

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Identifizierung einer Mutation im Exon 2
des C1q-B-Ketten-Gens
als Ursache eines hereditären C1q-Defekts
mit Ausbildung einer SLE-ähnlichen Symptomatik**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Markus Wilhelm Thomé

aus Saarburg

Mainz, 2010

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1.	Das Komplementsystem	1
1.1.1.	Zur Geschichte des Komplementsystems	1
1.1.2.	Aufbau und Funktion	2
1.1.3.	Der Klassische Weg	5
1.1.4.	Der Lektin-Weg	6
1.1.5.	Der Alternative Weg	6
1.1.6.	Die gemeinsame Endstrecke des Komplementsystems	7
1.1.7.	Die Regulierung des Komplementsystems	8
1.2.	Komplementdefizienzen und ihre Auswirkungen	10
1.2.1.	Komplementdefizienzen und bakterielle Infektionen	10
1.2.2.	Komplementdefizienzen und Autoimmunerkrankungen	11
1.3.	Der C1-Komplex - Funktion und Aufbau	18
1.3.1.	Der C1-Komplex – Aufbau	18
1.3.2.	C1q – Struktur und Funktion	19
1.3.3.	Bindung an C1q	21
1.4.	C1q-Defizienz	22
1.4.1.	Mutationen der A-Kette	23
1.4.2.	Mutationen der B-Kette	23
1.4.3.	Mutationen der C-Kette	24
1.4.4.	Stille Mutationen („single nucleotide variants“)	24
1.5.	Systemischer Lupus erythematodes	25
1.5.1.	Definition	25
1.5.2.	Prävalenz	26
1.5.3.	Genetik	26
1.5.4.	Klinische Symptomatik	27
1.5.5.	Diagnosekriterien des SLE	28
1.5.6.	Autoantikörper	30
1.5.7.	Pathogenese des SLE	33
1.5.8.	Therapie	36
1.6.	C1q und Autoimmunität	38
1.6.1.	C1q-Interaktion mit Rezeptoren	38
1.6.2.	C1q-Interaktion mit Immunkomplexen	38
1.6.3.	Die „Waste-Disposal“-Hypothese	39

1.6.4.	Die „Tolerance“-Hypothese	41
1.6.5.	Therapieoptionen bei hereditärer C1q-Defizienz	42
1.7.	Zielsetzung der Arbeit	43
2	Material und Methoden	45
2.1	Patientenbeschreibung	45
2.1.1.	Familienanamnese:	45
2.1.2.	Klinik und Laborbefunde bei Erstvorstellung	45
2.1.3.	Krankheitsverlauf und weitere Diagnostik	46
2.2.	Material	48
2.2.1.	Serum- und Zellproben	48
2.3.	Primer	49
2.3.1.	DNA-Längenstandards	50
2.3.2.	Enzyme	50
2.3.3.	Reagenzien und Chemikalien	51
2.3.4.	Puffer und Lösungen	51
2.3.5.	Geräte und Kunststoffartikel	52
2.4.	Komplement-Bestimmungen	53
2.4.1.	Gesamthämolytische Aktivitäts-Bestimmung (CH50)	53
2.4.2.	C1q-Konzentrationsbestimmung	53
2.5.	Molekularbiologische Methoden	53
2.5.1.	DNA-Extraktion	53
2.5.2.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	53
2.5.3.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
2.5.4.	Restriktionsverdauung von PCR-Amplifikaten	55
2.5.5.	Agarose-Gelelektrophorese:	56
2.5.6.	Elution von DNA aus Agarosegelen	57
2.5.7.	Sequenzierung	57
2.5.8.	Nachweis bekannter Mutationen im C1q A Exon 2, B Exon 1, C Exon 1	58
2.5.9.	Nachweis SNV (C1q A Exon 2 Gly70)	59
2.6.	Softwareanwendungen zu Primerdesign, Auswertung von Sequenzen, Restriktionsverdau-Enzymauswahl	61
3	Ergebnisse	62
3.1.	Stammbaum der Familienmitglieder	62
3.2.	Serologische Ergebnisse	63
3.2.1.	CH50-Aktivität und C1q-Konzentration	63
3.3.	Molekularbiologische Ergebnisse	65
3.3.1.	Nachweis vorab beschriebener, bekannter Mutationen	65

3.3.1.1.	Nachweis der Mutation C1q A Exon 2 (Gln 186)	65
3.3.1.2.	Nachweis der Mutation C1q B Exon 1 (Gly 15)	67
3.3.1.3.	Nachweis der Mutation C1q C Exon 1 (Gly 6)	68
3.3.1.4.	Nachweis SNV (C1qA Exon 2 Gly70)	69
3.3.2.	Sequenzierung der Exons 1 und 2 der C1qA-, C1qB- und C1qC-Gene	70
3.3.3.	Restriktionsverdauung mittels <i>NcoI</i>	74
3.3.4.	Übertragung der Ergebnisse auf den Stammbaum	78
4	Diskussion	79
4.1.	Serologische Ergebnisse	79
4.2.	Molekularbiologische Ergebnisse	81
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Abbildungsverzeichnis	96
8	Tabellenverzeichnis	97
9	Anhang	98
10	Danksagung	105
11	Lebenslauf	106

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ANA	Anti-nukleäre Antikörper
AP	<i>alternative pathway</i>
AP50	Gesamthämolytische Aktivität des alternativen Wegs
ARA	<i>American Rheumatism Association</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C1INH	C1-Esterase-Inhibitor
CH50	Gesamthämolytische Aktivität des Komplementsystems
CR	Komplement-Rezeptor
CRP	C-reaktives-Protein
C-terminal	carboxyterminal
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
FFP	<i>fresh frozen plasma</i>
HLA	<i>human leukocyte antigene</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
kb	Kilobasen
KBR	Komplement-Bindungs-Reaktion
MAC	<i>membrane attack complex</i>
MASP	MBL-assozierte-Serin-Proteasen
MBL	Mannan-bindendes-Lektin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
N-terminal	aminoterminal
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

RNA	Ribonukleinsäure
SCID	<i>severe combined immuno-deficiency</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNV	<i>single nucleotide variants</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UV	Ultraviolette Strahlung
w/v	weight/volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1. Das Komplementsystem

1.1.1. Zur Geschichte des Komplementsystems

Voraus bemerkt sei noch, dass weder Neutralisieren des Serums noch Behandlung von Pepsin, weder Entfernung der Kohlensäure noch Behandlung mit Sauerstoff einen Einfluss auf die bakterientödtende Wirkung äussern. Alle in dieser Richtung angestellten Versuche hatten nur negative Ergebniss; wir hatten bisher überhaupt nur ein Mittel kennen gelernt, um die Wirkung des Serums aufzuheben: die halbstündige Erwärmung auf 55° C oder die 6-stündige Erwärmung auf 52° C. Es gibt aber noch ein Mittel, welches das gleiche Bewirkt, und das ist die Dialyse.

H. Buchner „Ueber die nähere Natur der bakterientödtenden Substanz im Blutserum“ 1889 (1)

Der deutsche Immunologe Hans Ernst August Buchner (1850-1902) beschrieb 1889 eine „bakterientödtende Wirkung des zellfreien Blutserums“ (2), nachdem er beobachtete, dass sich das Wachstum von *Salmonella Typhi* in Anwesenheit von Serum deutlich inhibieren ließ. Eine Erwärmung des Serums auf 55° C über eine Stunde hob diesen Effekt jedoch auf. Er schloss daraus, dass es neben der zellulären Immunabwehr des Organismus, wie sie Metschnikow bislang propagierte, einen „gelösten“, nicht zellulären Faktor geben müsse, der eine effektive Immunantwort unterhalten könne. Er gab diesen im Serum gelösten Bestandteilen den Namen „Alexin“ (gr. ἀίεω = abwehren). Der belgische Immunologe Jules Bordet (1870-1961) beobachtete 1898, dass mit *Vibrio cholerae* immunisiertes Serum eine bakterizide Wirkung zeigte, dass diese, analog zu Buchner, nach Erwärmung auf 56° C aufzuheben, durch anschließende Zugabe geringer Mengen Serum aber wieder zu rekonstituieren sei (3). Er schloss daraus, dass es im Serum zwei Komponenten geben müsse, einen hitzelabilen und einen hitzestabilen. Diese Beobachtungen konnte er durch die Hämolyse von Erythrozyten nach Inkubation mit immunisierten Seren bestätigen und schuf hiermit die Grundlage für das erste „indirekte“ Nachweisverfahren einer Infektion, die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR), die den Nachweis von nicht oder unzureichend kultivierbaren Erregern, wie zum Beispiel Treponemen, möglich machte. Paul Ehrlich (1854-1915) nahm die Erkenntnisse Bordets in seinen

Ausführungen „Zur Theorie der Lysinwirkung“ (4) und „Ueber Hämolyse“ (5–7) auf und prägte den Begriff des „Komplements“ als Mittler des Effektes der Immunglobuline und einer „fermentativ“ wirkenden Substanz, dem eigentlichen Komplementsystem. Bordet wurde 1919 aufgrund seiner Arbeiten rund um das Komplementsystem und der Entwicklung der KBR mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Paul Ehrlich erhielt selbigen für seine Leistungen bereits 1908, zusammen mit Ilja Iljitsch Metschnikow. Buchner widerfuhr diese Ehre nicht.

1.1.2. Aufbau und Funktion

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems und zudem ein effektiver Bestandteil Antikörper-vermittelter Immunität (8). Es besteht aus über 30 Einzelfaktoren, von denen der Großteil im Plasma gelöst, ein kleinerer Teil zellgebunden ist. Die Faktoren des Komplementsystems besitzen ein Molekulargewicht zwischen 20 und 790 kDa und sind in allen elektroforetischen Gradienten des Serums zu finden. Faktor C3 erreicht mit einer Serumkonzentration von 1200 mg/l die höchste Konzentration aller Komplementfaktoren (9).

Die Funktion des Komplementsystems lässt sich in drei Hauptgruppen aufteilen (8):

a) Erregerabwehr:

- Opsonierung von Pathogenen durch „Markierung“
- Aktivierung und Chemoattraktion von Leukozyten
- Bildung von Anaphylatoxinen
- Lyse von Pathogenen und Zellen

b) Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität:

- Verstärkung der Antikörperantwort
- Stimulation des immunologischen Gedächtnisses

c) Entsorgung von „Abfall“:

- Beseitigung von Immunkomplexen
- „Abräumen“ apoptotischer Zellen

Bislang sind drei verschiedene Aktivierungswege des Komplementsystems bekannt:

- a) **der „Klassische Weg“**
(C1q-vermittelt)
- b) **der „Lektin-Weg“**
(vermittelt durch Mannan-bindendes Lektin und andere Collectine)
- c) **der „Alternative Weg“**
(vermittelt durch Bindung des „spontanaktiven“ Komplementfaktors C3 an z.B. ein Pathogen)

In jedem dieser Aktivierungswege sind einzelne Bestandteile, vergleichbar mit dem Gerinnungs- und Fibrinolyse-System, in Form einer *triggered-enzyme*-Kaskade hintereinandergeschaltet. Die enzymatisch aktiven Komplementkomponenten liegen zunächst in einer Proenzymform (Zymogen) vor, die erst nach proteolytischer Spaltung ihre Funktion wahrnehmen.

Alle drei Wege münden in einer gemeinsamen Endstrecke, aus der sich der „membran-attacking-complex“ generiert.

Die Nomenklatur des Komplementsystems folgt den Standardisierungen der WHO von 1968 bis 1993 (10–17). Die Komplementbestandteile des Klassischen Wegs und der Endstrecke werden demnach als Komponenten bezeichnet und mit dem Großbuchstaben „C“ („*Components*“) versehen. Diesem schließt sich eine Zahl von 1 bis 9 an, die jedoch nicht der Reihenfolge der Aktivierungsschritte folgt, sondern fortlaufend nach ihrer Entdeckung erfolgt (C1, **C4**, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9) (10). Nach ihrer Spaltung werden dem größeren Spaltprodukt (eine Serinprotease) ein „b“ („*big*“) angehängt, dem kleineren ein „a“ („*small*“). So resultiert aus der Spaltung von C4 -> C4b und C4a. Eine Ausnahme stellt in diesem System C2 dar.

Die Komplementbestandteile des Alternativen Weges werden als Faktoren bezeichnet und ausnahmslos mit Großbuchstaben versehen, die Spaltprodukte analog den Komponenten des Klassischen Weges mit „b“ und „a“ (12). Der Lektin-Weg besteht aus dem Mannan-bindenden Lektin und seinen Serin-Proteasen MASP1 und MASP2 sowie anderen Collectinen, die dann in den Klassischen Weg einmünden.

Erfolgt während der Komplementaktivierung eine Inaktivierung eines Komplementbestandteils durch enzymatischen Einfluss, so wird ihm ein „i“ vorangestellt, erfolgt diese „spontan“ (z.B. durch Hydrolysierung), so wird das „i“ nachgestellt.

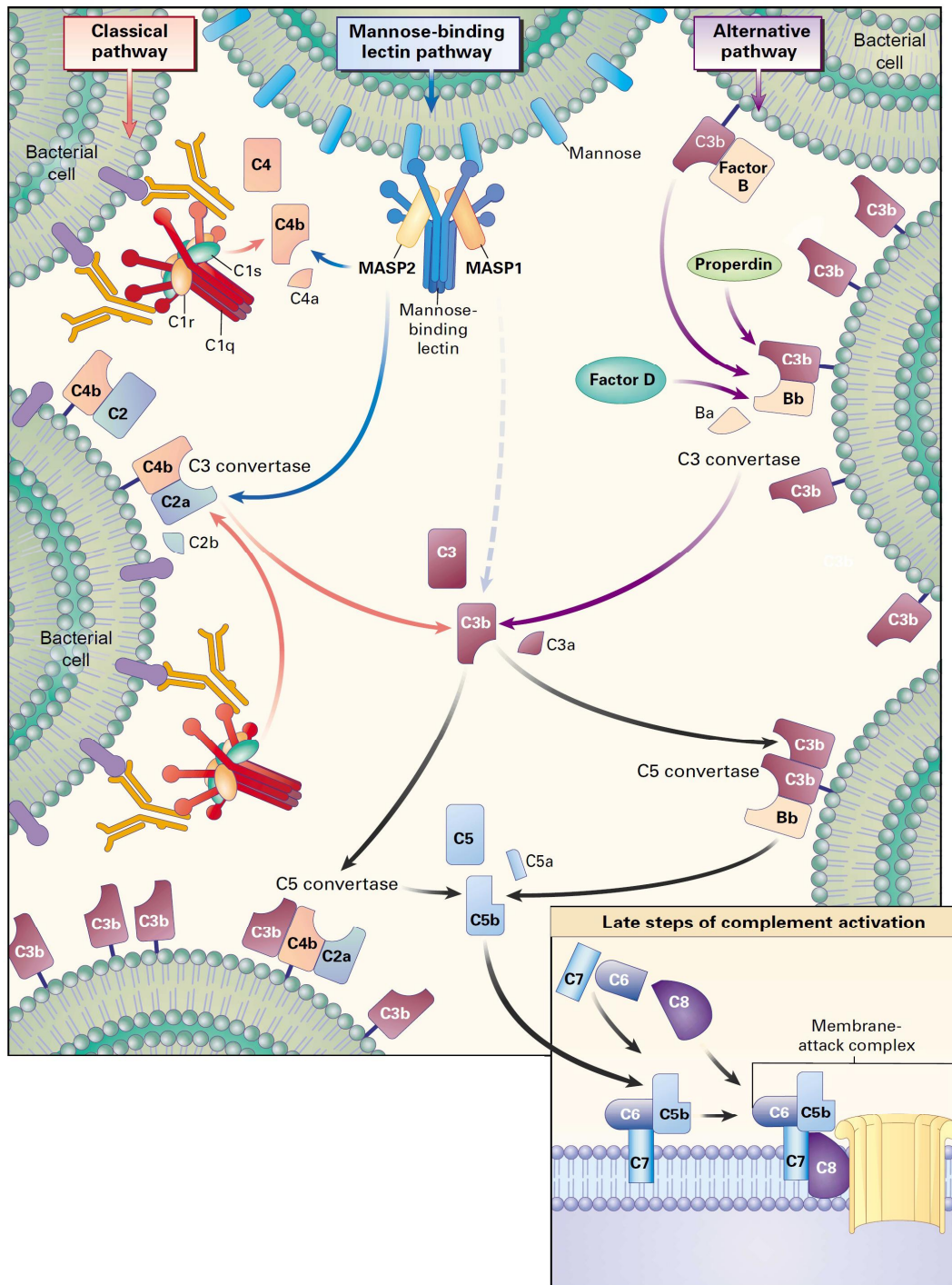


Abbildung 1: Das Komplementsystem (8)

1.1.3. Der Klassische Weg

Die erste Komponente des Klassischen Weges ist das C1, welches seinerseits einen Komplex aus 1 C1q- und jeweils 2 C1r- und C1s-Faktoren bildet (siehe Kapitel: Der C1-Komplex). Durch Bindung von mindestens zwei globulären Anteilen des C1q-Moleküls an einen Aktivator kommt es zu einer Konformationsänderung im Gesamtmolekül, die zur Freisetzung der autokatalytischen Funktion des C1r führt, welches seinerseits C1s in eine aktive Protease überführt. Entgegen der anderen Komponenten des Klassischen Weges kommt es beim C1-Molekül nicht zu einer Abspaltung in „a“- und „b“-Fragment, sondern zu einer Aktivierung der Protease durch Konformationsänderung. Als Ligand für die Bindung an den C1q-Anteil dienen Pathogene und Immunglobuline. Somit stellt C1 auch ein Bindeglied zwischen „angeborener“ und „erworbener“ Immunität dar.

Die nach der Konformationsänderung freigewordene Protease C1s spaltet ihrerseits nun die Komponente C4 in C4b/a. Diese Spaltung aktiviert am C4b eine hochreaktive Thioesterbindung, die, wenn sie nicht mit Hydroxyl- oder Aminogruppen kovalente Bindungen eingeht, schnell hydrolysiert wird. Somit wird gewährleistet, dass der Effekt örtlich begrenzt bleibt. Bindet C4b an z. B. Oberflächen von Pathogenen, kann sich C2 anlagern. C2 wird daraufhin von C1s in seine aktive Form C2a überführt. Der letztendlich durch diese Kaskade entstehende C4bC2a-Komplex bildet eine C3-Konvertase, deren Aufgabe die Spaltung von C3 in C3b und C3a darstellt. C3b, analog zu C4b, besitzt eine hochreaktive Thioesterbindung und hüllt den „Zielorganismus“ ein.

C3a selbst fungiert wie auch C4a und im weiteren C5a als Peptid-Entzündungsmediator, Anaphylatoxin, durch Bindung an spezielle Rezeptoren an der Oberfläche von z. B. Endothelzellen und Mastzellen und kann somit eine lokale Entzündungsreaktion über Histaminfreisetzung (Mastzellen), Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und Endothelsequestrierung bewirken (8, 18).

1.1.4. Der Lektin-Weg

Der Initiator des Lektin-Weges, das mannosebindende Lektin, ist funktionell und strukturell vergleichbar mit dem C1q. MBL zählt, im Gegensatz zu C1q, zu den Collectinen, denen ihr charakteristischer Aufbau gemeinsam ist. Es besteht aus einer Erkennungseinheit (2–6 kohlenhydratbindende globuläre Anteile), an die zwei Serinproteasen, MASP1 und MASP2, gekoppelt sind. Auch hier führt die Bindung der Arme an z. B. Mannosereste, die bei Vertebraten meist durch Sialinsäure „versteckt“ sind, zu einer Konformationsänderung, die ihrerseits die Serinproteasen MASP1 und MASP2 offenlegt und aktiviert. Analog zum Klassischen Weg spalten diese Proteasen nun C4 und C2 und bilden dann die C3-Konvertase.

1.1.5. Der Alternative Weg

„Alternativ“ zum Klassischen Weg existiert eine weitere Möglichkeit der C3-Aktivierung. Dieser Weg ist unabhängig von einer Erkennungseinheit wie C1q und MBL. Voraussetzung ist hier die spontane Hydrolyse der Thioesterbindung von C3 (*tickover*) in C3(H₂O), welches funktionell dem C3b entspricht. Dieses lagert sich spontan an Oberflächen an und bindet hier den Faktor B, der durch diese Bindung wiederum erst durch Faktor D in seine aktive Form Bb überführt werden kann. Der so entstandene Komplex C3(H₂O)Bb stellt seinerseits wieder eine C3-Konvertase dar, die ihrerseits durch Faktor P (Properdin) stabilisiert wird und somit ihre Halbwertszeit um das 10-fache erhöht. Die hierbei entstandene C3-Konvertase aktiviert wiederum C3 und es bildet sich eine Aktivierungsschleife (*amplifikation loop*). Der Alternative Weg ist somit in der Lage, die beiden vorher genannten zu unterstützen und die Bildung und Akkumulation von C3b zu potenzieren (8, 18).

1.1.6. Die gemeinsame Endstrecke des Komplementsystems

Alle drei Wege der Komplementaktivierung führen zur Anhäufung von C3b auf dem Pathogen in Form von C4b2b3b und C3bBb. Der C3b-Anteil besitzt in diesen Komplexen eine C5-Bindungsstelle; C5 seinerseits, durch die Bindung an C3b, wird für die Proteasenaktivität von C2b und Bb zugänglich und es entsteht so C5b und C5a. C5b bindet an C6 unter Bildung des C5bC6-Komplexes, an den sich nun C7 anlagern kann. Letzteres führt zu einer Konformationsänderung des Gesamtkomplexes unter Freisetzung eines hydrophoben Bereiches. Dieser ist Voraussetzung für die Einlagerung in die Lipid-Doppelschicht einiger Pathogene. Dort angelangt, initiiert der C5bC6C7-Komplex durch Bindung von C8 β an C5b die Ausbildung des terminalen membranangreifenden Komplexes. Gebunden kann der hydrophobe Anteil des C8-Moleküles C8 α - γ nun die Polymerisierung von bis zu 16 C9-Molekülen initiieren. Dieses Polymer bildet nun eine Pore in der Zellmembran, die durch Störung der Homöostase zum Untergang der Zelle führt oder aber auch Enzymen den Weg in die Zelle ermöglicht (19).

Neben diesem direkt zytotoxischen Effekt leistet das Komplementsystem weitaus mehr. Komplement-Rezeptoren (CR) auf Zellen erkennen oberflächengebundenes Komplement und ermöglichen so zum Beispiel die direkte Opsonierung von Pathogenen oder apoptotischen Zellen. C3b und C4b werden deshalb auch Opsonine genannt. Ebenfalls als Opsonin wirksam sind inaktive Varianten des C3b, wie das iC3b und C3dg. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Komplementrezeptoren und deren Funktion.

Tabelle 1: Komplementrezeptoren und ihre Funktion (20)

Rezeptor	Spezifität	Funktionen	Zelltypen
CR1 (CD35)	C3b, C4b, iC3b	Regt Zerfall von C3b und C4b an; stimuliert die Phagozytose; Erythrozytentransport von Immunkomplexen	Erythrozyten, Makrophagen, Monozyten, PMN, B-Zellen, dendritische Zellen
CR2 (CD21)	C3b, iC3b, C3dg, Epstein- Barr-Virus	Teil des B-Zell-Corezeptors, Rezeptor des Epstein-Barr-Virus	B-Zellen, dendritische Zellen
CR3 (CD11b/ CD18)	iC3b	stimuliert die Phagozytose	Makrophagen, Monozyten, PMN
CR4 (gp150, 95) (CD11c/ CD18)	iC3b	stimuliert die Phagozytose	Makrophagen, Monozyten, PMN, dendritische Zellen
C5a- Rezeptor	C5a	Bindung von C5a, aktiviert G-Protein	Endothelzellen, Mastzellen, Phagozyten
C3a- Rezeptor	C3a	Bindung von C3a, aktiviert G-Protein	Endothelzellen, Mastzellen, Phagozyten

1.1.7. Die Regulierung des Komplementsystems

Ebenso wie die Blutgerinnung, die ein vergleichbares Kaskadensystem mit Zymogenen darstellt, erfährt auch das Komplementsystem eine Kontrolle durch multiple Regulierungsmechanismen.

Neben der spontanen Hydrolyse der aktivierten Komplementfragmente, die somit eine kurze biologische Halbwertszeit besitzen, existieren spezielle Kontrollproteine, die an unterschiedlichen Positionen des Systems regulatorisch eingreifen können.

Bereits im ersten Schritt des Klassischen Weges reguliert der C1-Inhibitor, ein Plasmaserin-Proteinase-Inhibitor (Serpine), durch Abspaltung von C1r und C1s von C1q eine überschießende Aktivierung des Komplementsystemes. Ein weiterer Regulator des Klassischen Weges stellt das C4-bindende Protein dar. Dieses verhindert die Anbindung von C2 an aktiviertes C4b und unterbindet somit die Ausbildung der C3-Konvertase (21)

Tabelle 2: Regulatoren des Komplementsystems (20)

Name	Regulierung der Komplementaktivierung
C1-Inhibitor	bindet an aktiviertes C1r, C1s und trennt von C1q
C4-bindendes Protein	bindet an C4b und blockiert C2-Bindung
Komplementrezeptor 1 (CR1)	bindet an C4b und blockiert C2 oder an C3b und blockiert Bb, Cofaktor für Faktor I
Faktor H (H)	bindet an C3b und blockiert Bb; Cofaktor für Faktor I
Faktor I (I)	Serinprotease, spaltet C3b und C4b
decay-accelerating factor (DAF)	Membranprotein, verdrängt Bb von C3b und C2b von C3b
Membran-Cofaktor-Protein (MCP)	Membranprotein, stimuliert Inaktivierung von C3b und C4b durch Faktor I
CD59 (Protektin)	Verhindert Ausbildung des membranangreifenden Komplexes auf autologen oder allogenen Zellen
Serumprotein S (Vitronektin)	Bindung an C7 im C5b67-Komplex und Verhinderung der Zellwandintegrierung von MAC
Anaphylatoxin-Inaktivator (Serum-Carboxy-Peptidase N)	Inaktivierung der Anaphylatoxine durch Abspaltung von Arginin

Eine gewisse Ausnahme stellt CR1 dar. Durch seine Aktivierung wird z.B. die Phagozytose gesteuert, daneben obliegt ihm auch eine regulierende Aufgabe, indem er die Bindung von C2 an C4b unterbindet, aber auch im Alternativen Weg die Bindung von B an spontan gebildetes C3b verhindert. Zudem wirkt er als Cofaktor für Faktor I, der direkt als Serinprotease C3b und C4b spaltet. Es erscheint offensichtlich, dass gerade der alternative Aktivierungsweg des Komplementsystems einer intensiven Regulierung bedarf. Spontan gebildetes C3b vermag an allen Zelloberflächen zu binden. Körpereigene Zellen tragen an ihrer Oberfläche CR1 und DAF (decay accelerating-factor). Diese konkurrieren um die Bindung von Faktor B an C3b, können Bb sogar aus der Bindung verdrängen (21).

Das Komplementsystem stellt ein komplexes und höchst effektives Kaskadensystem dar. Es vermag durch direkten Pathogenkontakt aktiviert zu werden und unterstützt durch Stimulation nach Bindung mit Immunglobulinen (C1) die Immunantwort auf zellulärer wie humoraler Ebene. Das Komplement spielt jedoch nicht nur eine herausragende Rolle in der Auseinandersetzung mit Pathogenen. Seine Rolle beim „Abräumen“ apoptotischen Zellmaterials erscheint ebenso effektiv wie bedeutsam (22).

1.2. Komplementdefizienzen und ihre Auswirkungen

Die drei Aktivierungswege des Komplementsystems werden von unzähligen Strukturen initiiert. So wird der Klassische Weg, wie vorab beschrieben, durch Immunkomplexe und apoptotische Zellen, aber auch durch zahlreiche Viren und gramnegative Bakterien und ligandenbindendes CRP aktiviert. Als Hauptaktivator des Lektinwegs gelten Mikroorganismen mit Mannose-Resten. Der Alternative Weg erfährt seine Aktivierung vornehmlich durch zahlreiche Bakterien, Viren, Pilze und Tumorzellen. Der Ausfall eines dieser Aktivierungswege muss folglich mit einer verminderten Abwehr gegenüber Mikroorganismen einhergehen. Darüber hinaus führen Störungen im Klassischen und Alternativen Weg zu einer erheblichen Beeinträchtigung zellulärer Regulatorsysteme mit Ausbildung von Autoimmunerkrankungen.

1.2.1. Komplementdefizienzen und bakterielle Infektionen

Drei verschiedene Formen der Komplementdefizienzen führen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakterieller Infektionen:

- a) Der Verlust der opsonisierenden Eigenschaften des Komplementsystems, welcher zu einer generellen Anfälligkeit gegenüber Krankheitserregern führt.
- b) Jegliche Defizienz, die zum Verlust der membranlytischen Aktivität des Systems führt, geht mit einer Erhöhung der Anfälligkeit gegenüber *Neisserien*-Infektionen einher.
- c) Der Verlust der Funktion im Lektin-Weg (8).

Störungen in der Antikörper-Synthese sowie der Phagozytenfunktion und funktionelle, wie hereditäre Defizienzen im Klassischen Komplementweg führen allgemein zu einer Anfälligkeit gegenüber *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae*-Infektionen. Gerade diesen Krankheitserregern gegenüber erscheint die Funktionstüchtigkeit einer antikörper-vermittelten Komplementaktivierung mit abschließender Phagozytose als wesentlich. Daneben gilt die Opsoninfunktion von C3b und iC3b als wesentlich in der Abwehr gegenüber bakteriellen Krankheitserregern. Gegenüber *Neisserien*-Infektionen, besonders *Neisseria meningitidis*, ist die Funk-

tionstüchtigkeit des membranlytischen Komplexes entscheidend. So erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, an einer *Neisseria meningitidis*-Infektion zu erkranken, bei Patienten mit einer Komplementdefizienz des Faktors C9 um das 5000-fache (23).

