

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen

Immunhistochemie von Komplement-Faktoren
an humanen Spender-Netzhäuten mit AMD

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Andrea Luise Martina Schindler
aus Dortmund

promoviert am 27. Juli 2021

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G.R. Fink

1. Gutachtern: Privatdozent Dr. med. M. Hermann

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. T. Langmann

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Privatdozent Dr. Manuel Hermann

MTA Martina Becker

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM24/2011) der Universität gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 13.8.2019

Unterschrift: _____

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Privatdozent Dr. Manuel Hermann und der medizinisch-technischen Assistentin Frau Martina Becker von mir selbst ausgeführt worden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Epidemiologie und Bedeutung der AMD	8
1.2	Stadien und Klassifikation der AMD	10
1.2.1	Frühform und Spätform der AMD	10
1.2.2	Spätform – atrophische und neovaskuläre AMD	12
1.2.3	Klassifikationen	15
1.3	Diagnostik und Therapie	16
1.4	Ätiologie	18
1.5	Komplementsystem.....	23
1.5.1	Kategorisierung und Funktion des Komplementsystems	23
1.5.2	Aktivierung des Komplementsystems	24
1.6	Komplementsystem und AMD	29
1.7	Fragestellung – Zielsetzung und Arbeitshypothese	33
1.7.1	Ausgangssituation	33
1.7.2	Zielsetzung	34
1.7.3	Arbeitshypothese.....	35
2	Material und Methoden	37
2.1	Übersicht	37
2.2	Spendermaterial und Aufarbeitung	38
2.3	Klassifikation	40
2.4	Immunhistochemie und Entwicklung	43
2.4.1	Visualisierung	43
2.4.2	Bindungen und verwendete Antikörper	44

2.4.3	Färbemethode – Hämalaun Kernfärbung.....	45
2.5	Auswertung	48
2.6	Statistische Auswertung.....	51
3	Ergebnisse	54
3.1	Übersicht	54
3.2	Klassifikation	54
3.2.1	Statistik zur Stichprobe: AMD in der Frühform	55
3.2.2	Statistik zur Stichprobe: AMD in der Spätform	56
3.2.3	Statistik zur Stichprobe: Geschlecht, Alter und Postmortemzeit.....	57
3.2.4	Statistik zur Stichprobe – Homogenität und Korrelation von Variablen	60
3.3	Immunhistochemie und Entwicklung	62
3.3.1	Immunhistochemische Anfärbungen in Bezug auf die drei Antikörper	62
3.3.2	Unterschiede der Anfärbungen in Bezug auf das Krankheitsstadium: H-Test von Kruskal und Wallis	65
3.3.3	Nichtparametrische Tests	67
3.3.3.1	Mann-Whitney-Test.....	67
3.3.3.2	Deskriptive Auswertung	67
3.3.3.3	Unterschiede der Anfärbung der Choriokapillarwände nach dem Krankheitsstadium	70
3.3.3.4	Beobachtungen der Drusen beim Antikörper gegen MAC.....	72
3.3.3.5	Kruskal-Wallis-Test für Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen betreffend MAC	73
3.3.3.6	Beobachtungen der Anfärbung der Drusen beim Antikörper gegen CFI	80
3.3.3.7	Kruskal-Wallis-Test für Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen betreffend CFI	81
3.4	Auswertung	81

3.4.1	Zusammenfassung der statistischen Auswertung	81
3.4.2	Auswertung der Anfärbung des Antikörpers gegen CD88/C5aR.....	82
3.4.3	Auswertung der Anfärbung des MAC	83
3.4.4	Auswertung der Anfärbung des Antikörpers gegen CFI	83
4	Diskussion	84
4.1	Zusammenfassung weiterer Erkenntnisse	91
4.2	Limitationen der Methodik	95
5	Zusammenfassung	98
6	Literaturverzeichnis	100
7	Lebenslauf	112

Abkürzungsverzeichnis

A2E	<i>N-retinylidene-N-retinylethanolamine</i>	CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
AEC	<i>Aminoethyl carbacole</i>	DAF	<i>Decay acceleration factor</i>
AGEs	<i>Advanced-glycation-endproducts</i>	ERG	<i>Elektroretinografie</i>
AMD	<i>Altersbedingte Makuladegeneration</i>	FB	<i>Faktor B</i>
C1	<i>Komplementfaktor 1</i>	GA	<i>Geographische Atrophie</i>
C2	<i>Komplementfaktor 2</i>	GWAS	<i>Genomweite Assoziationsstudien</i>
C3	<i>Komplementfaktor 3</i>	HE	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>
C3aR	<i>C3a-Rezeptor</i>	HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
C4	<i>Komplementfaktor 4</i>	ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
C5	<i>Komplementfaktor 5</i>	IgG	<i>Immunglobulin G</i>
C5aR	<i>C5a-Rezeptor</i>	IgM	<i>Immunglobulin M</i>
C6	<i>Komplementfaktor 6</i>	MAC/C5b-9	<i>Membranangriffskomplex</i>
C7	<i>Komplementfaktor 7</i>	MCP	<i>Membrane cofactor protein</i>
C8	<i>Komplementfaktor 8</i>	MTA	<i>Medizin Technische Assistentin</i>
C9	<i>Komplementfaktor 9</i>	OCT	<i>Optische Kohärenz-Tomografie</i>
CFD	<i>Komplementfaktor D</i>	Pas	<i>Periodic acid-Schiff reaction</i>
CFH	<i>Komplementfaktor H</i>	PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
CFI	<i>Komplementfaktor I</i>	PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
CNV	<i>Choroidale Neovaskularisationsmembran</i>	RPE	<i>Retinale Pigmentepithel</i>
CR1	<i>Komplement Rezeptor 1</i>	SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
		VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit soll die Immunhistochemie von Komplement-Faktoren an humanen Spender-Netzhäuten mit altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) untersucht werden. Im Rahmen der Einleitung gehe ich zunächst auf die Epidemiologie und Bedeutung, Stadien und Klassifikation, Diagnostik und Therapie, Ätiologie sowie das Komplementsystem ein. Zudem erläutere ich die zu untersuchende Fragestellung.

1.1 Epidemiologie und Bedeutung der AMD

Die AMD ist eine Erkrankung der Makula bei über 55-Jährigen (Patzelt, 2009: 61). Klinisch kommt es zu einer irreversiblen Störung der zentralen Sehschärfe (Patzelt, 2009: 61).

Morphologisch kommt es zu einer progressiven Degeneration der Photorezeptoren (Sachsenweger, 2003: 273), zur Ansammlung von Lipofuszingranula in den Pigmentepithelzellen und zu hyalinen Ablagerungen (Drusen) in der Bruch-Membran (Burk & Burk, 2014: 303).

Für den Erkrankten ergeben sich durch die Erkrankung an der AMD Einschränkungen in der Bewältigung des täglichen Lebens (Weber et al., 2014: 133). Die Erkrankten haben in den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung Probleme u.a. beim Lesen und Erkennen von Gesichtern (Weber et al., 2014: 133).

A

B



C**D**

Abbildung 1: Sehempfinden eines AMD-Erkrankten mit der Zeit: (A) keine Sehbeeinträchtigung; (B), (C) beginnende AMD; (D) weiter fortgeschrittene AMD ("Simulieren von Augenerkrankungen und Sehbehinderungen-Makuladegeneration,").

Das Risiko an einer Depression zu erkranken ist doppelt so hoch wie bei gesunden Gleichaltrigen (Mitchell & Bradley, 2006: 97).

Die höchste Inzidenz findet sich unter der hellhäutigen Bevölkerung (Weber et al., 2014: 133).

In Europa, den USA und Australien stellt die AMD die häufigste Ursache für den Verlust der zentralen Sehschärfe dar (Khandhadia, Cipriani, Yates, & Lotery, 2012: 128).

In Europa haben 1,6 % der über 65-Jährigen und mehr als 13 % der über 85-Jährigen eine der beiden visusrelevanten Spätformen der AMD (Smith et al., 2001: 697).

In Deutschland leiden laut des Weißbuchs zur Situation der ophthalmologischen Versorgung 2.610.000 Personen an einer AMD im Frühstadium und 1.608.000 Personen an einer späten AMD (Christian Wolfram & Pfeiffer, 2012: 27). 2030 werden laut dieser schätzungsweise 3.433.000 eine frühe AMD und 2.131.000 eine späte AMD haben (Wolfram, 2012: 27). Prozentual ist die AMD in Deutschland für geschätzte 50 % aller schweren Sehbehinderungen verantwortlich, gefolgt vom Glaukom mit 15 % und der diabetischen Retinopathie mit 10 % (Finger, Fimmers, Holz, & Scholl, 2011: 4381). Der Anteil der AMD an allen schweren Sehbehinderungen wird voraussichtlich aufgrund des demographischen Wandels bis 2030 auf eine Inzidenz von 57 % ansteigen (Finger et al., 2011: 4381).

1.2 Stadien und Klassifikation der AMD

Im Rahmen der vereinfachten Unterteilung unterscheidet man die frühe AMD von der späten AMD (Andrea Gamulescu, 2009: 26). Die späte AMD lässt sich wiederum in die atrophische (geographische, trockene) und neovaskuläre (exsudative, feuchte) Form unterteilen (Andrea Gamulescu, 2009: 26). Unter der neovaskulären Form werden die choroidale Neovaskularisationsmembran (CNV), Pigmentepithelabhebung, retinale angiomatöse Proliferation, polypoidale choroidale Vaskulopathie und die disziforme Narbe subsumiert (Andrea Gamulescu, 2009: 26).

1.2.1 Frühform und Spätform der AMD

Die Frühform der AMD ist insgesamt häufiger (Gamulescu, 2013: 28). Die AMD in ihrer Frühform geht nur zu einem geringen Anteil in eine AMD in der Spätform über (Gamulescu, 2013: 28).

85 % der späten AMD sind der atrophischen Form zuzurechnen ("Die trockene AMD,"). Wohingegen die neovaskuläre Form 15 % der späten AMD ausmacht ("Die trockene AMD,").

Die beiden Spätformen sind laut Ho et al. als zwei Phänotypen der gleichen Krankheit anzusehen (Ho, van Leeuwen, de Jong, Vingerling, & Klaver, 2011). Sie können ineinander übergehen, vgl. (Ho et al., 2011).

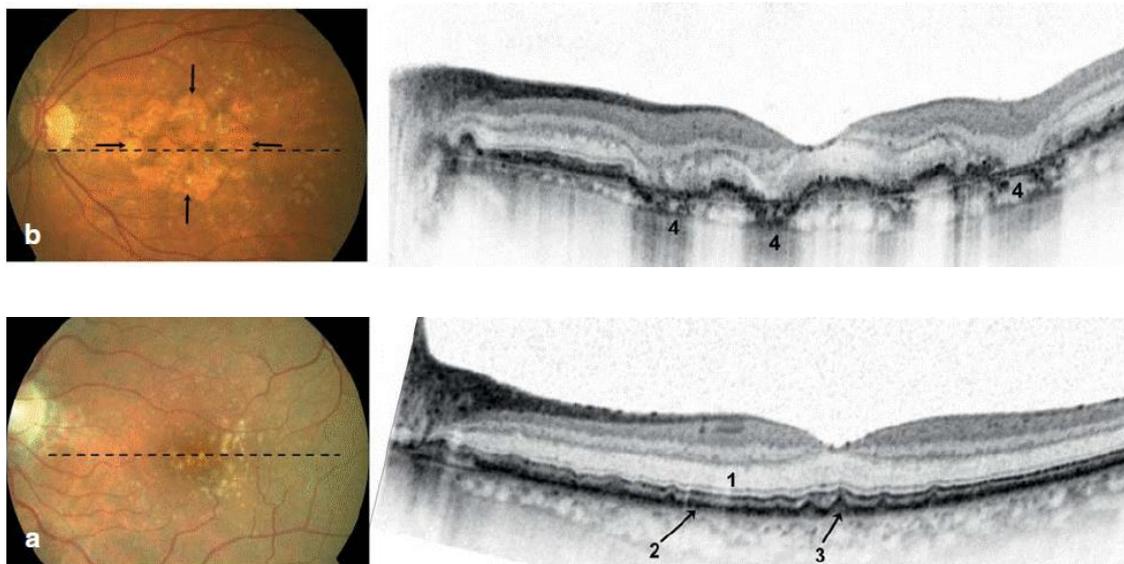
Dieser Übergang kann auch durch eine Behandlung mit VEGF Inhibitoren im Rahmen einer neovaskulären AMD induziert werden (Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research et al., 2012: 1395).

Die beiden Spätformen können auch zusammen auftreten, so dass neovaskuläre Läsionen in der Peripherie von Augen mit atrophischer AMD vorkommen können (Sunness et al., 1999). In der Regel sind die Patienten, bei denen sich eine geographische Atrophie manifestiert, älter als diejenigen Patienten mit einer neovaskulären Form (F. G. Holz, Pauleikhoff, Klein, & Bird, 2004). Es kann ein einseitiger oder beidseitiger Befall der Augen vorliegen (Ho et al., 2011). Bei einer späten AMD des einen Auges beliefen sich Schätzungen zum 5-Jahres-Risiko zur Entwicklung einer AMD des Partnerauges auf 30 bis 40 % (Ho et al., 2011). Ein grobes Orientieren im Raum bleibt dem Patienten durch

das periphere Sehen bei beiden Spätformen meist möglich, jedoch kann der Patient in der Regel nicht mehr scharf sehen.

Klinisch ist die frühe AMD Form oft asymptomatisch. Sie ist durch den Nachweis von Drusen und pigmentalen Unregelmäßigkeiten in der Retina nachweisbar (Kawa, Machalinska, Roginska, & Machalinski, 2014). Die Unregelmäßigkeiten kommen durch Verklumpungen oder Defekte des RPE zustande (Gamulescu, 2013). Sie imponieren als Hyper- oder Hypopigmentierungen (Gamulescu, 2013).

Drusen sind die erste nachweisbare klinische pathologische Veränderung, die funduskopisch festgestellt werden kann (Kawa et al., 2014). Auch bei Gesunden über 50-Jährigen können Drusen gefunden werden (Kawa et al., 2014). Diese sind jedoch kleiner als bei Erkrankten (Kawa et al., 2014). Man findet Drusen schätzungsweise bei 15-30% der über 65-Jährigen ophthalmologisch Untersuchten (Lommatzsch, Wasmuth, Pauleikhoff, Holz, & Bird, 2011). Drusen sind nicht pathognomisch für eine frühe AMD, sondern können differentialdiagnostisch u.a. bei der Membrano-proliferativen Glomerulonephritis Typ 2, bei der Sklerodermie und dem Sorsby-Syndrom vorkommen (Burk & Burk, 2014: 307).



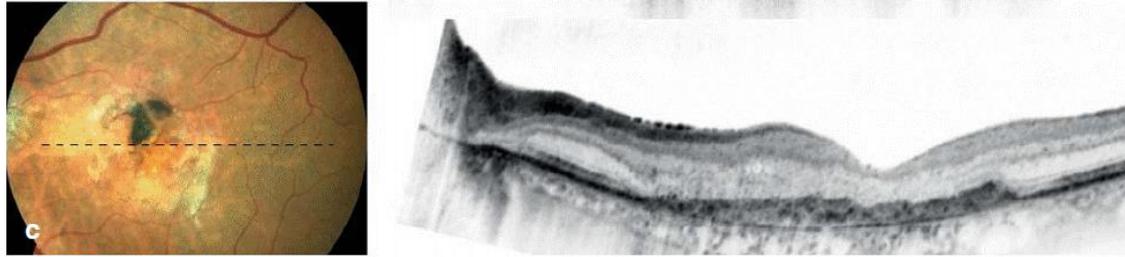


Abbildung 2: Fundusaufnahmen (links) und optische Kohärenztomographie (OCT) (rechts) der (a) frühen und (b), (c) späten AMD (b): geografische Atrophie und (c): vernarbte choroidale Neovaskularisation. Die gestrichelte Linie markiert die Position des OCT-Schnittes. 1=Photorezeptorschicht; 2=retinales Pigmentepithel (RPE). (a) Die Fundusaufnahme zeigt am Augenhintergrund multiple Drusen als typische Manifestation der trockenen AMD im Frühstadium. In der OCT-Untersuchung sind Drusen als Ablagerungen unter dem RPE zu sehen (=3). (b) Durch Pfeile markiert ist zentral ein Bereich scharf begrenzter Atrophien zu erkennen. Das RPE und die Photorezeptorschicht sind hier atrophisch, was sich in der OCT-Untersuchung entsprechend darstellt (=4). Mit Ausbildung solcher Atrophien geht an entsprechender Stelle ein kompletter Funktionsverlust einher. (c) Endstadium einer neovaskulären AMD ist die subretinale Vernarbung, in deren Bereich sich eine Degeneration von Photorezeptoren, Pigmentepithel und Choroidea ausgebildet. In den Narbenbereichen ist keine retinale Funktion mehr erhalten (Kawa et al., 2014).

1.2.2 Spätform – atrophische und neovaskuläre AMD

Die atrophische AMD ist durch eine Atrophie des RPE und der Photorezeptoren sowie einer Konstriktion der choroidalen Blutgefäße gekennzeichnet (Ambati, Ambati, Yoo, Ianchulev, & Adamis, 2003: 259). Drusen können auch bei der atrophischen AMD vorkommen (Gamulescu, 2013: 32), verschwinden jedoch im Verlauf der Erkrankung regelmäßig (Sarks, Van Driel, Maxwell, & Killingsworth, 1980).

Die Atrophie beginnt meistens in der perifovealen Region und dehnt sich im Verlauf der Erkrankung aus, vgl. (Fleckenstein, Schmitz-Valckenberg, Sunness, & Holz, 2011).

Klinisch zeigt sich eine im Verlauf zunehmende Sehinderung mit zunächst auftretenden Leseschwierigkeiten oder vermindertem Kontrastsehen (Gamulescu, 2013: 32). Bei Befall der Fovea kommt es zu einer starken Visusminderung (Gamulescu, 2013: 32).

Im Gegensatz zur neovaskulären AMD, die hauptsächlich für den schweren Sehverlust verantwortlich ist, sind nur 20 % der „Blindheit im Sinne des Gesetzes“ durch die trockene AMD bedingt, vgl. (Fleckenstein et al., 2011). Funduskopisch imponiert die atrophische AMD als Atrophie mit demarkierten, depigmentierten Arealen (Fleckenstein et al., 2011).

Unter der feuchten AMD werden die choroidale Neovaskularisationsmembran (CNV), die retinale Pigmentepithelabhebung, die retinale angiomatöse Proliferation, die polypoidale choroidale Vaskulopathie und die disziforme Narbe zusammengefasst (Gamulescu, 2013: 28). Die retinale Pigmentepithelabhebung ist gesondert zu betrachten (Gamulescu, 2013: 28). Die disziforme Narbe, die auch Junius-Kuhnt-Makulopathie genannt wird, ist das Endstadium der neovaskulären AMD (Gamulescu, 2013: 28). Die retinale angiomatöse Proliferation und die polypoidale choroidale Vaskulopathie sind Sonderformen der neovaskulären AMD (Burk & Burk, 2014: 304). Gekennzeichnet ist die neovaskuläre AMD durch die Invasion von abnormalen, brüchigen Blutgefäßen (Ambati, Atkinson, & Gelfand, 2013: 440). Typischerweise kommt es bei der neovaskulären AMD zu Blutungen und Ödemen (Gamulescu, 2013).

Die neovaskuläre Form lässt sich zum groben Verständnis in drei Stadien unterteilen (Herrmann, Holz, & Charbel Issa, 2013: 385). In Stadium 1 proliferieren die Endothelzellen und durchbrechen die Bruch-Membran (Herrmann et al., 2013: 385). Im Stadium 2 kommt es zu Symptomen durch die Neubildung von Gefäßen bzw. deren Leckage und Blutungen (Herrmann et al., 2013: 385). Die neugebildeten Gefäße bluten aufgrund des schlechten Wandaufbaus leicht (Grehn, 2012: 256). Das Stadium 3 ist durch eine Fibrose bzw. die Bildung einer disziformen Narbe (Herrmann et al., 2013: 385) gekennzeichnet. In diesem dritten Stadium ist das Auge zumeist „erblindet“, d.h. der Visus ist $\leq 1/50$ (Grehn, 2012: 257).

Klinisch zeigt sich die neovaskuläre Form bei den Patienten durch Auftreten von Metamorphopsien (Verzerrt sehen) bei gleichzeitiger Abnahme der Sehschärfe (Sachsenweger, 2003: 275).

Die Metamorphopsien kommen durch Ödeme der Netzhaut zustande und die mögliche plötzliche Sehverschlechterung wird entweder durch die Neovaskularisation an sich ausgelöst oder durch eine zentrale Einblutung (Grehn, 2012: 256). Funduskopisch zeigt sich eine Vorwölbung im Bereich der Makula (Grehn, 2012: 256).

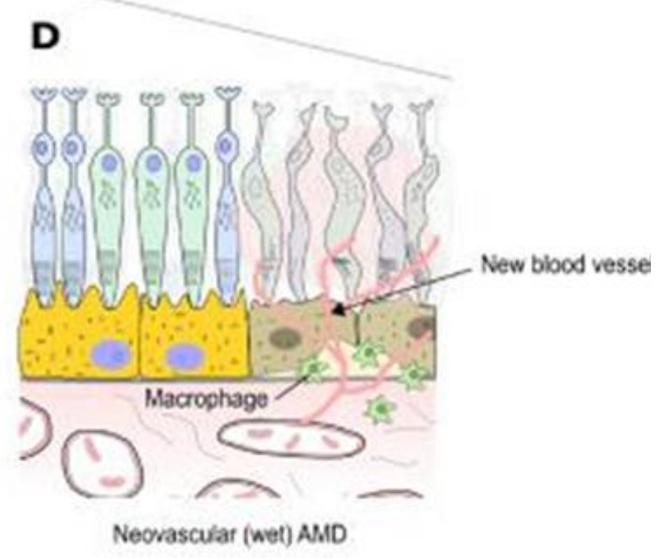
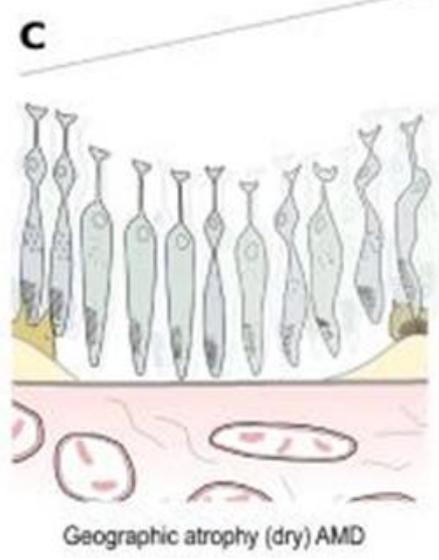
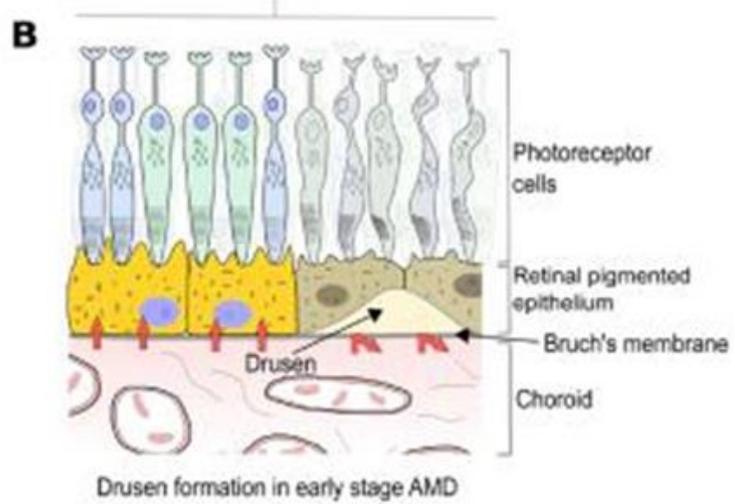
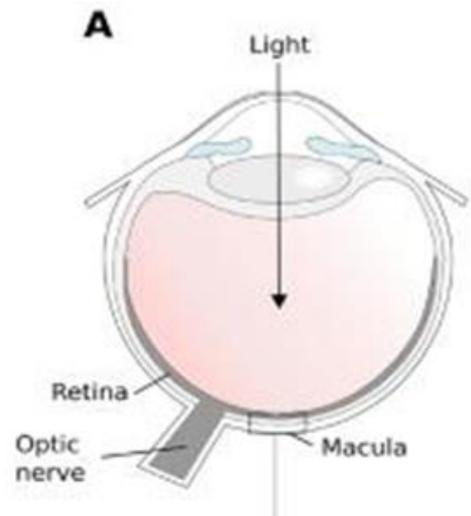


Abbildung 3: Schnittdiagramm der menschlichen Netzhaut (A) zeigt die Lokalisierung der Retina und Makula im Bulbus. (B) In der frühen AMD akkumulieren sich Drusen. (C) zeigt einen kompletten Verlust des RPE und Photorezeptorneurodegeneration. (D) Neovaskuläre oder „feuchte“ AMD ist gekennzeichnet durch die Invasion abnormaler, brüchiger Blutgefäße und Makrophagen in die Retina, die letztendlich zur Photorezeptordegeneration führt (Schramm et al., 2014).

1.2.3 Klassifikationen

Klassifikationssysteme			
Stadien	Klinische Klassifikation nach Ferris et al.	Klinische Klassifikation von Klein et al.	
Keine Veränderungen	nicht sichtbare Drusen oder keine Pigmentanomalien	nicht vorhandene, fragliche oder mittelgroße Drusen ($\leq 125\mu\text{m}$) und keinen Pigmentanomalien (definiert als vergrößertes Pigmentepithel oder RPE-Depigmentierung)	
Normale Altersveränderungen	kleine Drusen ($< 63\mu\text{m}$) ohne Pigmentanomalien		
Frühe AMD	mittelgroße Drusen (> 63 und $< 125\mu\text{m}$), aber ohne Pigmentanomalien	Frühe Milde AMD	kleine und mittelgroße Drusen ($\leq 125\mu\text{m}$) mit irgendeiner Pigmentanomalie oder große Drusen $\geq 125\mu\text{m}$ mit einem Drusengebiet von $\leq 331,820\mu\text{m}^2$ und keinen Pigmentanomalien
		moderate frühe AMD	Große Drusen mit einem Drusengebiet von $\leq 331,820\mu\text{m}^2$ und irgendeiner Pigmentanomalie oder große Drusen mit einem Drusengebiet mit $\geq 331,820\mu\text{m}^2$ ohne vergrößertem RPE und ohne RPE-Depigmentierung
		schwere frühe AMD	bei großen Drusen mit einem Drusengebiet mit $\geq 331,820\mu\text{m}^2$ und RPE-Depigmentierung und mit oder ohne vergrößertem RPE
Intermediäre AMD	große Drusen oder Pigmentanomalien plus mittelgroßen Drusen		
Späte AMD	atrophische oder neovaskuläre Makuladegenerationen	geographische Atrophie	bei einem betroffenen Gebiet von $\geq 350\mu\text{m}$ Durchmesser oder zumindest 2 der folgenden Bedingungen: scharfe Umrandung, Fehlen von RPE, sichtbare choroidale Gefäße
		exsudative / neovaskuläre Form	Vorhandensein eines der folgenden Tatsachen: Ablösung des RPE und/oder retinaler Ablösung, subretinaler

			Hämorrhagien, subretinaler Narbe, subretinaler neuer Blutgefäße
Bemerkung	Dieses Klassifikationssystem umfasst nur Personen über 55 Jahre. Als AMD Pigmentanomalien werden Hyper- oder Hypopigmentierungen bezeichnet, die assoziiert zu mittleren oder großen Drusen vorkommen, jedoch dürfen diese nicht im Rahmen von einer anderen Erkrankung erklärbar sein.		

Tabelle 1: Übersicht der beiden neuesten funduskopisch orientierten Klassifikationssysteme von Ferris et al. von 2013 und Klein et al. von 2014 (Ferris et al., 2013: 849) (Klein et al., 2014).

1.3 Diagnostik und Therapie

Zunächst wird beim Patienten mit Verdacht auf AMD die Anamnese erhoben, die Sehschärfe bestimmt, eine Spaltlampenuntersuchung des vorderen und mittleren Augenabschnitts durchgeführt sowie die Makula mit einer 78- bzw. 90-dpt-Lupe oder einem Kontaktglas untersucht.

In der Anamnese wird oft eine Sehverschlechterung angegeben (Burk & Burk, 2014: 303). Zusätzlich können Metamorphopsien (das bedeutet verzerrtes Sehen) bei der neovaskulären Form angegeben werden (Burk & Burk, 2014: 303).

Diagnostisch weiterführend kann der Amsler-Test, die Fundusfotografie, die optische Kohärenz-Tomografie (OCT), die Fluoreszenzangiographie, die Indozyanin-Grünangiographie, das multifokale ERG und eine fundusorientierte Perimetrie notwendig sein. Der Amsler-Test ist zum Erkennen von Metamorphopsien geeignet.

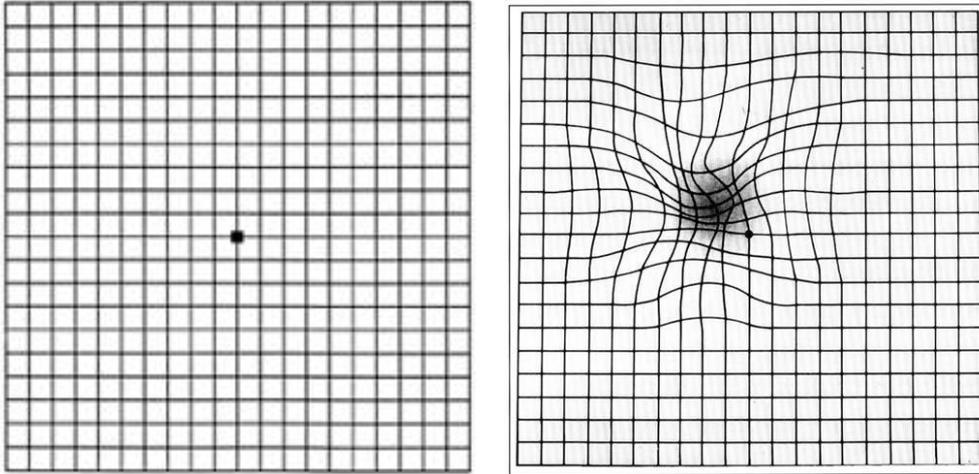


Abbildung 4: links normales Amsler Gitter, wie es von einer gesunden Person gesehen wird. Rechts Metamorphopsien wie sie von einer AMD-erkrankten Person (zumeist nur bei Neovaskularisationen) wahrgenommen werden können ("Amsler-Gitter," 09.02.2009).

Die Fundusfotografie wird zur Verlaufskontrolle benutzt. Das OCT und die Fluoreszenzangiographie dienen der Differenzierung der späten AMD. Die Indozyaninröntgenangiographie dient der weiterführenden Diagnostik bei der neovaskulären AMD.

Das multifokale ERG und die funduskontrollierte Perimetrie können zur Bestimmung der Ausdehnung und Tiefe des funktionellen Ausfalls sowie zur Verlaufskontrolle benutzt werden.

Funduskopisch zeigen sich bei der Frühform stadienabhängig unterschiedlich große Drusen (Burk & Burk, 2014: 303). Bei der atrophischen AMD zeigen sich funduskopisch scharf begrenzte gelb-weißliche Areale mit vergrößerten retinalen Gefäßen (Burk & Burk, 2014: 304). Bei Pigmentepithelabhebungen zeigen sich scharf begrenzte gelb-orange-farbene prominente Stellen (Burk & Burk, 2014: 304). Bei der CNV zeigen sich im Verlauf „grau-grüne oder rosa-gelbe, leicht erhabene subretinale Veränderungen unterschiedlicher Größe“ (Burk & Burk, 2014: 304).

Eine ursächliche Therapie gibt es zurzeit noch nicht (Patzelt, 2009: 61). Allen Patienten sollte laut Leitlinie ein Rauchstopp angeraten werden.

Wenn mindestens eine intermediäre AMD in einem Auge oder ein Sehverlust von 0,7 krankheitsbedingt in einem Auge vorliegt, wird die Einnahme von Antioxidantien (500

mg Vitamin C; 400 IU Vitamin E; 15 mg Beta-Carotin) und 80 mg Zinkoxid + 2 mg Kupferoxid empfohlen.

Bei der atrophischen AMD können verschiedene Hilfsmittel u.a. vergrößernde Sehhilfen und elektronische Vorlesegeräte angeboten werden (Burk & Burk, 2014: 308).

Bei der neovaskulären AMD kommt hauptsächlich eine Therapie mit VEGF-Hemmern zum Einsatz (Burk & Burk, 2014: 308).

1.4 Ätiologie

Die AMD wird als eine multikausale Krankheit angesehen bei der externe Umwelteinflüsse, altersbedingte Veränderungen, das Komplementsystem als Teil des Immunsystems als auch genetische Faktoren relevant sind (Herrmann et al., 2013: 377). Als wichtige Ursachen werden in verschiedenen Theorien Mutationen/Polymorphismen im Genom, die Lipofuszingenese und dessen Speicherung im retinalen Pigmentepithel (RPE), die Alterung des RPEs, oxidativer Stress, hydrodynamische Veränderungen im Bereich der Bruch-Membran, hämodynamische Veränderungen im choroidalen Blutfluss und eine chronische Entzündung genannt (Charbel Issa, Scholl, Holz, Knolle, & Kurts, 2005: 1036).

Altersveränderungen sowie individuell variable Genetik und externe Umwelteinflüsse im Zusammenspiel führen laut einer gängigen Vorstellung dazu, dass eine Krankheitsschwelle überschritten wird (Herrmann et al., 2013: 379).

Histologisch betrachtet sind bei der Entstehung einer AMD besonders das RPE, die Bruch-Membran und die Choriokapillaris von Bedeutung (Herrmann et al., 2013: 378f.).

