺) (CompTech) und MgEGTA Puffer (20 mM HEPES, 144 mM NaCl, 10 mM EGTA, 7 mM MgCl₂, pH 7,4).

2.3 Proteine, Lipide, Antikörper und Seren

Alle Komplementproteine, falls nicht anders aufgelistet, stammen von der Firma CompTech. Rekombinantes ApoE aus *E. coli* wurde von der Firma BioCat und aus Plasma aufgereinigtes

ApoE sowie Apolipoprotein A (ApoA) von der Firma Athens Research and Technology bezogen. Des Weiteren wurde MBL von Abcam, MASP1 von Abnova, LDL und Malondialdehyd-modifiziertes LDL (mLDL) von Cell Biolabs, der LDL-R von Sino Biological Inc., A β 1-42 von GenScript sowie Vnt und Collagen (Coll) I, II und III von Becton Dickinson verwendet. BSA wurde von AppliChem und Gelatine von Merck bezogen. Rekombinantes, extrazelluläres, Fibrinogen-bindendes Protein (EfB) von *Staphylococcus aureus* wurde wie bereits von Koch et al. [77] beschrieben exprimiert.

Peptide des ApoE Proteins (Tab. 1) wurden von der Firma Peptide 2.0 hergestellt. Antikörper gegen Komplementproteine stammen, falls nicht weiter erwähnt, von CompTech. Ebenso wurden in dieser Arbeit folgende Antikörper genutzt: α C5b-9 (Dako), α C1s (AssaybioTech), α ApoE (Calbiochem), α mLDL (Abcam), α Coll (Sigma-Aldrich), α A β (Abfrontier) und Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter α His (Miltenyi Biotec).

Normales humanes Serum (NHS) wurde von freiwilligen, gesunden Spendern bezogen und bei -80 °C gelagert. C1q defizientes Serum (C1q^{-/-}) stammt von CompTech. Erythrozyten wurden aus Schaf- bzw. Kaninchenblut der Firma Fiebig-Nährstofftechnik gewonnen.

Tab. 1 Sequenzen der verwendeten ApoE Peptide

Bezeichnung	Sequenz	Besonderheit
ApoE 30-40	LGRFWDYLRWV	
ApoE 74-85	YKSELEEQLTPV	
ApoE2 139-152	SHLCKLRKLLRDA	Beeinflusst LDL-R Bindestelle
ApoE3/4 139-152	SHLRKLRKLLRDA	Beeinflusst LDL-R Bindestelle
ApoE 210-232	WGERLRARMEEMMGSRTDRDLDEV	

2.4 Zelllinien, Stämme und Kultivierung

Die von induzierten, pluripotenten Stammzellen abgeleiteten Mikrogliazellen (bereitgestellt von Prof. Neumann, Bonn; [78]) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in spezifischem DMEM in Kulturflaschen oder auf Glasscheiben in 24-Well Mikrotiterplatten kultiviert. In dieser Arbeit wurde der nichtpathogene „One-Shot-TOP10“ *E. coli* Stamm (Invitrogen) verwendet. Um *E. coli* in den Versuchen zu nutzen, wurden die Mikroorganismen über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in Flüssigmedium angezogen. Zur längeren Aufbewahrung der Stämme wurden die Mikroorganismen auf Agarplatten ausplattiert und im Kühlschrank gelagert.

2.5 SDS-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld unter diskontinuierlichen Bedingungen aufgetrennt. Vor dem Laden der Proben auf 10%ige Gele wurden diese mit nicht reduzierendem (6,25 mM Tris Base, 1 % [v/v] SDS, 10 % [v/v] Glycerin, 7,23 µM Bromphenolblau) bzw. reduzierendem (RotiLoad I von Roth, 10 min 95 °C) Probenpuffer versetzt. Als Proteingrößenmarker wurde der PageRuler® Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet. Die Gele liefen bei 160 V für ca. 1 h mit Laufpuffer im PowerPac 300 System von BioRad.

2.6 Silberfärbung

Zur Visualisierung aller vorhandenen Proteinbanden im Gel wurde eine Silberfärbung der in der SDS-Gelelektrophorese gelaufenen Gele durchgeführt. Hierzu wurden die Gele zunächst für 30 min in Fixierlösung geschwenkt, wodurch die Proteine denaturieren und ausfallen. Anschließend wurde für je 10 min mit Spüllösung und ddH₂O gewaschen. Es folgte eine 1-minütige Inkubation in Sensibilisierungslösung, gefolgt von zwei Waschschritten für je 10 sec in ddH₂O. Mit der Silbernitratlösung wurden die Proteine, welche in der Lage sind Silberionen zu binden, für 30 min gefärbt und anschließend für 10 sec mit ddH₂O gewaschen. Zum Sichtbarmachen der Proteine wurde die Entwicklerlösung zugegeben. Diese enthält alkalisches Formaldehyd, welches Silberionen zu elementarem Silber reduziert und die Proteine so erkennbar macht. Um die Reaktion zu beenden wurde Stopplösung zugegeben, nachdem die gewünschte Bandenstärke erreicht war.

2.7 Western Blot

Um bestimmte Proteine im Gel nach der Elektrophorese sichtbar zu machen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden 6 Whatman Blot-Blätter (VWR), eine Nitrozellulosemembran (Amersham) und das Gel in Western-Transfer-Puffer getränkt und in folgender Reihenfolge in die Blotkammer geschichtet: 3 Whatman Blot-Blätter, Nitrozellulosemembran, Gel, 3 Whatman Blot-Blätter. Mittels Trans-Blot® Turbo™ Transfer System von BioRad wurden die Proteine bei 12 V für 10 bis 14 min vom Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung aller freien Bindestellen über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei RT in Blockpuffer geschwenkt. Je nachdem welches Protein detektiert werden sollte, wurden die entsprechenden Antikörper in Blockpuffer verdünnt und die Membran 1 h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer folgte ein Inkubationsschritt der Membran mit dem sekundären an eine HRP-gekoppelten Antikörper in Blockpuffer für 1 h bei RT. Es folgte erneut mehrmaliges kurzes Waschen mit Waschpuffer und ein längerer Waschschrift mit ausschließlich PBS II. Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte mittels Cheluminate-HRP Pico Detect Nachweiskit von AppliChem nach Herstellerangaben. Die Chemilumineszenz des Western Blots wurde mittels Fusion Fx Vilber Lourmat von Vilber visualisiert.

2.8 Biotinylierung von Proteinen

Sowohl für die Transmissionselektromikroskopie als auch für BLItz™ Versuche mussten bestimmte Proteine Biotin-gekoppelt werden. Dazu wurden die rekombinanten ApoE Isoformen, das aus Plasma aufgereinigte ApoE, das Peptid ApoE 155-168, C1s sowie ApoA im Verhältnis 1:2 mit EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fischer Scientific) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Auftrennung über die Säulen Centri Pure MINI Spin columns von empBiotech (für die Vollängenproteine) und PD MiniTrap™ G-10 von GE Health Care (für das ApoE Peptid) von ungebundenem Biotin befreit.

2.9 Herstellung Fluoreszenz-gekoppelter Proteine

Zur Visualisierung von C1q und ApoE mittels LSM sowie für die Affinitätsmessung von C1q an die Peptide ApoE 30-40 und ApoE 139-152 mussten diese Moleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Alexa Fluor® 647 [NanoTemper], Alexa Fluor® 488 [Thermo Fischer Scientific]) markiert werden. Dazu wurden die Farbstoffe für 30 min im Dunkeln bei RT mit den jeweiligen Molekülen inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Auftrennung

über Centri Pure MINI Spin columns für Proteine bzw. PD MiniTrap™ G-10 Säulen für die ApoE Peptide von ungebundenem Fluoreszenzfarbstoff getrennt.

2.10 Komplementassays

2.10.1 Hämolyseassay

Um den Effekt von ApoE auf die terminale Lyse des Komplementsystems von Zellen zu untersuchen, wurden der KW und AW im Hämolyseassay untersucht.

Dazu wurde für den AW zunächst 20 % NHS zusammen mit aufsteigenden Konzentrationen an ApoE, BSA oder EfB (jeweils 0,25 – 1,5 μ M) in MgEGTA Puffer für 15 min bei 37 °C und 350 rpm vorinkubiert. Zeitgleich wurden Kaninchenerythrozyten mit MgEGTA Puffer gewaschen. Dazu wurde Kaninchenserum für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und das Erythrozyten-reiche Pellet in MgEGTA Puffer resuspendiert. Dieser Schritt wurde sooft wiederholt, bis sich ein klarer Überstand nach dem Zentrifugieren zeigte und somit kein freies Hämoglobin durch beschädigte Erythrozyten vorhanden war. Anschließend wurde der NHS-Protein-Mix mit 2×10^7 Kaninchenerythrozyten versetzt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert.

Für den KW wurden zunächst Schafserythrozyten in GVB⁺⁺ Puffer gewaschen (Ablauf siehe Kaninchenerythrozyten) bis kein freies Hämoglobin im Überstand mehr vorhanden war. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml GVB⁺⁺ Puffer resuspendiert und für 20 min bei 37 °C mit Ambozeptor (1:300) (Siemens) inkubiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschriff der Erythrozyten. Zeitgleich wurde 1 % NHS mit verschiedenen Konzentrationen an ApoE (0,01 – 1,5 μ M) in GVB⁺⁺ Puffer für 15 min bei 37 °C und 350 rpm vorinkubiert. Anschließend wurde der NHS-Protein-Mix mit 2×10^7 Ambozeptor-gekoppelten Schafserythrozyten für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert.

Beiden Ansätzen folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 2000 rpm. Dabei setzten sich die festen Zellbestandteile am Boden des Reaktionsgefäßes ab und die Lyse der Erythrozyten konnte durch kolorimetrische Messung des freien Hämoglobins im Überstand bei 414 nm bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden relativ zur Hämolyserate ohne ApoE berechnet, welche 100 % gesetzt wurde.

2.10.2 *E. coli* Überlebensassay

Um festzustellen, ob ApoE einen Effekt auf das Überleben von Bakterien im NHS hat, wurden verschiedene Konzentrationen von ApoE (0,1 – 1 μ M) mit 0,2 % NHS für 10 min bei 37 °C vorinkubiert, danach mit je 1000 *E. coli* Zellen pro Ansatz versetzt und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar ausplattiert, bei 37 °C über Nacht kultiviert und am nächsten Tag die Kolonie-bildenden Einheiten gezählt. Um zu bestimmen welcher Komplementweg durch ApoE beeinflusst wird, wurden drei verschiedene Ansätze gewählt: Inkubation von ApoE (i) und NHS in MgEGTA Puffer für den AW, (ii) und NHS in GVB⁺⁺ Puffer für den KW und LW, (iii) und C1q^{-/-} in GVB⁺⁺ Puffer für den LW. Das Überleben von *E. coli* in NHS ohne die Zugabe von ApoE wurde 10 % gesetzt.

2.10.3 Komplementaktivierungsassay

Um den Effekt von ApoE auf den KW weiter zu untersuchen, wurde die C4b und C5b-9 Deposition der Komplementkaskade mittels ELISA untersucht. Zur Aktivierung des KW wurde entweder IgM (2 μ g/ml) oder mLDL (1 μ g/ml) über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei 37 °C in einer 96 Well Mikrotiterplatte immobilisiert. ApoE (0,25 – 2 μ M) oder Vnt (0.5 μ M) wurden mit 1 % NHS in GVB⁺⁺ oder PBS⁺⁺ Puffer für 15 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend für 1 h bei 37 °C zu den IgM bzw. mLDL immobilisierten Wells gegeben. Komplementaktivierung wurde über die Messung der C4b bzw. C5b-9 Deposition mittels Verwendung bestimmter Antikörper (α C4d und α C5b-9) bestimmt. Komplementaktivierung mit NHS allein wurde 100 % gesetzt.

2.10.4 Komplement-Spaltungs-Assay

Um festzustellen, ob ApoE die Spaltung von C2 und C4 durch C1s beeinflusst, wurde diese Reaktion in der Flüssigphase getestet. ApoE (5 und 50 μ g/ml) wurde dabei mit C1s (20 μ g/ml) in GVB⁺⁺ Puffer für 15 min bei 37 °C vorinkubiert bevor, C2 (10 μ g/ml) oder C4 (10 μ g/ml) für weitere 30 min bei 37 °C ergänzt wurden. Um zu überprüfen, ob ApoE C4b-Spaltungsaktivität besitzt, wurde C4b (20 μ g/ml) mit ApoE (5 und 50 μ g/ml) oder C4BP (20 μ g/ml) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Beide Versuche wurden mittels Western Blot und der Verwendung von α C2 und α C4 analysiert.

2.10.5 Kofaktor-Assay

C4b wird durch Faktor I in Anwesenheit von dessen Kofaktor, C4BP, in C4c und C4d gespalten. Um zu testen ob ApoE ebenfalls Kofaktoraktivität für Faktor I aufweist, wurde C4b

(10 µg/ml) mit Faktor I (5 µg/ml) und zunehmenden Konzentrationen an ApoE3 (0,1 – 100 µg/ml) für 30 min bei 37 °C in GVB⁺⁺ Puffer inkubiert. Als Positivkontrolle für die Spaltung der C4b α -Kette in ihre drei Spaltprodukte diente ein Inkubationsansatz bestehend aus C4b, Faktor I und C4BP (20 µg/ml). Die C4b Spaltung wurde mittels Western Blot und der Verwendung von α C4 analysiert.

2.11 Bindungsstudien

2.11.1 ELISA

Die allgemeine Durchführung eines ELISAs begann mit dem Immobilisieren des Zielmoleküls in PBS auf einer 96 Well Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei 37 °C. Es folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer, die Absättigung der freien Bindestellen mit Blockpuffer bei 37 °C für 1 h und wieder dreimaligem Waschen. Anschließend wurden die Wells mit dem Liganden, falls nicht anders beschrieben, in Calcium-haltigem Puffer (GVB⁺⁺ oder PBS⁺⁺) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten schloss sich die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 h bei RT und nach erneutem Waschen, die Inkubation mit dem passenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper an. Die Reaktion wurde nach mehrmaligem Waschen durch die Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (1x TMB ELISA Substrate Solution, eBioscience) oder 1,2-Phenylendiamin Dihydrochlorid (OPD tablets, Dako) entwickelt, mit 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Bindungsstärke kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bzw. 492 nm bestimmt.

2.11.2 Protein-Protein-Interaktion / einfacher ELISA

Um festzustellen mit welchen Komplementproteinen ApoE interagiert, wurden 0,1 µM ApoE bzw. 10 µg/ml Gelatine auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Anschließend wurden je 0,1 µM C3, C3b, C1q, C2 oder C4 zu den Wells gegeben und inkubiert. Die Bindung wurde mittels α C3b, α C1q, α C2 bzw. α C4d Antikörper in Verbindung mit dem passenden sekundären Antikörper bestimmt.

Um die Bindung von C1q an ApoE genauer zu analysieren, wurde rekombinantes sowie aus dem Plasma aufgereinigtes ApoE (0,1; 0,4 oder 0,5 µM) und Gelatine (10 µg/ml) immobilisiert und mit verschiedenen Konzentrationen an C1, C1q (0,02 – 5,33 nM) oder NHS (0,075 – 10 %) inkubiert. Gebundenes C1 und C1q wurde mittels α C1q Antikörper detektiert.

Die Spezifität der Bindung von ApoE mit C1q wurde durch den Vergleich mit MBL gemessen. Dazu wurden 1 μM der rekombinanten ApoE Isoformen und aus dem Plasma aufgereinigtes ApoE3 sowie C1s und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gelatine immobilisiert und mit 100 nM MBL inkubiert. Zur Kontrolle dienten 100 nM immobilisiertes MBL. Die Menge an gebundenem MBL wurde mittels αHis Antikörper ermittelt.

Um festzustellen, wo die Bindungsstelle von C1q an ApoE lokalisiert ist, wurden neben rekombinantem ApoE auch 0,1 μM der ApoE Peptide immobilisiert. Die weiteren Schritte waren identisch zur Bestimmung der Bindung von C1q an das ApoE Volllängeprotein.

2.11.3 Analyse der Bindungsbedingungen und der Bindungsart

Um die Calciumabhängigkeit dieser Interaktion zu testen, wurde zum einen C1q (0,02–5,33 nM) in GVB⁺⁺ oder in PBS verdünnt und die Ergebnisse verglichen. Zum anderen wurde EGTA (ein Calciumchelator) in aufsteigender Konzentration (3 – 12 μM) zu einer gleichbleibenden Konzentration an C1q (2 oder 5 nM) in GVB⁺⁺ zugefügt. Die Bindung von C1q an ApoE wurde mit Hilfe des αC1q Antikörpers bestimmt.

Des Weiteren wurde getestet, welche Wechselwirkung für die Interaktion von ApoE mit C1q verantwortlich ist. Um eine Bindung der beiden Proteine auf der Grundlage einer ionischen Wechselwirkung zu untersuchen, wurde zunächst 0,1 μM ApoE3 immobilisiert. Es folgte eine Inkubation mit 0,6 nM C1q bzw. 0,1 μM LDL-R in PBS⁺⁺ mit und ohne Natriumchlorid (0,5 M). Um die Interaktion von ApoE mit C1q in Bezug auf die Ausbildung anderer, nichtkovalenter Wechselwirkungen zu untersuchen, wurde ebenfalls 0,1 μM ApoE immobilisiert und anschließend mit 0,6 nM C1q bzw. 0,1 μM LDL-R in PBS⁺⁺ in An- und Abwesenheit von 1 % SDS inkubiert. Die Bindung von C1q an ApoE wurde mittels αC1q Antikörper und die Interaktion des LDL-R mit ApoE mit Hilfe eines αHis Antikörpers ermittelt.

2.11.4 Kompetitionsassay

Um die Lage der Bindestelle von ApoE an C1q zu verifizieren, wurden 0,6 nM C1q zunächst mit verschiedenen Konzentrationen des ApoE Peptids ApoE 46-56 und ApoE 155-168 (0 – 100 nM) für 30 min bei 37 °C vorinkubiert, bevor der Proteinmix für eine weitere Stunde bei 37 °C mit 0,1 μM rekombinantem immobilisiertem ApoE3 inkubiert wurde. Die Bindung von C1q an das immobilisierte ApoE3 wurde mit Hilfe eines αC1q Antikörpers detektiert.

Um festzustellen, ob ApoE und das C1s₂C1r₂ Tetramer simultan an C1q binden können, oder um die Bindestelle konkurrieren, wurden zunächst 0,6 nM C1q mit unterschiedlichen Konzentrationen an C1s₂C1r₂ (0 – 100 nM) für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde der Proteinmix mit immobilisierten ApoE3 (0,1 µM) inkubiert und die Bindung von C1q an ApoE mittels pαC1q Antikörpers bestimmt.

2.11.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Um eine direkte Abbildung der Bindung von ApoE an C1q zu erhalten, wurde eine Transmissionselektronenmikroskopie mit einem negativ gefärbten Präparat durchgeführt. Dazu wurde für die Darstellung von C1q allein 5 µg/ml C1q in PBS verdünnt. Um das kleinere ApoE Molekül (aus dem Plasma aufgereinigt) bzw. dessen Peptid ApoE 155-168 abzubilden, wurde dieses zunächst biotinyliert und 20 µg/ml davon mit, in 1:25 PBS verdünnten, Streptavidin-gekoppelten Goldpartikeln (5 nm Gold, British BioCell International Ltd.) für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde C1q (10 µg/ml) in einem 1:1 Verhältnis beigefügt und der C1q-ApoE-Gold-Mix für weitere 2 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Karbon-beladene Netzchen wurden durch Glimmentladung unter leichtem Druck hydrophilisiert. Je 20 µl der Proben (C1q allein, C1q-ApoE-Gold-Mix, C1q-ApoE 155-168-Gold-Mix) wurden auf den hydrophilisierten Karbon-gekoppelten Netzchen für 1 min absorbiert, 2-mal mit einem Tropfen dH₂O gewaschen und anschließend mit einem Tropfen 2 % Uranylacetat in dH₂O gefärbt. Die Präparate wurden mittels Zeiss EM902A Elektronenmikroskop (Carl Zeiss AG) bei 80 kV Beschleunigungsspannung analysiert und die Bilder mit einer FastScan-CCD-Kamera 1,024 x 1,024 (TVIPS) aufgenommen. Die Versuche am Transmissionselektronenmikroskop wurden freundlicherweise von Dr. Martin Westermann am elektronenmikroskopischen Zentrum in Jena durchgeführt.

2.11.6 Schicht-Interferenz-Technologie

Um die Affinitätskonstante der Bindung zwischen ApoE und C1q zu ermitteln wurde die Schicht-Interferenz-Technologie mit dem BLitz™-System von ForteBio verwendet. Bei dieser Methode werden biotinylierte Proteine auf einen Streptavidin-gekoppelten Biosensor (VWR) geladen und deren Weißlichtinterferenzmuster an der Oberfläche aufgenommen. Kommt es zur Bindung eines zweiten Proteins an das biotinylierte Protein im Assoziationsschritt, so wird die Schichtdicke auf dem Biosensor erhöht und der Brechungsindex an der Oberfläche ändert sich. Die Änderung der optischen Dichte führt zu einer Verschiebung in der

Wellenlänge des Interferenzmusters, aus dem das Programm die Affinitätskonstante bestimmt. Zunächst wurden Streptavidin-gekoppelte Biosensoren für mindestens 10 min in PBS⁺⁺ hydrolysiert. Anschließend wurden 20 µg/ml biotinyliertes Protein (rekombinantes ApoE2, ApoE3 und ApoE4, aus Plasma aufgereinigtes ApoE3 oder C1s) für 120 sec auf die Sensoren geladen. Es folgte ein 30-sekündiger Waschschrift mit PBS⁺⁺, der gleichzeitig die Basislinie darstellte. Die Bindung von C1q (0,0047 nM – 45,65 nM) oder MBL (45,45 nM) erfolgte in einem 4-minütigen Assoziationsschritt, gefolgt von einem ebenso langen Dissoziationsschritt mit PBS⁺⁺. Die Bindungsstärke wurde mit Hilfe der BLItz™ Software im „advanced kinetics“ Modus mit MBL als Referenzwert berechnet.

Die beschriebene Methode wurde außerdem dazu verwendet, um Bindepartner der initialen Phase des KW sowie des C1 Komplexes an ApoE zu bestimmen. Der Versuchsablauf war dabei derselbe, nur wurde auf die Auswertung durch die BLItz™ Software verzichtet. Zur Beladung der Biosensoren wurden 20 µg/ml biotinylierte ApoE Varianten (rekombinantes ApoE2, ApoE3 und ApoE4) verwendet. Diese wurden im Assoziationsschritt mit 45 nM C1, C2 oder C4 bzw. C1, C1q, C1s oder C1r inkubiert und die Änderung der Schichtdicke nach der Dissoziation mit PBS⁺⁺ bestimmt. Um die Spezifität der Binding zwischen ApoE und C1q zu analysieren, wurden des Weiteren die Bindung von MBL (45,45 nM) an biotinylierte ApoE Isoformen (20 µg/ml) sowie die Bindung von C1q (45,65 nM) an biotinyliertes ApoA (20 µg/ml) getestet.