Störungen im Lektin-Weg, häufig verursacht durch eine MBL-Defizienz, führen zu einer Häufung von rekurrierenden Infektionen im Kindesalter (24). Dies stellt den Lektin-Weg als wesentlichen Abwehrmechanismus nach Verlust des mütterlichen Nestschutzes bis zur Ausreifung des erworbenen Immunsystems dar.

Das Komplementsystem wird von einigen, gerade intrazellulären Krankheitserregern als Eintrittspforte genutzt. So bindet das Hüllprotein gp350/220 des *Epstein-Barr-Virus* an Komplementrezeptor 2 (CD21) von B-Lymphozyten, was den Tropismus dieses Erregers erklärt (25). *Mycobacterium tuberculosis* und das *Humane Immundefizienz Virus* dagegen benutzen zellwandgebundenes C3b, um über Komplementrezeptoren in Zellen zu gelangen (26, 27).

1.2.2. Komplementdefizienzen und Autoimmunerkrankungen

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Komplementsystem und Autoimmunerkrankungen. So finden sich zum Beispiel beim SLE Immunkomplex-Komplement-Ablagerungen im Gewebe (Niere, Haut), zudem korrelieren reziprok Komplementkonzentrationen mit der Schwere der Erkrankung. Es erscheint daher naheliegend, dass die Komplement- und Leukozytenaktivierung ein wesentlicher Bestandteil in der Pathogenese des SLE spielen (siehe Kapitel 1.6: C1q und Autoimmunität). Eine wesentliche Aufgabe wird dem Klassischen und Lektin-Weg beim Abraum von nekrotischen und apoptotischen Zellen zugewiesen. Eine Persistenz dieser Zellen führt zu einer Immunisierung des Systems gegenüber den exprimierten antigenen Strukturen.

Im Weiteren erfolgt die Beschreibung der Defizienzen der jeweiligen Einzelkomponenten des Komplementsystems.

Defizienzen des Klassischen Weges

Eine homozygote hereditäre Defizienz jeder einzelnen Komponente des Klassischen Komplementweges (C1q, C1r, C1s, C4, C2) geht mit einer drastischen Erhöhung des Erkrankungsrisikos für einen SLE einher. Dabei variieren die Erkrankungswahrscheinlichkeit und die Krankheitsausprägung mit der Position der Komponente im Aktivierungsablauf (C1q > C4 > C1r/C1s > C2) (28).

C1q-Defizienzen

Walport et al. berichten in ihrer Übersichtsarbeit von 41 Patienten aus 23 Familien mit C1q-Defizienz (28). 38 dieser Patienten entwickelten klinische Symptome, die einem SLE zugeordnet werden können (36 Erythem, 16 Glomerulonephritis, 7 ZNS-Symptomatik). Die klinische Symptomatik setzt typischerweise bei der hereditären C1q-Defizienz sehr früh ein (6 Monate bis 42 Jahre, Median 6 Jahre) und zeigt keine geschlechtsspezifische Verteilung. Untypisch scheint das Auftreten von Anti-dsDNA-Antikörpern bei der hereditären C1q-Defizienz zu sein (5 von 24 Patienten). Im Vergleich zu Gesunden zeigen Patienten mit einer hereditären C1q-Defizienz erhöhte Serumkonzentrationen von C3, C4 und des C1INH. Daneben litten 13 der beschriebenen Patienten an rekurrenten Infektionen (Otitis media, Meningitis, Pneumonie). Vier dieser Patienten verstarben schon in früher Kindheit an Sepsis. Neun Patienten litten an chronischen Pilzinfektionen (Stomatitis, Onychomykose). Heterozygote Träger einer Mutation im C1q-Gen zeigten dagegen keine klinische Symptomatik. Auch die von Marquart et al. untersuchten Geschwister zeigten alle eine SLE-typische klinische Symptomatik (29). Bei einem der Kinder fehlte jedoch eine positive Anamnese für schwere, rekurrende Infektionen. Eine genauere Beschreibung der C1q-Defizienzen findet sich im Kapitel C1q-Komplex.

C1r- und C1s-Defizienzen

Seltener als eine C1q-Defizienz ist eine Defizienz der katalytischen Einheiten des C1-Komplexes C1r und C1s (19 beschriebene Fälle). 8 der 14 Patienten, die in der Übersicht von Pickering et al. aufgeführt werden, leiden unter einem SLE-ähnlichen Syndrom (30). Ebenso, wenn auch mit einer geringeren Ausprägung als bei der C1q-Defizienz, zeigte sich bei den Betroffenen eine erhöhte Anfälligkeit für rekurrende Infektionen. Analog zur C1q-Defizienz ist die C3-, C4- und C1INH-Serumkonzentration erhöht (30).

C4-Defizienzen

C4 findet sich in zwei verschiedenen Isotypen, C4A und C4B, im Serum. Die kodierenden Gene sind allel im MHC-Klass-III-Komplex auf Chromosom 6 angelegt. Eine komplette Defizienz setzt Mutationen in beiden Genen voraus. Ein „Nullallel“ eines der beiden Gene mit Defizienz von C4A (C4AQ*0) und C4B (C4BQ*0) ist recht häufig. Nullallele beider Gene sind dagegen extrem selten (26 beschriebene Fälle). Analog zu den C1-Defizienzen zeigen diese eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit für einen SLE (18/24) (30). Anti-dsDNA-Antikörper fanden sich auch hier in nur 2 von 11 getesteten C4-defizienten Patienten.

C2-Defizienzen

Die homozygote C2-Defizienz ist die häufigste vererbte Komplement-Defizienz des Klassischen Weges. Sie findet sich mit einer Häufigkeit von 1:20.000 bei der kaukasischen Bevölkerung Westeuropas (30). Jönsson et al. zeigten für eine Kohorte schwedischer C2-defizienter Patienten eine Prävalenz SLE-ähnlicher Symptomatiken von 25% (31). Wie auch in der Übersicht von Pickering et al. konnten Jönsson et al. eine relative Häufung rekurrender Infektionen erkennen (ca. 50%), beschrieben aber auch eine Vielzahl vollkommen asymptomatischer C2-Defizienter.

C3-Defizienzen

Homozygote hereditäre C3-Defizienzen gehen mit einer extremen Erhöhung der Inzidenz für rekurrende bakterielle Infektionen, gerade bekapselter Bakterien wie *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae*, einher (30). Diese Infektionen treten bei den Betroffenen hauptsächlich in der Kindheit auf, was die Rolle von C3 als Opsonin bei noch „unausgereiften“ erworbenen Immunmechanismen hervorhebt. Pickering et al. konnten in ihrer Übersicht C3-defizienter Patienten (23 der insgesamt 27 beschriebenen Fälle) nur zwei Patienten mit einem SLE-ähnlichen Symptomenkomplex beschreiben. Das Auftreten von mesangioproliferativen Glomerulonephritiden ist mit einer C3-Defizienz assoziiert (30). Diese Erkrankung ist, analog zur Nierenbeteiligung beim SLE, durch eine Ablagerung von Immunkomplexen gekennzeichnet. Den Unterschied macht die fehlende Komplement-Aktivierung mit einhergehendem -Verbrauch aus.

MBL-Defizienzen

Die am häufigsten vorkommende Komplement-Defizienz mit einer Prävalenz von 5-10% der kaukasischen Bevölkerung ist der MBL-Mangel (32). Die Serumkonzentration von MBL variiert bei Gesunden zwischen 0 und 5 µg/ml (33), so dass eine konzentrationsbezogene Definition für einen MBL-Mangel schwierig festzulegen ist (34).

Bislang wurden drei Mutationsmuster des MBL2-Gens detektiert. Bei allen handelt es sich um eine „single-base-mutation“ im Exon 1 (Codon 52, 54 und 57) mit dem Resultat eines „Defektproteins“ bzw. vollkommenen Fehlens intakten MBL. Diese drei Varianten zeigen eine unterschiedliche Häufung zwischen ethnischen Gruppen. Die Mutation im Codon 54 findet sich in 22-28% der eurasischen Bevölkerung. Bei 50-60% der Sub-Sahara-Bevölkerung findet sich im Gegensatz dazu die Mutation im Codon 57 (33). MBL-Defizienzen führen zu einer erhöhten Infektanfälligkeit, gerade bei Neu- und Frühgeborenen, jedoch auch bei Erwachsenen und Kindern (35). In einer Studie 92 afroamerikanischer SLE-Patienten zeigte sich eine Häufung der Mutation in Codon 54 und 57 gegenüber Gesunden. Zudem zeigte sich, dass ein Promotor-Polymorphismus, der mit einer hohen MBL-Konzentration assoziiert ist, bei Lupus-Patienten nicht oder nur selten zu finden ist (36).

Defizienzen im Alternativen Weg (AP)

Der Alternative Weg führt über einen „amplification loop“ zur einer Akkumulation der C3-Konvertase C3bBb, stabilisiert durch Properdin. Es liegt nahe, dass Defizienzen des AP zu selben klinischen Ausprägung wie eine C3-Defizienz führen.

Die häufigste Defizienz im AP ist die Properdin-Defizienz, die X-chromosomal vererbt wird. Truedsson et al. unterteilen die Properdin-Defizienzen in drei verschiedene Typen (37). Typ I beschreibt das vollkommene Fehlen von Properdin, Patienten mit einer Typ II-Defizienz zeigen eine um 90% reduzierte Properdin-Serum-Konzentration. Patienten mit einer Typ III-Defizienz haben normale Serum-Konzentrationen eines jedoch nahezu nicht funktionellen Properdins. In allen drei Typen ist das Erkrankungsrisiko für Meningokokkeninfektionen deutlich erhöht (50%). Zudem zeigt sich eine extrem hohe Letalität (75%) gegenüber Patienten mit einer Defizienz im Endstreckenweg der Komplement-Kaskade (2,9%). Eine Häufung von SLE-Symptomen zeigte sich bei Properdin-Defizienzen nicht, sie ist somit vergleichbar mit der Frequenz bei C3-Defizienten (37).

Eine Faktor B (fB)-Defizienz wurde bislang nur ein Mal beschrieben (38). Auch dieser Patient litt vermeintlich unter einer Meningokokkeninfektion und zeigte ein nicht funktionelles fB-Protein. Zu Faktor D (fD)-Defizienzen finden sich zum jetzigen Zeitpunkt nur 3 Einzelbeschreibungen (39–41). Auch hier zeigten alle Betroffenen rekurrende Meningokokkeninfektionen. Autoimmunerkrankungen fanden sich in diesem Klientel nicht, auch wenn eine Häufung von mesangialer Immun-Komplex-Glomerulonephritis in fD-knock-out-Mäusen aufgezeigt werden konnte (42).

Defizienzen in der gemeinsamen Endstrecke des Komplementsystems (C5, C6, C7, C8, C9)

Die Prävalenz von C5-, C6-, C7-, C8- und C9-Defizienzen variiert erheblich geographisch und innerhalb ethnischer Gruppen (43). So fanden sich in Großbritannien 30 C5-, 80 C6-, 70 C7- und 70 C8-Defizienzen. Daneben wird die Prävalenz von C5-Defizienzen in Japan auf 0,0014%, von C6-Defizienzen auf 0,0027%, von C7-Defizienzen auf 0,0041%, von C8-Defizienzen auf 0,0027% und von C9-Defizienzen auf 0,009% bis 0,1% geschätzt (Bevölkerung Japan ca. 128 Millionen (44)). Patienten mit Defizienzen in der gemeinsamen Endstrecke leiden unter rekurrierenden Infektionen mit *Neisseria meningitidis* und systemischen *Neisseria gonorrhoeae*-Infektionen. Im Gegensatz zur Properdin-Defizienz ist die Mortalität jedoch nicht erhöht. Autoimmunerkrankungen sind nicht mit Defizienzen der gemeinsamen Endstrecke assoziiert (45).

Defizienzen der Komplement-Regulatoren

C1-Inhibitor-(C1INH)-Defizienz

Eine hereditäre oder erworbene C1INH-Defizienz verursacht ein angioneurotisches Ödem (Quincke-Ödem). Die Häufigkeit einer C1INH-Defizienz wird auf 2-10 auf 100.000 geschätzt (46). Auch der C1INH-Mangel wird in 3 verschiedene Typen unterteilt. Typ I zeigt verminderte C1INH-Spiegel (~ 85% der Fälle), Typ II ist gekennzeichnet durch normale Serumspiegel, jedoch verminderte bis fehlende Funktion (~ 15% der Fälle). Typ III (< 1% der Fälle) zeigt normale Serumspiegel und eine unter Hormoneinfluss auftretende Störung bei Frauen noch unbekannter Genese (46). Allen Formen des Angioödems ist das Auftreten von Schwellungen des tiefen kutanen, subkutanen oder submukösen Gewebes gemeinsam. Typisch für das hereditäre Angioödem scheinen intestinale Beschwerden wie Bauchschmerzen, Durchfälle und Erbrechen zu sein, die durch ein intestinales Ödem zu erklären sind. Diese Ödeme sind Kinin-vermittelt. C1INH inhibiert, neben seiner Rolle als Inhibitor der C1- und MBL-Aktivierung, die Umwandlung von Präkallikrein zu Kallikrein durch Faktor XII und ist somit ebenso ein Regulator des Angiotensin- und Bradykinin-Weges. Neben dem hereditären C1INH-Mangel kommt es im Rahmen von

Lymphomen zur erworbenen C1INH-Defizienz aufgrund Autoantikörperbildung gegen C1INH.

Faktor H (CFH)- und Faktor I (CFI)-Defizienzen

Komplement-Faktor H (FH) und Komplement Faktor I (FI) sind die Regulatoren des Alternativen Komplementweges. Ihr Fehlen resultiert in einer unkontrollierten Aktivierung des AP mit damit einhergehendem Verbrauch an Faktor C3. Sie führen somit zu einem C3-Mangel und den damit verbundenen oben beschriebenen Krankheits-symptomen.

Komplement-Rezeptor-Defizienzen

CD59-Defizienz

CD59 ist ein Glykopeptid an der Zelloberfläche, welches die Entfaltung von C9 im MAC unterbindet. CD59 wird durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker in der Zellmembran befestigt. Die Mutation in dem codierenden Gen (*PIG-A*) führt zum Verlust der Verankerung des CD59 und somit zu einer vermehrten Bildung des MAC auf den betroffenen Zellen (43). Das klinische Korrelat dieser Mutation ist die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (Marchiafava-Micheli-Syndrom) mit einer Inzidenz von 1:100.000 bis 1:500.000 pro Jahr (47). Die Patienten leiden unter einer Hämolyse, Thrombophilie und Panzytopenie aufgrund eines erhöhten MAC-vermittelten Zelluntergangs.

1.3. Der C1-Komplex - Funktion und Aufbau

Seit langem gilt der C1-Komplex als Erkennungs- und Initiatoreinheit in der Abwehr von Pathogenen. Dabei kann der direkte Kontakt zum Pathogen zur Aktivierung führen, aber auch die Bindung von CRP (48) und Immunglobulinen (49) vermögen C1 zu aktivieren und somit den klassischen Weg des Komplementsystems zu initiieren. Daneben beleuchten neuere Untersuchungen weitaus komplexere Zielstrukturen der C1-Erkennungseinheit. So scheint C1q wesentlich an der Entzündungsreaktion beim Morbus Alzheimer durch die Bindung an β -Amyloid-Fibrillen verantwortlich zu sein (50), auch erkennt C1q Prionen als Strukturverwandte neuronalen Gewebes (51). Eine weitere wichtige Erkennungsfunktion obliegt C1q durch das Binden an apoptotische Zellen, deren Elimination es hiermit initiiert (52). Seine ihm lange zugedachte Rolle als Mittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem erweitert sich zunehmend und beleuchtet C1q als pluripotente Erkennungseinheit von „Fremdstrukturen“.

1.3.1. Der C1-Komplex – Aufbau

C1 ist ein 790 kDa schwerer multimolekularer Komplex, der sich durch Assoziation einer Erkennungseinheit C1q und einer katalytischen Einheit, bestehend aus dem Ca^{2+} -abhängigen C1s-C1r-C1r-C1s-Serinproteasenkomplex, zusammensetzt. Die Bindung der C1q-Einheit an eine Zielstruktur führt zu einer Konformationsänderung der Erkennungseinheit, die das aktive Zentrum von C1r freilegt, welches C1s in seine aktive Form überführt (53). C1s wiederum aktiviert seinerseits die Komplementkomponenten des klassischen Wegs C4 und C2. Reguliert wird die C1-Aktivität weitestgehend durch den C1-Inhibitor (C1INH), einen Plasmaserinproteinase-Inhibitor aus der Familie der Serpine. Diese bindet an den aktivierten C1r:C1s-Komplex an und dissoziiert diesen von C1q ab (21). Neben der Inaktivierung über die Ablösung der Proteasen verhindert C1INH durch Bindung an nicht aktiviertes C1 eine immerwährende Komplementaktivierung durch frei zirkulierende Immunkomplexe (54). Ein Fehlen des C1INH geht mit dem „hereditären Angioödem“ einher. Durch ungebremste C1s-Aktivierung kommt es zu einer Akkumulation von C2b und seines Folgeprodukts C2-Kinin. Dies führt zu einer starken anaphylaktischen Reaktion mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit einhergehendem Ödem.

1.3.2. C1q – Struktur und Funktion

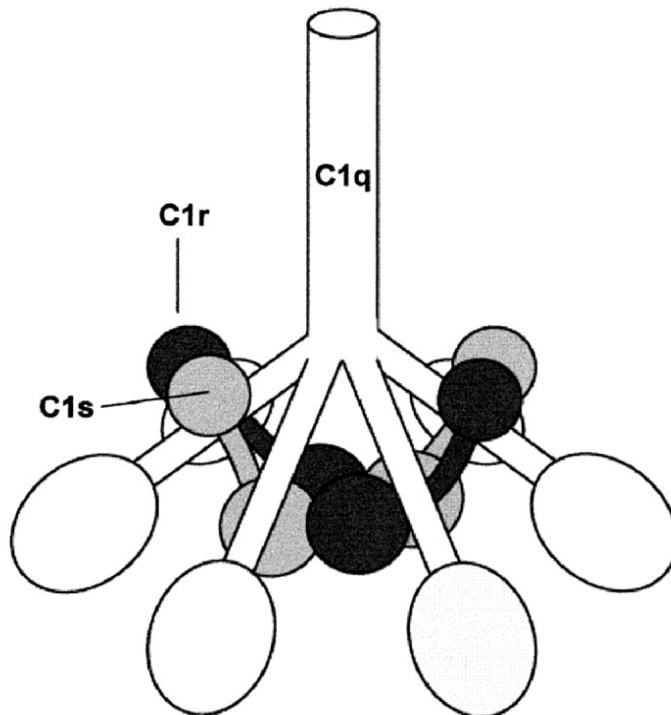


Abbildung 2: C1-Molekül (55)

Die Erkennungseinheit C1q (460 kDa) ist ein trimeres Protein, welches aufgrund seiner Gestalt häufig mit einem „Tulpenstrauß“ („*bouquet of tulips*“) verglichen wird. Es besteht aus insgesamt 18 Polypeptidketten (6A, 6B, 6C). Die A-Kette (223 Aminosäuren), B-Kette (226 Aminosäuren) und C-Kette (217 Aminosäuren) besitzen jeweils eine kurze (3-9 Aminosäuren) N-terminale Region, die einen Cystein-Rest für eine Disulfidbindung beinhaltet, gefolgt von einer kollagen-ähnlichen Region (~ 81 Aminosäuren) mit repetitiven *Gly-X-Y-Triplets*, wobei X häufig Prolin und Y Hydroxyprolin darstellt. Den C-terminalen globulären Anteil, die gC1q-Domäne (~ 135 Aminosäuren), schließt die jeweilige Kette ab (56). Insgesamt besitzt jede Kette 4 Cystein-Reste (Position 4, 125, 154, 171 Position der B-Kette). Das Cystein an Position 4 steht für eine Disulfidbindung unter den Ketten A-B und C-C zur Verfügung. Zwei weitere Cystein-Reste bilden eine Disulfidbindung innerhalb der Einzelketten. Der verbleibende Cystein-Rest steht für eine Interaktion mit einem Liganden (z. B. IgG) zur Verfügung (57) Es resultieren jeweils 6 dimere A-B- und C-C-Untereinheiten. Im Weiteren bilden eine A-B-Einheit und jeweils eine C-Kette einer C-C-Einheit die Struktureinheit ABC-CBA, die durch nichtkovalente und kovalente Bindungen zusammengehalten wird. 3 davon lagern sich zu dem C1q-Molekül zusammen (58).

Die katalytische Einheit C1r2-C1s2 ist an den kollagenen Anteil des C1q gebunden (siehe Abbildung 2).

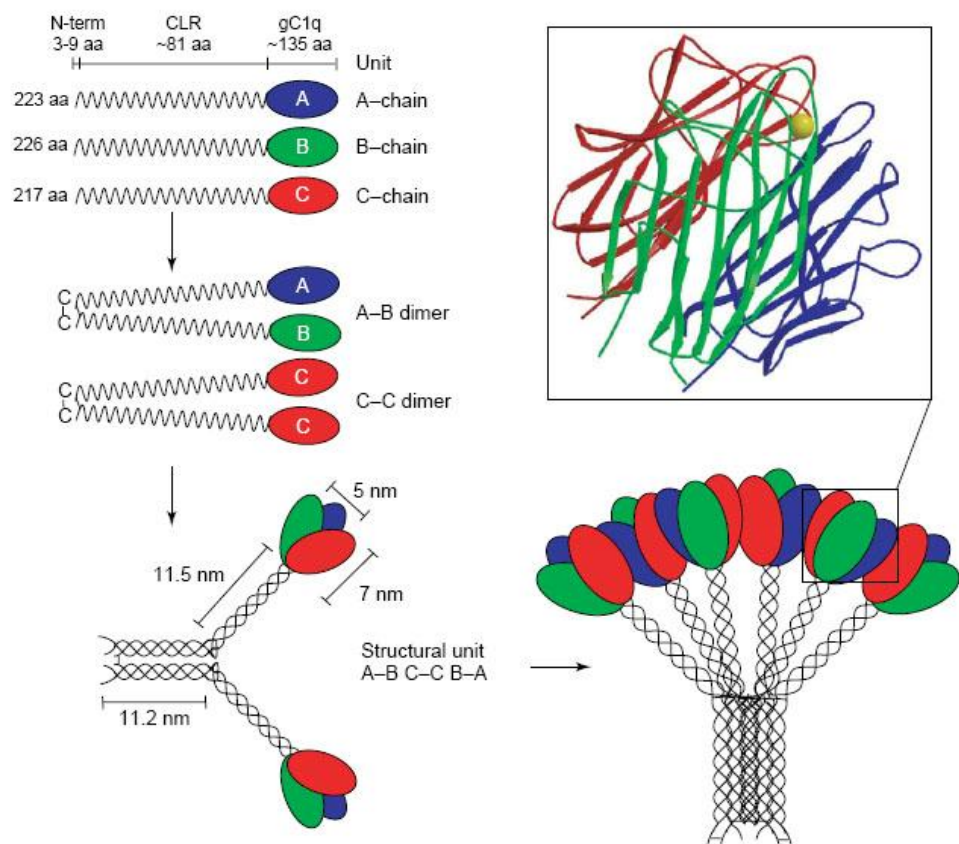


Abbildung 3: Ketten-Aufbau des C1q (nach Kishore und Reid (59))

Die Gene, die die A-, B- und C-Kette des menschlichen C1q kodieren, liegen auf der Region 1p34.1-1p36.3 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 (56). Sie liegen in 5' - 3' Richtung hintereinander in der Folge A-C-B auf einem 24 kb großen DNA-Abschnitt, wobei jedes einzelne Gen ca. 3 kb lang ist und jeweils durch Introns unterschiedlicher Größe in zwei Exons unterteilt wird (56). Das jeweils erste Exon aller drei Ketten-Gene kodiert das N-terminale Ende sowie annähernd die erste Hälfte des kollagenen Anteils. Exon 2 kodiert die zweite Hälfte des kollagenen Anteils sowie den jeweiligen globulären „Kopf“ (gC1q).

1.3.3. Bindung an C1q

Die globuläre Domäne gC1q wie auch die des MBL und anderer Collektine sind in der Lage *pathogen-assoziierte Merkmale* (PAMPs) und eine Vielfalt anderer Molekülmuster zu erkennen. Gemeinsam ist diesen „Erkennungsproteinen“ ihr Aufbau. So finden sich Cystein-Reste in der N-terminalen Region, eine kollagen-ähnliche Domäne, eine „*coiled-coil*“-Halsregion, die in eine globuläre Domäne mündet. Das Erkennungsmuster dieser Moleküle unterscheidet sich jedoch wesentlich. Ficoline, binden Kohlenhydratverbindungen von Pathogenen. Wie MBL erkennen sie auch N-Acetylglukosamin-Strukturen, Mannose-Reste werden von ihnen jedoch nicht erkannt. gC1q hingegen besitzt Erkennungseigenschaften gegenüber Immunglobulinen, was darauf schließen lässt, dass die evolutionäre Entwicklung zusammen mit der erworbenen Immunität zusammenfiel (21).

Die am ausführlichsten betrachtete Bindung des C1q ist die der Immunglobuline. Hier vermögen nur die Klassen IgM, IgG1, IgG2 und IgG3 über ihre Fc-Domäne mit gC1q zu interagieren, wobei die Bindung von zwei Fc-Domänen für eine Aktivierung notwendig und somit ein IgM-Molekül ausreichend ist. Da IgG nur über eine Fc-Region verfügt, sind 2 Moleküle Voraussetzung für eine Aktivierung, die dabei noch in einer kritischen Distanz von 30-40 nm an C1q anbinden müssen (60). Ungebundenes IgG bindet nur schwach, nach Antigenkontakt erhöht sich die Bindungsaffinität um das 1000-fache (59). Die Erkennungsstruktur gC1q zeigt einen Modularaufbau, bestehend aus den globulären „Köpfen“ der drei beteiligten Ketten A-B-C. Zwei dieser Module (*ghA* und *ghC*) haben ein ausgeglichenes Ladungsverhältnis, während *ghB* ein positives Ladungsverhältnis zeigt. Daneben liegt *ghB* in einer horizontalen Ausrichtung im C1q, wodurch es für Interaktionen mit Liganden bevorzugt scheint. Die Bindung negativ geladener Liganden geschieht in zwei Schritten. Durch eine initiale Bindung an gC1q kommt es zu einer Drehung im globulären Anteil und einer weiteren Exposition des *ghB*, der die Bindung festigt (61). Der Modularaufbau des C1q, kombiniert durch Exposition weiterer Bindungsstellen, ist die Voraussetzung für diese Unzahl an potenziellen Liganden. Dieses Strukturmuster findet sich daneben in weiteren Strukturproteinen (*Typ VIII und X Kollagen*), Effektorproteinen (*HP-20, -25, -27, -55*) und Immunmediatoren wie z. B. *TnF*. Neben der Bindung an den globulären Anteil gC1q vermögen einige Liganden auch an den kollagenen Anteil zu binden, wie z. B. C-reaktives Protein, Serum-Amyloid-Protein u.a (61).

Tabelle 3: Liganden des C1q (59)

Immunglobuline	Fc-Domäne des IgM, IgG1, IgG2, IgG3
nicht immunogene Proteine	CRP, C1r2-C1s2-Komplex, Fibronectin, SAP, Lactoferrin,
Polyanionen	Heparin, Chondroitinsulfat, ssDNA, dsDNA, LPS, Polynukleotide, Lipid A
Viren	HTLV-1, HIV-1, Polyoma-Virus
Zellen (über Rezeptoren)	B-Lymphozyten, Polymorphkernige Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Thrombozyten, apoptotische Zellen (Rezeptor-ungebunden)

1.4. C1q-Defizienz

Sekundäre funktionelle C1q-Defizienzen finden sich im Rahmen verschiedenster Krankheitsprozesse wie dem „hypokomplementämischen Urtikaria-Vaskulitis-Syndrom“ (HUVS), dem „severe immunodeficiency syndrom“ (SCID), dem SLE, im Rahmen von Hypogammaglobulinämien und anderer Autoimmunerkrankungen, als Folge eines erhöhten C1q-Verbrauchs (62). Gerade beim SLE findet sich häufig ein nicht-funktionelles C1q mit vermindertem Molekulargewicht (low molecular weight-C1q) als Ausdruck einer erhöhten „Produktionsrate“ im Rahmen eines C1q-Hyperkatabolismus (63), welches jedoch nicht zu verwechseln ist mit LMW-C1q im Rahmen einer hereditären C1q-Defizienz als Ausdruck einer mutationsbedingten Aberration im C1q-Aufbau (64).

Abzugrenzen von den funktionellen C1q-Defizienzen sind die hereditären C1q-Defizienzen. Wie oben beschrieben, finden sich hier entweder nicht-funktionelle C1q-Varianten oder C1q ist nicht nachweisbar. Somit ist den hereditären C1q-Defizienzen der Verlust der gesamthämolytischen Aktivität (CH50) gemeinsam, der nach Substitution von aufgereinigtem C1q wiederhergestellt werden kann. Zugrunde liegen allen Mutationen in einem der 3 C1q-Gene (Chromosom 1p34.11- 1p36.3). Bislang konnten 7 verschiedene Mutationen nachgewiesen werden (siehe Tabelle). Daneben konnten weiterhin 2 verschiedene „stille“ Mutationen detektiert werden (65, 66).