Zur Übersicht hier eine Abbildung in HE:

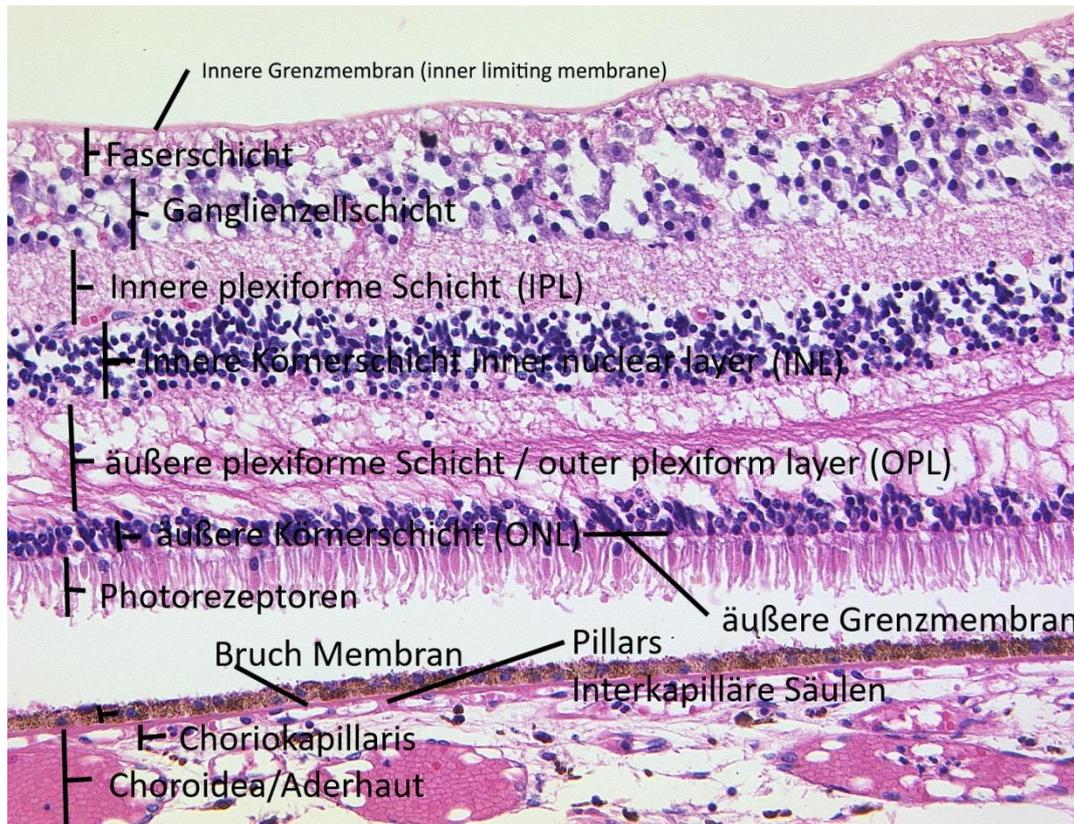


Abbildung 5: Übersicht der Netzhautschichten. Das Präparat stammt von einem HE Schnitt der Augenbank zu Köln. Der Patient war als er gestorben ist, 70 Jahre alt.

In Bezug auf die Entwicklung einer geographischen Atrophie wird ein Lipofuszin/A2E-vermittelter Zellschaden des RPEs als Ursache gehandelt (Bergmann, Schütt, Holz, & Kopitz, 2004; F. G. Holz, Bellman, Staudt, Schütt, & Völcker, 2001: 1051f.; F. G. Holz et al., 1999; Peter Charbel Issa, 2009: 15; Schütt, Davies, Kopitz, Holz, & Boulton, 2000). Bei der neovaskulären AMD wird von einer Störung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren ausgegangen (Peter Charbel Issa, 2009: 15f.). Zunächst gehe ich auf relevante Umweltfaktoren und Alterungsprozesse ein. Danach gehe ich auf die Genetik ein. Auf das Immunsystem bzw. den Zusammenhang zwischen Komplementfaktoren und AMD Pathogenese gehe ich im nächsten Abschnitt ein, nachdem ich das Komplementsystem vorstelle.

Rauchen gilt nachweislich als der bisher relevanteste externe Risikofaktor (Herrmann et al., 2013: 380). Als weiterer externer Risikofaktor wird Sonnenexposition genannt (Tomany, Cruickshanks, Klein, Klein, & Knudtson, 2004: 750-757). In Bezug auf Zusammenhänge zu Bluthochdruck, Atherosklerose und einem erhöhten Body-Mass-Index sind die Datenlagen inkonsistent (Herrmann et al., 2013: 380). In der Age-Related-

Eye-Disease-Studie (AREDS) zeigte sich ein protektiver Effekt von Zink, Betakarotin, Vitamin C und E (AREDSResearchGroup, 2001).

Als Ursache für altersbedingte Veränderungen werden vor allem Schäden durch oxidativen Stress gehandelt (Herrmann et al., 2013: 378). Zudem wird von einer altersabhängigen Beeinflussung der Expression mehrerer Gene in der Netzhaut ausgegangen (Yoshida, Yashar, Hirianna, & Swaroop, 2002: 2554-2560).

Bekannte altersbedingte Veränderungen sind Ablagerungen von vor allem Lipiden und advanced-glycation-endproducts (AGEs) in der Bruch-Membran, die Akkumulation von Lipofuszin in den RPE-Zellen und Ablagerungen zwischen dem RPE und der Bruch-Membran (Herrmann et al., 2013: 379).

Altersabhängig kommt es zu einer Verdopplung der Dicke der Bruch-Membran zwischen dem 10. und 90. Lebensjahr (Herrmann et al., 2013: 379). Von dieser Verdickung wird angenommen, dass sie zu einem zunehmenden Diffusionswiderstand führt und dass die Versorgung des RPEs beeinflusst wird (Herrmann et al., 2013: 379).

Das RPE erhält die Blut-Retina-Schranke, ist für den Transport und die Speicherung von Retinoiden zuständig, phagozytiert die Photorezeptoraußensegmente, schützt die Retina vor oxidativen Schäden und schützt Nerven und Gefäße durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Frank G. Holz, 2011: 50). Da das RPE aus nicht teilungsfähigen Zellen besteht und hohem oxidativem Stress aufgrund der Sonnenexposition ausgesetzt ist, wird vermutet, dass es im Rahmen von Alterungsprozessen zu einer Akkumulation von Schäden kommt (Frank G. Holz, 2011: 50).

Pigmentepithelzellen weisen im Randbereich geographischer Atrophien einen erhöhten Lipofuszingehalt auf (F. G. Holz, Bellman, Staudt, Schutt, & Volcker, 2001).

Lipofuszin findet sich in sekundären Lysosomen im mittleren bis basalen Zytoplasma (Frank G. Holz, 2011). Es besteht zum größten Teil aus oxidativ geschädigten Photorezeptoraußensegmenten und Bisretinoid-Produkten des Sehzyklus (Herrmann et al., 2013: 379).

Altersbedingte Ablagerungen zwischen RPE und Bruch-Membran imponieren histologisch unterschiedlich (Herrmann et al., 2013: 379f.). Eine dieser Ablagerungen sind Drusen (Herrmann et al., 2013: 380).

Über den Ursprung der Drusenbestandteile besteht die Hypothese, dass die Bestandteile entweder aus dem RPE oder aus dem Blutfluss der Choriokapillaris stammen (Lommatzsch et al., 2011).

Früher standen sich zwei unterschiedliche Hypothesen zur Entstehung der Drusen gegenüber. Zum einen die Transformationstheorie von 1855, in der Drusen als Degeneration der Pigmentepithelien aufgrund der mangelnden Fähigkeit der autolytischen lysosomalen Funktion verstanden wird (A. L. Wang et al., 2009). Zum anderen die Depositionstheorie, laut dieser entstehen die Drusen als Ablagerung aufgrund mangelnder Abtransportmöglichkeiten durch eine verstärkte Barriere der Bruch-Membran.

Heutzutage geht man jedoch von immunologischen Prozessen aus. In der Theorie der chronischen Inflammation werden die Drusen als Abfallprodukt einer chronisch lokalen Entzündung angesehen (Anderson et al., 2010: 95). Hageman et.al stellten die Hypothese auf, dass dendritische Zellen durch lokale Schädigung des RPEs chemokinvermittelt aktiviert und rekrutiert würden (Hageman et al., 2001: 723ff.). Daraufhin würden die dendritischen Zellen ihre Fortsätze in den Läsionsbereich aussenden und zur Freisetzung immunmodulierender Faktoren durch das RPE führen. Durch die Akkumulation der verschiedenen Zellen könnte es zur Drusenentstehung kommen. Die dendritischen Zellen würden sich wieder zurückziehen und die HLA-DR positiven Überreste, die in Drusen nachgewiesen wurden, würden zurückbleiben (Hageman et al., 2001: 723ff.).

Die Genetik macht schätzungsweise 46-71 % des Gesamtrisikos aus, an einer AMD zu erkranken (Seddon, Cote, Page, Aggen, & Neale, 2005: 321). Dennoch sind laut Weber et al. genetische Testungen, um das individuelle Risiko abzuschätzen, im Moment nicht sinnvoll (Weber et al., 2014: 133).

Bereits 1983 wurde der Zusammenhang mit einer positiven Familienanamnese postuliert (Hyman, Lilienfeld, Ferris, & Fine, 1983: 213).

Es konnte eine hohe Übereinstimmung des Krankheitsphänotyps bei Zwillingen festgestellt werden (Meyers, 1994). Zudem konnte eine höhere Inzidenz von AMD-Fällen bei Verwandten ersten Grades von AMD-Erkrankten belegt werden (Hammond et al., 2002; Seddon, Ajani, & Mitchell, 1997).

Es handelt sich bei der AMD um eine komplex genetische Erkrankung (Herrmann et al., 2013: 381). Die Gene konnten durch Assoziationsstudien, mithilfe derer genetische Polymorphismen aufgedeckt werden können, entdeckt werden (Peter Charbel Issa, 2009: 15ff.).

Die prädisponierenden Gene können übersichtshalber in folgende drei Gruppen unterteilt werden: in Gene die das Komplementsystem betreffen (CFH, CFB/C2, C3, CFI, CFHR), in Gene des Cholesterin und Lipidstoffwechsels (APOE, ABCA1, LIPC, CETP) und in Gene der extrazellulären Matrix (TIMP3, FRK/COL10A1, COL8A1) (Herrmann et al., 2013: 382).

Mittlerweile beläuft sich die Anzahl der Gene, die wahrscheinlich mit der Pathogenese der AMD zu tun haben auf 17 Gene (Cascella et al., 2014: 2). Davon sind laut Cascella et al. die Mehrheit Gene, die diejenigen Proteine codieren, die inflammatorische Funktionen innehaben (Cascella et al., 2014: 2).

Die besonders stark prädisponierenden Gene konnten auf Chromosom 1 und 10, jeweils auf dem langen Arm gefunden werden (Herrmann et al., 2013; Scholl et al., 2007: 196).

Die beiden relevantesten Gene sind das Komplementfaktor H Gen (CFH), das sich auf Chromosom 1 befindet, und der Chromosomenlokus 10q26 mit ARMS2, PLEKHA1 und HTRA1 (Herrmann et al., 2013; Swaroop, Branham, Chen, & Abecasis, 2007: 177).

Übersicht prädisponierende Gene				
Gen	Position: Chromosom	SNP Nummer	Phänotyp	Effekt auf das Risiko
CFH	1q31	Rs1061170	CC//Y402H	erhöht
ARMS2/HTRA1	10q26	Rs10490924	GT//A69S	erhöht
ARMS2/HTRA1	10q26	Rs3750848	ARMS2 intron	erhöht
ARMS2/HTRA1	10q26	Rs3793917	HTRA1 promoter polymorphismus	erhöht

Table 2: Übersicht der stark für AMD-prädisponierenden Gene auf Chromosom 1 und 10 (Kawa et al., 2014).

Für das Genprodukt von ARMS2 ist die Funktion noch nicht geklärt (Herrmann et al., 2013: 381). Bei HTRA1 handelt es sich um eine Serinprotease, die unter zellulärem Stress aktiviert wird und möglicherweise Umbauvorgänge reguliert (Herrmann et al., 2013: 381).

Die CFH Gen Mutation im Tyr402His (SNP rs1061170) ist mit einer Assoziation von fast 50 % an allen AMD-Erkrankungen sehr hoch (Donoso, Kim, Frost, Callahan, & Hageman, 2006: 137).

Die SNP ist ein Einzelnukleotidpolymorphismus, der die Basenpaare verändert ("Simulieren von Augenerkrankungen und Sehbehinderungen-Makuladegeneration,"). Dieser verändert die CFH Inhibierende Funktion (Cascella et al., 2014: 4).

Auch andere Gene des Komplementsystems wie z.B. C3, C2, FB und CFI spielen für die Entstehung einer AMD eine Rolle (Gold et al., 2006; Kawa et al., 2014; Thakkinstian, Bowe, McEvoy, Smith, & Attia, 2006; Yates et al., 2007).

1.5 Komplementsystem

1.5.1 Kategorisierung und Funktion des Komplementsystems

Kategorisiert wird das Komplementsystem klassischerweise als Teil der angeborenen Immunabwehr (Holländer, Barthlott, Keller, Krenger, & Piali, 2006: 219). Jedoch interagiert es auch mit dem erworbenem Immunsystem und wird daher als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem angesehen (Holländer et al.,

2006: 219). Das Komplementsystem hat, grob vereinfacht dargestellt, Funktionen bei der Infektabwehr, vermittelt zwischen natürlichem und erworbenen Immunsystem, beseitigt zellulären Debris und reguliert Entzündungsvorgänge (Holländer et al., 2006: 219). Komplementfaktoren können eine Opsonisation, eine Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten, eine Lyse von Bakterien und Zellen, eine Verbesserung der humoralen Immunantwort oder eine immunologische Gedächtnisfunktion sowie eine Beseitigung von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen bewirken (Holländer et al., 2006: 219). Das Komplementsystem besteht aus ca. 30 Proteinen, die offiziell zu den Akute-Phase-Proteinen gerechnet werden (Rassow, 2008: 672).

Sie werden größtenteils von der Leber, jedoch auch von anderen Zelltypen u.a. Epithelzellen, Endothelzellen, Fettgewebe, Monozyten und Makrophagen synthetisiert und größtenteils kontinuierlich ins Blut abgegeben (Charbel Issa et al., 2005: 1036; Holländer et al., 2006: 225). Ungefähr 15 % der Globulinfraktion im Plasma sind Komplementproteine (Holländer et al., 2006: 219). Die Komplementproteine lassen sich funktionell in Proteasen, regulatorische Membranproteine und Rezeptoren unterteilen (Markiewski & Lambris, 2007: 715) und strukturell in lösliche Proteine im Blut und Membran-assoziierte Proteine (Sarma & Ward, 2011: 227). Beim Komplementsystem handelt es sich um eine sich selbst verstärkende Kaskade, die oft zur Veranschaulichung der Funktionsweise mit der Blutgerinnung verglichen wird (Holländer et al., 2006: 220). Ein Komplementzymogen, d.h. eine inaktive Vorstufe, wird gespalten und die aktive Form davon spaltet das nächste Zymogen (Murphy, Travers, & Walport, 2009: 82).

1.5.2 Aktivierung des Komplementsystems

Die Aktivierung des Komplementsystems geschieht durch den klassischen Weg oder den Lektin-Weg oder den alternativen Weg. Zusätzlich gibt es noch direkte Aktivierungsmöglichkeiten wie z.B. durch CRP (Rassow, 2008: 696).

Der klassische Reaktionsweg wird als Antikörper-abhängig bezeichnet, da er hauptsächlich durch Immunkomplexe bzw. nach IgG oder IgM Bindung an Pathogene aktiviert wird (Rassow, 2008: 696). C1q bindet im Komplex (C1q, C1r, C1s) an einen Antikörper, der an ein Antigen gebunden ist (Sedlacek, 2014: 23). Die Proteasen C1r und C1s werden durch C1q aktiviert (Sedlacek, 2014: 23). Der aktivierte Komplex C1qrs

spaltet C4 und C2 (Sedlacek, 2014: 23). Die C3 Konvertase (C4bC2b) formiert sich und spaltet wiederum C3 (Sedlacek, 2014: 23). Dann bildet sich die C5-Konvertase C4bC2bC3b (Sedlacek, 2014: 23).

Der Lektin-Weg wird durch die Bindung von Mannose-Lectin oder Ficolin an mannosehaltige Kohlenhydrate auf Oberflächen von Pathogenen aktiviert (Murphy et al., 2009: 88). Die MBL-assoziierten Serinproteasen MASP-1, MASP-2 und MASP-3 werden dadurch aktiviert und spalten C4 und C2 (Sedlacek, 2014: 24). Dann bildet sich die C3 Konvertase (C4bC2b) und anschließend die C5-Konvertase C4bC2bC3b wie im klassischen Aktivierungsweg (Sedlacek, 2014: 24).

Im alternativen Weg kommt es kontinuierlich zu einem Basisumsatz, der theoretisch zur Opsonisation von allen körpereigenen und pathogenen Oberflächen führen würde, die mit Plasma in Berührung kommen (Charbel Issa et al., 2005: 1038). Dies geschieht Antikörper-unabhängig und durch die direkte Bindung von C3b an die Oberfläche (Rassow, 2008: 696). C3 spaltet sich spontan in C3b und C3a und daraufhin bindet C3b an Faktor B (Sedlacek, 2014: 24f.). Faktor D spaltet Faktor B in die Faktoren Bb und Ba (Sedlacek, 2014: 25). Es bildet sich die C3 Konvertase C3bBb aus, die durch Properdin (P) stabilisiert wird (Sedlacek, 2014: 25). Durch weitere Bindung von C3b an C3bBb entsteht die C5-Konvertase C3bBbC3b (Sedlacek, 2014: 25).

Alle drei Wege führen zu einer gemeinsamen Endstrecke, die bei der Bildung von einer C3 Konvertase beginnt und die in der Bildung von C3a, C3b, C5a und des Membranangriffskomplexes (MAC bzw. C5b-9) resultiert (Sarma & Ward, 2011: 227). Der MAC entsteht aus einem Komplex der Faktoren C5b, C6, C7, C8 und sechs C9 (Holländer et al., 2006: 224).

Der MAC ist ein röhrenförmiger Kanal, der außen lipophil und innen hydrophil ist (Holländer et al., 2006: 224). Er hebt die „osmotische und biochemische Differenz zwischen Zelläußerem und Innerem auf“ und führt damit zur Apoptose (Holländer et al., 2006: 224).

Zu drei wesentlichen Funktionen dieser Kaskade zählt neben der Lyse von Bakterien und Zellen durch die Ausbildung des MAC, die Opsonisation durch kovalent gebundenes C3 und C4 sowie die Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten durch die

Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a (Holländer et al., 2006: 219). C3a, C5a und C4a bewirken die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Serotonin, Histamin und Leukotriene (Holländer et al., 2006: 227). C5a hat eine bis zu 200 mal und C4a eine 100 mal stärkere Wirkung als C3a (Holländer et al., 2006: 227). Im Verlauf dieser Kaskade werden neben C3a, C4a und C5a mehrere weitere Komplementspaltprodukte freigesetzt u.a. C3b, iC3b, C3d, C4b und C1q (Sedlacek, 2014: 25). Sie vermitteln ihre Wirkung über Komplementrezeptoren (Sedlacek, 2014: 25).

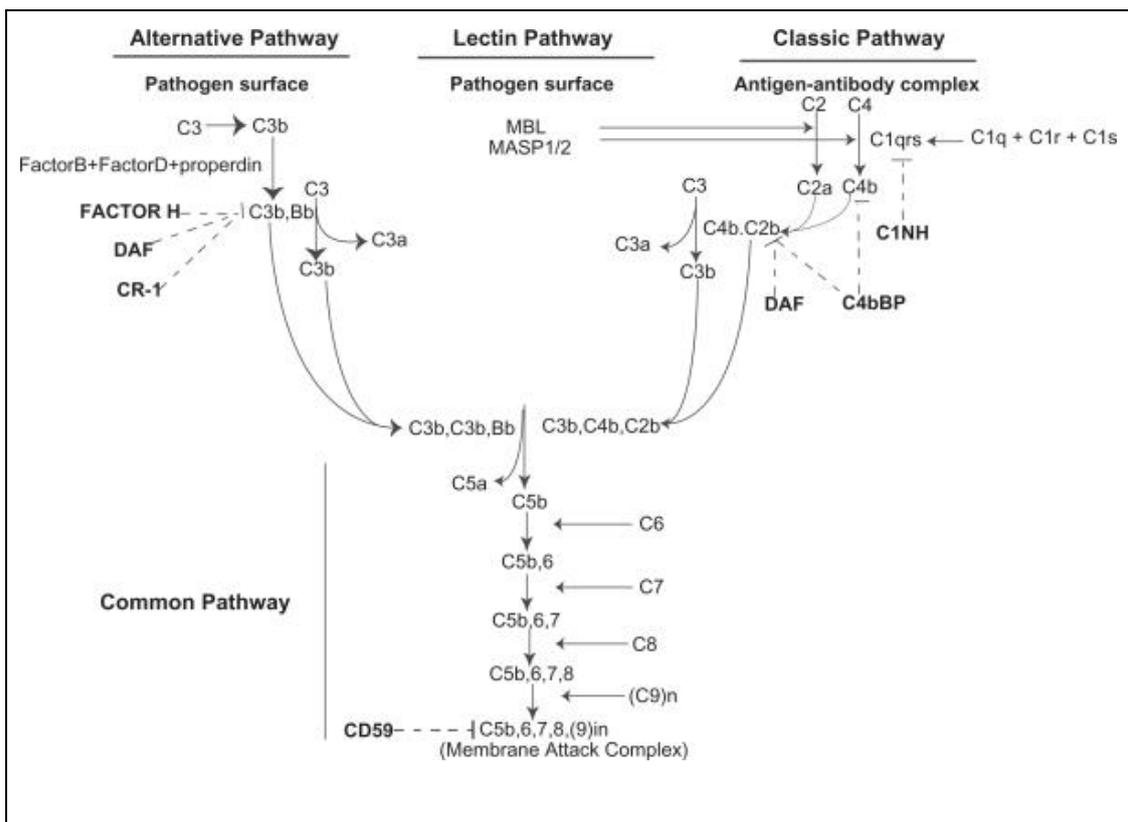


Abbildung 6: Übersicht der Komplementkaskade (Kulkarni & Afshar-Kharghan, 2008).

Die Komplementaktivierung wird kontrolliert durch lösliche und Membran-assoziierte Komplementregulatoren. Lösliche Komplementregulatoren sind der C1-Inhibitor (C1-INH), C4b bindendes Protein (C4BP), Komplementfaktor H, Komplementfaktor I, Clusterin, Vitronectin. Membran-assoziierte Regulatoren sind der Komplementrezeptor 1 (CR1; CD35), das Membran Cofactor protein (CD46) und Glycosylphosphatidylinositol-Proteine wie der Decay-accelerating factor (CD55) oder CD59 (Kawa et al., 2014).

CD59 ist dabei das Kontrollprotein, dass die Bildung des MAC Komplexes reguliert (Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis, 2006). CFI ist ein Regulator des

klassischen und alternativen Komplementweges, der für die Inaktivierung von C4b und C3b verantwortlich ist (Khandhadia et al., 2012).

C4b und C3b werden im Zusammenspiel von C4 binding protein (C4BP), CFH, MCP und CR1 mit CFI inaktiviert (Khandhadia et al., 2012).

CFI spaltet nicht nur C3b, sondern auch C4b und verhindert damit, die Komplexbildung zur C3-Konvertase. Dadurch kommt es zur Entstehung der inaktiven Formen iC3b, C4c und C4d.

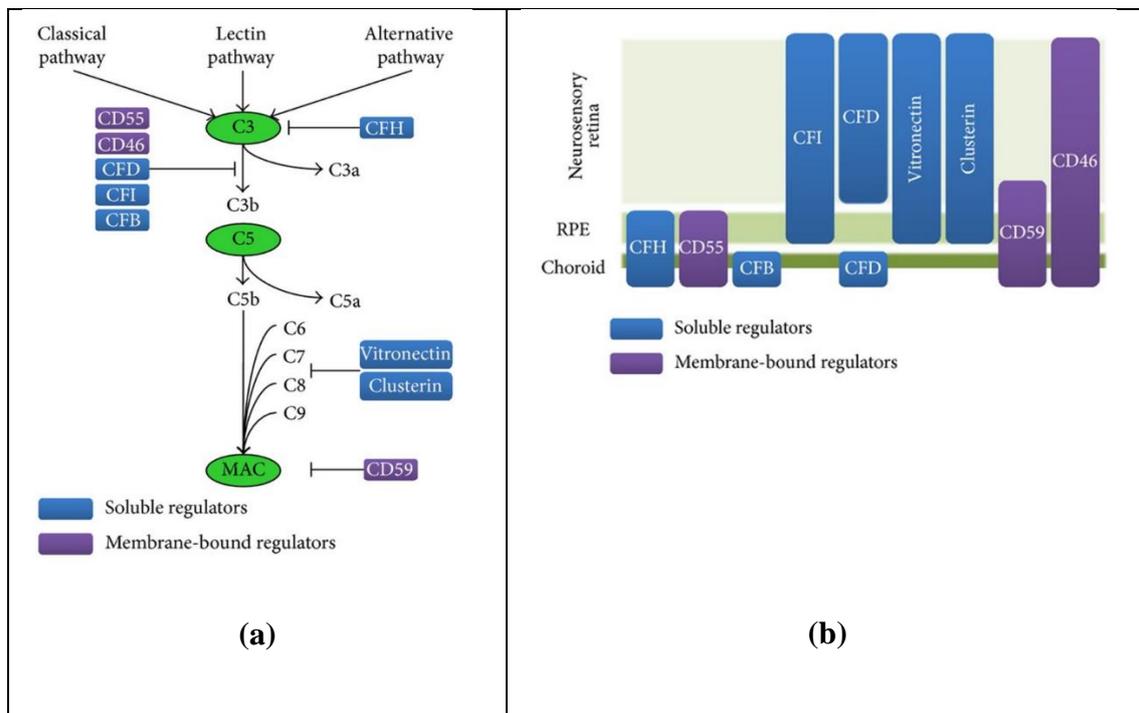


Abbildung 7: Übersicht der Kontrollproteine des Komplementsystems. (a) Lösliche (blau) und Membran-gebundene Regulatorproteine (lila) und ihre hemmende Wirkung innerhalb des Komplementsystems (b) Lösliche und Membran-gebundene Regulatorproteine innerhalb der Netzhaut lokalisiert. (Kawa et al., 2014).

Neben seinen Hauptfunktionen hat das Komplementsystem eine Funktion u.a. in der Synapsenreifung, in der Beseitigung von Immunkomplexen, in der Angiogenese, in der Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen, im Lipidmetabolismus und in der Geweberegeneration (Ricklin, Hajishengallis, Yang, & Lambris, 2010).

Bei verschiedenen Krankheitsbildern wie dem atypischen hämolytischen urämischem Syndrom, der membranproliferativen glomerulonephritis Typ II (MPGN II) spielt das Komplementsystem eine nachweisliche Rolle. Das Komplementsystem ist auch bei verschiedenen Immunerkrankungen involviert: Bei Lupus sind C1, C2, C3 und C4

vermindert sowie C3d Level im Blut erhöht. C3d und C4d Level im Blut sind bei der systemischen Sklerose erhöht. Und C1q und C2 Mangel und erhöhte Level von C3a und C5a sind mit der Rheumathoiden Arthritis assoziiert (M. Chen, Daha, & Kallenberg, 2010). Auch bei Alzheimer wird dem Komplementsystem eine Rolle zugeschrieben, sowie auch bei Sepsis und Myokardinfarkt (Ricklin et al., 2010).

Es konnte im Rahmen einer Untersuchung zum Zusammenhang des Komplementsystems und deren Wechselwirkung mit der T-Zell Regulation und Aktivierung bei Pollenallergie gezeigt werden, dass das Komplementsystem mit der CD4+T-Zell Antwort bei Pollenallergie und in der Pathogenese der Sensitivierung auf Pollenallergene involviert ist (Couto Alves et al., 2013). In der Allergie scheinen besonders der C5a Rezeptor und der C3a Rezeptor in der Steuerung der T-Helfer Zellen vom Typ 2 involviert zu sein (Couto Alves et al., 2013).

Das Auge besitzt einen immunologischen Sonderstatus. Im Auge ist das Ausmaß der Immunsystemaktivierung reduziert. Man spricht vom sogenannten Immunprivileg des Auges (Perez, Saeed, Tan, Urbieto, & Cruz-Guilloty, 2013). Die Retina und damit auch der Bereich der Makula ist durch die Retina Blutschranke in einem immunsuppressiven Status (Perez et al., 2013). Dieses Immunprivileg wird angesehen als Schutz vor Funktionsverlust durch Entzündungsgeschehen (Perez et al., 2013). Die äußere Blut-Retina-Schranke wird durch das RPE und die Choriokapillaris gebildet. Die retinalen Blutgefäße besitzen tight junctions, die die innere Blut-Retina-Schranke ausmachen (Ambati et al., 2013). Normalerweise wird die Immunsuppression sowohl durch die durch das RPE gebildete tight junction Barriere sowie durch anti-inflammatorische Zytokin-Produktion des RPE aufrechterhalten (Ambati et al., 2013). Im Auge gibt es keine klassische Lymphdrainage. Zelldebris wird venös über das Trabekelmaschenwerk und den Schlemmschen Kanal entfernt (Grisanti, 1998). Die inflammatorischen Zellen der Retina sind die Mikroglia, vergleichbar zu den Gewebsmakrophagen (Ambati et al., 2013). Zelldebris wird durch retinale Mikroglia entfernt (Ambati et al., 2013). Netzhaut, RPE, Bruch-Membran und Choriokapillaris besitzen generell im Vergleich zu anderen Geweben wenig komplementhemmende Faktoren (Bora et al., 2003).

Das Komplementsystem ist jedoch auch im Auge kontinuierlich auf einem niedrigen Niveau aktiv. Eine Regulierung durch die intraokularen Komplementregulatoren findet

statt (Sohn, Kaplan, Suk, Bora, & Bora, 2000). Komplementaktivierung ist bei verschiedenen retinalen Erkrankungen beteiligt, vgl.(Luo, Zhao, Madden, Chen, & Xu, 2013), u.a. auch in der Uveoretinitis (Mei Chen, Muckersie, Luo, Forrester, & Xu, 2010; Copland et al., 2010; Read, Szalai, Vogt, McGwin, & Barnum, 2006) und der diabetischen Retinopathie (Gerl et al., 2002; J. Zhang, Gerhardinger, & Lorenzi, 2002).

1.6 Komplementsystem und AMD

Erkenntnisse über die Beteiligung des Komplementsystems an der AMD hat man hauptsächlich durch genetische Erkenntnisse, Analyse der Drusen, veränderte Komplementlevel im Blut und durch Immunhistochemische Verfahren erhalten. Zusätzlich wird auch versucht anhand von Mausmodellen etwas über die Pathogenese der AMD zu erfahren. Beispielsweise konnten Bora et al. nachweisen, dass die systemische Blockade des gesamten Komplementsystems genau wie die selektive Depletion von C3 bei C3 Knockout-Mäusen die Entwicklung einer der neovaskulären AMD ähnlichen Ausbildung bei Mäusen von 98 % in den Kontrollen auf 3-5 % in den Knockout-Mäusen reduzieren konnte (Bora et al., 2005).

1993 wurden erstmals in Immunfluoreszenz-Untersuchungen Komplementfaktoren in Drusen nachgewiesen (van der Schaft, Mooy, de Bruijn, & de Jong, 1993).

Nachfolgend sind die in den Drusen u.a. vorkommenden Komplementfaktoren aufgeführt:

Übersicht Komplementärproteine					
Klassischer Komplementweg	Lektin Komplementweg	Alternativer Komplementweg	Komplement C3 und C3 Fragmente	Terminaler Reaktionsweg	Komplement-aktivatoren
C1q	Mannose binding lectin	Factor B (CFB) Faktor I (CFI) Faktor H (CFH) Alternative Komplementwegregulatoren Membrane cofactor Protein (MCP;CD46) Komplement Rezeptor 1 (CR1)	C3 C3d, C3dg C3B, iC3b	C5 C6 C7 C8 C9 C5-9 (MAC) Terminaler Reaktionswegregulatoren Vitronectin Clusterin (Apolipoprotein J)	Amyloid β Lipofuszin Bestandteile C-reaktives Protein (CRP) Cholesterol Immunglobulin (Ig) Advanced glycation endprodukts (AGE)

Tabelle 3: Übersicht der in Drusen nachgewiesenen Komplementproteine (Anderson et al., 2010).

Systemische Komplementlevelmessungen beim Menschen konnten veränderte Level der Komplementfaktoren sowie auch deren aktivierten Produkte in der Blutbahn bei AMD-Patienten beweisen (S.Khandhadia, V.Ciprani, J.R.W.Yates, & A.J.Lotery, 2012).

Für die Faktoren Ba, C3d, MAC, C3a und C5a sowie Faktor D wurden bei AMD-Patienten signifikant erhöhte Blutlevel, für Faktor 3 und Faktor 4 sowie CFH im Vergleich zu Gesunden keine erhöhten Level gefunden (Hecker et al., 2010; Scholl et al., 2008).

Erhöhte Plasmakonzentrationen von Faktor B und Faktor D und Ba und C3d zeigten sich assoziiert mit einem 5-fachen Anstieg des AMD-Risikos (Hecker et al., 2010).

Bei fortgeschrittener AMD konnte ein stärkerer Anstieg von Faktor D, Faktor B, Ba und C3d im Blut gefunden werden (Hecker et al., 2010).

Zudem konnte gezeigt werden, dass Faktor C5a und Bb bei fortgeschrittener AMD erhöht und CFH bei Patienten mit geographischer Atrophie erniedrigt ist (Reynolds et al., 2009).

Durch die Immunhistochemie konnten bereits mehrere Komplementfaktoren in der Retina lokalisiert werden.

In der Arbeit von Frau Fett et al. wurden Complement factor H, der Decay accelerating factor (DAF/CD55), Complement receptor 1 sowie das membrane cofactor protein (MCP, CD46) mittels Immunhistochemie lokalisiert (Fett, Hermann, Muether, Kirchhof, & Fauser, 2012).

Für CFH wurde moderate bis starke Färbung in (soft) Drusen in Augen mit früher AMD nachgewiesen. Soft-Drusen sind eine Form der Druse, die größer sind als die hard-Drusen. In den normalen Augen fanden sich stärkere Anfärbung im Vergleich zu AMD-Augen im Bereich der choroidalen Kapillarwände sowie in den interkapillären Säulen bis zur Bruch-Membran. Das Lumen der Blutgefäße war teils ebenfalls positiv.

Für DAF/CD55 wurde in allen Augen eine Anfärbung im Bereich des inneren Segments der Photorezeptorzellen auf Höhe der Membrana limitans externa/external limiting membrane sowie der Ganglienzellschicht gefunden.

Für den Komplement Rezeptor 1/CD35 wurde in der Ganglienzellschicht in allen Augen eine Anfärbung gefunden sowie auch an der apikalen Seite des retinalen Pigmentepithels. In Augen mit früher AMD wurde eine Anfärbung in soft Drusen nachgewiesen (Fett et al., 2012).

Fett et al. konnten dadurch zeigen, dass CR1 und CFH auf verschiedenen Seiten des RPE lokalisiert sind und somit nicht wie vorher vermutet überlappend wirken (Fett et al., 2012).

Die Anfärbung bei dem MCP-Antikörper im Bereich der Bruch-Membran und im basalen RPE war weniger stark bei AMD-Augen ausgeprägt.