2.11.7 Mikroskala-Thermophorese

Zur Bestimmung der Affinitätskonstanten zwischen C1q und dem ApoE 155-168 wurde die Mikroskala Thermophorese (MST) von NanoTemper angewendet. Bei dieser Methode wird die Bewegung von Molekülen entlang eines sehr geringen Temperaturgradienten gemessen. Geht ein Molekül mit einem anderen Molekül einen Komplex ein, so ändert sich dessen Bewegungsverhalten im Gradient und eine Bindung kann bestimmt werden. Der Temperaturgradient wird dabei mittels Infrarotlaser induziert und die direkte Bewegung der Moleküle mit Hilfe von kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen detektiert und quantifiziert. Für den Versuch wurden zunächst ApoE 139-152 sowie ApoE 30-40 als Kontrollpeptid mit Hilfe des MO-L004 Monolith™ Protein Labeling Kit RED-MALEIMIDE (Cysteine Reactive) nach Herstellerangaben mit Alexa®647 fluoreszenzmarkiert. ApoE 139-152 (10 nM) beziehungsweise ApoE 30-40 (30 nM) wurden mit verschiedenen

Konzentrationen (0,04 nM – 1196 nM) an C1q in PBS⁺⁺ Puffer für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor die Proben 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert und in Standardkapillaren überführt wurden. Die Fluoreszenzsignale wurden in einem LED-Bereich von 60 % mittels Monolith NT.115^{Pico} aufgenommen. Um sicherzustellen, dass die Fluoreszenz-markierten Peptide keine Interaktion mit der Kapillarwand eingingen, wurden die Fluoreszenzsignale auf Unregelmäßigkeiten (Doppelpeaks, wellige Form der Kurve) untersucht. Des Weiteren wurde ein Fluoreszenztest durchgeführt, bei dem zunächst die Intensität der Fluoreszenz in den einzelnen Proben überprüft wurde. Da jede Probe dieselbe Menge an Fluoreszenz-markiertem Peptid enthielt, sollte das Fluoreszenzsignal zwischen den einzelnen Messkapillaren nicht mehr als 10 % schwanken. Da dies jedoch der Fall war, musste ein SD-Test durchgeführt werden.

2.11.7.1 SD-Test

Um festzustellen, ob ein Fluoreszenzwechsel ohne Thermophorese zufällig oder in Folge eines Bindungsereignisses auftrat, wurde ein SD-Test durchgeführt. Dazu wurden jeweils die drei Proben mit der höchsten und der niedrigsten Konzentration des Liganden ausgewählt und für 10 min bei 12 700 rpm zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden anschließend vorsichtig entnommen, mit 10 µl SD-Mix (4 % SDS, 40 mM 1,4-Dithiothreitol) gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurden die Proben in die Messkapillaren überführt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Da kein Fluoreszenzwechsel zwischen den einzelnen Proben mehr sichtbar war, konnte davon ausgegangen werden, dass vorherige Unterschiede im Fluoreszenzsignal durch ein Bindungsereignis hervorgerufen wurden. Die Affinität der beiden Moleküle konnte somit direkt über den Fluoreszenztest ohne Thermophorese ermittelt werden. Zur Analyse wurde das K_D Modell der initialen Fluoreszenzanalyse v2.0.2 verwendet.

2.11.8 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Um die Bindung von ApoE und C1q auf der Oberfläche von Lipiden und Mikrogliazellen darzustellen, wurde die konfokale LSM verwendet. Für die Analyse der Bindung der Proteine an LDL und mLDL wurden die Lipide (0,5 mg/ml) mit 0,6 µM Alexa Fluor[®] 647 Fluorochrom-gekoppeltem ApoE4 und/oder mit 0,045 µM 488 Fluorochrom-gekoppeltem C1q für 30 min im Dunkel inkubiert, anschließend für 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert, auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Zur Visualisierung der Bindung von ApoE an Mikrogliazellen wurden zunächst $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well auf Deckgläschen mit 13 mm Durchmesser in einer 24 Well Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 4 % Formaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert, danach dreimal für je 10 min gewaschen und für 5 min auf Eis mit 0,3 % Triton X-100 und 1 % BSA in PBS II permeabilisiert. Es folgte erneut dreimaliges Waschen und die Inkubation der Zellen mit 24,5 nM Fluoreszenzgekoppelten ApoE4 bzw. 25 µg/ml Texa Red[®]-X (Invitrogen) für 1 h bei 37 °C. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Deckgläschen aus den Wells entfernt, getrocknet und auf einem Objektträger mit einem Tropfen ProTaq[®] Mount Fluor (Quartett Immundiagnostika und Biotechnologie) und handelsüblichem Nagellack fixiert. Die Präparate wurden im LSM untersucht.

2.11.9 Durchflusszytometrie

Um zu überprüfen, ob C1q und der LDL-R um die Bindung an ApoE konkurrieren, wurden zunächst 1×10^6 Mikrogliazellen, als natürliche Quelle für den LDL-R, pro Ansatz zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 % NHS sowie 0,49 µM Alexa Fluor[®] 647 Fluorochrom-gekoppeltem ApoE4 und/oder 0,2 µM C1q mit PBS⁺⁺ in 50 µl für 1 h im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze lediglich mit PBS⁺⁺ und Proben ausschließlich mit NHS in PBS⁺⁺. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 600 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer LSR II von Becton und Dickinson vermessen.

2.12 Statistische Auswertung

Um festzustellen, ob sich zwei Messreihen in ihrem Mittelwert signifikant voneinander unterscheiden, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Der t-Test wurde mit Hilfe der Software von GraphPad bestimmt. Ein p-Wert kleiner 0,05 (*) gilt dabei als signifikant, kleiner als 0,01 (**) als sehr signifikant und ein p-Wert kleiner 0,001 (***) als extrem signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von ApoE auf das Komplementsystem

ApoE ist ein Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa (Abb. 5). Genetische Variationen im *APOE* Gen erhöhen das Risiko für spezifische Erkrankungen wie Alzheimer [79], vaskuläre Demenz [80], Arteriosklerose [26] und AMD [39]. Sie sind gekennzeichnet durch die Ablagerung von Zelltrümmern, Lipiden und A β . Da diese Erkrankungen gleichzeitig mit einer Deregulation des Komplementsystems assoziiert sind, stellte sich die Frage, ob ApoE Einfluss auf die Aktivierung und/oder Regulierung des Komplementsystems nimmt.

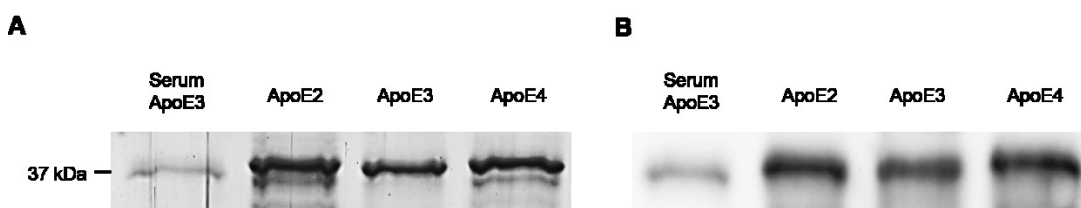


Abb. 5: ApoE Isoformen. Sowohl das aus dem Plasma aufgereinigte ApoE3, als auch die rekombinanten ApoE Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 zeigen eine Molekülgröße von 37 kDa. 2 μ g/ml Serum ApoE sowie 22 μ g/ml rekombinante ApoE Isoformen wurden unter reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel aufgetrennt und ihre Mobilität mittels (A) Silberfärbung und (B) α ApoE Antikörper im Western Blot analysiert.

Wie bereits beschrieben (1.2.1), kann das Komplementsystem im Wesentlichen über drei verschiedene Wege aktiviert werden, den KW, den LW und den AW. Mittels Hämolyseassay wurde der Einfluss von ApoE auf den KW und den AW untersucht. Bei dieser Methode werden tierische Erythrozyten zusammen mit NHS inkubiert. Komplementproteine im Serum erkennen dabei die Erythrozyten als fremd, was zur Aktivierung des Komplementsystems führt. Durch die Bildung des TCC auf der Oberfläche der Erythrozyten kommt es zur Lyse der Zellen. Hämoglobin aus den Erythrozyten wird dabei freigesetzt und kann im Überstand kolorimetrisch vermessen werden.

Zur Aktivierung des KW wurden Ambozeptor-beladene Schafserythrozyten verwendet. Schafserythrozyten sind in der Lage Faktor H, einen Regulator des AW [81, 82], zu binden und so den AW zu inhibieren. Der Ambozeptor ist ein spezifischer Hämolyseantikörper, welcher das Komplementsystem über den KW aktiviert.

Um lediglich den Effekt von ApoE auf den AW zu untersuchen, wurden Kaninchenerythrozyten und Puffer mit dem Calciumchelator EGTA verwendet. EGTA ist durch seine freien Elektronenpaare in der Lage Calciumionen zu binden, in einem Komplex zu fixieren und so chemisch zu inaktivieren. Im Gegensatz zum KW, benötigt der AW des

Komplementsystems lediglich Magnesium aber kein Calcium [83]. Durch Zugabe von EGTA wird somit die Aktivierung des KW, nicht aber des AW, unterbunden.

Durch die Zugabe von NHS zu den Erythrozyten wird das Komplementsystem aktiviert (entweder über den KW oder den AW) und die Erythrozyten durch die Bildung des TCC lysiert. Die Lyse der Schafserythrozyten konnte durch die Zugabe von 0,5 μ M rekombinanten ApoE um ca. 40 % vermindert werden. Dies lässt sich auf einen inhibitorischen Effekt von ApoE auf den KW des Komplementsystems zurückzuführen (Abb. 6A). Alle drei ApoE Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 inhibierten die Lyse der Schafserythrozyten ähnlich stark und dosisabhängig, wohingegen das Kontrollprotein BSA keinen Effekt auf die Lyse zeigte.

Im Gegensatz dazu hatte ApoE keinen Einfluss auf die Lyse der Kaninchenerythrozyten (Abb. 6B). ApoE zeigte somit keinen Effekt auf die Aktivierung des AW. EfB von *Staphylococcus aureus* zeigte schon in geringen Mengen eine Inhibition der Lyse der Kaninchenerythrozyten um ca. 90 %. EfB ist in der Lage die Plasmin-vermittelte Spaltung von C3 sowie C3b zu verstärken und so das Komplementsystem zu inhibieren [77]. Durch die direkte Interaktion mit C3 ist EfB außerdem in der Lage, die Bildung von C3b zu blockieren [84].

Um den inhibitorischen Effekt von ApoE auf den KW zu bestätigen, wurde außerdem ein *E. coli* Überlebensassay durchgeführt (Abb. 6C). Dafür wurde *E. coli* in NHS mit steigenden Konzentrationen an rekombinanten ApoE3 für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Agarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Kolonieformenden Einheiten (CFU) gezählt. Das Komplementsystem erkennt die fremde Oberfläche des Bakteriums und wird aktiviert. Es kommt zur Opsonisierung von *E. coli* und zur Aktivierung des lytischen Weges, welcher zur Zerstörung des Bakteriums führt. Um den Effekt von ApoE auf die drei verschiedenen Komplementaktivierungswege zu untersuchen, wurde die Aktivierung in NHS unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: in Calciumhaltigem NHS, welches die Aktivierung aller drei Komplementwege unterstützt, in Calciumdefizientem NHS, welches die Aktivierung des AW, nicht aber des KW oder des LW, zulässt und zum anderen in Calciumhaltigem aber C1q-depletiertem Serum, welches die Aktivierung über den KW verhindert, da das initiale Molekül dieses Weges, C1q, fehlt. Wenn alle drei Komplementwege aktivierbar waren, nahm bei einer Zugabe von 1 μ M ApoE3 die Überlebensrate von *E. coli* um das Vierfache zu. War hingegen die Aktivierung des KW durch die Abwesenheit von Calcium oder C1q verhindert, so hatte ApoE keinen Effekt auf das

Überleben von *E. coli* im NHS. Diese Ergebnisse zeigen, dass ApoE den KW des Komplementsystems inhibiert und bestätigen die Ergebnisse im Hämolyseassay.

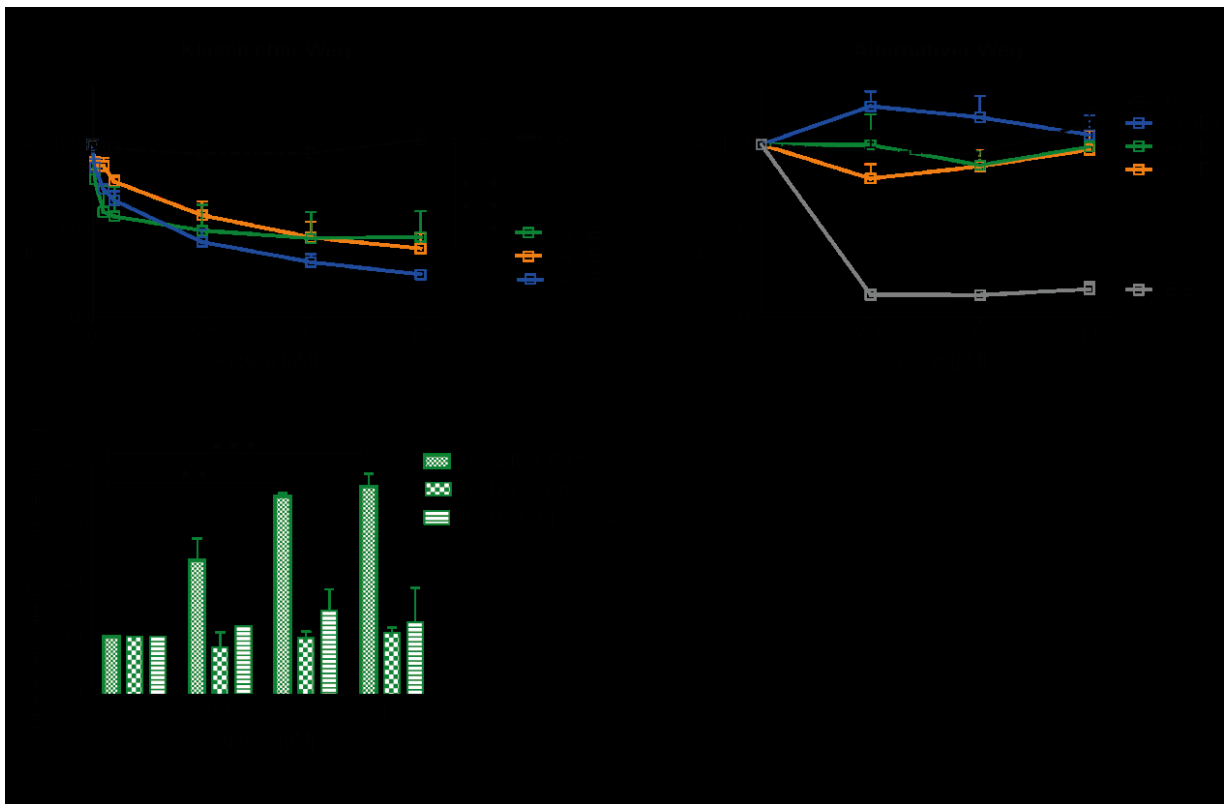


Abb. 6: Effekt von ApoE auf das Komplementsystem. Alle drei ApoE Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 inhibieren ausschließlich den klassischen Weg des Komplementsystems. ApoE2, ApoE3 oder ApoE4 wurden zusammen mit NHS, welches entweder über (A) den klassischen (1 % NHS in Calcium-haltigem Puffer) oder (B) den alternativen (20 % NHS in Puffer ohne Calcium) Weg aktiviert wurde, mit Erythrozyten inkubiert. Die Lyse der Schafs- (klassischer Weg) bzw. Kaninchen- (alternativer Weg) Erythrozyten, welche durch die Generierung des Terminalen Komplementkomplexes hervorgerufen wird, wurde kolorimetrisch durch die Freisetzung von Hämoglobin bei 414 nm bestimmt. Die durch NHS allein, ohne Zugabe von weiteren Proteinen, verursachte Hämolyse der Erythrozyten wurde gleich 100 % gesetzt. Die ApoE Isoformen zeigten lediglich eine Inhibition der Lyse, wenn Komplement über den klassischen, nicht aber über den alternativen Weg, aktiviert wurde. (C) ApoE3 in zunehmenden Konzentrationen wurde zusammen mit NHS unter drei verschiedenen, Komplement-aktivierenden Bedingungen mit *E. coli* Zellen inkubiert: I) in Calcium-haltigem NHS, welches die Aktivierung aller drei Komplementwege erlaubt, II) in NHS ohne Calcium, welches lediglich die Aktivierung des alternativen Weges ermöglicht und III) in Calcium-haltigem C1q-deplitiertem Serum, welches eine Komplementaktivierung über den alternativen und den Lektin-Weg erlaubt und den klassischen Weg ausschließt. Nach dem Ausplattieren und der Anzucht von *E. coli* wurde die Anzahl der Kolonien als Maß für die Überlebensrate des Bakteriums bestimmt. Das Überleben von *E. coli* in NHS ohne die Zugabe von ApoE wurde gleich 10 % gesetzt. Erhöhte ApoE Konzentrationen im NHS erhöhten die Überlebensrate von *E. coli* nur, wenn der klassische Komplementweg aktiv war. Die Daten in A - C repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten. BSA = bovines Serumalbumin, Efb = extrazellulär Fibrinogen-bindendes Protein (mikrobieller Inhibitor des Komplementsystems), NHS = normales humanes Serum, HS = humanes Serum. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.2 Inhibitorischer Einfluss von ApoE auf den klassischen Weg des Komplementsystems

Das Komplementsystem besteht aus einer Kaskade von Reaktionen. Sie beginnt mit der Initiation, der Erkennung von fremden und modifizierten Selbst-Oberflächen zur Aktivierung der Komplementkaskade. Es folgt der Aufbau der C3 Konvertase und daraus der

C5 Konvertase, welche zur Opsonisierung und Inflammation führen. Im letzten Schritt kommt es zur Bildung des TCC und zur Lyse der Komplement-aktivierenden Zelle [85]. Um festzustellen auf welcher Ebene des Komplementsystems ApoE den KW inhibiert, wurde die C5b-9 und die C4b Deposition nach der Aktivierung von NHS mit ApoE bestimmt. Rekombinantes ApoE wurde mit NHS vorinkubiert und auf mit IgM beschichtete Mikrotiterplatten gegeben, welche den KW aktivieren. Anschließend wurde die Ablagerung von C5b-9 und C4b mittels ELISA gemessen. Eine Zugabe von 2 μ M ApoE2, ApoE3 oder ApoE4 zum NHS inhibierte sowohl die C5b-9 (Abb. 7A) als auch die C4b (Abb. 7B) Deposition um etwa 80 %. Die Zugabe von Vnt, einem körpereigenen Inhibitor des TCC, zum Serum inhibierte wie erwartet [86, 87] die C5b-9 Deposition. Die Zugabe von BSA zum Serum hingegen zeigte keinen Effekt auf die Komplementaktivität. Das zeigt, dass ApoE die Aktivität des KW zu einem frühen Zeitpunkt der Kaskade im Bereich der Initiation und der Generierung der C3 Konvertase inhibiert.

Neben Antikörpern kann der KW auch über veränderte Selbstoberflächen oder modifizierte Lipide niederer Dichte, wie dem Malondialdehyd-modifiziertem LDL (mLDL) [47], aktiviert werden. LDL ist ein Hauptbestandteil der Ablagerung im Gehirn bei Morbus Alzheimer und in den Blutgefäßen bei Arthritis. Beide Erkrankungen sind Komplement-assoziiert [88-91]. Um festzustellen, ob ApoE in der Lage ist den KW zu inhibieren, wenn dieser über mLDL aktiviert wird, wurde mit ApoE vorinkubiertes NHS zu mLDL beschichteten Mikrotiterplatten gegeben und die C4b Deposition gemessen. Auch in diesem Fall zeigten alle drei ApoE Isoformen einen inhibitorischen Effekt auf das Komplementsystem von ca. 50 % bei einer Zugabe von 1 μ M ApoE (physiologische Konzentration im Serum beträgt 2 μ M [92]) (Abb. 7C). Im Gegensatz dazu hatte BSA keinen Einfluss auf die Aktivität des KW. Um zu zeigen, dass C1q lediglich durch modifizierte Lipide rekrutiert und aktiviert wird, wurde die Bindung von C1q an mLDL und LDL verglichen. C1q interagiert signifikant stärker mit mLDL und IgM als mit LDL oder Gelatine (Abb. 7D). Die Bindung von C1q an mLDL erfolgte dosisabhängig (Abb. 7E). Die Ergebnisse zeigen, dass ApoE die initiale Phase des KW inhibiert.