Tabelle 4: Mutationen bei hereditären C1q-Defizienzen*

Herkunft der Patienten	Mutation	C1q-Antigen
Slowakei Türkei (4 Familien) Zypern	C1qA Exon2/Gln-186-Stop-Codon	nicht nachweisbar
Mexiko	C1qB Exon 2/Arg-150-Stop-Codon	nicht nachweisbar
Grönland	C1qB Exon 2/Gly-217-Arg	nicht nachweisbar
Jugoslawien	C1qC Exon 2/Arg-41-Stop-Codon	nicht nachweisbar
England	C1qC Exon 2/Deletion Position 43 -> resultierend Stop-Codon 108	nicht nachweisbar
Marokko	C1qB exon 1/Gly-15-Asp	LMW-C1q nachweisbar
Deutschland Indien Saudi-Arabien	C1qC exon1/Gly-6-Arg	LMW-C1q nachweisbar

*Literaturangaben im Text

1.4.1. Mutationen der A-Kette

Im codierenden Bereich der A-Kette konnte bislang nur eine Mutation nachgewiesen werden. Der erste Nachweis konnte bei drei Kindern zweier Familien aus der Slowakei geführt werden. Die Eltern beider Familien waren blutsverwandt. Die Kinder zeigten SLE-ähnliche Symptomatik kombiniert mit einer erhöhten Infektanfälligkeit gegenüber bakteriellen Erregern. Die Gensequenzierung ergab eine Punktmutation an Position 186 mit der Folge eines vorzeitigen Stop-Codons (67). Dieselbe Mutation ließ sich im Weiteren bei vier Familien aus der Türkei und einer aus Zypern nachweisen (64, 68).

1.4.2. Mutationen der B-Kette

Bereits 1988 konnte bei einem Patienten mexikanischer Abstammung eine Punktmutation im Exon 2 des C1qB-Genes mit einhergehendem vorzeitigem Stop-Codon beschrieben werden (69). Dies war gleichzeitig der erste molekularbiologisch geführte Nachweis eines C1q-Defektes. Knapp 20 Jahre später wurde eine weitere Mutation bei drei Inuit-Kindern nachgewiesen (29). Hier handelt es sich um einen Basenaustausch an Position 217, der den Austausch von Glycin gegen Arginin zur Folge hat. Bei allen drei Kindern konnte C1q immunologisch nicht nachgewiesen werden. Alle drei leiden unter SLE-ähnlichen Symptomen unterschiedlicher Ausprägung.

Neben diesen obengenannten C1q-Defizienzen im C1qB-Gen ohne Nachweis eines C1q ist eine weitere Mutation mit Produktion eines aberranten C1q beschrieben worden (70). Hierbei führt eine Punktmutation an Position 15 im Exon 1 zu einem Basenaustausch (Glycin gegen Aspartat) im kollagenen Anteil der B-Kette mit funktionellem Verlust der C1q-Aktivität bei erhaltenem immunologischen (Ouchterlony-Test) Nachweis eines funktionslosen C1q.

1.4.3. Mutationen der C-Kette

Zwei Mutationen im C1qC-Gen mit komplettem Verlust der C1q-Synthese konnten bislang detektiert werden (71). Die eine fand sich bei einer in England lebenden Kaukasierin mit einer Deletion in Codon 43, die zu einem *Frame-shift* mit vorzeitigem Stop-Codon an Position 108 führt. In derselben Arbeit wurde eine weitere Mutation dargestellt. Hierbei handelt es sich um einen Patienten aus Ex-Jugoslawien, bei dem eine Transition (C→T) im Codon 41 (Arg) nachgewiesen werden konnte, die zu einem Stop-Codon führt.

Auch in dem C1qC-Gen konnte eine Mutation in dem, den kollagenen Abschnitt kodierenden Bereich unter Erhalt eines LMW-C1q nachgewiesen werden (67, 71–73). Ursache ist hier eine „*missence*“-Mutation im Codon 5 (GGG->AGG), die zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin führt.

1.4.4. Stille Mutationen („single nucleotide variants“)

Neben den obengenannten Mutationen mit einhergehender hereditärer C1q-Defizienz konnten in einer Genanalyse C1q-mutations-tragender Patienten 2 weitere „stille“ Mutationen aufgezeigt werden (65). Der Begriff „stille“ Mutation bezeichnet einzelne Nukleotidvarianten („single nucleotide variants“, SNV). Alle untersuchten Patienten mit homozygoter C1q-Mutation zeigten eine homozygote „stille“ Mutation an Position Gly70 des C1qA-Gens im Exon 2. Daneben fand sich bei diesen Patienten zusätzlich eine weitere „stille“ Mutation an Position Pro14 des C1qA-Gens im Exon 1. Keine dieser „stillen“ Mutationen konnten dagegen bei den Patienten mit C1qB Exon 2/Gly-217-Arg-Mutation aus Grönland nachgewiesen werden (29).

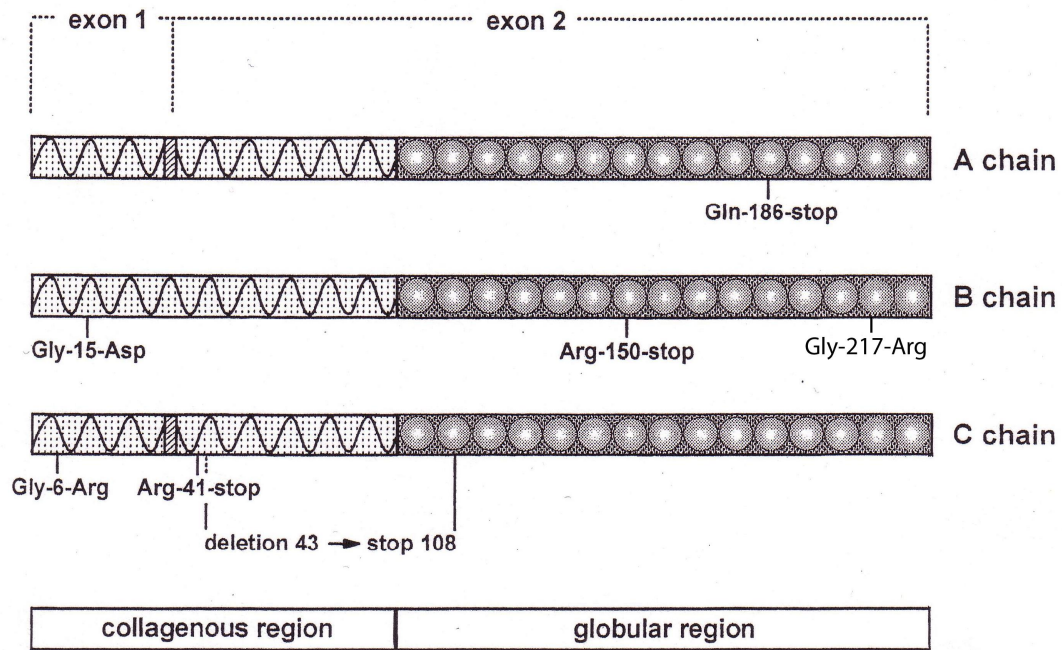


Abbildung 4: Übersicht der bislang bekannten C1q-Gen-Mutationen*(70)
 * Originalabbildung mit Gly-217-Arg ergänzt

1.5. Systemischer Lupus erythematoses

1.5.1. Definition

Der Lupus erythematoses (aus dem lateinischen lupus „Wolf“ und dem griechischen ἐρυθμία „Röte“) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch die Bildung von Autoantikörpern gegen Zellkernbestandteile geprägt ist. Die klinische Symptomatik ist stark variabel, sie reicht von einer rein kutanen Manifestation (kutaner Lupus erythematoses) bis hin zum Befall mehrerer Organe, von dem besonders die Lupusnephritis, aufgrund der damit einhergehenden hohen Letalität, besonders gefürchtet ist. Die Erkrankung verläuft in aller Regel schubweise, eine anfänglich rein kutane Manifestation kann im Laufe der Erkrankung in einen generalisierten Organbefall münden. Eine Sonderform stellt der medikamentös induzierte Lupus erythematoses dar. Bei diesem verursacht die Einnahme gewisser Medikamente (z.B. Antibiotika, Neuroleptika, Antiarrhythmika u.a.) eine Lupus-Symptomatik, die sich nach Absetzen des verursachenden Agens wieder zurückbildet. Im Weiteren wird vornehmlich auf die systemische Form (Systemischer Lupus erythematoses, SLE) eingegangen.

1.5.2. Prävalenz

In Mitteleuropa und Nordamerika geht man von einer Prävalenz des SLE von 40:100.000 Personen aus (74). Frauen im gebärfähigen Alter erkranken am häufigsten. Auffallend ist ebenso die deutliche Geschlechtsverteilung von 3-4 erkrankten Frauen auf einen erkrankten Mann.

Epidemiologische Daten aus den USA zeigten eine erhebliche Inzidenzsteigerung des SLE. Im Zeitraum von 1950-1979 betrug hier die Inzidenzrate der kaukasischen Bevölkerung 1,51:100.000 gegenüber 5,56:100.000 von 1980-1992 (75). Gründe hierfür sind zum einen die verbesserte Diagnosestellung durch Einführung von eindeutig definierten Diagnosekriterien sowie die Einführung der Antikörperdiagnostik mittels Immunfluoreszenz- und ELISA-Methoden. Daneben wird jedoch auch der Einfluss oraler Antikontrazeptiva, Östrogen-Ersatztherapie, Exposition gegenüber ultravioletter Strahlung und inhalatives Rauchen als Verursacher der Inzidenzsteigerung verantwortlich gemacht (74). Die Prävalenz bei Kindern und Jugendlichen wird mit 5-10 pro 100.000 angegeben (74). Erkrankungen im Kleinkindesalter gelten als extrem selten.

1.5.3. Genetik

Das 20–40-fach erhöhte Risiko gegenüber der Normalbevölkerung für Familienmitglieder eines SLE-Kranken, ebenso an einem SLE zu erkranken, legt den Schluss nahe, dass es sich beim SLE um eine genetisch determinierte Erkrankung handelt (76). Dafür spricht auch eine 10-fach erhöhte Konkordanz bei eineiigen gegenüber zweieiigen Zwillingen. Genanalysen und Stammbaum-untersuchungen konnten bislang mehrere Kandidatengene identifizieren, bei denen SNVs (single nucleotide variants), Allele und Mutationen das Auftreten eines SLE oder dessen Ausprägung begünstigen bzw. determinieren (siehe Tabelle 5)

Weiterhin kommen Defizienzen der Komplementfaktoren C1q, C2 und C4 eine besondere Bedeutung zu, die im Vorherigen (siehe 1.2.2.: Komplementdefizienzen und Autoimmunerkrankungen) näher erläutert wurden.

Die Identifizierung von Kandidatengenen für den SLE ließ Tiermodelle folgen, bei denen jedoch deutlich wurde, dass scheinbar mehr als ein Kandidatengen für die Entstehung und vor allem klinische Ausprägung eines SLE verantwortlich ist.

Tabelle 5: Gene, die das Auftreten eines SLE oder dessen Ausprägung begünstigen bzw. determinieren (77)

Kandidaten-Gen	Chromosomale Lokalisation	Genprodukt	Vermutete Funktion
<i>ptpn22</i>	1p13	Protein-Tyrosin-Phosphatase	T-Zell-Aktivierung
<i>fcgr-2a, fcgr-2b, fcgr-3a, fcgr-3b</i>	1q23-25	CD32, CD16a, CD16b	Fc-Rezeptoren; Clearance von Immunkomplexen
<i>tnfsf-4</i>	1p36	TNF-Superfamilie 4	TNF α -Expression
<i>stat-4</i>	2q32	STAT-Protein (Transducers and Activator of Transcription)	T-zelluläre-Zytokin-Produktion und makrozytäre INF- α -Antwort
<i>ctla-4</i>	2q33	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4 (CD152)	T-zelluläre Aktivierung
<i>pdcd-1</i>	2q37	Programmierter-Zelltod-Protein 4	lymphozytäre Differenzierung
<i>pxk</i>	3p14		unbekannt
<i>hla-dr2, hla-dr3</i>	6p11-21	Humane Leukozyten-Antigen	Antigenpräsentation
<i>irf-5</i>	7q32	Interferon-Regulierungs-Faktor 5	INF- α -Expression
<i>blk-c8orf13</i>	8p23	B-Lymphozyten-Tyrosin-Kinase	B-zelluläre Entwicklung und Clearance von Immunkomplexen
<i>mbi-2</i>	10q11	MBL-2	Antigenpräsentation und Clearance von Immunkomplexen
<i>kiaa-1542</i>	11p15	Interferon-regulierender Faktor 7	Interferon-Expression
<i>itgam</i>	16p11	Integrin alpha M	Adhärenz von Neutrophilen und Monozyten und Endothel

1.5.4. Klinische Symptomatik

Die Vielfältigkeit der Organmanifestationen des SLE spiegelt sich in seiner klinischen Symptomatik wider. Sie ist Grund für die häufig späte Diagnose und den somit ausbleibenden frühzeitigen Beginn einer adäquaten Therapie. Das für den SLE als typisch geltende Schmetterlingserythem tritt z. B. nur in 30-50% aller kindlichen SLE-Fälle auf. Eine generelle Haut- und Schleimhautsymptomatik findet sich dagegen in 70-90% der Fälle bei Kindern. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Manifestationen des SLE bei Kindern.

Tabelle 6: Manifestationen des SLE bei Kindern (74)

Symptom/Befund	Häufigkeit [%]	Kommentar
Müdigkeit/Gewichtsverlust	80-90	
Fieber	50-70	
Hepatosplenomegalie	30-40	
Haut- und Schleimhautbeteiligung	70-90	bei 30-40% besteht eine ausgeprägte Fotosensitivität
- Schmetterlingserythem	30-50	Typisch, aber nicht pathognomonisch
- Raynaud-Symptomatik	10-15	
- Haarausfall	10-40	
- Orale Ulzerationen	10-30	
- Vaskulitis	10-25	
- Diskoide Läsionen	5-10	
- periunguales Erythem	10	Nagelfalzkapillare untersuchen
Nephritis	50-80	
Muskuloskelettales System	60-80	
Hämatologische Auffälligkeiten	50-70	
Neurologische Auffälligkeiten	20-40	
Kardiale Beteiligung	10-30	
Pulmonale Beteiligung	20-40	

1.5.5. Diagnosekriterien des SLE

Diagnosekriterien wurden in den letzten Jahrzehnten vom American College of Rheumatology aufgestellt und zuletzt 1997 in überarbeiteter Form publiziert (siehe Tabelle 7) (78, 79). Der Nachweis von mindestens 4 der 11 Kriterien erlaubt die Diagnose Systemischer Lupus erythematoses.

Tabelle 7: Klassifikation des Systemischen Lupus erythematoses (revidierte Kriterien des American College of Rheumatology) (79).

Kriterium	Definition
1. Schmetterlingserythem	Flaches oder erhabenes Erythem über den Wangen, in der Regel die Nasolabialfalten aussparend
2. Diskoide Hautveränderungen	Erythematöse, erhabene Effloreszenzen, die zum Teil hyperkeratotisch verändert sind und mit Narbenbildung abheilen können
3. Fotosensibilität	Exanthem als Resultat einer ungewöhnlichen Reaktion auf Sonnenbestrahlung, anamnestisch oder aufgrund einer ärztlichen Untersuchung nachgewiesen
4. Orale Ulzeration	Orale oder nasopharyngale Ulzeration, zumeist schmerzlos, aufgrund ärztlicher Untersuchung nachgewiesen
5. (Nicht-erosive) Arthritis	Beteiligung mindestens zweier oder mehrerer peripherer Gelenke, charakterisiert durch Schmerzhaftigkeit, Schwellung oder Erguss
6. Pleuritis oder Perikarditis	a) Pleuritis: überzeugende anamnestische Angabe pleuritischer Beschwerden oder pleuritischen Reibens aufgrund ärztlicher Feststellung oder Nachweis eines Pleuraergusses; oder b) Perikarditis: dokumentiert durch EKG oder Geräusch oder Nachweis eines Perikardergusses
7. Nierenbeteiligung	a) Anhaltende Proteinurie von mehr als 0,5 g/Tag oder mehr als 3+ aufgrund von Teststreifenuntersuchung (ohne genaue Quantifizierung); oder b) Zellzylinder im Urin, möglich sind Erythrozytenzylinder, Hämoglobinzylinder, granuläre, tubuläre oder gemischte Zylinder
8. Neurologische Beteiligung	a) Krampfanfälle, nach Ausschluss anderer Ursachen (medikamenteninduziert, Urämie, Ketoazidose, Elektrolytverschiebung); oder b) Psychose, nach Ausschluss anderer Ursachen (medikamenteninduziert, Urämie, Ketoazidose, Elektrolytverschiebung)
9. Hämatologische Beteiligung	a) hämolytische Anämie, mit Retikulozytose; oder b) Leukopenie, < 4000/mm ³ (2 oder mehr Ereignisse); oder c) Lymphopenie, < 1,500/mm ³ (2 oder mehr Ereignisse); oder d) Thrombozytopenie, < 100.000/mm ³ in Abwesenheit einer medikamentösen Ursache
10. Immunologische Auffälligkeiten	a) Anti-DNA-Antikörper; oder b) Anti-Sm-Antikörper; oder c) Antiphospholipid-Antikörper 1. Nachweis von IgG oder IgM-Anticardiolipin-Antikörper; 2. Nachweis eines Lupus-Antikoagulans mittels einer Standardmethode; 3. Falschpositiver Treponema-pallidum-Immobilisationstest oder Treponema-pallidum-IFT
11. Antinukleäre Antikörper	Nachweis antinukleärer Antikörper mittels Immunfluoreszenz oder einem gleichwertigen Verfahren unter Abwesenheit von Medikamenteneinflüssen

1.5.6. Autoantikörper

Die unter Punkt 10 und 11 der ARA-Kriterien zur Diagnose eines SLE aufgezählten Autoantikörper gegen nukleäre Bestandteile stellen, wie bereits anfangs erwähnt, das eigentliche „krank machende Agens“ dar.

Pathologisch gesehen stellt der SLE eine Entzündungserkrankung mit Veränderungen des Gefäßsystems dar. Es zeigen sich vaskulitische Veränderungen, okklusive Vaskulopathien und Immunkomplexablagerungen. Die am besten untersuchte Organpathologie stellt die der Nieren beim SLE dar. Es zeigen sich mesangiale Zellproliferationen, entzündliche Basalmembranveränderungen und Ablagerung von Immunkomplexen und Komplement sowie Zelldebris apoptotischer Zellen. Die Immunkomplexe beinhalten zahlreiche Autoantikörper. Sie lassen sich in 95% der Fälle nachweisen und scheinen Resultat einer deutlich verminderten Regulierung der B- und T-Zellantwort auf (Auto)-Antigene zu sein (74).

Im Nachfolgenden wird auf die verschiedenen Autoantikörper eingegangen, die beim SLE gefunden werden können.

anti-dsDNA-Antikörper:

Antikörper gegen Doppelstrang-(ds)DNA sind die häufigsten und wichtigsten beim SLE nachgewiesenen Autoantikörper. Sie stellen eine heterogene Gruppe von Antikörpern dar, wobei nur Anti-dsDNA-Antikörper gegen natürliche DNA in Helixformation, beim SLE auftreten. Gegenüber Einzelstrang-DNA zeigen sie keine Reaktion. Sie sind mit einer Prävalenz von 90% der SLE-Fälle mit Nierenbeteiligung nachzuweisen, ohne Nierenbeteiligung in 50-70% der SLE-Fälle, beim inaktiven SLE in 40% der Fälle, beim Gesunden mit einer Prävalenz von 0,1%. Ein negativer Nachweis für anti-dsDNA-Antikörper schließt jedoch einen SLE nicht aus, vor allem wenn zusätzlich ein Nachweis antinukleärer Antikörper gelingt (80).

Nukleosomen-Antikörper (Chromatinantikörper):

Unter Nukleosomenantikörpern versteht man ebenfalls eine heterogene Gruppe von Antikörpern, die gegen antigene Epitope von Kernbestandteilen (Nukleosomen) gerichtet sind. Nukleosomen enthalten je ein Paar der Histone H2A, H2B, H3 und H4, um die sich jeweils ein 146 Basenpaare großes dsDNA-Stück windet. Durch ein H1-Histon werden benachbarte Histone verknüpft und es entsteht ein Tetramer mit kondensiertem DNA-Anteil. Das eigentliche Epitop kann nun vielfältig geartet sein. Es kommen Nukleosomen-Antikörper gegen den Histon-Anteil (Histon-Antikörper), gegen den dsDNA-Anteil oder einer Kombination beider vor.

Anti-Histon-Antikörper finden sich mit einer Prävalenz von 90-95% beim medikamenten-induzierten Lupus erythematodes, in 50-80% beim SLE, jedoch auch bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen und sind somit kein spezifischer SLE-Marker (9, 80).

Sm-Antikörper:

Sm-Antikörper erhielten ihren Namen nach der Indexpatientin Smith. Als Epitop für diese Antikörper fungieren eine Reihe von Ribonukleotidprotein-Komplexen, die in den Spleißosomen enthalten sind. Bekannt sind 9 Sm-Proteine (B, B', N, D1, D2, D3, E, F, G), von denen B'B, D1 und D3 die Hauptantigene darstellen. Aufgrund der Kreuzreaktivität des B'B-Epitopes mit den U1-snRNP-spezifischen Proteinen gelten diese als weniger spezifisch als die D1- und D3-gerichteten Antikörper. Daraus resultierte die Bezeichnung SmD-Antikörper für hochspezifische Sm-Antikörper.

Sm-Antikörper finden sich in 10-20% der kaukasischen SLE-Betroffenen, deutlich höher, mit 30-40% finden sie sich bei asiatischen und negroiden SLE-Kranken (9).

PCNA-Antikörper (*proliferating cell nuclear antigen*):

PCNA-Antikörper haben eine Prävalenz von ca. 1% bei SLE, gelten jedoch als höchst spezifisch (80).

Ribosomenantikörper

Ribosomenantikörper richten sich gegen die Protein- und RNA-Anteile der 60S und 40S-Ribosomenuntereinheiten. Besondere Bedeutung haben hier Antikörper gegen die Alanin-reichen ribosomalen Phosphoproteine Po, P1 und P2 (anti-RPP; RPP: ribosomale Phosphoproteine). Antigene Determinante ist hier ein Epitop am C-terminalen Ende der obengenannten Phosphoproteine. Ribosomenantikörper gelten

als die SLE-hochspezifischen Autoantikörper. Bei Fehlen von Anti-dsDNA-Antikörpern reicht ein positiver Nachweis ribosomaler Autoantikörper zur Diagnose eines SLE aus. Diskutiert wird zudem ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten ribosomaler Autoantikörper und der zentralen Manifestation eines SLE.

SS-A/Ro- und SS-B/La-Autoantikörper

Analog den Sm-Antikörpern verdanken die SS-A/Ro- und SS-B/La-Autoantikörper ihren Namen den jeweiligen Indexpatienten. Sie richten sich gegen Proteine von 60 kDa (Ro-60), 52 kDa (Ro-52) und 48 kDa (La), die mit kleinen, Uridin-reichen RNA-Bestandteilen das hYRNA (humaner zytoplasmatischer Ribonukleoprotein-Komplex) bilden. Autoantikörper gegen SS-B/La treten nahezu immer mit Autoantikörpern gegen SS-A/Ro auf, während Anti-SS-A/Ro auch ohne Anti-SS-B/La auftreten können. Anti-SS-A/Ro und Anti-SS-B/La sind primär Markerantikörper beim Sjögren-Syndrom, finden sich aber auch bei anderen Kollagenosen, insbesondere auch beim subakuten kutanen LE und dem neonatalen LE. Zudem sind Anti-SS-A/Ro- und Anti-SS-B/La-Antikörper häufig mit dem HLA DR3 assoziiert. Die gleichzeitige Anwesenheit von Anti-SS-B/La und Anti-dsDNA-Antikörpern ist häufig mit einer milderen Verlaufsform des SLE assoziiert (9).

Anti-C1q-Antikörper

Bei einem Drittel aller SLE-Patienten finden sich Anti-C1q-Autoantikörper. Diese Fälle zeichnen sich durch einen besonders schweren Verlauf mit ausgeprägter Nierenbeteiligung aus (22). C1q scheint im Rahmen seiner Funktion als Effektorprotein beim Abräumen apoptotischer Zellen nach Bindung an Zellantigene zum Antigen zu werden (siehe Kapitel 1.6: C1q und Autoimmunität).

Von den obengenannten Autoantikörpern kommt dem Nachweis der anti-dsDNA-Antikörper in der Verlaufsbeurteilung eine zentrale Rolle zu. Bei 70 % der SLE-Patienten geht einer Exazerbation ihrer klinischen Symptome ein Anstieg der anti-dsDNA-Antikörper voraus (80). Somit gehört die regelmäßige Kontrolle der anti-dsDNA-Antikörper zur Basisdiagnostik eines SLE-Patienten. Um einer Interassay-Varianz vorzubeugen, wird das Mitführen einer vorherigen Probe unter Beurteilung der IgG-Halbwertszeit empfohlen. Da die Nachweisverfahren von antinukleären Antikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik nur sehr schlecht zu

standardisieren sind, sollte ein etwaiger Nutzer- oder Testwechsel gut dokumentiert und dem behandelnden Arzt mitgeteilt werden.

1.5.7. Pathogenese des SLE

SLE wurde über Jahrzehnte als klassisch B-Zell-vermittelte Erkrankung angesehen. Diese Einschätzung erfährt in den vergangenen Jahren einen deutlichen Wandel, da besonders Komplementfaktor-Defizienzen (C1, C2, C4) sowie Defizienzen von DNase I, CRP und Serum-IgM und vieler anderer humoraler Effektoren starke Prädiktionsfaktoren zur Entstehung eines SLE darstellen. Wie bereits geschildert, konnten durch Genom- und Stammbaumanalysen zahlreiche Kandidatengene identifiziert werden. Die Pathogenese des SLE ist bislang nicht abschließend geklärt (77). Im Weiteren werden verschiedene Erklärungsansätze und Hypothesen vorgestellt.

a) Hormoneller Einfluss

Das Überwiegen weiblicher SLE-Patienten gegenüber männlichen lässt auf einen hormonellen Einfluss bei der Pathogenese des SLE schließen. Auch das äußerst seltene Auftreten von SLE bei Kindern und postmenopausal bestärken diese Vermutung. Patienten mit Klinefeltersyndrom, charakterisiert durch einen hypergonadotropen Hypogonadismus, sind ebenso häufiger betroffen (81).

SLE-Patienten zeigen einen abnormalen Östrogen-Metabolismus, resultierend in einer hohen Konzentration an 16 α Hydroxy-Östron (81).

Hohe Östrogen-Spiegel führen zu einer gesteigerten B-Zell-Differenzierung und Immunglobulinproduktion, im Falle des SLE korrelieren die anti-dsDNA-Antikörperkonzentrationen mit den Östrogenspiegeln. Im Gegensatz dazu kommt es durch hohe Östrogenspiegel zu einer verminderten Proliferationsaktivität von T-Zellen auf Mitogene und Antigene. Daneben kommt es zu einer „down“-Regulierung des Interleukin-2-Rezeptors und der Interleukin-2-Produktion.

Diese scheinbare hormonelle Abhängigkeit erklärt den stellenweise „schubweisen“ Verlauf des SLE. Häufig kommt es zu einer ersten Krankheitsmanifestation zum Zeitpunkt hoher endogener Hormonspiegel. Nicht selten wird ein SLE im Rahmen einer Erstschwangerschaft diagnostiziert. Unter exogener Hormonzufuhr (orale Antikontra-

zeptiva, postmenopausale Hormonsubstitution) kann es zu „Schüben“ kommen. Mit Eintritt der Menopause nehmen Lupus-Symptome deutlich ab (81).

b) Viraler Trigger

Viele Patienten berichten von einer „grippeähnlichen“-Symptomatik vor dem Auftreten eines SLE-Schubs. Auf der Suche nach einem infektiösen Trigger konnte das Epstein-Barr-Virus (EBV) als möglicher Verursacher identifiziert werden. In einer Fall-Kontroll-Studie zeigten Kinder und junge Erwachsene mit SLE zu 99% Anti-EBV-Antikörper und in 100% der Fälle einen positiven Nachweis für EBV-DNA. Die Vergleichsgruppe Gesunder dagegen zeigte eine deutlich niedrigere Durchseuchung (82).

c) UV-Strahlung

UV-Strahlung gilt als stärkster Auslöser gerade kutaner Manifestationen eines SLE. Dies ist wohl durch einen erhöhten Anfall apoptotischer Keratinozyten zu erklären. Der Einfluss einer verminderten oder inadäquaten Elimination apoptotischer Zellbestandteile auf die Auslösung eines SLE wird im Weiteren erläutert.

d) B- und T-Lymphozyten:

Die Bildung von Autoantikörpern setzt eine B-Zell-Antwort auf ein Antigen voraus. Klinische manifeste SLE-Erkrankungen ohne Autoantikörpernachweis sind bislang nicht beschrieben worden. Im Tierversuch konnte daneben gezeigt werden, dass MRL/lpr-Mäuse (ein SLE-Mausmodell) durch Kreuzung mit B-Zell-knock-out-Mäusen keinen SLE mehr ausbildeten. MRL/lpr-Mäuse, deren B-Zellreihen ausschließlich membranständige Autoantikörper produzierten, entwickelten dennoch einen SLE. Somit liegt der Schluss nahe, dass den B-Zellen in der Pathogenese nicht nur ein „produktiver“ Part zukommt (Antikörperproduktion). Im Gegensatz zu den auch beim Gesunden vorkommenden Autoantikörpern gegen „körpereigene“ Strukturen zeigen sich die IgG-Autoantikörper beim SLE-Patienten von äußerst hoher Affinität gegenüber dem jeweiligen Antigen. Voraussetzung hierfür ist zum einen der Toleranzverlust der B- und T-Zellen gegenüber der körpereigenen Matrix, zudem eine klonale Expansion mit einhergehender Affinitätssteigerung und somatischer Hypermutation vonseiten der B-Lymphozyten unter ständiger CD4-Zell-Stimulation mittels IL-10. Somit entstehen hoch affine Autoantikörper, deren „Zusammenstellungsmuster“ von SLE-Patient zu SLE-Patient variieren kann (81).