Die kontinuierliche Anfärbung des MCP-Antikörpers an der Bruch-Membran zeigte nach Fett et al., dass die Kontrolle der Komplementaktivierung durch die Komplementregulatoren an der Grenze zwischen Choroidea und Retina stattfindet und

die Bruch-Membran eine herausragende Stellung als immunologische Barriere einnimmt (Fett et al., 2012).

Der Anfärbungsbefund in den Drusen der Komplementregulatoren verstärkt nach Meinung der Autoren die Annahme, dass Drusen Byprodukte der Komplementaktivierung sind (Fett et al., 2012).

Zudem konnten Fett et al. zeigen, dass die Regulation innerhalb der Retina durch CR1 und DAF vonstattengeht (Fett et al., 2012).

Die Hauptfaktoren des Komplementsystems, wie C3, C5 und der MAC-Komplex fanden sich in den Kapillargefäßen der Choroidea vgl.(Kawa et al., 2014). Bei Anderson et al. befand sich C3 bei Gesunden in den Kapillaren der Choroidea (Anderson et al., 2010). Bei Personen mit Drusen fanden Anderson et al. C3 im sub-RPE Raum und im RPE, welches über Drusen lag.

Anderson et al. fanden eine CFH-Immunaktivität mittels Immunfluoreszenz in den Choriokapillaren und Zwischenräumen (Anderson et al., 2010).

MCP war bei Anderson et al. in den Choriokapillaren und Zwischenräumen lokalisiert an der basolateralen Oberfläche des Pigmentepithels und weniger stark an der luminalen Oberfläche der choroidalen Endothelzellen. Auch Ebrahimi et al. fanden MCP ähnlich verteilt. CD46/MCP Immunofärbung befand sich basolateral im RPE bei Gesunden und vermindert bei Patienten mit früher AMD (Ebrahimi, Fijalkowski, Cano, & Handa, 2013).

DAF fanden Ebrahimi et al. nur innerhalb der Choroidalen Kapillaren.

CFB-Immunaktivität war innerhalb der ganzen Choroidea zu finden sowie oberflächlich an den choroidalen Endothelzellen. CFI war bei Ihnen in der inneren Retina zu finden und relativ wenig in der Choroidea. CFD war diffus in der gesamten Neuroretina und Choroidea verteilt.

Im Makularbereich von AMD-Augen, konnten Ebrahimi et al. mithilfe von Immunhistochemie zeigen, dass CD59, der Regulator des MAC, erhöht in Bereichen von gesundem RPE war, jedoch vermindert im RPE, das über Drusen war und in geographischer Atrophie (Ebrahimi et al., 2013).

1.7 Fragestellung – Zielsetzung und Arbeitshypothese

1.7.1 Ausgangssituation

Die AMD ist eine häufige Erkrankung der Makula mit einer irreversiblen Störung der zentralen Sehschärfe (Patzelt, 2009: 61). Prozentual ist die AMD in Deutschland für geschätzte 50 % aller schweren Sehbehinderungen verantwortlich (Finger et al., 2011: 4381). Der Anteil der AMD an allen schweren Sehbehinderungen wird voraussichtlich aufgrund des demographischen Wandels bis 2030 auf eine Inzidenz von 57 % ansteigen (Finger et al., 2011: 4381).

Die Pathogenese der AMD ist noch nicht hinreichend geklärt.

Die AMD wird als eine multikausale Krankheit angesehen, bei der externe Umwelteinflüsse, altersbedingte Veränderungen, genetische Faktoren sowie das Komplementsystem als Teil des Immunsystems relevant sind (Herrmann et al., 2013: 377).

Besonders die Beteiligung des Komplementsystems als möglicherweise therapeutischer wichtiger und beeinflussbarer Faktor in der Pathogenese der AMD ist noch nicht hinreichend geklärt.

Erkenntnisse über die Beteiligung des Komplementsystems an der AMD hat man hauptsächlich durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS), qualitative Analysen der Drusen, veränderte Komplementlevel im Blut und durch Immunhistochemische Verfahren erhalten. Zusätzlich wird auch versucht, anhand von Mausmodellen etwas über die Pathogenese der AMD zu erfahren.

Die Immunhistochemie ist dabei eine wichtige Erkenntnisquelle und Mittel der Wahl zur Identifizierung Zell-spezifischer Protein Verteilung und Lokalisationsprofilen, da alle quantitativen Analysen durch die Verfügbarkeit von post-mortem Gewebe limitiert sind (Fett et al., 2012). Zudem ist kein adäquates Tiermodell verfügbar (Fett et al., 2012).

Die limitierte Aussagekraft von Mausmodellen ergibt sich daraus, dass Mäuse keine Makula haben und zudem das Immunsystem von Menschen und Mäusen sehr unterschiedlich ist (Khandhadia et al., 2012; Mestas & Hughes, 2004).

Zudem ist die Vergleichbarkeit bei Tier-Modellen begrenzt, da kein Tier-Modell alle verschiedenen Veränderungen widerspiegelt, die in der AMD vorkommen (Ambati et al., 2013).

Mithilfe Blutkomplementlevelmessung können systemische Komplementlevel gemessen und zwischen Gesunden und AMD-Erkrankten Unterschiede diesbezüglich festgestellt werden. Es sind damit Erkenntnisse über lösliche Komplementfaktoren möglich, jedoch können keine Erkenntnisse über lokale Vorgänge gewonnen werden und eine Lokalisation von Komplementfaktoren innerhalb der Retina ist nicht möglich.

Die Forschung über die Genetik kann Erkenntnisse über die genetische Disposition für die AMD liefern, jedoch wird die AMD als multikausale Erkrankung angesehen und deswegen sind andere Erkenntnisquellen wichtig. Mittels der Immunhistochemie lassen sich gut Aussagen über das Vorhandensein von Komplementfaktoren und deren Lokalisation innerhalb von Geweben treffen.

1.7.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die immunhistologische Darstellung wichtiger Komplementproteine, um Erkenntnisse über deren Vorhandensein in der Netzhaut und Aderhaut zu gewinnen sowie deren Lokalisation. Überdies hinaus vergleichen wir die ermittelten Befunde in Netzhäuten mit AMD versus Netzhäuten ohne AMD, um Erkenntnisse über die Beteiligung dieser Komplementfaktoren an der AMD zu gewinnen.

Im Rahmen der folgenden Arbeit wurden folgende Komplementfaktoren mittels immunhistochemischer Methoden in der Netzhaut und Aderhaut von Spendern dargestellt:

- C5aR (CD88)
- CFI (Complement factor I)
- MAC (Membranangriffskomplex oder C5b-9)

Verglichen wurde zwischen AMD (Früh- und Spätform) und Kontroll-Geweben.

Diese drei Komplementproteine wählten wir aufgrund ihrer besonderen Bedeutung in der Komplementkaskade aus.

Die Verteilung des C5aR ist besonders interessant, da die AMD als eine chronisch lokale Entzündung angesehen wird (Anderson et al., 2010: 95). C5a und C3a triggern Inflammation über ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. C5a ist um 100 bis 200fach potenter als C3a (*Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis*, 2006). Es ist das wichtigste und wirkungsvollste Komplementpeptid in Bezug auf Entzündung (*Janeway Immunologie*, 2009).

CFI wurde in dieser Arbeit ausgewählt, da er ein Regulator des klassischen und alternativen Komplementweges ist. In der Arbeit von Frau Fett et al. wurden bereits der Complement factor H, der Decay accelerating factor (DAF/CD55), Complement receptor 1 sowie das membrane cofactor protein (MCP, CD46) mittels Immunhistochemie lokalisiert (Fett et al., 2012). Somit waren andere wichtige Komplementregulatoren bereits immunhistochemisch lokalisiert. Ein Immunhistochemischer Nachweis und die Lokalisation von CFI innerhalb der Netzhaut und Aderhaut ist besonders bemerkenswert, da CFI bereits in Drusen (siehe Einleitung) nachgewiesen werden konnte und auch bestimmte genetische Polymorphismen des CFI, der CFI rs10033900T>C und rs2285714C>T Polymorphismus, eine Rolle spielen könnten (Q. Wang, Zhao, & Li, 2016).

Am Ende der abgelaufenen Komplementkaskade steht die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC bzw. C5b-9) (Sarma & Ward, 2011: 227). Eine Lokalisation des MAC zeigt eine abgelaufene Komplementkaskade an.

1.7.3 Arbeitshypothese

Wir wollten mittels immunhistochemischer Verfahren die Fragen beantworten, ob sich erstens der MAC, CFI und der C5aR in der Retina und Choroidea lokalisieren lassen und zweitens, ob sich Unterschiede zwischen AMD und Kontroll-Geweben zeigen lassen und drittens, falls Unterschiede in der Lokalisation und Intensität bestehen, die vorliegenden Ergebnisse im Kontext zu anderen Erkenntnissen über die Faktoren setzen und diskutieren, was die vorliegenden Ergebnisse bedeuten könnten. Folgende drei Hypothesen möchte ich aufstellen:

1. Es zeigt sich keinerlei Anfärbung in beiden Gruppen (AMD versus Gesund).
2. Die Anfärbung zeigt sich in beiden Gruppen in gleicher Lokalisation.
3. Die Anfärbungslokalisation und/oder Intensität bei Netzhäuten mit und ohne AMD ist nicht gleich.

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht

Die Experimente wurden von April 2014 bis Mai 2015 im Histologischen Labor der Universitäts-Augenklinik in Köln durchgeführt.

Wir benutzten hauptsächlich bereits geschnittene Präparate der Augenbank der Universität zu Köln. Ca. 40 Paraffinblöcke wurden von mir mithilfe der MTA Frau Martina Becker geschnitten. Die Augenbank bestand aus 106 verfügbaren Präparaten.

Ausgeschlossen aus dem untersuchten Kollektiv wurden Augen mit starken morphologischen Veränderungen sowie anderen vaskulären Erkrankungen, schwere Glaukomfälle, Fälle mit diabetischer Retinopathie, starken Netzhautablösungen oder Netzhautspaltungen. Ferner wurden Partneraugen aus dem Kollektiv ausgeschlossen, damit nicht rechtes und linkes Auge von einem Patienten im Kollektiv vorhanden sind.

Das vorliegende ausgewertete Kollektiv bestand aus Augen von 63 Patienten.

Die Qualität der Präparate wurde zunächst durch makroskopische Beurteilung und eingehender durch HE- und Pas-Färbungen jeweils aller Präparate überprüft.

Die Spenderaugen der Augenbank Köln wurden bei einer Organspende gewonnen.

Nachfolgend werde ich das Spendermaterial und seine Aufarbeitung, die Klassifikation und die Immunhistochemie und Entwicklung genauer betrachten:

Spendermaterial und Aufarbeitung	<ul style="list-style-type: none">• Spendermaterial• Chemikalienübersicht• Fixierung• Paraffinblockherstellung• Schnitttechnik
Klassifikation	<ul style="list-style-type: none">• Einteilung der Proben in AMD und Kontrollgruppe

<p>Immunhistochemie und Entwicklung</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Definition und immunhistochemische Grundlagen • Austestung der unterschiedlichen Antikörper • Demaskierung • Blockierung unspezifischer Reaktionen • Färbeprotokolle • Kontrollen • Auswertungsbögen und Färbeintensitätstafel
---	--

Table 4: Übersicht des Abschnitts zum Material und Methoden

2.2 Spendermaterial und Aufarbeitung

Das benutzte Gewebe bestand aus Augen mit bereits entfernter Linse, die in 5 % Formalin fixiert waren. Der hintere Augenabschnitt wurde herausgeschnitten im Bereich der Makula. Dabei haben wir uns am Sehnerv orientiert. Hilfreich zum Auffinden der Makula ist die Tatsache, dass die Makula nach dem Tod ihre Transparenz verliert und gelblich erscheint.

Zunächst wird mittels einer Lupe der Augenhintergrund der Spenderaugen inspiziert und die Makularegion ausfindig gemacht. Danach wird mit einem Filzstift, die Stelle von außen am Bulbus markiert. Es wird ein ca. 2 cm x 1 cm großer Schnitt angefertigt, der die Makularegion mitsamt eines Stückes des N.opticus bzw. der Papille enthält.

Anschließend wird das Makula-Sehnerv-Präparat in Paraffin eingebettet.



Abbildung 8: In Paraffin eingebettetes Präparat der Augenbank zu Köln.

Die Gewebeschnitte werden an einem Schlittenmikrotom in horizontaler Schnittrichtung bei Raumtemperatur angefertigt.

Die 4 µm dicken Präparate werden zur Entfaltung in ein Wasserbad (50 °C) überführt und schwimmend auf Objektträger aufgebracht und anschließend über Nacht bei 37 °C im Heizschrank getrocknet.

Chemikalien und Geräte	
Chemikalien	Wasserstoffperoxid 30 % der Firma Merck Xylol: Rotipuran ≥99 % von der Firma Roth® Wasser, Ampuwa Spüllösung, Fresenius Vollentsalztes Wasser der Uniklinik Köln 2-Propanol, Isopropylalkohol der Firma Walter CMP GmbH & Co
Fertiglösungen	AEC, High sensitive Substrate Chromogen, der Firma Dako DCS Lab Line, Antikörper Verdünnungspuffer Wasserhaltiges Eindeckmedium: Microscopy Aquatex der Firma Merck DCS Lab Line Waschpuffer Puffer, Dako Target Retrieval: pH9 und pH6

	Mayer's Hämalaun der Firma Merck
Einwegmaterialien und sonstige Geräte	Objektträger: star Frost® Reagiergefäße der Firma Sarstedt, Micro Tubes 1,5 ml Diverse Pipettenspitzen der Firma Sarstedt Pipetten diverse Größen Schlittenmikrotom von Lyca Paraffinstreckbad Mikroskop von Zeiss und Lyca Wasserbad zum Kochen von GFL

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Geräte

2.3 Klassifikation

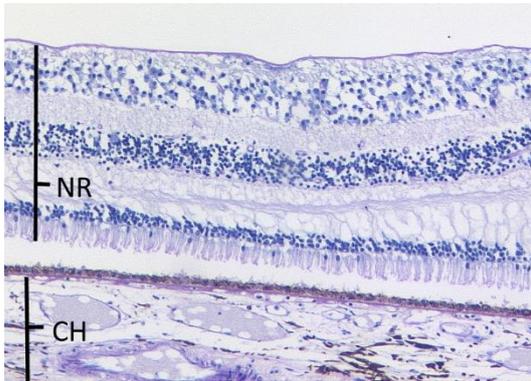
Die Bestimmung, in welche Kategorie die Proben fallen, erfolgte histologisch an HE Präparaten und anschließend in Pas gefärbten Präparaten. Die Proben wurden in Kontrollen, Frühe und Späte (trockene und feuchte) AMD eingeteilt. Die immunhistochemischen gefärbten Präparate wurden auf ihre Übereinstimmung in Bezug auf die Klassifikation hin zusätzlich untersucht.

Die histologische Klassifikation lehnt sich an die Klinische Klassifikation (siehe Teil Klassifikation in der Einleitung) an. Als Kontrollen wurden nur solche Proben eingeschlossen, in denen sich keine Drusen oder sehr peripher liegende Drusen befinden. Dies war notwendig, um auszuschließen, dass sich in der Kontrollgruppe AMD-Fälle befinden. Problematisch an der histologischen Klassifizierung der AMD ist, dass nicht die echte Größe der Drusen und Anzahl der Drusen im gesamten Auge bestimmt werden kann, da die Klassifizierung an einzelnen Schnitten erfolgte und Drusen auch bei Nicht-AMD-Erkrankten vorkommen können.

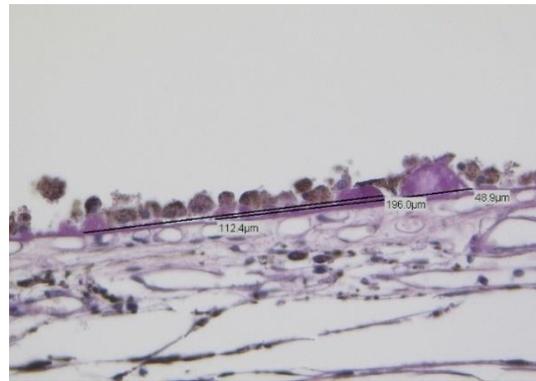
Damit sind in der frühe-AMD-Gruppe folglich wahrscheinlich auch Nicht-AMD-Augen gelandet.

Als späte AMD wurden die Proben klassifiziert, die entweder Zeichen der atrophischen AMD oder Veränderungen im Sinne der neovaskulären AMD aufzeigten.

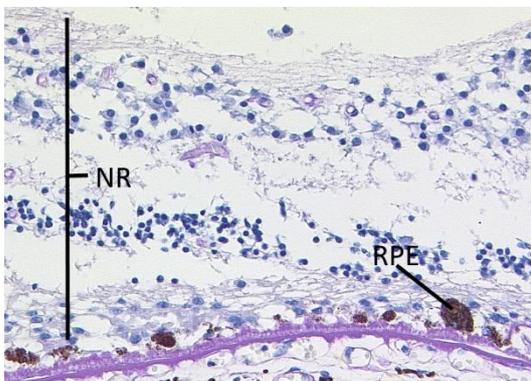
(A)



(B)



(C)



(D)

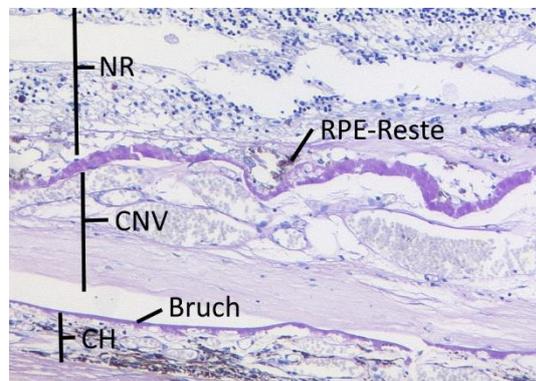


Abbildung 9: PAS Bilder. NR=Neuroretina; CH=Choroidea; RPE=Retinales Pigmentepithel; CNV=Choroidale Neovaskularisation (A) Kontrolle in PAS eines mit 70 Jahren Verstorbenen. Ausschnittvergrößerung aus Aufnahme mit 100-facher Vergrößerung. (B) Drusen bei früher AMD eines Präparates von einer/eines mit 66 Jahren Verstorbenen. Die Neuroretina ear bei diesem Präparat weiter oben und ist deshalb nicht sichtbar. Ausschnittvergrößerung aus Aufnahme mit 400-facher Vergrößerung. (C) Geografische Atrophie in PAS. Gut sichtbar sind vereinzelt und degenerierte Pigmentepithelzellen. Die Probe stammt von einer mit 57 Jahren verstorbenen Frau. Ausschnittvergrößerung aus Aufnahme mit 200-facher Vergrößerung. (D) Neovaskuläre Spätform der AMD. Die Neovaskularisationen sind sehr deutlich zwischen Bruch-Membran und Neuroretina zu finden. Das RPE ist degeneriert. Das Präparat stammt von einer mit 84 Jahren verstorbenen Frau. Ausschnittvergrößerung aus Aufnahme mit 200-facher Vergrößerung.

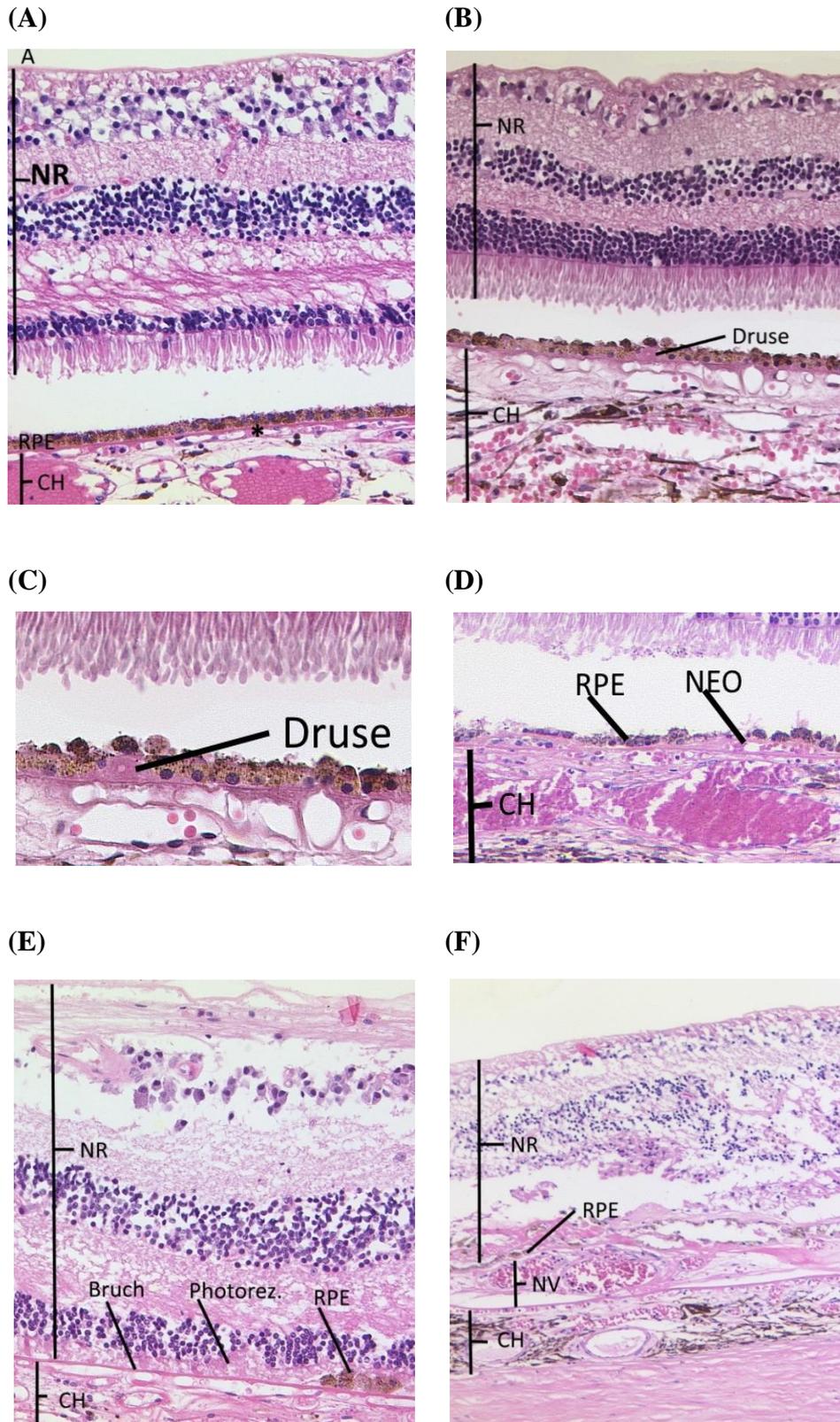


Abbildung 10: Klassifikation in HE NR=Neuroretina; CH=Choroidea; RPE=Retinales Pigmentepithel; NEO=Neovaskularisationen; Photorez.=Photorezeptoren; NV=Neovaskularisationsmembran (A)-(E) Ausschnittvergrößerungen aus Aufnahmen mit 200-facher Vergrößerung. (A) Kontrolle. Die Probe stammt von einem

mit 70 Jahren verstorbenem Mann. (B) Frühe AMD. Sichtbar sind für die Frühform klassischen Drusen. Das Bild stammt von einem Patienten (Geschlecht unbekannt) gestorben mit 66 Jahren (C) Vergrößerung der Drusen (D) Neovaskularisation, die die Bruch-Membran überschreitet. Das Präparat stammt von einer mit 67 Jahren verstorbenen Frau. (E) Geografische Atrophie. Degeneratives Pigmentepithel. Das Präparat stammt von einer mit 57 Jahren verstorbenen Frau. (F) Neovaskularisation unter dem RPE. Das Präparat stammt von einer mit 84 Jahren verstorbenen Frau. (F) Ausschnittvergrößerung aus Aufnahme mit 100-facher Vergrößerung.

2.4 Immunhistochemie und Entwicklung

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur histologischen Lokalisation von ausgewählten Makromolekülen (Romeis, 2010). Sie hat im Gegensatz zu anderen Methoden der Gewebeanalyse den Vorteil, dass eine nahezu unbegrenzte Anzahl von strukturell und funktionell bedeutsamen Makromolekülen in ihrer histologischen Lokalisation darstellbar sind (2003).

Dabei wird das Prinzip der Antigen-Antikörperbindung benutzt ("Immunhistochemie,"). Spezifische Antikörper binden an das Makromolekül ("Immunhistochemie,").

2.4.1 Visualisierung

Die Visualisierung erfolgt durch einen an den primären oder sekundären Antikörper gekoppelten Farbstoff (2010).

Wenn der Farbstoff an den primären Antikörper gekoppelt ist, spricht man von direkter Färbung ansonsten von indirekter Färbung (2010). Bei der indirekten Färbung wird ein Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper verwendet (2010).

Wir haben das Prinzip der indirekten Färbung benutzt. Sie hat den Vorteil, dass eine höhere Sensitivität erreicht wird. Dies liegt daran, dass mehrere Sekundärantikörper an einen einzelnen Primärantikörper binden können (Romeis, 2010).

Die indirekte Methode der Immunhistochemie stellt sich schematisch, wie folgt, dar:

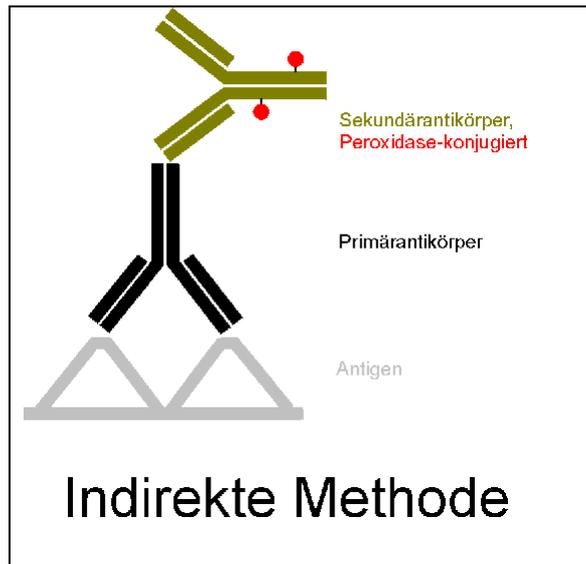


Abbildung 11: Schema der indirekten Immunhistochemie. An das Antigen bindet der Primärantikörper. Der Sekundärantikörper ist mit dem Peroxidase konjugiert, das in einem weiteren Schritt sichtbar gemacht wird. (Henne, 2000).

2.4.2 Bindungen und verwendete Antikörper

Die Detektion der Antikörper ist mit verschiedenen Markersubstanzen möglich (2010). Enzymgekoppelte Antikörper sind nicht direkt sichtbar und müssen durch Bildung eines farbigen Produktes sichtbar gemacht werden (2010).

Zur Lokalisierung der AK-Antigen-Reaktion haben wir AEC benutzt, das enzymatisch Chromogen umsetzt. Es ergibt sich eine Rotfärbung an den Stellen, wo Antigen vorhanden ist.

Um unerwünschte unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Proben mithilfe einer Blockierungslösung, in der Wasserstoffperoxid ein Bestandteil ist, geblockt. Zusätzlich werden unspezifische Bindungen durch Waschlösung entfernt (Romeis, 2010). Wir benutzten hierzu den PBS Waschlösung.

Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurden IgG-Kontrollen angefertigt. Da alle Primärantikörper Maus-Antikörper waren, wurden dafür Maus IgG Isotyp Kontrollen benutzt.

(A)



(B)

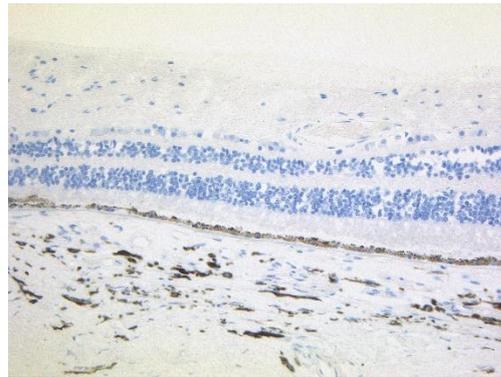


Abbildung 12: Beispiele von negativen IgG Kontrollen. Blaue Hämalaun Kernfärbung sichtbar. Das Pigmentepithel ist aufgrund Eigenfarbe bräunlich. (A) und (B) Ausschnittvergrößerungen aus Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung. (A) Das Präparat stammt von einer mit 51 Jahren verstorbenen Frau. (B) Das Präparat stammt von einer mit 57 Jahren verstorbenen Frau.

Primärantikörper:

Antikörper	Spezifität und Beschreibung	Verdünnung	Herkunft/Firma
CD88 (Synonym: C5aR)	Monoklonaler Antikörper Maus; igG2a; Klon S5/1	1:2000	abD Serotec
Anti-C5b-9	Monospezifisch für den C5-9 Komplex; Kanninchen polyclonal, reagiert mit Mensch und Maus	1:150	Abcam
CFI	Polyclonal Kanninchen gegen Mensch	1:100	LSBio

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Sekundärantikörper: DCS Detection Line, Polylink Sekundärantikörper

Label: DCS Detection Line, Peroxidase Label

2.4.3 Färbemethode – Hämalaun Kernfärbung

Bei der Mayers-Hämalaun-Kernfärbung werden die Kerne blau gefärbt. Es handelt sich dabei um eine gebrauchsfertige Lösung.

Hämalaun ist ein positiv geladener Farbstoff, der basophile Strukturen und daher selektiv Kerne anfärbt. Die Lösung in der das Hämalaun gelöst ist, verstärkt die Selektivität der Anfärbung durch eine gewisse Azidität und einen Überschuss an Alaun (Romeis, 2010).

Die Austestung der verschiedenen Antikörper erfolgte durch die vom Hersteller empfohlene Verdünnung sowie einer höheren und niedrigeren Verdünnung auf jeweils 3 Netzhautschnitten und 3 Kontrollschnitten. Zusätzlich wurden Gewebe zur Kontrolle verwendet. Bei anti-C5aR wurde Tonsillengewebe, bei anti-C5b-9 wurde Pankreas und bei anti-CFI wurde Nierengewebe benutzt.

Eine höhere und niedrigere Verdünnung wurden abhängig von dem Ergebnis solange durchgeführt bis eine gute Anfärbbarkeit erreicht werden konnte.

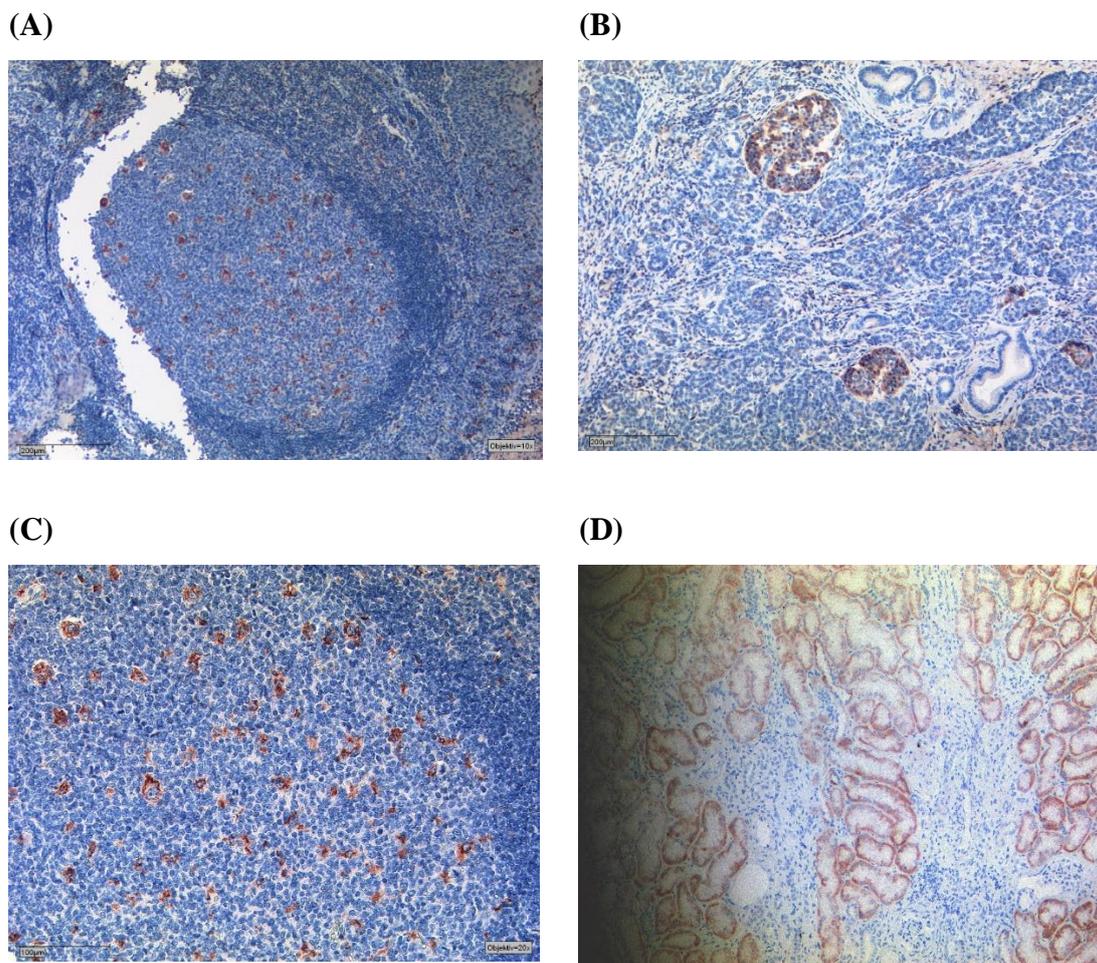


Abbildung 13: Gewebe zur Austestung. Rote Anfärbung des Antikörpers. Blaue Anfärbung durch Hämalaun (A), (C) Tonsillengewebe wurde zur Austestung des anti-C5aR benutzt. (A), (B) und (D) Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung. (C) Aufnahme mit 200-facher Vergrößerung. (A) Balken entspricht 200µm (C) Balken entspricht 100µm (B) Pankreasgewebe wurde zur Austestung des anti-C5b-9 (MAC) benutzt. Balken entspricht 200µm (D) Nierengewebe CFI.

Bis auf die verschiedene Benutzung von verschiedenen Puffern, Primärantikörpern und einer unterschiedlichen Entwicklungszeit mit AEC ist das Protokoll für die verschiedenen Komplementfaktorantikörper identisch.

Für die verschiedenen Färbungen wurden die Schnitte mit Xylol zwei mal zehn Minuten entparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe (Isopropanol/ 96 %-Alkohol-/ 70 %-Alkohol/50 %-Alkohol, Aqua dest.) hydriert, anschließend Hitze-induziert mithilfe von Puffer demaskiert und abgekühlt.

Diese Schritte sind notwendig, da in paraffineingebettetem Gewebe die Epitope meistens derart verändert sind, so dass eine Antigenmarkierung durch den Antikörper oft nicht möglich ist (Romeis, 2010).