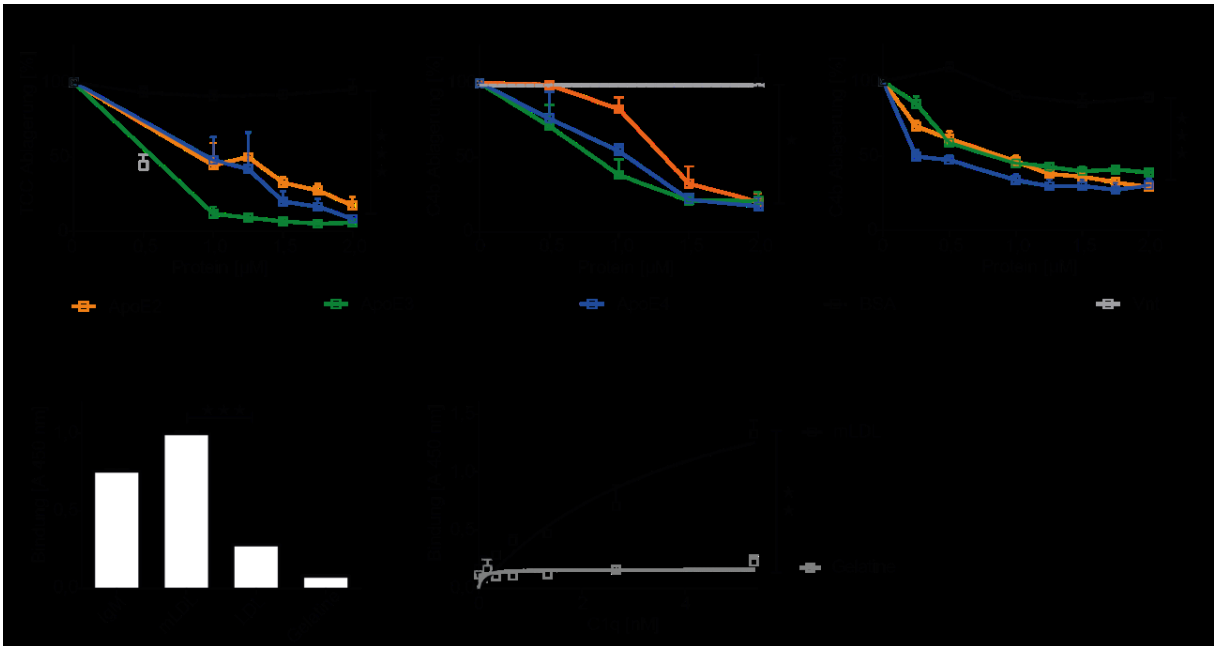


Abb. 7: ApoE inhibiert den klassischen Weg des Komplementsystems. Alle ApoE Isoformen inhibieren den klassischen Weg auf dem Level der initialen Phase. ApoE Isoformen wurden zusammen mit NHS auf **(A + B)** IgM bzw. **(C)** mLDL beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert. Die Komplementaktivierung des klassischen Weges erfolgte durch die Messung der Ablagerung **(A)** des Terminalen Komplementkomplexes (TCC) und **(B+ C)** von C4b mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Deposition des TCC bzw. C4b in NHS wurde gleich 100 % gesetzt. Sowohl die TCC, als auch die C4b Ablagerung, wurde durch die Zugabe von ApoE zu NHS inhibiert. C1q bindet an modifizierte Lipide. **(D)** IgM, mLDL, und LDL wurden auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und die Bindung von C1q mittels ELISA gemessen. **(E)** C1q bindet dosisabhängig an mLDL. C1q wurde in verschiedenen Konzentrationen zu immobilisiertem mLDL gegeben und die Bindung mittels C1q Antikörper gemessen. Die Daten zur klassischen Komplementaktivität A - C und die Bindungsstudien D - E repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von mindestens drei unabhängigen Experimenten. BSA = bovines Serumalbumin, Vnt = Vitronectin (körpereigener Regulator des TCC), mLDL = Malondialdehyd-modifiziertes Lipid niederer Dichte, LDL = Lipid niederer Dichte. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.3 Einfluss von ApoE auf die Spaltung von C2, C4 und C4b

Die Aktivierung des KW beginnt mit der Bindung des C1 Komplexes über C1q an seinen Liganden. Dabei wird die Protease C1r aktiv, welche wiederum die Protease C1s aktiviert. Proteolytisch aktives C1s ist in der Lage C4 am N-terminalen Ende der α -Kette zu schneiden. Dabei entstehen C4a und C4b. C4b besteht aus einer modifizierten α -Kette (α' 83 kDa) sowie aus einer β - (75 kDa) und γ -Kette (33 kDa) (Abb. 8B) [93]. C4b bindet an die Komplementaktivatoroberfläche und rekrutiert C2, welches ebenfalls durch C1s in C2a und C2b geschnitten wird (Abb. 8A) [55, 94]. C2a verbleibt an C4b gebunden und zusammen bilden sie die C3 Konvertase des KW (C4b2a) [95]. Um festzustellen, ob ApoE die Spaltung von C2 und C4 zu deren reaktiven Formen C2a und C4b durch C1s inhibieren kann, wurde ApoE3 zusammen mit C2 bzw. C4 in Anwesenheit von C1s inkubiert und die Spaltung mittels Western Blot verfolgt. ApoE hat keinen Einfluss auf die Spaltung von C2 und C4 durch C1s (Abb. 8D und E). Die Inkubation von C1s mit C2 zeigte eine deutliche Spaltung von C2 (Reihe

1) in dessen Spaltprodukte C2a (α' 30 kDa) und C2b (α' 75 kDa) (Reihe 2). Die Zugabe von ApoE führte nicht zu einer verminderten Spaltung oder zum Auftreten weiterer Spaltprodukte. Auch in Anwesenheit von ApoE traten die Spaltprodukte C2b (30 kDa) und C2a (75 kDa) auf (Reihe 3 und 4). Die Inkubation von C1s mit C4 führte zur Spaltung von C4 in C4a und C4b (Abb. 8E). Dies zeigte sich durch das Vorhandensein einer zusätzlich auftretenden Bande von 83 kDa (Reihe 2) im Gegensatz zu C4 allein (Reihe 1). Die Zugabe von ApoE führte zu keiner Veränderung der C4 Spaltung. Dies lässt darauf schließen, dass ApoE die Spaltung von C4 nicht hemmt und auch nicht zur Generierung neuer Spaltprodukte beiträgt (Reihe 3 und 4).

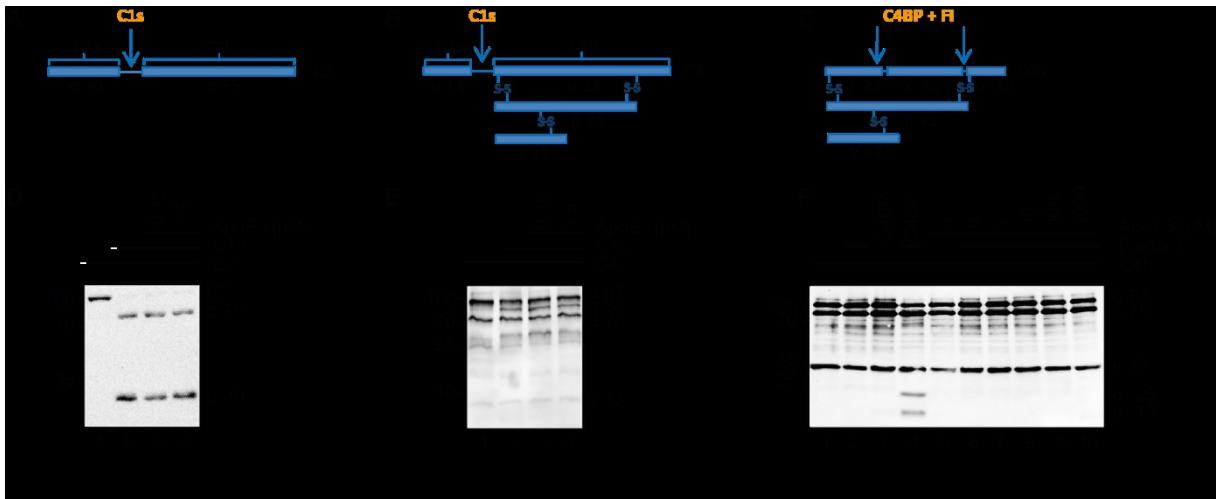


Abb. 8: Spaltung von C2, C4 und C4b. ApoE hat keinen Effekt auf die Spaltung von C2 und C4 durch C1s. **A + B** schematische Darstellung der Spaltung von **(A)** C2 und **(B)** C4 durch die Protease des C1 Komplexes C1s in C2a und C2b sowie C4a und C4b. C1s wurde zusammen mit **(D)** C2 bzw. **(E)** C4 mit und ohne Zugabe von ApoE inkubiert und die proteolytische Spaltung mittels Western Blot visualisiert. ApoE zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf die Spaltung von C2 oder C4 in dessen aktive Produkte C2a und C4b sowie keine weitere Degradierung der Spaltprodukte. ApoE besitzt keine Kofaktoraktivität für Faktor I (FI). **C** schematische Darstellung der Spaltung von C4b durch Faktor I mit C4BP. **(F)** C4b wurde zusammen mit Faktor I in Kombination mit C4BP oder aufsteigenden Mengen an ApoE inkubiert und die Spaltung von C4b in dessen Fragmente C4c und C4d mittels Western Blot analysiert. Faktor I war nicht in der Lage zusammen mit ApoE C4b zu spalten, im Gegensatz zu C4BP.

Der KW kann in der initialen Phase auch durch die Inaktivierung von C4b gehemmt werden. Dies geschieht durch die Serinprotease Faktor I. Faktor I in Anwesenheit von C4BP schneidet die α' -Kette von C4b. Dabei entsteht zum einen C4d (α'' 45 kDa) und C4c. C4c setzt sich aus der α' -Kette (α'' 25 und α'' 13) und der β - und γ -Kette zusammen (Abb. 8C) [96]. Um zu ermitteln, ob ApoE die Inhibition des KW durch eine Spaltung und Inaktivierung von C4b verursacht, wurde in diesem Fall ApoE3 zusammen mit C4b und der Serinprotease Faktor I

inkubiert. Die Spaltung von C4b wurde ebenfalls mittels Western Blot analysiert (Abb. 8F). ApoE allein (Reihe 5) sowie in Kombination mit Faktor I (Reihe 7 bis 10) vermittelte keine Spaltung von C4b. ApoE besitzt somit keine Kofaktoraktivität für Faktor I. Im Gegensatz dazu führte Faktor I in Kombination mit C4BP zu den Spaltprodukten der C4b α -Kette $\alpha''25$ und $\alpha''13$ (Reihe 4). Da die Inhibition des KW durch ApoE nicht durch die Spaltung von C2 und C4 sowie auf die Inaktivierung von C4b zurückzuführen ist, muss ApoE die Inhibition in der initialen Phase des Komplementsystems über einen anderen Mechanismus ausüben.

3.4 Bindung von ApoE an Proteine der initialen Phase des klassischen Komplementweges

Die drei zentralen Moleküle des KW sind C1, C2 und C4. Ob ApoE mit einem dieser drei Proteine interagiert wurde zunächst mittels ELISA getestet. Dazu wurde immobilisiertes ApoE mit äquimolaren Mengen an C1, C2, C4 sowie C3 und C3b inkubiert und deren Bindung mit Hilfe spezifischer Antikörper gemessen. Alle ApoE Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4, zeigten eine Interaktion mit C1 und geringfügig auch C2, jedoch keine Bindung zu C4 sowie Gelatine (Abb. 9A). Auch die beiden Moleküle der zweiten Phase der klassischen Komplementkaskade, C3 und C3b, wiesen keine Interaktion mit den ApoE Isoformen auf. Die Echtzeitinteraktionen zwischen den ApoE Isoformen mit C1 und C2 wurden mit Hilfe von „Biolayer Interferometry“ nochmals überprüft. Dafür wurden die ApoE Isoformen biotinyliert und an Streptavidin-Sensoren gebunden. Anschließend wurde die Assoziation und Dissoziation von C1, C2 und C4 an ApoE gemessen. Die Bindung von C1 an ApoE konnte mit dieser Methode bestätigt werden (Abb. 1B). Es wurde keine Interaktion von ApoE mit C2 und C4 gemessen. Bindung zwischen den ApoE Isoformen und C1 konnte in beiden Analysemethoden, ELISA und „Biolayer Interferometry“, nachgewiesen werden, was C1 als Bindungspartner für ApoE ausweist.

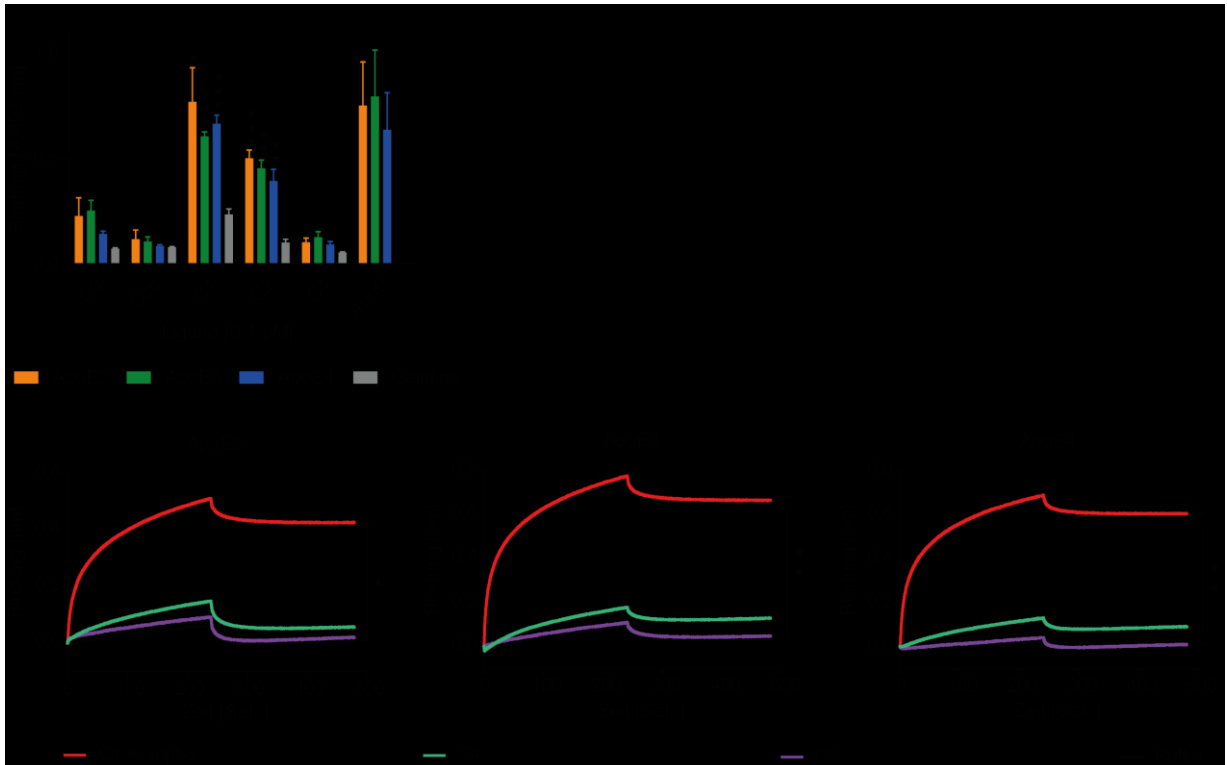


Abb. 9: Interaktion von ApoE mit Proteinen der initialen Phase des klassischen Komplementweges. ApoE interagiert mit dem C1 Komplex. **(A)** Immobilisierte ApoE Isoformen sowie Gelatine als Kontrolle wurden mit äquimolaren Mengen an C1, C2, C4 sowie C3 und C3b inkubiert und die Bindung mittels spezifischer Antikörper im ELISA getestet. Der C1 Komplex sowie C2 zeigten Bindung an alle ApoE Isoformen. Der C1 Komplex, nicht aber C2 oder C4, zeigten Bindung an ApoE2, ApoE3 und ApoE4. **(B)** Biotinylierte ApoE Isoformen wurden an Streptavidin-Sensoren gebunden und die Interaktion mit C1, C2 und C4 mittels „Biolayer Interferometry“ bestimmt. Die Daten zur Bindung von ApoE Isoformen an initiale Proteine des klassischen Weges A + B repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardfehler für A) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.5 Charakterisierung der Bindung von ApoE an den C1 Komplex

Der C1 Komplex besteht aus einem C1q Molekül, welches die Aktivatoroberfläche erkennt und bindet, und einem Tetramer aus jeweils zwei C1s und zwei C1r Molekülen. Um festzustellen mit welchem der C1 Komponenten ApoE interagiert, wurde die Interaktion zwischen den ApoE Isoformen und den C1 Komponenten mittels „Biolayer Interferometry“ gemessen. ApoE2, ApoE3 und ApoE4 wurden dazu biotinyliert und auf Streptavidin-Sensoren immobilisiert. Danach wurde die Assoziation und Dissoziation von C1, C1q, C1r und C1s an ApoE gemessen. Alle ApoE Isoformen zeigten eine ähnlich starke Bindung zu C1q sowie zum gesamten C1 Komplex, jedoch keine Interaktion mit den Proteasen C1s und C1r (Abb. 10A). Um die Bindung von C1q an ApoE zu bestätigen, wurde ein ELISA durchgeführt. Hierfür wurden die immobilisierten ApoE Proteine entweder mit dem gesamten C1 Komplex oder lediglich mit C1q inkubiert und deren Bindung an ApoE gemessen. Außerdem wurde NHS als Quelle für C1 und C1q verwendet. Bei diesem Ansatz lässt sich jedoch nicht zwischen der

Bindung von C1 und C1q an ApoE unterscheiden. Sowohl der gesamte C1 Komplex als auch C1q allein zeigten eine dosisabhängige Bindung zu allen ApoE Isoformen (Abb. 10B-D). Auch C1 und C1q aus NHS banden an die ApoE Isoformen.

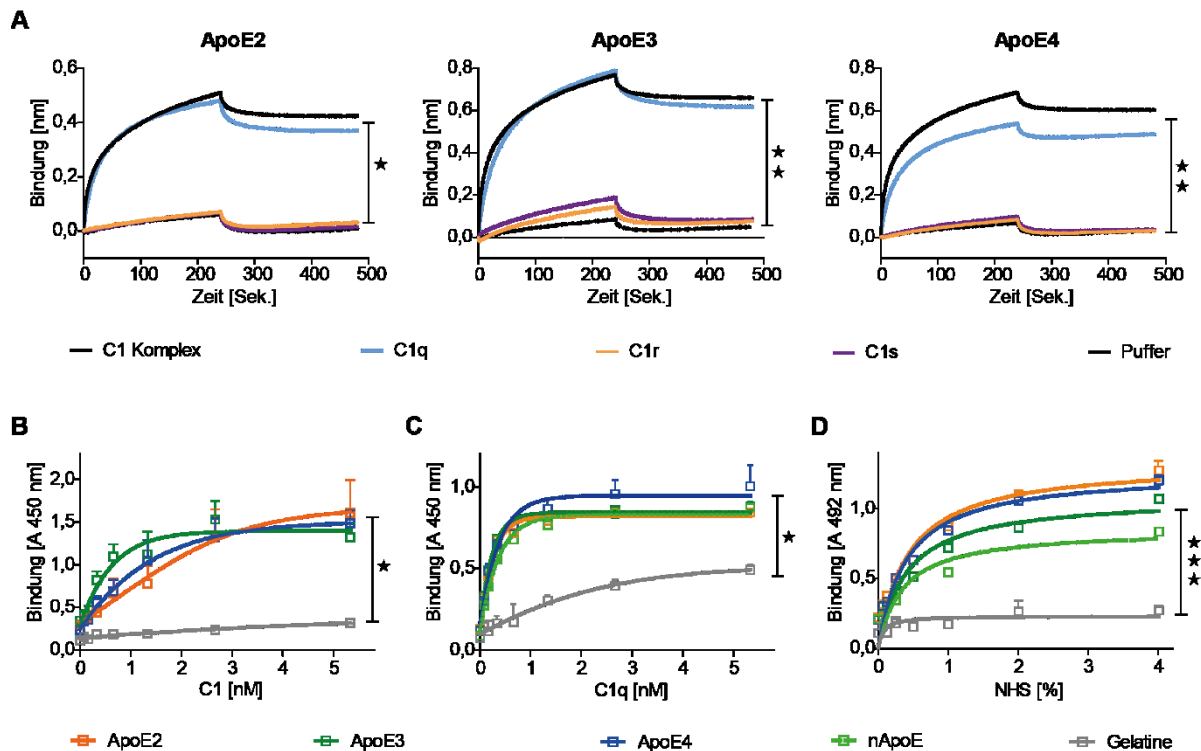


Abb. 10: Bindung von ApoE an C1 Komponenten. ApoE bindet via C1q an den C1 Komplex. **(A)** Die Interaktion von ApoE mit den C1 Komponenten C1q, C1s und C1r wurde mittels „Biolyer Interferometry“ untersucht. C1q, in ähnlicher Intensität wie der gesamte C1 Komplex, bindet an ApoE-beladene Biosensoren, im Gegensatz zu den Proteasen C1s und C1r. **(B)** Der C1 Komplex, **(C)** aus dem Plasma aufgereinigtes C1q sowie **(D)** natives C1 und C1q direkt aus dem Serum binden dosisabhängig an ApoE. Rekombinante ApoE Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 sowie aus dem Plasma aufgereinigtes ApoE3 (C + D) wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und mit aufsteigenden Mengen an aufgereinigtem C1 Komplex, C1q oder Serum inkubiert. Die Bindung von C1 und C1q erfolgte mittels α C1q Antikörper im ELISA. Die Daten zur Bindung von C1 sowie dessen Komponenten an ApoE Isoformen A - D repräsentieren den Mittelwert (\pm Standardfehler für B - D) von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

MBL ist das Initiatorprotein des LW. Es ist strukturell und funktional sehr ähnlich zu C1q [97-99] (Abb. 11A). Um die Spezifität von ApoE für den KW und dessen Komponente C1q zu testen wurde die Interaktion von ApoE mit C1q und MBL mittels „Biolyer Interferometry“ verglichen. Hierfür wurde die Assoziation und Dissoziation von C1q und MBL an Biosensorgekoppeltes ApoE bzw. C1s gemessen. C1q bindet an alle ApoE Isoformen und an C1s (Abb. 11C). Im Gegensatz dazu war keine Bindung von MBL an ApoE oder C1s nachweisbar, was die Rolle von ApoE im KW untermauert. Auch im ELISA zeigte MBL keine Bindung an immobilisierte ApoE Isoformen oder an C1s verglichen zur MBL Kontrolle (äquimolare Menge an MBL ohne Ligand) (Abb. 11B). Um die Spezifität von ApoE für C1q zu untermauern, wurde die Interaktion von C1q mit einem anderen Apolipoprotein, ApoA,

mittels „Biolayer Interferometry“ getestet. Im Vergleich zu ApoE zeigte C1q keine Bindung an ApoA (Abb. 11D).

