

**Systemische Komplementaktivierung bei der altersabhängigen
Makuladegeneration**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Stefanie Claudia Janzer
aus Bonn

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Hendrik P.N. Scholl
2. Gutachter: Professor Dr. Markus Nöthen

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.04.2011

Aus der Augenklinik der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. Frank G. Holz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Anatomische Grundlagen	8
1.2 Epidemiologie	9
1.3 Ätiologie	10
1.4 Klassifikation der altersabhängigen Makuladegeneration	13
1.4.1 Frühe altersabhängige Makuladegeneration	13
1.4.2 Geographische Atrophie	15
1.4.3 Chorioidale Neovaskularisation	16
1.5 Therapie	17
1.6 Komplementsystem	18
1.6.1 Der alternative Aktivierungsweg	20
1.6.2 Regulierung des Komplementsystems durch Faktor H	20
1.7 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Probandenrekrutierung	22
2.2 Einschlusskriterien	22
2.3 Vorgehen bei Probanden	23
2.3.1 Standardisierter Fragebogen	23
2.3.2 ETDRS-Visus	24
2.3.3 Augenuntersuchung	24
2.3.4 Fundusfotografie und Fundusautofluoreszenz	24
2.3.5 Angiographie	26
2.3.6 Optische Kohärenztomographie	27
2.4 Grading	28
2.5 Blutabnahme und Verarbeitung	29
2.6 Biochemische Analyse	29
2.7 Genotypisierung	30
2.8 Statistische Analyse	32
2.8.1 Deskriptive Statistik	34
2.8.2 Analyse der Daten	34

3	Ergebnisse	37
3.1	Übersicht der epidemiologischen Daten	37
3.2	Klassifikation des Phänotyps	38
3.3	Biochemische Analyse.....	39
3.3.1	Vergleich von Patienten mit Kontrollen.....	39
3.3.2	Vergleich der unterschiedlichen AMD Untergruppen.....	42
3.3.3	Intraindividuelle Variabilität.....	42
3.4	Genotypisierung.....	44
3.5	Assoziation zwischen der Proteinkonzentration der Komplementfaktoren und den Genotypen.....	46
3.6	Logistische Regression.....	47
4	Diskussion	50
4.1	Biochemische Analyse.....	51
4.2	Genotypisierung.....	53
4.3	Assoziation zwischen der Proteinkonzentration der Komplementfaktoren und den Genotypen.....	58
4.4	Logistische Regression.....	58
4.5	Übersicht der epidemiologischen Daten	59
4.6	Schlussfolgerungen	60
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	64
7	Danksagung	72
8	Lebenslauf	73

Abkürzungsverzeichnis:

AMD	altersabhängige Makuladegeneration
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
AUC	area under the curve
CFH	Komplementfaktor H
CNV	chorioidale Neovaskularisation
CRP	C reaktives Protein
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Chart
GA	geografische Atrophie
MAC	Membranangriffskomplex
MBL	Mannose-binding-Lectin
OCT	optische Kohärenztomographie
OR	odds ratio
PDT	photodynamische Therapie
ROC	receiver operating characteristic
SAS	SAS software package for Windows
SNP	single nucleotide polymorphism
RPE	retinales Pigmentepithel
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

1 Einleitung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Erblindungsursache in den westlichen Industrienationen. Im Alter zwischen 55 und 64 Jahren zeigen 40,8% erste Zeichen einer frühen AMD und ab 85 Jahren 52,6% (Vingerling et al., 1995).

Die visusrelevante Spätform der AMD hat eine Prävalenz von 0,05% vor dem 50. Lebensjahr und steigt auf 1,8% nach dem 80. Lebensjahr an. Allein in den USA sind 1,75 Millionen Menschen an einem fortgeschrittenen Stadium der AMD erkrankt. Nach neuen Schätzungen wird die Prävalenz der späten AMD bis zum Jahr 2020 wahrscheinlich um weitere 50% ansteigen (Friedman et al., 2004).

Es handelt sich bei der AMD um eine Erkrankung, bei der die Stelle des schärfsten Sehens der Netzhaut, die Makula, zunehmend zerstört wird. Dies bedeutet oft erhebliche Einschränkung der Lebensqualität der Patienten, da viele Aktivitäten des täglichen Lebens nicht mehr oder nur noch eingeschränkt möglich sind (Williams et al., 1998). Die Wahrscheinlichkeit, an einer Depression zu erkranken, ist bei Patienten mit AMD doppelt so hoch wie bei gesunden gleichaltrigen Vergleichspersonen (Mitchell and Bradley, 2006).

Drei große populationsbezogene Kohortenstudien, die Beaver Dam Eye Study, die Blue Mountains Eye Study und die Rotterdam Study, untersuchen die Inzidenz, Progression und Assoziation zwischen Erkrankung und Risikofaktoren der AMD. Um mögliche Risikofaktoren zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Studien unter anderem der Raucherstatus, das Geschlecht, der body mass index (BMI) und die Irisfarbe untersucht. Neben dem Alter ergab sich nur für das Rauchen eine signifikante Assoziation mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in allen drei Studien (Mitchell et al., 2002b; Smith et al., 2001; Tomany et al., 2004). Aufgrund von familienbasierten epidemiologischen Studien geht man davon aus, dass die AMD zu einem hohen Prozentsatz auf genetische Ursachen zurückzuführen ist (Hammond et al., 2002; Klaver et al., 1998; Meyers, 1994; Seddon et al., 2005a). Bereits 1983 zeigte sich in einer Fall-Kontroll-Studie, dass die Entwicklung einer AMD in engem Zusammenhang mit einer positiven Familienanamnese steht (Hyman et al., 1983). Klaver et al. zeigten, dass Verwandte ersten Grades eines an AMD erkrankten Patienten ein erhöhtes Lebenszeitrisiko im Vergleich zu Personen aus Familien ohne diese Krankheit haben (Klaver et al., 1998).

Im Rahmen von Zwillingsstudien wurde eine hohe Konkordanz bezüglich des Vorliegens einer AMD bei eineiigen Zwillingen gefunden, was ebenfalls auf eine signifikante Beteiligung genetischer Faktoren an der AMD Pathogenese hindeutet (de Jong et al., 1997; Hammond et al., 2002; Klaver et al., 1998; Meyers, 1994; Scholl et al., 2007; Seddon et al., 1997). Gemäß einer 2005 veröffentlichten Studie an ein- und zweieiigen Zwillingen mit Informationen aus dem „National Academy of Sciences-National Research Council World War II Veteran Twin Registry“ (siehe 1.3) wird der Anteil erblicher Faktoren der altersabhängigen Makuladegeneration auf 46 bis 71% geschätzt (Seddon et al., 2005a).

Bei der immunhistologischen Untersuchung von Drusen (siehe 1.4.1), welche gehäuft bei der Frühform der Makuladegeneration vorkommen, fand man unter anderem Ablagerungen von Komplementfaktoren, Immunglobulinen und „Human leukocyte antigen“ DR (HLA DR). Diese Bestandteile deuten auf eine Beteiligung von immunologischen Prozessen an der AMD-Pathogenese hin (Anderson et al., 2002; Hageman et al., 2001; Mullins et al., 2000).

Die Lokalisation und Aufschlüsselung der verantwortlichen Gene rückt bei immer mehr erblichen Erkrankungen in den Vordergrund (Hoh and Ott, 2004).

Im Rahmen von Genom-weiten Kopplungsanalysen ergab sich für verschiedene Genloki auf unterschiedlichen Chromosomen ein möglicher Zusammenhang zur AMD (10q26, 1q, 2p, 3p, 16) (Fisher et al., 2005).

Bei der Analyse von Genen, die für Proteine des Komplementsystems kodieren, konnte ein Polymorphismus im Gen des Komplementfaktors H (CFH) (Chromosom 1q) identifiziert werden, der beträchtlich zum Risiko, eine AMD zu entwickeln, beiträgt. Die Risikovariante Y402H, führt zu einem Austausch der Aminosäure Tyrosin durch Histidin (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b; Scholl et al., 2005).

Das Komplementsystem stellt eine Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem dar und schützt den Körper unter anderem vor bakteriellen Infektionen. Zum Schutz des Körpers gegen eindringende Pathogene ist das Komplementsystem ständig aktiviert und es bedarf genauer Regulationsmechanismen, um einen Angriff auf körpereigene Zellen zu verhindern. Teil dieser

Regulationsmechanismen ist CFH, welches eine überschießende Komplementaktivierung verhindert (Walport, 2001).

Neben dem Polymorphismus im CFH-Gen wurden weitere genetische Varianten in anderen Komplementfaktoren gefunden. Polymorphismen in den Genen von Faktor B, C2 und C3 sind ebenfalls mit einem erhöhten bzw. erniedrigten Risiko, eine AMD zu entwickeln, assoziiert (Gold et al., 2006; Maller et al., 2007; Sivaprasad et al., 2007; Yates et al., 2007).

Weil demnach genetische Varianten in Komplementgenen mit der Erkrankung assoziiert sind und sich auch lokale Anzeichen einer komplementvermittelten Immunreaktion finden, erscheint es möglich, wenn nicht sogar wahrscheinlich, dass eine systemische Komplementaktivierung bei der AMD vorliegt. Dies ist bisher aber nicht gezeigt worden. Bisher ist auch nicht bekannt, ob die genetischen Polymorphismen Auswirkungen auf die Komplementaktivierung auf Proteinebene haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher die Plasmakonzentrationen von Proteinen der Komplementkaskade bei AMD-Patienten sowie Kontrollpersonen bestimmt. Weiterhin wird der mögliche Zusammenhang der bekannten genetischen Polymorphismen sowohl mit dem klinischen Phänotyp als auch mit der Plasmakonzentration der Komplement-Proteine untersucht.

1.1 Anatomische Grundlagen

Die altersabhängige Makuladegeneration ist eine Erkrankung, welche das Zentrum der Netzhaut betrifft, wodurch es meist zu erheblichen und irreversiblen Störungen der Sehschärfe und des zentralen Sehens kommt (Bird et al., 1995).

In der Netzhaut wird der Lichtreiz über Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) aufgenommen. An diese grenzt das retinale Pigmentepithel, darauf wiederum die Bruch'sche Membran.

Im Zentrum der Retina findet man den gelben Fleck, die Makula lutea. Diese enthält eine kleine trichterförmige Vertiefung, die Fovea centralis, und bildet den Netzhautbezirk mit der größten Sehschärfe.

Ursächlich für die hohe Sehschärfe in diesem Bereich ist unter anderem, dass in der Fovea ausschließlich Zapfen und keine Stäbchen vorkommen. Die Zapfen sind schlanker geformt als in anderen Bereichen der Retina und erreichen mit einer Anzahl von 147.000/mm² ihre höchste Dichte. Die über der Retina liegenden Schichten sind im Bereich der Fovea an den Rand verlagert, so dass im Zentrum der Sehgrube, der Foveola, die Zapfen frei liegen und ein eintreffender Lichtstrahl ohne Abschwächung durch darüber liegende Schichten auf die Photorezeptoren fällt, was zu einer weiteren Verbesserung der Sehschärfe führt (Rager and van der Zypen, 1994).

Da es bei der altersabhängigen Makuladegeneration zu einer Zerstörung dieses Netzhautzentrums kommt, erklärt sich der zum Teil erhebliche Visusverlust der Patienten.

1.2 Epidemiologie

Die AMD ist die führende Ursache für Erblindung im Alter in den westlichen Industrienationen. Nach Schätzungen der „AMD Alliance International“ sind allein in Deutschland 4,5 Millionen Menschen daran erkrankt.

In einer populations-basierten europäischen Studie zur Epidemiologie der AMD („Rotterdam Study“) zeigten sich bei Probanden im Alter zwischen 55 und 64 Jahren bei 40,8% Zeichen einer frühen AMD und bei Probanden ab dem 85. Lebensjahr bei 52,6% (Vingerling et al., 1995). Die Spätform der AMD, die für das Sehvermögen der Patienten viel relevanter ist, weist vor dem 50. Lebensjahr in den westlichen Industrienationen eine Prävalenz von 0,05% auf, steigt aber auf 11,8% nach dem 80. Lebensjahr an (Friedman et al., 2004).

Die 2-Jahres-Inzidenz einer späten AMD lag bei den Probanden ab 55 Jahren bei 0,2%, während ab einem Alter von 85 Jahren die Inzidenz auf 1,8 % gestiegen war (Klaver et al., 2001).

Aufgrund demographischer Entwicklungen einschließlich der steigenden Lebenserwartung wird die Anzahl der AMD Patienten weiter zunehmen, so dass man im Jahr 2020 von einer um 50% angestiegenen Prävalenz der späten AMD ausgeht (Friedman et al., 2004).

1.3 Ätiologie

Die Ursache für diese Erkrankung ist noch nicht hinreichend erforscht. Es sind sowohl externe Umwelteinflüsse, als auch genetische Faktoren beteiligt, die zu Veränderungen in dem Komplex aus zentraler Netzhaut, retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran und Choriokapillaris führen.

Im Rahmen von drei großen epidemiologischen Studien (der Beaver Dam Eye Study, der Blue Mountains Eye Study und der Rotterdam Study) hat sich gezeigt, dass zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer AMD das Alter und eine positive Familienanamnese gehören (Mitchell et al., 2002a; Smith et al., 2001).

Als exogene Risikofaktoren wurden das Rauchen, Zugehörigkeit zum weiblichen Geschlecht und zur weißen Rasse, Irisfarbe, erhöhte Lichtexposition sowie Ernährungsgewohnheiten in Betracht gezogen. Allein das Rauchen konnte in praktisch allen Studien als exogener Risikofaktor bestätigt werden (Evans, 2001; Tomany et al., 2004).

In einer Fall-Kontroll-Studie von 1983 zeigte sich bereits ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einer positiven Familienanamnese (Hyman et al., 1983). In großen, familienbasierten epidemiologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die AMD eine bedeutende genetische Komponente besitzt (Hammond et al., 2002; Klaver et al., 1998; Meyers, 1994; Seddon et al., 2005a). Verwandte ersten Grades eines an AMD erkrankten Patienten haben ein erhöhtes Lebenszeitrisiko und erkranken früher im Vergleich zu Personen aus Familien ohne diese Erkrankung (Klaver et al., 1998). Bei der Untersuchung von eineiigen Zwillingen konnte eine große Übereinstimmung des Phänotyps der Makulae gefunden werden (Hammond et al., 2002; Meyers, 1994). Seddon et al. veröffentlichten 2005 die *US-Zwillingsstudie zur AMD*. Es handelt sich hierbei um eine Heritabilitätsschätzung, das heißt die Schätzung des Anteils erblicher Faktoren (gegenüber Umweltfaktoren), und dieser wurde für die AMD auf 46 bis 71% geschätzt. Die Daten erhielten Seddon und Mitarbeiter aus dem „National Academy of Sciences-National Research Council World War II Veteran Twin Registry“, welches Informationen über 15.924 weiße männliche Zwillingspaare enthält, die in den US-Streitkräften dienten und zwischen 1917 und 1927 geboren worden waren. In die Studie wurden 440 eineiige und 400 zweieiige Zwillinge eingeschlossen. Die Zwillinge wurden

hinsichtlich einer Erkrankung an AMD untersucht und mit dem jeweiligen anderen Zwilling verglichen. Die Erblichkeit einer ausgeprägten frühen und der späten AMD zusammen ließ sich auf 67% schätzen, während die Erblichkeit für die späte Form alleine auf 71% geschätzt wurde (Seddon et al., 2005a).

Bereits seit längerer Zeit gab es Hinweise, dass immunologische Prozesse an der Entstehung von Drusen beteiligt sind. Bei der immunhistologischen Untersuchung von Drusen konnten unter anderem die folgenden Drusenbestandteile identifiziert werden:

- Proteine, die mit der Blutgerinnung und Fibrinolyse in Zusammenhang stehen (Faktor X, Thrombin, und Fibrinogen)
- Akute Phase Proteine (Vitronectin, α 1-Antichymotrypsin, CRP und ein Bestandteil von Amyloid P)
- Komplementfaktoren (C3/C3d, C5, C5b-9)

(Anderson et al., 2002; Mullins et al., 2000)

Nach einem Modell von Hageman et al. spielen die dendritischen Zellen eine Schlüsselrolle bei der Drusenentstehung. Damit dendritische Zellen zu einem Zellschaden migrieren, müssen sie unter anderem durch Chemokine, Zytokine sowie Komplementaktivierungsprodukte rekrutiert, aktiviert und dirigiert werden. Nach diesem Modell kommt es nach einer lokalen Schädigung des RPE zu einer Freisetzung von Chemokinen sowie zur Aktivierung und Rekrutierung von dendritischen Zellen. Diese senden ihre Fortsätze in den Läsionsbereich aus. Dies könnte zur Freisetzung von immunmodulierenden Molekülen von RPE Zellen führen, die möglicherweise einen entstehenden Schaden durch die dendritischen Zellen begrenzen. Durch die Akkumulation von Molekülen und Entzündungszellen könnte es zu der Entstehung einer Druse kommen. Wenn sich die dendritischen Zellen wieder zurückziehen, bleiben häufig die HLA-DR-positiven Überreste zurück, welche sich immunhistochemisch in Drusen nachweisen lassen.

Hageman et al. vermuteten, dass die geschilderten Abläufe zu einer lokalen, chronischen Entzündung führen, welche jahrelang persistiert. Bereits 2001 spekulierte die Gruppe, dass dem chronischen Entzündungsprozess eine genetische Prädisposition zugrunde liegen könnte und dass inflammatorische Prozesse eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Drusen spielen (Hageman et al., 2001).

