

**Sequenzveränderungen in Kandidatengenomen bei Patient*innen mit
altersbedingter Makuladegeneration und deren potenzieller Einfluss auf ein
Therapieansprechen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Paula Michel

Betreuer*innen: Prof. Dr. med. Katrin Hoffmann, Halle

Prof. Dr. med. Claudia Grünauer-Kloevekorn, Halle

Gutachter*innen: Prof. Denise Horn, Berlin

PD Laura Kühlewein, Tübingen

Datum der Verteidigung: 15.10.2025

Referat

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine multifaktorielle Erkrankung mit genetischen und nicht-genetischen Risikofaktoren, die mit progredientem Visusverlust bis hin zur Erblindung einhergeht. Die neovaskuläre Spätform wird mittels intravitrealer Injektionen von Medikamenten, die gegen den *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF-A) gerichtet sind, therapiert. Das Therapieansprechen variiert dabei individuell erheblich. Hier wird ebenfalls ein Einfluss genetischer Varianten vermutet. Im Zuge dieser Arbeit wurden 19 an neovaskulärer AMD (nAMD) erkrankte Patient*innen, die eine Therapie mittels VEGF-Inhibitoren erhielten, bezüglich Varianten im *VEGFA*-Gen untersucht. Diese wurden hinsichtlich einer Assoziation mit AMD und dem Therapieansprechen ausgewertet. Zusätzlich wurden sieben mittels Gen-Panel-Diagnostik identifizierte Varianten in den Genen des Komplementsystems mit einer zweiten Methode verifiziert und im Hinblick auf einen möglichen Einfluss auf die Pathogenese der AMD ausgewertet.

Im *VEGFA*-Gen (Referenzsequenz: NM_003376.6) wurden die synonyme Variante c.534C>T, p.Ser178= (rs25648) und die intronische Variante c.856-28C>T (rs3025000) identifiziert. Nach den Kriterien des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) sind beide Varianten als benigne Veränderungen einzuordnen. Die Literaturrecherche legt nahe, dass beide Varianten nicht mit dem AMD-Risiko assoziiert sind, rs3025000 jedoch das Therapieansprechen beeinflussen könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen kein Zusammenhang zwischen diesen Varianten und dem Ansprechen nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang des T-Allels von rs25648 mit einem niedrigeren Risiko der Erkrankung an einer AMD, was jedoch einer Bestätigung in größeren Kohorten bedarf.

Alle aus der Gen-Panel-Diagnostik ausgewählten Varianten konnten mittels allelspezifischer PCR oder Sanger-Sequenzierung verifiziert werden. Nach ACMG ist NM_006610:c.359A>G, p.Asp120Gly in *MASP2* *likely pathogenic* und NM_005666:c.595G>T, p.Glu199Ter in *CFHR2* *pathogenic*. Beide Varianten haben funktionelle Konsequenzen. Im Falle einer Assoziation mit AMD, die mittels prospektiver, größerer Studien bestätigt werden müsste, können solche funktionell relevanten Varianten auf einen Beitrag der jeweiligen Gene zur Pathogenese der AMD hinweisen. Zudem könnten das Risiko beeinflussende Varianten in einem polygenetischen Kontext eine individualisierte Risikoeinschätzung und Behandlung ermöglichen.

Michel, Paula: Sequenzveränderungen in Kandidatengenen bei Patient*innen mit altersbedingter Makuladegeneration und deren potenzieller Einfluss auf ein Therapieansprechen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2025

Inhaltsverzeichnis

Seite

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

1	Einleitung	1
1.1	AMD – eine Hauptursache für Erblindung in Hochlohnländern	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Genetische Prädisposition	3
1.3.1	Das Komplementsystem mit <i>CFH</i> als Hauptrisikogen	3
1.3.2	Angiogenese – <i>VEGFA</i> spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AMD	5
1.4	Therapie der AMD	6
1.5	Vorausgegangene molekulargenetische Untersuchung der Studienpopulation	8
2	Zielstellung	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Studienpopulation und Kontrollgruppe	10
3.2	Materialien	11
3.2.1	Chemikalien	11
3.2.2	Kits	11
3.2.3	Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
3.2.4	Datenbanken und Software	12
3.3	Methoden	15
3.3.1	Ablauf	15

3.3.2	DNA-Isolation	15
3.3.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	16
3.3.4	Primerdesign	16
3.3.5	Polymerasekettenreaktion	17
3.3.6	Agarosegelelektrophorese	19
3.3.7	Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte	20
3.3.8	Sequenzierung nach Sanger	21
3.3.9	Nachweis von Einzelnukleotidpolymorphismen mittels allelspezifischer PCR	21
3.3.10	Interpretation der pathogenetischen Relevanz der identifizierten genetischen Varianten	24
3.3.11	Statistische Methoden	25
3.3.12	Sekundärstrukturanalyse und Proteinmodelle	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Identifizierung von zwei <i>VEGFA</i> -Varianten in der Studienpopulation	27
4.2	Bewertung der Varianten im <i>VEGFA</i> -Gen	29
4.2.1	Variante c.534C>T, p.Ser178=: kein Einfluss auf die Proteinsequenz	29
4.2.2	Intronische Variante c.856-28C>T	31
4.3	Ansprechen auf die Therapie mittels VEGF-Inhibitoren	32
4.4	Bewertung der Varianten der NGS-Genpaneldiagnostik	33
4.4.1	Die Veränderung c.359A>G, p.Asp120Gly betrifft die CUB-Domäne des <i>MASP2</i> -Gens	33
4.4.2	Vorzeitiges Stoppcodon durch c.595G>T, p.Glu199Ter im <i>CFHR2</i> -Gen	34
4.4.3	Heterozygote Veränderung c.1427T>C, p.Ile476Thr im <i>C9</i> -Gen	35
4.4.4	Potenzielle Schwächung des Spleißdonors durch c.1407C>G, p.Ile469Met im <i>CFB</i> -Gen	35

4.4.5	Seltene Varianten unklarer Signifikanz im <i>C5</i> - und <i>ITGAM</i> -Gen	36
4.4.6	Bisher nicht beschriebene Variante c.2533G>A, p.Val845Met im <i>C3</i> -Gen	37
4.5	Proteinmodelle der Missensevarianten	37
4.5.1	Position der Variante im jeweiligen Protein	37
4.5.2	Sekundärstrukturanalyse	38
4.5.3	3D-Modelle	39
5	Diskussion	43
5.1	Zusammenhang der nachgewiesenen <i>VEGFA</i> -Varianten mit der Erkrankung an einer AMD	43
5.1.1	Funktionelle Konsequenzen synonyme und intronischer Varianten	43
5.1.2	Mögliche Assoziation von c.534C>T, p.Ser178= mit der Entwicklung einer AMD	44
5.1.3	Kein eindeutiger Zusammenhang weiterer <i>VEGFA</i> -Varianten mit dem AMD-Risiko	45
5.2	Fehlende pharmakogenetische Assoziation der <i>VEGFA</i> -Varianten mit der Anti-VEGF-Therapie	46
5.3	Beeinträchtigte Enzymfunktion durch c.359A>G, p.Asp120Gly im <i>MASP2</i> -Gen	49
5.4	<i>CFHR2</i> ist möglicherweise relevant für die Pathogenese der AMD	51
5.5	Die Veränderung c.1427T>C, p.Ile476Thr liegt in der MACPF-Domäne von C9	52
5.6	Varianten in <i>CFB</i> sind vorwiegend protektiv	53
5.7	Kein eindeutiger Zusammenhang zwischen <i>C5</i> und AMD	53
5.8	Unklare pathogenetische Relevanz der Variante c.1790G>A, p.Gly597Glu in <i>ITGAM</i>	54
5.9	Einfluss von Varianten in <i>C3</i> auf die AMD-Pathogenese	55
5.10	Stärken und Limitationen der Arbeit	55
5.11	Schlussfolgerung	57

6	Literaturverzeichnis	60
7	Thesen	80
Anhang		
Erklärungen		
Danksagung		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der AMD	2
Abbildung 2: Mit der Pathogenese der AMD in Verbindung gebrachte Gene und Signalwege	5
Abbildung 3: Bilder der optischen Kohärenztomografie (OCT) von zwei Patient*innen mit neovaskulärer AMD nach Behandlung mit VEGF-Inhibitoren	7
Abbildung 4: Gelelektrophorese der Amplifikate der acht Exons des <i>VEGFA</i> -Gens zur Etablierung der Primer	20
Abbildung 5: Gelelektrophorese der allelspezifischen PCR der genetischen Variante NM_000632:c.1790G>A, p.Gly597Glu im <i>ITGAM</i> -Gen	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung des <i>VEGFA</i> -Gens mit den in der AMD-Patient*innen-Gruppe identifizierten Varianten	27
Abbildung 7: Elektropherografische Darstellung der Basenabfolge des Rückwärtsstranges im ersten Exon des <i>VEGFA</i> -Gens	30
Abbildung 8: Elektropherografische Darstellung der Basenabfolge des Rückwärtsstranges im Intronbereich <i>upstream</i> von Exon 4 des <i>VEGFA</i> -Gens	31
Abbildung 9: Darstellung der allelspezifischen PCR zum Nachweis von NM_006610:c.359A>G, p.Asp120Gly mittels Gelelektrophorese	34
Abbildung 10: Transkript NM_005666 von <i>CFHR2</i>	35
Abbildung 11: Ausschnitt der Sekundärstrukturvorhersage von Faktor B an Position 469	39
Abbildung 12: Ausschnitt aus MASP-2 im 3D-Modell mit Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen von Asp120	40
Abbildung 13: Ausschnitt aus der grafischen Darstellung der Hydrophobizität von MASP-2 im 3D-Modell	40
Abbildung 14: Ausschnitt aus der grafischen Darstellung der Hydrophobizität von C9 im 3D-Modell	41
Abbildung 15: Ausschnitt aus C9 im 3D-Modell mit Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen von Ile476	41
Abbildung 16: Ausschnitt aus C5 im 3D-Modell mit Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen von Arg766	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer der Sanger-Sequenzierung von <i>VEGFA</i> und <i>C9</i>	17
Tabelle 2: PCR-Programm 6030	18
Tabelle 3: PCR-Programme Touchdown 61 °C (TD 61 °C) und Touchdown 63 °C (TD 63 °C)	19
Tabelle 4: Optimierte PCR-Bedingungen zur Amplifikation von Exon 1 sowie Standard-PCR-Ansatz	19
Tabelle 5: Pipettierschema der enzymatischen Aufreinigung	20
Tabelle 6: Primer der allelspezifischen PCR	24
Tabelle 7: <i>Accession number</i> in der Proteindatenbank UniProt und <i>Identifier</i> des Proteinstrukturmodells	26
Tabelle 8: Gegenüberstellung der identifizierten <i>VEGFA</i> -Varianten und des Visus	28
Tabelle 9: Mittels NGS-Panel der Gene des Komplementsystems identifizierte Varianten in der Studienpopulation	29
Tabelle 10: Verteilung der Allele und Genotypen der Varianten c.534C>T, p.Ser178= und c.856-28C>T und Assoziation mit der Entwicklung einer AMD	30
Tabelle 11: Verteilung der Allele und Genotypen der <i>VEGFA</i> -Varianten auf Patient*innen mit stabilem Visus bzw. Visusabfall unter Therapie mit VEGF-Inhibitoren	32

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
ΔG	freie Enthalpie
$\Delta\Delta G$	Änderung der thermodynamischen Stabilität
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
1000G	1000-Genomprojekt
95%-KI	95-%-Konfidenzintervall
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter 1</i>
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
aHUS	atypisches Hämolytisch-Urämisches Syndrom
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
ApoE	Apolipoprotein E
ARMS2	<i>Age-Related Maculopathy Susceptibility 2</i>
bp	Basenpaare
c	Konzentration
C1	Komplementfaktor C1
C2	Komplementfaktor C2
C3	Komplementfaktor C3
C4	Komplementfaktor C4
C5	Komplementfaktor C5
C9	Komplementfaktor C9
CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CATT	<i>Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials</i>
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CFB	Komplementfaktor B
CFH	Komplementfaktor H
CFHR	<i>Complement Factor H Related Protein</i>
CFI	Komplementfaktor I
COL10A1	Kollagen Typ X alpha 1
COL4A3	Kollagen Typ IV alpha 3

COL8A1	Kollagen Typ VIII alpha 1
d	Schichtdicke
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EU	Europäische Union
EZM	extrazelluläre Matrix
FHR2	<i>Complement factor H-related protein 2</i>
g	Gramm
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GRS	genetischer Risikoscore
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HTRA1	<i>High-Temperature Requirement A1 Serinepeptidase</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IgG1	Immunglobulin G1
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITGAM	<i>Integrin subunit alpha M</i>
LIPC	Lipase C
LPL	Lipoproteinlipase
M	1 Mol pro Liter
MAC	Membranangriffskomplex
MACPF-Domäne	MAC/Perforin-Domäne
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
MBL	mannosebindendes Lektin
MDR1	<i>Multidrug-Resistance-Protein 1</i>

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mol	Mol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
nAMD	neovaskuläre AMD
ng	Nanogramm
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
OCT	optische Kohärenztomografie
OR	<i>Odds Ratio</i>
OS	Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PFS	progressionsfreies Überleben (<i>progression free survival</i>)
PGF	<i>Placental Growth Factor</i>
pmol	Pikomol
PolyPhen-2	<i>Polymorphism Phenotyping</i> Version 2
RCA	<i>Regulator of Complement Activation</i>
REVEL	<i>Rare Exome Variant Ensembl Learner</i>
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SCR	<i>short consensus repeat</i>
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SKIV2L	<i>Ski2-like RNA Helicase</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
uATG	<i>upstream ATG</i>
UTR	untranslatierte Region

V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGF-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
VEGF_C	VEGF-Heparinbindungsdomäne
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VUS	Variante unklarer Signifikanz
vWF-A-Domäne	von-Willebrand-Faktor-A-Domäne
ε	Extinktionskoeffizient

Buchstaben-Codes der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Selenocystein	Sec	U

1 Einleitung

1.1 AMD – eine Hauptursache für Erblindung in Hochlohnländern

Der gegenwärtige demographische Wandel und die damit einhergehende Alterung der Gesellschaft beeinflussen die Gesundheitsversorgung bedeutend, da sie zu einer Zunahme der Prävalenz altersassoziierter Erkrankungen führen (1). Diese meist komplex bedingten und chronisch verlaufenden Erkrankungen bedrohen die Selbständigkeit und Lebensqualität älterer Menschen, welche wichtige Ziele in deren Versorgung darstellen. Eine solche altersbedingte Erkrankung stellt auch die altersbedingte Makuladegeneration (AMD; MIM# 603075) dar, welche durch progredienten Visusverlust bis hin zur Erblindung gekennzeichnet ist.

Der Visusverlust beruht auf einer Schädigung der Netzhaut, insbesondere im Bereich der Makula. Ursächlich sind pathologische Veränderungen des Stoffwechsels im Bereich des retinalen Pigmentepithels (RPE) (2), die mit subretinalen Ablagerungen von Stoffwechselprodukten, sogenannten Drusen, und schließlich der Degeneration von RPE und Photorezeptorzellen, einhergehen (3). Als zugrundeliegende Mechanismen werden dysregulierte Phagozytose und oxidativer Stress, Akkumulation von Lipiden, beeinträchtigtes Remodeling der extrazellulären Matrix (EZM), und komplementbedingte Inflammation vermutet (2–4). Die resultierende Verdickung der Bruch-Membran führt zu einem vermindertem Austausch von Abfallprodukten, Nährstoffen und Sauerstoff zwischen Retina und Choriokapillaris und letztendlich einer Hypoxie (5). Es resultieren eine gesteigerte Expression des Wachstumsfaktors *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF-A) sowie eine VEGF-unabhängige Angiogenese und somit eine begünstigte Bildung von Neovaskularisationen (5).

Drusen kennzeichnen die frühen Stadien der AMD, aber führen meist noch nicht zu Seheinschränkungen. Schreitet die Erkrankung voran, kann eine geografische Atrophie oder eine neovaskuläre AMD (nAMD) entstehen, welche mit einem zentralen Visusverlust einhergehen (Abbildung 1). Charakteristisch für die geografische Atrophie sind scharf begrenzte Zelluntergänge des RPE (6). In der Folge atrophieren auch die darüber befindlichen Photorezeptorzellen. Die neovaskuläre Spätform wird hingegen durch die oben genannten Gefäßneubildungen verursacht, welche unkontrolliert unter RPE und Retina einsprossen. Da diese insuffizient gebaut sind, können sie über Hämorrhagien und den Austritt von Flüssigkeit schnell zu einem starken Visusverlust führen (7).

Die Lebensqualität Betroffener wird mit Fortschreiten der Erkrankung immer stärker eingeschränkt. Wird die Lebensqualität nach der Time Trade Off Methode, welche den Anteil verbleibender Lebensjahre, die ein Patient bereit wäre abzugeben, um völlige Gesundheit wiederzuerlangen, verglichen, so ähneln sich die Nutzwerte einer leichten AMD und einer Wirbelfraktur (8,9). Die Einschränkung der Lebensqualität durch eine sehr schwere AMD ist hingegen vergleichbar mit der durch ein fortgeschrittenes Prostatakarzinom (8,10).

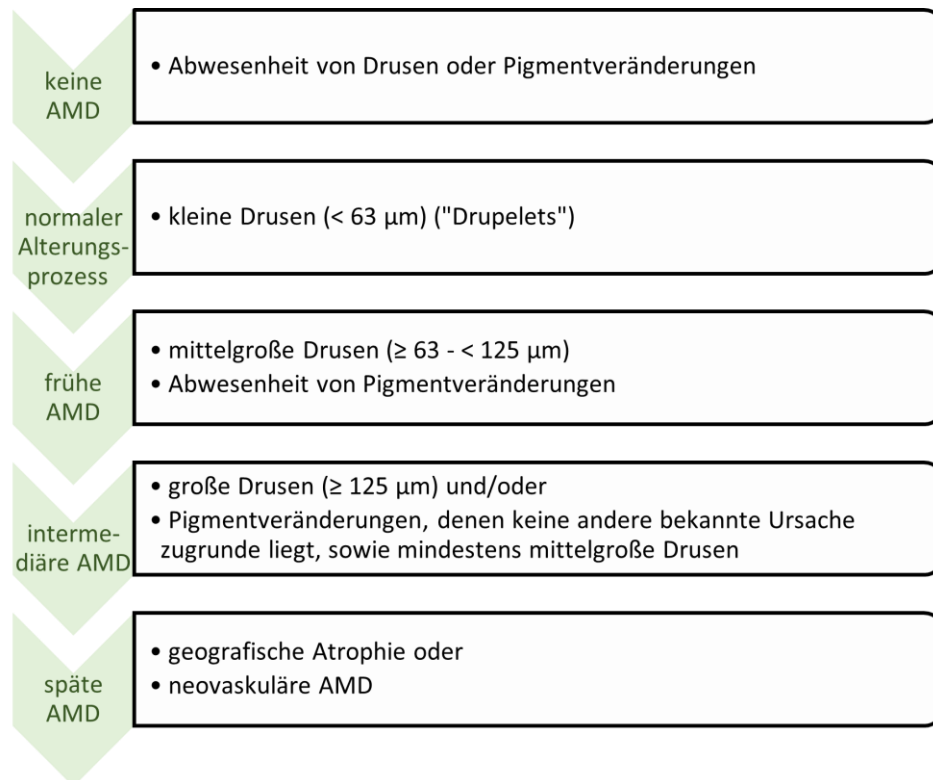


Abbildung 1: **Stadien der AMD.** Einteilung nach der klinischen Klassifikation des Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee (11).