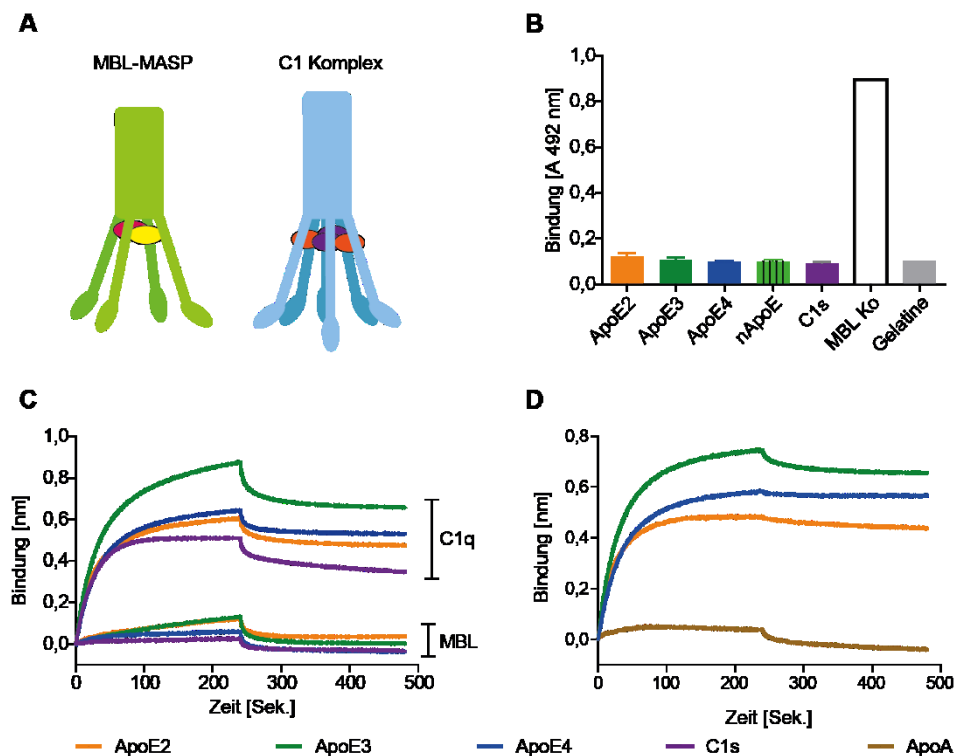


Abb. 11: Interaktion von ApoE mit MBL. ApoE interagiert nicht mit dem initialen Molekül des Lektin-Weges, Mannosebindendes Lektin (MBL). **A** Schematische Darstellung der initialen Molekülkomplexe des Lektin (MBL-MASP) und des klassischen (C1 Komplex) Weges. Der MBL-MASP Komplex setzt sich aus je einem MBL (grün), MASP-1 (gelb) und MASP-2 (rot) Molekül zusammen. Der C1 Komplex wird gebildet von einem C1q (blau) Molekül und je zwei C1s (lila) und C1r (orange) Proteinen. MBL interagiert nicht mit den ApoE Isoformen, C1s oder Gelatine. **(B)** ApoE Isoformen sowie C1s und Gelatine wurden immobilisiert und die Bindung von MBL mittels ELISA gemessen. MBL Ko = immobilisierte äquimolare Menge an MBL. MBL, im Gegensatz zu C1q, zeigte keine Interaktion mit ApoE2, ApoE3, ApoE4 oder C1s. **(C)** MBL und C1q Bindung zu Biosensor-beladenen ApoE Isoformen und C1s wurde mittels „Biolayer Interferometry“ untersucht. C1q zeigte, im Gegensatz zu ApoE Isoformen, keine Interaktion mit biotinyliertem und an Streptavidin-beladenen Sensoren gekoppeltem ApoA. **(D)** C1q Bindung zu ApoA im Vergleich zu ApoE Isoformen wurde mittels „Biolayer Interferometry“ analysiert. Die Daten zur MBL Bindung in B repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler dreier unabhängiger Messungen.

Die Affinitätskonstante der ApoE-C1q Bindung wurde mit Hilfe der Schicht-Interferenz-Technologie („Biolayer Interferometry“) bestimmt. Dabei wurden immobilisierte ApoE Proteinen mit C1q in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert und die Interaktion mit Hilfe des „Advanced Kinetics“ Programms in Echtzeit bestimmt. Die Messungen ergaben für die rekombinante Isoformen ApoE2 einen K_D -Wert von 0,27 nM, für ApoE3 von 0,58 nM und für ApoE4 von 0,21 nM sowie für das aus dem Plasma aufgereinigte ApoE3 von 0,18 nM (Tab. 2). Die Affinitätskonstanten der ApoE Proteine zu C1q sind somit sehr ähnlich und sehr stark. C1s, welches als C1q-bindendes Molekül bereits bekannt ist, bindet mit einem ca. zehnfach

höheren K_D -Wert von 2,3 nM an C1q. Da die Interferenzmethode Interaktionen in Echtzeit misst, kann die Assoziationskonstante k_a sowie die Dissoziationskonstante k_d einer Interaktion bestimmt werden. Der k_a -Wert gibt dabei an, wie viele Molekülkomplexe sich in einer Sekunde in einer molaren Lösung formen. Der k_d -Wert gibt an, wie viele Komplexe pro Sekunde zerfallen und ist somit ein Maß für die Stabilität einer Bindung. Die Assoziationskonstanten k_a zwischen den ApoE Formen und C1q sowie C1s und C1q waren sehr ähnlich. Es bildeten sich im Schnitt 900 000 Komplexe pro Sekunde. Im Gegensatz dazu wiesen die ApoE Formen größere Unterschiede in den Dissoziationskonstanten k_d auf. Im Fall von rekombinantem ApoE3 zerfielen 0,005 ApoE-C1q-Komplexe pro Sekunde, wohingegen es für ApoE4 nur rund 0,002 und für ApoE2 und ApoE3 aus dem Serum sogar nur rund 0,0001 ApoE-C1q-Komplexe waren. Es scheint, dass der Komplex zwischen ApoE2 und ApoE3 aus dem Serum mit C1q stabiler ist als der zwischen ApoE3 und ApoE4 mit C1q. Zugleich war jedoch auch zu beobachten, dass die Bindung von C1q an den Biosensor in der Assoziationsphase für rekombinantes ApoE3 höher war als für ApoE4, ApoE3 aus dem Serum und ApoE2 (Abb. 12). Der höhere Wert für die Dissoziationskonstante von ApoE3 korreliert dabei mit der stärkeren Bindung von C1q an ApoE3 in der Assoziationsphase und könnte den erhöhten k_d -Wert trotz ähnlicher K_D - und k_a -Werte der einzelnen ApoE-C1q-Komplexe erklären.

ApoE bindet den C1 Komplex über die Interaktion mit C1q. Diese Bindung ist spezifisch, da ApoE nicht an MBL bindet und C1q nicht mit ApoA interagiert. Alle ApoE Isoformen binden C1q mit einer ähnlich starken Bindungsaffinität.

Tab. 2: Bindungscharakteristika der Interaktion von C1q mit ApoE Formen. C1q bindet mit sehr hoher Affinität an alle getesteten ApoE Formen. K_D = Affinitätskonstante, k_a = Assoziationskonstante, k_d = Dissoziationskonstante

Interaktion von C1q mit	K_D (nM)	k_a (1/s)	k_d (1/Ms)
ApoE2	$0,27 \pm 0,04$	$11,4 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{-4}$
ApoE3	$0,58 \pm 0,02$	$9,0 \times 10^5$	$5,2 \times 10^{-4}$
ApoE4	$0,2 \pm 0,01$	$10,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^{-4}$
ApoE3 aus Serum	0,14	$6,4 \times 10^5$	$0,9 \times 10^{-4}$
C1s	2,32	$9,9 \times 10^5$	$23,0 \times 10^{-4}$

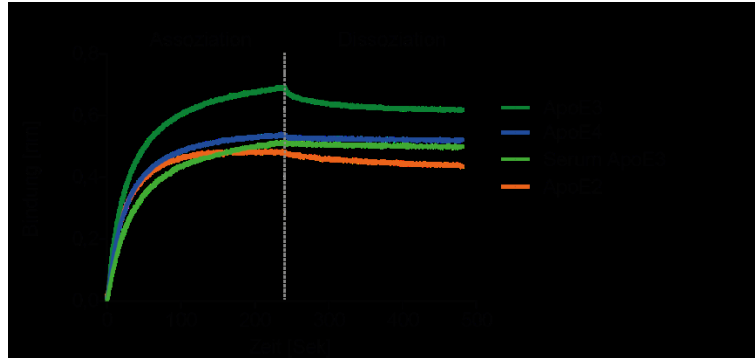


Abb. 12: Interaktionsprofil der ApoE Formen mit C1q. Alle ApoE Isoformen interagieren mit C1q in Echtzeit und bilden stabile Komplexe. Biotinylierte ApoE Formen (20 µg), rekombinantes ApoE2, ApoE3, und ApoE4 sowie aus dem Serum aufgereinigtes ApoE3, wurden an Streptavidin-Biosensoren gekoppelt und die Bindung von 45 nM C1q mittels Schicht-Interferenz-Technologie untersucht.

Sowohl ApoE, als auch C1q, interagieren mit modifizierten Lipiden. ApoE in der Rolle als Lipidtransporter [100] und C1q als Aktivator des Komplementsystems [44]. Durch die Inkubation von mLDL mit Fluoreszenz-markiertem ApoE4 (Alexa Fluor®647) und Fluoreszenz-markiertem C1q (Alexa Fluor®488) konnte die Interaktion im LSM sichtbar gemacht werden. Sowohl ApoE, als auch C1q, interagierten mit mLDL (Abb. 13).

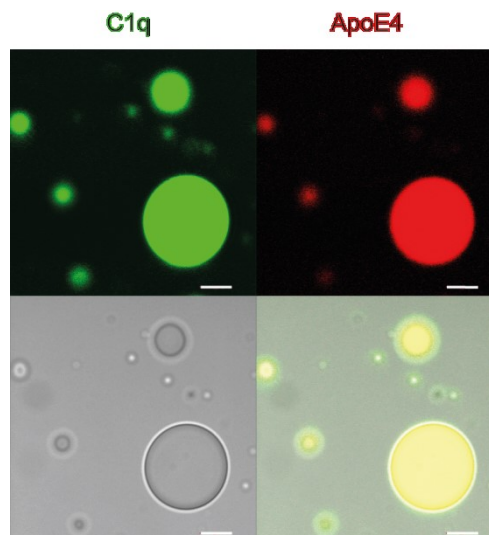


Abb. 13: Bindung von ApoE und C1q an mLDL. ApoE und C1q binden an Malondialdehyd-modifizierte Lipide niedriger Dichte (mLDL). Die Bindung von Fluoreszenz-markiertem ApoE4 (rot) und C1q (grün) an mLDL wurde mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops visualisiert. Sowohl ApoE als auch C1q bindet flächendeckend an den mLDL-Tropfen. Die untere linke Aufnahme zeigt die Durchlichtaufnahme und die untere rechte Aufnahme die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen (obere Aufnahmen) mit dem Durchlicht. Maßstabsleiste entspricht 10 µm.

3.6 Calciumabhängigkeit der Bindung zwischen ApoE und C1q

Die Bildung des C1 Komplexes und somit die Aktivierung des KW ist Calcium-abhängig [99]. Calcium wird für eine stabile Formation des C1 Komplexes benötigt. Alle bisher durchgeführten Experimente zur Analyse der Rolle von ApoE im KW des Komplementsystems wurden in Calcium-haltigen Puffer durchgeführt. Um festzustellen, ob ApoE in Abwesenheit von Calcium weiterhin in der Lage ist mit C1q zu interagieren, wurde die Bindung von ApoE an C1q in Puffer mit und ohne Calcium mittels ELISA verglichen. C1q in Puffer ohne Calcium zeigte eine signifikant schwächere Bindung an immobilisierte ApoE Isoformen als in Puffer mit Calcium (Abb. 14A). Ebenso wurde die Interaktion von ApoE mit C1q bestimmt, wenn der Calciumgehalt durch die Zugabe des Chelators EGTA reduziert wurde. Die Zugabe von EGTA verringerte die ApoE-C1q Interaktion signifikant und dosisabhängig (Abb. 14B). Die Interaktion zwischen ApoE und C1q findet somit nur unter Komplement-aktivierenden Bedingungen des KW statt.

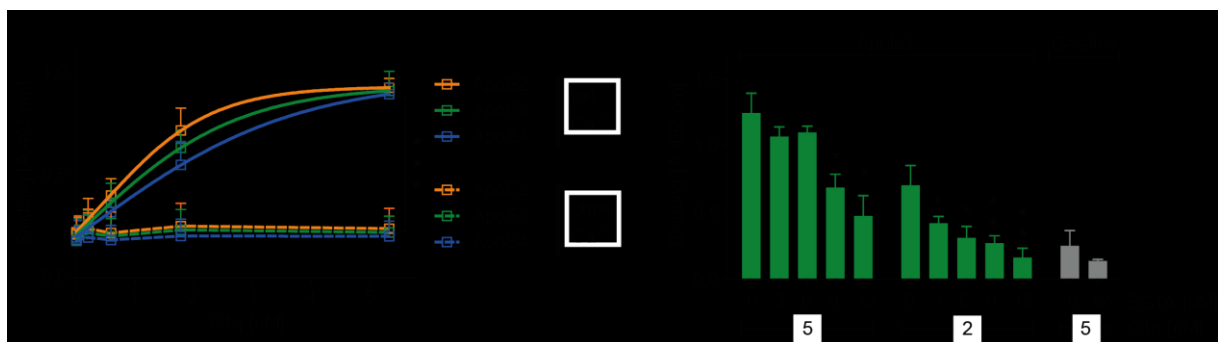


Abb. 14: Einfluss von Calcium auf die ApoE-C1q-Bindung. ApoE bindet Calcium-abhängig C1q. **(A)** Immobilisierte ApoE Isoformen wurden mit C1q in Puffer mit und ohne Calcium inkubiert und die C1q Bindung mittels ELISA gemessen. Die Bindung von C1q zu ApoE war nahezu verloren, wenn Puffer ohne Calcium verwendet wurde. **(B)** Die Bindung von immobilisiertem ApoE3 zu C1q war reduziert, wenn der Calciumchelator Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) im ELISA verwendet wurde. Die Daten in A und B repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.7 Charakterisierung der Bindestelle von ApoE an C1q

3.7.1 Position der C1q-Bindungsstelle an ApoE

Um festzustellen, wo im ApoE Molekül C1q bindet, wurden vier zufällig ausgewählte Peptide (Abb. 15A) hergestellt und zunächst die Bindung zu C1q im ELISA untersucht. Lediglich ApoE 139-152 zeigte eine vergleichbare Bindung mit den ApoE Vollängenproteinen an C1q (Abb. 15B). Die ApoE Peptide 30-40, 74-85 sowie 210-232 zeigten keine Bindung zu C1q im Vergleich zur Kontrolle mit Gelatine. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde getestet, ob ApoE 139-152 mit dem ApoE Vollängenprotein um die Bindung an C1q konkurriert. Dazu

wurde C1q zusammen mit aufsteigenden Mengen an ApoE 139-152 oder ApoE 30-40 auf immobilisiertem ApoE3 inkubiert und die Bindung von C1q an das Volllängenprotein mittels ELISA bestimmt (Abb. 15C). Die Zugabe von 100 nM ApoE 139-152 führte zu einer Reduktion der Bindung von C1q zu ApoE3 um ca. 45 %. Im Gegensatz dazu hatte ApoE 30-40, welches im ELISA keine Bindung zu C1q aufwies, keinen Effekt auf die Interaktion von C1q zum Volllängenprotein ApoE3. Des Weiteren wurde die Interaktion von ApoE 139-152 mit C1q im Hämolyseassay getestet. Dazu wurden alle vier Peptide mit ApoE4 und NHS inkubiert und die Aktivität des KW durch die Lyse von Schafserythrozyten gemessen. Auch in diesem Experiment war lediglich das ApoE Peptid 139-152 in der Lage die inhibitorische Funktion des ApoE4 Volllängenproteins zu reduzieren (Abb. 15D). ApoE 30-40, 74-85 sowie 210-232 zeigten keinen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt von ApoE4 auf den KW. Die Aminosäureposition 139-152 beinhaltet somit die Bindestelle von ApoE für C1q.

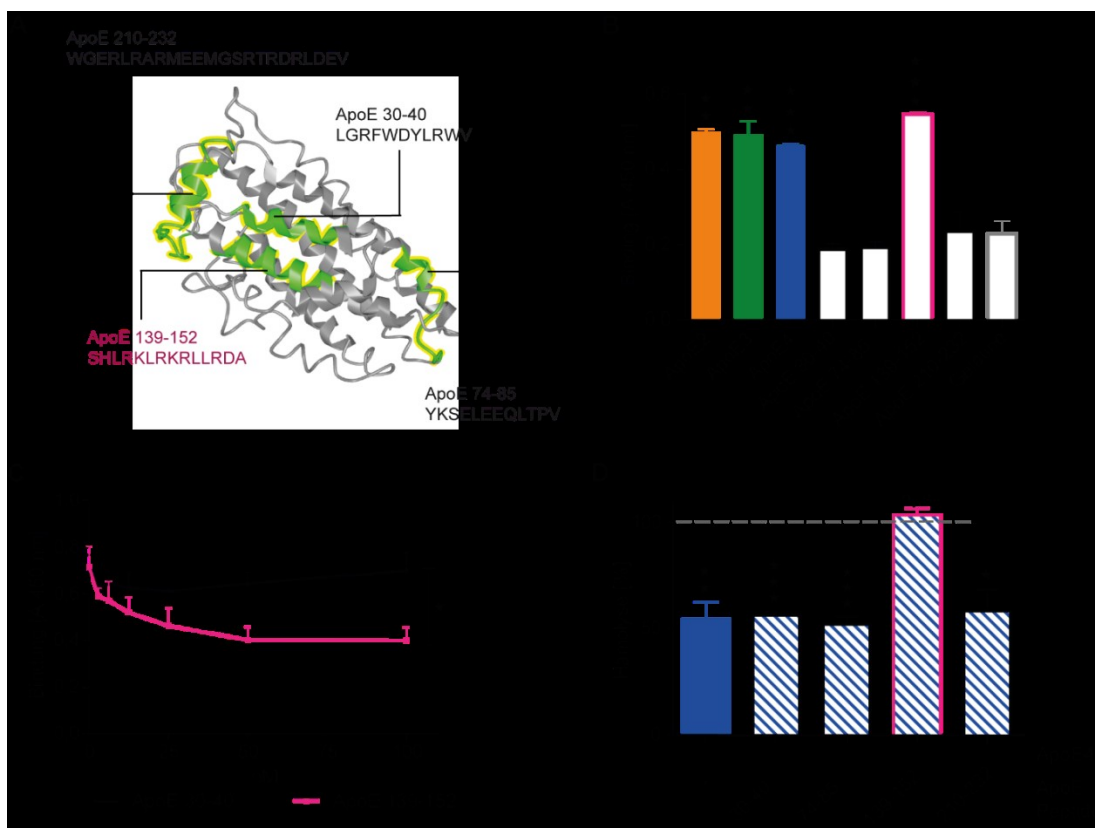


Abb. 15: Charakterisierung der C1q-Bindestelle an ApoE. C1q bindet an ApoE 139-152. **(A)** Schematische Darstellung der generierten ApoE Peptide (grün mit gelber Umrandung) im ApoE Volllängenmolekül sowie deren Aminosäuresequenzen. ApoE wurde mit Hilfe von CN3D in NCBI moduliert. **(B)** Rekombinante ApoE Volllängenproteine sowie die vier ApoE Peptide wurden immobilisiert und die Bindung von C1q im ELISA gemessen. C1q zeigte ähnliche Bindung zu ApoE 139-152, wie zu den Volllängenproteinen, wohingegen die anderen drei Peptide keine Bindung aufwiesen. **(C)** ApoE 139-152 konkurriert mit dem ApoE Volllängenprotein um die Bindung an C1q. C1q wurde zusammen mit aufsteigenden Konzentrationen an ApoE 139-152 und ApoE 30-40 zu immobilisiertem ApoE3 gegeben und die C1q Bindung mittels ELISA bestimmt. Steigende Konzentrationen von ApoE 139-152 reduzierten die Bindung von C1q an ApoE3. Die Zugabe von ApoE 30-40 zeigte keinen Effekt auf die Interaktion von C1q mit ApoE3. **(D)** ApoE 139-152 konkurriert mit ApoE4 und blockiert damit dessen

regulatorische Funktion. ApoE4 und NHS in Kombination mit jeweils einem der vier ApoE Peptide wurde mit Schaferythrozyten inkubiert und die Lyse der Erythrozyten durch die kolorimetrische Messung des freigesetzten Hämoglobins bei 414 nm gemessen. Die Zugabe von ApoE 139-152 führte zur vollständigen Lyse der Erythrozyten. Die Hämolyse durch NHS ohne Zugabe von ApoE wurde 100 % gesetzt. Die Daten zur Bindung von C1q an verschiedenen ApoE Peptide (A und C) sowie zur Komplementaktivierung (D) repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Die Bindestelle für den LDL-R befindet sich innerhalb der Aminosäureposition 136-150 und überlagert sich mit der gefundenen Bindestelle für C1q. Es ist somit fraglich, ob ApoE gleichzeitig an seinen Rezeptor und an C1q binden kann. Um dies zu untersuchen und die Bindestelle nochmals zu verifizieren, wurden Wettbewerbsversuche durchgeführt. Dazu wurde die Bindung von ApoE an den LDL-R in An- und Abwesenheit von C1q untersucht. Mikrogliazellen gelten als LDL-R präsentierende Zellen [101, 102]. Um dies für die verwendete Zelllinie zu bestätigen, wurde die Bindung von Fluoreszenz-gekoppeltem ApoE (Alexa Fluor®647) an Mikrogliazellen mittels Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. ApoE zeigte Interaktion mit den Mikrogliazellen, welche mit Hilfe von Texas Red®-X angefärbt werden konnten (Abb. 16A). Um die Bindung von ApoE an den LDL-R in Anwesenheit von C1q zu untersuchen, wurden LDL-R präsentierende Mikrogliazellen mit NHS sowie Fluoreszenz-markiertem ApoE3 mit und ohne C1q inkubiert und die ApoE Bindung an die Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. NHS wurde verwendet um die Bindung von ApoE an den LDL-R zu erhöhen, da ApoE in Verbindung mit Lipiden, die in diesem Falle aus dem NHS stammen, besser an seinen Rezeptor bindet [103]. Die Zugabe von C1q führte zu einer nur leicht reduzierten Interaktion von ApoE mit den Mikrogliazellen über den LDL-R (Abb. 16B). Ein ELISA Versuch mit ApoE 139-152 zeigte ähnliche Ergebnisse. Hierfür wurden ApoE 30-40 und ApoE 139-152 immobilisiert und die C1q Bindung in An- und Abwesenheit des LDL-R gemessen. Die Zugabe des LDL-R beeinflusste die C1q Bindung an ApoE 139-152 leicht (Abb. 16C), was die räumliche Nähe von C1q und der LDL-R Bindestelle aufzeigt.