Hageman et al. entdeckten bei der immunhistochemischen Untersuchung von Spenderaugen von AMD-Patienten eine intensive und spezifische CFH-Immunreaktivität in Drusen, sowie unterhalb des RPE und in chorioidalen Kapillaren. Die Immunreaktivität war bei AMD-Spenderaugen stärker ausgeprägt als bei Kontrollaugen. Darüber hinaus zeigte sich eine häufig auftretende Kolo-kalisation von CFH mit C3d und dem Membran-Angriffs-Komplex C5b-9 in Drusen (Hageman et al., 2005).

Da aufgrund der Drusenbestandteile ein Zusammenhang zwischen der AMD und immunologischen Prozessen vermutet wurde, lag der Schluss nahe, die für die einzelnen Komplementfaktoren verantwortlichen Gene zu betrachten. Vier unabhängige Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der Erkrankung und einem Polymorphismus auf Chromosom 1 feststellen. Dort findet sich das Gen für den Komplementfaktor H, bei dem es sich um einen Regulator im alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems handelt. In diesem Gen zeigte sich ein hochsignifikantes Risikoallel, Y402H (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b).

Man geht davon aus, dass das Risiko, an einer AMD zu erkranken, für homozygote Träger des Allels bis zu 7,4fach erhöht ist (Klein et al., 2005b; Scholl et al., 2007).

Gold et al. fand 2006 eine signifikante Assoziation zwischen dem Risiko, eine AMD zu entwickeln, und Varianten in den Genen, die für Komplementfaktor C2 und Faktor B kodieren. Die Varianten L9H (rs4151667) und R32Q (rs641153) im Faktor B-Gen sowie E318D (rs9332739) und der SNP rs547154 im C2-Gen zeigten eine Assoziation mit einem erniedrigtem Risiko für AMD (Gold et al., 2006).

Zudem konnte gezeigt werden, dass der SNP rs2230199 im Gen für Komplementfaktor C3 signifikant mit dem AMD-Risiko assoziiert ist (Yates et al., 2007).

1.4 Klassifikation der altersabhängigen Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration ist die häufigste Erkrankung im Bereich der Makula.

Die Diagnose einer AMD wird gestellt, wenn eine oder mehrere der folgenden Veränderungen im Makulabereich gefunden werden ohne Hinweis auf eine sekundäre Ursache für diese Pathologien:

- Weiche Drusen
- Hyper- und Hypopigmentierungen
- Zeichen einer Spätform der AMD (Bird et al., 1995).

Man muss zwischen einer trockenen Frühform, bei der nur weiche Drusen oder Hyper- und Hypopigmentierungen vorliegen, und der Spätform der AMD unterscheiden. Die Spätform kommt in zwei verschiedenen Phänotypen vor, als trockene Form (geografische Atrophie, GA) und als feuchte Form (chorioidale Neovaskularisation, CNV) (Holz et al., 2004).

1.4.1 Frühe altersabhängige Makuladegeneration

Bei der frühen AMD finden sich Drusen sowie Hyper- und Hypopigmentierungen, welche die Sehkraft meistens noch nicht einschränken.

Drusen befinden sich zwischen der Basallamina des retinalen Pigmentepithels und der inneren Seite der Bruch'schen Membran.

Bird et al. schlugen 1995 ein Schema zur einheitlichen Klassifizierung der AMD vor. Danach werden Drusen nach den folgenden Punkten klassifiziert:

- Drusenmorphologie (harte Drusen $<125\mu\text{m}$, intermediäre, weiche Drusen $>63 \leq 125\mu\text{m}$, große, weiche, deutlich begrenzte Drusen $>125\mu\text{m}$, große, weiche, nicht deutlich begrenzte Drusen $>125\mu\text{m}$)
- Vorherrschender Drusentyp
- Drusenanzahl (1-9, 10-19, ≥ 20)

- Drusengröße ($<63\mu\text{m}$, $\geq 63\mu\text{m}$ $<125\mu\text{m}$ $\geq 125\mu\text{m}$ $<175\mu\text{m}$, $\geq 175\mu\text{m}$ $<250\mu\text{m}$, $\geq 250\mu\text{m}$)
- Hauptlokalisationsort der Drusen (im Bereich der Fovea oder weiter peripher)
- Fläche, die von Drusen bedeckt ist

Hyper- und Hypopigmentierungen werden nach den folgenden Punkten klassifiziert:

- Hyperpigmentierung (Fläche $<63\mu\text{m}$, $\geq 63\mu\text{m}$)
- Hypopigmentierung (Fläche $<63\mu\text{m}$, $\geq 63\mu\text{m}$)
- Hauptlokalisierung der Hyper-/ Hypopigmentierungen (im Bereich der Fovea oder weiter peripher)

Bei der Einteilung nach der Morphologie unterscheiden Bird et al. zwischen harten und weichen Drusen. Bei den harten Drusen handelt es sich um kleine ($< 63 \mu\text{m}$), noduläre Ablagerungen, bei denen das Risiko, an einer Spätform der AMD zu erkranken, gering ist. Allerdings konnte im Rahmen der Beaver Dam Eye Study gezeigt werden, dass es bei Probanden mit 8 oder mehr harten Drusen innerhalb von zehn Jahren ein erhöhtes Risiko für das Auftreten weicher Drusen und für Pigmentveränderungen gibt. Im Vergleich mit Probanden, die nur ein bis zwei harte Drusen hatten, stieg die 10-Jahres Inzidenz für weiche Drusen von 6,7 auf 12,3% und für Pigmentveränderungen von 1,7 auf 4,9%.

Weiche Drusen sind meistens größer und haben keine so scharfe Begrenzung wie harte Drusen. Weiche Drusen können sich mit der Zeit vergrößern und konfluieren. Das Risiko, an einer Spätform der AMD zu erkranken, ist klar erhöht (Klein et al., 2002). Bei Patienten mit bilateralen Drusen fand man eine jährliche Inzidenz für GA oder CNV von ungefähr 8% über einen Beobachtungszeitraum von 3 Jahren (Holz et al., 1994).



Abbildung 1 - Fundusfotographien von Patienten mit weichen Drusen (linkes Bild) sowie Hypo- und Hyperpigmentierungen (rechtes Bild) (Gass, 1998)

1.4.2 Geographische Atrophie

Diese Form der trockenen AMD beruht auf Zelluntergängen im retinalen Pigmentepithel. Es kommt zu einer Atrophie der darüber liegenden Photorezeptoren und der Lamina chorioidocapillaris der Aderhaut (Donoso et al., 2006).

Die trockene Spätform der AMD tritt sowohl primär, als auch sekundär, z.B. nach Involution einer CNV, auf.

Zu den normalen Altersveränderungen gehört eine Akkumulation von Lipofuszin in den Pigmentepithelzellen. Eine gesteigerte Lipofuszinakkumulation kann den Untergang von Pigmentepithelzellen bedeuten.

Außerdem wird durch die Ausbildung von Drusen die Versorgung des Pigmentepithels durch die Aderhaut erschwert. Es kommt zu einer Dekompensation der an sich im Alter physiologischen Veränderungen und zu vermehrtem Zelltod.

Diese Veränderungen manifestieren sich im Bild der geographischen Atrophie.

An den Stellen, an denen Pigmentepithel zugrunde gegangen ist, findet man depigmentierte Areale, während es am Rand der Atrophie oft durch Proliferation und freigesetzte Melanin- und Lipofuszingranula zu einer Hyperpigmentierung kommt.

Die geographische Atrophie entwickelt sich oft langsam und erfasst manchmal die Fovea erst sehr spät, so dass der Visus lange noch gut bleibt.

In der Regel ist das Manifestationsalter der Patienten mit einer primären GA höher als das der Patienten mit CNV (Holz et al., 2004).

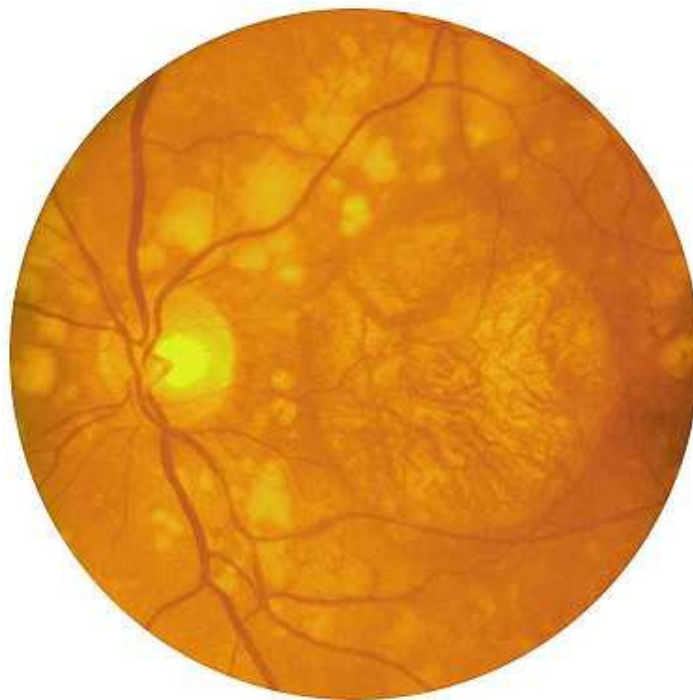


Abbildung 2 - Fundusfotografie von einem Patienten mit geographischer Atrophie (Gass, 1998)

1.4.3 Chorioidale Neovaskularisation

In über 90% der Fälle ist die neovaskuläre („feuchte“) Form der AMD für den schwerwiegenden Sehverlust bei der Makuladegeneration verantwortlich (Ferris et al., 1984).

Der neovaskulären AMD liegen abnorme Chorioidalgefäße zu Grunde, welche aus der Aderhaut in den subretinalen Raum einsprossen. Durch undichte Verbindungen zwischen den Endothelzellen kann Flüssigkeit aus diesen Gefäßen austreten, es kann

zu einem Makulaödem oder zu sub- und intraretinalen Blutungen kommen. Im Spätstadium zeigen sich oft fibrotische Umwandlungen.

Während Patienten zu Beginn der AMD oft nur eine leichte Sehverschlechterung beklagen, ist vor allem die neovaskuläre Spätform mit fibrotischen und atrophischen Umwandlungen für die oft erheblichen Einschränkungen des Visus verantwortlich (Ferris et al., 1984).

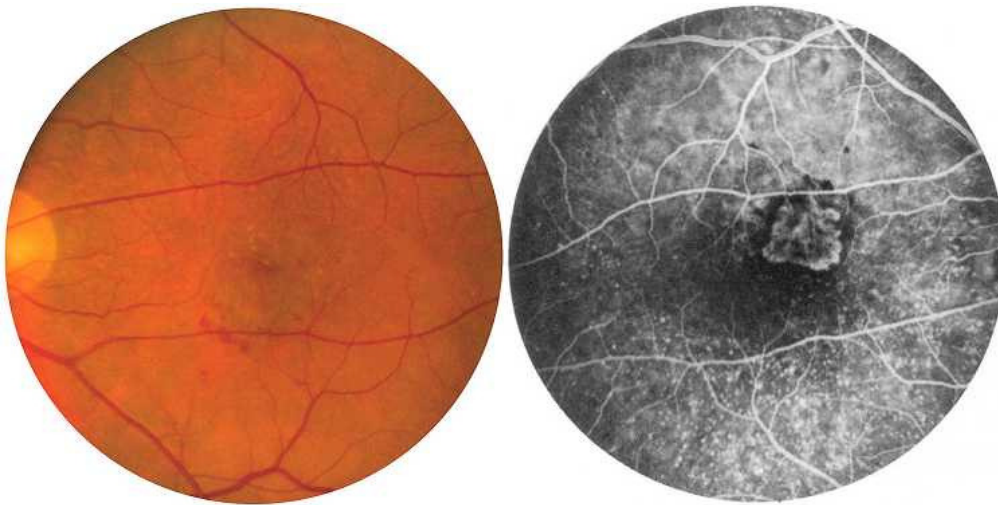


Abbildung 3 - CNV bei AMD, links dargestellt in einer Fundusfotografie, rechts in einer Fluoreszenzangiographie (Gass, 1998)

1.5 Therapie

Die therapeutischen Möglichkeiten bei der AMD sind begrenzt. Nur für die feuchte Form gibt es etablierte Therapieansätze.

Zu den verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten für die feuchte AMD gehören die thermische Laserkoagulation, die photodynamische Therapie sowie chirurgische Therapieverfahren (Holz et al., 2006).

Basierend auf neuen Erkenntnissen zur Pathogenese der AMD wurden in letzter Zeit neue Behandlungsansätze entwickelt. Durch wiederholte intravitreale Injektion von antiangiogen wirkenden Medikamenten kann das Wachstum von neovaskulären Membranen beeinflusst werden. Bei diesem Präparat handelt es sich um Inhibitoren, wie

z.B. Antikörper gegen vascular endothelial growth factor (VEGF), einen körpereigenen, vaskulären, endothelialen Wachstumsfaktor (Brown et al., 2006; Rosenfeld et al., 2006). Bei der trockenen Spätform der AMD hat man bisher keine Therapieoption.

Es deutet viel darauf hin, dass oxidativer Stress eine Rolle bei der Pathogenese der AMD spielt (Beatty et al., 2000). Im Rahmen der Age-related Eye Disease Study (AREDS) wurde überprüft, ob die Gabe von hohen Dosen von Antioxidantien (Vitamin C, E und β -Carotin) in Kombination mit Zink die Produktion von freien Radikalen an der Netzhaut reduzieren und eine Progression der Erkrankung limitieren kann. Es ergab sich eine Risikoreduktion der Progression von der Frühform zu Spätformen der AMD um 25% bei Einnahme der AREDS Medikation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der größte Effekt zeigte sich bei Studienteilnehmern mit einer großen Druse, multiplen mittelgroßen Drusen und später AMD an einem Auge (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001).

Unabhängig von den oben genannten Therapie- bzw. Prophylaxeansätzen besteht sowohl bei der feuchten, als auch bei der trockenen Makuladegeneration die Möglichkeit, durch vergrößernde Sehhilfen die Lebensqualität der Patienten zu verbessern.

1.6 Komplementsystem

Das Immunsystem wird in zwei Bereiche unterteilt, das angeborene und das erworbene. Das Komplementsystem lässt sich dem angeborenen Teil des Abwehrsystems zuordnen und hat die Aufgabe, Entzündungsreaktionen zu regulieren und Infektionen zu bekämpfen.

Es gibt drei unterschiedliche Aktivierungswege, den klassischen, den „Mannose-binding-Lectin“(MBL) und den alternativen Weg.

Alle drei Möglichkeiten führen zu einer Komplementaktivierung, an deren Ende es zu einer Opsonisierung der Pathogene, einem Anlocken von Leukozyten, zur Lyse von Bakterien und Zellen oder zur Verstärkung der Antikörperreaktion kommen kann (Walport, 2001).

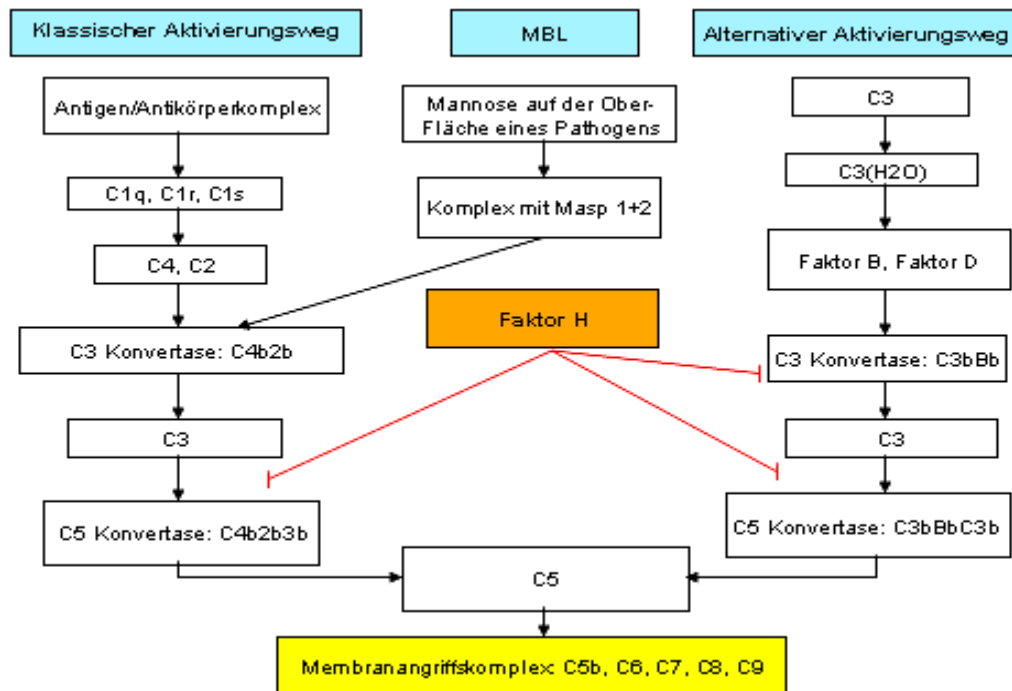


Abbildung 4 - Übersicht über das Komplementsystem - Die Komplementkaskade läuft über drei Aktivierungswege ab, den klassischen, den „Mannose-binding-Lectin“(MBL) und den alternativen Weg. Ziel der Kaskade ist die Opsonisierung von Pathogenen, die Lyse von Zellen und Bakterien und die Verstärkung der Antikörperreaktion. Alle drei Aktivierungswege haben eine gemeinsame Endstrecke, welche zur Bildung eines Membranangriffskomplexes führt, mit dessen Hilfe Poren in die Wände von Pathogenen gemacht und dadurch zerstört werden. Faktor H stellt einen Regulator des Komplementsystems dar, welcher körpereigene Zellen vor einer überschießenden Immunreaktion schützt. Adaptierte Graphik (Walport, 2001).