1.2 Epidemiologie

Die AMD ist eine multifaktorielle Erkrankung, daher interagiert die genetische Prädisposition mit weiteren Risikofaktoren. Zu den stärksten Risikofaktoren gehören das Rauchen (12–14) und das Alter (12,15,16). Die Prävalenz von AMD im frühen Stadium beträgt bei 55- bis 59-Jährigen 3,5 % und steigt bei den ≥ 85 -Jährigen auf 17,6 % (17). Die Spätformen der AMD betreffen 0,1 % der 55- bis 59-Jährigen und 9,8 % der ≥ 85 -Jährigen (17). Im Zusammenhang mit dem demografischen Wandel ist daher eine Zunahme der Betroffenen anzunehmen. Es wird prognostiziert, dass im Jahr 2040 weltweit 288 Millionen Menschen von AMD betroffen sein werden und Europa nach Asien die zweitmeisten AMD-Fälle aufweisen wird (18). Die Anzahl der AMD-Betroffenen

in der EU könnte von zurzeit 67 Millionen auf 77 Millionen im Jahr 2050 steigen und somit um 15 % zunehmen (19).

1.3 Genetische Prädisposition

1.3.1 Das Komplementsystem mit *CFH* als Hauptrisikogen

Den allgemeinen Risikofaktoren steht die genetische Prädisposition für die Erkrankung an AMD gegenüber. Nachdem Zwillings- (20,21) und Familienstudien (22,23) die Heritabilität der AMD impliziert hatten, wurden Chromosom 1q31 und 10q26 als Suszeptibilitätsloci identifiziert (24). In einer der ersten erfolgreichen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) (25) sowie weiteren familien- und populationsbasierten Assoziationsstudien wurde schließlich das Gen des Komplementfaktors H (*CFH*) auf Chromosom 1q31 als erstes Hauptrisikogen identifiziert (25–28). Besonders der Missensevariante NM_000186:c.1204T>C, p.Tyr402His (rs1061170), die den Austausch von Tyrosin durch Histidin an der Aminosäureposition 402 im kodierenden Bereich des *CFH*-Gens bewirkt, wurde ein risikosteigernder Effekt zugeschrieben. Das Vorhandensein des C-Allels, einer der Varianten des Gens, führt zu einer fast dreifachen Steigerung des AMD-Risikos (26,29).

Faktor H gehört zum Komplementsystem, einem ca. 30 Proteine umfassenden, kaskadenartigen Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems (30) (Abbildung 2). Dieses Abwehrsystem kann auf drei verschiedenen Wegen aktiviert werden, die durch die Bildung einer Konvertase für Komplementfaktor C3 (C3) in eine gemeinsame Endstrecke mit Bildung eines Membranangriffskomplexes (MAC) münden (30). Faktor H ist dabei ein komplementregulatorisches Protein (31).

Die Assoziation von rs1061170 in *CFH* mit dem AMD-Risiko und der Nachweis von Komplementfaktoren in Drusen (32,33) rückten das Komplementsystem in den Vordergrund für weitere Studien zu den genetischen Einflussfaktoren der AMD. In Genen verschiedener Komplementfaktoren wurden nachfolgend protektive und risikosteigernde genetische Varianten identifiziert (Abbildung 2). So führen Varianten, die die Funktion von Faktor I beeinträchtigen, ebenfalls zu einem erhöhten AMD-Risiko (34,35). Faktor I reguliert, wie Faktor H, die Komplementkaskade (30). Weitere risikoassoziierte Varianten befinden sich in den Genen der *Complement Factor H Related Proteins* (*CFHR*), die zu derselben Genfamilie wie *CFH* gehören. In diesen Genen wurden Deletionen identifiziert, die protektiv bezüglich AMD sind (36–38). Auch Varianten in C3 sind mit AMD assoziiert (39–41).

Der Komplementfaktor C3 nimmt mit seinen Spaltprodukten C3a und C3b als Ausgangspunkt des alternativen Weges der Komplementaktivierung, Bestandteil dessen C3-Konvertase sowie der C5-Konvertase und als Anaphylatoxin und Opsonin eine zentrale Rolle in der Komplementkaskade ein (30). Als Pathomechanismus der C3-Varianten wird daher eine gestörte Regulation der Komplementaktivierung über C3 in Betracht gezogen (42). Weiter *downstream* in der Komplementkaskade befindet sich der Komplementfaktor C9 (C9), der Bestandteil des MAC ist (30). In C9 ist insbesondere die Missensevariante NM_001737:c.499C>T, p.Pro167Ser (rs34882957) mit erhöhtem AMD-Risiko assoziiert (42,43). Die Nonsensevariante c.346C>T, p.Arg95Ter (rs121909592), eine in einem vorzeitigen Stoppcodon resultierende Variante in C9, ist hingegen mit einer deutlichen Risikoreduktion für AMD verbunden (44). Varianten in den paralogen Genen für Komplementfaktor C2 (C2) und Komplementfaktor B (CFB) sind vorwiegend protektiv (3,45–47). Die Heritabilität der AMD ist komplex. Seit der Entdeckung von *CFH* als krankheitsassoziiertes Gen wurden genetische Varianten, die das AMD-Risiko beeinflussen, in vielen weiteren Genen verschiedener Signalwege identifiziert. So wiesen in einer großen genomweiten Assoziationsstudie 52 Varianten an 34 verschiedenen Genorten eine Assoziation mit AMD auf (43). Ein Überblick über die AMD-assoziierten Signalwege und Gene ist in Abbildung 2 dargestellt.

Neben Faktoren der Komplementkaskade stehen auch das extrazelluläre Remodeling, der Fettstoffwechsel, und die Angiogenese, im Fokus der Forschung zu den genetischen Ursachen der AMD (Abbildung 2). Das extrazelluläre Remodeling ist abhängig von der Balance zwischen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) und könnte insbesondere eine Rolle in der Pathogenese fortgeschrittener AMD spielen (48–50). In einer Studie wurde zudem rs42450006 *upstream* von *MMP9* identifiziert, eine Variante, die spezifisch mit der neovaskulären Form der fortgeschrittenen AMD assoziiert ist (43). Weitere mit AMD assoziierte Gene sind unter anderem *COL8A1*, *COL4A3* und *COL10A1*, welche Kollagenkomponenten kodieren (43,51). Auch Varianten in Genen des Fettstoffwechsels sind mit dem AMD-Risiko assoziiert: Allel e2 des *ApoE*-Gens erhöht das Risiko, während Allel e4 zu einer Risikoreduktion führt (52). Weitere assoziierte Loci sind *LPL*, *LIPC* und *CETP* (43,50,53).

Neben 1q31 war in der Metaanalyse von Fisher *et al.* auch die Region 10q26 stark mit AMD gekoppelt (24). Diese enthält unter anderem die Gene *ARMS2* und *HTRA1*. Da diese im starken Kopplungsungleichgewicht stehen, ist die Identifikation des kausalen Gens erschwert (54). Die durch *HTRA1* kodierte Serinprotease steht jedoch im Verdacht, über den TGF- β -Signalweg zu Angiogenese zu führen (55) und in das Remodeling der EZM zwischen Choriokapillaris und Retina involviert zu sein (56). Auch bei *ARMS2* wird

eine Beteiligung am EZM-Remodeling vermutet (57). Insgesamt ist die Bedeutung der Region für die AMD-Pathogenese noch unzureichend geklärt.

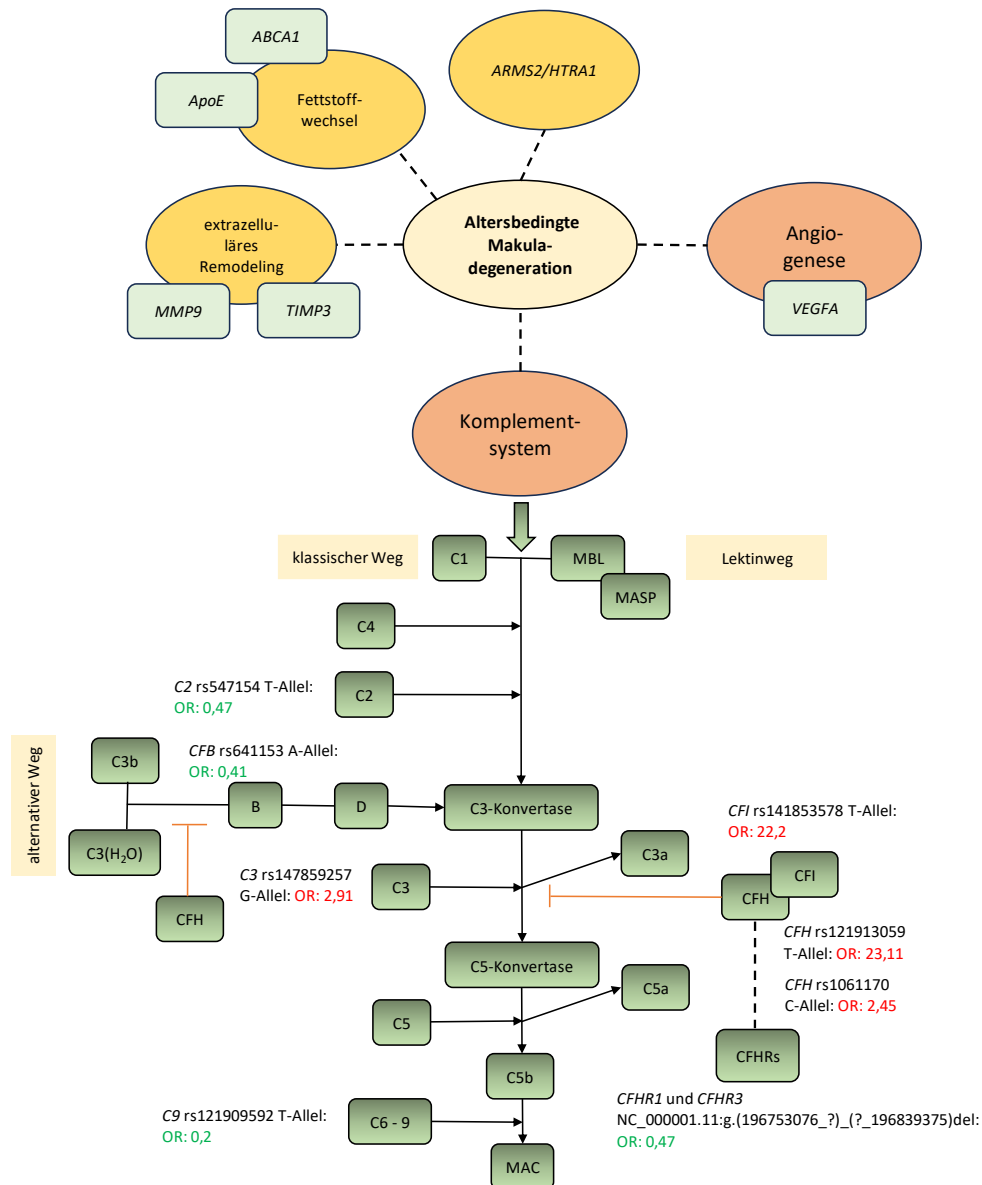


Abbildung 2: **Mit der Pathogenese der AMD in Verbindung gebrachte Gene und Signalwege.** Gene verschiedener Komplementfaktoren und weiterer Signalwege wurden mit der Entwicklung der AMD in Verbindung gebracht (43,52,58–60). Protektive (grün) und risikosteigernde (rot) Varianten der Gene des Komplementsystems verdeutlichen beispielhaft die Assoziation verschiedener Komplementfaktoren mit dem AMD-Risiko (26,28,35,37,41,44,47). Die Odds Ratio (OR) gibt dabei an, wie groß die Chance ist, an AMD zu erkranken, wenn das jeweilige Variantenallel vorliegt verglichen mit dem Vorliegen des Wildtypallels. Die Chance, an AMD zu erkranken, ist also bei Träger*innen eines C-Allels der *CFH*-Variante rs1061170 etwa 2,5 Mal so hoch wie in der Gruppe ohne C-Allel (28).

1.3.2 Angiogenese – *VEGFA* spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AMD

Die Angiogenese stellt einen weiteren Signalweg dar, bei dem eine Assoziation genetischer Varianten mit dem Auftreten von AMD naheliegt. Hierbei spricht vor allem

die Rolle des VEGF-A in der Pathogenese der Erkrankung, insbesondere bei der neovaskulären Spätform der AMD, für *VEGFA* als funktionelles Kandidatengen. VEGF-A wurde als permeabilitätssteigernder, von Tumorzellen sezernierter *vascular permeability factor* (VPF) beschrieben (61) und später durch Ferrara und Henzel als Wachstumsfaktor des Gefäßendothels identifiziert (62,63). VEGF-A gehört, gemeinsam mit VEGF-B, -C, -D, -E und PGF, zu einer Familie von vaskulären Wachstumsfaktoren und besitzt selbst mehrere, durch alternatives Spleißen bedingte Isoformen (63).

VEGF-A entfaltet seine Wirkung auf das Gefäßendothel vorrangig über die Bindung an die Rezeptortyrosinkinase VEGFR-2 (63). Über die Dimerisierung des Rezeptors und Autophosphorylierung wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu Proliferation, Migration und gesteigertem Überleben der Endothelzellen führt (63). Zudem erhöht sich die Permeabilität der Blutgefäße (61). Hypoxie beeinflusst die Expression von VEGF-A. Durch gesteigerte Bindung von HIF-1 an ein upstream nahe des 5'-Endes von *VEGFA* gelegenes *hypoxia response element* wird die Transkription von *VEGFA* verstärkt (64). Zudem wird die Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*; mRNA) bei Hypoxie durch Bindung von Proteinen an AU-reiche Elemente in der 3'-UTR stabilisiert (65,66). Die hypoxiebedingte Überexprimierung von VEGF-A und darauffolgende Bildung von Neovaskularisationen ist Bestandteil des Pathomechanismus der Netzhautschädigung bei neovaskulärer AMD. Es wurden Varianten in *VEGFA* beschrieben, die mit dem AMD-Risiko im Zusammenhang stehen (58,67–69). Insgesamt sind die Assoziationen jedoch nicht konsistent (3,70).

1.4 Therapie der AMD

AMD ist bisher nicht heilbar. Die Supplementierung von Nahrungsergänzungsmitteln wird eingesetzt, um zu versuchen, die Progression der frühen AMD zu verlangsamen. Untersucht wurde dies insbesondere durch die Age-Related Eye Disease-Studien, wobei eine Supplementierung von Vitamin C und E, Beta-Carotin und Zink- sowie Kupferoxid mit einer Senkung des Progressionsrisikos einherging (71). Für die geografische Atrophie gibt es derzeit keine wirksame Therapie. Kommt es zu Neovaskularisationen, stellt der zügige Beginn intravitrealer Injektionen von gegen VEGF gerichteten Medikamenten den Goldstandard dar. Als intravitreale Anti-VEGF-Medikamente bei neovaskulärer AMD können Ranibizumab, Brolucizumab, Aflibercept, Faricimab und im *off-label use* Bevacizumab eingesetzt werden. Bevacizumab ist ein vollständiger humanisierter, monoklonaler Antikörper, Ranibizumab ein von Bevacizumab abgeleitetes Fab-Fragment (72). Brolucizumab ist ein kleineres, aus den variablen Domänen einer leichten und einer schweren Kette bestehendes Antikörper-Fragment

(73). Aflibercept ist ein rekombinantes Fusionsprotein, das die zweite Domäne von VEGFR-1 und die dritte Domäne von VEGFR-2 enthält, die wiederum an die Fc-Domäne von IgG1 gebunden sind (74). Im Unterschied zu den anderen Anti-VEGF-Medikamenten kann Aflibercept zusätzlich zu VEGF-A auch PGF und VEGF-B, weitere vaskuläre Wachstumsfaktoren, binden (75,76). Faricimab ist ein humanisierter bispezifischer Antikörper, der neben VEGF-A auch Angiopoietin-2, einen Wachstumsfaktor der Angiogenese, bindet (77,78).

Doch bei einem Teil der Patient*innen schreitet die Erkrankung trotz Anti-VEGF-Therapie voran (50) (Abbildung 3). Bei Behandlung mit Ranibizumab verbessert sich der mittels standardisierter Sehtafel gemessene Visus bei 25 – 40 % der Patient*innen um mindestens 15 Buchstaben, andererseits weisen 5 – 10 % trotz Therapie eine Verschlechterung von mehr als 15 Buchstaben auf (79,80). Varianten innerhalb der Bindungsstelle für VEGF-Inhibitoren, können die Affinität der Bindung stark senken (81). Entsprechende *VEGFA*-Varianten stellen somit einen Ansatz für die Erklärung eines unterschiedlichen Therapieansprechens dar.



Abbildung 3: **Bilder der optischen Kohärenztomografie (OCT) von zwei Patient*innen mit neovaskulärer AMD nach Behandlung mit VEGF-Inhibitoren.** (A) Patient*in mit gutem Therapieansprechen auf die Behandlung mit VEGF-Inhibitoren. Es ist keine subretinale Flüssigkeit vorhanden. (B) Trotz Anti-VEGF-Therapie haben sich eine große Narbe und eine Abhebung der Retina entwickelt haben. Bilder: Praxisklinik Augenärzte am Markt, Halle.

Die AMD-Haupttrisikogene waren früh Gegenstand der Untersuchung des Therapieansprechens. So wurde der Genotyp CC der mit erhöhtem AMD-Risiko assoziierten *CFH*-Variante rs1061170 als ein Risikofaktor für ein schlechteres Ergebnis bezüglich der Fern- und Nahvisus nach der Therapie mit Bevacizumab identifiziert ($p=0,0039$) (82). Andere Studien wiederum kamen zu der Erkenntnis, dass der Genotyp CC mit einem besseren Visus nach Therapie mit Ranibizumab verbunden ist (83), bzw. diese Variante keine Assoziation mit dem Therapieansprechen aufweist (84,85).

Im *VEGFA*-Gen, das das Zielprotein der Therapie kodiert, wurden Assoziationen des T-Allels der intronischen Variante NM_003376.6:c.856-28C>T (rs3025000) und des C-Allels der *upstream* von *VEGFA* gelegenen Missensevariante rs699947 mit einem besseren Therapieansprechen in Bezug auf den Visus festgestellt (86,87), was allerdings durch die *Comparison of AMD Treatments Trials* (CATT)-Studie nicht bestätigt wurde (88). Varianten in *VEGFA* stehen insgesamt nicht konsistent mit dem Therapieansprechen in Zusammenhang (88). Phan *et al.* stellen fest, dass zur Untersuchung möglicher Assoziationen genetischer Varianten mit dem Therapieansprechen neben prospektiven Studien zu identifizierten Varianten auch weitere individuelle Studien durchgeführt werden sollten, um mehr Wissen über bisher wenig untersuchte Varianten und ethnische Unterschiede zu schaffen (76).

1.5 Vorausgegangene molekulargenetische Untersuchung der Studienpopulation

Dieser Arbeit ging die molekulargenetische Untersuchung der Patient*innen bezüglich genetischer Varianten in den Genen des Komplementsystems mithilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS) voraus. Hierzu wurde ein *Custom-Panel* mit 55 enthaltenen Genen genutzt. Das Ziel war dabei die Identifizierung von Varianten, welche das Risiko, eine AMD zu entwickeln, beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Daten zur weiteren Auswertung genutzt, sowie weitere molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt.

2 Zielstellung

In dieser Arbeit sollen sieben Varianten, welche bei 19 Patient*innen mit nAMD mittels Genpaneldiagnostik identifiziert wurden, mit einer zweiten Methode, einer allelspezifischen Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. Sequenzierung nach Sanger, verifiziert werden.