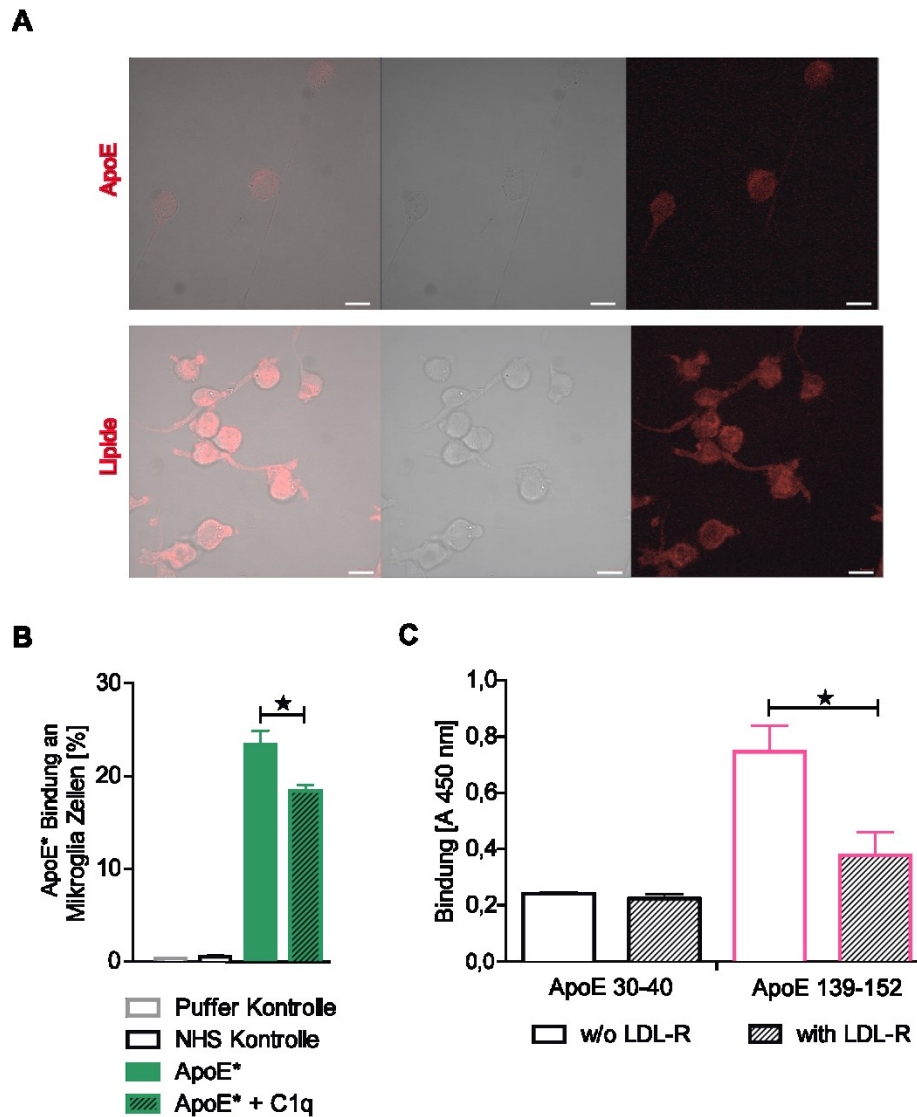


Abb. 16: Bindung von ApoE an C1q und den LDL-R. C1q konkurriert leicht mit dem Rezeptor für Lipide niedriger Dichte (LDL-R) um die Bindung an ApoE. **(A)** Die Bindung von Alexa Fluor®647 Fluorochrom-gekoppeltem ApoE3 (obere Reihe) an Mikrogliazellen wurde mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops untersucht. ApoE bindet an Mikrogliazellen, welche mittels Texas Red®-X visualisiert werden konnten (untere Reihe). **(B)** Mittels Durchflusszytometrie wurde der Einfluss von C1q auf die Bindung von ApoE3 an die Mikrogliazellen gemessen. Die Interaktion von ApoE mit den Zellen wurde durch die Zugabe von C1q reduziert. LDL-R-präsentierende Mikrogliazellen wurden mit Serum, als Quelle für Lipide, und Fluoreszenzmarkiertem ApoE3* in An- und Abwesenheit von C1q inkubiert und im Durchflusszytometer vermessen. **(C)** Die Bindung von C1q mit und ohne Zugabe des LDL-R an immobilisiertes ApoE 139-152 wurde mittels ELISA gemessen. In Anwesenheit des LDL-R war die Bindung von ApoE 139-152 an C1q leicht reduziert. ApoE 30-40 zeigte keine Bindung zu C1q und diente als Kontrolle. Die mittleren Aufnahmen in A zeigen die Durchlichtaufnahme und die linken Aufnahmen die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit dem Durchlicht. Maßstabsleiste entspricht 20 µm. Die Daten zur Konkurrenz von C1q und des LDL-R an ApoE (A + B) repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. *p < 0,05

3.7.2 Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen ApoE und C1q

Proteininteraktionen sind auf nichtkovalente Wechselwirkungen zurückzuführen. Zu den nichtkovalenten Bindungsarten gehören die elektrostatischen bzw. ionischen Bindungen (Salzbrücken), Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kräfte. Eine weitere Bindungsart zwischen Proteinen ist die hydrophobe Wechselwirkung. Um die Interaktion

zwischen ApoE und C1q zu charakterisieren, wurden Bindungsstudien mit SDS und Natriumchlorid durchgeführt. SDS ist ein anionisches Detergens, welches zur Denaturierung von Proteinen verwendet wird. Dabei schichtet es sich mizellenartig an Proteine, zerstört dabei nichtkovalente Bindungen und bildet SDS-Protein-Komplexe aus. Die Zugabe von 1 % SDS verringerte die Bindung von immobilisiertem ApoE3 an C1q um etwa 50 % (Abb. 17). Im Gegensatz dazu zeigte SDS keinen Effekt auf die Interaktion von ApoE mit dessen Rezeptor (LDL-R). Der Bindung von ApoE zum LDL-R liegt eine ionische Wechselwirkung und die Ausbildung von Salzbrücken zu Grunde [104]. Aus diesem Grund war die Interaktion von ApoE und dem LDL-R nach Zugabe von 0,5 M Natriumchlorid, welches Salzbrücken zerstört, um ca. 75 % reduziert (Abb. 17). Im Gegensatz dazu hatte Natriumchlorid keine signifikanten Auswirkungen auf die Bindung von ApoE an C1q. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion von ApoE und C1q nicht über ionische Wechselwirkungen stattfindet.

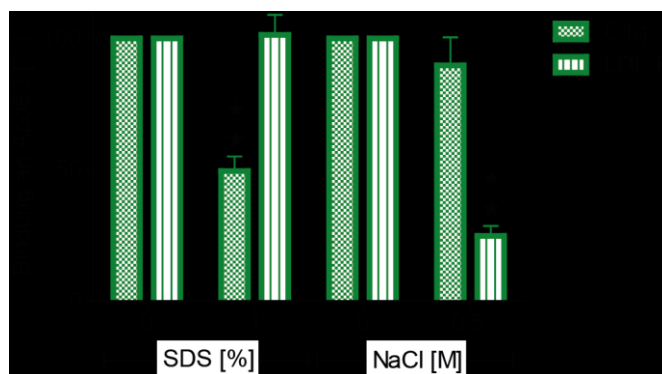


Abb. 17: Charakterisierung der Bindungsart zwischen ApoE und C1q. ApoE bindet C1q nicht über ionische Wechselwirkung. Die Bindung von immobilisiertem ApoE3 zu C1q ist durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS), welches in der Lage ist nichtkovalente Bindungen zu zerstören, im ELISA reduziert. Im Gegensatz dazu hat SDS keinen Effekt auf die Bindung des Rezeptors an Lipide niedriger Dichte (LDL-R) mit immobilisiertem ApoE3. Die Zugabe von Natriumchlorid (NaCl) zum Puffer hatte keinen Effekt auf die Interaktion von ApoE mit C1q, reduzierte jedoch die Bindung von ApoE zum LDL-R. Die Daten zur Wechselwirkung zwischen ApoE und C1q repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten. ****p < 0,01**

3.7.3 Bestimmung der Bindungsaffinität von ApoE 139-152 zu C1q

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität von C1q und dem Peptid ApoE 139-152, welches die Bindestelle für C1q aufweist, wurde die Interaktion in Flüssigkeit in Echtzeit, mittels MST, gemessen. Dafür wurden ApoE 139-152 und ApoE 30-40 mit Alexa[®]647 Fluoreszenz-markiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an C1q inkubiert. Zunächst wurde getestet, ob die verwendeten Kapillaren für die zu überprüfenden Moleküle geeignet waren. Der Aggregationstest zeigte keine Unregelmäßigkeiten in der Form der Fluoreszenzkurven (Abb. 18A), wie etwa Doppelpeaks oder wellige Kurven. Es konnte daher davon ausgegangen

werden, dass die ApoE Peptide nicht an die Kapillarwand gebunden haben, was die weitere Verwendung der genutzten Standardkapillaren ermöglichte. Pro Versuchsdurchlauf wurden 16 Kapillaren mit einer konstanten Konzentration an Fluoreszenz-markiertem ApoE Peptid und aufsteigenden Konzentrationen an C1q beladen. Auf Grund der konstanten Konzentration an ApoE 139-152 bzw. ApoE 30-40 sollte das Fluoreszenzsignal in jeder Kapillare gleich hoch sein. Dies war jedoch nicht der Fall (Abb. 18B). Das Fluoreszenzsignal nahm dosisabhängig mit sinkender C1q Konzentration ab. Um festzustellen, ob der Fluoreszenzwechsel zufällig oder Liganden-abhängig zustande kam, wurde ein sogenannter SD-Test durchgeführt. Dazu wurden die drei Proben mit der höchsten (1196 nM, 589 nM und 299 nM) bzw. der niedrigsten (0,146 nM, 0,07 nM und 0,04 nM) C1q Konzentration bei 95 °C und der Zugabe von SDS denaturiert und erneut das Fluoreszenzsignal gemessen. In allen sechs Proben wurde ein sehr ähnliches Fluoreszenzsignal bestimmt (Abb. 18C). Dies ließ darauf schließen, dass der ermittelte Fluoreszenzwechsel durch ein Bindungsereignis hervorgerufen wurde. Aus diesem Grund konnte die Affinität direkt über die Änderung der Fluoreszenzintensität ohne Laser-induzierte Thermophorese analysiert werden (Abb. 18D). Der gemessene K_D der Bindung von ApoE 139-152 an C1q beträgt $0,47 \pm 0,63$ nM und liegt somit in einem ähnlichen Bereich wie der für die Vollängenproteine (ca. 0,35 nM). Im Gegensatz dazu konnte in einer gleichen Analyse für ApoE 30-40 kein K_D gemessen werden.

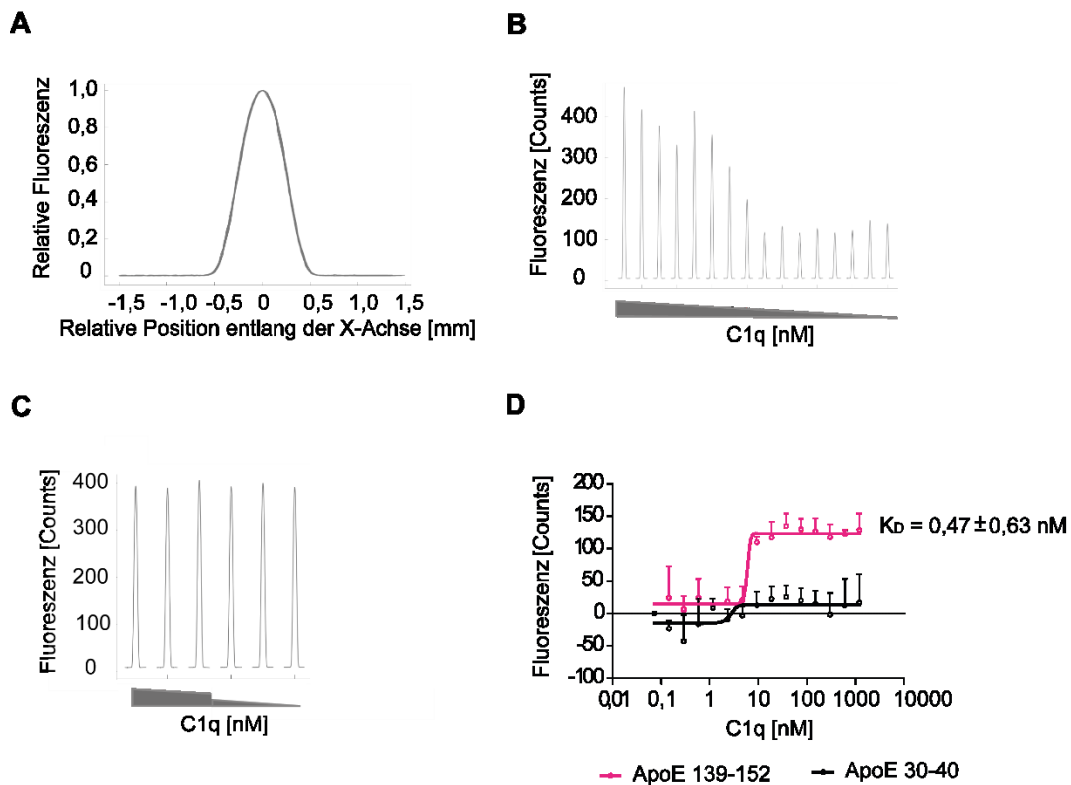


Abb. 18: Bestimmung der Affinität zwischen ApoE 139-152 und C1q. ApoE 139-152 bindet mit einer vergleichbar hohen Affinität an C1q ähnlich der ApoE Vollständigproteine. Die Affinität wurde mittels Fluoreszenzwechsel bestimmt. ApoE 139-152 und ApoE 30-40 wurden mit Alexa[®]647 Fluoreszenz-markiert, mit C1q inkubiert und die Fluoreszenz gemessen. **(A)** Der Aggregationstest zeigte keine Unregelmäßigkeiten der Fluoreszenz-Signale (Signale aller 16 Messkapillaren normalisiert und übereinandergelegt). Es konnte somit eine Interaktion der Fluoreszenz-markierten Peptide mit den Kapillaren ausgeschlossen werden. **(B)** Der Fluoreszenztest der Messkapillaren zeigte eine dosisabhängige Verringerung der Fluoreszenz mit abnehmender C1q Konzentration (1196 nM – 0,04 nM), was auf einen Liganden-abhängigen Fluoreszenzwechsel schließen ließ. **(C)** Der SD-Test weist keine Fluoreszenzänderung der Proben mit der höchsten und der Proben mit der niedrigsten C1q Konzentration auf. Aus diesem Grund ist eine K_D -Bestimmung mittels initialer Fluoreszenzanalyse v2.0.2 möglich. **(D)** C1q bindet mit einem K_D von $0,47 \pm 0,63 \text{ nM}$ an ApoE 139-152, wohingegen für die Bindung an ApoE 30-40 kein K_D bestimmt werden konnte. Die Daten in A - C zeigen die Vorversuche mit ApoE 139-152. Die Daten in D zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

3.8 Charakterisierung der ApoE-Bindestelle an C1q

C1q ist ein Makromolekül bestehend aus sechs identischen Untereinheiten. Jede Untereinheit setzt sich dabei aus drei Ketten, A, B und C, zusammen. C-terminal bildet jede der sechs Untereinheiten eine kugelförmige, globuläre Domäne. N-terminal polymerisieren die Untereinheiten und kommen zu einem Strang zusammen. Zwischen dem Strang und den sechs globulären Einheiten befindet sich je eine flexible, Collagen-reiche, Region. Die Struktur des C1q Moleküls ähnelt dabei einem Tulpenstrauß, wobei die globulären Domänen die Blüten und der N-terminal gelegene Strang den Stiel darstellen (Abb. 19 rechtes Bild obere Reihe). Zur Feststellung der Binderegion von ApoE im C1q Molekül, wurde die Interaktion von Gold-markiertem, aus dem Plasma aufgereinigtem, ApoE3 und mit Gold-markiertem ApoE 139-152 zu C1q im Elektronenmikroskop untersucht. Sowohl das ApoE

Volllängenprotein, als auch das Peptid, zeigten eine Bindung an den Stiel des C1q Moleküls (Abb. 19 Reihe 2 und 3). ApoE zeigte keine Interaktion mit der globuläre Domäne von C1q, welche für die Bindung an die Aktivatoroberfläche verantwortlich ist.

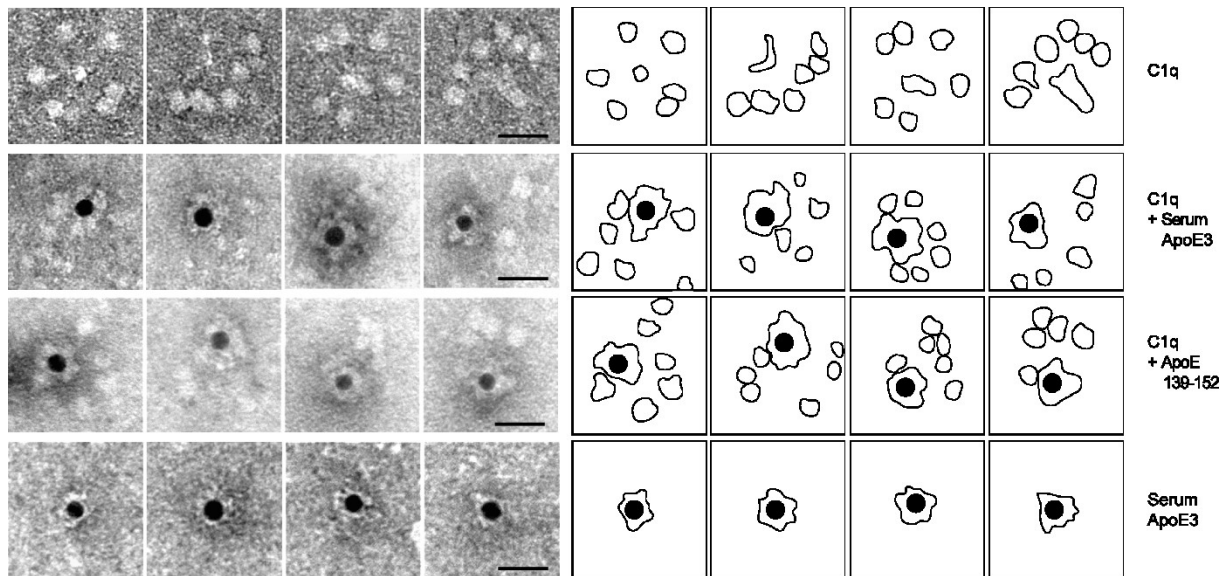


Abb. 19: Charakterisierung der Bindestelle von ApoE an C1q. ApoE bindet am N-terminalen Bereich des C1q Moleküls. C1q allein (obere Reihe) sowie C1q in Kombination mit Gold-markiertem, aus dem Plasma aufgereinigtem ApoE3 (zweite Reihe) und Gold-markiertem ApoE 139-152 (dritte Reihe) wurden mittels Elektronenmikroskopie visualisiert. Reihe vier zeigt Gold-markiertes, aus dem Plasma aufgereinigtes ApoE3 allein. Maßstabsleiste entspricht 20 nm. Abb. wurde generiert mit freundlicher Hilfe von PD Dr. Martin Westermann.

Am Strang, bevor es zur Multimerisierung des Stiels kommt, befindet sich eine Collagen-ähnliche Struktur. Sie beinhaltet die Bindestelle des Proteasentetramers C1s₂C1r₂ [105, 106]. Um festzustellen, ob ApoE mit C1s₂C1r₂ um die Bindestelle an C1q konkurriert und dadurch den KW des Komplementsystems inhibiert, wurde C1q zusammen mit aufsteigenden Mengen an C1s₂C1r₂ in ApoE3 immobilisierten Wells inkubiert und die C1q Bindung an ApoE gemessen. Die Zugabe von C1s₂C1r₂ hatte keinen Einfluss auf die Interaktion von ApoE mit C1q (Abb. 20), was darauf schließen lässt, dass das C1s₂C1r₂ Tetramer und ApoE nicht an dieselbe Bindestelle im C1q Molekül binden. Die Inhibition des KW kommt somit nicht durch eine Verdrängung von C1s₂C1r₂ durch ApoE zustande.

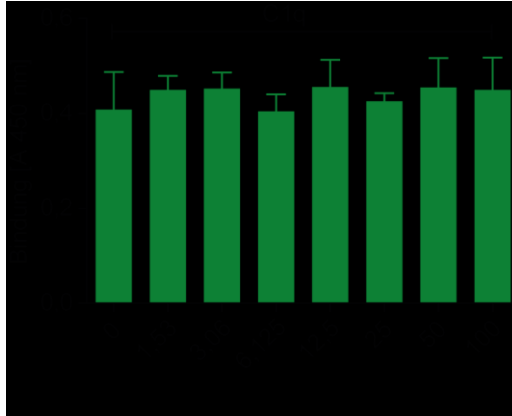


Abb. 20: Bindung von ApoE und C1s₂C1r₂ an C1q. ApoE konkurriert nicht mit dem C1s₂C1r₂ Tetramer um die Bindung an C1q. C1q Bindung an immobilisiertes ApoE3 in Kombination mit aufsteigenden Mengen an C1s₂C1r₂ wurde mittels ELISA gemessen. Die Zugabe von C1s₂C1r₂ hatte keinen Effekt auf die Bindung von ApoE3 zu C1q. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt erstmalig eine neue Funktion von ApoE. ApoE reguliert spezifisch den KW des Komplementsystems, wobei alle drei ApoE Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4, ähnlich stark inhibieren. ApoE bindet Calcium-abhängig und mit hoher Affinität an C1q ($K_D < 1 \text{ nM}$) und blockiert die initiale Phase der Komplementkaskade. ApoE besitzt somit eine Doppelfunktion als Lipidtransportmolekül und Komplementregulator. Diese Funktion ist von besonderer Relevanz, da z. B. Träger der ApoE4 Variante ein deutlich erhöhtes Risiko besitzen an Arteriosklerose oder frühzeitig an Morbus Alzheimer zu erkranken [26, 27, 30]. Bei beiden Krankheiten sowie einer Vielzahl anderer ApoE-assoziiierter Erkrankungen ist der Pathomechanismus noch ungeklärt.

ApoE ist ein seit über 40 Jahren bekanntes Protein des Lipidmetabolismus. Es bindet Lipidkomplexe und trägt dazu bei diese aus dem Plasma zu entfernen. Dabei koppelt ApoE an LDL-R-präsentierende Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Lymphoblasten, welche daraufhin die Lipidkomplexe aufnehmen und abbauen bzw. verwerten [1]. Ein Polymorphismus im humanen *APOE* Gen führt zu drei Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4, welche sich jeweils nur in einer Aminosäure an Position 112 oder 158 unterscheiden. Die Isoformen besitzen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu deren Liganden sowie deren Rezeptor [5, 7, 8].

In einer 1993 durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass das Vorhandensein eines *ApoE4* Allels spät auftretenden Alzheimer um fünf Jahre nach vorne verschiebt, das Vorhandensein von zwei *ApoE4* Allelen sogar um zehn Jahre. Im Gegensatz dazu wirkt sich der Besitz eines *ApoE2* Allels protektiv auf das Auftreten von Alzheimer aus und die Risikokurve an spät auftretendem Alzheimer zu erkranken verschiebt sich um fünf Jahre nach hinten [107]. ApoE Isoformen spielen außerdem eine Rolle bei der Entwicklung von AMD. In diesem Fall führt jedoch das Vorhandensein von *ApoE2* Allelen zu einem leicht erhöhten Risiko an AMD zu erkranken, wohingegen das Vorkommen von ApoE4 eher vor dem Auftreten der Krankheit schützt [108, 109]. Allen ApoE-assoziierten Erkrankungen ist gemein, dass es zu einer lokalen Ablagerung von Lipiden, A β und Zelltrümmern kommt. Diese Ablagerungen sind Aktivatoroberflächen für das Komplementsystem und Ausgangspunkt chronischer Inflammation. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und inwieweit ApoE am Prozess der Komplementaktivierung beteiligt ist.