Bei der AMD wurde ein Polymorphismus im Gen des Komplementfaktors H entdeckt, welcher mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert ist (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b). Komplementfaktor H ist ein Regulator, der vor allem bei dem alternativen Aktivierungsweg eine überschießende Immunreaktion verhindert und ein Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung herstellt (Walport, 2001).

1.6.1 Der alternative Aktivierungsweg

Zu Beginn des alternativen Aktivierungsweges wird Faktor C3 im Plasma gespalten. Der daraus resultierende Faktor C3b bindet kovalent an die Hydroxylgruppen auf der Oberfläche von Zellen. C3b wird anschließend an das Plasmaprotein Faktor B gebunden, welches durch die Protease Faktor D in Ba und Bb gespalten wird, so dass der Komplex C3bBb entsteht. Es handelt sich bei diesem Komplex um eine C3-Konvertase, welche C3 in C3a und C3b spaltet.

Auch in den anderen beiden Aktivierungswegen des Komplementsystems wird eine Protease gebildet, bei der es sich ebenfalls um eine C3-Konvertase handelt.

Das aus der Spaltung von C3 resultierende Produkt C3a ist in der Lage, eine lokale Entzündungsreaktion und eine Chemotaxis von Leukozyten hervorzurufen, während C3b an die C3-Konvertase bindet, wodurch diese zur C5-Konvertase wird.

Diese spaltet C5 in C5a und C5b. C5a fördert wie C3a und C4a die Chemotaxis und führt durch Bindung an die Anaphylatoxinrezeptoren auf Leukozyten zu deren Aktivierung. C5b stellt den Ausgangspunkt für den Membranangriffskomplex dar (MAC, SC5b-9), welcher dadurch gebildet wird, dass an C5b die Komplementfaktoren C6, C7, C8 und C9 angelagert werden. Der MAC kann Poren in die Wände von bestimmten Pathogenen machen, durch welche diese zerstört werden (Walport, 2001).

1.6.2 Regulierung des Komplementsystems durch Faktor H

Faktor H und Faktor I sind in der Lage, eine überschießende Immunreaktion und den Angriff körpereigener Zellen zu verhindern. Bei Faktor I handelt es sich um eine Serinprotease, welche gemeinsam mit dem Kofaktor H C3b inaktiviert. Faktor B und Faktor H konkurrieren um die Bindung an Faktor C3b miteinander. In Anwesenheit von Polyanionen, wie sie auf den körpereigenen Zellen vorkommen, besitzt Faktor H eine höhere Affinität für die Bindungsstelle an C3b. Auf der Oberfläche von Bakterien fehlen diese Polyanionen, so dass Faktor B mit einer höheren Affinität an C3b bindet und eine Zerstörung der Pathogene durch Faktor H weitestgehend nicht inhibiert wird (Walport, 2001).

1.7 Fragestellung

Basierend auf der Hypothese, dass eine gestörte Regulierung des Komplementsystems zu einer Erhöhung von Komplementspaltprodukten führt und diese wiederum mit dem Erkrankungsrisiko für eine AMD assoziiert sind, wurden im Rahmen der folgenden Arbeit die Proteinplasmakonzentrationen des alternativen Aktivierungswegs bei AMD-Patienten und Kontrollen analysiert.

Bei folgenden Faktoren werden die Konzentrationen im Plasma bestimmt:

- C3 und C4, Substrate des Komplementsystems
- C3a und C5a, Proteine, die für eine akute Komplementaktivierung stehen
- aktiviertes C3, Ba und C5b-9, Proteine, die für eine chronische Komplementaktivierung stehen
- CFH, CFB und Faktor D, Regulatoren des Komplementsystems

Die Plasmakonzentrationen wurden auf eine mögliche Assoziation mit dem Phänotyp und mit den Polymorphismen in den Genen von Faktor H, B, C2 und C3 untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Probandenrekrutierung

Die Kontaktaufnahme zu den Probanden erfolgte auf den Stationen oder in der Ambulanz der Augenklinik der Universität Bonn. Es erfolgte ein persönliches Aufklärungsgespräch, bei dem der Proband über den Ablauf und die Auswertung der Studie informiert wurde. Neben dem Aufklärungsgespräch wurde jedem Studienteilnehmer auch eine schriftliche Aufklärung ausgehändigt, in welcher der Ablauf der Studie dokumentiert war. Im Anschluss daran gab jeder Proband sein schriftliches Einverständnis.

Bei den Kontrollpersonen handelte es sich um Ehepartner von Patienten oder um Patienten mit anderen Augenerkrankungen (z.B. Fehlstellungen der Lider).

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt und folgte der Deklaration von Helsinki.

2.2 Einschlusskriterien

Folgende Kriterien mussten erfüllt sein, damit ein Einschluss in die Studie erfolgen konnte:

- Alter: über 50 Jahre
- klare optische Medien für Fundus-Fotografie und Fundus-Autofluoreszenz-Bildgebung
- schriftliches Einverständnis
- bei AMD-Patienten: Diagnose einer AMD
- bei Kontrollpersonen: Ausschluss einer AMD

2.3 Vorgehen bei Probanden

Bei allen an der Studie teilnehmenden Probanden wurden folgende Daten erhoben und Untersuchungen durchgeführt:

- Einverständniserklärung
- Standardisierter Fragebogen
- ETDRS-Visus (Early Treatment Diabetic Retinopath Study Chart) bei Patienten mit einer AMD
- klinische augenärztliche Untersuchung
- Fundusfotografie und Fundusautofluoreszenz
- Angiographie (nur bei Patienten mit CNV)
- optische Kohärenztomographie (OCT) bei Patienten mit AMD
- Blutabnahme (27ml EDTA-Blut und 9ml Serum)

2.3.1 Standardisierter Fragebogen

Mittels eines standardisierten Fragebogens wurden folgende klinische Daten der Probanden erhoben:

- Geburtsdatum, Geschlecht, Körpergröße und Gewicht
- Augenerkrankungen in der Vorgeschichte
- bei Patienten mit Makuladegeneration:
 - o Zeitpunkt der Diagnosestellung der Makuladegeneration
 - o bisherige Behandlungen (Laser, Photodynamische Therapie etc.)
- allgemeinmedizinische Anamnese (z.B. Vorerkrankungen wie Hypertonus, Diabetes mellitus, Apoplex, Herzinfarkt und Hypercholesterinämie)
- Raucheranamnese: es erfolgte eine Unterteilung in Raucher, ehemalige Raucher und Nichtraucher
- Medikamentenanamnese
- Familienanamnese: Anzahl der Geschwister und Kinder, Auftreten von AMD in der Verwandtschaft

Probanden mit einer Erkrankung, die bekannterweise zu einer Veränderung der Konzentration von Komplementfaktoren führt, wurden ausgeschlossen. Hierzu zählen entzündliche systemische Erkrankungen wie beispielsweise rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes oder auch manifeste Infektionen.

2.3.2 ETDRS-Visus

Der Visus mit der bestmöglichen Korrektur wurde nach dem standardisierten ETDRS-Protokoll (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) bestimmt. Jedes Auge wurde einzeln getestet.

Bei Kontrollpersonen wurde keine Visusbestimmung vorgenommen.

2.3.3 Augenuntersuchung

Vor der klinischen Untersuchung erfolgte eine Weitstellung mit Tropicamid und Neosynephrin Augentropfen. Anschließend wurde der vordere und hintere Augenabschnitt an der Spaltlampe biomikroskopisch beurteilt.

Funduskopisch wurden bei den Patienten mit AMD die verschiedenen Formen (GA, CNV oder Drusen) unterschieden und bei Kontrollpersonen eine Makuladegeneration ausgeschlossen.

2.3.4 Fundusfotografie und Fundusautofluoreszenz

Zur Befunddokumentation erfolgten eine Farbfundusfotografie mittels Funduskamera und eine Fundusautofluoreszenzaufnahme.

Die Autofluoreszenzaufnahmen wurden mittels konfokaler Scanning Laser Ophthalmoskopie durchgeführt.

Verantwortlich für die Autofluoreszenz ist das retinale Pigmentepithel. In den Lysosomen dieser Zellen werden über Phagozytose die Photorezeptoraußensegmente abgebaut

und bei Gesunden zum größten Teil zur Aderhaut abtransportiert. Aus diesen Lysosomen können Lipofuszingranula hervorgehen, in denen sich metabolische Abbauprodukte, Fluorophore, befinden, welche die Autofluoreszenz hervorrufen (Heimann et al., 2004).

Eine pathologische, exzessive Akkumulation von Lipofuszingranula kommt im Rahmen von erblichen und komplexen Netzhauterkrankungen vor, unter anderem auch bei der AMD (Schmitz-Valckenberg et al., 2008).

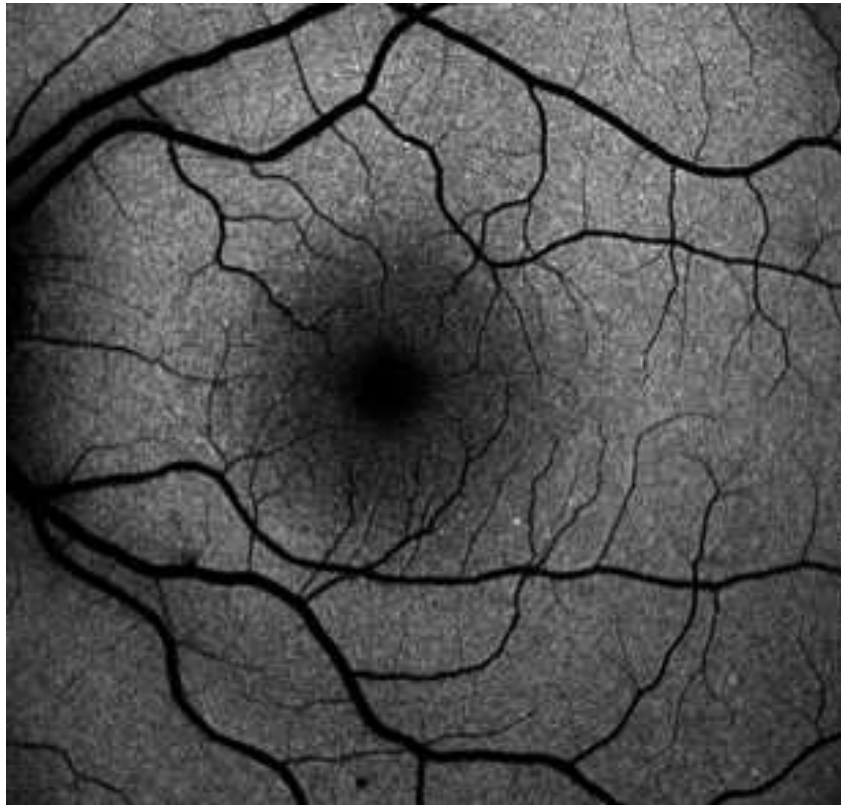


Abbildung 5 - Autofluoreszenz einer Kontrollperson - Die Fovea weist eine verminderte Autofluoreszenz auf, da hier das Makulapigment liegt, welches das Exzitationswellenlicht abschwächt (Bindewald et al., 2004).

Wenn die Zellen des retinalen Pigmentepithels im Rahmen einer geographischen Atrophie zugrunde gehen, führt dies zu einer reduzierten Autofluoreszenz. Häufig sind diese atrophischen Areale von einer verstärkten Autofluoreszenz umgeben, was auf

eine pathologisch gesteigerte Lipofuzinspeicherung schließen lässt. Innerhalb der Bereiche mit verstärkter Autofluoreszenz entwickelt sich häufig eine größere Atrophiezone (Holz et al., 2001).

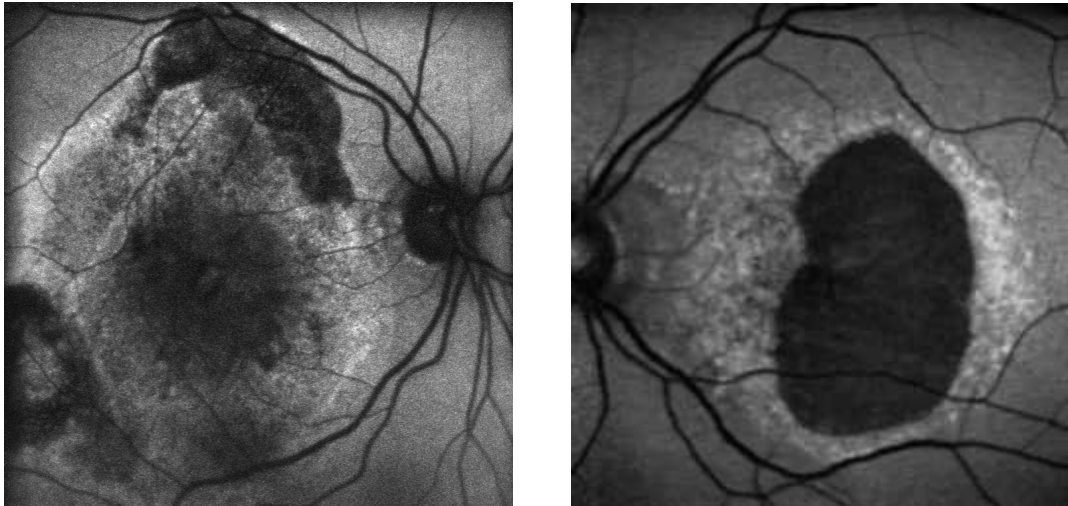


Abbildung 6 - Autofluoreszenz bei einem Patienten mit CNV (linkes Bild) und einer geographischen Atrophie (rechtes Bild) (Holz et al., 2001)

2.3.5 Angiographie

Bei Patienten mit einer neovaskulären AMD wurde eine Fluoreszenzangiographie durchgeführt. Dazu werden dem Patienten 5 ml eines Fluoreszeinfarbstoffs (Konzentration: 100mg/ml) in eine Vene der Armbeuge oder des Handrückens gespritzt. Zuerst erreicht der Farbstoff die chorioidalen Arterien, kurz danach die retinalen Arteriolen. Durch die fenestrierten Kapillaren der Choriokappilaris kann der Farbstoff hindurch treten, wobei bei intaktem retinalen Pigmentepithel eine Diffusion des Farbstoffes über die Blut-Retina-Schranke verhindert wird. Die Fovea der Makula enthält bei einem gesunden Menschen keine retinalen Gefäße. Über die Venen verlässt der Farbstoff das Auge wieder.

Bei Patienten mit AMD treten im Rahmen der Fluoreszenzangiographie Hyper- und Hypofluoreszenzen auf. In einem gesunden Auge schwächt das Xanthophyllpigment der

Makula sowie das Melanin in den Pigmentepithelzellen und in der Aderhaut die chorioidale Fluoreszenz ab. Wenn nun das abschwächende Melanin oder das Xanthophyllpigment vermindert ist, kommt es zu einer Hyperfluoreszenz, einem so genannten Fensterdefekt.

Bei AMD-Patienten kann es außerdem durch eine Farbstoffanhäufung in den krankhaft veränderten Gefäßen oder in Leckagen zu einer Hyperfluoreszenz kommen.

Durch Blutungen oder Pigmentepithelhyperplasie kann sich bei Patienten in der Angiographie auch eine Hypofluoreszenz zeigen (Holz et al., 2004).

2.3.6 Optische Kohärenztomographie

Alle Patienten mit AMD erhielten ein zweidimensionales Schnittbild mit einem optischen Kohärenztomogramm (OCT). Dabei handelt es sich wie bei der Fundusautofluoreszenz um ein nichtinvasives Verfahren.

Die Netzhaut wird mit zeitlich inkohärentem Licht bestrahlt, welches an den Grenzflächen der Netzhautbestandteile verschieden reflektiert und gebrochen wird.

Die Entfernung und die Brechung des Lichtes werden von einem Interferometer ausgemessen und zu einem Bild verarbeitet, welches eine Auflösung von 10µm hat (Burk and Burk, 2005).

Dieses Verfahren eignet sich zur Beurteilung der einzelnen Netzhautschichten im Hinblick auf das Vorhandensein von sub- oder intraretinaler extrazellulärer Flüssigkeitsakkumulation oder Pigmentepithelabhebungen, wodurch sich beispielsweise Aussagen über die Manifestationsform der AMD machen lassen (Eter et al., 2004).

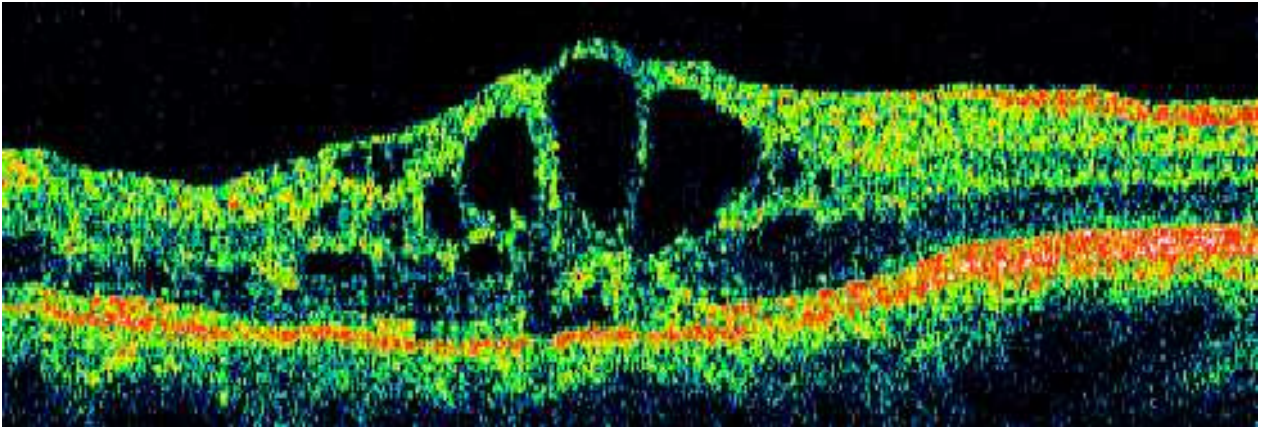


Abbildung 7 - OCT bei einem Patienten mit CNV - Die Schichtaufnahme der Netzhaut zeigt eine intraretinale extrazelluläre Flüssigkeitsakkumulation (Bild aufgenommen bei Patienten der Universitätsaugenklinik in Bonn).