Weiterhin sollen diese sieben Varianten mithilfe von Populationsdatenbanken, *in silico*-Tools, sowie Fachliteratur beurteilt werden. Auf diesem Weg soll die AMD-bezogene pathogenetische Bedeutung der Varianten eingeschätzt werden.

Die Studienpopulation soll zudem eine molekulargenetische Diagnostik hinsichtlich Varianten innerhalb des *VEGFA*-Gens durchlaufen. Zur Interpretation gefundener Veränderungen werden ebenfalls Populationsdatenbanken, *in silico*-Tools und Fachliteratur herangezogen. Mithilfe einer Kontrollgruppe soll überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen Varianten in *VEGFA* und der Erkrankung an einer AMD besteht. Zudem wird das Therapieansprechen auf VEGF-A-Inhibitoren ausgewertet. Dies soll zu einem besseren Verständnis des Therapieversagens bei Anti-VEGF-A-Therapien führen und so zur Grundlage für eine Prädiktion des Therapieansprechens und eine Individualisierung der Behandlung beitragen.

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulation und Kontrollgruppe

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt (Bearbeitungsnummer: 2016-96). Die Patient*innen gaben ihr informiertes Einverständnis zur Studienteilnahme.

Die Studienpopulation bildeten 19 an nAMD erkrankte Patient*innen, welche eine Anti-VEGF-Therapie erhielten. Das Alter betrug im Mittel 76,95 Jahre (Spannweite: 69 Jahre bis 88 Jahre). Der Eingangsvision beider Augen wurde dokumentiert und anschließend der VEGF-Inhibitor dreimalig in einem Intervall von vier Wochen intravitreal injiziert. Vier Wochen nach der Behandlung wurde der Therapieerfolg kontrolliert und die Therapie im Falle persistierender Krankheitsaktivität fortgeführt. Anschließend wurde erneut der Visus dokumentiert.

36 nicht an einer AMD erkrankte Individuen dienten als populationsgemachte Kontrollgruppe. Sie wiesen zum Zeitpunkt der Studienteilnahme keine AMD-typischen Netzhautveränderungen, wie Drusen, Ödeme oder Narben, auf. Das mittlere Alter betrug in dieser Gruppe 78,94 Jahre (Spannweite: 64 Jahre bis 89 Jahre).

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

100 bp DNA Ladder	Invitrogen (Carlsbad)
Betain-Lösung 5 M	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid	Thermo Fisher (Waltham)
Elution Buffer	Qiagen (Hilden)
	10 mmol/l Tris-Cl; pH 8,5
Ethanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Formamid	Applied Biosystems (Darmstadt)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GoTaq G2 Colorless Master Mix	Promega (Mannheim)
	Taq-Polymerase; GoTaq Reaction Buffer (pH 8.5); 400µM dATP; 400µM dGTP; 400µM dCTP; 400µM dTTP; 3mM MgCl ₂
Ladepuffer	50% Glycerin und 0,05% Orange G in 0,5x TBE-Puffer
LE Agarose	Biozym (Oldendorf)
Orange G	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PCR-Produkt-Reinigungsreagenz ExoSAP-IT	Thermo Fisher (Waltham)
	Exonuklease I; Shrimp-Alkaline-Phosphatase; Puffer
Primer	IDT Biologika (Dessau-Roßlau)
	Metabion (Planegg)
Rotiphorese 10x TBE-Puffer	Carl Roth (Karlsruhe)
	1,0 mol/l Tris-Borat; 20 mmol/l EDTA; destilliertes Wasser; pH 8,3
SERVA DNA Stain Clear G	Serva (Heidelberg)
Ultra pure water	Biochrom GmbH (Berlin)

3.2.2 Kits

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen (Hilden)
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)

3.2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer	Thermo Fisher (Waltham)
Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5430	Eppendorf (Hamburg)
Combitips advanced	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Research plus Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Geldokumentationssystem E-Box CX5	Vilber Lourmat (Collégien)
Gelelektrophoresesystem EasyCast	Thermo Fisher (Waltham)
Laborwaage	Kern (Balingen)
Mastercycler nexus gradient	Eppendorf (Hamburg)
Mehrkanalpipette Research plus 0,5 - 10 µl	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowelle	Sharp (Hamburg)
MiniSpin plus	Eppendorf (Hamburg)
Multipette M4 1 µl - 10 ml	Eppendorf (Hamburg)
Netzgerät Biometra	Analytik Jena (Jena)
PCR-Platte 96 Well	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
SafeSeal-Tips professional	Biozym (Oldendorf)
Spektralphotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher (Waltham)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Vibrationsmischer Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia)

3.2.4 Datenbanken und Software

2Struc	https://2struc.cryst.bbk.ac.uk/twostruc
AlphaFold	https://alphafold.ebi.ac.uk/
BLAST	https://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core
CADD	https://cadd.gs.washington.edu/
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/

color_h	http://www.protein.osakau.ac.jp/rcsfp/supracryst/suzuki/jpxtal/Katsutani/en/hydrophobicity.php
Database of Single Nucleotide Polymorphisms	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
DECIPHER	https://www.deciphergenomics.org/
DynaMut	https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut/
Ensembl	https://www.ensembl.org/index.html
GalaxyTBM	https://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=TBM
Genome Aggregation Database	https://gnomad.broadinstitute.org/
Human Phenotype Ontology	https://hpo.jax.org/app/
I-TASSER	https://zhanggroup.org/I-TASSER/
Jpred 4	https://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/
MutationTaster	https://www.genecascade.org/MutationTaster2021/#transcript
NanoDrop Software	Thermo Fisher (Waltham)
OMIM	https://www.omim.org/
PhastCons	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/
PhyloP	http://compugen.bscb.cornell.edu/phast/
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/bgi.shtml
Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Primer3Plus	https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
PSIPRED	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
PyMOL v2.5.5	Schrödinger (New York)
Reverse Complement	https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
Robetta	https://rosetta.bakerlab.org/

s2D	https://www-cohsoftware.ch.cam.ac.uk/index.php/s2D
Scratch Protein Predictor	http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/
SEQUENCE Pilot	J.S.I. Medical Systems (Ettenheim)
Sequence Scanner v1.0	Applied Biosystems (Darmstadt)
SIFT	https://sift.bii.a-star.edu.sg/
SpliceAI	https://spliceailookup.broadinstitute.org/
SPSS Statistics 27.0.0	IBM (Armonk)
SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/
UCSC	https://genome.ucsc.edu/
UniProt	https://www.uniprot.org/
VarSome	https://varsome.com/

3.3 Methoden

3.3.1 Ablauf

Das *VEGFA*-Gen aller Patient*innen wurde mittels Sequenzierung nach Sanger auf genetische Varianten untersucht. Dafür wurden zunächst sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) designt. Die Exons wurden inklusive eines flankierenden Intronbereiches mittels PCR amplifiziert. Zur Beurteilung der PCR-Produkte wurde eine Agarosegelelektrophorese angefertigt. Vorbereitend für die Sequenzierung wurden die Amplifikate enzymatisch gereinigt, einer Sequenzier-PCR zugeführt und überflüssige Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTP) mithilfe des Dye Ex 2.0 Spin Kits entfernt. Ein Teil der Proben wurde nach der enzymatischen Reinigung an den bioanalytischen Dienstleister Eurofins versandt. Die molekulargenetische Untersuchung der Kontrollgruppe erfolgte ebenfalls mittels Sanger-Sequenzierung der Exons, in denen in der Gruppe der AMD-Patient*innen Varianten nachgewiesen wurden.

Aus den Varianten, welche in der NGS-Genpaneldiagnostik identifiziert wurden, wurden die Varianten mit der größten vorhergesagten pathogenetischen Relevanz für die weitere Auswertung ausgewählt und mit einer zweiten Methode verifiziert. Dafür wurde ein auf den drei *in silico*-Pathogenitätsprädiktionstools *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT) (89), *Polymorphism Phenotyping* Version 2 (PolyPhen-2) (90) und *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD) (91) basierender Score genutzt. Die Varianten wurden zur Verifikation einer allelspezifischen PCR zugeführt, deren Ergebnis mittels Agarosegelelektrophorese beurteilt wurde. Die im NGS detektierte Variante NM_001737:c.1427T>C im *C9*-Gen wurde mittels Sequenzierung nach Sanger verifiziert, da die allelspezifische PCR nicht aussagekräftig war.

Die Klassifikation der Varianten erfolgte anhand der Kriterien des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (92). Zur statistischen Auswertung wurde die Statistik-Software SPSS Statistics (Version 27.0.0) (93) genutzt.

3.3.2 DNA-Isolation

Die Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*; DNA) der Patient*innen wurde nach Laborstandard und unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kit aus Vollblut präpariert. 200 µl Blut wurden mittels 20 µl Proteinase, 200 µl Lysepuffer 10-minütiger Inkubation bei 56 °C lysiert. Zur Fällung wurden 200 µl Ethanol (96 %) hinzugegeben und die DNA durch Zentrifugation für eine Minute bei 8000 rpm an eine Silikagelsäule gebunden. Der Waschvorgang wurde zweimal durchgeführt und bestand aus der Zugabe von Waschpuffer 1, Zentrifugation für 1 min bei 8000 rpm und anschließender Wiederholung

dieses Vorganges mit Waschpuffer 2. Die DNA wurde schließlich mit 50 µl Elutionspuffer durch Zentrifugation der Säulen für eine Minute bei 8000 rpm eluiert.

3.3.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Mithilfe der Software Nanodrop 2000 (94) wurden Konzentration und Reinheit der DNA mit einem Spektralphotometer bestimmt. Dazu wurde zuerst eine Leermessung mit 1 µl Elution Buffer durchgeführt und anschließend 1 µl der DNA vermessen. Zur Berechnung der Konzentration wird die Formel $c = E/(\epsilon \times d)$ genutzt, welche sich durch Umstellung des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E = \epsilon \times c \times d$) ergibt. Dabei entspricht c der Konzentration, E der Extinktion, ϵ dem Extinktionskoeffizienten und d der Schichtdicke. Entsprechend der gemessenen Konzentration wurde die DNA unter Zugabe von Elution Buffer auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt.

3.3.4 Primerdesign

Als Grundlage für die Primererstellung wurde die Sequenz von *VEGFA* (Ensembl-ID: ENSG00000112715) aus der Genomdatenbank Ensembl (95) bezogen. Verwendet wurde das Transkript 203 mit der Transkript-ID ENST00000372055.9. Für jedes der acht Exons wurden ein Vorwärts- sowie ein Rückwärtsprimer mittels Primer3Plus (96) designt. Die Zielsequenz umfasste neben dem jeweiligen Exon auch etwa 100 Basenpaare *up-* bzw. *downstream*, um einerseits das gesamte Exon sequenzieren und andererseits auch Spleißstellenmutationen feststellen zu können.

Die Länge der Primer wurde auf den Bereich von 18 bis 27 Basenpaaren festgelegt, da längere Primer spezifischer sind, aber auch mit einem höheren Risiko für Sekundärstrukturen oder Primerdimere einhergehen. Daher wurden Primer mit niedrigen Werten der Scores für Intraprimer-Homologien geachtet. Berücksichtigt wurde zudem, dass sich die Schmelztemperaturen zusammengehöriger Primer nicht mehr als 1 °C unterscheiden. Dies sollte gewährleisten, dass beide Primer unter denselben Reaktionsbedingungen effizient funktionieren. Um unspezifischen Sekundärprodukten vorzubeugen wurden die Bindungsstellen der Primer mit dem Primerdesign-Tool Primer-BLAST (97) überprüft. Die Primer sollten so spezifisch wie möglich für die Zielsequenz im *VEGFA*-Gen auf Chromosom 6 sein und auf diesem Chromosom keine weiteren Bindungen aufweisen. Anhand dieser Kriterien wurden geeignete Primer ausgewählt, welche in Tabelle 1 dargestellt sind. Auf dieselbe Weise wurden die Primer für das zehnte Exon des *C9*-Gens (Ensembl-ID: ENSG00000113600) designt, um die Variante NM_001737:c.1427T>C mittels Sanger-Sequenzierung zu verifizieren (Tabelle 1). Hierfür wurde das Ensembl-Transkript ENST00000263408 verwendet.

Tabelle 1: **Primer der Sanger-Sequenzierung von VEGFA und C9**

Exon	Primer	Vorwärtssequenz Rückwärtssequenz	Amplikongröße (bp)
1	VEGFA-e1.1-F/R	5'-GAGAGACGGGGTCAGAGAGA-3' 5'-TCGGCGAGCTACTCTTCCT-3'	596
1	VEGFA-e1.2-F/R	5'-CGAGAAGTGCTAGCTCGGG-3' 5'-CCTAAGACGACAGAGGGGGA-3'	516
2	VEGFA-e2-F/R	5'-CTGGGGTTTTTCCTCCTGCAT-3' 5'-CAGAGACCTGAACAGCGGAG-3'	517
3	VEGFA-e3-F/R	5'-GCCTTCACCAGTGTTGATGG-3' 5'-AAGGAGATGGTTGGGGCTTG-3'	600
4	VEGFA-e4-F/R	5'-GGGGTTGCTTTCGGGTATCT-3' 5'-GACGGGGGCCAAAAAGTACA-3'	524
5	VEGFA-e5-F/R	5'-TGTACTTTTTGGCCCCCGTC-3' 5'-CATCCCATTGTTGCTGCCAC-3'	459
6	VEGFA-e6-F/R	5'-TCCCACCAAAGCCTTGTCAG-3' 5'-GGGTCCCCTCCCTTAATCCT-3'	599
7	VEGFA-e7-F/R	5'-GTCTTTTGCTGTAGCGCTCG-3' 5'-CTACCACTCAGGCAACCAGG-3'	540
8	VEGFA-e8-F/R	5'-ACCACACCTTCCTGTCCTCT-3' 5'-TTCCGGGCTCGGTGATTTAG-3'	466
10	C9-e10-F/R	5'-AACCCCAAAGTGCATATTTTGTGTC-3' 5'-ATCAGCCTCCTTAACCTCCGTAA-3'	497

3.3.5 Polymerasekettenreaktion

Die PCR dient dazu, einen bestimmten DNA-Abschnitt *in vitro* zu vervielfältigen. Die Menge der Zielsequenz nimmt dabei über mehrere Zyklen exponentiell zu (98). Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Zuerst werden beide DNA-Stränge bei 95 °C voneinander getrennt (Denaturierung). Anschließend binden die Primer bei niedrigerer Temperatur an den komplementären Bereich eines DNA-Stranges (Hybridisierung). Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der der Schmelztemperatur des Primers, welche von der Länge des Primers und dem Anteil der verschiedenen Nukleinbasen abhängt. Im letzten Schritt, der Elongation, transferiert die DNA-Polymerase Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTP) an das 3'-Ende des an die DNA angelagerten Primers.

Für den Standard-PCR-Ansatz (Tabelle 4) wurden zu einem Mikroliter DNA (50 ng/µl) jeweils 1 µl des Vorwärtsprimers (10 pmol/µl) und 1 µl des Rückwärtsprimers (10 pmol/µl) sowie 9,5 µl destilliertes Wasser und 12,5 µl GoTaq Mastermix gegeben. Im Mastermix sind DNA-Polymerase, Reaktionspuffer (pH 8,5), dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und MgCl₂ enthalten.

Für die Exons 2 bis 8 verlief die PCR nach dem PCR-Programm 6030 (Tabelle 2) mit einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C erfolgreich. Die PCR-Bedingungen für Exon 1 mussten jedoch optimiert werden, da es unzureichend amplifiziert wurde. Dazu wurde der PCR-Ansatz modifiziert, die Hybridisierungstemperatur und Zyklenzahl variiert sowie eine Touchdown-PCR eingesetzt. Zur Modifikation des PCR-Ansatzes wurde die DNA-Menge erhöht und die Zusätze Dimethylsulfoxid, Formamid und Betain verwendet. PCR-Zusätze verbessern aufgrund unterschiedlicher Mechanismen die Amplifikation (98,99). Das beste Ergebnis für Exon 1_{VEGFA-e1.1-F/R} wurde durch Zugabe 1 mol/l konzentriertem Betain erreicht. Indem Betain die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotiden schwächt (98), reduziert es die Abhängigkeit der Schmelztemperatur vom GC-Gehalt und senkt diese somit (100). Betain löst zudem Sekundärstrukturen auf (101). Die Erhöhung der DNA-Menge im PCR-Ansatz führte bei Exon 1_{VEGFA-e1.2-F/R} zu einer besseren Amplifikation. Außerdem wurde zur Minimierung unspezifischer Produkte eine Touchdown-PCR verwendet (Tabelle 3). Bei dieser PCR-Methode fällt die zu Beginn hohe Hybridisierungstemperatur über die folgenden Zyklen allmählich ab (102). Die niedrige Hybridisierungstemperatur der letzten Zyklen führt dann zu einer effizienten Amplifikation der spezifischen Produkte der vorherigen Zyklen. Die optimierten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 2: **PCR-Programm 6030**

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	60 °C	30 s	30
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	5 min	
Kühlung	10 °C	-	

Tabelle 3: **PCR-Programme Touchdown 61 °C (TD 61 °C) und Touchdown 63 °C (TD 63 °C)**

	Temperatur		Dauer	Zyklen
	TD 61 °C	TD 63 °C		
Denaturierung	95 °C	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	95 °C	30 s	
Hybridisierung	61 °C	63 °C	30 s	2
Elongation	72 °C	72 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	95 °C	30 s	
Hybridisierung	59 °C	61 °C	30 s	2
Elongation	72 °C	72 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	95 °C	30 s	
Hybridisierung	57 °C	59 °C	30 s	2
Elongation	72 °C	72 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	95 °C	30 s	
Hybridisierung	55 °C	57 °C	30 s	29
Elongation	72 °C	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	72 °C	10 min	
Kühlung	10 °C	10 °C	-	

Tabelle 4: **Optimierte PCR-Bedingungen zur Amplifikation von Exon 1 sowie Standard-PCR-Ansatz**

	Konzentration	Volumen pro Reaktion in µl		
		Exon 1	Exon 1	Exons 2, 3, 4,
		VEGFA-e1.1-F/R	VEGFA-e1.2-F/R	5, 6, 7, 8
PCR-Ansatz				
DNA	50 ng/µl	1,0	1,2	1,0
Primer F	10 pmol/µl	1,0	1,0	1,0
Primer R	10 pmol/µl	1,0	1,0	1,0
GoTaq Mastermix		12,5	12,5	12,5
destilliertes Wasser		4,5	9,3	9,5
Betain	5 mol/l	5,0	0,0	0,0
Summe		25	25	25
PCR-Programm		Touchdown	Touchdown	6030
		63 °C	63 °C	

3.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Darstellung des amplifizierten DNA-Abschnittes und der Detektion unspezifischer Produkte. Dabei kann mithilfe eines Längenstandards auch die Größe des PCR-Produktes abgeschätzt und mit der erwarteten Produktlänge des eingesetzten Primerpaares verglichen werden. Auf dieser Grundlage können die

Parameter der PCR, wie Hybridisierungstemperatur, Anzahl der Zyklen und Zusammensetzung der Reagenzien, verändert werden, wenn für das jeweilige Primerpaar kein Produkt der erwarteten Länge erzielt wird (Abbildung 4)

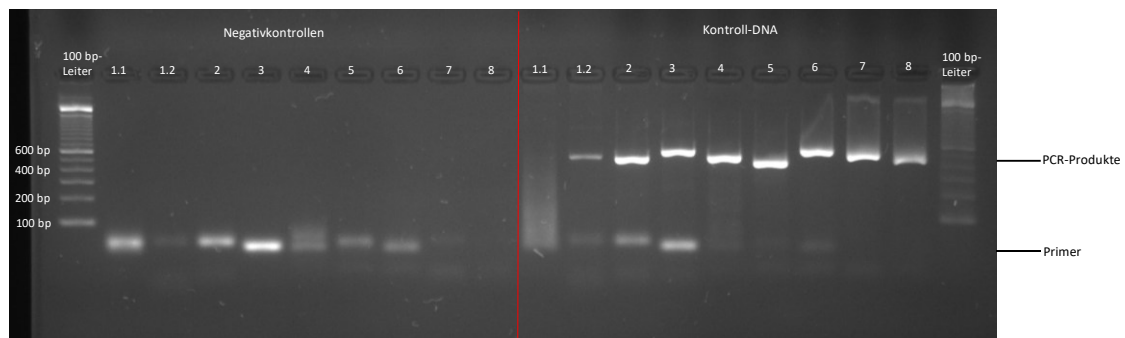


Abbildung 4: **Gelelektrophorese der Amplifikate der acht Exons des VEGFA-Gens zur Etablierung der Primer.** Zur Amplifikation von Exon 1 wurden aufgrund der Länge des ersten Exons zwei Primerpaare eingesetzt, deren Produkte mit 1.1 (VEGFA-e1.1-F/R) und 1.2 (VEGFA-e1.2-F/R) gekennzeichnet sind.