4.1 ApoE inhibiert den klassischen Weg des Komplementsystems

In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass ApoE ein Komplementinhibitor ist. Das Komplementsystem ist eine kaskadenartig aufgebaute Proteinreaktion zur Abwehr mikrobieller Erreger und zur Beseitigung toter oder modifizierter Körperzellen und -bestandteile. Dabei wirkt ApoE ausschließlich auf den KW, jedoch nicht auf den AW oder den LW. Verschiedene Experimente, wie ein Hämolyseassay und ein *E. coli* Überlebensassay, belegen dies.

Um den eigenen Körper vor einer Überaktivierung des Komplementsystems zu schützen und eine inflammatorische Reaktion lokal zu halten besitzt der Körper humorale Regulatoren, welche das Komplementsystem inhibieren und dessen Aktivierung regulieren. Hierzu zählen u. a. für die frühe Phase des KW der C1 INH sowie auf Ebene der C3 Konvertase Faktor I und C4BP und für den TCC Vnt [54, 72]. Wichtig ist, dass diese Regulatoren zwischen Selbst- und Fremdoberflächen unterscheiden können. Eine Inhibition des Komplementsystems ist dabei auf Selbstoberflächen, nicht aber auf mikrobiellen Oberflächen, erwünscht. Wie zerstörend das Komplementsystem sein kann, wird am Beispiel der hyperakuten Abstoßung bei Transplantationen deutlich. Hierbei reagiert das Komplementsystem gegen bestimmte Antigene (vor allem Blutgruppenmerkmale und HLA-Klasse-I-Antigene) des Organspenders, die als fremd erkannt werden. Diese Reaktion tritt innerhalb eines Tages, oft auch schon innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Transplantation, auf und führt zur kompletten Zerstörung des Organs. Sie kann eine großflächige Gerinnungsreaktion nach sich ziehen, welche im schlimmsten Fall zu lebensbedrohlichen Problemen führt [110].

4.2 ApoE inhibiert die Initiation des klassischen Komplementweges

ApoE inhibiert den durch Antigen-Antikörper-Komplexe aktivierten KW sowohl auf Ebene des TCC, als auch auf Ebene der C4b Deposition, wie Aktivitätsassays zeigen. Alle drei ApoE Isoformen inhibieren dabei ähnlich stark. Im Verlauf von ApoE-assoziierten Erkrankungen, wie AMD, Alzheimer und Arteriosklerose, wird der KW des Komplementsystems vermutlich durch modifizierte, körpereigene Oberflächen, wie deponierte Zelltrümmer, modifizierte Lipide (mLDL) und A β Plaques, induziert [45-47]. Wenn der KW *in vitro* über mLDL aktiviert wird, zeigen die ApoE Isoformen eine deutliche Inhibition der C4b Deposition.

Da ApoE sowohl die Ablagerung des TCC sowie die Ablagerung von C4b auf der Oberfläche verringert, wurde geschlussfolgert, dass ApoE die Komplementaktivierung nach der Assemblierung der C3 Konvertase hemmt. Um die C3 Konvertase, C4b2a, des KW zu generieren, müssen sowohl C2, als auch C4, zunächst durch die aktivierte Serinprotease C1s geschnitten werden. ApoE zeigt weder direkte Inhibition von C1s, noch ist ApoE in der Lage C2 oder C4 zu schneiden und zu inaktivieren. Ein bekannter Regulator auf Ebene der C3 Konvertase ist Faktor I. Er spaltet mit Hilfe von C4BP, welches die C3 Konvertase bindet und C4b für Faktor I zugänglich macht, C4b in C4c und C4d [65, 95, 96, 111]. Da ApoE keine C4b Spaltungsaktivität aufweist und auch keine Kofaktoraktivität für Faktor I zeigt, wird angenommen, dass ApoE einen anderen Wirkungsmechanismus als Faktor I und C4BP besitzt.

Die bislang einzigen bekannten Regulatoren der initialen Phase des KW sind der C1 INH und Calreticulin (CRT). Der C1 INH ist ein Serinproteaseinhibitor, welcher neben der Regulation des Komplementsystems auch ein Regulator der Kontaktaktivierung und der Koagulation ist [112]. Der C1 INH verhindert die Aktivierung des KW über die Interaktion mit dem C1 Komplex auf zwei unterschiedliche Weisen. Er bindet zum einen reversibel an C1s und C1r Proenzyme im C1 Komplex und verhindert somit deren Aktivierung [62]. Zum anderen interagiert der C1 INH mit bereits aktiviertem C1s und C1r. Der Regulator wirkt somit nachdem der C1 Komplex an eine Aktivatoroberfläche gebunden hat. Die Bindung des C1 INH mit den aktivierten Proteasen ist dabei irreversibel und hemmt deren Aktivität. Es kommt außerdem zur Spaltung des C1 Komplexes, wobei sich C1 INH-gebundenes C1s und C1r vom C1q Molekül lösen [63]. ApoE bindet ebenfalls wie der C1 INH an den C1 Komplex, nicht aber an C2 oder C4. Anders als der C1 INH geht ApoE jedoch mit dem C1q Molekül des C1 Komplexes eine Bindung ein, nicht aber mit C1s oder C1r. ApoE besitzt somit einen anderen Wirkungsmechanismus als der C1 INH. CRT beeinflusst, ebenso wie ApoE, den KW über die Interaktion mit C1q. CRT befindet sich hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum der meisten kernhaltigen Zellen, ist dadurch für C1q nicht direkt erreichbar. Unter bestimmten Bedingungen, wie Zellstress oder auch Zelltod, verursacht u. a. durch Inflammation, Arteriosklerose, Hitzeschock oder virale Infektion, wird CRT jedoch an die Zelloberfläche und in den extrazellulären Raum transloziert [113, 114]. Unter diesen Umständen kann CRT an C1q binden. Die Bindungsregion von CRT an C1q ist noch nicht vollständig geklärt. Sowohl die globuläre [115, 116], als auch die Collagen-ähnliche [117]

Domäne von C1q sind als Bindungsregion für CRT beschrieben. Auch eine Doppelbindung von CRT an beide Domänen, die globuläre und die Collagen-ähnlichen, von C1q wurde beobachtet [118]. Gebunden an die globuläre Domäne von C1q verhindert CRT die Interaktion von C1q mit Immunkomplexen und somit die Aktivierung des KW [115, 116]. Exprimiert auf der Zelloberfläche apoptotischer und nekrotischer Zellen wirkt CRT außerdem als C1q Rezeptor. CRT interagiert dabei mit der Collagen-ähnliche Domäne von C1q und vermittelt die Phagozytose der kranken oder toten Zellen [117, 119, 120]. Dies ist vor allem für eine antiinflammatorische Beseitigung apoptotischer Zellen und dem Schutz vor steriler Inflammation wichtig.

4.3 ApoE interagiert Calcium-abhängig mit C1q

Alle rekombinanten ApoE Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4 sowie das aus dem Plasma aufgereinigte ApoE3, binden C1q mit ähnlich starken Affinitäten zwischen 0,18 und 0,58 nM. Dies übersteigt die Bindungsaffinität von C1q für C1s, welche bei ca. 13,3 nM liegt [105] und zeigt die starke Bindung zwischen ApoE und C1q. Übereinstimmend mit diesen sehr ähnlichen Bindungsaffinitäten inhibieren auch alle drei Isoformen gleichermaßen den KW (siehe 4.1). Die hohe Bindungsstärke der Interaktion von ApoE mit C1q ist vergleichbar mit der Bindung von C1q an MASP-3, welche bei 1,35 nM liegt [105]. MASP-3 ist eine Serinprotease des LW und Ligand des Initiator-moleküls MBL. C1q und MBL sind sich strukturell sehr ähnlich [97-99], was auch die Bindung von MASP-3 an C1q erklärt [121]. Im Gegensatz dazu interagiert ApoE sehr spezifisch mit C1q, nicht aber mit MBL. Dies verdeutlicht die Spezifität von ApoE für C1q und den Effekt auf den KW, nicht aber den LW.

C1q ist ein 460 kDa großes Makromolekül bestehend aus sechs Ketten. N-terminal verbinden sich die Ketten zu einem gemeinsamen Strang, C-terminal stehen die Ketten auseinander. Am Ende des C-Terminus jeder Kette befindet sich eine globuläre Domäne, die dem Molekül die Form eines Tulpenstraußes verleiht. Als initiales Molekül des KW erkennt C1q mit seinen globulären Domänen Aktivatoroberflächen wie Antigen-Antikörper-Komplexe, A β , apoptotische Zellen und Lipide [45, 46]. Zwischen der globulären Domäne und dem „Stiel“, indem die sechs Ketten zusammenlaufen, befindet sich eine Collagen-ähnliche Domäne, die für die Interaktion mit dem C1s₂C1r₂-Tetramer verantwortlich ist.

Die Bildung eines stabilen C1 Komplexes durch die Bindung eines C1s₂C1r₂-Tetramers an C1q erfordert das Vorhandensein von Calcium [99]. Gleichermäßen bindet ApoE nur in

Anwesenheit von Calcium C1q. Daraus resultiert, dass ApoE unter ähnlichen Bedingungen wie C1s und C1r an C1q bindet.

4.4 ApoE interagiert in der Nähe seiner LDL-R Bindestelle mit C1q

Mittels ELISA, initialer Fluoreszenzanalyse und dem Hämolyseassay ist die Bindestelle von C1q im ApoE Molekül im N-terminalen Bereich 139-152 lokalisiert worden. Dieser Bereich überlappt mit der Bindestelle für den LDL-R (136-150) [8].

Mit der durchgeführten Bindungsstudie ist gezeigt worden, dass ApoE über unterschiedliche Wechselwirkungen an C1q und an den LDL-R bindet. Der Bindung von ApoE und C1q liegt keine ionische Wechselwirkung, die u. a. für die Interaktion von ApoE mit dem LDL-R verantwortlich ist, zu Grunde. Eine andere, nichtkovalente Bindungsart (Wasserstoffbrückenbindung oder Van-der-Waals-Kräfte) oder hydrophobe Wechselwirkungen sind somit für die ApoE-C1q-Interaktion verantwortlich. Für die Bindung von ApoE an den LDL-R sind vor allem positiv geladene Aminosäuren im hydrophilen Bereich verantwortlich (Abb. 21B) [104]. Es ist somit wahrscheinlich, dass ApoE, anders als beim LDL-R, C1q mit der hydrophoben Domäne im Bereich der Aminosäuren 139-152 bindet. Die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen zwischen ApoE und C1q ist somit sehr wahrscheinlich.

Strukturell besitzt das 37 kDa große ApoE Molekül zwei Domänen, welche durch eine flexible Region miteinander verbunden sind. Die N-terminale Domäne (1-167) beinhaltet die LDL-R Bindestelle und die C-terminale Domäne (205-299) besitzt die Bindestelle für Lipide [79, 122]. Wettbewerbsversuche mittels Durchflusszytometrie und ELISA zeigen, dass C1q und der LDL-R um die Bindung an ApoE leicht konkurrieren. Das ApoE Peptid 139-152, was sowohl die Bindestelle für C1q und den LDL-R beinhaltet, ist ein amphipathisches Peptid mit einem hydrophoben und einem hydrophilen Bereich (Abb. 21A). Diese Struktur würde eine gleichzeitige Bindung von ApoE an C1q und LDL-R erlauben. Doch noch ist ungeklärt, ob ein ApoE Molekül gleichzeitig beide Funktionen, als Lipidtransportmolekül und als Komplementregulator, wahrnimmt. In diesem Falle könnte ein Lipidkomplex transportiert werden und wäre zeitgleich vor einer Komplementaktivierung geschützt. Die unterschiedlichen Bindungsarten von ApoE an C1q und den LDL-R sowie die lediglich leichte Konkurrenz zwischen C1q und dem LDL-R an ApoE zu binden, sprechen für eine parallele Ausübung der Doppelfunktion von ApoE.

Für die Bindung von ApoE und C1q hat der Aminosäureaustausch an Position 158 und somit die Interaktion von Arginin 150 und der Asparaginsäure 154 keinen Einfluss. Alle ApoE Isoformen inhibieren nahezu gleich stark den KW und binden mit vergleichbaren Affinitäten an C1q. Der Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein an Position 158, welcher charakteristisch für ApoE2 im Vergleich zu ApoE3 und ApoE4 ist, führt zu einem geänderten Bindungsverhalten der ApoE Isoformen zum LDL-R. So wurde gezeigt, dass ApoE2 50 bis 100fach schlechter an den LDL-R bindet als ApoE3 und ApoE4 [16]. Im Falle von ApoE2 interagiert das Arginin an Position 150 mit der Asparaginsäure an Position 154. Bei ApoE3 und ApoE4 bildet sich keine Interaktion von Arginin 150 mit einer anderen Aminosäure im ApoE Molekül aus. Demnach hat der Aminosäureaustausch an Position 150 einen Einfluss auf die Bindung von ApoE an den Rezeptor, aber nicht an das C1q Molekül. Daraus lässt sich wiederum schlussfolgern, dass die Isoformen einen Einfluss auf den Lipid-Transport haben, aber alle gleichermaßen Komplement inhibieren.

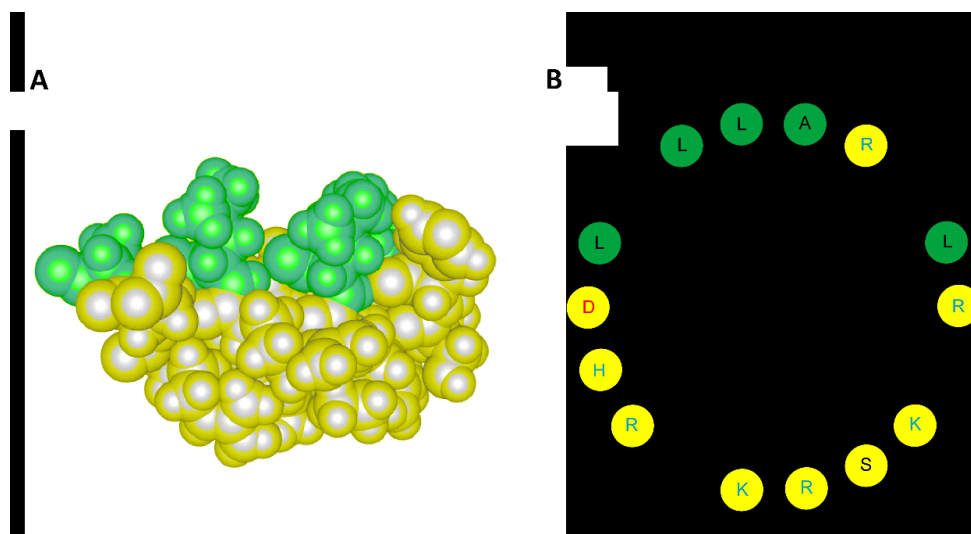


Abb. 21: ApoE 139-152 beinhaltet die Bindestelle für C1q und den LDL-R. (A) Räumliches Modell des ApoE Peptides 139-152. ApoE 139-152 besitzt eine amphipathische Struktur mit einer hydrophoben (grün) und einer hydrophilen Domäne (gelb). Die Struktur wurde mit Hilfe der iCn3D Software von NCBI und dem PDF File 2L7B modelliert. **(B)** Helixrad des ApoE Peptides 139-152. Positive Aminosäuren sind in Blau, negative in Rot, hydrophobe in Grün und hydrophile in Gelb gezeigt. Modifikation nach [http://www.bioinformatics.nl/cgi-77 bin/emboss/pepwheel](http://www.bioinformatics.nl/cgi-77/bin/emboss/pepwheel).

4.5 ApoE bindet an die Collagen-ähnliche Struktur des C1q Moleküls

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Plasma-aufgereinigtem ApoE sowie dem ApoE 139-152 Fragment mit C1q lokalisieren die Binderegion von ApoE im N-terminalen Bereich des C1q Moleküls, wohingegen eine Interaktion von ApoE mit der C-terminal gelegenen, globulären Domäne von C1q ausgeschlossen wird. Die globuläre Domäne des C1q Moleküls gilt als Erkennungsstruktur von Aktivatoroberflächen des KW. Aus diesem Grund wird diese

Domäne vor allem mit Molekülen die den KW aktivieren in Verbindung gebracht. Da ApoE einen inhibitorischen Effekt auf den KW besitzt, ist eine Interaktion von ApoE mit der globulären Domäne von C1q unwahrscheinlich.

ApoE konkurriert nicht mit dem C1s₂C1r₂-Tetramer um die Bindung an C1q und besitzt demnach eine andere Bindungsstelle im C1q Molekül. Dieses wird auch durch die Bindung von ApoE an den C1 Komplex bestätigt. Zwischen der globulären Domäne und der Position, an der sich die sechs Ketten des C1q Moleküls zu einem Strang verbinden, befindet sich eine Collagen-ähnliche Struktur, welche die Bindestelle für das C1s₂C1r₂-Tetramer beinhaltet [123, 124] (Abb. 22).

Den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nach, interagiert ein ApoE Molekül bzw. ein ApoE Peptide mit einem C1q Molekül. Da der Interaktion von ApoE mit C1q höchstwahrscheinlich eine hydrophobe Wechselwirkung zu Grunde liegt, befindet sich die Bindestelle von ApoE vermutlich in der Collagen-ähnlichen Domäne von C1q. Collagen-ähnliche Domänen zeichnen sich durch die immer wiederkehrende Aminosäuresequenz Gly-Xaa-Yaa aus (Abb. 22). Das hydrophobe Glycin ist dabei ein idealer Interaktionspartner für das hydrophobe Alanin und Leucin des ApoE Proteins und ApoE 139-152 Peptids. Die Collagen-ähnlichen Domänen der C1q Ketten C1qA, C1qB und C1qC sind zwischen 73 und 82 Aminosäuren lang. Am N-Terminus dieser Domänen verbinden sich die sechs C1q Ketten zu einem Strang, bildlich gesprochen dem Stiel des Tulpenstrauß-ähnlichen C1q Moleküls. In der C-terminalen Hälfte der Collagen-ähnlichen Domäne befindet sich die C1s₂C1r₂-Bindestelle [123, 124]. Sie besitzt das Aminosäuremuster Hyp-Gly-Lys-Xaa-Gly-Pro/Tyr/Asn, wobei das Lysin eine Schlüsselrolle für die Bindung des Tetramers spielt [105, 123]. Ob ApoE an die N-terminale, Collagen-ähnliche Domäne bindet und welche Aminosäuren dabei im Speziellen für die Interaktion verantwortlich sind ist noch unbekannt. Ebenso ob ApoE an alle C1q Ketten oder nur an bestimmte Ketten des Tulpenstraußes bindet. Diese Fragestellungen könnten mit Hilfe von Peptidbindungsstudien analysiert werden. Dazu müssten kurze C1q Peptide innerhalb der Collagen-ähnlichen Struktur generiert werden und auf ihren Bindungscharakter mit ApoE überprüft werden. Dazu böten sich vor allem Methoden an, die in Echtzeit die Interaktion zeigen können, wie BLitz[®] oder MST. Auch eine PepSpot[™] Analyse könnte angewandt werden, die den Vorzug hat die Bindungsdomäne genauer zu lokalisieren.

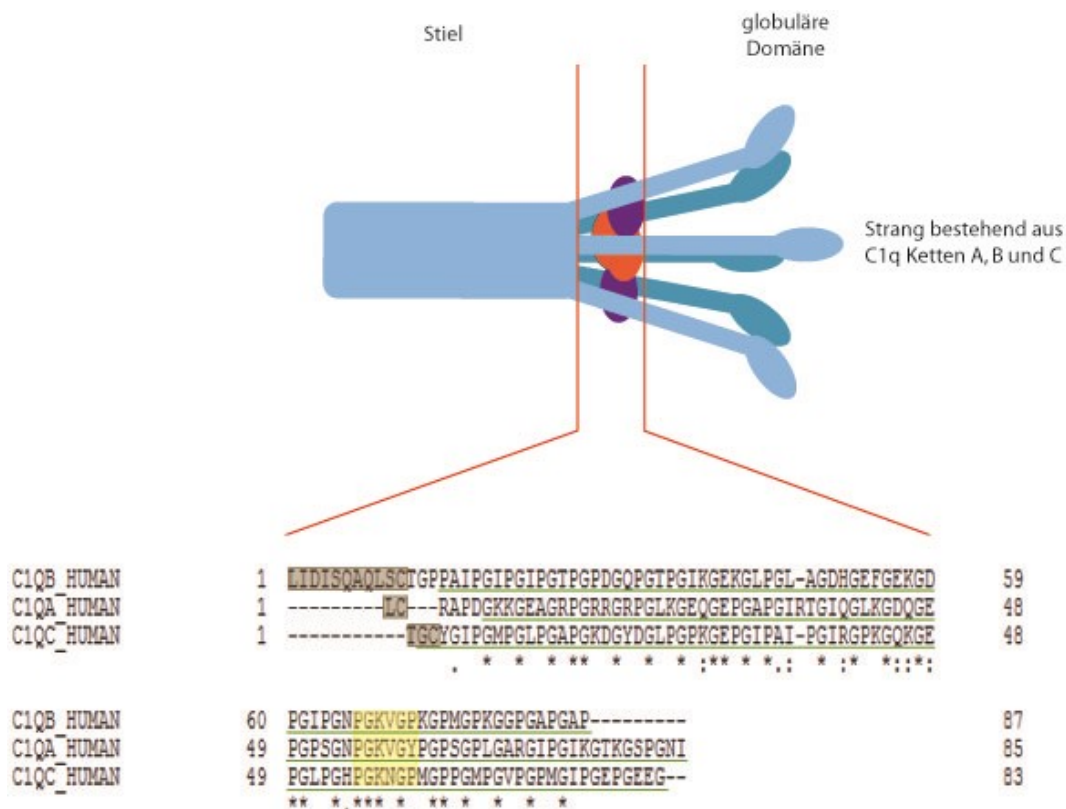


Abb. 22: Model der ApoE Interaktionsdomäne im C1q Molekül. Alignementvergleich (erstellt mit Hilfe von <http://www.uniprot.org>) der C1q Ketten A (31-109), B (21-107) und C (20-112) mit schematischer Lage im C1q-Molekül. Grün unterstrichen: Aminosäuren der Collagen-ähnlichen Domäne; Gelb hinterlegt: Bindestelle für das C1s₂C1r₂-Tetramer; Braun hinterlegt: letzte Aminosäuren des „Stiels“.

4.6 Wirkungsweise von ApoE auf den klassischen Komplementweg

Die Aktivierung des C1 Komplexes initiiert den KW. Dabei binden zunächst die globulären Ligandenbindungsdomänen des C1q Moleküls an eine Aktivatoroberfläche. Durch die Bindung an die Aktivatoroberfläche kommt es zu einer Konformationsänderung von C1q. Dabei öffnet sich der C-terminale Bereich des Moleküls durch ein leichtes Auseinanderdriften der C1q Ketten (Abb. 23). Dies wiederum führt zu einer Strukturänderung des C1r Moleküls, welches an C1q gebunden ist. Das C1r Zymogen wird dabei autokatalytisch in eine aktive Form überführt und kann das C1s Zymogen schneiden und aktivieren [60, 99]. Das C1s Molekül des nun vollständig aktivierten C1 Komplexes schneidet zunächst C4 und danach C2. In diesem Prozess bildet sich die C3 Konvertase des KW, C4b2a, auf der Aktivatoroberfläche aus (Abb. 23) [60].