2.4 Grading

Anhand der bildgebenden Diagnostik wurde jedes Auge folgenden AMD-Manifestationen zugeteilt:

- CNV
- GA
- Drusen

Bei Vorliegen einer neovaskulären AMD an mindestens einem Auge wurde der Patient der CNV Gruppe zugeteilt. Zeigte sich beidseits eine trockene AMD und lag an mindestens einem Auge eine GA vor, wurde der Patient der GA Gruppe zugeteilt.

In folgenden Fällen wurde der Patient von der weiteren Analyse ausgeschlossen:

- Patienten, deren Fundusveränderungen nicht mit Sicherheit einer AMD zugeordnet werden konnten
- Kontrollpersonen mit pathologischen Veränderungen der Makula, wie z.B. ein Venenverschluss.

Inaktive Krankheiten, wie beispielsweise Makulaforamina, welche eine bekannte Pathophysiologie haben, wurden nicht ausgeschlossen.

2.5 Blutabnahme und Verarbeitung

Zur Bestimmung der biochemischen Parameter wurden 18ml EDTA-Blut abgenommen, aus dem innerhalb von 3 Stunden das Plasma abzentrifugiert wurde (Einstellungen: 4 °C, 20 Minuten Laufzeit, RZB=1000g). Im Anschluss daran erfolgte die Einlagerung der Proben bis zur Analyse an der Universität Göttingen (Leitung M.Oppermann) bei –80 °C. Zur Genotypisierung wurden 9ml venöses Blut an die Universität Regensburg (Leitung B. Weber) geschickt.

Im Zentrallabor der Universität Bonn erfolgte in einer weiteren 9ml Blutprobe die Bestimmung von Kreatinin, Cystatin C, C3 und C4.

Da sich gezeigt hat, dass Komplementfaktoren wie Faktor D und Ba abhängig von der glomerulären Filtrationsrate sind, wurden Kreatinin und Cystatin C bestimmt (Oppermann et al., 1991a). Anhand dieser Werte konnten Probanden mit einer Niereninsuffizienz identifiziert werden.

Ein Proband wies eine erhöhte Konzentration von Komplementfaktoren infolge einer Niereninsuffizienz auf und wurde von der Analyse für Faktor D und Ba ausgeschlossen. Oppermann et al hatten 1991 gezeigt, dass der Abbau von Faktor D und Ba von der glomerulären Filtrationsrate abhängt (Oppermann et al., 1991a). Die Werte für Cystatin C und Kreatinin von allen anderen Probanden lagen im Normbereich. Bei allen anderen Probanden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und AMD Patienten im Hinblick auf die Nierenfunktion (p-Wert für Kreatinin=0,73, p-Wert für Cystatin C=0,11).

2.6 Biochemische Analyse

Die biochemische Analyse erfolgte an der Universität Göttingen.

Bei den folgenden Faktoren wurde die Konzentration im Plasma bestimmt:

- C3 und C4, Substrate des Komplementsystems
- C3a und C5a, Proteine, die für eine akute Komplementaktivierung stehen
- aktiviertes C3, Ba und C5b-9, Proteine, die für eine chronische Komplementaktivierung stehen

- CFH, CFB und Faktor D, Regulatoren des Komplementsystems

(siehe auch Abbildung 8 - Der alternative Aktivierungsweg: Übersicht der biochemischen und genetischen Marker).

Für die Konzentrationsbestimmung der Komplementfaktoren B, Ba, C3a, C3d, C5a, SC5b-9, Faktor D und Faktor H wurden passende Assays entwickelt (Oppermann et al., 1990; Oppermann et al., 1991b; Würzner et al., 1991). Diese basieren auf monoklonalen Antikörpern, welche gegen die durch Aktivität induzierten Neoepitope auf den verschiedenen Komplementprodukten gerichtet sind, die bei den jeweiligen Vorläuferproteinen nicht vorkommen. Beispielsweise wird bei dem Assay, welcher für die Konzentrationsbestimmung von C3d benutzt wird, ein Capture mAb (I3/15) benutzt, welcher mit den Neoepitopen auf C3b, iC3b und C3dg reagiert. Dies wird kombiniert mit einem polyklonalen Antikörper von Kaninchen, Anti-C3d (Oppermann et al., 1990).

Die Proben von Probanden und Kontrollen wurden identisch behandelt und gleichzeitig analysiert, um stabile Bedingungen für die Assays zu gewährleisten. Die Variabilität der Assays mit ELISA liegt bei mehrfacher Testung derselben Blutprobe bei unter 10 % (Oppermann et al., 1991b).

2.7 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte an der Universität Regensburg.

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht der analysierten Marker in den Genen von CFH, Faktor B, C2 und C3.

Gen	Marker
CFH	rs800292
	rs1061170 (Y402H)
	rs1048663
	rs2274700
	rs412852
	rs11582939
BF-C2	rs9332739 (E318D)
	rs547154
	rs4151667 (L9H)
	rs12614
C3	rs641153 (R32Q)
	rs2230199

Tabelle 1 - Übersicht über die analysierten Marker in den Genen von Faktor H, B, C2 und C3

Für die Genotypisierung wurde die DNA der peripheren Leukozyten aus den abgenommenen Blutproben analysiert. Dies erfolgte durch TaqMan SNP Genotypisierung oder durch direkte Sequenzanalyse der SNPs. Insgesamt wurden zwölf SNPs bestimmt, davon waren sechs Marker im CFH-Gen auf Chromosom 1, fünf im BF-C2-Gen auf Chromosom 6 und einer im C3-Gen auf Chromosom 19.

Die TaqMan Pre-Designed SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.) wurden entsprechend den Angaben des Herstellers angewandt und mit Hilfe eines 7900HT Fast Real-Time PCR Systems analysiert.

Die direkte Sequenzierung der SNPs erfolgte mit der Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit Version 1.1 gemäß den Herstelleranweisungen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des ABI Prism Model 3130xl Sequencer ausgewertet.

Fehlende oder nicht eindeutige Resultate wurden erneut getestet, so dass sich am Ende eine Call-Rate von 100% für die SNPs ergab (Scholl et al., 2008).

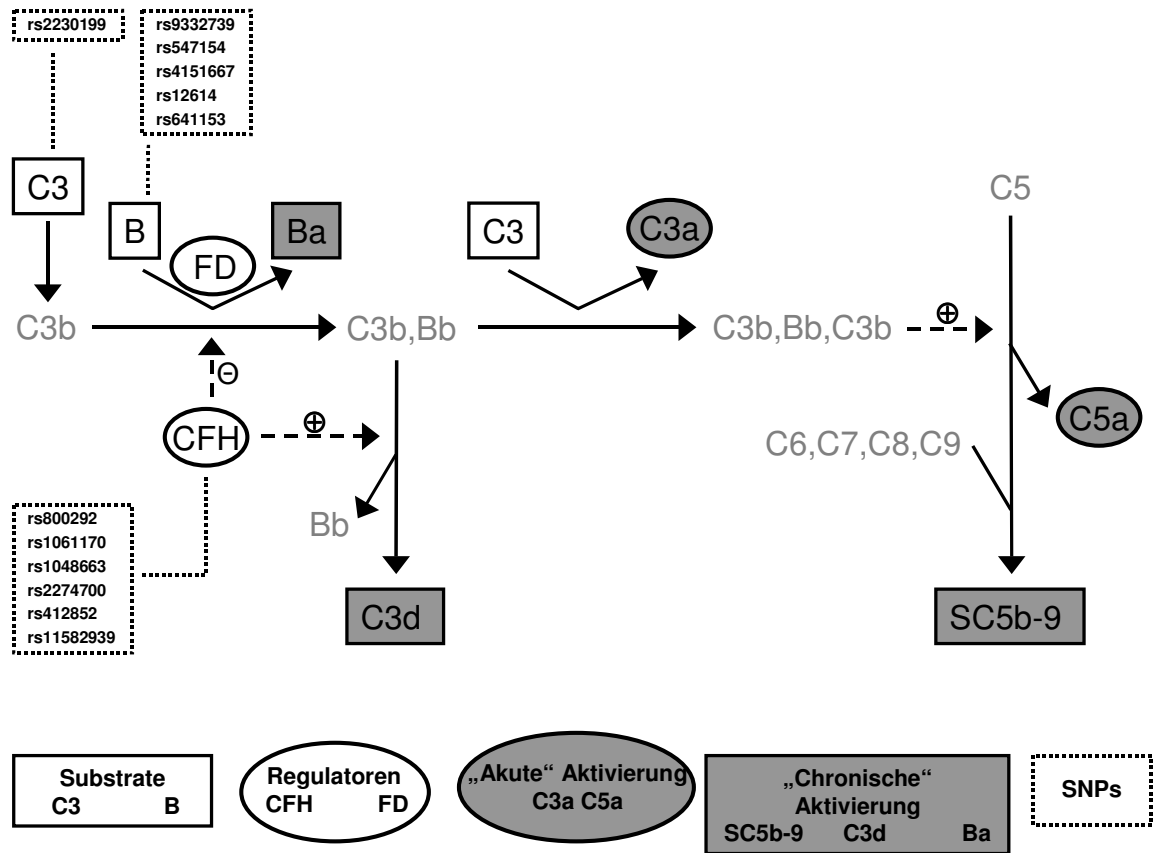


Abbildung 8 - Der alternative Aktivierungsweg: Übersicht der biochemischen und genetischen Marker - Die SNPs der Komplementgene (Kästen mit gepunkteter Umrandung) und die Proteinplasmakonzentrationen (Kästen mit durchgezogener Umrandung) wurden bei allen Probanden bestimmt. Bei C3, C4 und Faktor B handelt es sich um Substrate (weiße Rechtecke, bei Faktor D und Faktor H um Regulatoren (weiße Ellipsen), bei Faktor Ba, C3d (=aktiviertes C3) und SC5b-9 um Marker für eine chronische Komplementaktivierung (graue Rechtecke) und bei C3a und C5a um Marker für eine akute Aktivierung des Komplementsystems (graue Ellipsen).

2.8 Statistische Analyse

Zu Beginn der Auswertung in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn erfolgte die deskriptive Statistik der Phänotypen, der biochemischen und der genetischen Daten. Im Anschluss

wurden die erhobenen Daten untereinander mit Hilfe von verschiedenen Testverfahren verglichen und auf Assoziationen untersucht.

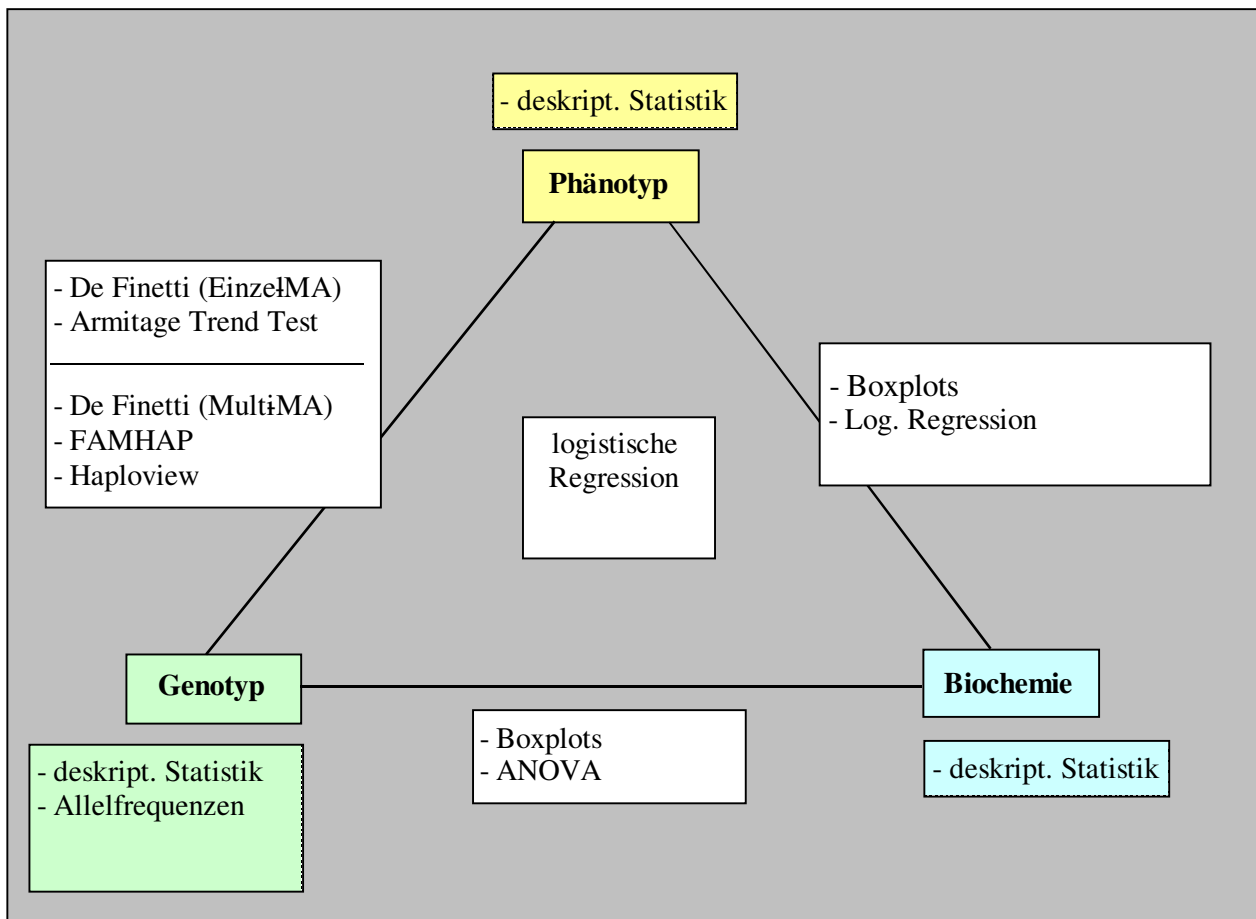


Abbildung 9 - Übersicht über die statistischen Analysen - Nach der deskriptiven Statistik der Phänotypen, der biochemischen und der genetischen Daten wurden die Daten mit oben genannten Verfahren auf Assoziationen analysiert und mit Hilfe von Box Plots und ROC (receiver operating characteristic) Kurven dargestellt.

2.8.1 Deskriptive Statistik

Zu Beginn der Auswertung erfolgte die deskriptive Statistik mit Darstellung und Auszählung der Daten bezüglich der Diagnosen und Phänotypen. Bei allen Probanden wurden die Daten über das Alter, das Geschlecht, die Nierenwerte und das Rauchverhalten erhoben und jeweils getrennt für AMD Patienten und Kontrollen mittels Median, Mittelwert, Standardabweichung und Spannweite dargestellt.

Bei den biochemischen Daten wurden für AMD Patienten und Kontrollen Median, Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und mit Hilfe von Boxplots graphisch dargestellt.

Im Rahmen der Genanalyse wurden die Allelfrequenzen und Haplotypen bei Patienten mit CNV, GA, Drusen und Kontrollen beschrieben und mit Hilfe des De Finetti Diagramms dargestellt, wobei alle SNPs im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht lagen. Die Allelfrequenzen lagen in denselben Messbereichen, welche sowohl in der Entrez SNP Datenbank (www.ncbi.nih.gov, dbSNP) als auch in verschiedenen Publikationen beschrieben worden sind (Edwards et al., 2005; Gold et al., 2006; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b; Li et al., 2006; Maller et al., 2007; Spencer et al., 2007; Yates et al., 2007).

2.8.2 Analyse der Daten

Um eine Assoziation zwischen den Phänotypen und den biochemischen Daten zu finden, erfolgte eine Gegenüberstellung der Daten zur Darstellung der Verteilung mit Hilfe von Boxplots und eine Prüfung auf die Signifikanz der gefundenen Unterschiede mit dem t-Test. Um das Verhältnis der biochemischen Daten untereinander zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.

Mittels des Armitage Trend Test wurde überprüft, ob ein signifikanter Unterschied in den Genotypfrequenzen zwischen Fällen und Kontrollen vorlag.

Die Häufigkeit der Haplotypen für die Marker im CFH- und BF-C2-Gen wurde mittels FAMHAP geschätzt (Becker et al., 2005).

Mit Hilfe des Likelihood ratio Tests wurde auf Unterschiede in der Verteilung der Haplotypen getestet.

Beim Vergleich der Genotypen und der Biochemie wurden für jeden untersuchten genetischen Marker die biochemischen Daten erhoben und mit Hilfe von Boxplots dargestellt. Die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Höhe der biochemischen Konzentrationen und den Markern erfolgte mit einer Varianzanalyse.

Bei einer stufenweise logistischen Regressionsanalyse wurden unterschiedliche Modelle entwickelt, welche ausschließlich auf den biochemischen, den genetischen Markern oder beiden zusammen beruhen. Die diagnostische Vorhersagekraft der unterschiedlichen Modellen wurde in ROC (receiver operating characteristic) Kurven dargestellt. Dabei handelt es sich um eine Graphik, mit Hilfe derer sich eine Vorhersage bezüglich eines binären Problems bei einem diagnostischen Test treffen lässt.