Danach wurde in Wasserstoffperoxid-PBS Lösung gebockt, mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert, in PBS Waschpuffer gewaschen, mit dem Link bzw. Sekundärantikörper inkubiert, in PBS gewaschen und danach mit dem Peroxidase Label inkubiert und mit dem Chromogen AEC® gefärbt. Anschließend wurde noch eine Kernfärbung in Mayer's Hämalaun durchgeführt und zum Schluss mit Microscopy aquatex® eingedeckelt.

Das Peroxidase Label ist ein Nachweissystem für den Sekundärantikörper, in dem die Enzymumsetzung erfolgt.

Deparaffinierung	Xylol 10 Min. (2x)
Rehydrierung der Gewebeschnitte in absteigender Alkoholreihe	2-Propanol 1 Min. (2x) 96 %Ethanol 1 Min. (2x) 70 % Ethanol 1 Min. (2x) 50 % Ethanol 1 Min.
Spülen	Aqua dest 1min (3-4x)
Hitze-induzierte Demaskierung	CD88: ph9 TRS 30 Min. C5b-9: ph6 TRS 30 Min. CFI: ph6 TRS 30 Min. 20 min Abkühlen Spülen mit Aqua dest (4x)

Block	Peroxidase Block aus 50 ml PBS und 3 ml Wasserstoffperoxid 10 Min.
Spülen	Spülen in PBS (2x)
Inkubation mit Primärantikörper 30 Minuten in der feuchten Kammer	
Spülen	Spülen in PBS(2x)
Inkubation mit Link 10 min	2. Ak
Spülen	Spülen in PBS (2x)
Inkubation mit Label 10 min	Färben mit AEC CD 88:1-3 Min. CD59:2-4 Min. CFI: ca 5-7 Min.
Kernfärbung	Kernfärbung in Mayer's Hämalau 5 min
Spülen	Spülen in aqua dest (4x)
Bläuen	Bläuen der kerne in warmen Leitungswasser 10 Min.
Eindeckeln	Eindeckeln in Eindeckmedium

Tabelle 7: Färbeprotokoll, Rezept der Anfärbung. Die Arbeitsschritte sind chronologisch angegeben. In Klammern ist die Anzahl der jeweiligen Wiederholungen angegeben.

2.5 Auswertung

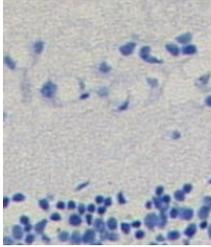
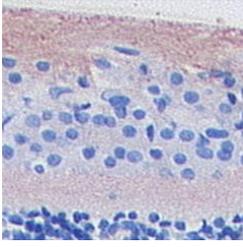
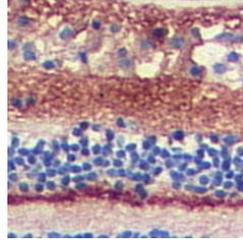
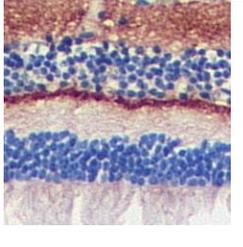
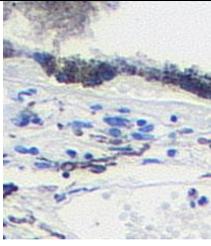
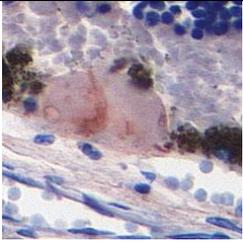
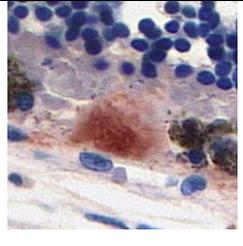
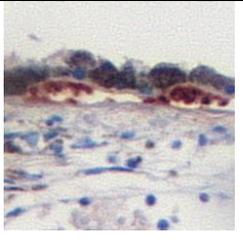
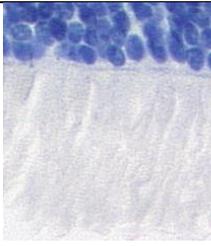
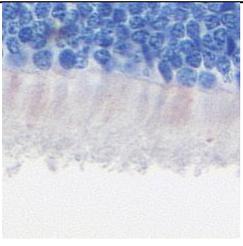
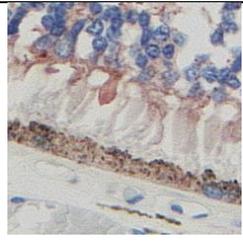
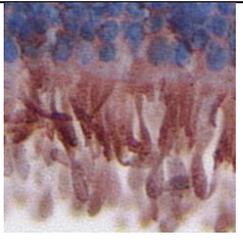
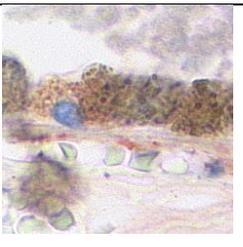
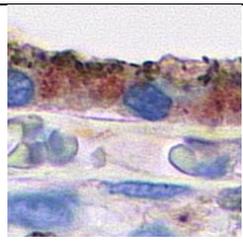
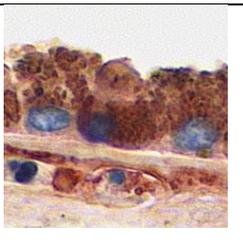
Nachfolgend findet sich die Färbeintensitätstafel mithilfe derer ich die Anfärbung der einzelnen Netzhautschichten in Zahlen umcodiert habe, um eine statistische Auswertung anhand meines Datenmaterials durchführen zu können. Drusen wurden gesondert betrachtet.

Wert	Färbeintensität
0	Keine Anfärbung
0,5	Schwache Anfärbung
1	Mittlere Anfärbung
2	Starke Anfärbung

Tabelle 8: Färbeintensitätswerte

Wert	Werte zur Auswertung von Drusen
-1	Keine Drusen vorhanden
0	Keine Anfärbung
0,5	Schwache Anfärbung
1	Mittlere Anfärbung
2	Starke Anfärbung

Tabella 9: Bedeutung der festgestellten Werte

Färbeintensität	0	0,5	1	2
Plexiforme Schichten				
Drusen				
Photorezeptoren				
RPE				

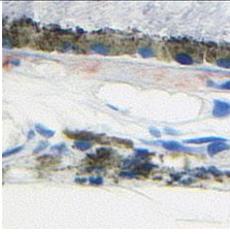
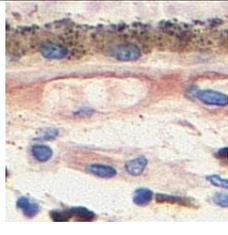
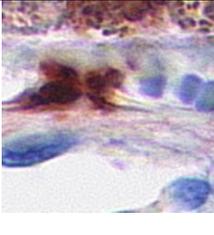
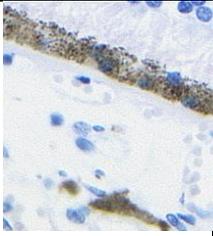
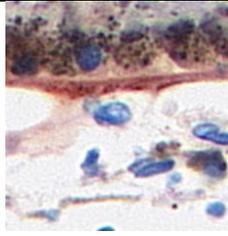
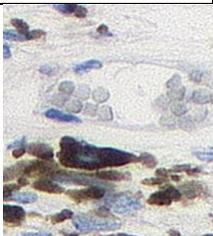
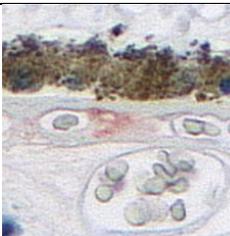
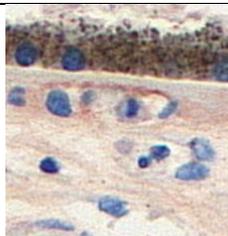
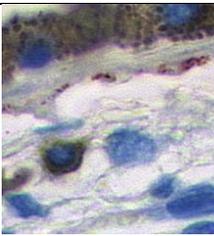
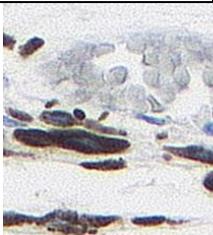
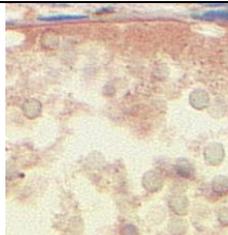
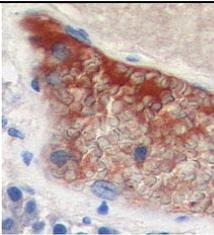
Pillars				
Bruch-Membran				
Gefäßwände				
Gefäßserum				

Tabelle 10: Färbeintensität geordnet nach den jeweiligen Schichten. Nachfolgender Tabelle wurde die Zuordnung zu einer bestimmten Färbeintensität vorgenommen.

Immunhistochemie-Auswertung Einzelbogen				
Präparat:		Färbung/Epitop:		
Morphologie:	<input type="radio"/> sehr gut <input type="radio"/> gut <input type="radio"/> teilweise gut	Entwicklung 1:	<input type="radio"/> schwach <input type="radio"/> normal <input type="radio"/> stark	
Diagnose AMD:	<input type="radio"/> normal <input type="radio"/> early <input type="radio"/> moderate <input type="radio"/> advanced	Entwicklung 2:	<input type="radio"/> schwach <input type="radio"/> normal <input type="radio"/> stark	

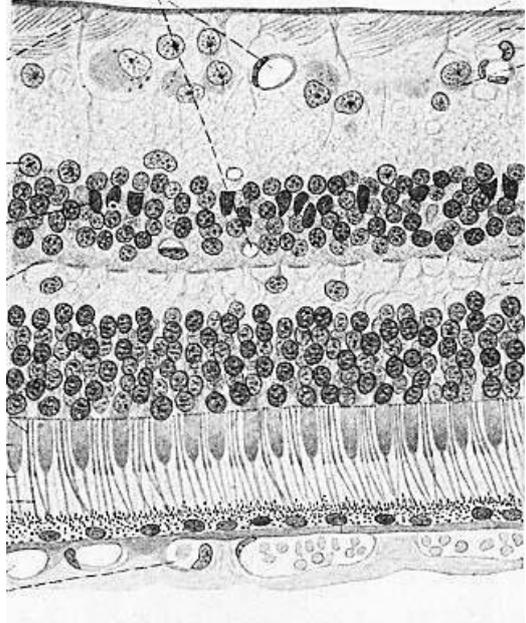
Pt. Alter				
		Schicht	Score	Bemerkung
		Nervenfaserschicht		
		Ganglienzellschicht		
		innere plexiforme Schicht		
		innere Körnerschicht		
		äußere retikuläre Schicht		
		Faserschicht		
		äußere Körnerschicht		
		Photorezeptoren		
		Rezeptor AS		
		Rezeptor IS		
		PE		
		Pillars		

Table 11: Schema der Auswertung. Die erste Auswertung erfolgte anhand des dargestellten Auswertungseinzelbogen. Für jedes Präparat und jeden Antikörper wurde eins angefertigt. Die Kontrolle erfolgte in zeitlichem Abstand.

2.6 Statistische Auswertung

Zunächst wurden am Datenmaterial eine deskriptive Statistik und Korrelationsanalyse durchgeführt, um folgende Fragen zu beantworten:

- Wie viele Männer und wie viele Frauen befinden sich in meiner Stichprobe?
- Wie alt waren die Patienten, wie alt war der Jüngste, wie alt der älteste Patient?
- Wie alt waren die Patienten im Mittel?
- Ist die Stichprobe normalverteilt oder verzerrt in Bezug auf den Parameter Alter?

Die Beantwortung der Fragen erfolgte durch die Beschreibung der Häufigkeiten des Geschlechts, sowie beim Todesalter durch Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung. Bezüglich des Parameters Alter wurden Altersgruppen gebildet und ein Test auf Normalverteilung nach Kolmogorov/Smirnov und Shapiro Wilk durchgeführt.

- Sind sowohl die Männer als auch die Frauen ähnlich alt bzw. beide Gruppen in Bezug auf das Alter vergleichbar?
- Wie verhält sich bezüglich des Gradings die Verteilung von Männern und Frauen? Sind beispielsweise in der Kontrollgruppe nur Männer?

Es folgte ein Chi-Quadrat-Test nach Pearson unter der Fragestellung, ob die Häufigkeitsverteilung nach der Altersgruppe in Bezug auf das Geschlecht proportional sind oder nicht. Zudem wurde ein Chi-Quadrat-Test bezüglich Grading nach dem Geschlecht untersucht.

- Sind die Patienten, die in meiner Stichprobe ein höheres Krankheitsstadium haben, älter?

Die Beantwortung erfolgte durch ein Korrelationstest. Dazu wurde der Kendall-Tau-Test benutzt.

Daran schließt sich die statistische Analyse der einzelnen Antikörper an.

- Mit welcher Häufigkeit waren die einzelnen Färbeintensitäten in den jeweiligen Schichten vorhanden?
- Wie waren die einzelnen Schichten im Mittel angefärbt?

Zunächst wurden die Häufigkeiten der Färbeintensität innerhalb der einzelnen Schichten beschrieben. Die Daten wurden anhand des Lageparameter-Median und der Perzentile untersucht, da die Variable Färbeintensität ordinalskaliert ist.

- Unterscheiden sich die Färbeintensitäten in Bezug auf das Grading?

Anschließend wird ein nicht parametrische Homogenitätstest nach Kruskal und Wallis für mehrere unabhängige Stichproben durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine

verteilungsfreie oder verteilungsunabhängige statistische Methode, die die Normalverteilung nicht voraussetzt und keine Kenntnis über die Verteilungsfunktion der Gesamtheit bedingt. Die Anfärbungen der Netzhautschichten sind ordinalskaliert und müssen damit als nicht normalverteilt gelten. Zudem handelt es sich bei den Anfärbungen der einzelnen Netzhautschichten um mehrere unabhängige Stichproben. Zeigen sich beim H-Test von Kruskal und Wallis signifikante Unterschiede bei einer jeweiligen Stichprobe, entstammt diese Stichprobe nicht der gleichen Grundgesamtheit. Damit ist die Farbeintensität in der jeweiligen Netzhautschicht nach dem Krankheitsstadium unterschiedlich.

- Wenn sich die Anfärbung in den einzelnen Schichten unterscheiden, wie korreliert die Anfärbung mit dem Grading?

Dort wo eine signifikante Abweichung vorlag, wurde eine Korrelationsanalyse mittels Kendall-Tau durchgeführt, um eine Abhängigkeit Farbeintensität zu Grading darzustellen. Eine besondere Betrachtung galt noch den Drusen. Zunächst wurde als nichtparametrischer Test der Mann-Whitey-Test durchgeführt, um zu beweisen, dass Drusen nach dem Krankheitsstadium unterschiedlich oft vorkommen. Wenn Drusen in unterschiedlicher Farbintensität angefärbt wurden, wurde ein H-Test nach Kruskal-Wallis durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht

In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe der Immunhistochemie der Membranangriffskomplex, der Rezeptor von C5a und ein Regulator des Komplementsystems, CFI, vergleichend in gesunden humanen Spenderaugen und AMD-Augen untersucht. Wir konnten alle drei Komplementfaktoren lokalisieren.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mikroskopisch. Es wurde eine semi-quantitative Auswertung durchgeführt.

Hier eine Übersicht über die nachfolgenden Kapitel:

Klassifikation (Kap. 3.2)	<ul style="list-style-type: none">• Beschreibung des ausgewerteten Kollektivs
Immunhistochemie und Entwicklung (Kap. 3.3)	<ul style="list-style-type: none">• Aussuchen von typischen Färbeergebnissen und Präsentation in einer Figur• Stichwortartige Interpretation der Färbungen und Statistik
Auswertung (Kap. 3.4)	<ul style="list-style-type: none">• Zusammenfassung der deskriptiven und non-parametrischen Statistik

Tabelle 12: Übersicht über die nachfolgenden Kapitel.

3.2 Klassifikation

Wir untersuchten 63 Präparate der Augenbank der Uniklinik Köln. Es wurden 36 Präparate als Kontrollen, 21 Präparate als Frühstadium, 2 Präparate als atrophische Spätform und 4 Präparate als neovaskuläre Spätform klassifiziert.

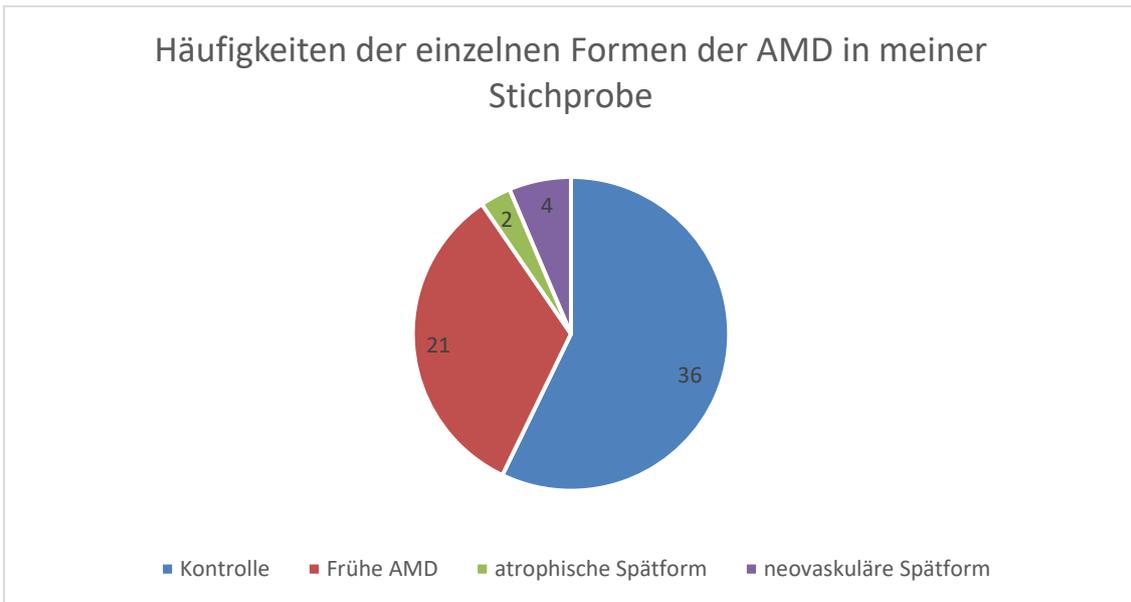


Abbildung 14: Häufigkeiten der einzelnen Formen der AMD in meiner Stichprobe.

In Deutschland leiden laut des Weißbuchs zur Situation der ophthalmologischen Versorgung 2.610.000 Personen an einer AMD im Frühstadium und 1.608.000 Personen an einer späten AMD (Christian Wolfram & Pfeiffer, 2012: 27).

3.2.1 Statistik zur Stichprobe: AMD in der Frühform

Nach dem Weißbuch beträgt die Wahrscheinlichkeit an einer Frühform zu erkranken in der Gesamtbevölkerung 3,1 %. Fasst man die Einzelpersonen als unabhängige Zufallsvariablen auf, so ist die Gesamtbevölkerung (bei der Annahme, dass Deutschland 82.521.653 Einwohner hat) hinsichtlich dem Durchschnittswert der Erkrankung an einer Frühform als Summe von vielen unabhängigen beliebig verteilten Zufallsvariablen angenähert, nach dem zentralen Grenzwertsatz normalverteilt. Damit ist die Voraussetzung erfüllt für den Vergleich des empirischen Mittelwertes der Stichprobe für eine Erkrankung an einer Frühform mit dem Mittelwert von 3,1 % an Erkrankungen der Frühform in der Gesamtbevölkerung als normalverteilte Grundgesamtheit. Also kann man den T-Test anwenden auf die Frage, ob der Mittelwert der Erkrankungen an einer Frühform nur zufällig oder signifikant von dem vorgegebenen Mittelwert in Höhe von 3,1 % in der Gesamtbevölkerung verschieden ist. Als Ergebnis erhält man, dass zum Signifikanzniveau von 0,00042 % die Hypothese abgelehnt wird, dass der Mittelwert der Stichprobe mit dem Mittelwert der Gesamtbevölkerung übereinstimmt. Die offensichtliche Abweichung beider Mittelwerte voneinander wird also auch statistisch

signifikant abgesichert. Die Stichprobe entstammt hinsichtlich der Erkrankung an einer Frühform nicht der Grundgesamtheit der Gesamtbevölkerung. In der Stichprobe ist die Erkrankung an einer Frühform statistisch signifikant überrepräsentiert.

Statistik bei einer Stichprobe (Frühform)				
	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Frühform	63	,33	,475	,060

Tabelle 13: Statistik bei einer Stichprobe (Frühform).

Test bei einer Stichprobe (Frühform)						
	Testwert = 0.031					
	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	95 % Konfidenzintervall der Differenz	
					Untere	Obere
Frühform	5,050	62	,0000042	,302	,18	,42

Tabelle 14: Test bei einer Stichprobe (Frühform).

Im ersten Teil des Outputs wird der Mittelwert der Variable dargestellt sowie dessen Standardabweichung und dem Standardfehler des Mittelwertes. Der zweite Teil zeigt nun, gegen welchen Testwert der obere Mittelwert verglichen wurde und präsentiert den resultierenden t-Wert, die Freiheitsgrade, die mittlere Differenz zwischen Mittelwert und Testwert sowie das Konfidenzintervall der Differenz. Dieses liegt ausschließlich im positiven Bereich, was bedeutet, dass die Differenz zwischen der Variablen und dem Testwert in der Population mit 95 %iger Sicherheit im Bereich zwischen 0,18 und 0,42 liegt. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen ist der t-Wert von 5,050 hochsignifikant (Rasch, 2010).

3.2.2 Statistik zur Stichprobe: AMD in der Spätform

Statistik bei einer Stichprobe (Spätform)				
	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Spätform	63	,10	,296	,037

Tabelle 15: Statistik bei einer Stichprobe (Spätform).

Test bei einer Stichprobe (Spätform)						
	Testwert = 0.019					
			Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	95 % Konfidenzintervall der Differenz	
	T	df			Untere	Obere
Spätform	2,045	62	,045	,076	,00	,15

Table 16: Test bei einer Stichprobe (Spätform).

Gleiches gilt für die Spätform. Auch diese ist in unserer Stichprobe überrepräsentiert.

3.2.3 Statistik zur Stichprobe: Geschlecht, Alter und Postmortemzeit

In der vorliegenden Stichprobe fanden sich 20 Frauen und 36 Männer. Bei 7 Stichproben war das Geschlecht nicht bestimmbar.

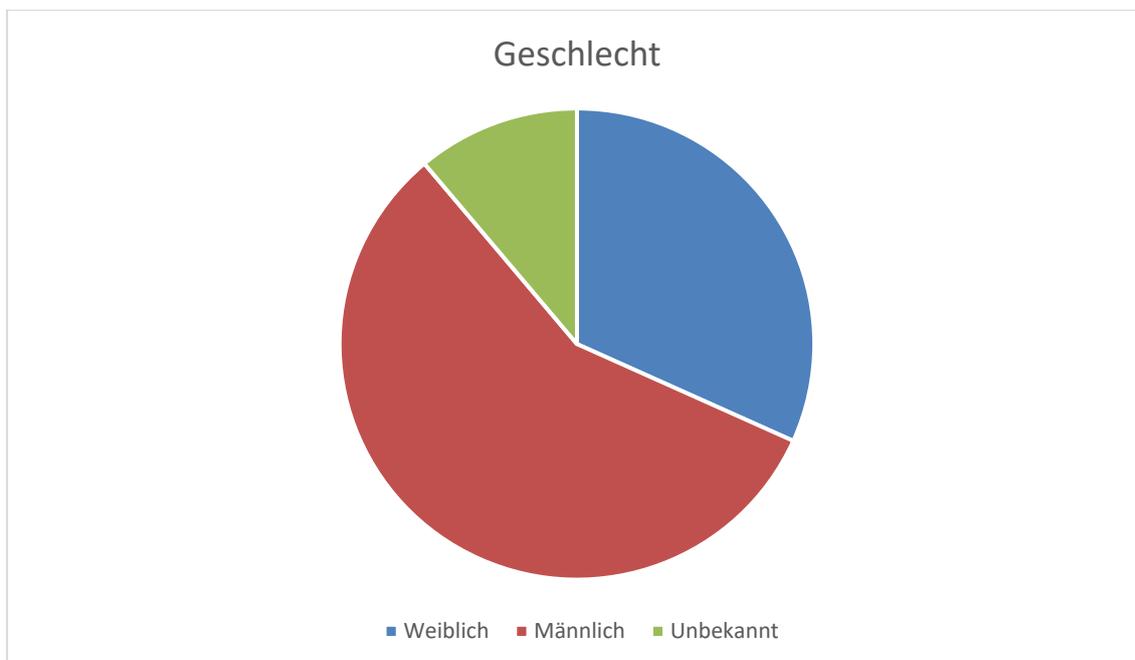


Abbildung 15: Statistik zum Geschlecht der Patienten in der Probe.

Das Todesalter lag im Mittel bei 66,95 Jahren mit einer Standardabweichung von 13,198 Jahren. Das minimale Todesalter lag bei 20 Jahren. Das maximale Todesalter bei 86 Jahren.

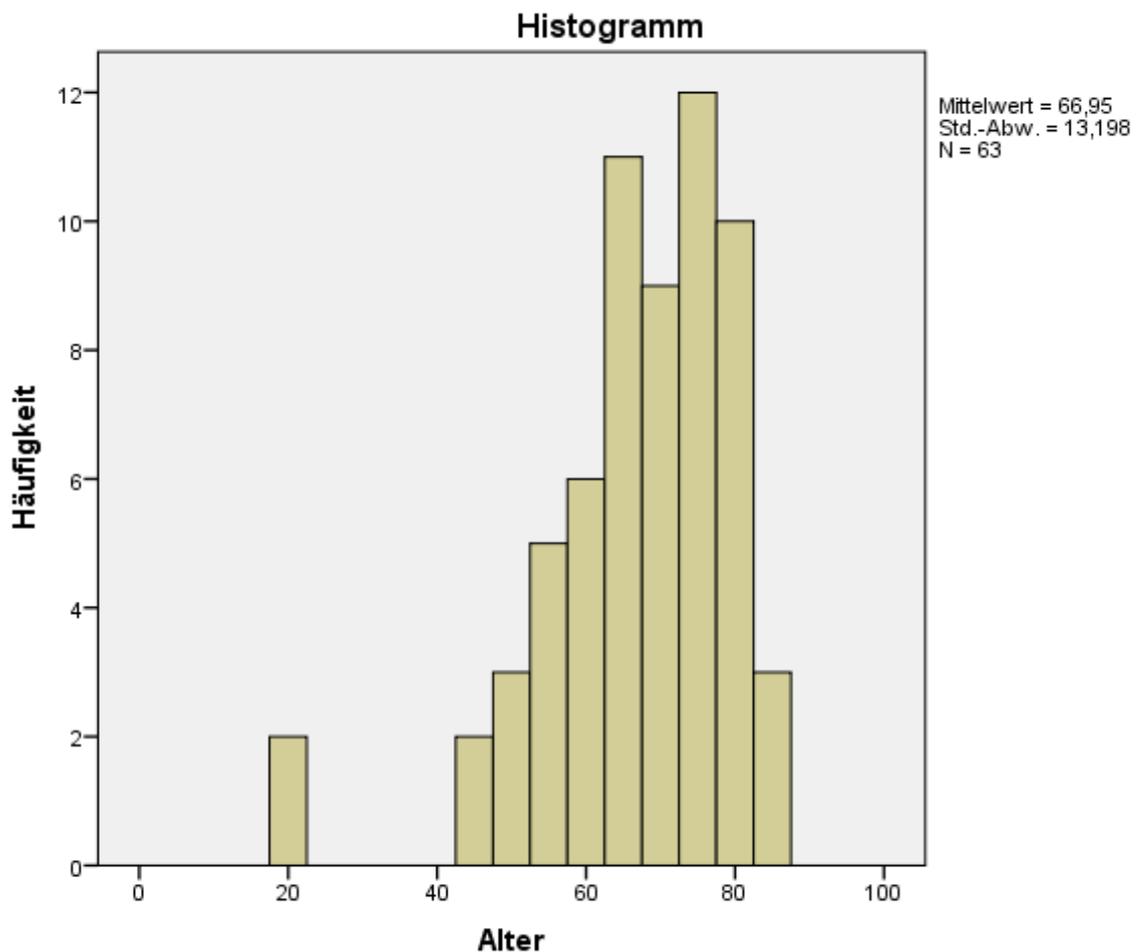


Abbildung 16: Histogramm.

Diese Verteilung des Lebensalters der Organspender war zu erwarten, da Organspender in der Regel gesünder und jünger sind als Patienten, die nicht als Organspender in Frage kommen. Zwar besteht in Bezug auf das Alter bei Augenhornhäuten keine Altersgrenze, jedoch gibt es verschiedene Kriterien, die eine Organspende ausschließen. Generell sind Patienten von einer Organspende ausgeschlossen, die eine maligne Erkrankung oder eine Infektionskrankheit zu Lebzeiten hatten. Da maligne Grunderkrankungen mit höherem Alter positiv korrelieren, sind in der Regel ältere Menschen von einer Organspende ausgeschlossen. Diese Kriterien sind in der Richtlinie zur medizinischen Beurteilung von Organspendern und zur Konservierung von Spenderorganen der Bundesärztekammer nachzulesen (Bundesärztekammer). Bei 6 Patienten (9,5 %) war das Todesalter bis 49 Jahre. In der Altersgruppe von 50 bis 59 waren es 9 Proben (14,3 %), von 60 bis 69 waren es 21 Proben (33,3 %), von 70 bis 79 waren es 17 Proben (27 %) und von 80 und älter waren es 10 Proben (15,9 %).

Um eine Testung auf Normalverteilung durchführen zu können, habe ich die Stichprobe in Altersklassen sortiert.

Altersgruppen klassifiziert					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	... bis 49	6	9,5	9,5	9,5
	50 bis 59	9	14,3	14,3	23,8
	60 bis 69	21	33,3	33,3	57,1
	70 bis 79	17	27,0	27,0	84,1
	80 und älter	10	15,9	15,9	100,0
	Gesamt	63	100,0	100,0	

Tabelle 17: Klassifizierung der Altersgruppen.

Anschließend folgten die Tests auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk.

Tests auf Normalverteilung Signifikanzkorrektur nach Lilliefors						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Altersgruppen klassifiziert	,177	63	,000043	,909	63	,000

Tabelle 18: Tests auf Normalverteilung.

Als Ergebnis zeigte sich, dass die Altersgruppen signifikant zum Niveau $p=0,0043$ % nicht normalverteilt sind.

Bei 49 Stichproben konnte die Postmortemzeit untersucht werden.

Postmortemzeit in Stunden					
N		Mittelwert	Standard- abweichung		
Gültig	Fehlend				
49	14	20,92	9,654		

Tabelle 19: Postmortemzeit in Stunden.

Die Postmortemzeit ist die Zeit in Stunden von der Entnahme bis zur Paraffineinbettung. Im Mittel beträgt die Postmortemzeit 20,92 Stunden mit einer Standardabweichung von 9,654 Stunden.

3.2.4 Statistik zur Stichprobe – Homogenität und Korrelation von Variablen

Kreuztabelle nach den Variablen Altersgruppen und Geschlecht						
			Geschlecht		Gesamt	
			Weiblich	Männlich		
Altersgruppen klassifiziert	... bis 49	Anzahl	2	2	4	
		Erwartete Anzahl	1,4	2,6	4,0	
	50 bis 59	Anzahl	1	6	7	
		Erwartete Anzahl	2,5	4,5	7,0	
	60 bis 69	Anzahl	6	12	18	
		Erwartete Anzahl	6,4	11,6	18,0	
	70 bis 79	Anzahl	8	9	17	
		Erwartete Anzahl	6,1	10,9	17,0	
	80 und älter	Anzahl	3	7	10	
		Erwartete Anzahl	3,6	6,4	10,0	
	Gesamt		Anzahl	20	36	56
			Erwartete Anzahl	20,0	36,0	56,0

Tabelle 20: Kreuztabelle nach den Variablen Altersgruppen und Geschlecht.

Chi-Quadrat-Test			
5 Zellen (50,0 %) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,43			
	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,895 ^a	4	,576
Likelihood-Quotient	3,070	4	,546
Zusammenhang linear-mit-linear	,078	1	,780
Anzahl der gültigen Fälle	56		

Tabelle 21: Chi-Quadrat-Test.

Der Chi-Quadrat-Test ist ein Homogenitätstest, d.h. er prüft, ob zwei Variablen unabhängig sind.

Unabhängig sind die Häufigkeitsverteilungen zweier Variablen, wenn die beobachteten Häufigkeiten mit den erwarteten Häufigkeiten übereinstimmen. Unter der Nullhypothese ist für die Zellen der Tabellen eine zu den Randsummen weitgehend proportionale Häufigkeitsverteilung zu erwarten. Im obigen Fall ist die asymptotische Signifikanz nach dem Chi-Quadrat Test nach Pearson nicht gegeben, d.h. die Nullhypothese kann nicht

abgelehnt werden. Somit sind die Häufigkeitsverteilungen der Altersgruppen nach der Variablen Geschlecht weitgehend proportional, d.h. es findet sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der Altersgruppen nach dem Geschlecht. Somit gibt es keine systematischen Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Altersgruppen nach Geschlecht.

Zudem gibt es keine systematischen Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung des Merkmals Geschlecht nach dem Grading/Klassifizierung.

Kreuztabelle nach den Variablen Geschlecht und Grading/Klassifizierung						
			Geschlecht		Gesamt	
			Weiblich	Männlich		
Grading/Klassifizierung	Kontrolle	Anzahl	9	22	31	
		Erwartete Anzahl	11,1	19,9	31,0	
	Früh	Anzahl	9	10	19	
		Erwartete Anzahl	6,8	12,2	19,0	
	Atrophisch	Anzahl	1	1	2	
		Erwartete Anzahl	,7	1,3	2,0	
	Neovaskulär	Anzahl	1	3	4	
		Erwartete Anzahl	1,4	2,6	4,0	
	Gesamt		Anzahl	20	36	56
			Erwartete Anzahl	20,0	36,0	56,0

Tabelle 22: Kreuztabelle nach den Variablen Geschlecht und Grading/Klassifizierung.

Chi-Quadrat-Test			
4 Zellen (50,0 %) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,71.			
	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,105 ^a	3	,551
Likelihood-Quotient	2,087	3	,555
Zusammenhang linear-mit-linear	,234	1	,629
Anzahl der gültigen Fälle	56		

Tabelle 23: Chi-Quadrat-Test.

Wie oben erwähnt ist die Nullhypothese nicht abzulehnen, d.h. es existiert kein systematischer Unterschied in der Häufigkeitsverteilung des Merkmals Grading/Klassifizierung nach dem Geschlecht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass mit zunehmendem Alter, die Erkrankung an AMD zunimmt.