Für die Herstellung eines 1,6 %-Agarosegels wurden 1,6 g Agarose in 100 ml 0,5-facher TBE-Puffer gegeben und bis zur Aufklärung erhitzt. Anschließend wurden 4 µl eines Farbstoffes für Nukleinsäuredetektion (SERVA DNA Stain Clear G) hinzugefügt. Das Gel wurde nach der Abkühlung in eine mit 0,5-fachem TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. In einer Terasakiplatte wurden 2 µl Ladepuffer vorgelegt und dazu 10 µl der Probe gegeben und untergemischt. Die gesamten 12 µl wurden schließlich in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard wurde eine 100 bp-DNA-Leiter verwendet. An die Kammer wurde für 20 min eine Spannung von 130 V angelegt.

3.3.7 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte

Um nach der PCR überschüssige Primer und unverbrauchte dNTP zu entfernen, wurde das PCR-Produkt enzymatisch aufgereinigt. Dazu wurden zu 1 µl PCR-Produkt 3,4 µl destilliertes Wasser und 0,6 µl ExoSAP-IT gegeben (Tabelle 5) und im Thermocycler für 15 min bei 37 °C inkubiert, um das PCR-Produkt zu reinigen. Anschließend wurden die Enzyme des Aufreinigungsreagenz 15 min bei 80 °C inaktiviert.

Tabelle 5: **Pipettierschema der enzymatischen Aufreinigung**

	Menge in µl
PCR-Produkt	1,0
ExoSAP-IT	0,6
destilliertes Wasser	3,4
Summe	5,0

3.3.8 Sequenzierung nach Sanger

Die Sanger-Sequenzierung zur Bestimmung der Nukleotidabfolge von DNA wurde von Frederick Sanger entwickelt, der dafür 1980 seinen zweiten Nobelpreis für Chemie erhielt (103). Sie beruht auf der Didesoxymethode, welche durch den Einsatz von ddNTP und dem dadurch verursachten Kettenabbruch gekennzeichnet ist (103). Zuerst wird eine Sequenzier-PCR durchgeführt, wobei nur ein Primer (Vorwärts- oder Rückwärtssequenz) verwendet und somit nur eine Richtung zur Synthese des neuen DNA-Stranges genutzt wird. Dabei können sowohl dNTP als auch ddNTP eingebaut werden, wobei der Einbau eines ddNTP (Terminator) zum Kettenabbruch führt, da die 3'-Hydroxygruppe fehlt, an die weitere Nukleotide geknüpft werden. Auf diesem Weg entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die für die Analyse allerdings gekennzeichnet werden müssen. Bei der Sanger-Sequenzierung kann dies grundsätzlich mithilfe von Radionukliden oder Fluoreszenzmarkern erreicht werden. In dieser Arbeit wurden Fluorophor-markierte ddNTP in der Sequenzier-PCR verwendet. Die Fluoreszenz wird in den Kapillaren eines Sanger-Sequenziergerätes durch einen Laserdetektor dokumentiert (103).

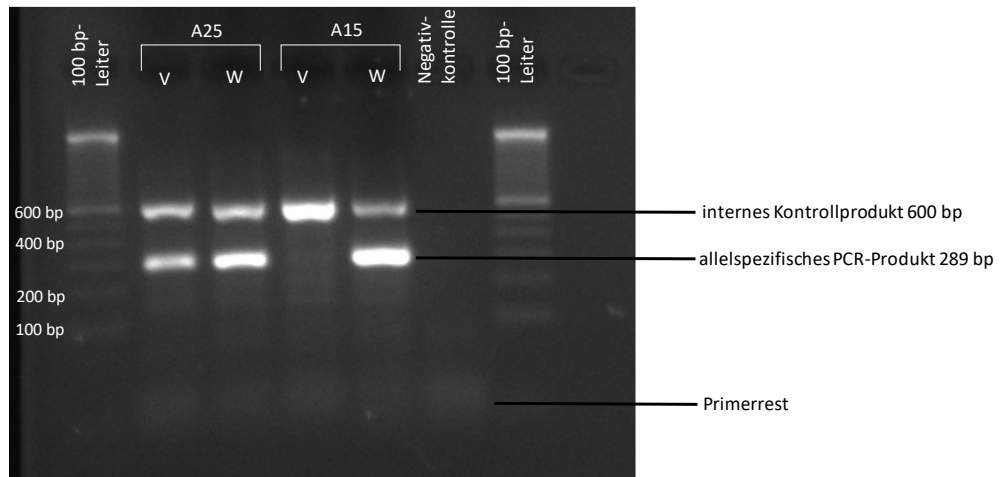
Bevor das PCR-Produkt in das Sequenziergerät eingeladen wird, müssen überflüssige Terminatoren entfernt werden. Diese nicht eingebauten ddNTP könnten die Analyse der Probe stören, indem sie zu *dye blobs*, Bereiche mit unsauber abgebildeter Sequenz, führen.

Zur Entfernung der Terminatoren wurde das PCR-Produkt mithilfe des Dye Ex 2.0 Spin Kits durch eine Aufreinigung mittels Silikagelsäule gesäubert. Die Gelsäule wurde mithilfe des Vibrationsmischers resuspendiert und anschließend für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert, um überflüssiges Wasser zu entfernen. Anschließend wurde das Produkt der Sequenzier-PCR auf das Gel pipettiert und die Säule in einem Auffanggefäß bei 3000 rpm drei Minuten lang zentrifugiert. Das Eluat enthielt das gereinigte PCR-Produkt, während die überflüssigen ddNTP in den Poren des Gels zurückgehalten wurden.

3.3.9 Nachweis von Einzelnukleotidpolymorphismen mittels allelspezifischer PCR

Die allelspezifische PCR ist eine Methode, die es ermöglicht, verschiedene Allele durch PCR und nachfolgende Gelelektrophorese nachzuweisen. Dazu werden je Probe zwei PCRs mit verschiedenen Vorwärtsprimern durchgeführt. Diese sind am 3'-Ende modifiziert, sodass die letzte Base entweder zum Wildtyp oder zur Variante

komplementär ist (104). Um die Spezifität der Vorwärtsprimer zu erhöhen, wird auch die vorletzte Base modifiziert, sodass ein Basenfehlpaarung entsteht. Da unterschiedliche Basenfehlpaarungen die Hybridisierung zwischen Primer und Template unterschiedlich stark destabilisieren, wird bei starker Basenfehlpaarung der letzten Base eine schwache Basenfehlpaarung der vorletzten Base gewählt und anders herum (105). Für beide PCR-Ansätze wird derselbe Rückwärtsprimer verwendet und zudem wird ein Kontroll-Primerpaar eingesetzt, welches an anderer Stelle bindet (104). Bei Homozygoten erwartet man entweder ein Produkt in der PCR mit dem wildtyp- oder mit dem variantenspezifischen Vorwärtsprimer. Bei Heterozygoten entstehen in beiden Fällen PCR-Produkte (Abbildung 5). Um die Spezifität des variantenspezifischen Primers zu testen, wurde eine Probe mit homozygotem Wildtypallel als Kontrolle sequenziert, wobei erwartet wurde, dass bei Einsatz des variantenspezifischen Primers kein PCR-Produkt entsteht. Die Spezifität des wildtypspezifischen Primers konnte nicht mithilfe einer Probe mit homozygotem Vorliegen der jeweiligen Variante getestet werden, da sich in der Studienpopulation keine Patient*innen mit diesem Genotyp befanden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Um die Variante NM_001737:c.1427T>C, p.Ile476Thr in Exon 10 des *C9*-Gens darzustellen, wurden ein zweites Mal Primer designt, welche jedoch ebenfalls nicht zu einer allelspezifischen Amplifikation führten. Nach der Optimierung der PCR-Bedingungen wurde für NM_001710:c.1407C>G, p.Ile469Met in *CFB* das Programm Touchdown 61 °C und für NM_000064:c.2533G>A, p.Val845Met in *C3* das Programm Touchdown 63 °C genutzt (Tabelle 3). Für alle anderen Varianten wurde das Programm 6030 (Tabelle 2) verwendet. Zur internen Kontrolle der Funktionsfähigkeit des PCR-Ansatzes wurde Exon 3 des *VEGFA*-Gens unter Nutzung der Primer VEGFA-e3-F und VEGFA-e3-R (Tabelle 1) mitamplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese dargestellt.



V: variantenspezifischer Vorwärtsprimer
W: wildtypspezifischer Vorwärtsprimer

Abbildung 5: Gelelektrophorese der allelspezifischen PCR der genetischen Variante NM_000632:c.1790G>A, p.Gly597Glu im *ITGAM*-Gen. Unter Einsatz des wildtypspezifischen Vorwärtsprimers kommt es sowohl bei A25, wo c.1790G>A heterozygote vorliegt, als auch bei A15, wo das G-Allel homozygot vorliegt, zu einer Amplifikation, erkennbar an der Bande bei ca. 300 bp. Wird der variantenspezifische Primer eingesetzt, entsteht nur bei A25 ein PCR-Produkt von ca. 300 bp und bei Patient*in A15 lediglich das ca. 600 bp große Produkt der internen Kontrollprimer VEGFA-e3-F/R. Patient*in A15 trägt die genetische Variante somit nicht. In der Negativkontrolle ist bei Abwesenheit der zu amplifizierenden DNA kein PCR-Produkt entstanden. V: variantenspezifischer Vorwärtsprimer; W: wildtypspezifischer Vorwärtsprimer.

Tabelle 6: Primer der allelspezifischen PCR

Primer	Vorwärtssequenz Variante	Amplikongröße (bp)
	Vorwärtssequenz Wildtyp	
	Rückwärtssequenz	
MAASP2-e3-Fv/Fw/R	5'-CCCGTGAACGGCTTCTCGTTGGAGTACC-3'	194
	5'-CCCGTGAACGGCTTCTCGTTGGAGTACT-3'	
	5'-CCTGGGTCTTGCCTTCACTCCCTGTGAC-3'	
CFHR2-e4-Fv/Fw/R	5'-ATCAAATAACATGTAGAAACGGACAATGGTCGT-3'	185
	5'-ATCAAATAACATGTAGAAACGGACAATGGTCGG-3'	
	5'-ATATAGACATTTGGTAGGCAAGCATTTCAGCAGA-3'	
C9-e10-1-Fv/Fw/R	5'-TTCATTTTCACTGGAACCAGATTATAGG-3'	195
	5'-TTCATTTTCACTGGAACCAGATTATAGA-3'	
	5'-TGATTGTTTAAAAGCTAACATCACATCT-3'	
C9-e10-2-Fv/Fw/R	5'-CATTTTTTCATTTTCACTGGAACCAGATTATAGG-3'	233
	5'-CATTTTTTCATTTTCACTGGAACCAGATTATAGA-3'	
	5'-GACCTCCCTGATAGCAGTCATCTT-3'	
CFB-e22-Fv/Fw/R	5'-GGAAAACCTGGAAGATGTTTTCTACCAAATGAAG-3'	207
	5'-GGAAAACCTGGAAGATGTTTTCTACCAAATGAAC-3'	
	5'-ATTCTAAGGTAAAGTGAACAGTGCCAGGAAAC-3'	
C5-e18-Fv/Fw/R	5'-CCACAACCAGCTTTCTGGAAAATAACTAT-3'	227
	5'-CCACAACCAGCTTTCTGGAAAATAACTAC-3'	
	5'-GCACCCTGCCTATAATTCTATTTTGGAA-3'	
ITGAM-e15-Fv/Fw/R	5'-GTGGGGGCCAGGACCTCACAATGGATCA-3'	289
	5'-GTGGGGGCCAGGACCTCACAATGGATCG-3'	
	5'-GACTCTGACCTCTCCGGCTTCCTTGCCT-3'	
C3-e20-Fv/Fw/R	5'-TAATTGTAGAGAACGGCTCGGATTTCCCT-3'	260
	5'-TAATTGTAGAGAACGGCTCGGATTTCCCC-3'	
	5'-CGTTTAGTTCACAGGCTTCAGCAAAGACA-3'	

3.3.10 Interpretation der pathogenetischen Relevanz der identifizierten genetischen Varianten

Die zur Interpretation der identifizierten Sequenzvarianten genutzten ACMG-Kriterien berücksichtigen neben der Art der Mutation und der resultierenden Auswirkung auch Daten aus Genomdatenbanken, Literatur sowie Segregationsanalysen und Vorhersagen mittels *in silico*-Tools (92). Die Kriterien wurden manuell auf die identifizierten genetischen Varianten angewendet. Daraufhin wurden die Varianten anhand der

zutreffenden Kriterien einer von fünf Kategorien (*pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign, benign*) zugeordnet.

Die europäischen Populationen des 1000-Genomprojektes (1000G) (Datensatz: 1000 Genomes Project Phase 3; Population: EUR) sowie der Genomdatenbank *Genome Aggregation Database* (gnomAD) (106) (Datensatz: gnomAD v2.1.1, Population: European (non-Finnish)) wurden zur Einordnung der beobachteten Allelfrequenzen genutzt. Für die Bewertung der *in silico*-Evidenz wurden zur Pathogenitätsprädiktion von Missensevarianten neben dem SIFT-, CADD- und PolyPhen-2-Score auch die Bewertung durch die Prädiktionstools *Rare Exome Variant Ensembl Learner* (REVEL) (107) sowie Mutation Taster (108) genutzt. Zur Prädiktion eines möglichen Einflusses auf das Spleißen wurde SpliceAI genutzt (109). Die Konservierung wurde durch den phastCons- und den phyloP-Score abgebildet (110). Der phastCons-Score kann Werte von 0 bis 1 annehmen, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass ein Nukleotid konserviert ist, umso höher ist, desto näher der Wert bei 1 liegt. Der phyloP-Score nimmt Werte von -14 bis 6 an, wobei positive Werte eine Konservierung und negative Werte eine Akzeleration anzeigen.

UniProt (111) lieferte Informationen über die Proteinsequenz und -struktur und diente zur Ermittlung, ob die Mutation innerhalb einer funktionellen Domäne lokalisiert ist. Die Datenbank Decipher (112) gab einen Überblick über benachbarte genetische Varianten und deren Phänotypassoziationen. Auch die Datenbank ClinVar (113) wurde verwendet, um bereits beobachtete Phänotypassoziationen der identifizierten Variante zu recherchieren.

3.3.11 Statistische Methoden

Um den Zusammenhang zwischen genetischen Varianten in *VEGFA* und der Entwicklung einer AMD zu betrachten, wurde zuerst die Verteilung der jeweiligen Allele und Genotypen auf Studienpopulation und Kontrollgruppe berechnet. Daraufhin wurden zur Betrachtung eines möglichen Zusammenhangs der Allele und Genotypen mit der Entwicklung einer AMD die Odds Ratio (OR) mit 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) und der p-Wert (114) mittels SPSS ermittelt. Dazu wurden die Fälle mit den Häufigkeiten gewichtet und eine binär-logistische Regression durchgeführt. Um die Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) für Studienpopulation und Kontrollgruppe zu betrachten, wurde der p-Wert der Abweichung der tatsächlichen Genotyphäufigkeit von der erwarteten Häufigkeit mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt. Ebenso wurde die Verteilung der Allele und Genotypen auf Patient*innen mit stabilem Visus unter Anti-VEGF-Therapie und Patient*innen mit einem Visusabfall von mehr als drei Zeilen und

damit schlechtem Ansprechen auf die Therapie mit VEGF-Inhibitoren betrachtet, um den Zusammenhang von *VEGFA*-Varianten und dem Therapieansprechen zu beurteilen. Auch hier wurden OR mit 95%-KI und p-Wert ermittelt. Da bei der Variante rs25648 in der Gruppe der Patient*innen mit gutem Therapieansprechen der Genotyp TT nicht auftrat, wurde hier für die Berechnung der OR eine Haldane-Anscombe-Korrektur angewendet.

3.3.12 Sekundärstrukturanalyse und Proteinmodelle

Für die identifizierten Missensevarianten wurde die Ausbildung von β -Faltblättern und α -Helices mithilfe der Sekundärstrukturprädiktionstools PSIPRED (115), Jpred4 (116) und s2D (117) und der Modellierungsserver SWISS-MODEL (118) und I-TASSER (119) untersucht. Das Onlinetool 2Struc (120) wurde genutzt, um aus den 3D-Modellen die Sekundärstruktur zu generieren. Die Aminosäuresequenzen wurden von UniProt bezogen (Tabelle 7). Es wurde verglichen, ob für Wildtyp und Variante Unterschiede in der Sekundärstruktur vorhergesagt werden (Anhang 1).

Mithilfe der 3D-Grafiksoftware PyMOL (Version 2.5.5) (121) wurden zudem 3D-Modelle der jeweiligen Proteine modifiziert, sodass sie den jeweiligen Aminosäureaustausch enthalten und bezüglich der Wasserstoffbrückenbindungen (Anhang 2) und Hydrophobizität (Anhang 3) mit dem Wildtyp verglichen werden können. Dabei wurde das Rotamer mit der höchsten Frequenz ausgewählt (Anhang 4). Ein Rotamer bezeichnet die Konformation der Seitenketten einer Aminosäure in einem Protein (122). Zudem wurde die Energie im Bereich von 5 Å um den Aminosäureaustausch minimiert, um die Konformation zu optimieren. Das jeweilige PDB-File, welches die Informationen über die dreidimensionale Struktur des Proteins enthält, wurde von der Proteinstruktur-Datenbank AlphaFold (123,124) bezogen (Tabelle 7).

Tabelle 7: *Accession number* in der Proteindatenbank UniProt und *Identifier* des Proteinstrukturmodells

Protein	UniProt accession number	Identifier
MASP-2	O00187	AF-O00187-F1
C9	P02748	AF-P02748-F1
Faktor B	P00751	AF-P00751-F1
C5	P01031	AF-P01031-F1
Integrin α-M	P11215	AF-P11215-F1
C3	P01024	AF-P01024-F1

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von zwei VEGFA-Varianten in der Studienpopulation

In der Gruppe der AMD-Betroffenen wurden insgesamt zwei Abweichungen von der Referenzsequenz des VEGFA-Gens (Transkript NM_003376.6) identifiziert (Abbildung 6, Tabelle 8). Die synonyme Variante c.534C>T, p.Ser178= (rs25648) und die intronische Variante c.856-28C>T (rs3025000) wurden jeweils sowohl hetero-, als auch homozygot detektiert. Die Varianten sind nicht in den funktionellen Proteindomänen von VEGF-A lokalisiert. Diese sind eine *Platelet-derived growth factor* (PDGF)-Domäne zur Rezeptorbindung sowie, bei Heparin bindende Isoformen von VEGF-A, eine C-terminale Heparinbindungsdomäne, die die Bindung an die Rezeptoren moduliert und relevant für die Endothelzellproliferation ist (125,126). Beide Varianten wurden in der Populationsdatenbank gnomAD bereits beschrieben (T = 0,1668 bzw. T = 0,3060; v2.1.1) und auch in der Gruppe der Individuen ohne AMD jeweils hetero- und homozygot nachgewiesen.