Bei einem diagnostischen Test, der positiv oder negativ ausfallen kann, wird auf das Vorliegen einer bestimmten Erkrankung (in diesem Falle der AMD) geschlossen. Um die Aussagekraft des Tests beurteilen zu können, werden Angaben über die Sensitivität und die Spezifität benötigt. Bei der Sensitivität handelt es sich um den Anteil positiver Testergebnisse bei den Kranken, während die Spezifität Auskunft über den Anteil negativer Testergebnisse unter den Gesunden gibt. In den meisten Fällen gibt es bei einer Erkrankung keine vorgegebene, natürliche Grenze zwischen pathologisch und gesund. Sensitivität und Spezifität sind folglich abhängig von der Festlegung eines geeigneten Trennwertes, bei dem es möglichst wenig falsch positive und falsch negative Entscheidungen gibt. Zur Festlegung eines objektiven Trennwertes kann das ROC Verfahren genutzt werden, bei dem möglichst viele Werte über dem Definitionsbereich der Messgröße durchlaufen werden und die dazugehörigen Spezifitäten und Sensitivitäten berechnet werden. Die Ergebnisse werden in einer Graphik, der ROC Kurve dargestellt. Aus dieser Graphik lässt sich der Trennwert ablesen, der um so besser ist, wenn Sensitivität und Spezifität hoch sind. Je größer die Fläche unter der Kurve ist, um so besser ist der Trennwert und um so weniger falsch positive und falsch negative Ergebnisse gibt es (Sachs and Hedderich, 2006).

Im Rahmen dieser Studie zeigt die ROC Kurve an, ob sich aufgrund von genetischen und biochemischen Daten eine Aussage über den Phänotyp der Netzhaut treffen lässt. Ein Beispiel für ein richtig positives Ergebnis wäre in der vorliegenden Arbeit ein

Proband mit dem Phänotyp einer AMD, der allein aufgrund der genetischen und biochemischen Ergebnisse der Gruppe der Kranken zugeteilt werden könnte. Bei einem falsch positiven Ergebnis würde es sich beispielsweise um einen Probanden handeln, der phänotypisch keine Zeichen einer AMD aufweist, aber bei alleiniger Betrachtung der biochemischen und genetischen Werte in die Gruppe mit AMD zugeteilt werden würde. Mittels einer Varianzanalyse wurde die Abhängigkeit der erhöhten biochemischen Werte im Plasma von den CFH Haplotypen und dem Phänotyp bestätigt. Die Datenanalyse erfolgte mit SAS (SAS software package for Windows, version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; <http://www.sas.com>).

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht der epidemiologischen Daten

Es wurden 112 Patienten mit AMD und 67 Kontrollen ohne AMD in die Studie eingeschlossen.

Alle eingeschlossenen Probanden waren Kaukasier und wurden im Zeitraum von Januar bis Oktober 2006 in die Studie aufgenommen.

		Kontrollen n=67	Probanden mit AMD n=112
Phänotyp (Anzahl)	keine AMD	67	
	Drusen		9
	Geographische Atrophie		25
	CNV		78
Geschlecht (Anzahl)*	männlich	37	41
	weiblich	30	71
Durchschnittsalter - Jahre** (Standardabweichung / Spanne)	Kontrollen	70,1 (6,0 / 60-86)	
	AMD		75,6 (6,6 / 59-94)
Raucheranamnese - Anzahl (Prozent)	nie geraucht	35 (52%)	59 (53%)
	Raucher	6 (9%)	10 (9%)
	ehemaliger Raucher	26 (39%)	43 (38%)

Tabelle 2 - Übersicht über die epidemiologischen Daten: Geschlecht, Durchschnittsalter, Raucheranamnese und Phänotypisierung (ein Proband wurde aufgrund einer bestehenden Niereninsuffizienz von einer Analyse von Faktor D und Ba ausgeschlossen)

* Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen, $p=0.02$; ** $p<0.001$

Obwohl die Patienten- und die Kontrollgruppe im Alter ähnlich waren, zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen (siehe Tabelle 2 – Übersicht über die epidemiologischen Daten). Auch beim Geschlechterverhältnis zeigte sich ein Unterschied zwischen AMD-Patienten und Kontrollen. Bezüglich des Rauchverhaltens konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen gefunden werden.

3.2 Klassifikation des Phänotyps

Für eine genaue Analyse der Daten wurde der Netzhautstatus der Probanden klassifiziert. Bei der Rekrutierung und im Rahmen des Gratings (siehe 2.4) waren die Studienteilnehmer verschiedenen Hauptgruppen (aktive und inaktive CNV, GA, Drusen und Kontrollen) zugeordnet worden. Folgende Gruppierungen ergaben sich daraus:

	CNV	GA	Drusen	keine AMD
CNV	36			
GA	4	20		
Drusen	35	4	9	
keine AMD	3	0	0	67
Anophthalmus	0	1	0	0
gesamt	78	25	9	67

Tabelle 3 - Phänotypen - Bei jedem Probanden erfolgte eine ophthalmoskopische Untersuchung der Retina beider Augen und eine Klassifikation in CNV, GA, Drusen und keine AMD. Bei einem Probanden lag ein Anophthalmus vor, bei geographischer Atrophie am anderen Auge wurde er dieser Gruppe zugeordnet.

3.3 Biochemische Analyse

3.3.1 Vergleich von Patienten mit Kontrollen

Bei der Analyse der biochemischen Daten zeigte sich für alle Komplementaktivierungsprodukte eine signifikante Erhöhung bei AMD Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Der größte Unterschied ergab sich bei den Konzentrationen von C3d und Ba, beides Faktoren, welche für eine chronische Aktivierung stehen.

Für C3a, C5a und SC5b-9 wurden ebenfalls höhere Konzentrationen im Plasma gemessen, allerdings war der Unterschied von Patienten zu Kontrollen nicht so stark ausgeprägt.

Auch für den Regulator Faktor D konnte eine signifikant höhere Konzentration bei den Fällen gemessen werden.

Die Konzentration von CFH unterschied sich nicht in den beiden Populationen und auch für die Substrate C3 und C4 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 4).

		Kontrollen		AMD Patienten		P *
		Median	5 th , 95 th Pc.	Median	5 th , 95 th Pc.	
Substrate	C3 [g/l]	1.18	0.85, 1.48	1.12	0.89, 1.53	0.85
	C4 [g/l]	0.24	0.15, 0.34	0.23	0.15, 0.38	1.0
	FB [µg/ml]	642	378, 1354	803	497, 1489	0.02
Regulatoren	CFH [µg/ml]	515	365, 711	546	396, 758	0.21
	FD [µg/ml]	0.95	0.50, 1.65	1.27	0.69, 2.30	< 0.001
Marker für akute Komplement- aktivierung	C3a [ng/ml]	14.3	10.6, 21.2	15.5	11.2, 24.1	0.03
	C5a [ng/ml]	1.67	0.66, 2.32	1.85	0.78, 2.66	0.04
Marker für chronische Komplement- aktivierung	Ba [µg/ml]	1.09	0.60, 1.71	1.33	0.90, 2.09	<0.001
	C3d [ng/ml]	46.9	32.2, 68.5	55.2	35.7, 94.1	<0.001
	SC5b-9 [units]	159	90, 710	188	107, 777	0.01

Tabelle 4 - Ergebnisse der Biochemie - Die Komplementproteine in dieser Tabelle wurden unterteilt in Substrate (C3, C4, Faktor B), Regulatoren (Faktor H, Faktor D), Marker für akute (C3a, C5a) und chronische Komplementaktivierung (Ba, C3d, SC5b-9), siehe auch Abbildung 8.

Bei den Faktoren C3d, D, Ba, B, C3a, C5a und SC5b-9 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen

*Wilcoxon-Rangsummentest; korrigiert für multiples Testen durch eine Bonferroni-Holm-Prozedur

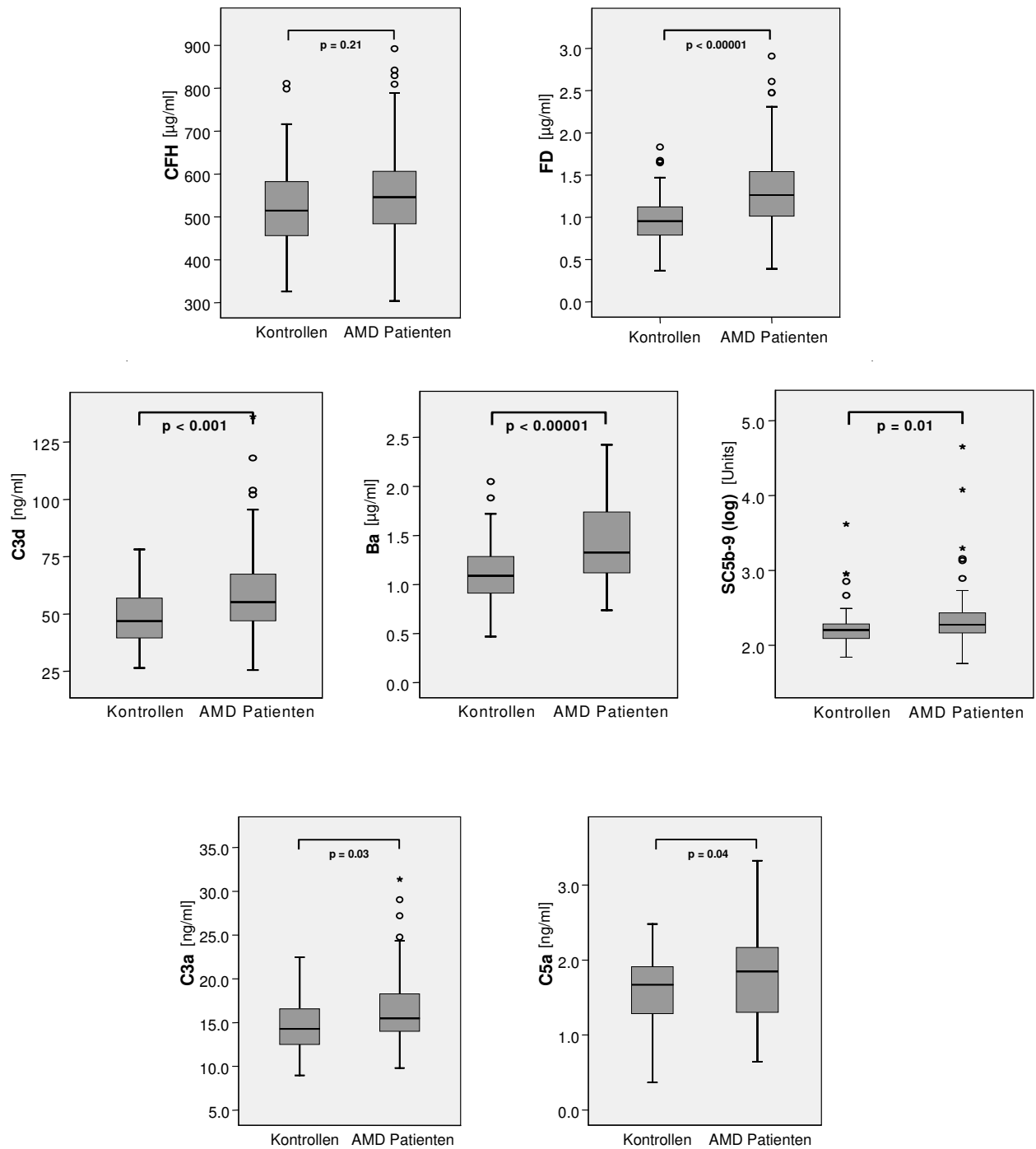


Abbildung 10 - Boxplots der biochemischen Ergebnisse - Für FD, C3d, Ba, SC5b-9, C3a und C5a zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen. Bei Faktor H ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

Zwei Patienten mit CNV und ein Proband aus der Kontrollgruppe wiesen bei der Bestimmung von SC5b-9 stark erhöhte Werte auf. Der Phänotyp dieser Ausreißer zeigte im Vergleich zu Probanden mit durchschnittlichen Blutwerten keine Besonderheiten und auch die Erkrankungs- und Medikamentenanamnese zeigte keine systemischen Veränderungen, die die stark erhöhten Werte erklären könnten.

3.3.2 Vergleich der unterschiedlichen AMD Untergruppen

Bei der Analyse der Plasmakonzentrationen ergaben sich nur für C3d signifikante Unterschiede zwischen den Untergruppen der AMD Population (ANOVA, unkorrigierter p-Wert<0,001). Patienten mit Drusen wiesen die höchsten Werte mit einem Mittelwert von 76,2ng/ml auf, während die Probanden mit einer GA sowie mit einer CNV signifikant niedriger waren (69,9ng/ml und 53,7ng/ml).

Für die übrigen Proteine konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Phänotyp	Median [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung [ng/ml]	n
CNV	52,8	53,7	15,6	78
GA	67,4	69,9	20,9	25
Drusen	77,5	76,2	19,1	9

Tabelle 5 - Median, Mittelwert, und Standardabweichung der Konzentration von C3d bei AMD Untergruppen, unkorrigierter p-Wert<0,001

3.3.3 Intraindividuelle Variabilität

Um die intraindividuelle Variabilität der Komplementfaktoren im Plasma zu bewerten, wurde bei einem Teil der AMD Patienten (n=14) nach einem Jahr eine zweite Blutprobe

entnommen und die Konzentration der Faktoren Ba, C3d und Faktor D erneut bestimmt. Es zeigte sich für alle drei Faktoren eine intraindividuelle Variabilität von unter 15%.

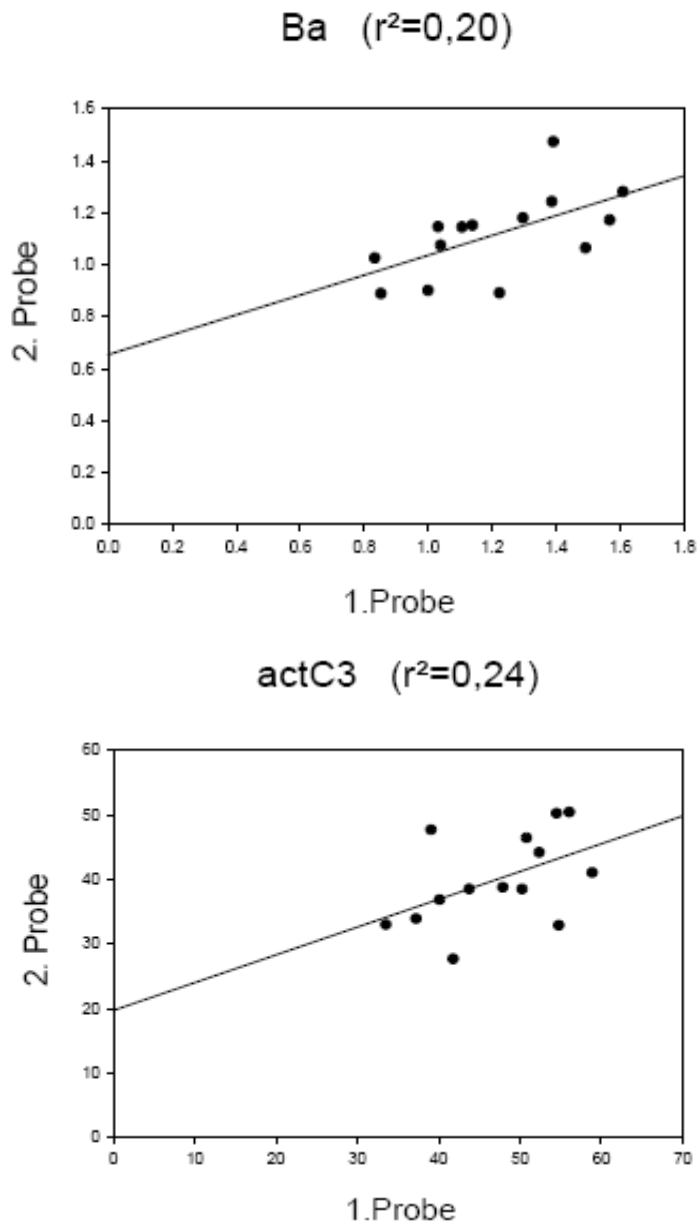


Abbildung 11 - intraindividuelle Variabilität von actC3 (C3d) und Ba - Nach einem Jahr wurde bei einem Teil der Probanden (n=14) eine zweite Blutprobe entnommen und erneut analysiert. Die Plasmakonzentrationen variierten <15%.

3.4 Genotypisierung

Die Erfolgsrate der Genotypisierung betrug 100% für alle getesteten SNPs. Dabei ergab sich keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für keinen der getesteten Marker.

Im CFH-Gen wiesen vier der sechs Marker eine signifikante Assoziation mit der AMD auf. Zwei dieser SNPs waren mit einem erniedrigten Risiko assoziiert bezüglich der Makuladegeneration (rs800292, rs2274700; die in der Normpopulation häufigere Variante kommt bei Patienten häufiger vor bzw. die seltenere Variante kommt seltener vor), während die beiden anderen SNPs mit erhöhtem Risiko einher gingen (rs1061170, rs412852).

Für die Marker im BF-C2-Gen (rs547154 und rs641153) zeigte sich ein protektiver Effekt.

Der SNP rs2230199 im C3-Gen war wiederum mit einem erhöhten Risiko assoziiert, da die Frequenz der weniger häufigen Variante bei Fällen 23,7% und bei Kontrollen 13,4% betrug.

^{1*}

^{1*} Die Beschreibung einer Variante als protektiv beruht auf Ergebnissen, bei denen diese häufiger bei den Kontrollen als bei den Fällen vorkommen. Da der biologische Zusammenhang zwischen den Varianten und deren Einfluss auf die Makuladegeneration bisher nicht geklärt ist, wäre es ebenfalls denkbar, dass die entsprechende Variante, welche häufiger bei Fällen vorkommt, das Risikoallel darstellt (Spencer et al., 2007).