In meiner Stichprobe habe ich deshalb einen Korrelationstest durchgeführt. Dieser Korrelationstest bestätigte die Abhängigkeit der Erkrankung vom Todesalter in meiner Stichprobe.

Korrelationen zwischen Alter und Grading/Klassifizierung				
			Alter	Grading/ Klassifizierung
Kendall-Tau-b	Alter	Korrelationskoeffizient	1,000	,315**
		Sig. (1-seitig)	.	,001
		N	63	63
	Grading/Klassifizierung	Korrelationskoeffizient	,315**	1,000
		Sig. (1-seitig)	,001	.
		N	63	63
**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (einseitig).				

Tabelle 24: Korrelationen nach den Variablen Alter und Grading/Klassifizierung.

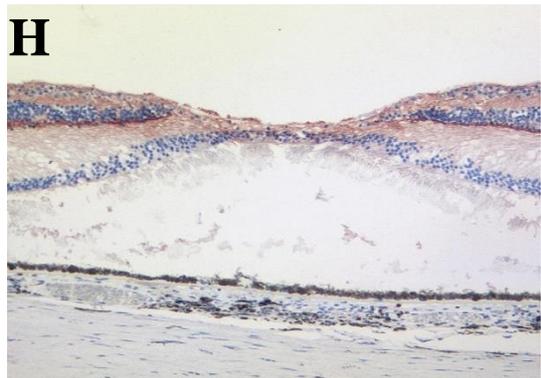
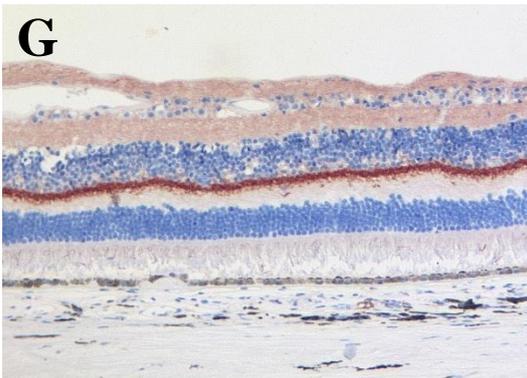
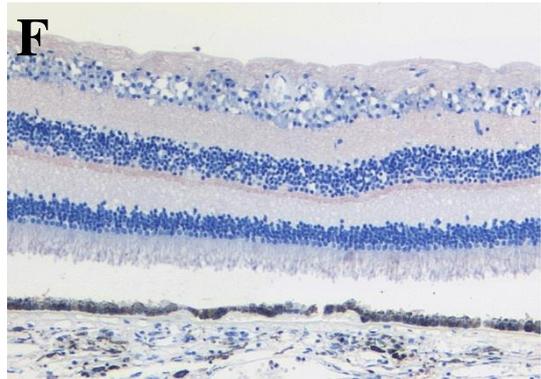
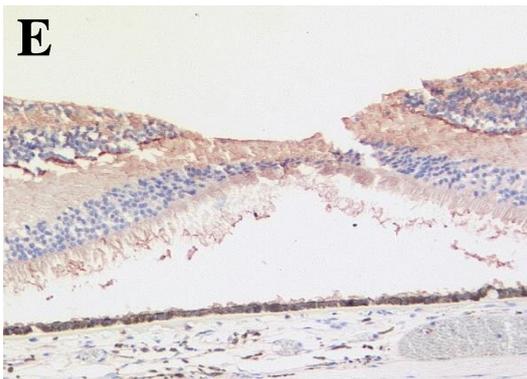
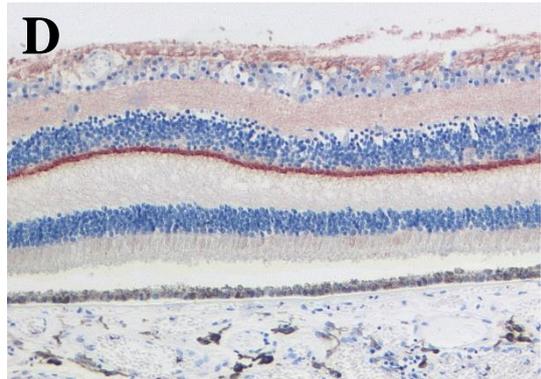
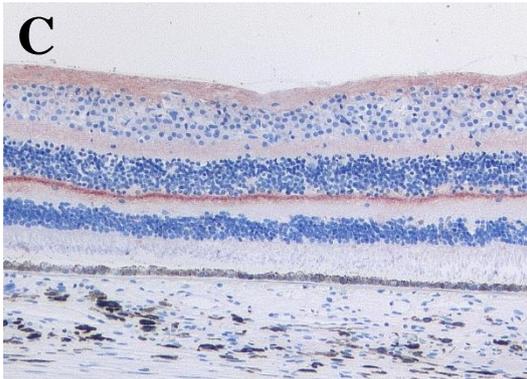
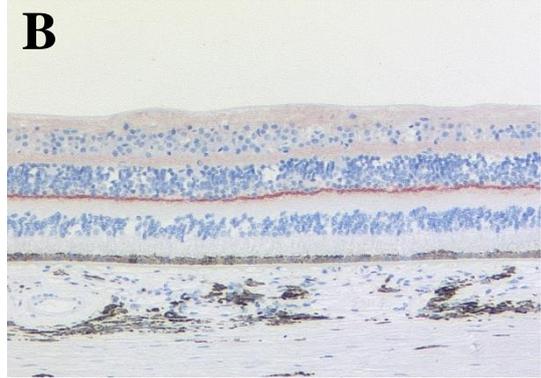
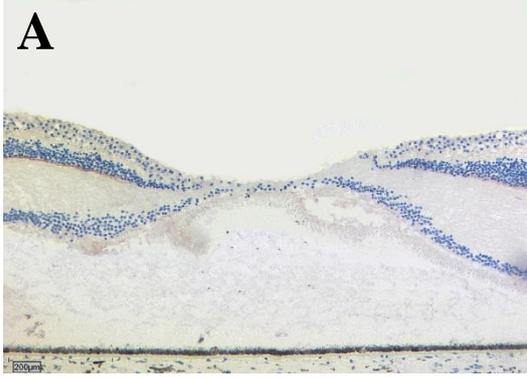
Es wurde ein einseitiger Test verwendet. Dieser Test ergab ein Signifikanzniveau von 0,001, d.h. von 0,1 %. D.h. die Nullhypothese H_0 wird abgelehnt, dass die Variablen unabhängig sind. Es gilt zum Signifikanzniveau 0,1 % die Alternativhypothese, dass die Variablen abhängig sind. Der Korrelationskoeffizient in der Höhe von 0,315 zeigt eine schwache positive Korrelation zwischen den Variablen Todesalter und Grading/Klassifizierung an. Mit höherem Alter geht eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung einher. Die Stichprobe ist bezüglich des Alters und Grading nicht systematisch verfälscht und steht in Übereinkunft mit den Feststellungen aus der Literatur.

In meiner Stichprobe geht also ein höheres Alter mit einem höheren Krankheitsgrad einher.

3.3 Immunhistochemie und Entwicklung

3.3.1 Immunhistochemische Anfärbungen in Bezug auf die drei Antikörper

Zunächst wird C5aR, dann MAC und zuletzt CFI betrachtet.



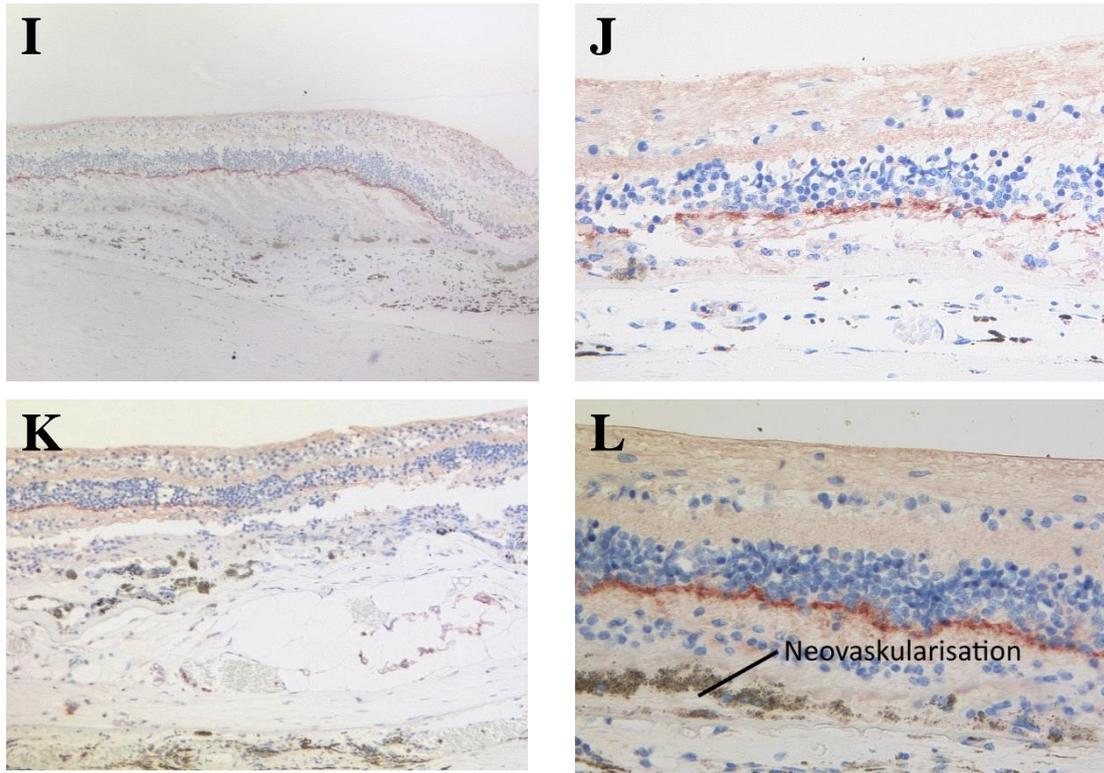


Abbildung 17: Lokalisierung von C5aR in rot. Blau sind die Kerne aufgrund der Hämalaun-Blau Färbung. Besonders stark ist eine Bande in der äußeren plexiformen Schicht angefärbt. (A)-(D) Kontrolle; (E)-(H)Frühe AMD; (I)-(J) Geografische Atrophie; (K)-(L) Neovaskuläre AMD, (A)-(I) sowie (K) Ausschnittvergrößerungen aus Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung. (J) und (L) Ausschnittvergrößerungen aus Aufnahmen mit 200-facher Vergrößerung. (A) Kontrolle. Man sieht die Fovea abgebildet. Am Rande sieht man die typische Anfärbung der Bande in der äußeren plexiformen Schicht. Die Probe stammt von einem mit 68 Jahren verstorbenen Mannes (B) Die Probe stammt von einem mit 22 Jahren verstorbenen Mannes. (C) Die Probe stammt von einem/einer mit 63 Jahren Verstorbenen. Das Geschlecht bei dieser Probe war nicht notiert. (D)Die Probe stammt von einer mit 68 Jahren verstorbenen Frau. Einige Zapfen sind bei dieser Probe angefärbt. (E) Die Fovea ist abgebildet. Die Anfärbung ist insgesamt stark ausgeprägt. Die abgebildeten Drusen sind wie bei allen Proben nicht angefärbt. Die Probe stammt von einer mit 86 Jahren verstorbenen Frau. (F) Die Anfärbung ist eher schwach. Man sieht das die Drusen nicht angefärbt sind. Die Probe stammt von einem/einer 66 Jährigen. Das Geschlecht bei dieser Probe war nicht aufgenommen. (G) Die Probe stammt von einem mit 76 Jahren verstorbenen Mannes. (H) Die Fovea ist abgebildet. Die Probe stammt von einem 83 jährigen Mann. (I) Die Probe stammt von einer mit 57 Jahren verstorbenen Frau. Deutlich ist das degenerierte und rarifizierte RPE sichtbar. (J) Die Probe stammt von einem mit 76 Jahren verstorbenen Mannes. Links im Bild ein degenerierte RPE-Zelle. Die Photorezeptoren sind degeneriert. (K) Es ist deutlich eine Neovaskularisationsmembran zu sehen. Das RPE ist stark degeneriert. Die Probe stammt von einer mit 84 Jahren verstorbenen Frau. (L) Die Neovaskularisationen sind markiert. Die Probe stammt von einer mit 80 Jahren verstorbenen Frau.

Ergebnis: Wie bereits durch die optische Betrachtung der Bilder zu erkennen ist, ist auch mathematisch bei der Auswertung in der äußeren Plexiformen eine Bande am deutlichsten angefärbt. Dies zeigt sich in dem Lageparameter Median und den Perzentilen.

Deskriptive Statistik von CD88/C5aR						
	N		Median	Perzentile		
	Gültig	Fehlend		25	50	75
Nerven-faser-schicht	63	0	,5	,5	,5	,5
Ganglienzell-schicht	63	0	,5	,5	,5	,5
Innere plexiforme Schicht	63	0	,5	,5	,5	,5
Innere Körner-schicht	63	0	,0	,0	,0	,0
äußere Plexiforme Schicht	63	0	1,0	1,0	1,0	2,0
Faserschicht	63	0	,0	,0	,0	,5
äußere Körnerschicht	63	0	,0	,0	,0	,0
Photo-rezeptor-schicht innen	62	1	,0	,0	,0	,5
Retinales Pigment-epithel	62	1	,0	,0	,0	,0
Ader-haut	63	0	,0	,0	,0	,0
Gefäß-wand	62	1	,0	,0	,0	,0

Tabelle 25: Deskriptive Statistik von CD88/C5aR.

3.3.2 Unterschiede der Anfärbungen in Bezug auf das Krankheitsstadium: H-Test von Kruskal und Wallis

Als nächstes wurde die Frage überprüft, ob die Anfärbung in Bezug auf das Krankheitsstadium unterschiedlich ist.

Da die Färbeintensität ordinalskaliert ist, ließ sich beim Vergleich der H-Test von Kruskal und Wallis anwenden. Er prüft die Nullhypothese, dass die Stichproben nach der Variablen Grading/Klassifizierung einer gleichen Grundgesamtheit entstammen.

Als Ergebnis zeigte sich, dass allein die äußere Körnerschicht signifikant zum Niveau $\alpha=0,3\%$. Das heißt, die Nullhypothese ist mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=0,3\%$ abzulehnen. Also ist die Alternativhypothese, dass es sich bei der Stichprobe um verschiedene Grundgesamtheiten nach der Variablen Grading/Klassifizierung handelt. Die Färbeintensität in der Netzhautschicht äußere Körnerschicht ist nach dem Krankheitsstadium unterschiedlich.

Bei allen anderen Schichten wird die Nullhypothese, dass die Stichproben nach der Variablen Grading/Klassifizierung der gleichen Grundgesamtheit entstammen, nicht verworfen. D.h. die Unterschiede in der Färbeintensität sind rein zufällig.

Um zu testen, ob die Färbeintensität zufällig oder nicht zufällig in der äußeren Körnerschicht unterschiedlich in den verschiedenen Gruppen war, wurde ein Kendall-Tau-b Test durchgeführt.

Korrelationen zum Krankheitsstadium				
			Grading/ Klassifizierung	äußere Körnerschicht
Kendall- Tau-b	Grading/Klassifizierung	Korrelationskoeffizient	1,000	,191
		Sig. (1-seitig)	.	,060
		N	63	63
	äußere Körnerschicht	Korrelationskoeffizient	,191	1,000
		Sig. (1-seitig)	,060	.
		N	63	63

Tabelle 26: Korrelationen zum Krankheitsstadium.

Dieser Test ergab ein Signifikanzniveau von 0,06, d.h. von 6 %. D.h. die Nullhypothese H_0 wird beibehalten, dass die Variablen unabhängig sind. Also ist die beobachtete Anfärbung der äußeren Körnerschicht als rein zufällig in Abhängigkeit zum Krankheitsstadium. Gesondert wurden die Drusen betrachtet.

Anfärbung der Drusen					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Keine	47	74,6	74,6	74,6
	keine Anfärbung	16	25,4	25,4	100,0
	Gesamt	63	100,0	100,0	

Tabelle 27: Anfärbung der Drusen.

Die Drusen werden durch den Antikörper gegen CD88/C5aR nicht angefärbt.

3.3.3 Nichtparametrische Tests

3.3.3.1 Mann-Whitney-Test

Ränge nach Mann-Whitney-Test				
	Drusen	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Grading/Klassifizierung	keine Drusen	47	26,88	1263,50
	keine Anfärbung	16	47,03	752,50
	Gesamt	63		

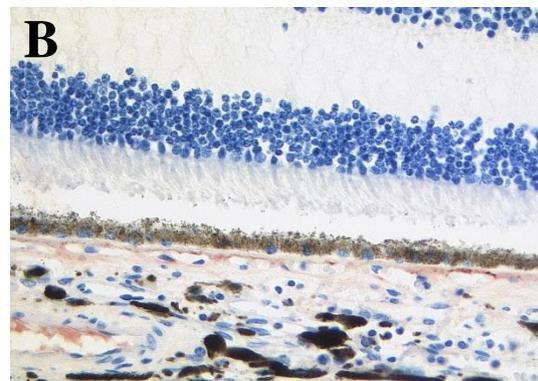
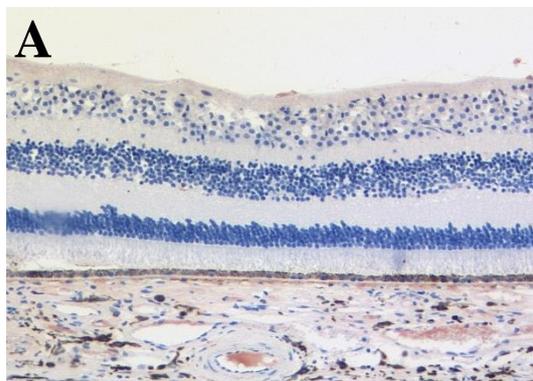
Tabelle 28: Ränge nach Mann-Whitney-Test:

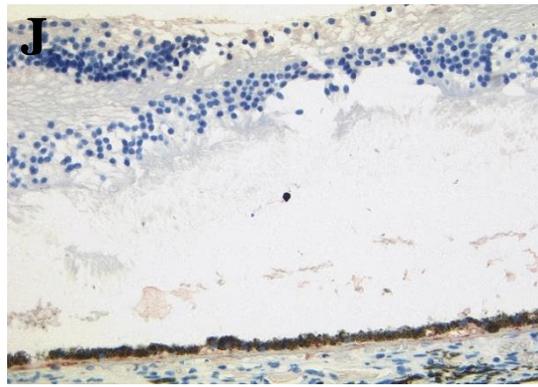
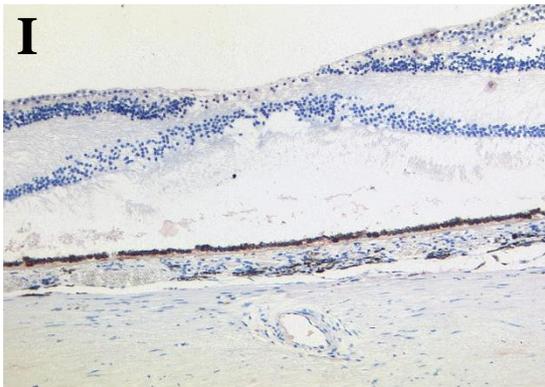
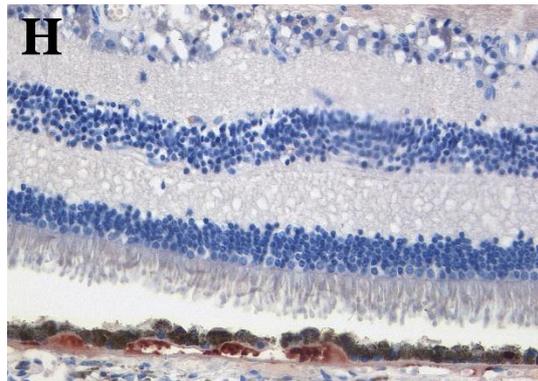
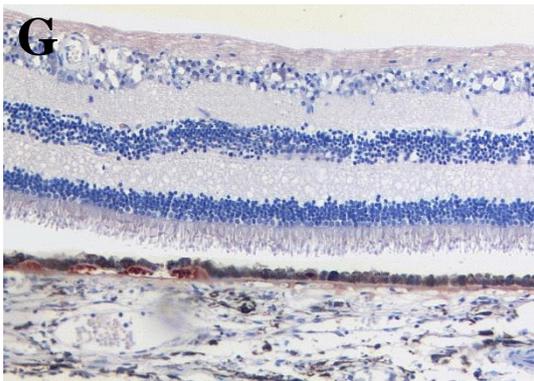
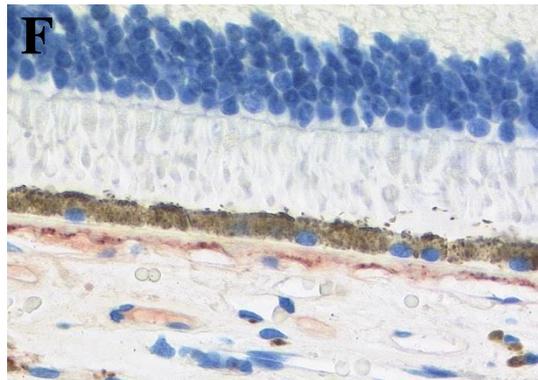
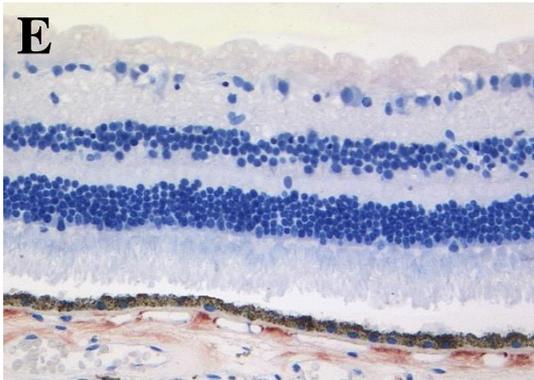
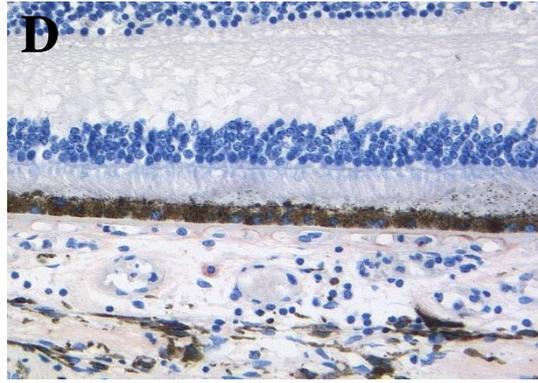
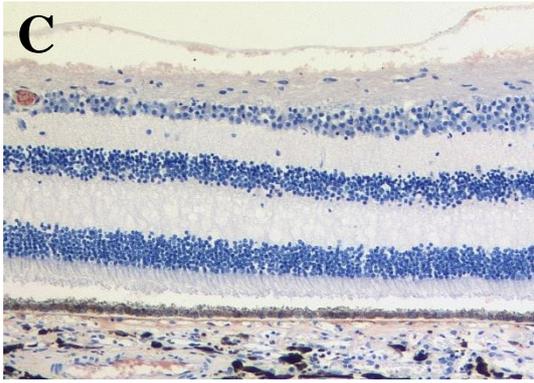
Statistik für Mann-Whitney-Test betreffend Drusen	
	Grading/Klassifizierung
Mann-Whitney-U	135,500
Wilcoxon-W	1263,500
Z	-4,310
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000016

Tabelle 29: Statistik für Mann-Whitney-Test.

Ergebnis: Das Vorhandensein von Drusen ist signifikant zum Niveau $\alpha=0,0016$ %. Das heißt, die Nullhypothese ist mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=0,0016$ % abzulehnen. Also ist die Alternativhypothese anzunehmen, dass es sich bei der Stichprobe um verschiedene Grundgesamtheiten nach der Variablen Drusen handelt. Das Vorhandensein von Drusen ist nach dem Krankheitsstadium unterschiedlich.

3.3.3.2 Deskriptive Auswertung





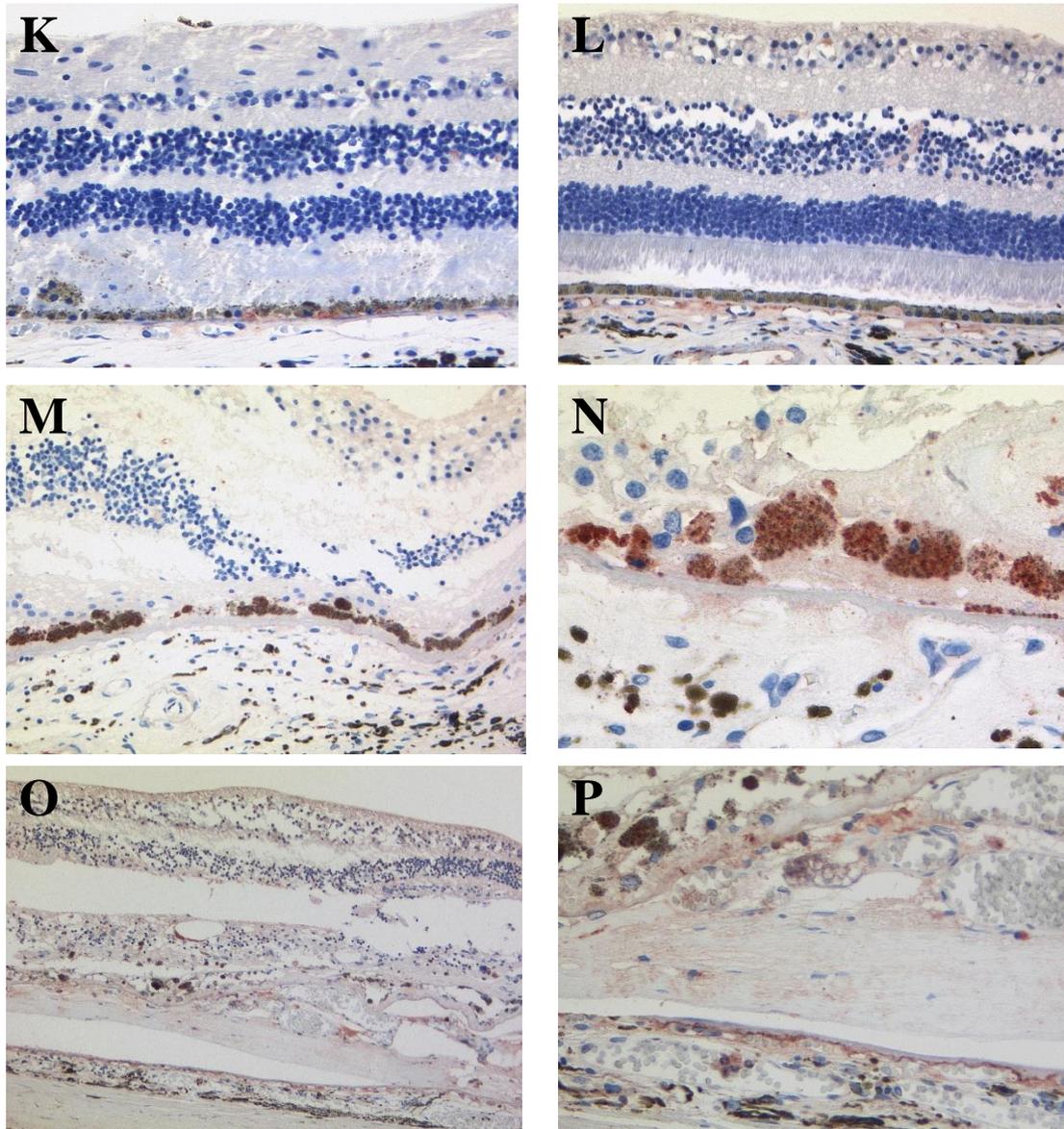


Abbildung 18: Anfärbung des Antikörpers gegen den Membranangriffskomplex A-F Kontrolle; G-L Frühe AMD; M-N Geografische Atrophie; O-P Neovaskuläre AMD (A)-(C), (F)-(I) und (O) Ausschnittvergrößerungen aus Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung. (D), (E), (J)-(M) und (P) Ausschnittvergrößerungen aus Aufnahmen mit 200-facher Vergrößerung. (N) Ausschnittvergrößerung aus Aufnahme mit 400-facher Vergrößerung. (A) Kontrolle. Die Probe stammt von einem mit 59 Jahren Verstorbenen (das Geschlecht war nicht bekannt). Die Interkapillären Säulen und das Gefäßserum ist deutlich gefärbt. Weniger deutlich ist zudem die Nervenfaserschicht gefärbt. (B) Die Probe stammt von einer Frau, die mit 58 Jahren verstorben ist. Die Anfärbung ist bei dieser Kontrolle besonders deutlich in den Choriokapillärwänden zur Netzhaut hin. (C) stammt von der gleichen Patientin wie (B), ist jedoch das Gesamtbild. Wohingegen (B) ein Bildausschnitt ist. (D) Diese Kontrolle stammt von einer mit 60 Jahren verstorbenen Frau. Insgesamt ist die Anfärbung hier schwächer und eher in der Choriokapillaris. (E) Die Probe stammt von einem mit 68 Jahre verstorbenen Mann. In dieser Kontrolle sind die Interkapillären Säulen stärker und die Choriokapillärwände zur Retina hin kaum angefärbt. (F) Ist ein Bildausschnitt von (A). (G) und (H) sind der Frühen AMD zuzurechnen. Sie stammen von einem mit 66 Jahren Verstorbenen. (Das Geschlecht war bei dieser Probe nicht bekannt.) (H) ist ein Bildausschnitt aus (G). Sehr kräftig sind die Drusen angefärbt. Wesentlich deutlicher als die Interkapillären Säulen. (I) und (J) stammen vom gleichen Patienten. (I) ist 100-fach vergrößert (J) 200-fach vergrößert. Sie stammen von einem

mit 83 Jahren verstorbenen Mann. Die Drusen sind deutlich schwächer angefärbt als bei (G)/(H). (K) stammt von einer mit 66 Jahren verstorbenen Frau. Die Drusen sind stärker als die Interkapillären Säulen gefärbt. (L) stammt von einem mit 76 Jahren verstorbenen Mann. In dieser Probe sind die Drusen schwächer gefärbt. (M) und (N) stammen vom gleichen Patienten (männlich, mit 76 Jahren verstorben). Die RPE-Zellen sind deutlich degeneriert. In (N) kann man deutlich eine Anfärbung der RPE-Zellen erkennen. Die Bruch-Membran sieht verdickt aus. Die Interkapillären Säulen erscheinen schwach angefärbt. (O) und (P) stammen vom gleichen Patienten (einer mit 84 Jahren verstorbenen Frau). Zusätzlich zu den Interkapillären Säulen scheinen Bereiche der Neovaskularisationsmembran MAC zu halten.

Ergebnis: Wie bereits optisch zu erwarten, zeigt sich auch bei der deskriptiven Auswertung, dass die Choriokapillarwände, die Pillars und das Serum am Deutlichsten angefärbt sind. Dies ergeben die Lagemaße Median und Perzentile. Die einzelnen Schichten und ihre Anfärbung sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Statistiken zur Anfärbung der Schichten						
	N		Median	Perzentile		
	Gültig	Fehlend		25	50	75
Nervenfasern und Ganglienschicht	62	1	,000	,000	,000	,500
Retinales Pigmentepithel	59	4	,000	,000	,000	,500
Bruch-Membran	54	9	,000	,000	,000	,000
Pillars	60	3	1,000	,500	1,000	1,000
Choriokapillarwände	62	1	2,000	,500	2,000	2,000
Aderhaut	63	0	,000	,000	,000	,500
Serum	63	0	1,000	,000	1,000	1,000
Photorezeptoren	63	0	,000	,000	,000	,000

Tabelle 30: Statistiken zur Anfärbung der Schichten.

3.3.3.3 Unterschiede der Anfärbung der Choriokapillarwände nach dem Krankheitsstadium

Als nächstes wurde betrachtet, ob Unterschiede der Anfärbung nach dem Krankheitsstadium auftreten. Das Serum ist signifikant zum Niveau $\alpha=2\%$. Die Choriokapillarwände sind signifikant zum Niveau $\alpha=4,8\%$. Das heißt, die Nullhypothese ist jeweils mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=2\%$ bzw. $4,8\%$ abzulehnen. Also ist die Alternativhypothese, dass es sich bei der Stichprobe um verschiedene Grundgesamtheiten nach der Variablen Grading/Klassifizierung handelt.

Bei allen anderen Schichten wird die Nullhypothese, dass die Stichproben nach der Variablen Grading/Klassifizierung der gleichen Grundgesamt entstammen, nicht verworfen, d.h. dort sind die Unterschiede in der Färbeintensität rein zufällig.

Statistik für Kruskal-Wallis-Test			
Gruppenvariable: Grading/Klassifizierung			
	Chi-Quadrat	Df	Asymptotische Signifikanz
Nervenfaser und Ganglienschicht	4,602	3	,203
Retinales Pigmentepithel	2,749	3	,432
Bruch-Membran	1,241	3	,743
Pillars	3,293	3	,349
Choriokapillarwände	7,924	3	,048
Aderhaut	1,875	3	,599
Serum	9,810	3	,020
Photorezeptoren	4,009	3	,261

Tabelle 31: Statistik zum Kruskal-Wallis-Test in Bezug auf die Gruppenvariable Grading/Klassifizierung

Korrelationen				
			Grading/ Klassifizierung	Choriokapillar- wände
Kendall-Tau-b	Grading/ Klassifizierung	Korrelationskoeffizient	1,000	-,239*
		Sig. (1-seitig)	.	,020
		N	63	62
	Choriokapillarwände	Korrelationskoeffizient	-,239*	1,000
		Sig. (1-seitig)	,020	.
		N	62	62

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (einseitig).

Tabelle 32: Korrelationen zwischen Grading/Klassifizierung und der Färbeintensität der Choriokapillärwände.

Dieser Test ergab ein Signifikanzniveau von 0,02, d.h. von 2 %. D.h. die Nullhypothese H_0 wird abgelehnt, dass die Variablen unabhängig sind. Es gilt zum Signifikanzniveau 2 % die Alternativhypothese, dass die Variablen abhängig sind. Der Korrelationskoeffizient in der Höhe von -0,239 zeigt eine schwache negative Korrelation zwischen den Variablen Grading/Klassifikation und der Färbeintensität der Choriokapillärwände an. Mit höherem Krankheitsstadium geht eine geringere Wahrscheinlichkeit einer Anfärbung der Choriokapillarwände einher.

Korrelationen des Serums in Bezug auf Grading/Klassifizierung				
			Grading/ Klassifizierung	Serum
Kendall-Tau-b	Grading/ Klassifizierung	Korrelationskoeffizient	1,000	-,184
		Sig. (1-seitig)	.	,065
		N	63	63
	Serum	Korrelationskoeffizient	-,184	1,000
		Sig. (1-seitig)	,065	.
		N	63	63

Tabelle 33: Korrelationen des Serums in Bezug auf Grading/Klassifizierung.