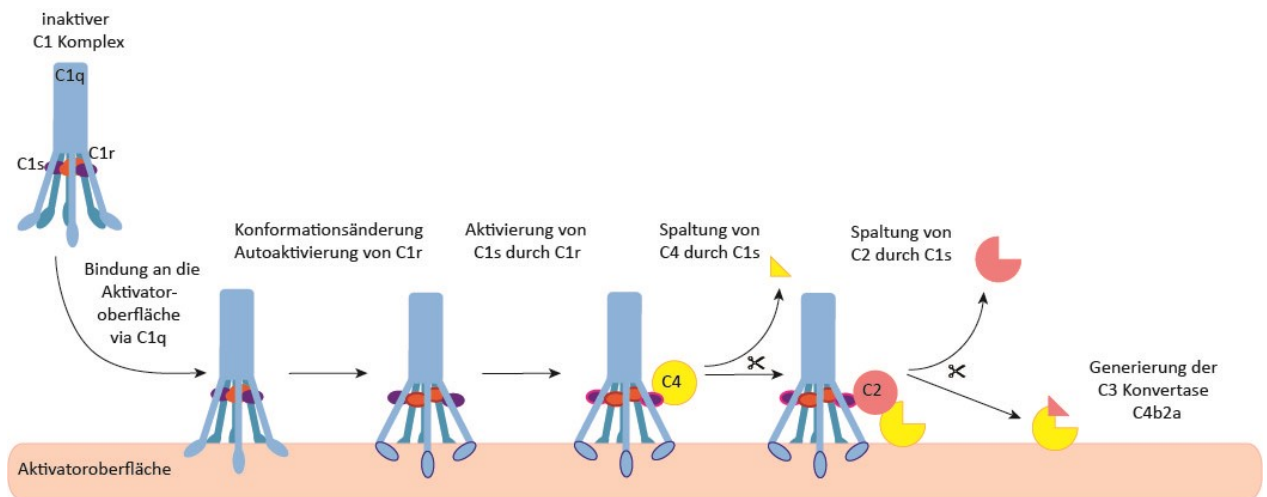


Abb. 23: Frühe Phase des klassischen Komplementweges. Um den klassischen Weg des Komplementsystems zu aktivieren, muss zunächst ein inaktiver C1 Komplex, bestehend aus einem C1q und jeweils zwei C1r und C1s Molekülen, über C1q eine Aktivatoroberfläche erkennen und binden. Durch die Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung von C1q und gleichzeitig zur Autokatalyse und Aktivierung von C1r. C1r spaltet und aktiviert daraufhin das C1s Zymogen. Es entsteht ein aktiver C1 Komplex, welcher zunächst C4 über C1s bindet und in C4a und C4b spaltet. C4b lagert sich an der Aktivatoroberfläche an und bindet C2, welches wiederum von C1s in C2a und C2b geschnitten wird. C2a verbleibt gebunden an C4b an der Aktivatoroberfläche, es entsteht die C3 Konvertase des klassischen Komplementweges, C4b2a.

ApoE inhibiert die initiale Phase des KWs. ApoE bindet an den C1 Komplex, konkurriert aber nicht mit dem C1s₂C1r₂-Tetramer. Eine Möglichkeit der Hemmung des KW durch ApoE besteht in der Verhinderung der Konformationsänderung von C1q, die für die Aktivierung des C1 Komplexes notwendig ist. Damit wäre eine Aktivierung von C1r und somit auch von C1s nach der Bindung von C1q an die Aktivatoroberfläche nicht mehr möglich. Unterstützt wird diese Hypothese von der begründeten Vermutung, dass ApoE an die Collagen-ähnliche Region im C1q Molekül bindet, die sich N-terminal der Bindestelle für das C1s₂C1r₂-Tetramer an C1q befindet. Diese Region ist für die Konformationsänderung im C1q Molekül verantwortlich [125]. Dieses Wirkungsmodell ist in Abb. 26 dargestellt. Damit besitzt ApoE einen anderen Wirkmechanismus als die bis jetzt bekannten Regulatoren dieser Phase, dem C1 INH und CRT. Der C1 INH interagiert mit den Serinproteasen C1s und C1r und nicht wie ApoE und CRT mit C1q. CRT inhibiert C1q über die Interaktion mit der globulären und/oder der Collagen-ähnlichen Domäne. Dabei wird die Bindung von C1q an seine Liganden blockiert [46] bzw. die Phagozytose apoptotischer Zellen vermittelt [119]. Eine Inhibition des KW durch die Blockade der Aktivierung von C1r, wie für ApoE postuliert, wurde bereits für *Brugia malayi* CRT (BmCRT) nachgewiesen. Anders als humanes CRT interagiert BmCRT lediglich mit der globulären Domäne von C1q. Durch die Bindung von BmCRT an C1q kommt es zu einer Konformationsänderung des C1q Moleküls, welche jedoch nicht zur Autokatalyse

von C1r und somit nicht zur Aktivierung des KW führt [126]. Da ApoE jedoch nicht wie BmCRT die globuläre Domäne von C1q bindet, besitzt ApoE einen neuen, noch unbekanntem Wirkungsmechanismus.

4.7 Interaktion von ApoE mit C1q *in vivo*

ApoE bindet C1q und wirkt auch *in vivo* inhibitorisch auf den KW des Komplementsystems. In Kooperation mit Professor Habenicht und Doktor Yin vom Institut für kardiovaskuläre Prävention in München wurde die Interaktion von ApoE mit C1q sowie der Einfluss von ApoE auf das Komplementsystem im Mausmodell getestet. Dazu wurde der choroidale Plexus (ChP) 76-78 Wochen alter ApoE Knockout-Mäuse (ApoE^{-/-}), ApoE3 und ApoE4 Knockin-Mäuse (ApoE3-KI; ApoE4-KI) unter normaler (ND) oder fettreicher Kost (HFD) sowie entsprechender Wildtypmäuse (WT) untersucht und verglichen. Der ChP ist ein Netzwerk miteinander verflochtener Adern und befindet sich in den Ventrikeln des Gehirns. Er ist Bildungsort der Rückenmarksflüssigkeit (Liquor) und gleichzeitig Blut-Liquor-Schranke. Der Liquor füllt die Zwischenräume des Gehirns aus und bietet mechanischen Schutz sowie ein stabiles physiologisches Umfeld für das zentrale Nervensystem. Der ChP besitzt neben seiner Barriere- auch eine Transportfunktion. So werden u. a. Ionen, Proteine, Hormone und Wasser ins sowie Stoffwechselprodukte aus dem Gehirn transportiert [127].

Für die Herstellung histologischer Schnitte des Hirns wurde Gewebe sezerniert, in Tissue-Tec eingebettet und in Isopentan gefroren. Um die Lipidablagerung der Mäuse im Gehirn zu untersuchen, wurden die Regionen des ChP mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und die Lipide durch Oil-Red O (ORO) sichtbar gemacht. Alte ApoE^{-/-} und ApoE4-KI HFD Mäuse zeigen starke Lipidablagerungen im ChP im Gegensatz zu WT, ApoE3-KI ND und HFD und ApoE4-KI ND, welche keine Lipidablagerungen aufweisen (Abb. 24).

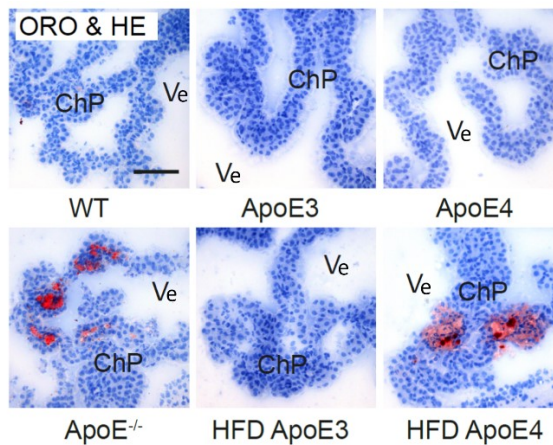


Abb. 24: Lipidablagerung im ChP. Lipide lagern sich ähnlich stark im ChP von ApoE^{-/-} und ApoE4-KI unter HFD an. Im Gegensatz dazu weist der ChP von WT, ApoE3-KI unter ND und HFD und ApoE4-KI unter ND keine Lipidablagerung auf. ChP Bereiche (blau) wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Lipide (rot) mit Oil red O (ORO) gefärbt. Maßstabsleiste entspricht 100 µm. ChP = choroidaler Plexus; Ve = Ventrikel; Abb. generiert von Dr. Yin

Oxidisierte Lipide sind Aktivatoroberflächen des Komplementsystems, insbesondere des KW [47]. Dabei bindet C1q [47] direkt oder über CRP [44] an diese modifizierten Lipide und initiiert die Aktivierung des C1 Komplexes. In Folge dessen kommt es zur Bildung der C3 und anschließend der C5 Konvertase. Die oxidierten Lipide werden mit C3b opsonisiert, C3a und C5a generiert und dadurch bedingt Immunzellen rekrutiert. Oxidierte Lipide sind demnach Hotspots für lokale Entzündungen. Immunfärbungen der Hirnschnitte von ApoE4-KI HFD Mäusen mit Lipidablagerungen zeigen eine Kolokalisation von ApoE mit C1q (Abb. 25A). Entsprechende Kolokalisationen wurde auch in einem Zellkulturmodell des retinalen Pigmentepithels beobachtet. Dieses Modell soll die Drusenformation bei AMD nachahmen [128]. Retinale Pigmentepithelzellen wurden dazu auf einem permeablen Untergrund angezüchtet, mit humanem Serum inkubiert und die Entstehung extrazellulärer Ablagerungen beobachtet. Diese wiesen einige der Drusen-charakteristischen Proteine, wie ApoE und Clusterin, auf. Die im Zellkulturmodell gezeigte Kolokalisation von ApoE mit C1q bestätigt die *in vivo* Interaktion von ApoE mit C1q im Mausmodell. Die Ursache für die Kolokalisation der beiden Proteine wurde jedoch im Zellkulturmodell nicht weiter betrachtet.

Die funktionale Relevanz der ApoE-C1q Interaktion wird in Mäusen deutlich, die statt ihres ApoE-Moleküls die humane ApoE4 Isoform exprimieren (ApoE4-KI). Diese Mäuse zeigen unter HFD ähnliche Lipidablagerungen im ChP im Vergleich zu ApoE^{-/-}. Interessanterweise weisen ApoE4-KI aber eine deutlich verminderte Deposition an C4 und eine leichte

Verminderung der C3-Deposition auf (Abb. 25B), trotz ähnlicher Lipid- und C1q-Ablagerung. Daraus kann geschlossen werden, dass das humane ApoE4 in Mäusen die Komplementaktivierung auf den Lipidablagerungen zu einem gewissen Ausmaß inhibiert und den ChP vor Inflammation schützt. ApoE3-KI Mäuse zeigen keine Lipidablagerung und keine Neuroinflammation (Abb. 25B).

Im Zellkulturmodell der Drusenformation bei AMD wurde die Aktivierung des Komplementsystems durch die Detektion von C5b-9 in den extrazellulären Ablagerungen nachgewiesen [128]. Interessanterweise kolokalisiert ApoE nicht mit C5b-9. Dies unterstützt den, in dieser Arbeit gezeigten, inhibitorischen Effekt von ApoE auf das Komplementsystem.

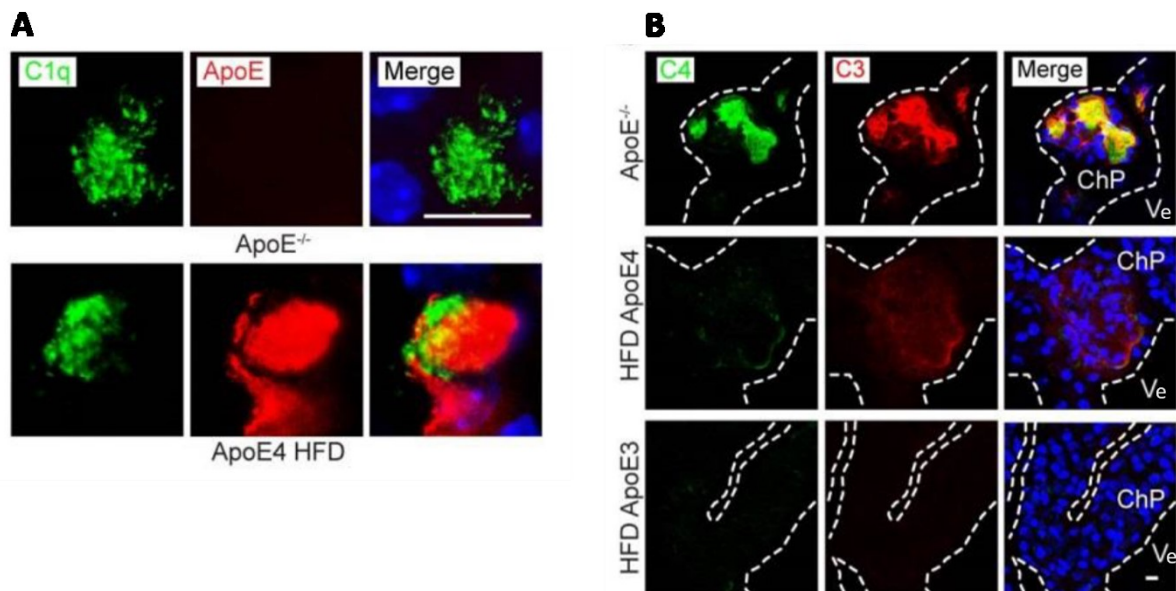


Abb. 25: Komplementdeposition im ChP. ApoE vermindert die Lipid-bedingte C4 und C3 Deposition im ChP. Hochauflösende Mikroskopaufnahmen des ChP. Maßstabsleiste entspricht 10 μ m. Mittels Einsatz immunfluoreszierender Antikörper wurden C1q (Grün, linke Figur), ApoE (Rot, linke Figur), C4 (Grün, rechte Figur) und C3 (Rot, rechte Figur) gefärbt. Blau – Dapi; ChP = choroidaler Plexus; Ve = Ventrikel; Abb. generiert von Dr. Yin

4.8 Relevanz der Ergebnisse für ApoE assoziierte Erkrankungen

In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass ApoE zusätzlich zu seiner Lipidtransportfunktion auch als Komplementregulator agiert. Alle drei ApoE Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4, inhibieren den KW des Komplementsystems in vergleichbarem Maße. Damit stellt sich die Frage, wann ApoE den KW reguliert und ob diese neue Funktion die Assoziation von speziell ApoE4 mit spezifischen Erkrankungen erklären kann. Besonders ApoE4 ist ein Risikofaktor für kardiovaskuläre und neurodegenerative Krankheiten, wie Arteriosklerose, Schlaganfälle, vaskuläre Demenz, Parkinson und Alzheimer [26, 29-32]. Ein Ansatz zur Klärung der

Assoziation von ApoE4 mit diesen Erkrankungen ist die unterschiedliche Bindungsaffinität von ApoE4 im Vergleich zu ApoE2 und der am häufigsten auftretenden, mit keiner Krankheit assoziierten Isoform, ApoE3, zu den Liganden. ApoE4 bindet vor allem an große Triglyceridreiche Lipoproteine mit sehr geringer Dichte (VLDL), wohingegen ApoE2 und ApoE3 kleinere, Phospholipid-reiche Lipoproteine höherer Dichte bevorzugen (HDL) [7, 129, 130]. VLDL-Komplexe werden mittels Lipase in kleinere, besser zu transportierende Komplexe zerlegt. ApoE4 jedoch verdrängt die Lipase auf den großen Lipidkomplexen und führt zu einem erhöhten LDL- und Cholesterin-Level im Plasma [25, 26, 131]. Cholesterin-reiches VLDL und LDL wird im Vergleich zu HDL schlechter im Körper transportiert, lagert sich ab und wird eher oxidiert. Diese Ablagerungen aktivieren dann das Komplementsystem. Die Präferenz der ApoE Isoformen ist nicht nur zu Lipoproteinen unterschiedlich, sondern auch ihre Bindung an A β . ApoE4 besitzt eine geringere Bindungsaffinität zu A β als ApoE3 [12, 13], verbunden mit einer geringeren Transportrate und höheren Wahrscheinlichkeit zur Ablagerung von A β . Auch abgelagertes A β ist Aktivatoroberfläche für Komplement [45, 47]. Der durch ApoE4 bedingte, schlechtere Transport von Lipiden und A β führt vermutlich zu einer erhöhten Komplementaktivierung und Rekrutierung von Immunzellen. Es kommt zur sterilen Inflammation.

Anders als die Lipidtransportfunktion, ist die in dieser Arbeit beschriebene Komplementregulatorische Funktion aller drei ApoE Isoformen sehr ähnlich. Die Assoziation von ApoE4 mit speziellen Krankheiten wird somit eher durch die Lipidtransportfunktion, als durch die Komplement-regulative Funktion erklärt.

Ist die Komplement-aktivierende Oberfläche zu massiv, sprich die Ablagerung oxidierter Lipide zu großflächig, ist ApoE vermutlich nicht mehr in der Lage die Aktivierung des KW ausreichend zu regulieren. Es kommt zu einer Überschussreaktion des Komplementsystems und zur Inflammation. Dies wiederum führt zur Rekrutierung von Immunzellen, wie dendritischen Zellen und Makrophagen, zur Ausschüttung von Zytokinen und zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Die Rekrutierung von phagozytierenden Zellen, z. B. ins Hirn, führt vermutlich zur Schädigung umliegender Zellen und somit zur Verstärkung und Vergrößerung der chronischen Entzündung.

4.9 Fazit

In dieser Arbeit wird erstmalig gezeigt, dass ApoE, neben seiner Lipidtransportfunktion, eine Komplement-inhibitorische Funktion besitzt. ApoE ist demnach neben dem C1 INH und CRT der dritte bekannte, humane Inhibitor der initialen Phase des klassischen Komplementweges. Im Allgemeinen binden die globulären Domänen des C1q Moleküls an modifizierte Lipide oder Immunkomplexe. Dadurch kommt es zur Aktivierung von C1r und C1s im C1 Komplex und zur Initiierung der Komplementkaskade (Abb. 26). ApoE bindet Calcium-abhängig an C1q. Durch die Interaktion von ApoE mit C1q wird vermutlich die für die Aktivierung des C1 Komplexes benötigte Konformationsänderung blockiert und somit der KW inhibiert. Damit unterscheidet sich der ApoE Wirkungsmechanismus von dem des C1 INH, der die Proteaseaktivität von C1s und C1r hemmt und dem Wirkungsmechanismus von CRT, der sowohl die Bindung von C1q an seinen Liganden blockiert, als auch die Phagozytose speziell toter und geschädigter Zellen vermittelt. Ein modifizierter Lipidkomplex der sowohl ApoE, als auch C1q bindet, kann vermutlich zeitgleich transportiert und vor einer Aktivierung des Komplementsystems geschützt werden. Diese Arbeit rückt die Rolle des KW des Komplementsystems in ApoE-assoziierte Krankheiten in den Vordergrund und eröffnet eine neue Sichtweise in Bezug auf ApoE und das Komplementsystem im Krankheitsverlauf und der Entwicklung neuer Therapien.

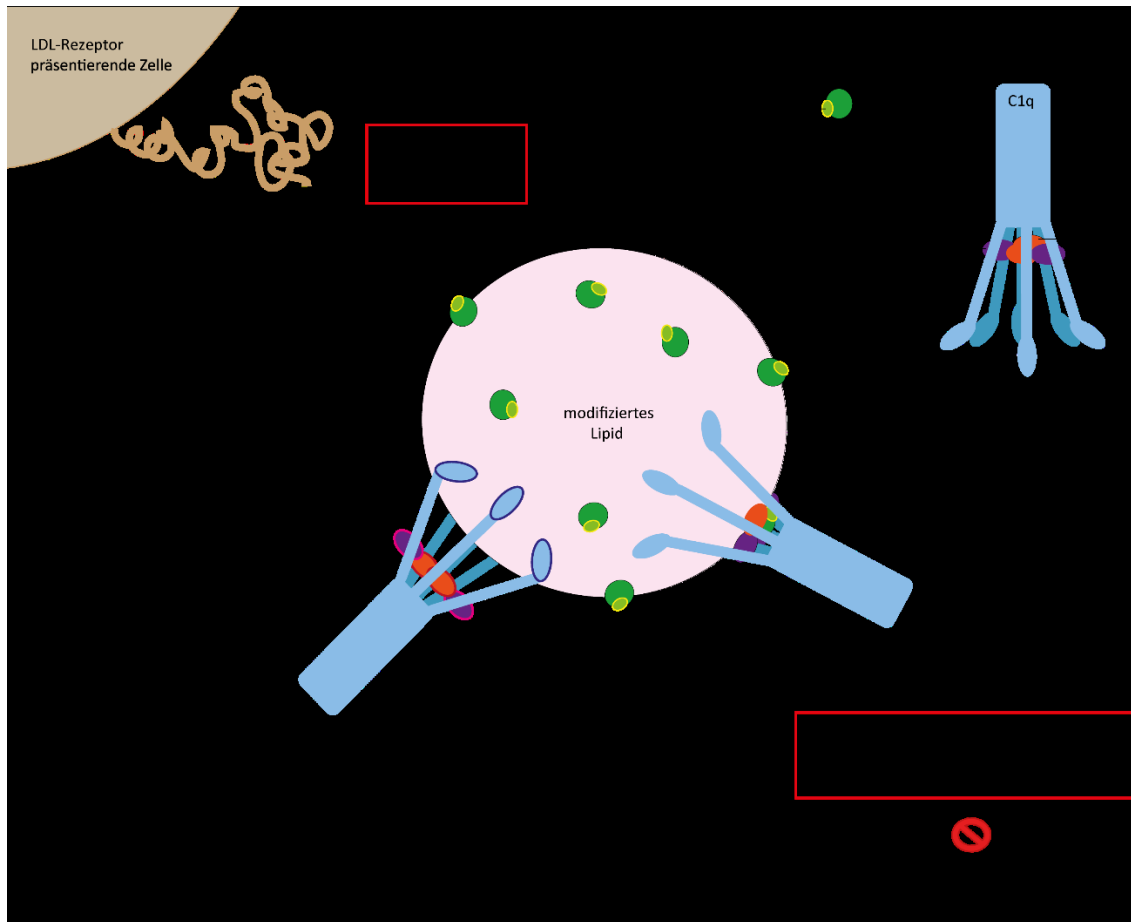


Abb. 26: Model der Doppelfunktion von ApoE. ApoE wirkt im Körper als Lipidtransportmolekül und als Komplementregulator. ApoE bindet, transportiert und ermöglicht über die Interaktion mit dem LDL-Rezeptor die Aufnahme und Verarbeitung von Lipiden. Modifizierte Lipide sind Aktivatoroberflächen des Komplementsystems. Dabei kommt es zur Bindung des C1 Komplexes über C1q. Der C1q Komplex und somit das Komplementsystem wird aktiviert und führt zu Inflammation. ApoE reguliert diesen Vorgang, indem es C1q bindet und die Aktivierung des C1 Komplexes blockiert. Durch die Regulation von ApoE wird eine chronische Inflammation verhindert. Das Model zeigt einen möglichen Wirkungsmechanismus von ApoE. ApoE bindet dabei an die Collagen-ähnliche Domäne von C1q und verhindert die Konformationsänderung des C1q Molekül, welche zur Aktivierung des C1 Komplexes nötig ist.