Marker	Allel 1	Allel 2	Genotypen Fälle			HWE *	MAF **	Genotypen Kontrollen			HWE *	MAF **	ATT ***
			11	12	22	p-Wert	11	12	22	p-Wert	p-Wert		
CFH Gene													
rs800292	G	A	84 75.0%	27 24.1%	1 8.9%	0.69	12.9%	38 56.7%	27 40.3%	2 3.0%	0.49	23.1%	0.0092
rs1061170	T	C	20 17.9%	56 50.0%	36 32.1%	0.83	57.1%	27 40.3%	32 47.8%	8 11.9%	0.75	35.8%	<0.001
rs1048663	G	A	78 69.6%	32 28.6%	2 1.8%	0.73	16.1%	47 70.1%	16 23.9%	4 6.0%	0.20	17.9%	0.6583
rs2274700	G	A	71 63.3%	35 31.2%	6 5.4%	0.57	16.5%	21 31.3%	36 53.7%	10 14.9%	0.39	41.8%	<0.001
rs412852	A	G	16 14.3%	53 47.3%	43 38.4%	0.96	62.1%	23 34.3%	34 50.7%	10 14.9%	0.65	40.3%	<0.001
rs11582939	C	T	75 67.0%	35 31.2%	2 1.8%	0.52	17.4%	46 68.7%	17 25.4%	4 6.0%	0.22	18.7%	0.7671
C2-BF Gene													
rs9332739	G	C	105 93.8%	7 6.3%	0 0.0%	1.0	3.1%	62 92.5%	5 7.5%	0 0.0%	1.0	3.7%	0.7536
rs547154	G	T	106 94.6%	6 5.4%	0 0.0%	1.0	2.7%	57 85.1%	10 14.9%	0 0.0%	1.0	7.5%	0.0299
rs4151667	T	A	105 93.8%	7 6.3%	0 0.0%	1.0	3.1%	62 92.5%	5 7.5%	0 0.0%	1.0	3.7%	0.7536
rs12614	C	T	88 78.6%	23 20.5%	1 0.9%	1.0	11.2%	60 89.6%	7 10.4%	0 0.0%	1.0	5.2%	0.0531
rs641153	G	A	106 94.6%	6 5.4%	0 0.0%	1.0	2.7%	57 85.1%	10 14.9%	0 0.0%	1.0	7.5%	0.0299
C3 Gene													
rs2230199	G	C	68 60.7%	35 31.2%	9 8.0%	0.15	23.7%	50 74.6%	16 23.9%	1 1.5%	1.0	13.4%	0.0254

* HWE, Hardy -Weinberg Gleichgewicht; ** MAF, Minorallelfrequenz; *** ATT, Armitage's trend Test

Tabelle 6 - genetische Daten - Darstellung der analysierten Marker und der Allelverteilung bei Fällen und Kontrollen

rot: Risiko erhöhende SNPs, blau: protektive SNPs

Bei einer Analyse der Haplotypen zeigte sich im CFH-Gen ein Risikohaplotyp GCGGGC, den 57% der AMD Patienten aufwiesen, der aber bei nur 36% der Kontrollpersonen zu finden war. Als protektiv erwiesen sich die Haplotypen ATGAAC und GTGAAC (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7).

Im BF-C2 Gen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Haplotypenverteilung zwischen Fällen und Kontrollen (p-Wert=0,14).

Haplotypen	Frequenz der Genotypen	
	Fälle	Kontrollen
CFH-Gen		
ATGAAC	12%	23,1%
GCGGGC	56,7%	35,8%
GTAGAT	16,1%	17,9%
GTGAAC	8,1%	17,9%
GTGGGC	4,5%	4,5%
BF-C2-Gen		
CGACG	2,8%	2,4%
CTACA	0,0%	1,3%
GGTCG	83,4%	85,3%
GGTTG	11,2%	4,8%
GTTCA	2,3%	5,7%

Tabelle 7 - Haplotypenanalyse durch FAMHAP - p-Wert für die Verteilung der Haplotypen im CFH-Gen $p < 0,001$, im BF-C2-Gen $p = 0,14$

rot: Risikohaplotyp, blau: protektiver Haplotyp

3.5 Assoziation zwischen der Proteinkonzentration der Komplementfaktoren und den Genotypen

Um eine direkte Assoziation zwischen den genetischen Polymorphismen und den Komplementfaktoren des alternativen Aktivierungswegs nachzuweisen, wurden die Haplotypen mit den Plasmakonzentrationen der einzelnen Faktoren verglichen.

Bei der Analyse des CFH-Gens zeigte sich, dass Träger des Risikohaplotypen sowohl in der AMD Population als auch bei den Kontrollen eine erhöhte Komplementaktivierung im Vergleich zu den Probanden mit protektiven Haplotypen aufwiesen (Ausnahme C5a).

Komplement-protein	Kontrollen			AMD Patienten		
	Alle (n=67)	Risiko- haplotypen (n=17)	Protective Haplotypen (n=23)	Alle (n=112)	Risiko- haplotypen (n=67)	Protective Haplotypen (n=16)
Ba [µg/ml]	1.11 ± 0.04	1.21 ± 0.25	1.04 ± 0.08	1.41 ± 0.04	1.46 ± 0.05	1.27 ± 0.11
C3d [µg/ml]	48.1 ± 1.40	50.9 ± 3.71	45.4 ± 2.34	59.1 ± 1.80	60.6 ± 2.11	52.7 ± 4.88
C3a [ng/ml]	14.7 ± 0.38	15.3 ± 0.70	14.0 ± 0.62	16.4 ± 0.37	16.6 ± 0.53	15.3 ± 0.89
C5a [ng/ml]	1.55 ± 0.06	1.64 ± 0.12	1.46 ± 0.11	1.77 ± 0.06	1.72 ± 0.07	1.86 ± 0.16
D [µg/ml]	0.98 ± 0.04	1.04 ± 0.05	0.85 ± 0.07	1.35 ± 0.05	1.38 ± 0.06	1.26 ± 0.12

Tabelle 8 - Plasmakonzentration (Mittelwert ± Standardabweichung) der Komplementfaktoren im Zusammenhang mit dem Risikohaplotyp und den protektiven Haplotypen des CFH-Gens.

Es zeigen sich bei allen Probanden mit dem Risikohaplotyp erhöhte, mit den protektiven Haplotypen erniedrigte Komplementkonzentrationen (Ausnahme: C5a).

3.6 Logistische Regression

Bei einer stufenweise logistischen Regression, welche ausschließlich die genetischen Marker umfasste, ergab sich das beste Modell für eine Risikoabschätzung einer AMD mit den Markern rs2274700 (CFH-Gen), rs547154 (FB-C2) und rs2230199 (C3). Für die daraus resultierende ROC-Kurve ergab sich eine geschätzte Fläche von 0,73 unter der Kurve (AUC).

Für eine logistische Regression, welche ausschließlich die Komplementfaktoren im Plasma erfasste, ergab sich das beste Modell für Ba, C3d und Faktor D. Es resultierte eine ROC-Kurve mit einer geschätzten Fläche unter der Kurve von 0,82.

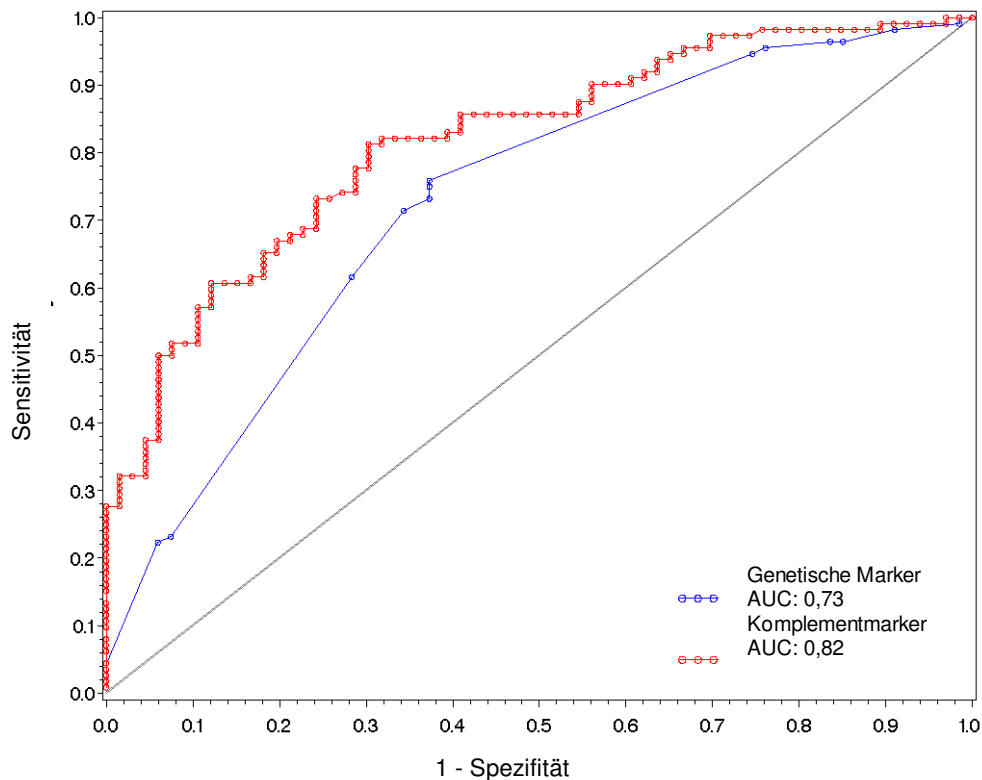


Abbildung 12 - ROC-Kurven für biochemische und genetische Marker - Es ergab sich eine Fläche unter der Kurve von 0,82 für biochemische und 0,73 für genetische Marker.

Wenn sowohl biochemische als auch genetische Faktoren in die logistische Regression mit einbezogen wurden, ergab sich das beste Modell für die Marker rs2274700 (CFH), rs547154 (FB-C2) und rs2230199 (C3), sowie für C5a, C3d und Faktor D. Die ROC-Kurve wies mit einer Fläche von 0,85 die beste Trennschärfe zwischen Probanden mit und ohne AMD in unserer Studienpopulation auf.

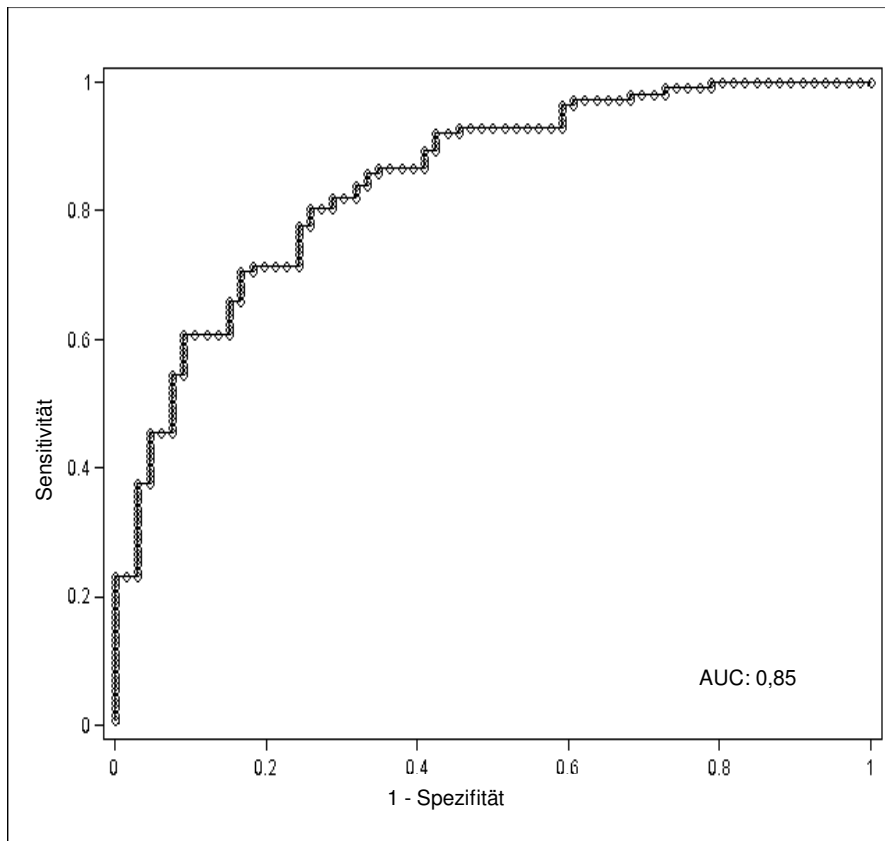


Abbildung 13 - ROC-Kurve beruhend auf genetischen und biochemischen Markern - Es ergab sich eine Fläche unter der Kurve von 0,85.

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Marker für eine systemische Komplementaktivierung bei AMD erhöht sind.

Eine Akkumulation der analysierten Proteine C3a und C5a wird im Plasma unter akuter, massiver Komplementaktivierung beobachtet. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Faktoren Ba und C3d um Marker, welche mit einer Halbwertszeit von mehreren Stunden in vivo für eine chronische Aktivierung stehen (Mollnes et al., 2007).

Die Aussage, dass es eine systemisch erhöhte Komplementaktivierung im alternativen Aktivierungsweg gibt, liegt darin begründet, dass alle in dieser Studie untersuchten Komplementaktivierungsprodukte bei AMD Patienten im Vergleich zu Kontrollen erhöht waren. Besonders ausgeprägt waren diese Resultate bei Ba und C3d, beides Marker für eine chronische Komplementaktivierung. Im Gegensatz dazu ergaben sich für die Komplementproteine C3, C4 und Faktor H keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die erhöhten Werte für die Faktoren B und D können ebenfalls an der verstärkten Komplementaktivierung beteiligt sein, sind aber nicht in der Lage, den verstärkten Umsatz an Substraten des Komplementsystems allein zu erklären.

Vorherige Studien haben bereits gezeigt, dass sich systemisch messbare Biomarker besonders auf lokale Strukturen wie die Makula auswirken können. Im Jahr 2005 zeigten Seddon et al., dass erhöhte Konzentrationen von CRP und Interleukin 6 mit einer Progression der AMD assoziiert sind (Seddon et al., 2005b). Boekhoorn et al. wiesen an Probanden aus der Rotterdam Study nach, dass erhöhte Plasmaspiegel von CRP das Risiko für die Entwicklung einer AMD erhöhen (Boekhoorn et al., 2007). Widersprüchliche Ergebnisse veröffentlichte allerdings die Forschungsgruppe um Klein et al., die keine Assoziation zwischen den Entzündungsmarkern und der Makuladegeneration feststellen konnten (Klein et al., 2005a). Weitere Studien werden nötig sein, um die Frage nach einer systemischen Erhöhung von CRP und Interleukin 6 endgültig zu klären.

Da es bei der AMD zu einer systemisch nachweisbaren Erhöhung von Komplementfaktoren und wahrscheinlich auch anderen Entzündungsmarkern wie CRP und Interleukin 6 kommt, liegt der Schluss nahe, dass es sich um eine systemische Erkrankung handelt. Die Netzhaut und besonders die Makula sind möglicherweise

vulnerabler als andere Körperregionen. Dies wurde bereits bei Mutationen im PRPF3 Gen festgestellt. Es handelt sich dabei um ein ubiquitär vorkommendes Bestandteil des RNA Splicing-Mechanismus, dessen Mutation aber, wie bisherige Untersuchungen zeigen, ausschließlich eine Veränderung der Netzhaut verursacht, nämlich eine Retinitis pigmentosa (Comitato et al., 2007).

Mögliche Ursachen für eine verstärkte Vulnerabilität der Netzhaut und speziell der Makula könnten die pathophysiologischen Einflüsse sein, denen dieser Bereich ausgesetzt ist. Die Makula ist im Laufe des Lebens von anhaltendem oxidativem Stress betroffen. Im Bereich der Netzhaut liegt eine hohe Sauerstoffspannung vor, hinzu kommen hohe Konzentrationen von ungesättigten Fettsäuren und Oxidantien, chronische Lichtexposition und das im Alter zunehmende Lipofuszin, welches zu einer sekundären Photosensibilisierung führt.

Obwohl bei der AMD die gesamte Netzhaut Pathologien aufweist, kommt eine CNV in der Peripherie selten vor. Eine mögliche Ursache für eine erhöhte Vulnerabilität im Bereich der Makula könnte sein, dass ein Abschnitt in der Bruch'schen Membran in dieser Lokalisation signifikant dünner und durchlässiger ist, was besonders ausgeprägt an AMD Spenderaugen gefunden wurde (Chong et al., 2005).

Diese anatomischen und physiologischen Besonderheiten können dazu führen, dass bei einer systemisch messbaren Erhöhung von Entzündungsparametern die Makula häufiger betroffen ist als andere Organe.

4.1 Biochemische Analyse

Da bei der Untersuchung von Drusen als Bestandteile „Human leukocyte antigen“ DR (HLA DR), Immunglobuline und Komplementfaktoren gefunden wurden, lag der Schluss nahe, dass an der AMD-Pathogenese immunologische Prozesse eine Rolle spielen könnten (Anderson et al., 2002; Hageman et al., 2001).

Bei der Analyse von Genen, die für Proteine des Komplementsystems kodieren, konnte ein Polymorphismus im Gen des Komplementfaktors H (CFH) identifiziert werden, der das Risiko, an einer AMD zu erkranken, erhöht (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b).

Die drei verschiedenen Wege des Komplementsystems enden alle in der Aktivierung von Faktor C3.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich für C3a eine signifikante Erhöhung der Plasmakonzentration bei den an AMD erkrankten Probanden ($p=0,03$).

Bereits im Jahr 2007 konnte von Sivaprasad et al. eine erhöhte Konzentration der Plasmakonzentration von C3a des Arg im von Patienten mit AMD im Vergleich zu Kontrollen gefunden werden. Bei dem Molekül C3a des Arg handelt es sich um einen inaktiven Immunmodulator, der durch die Abspaltung von Arginin vom aktiven Molekül C3a durch die Carboxypeptidase N entstanden ist. Allerdings hatte Sivaprasad et al. mit Heparin gemischtes Plasma analysiert, was zu irrtümlich hohen Konzentrationen von Komplementfaktoren führte (Sivaprasad et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde mit EDTA Plasma gearbeitet, um dies zu vermeiden.