Dieser Test ergab ein Signifikanzniveau von 0,065, d.h. von 6,5 %. D.h. die Nullhypothese H_0 wird beibehalten, dass die Variablen unabhängig sind. Also ist die beobachtete Anfärbung des Serums als rein zufällig in Abhängigkeit zum Krankheitsstadium.

3.3.3.4 Beobachtungen der Drusen beim Antikörper gegen MAC

Drusen					
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Keine	43	68,3	69,4	69,4
	keine Anfärbung	4	6,3	6,5	75,8
	Schwach	8	12,7	12,9	88,7
	Gut	4	6,3	6,5	95,2
	Stark	3	4,8	4,8	100,0
	Gesamt	62	98,4	100,0	
Fehlend	-999,0	1	1,6		
Gesamt		63	100,0		

Tabelle 34: Beobachtungen der Drusen beim Antikörper gegen MAC

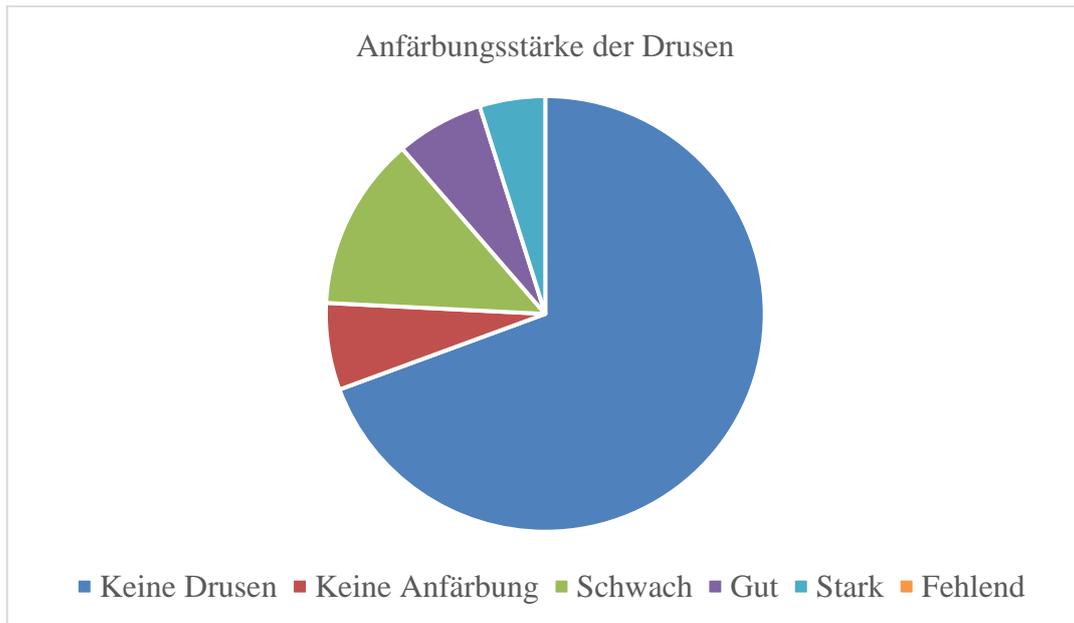


Abbildung 19: Anfärbungsstärke der Drusen.

Der Antikörper gegen MAC färbt die Drusen in unterschiedlicher Färbeintensität an. Deshalb kommt der H-Test nach Kruskal-Wallis in Frage.

3.3.3.5 Kruskal-Wallis-Test für Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen betreffend MAC

Ränge in Bezug auf Kruskal-Wallis-Test			
	Grading/Klassifizierung	N	Mittlerer Rang
Drusen	Kontrolle	35	24,80
	Früh	21	41,17
	Atrophisch	2	22,00
	Neovaskulär	4	44,13
	Gesamt	62	

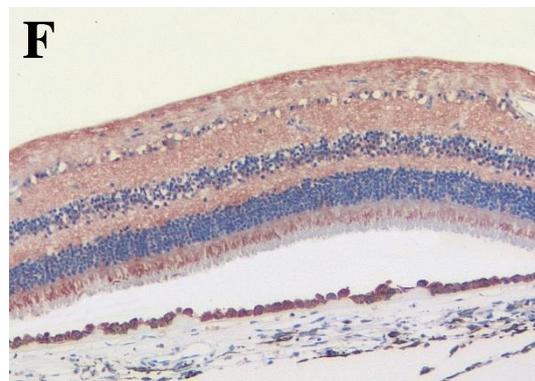
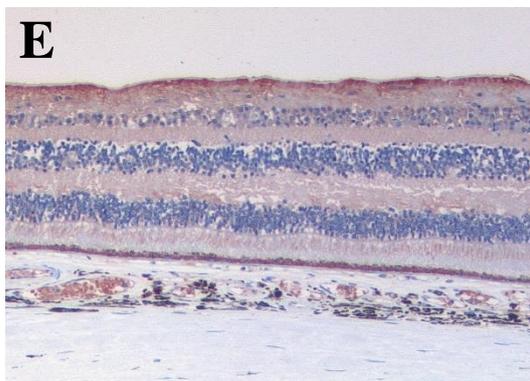
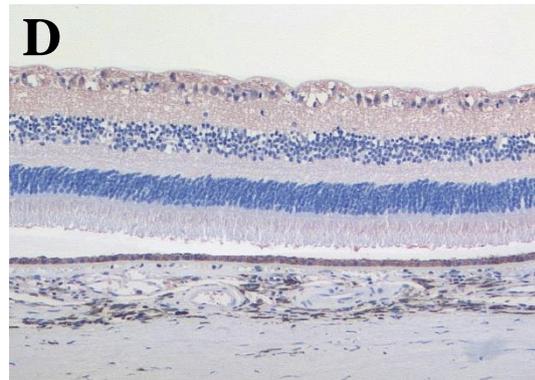
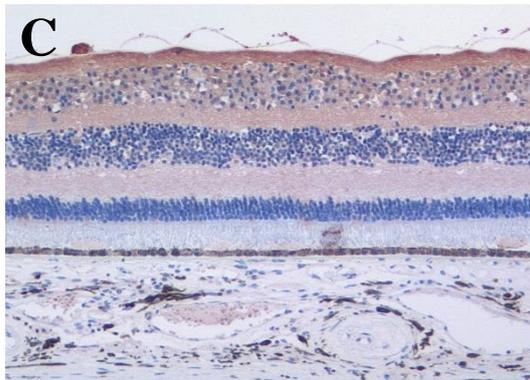
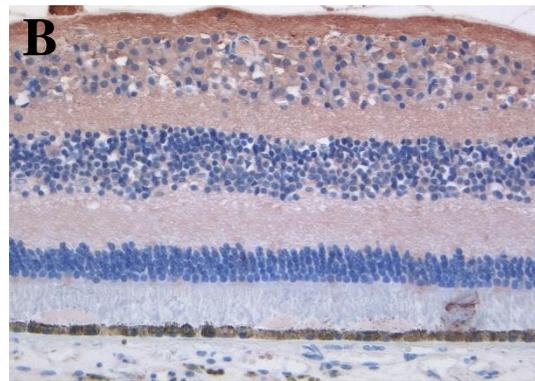
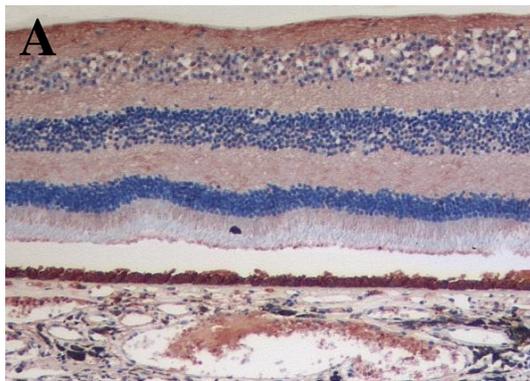
Tabelle 35: Ränge in Bezug auf Kruskal-Wallis-Test.

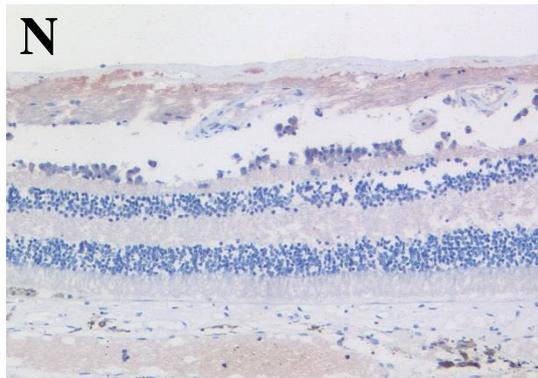
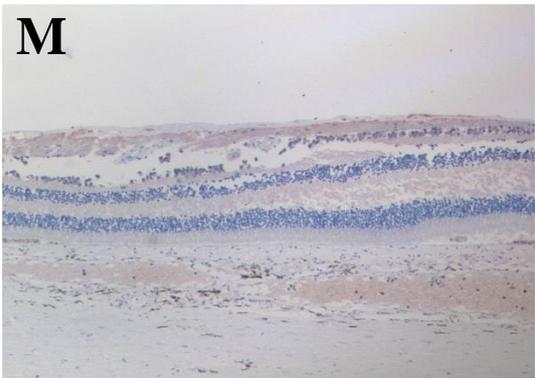
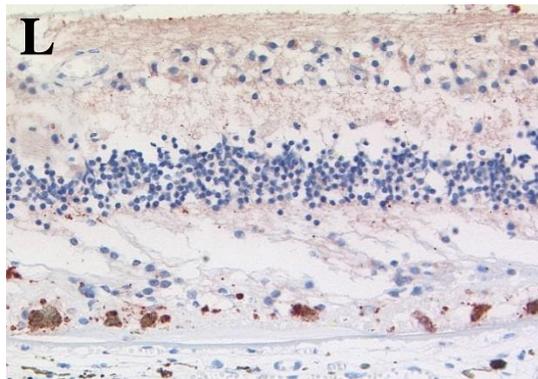
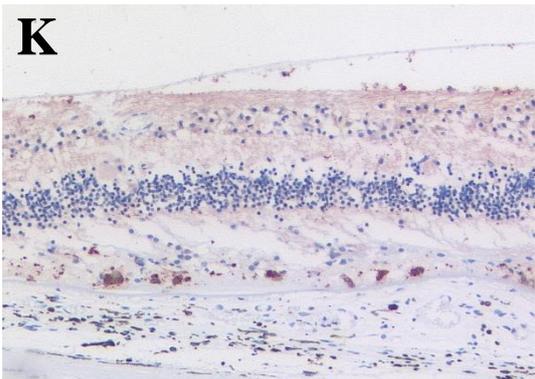
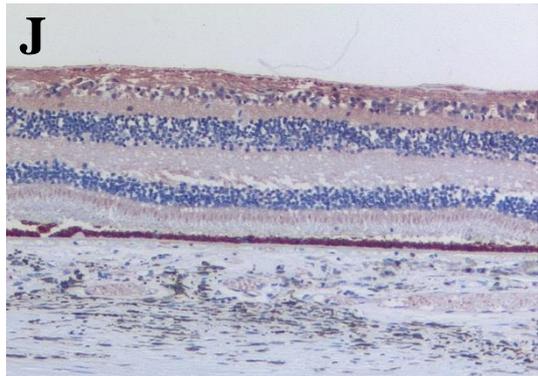
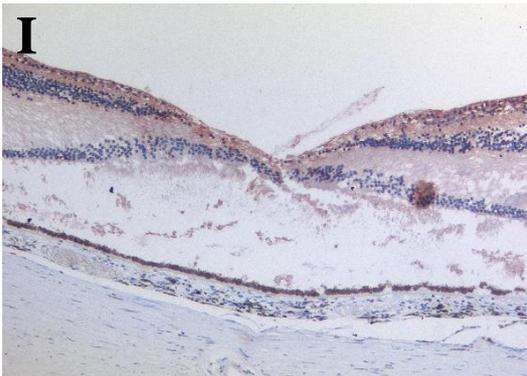
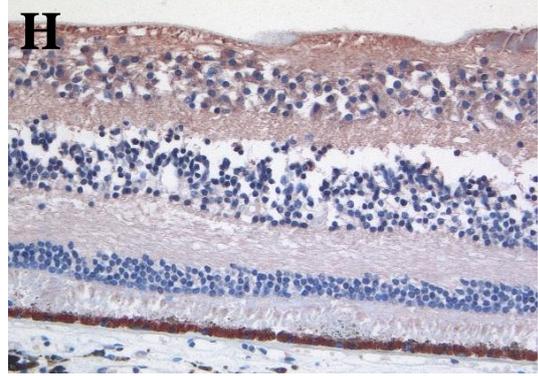
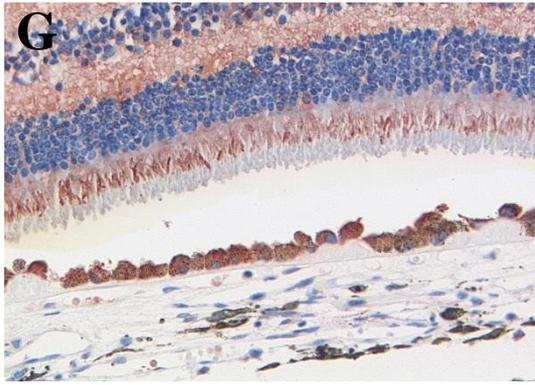
Statistik zum Kruskal-Wallis-Test	
Grading/Klassifizierung	
	Drusen
Chi-Quadrat	20,141
df	3
Asymptotische Signifikanz	,000159

Tabelle 36: Statistik zum Kruskal-Wallis-Test.

Ergebnis: Das Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen ist signifikant zum Niveau $\alpha=0,0159\%$. Das heißt, die Nullhypothese ist mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=0,0159\%$ abzulehnen. Also ist die Alternativhypothese gültig, dass es sich bei der Stichprobe um verschiedene Grundgesamtheiten nach der Variablen Drusen handelt. Das Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen ist nach dem Krankheitsstadium unterschiedlich.

Das zeigt auch die optische Auswertung:





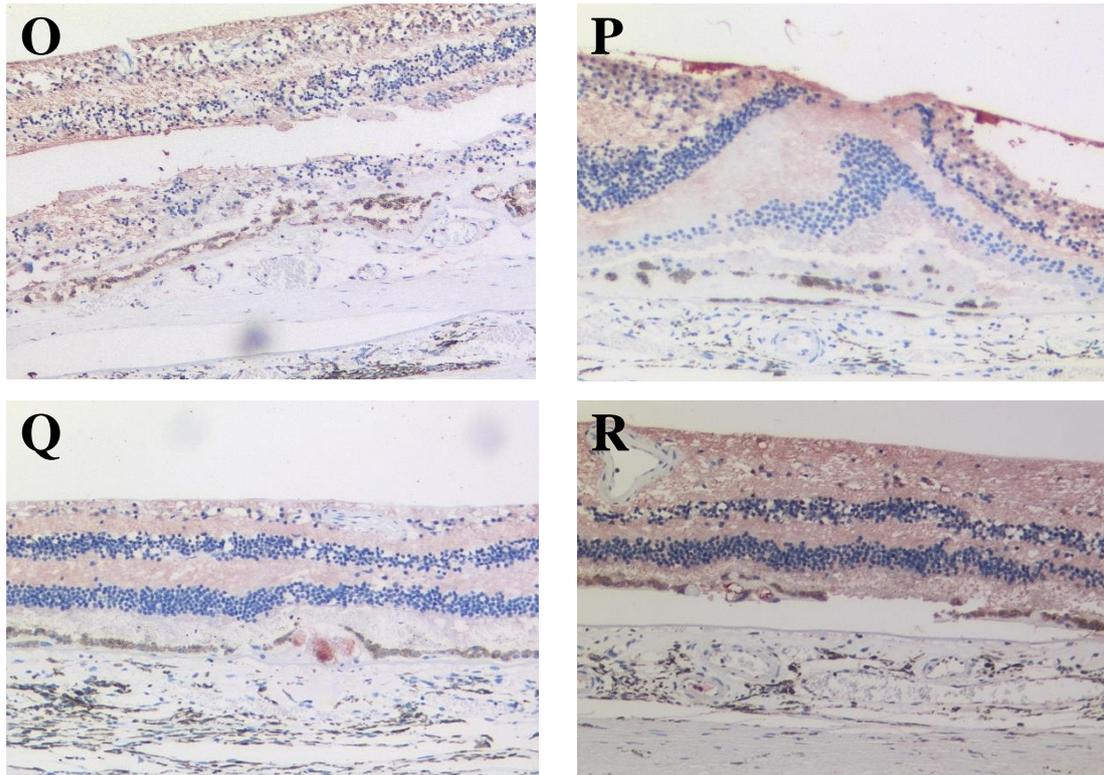


Abbildung 20: Anfärbung des CFI (A)-(E) Kontrolle; (F)-(J) Frühe AMD; (K)-(N) Geografische Atrophie; (O)-(R) neovaskuläre AMD; (A)-(G) und (I)-(R) Ausschnittvergrößerungen aus Aufnahmen mit 100-facher Vergrößerung. (H) Ausschnittvergrößerung aus Aufnahme mit 200-facher Vergrößerung. (A) Bei der Kontrolle (mit 63 Jahren verstorben) sieht man eine deutliche Anfärbung der Neuroretina. Die Innensegmente der Photorezeptoren sind in dieser Probe gar nicht angefärbt. Die Choroidea ist leicht angefärbt. Zudem sind die RPE-Zellen angefärbt (B) In dieser Kontrolle (mit 59 Jahren verstorben) sind die Photorezeptoren, die Choroidea und das RPE im Vergleich zu (A) nicht angefärbt. (C) stammt von der gleichen Probe, zeigt jedoch mehr von der Choroidea. (D) In dieser Kontrolle (mit 65 Jahren gestorben) ist die innere plexiforme Schicht, die Ganglienzellschicht, die Nervenfaserschicht und die Photorezeptorinnensegmente angefärbt. (E) Diese Probe stammt von einer mit 57 Jahren verstorbenen Frau. Die Anfärbung ist insgesamt ähnlich stark wie bei (A). Jedoch ist die Choroidea nicht angefärbt. (F) und (G) stammen von der gleichen Probe (66 Jähriger mit früher AMD). Die Drusen sind nicht angefärbt. Die Neuroretina ist deutlich angefärbt. Lediglich die Photorezeptoraußensegmente sind nicht angefärbt. Das RPE ist angefärbt. (H) Die Probe stammt von einer mit 66 Jahren verstorbenen Frau. Es ist die Nervenfaserschicht, die Ganglienzellschicht, die innere plexiforme Schicht sowie das RPE angefärbt. (I) Abgebildet ist die Fovea Region eines mit 88 Jahren verstorbenen Mannes. Die Drusen sind nicht angefärbt. Es zeigt sich eine Anfärbung der Nervenfaserschicht, der Ganglienzellschicht, der inneren plexiformen Schicht sowie der Photorezeptorinnensegmente. (J) stammt von einem mit 79 Jahren verstorbenen Mann. Auch hier sind die Drusen nicht angefärbt. (K) und (L) stammen von der gleichen Person. (L) ist eine vergrößerter Bildausschnitt aus (K). Sie stammen von einem mit 76 Jahren verstorbenen Mann. Deutlich sind die atrophischen Veränderungen. Die RPE sind deutlich degeneriert. Neuroretina mitsamt RPE sind angefärbt. (M) und (N) stammen ebenfalls von der gleichen Person mit geografischer Atrophie. Über eine weite Strecke ist das RPE nicht mehr vorhanden. Die Probe stammt von einer mit 57 Jahren verstorbenen Frau. Bei dieser Probe zeigt sich die Anfärbung der Ganglienzellschicht und inneren plexiformen Schicht am Deutlichsten. (O) stammt von einer mit 84 Jahren verstorbenen Frau. Innerhalb der Neovaskularisationsmembran zeigen sich keine Anfärbung. Die restliche Neuroretina ist angefärbt. In (P) zeigt sich die Anfärbung am Deutlichsten in der Nervenfaserschicht. Das RPE ist nicht angefärbt. (P), (Q) und (R) stammen von der gleichen Person sind nur unterschiedliche Schnitte. Sie

stammen von einer mit 84 Jahren verstorbenen Frau. Die Neuroretina ist angefärbt. In (Q) scheint innerhalb der Neovaskularisation sich etwas angefärbt zu haben. Jedoch handelt es sich wahrscheinlich um Serum.

Die Statistik zur optischen Auswertung stellt sich folgendermaßen dar:

Statistik zur Anfärbung der Schichten						
	N		Median	Perzentile		
	Gültig	Fehlend		25	50	75
Anfärbung in der Nervenfaserschicht	62	1	1,000	1,000	1,000	2,000
Ganglienzellschicht	62	1	1,000	1,000	1,000	1,250
Innere plexiforme Schicht	62	1	1,000	,500	1,000	1,000
Innere Körnerschicht	62	1	,500	,500	,500	1,000
äußere Plexiforme Schicht	62	1	,500	,500	,500	1,000
äußere Körnerschicht	62	1	,500	,500	,500	1,000
Photorezeptorinnensegmente	59	4	1,000	,500	1,000	1,000
Zapfen	58	5	1,000	,000	1,000	1,000
Stäbchen	56	7	1,000	,000	1,000	1,000
Photoaußen	53	10	,000	,000	,000	,000
Retinales Pigmentepithel	58	5	,500	,500	,500	2,000
Aderhaut	61	2	,500	,000	,500	1,000
Serum	62	1	1,000	,000	1,000	1,000
Gefäßwand	61	2	,000	,000	,000	,500

Table 37: Statistik zur Anfärbung der Schichten.

Ergebnis: Die Stäbchen und Zapfen, die Ganglienzellschicht, die Nervenfaserschicht die innere plexiforme Schicht und das Serum sind nach Beurteilung der Lagemaße Median und Perzential am Deutlichsten angefärbt.

Statistik für Kruskal-Wallis-Test			
Gruppenvariable: Grading/Klassifizierung			
	Chi-Quadrat	Df	Asymptotische Signifikanz
Anfärbung in der Nervenfaserschicht	11,986	3	,007
Ganglienzellschicht	1,701	3	,637
innere plexiforme Schicht	9,620	3	,022
innere Körnerschicht	7,372	3	,061
äußere Plexiforme Schicht	7,830	3	,050
äußere Körnerschicht	7,376	3	,061
Photorezeptorinnensegmente	,314	2	,855
Zapfen	5,065	2	,079

Stäbchen	3,925	2	,140
Photoaußen	3,014	3	,389
Retinales Pigmentepithel	1,752	3	,625
Aderhaut	2,075	3	,557
Serum	3,300	3	,348
Gefäßwand	3,840	3	,279

Tabelle 38: Statistik zum Kruskal-Wallis-Test.

Ergebnis: Die Nervenfaserschicht ist signifikant zum Niveau $\alpha=0,7\%$. Die innere plexiforme Schicht ist signifikant zum Niveau $\alpha=2,2\%$. Die äußere plexiforme Schicht ist signifikant zum Niveau $\alpha=5\%$. Das heißt, die Nullhypothese ist jeweils mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha=0,7\%$, $2,2\%$ und 5% abzulehnen. Also ist die Alternativhypothese gültig, dass es sich bei der Nervenfaserschicht, inneren plexiformen Schicht und der äußeren plexiformen Schicht um verschiedene Grundgesamtheiten nach der Variablen Grading/Klassifizierung handelt.

Bei allen anderen Schichten wird die Nullhypothese, dass die Stichproben nach der Variablen Grading/Klassifizierung der gleichen Grundgesamt entstammen, nicht verworfen. D.h. die Unterschiede in der Farbintensität sind rein zufällig.

Korrelationen zwischen Grading/Klassifizierung und der Anfärbung in der Nervenfaserschicht				
			Grading/ Klassifizierung	Anfärbung in der Nervenfaserschicht
Kendall-Tau-b	Grading/ Klassifizierung	Korrelationskoeffizient	1,000	,022
		Sig. (1-seitig)	.	,426
		N	63	62
	Anfärbung in der Nervenfaserschicht	Korrelationskoeffizient	,022	1,000
		Sig. (1-seitig)	,426	.
		N	62	62

Tabelle 39: Korrelationen zwischen Grading/Klassifizierung und der Anfärbung in der Nervenfaserschicht.

Dieser Test ergibt ein Signifikanzniveau von $0,426$, d.h. von $42,6\%$. D.h. die Nullhypothese H_0 wird beibehalten, dass die Variablen unabhängig sind. Also ist die beobachtete Anfärbung der Nervenfaserschicht rein zufällig in Abhängigkeit zum Krankheitsstadium.

Korrelationen zwischen Grading/Klassifizierung und der Anfärbung in der inneren plexiforma Schicht				
			Grading/ Klassifizierung	Anfärbung in der inneren plexiformen Schicht
Kendall-Tau-b	Grading/ Klassifizierung	Korrelationskoeffizient	1,000	,193
		Sig. (1-seitig)	.	,058
		N	63	62
	Anfärbung in der inneren plexiformen Schicht	Korrelationskoeffizient	,193	1,000
		Sig. (1-seitig)	,058	.
		N	62	62

Tabelle 40: Korrelationen zwischen Grading/Klassifizierung und der Anfärbung in der inneren plexiformen Schicht.

Dieser Test ergibt ein Signifikanzniveau von 0,058, d.h. von 5,8 %. D.h. die Nullhypothese H_0 wird beibehalten, dass die Variablen unabhängig sind. Also ist die beobachtete Anfärbung der Inneren plexiformen Schicht rein zufällig in Abhängigkeit zum Krankheitsstadium.

Korrelationen zwischen Grading/Klassifizierung und der Anfärbung in der äußeren plexiformen Schicht				
			Grading/ Klassifizierung	Anfärbung der äußeren Plexiformen Schicht
Kendall-Tau-b	Grading/ Klassifizierung	Korrelationskoeffizient	1,000	,124
		Sig. (1-seitig)	.	,150
		N	63	62
	Anfärbung der äußeren plexiformen Schicht	Korrelationskoeffizient	,124	1,000
		Sig. (1-seitig)	,150	.
		N	62	62

Tabelle 41: Korrelationen zwischen Grading/Klassifizierung und der Anfärbung in der äußeren plexiformen Schicht.

Dieser Test ergibt ein Signifikanzniveau von 0,150, d.h. von 15 %; d.h. die Nullhypothese H_0 wird beibehalten, dass die Variablen unabhängig sind. Also ist die beobachtete Anfärbung der äußeren plexiformen Schicht rein zufällig in Abhängigkeit zum Krankheitsstadium.

3.3.3.6 Beobachtungen der Anfärbung der Drusen beim Antikörper gegen CFI

Statistik zur Anfärbung der Drusen beim Antikörper gegen CFI		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Fehlende Anfärbung des Präparates	1	1,6	1,6	1,6
	keine	43	68,3	68,3	69,8
	keine Anfärbung	14	22,2	22,2	92,1
	schwach	5	7,9	7,9	100,0
	Gesamt	63	100,0	100,0	

Tabelle 42: Statistik zur Anfärbung der Drusen beim Antikörper gegen CFI.



Bei einem Präparat war keine Anfärbung mit dem Antikörper feststellbar. 43 Präparate hatten keinerlei Drusen. Bei 14 Präparaten zeigte sich keine Anfärbung der Drusen. Lediglich bei 5 Präparaten zeigte sich eine schwache Anfärbung der Drusen.

3.3.3.7 Kruskal-Wallis-Test für Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen betreffend CFI

Ränge in Bezug auf Kruskal-Wallis-Test			
	Grading/Klassifizierung	N	Mittlerer Rang
Drusen	Kontrolle	36	25,03
	Früh	21	42,45
	Atrophisch	2	23,00
	Neovaskulär	4	44,38
	Gesamt	63	

Tabelle 43: Ränge in Bezug auf Kruskal-Wallis-Test.

Statistik für Kruskal-Wallis-Test	
Gruppenvariable: Grading/Klassifizierung	
	Drusen
Chi-Quadrat	21,383
df	3
Asymptotische Signifikanz	,000088

Tabelle 44: Statistik zum Kruskal-Wallis-Test.

Ergebnis: Das Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen ist signifikant zum Niveau $\alpha=0,0088$ %. Das heißt, die Nullhypothese ist mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=0,0088$ % abzulehnen. Also ist die Alternativhypothese gültig, dass es sich bei der Stichprobe um verschiedene Grundgesamtheiten nach der Variablen Drusen handelt. Das Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen ist nach dem Krankheitsstadium unterschiedlich.

3.4 Auswertung

3.4.1 Zusammenfassung der statistischen Auswertung

Wir untersuchten 63 Präparate der Augenbank der Uniklinik Köln. Davon klassifizierten wir 36 als Kontrollen, 21 Präparate als Frühstadium der AMD, 2 Präparate als atrophische Spätform der AMD und 4 Präparate als neovaskuläre Spätform der AMD. Die untersuchten Präparate kamen von 20 Frauen und 36 Männern. Bei 7 Präparaten war das Geschlecht nicht dokumentiert. Das mittlere Todesalter beträgt aufgerundet 67 Jahre bei einer Spanne von 20 bis 86 Jahren. Das Alter der Stichprobe ist nicht normalverteilt.

Es fanden sich keine systematischen Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Altersgruppen nach Geschlecht. Es gab keine systematischen Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung des Merkmals Geschlecht nach dem Grading/Klassifizierung. In der Stichprobe geht ein höheres Alter mit einem höheren Krankheitsgrad einher.

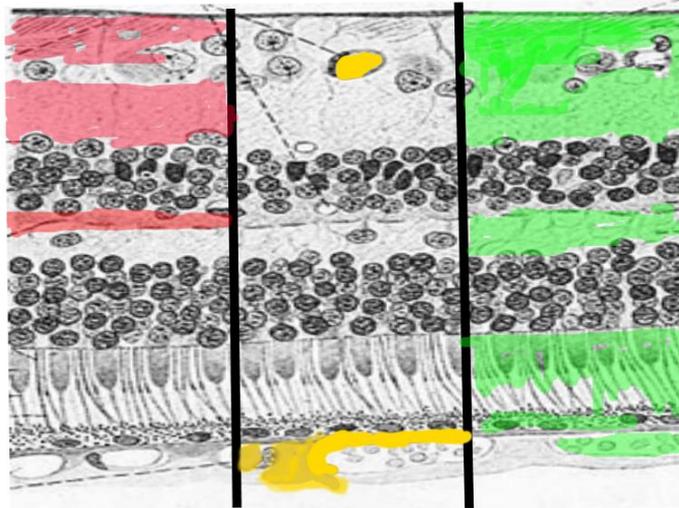


Abbildung 21: Skizze der Anfärbung des C5aR, MAC und CFI. C5aR: rot, MAC gelb, CFI grün. Die Skizze verdeutlicht die typische Anfärbung der verschiedenen Komplementfaktoren.

3.4.2 Auswertung der Anfärbung des Antikörpers gegen CD88/C5aR

Die Anfärbung der meisten Schichten war überwiegend nicht oder schwach ausgeprägt. Allein eine Bande in der äußeren plexiformen Schicht ergibt eine gute bis starke Anfärbung. Dies wurde angezeigt durch das Lagemaß-Median. Um den Einfluss der Krankheitsstadien auf die Anfärbung zu untersuchen, wurden nichtparametrische Tests nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Allein die Färbeintensität in der äußeren Körnerschicht schien unterschiedlich in Bezug auf das Krankheitsstadium zu sein. Bei allen anderen Schichten waren die Unterschiede der Färbeintensität rein zufällig. Eine Korrelationsanalyse ergab, dass die äußere Körnerschicht zufällig und nicht abhängig vom Krankheitsstadium ist. Knapp 75 % (47 Präparate) haben keine Drusen. Die Drusen zeigten keinerlei Anfärbung.

3.4.3 Auswertung der Anfärbung des MAC

Die Pillars, die Choriokapillarwände sowie das Serum waren am Deutlichsten angefärbt. Das Lagemaß-Median ergab eine gute bis starke Anfärbung. Signifikante Unterschiede in der Stichprobe gab es bei den Choriokapillarwänden und dem Serum. Bei den anderen waren die Unterschiede der Anfärbungsintensität nicht unterschiedlich in den verschiedenen Gruppen. Mit höherem Krankheitsstadium ging eine geringere Wahrscheinlichkeit der Anfärbung der Choriokapillarwände einher. Die beobachteten Anfärbungsunterschiede des Serums waren rein zufällig. Bei 15 von 19 Präparaten mit Drusen sind die Drusen angefärbt. Bei 8 Präparaten zeigten die Drusen eine schwache Anfärbung. Bei 4 Präparaten war die Anfärbung gut und bei 3 Präparaten zeigte sich eine starke Anfärbung.

3.4.4 Auswertung der Anfärbung des Antikörpers gegen CFI

Die Stäbchen und Zapfen, die Ganglienzellschicht, die innere plexiforme Schicht und das Serum wurden nach dem Lagemaß-Median am Deutlichsten angefärbt. Bei 9 Proben zeigte das RPE keine Anfärbung. Bei 23 Proben zeigte das RPE eine schwache Anfärbung. Bei 9 Proben zeigte das RPE eine gute Anfärbung und bei 17 Proben war das RPE stark angefärbt. Es handelte sich bei der Nervenfaserschicht, der inneren plexiformen Schicht und der äußeren plexiformen Schicht um verschiedene Grundgesamtheiten. Die Anfärbung der Nervenfaserschicht und der äußeren plexiformen Schicht war rein zufällig unterschiedlich. Bei der inneren plexiformen Schicht ging ein höheres Krankheitsstadium mit einer vermehrten Anfärbung einher. Das Vorhandensein von Drusen und die Färbintensität der Drusen war nach dem Krankheitsstadium unterschiedlich. Bei einem Präparat war keine Anfärbung mit dem Antikörper feststellbar. 43 Präparate hatten keinerlei Drusen. Bei 14 Präparaten zeigte sich keine Anfärbung der Drusen. Lediglich bei 5 Präparaten zeigte sich eine schwache Anfärbung der Drusen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wir mithilfe der Immunhistochemie den Membranangriffskomplex, den Rezeptor von C5a und einen Regulator des Komplementsystems, CFI, vergleichend in gesunden humanen Spenderaugen und AMD-Augen untersuchen. Wir konnten alle drei in der Retina lokalisieren. Anhand der Lokalisierung in der Netzhaut und Aderhaut lassen sich Rückschlüsse auf die Beteiligung der untersuchten Moleküle im Krankheitsgeschehen der AMD ziehen.

Epidemiologisch finden sich in Deutschland bei Patienten mit fortgeschrittener AMD zu 85 % die atrophische Spätform und zu 15 % die neovaskuläre AMD (siehe Einleitung, Kap. 1.2.1). In der vorliegenden Stichprobe hat sich eine andere Verteilung der Spätform ergeben. In der vorliegenden Stichprobe war ein Drittel der Spätform atrophisch und 2/3 neovaskulär.