Literaturverzeichnis

1. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3330-7.
2. Anderson, D.H., et al., *Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation*. Am J Ophthalmol, 2001. **131**(6): p. 767-81.
3. Giau, V.V., et al., *Role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2015. **11**: p. 1723-37.
4. Chen, J., Q. Li, and J. Wang, *Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(36): p. 14813-8.
5. Emi, M., et al., *Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms*. Genomics, 1988. **3**(4): p. 373-9.
6. Dong, L.M. and K.H. Weisgraber, *Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19053-7.
7. Dong, L.M., et al., *Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms*. J Biol Chem, 1994. **269**(35): p. 22358-65.
8. Hatters, D.M., C.A. Peters-Libeu, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E structure: insights into function*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(8): p. 445-54.
9. Phillips, M.C., *Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism*. IUBMB Life, 2014. **66**(9): p. 616-23.
10. Tycko, R., *Molecular Structure of Aggregated Amyloid-beta: Insights from Solid-State Nuclear Magnetic Resonance*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(8).
11. Grimm, M.O., D. Michaelson, and T. Hartmann, *Omega-3 fatty acids, lipids and apoE lipidation in Alzheimer's disease: a rationale for multi-nutrient dementia prevention*. J Lipid Res, 2017.
12. LaDu, M.J., et al., *Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid*. J Biol Chem, 1994. **269**(38): p. 23403-6.
13. Ly, S., et al., *Binding of apolipoprotein E inhibits the oligomer growth of amyloid-beta peptide in solution as determined by fluorescence cross-correlation spectroscopy*. J Biol Chem, 2013. **288**(17): p. 11628-35.
14. Strittmatter, W.J., et al., *Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 8098-102.
15. Dong, L.M., et al., *Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(8): p. 718-22.
16. Weisgraber, K.H., T.L. Innerarity, and R.W. Mahley, *Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site*. J Biol Chem, 1982. **257**(5): p. 2518-21.
17. Feingold, K.R. and C. Grunfeld, *Introduction to Lipids and Lipoproteins*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
18. Elshourbagy, N.A., H.V. Meyers, and S.S. Abdel-Meguid, *Cholesterol: the good, the bad, and the ugly - therapeutic targets for the treatment of dyslipidemia*. Med Princ Pract, 2014. **23**(2): p. 99-111.
19. Binder, C.J., N. Papac-Milicevic, and J.L. Witztum, *Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(8): p. 485-97.
20. Pagidipati, N.J. and T.A. Gaziano, *Estimating deaths from cardiovascular disease: a review of global methodologies of mortality measurement*. Circulation, 2013. **127**(6): p. 749-56.
21. Zingg, J.M., R. Ricciarelli, and A. Azzi, *Scavenger receptors and modified lipoproteins: fatal attractions?* IUBMB Life, 2000. **49**(5): p. 397-403.

22. Fatkhullina, A.R., I.O. Peshkova, and E.K. Koltsova, *The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis*. Biochemistry (Mosc), 2016. **81**(11): p. 1358-1370.
23. Bobryshev, Y.V., et al., *Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 9582430.
24. Tsiantoulas, D., et al., *B cells and humoral immunity in atherosclerosis*. Circ Res, 2014. **114**(11): p. 1743-56.
25. Li, H., et al., *Molecular mechanisms responsible for the differential effects of apoE3 and apoE4 on plasma lipoprotein-cholesterol levels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(4): p. 687-93.
26. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders*. J Mol Med (Berl), 2016. **94**(7): p. 739-46.
27. Meir, K.S. and E. Leitersdorf, *Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1006-14.
28. Lee, Y.T., et al., *Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances*. Lipids Health Dis, 2017. **16**(1): p. 12.
29. Basun, H., et al., *Apolipoprotein E polymorphism and stroke in a population sample aged 75 years or more*. Stroke, 1996. **27**(8): p. 1310-5.
30. Mayeux, R., et al., *The apolipoprotein epsilon 4 allele in patients with Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 1993. **34**(5): p. 752-4.
31. Kawamata, J., et al., *Apolipoprotein E polymorphism in Japanese patients with Alzheimer's disease or vascular dementia*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994. **57**(11): p. 1414-6.
32. Ghebremedhin, E., et al., *Relationship of apolipoprotein E and age at onset to Parkinson disease neuropathology*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(2): p. 116-23.
33. Grimm, M.O., et al., *APP Function and Lipids: A Bidirectional Link*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 63.
34. Corder, E.H., et al., *Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease*. Nat Genet, 1994. **7**(2): p. 180-4.
35. Anoop, S., et al., *Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases*. Indian J Med Res, 2010. **132**: p. 363-78.
36. Fernandez-Robredo, P., et al., *Current treatment limitations in age-related macular degeneration and future approaches based on cell therapy and tissue engineering*. J Ophthalmol, 2014. **2014**: p. 510285.
37. Wang, L., et al., *Abundant lipid and protein components of drusen*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e10329.
38. Liu, R.T., et al., *Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE in vivo: implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(3): p. 2225-37.
39. McKay, G.J., et al., *Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies*. Hum Mutat, 2011. **32**(12): p. 1407-16.
40. Tacnet-Delorme, P., S. Chevallier, and G.J. Arlaud, *Beta-amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A beta on the C1q globular regions*. J Immunol, 2001. **167**(11): p. 6374-81.
41. Edwards, A.O., et al., *Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration*. Science, 2005. **308**(5720): p. 421-4.
42. Laurell, A.B., *Jules Bordet--a giant in immunology*. Scand J Immunol, 1990. **32**(5): p. 429-32.
43. Bhakdi, S., et al., *Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(10): p. 2348-54.
44. Chang, M.K., et al., *C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13043-8.

45. Rogers, J., et al., *Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10016-20.
46. Kishore, U., et al., *Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q*. Immunol Lett, 2004. **95**(2): p. 113-28.
47. Arlaud, G.J., A. Biro, and W.L. Ling, *Enzymatically modified low-density lipoprotein is recognized by c1q and activates the classical complement pathway*. J Lipids, 2011. **2011**: p. 376092.
48. Nauta, A.J., et al., *Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation*. Eur J Immunol, 2002. **32**(6): p. 1726-36.
49. Korb, L.C. and J.M. Ahearn, *C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited*. J Immunol, 1997. **158**(10): p. 4525-8.
50. Taylor, P.R., et al., *A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 359-66.
51. Navratil, J.S., et al., *The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3231-9.
52. Castellano, G., et al., *Infiltrating dendritic cells contribute to local synthesis of C1q in murine and human lupus nephritis*. Mol Immunol, 2010. **47**(11-12): p. 2129-37.
53. Castellano, G., et al., *Maturation of dendritic cells abrogates C1q production in vivo and in vitro*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3813-20.
54. Arlaud, G.J. and M.G. Colomb, *Complement: Classical Pathway*. 2005, eLS.
55. Nagasawa, S. and R.M. Stroud, *Cleavage of C2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: demonstration of binding of C2b to C4b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(7): p. 2998-3001.
56. Matsushita, M., *The lectin pathway of the complement system*. Microbiol Immunol, 1996. **40**(12): p. 887-93.
57. Gal, P., et al., *Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions*. Mol Immunol, 2009. **46**(14): p. 2745-52.
58. Jenny, L., et al., *MASP-1 of the complement system promotes clotting via prothrombin activation*. Mol Immunol, 2015. **65**(2): p. 398-405.
59. Pangburn, M.K., R.D. Schreiber, and H.J. Muller-Eberhard, *Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3*. J Exp Med, 1981. **154**(3): p. 856-67.
60. Merle, N.S., et al., *Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 262.
61. Hadders, M.A., et al., *Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9*. Cell Rep, 2012. **1**(3): p. 200-7.
62. Bianchino, A.C., P.H. Poon, and V.N. Schumaker, *A mechanism for the spontaneous activation of the first component of complement, C1, and its regulation by C1-inhibitor*. J Immunol, 1988. **141**(11): p. 3930-6.
63. Sim, R.B., et al., *Interaction of 125I-labelled complement subcomponents C-1r and C-1s with protease inhibitors in plasma*. FEBS Lett, 1979. **97**(1): p. 111-5.
64. E, S.R., D.A. Falcao, and L. Isaac, *Clinical aspects and molecular basis of primary deficiencies of complement component C3 and its regulatory proteins factor I and factor H*. Scand J Immunol, 2006. **63**(3): p. 155-68.
65. Fujita, T. and V. Nussenzweig, *The role of C4-binding protein and beta 1H in proteolysis of C4b and C3b*. J Exp Med, 1979. **150**(2): p. 267-76.
66. Zipfel, P.F., et al., *The factor H protein family*. Immunopharmacology, 1999. **42**(1-3): p. 53-60.
67. Gigli, I., T. Fujita, and V. Nussenzweig, *Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(12): p. 6596-600.

68. Noris, M. and G. Remuzzi, *Overview of complement activation and regulation*. *Semin Nephrol*, 2013. **33**(6): p. 479-92.
69. Hourcade, D.E., *The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(4): p. 2128-32.
70. Spitzer, D., et al., *Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly*. *J Immunol*, 2007. **179**(4): p. 2600-8.
71. Wong, W.W., et al., *Structure of the human CR1 gene. Molecular basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new CR1-like allele*. *J Exp Med*, 1989. **169**(3): p. 847-63.
72. Zipfel, P.F. and C. Skerka, *Complement regulators and inhibitory proteins*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(10): p. 729-40.
73. Dunkelberger, J.R. and W.C. Song, *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. *Cell Res*, 2010. **20**(1): p. 34-50.
74. Ghannam, A., et al., *Human complement C3 deficiency: Th1 induction requires T cell-derived complement C3a and CD46 activation*. *Mol Immunol*, 2014. **58**(1): p. 98-107.
75. Heeger, P.S. and C. Kemper, *Novel roles of complement in T effector cell regulation*. *Immunobiology*, 2012. **217**(2): p. 216-24.
76. Merle, N.S., et al., *Complement System Part II: Role in Immunity*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 257.
77. Koch, T.K., et al., *Staphylococcus aureus proteins Sbi and Efb recruit human plasmin to degrade complement C3 and C3b*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47638.
78. Beutner, C., et al., *Generation of microglial cells from mouse embryonic stem cells*. *Nat Protoc*, 2010. **5**(9): p. 1481-94.
79. Yu, J.T., L. Tan, and J. Hardy, *Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update*. *Annu Rev Neurosci*, 2014. **37**: p. 79-100.
80. Rohn, T.T., et al., *Apolipoprotein E pathology in vascular dementia*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(3): p. 938-47.
81. Weiler, J.M., et al., *Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(9): p. 3268-72.
82. Whaley, K. and S. Ruddy, *Modulation of C3b hemolytic activity by a plasma protein distinct from C3b inactivator*. *Science*, 1976. **193**(4257): p. 1011-3.
83. Snyderman, R. and M.C. Pike, *Interaction of complex polysaccharides with the complement system: effect of calcium depletion on terminal component consumption*. *Infect Immun*, 1975. **11**(2): p. 273-9.
84. Chen, H., et al., *Solution insights into the structure of the Efb/C3 complement inhibitory complex as revealed by lysine acetylation and mass spectrometry*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008. **19**(1): p. 55-65.
85. Varela, J.C. and S. Tomlinson, *Complement: an overview for the clinician*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2015. **29**(3): p. 409-27.
86. Hayman, E.G., et al., *Vitronectin--a major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum*. *Exp Cell Res*, 1985. **160**(2): p. 245-58.
87. Preissner, K.T. and D. Seiffert, *Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling*. *Thromb Res*, 1998. **89**(1): p. 1-21.
88. Bagyinszky, E., et al., *The genetics of Alzheimer's disease*. *Clin Interv Aging*, 2014. **9**: p. 535-51.
89. Veerhuis, R., H.M. Nielsen, and A.J. Tenner, *Complement in the brain*. *Mol Immunol*, 2011. **48**(14): p. 1592-603.
90. Orłowski, E.W. and V.B. Kraus, *The role of innate immunity in osteoarthritis: when our first line of defense goes on the offensive*. *J Rheumatol*, 2015. **42**(3): p. 363-71.
91. Solomon, S., D. Kassahn, and H. Illges, *The role of the complement and the Fc gamma R system in the pathogenesis of arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(4): p. 129-35.

92. Haddy, N., et al., *The importance of plasma apolipoprotein E concentration in addition to its common polymorphism on inter-individual variation in lipid levels: results from Apo Europe*. Eur J Hum Genet, 2002. **10**(12): p. 841-50.
93. Pangburn, M.K., R.D. Schreiber, and H.J. Muller-Eberhard, *Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution*. J Exp Med, 1977. **146**(1): p. 257-70.
94. Kerr, M.A., *Limited proteolysis of complement components C2 and factor B. Structural analogy and limited sequence homology*. Biochem J, 1979. **183**(3): p. 615-22.
95. Dahlback, B. and B. Hildebrand, *Degradation of human complement component C4b in the presence of the C4b-binding protein-protein S complex*. Biochem J, 1983. **209**(3): p. 857-63.
96. Nagasawa, S., C. Ichihara, and R.M. Stroud, *Cleavage of C4b by C3b inactivator: production of a nicked form of C4b, C4b', as an intermediate cleavage product of C4b by C3b inactivator*. J Immunol, 1980. **125**(2): p. 578-82.
97. Matsushita, M. and T. Fujita, *Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1497-502.
98. Thiel, S., et al., *Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAp19*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 878-87.
99. Wallis, R., et al., *Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation*. Immunobiology, 2010. **215**(1): p. 1-11.
100. Mahley, R.W., Y. Huang, and K.H. Weisgraber, *Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1226-9.
101. Jordan, C.A., et al., *Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent*. J Virol, 1991. **65**(2): p. 736-42.
102. Nakai, M., et al., *Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia*. Neurosci Lett, 1996. **211**(1): p. 41-4.
103. Ruiz, J., et al., *The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor*. J Lipid Res, 2005. **46**(8): p. 1721-31.
104. Prevost, M. and V. Raussens, *Apolipoprotein E-low density lipoprotein receptor binding: study of protein-protein interaction in rationally selected docked complexes*. Proteins, 2004. **55**(4): p. 874-84.
105. Bally, I., et al., *Expression of recombinant human complement C1q allows identification of the C1r/C1s-binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8650-5.
106. Bally, I., et al., *Identification of the C1q-binding Sites of Human C1r and C1s: a refined three-dimensional model of the C1 complex of complement*. J Biol Chem, 2009. **284**(29): p. 19340-8.
107. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
108. Klaver, C.C., et al., *Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(1): p. 200-6.
109. Souied, E.H., et al., *The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol, 1998. **125**(3): p. 353-9.
110. Cooper, D.K., B. Ekser, and A.J. Tector, *Immunobiological barriers to xenotransplantation*. Int J Surg, 2015. **23**(Pt B): p. 211-6.
111. Fujita, T., I. Gigli, and V. Nussenzweig, *Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator*. J Exp Med, 1978. **148**(4): p. 1044-51.
112. Davis, A.E., 3rd, P. Mejia, and F. Lu, *Biological activities of C1 inhibitor*. Mol Immunol, 2008. **45**(16): p. 4057-63.
113. Eggleton, P. and D.H. Llewellyn, *Pathophysiological roles of calreticulin in autoimmune disease*. Scand J Immunol, 1999. **49**(5): p. 466-73.

114. Eggleton, P., A.J. Tenner, and K.B. Reid, *C1q receptors*. Clin Exp Immunol, 2000. **120**(3): p. 406-12.
115. Kishore, U., et al., *Release of calreticulin from neutrophils may alter C1q-mediated immune functions*. Biochem J, 1997. **322 (Pt 2)**: p. 543-50.
116. Kishore, U., et al., *The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes*. Clin Exp Immunol, 1997. **108**(2): p. 181-90.
117. Steino, A., et al., *Interaction of C1q with the receptor calreticulin requires a conformational change in C1q*. Scand J Immunol, 2004. **59**(5): p. 485-95.
118. Paidassi, H., et al., *Investigations on the C1q-calreticulin-phosphatidylserine interactions yield new insights into apoptotic cell recognition*. J Mol Biol, 2011. **408**(2): p. 277-90.
119. Ogden, C.A., et al., *C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 781-95.
120. Raghavan, M., et al., *Calreticulin in the immune system: ins and outs*. Trends Immunol, 2013. **34**(1): p. 13-21.
121. Phillips, A.E., et al., *Analogous interactions in initiating complexes of the classical and lectin pathways of complement*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7708-17.
122. Weisgraber, K.H., *Apolipoprotein E: structure-function relationships*. Adv Protein Chem, 1994. **45**: p. 249-302.
123. Venkatraman Girija, U., et al., *Structural basis of the C1q/C1s interaction and its central role in assembly of the C1 complex of complement activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(34): p. 13916-20.
124. Wallis, R., et al., *Localization of the serine protease-binding sites in the collagen-like domain of mannose-binding protein: indirect effects of naturally occurring mutations on protease binding and activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 14065-73.
125. Schumaker, V.N., et al., *Semi-flexible joint in the C1q subunit of the first component of human complement*. J Mol Biol, 1981. **148**(2): p. 191-7.
126. Yadav, S., et al., *In silico and in vitro studies on the protein-protein interactions between Brugia malayi immunomodulatory protein calreticulin and human C1q*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106413.
127. Lun, M.P., E.S. Monuki, and M.K. Lehtinen, *Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system*. Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(8): p. 445-57.
128. Johnson, L.V., et al., *Cell culture model that mimics drusen formation and triggers complement activation associated with age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(45): p. 18277-82.
129. Gregg, R.E., et al., *Abnormal in vivo metabolism of apolipoprotein E4 in humans*. J Clin Invest, 1986. **78**(3): p. 815-21.
130. Weisgraber, K.H., *Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoproteins: role of the cysteine-arginine interchange at residue 112*. J Lipid Res, 1990. **31**(8): p. 1503-11.
131. Davignon, J., R.E. Gregg, and C.F. Sing, *Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis*. Arteriosclerosis, 1988. **8**(1): p. 1-21.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Die vorliegende Dissertation wurde von mir selbst angefertigt. Sie beinhaltet keine Textabschnitte Dritter oder eigene Prüfungsarbeiten. Alle verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit gekennzeichnet.

Alle Personen, die mich bei der Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben, sind von mir vermerkt.

Ich habe keinen Promotionsberater in Anspruch genommen. Es gab keine unmittelbaren oder mittelbaren geldwerten Leistungen an Dritte, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Es wurde außerdem keine identische, ähnliche oder abgewandelte Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation vorgelegt.

Weimar, den

Susanne Ackermann

Konferenzbeiträge und Publikationen

Poster

ProRetina Forschungskolloquium, März 2013, Potsdam

Titel: "Role of ApoE and its isoforms in AMD"

14. Europäische Komplementtagung der humanen Krankheiten, August 2013, Jena

Titel: "Role of ApoE and its isoforms in AMD"

ProRetina Forschungskolloquium, April 2014, Potsdam

Titel: "The drusen component Apolipoprotein E interacts with Complement Component C1q "

ProRetina Forschungskolloquium, April 2016, Potsdam

Titel: "The plasma protein and drusen component Apolipoprotein E is an inhibitor of the Classical Complement Pathway"

Symposium der International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions (ILRS), Mai 2016, Wittenberg

Titel: "Apolipoprotein E is an inhibitor of the Classical Complement Pathway"
Posterpreis

Vortrag

Symposium der International Leibniz Research School for Microbial and Biomolecular Interactions (ILRS), Oktober 2015, Jena

Titel: "The Role of Apolipoprotein E in the Innate Immune System"

Publikationen

Pauly D, Nagel BM, Reinders J, Killian T, Wulf M, **Ackermann S**, Ehrenstein B, Zipfel PF, Skerka C, Weber BH: A novel antibody against human properdin inhibits the alternative complement system and specifically detects properdin from blood samples. PLoS One. 2014 May 5;9(5)

Yin C#, **Ackermann S#**, Mohanta SK, Ma Z, Nietzsche S, Westermann M, Peng L, Bontha V, Srikakulapu P, Beer M, Megens RTA, Weber C, Steffens S, Hildner M, Zipfel PF,10, Skerka*, Habenicht AJR*: ApoE attenuates choroid plexus inflammation by binding and inhibiting C1q (eingereicht)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zur Dissertation begleitet, mir geholfen und mich unterstützt haben.

Zu Beginn möchte ich meiner Doktormutter Prof. Dr. Christine Skerka danken, die mich für dieses spannende Thema begeistert hat. Neben konspirativen Gesprächen, der fachlichen und wissenschaftlichen Unterstützung sowie der Möglichkeit meine Ergebnisse auf Konferenzen zu präsentieren, möchte ich mich vor allem für die stete Motivation bedanken. Ihr und Prof. Dr. Peter F. Zipfel gilt außerdem der Dank, dass ich meine Doktorarbeit am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie schreiben konnte.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Infektionsbiologie für die schöne und harmonische Arbeitsatmosphäre, das hilfsbereite Miteinander und das freundschaftliche Verhältnis. Mein besonderer Dank gilt Denise Buhlmann, Christiane Pilz und Isabel Kopka, die mich mit offenen Armen aufgenommen und mir am Anfang alles Wichtige gezeigt haben. Außerdem möchte ich mich noch bei Heike Gäbler, Andrea Hartmann, Anika Westphal, Ramona Rudnick, Nadine Reiher und Sarah Irscher für ihre stets offenen Ohren, die lustigen Pausen, die willkommene Abwechslung und die schöne Zeit außerhalb des Labors bedanken.

Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit sowie für ihr immer-für-mich-da-sein danken. Bei meinem Bruder Martin möchte ich mich für seine Vorbildfunktion, seine Ratschläge und seine Motivation zu dieser Arbeit bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine drei Männer: meinen Ehemann Till und meine beiden Söhne Mats und Hector. Till möchte ich dafür danken, dass er mich immer unterstützt hat, mich abgelenkt hat, wenn ich es gebraucht habe und dafür, dass ich trotz zweier Wirbelwinde diese Arbeit abschließen konnte. Mats und Hector verdanke ich, trotz einiger Rückschläge, am Ende immer einen schönen Tag gehabt zu haben.