Eine Störung auf B- und T-Zell-Ebene vermag alleine die Pathogenese des SLE jedoch nicht zu erklären. Der Toleranzverlust gegenüber eigener Matrix durch die B- und T-Zellen würde normalerweise durch den phagozytotischen Abtransport apoptotischer Zellenbestandteile und Immunkomplexe durch z. B. Makrophagen und anderen gewebsständigen Zellen nicht wesentlich zum Tragen kommen. Es ist also davon auszugehen, dass auch auf dieser Ebene eine Störung der „Clearance“ apoptotischen Zellmaterials und Immunkomplexen zur Pathogenese des SLE beiträgt, wenn nicht sogar als Grundursache zur Entstehung eines SLE anzusehen ist.

e) Apoptose und Clearance apoptotischer Zellen

Zelluntergang erfolgt in jenen Organismen auf zweierlei Wegen. Die Zellnekrose, ausgelöst durch zum Beispiel physikalische oder chemische Verletzungen, führt zu einem spontanen Zerfall der Zelle unter Freisetzung der einzelnen Zellkompartimente. Diese lösen Komplement-vermittelt eine starke Entzündungssituation aus mit mehr oder minder schweren Folgen (z. B. Myokardinfarkt). Daneben spielt die Apoptose, der „programmierte“ Zelltod, eine wesentliche Rolle in der Differenzierung und Organogenese. Vielzählige Ursachen lösen Apoptose aus. So ist der „Untergang“ des Thymusgewebes apoptotisch vermittelt. Daneben ist die Hauptfunktion der Apoptose die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase im Gewebsverband. Im Gegensatz zur Nekrose stellt die Apoptose einen vollkommen geregelten Vorgang dar. Getriggert durch externe oder interne pro-apoptotische Stimuli (z. B. Virus-Infektion), kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege (z. B. durch Fas-Fas-Liganden-Bindung und/oder TNF-TNF-Rezeptor-Bindung durch CD8-T-Zellen). Diese intrazellulären Signalwege sind in etwa mit dem Kaskadenprinzip des Komplementsystems vergleichbar. Kommt es zu einer ausreichenden Aktivierung intrazellulärer Caspasen (**cysteiny-l-aspartate-specific-protease**), so kommt es schlussendlich zur Vollendung aller für den „geregelten“ Zelluntergang notwendigen Maßnahmen. Diese beinhalten zum Beispiel die Aktivierung von Endonukleasen, die für die Spaltung der Kern-DNA an den Nukleosomen in 200bp-DNA-Stücken verantwortlich sind. Durch einen erhöhten K-Influx kommt es im Weiteren zur Schrumpfung der Zelle. Die Zellorganellen und die entstandenen 200bp-ds-DNA-Stücke werden an der Zelloberfläche in „apoptotic-blebs“, Ausstülpungen des Zytoplasmas an der Zellmembran, unter Expression von Phosphatidylserin zum „Abtransport“ präsentiert. Dieser erfolgt durch ein höchst effizientes phagozytotisches System, bestehend aus Phagozyten und dendritischen Zellen (DC) oder bereits durch gewebsständige

phagozytische Zellen (z. B. bei der Elimination von apoptotischen Keratinozyten nach UV-Bestrahlung). Das Erkennen der apoptotischen Residuen erfolgt über eine Vielzahl von Rezeptoren an der Oberfläche der Effektorzellen, wie dem Phosphatidylserin-Rezeptor (PS), CD14 (Lipopolysaccharidrezeptor), Vitronektin-Rezeptor, C1q-Rezeptor und anderen (83).

Die in den „apoptotic blebs“ enthaltenen Strukturen (z. B. Histon-ds-DNA-Komplex) stellen die Epitope für die beim SLE nachweisbaren Autoantikörper dar. Es erscheint nun wahrscheinlich, dass eine Fehlregulation im Ablauf der Apoptose oder der nachgeschalteten „Clearance“-Vorgänge die Pathogenese des SLE darstellt.

Verschiedene Erklärungsansätze zur Pathogenese des SLE im Zusammenhang mit einer Störung der Regulierung von Apoptose-Abläufen existieren zum jetzigen Zeitpunkt. Auf diese wird im Kapitel „C1q und Autoimmunität“ näher eingegangen.

1.5.8. Therapie

Trotz verbesserter Diagnose- und Therapiemöglichkeiten ist der SLE mit einer hohen Mortalität behaftet. In einer europäischen Studie zur Morbidität und Mortalität des SLE konnte die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit mit 92% des Gesamtkollektivs errechnet werden, bei SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung sank diese auf 88% (84). Durch die verbesserten Therapiemöglichkeiten und das längere Überleben der Patienten wurde auffällig, dass es bei SLE-Patienten zu einer Atherosklerose mit Häufung von cerebralen Ischämien und Myokardinfarkten kommt. Als Grund hierfür wird, neben der chronischen Entzündungssituation, der Einsatz von Glukokortikoiden als Therapeutikum der ersten Wahl angesehen (85).

Der schubweise Verlauf des SLE bedarf einer konsequent durchgeführten Dauertherapie. Diese wird, je nach Organmanifestation und Schwere, mit unterschiedlichen Immunsuppressiva durchgeführt.

Wie bereits oben erwähnt, stellt die Gruppe der Glukokortikoide die Basis nahezu jeder SLE-Therapie dar. Sie sind als Stoßtherapie in der Akutphase sowie als Dauertherapie einsetzbar. Nach Erreichen einer Remission unter Glukokortikoiden sollten diese in ihrer Dosis reduziert, jedoch nicht vollständig ausgeschlichen werden (74).

Zur Therapie von Gelenk-assoziierten Symptomen kommen nicht-steroidale Antiphlogistika zum Einsatz. Von einer Dauertherapie mit dieser Substanzgruppe sollte, besonders bei SLE-Patienten mit renaler Beteiligung, abgesehen werden.

Hydroxychloroquin, ein primär aus der Malariatherapie bekannter Verwandter des Chinins, wird insbesondere beim medikamenten-induzierten Lupus und bei rein kutanen Verlaufsformen eingesetzt.

Azathioprin, ein Immunsuppressivum, welches nach Gabe zu 6-Mercaptopurin verstoffwechselt wird, hemmt als Purinantagonist die RNA- und DNA-Synthese. Aufgrund des hiermit assoziierten Nebenwirkungsprofils (z. B. Hämatotoxizität) bedarf es regelmäßiger Laborkontrollen. Es hat sich als Therapeutikum zur Remissionserhaltung über Jahrzehnte bewährt (74).

Gerade zur Akuttherapie bei SLE-Patienten mit renaler Beteiligung oder schwerer sonstiger Organmanifestation eignen sich obengenannte Therapeutika nur bedingt. Hier kommen Cyclophosphamid (Purinsyntheseinhibitor), Methotrexat (Dihydrofolatreduktaseinhibitor), Cyclosporin (Calcineurinhemmer) und Mycophenolatmofetil (MMF, Inosinmonophosphatdehydrogenaseinhibitor) zum Einsatz. Einige dieser Substanzen eignen sich auch zur Remissionserhaltung bei Nephropathie und schweren viszeralen Verlaufsformen.

Um die Autoantikörperlast im akuten Schub zu reduzieren, kommen auch Aphereseverfahren zum Einsatz (Plasmapherese). Gerade beim schweren Antiphospholipid-Syndrom mit thrombembolischen Ereignissen zeigt sich eine solche Therapie den medikamentösen überlegen (74).

Zwischen 1995 und 2002 erhielten 53 SLE-Patienten an 23 Zentren eine autologe Stammzelltransplantation (86). Die Remissionsrate nach 6 Monaten betrug 66%, die Transplantations-assoziierte Mortalität betrug zu diesem Zeitpunkt 12%. Die autologe Stammzelltransplantation bleibt zum momentanen Zeitpunkt sicherlich noch eine „last-rescue“-Therapie, der eine intensive Abklärung der SLE-Ursache vorausgehen sollte.

1.6. C1q und Autoimmunität

Wie in den Ausführungen zum C1q-Komplex dargestellt, geht eine C1q-Defizienz mit einer über 90%-igen Wahrscheinlichkeit einer SLE-Entstehung einher. Daneben finden sich bei einer Vielzahl von SLE-Patienten (ca. 30%) Autoantikörper gegen C1q und einer somit vermittelten funktionellen Defizienz mit schwerer Symptomatik (22). Die genaue Rolle des C1q in der Entstehung und Unterhaltung eines SLE ist bislang unklar.

1.6.1. C1q-Interaktion mit Rezeptoren

Komplementfaktoren wie C1q, C3b und iC3b vermitteln ihre Funktion als Opsonine durch Rezeptor-Interaktion an Zielzellen (C1qRp/CD93, cC1q-R/Calreticulin, CR1, CR3, CR4) und führen so zur Phagozytose von z.B. Bakterien, aber auch zum Abraum nekrotischer und apoptotischer Zellen und ihrer Elimination aus dem System. So ist die Bindung von C1q an CD93 für den Abraum apoptotischer Zellen notwendig, spielt aber keine Rolle in der C1q-vermittelten Phagozytose. Der cC1q-Rezeptor an apoptotischen Zellen entspricht dem normalerweise am endoplasmatischen Retikulum ansässigen Calreticulin (87). Dieses wird in den *apoptotic blebs* externalisiert und durch C1q gebunden. Über die Interaktion dieses Komplexes an CD91 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1) auf Makrophagen erfolgt die Phagozytose (88). Interessanterweise finden sich bei SLE-Patienten auch Autoantikörper gegen Calreticulin. Die genaue Interaktion von C1q mit CR1 (CD35) und daraus resultierende Effekt ist unklar (89).

1.6.2. C1q-Interaktion mit Immunkomplexen

Die globuläre Domäne des C1q interagiert mit der CH2-Domäne von Immunkomplexen der Immunglobulinklassen IgM und IgG (IgG3>IgG1>IgG2). C1q wird nicht durch IgA, IgE, IgD und IgG-Subklasse 4 aktiviert (90). Die Aktivierung des C1q führt zur Initiierung des Klassischen Weges. Daneben führt die Bindung von CRP über den kollagenen Anteil des C1q ebenso zu dessen Aktivierung und Initiierung des Klassischen Weges. Daneben bindet CRP auch Faktor H und führt somit zu einer „Beschleunigung“ des Alternativen Weges (91). Im Gegensatz dazu stimuliert

CRP die Hochregulierung von CD59 (Protectin) und DAF und schützt somit vor einer zu starken Entzündungsreaktion über Anaphylatoxine und Zellzerstörung über MAC (90). Serum Amyloid P und CRP binden wiederum an apoptotischen Zellen und sorgen so C1q-vermittelt für eine Komplementaktivierung (92, 93).

1.6.3. Die „Waste-Disposal“-Hypothese

C1q ist somit in der Lage apoptotische Zellen direkt über Rezeptorinteraktion sowie indirekt über Aktivierung des Klassischen Weges dem Abraum durch phagozytosefähige Zellen zuzuweisen. Eine C1q-Defizienz führt also zwangsläufig zu einer „verlangsamten“ Clearance von apoptotischen Zellen und im zweiten Schritt zu einer möglichen Immunisierung des Systems, wie von Walport in seiner „Waste Disposal“-Hypothese angenommen (Abbildung 5) (22)

C1q reguliert offensichtlich auch die Differenzierung dendritischer Zellen (DC), deren Aktivierung und Antigen-Präsentation. C1q-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Konzentration von Interleukin-12p40 (IL 12) (94), welches hauptsächlich von reifen dendritischen Zellen gebildet wird und die T-Zell-Ausreifung stimuliert, sowie die Immunglobulinproduktion von IgG2 durch Plasmazellen hochreguliert (95). Lood et al. konnten daneben eine verminderte Interferon α -(IFN α) Produktion bei plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Stimulation über Toll-like-Rezeptor 7 und 9 nachweisen (96). Diese Beobachtung bestätigt eine immunmodulierende Funktion des C1q und könnte die schweren klinischen Verläufe bei SLE-Patienten mit C1q-Autoantikörpern erklären.

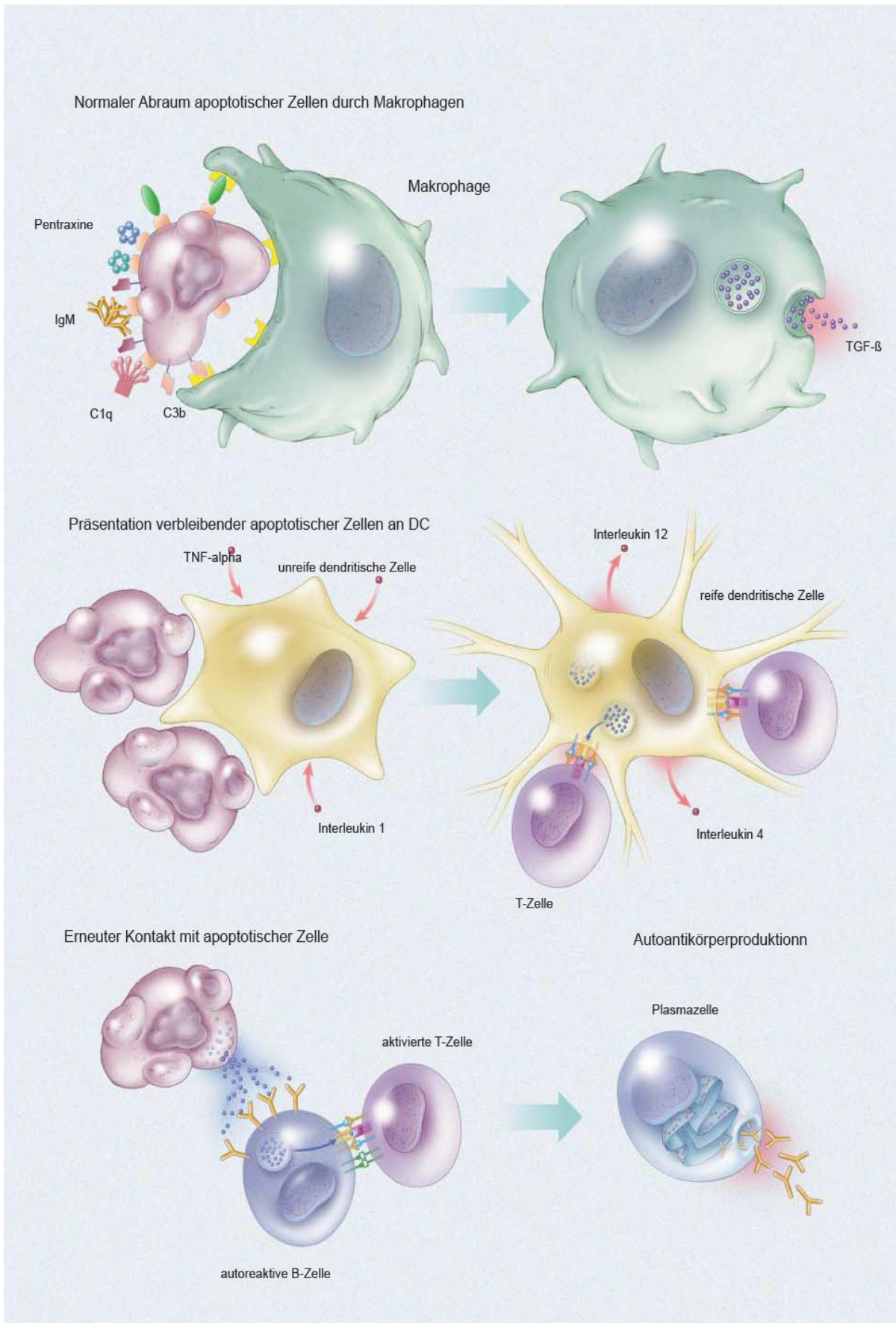


Abbildung 5: Die „Waste Disposal“-Hypothese (nach Walport, 2001 (22), vereinfacht dargestellt)

1.6.4. Die „Tolerance“-Hypothese

Carroll wertet die Bedeutung des Komplementsystems als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität in seiner „Tolerance“-Hypothese noch auf (97) (Abbildung 6). So präsentiert das angeborene Immunsystem körpereigene Antigene unreifen B-Zellen und induziert somit deren negative Selektion. Wesentlich ist hierfür die Bindung von iC3b und seine Umwandlung in C3d durch Faktor I. Hierdurch kann das markierte Antigen an einen Komplex aus B-Zellrezeptor CD19, CD81 und CR2 (98) anbinden und eine negative Selektionierung erfahren. Daneben führt die Präsentation von C4b, gebunden an den CR1 von folliculären dendritischen Zellen, zu einer negativen Selektionierung von unreifen B-Zellen über Interaktion am Rezeptorkomplex CD19-CD81-CR2 im Knochenmark und in der Milz. Eine fehlende Präsentation, vermittelt durch einen Komplementmangel oder Rezeptordefekt, führt folglich, Carrolls Hypothese folgend (97), zu einem Überleben autoreaktiver B-Zellen, die nach „unbehelligtem“ Durchlaufen ihrer Reifungsstadien durch klonale Mutation und somatische Hypermutation nach Antigenkontakt, zu Antikörperproduzenten höchster Affinität werden.

Walports und Carrolls Hypothesen können beide nicht abschließend die genaue Pathogenese des SLE erläutern. Diese ist, abgesehen von Ausnahmen wie hereditärer Komplementdefizienz, multifaktorieller Genese. Charakteristisch ist in allen Fällen das Auftreten von Autoantikörpern. Das Auftreten von C1q-Autoantikörpern geht mit einer schweren klinischen Symptomatik einher, die die immunmodulierende Rolle des C1q herausstellt.

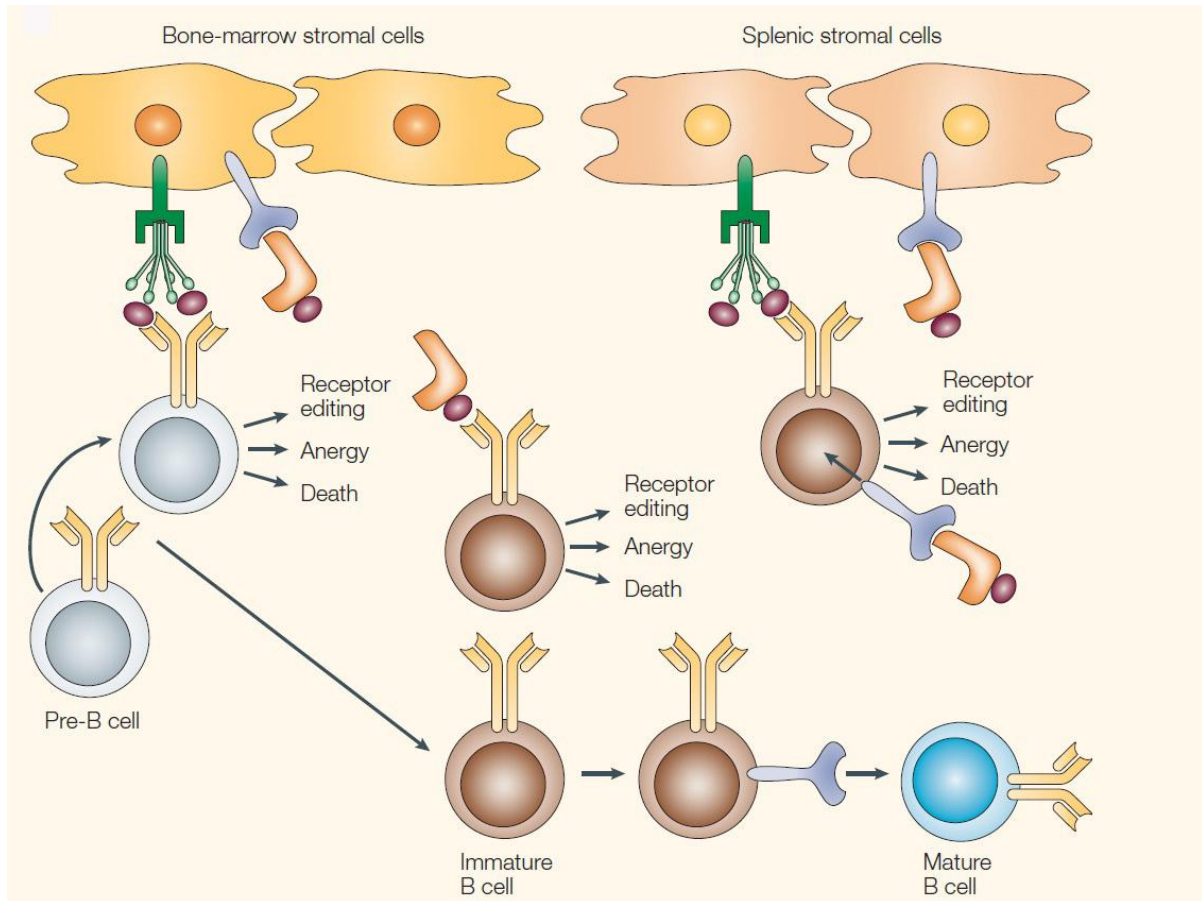


Abbildung 6: Die „Tolerance“-Hypothese (97)

1.6.5. Therapieoptionen bei hereditärer C1q-Defizienz

Die Therapie hereditärer C1q-Defizienzen sollte zwei Regime beinhalten. Neben der immunsuppressiven Therapie bei SLE-ähnlichen Erkrankungen kommen Substitutionsverfahren mittels FFP (*fresh-frozen plasma*) zum Ersatz der fehlenden Komponente C1q zum Einsatz (99). Diese ist jedoch aufgrund zweier Faktoren nicht unproblematisch. Die Substitution von C1q führt zur signifikanten Wiederherstellung der gesamthämolytischen Aktivität des Serums. Diese verliert sich jedoch wieder drastisch innerhalb von Stunden bis Tagen nach Infusion (99, 100) aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit. Ein weiterer Faktor, der die Wirksamkeit der Substitutionstherapie vermindert bis aufhebt, besteht in der Immunisierung der Patienten mit dem bis dahin „unbekannten“ Antigen C1q. Diese führt zur Entwicklung von C1q-Antikörpern mit klinischer Signifikanz, so dass eine Substitutionstherapie unter Anaphylaxie-Schutz durchzuführen ist (99, 101, 102). Trotz dieser Widrigkeiten gelang es mittlerweile, eine Patientin 10 Jahre lang erfolgreich mit der Kombination einer

niedrig dosierten immunsuppressiven Therapie und FFP-Gabe (4-wöchige Abstände) zu therapieren (99).

C1q wird im Gegensatz zu der Majorität der Komplementfaktoren nicht in der Leber, sondern vornehmlich in knochenmarksabhängigen Zellen (103, 104) synthetisiert. Somit erscheint eine Stammzelltransplantation als Therapiemöglichkeit naheliegend. Im Tierversuch konnte die C1q-Produktion von C1q-defizienten Mäusen (C1qa^{-/-}) durch Stammzelltransplantation wiederhergestellt werden (104). In einem weiteren Schritt gelang es derselben Arbeitsgruppe durch Stammzelltransplantation die SLE-ähnliche Symptomatik bei C1qa^{-/-}-defizienten Mäusen abzumildern (105). Beim Menschen wurde diese Therapieoption bislang noch nicht angewandt.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Defizienzen des Klassischen Komplementweges gehen mit einer deutlich erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit für ein SLE-Syndrom einher. Hereditäre Komplementdefizienzen stellen zwar eine seltene Ursache für ein solches Syndrom dar, müssen jedoch, gerade bei frühem Erkrankungsbeginn, als solche in Betracht gezogen werden. Eine möglichst frühzeitige Detektion hereditärer Komplementdefizienzen stellt die Voraussetzung für eine adäquate Therapie dar, die die ansonsten rasche Progredienz zwar nicht vollständig zu vermeiden, jedoch wesentlich zu verlangsamen vermag. Zudem ermöglicht eine rasche Ursachenabklärung zukünftig Therapieoptionen, wie zum Beispiel die Stammzelltransplantation. Diese erscheint nur dann sinnvoll, wenn funktionelle und strukturelle Organveränderungen noch nicht wesentlich fortgeschritten sind.

Die Identifizierung von Defizienzen des Komplementsystems setzt wenige, jedoch gezielte Untersuchungen voraus. Ihrer Detektion sollte der Nachweis der verursachenden Mutation folgen, um weitere Blutsverwandte als mögliche „Mutations-träger“ oder „Risikopatienten“ zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit ist die Abklärung der Ursache einer SLE-ähnlichen Symptomatik der im Weiteren beschriebenen Patientin. Die Abklärung beinhaltet serologische Untersuchungen zur Identifizierung einer Komplementdefizienz unter Miteinbeziehung zur Verfügung gestellter Untersuchungsergebnisse anderer Labore. Es

schließen sich molekularbiologische Untersuchungen zum Ausschluss bekannter Mutationen an. Unbekannte Mutationen waren durch Sequenzierung der betroffenen Gene aufzudecken und Vererbungswege durch Familienuntersuchungen offenzulegen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenbeschreibung

2.1.1. Familienanamnese:

Im Juli 2003 wird eine zu diesem Zeitpunkt 15 Monate alte weibliche Patientin zweier türkischer Eltern erstmalig der dermatologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Münster aufgrund eines gesichtsbetonten Erythems vorgestellt. Beide Elternteile stammen aus der Türkei und sind blutsverwandt (Großmütter waren Schwestern, Großväter Brüder, siehe Stammbaum in Abbildung 7). Die Patientin ist das dritte von drei Kindern. Beide Geschwister sind bis zum jetzigen Zeitpunkt gesund. Rekurrende Infektionserkrankungen traten bei beiden Geschwistern nicht auf.

2.1.2. Klinik und Laborbefunde bei Erstvorstellung

Zum Zeitpunkt der ersten Vorstellung litt die Patientin, beginnend seit einem Türkei-aufenthalt im Vormonat, unter rezidivierenden Fieberepisoden, einhergehend mit einem progredienten Erythem, betont im Nasen- und Wangenbereich. Die durchgeführte Labordiagnostik zeigte eine Erhöhung der Transaminasen sowie deutlich positive antinukleäre Antikörper. Des Weiteren zeigte sich in einer auswärtig durchgeführten Komplementdiagnostik ein vollständiges Fehlen der lytischen Aktivität des Serums. Zur genaueren Diagnostik und Therapie wurde die Patientin daraufhin in ein heimatnahes Krankenhaus stationär eingewiesen. Die hier nochmalig durchgeführte Antikörperdiagnostik bestätigte das erste Ergebnis mit einem ANA-Titer von 1:1280 bei negativem Nachweis von Antikörpern gegen Doppelstrang-DNA und positivem Nachweis von Antikörpern gegen Ribonukleoprotein/Sm-Komplex als Marker für eine „mixed-connective-tissue-disease“. Daneben imponierte eine ausgeprägte hypochrome mikrozytäre Anämie als Ausdruck eines Eisenmangels. Die Erhöhung der Transaminasen auf das 2- bis 3-fache der Norm machte eine Hepatitis-Diagnostik notwendig. Diese ließ sich laborchemisch nicht eindeutig abgrenzen, so dass eine Leberbiopsie durchgeführt wurde. Hierbei konnte eine disseminierte Leberparenchymverfettung Grad I und unspezifische reaktive Aktivierung des Leberparenchyms ohne zirrhotischen Umbau oder portale Fibrose nachgewiesen werden.

2.1.3. Krankheitsverlauf und weitere Diagnostik

Die zum Zeitpunkt der stationären Behandlung vorherrschende klinische Symptomatik eines gesichtsbetonten erythematösen Exanthems, mit Ulzerationen einhergehend, sowie stammnahen nummulären exanthematischen Hautveränderungen verschlechterte sich zusehends, so dass auch hier eine bioptische Abklärung für notwendig erachtet wurde. Diese ergab fokale Zeichen einer diskreten Interface-Dermatitis mit Einwanderung von Granulozyten wie bei einem Lupus erythematoses in einem sehr frühen Entwicklungsstadium. Die direkte Immunfluoreszenz zeigte jedoch keine Ablagerung von Immunkomplexen (IgG, IgM, IgA) sowie Komplement (C3) in der Epidermis oder oberen Dermis. Aufgrund des histologischen Ergebnisses wurde die Diagnose eines subakuten kutanen Lupus erythematoses (SCLE), differentialdiagnostisch Systemischer Lupus erythematoses im Anfangsstadium, gestellt. Aufgrund spontaner Erholung der Transaminasen ohne spezifische Therapie wurde zu diesem Zeitpunkt auf eine immunsuppressive Therapie verzichtet.

Innerhalb von sieben Monaten verschlechterte sich das Symptombild der Patientin so dramatisch, dass eine erneute stationäre Aufnahme notwendig wurde. Hier zeigte sich, neben dem vorbeschriebenen erneut schwer ulzerierenden Exanthem, eine ausgeprägte Candida-Mykose der Haut und Schleimhäute. Eine begonnene Vertikalisierung der Patientin mit symmetrischem Krabbeln und ersten Gehversuchen stagnierte und war schließlich rückläufig mit der Verweigerung des Stehens und fehlender Lokomotion im Vierfüßlerstand. Laborchemisch zeigten sich die Transaminasen erneut deutlich erhöht. Ebenfalls deutlich positiv waren die ANA-Titer. Die Entzündungsparameter waren normal.