Bei anti-C5aR ließ sich in allen Proben eine Färbung in dem apikalen Teil der äußeren plexiformen Schicht nachweisen. Zwischen den verschiedenen Klassifizierungstypen – Kontrolle, frühe AMD und späte AMD – konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Eine sehr leichte Anfärbung zeigte sich zudem in der inneren plexiformen Schicht sowie in der Nervenfaserschicht. Die Drusen zeigten keinerlei Anfärbung.

Die Anfärbung in dem apikalen Teil der äußeren plexiformen Schicht war in der Literatur bis dato noch nicht beschrieben.

Skeie et al. fanden in ihren immunhistochemischen Untersuchungen bezüglich C5aR eine andere Lokalisation der Anfärbungen.

Skeie et al. testeten anti-C3aR und anti-C5aR Antikörper an humanen Spenderaugen. Sie benutzten dazu einen Antikörper von Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology) 4 µg/mL und zusätzlich einen anti-C5aR von Mäusen (AbD Serotec, Raleigh, NC) 5 µg/mL.

Skeie et al. fanden, dass anti-C5aR Antikörper an den choroidalen Gefäßen und an der basalen Oberfläche des RPE zu finden waren. Wohingegen sie für anti C3aR keinen Nachweis in der Retina und Choroidea finden konnten (Skeie, Fingert, Russell, Stone, & Mullins, 2010).

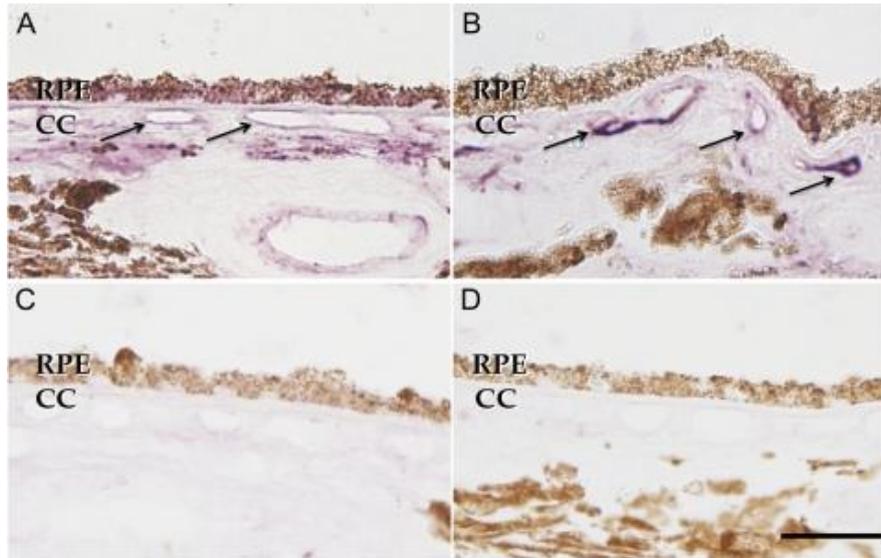


Abbildung 22: C3aR und C5aR Immunhistochemisch. (A, B) Menschliche Gewebeschnitte mit zwei verschiedenen anti-C5aR Antikörpern. C5aR war am RPE und den Endothelzellen in der Choriokapillaris lokalisiert (Pfeile). Es gab keine Färbung bei dem anti-C3aR Antikörper (C). (D) Kontrollgewebe CC, Choriokapillaris. Skala, 25 µm (Skeie et al., 2010).

Bei den vorliegenden Präparaten zeigten sich jedoch keine Anfärbungen an den choriodalen Gefäßen oder am RPE.

Nozaki et. al. konnten C3a und C5a mittels Immunhistochemie in Drusen und in der Bruch-Membran in einem Auge eines Patienten mit AMD nachweisen, wohingegen in einem Kontrollauge weder C3a noch C5a nachgewiesen wurden (Nozaki et al., 2006).

Den anti-C5aR konnten wir in Drusen nicht nachweisen. Somit scheint in Drusen zwar C5a vorhanden, jedoch nicht sein Rezeptor. Der C5aR stimuliert unter anderem die „Chemotaxis, verbesserte Zelladhäsion, vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen und die Freisetzung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren“ (*Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis*, 2006).

Die vorliegende Lokalisierung des C5a-Rezeptors zeigt, dass innerhalb der Retina der wichtigste entzündungsfördernde Komplementeffektor über seinen Rezeptor wirken kann. Es findet eine Signaltransduktion statt. Wir konnten zeigen, dass sich der C5aR in einer Bande der äußeren plexiformen Schicht angrenzend zur inneren Körnerschicht besonders deutlich nachweisen lässt. Denkbar ist, dass es sich dabei um die in dieser Schicht vorhandenen Horizontalzellen handelt. Denkbar ist, dass eine Freisetzung von

Entzündungsmediatoren oder Chemotaxis in der äußeren plexiformen Schicht möglich ist.

Ob die Horizontalzellen oder andere Zellen den C5aR auf ihrer Oberfläche haben, könnte man mithilfe von Proteomanalysen an einzelnen Zellen dieser Schicht herausfinden. Zusätzlich wäre aufschlussreich, welche Zellen C5aR transkribieren. In einer PCR an humanen Augen konnten Skeie et al. zeigen, dass Transkripte für C5aR in Retina und Choroidea nachweisbar sind. Im Gegensatz zu C3aR Transkripten, die sie nicht in der Retina oder im Choroidea nachweisen konnten (Skeie et al., 2010). C3aR- und C5aR-Signale scheinen wichtig für eine normale Retinafunktion zu sein, da sie involviert sind in retinaler Reparatur und Regeneration (Kawa et al., 2014).

Nachfolgend einige weitere Erkenntnisse zum C5a Rezeptor:

Skeie et al. konnten zeigen, dass die Stimulation des C5a-Rezeptors in menschlicher Choroidea zur Monozyten-Rekrutierung durch ICAM-1 expression führte (Skeie et al., 2010).

ICAM-1 ist ein Typ 1 Transmembranprotein mit der Hauptrolle zirkulierende Monozyten und Makrophagen zu rekrutieren (Whitmore et al., 2015). ICAM-1 wird auch innerhalb der external limiting membrane in der Retina exprimiert und in den Photorezeptoren im Endstadium der AMD (Mullins, Skeie, Malone, & Kuehn, 2006).

Genetisch getestete Varianten für C3aR und C5aR (C5R1 und C3Ar1) konnten in einer Assoziationsstudie nicht in Zusammenhang mit AMD gebracht werden (Skeie et al., 2010).

Bioaktive Fragmente der Komplementkomponenten C3a und C5a sind, wie bereits oben erwähnt, in Drusen von AMD-Patienten nachgewiesen worden (Nozaki et al., 2006). Zudem konnten Nozaki et al. nachweisen, dass C3a und C5a im Maus Modell bei Laser-induzierter neovaskulärer AMD früh generiert werden (Nozaki et al., 2006), genetische Ablation von C3a- und C5a-Rezeptoren die VEGF-Expression senken sowie die Leukozytenrekrutierung senken und die Bildung der neovaskulär-ähnlichen Ausbildung nach Laserschaden senken und zusätzlich eine pharmakologische Blockade der Rezeptoren die neovaskulär-ähnliche Form reduzieren (Nozaki et al., 2006).

Der C3aR bindet nur C3a, wohingegen der C5aR sowohl C5a und das degradierte C5adesArg erkennt (Ricklin et al., 2010).

Zusätzlich zum C5aR wurde C5L2 entdeckt, welches wohl auch C5adesArg und C5a binden kann (Cain & Monk, 2002; Okinaga et al., 2003).

Durch C3aR und C5aR Signalwege werden Toll like Rezeptoren zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF, Il-1 β und Il-6) angeregt (X. Zhang et al., 2007).

Diese Zytokine spielen wiederum eine Rolle in der Differenzierung bestimmter T-Zellen (Ricklin et al., 2010).

Liu et al. konnten zeigen, dass C5a expression IL 22 und IL17 von humanen CD4+ t Zellen fördert und vor der Apoptose der T-Zellen schützt (Liu et al., 2011). Und diese beiden Interleukine waren in Blutleveln von AMD-Patienten erhöht im Vergleich zu Nicht-AMD-Patienten (Liu et al., 2011). Daraus schlussfolgerten sie, dass beide Interleukine möglicherweise im Entzündungsgeschehen in der AMD mit beteiligt sind (Liu et al., 2011).

Beim anti-Mac konnten wir eine Anfärbung der Interkapillaren Säulen (Pillars) und Choriokapillarwänden feststellen. Statistisch waren bei der späten AMD die Anfärbung der Choriokapillarwände schwächer ausgeprägt als bei Kontrollen. Das Gefäßendothel sowie das Serum in den Gefäßen färbten sich nahezu immer an. Drusen waren in unterschiedlicher Färbeintensität angefärbt. Bei 15 von 19 Präparaten mit Drusen sind die Drusen angefärbt. Bei 8 Präparaten zeigten die Drusen eine schwache Anfärbung. Bei 4 Präparaten war die Anfärbung gut und bei 3 Präparaten zeigte sich eine starke Anfärbung. Die von uns gefundene Anfärbung der Drusen deckt sich mit anderen Untersuchungen so z.B. (Skeie et al., 2010). Insgesamt wirkte die Anfärbung bei den Proben, die als Spätformen klassifiziert waren, stärker und diffuser.

Der Membranangriffskomplex konnte histologisch in Drusen gefunden werden (Mullins, Russell, Anderson, & Hageman, 2000).

In Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte anti-C5b-9 in der Bruch-Membran und um die Choriokapillaris herum gefunden werden (Skeie et al., 2010).

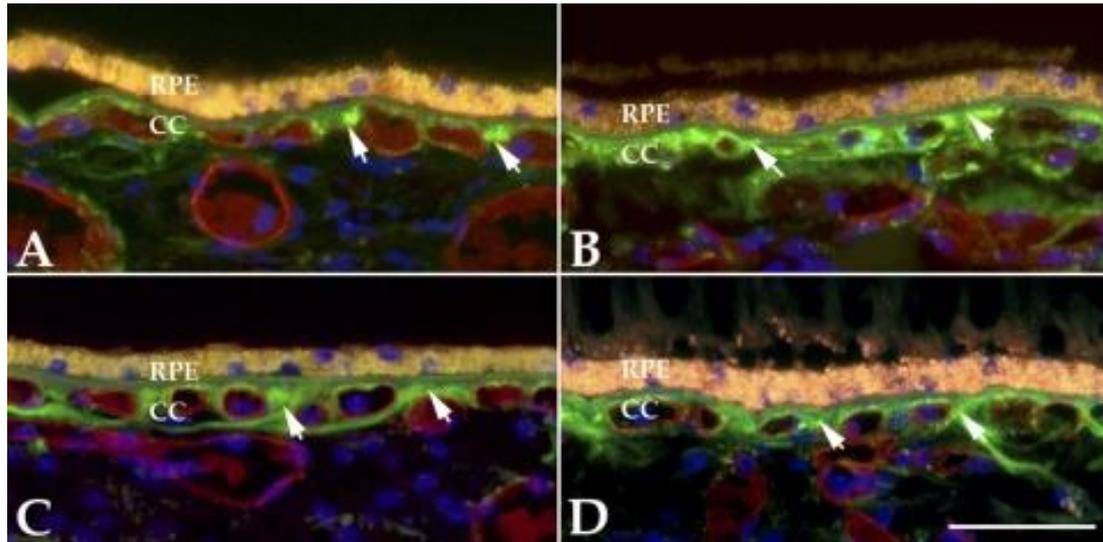


Abbildung 23: Lokalisierung vom Membranangriffskomplexes in humanen Augen. Der C5b-9 Komplex (Pfeile, grün) ist anwesend in der Bruch-Membran und um die Choriokapillaris herum, wo sie möglicherweise die choroidalen Endothelzellen beeinflussen. Rotes Fluoreszenz repräsentiert UEA-1 Lektin. (A-D) Schnitte von 4 Spendern. (B) 93-Jähriger mit früher AMD (klinisch soft drusen). Die gelbe Anfärbung im Bereich des RPE sichtbar entspricht Lipofuszin. Skala 50 μ m (Skeie et al., 2010).

Auch Seth et al. untersuchten C5b-9 immunhistochemisch und fanden die stärkste Anfärbung in der Bruch-Membran und den interkapillären Säulen. Drusen waren bei ihnen auch angefärbt (Seth, Cui, To, Kwee, & Matsubara, 2008). Sie benutzten einen monoklonalen Maus anti-Human C5b-9 Clon aE11 (1:100; Dako, Glostrup, Denmark).

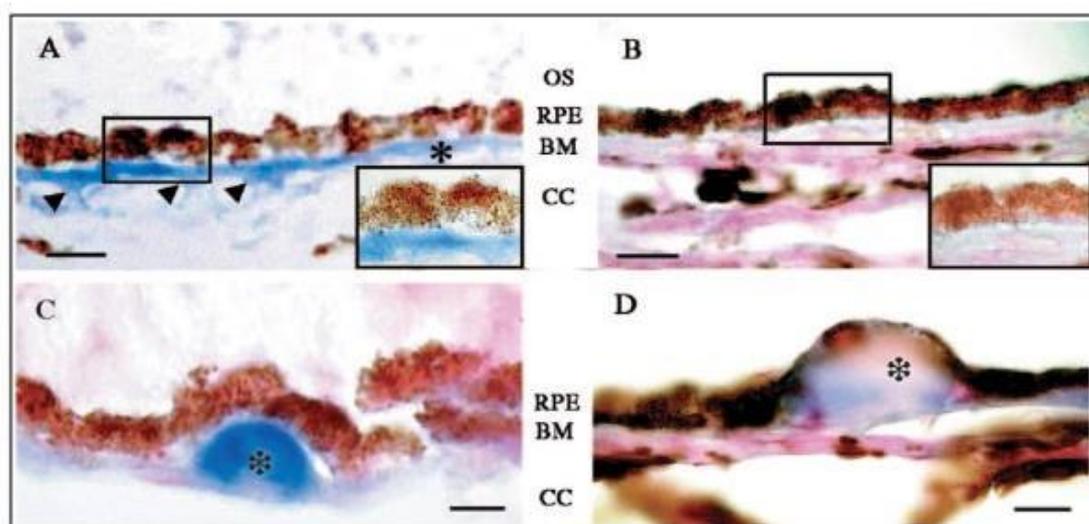


Abbildung 24: (A) Repräsentative Immunreaktion von Gewebe aus älterer Spendergruppe. Blaue Reaktion zeigt eine positive Immunreaktion für den Membranangriffskomplexes, C5b-9. Besonders die Bruch-Membran (Pfeile) und die Interkapillären Säulen (Sterne) färben sich stark an. Die basale Seite der RPE-Zellen war schwach immunreaktiv für C5b-9 (Vergrößerung). (B) Hintergrund Anfärbung wird festgestellt bei Geweben von einer jüngeren Spendergruppe.

(C), (D) Drusen (Sterne) wurden in der älteren Spendergruppe gefunden. Alle Drusen waren stark angefärbt bei C5b-9. RPE-Zellen zeigten keine bläuliche Anfärbung. Die Kryoschnitte waren mit neutralen rot angefärbt. Resultierend ist eine leichte Pink Anfärbung der Chorioidea und des RPE. Das RPE bei (D) ist braun aufgrund endogenem Pigment (Seth et al., 2008).

Die oben dargestellten Ergebnisse decken sich größtenteils mit unseren Ergebnissen. Jedoch fanden wir nicht in allen Drusen eine starke Anfärbung des anti-MAC. Laut Skeie et al. könnte die Anfärbung der Choriokapillarwände ein Hinweis sein, dass der MAC die choroidalen Endothel Zellen beeinflussen könnte.

Die vorliegende Lokalisierung des Membranangriffskomplexes zeigt, dass die Komplementkaskade in den retinalen Pigmentepithelzellen bis zur Bildung des Membranangriffskomplexes abgelaufen ist. Wir haben den Membranangriffskomplex bei allen Augen im intravasalen Bereich der Choriokapillaris gefunden. Normalerweise vermittelt der Membranangriffskomplex eine Lyse. In einigen Präparaten zeigten die RPE-Zellen eine Anfärbung.

Es ist bemerkenswert, dass der Membranangriffskomplex in gesunden Augen im Bereich der intervaskulären choroidalen Stroma zu finden ist und bei der späten AMD die Anfärbung der Choriokapillarwände schwächer ausgeprägt ist als bei Kontrollen. Möglicherweise kommt es zu einem Verlust des MAC in den Choriokapillarwänden. Die schwächere Anfärbung der Choriokapillarwände bei AMD im Gegensatz zu Kontrollen könnte auf einen möglichen Verlust der Regulierung bei AMD durch den MAC-Komplex hindeuten. Dies steht im Kontrast zu bisherigen Annahmen.

Im Bereich der Makula, besonders bei älteren Personen mit AMD wurde der MAC gefunden (Hageman et al., 2005) vgl. (Khandhadia et al., 2012). Laut Chirco et al. kommt es in der alternden Choriokapillaris zu einer Akkumulation des MAC, welches in einer Komplement vermittelten Lyse resultiert und der Hauptgrund für die AMD assoziierte Choriokapillardegeneration sei (Chirco, Sohn, Stone, Tucker, & Mullins, 2017).

Hageman et al. nennen CFH und C3d mit dem Membran-Angriffs-Komplex häufig colokalisiert (Hageman et al., 2005). Fett et al. konnten für CFH eine moderate bis starke Färbung in Drusen in Augen mit früher AMD nachweisen. In den Kontrollen fanden sie stärkere Anfärbung von CFH im Vergleich zu AMD-Augen im Bereich der choroidalen Kapillarwände sowie in den interkapillären Säulen bis zur Bruch-Membran (Fett et al.,

2012). Dies bestärkt die Annahme von Hageman et al., dass CFH und der MAC colokalisiert sind.

In einem Mausmodell wurde in Bezug auf die neovaskuläre AMD gezeigt, dass C6-Antikörper die Bildung des MAC-Komplexes und die Neovaskularisation nach Laserinduziertem Schäden verhindern konnten (Khandhadia et al., 2012). Ein bestimmter C7-Haplotyp konnte in Patienten mit zumindest einem Y402H Allel ermittelt werden, der mit einem reduzierten Risiko an neovaskulärer AMD zu erkranken, einherging (Dinu, Miller, & Zhao, 2007).

Der CFI-Antikörper färbte die gesamte Retina. Der CFI ließ sich bei unseren Auswertungen am Deutlichsten in den Stäbchen und Zapfen, der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht lokalisieren. Bei 9 Proben zeigte das RPE keine Anfärbung. Bei 23 Proben zeigte das RPE eine schwache Anfärbung. Bei 9 Proben zeigte das RPE eine gute Anfärbung und bei 17 Proben war das RPE stark angefärbt. Die beobachteten Unterschiede in der Anfärbung der Nervenfaserschicht und der äußeren plexiformen Schicht sind rein zufällig. Bei der inneren plexiformen Schicht geht ein höheres Krankheitsstadium mit einer vermehrten Anfärbung einher. Das Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen ist unterschiedlich. Bei einem Präparat war keine Anfärbung mit dem Antikörper zu verzeichnen. 43 Präparate hatten keinerlei Drusen. Bei 14 Präparaten zeigte sich keine Anfärbung der Drusen. Lediglich bei 5 Präparaten zeigten sich schwache Anfärbungen der Drusen.

Unsere Lokalisierung von CFI in der Retina und Choroidea zeigt, dass die Komplementkaskade innerhalb der Retina inhibiert wird. Obwohl CFI mit CFH zusammenwirken, konnten wir zeigen, dass sie doch an unterschiedlichen Stellen in der Retina lokalisiert sind. Im Gegensatz zu den anderen Komplementinhibitoren, die hauptsächlich im Bereich der Choriokapillaris wirken, ist CFI in der gesamten Retina lokalisiert. Denkbar ist, dass sich die Retina vor dem Ablauf der Komplementkaskade CFI vermittelt schützt. Verwunderlich ist, dass die Anfärbungen in den Drusen unterschiedlich waren.

4.1 Zusammenfassung weiterer Erkenntnisse

Laut Wang et al. könnte die Regulation durch CFI in den Augen der AMD-Patienten verändert sein. Sie fanden, dass die Drusenkomponente amyloid beta CFI binden kann und die Funktion von CFI reduzieren kann und stellten die Hypothese auf, dass es möglicherweise dadurch zur chronischen Entzündung kommen könnte (J. Wang et al., 2008).

Von Kociok and Jousen wurde gezeigt, dass proliferierende RPE-Zellen, wie sie auch in der frühen AMD vorkommen, eine erhöhte Expression von CFI aufweisen (Kociok & Jousen, 2010).

Khandadia et al. vermuten, dass die RPE Hypertrophie ein Resultat der Entzündung sein könnte und erhöhte CFI Produktion als kompensatorischer Versuch zu werten sein könnte (Khandhadia et al., 2012).

Systemische Level von CFI waren nicht verändert bei AMD-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen (Reynolds et al., 2009). In einer neueren Studie von Altay et al. konnte gezeigt werden, dass die C3a-Konzentration im Kammerwasser von AMD-Patienten mit früher ($p=0,016$), mittlerer ($p=0,003$) und neovaskulärer ($p=0,018$) AMD signifikant erhöht waren, während die C3a-Konzentration nur bei Patienten mit früher AMD signifikant erhöht war ($p=0,019$). Die Konzentrationen von CFB und CFH waren im Kammerwasser von neovaskulären AMD-Patienten auch signifikant erhöht ($p=0,023$ bzw. $p=0,018$) (Altay et al., 2019).

Kavanagh et al. untersuchten CFI als potentiellen Biomarker für AMD. Dazu untersuchten sie 2266 Individuen mit AMD und 1400 Kontrollpersonen. Es hatten 231 Individuen seltene genetische Variationen des CFI. Kavanagh et al. untersuchten Blutlevel von Serum Faktor I mit und ohne seltene Genvarianten des CFI Gens. Seltene Genvarianten (Frequenz $< 1/1000$) waren häufig mit AMD assoziiert ($P = 1.1 \times 10^{-8}$). Individuen mit einer Form der späten AMD und einer seltenen Genvariante hatten niedrigere mittlere Blutwerte von CFI im Vergleich zu gesunden Probanden mit einer seltenen Genvariante ($P < 0.001$) (Kavanagh et al., 2015).

Wie in der Einleitung beschrieben, versteht man die AMD als multikausale Erkrankung bei der das Komplementsystem einen Einfluss aufs Krankheitsgeschehen hat oder sogar ursächlich für die Erkrankung sein könnte.

Im Zentrum steht das RPE, welches für die normale Funktion der Photorezeptoren durch seine Phagozytose der Photorezeptoraußensegmente, der äußeren Blut-Retina-Schranke, der Sekretion von Wachstumsfaktoren, den Wasser-Transport und die bidirektionale Regulierung von Ionen und Metaboliten zwischen Netzhaut und Aderhaut essentiell ist (Strauss, 2005). Angrenzend zum RPE befindet sich die Aderhaut, in der im Laufe des Lebens bei Patienten mit AMD die Akkumulierung des MAC zunimmt (Whitmore et al., 2015). Man stellt sich vor, dass ein Ausfall der choroidalen Endothelzellen und Atrophie derselben zu einer Erschwerung der Versorgung des RPE mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen führt, die zu einem RPE Zellverlust und Photorezeptorverlust führen (Whitmore et al., 2015). Drusen (siehe Einleitung) enthalten eine Vielzahl von Komplementfaktoren. Ein Verlust von Komplementregulatoren könnte zu pathologischen Läsionen in der äußeren Retina und Bruch-Membran führen (van Lookeren Campagne, Strauss, & Yaspan, 2016). In der Theorie der chronischen Inflammation werden die Drusen als Abfallprodukt einer chronisch lokalen Entzündung angesehen (Anderson et al., 2010: 95). Hageman et al. stellten die Hypothese auf, dass dendritische Zellen durch lokale Schädigung des RPEs chemokinvermittelt aktiviert und rekrutiert würden (Hageman et al., 2001: 723ff.). Daraufhin würden die dendritischen Zellen ihre Fortsätze in den Läsionsbereich aussenden und folgend würde es zur Freisetzung immunmodulierender Faktoren durch das RPE führen.

Die vorliegenden Anfärbungen könnten in Zusammenschau mit anderen Ergebnissen das Verständnis in Zukunft möglicherweise verbessern.

Folgende Antikörper und Medikamente mit Bezug auf das Komplementsystem sind Gegenstand derzeitiger Forschung:

CD59 ist ein natürlich vorkommender Inhibitor des Zusammenbaus von MAC (Kumar-Singh, 2019). CD59 könnte daher therapeutisch wirksam gegen die Pathophysiologie der trockenen und feuchten AMD sein (Kumar-Singh, 2019). In einer Studie von Kumar-Singh wurde die Sicherheit und Verträglichkeit der Expression von CD59 aus einem Adeno-assoziierten Virus (AAV), das einmal in den Glaskörper injiziert untersucht

(Kumar-Singh, 2019). Eine zweite klinische Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit von CD59 bei Patienten mit feuchter AMD ist ebenfalls im Gange (Kumar-Singh, 2019).

Eculizumab ist ein IgG-Antikörper, der die C5-Aktivierung inhibiert (Jakub Hanus, Fangkun Zhao, & Shusheng Wang, 2016). Die COMPLETE Phase II-Studie mit Eculizumab rekrutierte 60 Teilnehmer (50 Jahre und älter) mit trockener AMD, dokumentiert durch Fundusfotografie, Fundusautofluoreszenz (FAF) und Fluoreszenzangiographie (FA) (J. Hanus, F. Zhao, & S. Wang, 2016). Die erste Gruppe von Patienten erhielt 4 Wochen lang ein niedrig dosiertes Schema von 600 mg wöchentlich, gefolgt von 900 mg alle 2 Wochen bis zur 24. Woche (J. Hanus et al., 2016). Die zweite Gruppe von Patienten erhielt eine hohe Dosis von 900 mg, gefolgt von 1200 mg über den gleichen Zeitraum (J. Hanus et al., 2016). Das primäre Ergebnis war die gemessene Veränderung des Drusenvolumens und der Fläche der GA nach 26 Wochen (J. Hanus et al., 2016). Die Studie zeigte, dass die systemische Komplementhemmung mit Eculizumab über 6 Monate gut vertragen wurde, aber die Wachstumsrate von GA oder Drusen nicht signifikant verringerte (Garcia Filho et al., 2014; Jakub Hanus et al., 2016; Yehoshua et al., 2014).

Zimura (ARC-1905) ist ein PEGyliertes Einzelstrangnukleotid, welches den Komplementfaktor 5 inhibiert und dadurch C5 nicht in seine Spaltprodukte C5a und C5b umgesetzt werden ("Product Candidates," 2017). In einer Phase 1 Studie für trockene AMD wurde die Toleranz von intravitrealen Zimura-Injektionen bei Patienten mit geographischer Atrophie bei trockener AMD untersucht. 50 Probanden (50 Jahre oder älter) mit trockener AMD (Drusen und oder GA) in beiden Augen wurden untersucht (J. Hanus et al., 2016).

Ein weiterer C5-Inhibitor, Avacincaptad Pegol, wird durch intravitreale Injektion verabreicht und soll in Phase 2-Studien auf Sicherheit und erste Wirksamkeitsanzeichen bei AMD-Patienten untersucht werden (Kassa, Ciulla, Hussain, & Dugel, 2019).

LFG316 (C5-Hemmer) und CLG561 (Properdin-Hemmer) konnten das Fortschreiten der GA in den Phase-2-Studien nicht aufhalten (Kassa et al., 2019). In einer Phase 1-Studie werden die Auswirkungen der Kombination von LFG316 und CL561 untersucht (Kassa et al., 2019).

Lampalizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen Faktor D des alternativen Komplementweges, zeigte in einer Phase II Studie 20,4 % Reduktionsrate in GA (Geographischer Atrophie) in 18 Monaten vgl.(Jakub Hanus et al., 2016). In den größten Studien Chroma und Spectri zur GA, reduzierte Lampalizumab während der 48-wöchigen Behandlung die geographische Atrophie-Vergrößerung im Vergleich zur Scheinbehandlung nicht (F. G. Holz et al., 2018). Insgesamt 906 Teilnehmer (553 Frauen und 353 Männer; mittleres [SD] Alter, 78,1 [8,1] Jahre) waren in Chroma und 975 Teilnehmer (578 Frauen und 397 Männer; mittleres [SD] Alter, 77,9 [8,1] Jahre) in Spectri eingeschrieben; 1733 der 1881 Teilnehmer (92,1 %) schlossen die Studien über 48 Wochen ab (F. G. Holz et al., 2018). Die bereinigte mittlere Zunahme der GA-Läsionsfläche gegenüber dem Ausgangswert in Woche 48 betrug in beiden Studien über alle Gruppen 1,93 bis 2,09 mm². Die Unterschiede in der bereinigten mittleren Veränderung der GA-Läsionsfläche (Lampalizumab minus Schein) betrugen -0,02 mm² (95 % CI, -0,21 bis 0,16 mm²; P = .80) für Lampalizumab alle 4 Wochen in Chroma, 0,16 mm² (95 % CI, 0,00-0,31 mm²; P = .048) für Lampalizumab alle 4 Wochen in Spectri, 0,05 mm² (95 % CI, -0,13 bis 0,24 mm²; P = .59) für Lampalizumab alle 6 Wochen in Chroma und 0,09 mm² (95 % CI, -0,07 bis 0,24 mm²; P = .27) für Lampalizumab alle 6 Wochen in Spectri. Es wurde kein Nutzen von Lampalizumab in den vordefinierten Untergruppen beobachtet, auch nicht bei den Biomarkern mit Komplementfaktor I-Profil (F. G. Holz et al., 2018).

Der Komplementfaktor 3 (C3)-Inhibitor, APL-2, hat in einer Phase 2-Studie das Potenzial gezeigt, das GA-Wachstum zu reduzieren, was den Übergang zu Phase 3-Studien unterstützt (Kassa et al., 2019). Es wurde von Liao et al. die Sicherheit und Wirksamkeit von Pegcetacoplan, einem Komplement C3-Hemmer, zur Behandlung der GA untersucht. Bei Patienten, die monatlich Pegcetacoplan oder EOM (jeden zweiten Monat) erhielten, war die GA-Wachstumsrate im Vergleich zur Scheinbehandlungsgruppe um 29 % (95 % Konfidenzintervall [CI], 9-49; P = 0,008) und 20 % (95 % CI, 0-40; P = 0,067) reduziert (Liao et al., 2019). Die Post-Hoc-Analyse zeigte, dass der Effekt in den zweiten 6 Monaten der Behandlung größer war, mit beobachteten Reduktionen von 45 % (P = 0,0004) und 33 % (P = 0,009) für Pegcetacoplan monatlich bzw. EOM (Liao et al., 2019). Die neu aufgetretene exsudative AMD wurde bei den mit Pegcetacoplan behandelten Augen häufiger gemeldet (18/86 Augen [20,9 %] und 7/79 Augen [8,9 %] in der Monats- bzw. EOM-Gruppe) als bei den scheinbehandelten Augen (1/81 Augen [1,2 %]) (Liao et

al., 2019). Liao et al. konnte zeigen, dass die lokale C3-Inhibition mit Pegcetacoplan zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Wachstums der GA im Vergleich zur Scheinbehandlung führte (Liao et al., 2019).

Der Komplementrezeptor 1 (CR1) ist ein membrangebundener Komplementhemmer, der häufig auf Erythrozyten und Immunzellen zu finden ist (Simmons et al., 2019). In der Studie von Simmons et al. zeigten QPCR- und Durchflusszytometriedaten, dass CR1 vom RPE nicht gut exprimiert wird, was darauf hindeutet, dass seine Überexpression einen zusätzlichen Schutz vor Komplementaktivierung bieten kann (Simmons et al., 2019). Um CR1 auf diese Fähigkeit zu untersuchen, wurde eine stabile CR1-exprimierende ARPE19-Linie mit einer Kombination aus Antibiotika-Selektion und FACS erstellt (Simmons et al., 2019). Mit zellbasierten Assays wurde gezeigt, dass die Zugabe von CR1 die Ablagerung der Komplementproteine C3b und C6 auf der transfizierten Linie hemmt (Simmons et al., 2019). Letztendlich identifiziert die Studie von Simmons et al. CR1 als einen Komplementinhibitor, der möglicherweise auf Stammzell-abgeleiteten RPE überexprimiert wird, um eine potentiell "verbesserte" Zelltherapie für AMD zu schaffen (Simmons et al., 2019). Eine kombinierte Zell-/Komplementtherapie könnte ein transplantierbares RPE schaffen, das besser geeignet ist, eine komplementvermittelte Lyse zu vermeiden und die chronische Entzündung in der Netzhaut zu begrenzen (Simmons et al., 2019).

4.2 Limitationen der Methodik

Die Stichprobengröße mit insgesamt 63 Präparaten (36 Präparate als Kontrollen, 21 Präparate als Frühstadium, 2 Präparate als atrophische Spätform und 4 Präparate als neovaskuläre Spätform) muss als kritisch betrachtet werden. Vor allem die Anzahl der Spätformen ist zu gering, um gesicherte Ergebnisse zu erhalten.

Die Repräsentativität der Stichprobe ist in Bezug auf das Alter nicht gegeben, könnte jedoch gegebenenfalls mit einer Erhöhung der Anzahl der Proben verbessert werden. Aufgrund der Gegebenheit, dass Organspender in der Regel jünger und keine malignen Erkrankungen aufweisen dürfen, ist diese mögliche Fehlerquelle schwer zu verändern. Lediglich die Veränderung und Ausweitung der Untersuchung von Netzhäuten von allen Verstorbenen würde diese mögliche Fehlerquelle minimieren. Bezogen auf das

Geschlecht ist meine Stichprobe bezogen auf das Alter repräsentativ. Auch bezogen auf die Erkrankung ist das Geschlecht repräsentativ. Es finden sich dort keine systematischen Unterschiede. Wie in der Normalbevölkerung geht in meiner Stichprobe ein höheres Alter mit der Erkrankung einher.

Die Immunhistochemie ermöglicht eine semiquantitative Auswertung. Vorteile der immunhistochemischen Verfahren sind klar die einfache Aufbewahrung der immunhistochemischen Präparate, die Diagnostik an einem laborüblichen Lichtmikroskop und die mögliche Lokalisierung von Molekülen. Nachteile der Immunhistochemie sind die unterschiedliche Sensitivität und Spezifität der verwendeten Antikörper und in der Auswertung das verwendete subjektive Scoring-System. Zudem haben die Aufarbeitungsmethoden einen großen Einfluss auf das Anfärbungsergebnis.