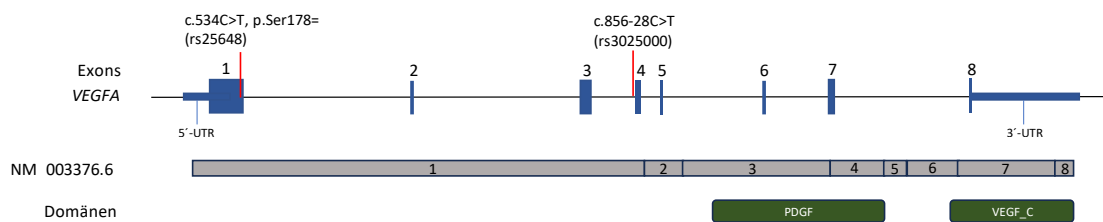


Abbildung 6: **Schematische Darstellung des VEGFA-Gens mit den in der AMD-Patient*innen-Gruppe identifizierten Varianten.** Als blaue Balken sind die 8 Exons des VEGFA-Gens sowie die untranslatierten Regionen (abgeflachte Balken) dargestellt. Zudem sind am Transkript NM_003376.6 (grau) die funktionellen Proteindomänen (grün) PDGF und VEGF_C gezeigt.

Tabelle 8: **Gegenüberstellung der identifizierten VEGFA-Varianten und des Visus.** Dargestellt sind die beiden im Patient*innenkollektiv festgestellten Varianten des VEGFA-Gens gegenüber dem Therapieansprechen (stabiler Visus oder Visusabfall unter Therapie mittels VEGF-Inhibitor). Die Spalten 3 und 4 zeigen den Genotyp der Varianten c.856-28C>T und c.534C>T, p.Ser178=.

Patient*in	Visus	Genotyp c.856-28C>T	Genotyp c.534C>T
A1	stabil	CC	CC
A2	stabil	CC	CC
A3	abfallend	TT	CC
A4	abfallend	TT	CC
A5	abfallend	CC	CC
A6	stabil	TT	CC
A7	abfallend	CT	CC
A8	abfallend	CC	CC
A9	stabil	TT	CC
A10	stabil	CC	CT
A12	stabil	TT	CC
A13	abfallend	CC	CC
A14	abfallend	CT	CC
A15	abfallend	CT	CC
A16	abfallend	CC	TT
A19	stabil	CC	CC
A23	abfallend	CT	CC
A24	abfallend	CC	CC
A25	stabil	CT	CC

Zudem wurden die Varianten mit der höchsten prädiktierten Pathogenität aus der NGS-Panel-Analyse ausgewählt. Die sieben Varianten konnten mittels allelspezifischer PCR bzw. Sanger-Sequenzierung verifiziert werden. Alle sieben Veränderungen sind im Exonbereich gelegene, nicht-synonyme Varianten, die jeweils bei einem Individuum aus der Gruppe der AMD-Betroffenen heterozygot nachgewiesen wurden. Sechs Varianten sind Missensevarianten und wiesen einen SIFT-Score < 0,05 (*deleterious*), einen PolyPhen-2-Score > 0,908 (*probably damaging*) und einen CADD-Score > 20 auf und erhielten somit 3 Punkte im daraus gebildeten Score für die größte prädiktierte pathogenetische Relevanz. Zudem wurde die Variante NM_005666:c.595G>T, p.Glu199Ter im CFHR2-Gen zur weiteren Auswertung ausgewählt. Diese Variante erhielt keinen SIFT- und PolyPhen-2-Score, da diese Tools Missensevarianten aufgrund der verursachten Aminosäuresubstitution beurteilen. Die Variante c.595G>T, p.Glu199Ter führt durch den Basenaustausch jedoch zu einem Stoppcodon. Da eine solche Nonsensevariante zu einem verkürzten Protein oder dem vorzeitigen Abbau der mRNA führt, wurde sie trotzdem zur weiteren Auswertung ausgewählt. Weitere Nonsensevarianten wurden in der Studienpopulation nicht nachgewiesen. Bereits

eindeutig als Risikovarianten für die Entwicklung einer AMD beschriebene Varianten, wie die Hauptrisikovariante NM_000186.4:c.1204T>C, p.Tyr402His im *CFH*-Gen, wurden in dieser Studienpopulation nicht detektiert. Die *in silico*-Prädiktionen der ausgewählten Varianten des NGS-Panels durch die drei Tools SIFT, PolyPhen-2 und CADD sowie durch Mutation Taster und die Konservierung sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: **Mittels NGS-Panel der Gene des Komplementsystems identifizierte Varianten in der Studienpopulation.** SIFT (S): < 0,05: *deleterious*; PolyPhen-2 (P): > 0,908: *probably damaging*; C: CADD; Mutation Taster (MT): B: *benign*, D: *deleterious*; phastCons (phast): 0 (nicht konserviert) – 1 (konserviert); phyloP (phylo): - 14 (Akzeleration) – 6 (Konservierung).

Gen	Variante kodierende DNA Protein	Score NGS-Varianten			MT	Konservierung	
		S	P	C		phast	phylo
MASP2	NM_006610:c.359A>G p.Asp120Gly	0,01	0,993	28,8	D	1	4,502
CFHR2	NM_005666:c.595G>T p.Glu199Ter	/	/	35,0	B	0,005	-0,158
C9	NM_001737:c.1427T>C p.Ile476Thr	0,00	0,950	26,8	B	0,976	3,883
CFB	NM_001710:c.1407C>G p.Ile469Met	0,02	0,972	22,8	D	0,991	-0,101
C5	NM_001735:c.2297G>A p.Arg766Gln	0,01	0,998	28,5	D	1	4,469
ITGAM	NM_000632:c.1790G>A p.Gly597Glu	0,00	0,998	25,1	B	0,995	2,206
C3	NM_000064:c.2533G>A p.Val845Met	0,00	1,000	26,7	B	1	1,44

4.2 Bewertung der Varianten im *VEGFA*-Gen

4.2.1 Variante c.534C>T, p.Ser178=: kein Einfluss auf die Proteinsequenz

Die Substitution c.534C>T, p.Ser178= (rs25648) befindet sich im ersten Exon bzw. der 5'-UTR und wurde bei zwei Patient*innen festgestellt. Die Veränderung ist synonym und führt folglich zu keinem Austausch des an dieser Stelle befindlichen Serins. In der Studienpopulation trägt Patient*in A10 die Veränderung heterozygot und Patient*in A16 homozygot (Abbildung 7). Die ermittelten Allelfrequenzen von rs25648 zeigten einen niedrigeren Anteil des T-Allels in der Gruppe mit AMD verglichen mit der Kontrollgruppe ohne AMD (OR T gegenüber C = 0,277; 95%-KI = 0,076 – 1,016; p = 0,053) (Tabelle 10). Die Genotypen CT und TT zusammen waren in der Kontrollgruppe häufiger (OR = 0,147; 95%-KI = 0,030 – 0,733; p = 0,019) (Tabelle 10). Der Genotyp TT wurde in der Gruppe mit AMD und der Kontrollgruppe jeweils nur einmal detektiert (Tabelle 10). Die Verteilung der Genotypen zeigte in der Gruppe mit AMD keine Übereinstimmung mit dem HWE (Tabelle 10).

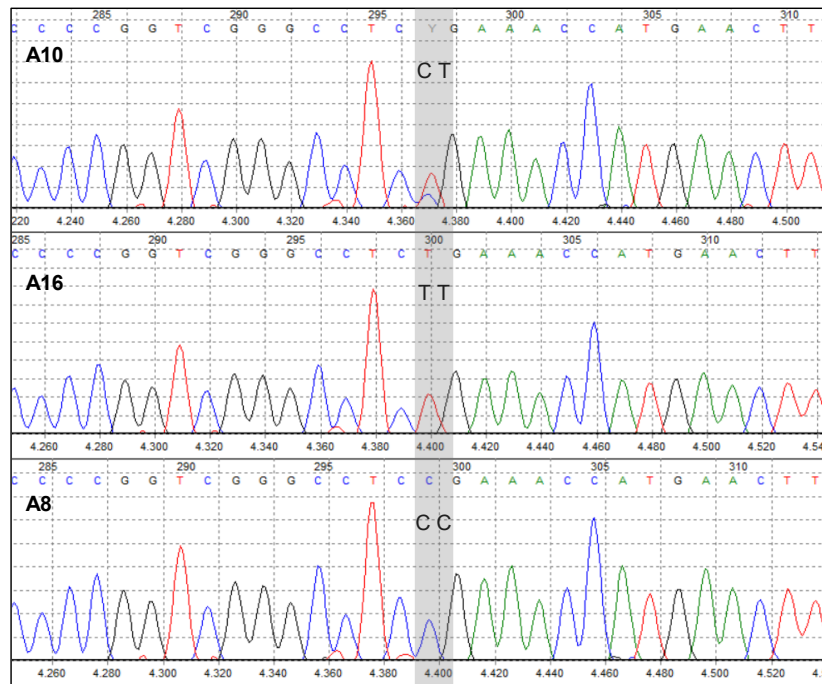


Abbildung 7: **Elektropherografische Darstellung der Basenabfolge des Rückwärtsstranges im ersten Exon des VEGFA-Gens.** Patient*in A10 ist heterozygot für c.534C>T (Genotyp CT), Patient*in A16 trägt das Minorallel homozygot (Genotyp TT) und Patient*in A8 trägt homozygot das Majorallel (Genotyp CC).

Tabelle 10: **Verteilung der Allele und Genotypen der Varianten c.534C>T, p.Ser178= und c.856-28C>T und Assoziation mit der Entwicklung einer AMD.** p-Wert HWE: p-Wert der Abweichung vom HWE; OR: Odds Ratio; 95%-KI: 95%-Konfidenzintervall.

genetische Variante		Häufigkeit in % (n)			OR mit 95%-KI	p-Wert
		gnomAD	AMD	keine AMD		
c.534C>T (rs25648)	Allel					
	C	83,3	92,1 (35)	76,4 (55)	0,277 (0,076 - 1,016)	0,053
	T	16,7	7,9 (3)	23,6 (17)		
	Genotyp					
	CC	69,4	89,5 (17)	55,6 (20)	0,147 (0,030 – 0,733) CT/TT vs. CC 1,944 (0,115 – 32,933) TT vs. CC/CT	0,019
	CT	27,9	5,3 (1)	41,7 (15)		
	TT	2,7	5,3 (1)	2,8 (1)		
	p-Wert HWE		0,005	0,352		
c.856-28C>T (rs3025000)	Allel					
	C	69,4	60,5 (23)	72,2 (52)	1,696 (0,739 - 3,889)	0,212
	T	30,6	39,5 (15)	27,8 (20)		
	Genotyp					
	CC	48,0	47,4 (9)	50,0 (18)	1,111 (0,365 – 3,380) CT/TT vs. CC 6,071 (1,051 – 35,077) TT vs. CC/CT	0,853
	CT	42,8	26,3 (5)	44,4 (16)		
	TT	9,2	26,3 (5)	5,6 (2)		
	p-Wert HWE		0,050	0,518		

Anhand der ACMG-Kriterien ist diese Variante als benigne einzuordnen, da die Frequenz des T-Allels mit etwa 17 % in gnomAD und 1000G in Europa hoch ist. Zudem handelt es sich um eine synonyme Variante, die das Spleißen voraussichtlich nicht beeinflusst und

sich nicht an einer stark konservierten Position befindet (phyloP = 0,604). Unterstützt wird die benigne Klassifizierung auch durch die benigne Bewertung durch *in silico*-Tools.

4.2.2 Intronsche Variante c.856-28C>T

Die intronsche Variante c.856-28C>T (rs3025000) konnte bei fünf Patient*innen (A3, A4, A6, A9, A12) homozygot und bei weiteren fünf (A7, A14, A15, A23, A25) heterozygot nachgewiesen werden (Abbildung 8). Die Häufigkeit des Minorallels T beträgt in der Gruppe mit AMD 0,395 und liegt somit etwas über der europäischen Vergleichspopulationen (1000G: 0,290; gnomAD: 0,306). Das T-Allel ist in dieser Studie in der Gruppe mit AMD häufiger (OR T gegenüber C = 1.696; 95%-KI = 0,739 – 3,889; $p = 0,212$). Der Anteil des Genotyp TT war ebenfalls in der Gruppe der von AMD Betroffenen größer (OR = 6,071; 95%-KI = 1,051 – 35,077; $p = 0,044$). Auch die Genotypen CT und TT zusammen wiesen eine höhere Frequenz in der AMD-Gruppe auf (OR = 1,111; 95%-KI = 0,365 – 3,380; $p = 0,853$). Die Verteilung der Allele und Genotypen sowie die Assoziation mit der Entwicklung einer AMD sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Variante ist nach ACMG als benigne Variante einzuordnen, da sie in europäischen Vergleichspopulationen sehr häufig nachgewiesen wurde und auch die *in silico*-Evidenz für Benignität spricht.

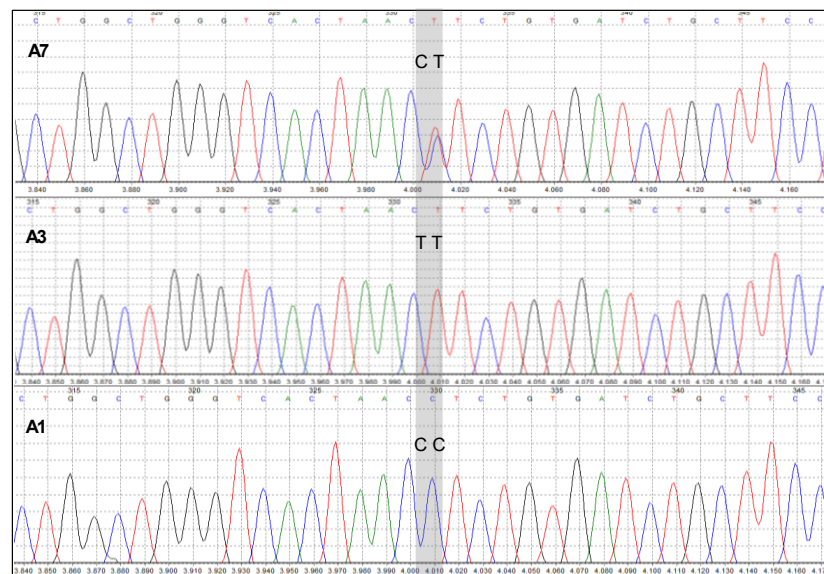


Abbildung 8: Elektropherografische Darstellung der Basenabfolge des Rückwärtsstranges im Intronbereich *upstream* von Exon 4 des *VEGFA*-Gens. Patient*in A7 ist heterozygot für c.856-28C>T (Genotyp CT), Patient*in A3 trägt das Minorallel homozygot (Genotyp TT) und Patient*in A1 trägt homozygot das Majorallel (Genotyp CC).

4.3 Ansprechen auf die Therapie mittels VEGF-Inhibitoren

In der Gruppe der AMD-Betroffenen sprachen 8 Patient*innen auf die Anti-VEGF-Therapie an, während 11 Patient*innen nicht ausreichend ansprachen. Die Einteilung erfolgte dabei anhand des Dezimalvisus unter Therapie. Die Patient*innen wurden in solche mit stabilem Visus und mit Visusabfall unter Therapie eingeteilt, wobei ein Visusabfall einen Verlust von mehr als drei Zeilen bedeutete. Das Minorallel T der VEGFA-Variante rs25648 wurde einmal (6,3 %) in der Gruppe der Patient*innen mit stabilem Visus und zweimal (9,0 %) in der Gruppe mit Visusabfall unter Therapie nachgewiesen (OR: 0,667; 95%-KI = 0,055 – 8,057; p = 0,750) (Tabelle 11). In der Gruppe mit stabilem Visus trägt Patient*in A10 die Variante heterozygot (CT). Patient*in A16 aus der Gruppe mit stabilem Visus unter Therapie trägt den Genotyp TT und somit die Variante rs25648 homozygot. Alle anderen Patient*innen beider Gruppen weisen die Variante nicht auf.

Das T-Allel der zweiten in der Studienpopulation identifizierten Variante, rs3025000, wurde siebenmal (43,8 %) in der Gruppe der Patient*innen mit stabilem Visus und achtmal (36,4 %) in der Gruppe mit Visusabfall unter Therapie festgestellt (OR: 1,361; 95%-KI = 0,365 – 5,072; p = 0,646) (Tabelle 11). Der heterozygote Genotyp CT wurde einmal (12,5 %) in der Gruppe mit stabilem Visus nachgewiesen und 3 Patient*innen (37,5 %) wiesen in dieser Gruppe die Variante homozygot (TT) auf. Bei den Patient*innen mit Visusabfall trotz Anti-VEGF-Therapie trat der Genotyp CT viermal (36,4 %) und der Genotyp TT zweimal (18,2 %) auf (Tabelle 11).