Entsprechend der revidierten Kriterien zur Diagnose des SLE des American College of Rheumatology von 1997 wurde ein SLE diagnostiziert. Folgende Kriterien wurden als erfüllt angesehen:

- Schmetterlingserythem
- Diskoide Hautveränderungen
- Orale Ulzerationen
- Arthritis

- Immunologische Auffälligkeiten
- Antinukleäre Antikörper

Man begann mit einer systemischen Hochdosissteroidtherapie, unter der es zu einer septischen Episode mit dem Nachweis von Streptokokken der Gruppe A kam, die unter einer systemischen Antibiotikatherapie ausheilte.

Unter der immunsuppressiven Therapie kam es zu einem deutlichen Symptomrückgang, so dass man sich für eine orale Dauermedikation mit Azathioprin (6-(1-Methyl-4-nitro-5-imidazolyl)-mercaptapurin) und Prednisolon entschied.

Unter dieser Therapie besserte sich die Gesamtsymptomatik der Patientin deutlich. Laborkontrollen der ANA blieben in Folge negativ. Aufgrund der mittlerweile jedoch deutlich progredienten Gangunsicherheit und Gehunfähigkeit kam es zu erneuten Vorstellungen der Patientin. Hier zeigte sich eine zunehmende spastische Paraparese der unteren Extremitäten unklarer Ursache. Die Geburtsanamnese der Patientin war bezüglich asphyktischer Ereignisse negativ, die Serologien von Erregern mit der Möglichkeit pränataler Schädigung waren ebenfalls negativ. Eine Magnetresonanztomographie des Schädels war unauffällig hinsichtlich fokaler Läsionen, Hinweise für intrazerebrale Blutungen und ebenfalls ohne den Nachweis entzündlicher Aktivität.

Im Rahmen der ambulanten Betreuung wurden jetzt auch Nagelfalzveränderungen beschrieben, die als vaskulitische Komponente der Grunderkrankung zu erklären wären. Zudem häuften sich unter der immunsuppressiven Therapie in den Wintermonaten Infekte des Respirationstraktes und des Mittelohres sowie der Kopfhaut. Aufgrund des untypischen Erkrankungsalters sowie der unklaren Gesamtsymptomatik mit weiterhin deutlicher Entzündungsaktivität und ansteigender ANA-Titer erfolgte eine erneute stationäre Aufnahme der Patientin zur Diagnosesicherung in der Universitätsklinik Münster.

Die hier durchgeführte immunologische Labordiagnostik zeigte eine unauffällige Funktion der T- und B-Zellen, die Analyse des angeborenen Immunsystems brachte zunächst eine fehlende phagozytotische Aktivität der Granulozyten und Monozyten

gegenüber *Escherichia coli* zu Tage bei unauffälliger oxidativer burst-Reaktion. Zusätzlich zeigte sich eine fehlende lytische Aktivität des Patientenserums gegenüber Kaninchenerythrozyten. Diese Konstellation führte zu dem Verdacht einer Komplementdefizienz.

Die vorübergehend ausgesetzte Therapie mittels Azathioprin und Prednisolon musste nach kurzer Zeit, bei deutlich klinischer Verschlechterung der inflammatorischen Symptome, wieder aufgenommen werden. Zusätzlich wurde nach einer systemischen antibiotischen Therapie eine Sekundärprophylaxe mit Fluconazol und Cotrimoxazol begonnen.

Eine Übersicht über die erhobenen Laborbefunde befindet sich im Anhang.

2.2. Material

2.2.1. Serum- und Zellproben

Die Serum- und Zellproben der betroffenen Patientin sowie ihrer Eltern wurden uns freundlicherweise von der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Münster (Leitung Univ.-Prof. Dr. med. Heyman Omran) zur Verfügung gestellt.

Die Zellproben der Geschwister wurden uns freundlicherweise von Guido Dissemond, niedergelassener Facharzt für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, 48703 Stadtlohn, zugesandt.

Die fetale DNA-Probe, aus einer Amnionzottenbiopsie gewonnen, des ungeborenen Geschwisterkindes der Patientin wurde uns freundlicherweise von der Abteilung für Ambulante Humangenetik des Medizinischen Versorgungszentrums am Universitätsklinikum Münster (Leitung Univ.-Prof. Dr. med. Peter Wieacker) zur Verfügung gestellt.

Die Proben wurden umgehend nach Erhalt bei -70°C gelagert. Nach DNA-Extraktion wurde diese jeweils zwischen den einzelnen Versuchsschritten bei -20°C gelagert.

Als Kontrollproben für die CH50-Bestimmung und den C1q-Antigennachweis wurden gepoolte Serumproben gesunder Blutspender eingesetzt. Als Kontrollen bei den jeweiligen PCR- und RLFP-Untersuchungen kamen DNA-Proben gesunder Probanden, gesunder Merkmalsträger und des Verfassers zur Anwendung.

2.3. Primer

Zielsequenzen

Als Zielsequenzen wurden die jeweiligen Exons 1 und 2 der A-, B- und C-Kette des C1q auf Chromosom *1p34.1* bis *1p36.3* (gi: 29466516) ausgewählt (Zielsequenzen siehe Anhang).

Primer

Alle Primer (siehe Tabelle 8) (Ausnahmen mit * gekennzeichnet), die zur Amplifikation- und Sequenzierung der Patienten- und Familien-DNA zum Einsatz kamen, wurden mit der Primer3 Software (106) entwickelt. Die Primer, die zur Abklärung bereits bekannter Mutationen verwandt wurden, sind in den jeweiligen Ausführungen genannt. Um einheitliche Amplifikationsprofile zu erhalten, wurden die Primer so gewählt, dass sie einen GC-Gehalt von annähernd 50% und ein Temperaturoptimum T_m von 60°C besaßen. Die jeweiligen Zielsequenzen beginnen und enden in nicht kodierenden Abschnitten und erfassen die Intron/Exon-Grenzen. Die mit * gekennzeichneten Primer wurden aus der Arbeit von Marquart et al. (29) übernommen.

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) im 25 nMol-Maßstab synthetisiert und anschließend entsalzt.

Die für die PCR verwandten Primer fungierten auch als Sequenzierungsprimer.

Tabelle 8: Verwandte Primer (* nach Marquart, (29))

Name	Sequenz	Lokalisation	Amplifikatgröße
MTAex1F	GTGTGAAGATGTGGGTGTGC	A-Kette, Exon 1, Forward-Primer	
MTAex1R	AAGTCAGGCCAAGGTCCAAG	A-Kette, Exon 1, Reverse-Primer	450 bp
MTAex2F	GAGGACCAGTAGGCATTGGA	A-Kette, Exon 2, Forward-Primer	
MTAex2R	CAATAGCGCCCCATTTTAC	A-Kette, Exon 2, Reverse-Primer	701 bp
MTBex1F	GGATGCAGATGGAGGGATAG	B-Kette, Exon 1, Forward-Primer	
MTBex1R	TTTGAGTCTCAAAGGTAGGC	B-Kette, Exon 1, Reverse-Primer	467 bp
MTBex2F	GGCCTCCTTCTTTTGGTCT	B-Kette, Exon 2, Forward-Primer	
MTBex2R	TGGTGTGGGGGTAGAGTGA	B-Kette, Exon 2, Reverse-Primer	696 bp
MTCex1F	GAAGAAAAGGCCCCACCAT	C-Kette, Exon 1, Forward-Primer	
MTCex1R	AGACACACCGTGAGAGTCCA	C-Kette, Exon 1, Reverse-Primer	497 bp
MTCex2F	TGTCCCCCACCCTATCACTT	C-Kette, Exon 2, Forward-Primer	
MTCex2R	AGTAAGGTGGGTCCATGCAG	C-Kette, Exon 2, Reverse-Primer	671 bp
C1B2F*	GACTGAGGCTCAGAGAGAG	B-Kette, Exon 2, Forward-Primer*	
C1B2R*	TACTGTGTGCATTGGTTGG	B-Kette, Exon 2, Reverse-Primer*	771 bp
C1C1F*	ATCCATCCATGGTGAGGCTC	C-Kette, Exon 1, Forward-Primer*	
C1C1R*	CCCAGACAGACACTCTGAT	C-Kette, Exon 1, Reverse-Primer*	392 bp

2.3.1. DNA-Längenstandards

100 bp DNA Ladder

Invitrogen (Karlsruhe)

2.3.2. Enzyme

Restriktionsendonukleasen:

NcoI

PvuII

EcoRV

BfmI

alle

Apal

NEB (Bad Schwalbach)

DNA-Polymerase HotStar *Taq*

Qiagen (Hilden)

2.3.3. Reagenzien und Chemikalien

Agarose (SeaKem LE Agarose)	Biozym (Hess. Oldendorf)
Borsäure	Sigma (Deisendorf)
EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	GERBU (Gaiberg)
Ethanol (für DNA-Extraktion)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate)	Invitrogen (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)

Alle nicht gesondert aufgeführten Reagenzien und Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu Ulm), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.3.4. Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich gereinigtes 18 Megaohm-Wasser (membraPur, Bodenheim) verwendet.

Elektrophoresepuffer

TBE (10x)	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 0,02 M EDTA pH 8,3
PCR-Puffer (10x)	Qiagen (Hilden) 500 mM KCl 100 mM Tris 15 mM MgCl ₂ 0,1 % (w/v) Gelatine

Restriktionsenzymbuffer und Stabilisatoren

NEBBuffer 2, 3, 4	NEB (Bad Schwalbach)
Buffer Y+/Tango	NEB (Bad Schwalbach)
BSA (Bovine Serum Albumin)	NEB (Bad Schwalbach)

2.3.5. Geräte und Kunststoffartikel

PCR-Cycler	
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	
Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
Transluminator (302 nm)	Bachofer (Reutlingen)
Digitalkamera DC120 Zoom	Kodak (Rochester, USA)
Kodak Digital Science 1D Software	
Glasartikel	Schott (Mainz)
0,5, 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
DNase-freie Filterbarrier Pipettenspitzen	Sorensen (Salt Lake City , USA)
Power Supply für Elektrophorese E431	Consort (Turnhut, Belgien)
TS 100 Thermo Shake (Laborrüttler)	peqLab (Erlangen)
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer Software Version 3.5.2	peqLab (Erlangen)

2.4. Komplement-Bestimmungen

2.4.1. Gesamthämolytische Aktivitäts-Bestimmung (CH50)

Die Bestimmung der gesamthämolytischen Aktivität von Seren wurden als CH50-Wert mittels Mikrotiterplatten-Assay (107) bestimmt. Als Kontrollproben kamen hier gepoolte Seren gesunder Blutspender zur Anwendung.

2.4.2. C1q-Konzentrationsbestimmung

Die C1q-Konzentration(Antigen-Bestimmung) im Serum wurde mittels ELISA (108) bestimmt. Als Kontrollproben kamen hier gepoolte Seren gesunder Blutspender zur Anwendung.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. DNA-Extraktion

Die Extraktion der genomischen DNA (Patient, Familie, Kontrollpersonen) erfolgte aus Vollblut und „buffy coat“ mittels des „DNeasy Blood & Tissue“-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben.

2.5.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Proben wurden mittels Mikrovolumen-Spektrometrie (109) an einem NanoDrop ND-1000 durchgeführt.

2.5.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die kodierenden Sequenzen der Exone 1 und 2 der jeweiligen A-, B- und C-Ketten des C1q-Komplex auf Chromosom 1p34.1-1p36, wurden unter Zuhilfenahme der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (110).

Der Standard-Ansatz einer PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

genomische DNA	100 ng
PCR-Puffer (10x)	5 μ l
dNTPs (je 10mM)	1 μ l
5'- und 3'-Primer (je 20 pmol/ μ l)	je 1 μ l
HotStar <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	2,5 Units
H ₂ O	ad 50 μ l

Reaktionsbedingungen

95° C	15 min	Denaturierung	}	35 Zyklen
94° C	1 min	"		
60° C	1 min	Primerhybridisierung		
72° C	1 min	DNA-Synthese		
72° C	10 min	"		

2.5.4. Restriktionsverdauung von PCR-Amplifikaten

Zur genotypischen Analyse nach PCR-Amplifikation kam das Verfahren des enzymatischen Verdauens mittels Restriktionsenzymen zur Anwendung.

Für den Nachweis der *C1qB* Exon 2-Mutation (c283_311del) kam dafür *NcoI* zum Einsatz.

Der Verdau-Ansatz (*NcoI*) setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-amplifizierte DNA	5 µl (konzentrationsunabhängig)
NEBBuffer 3	6 µl
<i>NcoI</i>	8 µl (entsprechend 80 Units)
H ₂ O	ad 45 µl

Inkubation bei 37° C für 1 h

Für den Nachweis der Mutation im C1q A Exon 2 (Gln186) kam *PvuII* zum Einsatz.

Der Verdau-Ansatz (*PvuII*) setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-amplifizierte DNA	8,5 µl (konzentrationsunabhängig)
NEBBuffer 2	1 µl
<i>PvuII</i>	0,5 µl (entsprechend 5 Units)

Inkubation bei 37° C für 1 h

Für den Nachweis der Mutation im C1q B Exon 1 (Gly15) kam *EcoRV* zum Einsatz.

Der Verdau-Ansatz (*EcoRV*) setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-amplifizierte DNA	10 µl (konzentrationsunabhängig)
NEBBuffer 3 + BSA	1,2 µl
<i>EcoRV</i>	1 µl (entsprechend 20 Units)

Inkubation bei 37° C für 3 h

Für den Nachweis der Mutation im C1q C Exon 1 (Gly6) kam *Bfml* zum Einsatz.

Der Verdau-Ansatz (*Bfml*) setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-amplifizierte DNA	10 µl (konzentrationsunabhängig)
Buffer Y+/Tango	1,2 µl
<i>Bfml</i>	1 µl (entsprechend 5 Units)

Inkubation bei 37° C für 2 h

Für den Nachweis der SNV im C1q A Exon 2 (Gly70) kam *Apal* zum Einsatz.

Der Verdau-Ansatz (*Apal*) setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-amplifizierte DNA	8,5 µl (konzentrationsunabhängig)
Neb 4 + BSA	1,1 µl
<i>Apal</i>	1 µl (entsprechend 5 Units)

Inkubation bei Raumtemperatur für 1,5 h

2.5.5. Agarose-Gelelektrophorese:

Zur Längenbestimmung der DNA-Fragmente sowie zur Aufreinigung der PCR-Produkte vor Sequenzierung wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Dabei kamen 1,2%-, 1,5%- und 2%-Agarose-Gele in 1 x TBE-Puffer zur Anwendung. Die angelegte Spannung betrug 10 V/cm Gel. Den Gelen wurde zur Anfärbung der DNA entweder direkt Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben oder es erfolgte die Färbung mittels Ethidiumbromid in selbiger Konzentration, in 1 x TBE im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung. Zum Größenvergleich wurde den Gelen ein Längenstandard (100bp-ladder) zugefügt. Die DNA wurde mittels UV-Licht (Transluminator, 302 nm) sichtbar gemacht und mit einer digitalen

Kamera (Kodak) dokumentiert. Zur Steigerung der Bandenintensitäten erfolgte eine Nachbearbeitung durch Auswahl des S/W-Modus und Invertierung.

2.5.6. Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA, die nach Amplifikation der Sequenzierung zugeführt werden sollte, wurde zunächst präparativ elektrophoretisch aufgetrennt. Die zu eluierende Bande wurde manuell, unter Zuhilfenahme eines Skalpells, aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction“-Kits der Firma Qiagen (Hilden) eluiert. Abschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der eluierten DNA mittels NanoDrop-Spectrophotometer.

2.5.7. Sequenzierung

Für die Sequenzanalysen wurden nach Gelelektrophorese und -Extraktion ca 150–500 ng DNA zur Sequenzierung eingesetzt. Hierfür kamen die in Tabelle 8 aufgelisteten Primer zur Anwendung. Jedes einzelne Amplifikationsprodukt der jeweiligen Exons der C1q-Gene wurde sowohl mittels „forward“-Primer (F) in 5'-3'-Richtung und „reverse“-Primer (R) in 3'-5'-Richtung sequenziert. Die DNA-Sequenzierung der PCR-Amplifikate wurde von der Firma GENterprise GmbH (Mainz) durchgeführt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden anschließend mit Hilfe des Programmes FinchTV ausgelesen und mit den Referenzsequenzen abgeglichen. Bei unzureichender Abdeckung mit den Referenzsequenzen wurde der Amplifikations- und Sequenzierungsschritt, bis zur kompletten Abdeckung mit den Referenzsequenzen, wiederholt. Ebenso wurde die nachgewiesene Mutation im C1q B Exon 2 (c283_311del) der Patientin durch erneute Amplifikation und Sequenzierung bestätigt.

2.5.8. Nachweis bekannter Mutationen im C1q A Exon 2, B Exon 1, C Exon 1

Der Nachweis der Mutationen C1q A Exon 2 (Gln 186 → stop), C1q B Exon 1 (Gly 15 → Asp) und C1q C Exon 1 (Gly 6 → Arg) wurden mittels Restriktionsverdau mit *PvuII*, *EcoRV* und *Bfml*, wie vorab beschrieben (65), geführt. Als Amplifikationsprimer dienten hierfür folgende Primer:

Nachweis der Mutation C1q A Exon 2 (Gln 186)

Primer:

C1qA Ex2-5neu (5'-3'): TTC CAA TCT GGC ATT TCT CC

C1qA Ex2-3neu (3'-5'): CAT GGA AGC CAG AGA GGT G

Reaktionsbedingungen:

95° C	15 min	Denaturierung	}	35 Zyklen
94° C	1 min	"		
55° C	1 min	Primerhybridisierung		
72° C	1 min	DNA-Synthese		
72° C	10 min	"		

Anschließend erfolgte der Verdau mittels *PvuII*.

Nachweis der Mutation C1q B Exon 1 (Gly 15)

Primer:

C1qB Ex1-5' (5'-3'): AGG ATC ACC ACG GTG GTA AC

C1qB Ex1-3' (3'-5'): TGC CTG CTA AAT CCC ATG GT

Reaktionsbedingungen:

95° C	15 min	Denaturierung	}	35 Zyklen
94° C	1 min	"		
58° C	1 min	Primerhybridisierung		
72° C	1 min	DNA-Synthese		
72° C	5 min	"		

Anschließend erfolgte der Verdau mittels *EcoRV*.

Nachweis der Mutation C1q C Exon 1 (Gly 6)

Primer:

C1qC Ex1 5' (5'-3'): TCT CTC CCT CCC AGT TCC TT

C1qA Ex1 3' (3'-5'): CAA ACC AGG CCA GCA GAC TC

Reaktionsbedingungen:

95° C	15 min	Denaturierung	}	35 Zyklen
94° C	1 min	"		
65° C	1 min	Primerhybridisierung		
72° C	1 min	DNA-Synthese		
72° C	5 min	"		

Anschließend erfolgte der Verdau mittels *BfmI*.

2.5.9. Nachweis SNV (C1q A Exon 2 Gly70)

Der Nachweis der *single nucleotide variant* (SNV) im C1q A Exon 2 (Gly 70 GGG>GGA) wurde mittels Restriktionsverdau mit *Apal* wie vorab beschrieben (65) geführt. Als Amplifikationsprimer dienten hierfür ebenso die in Petry et al. (67) genannten Primer. In der hier aufgeführten Darstellung des *Apal*-Verdaus kommt, in Ergänzung der in Petry et al. (65) beschriebenen Methode, ein zusätzlicher

Amplifizierungsschritt mittel eines „SNV-differenzierenden Primers“ (C1q Aex2 Gly GGG 5') zur Anwendung. Die hieraus resultierenden Verdau-Fragmente unterscheiden sich von denen in Petry et al. (65) beschriebenen.

Der Amplifikationsansatz war wie folgt aufgebaut:

Primer:

C1q Aex2 Gly GGG 5' (5'-3'): CAG CGG CCC CCT CGG GG
 C1qa Gly 70 3' (3'-5'): AAT CGG CCG GAG TGG TTC TGG T
 C1qa Gly 70 5' (5'-3'): GCC TTG GGC AGG AAC ACA GCA G

Reaktionsbedingungen

(Primer C1qa Gly 70 3' und SNV-differenzierenden Primer C1q Aex2 Gly GGG 5')

95° C	15 min	Denaturierung	}	10 Zyklen
94° C	1 min	"		
68° C	1 min	Primerhybridisierung		
72° C	1 min	DNA-Synthese		

dann Zugabe des C1qa Gly 70 5'-Primer)

94° C	1 min	Denaturierung	}	30 Zyklen
68° C	1 min	Primerhybridisierung		
72° C	1 min	DNA-Synthese		
72° C	10 min			

Im Anschluss darauf folgte der Verdau mittels *Apal* wie vorab beschrieben.

2.6. Softwareanwendungen zu Primerdesign, Auswertung von Sequenzen, Restriktionsverdau-Enzymauswahl

Für das Primerdesign aller neu konzeptionierten Primer, die zur Amplifikation- und Sequenzierung der Patienten- und Familien-DNA zum Einsatz kamen, wurden die **Primer3** Software (106) verwendet.

Das Auslesen der Sequenzdateien der Firma GENTERprise sowie die Beurteilung der Signalstärken erfolgte mit dem Programm **FinchTV** Version 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, WA, USA).

Zum Abgleich der Nukleotidsequenzen mit der Nukleotiddatenbank wurde das Programm **blastn** (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool for **N**ucleotides)(111) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA) in der Version 2.2.18+ unter Vorgabe folgender Suchparameter (Expect value 0,01; Hitlist size 100; Match/Mismatch scores 1,-2; Gapcosts 0,0) genutzt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Zur vergleichenden Darstellung der Aligments und Mutationsdetektion fand das Programm **ClustalX** (University College Dublin, IRL) in der Version 2.0.10 Verwendung (112).

Zur Auswahl eines geeigneten Enzyms zur Durchführung des Restriktionsverdaus wurde das Online-Programm **NEBcutter** (NewEngland Biolabs Ipswich, MA, USA) in der Version 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) (113) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1. Stammbaum der Familienmitglieder

Zur Vereinfachung der Beschreibungszuweisung der einzelnen Familienmitglieder wird dem Ergebnisteil ein Stammbaum vorangestellt (siehe Abbildung 7). Die beiden Elternteile (I1 ♂; I2 ♀) der betroffenen Patientin sind Cousin/Cousine 1. Grades. Ihre Väter sind Brüder und ihre Mütter Schwestern. Aufgrund der fehlender Untersuchungsmaterialien zu den Großeltern beginnt die Beschriftung auf Ebene der Eltern der betroffenen Patientin.

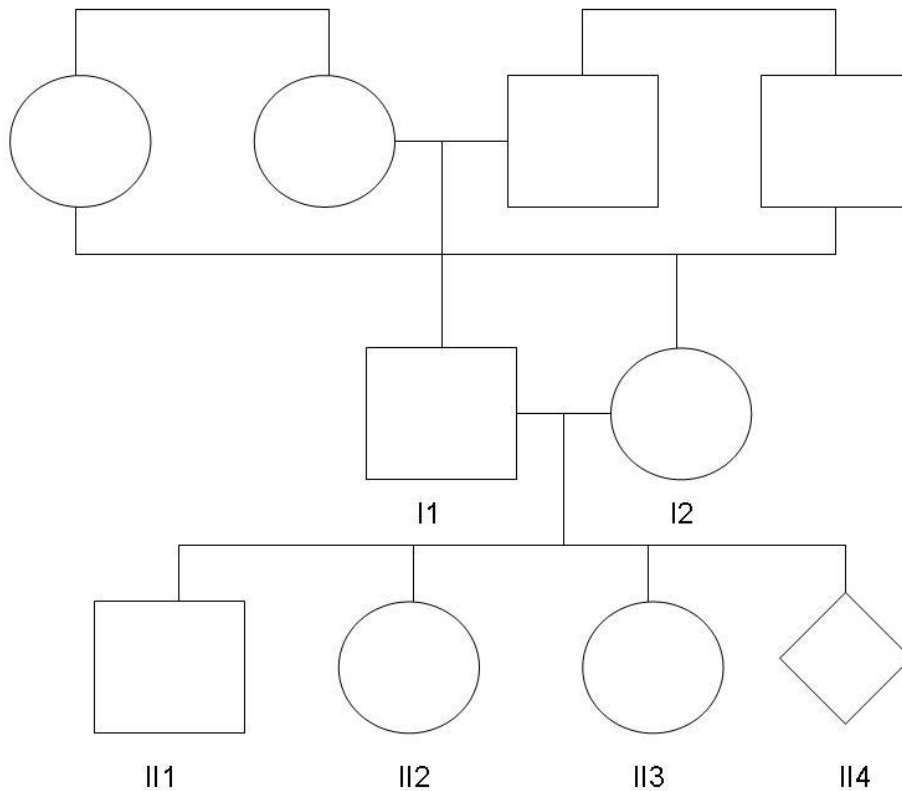


Abbildung 7: Familienstammbaum

Legende: Quadrat = männlich; Kreis = weiblich, Raute = Geschlecht unbekannt,
II3: Patientin mit SLE-ähnlicher Symptomatik

3.2. Serologische Ergebnisse

3.2.1. CH50-Aktivität und C1q-Konzentration

Die zuerst zur Verfügung gestellten Serumproben der betroffenen Patientin und ihrer Eltern wurden auf die gesamthämolytische Aktivität (CH50) und die C1q-Konzentration (Antigennachweis) hin überprüft. Die Ergebnisse sind absolut und in Prozent, in Bezug auf „Normal Human Plasma (gepooltes Spenderplasma), angegeben.

Tabelle 9: CH50-Aktivität und C1q-Antigennachweis

	relative CH50-Aktivität*/ (absolute CH50-Aktivität)	relative C1q-Konzentration*/ (absolute C1q-Konzentration)
NHS	100/(21,4)	100/(223,23 µg/ml)
Vater (I1)	111,7/(23,9)	50,5/(112,7 µg/ml)
Mutter (I2)	114/(24,4)	74,4/(166 µg/ml)
Tochter (II3)	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar

* prozentuale Angabe im Bezug auf NHS

Die CH50-Werte beider Eltern (I1; I2) können als normal interpretiert werden. Die jeweiligen C1q-Konzentrationen sind, im Vergleich zum getesteten Normalserum, erniedrigt, die ermittelten Antigenkonzentrationen scheinen allerdings ausreichend, um eine gesamthämolytische Aktivität des Serums im Normalbereich zu vermitteln. Im Gegensatz dazu zeigte die Patientin (II3) keinerlei Reaktion im CH50-Ansatz bei fehlendem Antigennachweis von C1q. Diese Befundkonstellation bestätigte den Verdacht einer hereditären C1q-Defizienz, ohne Nachweis eines C1q-Antigens, als Verursacher der SLE-ähnlichen Symptomatik.

Diese Untersuchungsergebnisse deckten sich mit den initial durch die Kollegen der Kinderklinik des Universitätsklinikums Münster beauftragten Laboruntersuchungen. Diese ergaben keine Reaktionen (keine Lyse) im CH100-Ansatz (< 200 U/ml, August 2003, bioscientia, Ingelheim) mit nochmaliger Bestätigung im CH50-Ansatz (Mai und September 2006, Kinderimmunlabor Düsseldorf). Der AP50-Ansatz (hämolytische Aktivität des alternativen Weges) zeigte sich nicht gestört (119 % d. N. Mai 2006 und 89 % d. N. September 2006). Die Wiederholung des CH50-Ansatzes unter Zugabe

eines C2-defizienten Serums zeigte ebenso keine Lyse (September 2006). Durch Zugabe eines C4 defizienten Serums konnte die gesamthämolytische Aktivität wieder hergestellt werden ($> 200 \% \text{ d. N.}$). Die quantitative Einzelkomponentenbestimmung für C3 (C3c) und C4 waren wiederholt normwertig (Labor Münster). Die im Januar 2007 durchgeführte C1q-Bestimmung ergab einen Messwert unterhalb der Nachweisgrenzen ($< 2,4 \text{ mg/dl}$, Labor Münster), die C2-Konzentration war mit 91 % im Referenzbereich (Labor Seelig, Karlsruhe). Die Quantifizierung des C2 durch das Laboratoire d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire (Les Hôpitaux Universitaire de Strasbourg, Frankreich) war mit 31,5 mg/l oberhalb des Referenzbereiches (14 – 24 mg/l), die C3- (1,36 g/l) und C4-Konzentration (0,32 g/l) normwertig. In der Immunodiffusion nach Ouchterlony gegen C1q-Antikörper konnte keine Präzipitationslinie nachgewiesen werden. Eine Mutation im C2-Gen konnte durch das Laboratoire d'immunogénétique moléculaire (Université Louis Pasteur, Strasbourg, Frankreich) ausgeschlossen werden. Eine C4-Polymorphismusanalyse durch isoelektrische Fokussierung ergab für den Vater einen BfS-Typ, für die Mutter den BfFS-Typ und für die Patientin einen BfS-Typ. Durch das Research Institute at Nationwide Children's Hospital (Professor Chack-Yung, Yu, Columbus, Ohio, USA) konnte eine partielle C4B-Defizienz diagnostiziert werden (Korrespondenz Professor Georges Hauptmann, Université Louis Pasteur, Strasbourg, Frankreich).

3.3. Molekularbiologische Ergebnisse

3.3.1. Nachweis vorab beschriebener, bekannter Mutationen

Nachdem durch die serologischen Untersuchungen eine C1q-Defizienz festgestellt werden konnte, erfolgte im nächsten Schritt die Überprüfung auf das Vorliegen einer bereits beschriebenen Mutation (siehe Kapitel 1.4 C1q-Defizienz) als Verursacher der Defizienz. Es wurden im Einzelnen die Mutationen im C1q A Exon 2 (Gln 186), C1q B Exon 1 (Gly 15), C1q C Exon 1 (Gly 6) überprüft. Im weiteren erfolgte die Überprüfung auf das Vorliegen einer SNV im C1q A Exon 2 (Gly 70).