Einschränkungen in der Aussagekraft ergeben sich daraus, dass es zu falsch positiven oder falsch negativen Anfärbungen kommen kann. Nach der Entnahme der Probe können die Lagerungsdauer und -bedingungen, die Fixationszeit und Typ des Fixativs, die Paraffineinbettung, die Schnittdicke und der Anschnitt der Zellen beim Anfertigen der Präparate oder auch die Entparaffinisierung nachfolgender Schritte und damit letztendlich auch die Messergebnisse beeinflussen. Ein möglicher Störfaktor ist wie bereits genannt die Fixierungsdauer. Ist die Fixierung mit Formalin zu lang, kann es zu einer Proteinvernetzung kommen und immunhistochemische Färbungen können zu „falschen“ Ergebnissen führen. Zudem haben Variablen wie die Dauer und der Typ der Antigendemaskierung, die Spezifität und Konzentration des Antikörpers, die Inkubationszeit oder Merkmale des Chromogens einen Einfluss auf die Intensität der Färbung und somit auf das Messergebnis.

Wir verwendeten monoklonale und polyklonale Antikörper. Der Nachteil polyklonaler Antikörper besteht in möglichen Kreuzreaktionen. Somit könnte es bei CFI zu ungeahnten Kreuzreaktionen gekommen sein. Bei anti-MAC und anti-C5aR benutzten wir monoklonale Antikörper. Deren Vorteile sind die hohe Standardisierung, die hohe und enge Spezifität. Der Nachteil der monoklonalen Antikörper könnte eine zu enge Spezifität sein ("Immunhistochemie," 2004).

Zum Weiteren könnten lösliche Komplementfaktoren eine größere Rolle in der Pathogenese spielen und somit durch Immunhistochemische Verfahren nicht nachweisbar sein.

Weiterführende Transkriptionsanalysen erscheinen sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Die AMD ist eine multikausale Erkrankung, die prozentual allein in Deutschland für geschätzte 50 % aller schweren Sehbehinderungen verantwortlich ist (Finger et al., 2011).

Nachgewiesen wurde die prädisponierende Bedeutung vieler Gene des Komplementsystems für die Entstehung einer AMD.

Aufgrund der Hypothese der chronischen Inflammation, in der das Komplementsystem eine hervorragende Stellung einnimmt, sind weitere Erkenntnisse über das Komplementsystem und die Lokalisierung der Komplementfaktoren innerhalb der Retina-Choroidea Gegenstand der Forschung.

Es werden in klinischen Studien Antikörper gegen Komplementfaktoren auf ihren therapeutischen Nutzen bei AMD-Erkrankten hin getestet.

In der vorliegenden Arbeit wurden in Netzhäuten mit angrenzender Aderhaut von 63 humanen Spenderaugen C5aR, CFI und MAC mittels immunhistochemischer Methoden dargestellt und semiquantitativ analysiert.

Verglichen wurde zwischen AMD (Früh- und Spätform) und Kontroll-Geweben. Es wurden 36 Präparate als Kontrollen, 21 Präparate als Frühstadium klassifiziert, 2 Präparate als atrophische Spätform und 4 Präparate als neovaskuläre Spätform klassifiziert.

Bei anti-C5aR konnten wir in allen Proben eine Färbung in dem apikalen Teil der äußeren plexiformen Schicht nachweisen. Zwischen den verschiedenen Klassifizierungstypen Kontrolle, frühe AMD und späte AMD konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Eine sehr leichte Anfärbung zeigte sich zudem in der inneren plexiformen Schicht sowie in der Nervenfaserschicht. Die Drusen zeigten keinerlei Anfärbung.

Die Anfärbung in dem apikalen Teil der äußeren plexiformen Schicht war in der Literatur bis dato noch nicht beschrieben.

Beim anti-Mac konnten wir eine Anfärbung der Interkapillaren Säulen (Pillars) und Choriokapillarwänden feststellen.

Statistisch waren bei der späten AMD die Anfärbung der Choriokapillarwände schwächer ausgeprägt als bei Kontrollen. Das Gefäßendothel sowie das Serum in den Gefäßen färbten sich nahezu immer an. Drusen waren in unterschiedlicher Färbeintensität angefärbt. Bei 15 von 19 Präparaten mit Drusen sind die Drusen angefärbt. Bei 8 Präparaten zeigten die Drusen eine schwache Anfärbung. Bei 4 Präparaten war die Anfärbung gut und bei 3 Präparaten zeigte sich eine starke Anfärbung.

Der CFI-Antikörper färbte die gesamte Retina. Der CFI- Antikörper ließ sich bei uns am Deutlichsten in den Stäbchen und Zapfen, der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht lokalisieren. Bei 9 Proben zeigte das RPE keine Anfärbung. Bei 23 Proben zeigte das RPE eine schwache Anfärbung. Bei 9 Proben zeigte das RPE eine gute Anfärbung und bei 17 Proben war das RPE stark angefärbt. Die beobachteten Unterschiede in der Anfärbung der Nervenfaserschicht und der äußeren plexiformen Schicht korrelierten nicht signifikant mit der diagnostischen Klassifizierung. Bei der inneren plexiformen Schicht geht statistisch ein höheres Krankheitsstadium mit einer vermehrten Anfärbung einher. Das Vorhandensein von Drusen und die Färbeintensität der Drusen ist unterschiedlich. Bei einem Präparat war keine Anfärbung mit dem Antikörper zu verzeichnen. 43 Präparate hatten keinerlei Drusen. Bei 14 Präparaten zeigte sich keine Anfärbung der Drusen. Lediglich bei 5 Präparaten zeigte sich eine schwache Anfärbung der Drusen.

Die gefundenen Anfärbungen geben einen Überblick über die Lokalisierung der untersuchten Komplementfaktoren in der Retina und der Choroidea. Die Anfärbungsergebnisse verdeutlichen einmal mehr, dass das Komplementsystem und deren Faktoren in Bezug auf die AMD-Entstehung noch nicht hinreichend verstanden sind. Denn wir konnten zeigen, dass auch in der Neuroretina der Komplementregulator CFI, C5aR und der Membranangriffskomplex nachweisbar sind und potentiell bei der Pathogenese der AMD wirksam sein könnten.

Momentan wird die AMD als Folge einer chronisch lokalen Entzündung angesehen (Anderson et al., 2010: 95).

Inwiefern das Komplementsystem zur Entstehung der AMD beiträgt und welche möglichen therapeutischen Optionen es zur Modulation bietet, gilt es weiter zu erforschen.

6 Literaturverzeichnis

1. Altay, L., Sitnilska, V., Schick, T., Widmer, G., Duchateau-Nguyen, G., Piraino, P., Fauser, S. (2019). Early local activation of complement in aqueous humour of patients with age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*, 33(12), 1859-1864. doi:10.1038/s41433-019-0501-4.
2. Ambati, J., Ambati, B. K., Yoo, S. H., Ianchulev, S., & Adamis, A. P. (2003). Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol*, 48(3), 257-293.
3. Ambati, J., Atkinson, J. P., & Gelfand, B. D. (2013). Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol*, 13(6), 438-451. doi:10.1038/nri3459.
4. Amsler-Gitter. (09.02.2009, 07.05.2015). Retrieved from <https://de.wikipedia.org/wiki/Amsler-Gitter> (Zuletzt abgerufen am 1. Dezember 2019).
5. Anderson, D. H., Radeke, M. J., Gallo, N. B., Chapin, E. A., Johnson, P. T., Curletti, C. R., Johnson, L. V. (2010). The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res*, 29(2), 95-112. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.11.003.
6. Andrea Gamulescu, V.-P. G. (2009). *Die altersabhängige Makuladegeneration* (Vol. Bremen [u.a.]): UNI-MED-Verl.
7. AREDSResearchGroup. (2001). 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. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 119(10), 1417-1436.
8. Bergmann, M., Schütt, F., Holz, F. G., & Kopitz, J. (2004). Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J*, 18(3), 562-564.
9. Bora, P. S., Hu, Z., Tezel, T. H., Sohn, J. H., Kang, S. G., Cruz, J. M., Kaplan, H. J. (2003). Immunotherapy for choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model simulating exudative (wet) macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5), 2679-2684. doi:10.1073/pnas.0438014100.
10. Bora, P. S., Sohn, J. H., Cruz, J. M., Jha, P., Nishihori, H., Wang, Y., Bora, N. S. (2005). Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J Immunol*, 174(1), 491-497.

11. Bundesärztekammer. Richtlinie zur medizinischen Beurteilung von Organspendern und zur Konservierung von Spenderorganen gemäß § 16 Abs. 1 S. 1 Nr. 4 a) und b) TPG. Retrieved from <https://www.bundesaerztekammer.de/richtlinien/richtlinien/transplantationsmedizin/empfaengerschutz-medizinische-beurteilung/> (Zuletzt abgerufen am 1. Dezember 2019).
12. Burk, A., & Burk, R. (2014). *Checkliste Augenheilkunde* (Vol. Stuttgart [u.a.]): Thieme.
13. Büttner, R. (2003). *Allgemeine Pathologie mit 15 Tabellen* (Vol. Stuttgart [u.a.]): Schattauer.
14. Cain, S. A., & Monk, P. N. (2002). The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem*, 277(9), 7165-7169. doi:10.1074/jbc.C100714200.
15. Cascella, R., Ragazzo, M., Strafella, C., Missiroli, F., Borgiani, P., Angelucci, F., Giardina, E. (2014). Age-Related Macular Degeneration: Insights into Inflammatory Genes. *Journal of Ophthalmology*, 2014, 582842. doi:10.1155/2014/582842.
16. Charbel Issa, P., Scholl, H. P. N., Holz, F. G., Knolle, P., & Kurts, C. (2005). Das Komplementsystem und dessen mögliche Beteiligung an der Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD). *Der Ophthalmologe*, 102(11).
17. Chen, M., Daha, M. R., & Kallenberg, C. G. (2010). The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimmun*, 34(3), J276-286. doi:10.1016/j.jaut.2009.11.014.
18. Chen, M., Muckersie, E., Luo, C., Forrester, J. V., & Xu, H. (2010). Inhibition of the alternative pathway of complement activation reduces inflammation in experimental autoimmune uveoretinitis. *European Journal of Immunology*, 40(10), 2870-2881. doi:10.1002/eji.201040323.
19. Chirco, K. R., Sohn, E. H., Stone, E. M., Tucker, B. A., & Mullins, R. F. (2017). Structural and molecular changes in the aging choroid: implications for age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*, 31(1), 10-25. doi:10.1038/eye.2016.216.
20. Christian Wolfram, & Pfeiffer, N. (2012). Weißbuch zur Situation der ophthalmologischen Versorgung in Deutschland. Retrieved from <http://www.dog.org/?cat=33#3> (Zuletzt abgerufen am 1. Dezember 2019).
21. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research, G., Martin, D. F., Maguire, M. G., Fine, S. L., Ying, G. S., Jaffe, G. J., Ferris, F. L., 3rd. (2012). Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-

- year results. *Ophthalmology*, 119(7), 1388-1398. doi:10.1016/j.ophtha.2012.03.053.
22. Copland, D. A., Hussain, K., Baalasubramanian, S., Hughes, T. R., Morgan, B. P., Xu, H., Nicholson, L. B. (2010). Systemic and local anti-C5 therapy reduces the disease severity in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 159(3), 303-314. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04070.x.
 23. Couto Alves, A., Bruhn, S., Ramasamy, A., Wang, H., Holloway, J. W., Hartikainen, A. L., Coin, L. J. (2013). Dysregulation of complement system and CD4+ T cell activation pathways implicated in allergic response. *PLoS One*, 8(10), e74821. doi:10.1371/journal.pone.0074821.
 24. Die trockene AMD. (22.08.2016). Retrieved from <http://www.pro-retina.de/oeffentlichkeit/leben-mit-der-chronischen-amd/die-trockene-amd> (Zuletzt abgerufen am 1. Dezember 2019).
 25. Dinu, V., Miller, P. L., & Zhao, H. (2007). Evidence for association between multiple complement pathway genes and AMD. *Genet Epidemiol*, 31(3), 224-237. doi:10.1002/gepi.20204.
 26. Donoso, L. A., Kim, D., Frost, A., Callahan, A., & Hageman, G. (2006). The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*, 51(2), 137-152. doi:10.1016/j.survophthal.2005.12.001.
 27. Ebrahimi, K. B., Fijalkowski, N., Cano, M., & Handa, J. T. (2013). Decreased membrane complement regulators in the retinal pigmented epithelium contributes to age-related macular degeneration. *The Journal of pathology*, 229(5), 729-742.
 28. Ferris, F. L., Wilkinson, C. P., Bird, A., Chakravarthy, U., Chew, E., Csaky, K., & Sadda, S. R. (2013). Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 120(4), 844-851.
 29. Fett, A. L., Hermann, M. M., Muether, P. S., Kirchhof, B., & Fauser, S. (2012). Immunohistochemical localization of complement regulatory proteins in the human retina. *Histol Histopathol*, 27(3), 357-364.
 30. Finger, R. P., Fimmers, R., Holz, F. G., & Scholl, H. P. (2011). Incidence of blindness and severe visual impairment in Germany: projections for 2030. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(7), 4381-4389. doi:10.1167/iovs.10-6987.
 31. Fleckenstein, M., Schmitz-Valckenberg, S., Sunness, J. S., & Holz, F. G. (2011). Geographische Atrophie *Altersabhängige Makuladegeneration* (pp. 125-141): Springer Berlin Heidelberg.

32. Gamulescu, B. F. M.-A. (2013). *Die altersabhängige Makuladegeneration, aktuelle Altersdiagnostik und Therapieoptionen* (Vol. Bremen [u.a.]): UNI-MED.
33. Garcia Filho, C. A., Yehoshua, Z., Gregori, G., Nunes, R. P., Penha, F. M., Moshfeghi, A. A., Rosenfeld, P. J. (2014). Change in drusen volume as a novel clinical trial endpoint for the study of complement inhibition in age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*, 45(1), 18-31. doi:10.3928/23258160-20131217-01.
34. Gerl, V. B., Bohl, J., Pitz, S., Stoffelns, B., Pfeiffer, N., & Bhakdi, S. (2002). Extensive deposits of complement C3d and C5b-9 in the choriocapillaris of eyes of patients with diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(4), 1104-1108.
35. Gold, B., Merriam, J. E., Zernant, J., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Gehrs, K., Allikmets, R. (2006). Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 38(4), 458-462. doi:10.1038/ng1750.
36. Grehn, F. (2012). *Augenheilkunde mit 27 Tabellen ; [mit Fallquiz]* (Vol. Berlin [u.a.]): Springer.
37. Grisanti, S. (1998). Das Immunprivileg des Auges. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 95(2), 124-135.
38. Hageman, G. S., Anderson, D. H., Johnson, L. V., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Hardisty, L. I., Allikmets, R. (2005). 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*, 102(20), 7227-7232. doi:10.1073/pnas.0501536102.
39. Hageman, G. S., Luthert, P. J., Victor Chong, N. H., Johnson, L. V., Anderson, D. H., & Mullins, R. F. (2001). An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 20(6), 705-732.
40. Hammond, C. J., Webster, A. R., Snieder, H., Bird, A. C., Gilbert, C. E., & Spector, T. D. (2002). Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study. *Ophthalmology*, 109(4), 730-736.
41. Hanus, J., Zhao, F., & Wang, S. (2016). Current Therapeutic Development for Atrophic Age-related Macular Degeneration. *The British journal of ophthalmology*, 100(1), 122-127. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-306972.

42. Hanus, J., Zhao, F., & Wang, S. (2016). Current therapeutic developments in atrophic age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, *100*(1), 122-127. doi:10.1136/bjophthalmol-2015-306972.
43. Hecker, L. A., Edwards, A. O., Ryu, E., Tosakulwong, N., Baratz, K. H., Brown, W. L., Oppermann, M. (2010). Genetic control of the alternative pathway of complement in humans and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*, *19*(1), 209-215. doi:10.1093/hmg/ddp472.
44. Henne, D. C. (2000). Immunhistochemie. Retrieved from <http://www.pathologie-online.de/methoden/immunhistologie/> (Zuletzt abgerufen am 1. September 2017).
45. Herrmann, P., Holz, F. G., & Charbel Issa, P. (2013). Ätiologie und Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, *110*(4).
46. Ho, L., van Leeuwen, R., de Jong, P. T. V. M., Vingerling, J., & Klaver, C. C. W. (2011). Epidemiologie der AMD *Altersabhängige Makuladegeneration* (pp. 3-31): Springer Berlin Heidelberg.
47. Holländer, Barthlott, Keller, Krenger, & Piali. (2006). *Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis* (Vol. München u.a.): Elsevier, Urban & Fischer.
48. Holz, F. G. (2011). *Altersabhängige Makuladegeneration mit 21 Tabellen* (Vol. Berlin [u.a.]): Springer.
49. Holz, F. G., Bellman, C., Staudt, S., Schutt, F., & Volcker, H. E. (2001). Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *42*(5), 1051-1056.
50. Holz, F. G., Bellman, C., Staudt, S., Schütt, F., & Völcker, H. E. (2001). Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *42*(5), 1051-1056.
51. Holz, F. G., Pauleikhoff, D., Klein, R., & Bird, A. C. (2004). Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol*, *137*(3), 504-510. doi:10.1016/j.ajo.2003.11.026.
52. Holz, F. G., Sadda, S. R., Busbee, B., Chew, E. Y., Mitchell, P., Tufail, A., Bressler, N. M. (2018). Efficacy and Safety of Lampalizumab for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration: Chroma and Spectri Phase 3 Randomized Clinical Trials. *JAMA Ophthalmol*, *136*(6), 666-677. doi:10.1001/jamaophthalmol.2018.1544.

53. Holz, F. G., Schütt, F., Kopitz, J., Eldred, G. E., Kruse, F. E., Völcker, H. E., & Cantz, M. (1999). Inhibition of lysosomal degradative functions in RPE cells by a retinoid component of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *40*(3), 737-743.
54. Hyman, L. G., Lilienfeld, A. M., Ferris, F. L., 3rd, & Fine, S. L. (1983). Senile macular degeneration: a case-control study. *Am J Epidemiol*, *118*(2), 213-227.
55. Immunhistochemie. (2004, 14.09.2016). Retrieved from <https://de.wikipedia.org/wiki/Immunhistochemie> (Zuletzt abgerufen am 1. Dezember 2019).
56. *Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis*. (2006). (Vol. München [u.a.]): Elsevier, Urban & Fischer.
57. *Janeway Immunologie*. (2009). (Vol. Heidelberg [u.a.]): Spektrum, Akad. Verl.
58. Kassa, E., Ciulla, T. A., Hussain, R. M., & Dugel, P. U. (2019). Complement inhibition as a therapeutic strategy in retinal disorders. *Expert Opin Biol Ther*, *19*(4), 335-342. doi:10.1080/14712598.2019.1575358.
59. Kavanagh, D., Yu, Y., Schramm, E. C., Triebwasser, M., Wagner, E. K., Raychaudhuri, S., Seddon, J. M. (2015). Rare genetic variants in the CFI gene are associated with advanced age-related macular degeneration and commonly result in reduced serum factor I levels. *Human Molecular Genetics*, *24*(13), 3861-3870. doi:10.1093/hmg/ddv091.
60. Kawa, M. P., Machalinska, A., Roginska, D., & Machalinski, B. (2014). Complement system in pathogenesis of AMD: dual player in degeneration and protection of retinal tissue. *Journal of immunology research*, 2014.
61. Khandhadia, S., Cipriani, V., Yates, J. R. W., & Lotery, A. J. (2012). Age-related macular degeneration and the complement system. *Immunobiology*, *217*(2), 127-146. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.019.
62. Klein, R., Meuer, S. M., Myers, C. E., Buitendijk, G. H. S., Rochtchina, E., Choudhury, F., Klein, B. E. K. (2014). Harmonizing the classification of age-related macular degeneration in the three-continent AMD consortium. *Ophthalmic epidemiology*, *21*(1), 14-23.
63. Kociok, N., & Jousseaume, A. M. (2010). Enhanced expression of the complement factor H mRNA in proliferating human RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, *248*(8), 1145-1153. doi:10.1007/s00417-010-1371-4.
64. Kulkarni, P. A., & Afshar-Kharghan, V. (2008). Anticomplement therapy. *Biologics*, *2*(4), 671-685.

65. Kumar-Singh, R. (2019). The role of complement membrane attack complex in dry and wet AMD - From hypothesis to clinical trials. *Exp Eye Res*, *184*, 266-277. doi:10.1016/j.exer.2019.05.006.
66. Liao, D. S., Grossi, F. V., El Mehdi, D., Gerber, M. R., Brown, D. M., Heier, J. S., Francois, C. G. (2019). Complement C3 Inhibitor Pegcetacoplan for Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: A Randomized Phase 2 Trial. *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.optha.2019.07.011.
67. Liu, B., Wei, L., Meyerle, C., Tuo, J., Sen, H. N., Li, Z., Nussenblatt, R. B. (2011). Complement component C5a promotes expression of IL-22 and IL-17 from human T cells and its implication in age-related macular degeneration. *J Transl Med*, *9*, 1-12. doi:10.1186/1479-5876-9-111.
68. Lommatzsch, A., Wasmuth, S., Pauleikhoff, D., Holz, F. G., & Bird, A. C. (2011). *Histopathologie Altersabhängige Makuladegeneration* (pp. 79-102): Springer Berlin Heidelberg.
69. Luo, C., Zhao, J., Madden, A., Chen, M., & Xu, H. (2013). Complement expression in retinal pigment epithelial cells is modulated by activated macrophages. *Exp Eye Res*, *112*(0), 93-101. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2013.04.016.
70. Markiewski, M. M., & Lambris, J. D. (2007). The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol*, *171*(3), 715-727. doi:10.2353/ajpath.2007.070166.
71. Mestas, J., & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, *172*(5), 2731-2738.
72. Meyers, S. M. (1994). A twin study on age-related macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc*, *92*, 775-843.
73. Mitchell, J., & Bradley, C. (2006). Quality of life in age-related macular degeneration: a review of the literature. *Health Qual Life Outcomes*, *4*, 97. doi:10.1186/1477-7525-4-97.
74. Mullins, R. F., Russell, S. R., Anderson, D. H., & Hageman, G. S. (2000). 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*, *14*(7), 835-846.
75. Mullins, R. F., Skeie, J. M., Malone, E. A., & Kuehn, M. H. (2006). Macular and peripheral distribution of ICAM-1 in the human choriocapillaris and retina. *Mol Vis*, *12*, 224-235.
76. Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie* (Vol. Heidelberg [u.a.]): Spektrum, Akad. Verl.

77. Nozaki, M., Raisler, B. J., Sakurai, E., Sarma, J. V., Barnum, S. R., Lambris, J. D., Ambati, J. (2006). Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7), 2328-2333. doi:10.1073/pnas.0408835103.
78. Okinaga, S., Slattery, D., Humbles, A., Zsengeller, Z., Morteau, O., Kinrade, M. B., Gerard, C. (2003). C5L2, a nonsignaling C5A binding protein. *Biochemistry*, 42(31), 9406-9415. doi:10.1021/bi034489v.
79. Patzelt, J. (2009). *Basics Augenheilkunde* (Vol. München): Elsevier, Urban & Fischer.
80. Perez, V. L., Saeed, A. M., Tan, Y., Urbieto, M., & Cruz-Guilloty, F. (2013). The eye: A window to the soul of the immune system. *Journal of Autoimmunity*, 45(0), 7-14. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2013.06.011.
81. Peter Charbel Issa, F. G. H. (2009). *Die altersabhängige Makuladegeneration* (Vol. Bremen [u.a.]): UNI-MED-Verl.
82. Product Candidates. (2017). Retrieved from <http://www.ophtotech.com/product-candidates/> (Zuletzt abgerufen am 1. Mai 2017).
83. Rasch, F., Hofmann & Nauman. (2010). Retrieved from http://www.quantitative-methoden.de/Dateien/Auflage3/Band_I/Kapitel_3_SPSS_Ergaenzungen_A3.pdf (Zuletzt abgerufen am 1. Dezember 2019).
84. Rassow, J. (2008). *Biochemie, 50 Tabellen* (Vol. Stuttgart): Thieme.
85. Read, R. W., Szalai, A. J., Vogt, S. D., McGwin, G., & Barnum, S. R. (2006). Genetic deficiency of C3 as well as CNS-targeted expression of the complement inhibitor sCrry ameliorates experimental autoimmune uveoretinitis. *Exp Eye Res*, 82(3), 389-394. doi:10.1016/j.exer.2005.07.011.
86. Reynolds, R., Hartnett, M. E., Atkinson, J. P., Giclas, P. C., Rosner, B., & Seddon, J. M. (2009). Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(12), 5818-5827. doi:10.1167/iovs.09-3928.
87. Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11(9), 785-797. doi:10.1038/ni.1923
88. Romeis, M. M. (2010). *Mikroskopische Technik* (Vol. Heidelberg): Spektrum, Akad. Verl.
89. Sachsenweger, M. (2003). *Augenheilkunde, 73 Tabellen* (Vol. Stuttgart): Thieme.

90. Sarks, S. H., Van Driel, D., Maxwell, L., & Killingsworth, M. (1980). Softening of drusen and subretinal neovascularization. *Trans Ophthalmol Soc U K*, *100*(3), 414-422.
91. Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell Tissue Res*, *343*(1), 227-235. doi:10.1007/s00441-010-1034-0.
92. Scholl, H. P., Charbel Issa, P., Walier, M., Janzer, S., Pollok-Kopp, B., Borncke, F., Oppermann, M. (2008). Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One*, *3*(7), e2593. doi:10.1371/journal.pone.0002593.
93. Scholl, H. P., Fleckenstein, M., Charbel Issa, P., Keilhauer, C., Holz, F. G., & Weber, B. H. (2007). An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Mol Vis*, *13*, 196-205.
94. Schramm, E. C., Clark, S. J., Triebwasser, M. P., Raychaudhuri, S., Seddon, J., & Atkinson, J. P. (2014). Genetic Variants in the Complement System Predisposing to Age-Related Macular Degeneration: A Review. *Mol Immunol*, *61*(2), 118-125. doi:10.1016/j.molimm.2014.06.032.
95. Schütt, F., Davies, S., Kopitz, J., Holz, F. G., & Boulton, M. E. (2000). Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *41*(8), 2303-2308.
96. Seddon, J. M., Ajani, U. A., & Mitchell, B. D. (1997). Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol*, *123*(2), 199-206.
97. Seddon, J. M., Cote, J., Page, W. F., Aggen, S. H., & Neale, M. C. (2005). The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol*, *123*(3), 321-327. doi:10.1001/archopht.123.3.321
98. Sedlacek, H.-H. (2014). *Immunologie - die Immunabwehr des Menschen. [Schutz, Gefahren, Erkrankungen] ; Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten* (Vol. Berlin): de Gruyter.
99. Seth, A., Cui, J., To, E., Kwee, M., & Matsubara, J. (2008). Complement-Associated Deposits in the Human Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *49*(2), 743-750. doi:10.1167/iovs.07-1072.
100. Simmons, K. T., Mazzilli, J. L., Mueller-Ortiz, S. L., Domozhirov, A. Y., Garcia, C. A., Zsigmond, E. M., & Wetsel, R. A. (2019). Complement Receptor 1 (CR1/CD35)-expressing retinal pigment epithelial cells as a potential therapy for age-related macular degeneration. *Mol Immunol*, *118*, 91-98. doi:10.1016/j.molimm.2019.11.007.
101. Simulieren von Augenerkrankungen und Sehbehinderungen-Makuladegeneration. (11.02.2016). Retrieved from <http://www.pro->

- retina.de/simulation/makuladegeneration (Zuletzt abgerufen am 1. Dezember 2019).
102. Skeie, J. M., Fingert, J. H., Russell, S. R., Stone, E. M., & Mullins, R. F. (2010). Complement component C5a activates ICAM-1 expression on human choroidal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *51*(10), 5336-5342. doi:10.1167/iovs.10-5322.
 103. Smith, W., Assink, J., Klein, R., Mitchell, P., Klaver, C. C., Klein, B. E., de Jong, P. T. (2001). Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*, *108*(4), 697-704.
 104. Sohn, J. H., Kaplan, H. J., Suk, H. J., Bora, P. S., & Bora, N. S. (2000). Chronic low level complement activation within the eye is controlled by intraocular complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *41*(11), 3492-3502.
 105. Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, *85*(3), 845-881. doi:10.1152/physrev.00021.2004.
 106. Sunness, J. S., Gonzalez-Baron, J., Applegate, C. A., Bressler, N. M., Tian, Y., Hawkins, B., Bergman, A. (1999). Enlargement of atrophy and visual acuity loss in the geographic atrophy form of age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, *106*(9), 1768-1779. doi:10.1016/S0161-6420(99)90340-8.
 107. Swaroop, A., Branham, K. E., Chen, W., & Abecasis, G. (2007). Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum Mol Genet*, *16 Spec No. 2*, R174-182. doi:10.1093/hmg/ddm212.
 108. Thakkestian, A., Bowe, S., McEvoy, M., Smith, W., & Attia, J. (2006). Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*, *164*(9), 813-822. doi:10.1093/aje/kwj279
 109. Tomany, S. C., Cruickshanks, K. J., Klein, R., Klein, B. E., & Knudtson, M. D. (2004). Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol*, *122*(5), 750-757. doi:10.1001/archoph.122.5.750.
 110. van der Schaft, T. L., Mooy, C. M., de Bruijn, W. C., & de Jong, P. T. (1993). Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study. *Br J Ophthalmol*, *77*(10), 657-661.
 111. van Lookeren Campagne, M., Strauss, E. C., & Yaspan, B. L. (2016). Age-related macular degeneration: Complement in action. *Immunobiology*, *221*(6), 733-739. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.11.007.

112. Wang, A. L., Lukas, T. J., Yuan, M., Du, N., Tso, M. O., & Neufeld, A. H. (2009). Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *PLoS One*, *4*(1), e4160. doi:10.1371/journal.pone.0004160.
113. Wang, J., Ohno-Matsui, K., Yoshida, T., Kojima, A., Shimada, N., Nakahama, K., Morita, I. (2008). Altered function of factor I caused by amyloid beta: implication for pathogenesis of age-related macular degeneration from Drusen. *J Immunol*, *181*(1), 712-720.
114. Wang, Q., Zhao, H. S., & Li, L. (2016). Association between complement factor I gene polymorphisms and the risk of age-related macular degeneration: a Meta-analysis of literature. *Int J Ophthalmol*, *9*(2), 298-305. doi:10.18240/ijo.2016.02.23.
115. Weber, B. H. F., Issa, P. C., Pauly, D., Herrmann, P., Grassmann, F., & Holz, F. G. (2014). The Role of the Complement System in Age-Related Macular Degeneration. *Deutsches Ärzteblatt International*, *111*(8), 133-138. doi:10.3238/arztebl.2014.0133.
116. Whitmore, S., Sohn, E. H., Chirco, K. R., Drack, A. V., Stone, E. M., Tucker, B. A., & Mullins, R. F. (2015). Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: Implications for pathophysiology and therapy. *Progress in retinal and eye research*, *0*, 1-29. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.11.005.
117. Wolfram, C. P., Norbert. (2012). Weißbuch zur Situation der ophthalmologischen Versorgung in Deutschland. Retrieved from <http://www.dog.org/?cat=229> (Zuletzt abgerufen am 1. Dezember 2019).
118. Yates, J. R., Sepp, T., Matharu, B. K., Khan, J. C., Thurlby, D. A., Shahid, H., Genetic Factors in, A. M. D. S. G. (2007). Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, *357*(6), 553-561. doi:10.1056/NEJMoa072618.
119. Yehoshua, Z., Filho, C., Nunes, R. P., Gregori, G., Penha, F. M., Moshfeghi, A. A., Rosenfeld, P. J. (2014). Systemic Complement Inhibition with Eculizumab for Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration: The COMPLETE Study. *Ophthalmology*, *121*(3), 693-701. doi:10.1016/j.ophtha.2013.09.044.
120. Yoshida, S., Yashar, B. M., Hiriyanna, S., & Swaroop, A. (2002). Microarray analysis of gene expression in the aging human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *43*(8), 2554-2560.
121. Zhang, J., Gerhardinger, C., & Lorenzi, M. (2002). Early complement activation and decreased levels of glycosylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in

- human and experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*, 51(12), 3499-3504.
122. Zhang, X., Kimura, Y., Fang, C., Zhou, L., Sfyroera, G., Lambris, J. D., Song, W. C. (2007). Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. *Blood*, 110(1), 228-236. doi:10.1182/blood-2006-12-063636.

7 Lebenslauf



Andrea Luise Schindler

Limburger Straße 6
50672 Köln

Telefon: 0176 633 50 402

E-Mail: andlui.schindler@googlemail.com

* 20. Mai 1989 in Dortmund

Beruflicher Werdegang

11/2018-heute	Universitätsklinik Düsseldorf Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
08/2018-11/2018	Evangelisches Klinikum Köln Weyertal Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
04/2017-07/2018	Universitätsklinik Frankfurt am Main Beginn der Weiterbildung in der Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Universität und Promotion

10/2009	Universität zu Köln Beginn des Studiums der Humanmedizin
seit 03/2014	Universität zu Köln Laufende Promotion im Fachgebiet der Augenheilkunde zum Thema: Immunhistochemische Lokalisierung von Komplementfaktoren anhand von Spenderaugen bei AMD
05/2015	ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) in Denver, Colorado, USA Teilnahme am Jahreskongress und Präsentation von Forschungsergebnissen mit Doktorvater zum Thema AMD (Altersbedingte Makuladegeneration)

12/2016

Landesprüfungsamt NRW / Universität zu Köln

Ärztliche Prüfung

- 03/2012: 1. Abschnitt (Physikum)
- 10/2015: 2. Abschnitt (schriftlich)
- 12/2016: 3. Abschnitt (mündlich)

Praktisches Jahr

11/2015 - 03/2015

Universitätsklinikum Köln

Erstes Tertial in der Augenheilkunde

03/2016 - 07/2016

Inselspital Bern, Schweiz

Zweites Tertial in der Chirurgie

07/2016 - 10/2016

Krankenhaus Porz am Rhein

Drittes Tertial in der Inneren

Famulaturen

08/2012 - 09/2012

Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg

Anästhesie

02/2013 - 03/2013

Klinikum rechts der Isar, München

Radiologie

08/2013 - 09/2013

Universitätsklinikum Freiburg im Breisgau

Nuklearmedizin

09/2013 - 10/2013

Evangelisches Krankenhaus Oldenburg

Notfallambulanz

09/2014 - 09/2014

Kliniken der Stadt Köln, Krankenhaus Merheim

Zentrum für Schwerstverbrannte / plastische Chirurgie

Schule und Praktika

08/2001 - 06/2008

Altes Gymnasium zu Oldenburg

Erwerb der Hochschulreife

Leistungskurse: Deutsch, Französisch, Biologie

07/2009 - 09/2009

Pius Hospital, Oldenburg

Krankenpflegepraktikum, Onkologie

08/2010 - 09/2010

Universitätsklinikum Köln
Krankenpflegepraktikum, HNO

Fremdsprachen

Englisch, Französisch, Italienisch

Köln, den 13. August 2019

Andrea Luise Schindler