Einen weiteren Hinweis für eine bedeutende Rolle des Komplementsystems bei der AMD Pathogenese liefern zwei Studien, welche zeigen, dass eine laserinduzierte chorioidale Neovaskularisation bei Mäusen ausschließlich mit intakten C3- und C3aR/C5aR-Rezeptoren möglich ist (Bora et al., 2005; Nozaki et al., 2006).

Die Bedeutung von systemisch messbaren Faktoren des Immunsystems auf lokale Strukturen wie die Makula oder die glomeruläre Basalmembran wurde bereits in Tiermodellen nachgewiesen.

Pickering et al. hatten 2006 Mäuse untersucht, bei denen das Erbgut dahin gehend verändert worden war, dass sie keinen Komplementfaktor H bilden konnten. Diese Knockout-Mäuse entwickelten in Anwesenheit von C5 spontan eine membranproliferative Glomerulonephritis, die unter Gabe von C5 Antikörpern nicht auftrat (Pickering et al., 2006). Diese Studie zeigt, inwieweit sich eine Veränderung im Komplementsystem auf lokale Strukturen auswirken kann. Wie die Basalmembran der Glomeruli scheint auch die Netzhaut empfindlicher auf systemische Einflüsse zu reagieren als andere Gewebe. Die membranproliferative Glomerulonephritis Typ II geht sowohl mit einer systemischen Komplementaktivierung als auch mit retinalen Ablagerungen, welche Drusen sehr ähnlich sind, einher (Huang et al., 2003).

Die Gruppe um Hollyfield et al. zeigte, dass Mäuse, welche mit an Albumin gebundenen Carboxyethylpyrrolen immunisiert werden, Veränderungen an der Netzhaut entwickeln, die denen einer trockenen AMD ähneln. Bei Carboxyethylpyrrolen (CEP) handelt es sich

um ein Oxidationsprodukt von Docosahexaenoicssäure (DHA), welches gehäuft in Spenderaugen von AMD Patienten vorkommt. DHA findet man in Zellen des retinalen Pigmentepithels und in Photorezeptorzellen, so dass Hollyfield et al. die Docosahexaenoicssäure als mögliche Quelle von CEP im Alterungsprozess sahen. Um die Sensitivität gegen körpereigenes CEP zu erhöhen, immunisierte die Gruppe Mäuse mit an Albumin gebundenem CEP (CEP-MSA). Die gemessenen Antikörpertiter der CEP-MSA immunisierten Mäuse waren 6-8mal höher verglichen mit Kontrollmäusen. Die histologische Untersuchung der Augen von CEP-MSA immunisierten Mäusen zeigte viel mehr Veränderungen im retinalen Pigmentepithel und Zelllyse als bei den Kontrollmäusen. In der Bruch'schen Membran unter dem RPE von CEP-MSA immunisierten Mäusen zeigte sich mit Hilfe von Immunfluoreszenz eine Anhäufung von C3d, die um den Faktor zehn größer war als bei Kontrollmäusen (Hollyfield et al., 2008). Diese Studie weist erneut auf die Bedeutung des Immunsystems in der AMD Pathogenese hin, wobei die Netzhaut erneut vulnerabler als andere Gewebe reagiert. Beim Vergleich der biochemischen Ergebnisse innerhalb der AMD Untergruppen Drusen, CNV und GA zeigte sich eine signifikante Erhöhung von Faktor C3d bei den Patienten mit Drusen im Vergleich zu den Probanden mit CNV und GA. Da es sich bei den Probanden mit Drusen nur um eine kleine Population handelt und die signifikant erhöhten Werte ausschließlich für Faktor C3d gefunden wurden, ist die Aussagekraft und Verwertbarkeit dieses Ergebnisses eingeschränkt. Weitere Studien sind zur Klärung dieses Sachverhalts notwendig.

4.2 Genotypisierung

Ziel der genetischen Datenerhebung war zunächst eine Bestätigung der bereits vorliegenden Daten aus der Literatur (siehe Tabelle 9 - Übersicht der genetischen Studien zur AMD bezüglich der Komplementfaktoren CFH, B, C2 und C3). Um zu überprüfen, ob die in Bonn untersuchten Probanden eine repräsentative Population darstellen, wurden die Ergebnisse der Genetik mit den vorliegenden Daten zu genetischen Markern im CFH-Gen, in BF-C2 und im C3-Gen verglichen (siehe Tabelle

9). Für die bereits vorbeschriebenen Marker konnte in der Tat eine signifikante Assoziation mit der AMD bestätigt werden.

Gen	Variante, Marker	Odds Ratio bezüglich des Risikos einer AMD	p-Wert	Literaturnachweise	Marker aus der Bonner Population
CFH	Y402H (rs1061170),	Siehe Abbildung 14	$<10^{-11}$	(Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b) (Li et al., 2006)	rs1061170 (T/C)
	rs2274700	nicht beschrieben	$<10^{-30}$		rs2274700 (G/A)
	rs1410996		$<10^{-29}$		rs412852 (A/G)
	rs7535263		$<10^{-29}$		rs800292 (G/A)
Komplementfaktoren B und C2	Haplotyp H1	1,32	0,0013	(Gold et al., 2006)	rs641153 (G/A)
	H7 (R32Q, rs641153)	0,45	$<0,0001$		
	H10 (E318D, rs9332739)	0,36	$<0,0001$	(Spencer et al., 2007)	rs547154 G/T
	rs547154	nicht beschrieben	9×10^{-6}		
C3	C3F, rs2230199	2,6 für Homozygote	$p = 5,9 \times 10^{-5}$ (englische Population) $p = 5,0 \times 10^{-5}$ (schottische Population)	(Yates et al., 2007)	rs2230199 G/C

Tabelle 9 - Übersicht der genetischen Studien zur AMD bezüglich der Komplementfaktoren CFH, B, C2 und C3

Die Odds Ratios und p-Werte beziehen sich auf die Angaben aus der Literatur. In der rechten Spalte folgen die Marker, für die sich in der Bonner Population signifikante Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen ergeben haben. Die roten Marker führen zu einem erhöhten, die blauen zu einem erniedrigten Risiko einer AMD. Die unterstrichenen Marker bestätigen die linksstehenden in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse.

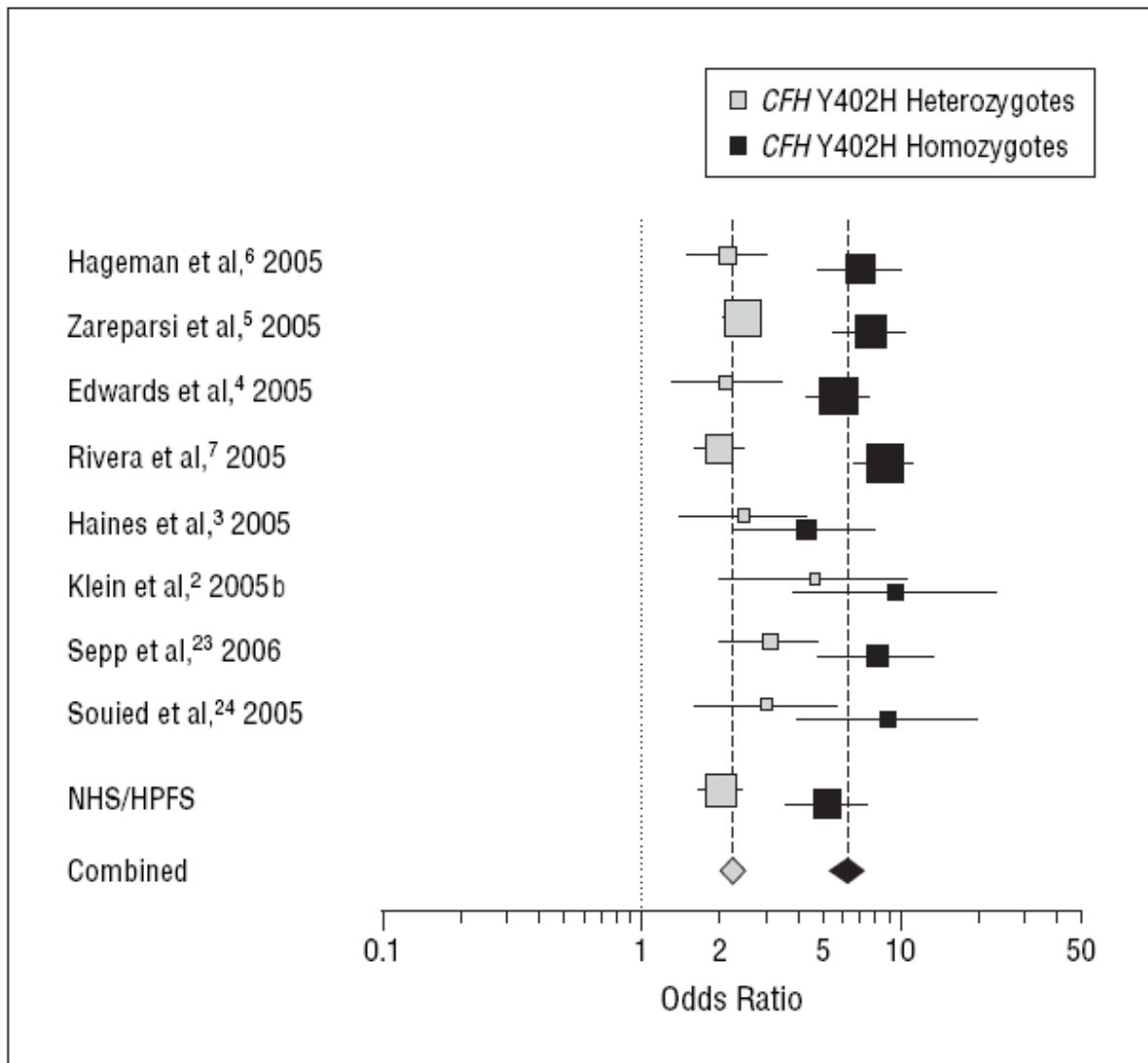


Abbildung 14 - Übersicht über verschiedene Studien zum Y402H Polymorphismus mit Darstellung der Odds ratios (ORs) für Hetero- und Homozygote (Schaumburg et al., 2007) - NHS/HPFS steht für die Nurse`Health Study / Health Professionals Follow-up Study

Dargestellt sind die ORs, die 95% Konfidenzintervalle und die geschätzten ORs für alle Studien zusammen.

Die ORs können in der Mitte der Kästen abgelesen werden, die horizontalen Linien stellen die Konfidenzintervalle dar und die Größe ist proportional zu dem Anteil, welchen die Studie zu der GesamtOR beigetragen hat (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b; Rivera et al., 2005; Sepp et al., 2006; Souied et al., 2005; Zarepari et al., 2005).

Vier der sechs untersuchten SNPs des CFH-Gens wiesen eine signifikante Assoziation mit der AMD auf, wobei sich für die Marker rs800292 und rs2274700 ein protektiver Effekt zeigte, während die Marker rs1061170 und rs412852 mit einem erhöhten Risiko für die AMD assoziiert waren.

Der Y402H Polymorphismus (rs1061170) ist ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung einer AMD. Auf Proteinebene führt die Risikovariante zu einem Austausch von Tyrosin gegen Histidin, wodurch sich die Bindungseigenschaften des Proteins verändern. In welchem Ausmaß dies die Entstehung einer AMD beeinflusst, ist noch nicht bekannt (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b). Im Rahmen dieser Studie konnte die Assoziation zwischen der Y402H-Variante und dem Risiko für die Erkrankung bestätigt werden.

Wie bereits von Yates et al. beschrieben (siehe Tabelle 9), ergab sich auch eine signifikante Assoziation für den Marker rs2230199 im C3-Gen und dem AMD-Risiko. Die Assoziation der SNPs rs547154 und rs641153 Faktor B/C2-Gen mit dem AMD-Risiko konnte ebenfalls bestätigt werden. Diese beiden Marker befinden sich in hohem Kopplungsungleichgewicht und repräsentieren wahrscheinlich dieselbe protektive genetische Variante.

rs9332739	B_M1
rs547154	B_M2
rs4151667	B_M3
rs12614	B_M4
rs641153	B_M5

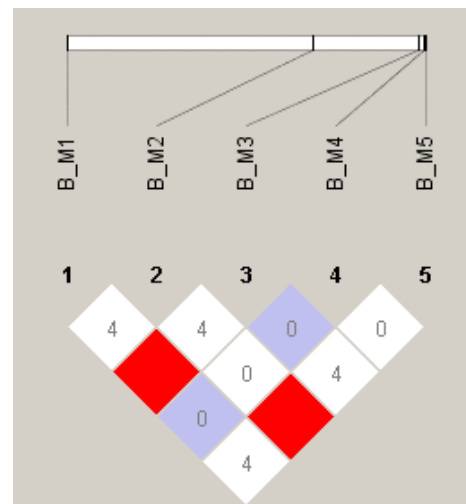


Abbildung 15 - Linkage Disequilibrium der Marker im FB-C2 Gen - Marker 2 und Marker 5 stellen wahrscheinlich dasselbe protektive Signal dar.

4.3 Assoziation zwischen der Proteinkonzentration der Komplementfaktoren und den Genotypen

Sowohl bei den AMD Patienten als auch bei den Kontrollen zeigten sich bei Trägern des Risikohaplotyps im CFH-Gen höhere Plasmakonzentrationen der Proteine des alternativen Aktivierungswegs. Probanden mit den protektiven Haplotypen wiesen eine geringere Plasmakonzentration der Proteine auf.

Eine bereits bekannte systemische Auswirkung von Veränderungen der Gene des Komplementsystems betrifft eine Mutation des Markers rs1061170. Es handelt sich dabei um den Y402H Polymorphismus im CFH-Gen, welcher schon in vorhergehenden Studien beschrieben worden ist (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b). Über diesen Polymorphismus ist bekannt, dass er zu einer Variante des Komplementfaktors H führt, welche weniger stark an C reaktives Protein (CRP), Heparin und RPE Zellen bindet (Clark et al., 2006; Laine et al., 2007; Sjöberg et al., 2007; Skerka et al., 2007). Eine verminderte Bindungskapazität an CRP könnte dazu führen, dass weniger Zelltrümmer beseitigt werden können und es zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion kommt (Laine et al., 2007). Obwohl die Komplementaktivierung systemisch vorkommt, scheint die Netzhaut besonders empfindlich auf eine inadäquate Komplementreaktion zu reagieren.

4.4 Logistische Regression

Bei der stufenweise logistischen Regression zeigte sich, dass sich mit einem Modell, welches ausschließlich auf biochemischen Markern beruhte, eine bessere Aussage bezüglich einer Erkrankung an AMD treffen lässt, als mit einem genetischen Modell, welches sowohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit als auch in vorherigen Studien entwickelt worden ist (Despriet et al., 2007). Die Gene sind der Ausgangspunkt der Proteinbiosynthese, bis zur Bildung eines funktionsfähigen Proteins sind jedoch viele Schritte zwischen geschaltet. Daraus folgt, dass die Komplementfaktoren die Abläufe im Körper direkter beeinflussen als die Gene. Dies könnte eine Erklärung für eine möglicherweise bessere Aussagekraft der ROC Kurven, beruhend auf biochemischen,

im Vergleich zu genetischen Markern sein. Da bei dieser Studie ausschließlich Proteine des alternativen Aktivierungswegs untersucht wurden, kann nicht von einer generellen Überlegenheit der Proteine als biologische Marker ausgegangen werden. Weitere Studien sind nötig, um diese Frage zu klären.

Inwieweit sich mit biochemischen Parametern prädiktive Aussagen bezüglich eines Erkrankungsrisikos treffen lassen, muss in longitudinalen Studien untersucht werden.

4.5 Übersicht der epidemiologischen Daten

Sowohl für die Alters- als auch für die Geschlechterverteilung ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Ursächlich könnte die Tatsache sein, dass als Kontrollpersonen häufig Ehepartner der Erkrankten Probanden genommen wurden. Für die Plasmakonzentration der Komplementfaktoren wurden die bestehenden Unterschiede in der Alters- und Geschlechterverteilung als irrelevant bewertet (Oppermann et al., 1992).

Das Alter ist ein gesicherter Risikofaktor für die Entwicklung einer Makuladegeneration (Evans, 2001). Ein Teil der Kontrollpersonen mit bisher gesunder Makula kann im Laufe der kommenden Jahre noch eine AMD entwickeln, die sich zum momentanen Zeitpunkt noch nicht vorhersagen lässt. In diesem Fall würde sich die Trennschärfe zwischen Fällen und Kontrollen anhand der gemessenen Parameter verschlechtern.

Auch die Geschlechterverteilung ist signifikant verschieden. Während bei den Patienten mit AMD die Frauen überwiegen, gibt es unter den Kontrollen mehr Männer. Die Frage, ob Frauen ein höheres Risiko haben, an einer AMD zu erkranken, ist noch nicht vollständig geklärt. In vielen Studien zeigt sich eine leicht erhöhte Prävalenz bei Frauen, welche möglicherweise durch eine längere Lebensdauer und größeres Gesundheitsbewusstsein beim weiblichen Geschlecht erklärt werden kann (Ambati et al., 2003). Im Rahmen der Beaver Dam Eye Study, der Blue Mountains Eye Study und der Rotterdam Study konnten keine Unterschiede bei den beiden Geschlechtern bezüglich eines erhöhten Risikos für eine AMD festgestellt werden (Smith et al., 2001).

Weitere Studien werden nötig sein, um die Frage nach Geschlechtsunterschieden bei dem Erkrankungsrisiko endgültig zu klären.