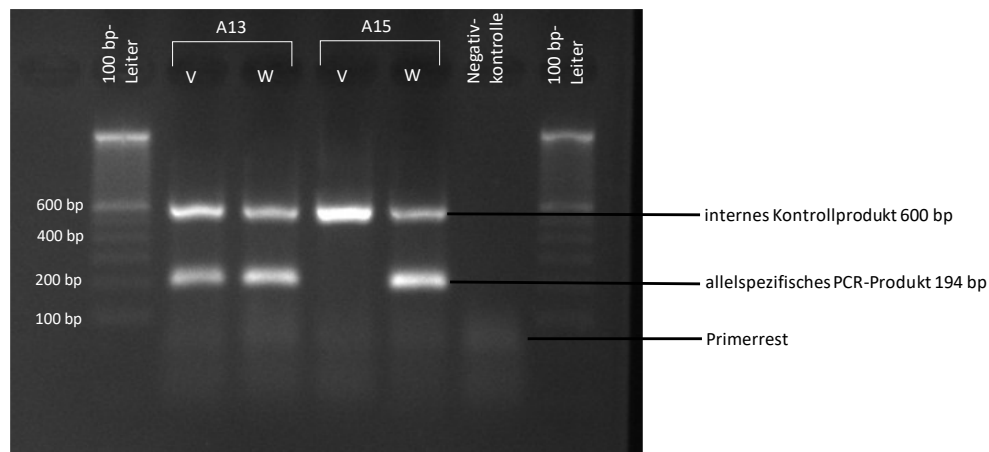
Tabelle 11: **Verteilung der Allele und Genotypen der VEGFA-Varianten auf Patient*innen mit stabilem Visus bzw. Visusabfall unter Therapie mit VEGF-Inhibitoren.** OR: Odds Ratio; 95 % KI: 95%-Konfidenzintervall.

genetische Variante		Häufigkeit in % (n)		OR mit 95%-KI	p-Wert
		Visus stabil	Visusabfall		
c.534C>T (rs25648)	Allel				
	C	93,8 (15)	90,9 (20)	0,667	0,750
	T	6,3 (1)	9,0 (2)	(0,055-8,057)	
	Genotyp				
	CC	87,5 (7)	90,9 (10)	0,700	0,812
	CT	12,5 (1)	0,0 (0)	(0,037-13,179) CT/TT vs. CC	
c.856-28C>T (rs3025000)	TT	0,0 (0)	9,1 (1)	2,429 (0,087-67,573) TT vs. CC/CT	0,601
	Allel				
	C	56,3 (9)	63,6 (14)	1,361	0,646
	T	43,8 (7)	36,4 (8)	(0,365-5,072)	
	Genotyp				
	CC	50,0 (4)	45,5 (5)	1,200	0,845
	CT	12,5 (1)	36,4 (4)	(0,194-7,441) CT/TT vs. CC	
	TT	37,5 (3)	18,2 (2)	0,370 (0,046-3,015) TT vs. CC/CT	0,353

4.4 Bewertung der Varianten der NGS-Genpaneldiagnostik

4.4.1 Die Veränderung c.359A>G, p.Asp120Gly betrifft die CUB-Domäne des *MASP2*-Gens

Patient*in A13 wies die heterozygote Substitution NM_006610:c.359A>G, p.Asp120Gly (rs72550870) im *MASP2*-Gen auf (Abbildung 9). Der Austausch von T gegen C führt dabei zu einem Ersatz der sauren Aminosäure Asparaginsäure durch das neutrale Glycin an Aminosäureposition 120. Die Häufigkeit des C-Allels beträgt in Europa 0,039 (1000G). PhastCons- (1) und phyloP-Score (4,502) sprechen für eine starke Konservierung an der Position dieses Basenaustausches. Die betroffene Aminosäure ist ebenfalls stark konserviert. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Varianten an dieser Stelle schlechter toleriert werden und spricht für eine mögliche Auswirkung auf Proteinebene, was auch durch funktionelle Studien unterstützt wird. *In vitro* wurde eine Beeinträchtigung der Bildung von MBL-MASP-2-Komplexen und somit eine veränderte Proteinfunktion durch die Variante nachgewiesen (128,129). Die Variante befindet sich in der funktionell wichtigen CUB1-Domäne. In der Literatur wurde diese Variante bei Patient*innen mit Immundefizienz nachgewiesen (128,130). Jedoch sind auch gesunde Träger*innen der Variante berichtet worden (130–132). Die Variante ist in der Datenbank ClinVar enthalten. Das G-Allel wurde bezüglich MASP-2-Defizienz zweimal als *likely pathogenic* und je einmal als *pathogenic* und als Variante unklarer Signifikanz (VUS) klassifiziert. Anhand der ACMG-Kriterien kann die Variante als *likely pathogenic* eingeordnet werden.



V: variantenspezifischer Vorwärtsprimer
W: wildtypspezifischer Vorwärtsprimer

Abbildung 9: **Darstellung der allelspezifischen PCR zum Nachweis von NM_006610:c.359A>G, p.Asp120Gly mittels Gelelektrophorese.** Unter Einsatz des wildtypspezifischen Vorwärtsprimers entsteht bei A13 und bei A15 ein ca. 200 bp großes Produkt, während bei Verwendung des variantenspezifischen Primers nur bei A13 ein entsprechendes PCR-Produkt entsteht. Somit trägt A13 die Variante c.359A>G in *MASP2* heterozygot während A15 die Variante nicht trägt.

4.4.2 Vorzeitiges Stoppcodon durch c.595G>T, p.Glu199Ter im *CFHR2*-Gen

Die Substitution NM_005666:c.595G>T, p.Glu199Ter (rs41257904), welche bei Patient*in A10 vorlag, führt zur Entstehung eines neuen Stoppcodons (TAA) und ist somit eine Nonsensevariante (Abbildung 10). Das resultierende Protein wäre stark trunkiert: Das Stoppcodon befände sich bereits an Position 597 statt 813 und es würde zum teilweisen bzw. vollständigen Verlust der für die C3b-Bindung wichtigen Domänen SCR 3 und SCR 4 kommen (133). Da stark verkürzte mRNA wesentlich stärker abgebaut wird (*nonsense-mediated mRNA decay*; NMD), um Schäden durch trunkierte Proteine zu vermeiden (134,135), ist es möglich, dass die mRNA nicht translatiert wird. Insbesondere bei einem vorzeitigen Stoppcodon mindestens 50 bp upstream der letzten Exon-Exon-Grenze, kann ein NMD ausgelöst werden (136). Da c.595G>T, p.Glu199Ter weniger als 50 bp vor der letzten Exon-Exon-Grenze liegt, wäre es möglich, dass die mRNA bei Vorliegen dieser Variante dem NMD entgeht. Dies entspricht auch der Prädiktion durch Mutation Taster. Mittels funktioneller Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Vorliegen der Variante kein Protein synthetisiert wird, da die Variante zu einem Verlust der Proteindomäne SCR 4 führt (137). Individuen, welche die Variante tragen, wiesen eine verminderte Serumkonzentrationen von FHR2 auf (38,137). Die Variante führt somit zu einem Funktionsverlust, jedoch sind in der Datenbank ClinVar keine pathogenen Varianten, die zu einem Funktionsverlust führen, hinterlegt.

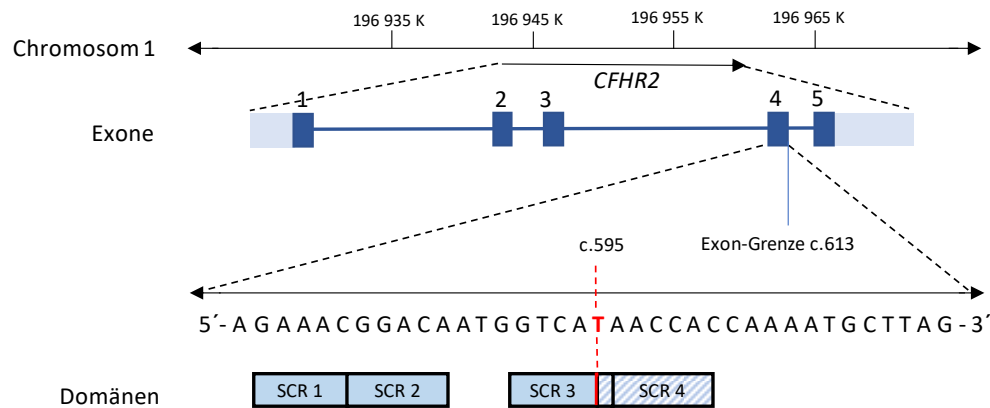


Abbildung 10: **Transkript NM_005666 von CFHR2.** Im Ausschnitt der Sequenz des vierten Exons ist die Variante c.595G>T rot markiert. Der Austausch von G gegen T führt zum Stoppcodon TAA. Die Variante betrifft die funktionellen Domänen SCR 3 und SCR 4 des FHR2-Proteins.

Diese Variante kann aufgrund des resultierenden vorzeitigen Stoppcodons und den resultierenden funktionellen Konsequenzen als *pathogenic* klassifiziert werden.

4.4.3 Heterozygote Veränderung c.1427T>C, p.Ile476Thr im C9-Gen

Die Missense-Variante NM_001737:c.1427T>C, p.Ile476Thr (rs141645272) führt zu einem Austausch von Isoleucin gegen Threonin an der Aminosäureposition 476. Patient*in A19 trägt diese Variante heterozygot. Sie befindet sich in der MAC/Perforin-Domäne (MACPF-Domäne), welche funktionell wichtig für die Lyse von Krankheitserregern durch den Membranangriffskomplex ist (138). Jedoch gibt es keine eindeutigen Anhaltspunkte durch funktionelle Studien, Datenbanken oder *in silico*-Analysen, ob diese Variante als benigne oder pathogene Variante einzuordnen ist, weshalb laut ACMG-Kriterien eine Variante unklarer Signifikanz vorliegt.

Die Variante rs141645272 ist selten. Die Frequenz des C-Allels beträgt in Europa 0,0022 (gnomAD) und ist in anderen Populationen noch niedriger. In der Datenbank ClinVar ist die Variante bereits einmal als *likely benign* aufgeführt, jedoch ohne Spezifizierung eines Phänotyps.

4.4.4 Potenzielle Schwächung des Spleißdonors durch c.1407C>G, p.Ile469Met im CFB-Gen

Die Variante NM_001710:c.1407C>G, p.Ile469Met (rs201798809), welche bei Patient*in A1 nachgewiesen wurde, betrifft das vorletzte Nukleotid von Exon 10 des CFB-Gens und liegt damit innerhalb der letzten Aminosäure, sodass ein möglicher Einfluss auf das Spleißen bedacht werden muss. Basierend auf dem MaxEntScan-Modell, welches auf

dem Prinzip der maximalen Entropie aufbaut (139), wird eine Schwächung des Spleißdonors prädiziert. SpliceAI sagt wiederum keinen Einfluss auf das Spleißen vorher. Laut Uniprot befindet sich die Veränderung in der von-Willebrand-Faktor-A-Domäne (vWF-A-Domäne), welche in die Ligandenbindung von Faktor B involviert ist (140).

Das von der Variante betroffene Nukleotid ist selbst nicht konserviert (phyloP: - 0,101), aber befindet sich in einem konservierten Element (phastCons: 0,991). Die Frequenz beträgt in der europäischen Population 0,0002 in gnomAD und 0,001 laut dem 1000-Genomprojekt, wobei das G-Allel in der europäischen Population am häufigsten vorkommt und in den meisten anderen Populationen gänzlich fehlt. Die Variante ist als seltene Variante zu betrachten. Mutation Taster annotiert rs201798809 als pathogene Variante. Insgesamt ist rs201798809 nach den ACMG-Guidelines eine VUS.

Laut ClinVar wurde das G-Allel bereits für den Phänotyp atypisches Hämolytisch-Urämisches Syndrom (aHUS) (MIM# 612924), einer durch Komplementüberaktivierung verursachten Erkrankung (141), einmal *likely benign* und einmal als VUS klassifiziert. Bezüglich Makuladegeneration wurde das G-Allel ebenfalls als VUS klassifiziert.

4.4.5 Seltene Varianten unklarer Signifikanz im C5- und ITGAM-Gen

Bei Patient*in A3 wurde die C5-Variante NM_001735:c.2297G>A, p.Arg766Gln (rs758933855) heterozygot nachgewiesen. Aus der Proteindatenbank Uniprot wird ersichtlich, dass sich die Veränderung in keiner bekannten, funktionell gut untersuchten Domäne von C5 befindet. Die Variante rs758933855 ist nach den ACMG-Guidelines eine VUS, da zu wenig Evidenz für Pathogenität oder Benignität vorliegt. Das A-Allel ist in gnomAD v2.1.1 nicht vorhanden.

Die Variante NM_000632:c.1790G>A, p.Gly597Glu (rs199700282) in ITGAM wurde bei Patient A25 heterozygot nachgewiesen. Die Frequenz des A-Allels beträgt in Europa 0,0001168 (gnomAD), während es in anderen Populationen in gnomAD nur ein weiteres detektiert wurde. Die Variante ist nicht in der Literatur beschrieben. Zudem sind auch keine funktionellen Auswirkungen oder Phänotypassoziationen benachbarter Varianten beschrieben.

4.4.6 Bisher nicht beschriebene Variante c.2533G>A, p.Val845Met im C3-Gen

Auch NM_000064:c.2533G>A, p.Val845Met, eine C3-Variante, die bei Patient*in A12 heterozygot vorliegt ist aufgrund fehlender Evidenz eine VUS. Sie ist in der Populationsdatenbank gnomAD (Datensatz: gnomAD v2.1.1) und im 1000-Genomprojekt (Datensatz: 1000 Genomes Project Phase 3) nicht vorhanden.

Nach Decipher befinden sich in derselben Domäne weitere Varianten, welche mit aHUS in Verbindung gebracht werden. An Aminosäureposition 844 befindet sich die Missensevariante c.2531A>G, p.Gln844Arg, dessen C-Allel als *likely pathogenic* für aHUS mit C3-Anomalie (MIM# 612925) klassifiziert wurde. Die Nonsensevariante c.2562C>G, p.Tyr854Ter ist ein Risikofaktor für denselben Phänotyp.

4.5 Proteinmodelle der Missensevarianten

4.5.1 Position der Variante im jeweiligen Protein

Asp120Gly in MASP-2: Die an Aminosäureposition 120 befindliche Asparaginsäure stellt eine Bindungsstelle für Ca^{2+} dar. Da Asp120Gly sowie der Austausch der benachbarten Residuen Tyrosin an den Positionen 74 und 121, Glutaminsäure an den Positionen 98 und 124 und Asparaginsäure an Position 75 gegen Alanin zu fehlender oder sehr schwacher Bindung an MBL führt, ist diese Region wahrscheinlich für die Bindung an MBL und Ficoline verantwortlich (142). Asp120 und Asp75 sind dabei wahrscheinlich nicht direkt in die Interaktion involviert, sondern binden, zusammen mit Glu67, Ser122, Asn123 und einem Wassermolekül, ein Ca^{2+} -Ion und stabilisieren darüber die Bindungsstelle für MBL und Ficoline (142). Die Mutation von Asparaginsäure zu Glycin an Position 120 könnte daher über die Destabilisierung der Ca^{2+} -Bindung zum Verlust der Fähigkeit zur Bindung von MBL und Ficolinen führen (142).

Ile476Thr in C9: Diese Variante betrifft die MACPF-Domäne. Es wird vermutet, dass die meisten vom Monomer zur Pore führenden Konformationsänderungen von C9 in dieser Domäne stattfinden (143,144).

Ile469Met im Faktor B: Die vWF-A-Domäne besteht, homolog zur Integrin αM A-Domäne, aus β -Faltblättern, welche von α -Helices flankiert werden (145). Ile469 befindet sich in der C-terminalen Helix der Domäne, die sich bei den Integrinen nach Ligandenbindung nach unten verlagert (146). Die Interaktion von an C3b gebundenem Faktor B (C3bB) mit Faktor D führt zu einer Konformationsänderung und Entwindung der C-terminalen Helix und schließlich zur Bindung von Faktor D und Bildung der C3-

Konvertase des alternativen Wegs (140). Jedoch kann auch ohne Faktor D eine aktive C3-Konvertase entstehen (145). Analog zur Integrin α M A-Domäne könnte dies durch eine Verlagerung der C-terminalen Helix nach unten durch die Bindung von C3b ermöglicht werden (145,146). Die daraus resultierende funktionelle Bedeutung der C-terminalen Helix der vWF-A-Domäne für die Komplementaktivierung über den alternativen Weg könnte durch Ile469Met beeinflusst werden.

Die Varianten Arg766Gln in C5, Gly597Glu im Integrin α -M und Val845Met in C3 betreffen keine funktionell abgrenzbare Proteindomäne, was jedoch einen Einfluss auf das Protein nicht ausschließt.

4.5.2 Sekundärstrukturanalyse

Die Variante Asp120Gly in MASP-2 befindet sich am Übergang eines β -Faltblattes in einen Random Coil, also einer strukturell flexiblen Region ohne erkennbare Sekundärstruktur. Die Sekundärstruktur wird durch die Mutation voraussichtlich nicht verändert. Ile476Thr in C9 befindet sich in einer α -Helix und Val845Met in C3 liegt in einem β -Faltblatt. In beiden Fällen kommt es durch die Mutation, laut Prädiktion, ebenfalls nicht zu einer Beeinflussung der Sekundärstruktur. Die Varianten Arg766Gln (C5) und Gly597Glu (Integrin α -M) befinden sich laut Vorhersage in einem Random Coil, was durch die Mutation nicht beeinflusst wird. Ile469Met im Komplementfaktor B liegt am Übergang einer α -Helix zu einem Random Coil. Das Tool PSIPRED prädiziert bei Vorhandensein von Isoleucin an Aminosäureposition 469 eine α -Helix, bei Vorhandensein von Methionin einen Random Coil (Abbildung 10), wobei zu beachten ist, dass sich die α -Helix an dieser Stelle ohnehin in einen Random Coil auflöst. Zur Validierung wurde die Analyse dennoch auf das Sekundärstrukturprädiktionstool SCRATCH (147) und die Modellierungsserver GalaxyWeb (148) und Robetta (149) erweitert. Die Vorhersagen aller anderen Tools, außer PSIPRED, zeigten keinen Unterschied in der Sekundärstruktur zwischen Isoleucin oder Methionin an Position 469 (Abbildung 10). Aufgrund der hohen Beweglichkeit von Random Coils können kurzzeitig auch Sekundärstrukturen auftreten, die dann jedoch nicht dauerhaft bestehen bleiben.

AA-Position	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475
Residuum	D	M	E	N	L	E	D	V	F	Y	Q	M	I/M	D	E	S	Q	S	L
UniProt		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H							
469I PSIPRED						H	H	H		H	H	H	H	H	H				
469I Jpred4																			
469I s2D			H	H	H	H	H	H	H										
469I SWISS-MODEL		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H					
469I I-TASSER						H	H	H	H	H									
469I SCRATCH		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H						
469I GalaxyWeb		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H			
469I Robetta			H	H	H	H	H	H	H	H	H				H	H	H		
469M PSIPRED					H	H	H	H	H	H	S	S							
469M Jpred4																			
469M s2D			H		H	H	H	H	H		H								
469M SWISS-MODEL		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H					
469M I-TASSER			H	H		H	H	H	H	H	H								
469M SCRATCH		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H						
469M Galaxy-Web		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H			
469M Robetta			H	H	H	H	H	H	H	H	H								

Abbildung 11: **Ausschnitt der Sekundärstrukturvorhersage von Faktor B an Position 469.** Laut der Vorhersage von PSIPRED geht die α -Helix bei Vorliegen von Methionin in ein β -Faltblatt über und ab Position 469 liegt ein Random Coil vor. Die anderen Tools zeigen keine Änderung der Sekundärstruktur durch Ile469Met. S (gelb): β -Faltblatt; H (rot): α -Helix; weiß: Random Coil; grün markiert: Position der Variante.

4.5.3 3D-Modelle

Die mit dem jeweiligen Aminosäureaustausch modifizierten Proteinmodelle wurden hinsichtlich der Wasserstoffbrückenbindungen (Anhang 2) und Hydrophobizität (Anhang 3) mit dem Wildtyp verglichen, da nichtkovalente Bindungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Effekte zur Stabilität der dreidimensionalen Struktur von Proteinen beitragen und die Interaktion mit anderen Molekülen ermöglichen (150). Der Verlust oder Gewinn von Salzbrücken oder Wasserstoffbrückenbindungen kann durch die Beeinflussung der lokalen Struktur krankheitsverursachend sein, selbst wenn die freie Enthalpie (ΔG) nicht verändert wird (150). Asp120Gly ragt in die Oberfläche von MASP-2 hinein und könnte zum Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung führen (Abbildung 12) sowie die Hydrophobizität steigern (Abbildung 13). Hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen spielen auch bei der Dimerbildung von MASP-2 eine Rolle und sind innerhalb der Proteinfamilie an der Oberfläche zwischen den Monomeren konserviert (142).