3.3.1.1. Nachweis der Mutation C1q A Exon 2 (Gln 186)

Die Mutation C1q A Exon 2 (Gln 186) konnte zuvor bei 4 Familien aus der Türkei nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.4.1 Mutationen der A-Kette). Beide Elternteile der Patientin stammen aus der Türkei, so dass diese Mutationsform als erste überprüft wurde.

Es erfolgte nach DNA-Extraktion die Amplifikation des C1qA-Exon 2 mit anschließendem Restriktionsverdau mittels *PvuII* (siehe Abbildung 8) zum Nachweis der C1q A Exon 2 (Gln 186)-Mutation. Die Amplifikatgröße beträgt 601 bp. Durch *PvuII*-Verdau entstehen bei Normalsequenz zwei Fraktionen mit der Größe 475 bp und 126 bp, bei Vorhandensein der C1q A Exon 2 (Gln 186)-Mutation kommt es zu keinem Verdau durch das Enzym. Als Kontrollprobe (N) wurde DNA eines „Nicht-Merkmalsträger“ mitgeführt. Die Analyse zeigt, dass beide Elternteile (I1, I2), sowie die Patientin (II3) keine Mutationsanlage bezüglich der untersuchten Mutation tragen. Die schwachen Banden mit der Größe von 601 bp sind durch einen unvollständigen Verdau durch das Enzym zu erklären, da sie auch bei der mitgeführten Kontrollprobe auftreten.

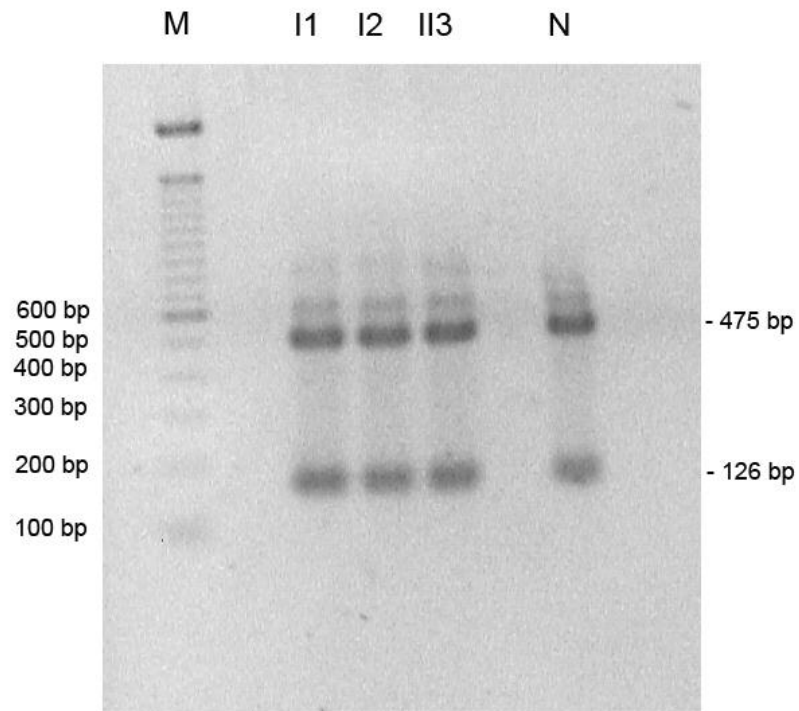


Abbildung 8: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qA Exon 2 nach Verdau mit PvuII

M: 100 bp ladder (DNA-Längenstandard)

N: Kontrolle Normalperson

I1; I2; I13 siehe Stammbaum (Abb. 7)

3.3.1.2. Nachweis der Mutation C1q B Exon 1 (Gly 15)

Der Nachweis der C1q B Exon 1 (Gly 15)-Mutation wurde nach Amplifikation mittels Restriktionsverdau mit *EcoRV* geführt. Die Amplifikatgröße beträgt 269 bp. Durch *EcoRV* -Verdau entstehen bei Normalsequenz zwei Fraktionen mit der Größe 140 bp und 129 bp, bei Vorhandensein der C1q B Exon 1 (Gly 15)-Mutation stellen sich drei Banden mit den Größen 129 bp, 83 bp und 57 bp dar. Als Positivkontrolle wurde DNA eines Merkmalsträgers, als Kontrollprobe (N) DNA eines „Nicht-Merkmalsträger“ mitgeführt. Die Analyse zeigt, dass beide Elternteile (I1, I2), sowie die Patientin (II3) keine Mutationsanlage bezüglich der untersuchten Mutation tragen (siehe Abbildung 9).

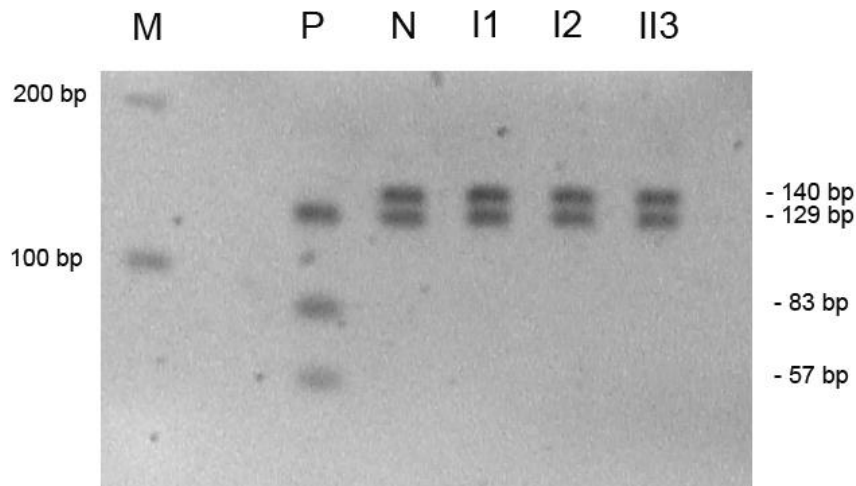


Abbildung 9: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 1 nach Verdau mit *EcoRV*

M: 100 bp DNA-Längenstandard
P: Positivkontrolle
N: Normalperson
I1; I2; II3 : siehe Stammbaum (Abb. 7)

3.3.1.4. Nachweis SNV (C1qA Exon 2 Gly70)

Petry und Loos (65) untersuchten 46 Personen aus 7 Familien mit einem oder mehreren homozygoten Mutationsträgern einer hereditären C1q-Defizienz und konnten bei 93 % der Untersuchten eine *single nucleotide variant* (SNV) im C1qA Exon 2 an Position Gly70 nachweisen (homozygot 44%, heterozygot 49%). Marquart et. al (29) konnten diese SNV bei keinem der 3 homozygoten Merkmalsträger der C1q-defizienten Inuit-Familie nachweisen. Racila et al. (66) zeigten auf, dass homozygote Merkmalsträger der SNV Gly70 eine erniedrigte C1q-Konzentration aufweisen. Um diese SNV bei den von uns beobachteten Elternteilen und der Patientin zu überprüfen, erfolgte der Nachweis durch Amplifikation der C1qA Exon 2 unter Zuhilfenahme einer „2-Phasen“-PCR (siehe Kapitel 2.5.9). In ihrem Anschluss erfolgte der Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit *Apal*. Die Amplifikatgröße beträgt 571 bp. Durch den Restriktionsverdau entstehen für den GGG-Typ zwei Banden mit den Größen 287 bp und 173 bp, für den GGA-Typ zwei Banden mit den Größen 287 bp und 192 bp. Als Kontrollen zwei heterozygote SNV-Träger (P1 und P3, GGG/GGA) und einen homozygoten (P2, GGA/GGA) Träger. Beide Elternteile und die Patientin tragen den GGA/GGA-Typ (siehe Abbildung 11).

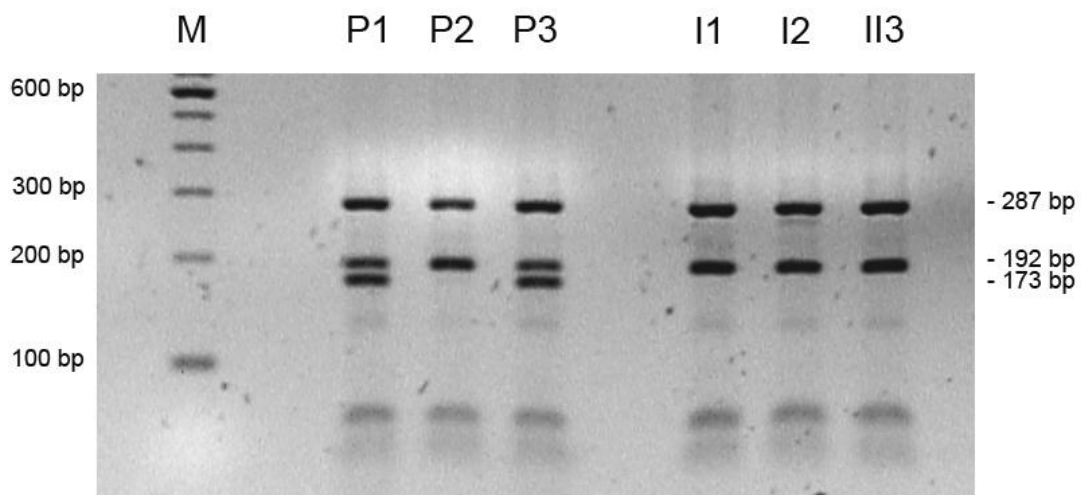


Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qA Exon 2 nach Verdau mit *ApalI* (SNV Gly70-Nachweis)

M: 100 bp Längenstandard
P1, P2, P3: Kontrollproben
I1; I2; I13: siehe Stammbaum (Abb. 7)

3.3.2. Sequenzierung der Exons 1 und 2 der C1qA-, C1qB- und C1qC-Gene

Da sich durch die vorhergehenden Untersuchungen keine Mutation als Ursache für die C1q-Defizienz der Patientin nachweisen ließen, entschlossen wir uns zur Durchführung der Sequenzierung der Exons 1 und 2 der jeweiligen C1qA-, C1qB- und C1qC-Gene in beiden Richtungen (5'-3' und 3'-5'). Dies sollte es uns ermöglichen eine mutmaßliche Mutation zu identifizieren. Die Primer wurden so gewählt, dass sie die Intron-/Exon-Grenzen miteinbeziehen und der gesamte kodierende Abschnitt zum Sequenzabgleich erhalten wird. Aufgrund der teilweise „großen“ Amplifikate war die Sequenzierung in beiden Richtungen notwendig. Um die Güte der PCR-Produkte noch zu verbessern wurden die Reaktionsbedingungen hinsichtlich Hybridisierungstemperatur und Zyklenanzahl variiert. Entgegen der kalkulierten Hybridisierungstemperatur erwies sich eine Hybridisierungstemperatur von 60°C bei 35 Zyklen als für unsere Ansprüche optimal. Mit den von uns initial verwandten Primern zeigten sich keine Sequenzabweichungen in Exon 1 und 2 des C1qA-Gens, Exon 1 des C1qB-Gens und Exon 2 des C1qC-Gens (siehe Anhang). Die Sequenzierung der PCR-Amplifikate des Exon 2 des C1qB-Gens und Exon 1 des C1qC-Gens erwies sich jedoch als sehr problematisch. Die Konzentration der PCR-Amplifikate war entweder für eine Sequenzierung zu gering oder die Sequenzierungsreaktion brach frühzeitig ab. Wiederholt durchgeführte Änderungen des Reaktionsprotokolls vermochten diese Probleme ebenso wenig zu lösen, wie Änderung in der Aufreinigung des PCR-Templates. Auch Konzentrationsversuche mittels Vakuumextraktion waren nicht erfolgreich. Darauf entschieden wir uns im nächsten Schritt die von Marquart et al. (29) für diese Exons verwandten Primer anzuwenden. Obwohl diese Primer in der Überprüfung durch die Primer3-Software deutlich schlechtere Eigenschaften besaßen, konnten wir dennoch zufriedenstellende Amplifikationsergebnisse erzielen. Es konnte auch im Exon 1 des C1qC-Gens keine Sequenzabweichung gefunden werden.

Auffallend war hingegen in C1qB-Exon 2 eine Größendifferenz des Amplifikates der Patientin II3 gegenüber der Normalkontrolle (N) sowie eine Verbreiterung der Banden für I1 und I2 (siehe Abbildung 12).

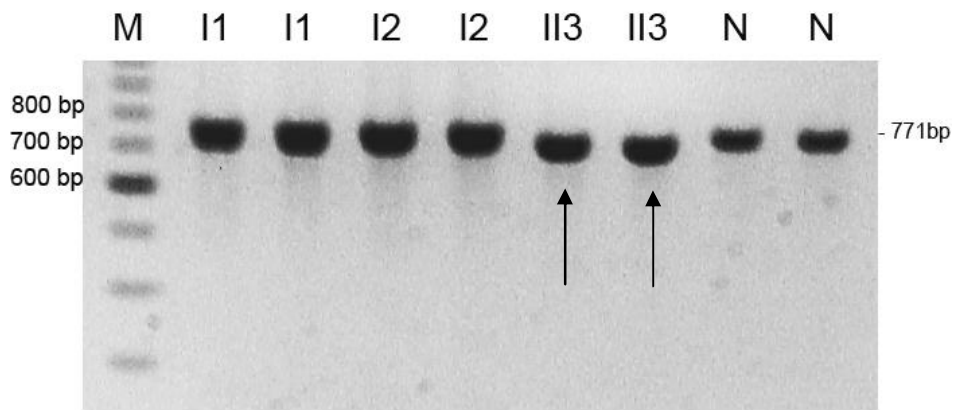


Abbildung 12: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 2

M: 100 bp DNA-Längenstandard; N: Normalkontrolle
I1; I2; II3 siehe Stammbaum (Abb. 7)

Der offensichtliche Größenunterschied der Amplifikatbande der Patientin (II3) ließ das Vorliegen einer nicht unwesentlichen Deletion im C1qB Exon 2 erahnen. Die Verbreiterung der Banden beider Elternteile (I1, I2) wären dann mit dem Vorliegen eines heterozygoten Trägerstatus vereinbar, also dem Vorliegen zweier Amplifikate unterschiedlicher Größe. Bei optimaler Wahl des Templateinsatzes bei der Agarosegelelektrophorese wäre dies besser darstellbar geworden.

Die Sequenzierung des PCR-Amplifikats zeigte in beiden Richtungen eine 29 Basen-Deletion im Exon 2 zwischen Position 283 bis 311 (Referenzsequenz NM_000491.3) des C1qB-Gens. Diese führt zu einem Rasterschub mit resultierendem frühzeitigem Stop-Codon. Entsprechend der Nomenklatur der Human Genome Variation Society (114) ergibt sich folgende Terminologie: c283_311del (pMet95TrpfsX8). Hierbei steht „c“ für „kodierende DNA-Sequenz“ (*coding DNA sequence*). Darauf folgt die Position des Beginns der Mutation, wobei die Position 1 das Adenin des „ATG“-Startcodons darstellt. In diesem Falle beginnt die Mutation an Position 283 und endet an Position 311 (283_311). Da es sich um eine Deletion handelt, wird der Positionsangabe ein „del“ (*deletion*) nachgestellt. Auf Proteinebene „p“ (*protein*) kommt es durch die Deletion zu einem Austausch von Methionin an Position 95 durch Tryptophan (pMet95Trp) und dadurch zu einem Rasterschub „fsX“ (*frameshift*) mit Auftreten eines frühzeitigen Stopcodons (X) an Codon 8 nach dem Aminosäureaustausch (pMet95TrpfsX8).

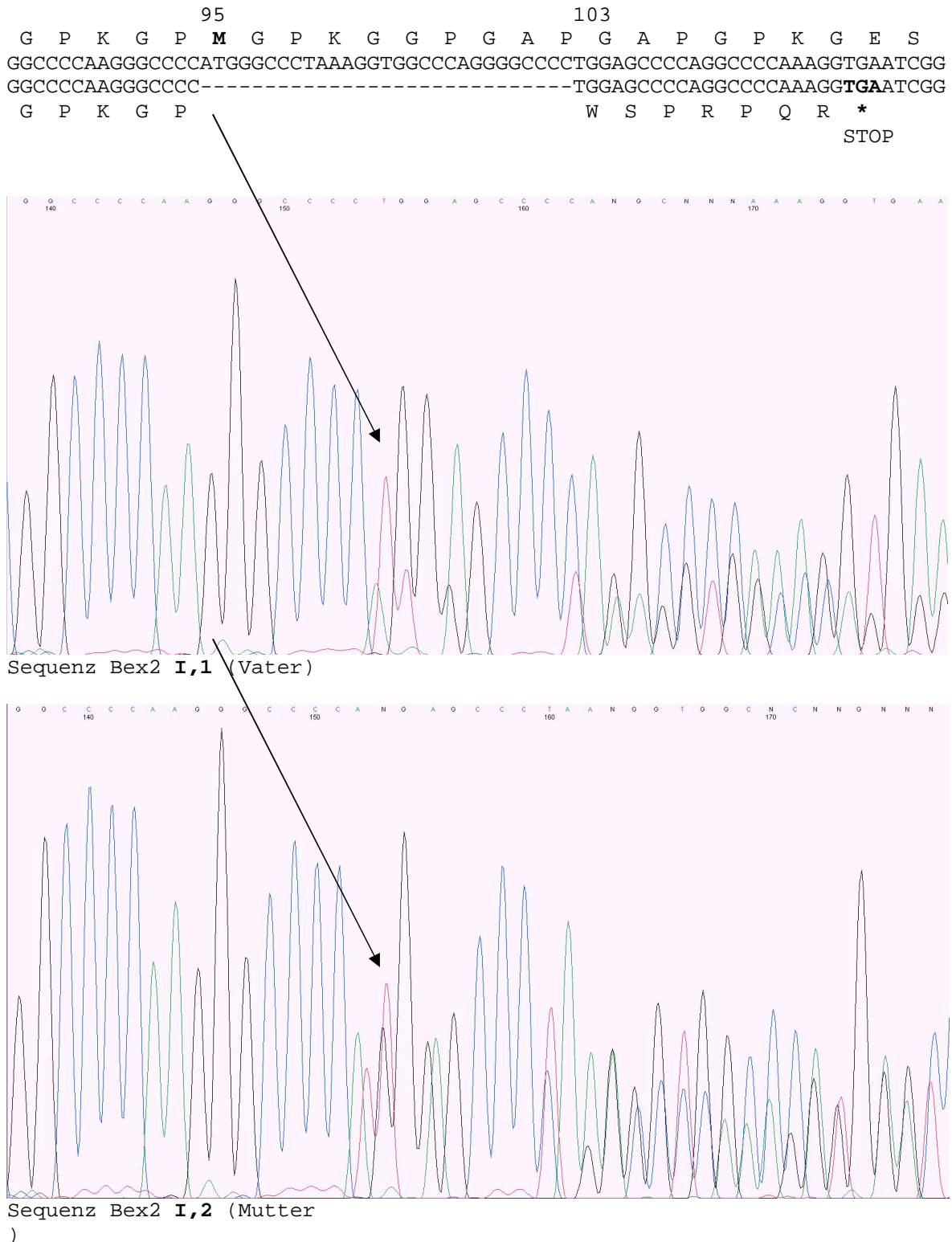


Abbildung 14 : Vergleichende Sequenzanalyse beider Elternteile und der Patientin (Vater und Mutter)

Abbildung 14 zeigt einen Ausschnitt des Chromatogrammes beider Elternteile. Zu erkennen ist, dass es ab Position 283 zu einer Überlagerung der Chromatogramme kommt (heterozygote Merkmalsträger).

3.3.3. Restriktionsverdauung mittels *NcoI*

Nach Identifizierung der verursachenden Mutation sollten nun im weiteren die Familienmitglieder auf ihren Mutationsträgerstatus überprüft werden. Um diese Analyse zu vereinfachen, konzeptionierten wir einen Restriktionsenzymverdau, analog zu den vorab untersuchten Mutationen. Hierfür wurden die Normalsequenz und Mutationssequenz unter Zuhilfenahme des Programmes NEBcutter (siehe Kapitel 2.6) einem virtuellen Verdau unterzogen. Das Restriktionsergebnis durch *NcoI* erschien uns geeignet (siehe Abbildung 15 und 16).

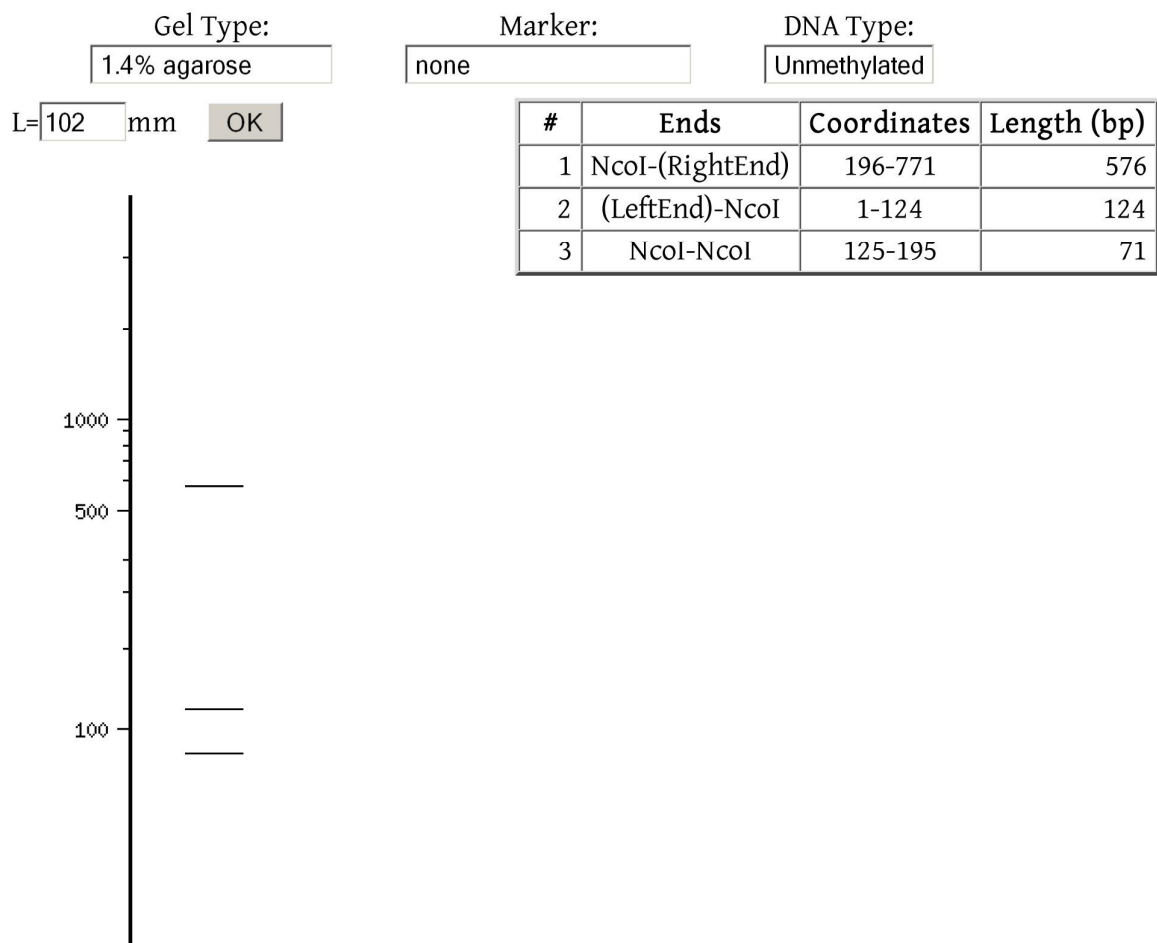


Abbildung 15 : Restriktionsstellen der Normalsequenz durch *NcoI*

Virtueller Restriktionsverdau und Elektrophorese der zu erwartenden DNA-Fragmente der Normalsequenz

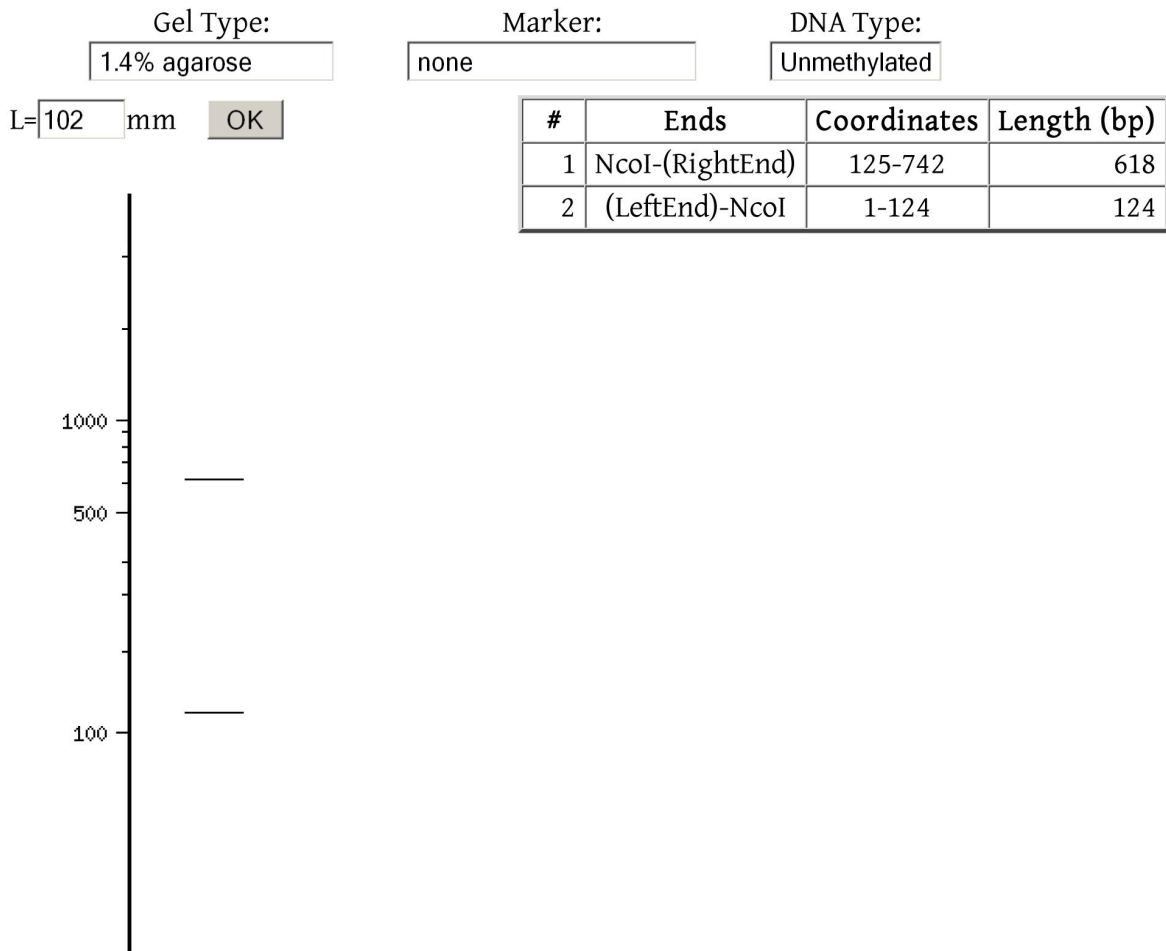


Abbildung 16 : Restriktionsstellen der Mutationssequenz (c283_311del) durch NcoI

Virtueller Restriktionsverdau und Elektrophorese der zu erwartenden DNA-Fragmente der Mutationssequenz

Wie in Abbildung 14 und 15 dargestellt führt der Verdau mittels *NcoI* bei der Normalsequenz zu 3 Banden mit den Größen 576 bp, 124 bp und 71 bp. Beim Verdau der Mutationssequenz c283_311del zu zwei Banden der Größe 618 bp und 124 bp. Im ersten Schritt erfolgte die Überprüfung mittels *NcoI*-Verdau an den Proben der Patientin und ihrer Eltern (siehe Abbildung 17). Als Kontrolle (N) wurde DNA einer Normalperson mitgeführt. Durch den Verdau bestätigte sich, dass die Patientin homozygote Mutationsträgerin ist (Bandengröße 618 bp und 124 bp), beide Eltern-teile sind heterozygote Merkmalsträger. Nachdem wir somit den Vererbungsgang darstellen konnten, bemühten wir uns zusammen mit den Kollegen der Universitätsklinik Münster um DNA-Proben beider Geschwister der Patientin. Die Eltern stimmten einer Untersuchung ihrer minderjährigen Kinder zu und wir erhielten EDTA-Blut zur DNA-Extraktion und weiteren Analyse. Diese ergab, dass der ältere Bruder der Patientin, wie seine Eltern, heterozygoter Merkmalsträger ist, die Schwester der Patientin trägt dagegen den Wildtyp (siehe Abbildung 18).

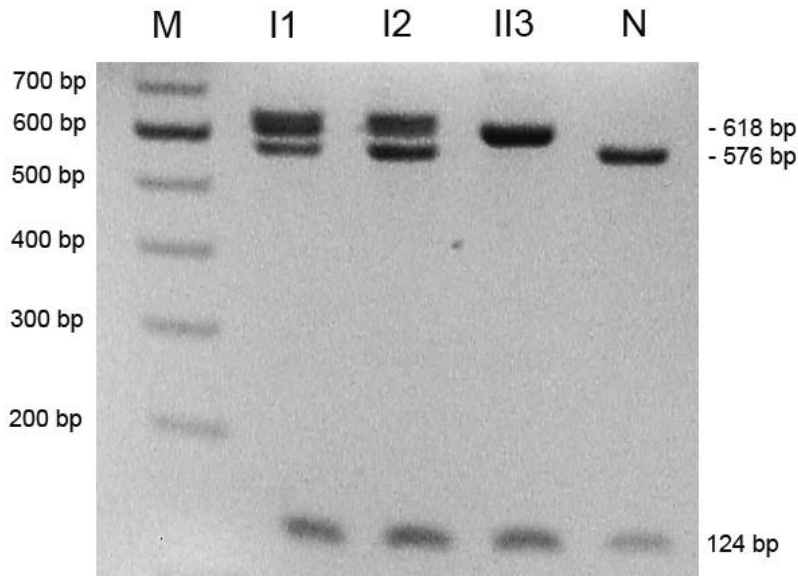


Abbildung 17: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 2 nach Verdau mittels NcoI

N: Normalperson

I1; I2; II3 siehe Stammbaum (Abb. 6)

I1 (Vater) und I2 (Mutter) zeigen die heterozygote Anlage der Mutation gegenüber der Patientin II3. Auf die Darstellung der 71 bp-Bande wurde zugunsten der besseren Übersicht verzichtet.