Rauchen stellt den einzigen gesicherten exogenen Risikofaktor für die Erkrankung an einer Makuladegeneration dar (Chakravarthy et al., 2007; Mitchell et al., 2002b). Die Konzentration von CFH im Plasma wird durch Rauchen gesenkt. (Esparza-Gordillo et al., 2004). Bei den im Rahmen dieser Studie untersuchten Probanden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Rauchverhalten von AMD Patienten und Kontrollen, so dass nicht von einer artifiziellen Beeinflussung der Ergebnisse ausgegangen werden kann.

4.6 Schlussfolgerungen

Die altersabhängige Makuladegeneration geht mit einer systemisch nachweisbaren Komplementaktivierung einher.

Varianten in Genen des Komplementsystems können zu einer Veränderung der Komplementreaktion im ganzen Körper führen, wobei die Netzhaut besonders empfindlich zu reagieren scheint.

Wenn es sich bei der AMD um eine systemische Erkrankung handelt, ist es möglich, dass auch andere Organe betroffen sind und eine mögliche Assoziation zwischen der Manifestation in anderen Geweben und der AMD bisher nur noch nicht gefunden worden ist.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen systemischer Komplementaktivierung und Ablagerungen im Bereich der Netzhaut wurde bereits bei einer anderen Erkrankung beschrieben, der membranproliferativen Glomerulonephritis Typ II. Bei dieser Erkrankung kommt es sowohl zu einer systemischen Komplementaktivierung als auch zu retinalen Ablagerungen, welche eine große Ähnlichkeit mit Drusen haben (Huang et al., 2003). Therapiert wird die Glomerulonephritis II unter anderem durch die Substitution von intakten Kontrollproteinen des Komplementsystems. Dies bietet eine mögliche Therapieoption bei der AMD für die Zukunft.

Die logistische Regression hat gezeigt, dass mit biochemischen Markern eine ähnliche, wenn nicht sogar bessere Unterscheidung zwischen AMD Patienten und Kontrollen möglich zu sein scheint, als mit genetischen Markern. Die Frage, ob die biochemischen

Marker verlässlich mit dem Risiko für das Auftreten der AMD assoziiert sind, müssen zukünftige, insbesondere longitudinale Studien klären.

5 Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration ist die häufigste Erblindungsursache in den Industrienationen. Kürzlich konnten Polymorphismen in Genen der Komplementfaktoren H, B, C2 und C3 gefunden werden, die mit der Erkrankung assoziiert sind (Edwards et al., 2005; Gold et al., 2006; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005b; Maller et al., 2007; Yates et al., 2007). Dies war Grundlage für die Hypothese, dass bei der AMD eine systemische Komplementaktivierung vorliegen könnte, welche für die Erkrankung prädisponiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher die Blutproben von Patienten mit AMD und Kontrollpersonen zunächst auf die bekannten, mit der AMD assoziierten, genetischen Marker untersucht und außerdem die Konzentrationen der Komplementfaktoren C3, C4, C3d, Ba, C3a, C5a, SC5b-9, B, H und D im Blutplasma auf Proteinebene bestimmt.

Für Marker einer Komplementaktivierung (C3d, Ba, C3a, C5a, SC5b-9) ergaben sich signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen bei Patienten mit AMD im Vergleich zu Kontrollpersonen. Die Faktoren Ba und C3d, welche eine chronische Komplementaktivierung anzeigen, wiesen die deutlichsten Effekte auf ($p < 0,001$).

Im CFH-Gen zeigten sich sowohl zwei signifikant protektive (rs800292 und rs2274700) als auch zwei signifikant mit erhöhtem Risiko assoziierte Marker (rs1061170 und rs412852). Außerdem konnte die Risikovariante (rs2230199) im C3-Gen bestätigt werden. Im CFB-C2-Gen zeigten sich ebenfalls protektive Varianten (rs547154 und rs641153).

Beim Vergleich der biochemischen Marker mit den genetischen ergab sich eine signifikante Assoziation der systemischen Komplementaktivierung mit Polymorphismen im Faktor H-Gen.

Die logistische Regressionsanalyse zeigte, dass ein Modell, welches auf den biochemischen Markern Ba, C3d und Faktor D beruht, eine bessere Trennschärfe zur Unterscheidung zwischen Fällen und Kontrollen aufwies (82%), als ein Modell mit ausschließlich genetischen Markern (73%). Eine im Vergleich zu dem biochemischen Modell nur geringfügig bessere Diskrimination zwischen Gesunden und Kranken ergab sich für das Modell mit biochemischen und genetischen Markern, zusammen (85%).

Die Frage, ob die biochemischen Marker verlässlich mit dem Risiko für das Auftreten der AMD assoziiert sind, muss in zukünftigen, insbesondere longitudinalen Studien geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119: 1417-1436.

Ambati J, Ambati BK, Yoo S, Ianchulev S, Adamis AP. Age-Related Macular Degeneration, Etiology, Pathogenesis, and Therapeutic Strategies. *Surv Ophthalmol.* 2003; 48: 257-293.

Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol.* 2002; 134: 411-431.

Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2000; 45: 115-134.

Becker T, Cichon S, Jönson E, Knapp M. Multiple testing in the context of haplotype analysis revisited: application to case-control data. *Ann Hum Genet.* 2005; 69: 747-756.

Bindewald A, Jorzik JJ, Loesch A, Schutt F, Holz FG. Visualization of retinal pigment epithelial cells in vivo using digital high-resolution confocal scanning laser ophthalmoscopy. *Am J Ophthalmol.* 2004; 137: 556-558.

Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm LH, Coscas G, Davis MD, de Jong PTVM, KLaver CCW, Klein BEK, Klein R, Mitchell P, Sarks JP, Sarks SH, Soubrane G, Taylor HR, Vingerling JR. An International Classification and Grading System for Age-related Maculopathy and Age-related Macular Degeneration. *Surv Ophthalmol.* 1995; 39: 367-374.

Boekhoorn SS, Vingerling JR, Witteman JC, Hofman A, de Jong PTVM. C-reactive protein level and risk of aging macula disorder: The Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 1396-1401.

Bora PS, Sohn JH, Cruz JMC, Jha P, Nishihori H, Wang Y, Kaliappan S, Kaplan HJ, Bora NS. Role of Complement Membrane Attack Complex in Laser-Induced Choroidal Neovascularisation. *J Immunol.* 2005; 174: 491-497.

Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S, ANCHOR Study Group. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006; 355: 1432-1444.

Burk A, Burk R. Checkliste Augenheilkunde. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005

Chakravarthy U, Augood C, Bentham GC, de Jong PTVM, Rahu M, Seland J, Soubrane G, Tomazzoli M, Topouzis F, Vingerling JR, Vioque J, Young IS, Fletcher AE. Cigarette

Smoking and Age-Related Macular Degeneration in the EUREYE Study. *Ophthalmology* 2007; 114: 1157-1163.

Chong NH, Keonin J, Luthert PJ, Frennesson CI, Weingeist DM, Wolf RL, Mullins RF, Hageman GS. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. *Am J Pathol.* 2005; 166: 241-251.

Clark SJ, Higman VA, Mulloy B, Perkins SJ, Lea SM, Sim RB, Day AJ. His-384 allotypic variant of factor H associated with age-related macular degeneration has different heparin binding properties from the non-disease-associated form. *J Biol Chem.* 2006; 281: 24713-24720.

Comitato A, Spampanato C, Chakarova C, Sanges D, Bhattacharya SS, Marigo V. Mutations in splicing factor PRPF3, causing retinal degeneration, form detrimental aggregates in photoreceptor cells. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 1699-1707.

de Jong PTVM, Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ, Hofman A. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol.* 1997; 124: 862-863.

Despriet DD, Klaver CC, van Duijn CC, Janssens AC. Predictive value of multiple genetic testing for age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 1270-1271.

Donoso LA, Kim D, Frost A, Callahan A, Hageman GS. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration. *Surv Ophthalmol.* 2006; 51: 137-152.

Edwards AO, Ritter R 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005; 308: 421-424.

Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almasy L, BJ, Fontcuberta J, Rodríguez de Córdoba S. Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics.* 2004; 56: 77-82.

Eter N, Bindewald A, Roth F, Holz FG. OCT bei altersabhängiger Makuladegeneration. *Ophthalmologe* 2004; 101: 794-803.

Evans J. Risk factors for age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2001; 20: 227-253.

Ferris FL3, Fine SL, Hyman L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol.* 1984; 102: 1640-1642.

Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, Zareparsy S, Swaroop A, Iyengar SK, Klein BE, Klein R, Lee KE, Majewski J, Schultz DW, Klein ML, Seddon JM, Santangelo SL, Weeks DE, Conley YP, Mah TS, Schmidt S, Haines JL, Pericak-Vance MA, Gorin MB, Schulz

HL, Pardi F, Lewis CM, Weber BH. Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 2257-2264.

Friedman DS, O'Colmain BJ, Muñoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PTVM, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J, Eye Diseases Prevalence Research Group. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122: 564-572.

Gass JD. *Stereoscopic Atlas of Macular Diseases: Diagnosis and Treatment.* Oxford: Elsevier LTD, 1998

Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Barile GR, Smith RT, AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman GS, Dean M, Allikmets R. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006; 38: 458-462.

Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM, Smith RJ, Silvestri G, Russell SR, Klaver CC, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 7227-7232.

Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruchs membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2001; 20: 705-732.

Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Nouredine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 2005; 308: 419-421.

Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, Bird AC, Gilbert CE, Spector TD. Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study. *Ophthalmology.* 2002; 109: 730-736.

Heimann H, Kellner U, Foerster MH. *Angiographie-Atlas des Augenhintergrundes.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2004

Hoh J, Ott J. Genetic dissection of diseases: design and methods. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14: 229-232.

Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, Yang X, Shadrach KG, Lu L, Ufret RL, Salomon RG, Perez VL. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med.* 2008; 14: 194-198.

Holz FG, Bellman C, Staudt S, Schütt F, Völcker HE. Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 1051-1056.

Holz FG, Bindewald-Wittich A, Schmitz-Valckenberg S, Eter N, Scholl HPN. Neue Entwicklungen in der Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration. *Deutsches Ärzteblatt* 2006; 103: 482-487.

Holz FG, Pauleikhoff D, Spaide RF, Bird AC. Die altersabhängige Makuladegeneration. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2004

Holz FG, Wolfensberger TJ, Piguet B, Gross-Jendroska M, Wells JA, Minassian DC, Chisholm IH, Bird AC. Bilateral macular drusen in age-related macular degeneration. Prognosis and risk factors. *Ophthalmology.* 1994; 101: 1522-1528.

Huang SJ, Costa DL, Gross NE, Yannuzzi LA. Peripheral drusen in membranoproliferative glomerulonephritis type II. *Retina.* 2003; 23: 429-431.

Hyman LG, Lilienfeld AM, Ferris F.L.3rd, Fine SL. Senile macular degeneration: a case-control study. *Am J Epidemiol.* 1983; 118: 213-227.

Klaver CC, Assink JJ, van Leeuwen R, Wolfs RC, Vingerling JR, Stijnen T, Hofman A, de Jong PTVM. Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 2237-2241.

Klaver CC, Wolfs RC, Assink JJ, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PTVM. Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116: 1646-1651.

Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Wong TY, Shankar A, Tsai MY. Systemic markers of inflammation, endothelial dysfunction, and age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol.* 2005a; 140: 35-44.

Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology.* 2002; 109: 1767-1779.

Klein R, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris F.L., Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005b; 308: 385-389.

Laine M, Jarva H, Seitsonen S, Haapasalo K, Lehtinen MJ, Lindeman N, Anderson DH, Johnson PT, Järvelä I, Jokiranta TS, Hageman GS, Immonen I, Meri S. Y402H polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein. *J Immunol.* 2007; 178: 3831-3836.

Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham K, Khanna R, Wade M, Li Y, Liang L, Zareparsis S, Swaroop A, Abecasis G. CFH haplotypes without the Y402H coding variant

show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006; 38: 1049-1054.

Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, Neale BM, Daly MJ, Seddon JM. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2007; 39: 1200-1201.

Meyers S. A twin study on age-related macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1994; 92: 775-843.

Mitchell J, Bradley C. Quality of life in age-related macular degeneration: a review of the literature. *Health Qual Life Outcomes.* 2006; 4: 97.

Mitchell P, Wang JJ, Foran S, Smith W. Five-year incidence of age-related maculopathy lesions: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology.* 2002a; 109: 1092-1097.

Mitchell P, Wang JJ, Smith W, Leeder SR. Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 2002b; 120: 1357-1363.

Mollnes TE, Jokiranta TS, Truedsson L, Nilsson B, Rodriguez de Cordoba S, Kirschfink M. Complement analysis in the 21st century. *Mol Immunol.* 2007; 44: 3838-3849.

Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J.* 2000; 14: 835-846.

Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Labris D, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 2328-2333.

Oppermann M, Baumgarten H, Brandt E, Gottsleben W, Kurts C, Götze O. Quantitation of components of the alternative pathway of complement (APC) by enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods.* 1990; 133: 181-190.

Oppermann M, Höpken U, Götze O. Assessment of complement activation in vivo. *Immunopharmacology.* 1992; 24: 119-134.

Oppermann M, Kurts C, Zierz R, Quentin E, Weber MH, Götze O. Elevated plasma levels of the immunosuppressive complement fragment Ba in renal failure. *Kidney Int.* 1991a; 40: 939-947.

Oppermann M, Schulze M, Götze O. A sensitive enzyme immunoassay for the quantitation of human C5a/C5a(desArg) anaphylatoxin using a monoclonal antibody with specificity for a neoepitope. *Complement Inflamm.* 1991b; 8: 13-24.

Pickering MC, Warren J, Rose KL, Carlucci F, Wang Y, Walport MJ, Cook HT, Botto M. Prevention of C5 activation ameliorates spontaneous and experimental

glomerulonephritis in factor H-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 9649-9654.

Rager G, van der Zypen E. Benninghoff, Anatomie. Makroskopische, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 2. München-Wien-Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1994

Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, Weber BH. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet.* 2005; 14: 3227-3236.

Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY, MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006; 355: 1419-1431.

Sachs L, Hedderich J. *Angewandte Statistik, Methodensammlung mit R.* Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2006

Schaumberg DA, Hankinson SE, Guo Q, Rimm E, Hunter DJ. A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 55-62.

Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, Bird AC, Spaide RF. Fundus autofluorescence imaging: review and perspectives. *Retina.* 2008; 28: 385-409.

Scholl HPN, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, Fritsche L, Chong NV, Fimmers R, Wienker T, Holz FG, Weber BH, Oppermann M. Systemic Complement Activation in Age-Related Macular Degeneration. *PLoS ONE* 2008; 3: e2593.

Scholl HPN, Fleckenstein M, Charbel Issa P, Keilhauer C, Holz FG, Weber BH. An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2007; 13: 196-205.

Scholl HPN, Weber BHF, Nöthen MM, Wienker T, Holz FG. Y402H-Polymorphismus im Komplementfaktor H und altersabhängige Makuladegeneration (AMD). *Ophthalmologie* 2005; 102: 1029-1035.

Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol.* 1997; 123: 199-206.

Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol.* 2005a; 123: 321-327.

Seddon JM, George S, Rosner B, Rifai N. Progression of age-related macular degeneration: prospective assessment of C-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers. *Arch Ophthalmol.* 2005b; 123: 774-782.

Sepp T, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Moore AT, Bird AC, Yates JR. Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 536-540.

Sivaprasad S, Adewoyin T, Bailey TA, Dandekar SS, Jenkins S, Webster AR, Chong NV. Estimation of systemic complement C3 activity in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125: 515-519.

Sjöberg AP, Trouw LA, Clark SJ, Sjölander J, Heinegård D, Sim RB, Day AJ, Blom AM. The factor H variant associated with age-related macular degeneration (His-384) and the non-disease-associated form bind differentially to C-reactive protein, fibromodulin, DNA, and necrotic cells. *J Biol Chem.* 2007; 282: 10894-10900.

Skerka C, Lauer N, Weinberger AA, Keilhauer CN, Sühnel J, Smith R, Schlötzer-Schrehardt U, Fritsche L, Heinen S, Hartmann A, Weber BH, Zipfel PF. Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration. *Mol Immunol.* 2007; 44: 3398-3406.

Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ, de Jong PTVM. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology.* 2001; 108: 697-704.

Souied EH, Leveziel N, Richard F, Dragon-Durey MA, Coscas G, Soubrane G, Benlian P, Fremeaux-Bacchi V. Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population. *Mol Vis.* 2005; 11: 1135-1140.

Spencer KL, Hauser MA, Olson LM, Schmidt S, Scott WK, Gallins P, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA, Haines JL. Protective effect of complement factor B and complement component 2 variants in age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet.* 2007; 16: 1986-1992.

Tomany SC, Wang JJ, van Leeuwen R, Klein R, Mitchell P, Vingerling JR, Klein BEK, Smith W, de Jong PTVM. Risk factors for incident age-related macular degeneration Pooled findings from 3 continents. *Ophthalmology* 2004; 111: 1280-1287.

Vingerling JR, Dielemans I, Hofman A, Grobbee DE, Hancox S, Hijmering M, Kramer C, de Jong PTVM. The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology.* 1995; 102: 205-210.

Walport MJ. Complement. First of Two Parts. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1058-1066.

Williams RA, Brody BL, Thomas RG, Kaplan RM, Brown SI. The psychosocial impact of macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116: 514-520.

Würzner R, Schulze M, Happe L, Franzke A, Bieber FA, Oppermann M, Götze O. Inhibition of terminal complement complex formation and cell lysis by monoclonal antibodies. *Complement Inflamm.* 1991; 8: 328-340.

Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrecht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT, Genetic Factors in AMD Study Group. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2007; 357: 553-561.

Zarepari S, Branham KE, Li M, Shah S, Klein RJ, Ott J, Hoh J, Abecasis GR, Swaroop A. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 149-153.