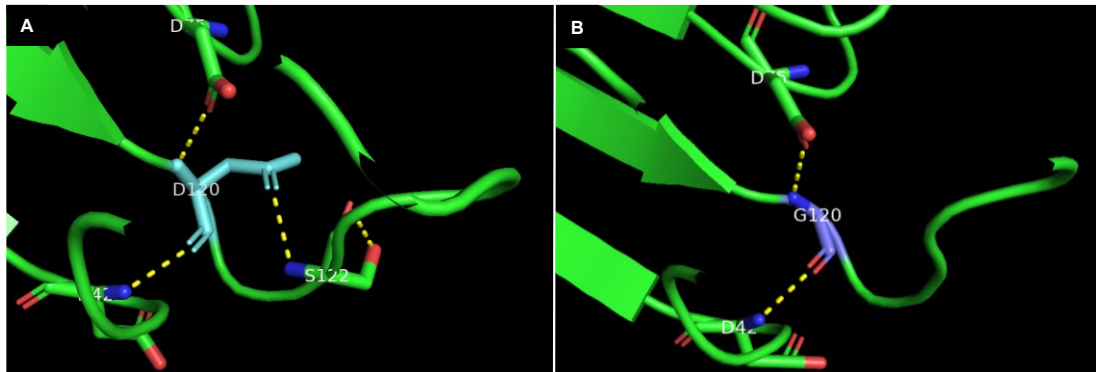


Abbildung 12: **Ausschnitt aus MASP-2 im 3D-Modell mit Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen von Asp120.** (A) Wildtyp mit Wasserstoffbrückenbindungen von Asp120 zu Ser122, Asp42 und Asp75. (B) Durch die Substitution von Asparaginsäure gegen Glycin geht die Wasserstoffbrückenbindung zu Ser122 verloren. Die Wasserstoffbrückenbindungen zu Asp42 und Asp75 bleiben unverändert.

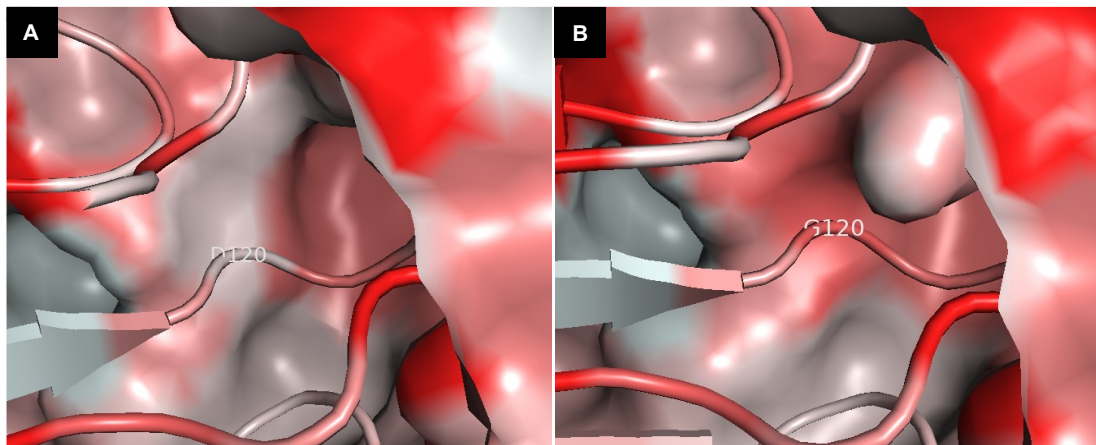


Abbildung 13: **Ausschnitt aus der grafischen Darstellung der Hydrophobizität von MASP-2 im 3D-Modell.** Asp120 ist Teil der Proteinoberfläche. Die Hydrophobizität wurde mittels des Skriptes "Color h" in PyMol nach der normalisierten Eisenberg-Konsensuskala (151) dargestellt. Je stärker die Rotfärbung, umso stärker ist die Hydrophobizität. (A) Dargestellt ist die schwache Hydrophobizität, wenn sich an Position 120 Asparaginsäure befindet. (B) Es zeigt sich eine leichte Zunahme der Hydrophobizität bei einer Substitution gegen Glycin.

Auch die nachgewiesenen Mutationen in C9 und C5 könnten die lokalen nichtkovalenten Kräfte beeinflussen. Ile476Thr in C9 schwächt die Hydrophobizität (Abbildung 14) und bewirkt im Modell eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung (Abbildung 15), was sich auf die Funktionalität der MACPF-Domäne auswirken kann.

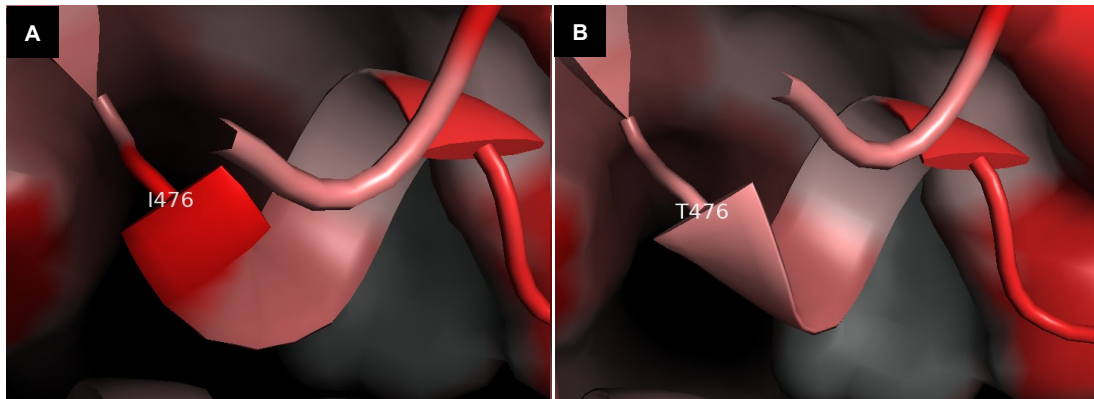


Abbildung 14: **Ausschnitt aus der grafischen Darstellung der Hydrophobizität von C9 im 3D-Modell.** Ile476 befindet sich im Kern von C9. Ein Teil der Oberfläche ist nach der Hydrophobizität der dort befindlichen Aminosäuren eingefärbt und im Hintergrund dargestellt. Ile476Thr ragt nicht in die Oberfläche. **(A)** Darstellung der starken Hydrophobizität durch Isoleucin an Position 476. **(B)** Abnahme der Hydrophobizität durch den Austausch gegen Threonin.

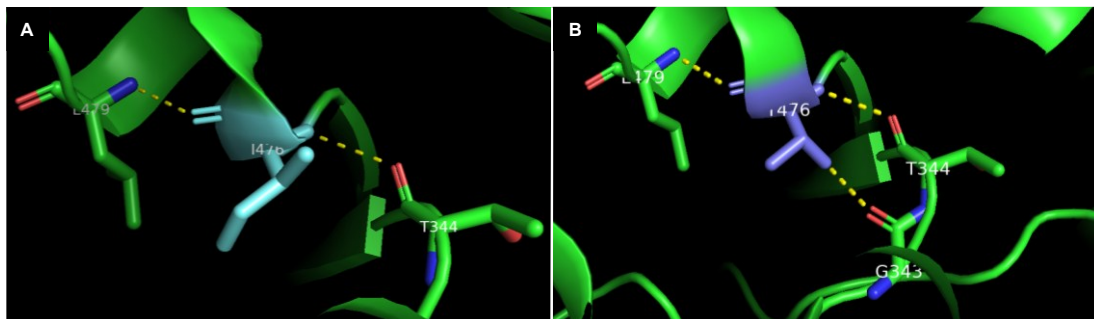


Abbildung 15: **Ausschnitt aus C9 im 3D-Modell mit Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen von Ile476.** **(A)** Isoleucin an der Aminosäureposition 476 bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu Leu479 und Thr344. **(B)** Durch Ile476Thr entsteht zusätzlich zu diesen Wasserstoffbrückenbindungen eine weitere zu Gly343.

In C5 gehen durch Arg766Gln die Wasserstoffbrücke zu Ser228 und die beiden Wasserstoffbrücken zu Val229 in der Prädiktion verloren (Abbildung 16), während die Hydrophobizität nur leicht zunimmt. Ile469Met in Faktor B, Val845Met in C3 und Gly597Glu in Integrin α -M schwächen die Hydrophobizität lediglich gering (Anhang 3). Jedoch kann es durch die Mutation in Integrin α -M zur Ausbildung einer zweiten Wasserstoffbrückenbindung zu Asp592 und in Faktor B zum Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zu Tyr466 kommen (Anhang 2). Wasserstoffbrückenbindungen beeinflussen die Stabilität des Proteins (152,153). Die Auswirkungen einer bestimmten Aminosäuresubstitution auf das Protein sind dabei unterschiedlich und abhängig von der Umgebung der betroffenen Aminosäure, wobei neben dem Einfluss auf die Wasserstoffbrückenbindungen weitere Auswirkungen der Aminosäuresubstitution, u.a. auf die hydrophoben Interaktionen und die Konformation eine Rolle spielen (152).

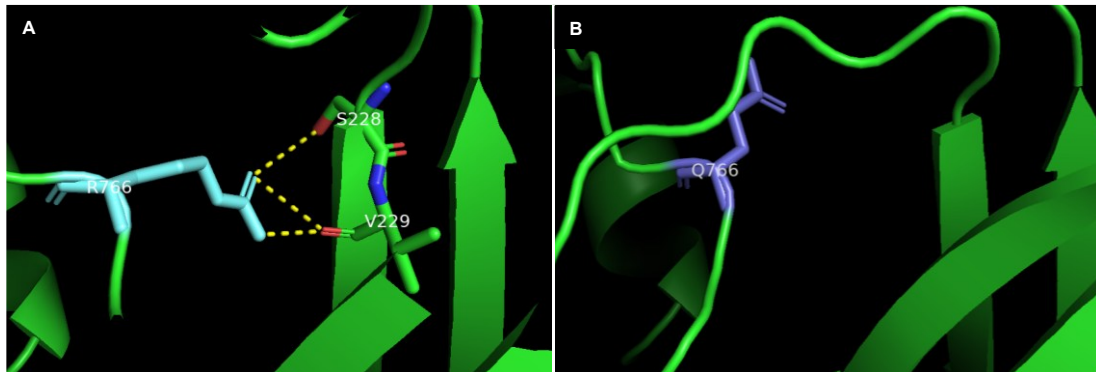


Abbildung 16: **Ausschnitt aus C5 im 3D-Modell mit Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen von Arg766.** (A) Darstellung der beiden Wasserstoffbrückenbindungen von Arg766 zu Val229 sowie der Wasserstoffbrückenbindung zu Ser228. (B) Die Substitution von Arginin gegen Glutamin führt zum Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen zu Ser228 und Val229.

Das Tool DynaMut (154) trifft mithilfe der Änderung der thermodynamischen Stabilität ($\Delta\Delta G$) Vorhersagen über den Einfluss von Varianten auf die Stabilität der Proteinstruktur. Werte < 0 kcal/mol wurden dabei als destabilisierend definiert, Werte ≥ 0 kcal/mol als stabilisierend (154). Somit wirken Asp120Gly (MASP-2), Ile476Thr (C9), Arg766Gln (C5) und Val845Met (C3) möglicherweise destabilisierend und Ile469Met (Faktor B) sowie Gly597Glu (Integrin α -M) möglicherweise stabilisierend (Anhang 5).

5 Diskussion

5.1 Zusammenhang der nachgewiesenen *VEGFA*-Varianten mit der Erkrankung an einer AMD

5.1.1 Funktionelle Konsequenzen synonymmer und intronischer Varianten

Als synonyme bzw. intronische Variante verändern die in der Studienpopulation festgestellten *VEGFA*-Varianten c.534C>T, p.Ser178= (rs25648) und c.856-28C>T (rs3025000) zwar nicht die Aminosäuresequenz, aber dennoch können sie sich auf die Proteinfunktion auswirken. Mögliche, aber teils noch nicht bis ins Detail verstandene Mechanismen sind verändertes Spleißen, veränderte mRNA-Stabilität und Beeinflussung der Proteinfaltung und -konformation (155,156). Genetische Varianten können neben den Spleißstellen an den Intron-Exon-Grenzen den Spleißvorgang betreffende intronische Sequenzmotive, wiederkehrende DNA-Abschnitte, beeinflussen. Prä-mRNAs besitzen Pseudo-Spleißstellen, die nicht genutzt werden, aber durch Aktivierung von Enhancern gestärkt werden können (157,158). Die Nutzung der Pseudospleißstelle kann zur Insertion eines kryptischen Exons führen (159,160). Auch die Insertion eines kryptischen Exons mit Stoppcodon und folglich Trunkierung des Proteins ist beschrieben (160–162). Varianten in den Spleißstellen können zu Exonskipping und Intronretention führen (159,160,163). Aufgrund dieser Mechanismen ist auch bei nicht-kodierenden Varianten ein Einfluss auf das Protein nicht ausgeschlossen. Mithilfe des Tools SpliceAI ergibt sich jedoch *in silico* kein Anhalt, dass rs3025000 das Spleißen verändert.

Es wurde beobachtet, dass auch synonyme Mutationen die Proteinfaltung beeinflussen können (164). Im *MDR1*-Gen, welches das Transportprotein P-Glykoprotein kodiert, können Kombinationen synonymmer Mutationen die Struktur der Substratbindungsstelle und die Substratspezifität verändern (155,165). Eine mögliche Erklärung ist, dass die durch die synonyme Mutation verursachte Änderung des jeweiligen Codons zum Stalling der Ribosomen führen kann (165). Das Stalling führt wiederum zur Änderung der Faltungspfade während der Proteinfaltung (165). Funktionelle oder quantitative Auswirkungen synonymmer Varianten, wie rs25648, sind demnach nicht ausgeschlossen, obwohl die Aminosäuresequenz unverändert bleibt.

Insbesondere wird vermutet, dass Varianten im Promotor und in den untranslatierten Regionen die *VEGFA*-Expression beeinflussen (166,167). So sind bei Vorliegen der Minorallele der *VEGFA*-Varianten rs2010963 (5'-UTR) und rs3025039 (3'-UTR) eine stärkere *VEGFA*-Expression und höhere Serumkonzentrationen beobachtet worden

(167). Die 5'-UTR, in welcher sich auch rs25648 befindet, beeinflusst, welcher Weg zur Initiation der Translation genutzt wird, wie effizient dieser ist und welche Initiationsstelle verwendet wird und kann die Translation auch über sequenzspezifische mRNA-Bindungsproteine beeinflussen (168). Die 5'-UTR der VEGF-A-mRNA enthält die Elemente IRES-A und -B, welche beeinflussen, ob AUG oder ein upstream gelegenes alternatives CUG-Startcodon zur Translation genutzt wird (65). Mit c.-94C>G (rs2010963) ist eine *VEGFA*-Variante bekannt, die über eine Dysfunktion von IRES-B die Translation beeinflusst und mit unter anderem erhöhtem Risiko für diabetische Makulaödeme verbunden ist (169,170). Die Veränderung rs25648 befindet sich *downstream* dieser Elemente, doch kann ein Einfluss auf Translationsregulation und Spleißen nicht ausgeschlossen werden. Mithilfe SpliceAI ergibt sich jedoch auch für die Variante rs25648 *in silico* kein Anhalt, dass das Spleißen beeinflusst wird.

Um die funktionellen Auswirkungen identifizierter Varianten beurteilen zu können, sollten auch *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt werden. Funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von rs25648 auf die *VEGFA*-Expression und Proteinkonzentration ergaben bisher jedoch inkonsistente Ergebnisse. Bei Vorliegen des CC-Genotyps von rs25648 wurde eine erhöhte VEGF-A-Konzentration festgestellt (166). In anderen Studien wurden wiederum keine Unterschiede bezüglich der VEGF-A-Konzentration abhängig von rs25648 gefunden (171,172). Auch rs3025000 war nicht mit dem VEGF-A-Serumlevel assoziiert (173). Ruggiero *et al.* stellten dazu fest, dass häufige *VEGFA*-Varianten die unterschiedliche Serumkonzentration nicht erklären und vermuten, dass seltene, und gegebenenfalls in verschiedenen Populationen unterschiedliche Varianten ursächlich sind (173). Daher ist die funktionelle Relevanz der Variante zum aktuellen Zeitpunkt auch durch funktionelle Untersuchungen nicht eindeutig geklärt.

5.1.2 Mögliche Assoziation von c.534C>T, p.Ser178= mit der Entwicklung einer AMD

Anhand der in der Studienpopulation und bei den nicht an AMD erkrankten Individuen beobachteten Allelfrequenzen deutet sich eine mögliche Assoziation von c.534C>T, p.Ser178= (rs25648) mit der Entwicklung einer AMD an. Das T-Allel wurde häufiger in der Kontrollgruppe ohne AMD nachgewiesen, was auf einen protektiven Effekt des T-Allels bezüglich des AMD-Risikos hinweist. Die Verteilung der Genotypen CT und TT gegenüber CC weist ebenfalls auf ein niedrigeres Risiko bei Vorliegen mindestens eines T-Allels hin. Die Ungleichverteilung der Genotypen zeigt sich auch in der Abweichung vom HWE in der Gruppe der AMD-Betroffenen. Das HWE beschreibt, dass die

Allelfrequenzen in einer Population von Generation zu Generation unverändert bleiben und wird in Assoziationsstudien genutzt, um Fehler bei der Genotypisierung zu detektieren (174). Eine Abweichung vom HWE in der Gruppe der Betroffenen kann jedoch auch auf eine Assoziation der jeweiligen genetischen Variante mit der Erkrankung hinweisen (174). Die kleine Fallzahl führt allerdings zu einer großen Unsicherheit der Werte, weshalb sich kein eindeutiger Zusammenhang ableiten lässt. Im Gegensatz zu dem Ergebnis dieser Arbeit stellten Fang *et al.* bei einer OR des T-Allels mit einem Wert von 0,93 und einem adjustierten p-Wert von 1 fest, dass kein Zusammenhang dieser Variante mit neovaskulärer AMD bestehe (70).

Wiederum wurde bei Diabetikern mit proliferativer Retinopathie, die ebenfalls mit Gefäßneubildungen einhergeht, im Vergleich zu Diabetikern ohne Retinopathie eine Häufung des T-Allels gezeigt (OR = 2,89; 95 %-KI = 1,42-5,88; p = 0,002) (175) und somit das T-Allel als Risikoallel identifiziert. Eine 2020 veröffentlichte Metaanalyse mit 26 inkludierten Studien stellte insgesamt keine Assoziation fest, zeigte jedoch in der kaukasischen Subgruppe ebenfalls eine Assoziation zwischen dem T-Allel und einem erhöhten Risiko für diabetische Retinopathie (T vs. C: OR = 2,89; 95%-KI = 1,43–5,83; p = 0,003; (176). In anderen Analysen wurde hingegen keine Assoziation der Variante mit diabetischer Retinopathie festgestellt (177,178). So auch in einer Metaanalyse mit 82 inkludierten Publikationen (177). Es konnte hier kein Zusammenhang zwischen rs25648 und diabetischer Retinopathie in der Gesamtauswertung gezeigt werden, wobei ethnische Unterschiede der für das Risiko verantwortlichen Varianten möglich sind und für rs25648 keine Subgruppenanalyse durchgeführt wurde (177). Das Risiko für eine Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 an sich betreffend wurde hingegen eine Assoziation des T-Allels mit einem niedrigeren Risiko festgestellt (172). Auch unter Berücksichtigung des bisher uneindeutigen funktionellen Einflusses von rs25648, ist ein Zusammenhang mit dem AMD-Risiko und ein möglicher Einfluss auf die Pathogenese bisher nicht eindeutig erklärbar.

5.1.3 Kein eindeutiger Zusammenhang weiterer VEGFA-Varianten mit dem AMD-Risiko

Die zweite in dieser Arbeit nachgewiesene Variante, c.856-28C>T (rs3025000), wurde mit der Entstehung von choroidalen Neovaskularisationen im Rahmen starker Kurzsichtigkeit in Verbindung gebracht (p = 0,063) (179), jedoch bisher nicht mit einem Einfluss auf das AMD-Risiko. Das T-Allel und Genotypen, die mindestens ein T-Allel enthalten, waren in der vorliegenden Arbeit in der Fallgruppe häufiger, 95 %-KI und p-Werte wiesen jedoch ebenfalls auf eine hohe Unsicherheit der Werte hin. Somit zeigte

sich in dieser Arbeit ebenfalls kein klarer Zusammenhang zwischen der genetischen Variante und dem AMD-Risiko.