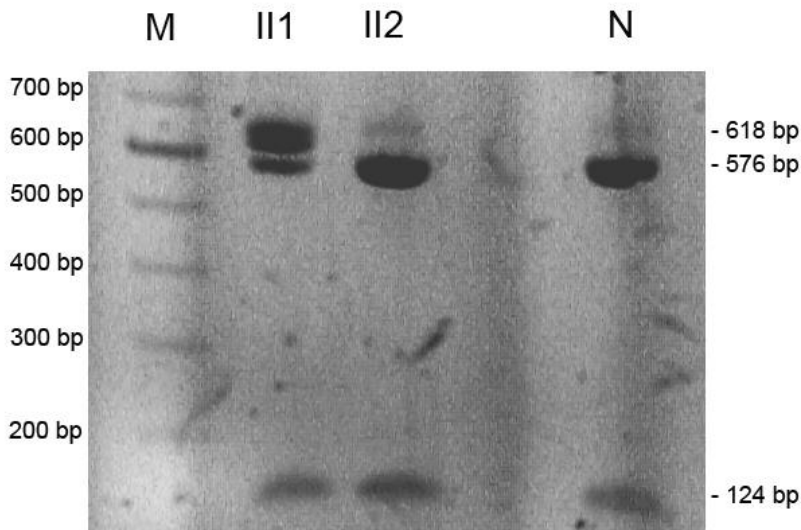


Abbildung 18: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 2 nach Verdau mittels NcoI

N: Normalperson

II1 (Bruder); II2 (Schwester); siehe Stammbaum (Abb. 6)

II1 zeigt die heterozygote Anlage der Mutation, II2 den Wildtyp

Auf die Darstellung der 71 bp-Bande wurde zugunsten der besseren Übersicht verzichtet.

Nach Aufdeckung der Mutation im C1qB Exon 2 als Verursacher der SLE-ähnlichen Symptomatik der Patientin, wurden wir darüber informiert, dass die Mutter der Patientin erneut schwanger sei. Sie konnte von der Notwendigkeit einer humangenetischen Betreuung überzeugt werden und stimmte einer Chorionzottenbiopsie zu, die es uns im weiteren ermöglichte, auch das ungeborene Kind auf seine Mutationsanlagen hin zu untersuchen.

Durch das Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Münster wurde uns daraufhin eine DNA-Probe, gewonnen aus einer Chorionzottenbiopsie der schwangeren Mutter (I2) zur Verfügung gestellt. Es gelang uns mittels des Restriktionsverdau des PCR-Amplifikates nachzuweisen, dass das Ungeborene ebenfalls den Wildtyp, also keine Mutationsanlage trägt (Abbildung 19)

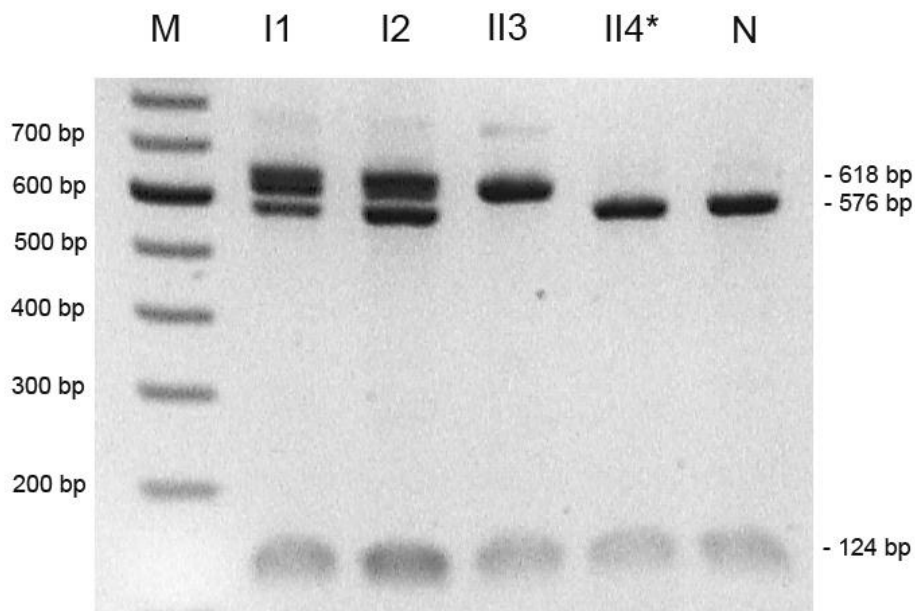


Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 2 aus Chorionzottenbiopsie nach Verdau mittels NcoI

N: Normalperson

I1, I2, I13; I14* siehe Stammbaum (Abb. 6)

I14* (ungeborenes Kind) trägt den Wildtyp wie Kontrolle N

Auf die Darstellung der 71 bp-Bande wurde zugunsten der besseren Übersicht verzichtet.

3.3.4. Übertragung der Ergebnisse auf den Stammbaum

Die obengenannten Analysen ermöglichten uns den Nachweis einer bislang nicht beschriebenen Mutation im C1q B Exon 2 als Verursacher einer hereditären C1q-Defizienz mit Ausbildung einer SLE-ähnlichen Symptomatik. Gemäß der Nomenklatur der Human Genome Variation Society (114) ergibt sich folgende Terminologie: c283_311del (pMet95TrpfsX8). Durch die Überprüfung der Eltern und Geschwister der Patientin, sowie des zum Zeitpunkt der Analyse ungeborenen Kindes, konnten wir den Vererbungsweg darstellen (Abbildung 20). Leider lagen uns keine Proben der Großeltern vor, um den Vererbungsweg in dieser Generation darzustellen. Aufgrund der schweren klinischen Manifestation der Patientin, wobei der Einfluss der partiellen C4B-Mutation nicht abgeschätzt werden kann, erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass einer der Großeltern homozygoter Merkmalsträger ist. Da die Großmütter Schwestern, die Großväter Brüder sind, erscheint es durchaus möglich, dass beide Großväter oder Großmütter heterozygote Merkmalsträger sind, zumindest aber pro Paar ein Merkmalsträger vorhanden ist.

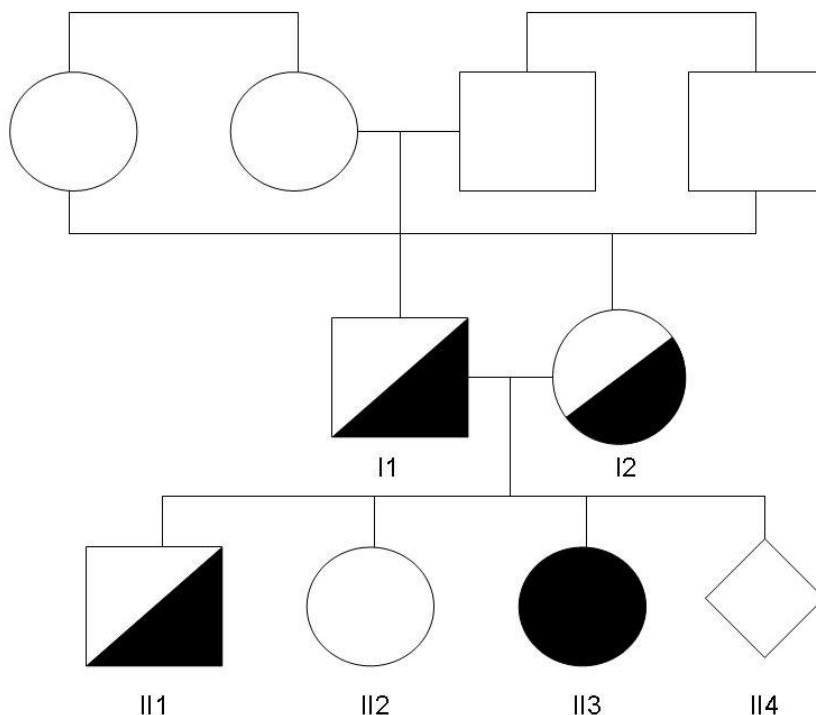


Abbildung 20: Stammbaum der Familie der Patientin II3

I1 und I2 (Eltern) sind heterozygote Träger der Mutation, ebenso II1. II3 ist homozygot für die Mutation c283_311del und erkrankt. II2 und II4 tragen den Wildtyp.

4 Diskussion

4.1. Serologische Ergebnisse

Das Auftreten von Autoimmunerkrankungen, insbesondere von SLE-ähnlichen Symptomatiken ist charakteristisch für Defizienzen im Klassischen Weg des Komplementsystems. Dabei unterscheiden sich die klinische Symptomatik und das Auftreten von Autoantikörpern bei Patienten mit hereditären Komplementdefizienzen sehr von SLE-Patienten ohne angeborene Defizienz. So ist das Auftreten von dsDNA-Antikörpern bei Patienten mit einer hereditären C1q- oder C4-Defizienz zu Beginn eine Seltenheit. Bei der von uns betrachteten Patientin zeigte sich anfangs der Nachweis antinukleärer Antikörper (ANA) zwar positiv, die Differenzierung ergab jedoch keinen Nachweis von Anti-dsDNA-Antikörpern. Positiv waren jedoch Antikörper gegen Sm und U1-snRNP. Dieser Nachweis suggeriert das Vorliegen eines SLE, auch bei Fehlen von Anti-dsDNA-Antikörpern. Die Heterogenität der Autoantikörperbildung bei C1q-Defizienzen gegenüber derer bei z. B. C4- oder C2-Defizienzen ist ausführlich beschrieben (101). Die zur Verfügung gestellten Untersuchungsergebnisse zeigten, dass es im weiteren Verlauf zu einer plötzlichen Erhöhung der Anti-dsDNA-Antikörper kam und von einer drastischen Verschlechterung des klinischen Bildes begleitet wurde. Sie stellen somit auch in diesem Fall einen wesentlichen Marker für die Aktivität der SLE-ähnlichen Symptomatik dar. Zudem sind Organmanifestationen, wie zum Beispiel die Lupus-Nephritis, mit ihrer Anwesenheit assoziiert (115). Ihre regelmäßige Kontrolle auch bei initialem Fehlen sollte demnach in die Routinediagnostik von Patienten mit hereditären Komplementdefizienzen aufgenommen werden. Daneben sind regelmäßige Kontrollen der hämatologischen Parameter und Entzündungsmarker zu empfehlen. Zur Beurteilung möglicher Organmanifestationen sollten in regelmäßigen Abständen Urinalysen und echokardiographische Untersuchungen erfolgen. Invasive Diagnostik, wie zum Beispiel eine Nierenbiopsie zur Abklärung einer Lupus-Nephritis, sollte nach Auftreten einer Proteinurie frühzeitig in Betracht gezogen werden, da eine verzögert einsetzende Therapieoptimierung in solchen Fällen zu einem frühzeitigen Verlust der Organfunktion mit damit einhergehenden Ersatzverfahren und Steigerung der Letalität einhergehen kann.

Hereditären Komplementdefizienzen des Klassischen Weges ist ein Verlust der gesamthämolytischen Aktivität CH50 (CH100) gemeinsam. Durch gleichzeitige Bestimmung des AP50 ist schon frühzeitig eine Eingrenzung der Defizienz auf die Komponenten des Klassischen Weges möglich. Die Bestimmung der Einzelkomponenten C3 (bzw. C3c) und C4 ist zur Aktivitätsbeurteilung eines SLE durchaus sinnvoll, vermag jedoch eine C1q-Defizienz als Verursacher eines SLE nicht zu demaskieren. Die Quantifizierung des C1q mittels ELISA oder Immunodiffusion stellt den „Goldstandard“ in der Identifizierung einer C1q-Defizienz dar. Hier ist die Immunodiffusion dem ELISA durch Detektion von LMW-C1q noch deutlich überlegen, bei jedoch verminderter Sensitivität. In unserem Fall war weder mittels ELISA noch über die Doppel-Immunodiffusion nach Ouchterlony C1q nachweisbar. Das Vorliegen eines LMW-C1q war somit ausgeschlossen. Die Einzelfaktorenbestimmung der Komponenten C2 und C4 waren wiederholt normwertig, so dass die C1q-Defizienz als Verursacher der SLE-ähnlichen Symptomatik der Patientin angenommen werden musste. Eine funktionelle C1q-Defizienz, wie sie im Rahmen eines SLE durch Auftreten von Anti-C1q-Antikörpern auftritt, ist durch parallele Quantifizierung gerade eben dieser Antikörper auszuschließen. Aufgrund der zum Zeitpunkt der Diagnose eines SLE noch geringgradig ausgeprägten Autoantikörper-Synthese erscheint die Existenz von Anti-C1q-Antikörpern jedoch unwahrscheinlich. Eine Elimination von C1q durch Auto-C1q-Antikörper und der damit einhergehende fehlende Nachweis in der Doppel-Immunodiffusion nach Ouchterlony zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist somit auszuschließen. Die ausbleibende Wiederherstellung der gesamthämolytischen Aktivität (CH50) durch Zugabe eines C2-defizienten Serums unterstreicht den Verdacht auf das Vorliegen einer C1q-Defizienz bei gleichzeitig nachgewiesener hochnormaler C2-Konzentration. Die überschießende gesamthämolytische Aktivität (CH50 >200 d.N.) nach Zugabe eines C4-defizienten Serums kann durch die Hochregulation von C2 erklärt werden. Die mittlerweile diagnostizierte partielle C4B-Defizienz scheint daneben keine wesentliche funktionelle Bedeutung zu besitzen. Die ausbleibende Wiederherstellung der gesamthämolytischen Aktivität (CH50) durch Zugabe eines C2-defizienten Serums verleitet zur Annahme einer C2-Defizienz, wobei die gleichzeitig ermittelte hochnormale C2-Konzentration dann auf ein „nicht-funktionelles“ C2 hingewiesen hätte. Unter Berücksichtigung der parallel ermittelten C1q-Defizienz ist Letztgenannte jedoch als Verursacher der Symptomatik vorab zu berücksichtigen und nachgeschaltete Reaktionsverluste auf eben ihre Abwesenheit

zurückzuführen. Aufgrund dieser Schlussfolgerungen folgte die molekularbiologische Abklärung einer C1q-Defizienz aufgrund einer Mutation in einem der drei C1q-Gene, unter besonderer Berücksichtigung der bislang bekannten Mutationen. Die ethnische Abstammung der betroffenen Patientin (beide Elternteile stammen aus der Türkei) ließ eine Mutation im C1q Exon 2 (Gln 186) am wahrscheinlichsten erscheinen.

4.2. Molekularbiologische Ergebnisse

C1q stellt ebenso wie C8 eine Ausnahme unter den Komplementfaktoren dar, da es durch mehr als ein Gen kodiert wird. Posttranslationale Modifizierung und enzymatische Aktivierung führen zu einer Aufspaltung der Komponenten in kleinere Fraktionen, die üblicherweise durch Disulfidbrückenbindungen zusammengehalten werden. Im Falle von C1q werden 18 Polypeptide als Produkt dreier Gene zusammengestellt, was einer hochgradigen Regulierung bedarf (67). Die Abwesenheit aller C1q-Formen legt nahe, dass Struktur und Funktion streng aneinander gebunden sind. Dies wird zusätzlich unterstrichen durch die Strukturhomologie von C1q in verschiedenen Spezies (116). Eine mutationsbedingte Änderung einzelner Bestandteile des C1q führt folglich zu einem Verlust der Funktionalität, wenn nicht sogar zum vollständigen Erliegen der C1q-Synthese. Dies erklärt den Nachweis einer LMW-C1q-Variante bei Vorliegen der Mutationen C1qB Exon 1 (Gly15-Asp) und C1qC Exon 1 (Gly6-Arg) bei vollständigem Verlust der C1q-Funktionalität und dem vollkommen fehlenden Nachweis eines C1q bei allen anderen beschriebenen Mutationen in einem der 3 C1q-Gene. Im Falle der C1qB Exon 1 (Gly15-Asp)- und C1qC Exon 1 (Gly6-Arg)-Mutationen wird angenommen, dass der Austausch einer ungeladenen Aminosäure (Gly) gegen eine negativ geladene Aminosäure (Asp) oder positiv geladenen Aminosäure (Arg) zu einer Ladungsänderung in den betroffenen Ketten führt und eine regelrechte Anlage somit verhindert wird (72). Eine Störung im repetitiven Muster von kollagenen Komponenten durch Ersetzen eines Glycins durch eine andere Aminosäure führt z.B. auch bei der Osteogenesis imperfecta (Punktmutation im Kollagen I) zur Ausbildung eines strukturell schwer geschädigten Kollagens mit deutlich verminderter Synthese und Funktionalität. Bei Mutationen in einem der drei C1q-Gene, die zu Kettenabbrüchen führen, konnte bislang kein C1q oder LMW-C1q nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass bereits auf translationaler Ebene eine

Syntheseregulation der nachgeschalteten Ketten vorliegt. Eine Bestätigung dieser These konnte bislang jedoch noch nicht erbracht werden. Ein C1q-Antigen konnte weder durch den von uns durchgeführten ELISA noch durch einen Doppel-Immunodiffusionstest nach Ouchterlony detektiert werden. Durch den Einsatz verschiedener Antikörper gegen C1q in den beiden genannten Verfahren erscheint das Vorhandensein eines C1q unwahrscheinlich.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten sieben verschiedene Mutationen in den C1q-Genen als Verursacher einer hereditären C1q-Defizienz beschrieben werden. Allen Mutationen ist gemeinsam, dass es sich um Punktmutationen mit Basenaustausch handelte, die entweder zu einem Aminosäureaustausch oder durch ein frühzeitiges Stop-Codon zum Kettenabbruch oder einem Rasterschub führen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Mutation unterscheidet sich grundsätzlich von den vorher genannten. Es handelt sich um die Deletion von 29 Basen im Exon 2 zwischen Position 283 bis 311 des C1q-B-Genes (c.283_311del). Daraus resultiert der Austausch des Methionin an Position 95 durch Tryptophan mit einhergehendem Rasterschub unter Ausbildung eines vorzeitigem Stop-Codon an Position 103 (p.Met95TrpfsX8). Die relative Größe der Mutation konnte durch die offensichtliche Diskrepanz der Amplifikatgröße nach Amplifikation des C1qB Exon 2 der elterlichen und Patienten-DNA erahnt werden (siehe Abbildung 11). Diese fiel schon nach Amplifikation mit den ursprünglich genutzten Primern auf, ihr wurde zu diesem Zeitpunkt jedoch wenig Bedeutung beigemessen. Da die Optimierungsversuche und mehrmaligen Wiederholungen der Amplifikation und Sequenzierung unter Nutzung der primär ausgewählten Primer sehr zeitaufwendig waren, verzögerte sich die „Entdeckung“ der obengenannten Mutation unnötig. Erst durch Auswahl der von Marquart et al. (29) verwandten Primer für die ausstehende Amplifizierung und Sequenzierung des C1qB Exon 2 und C1qC Exon 1 gelang uns der vollständige Sequenzabgleich und Offenlegung der Mutation. Erstaunlicherweise waren die von Marquart et al. (29) für diese Exons gewählten Primer in der Überprüfung mittels Primer3-Software (106) den primär von uns ausgewählten hinsichtlich GC-Gehalt und Temperaturoptimum unterlegen. Auch die deutlich größere Amplifikatgröße des C1qB Exon 2-Produktes erschien uns initial eher kontraproduktiv.

Die Mutation betrifft, wie bereits bekannten Mutationen, den kollagenen Anteil einer C1q-Untereinheit. Die Patientin ist für diese Mutation homozygot, ihre Eltern tragen

diese Anlage so wie ihr älterer Bruder heterozygot, ihre ältere Schwester und das zum Zeitpunkt des Nachweises ungeborene Kind tragen die Mutationsanlage nicht.

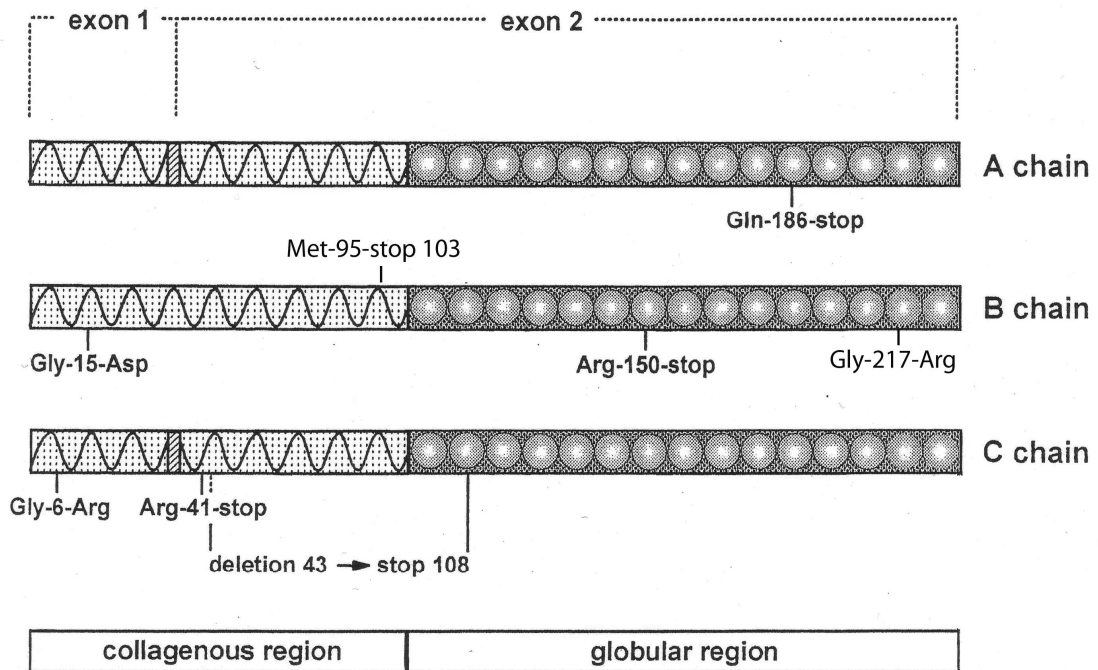


Abbildung 21: Übersicht der bislang bekannten C1q-Gen-Mutationen(70)

* Originalabbildung durch Gly-217-Arg und Met-95-Trp ergänzt

Wie in der Vielzahl der bisher nachgewiesenen Familien mit hereditären C1q-Defizienzen liegt auch hier eine Blutsverwandtschaft der Eltern vor (Großväter waren Brüder, Großmütter Schwestern). Bei Kindern von Cousin und Cousine ersten Grades erhöht sich das Risiko zusätzlich zum „Basisrisiko“ für eine angeborene Fehlbildung oder Erbkrankheit um 3–4%. In unserem Falle bestand eine Verwandtschaft sowohl auf großväterlicher als auch auf großmütterlicher Seite, so dass sich dieses Risiko nochmals verdoppelte (117). Eheschließungen unter Verwandten sind bei 20 Prozent der Weltbevölkerung üblich (117). Auch in Deutschland ist davon auszugehen, dass mit einer Zunahme von Immigranten aus Kulturkreisen, die Eheschließungen unter Verwandten bevorzugen, eine Zunahme von Erbkrankheiten zu verzeichnen sein wird. An dieser Stelle grundsätzlich die Notwendigkeit einer humangenetischen Betreuung von Partnern aus Verwandtenehen zu empfehlen, ist moralisch und historisch bedingt schwierig.

Die Bereitschaft der in unserem Falle betroffenen Familie, sich einer humangenetischen Betreuung zu unterziehen, machte es uns möglich, den Gendefekt für

ein Ungeborenes auszuschließen. Dies stellt in der Diagnostik von Komplementdefekten ein Novum dar. Die frühzeitige, in diesem Falle sogar pränatale Diagnostik eröffnet Behandlungsmöglichkeiten für den Falle einer Komplementdefizienz vor Ausbildung einer klinischen Symptomatik. Dies würde die Lebensqualität und -erwartung der Betroffenen signifikant verbessern. Neben der Substitutionstherapie mittels Plasmaprodukten könnten zukünftig rekombinant hergestellte Komplementfaktoren eine Behandlungsoption darstellen. Der komplexe Aufbau und die umfangreichen posttranslationalen Modifikationen des C1q-Komplexes machten seine Synthese bislang noch sehr schwierig und es ist abzuwarten, ob ein Einsatz als Therapeutikum in absehbarer Zeit realisierbar ist. Bis dahin stellt die Substitutionstherapie mit Plasmapräparaten, mit all ihren Nachteilen wie Immunisierung des Systems und Infektion mit bislang unbekannten Erregern (z. B. Prionen), die erfolgversprechendste Therapieoption dar. Eine alleinige immunsuppressive Therapie erscheint unter Betrachtung der komplexen Funktionen des C1q wenig sinnvoll. Der Einsatz von Thalidomid als immunmodulierende Substanz erscheint bei der Behandlung des SLE und SLE-ähnlicher Symptomatiken erfolgversprechend (118, 119). Jedoch steht der Renaissance dieser Substanz ihre Historie offensichtlich im Wege (Contergan-Skandal). Eine weitere Option stellt der Einsatz von Stammzelltransplantationen als Therapieform von Komplementdefizienzen dar. Die im Tierversuch nachgewiesene Rekonstitution einer C1q-Defizienz durch allogene Stammzelltransplantation (104) erweckt Hoffnungen. Die sich beim Einsatz dieser Therapieform beim SLE bislang gemachten Erfahrungen waren wider Erwarten enttäuschend (86). Analog zum SCID wären Defizienzen des Komplementsystems zukünftig auch mittels Gentherapie behandelbar.

Im Falle der von uns untersuchten Patientin stellt das Auftreten von Anti-dsDNA-Antikörpern eine ernst zu nehmende Verschlechterung der klinischen Situation dar. Organmanifestationen, wenn noch nicht wesentlich aufgetreten, sind durch eine Therapieoptimierung zu limitieren. Die Substitution der fehlenden Komponente mittels Plasmapräparaten in Kombination mit einem Immunmodulator (z. B. Thalidomid) könnte hier erfolgversprechend sein. Hereditäre Komplementdefizienzen gehen mit einer wesentlichen Reduzierung der Lebensqualität der Betroffenen einher. Die erhöhte Infektanfälligkeit und das Auftreten von Autoimmunerkrankungen senken die Lebenserwartung, auch in Industrieländern mit maximaler Gesundheitsfürsorge, drastisch. Optimierung der jeweiligen Therapien und

engmaschige Kontrollen der Therapieeffektivität stellen die Basis für eine zufriedenstellende Betreuung des Patienten dar.

5 Zusammenfassung

Komplementdefizienzen gehen mit einer erhöhten Infektionsanfälligkeit gegenüber bestimmten Krankheitserregern in den ersten Lebensjahren (MBL-Defizienz) und darüber hinaus (C1q- und anderen Komplement-Defizienzen) einher. Dies unterstreicht die Rolle des Komplementsystems als effektiver Abwehrmechanismus in der Übergangsphase zwischen Verlust des „mütterlichen Nestschutzes“ und Ausreifung der eigenen „erworbenen“ Immunität. Das Auftreten von Autoimmunerkrankungen wie dem SLE-ähnlichen Syndrom bei Defizienzen des Klassischen Weges beleuchtet zusätzliche Funktionen des Komplementsystems während der Ausreifung der erworbenen Immunität und als wesentlicher Effektor in der Erkennung apoptotischer Zellen und deren Eliminierung aus dem System.

Hereditäre C1q-Defizienzen gehen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit mit einem SLE-ähnlichen Syndrom einher. Sie stellen unter den Defizienzen des Komplementsystems eine Seltenheit dar, ihr klinisches „Gesicht“ ist umso eindrucksvoller. Sie sind von den funktionellen C1q-Defizienzen im Rahmen eines erhöhten „turnover“ und in Folge einer C1q-Autoantikörperbildung abzugrenzen. Ursächlich ist ihnen eine Mutation in einem der drei C1q-Gene. Homozygote Mutationsträger können den Defekt nicht ausgleichen und zeigen eine C1q-Defizienz mit Verlust der gesamthämolytischen Aktivität CH50. Die Defizienzen werden autosomal vererbt und treten bei Nachkommen von Geschwister- und Verwandtschaftsehen somit häufiger auf. Verwandtschaftsehen stellen in bestimmten ethnischen Gruppen keine Besonderheit dar, gehen jedoch allgemein mit einem erhöhten Risiko für Erbkrankheiten bei ihren Nachkommen einher. Auch in Deutschland ist davon auszugehen, dass mit einer Zunahme von Immigranten aus Kulturkreisen, die Eheschließungen unter Verwandten bevorzugen, eine Zunahme von Erbkrankheiten zu verzeichnen sein wird.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Mutation im C1q-B-Gen führt zu einer kompletten C1q-Defizienz mit Ausbildung eines SLE-ähnlichen Syndroms ohne Nachweis eines C1q-Antigens. Im Gegensatz zu den bislang identifizierten Mutationen in den C1q-Genen stellt sie eine Deletion von mehr als einer Base dar. Diese Deletion führt zu einem Rasterschub mit Ausbildung eines verfrühten Stop-Codons.

Der sehr frühe Erkrankungsbeginn der Patientin kann Ausdruck der bei ihr vorliegenden kombinierten C1q-C4-Defizienz sein. Neben einer immunsuppressiven Therapie stellt, gerade bei kombinierten Komplementdefizienzen, die Gabe von Plasmapräparaten eine Behandlungsoption dar. Vorausblickend können auch allogene Stammzelltrans-plantationen solche Defekte lebenslang ausgleichen.

Die Möglichkeit unsere Mutationsanalyse als pränatale Diagnostik anzuwenden stellt in der Diagnostik der Komplementdefizienzen ebenso eine Neuheit dar. Zukünftig können solche Diagnosemöglichkeiten wesentlich den Krankheitsverlauf von betroffenen Patienten durch frühzeitigen Substitutionsbeginn von z. B. Plasmapräparaten entscheiden.

Die Aufgaben des Komplementsystems, neben der reinen Vermittlung einer „angeborenen“ Immunität, als Erkennungs- und Effektorsystem müssen durch weitere Untersuchungen und Tier-Modelle beleuchtet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Buchner H. Ueber die nähere Natur der bakterientödtenden Substanz im Blutserum. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde 1889; 6(21):561–5.
2. Buchner H. Ueber die bakterientödtende Wirkung des zellenfreien Blutserums : nach einem Vortrag in der morphologisch-physiologischen Gesellschaft zu München am 7. Mai 1889. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. V. Band. 1889:1–11.
3. Bordet J. Mécanisme de L'Agglutination. Annales de l'Institut Pasteur 1899; 13:225–50.
4. Ehrlich P, Morgenroth J. Zur Theorie der Lysinwirkung. Berliner klinische Wochenschrift 1899; 36:6–9.
5. Ehrlich P, Morgenroth J. Ueber Hämolysine Zweite Mittheilung. Berliner klinische Wochenschrift 1899; 36:481–6.
6. Ehrlich P, Morgenroth J. Ueber Haemolysine : dritte Mittheilung. Berliner klinische Wochenschrift 1900; 37:453–8.
7. Ehrlich P, Morgenroth J. Ueber Haemolysine : vierte Mittheilung. Berliner klinische Wochenschrift 1900; 37:681–7.
8. Walport MJ. Complement First of Two Parts. The New England Journal of Medicine 2001; 344(14):1058–66.
9. Thomas L, editor. Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 7. Aufl. Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges.; 2008.
10. WHO. Nomenclature of complement. Bulletin of the World Health Organization. 1968; 39(6):935–8.
11. WHO. Complement nomenclature. Bulletin of the World Health Organization. 1969; 40(3):455–8.
12. WHO. WHO report. Nomenclature of the alternative activating pathway of complement. European Journal of Immunology. 1981; 11(8):668–9.
13. WHO. Nomenclature for human complement component C2. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee. Bulletin of the World Health Organization. 1992; 70(4):527–30.
14. WHO. Nomenclature for human complement factor B. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee. Bulletin of the World Health Organization. 1992; 70(4):541–6.
15. WHO. Revised nomenclature for human complement component C4. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee. Bulletin of the World Health Organization. 1992; 70(4):531–40.
16. WHO. Nomenclature for human complement component C2. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee. Journal of Immunological Methods 1993; 163(1):1–2.
17. WHO. Nomenclature for human complement factor B. WHO-IUIS Nomenclature Sub-Committee. Journal of Immunological Methods 1993; 163(1):9–11.

18. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag; 5. Aufl. Heidelberg: 2002.
19. Bhakdi S, Trantum-Jensen J. Molecular nature of the complement lesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978; 75(11):5655–9.
20. Janeway CA Jr., Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology*. 7th ed. New York: Garland Publishing; 2009.
21. Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag; 7. Aufl. Heidelberg: 2009.
22. Walport MJ. Complement Second of Two Parts. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344(15):1140–4.
23. Nagata M, Hara T, Aoki T, Mizuno Y, Akeda H, Inaba S, Tsumoto K, Ueda K. Inherited deficiency of ninth component of complement: an increased risk of meningococcal meningitis. *Journal of Pediatrics* 1989; 114(2):260–4.
24. Summerfield JA, Sumiya M, Levin M, Turner MW. Association of mutations in mannanose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. *British Medical Journal* 1997; 314(7089):1229–32.
25. Tanner J, Weis J, Fearon D, Whang Y, Kieff E. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 1987; 50(2):203–13.
26. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 1997; 277(5329):1091–3.
27. Lindahl G, Sjöbring U, Johnsson E. Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. *Current Opinion in Immunology* 2000; 12(1):44–51.
28. Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 1998; 199(2):265–85.
29. Marquart HV, Schejbel L, Sjöholm A, Martensson U, Nielsen S, Koch A, Svejgaard A, Garred P. C1q deficiency in an Inuit family: Identification of a new class of C1q disease-causing mutations. *Clinical Immunology* 2007; 124(1):33–40.
30. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Advances in Immunology* 2000; 76:227–324.
31. Jönsson G, Truedsson L, Sturfelt G, Oxelius V, Braconier JH, Sjöholm AG. Hereditary C2 deficiency in Sweden: frequent occurrence of invasive infection, atherosclerosis, and rheumatic disease. *Medicine (Baltimore)* 2005; 84(1):23–34.
32. Turner MW. Deficiency of mannan binding protein - a new complement deficiency syndrome. *Clinical & Experimental Immunology* 1991; (86 (Suppl. 1)):53–6.
33. Presanis JS, Kojima M, Sim RB. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochemical Society Transactions* 2003; (31/ Part 4):748–52.
34. Botto M, Kirschfink M, Macor P, Pickering MC, Würzner R, Tedesco F. Complement in human Diseases: Lessons from complement deficiencies. *Molecular Immunology* 2009; (46):2774–83.

35. Neth O, Hann I, Turner MW, Klein N. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet* 2001; (358):614–8.
36. Sullivan KE, Wooten C, Goldman DPM. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1996; 39(12):2046–51.
37. Truedsson L, Westberg J, Fredrikson GN, Sjöholm AG, Kuijper EJ, Fijen CA, Späth PJ, Uhlén M. Human properdin deficiency has a heterogeneous genetic background. *Immunopharmacology* 1997; 38(1-2):203–6.
38. Densen J. Functional and antigenic analysis of human factor B deficiency. *Molecular Immunology* 1996; (33 Suppl.):Abstract 270.
39. Biesma DH, Hannema AJ, van Velzen-Blad H, Mulder L, van Zwieten R, Kluij I, Roos D. A family with complement factor D deficiency. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 108(2):233–40.
40. Hiemstra PS, Langeler E, Compier B, Keepers Y, Leijh PC, van den Barselaar MT, Overbosch D, Daha MR. Complete and partial deficiencies of complement factor D in a Dutch family. *The Journal of Clinical Investigation* 1989; 84(6):1957–61.
41. Sprong T, Roos D, Weemaes C, Neeleman C, Geesing CLM, Mollnes TE, van Deuren M. Deficient alternative complement pathway activation due to factor D deficiency by 2 novel mutations in the complement factor D gene in a family with meningococcal infections. *Blood* 2006; 107(12):4865–70.
42. Abrera-Abeleda MA, Xu Y, Pickering MC, Smith RJH, Sethi S. Mesangial immune complex glomerulonephritis due to complement factor D deficiency. *Kidney International* 2007; 71(11):1142–7.
43. Pettigrew HD, Teuber SS, Gershwin ME. Clinical significance of complement deficiencies. *The New York Academy of Sciences* 2009; 1173:108–23.
44. Der Fischer Weltalmanach 2010: Zahlen, Daten, Fakten. Schwerpunkt. Wirtschafts- und Finanzkrise: Fischer (TB.), Frankfurt; 2009.
45. Würzner R, Orren A, Lachmann PJ. Inherited deficiencies of the terminal components of human complement. *Immunodeficiency Review* 1992; 3(2):123–47.
46. Agostoni A, Aygören-Pürsün E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, Bucher C, Castaldo AJ, Cicardi M, Davis AE, De Carolis C, Drouet C, Duponchel C, Farkas H, Fáy K, Fekete B, Fischer B, Fontana L, Füst G, Giacomelli R, Gröner A, Hack CE, Harmat G, Jakenfelds J, Juers M, Kalmár L, Kaposi PN, Karádi I, Kitzinger A, Kollár T, Kreuz W, Lakatos P, Longhurst HJ, Lopez-Trascasa M, Martinez-Saguer I, Monnier N, Nagy I, Németh E, Nielsen EW, Nuijens JH, O'grady C, Pappalardo E, Penna V, Perricone C, Perricone R, Rauch U, Roche O, Rusicke E, Späth PJ, Szendei G, Takács E, Tordai A, Truedsson L, Varga L, Visy B, Williams K, Zanichelli A, Zingale L. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 114(3 Suppl):S51-131.
47. Röth A, Dührsen U. Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie Pathogenese, Diagnostik und Behandlung. *Deutsches Ärzteblatt* 2007; 104(4):192–7.

48. Szalai AJ, Agrawal A, Greenhough TJ, Volanakis JE. C-reactive protein: structural biology and host defense function. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 1999; 37(3):265–70.
49. Loos M, Laurell AB, Sjöholm AG, Mårtensson U, Berkel AI. Immunochemical and functional analysis of a complete C1q deficiency in man: evidence that C1r and C1s are in the native form, and that they reassociate with purified C1q to form macromolecular C1. *The Journal of Immunology* 1980; 124(1):59–63.
50. Tenner AJ. Complement in Alzheimer's disease: opportunities for modulating protective and pathogenic events. *Neurobiology of Aging* 2001; 22(6):849–61.
51. Klein MA, Kaeser PS, Schwarz P, Weyd H, Xenarios I, Zinkernagel RM, Carrol MC, Verbeek JS, Botto M, Walport MJ, Molina H, Kalinke U. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nature Medicine* 2001; 7(4):488–92.
52. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ. A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 2000; 192(3):359–66.
53. Sim RB, Porter RR, Reid KB, Gigli I. The structure and enzymic activities of the C1r and C1s subcomponents of C1, the first component of human serum complement. *Biochemical Journal* 1977; 163(2):219–27.
54. Ziccardi RJ, Tschopp J. The dissociation properties of native C1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1982; 107(2):618–23.
55. Arlaud GJ, Gaboriaud C, Thielens NM, Rossi V. Structural biology of C1. *Biochemical Society Transactions* 2002; 30(6):1001–6.
56. Sellar GC, Blake DJ, Reid KB. Characterization and organization of the genes encoding the A-, B- and C-chains of human complement subcomponent C1q. The complete derived amino acid sequence of human C1q. *Biochemical Journal* 1991; 274(2):481–90.
57. Martin H, Kaul M, Loos M. Disulfide bridge formation between C1q and IgG in vitro. *European Journal of Immunology*. 1990; (20):1641–5.
58. Reid KB, Porter RR. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochemical Journal* 1976; 155(1):19–23.
59. Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 2000; 49(1-2):159–70.
60. Hughes-Jones NC, Gorick BD, Howard JC. The mechanism of synergistic complement-mediated lysis of rat red cells by monoclonal IgG antibodies. *European Journal of Immunology*. 1983; 13(8):635–41.
61. Gadjeva MG, Rouseva MM, Zlatarova AS, Reid KBM, Kishore U, Kojouharova MS. Interaction of human C1q with IgG and IgM: revisited. *Biochemistry* 2008; 47(49):13093–102.
62. Reid KB. Chemistry and molecular genetics of C1q. *Behring Institute Mitteilungen* 1989; (84):8–19.
63. Hoekzema R, Hannema AJ, Swaak TJ, Paardekooper J, Hack CE. Low molecular weight C1q in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology* 1985; 135(1):265–71.

64. Petry F, Berkel AI, Loos M. Multiple identification of a particular type of hereditary C1q deficiency in the Turkish population: review of the cases and additional genetic und functional analysis. *Human Genetics* 1997; 100:51–6.
65. Petry F, Loos M. Common silent mutations in all types of hereditary complement C1q deficiencies. *Immunogenetics* 2005; 57(8):566–71.
66. Racila DM, Sontheimer CJ, Sheffield A, Wisnieski JJ, Racila E, Sontheimer RD. Homozygous single nucleotide polymorphism of the complement C1QA gene is associated with decreased levels of C1q in patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2003; 12(2):124–32.
67. Petry F, Le DT, Kirschfink M, Loos M. Non-sense and missense mutations in the structural genes of complement component C1q A and C chains are linked with two different types of complete selective C1q deficiencies. *The Journal of Immunology* 1995; 155(10):4734–8.
68. Topaloglu R, Bakkaloglu A, Slingsby JH, Mihatsch MJ, Pascual M, Norsworthy P, Morley BJ, Saatci U, Schiiferli JA, Walport MJ. Molecular basis of hereditary C1q deficiency associated with SLE and IgA nephropathy in a Turkish family. *Kidney International* 1996; 50(2):635–42.
69. McAdam RA, Goundis D, Reid KB. A homozygous point mutation results in a stop codon in the C1q B-chain of a C1q-deficient individual. *Immunogenetics* 1988; 27(4):259–64.
70. Petry F. Molecular basis of hereditary C1q deficiency. *Immunobiology* 1998; 199(2):286–94.
71. Slingsby JH, Norsworthy P, Pearce G, Vaishnav AK, Issler H, Morley BJ, Walport MJ. Homozygous hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. A new family and the molecular basis of C1q deficiency in three families. *Arthritis & Rheumatism* 1996; 39(4):663–70.
72. Petry F, Hauptmann G, Goetz J, Grosshans E, Loos M. Molecular basis of a new type of C1q-deficiency associated with a non-functional low molecular weight (LMW) C1q: parallels and differences to other known genetic C1q-defects. *Immunopharmacology* 1997; 38(1-2):189–201.
73. Suwairi W, Bahabri S, Beving D, Wisnieski J, Warman M. Dysfunctional and antigenetically abnormal C1q resulting from a point mutation in codon 6 of the C chain. *Arthritis & Rheumatism* 1997; 40:S308.
74. Wagner N, Dannecker G, editors. *Pädiatrische Rheumatologie*: Springer Berlin; 2007.
75. Uramoto KM, Michet CJ, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the Incidence and Mortality of Systemic Lupus Erythematosus, 1950-1992. *Arthritis & Rheumatism* 1999; 42(1):46–50.
76. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the Genetic Basis of Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity* 2001; 15:397–408.
77. Ardoin SP, Pisetsky DS. Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10(5):218.
78. Tan EM, Cohen JE, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Tala N, Winchester RG. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1982; (25):1271–7.

79. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 1997; 40(9):1725.
80. Hartung K, Seelig H. Labordiagnostik ders systemischen Autoimmunerkrankungen Teil I: Kollagenosen. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2006; 65:709–24.
81. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Pathology* 2003; 56:481–90.
82. James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehmann TJ, Harley JB. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation* 1997; (100):3019–26.
83. O'Reilly LA, Strasser A. Apoptosis and autoimmune disease. *Inflammation Research* 1999; 48(1):5–21.
84. Cervera R, Kamastha MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestation in a cohort of 1,000 patients. *Medicine* 2003; (82):299–308.
85. Manson JJ, Rahman A. Systemic lupus erythematosus; *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; 1:6
86. Jayne D, Passweg J, Marmont A, Farge D, Zhao X, Arnold R, Hiepe F, Lisukov I, Musso M, Ou-Yang J, Marsh J, Wulffraat N, Besalduch J, Bingham SJ, Emery P, Brune M, Fassas A, Faulkner L, Ferster A, Fiehn C, Fouillard L, Geromin A, Greinix H, Rabusin M, Saccardi R, Schneider P, Zintl F, Gratwohl A, Tyndall A; European Group for Blood and Marrow Transplantation; European League Against Rheumatism Registry. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004 Mar 1; 13(3):168–76.
87. Ghebrehiwet B, Peerschke EIB. cC1q-R (calreticulin) and gC1q-R/p33: ubiquitously expressed multi-ligand binding cellular proteins involved in inflammation and infection. *Molecular Immunology* 2004; 41(2-3):173–83.
88. Norsworthy PJ, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Taylor PR, Bygrave AE, Thompson RD, Nourshargh S, Walport MJ, Botto M. Murine CD93 (C1qRp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *The Journal of Immunology* 2004; 172(6):3406–14.
89. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA Henson PM. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2001; 194(6):781–95.
90. Lu JH, Teh BK, Wang Ld, Wang YN, Tan YS, Lai MC, Reid KB. The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity. *Cellular & Molecular Immunology* 2008; 5(1):9–21.
91. Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* 1999; 42(1-3):23–30.
92. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components,

- and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine* 2000; 192(9):1353–64.
93. Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB. Opsonization of apoptotic cells and its effect on macrophage and T cell immune responses. *The New York Academy of Sciences* 2003; 987:68–78.
 94. Yamada M, Oritani K, Kaisho T, Ishikawa J, Yoshida H, Takahashi I, Kawamoto S, Ishida N, Ujiie H, Masaie H, Botto M, Tomiyama Y, Matsuzawa Y. Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells. *European Journal of Immunology*. 2004; 34(1):221–30.
 95. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3(2):133–46.
 96. Lood C, Gullstrand B, Truedsson L, Olin AI, Alm GV, Rönnblom L et al. C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis & Rheumatism* 2009; 60(10):3081–90.
 97. Carrol MC. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews - Immunology* 2004; (4):825–31.
 98. Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992; 256(5053):105–7.
 99. Mehta P, Norsworthy PJ, Hall AE, Kelly SJ, Walport MJ, Botto M, Pickering MC. SLE with C1q deficiency treated with fresh frozen plasma: a 10-year experience. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49 (4): 823-4.
 100. Berkel AI, Petry F, Sanal Ö, Tinaztepe K, Ersoy F, Bakkaloglu A, Loos M. Development of systemic lupus erythematosus in a patient with selective complete C1q deficiency. *European Journal of Pediatrics* 1997; 156:113–5.
 101. Bowness P, Davies KA, Norsworthy PJ, Athanassiou P, Taylor-Wiedeman J, Borysiewicz LK, Meyer PA, Walport MJ. Hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. *Quarterly Journal of Medicine* 1994; 87(8):455–64.
 102. Kirschfink M, Petry F, Khirwadkar K, Wigand R, Kaltwasser JP, Loos M. Complete functional C1q deficiency associated with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical & Experimental Immunology* 1993; 94(2):267–72.
 103. Schwaeble W, Schäfer MK, Petry F, Fink T, Knebel D, Weihe E, Loos M. Follicular dendritic cells, interdigitating cells, and cells of the monocyte-macrophage lineage are the C1q-producing sources in the spleen. Identification of specific cell types by in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *The Journal of Immunology* 1995; 155(10):4971–8.
 104. Petry F, Botto M, Holtappels R, Walport MJ, Loos M. Reconstitution of the complement function in C1q-deficient (C1qa^{-/-}) mice with wild-type bone marrow cells. *The Journal of Immunology* 2001; 167(7):4033–7.
 105. Cortes-Hernandez J, Fossati-Jimack L, Petry F, Loos M, Izui S, Walport MJ, Cook HT, Botto M. Restoration of C1q levels by bone marrow transplantation attenuates autoimmune disease associated with C1q deficiency in mice. *European Journal of Immunology*. 2004; 34(12):3713–22.

106. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 2000; 132:365–86.
107. Heinz HP, Hitschold T, Latsch M, Loos M. Vereinfachter Microassay zur Bestimmung der gesamthämolytischen Komplementaktivität, CH-50. *LaboratoriumsMedizin* 1985; 9(9):320–3.
108. Antes U, Heinz HP, Loos M. Enzyme-linked immunosorbent assay for C1q in human serum by use of monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 1984; 74(2):299–306.
109. Gallagher SR, Desjardins PR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current Protocols in Protein Science* 2008; Appendix 3:Appendix 4K1-21.
110. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839):487–91.
111. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 2000; 7(1-2):203–14.
112. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23(21):2947–8.
113. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research* 2003; 31(13):3688–91.
114. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human Mutation* 2000; 15(1):7–12.
115. Tang S, Lui SL, Lai KN. Pathogenesis of lupus nephritis: an update. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10(2):174–9.
116. Dodds AW, Petry F. The phylogeny and evolution of the first component of complement, C1. *Behring Institute Mitteilungen* 1993; (93):87–102.
117. Müller H, Imhasly P, Leuthold M. Familienplanung und Genetik. *Schweizerisches Medizinisches Forum* 2005;(5):639–41.
118. Perri AJ, Hsu S. A review of thalidomide's history and current dermatological applications. *Dermatology Online Journal* 2003; 9(3):5.
119. Klausner JD, Freedman VH, Kaplan G. Thalidomide as an anti-TNF-alpha inhibitor: implications for clinical use. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996; 81(3):219–23.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Das Komplementsystem (8)	4
Abbildung 2:	C1-Molekül (55)	19
Abbildung 3:	Ketten-Aufbau des C1q (nach Kishore und Reid (59))	20
Abbildung 4:	Übersicht der bislang bekannten C1q-Gen-Mutationen*(70)	25
Abbildung 5:	Die „Waste Disposal“-Hypothese (nach Walport, 2001 (22), vereinfacht dargestellt)	40
Abbildung 6:	Die „Tolerance“-Hypothese (97)	42
Abbildung 7:	Familienstammbaum	62
Abbildung 8:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qA Exon 2 nach Verdau mit PvuII	66
Abbildung 9:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 1 nach Verdau mit EcoRV	67
Abbildung 10:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qC Exon 1 nach Verdau mit Bfml	68
Abbildung 11:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qA Exon 2 nach Verdau mit ApaI (SNV Gly70-Nachweis)	69
Abbildung 12:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 2	71
Abbildung 13 :	Vergleichende Sequenzanalyse beider Elternteile und der Patientin	72
Abbildung 14 :	Vergleichende Sequenzanalyse beider Elternteile und der Patientin	73
Abbildung 15 :	Restriktionsstellen der Normalsequenz durch NcoI	74
Abbildung 16 :	Restriktionsstellen der Mutationssequenz (c283_311del) durch NcoI	75
Abbildung 17:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 2 nach Verdau mittels NcoI	76
Abbildung 18:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 2 nach Verdau mittels NcoI	76
Abbildung 19:	Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes C1qB Exon 2 aus Chorionzottenbiopsie nach Verdau mittels NcoI	77
Abbildung 20:	Stammbaum der Familie der Patientin II3	78
Abbildung 21:	Übersicht der bislang bekannten C1q-Gen-Mutationen(70)	83

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Komplementrezeptoren und ihre Funktion (20)	8
Tabelle 2:	Regulatoren des Komplementsystems (20)	9
Tabelle 3:	Liganden des C1q (59)	22
Tabelle 4:	Mutationen bei hereditären C1q-Defizienzen*	23
Tabelle 5:	Gene, die das Auftreten eines SLE oder dessen Ausprägung begünstigen bzw. determinieren (77)	27
Tabelle 6:	Manifestationen des SLE bei Kindern (74)	28
Tabelle 7:	Klassifikation des Systemischen Lupus erythematodes (revidierte Kriterien des American College of Rheumatology) (79).	29
Tabelle 8:	Verwandte Primer (* nach Marquart, (29))	50
Tabelle 9:	CH50-Aktivität und C1q-Antigennachweis	63

9 Anhang

Resultate der Sequenzierungen:

Eingezeichnet sind die jeweiligen 5'- und 3'-Primer. „atg“ und „tga“ bezeichnen jeweils Start- und Stop-Codons (atg, tga). In nichtkursiv **rot** dargestellt sind die Sequenzen, die durch Sequenzierung der Forward-Primer erhalten wurden. In nichtkursiv **türkis** diejenigen, die durch Sequenzierung der Reverse-Primer erhalten wurden. In kursiv **rot** Sequenzen, die sowohl durch die Forward- als auch Reverse-Primer erhalten wurden.

C1qA Exon 1

Primer:

MTAex1F	<i>GTGTGAAGATGTGGGTGTGC</i>	A-Kette, Exon 1, Forward-Primer
MTAex1R	<i>AAGTCAGGCCAAGGTCCAAG</i>	A-Kette, Exon 1, Reverse-Primer

Human DNA sequence [gi:29466516]

```

10021 gggggtatag tggatttctg agtttgccta ctgtgttttg taggtgcgtg gatgagagct
10081 gtgtttgtgt gagtgtgtga agatgtgggt gtgctctgtt gcatgtgtgg atgtgtgtga
      →      5'-forward-Primer
10141 gtttgtggtt ctgtgtatat gcgtggggtc ctggggctgg attgagagtg gacattgaga
10201 gccccagagg gtgcatgtgc acttggggag gactgtgcat atatcattgt gtgcatggga
10261 ctcaaggggtg ggagctgggt gtgagtgtga tgtccaacct gcccaggccc tcccgtgtct
10321 ccacagaggc atcatggagg gtccccgggg atggctggtg ctctgtgtgc tggccatatic
10381 gctggcctct atggtgaccg aggacttgtg ccgagcacca gacgggaaga aaggggaggc
10441 aggaagacct ggcagacggg ggcggccagg cctcaagggg gagcaagggg agccgggtaa
10501 gcacccttcc tcgggaccca gcccttgga ccttggcctg acttggcctc caggggtaag
      3' reverse-Primer ←
10561 gcttgggggtg gactgagaaa tcaggagtcc gtctgcccc agtgccccat gaatcctctc
10621 cagtttgtac ttggccacag gggctaaggg aggcctagcc ttctcgggcc atgtcctcag
10681 gcctctccac tcctgtgta ctgcctgggc cctctttctt cggttcacc ttccccctct

```


Datum	31.07.2003	04.05.2006	08.05.2006	17.05.2006	12.07.2006	18.07.2006	31.09.2006	08.01.2007	18.01.2007	23.01.2007	22.02.2007	29.03.2007
Faktor									< 2,4	n.n.		
C1q (mg/dl)		124			149						136	138
C3c (mg/dl)		30,3			33,3						32	28,5
C4 (mg/dl)												
C2 (mg/dl)								31,5 (st)			91%	
CH 50 (%)				keine Lyse			keine Lyse					
AP 50 (%)				119%			89%					
CH 50 mit C2 def. Serum (%)				n.d.			keine Lyse					
CH 50 mit C4 def. Serum (%)				n.d.			> 200 %					
CH 100 (U/ml)					< 10							
ANA (IFT) (negativ)	positiv	positiv			positiv							
ANA-Screen (<1)		1,6			2,8							
ANA-Screen (FIA) (<1)	3,5											
(Q)Anti-dsDNA (U/ml)		n.d.			21,8							
(Q)Anti-U1-RNP (U/ml)												
(Q)Anti-Sm (U/ml)												
(Q)Anti-Ro/SS-A (U/ml)			2,2									
(Q)Anti-La/SS-B (U/ml)			1									
(Q)Anti-Scl 70 (U/ml)												
(Q)Anti-CENP-B (U/ml)												
(Q)Anti-Jo-1 (U/ml)												
(SQ)Anti-dsDNA-Ak (Ratio <1)	0,4				1,6							
(SQ)Anti-U1-RNP (Ratio <1)	3,8				2,3							
(SQ)Anti-Sm (Ratio <1)	4,7				2,2							
(SQ)Anti-Ro/SS-A (Ratio <1)	1,2				0,6							
(SQ)Anti-La/SS-B (Ratio <1)	0,1				0,1							
(SQ)Anti-Scl 70 (Ratio <1)	0,3				0,3							
(SQ)Anti-CENP-B (Ratio <1)	0,2				0,2							
(SQ)Anti-Jo-1 (Ratio <1)	0,2				0,2							
Anti-EBM-Antikörper (neg)					negativ							
IgG (mg/dl)		1330			751		742				820	876
IgA (mg/dl)		198			199						152	173
IgM (mg/dl)		279			277		284				243	326
IgE (IU/ml)											33,8	55,8
n.n. = nicht nachgewiesen												
n.d. = nicht durchgeführt												

Zur Verfügung gestellte Laborbefunde Patientin

Datum	09.08.2007	13.09.2007	18.10.2007	29.11.2007	17.04.2008	12.06.2008	07.08.2008	26.03.2009
Faktor								
C1q (mg/dl)								
C3c (mg/dl)								
C4 (mg/dl)								
C2 (mg/dl)								
CH 50 (%)								
AP 50 (%)								
CH 50 mit C2 def. Serum (%)								
CH 50 mit C4 def. Serum (%)								
CH 100 (U/ml)								
ANA (IFT) (negativ)	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
ANA-Screen (<1)								
ANA-Screen (FIA) (<1)	2,6	2,3	1,7					0,4
(Q)Anti-dsDNA (U/ml)	18,4	21,9	26,1		18,8	31	34,6	228
(Q)Anti-U1-RNP (U/ml)	22							
(Q)Anti-Sm (U/ml)	1,3							
(Q)Anti-Ro/SS-A (U/ml)	0,9							
(Q)Anti-La/SS-B (U/ml)	0,4							
(Q)Anti-Scl 70 (U/ml)	0,2							
(Q)Anti-CENP-B (U/ml)	0,6							
(Q)Anti-Jo-1 (U/ml)	0,1							
(SQ)Anti-dsDNA-Ak (Ratio <1)								
(SQ)Anti-U1-RNP (Ratio <1)								
(SQ)Anti-Sm (Ratio <1)								
(SQ)Anti-Ro/SS-A (Ratio <1)								
(SQ)Anti-La/SS-B (Ratio <1)								
(SQ)Anti-Scl 70 (Ratio <1)								
(SQ)Anti-CENP-B (Ratio <1)								
(SQ)Anti-Jo-1 (Ratio <1)								
Anti-EBM-Antikörper (neg)								
IgG (mg/dl)	1060	849	910	599	671			
IgA (mg/dl)	182	152	168	117	136			
IgM (mg/dl)	190	194	224	151	196			
IgE (IU/ml)		15,1		11,9				
n.n. = nicht nachgewiesen								
n.d.= nicht durchgeführt								

Zur Verfügung gestellte Laborbefunde Patientin Fortsetzung

10 Danksagung

11 Lebenslauf