Der Einfluss von *VEGFA*-Varianten auf das AMD-Risiko ist auch insgesamt inkonsistent (3,70). Der Genotyp TT der intronischen Variante rs1413711 von *VEGFA* ist mit erhöhtem Risiko für AMD insgesamt und auch speziell mit erhöhtem Risiko für neovaskuläre AMD assoziiert (67,69). Zudem wurden Varianten in der regulatorischen Region von *VEGFA* als Risikofaktoren für AMD beschrieben. Das C-Allel von rs833061, einer Variante im *VEGFA*-Promotor, ist ein Risikofaktor für AMD und mit einem erhöhten Risiko für die neovaskuläre Spätform assoziiert (67–69). Die Veränderungen rs2010963 in der 5'-UTR (68) und rs3025039 in der 3'-UTR (69) waren in einzelnen Studien mit dem AMD-Risiko assoziiert, aber dieses Ergebnis konnte in einer Metaanalyse nicht bestätigt werden (67). Die Pathogenese der Erkrankung deutet auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den Varianten von *VEGFA* und dem Auftreten von AMD hin, was allerdings weiterer Untersuchungen mit großen Fallzahlen bedarf. In dieser Arbeit konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Varianten in *VEGFA* und dem AMD-Risiko gezeigt werden.

Sowohl protektive als auch risikosteigernde Varianten könnten in einem genetischen Risikoscore (GRS) eine Individualisierung der Betreuung von AMD-Patient*innen ermöglichen. So könnten das AMD-Risiko, das Risiko einer Progression zu einer AMD-Spätform, und das Therapieansprechen besser abgeschätzt werden und Vorsorge und Behandlung könnten dann individualisiert erfolgen. Innerhalb des europäischen EYE-RISK-Projektes wurde ein Test zur Ermittlung eines GRS entwickelt, der seltene und häufige Varianten enthält, wobei keine *VEGFA*-Varianten inkludiert sind (180). Dieser führte bei später AMD zu höheren Scores als bei früher oder intermediärer AMD (p -Wert $< 0,001$) (180). Bisher werden genetische Risikoscores im klinischen Alltag jedoch nicht eingesetzt. Neben der Identifizierung risikomodifizierender genetischer Varianten unter der Beachtung möglicher populationsspezifischer Unterschiede sollten auch nicht-genetische Risikofaktoren berücksichtigt werden, da AMD eine komplexe Erkrankung ist.

5.2 Fehlende pharmakogenetische Assoziation der *VEGFA*-Varianten mit der Anti-VEGF-Therapie

Da gegen VEGF gerichtete Wirkstoffe zuerst in der Therapie maligner Neoplasien eingesetzt wurden (63,181), wurde der Einfluss genetischer Varianten auf das Therapieansprechen auf Anti-VEGF-Medikamente auch in diesem Kontext untersucht (182,183). Es zeigten sich Assoziationen mehrerer *VEGFA*-Varianten mit einem

besseren Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreien Überleben (PFS) unter Chemotherapie in Kombination mit Anti-VEGF-Medikamenten, unter anderem für die 5'-UTR-Variante rs2010963, rs3025039 in der 3'-UTR und rs699947 im Promotor (184,185). Jedoch waren diese Ergebnisse nicht konsistent (171,186). Von den untersuchten Varianten wurde in der Studienpopulation dieser Arbeit die Variante rs25648 identifiziert. Es zeigte sich, dass das C-Allel von rs25648 mit einem besseren OS assoziiert ist und einen Trend zu einem besseren PFS ($p = 0,049$) aufweist, wobei der Einfluss auf das PFS nach Korrektur für multiple Testung einen p -Wert $> 0,05$ aufwies (185,186). Chionh *et al.* vermuten, dass die Beeinflussung des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens durch veränderte Expression von VEGF-A-mRNA bewirkt wird (171). Der Genotyp CC ist bei kolorektalem Karzinom mit gesteigertem PFS und OS verbunden, jedoch nicht prädiktiv für das Ansprechen auf den VEGF-Inhibitor Bevacizumab (171). Diese Ergebnisse weisen auf einen eher prognostischen als prädiktiven Effekt der Variante hin.

In der Behandlung der nAMD ist die intravitreale Applikation von Anti-VEGF-Medikamenten eine wirksame Therapie. Jedoch sprechen nicht alle Patient*innen auf die Behandlung an (187). Bereits mit dem Risiko der Entwicklung einer AMD assoziierte Gene gehörten zu den ersten Kandidatengenen für die Untersuchung eines Zusammenhanges mit dem Therapieansprechen, wobei in zwei großen Studien kein Zusammenhang mit dem Therapieansprechen von AMD-Patient*innen gezeigt werden konnte (84,188). Die CATT-Studie untersuchte vier Risikovarianten in den Genen *CFH*, *ARMS2*, *HTRA1* und *C3* bei 834 Patient*innen, wobei sich kein Zusammenhang dieser Varianten mit dem Therapieansprechen zeigte (84). Die *Inhibition of VEGF in Age-related Choroidal Neovascularisation* (IVAN) Studie untersuchte drei Varianten, welche vorher mit dem Therapieansprechen assoziiert wurden. Darunter befanden sich die Hauptrisikovariante für AMD, NM_000186.4:c.1204T>C, p.Tyr402His (rs1061170) in *CFH* sowie Gene des VEGF-Signalweges und der Angiogenese. Die IVAN-Studie zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang der untersuchten Gene mit dem Therapieansprechen (188). In kleineren Studien wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Varianten in *CFH* und *ARMS2* und dem Therapieansprechen gesehen (189). Metaanalysen, welche die beiden genannten Studien enthielten, zeigten eine Assoziation des C-Allels der *CFH*-Variante rs1061170 mit einem schlechteren Therapieansprechen, insbesondere in der kaukasischen Bevölkerung (18,190,191).

Varianten in *VEGFA* sind bisher nicht eindeutig mit dem Therapieansprechen von nAMD-Patient*innen assoziiert (88,192). In der CATT-Studie wurde in einer großen Kohorte kein Zusammenhang der untersuchten *VEGFA*-Varianten festgestellt (88). Kleinere

Studien zeigten zum Teil einen Zusammenhang zwischen *VEGFA*-Varianten und dem Therapieansprechen, teilweise mit widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des Risikoallels (76,87,192,193). Insgesamt sind pharmakogenetische Assoziationen von *VEGFA* mit dem Ansprechen auf Anti-VEGF-Medikamente zurzeit nicht eindeutig. Im Einklang mit diesen Ergebnissen, zeigte sich auch in dieser Arbeit kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Varianten in *VEGFA* und dem Therapieansprechen.

Die IVAN-Studie beinhaltete auch die in dieser Arbeit identifizierte *VEGFA*-Variante rs25648 und zeigte keinen Zusammenhang dieser Variante mit dem Therapieansprechen (188). Das T-Allel von rs3025000 wurde in einer prospektiven Studie mit 201 Patient*innen unter Anti-VEGF-Therapie mit einem besseren Therapieergebnis bezüglich der Sehkraft und einer wahrscheinlicheren Zugehörigkeit zur Gruppe mit Therapieansprechen in Verbindung gebracht (86). Das T-Allel habe hierbei eine OR von ca. 3 bezüglich eines positiven Therapieansprechens (86,194). Die Datenlage zur Assoziation von rs3025000 mit dem Ansprechen auf eine Anti-VEGF-Therapie ist allerdings schwach. Reviews, unter anderem eine Metaanalyse zu genetischen Biomarkern des Therapieansprechens aus dem Jahr 2018, nennen nur die oben genannte Studie von Abedi *et al.* als Referenz für eine Assoziation von rs3025000 mit dem Anti-VEGF-Therapieansprechen (194–196). In einer Studie mit Patient*innen mit choroidalen Neovaskularisationen im Rahmen starker Kurzsichtigkeit wurde hingegen keine Assoziation von rs3025000, rs25648 oder einem der anderen untersuchten SNPs in *VEGFA* zum Therapieansprechen auf eine Anti-VEGF-Therapie mittels Ranibizumab beobachtet (179). Ebenso beobachteten Kitchens *et al.* keine Assoziation zwischen rs3025000 und dem Ansprechen auf Anti-VEGF-Therapie bei der Untersuchung dieser Variante bezüglich der Nutzung als Biomarker für das Therapieansprechen auf VEGF-Inhibitoren (197). In der Studienpopulation dieser Arbeit zeigte sich ebenfalls keine Assoziation der Variante mit dem Therapieansprechen, jedoch wurde das T-Allel nur einmal (6,3 %) in der Gruppe mit stabilem Visus unter Therapie und zweimal (9,0 %) in der Gruppe mit unzureichendem Therapieansprechen nachgewiesen, sodass eine Assoziation möglicherweise bei größerer Fallzahl nachweisbar wäre.

Insgesamt ist unsicher, ob *VEGFA*-Varianten das Therapieansprechen auf VEGF-Inhibitoren beeinflussen. Eine Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich einer Assoziation mit dem Therapieansprechen könnten auch die verschiedenen Maße des Ansprechens sein. Für die Messung des Therapieansprechens wurde in der IVAN-Studie die Gesamtdicke der Netzhaut genutzt (188), in dieser Arbeit jedoch der Visus. Weitere Studien nutzten multiple Maße inklusive anatomischer Messwerte, dem Visus

und der Anzahl an Injektionen als Marker für das Therapieansprechen (84,192). Außerdem sind ethnische Unterschiede in Bezug auf pharmakogenetische Assoziationen denkbar (192), weshalb Studien mit ethnisch unterschiedlichen Studienpopulationen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

Auch wenn für rs25648 und rs3025000 kein Zusammenhang mit dem Therapieansprechen gezeigt wurde, könnten in dieser Arbeit nicht identifizierte *VEGFA*-Varianten oder Varianten in anderen Genen mit dem Therapieansprechen in Zusammenhang stehen. Zudem könnten unterschiedliche Anti-VEGF-Medikamente mit verschiedenen Genen und Varianten assoziiert sein, was aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Zu beachten ist dabei, dass verschiedene Anti-VEGF-Medikamente unterschiedliche Möglichkeiten der Bindung an Mitglieder der VEGF-Familie aufweisen (76). Zudem spielen, wie auch in der Pathogenese der AMD, weitere nicht-genetische Faktoren eine Rolle beim Therapieansprechen, welche in dieser Arbeit nicht erfasst wurden. Nicht-genetische Faktoren sind insbesondere Art und Größe der Läsionen sowie Visus bei Therapiebeginn, aber auch das Alter und Rauchen (76). Um genetische Varianten als Prädiktoren für das Therapieansprechen zu nutzen, müssen die Effekte der Varianten stark genug sein (76), wobei zurzeit im klinischen Alltag noch keine genetischen Biomarker genutzt werden (198). Zukünftig könnten jedoch genetische und nicht-genetische Faktoren gemeinsam zur Individualisierung der Therapie herangezogen werden.

5.3 Beeinträchtigte Enzymfunktion durch c.359A>G, p.Asp120Gly im *MASP2*-Gen

Die Variante c.359A>G, p.Asp120Gly (rs72550870) befindet sich in der CUB1-Domäne des MASP-2-Proteins (Abbildung 17). Diese befindet sich N-terminal und bildet mit einer zweiten CUB-Domäne und einer dazwischenliegenden EGF-ähnlichen Domäne die Bindungsstelle für die Ca²⁺-abhängige Bindung von MASP-2 an MBL oder Ficoline (129,199–201). Diese Bindung ist Voraussetzung für die Aktivierung des Komplementsystems über den Lektinweg. Der Komplex aus dem an die Pathogenoberfläche gebundenen MBL oder Ficolin und MASP-2 spaltet die Komplementfaktoren C4 und C2, welche schließlich die C3-Konvertase des Lektinweges bilden. Die CUB1-Domäne ist zudem an der ebenfalls Ca²⁺-abhängigen Bildung von MASP-2-Dimeren beteiligt (200). Die genetische Veränderung betrifft daher einen funktionell wichtigen Bereich von MASP-2 und der Einfluss auf die Proteinfunktion wurde bereits in Studien nachgewiesen (128,202,203). Das Vorhandensein des G-Allels ist mit niedrigeren MASP-2-Serumkonzentrationen assoziiert (202,203). Zudem führt die

Substitution zum Verlust der Fähigkeit von MASP-2, Komplexe mit MBL zu bilden (128). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sich die Variante in der Ca^{2+} -Bindungsstelle der CUB1-Domäne befindet (129). Durch den Verlust eines der Ca^{2+} -Liganden durch Asp120Gly entfällt die Stabilisierung der Proteinstruktur an der Bindungsstelle für MBL (142). Auch das Proteinmodell (Abbildungen 12 und 13) legt nahe, dass durch den Austausch von Asparaginsäure gegen Glycin lokale Interaktionen in der Proteinstruktur verändert werden könnten.

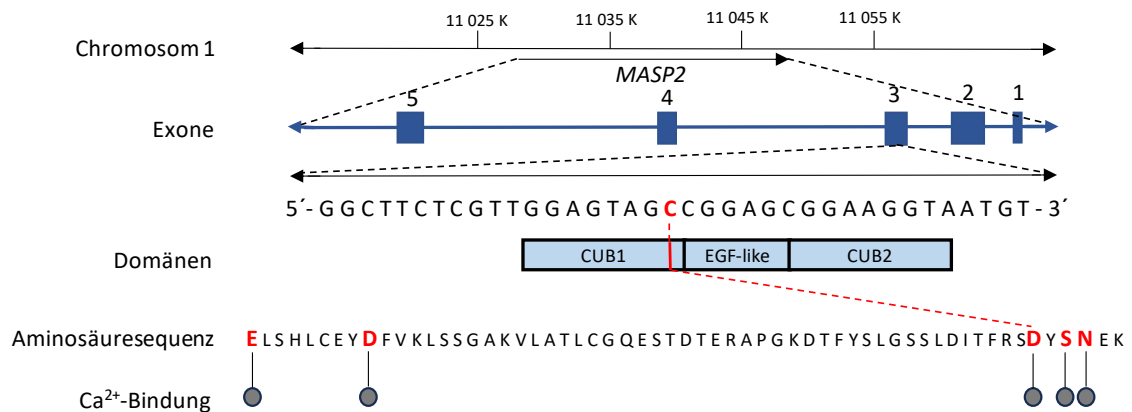


Abbildung 17: **Transkript NM_006610 von MASP2.** Dargestellt sind die ersten fünf Exons, Ausschnitte aus der Basenabfolge und der Aminosäuresequenz und die für die Bindung an MBL/Ficoline zuständigen Domänen CUB1, EGF-like und CUB2. Die Veränderung rs72550870 ist rot markiert. Zudem sind die Bindungsstellen für Ca^{2+} eingezeichnet.

Die veränderte Proteinstruktur und der Verlust der Funktion implizieren, dass die Variante die Aktivität des Lektinweges beeinflussen könnte. Jedoch sind die Auswirkungen auf Betroffene uneindeutig: Homozygote Träger der Variante weisen teils eine durch häufigere, vor allem infektiöse Krankheiten geprägte Vorgeschichte auf (128,130), sind aber teils auch gesund (130–132). Bei Heterozygoten ist selbst die Aktivität des MBL-MASP-2-Komplexes unbeeinflusst (202). Die klinische Penetranz ist zumindest bezüglich einer Immundefizienz unvollständig und bei Heterozygotie scheint der Lektinweg dennoch suffizient aktiviert zu werden. Jedoch ist das Komplementsystem komplex und spielt in der Pathogenese der AMD eine wichtige Rolle, weshalb die Auswirkung von rs72550870 auf diese Erkrankung gesondert untersucht werden sollte.

Bei AMD-Patient*innen wurde im Kammerwasser eine verringerte MASP-2-Konzentration nachgewiesen (204). Dies deutet an, dass insbesondere funktionell relevante Varianten in *MASP2* auch einen Einfluss auf die Entwicklung einer AMD haben könnten. Aufgrund seiner nachgewiesenen funktionellen Auswirkungen ist daher interessant, ob rs72550870 in größeren Studienpopulationen mit AMD assoziiert ist.

Falls eine Assoziation mit AMD gezeigt wird, könnte die Variante zu einem besseren Verständnis der Rolle von MASP-2 in der AMD-Pathogenese beitragen.

5.4 *CFHR2* ist möglicherweise relevant für die Pathogenese der AMD

CFH und die Gene der Komplement-Faktor-H-verwandten Proteine (FHR) liegen im RCA-Gencluster (Regulator of Complement Activation) auf Chromosom 1 im Abschnitt 1q32 (205). Dieses Cluster entstand durch segmentale Duplikationen eines gemeinsamen Vorfahrens (206). Wie auch *CFH* bestehen die *CFHR*-Gene aus *short consensus repeats* (SCR), also repetitiven Einheiten, welche ca. 60 Aminosäuren umfassen (207). Aufgrund des gleichen Ursprunges ähneln die SCRs der *CFHR*-Gene in unterschiedlichem Umfang denen von *CFH* (133). Es wird vermutet, dass die Faktor-H-verwandten Proteine gemeinsam mit Faktor H für die Feinabstimmung des Komplementsystems zuständig sind (38,208). Genetische Varianten sind bisher insbesondere mit komplementbedingten Nierenerkrankungen wie aHUS und C3-Glomerulopathie (MIM# 614809) in Verbindung gebracht worden (209,210). Es wurden jedoch auch mit dem AMD-Risiko assoziierte Kopienzahlveränderungen identifiziert (36–38), wobei der Aufbau aus segmentalen Duplikationen für Rearrangements prädisponiert (211).

FHR-2 selbst besteht aus vier SCR-Domänen, wobei die zwei N-terminalen Domänen SCR 1 und 2 in die Formation von Dimeren eingebunden sind und die zwei C-terminalen Domänen SCR 3 und 4 an C3b und C3d binden (133). Die Sequenz von SCR 3 und 4 ähnelt stark der Sequenz von SCR 19 und 20 von *CFH*, welche ebenfalls die Funktion der C3b-Bindung haben (133). Die in dieser Arbeit nachgewiesene *CFHR2*-Variante c.595G>T, p.Glu199Ter (rs41257904) führt zu einem teilweisen bzw. vollständigen Verlust der SCR-Domänen 3 und 4 und betrifft somit die C3b-Bindungsstellen. Es wurde durch funktionelle Untersuchungen gezeigt, dass das vorzeitige Stoppcodon zu einem Verlust der Proteinexpression führt und die Variante somit die FHR-2-Konzentration senkt (38,137).

Das Gleichgewicht zwischen Faktor H und FHR-2 spielt jedoch vermutlich eine Rolle bei der Kontrolle der Komplementinaktivierung (133). Dieses Zusammenwirken kann durch Funktionsgewinn durch Duplikationen und Hybrid-Proteine verursachende Deletionen, aber auch durch Funktionsverlust gestört werden, denn FHR-2 inhibiert auch die C3-Konvertase des alternativen Weges und die Formation des Membranangriffskomplexes (133).

Eine 2021 veröffentlichte Arbeit zur Rolle von Faktor H und der FHRs bei AMD (38) identifizierte protektive Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb der *CFHR*-Gene, die auch zu verminderter oder fehlender Expression der jeweiligen Proteine führen (38). So sind die intronische Variante rs3790414 und die exonische Variante rs79351096 in *CFHR2* mit verringertem AMD-Risiko assoziiert (38). Insgesamt wurde gezeigt, dass seltene und proteinverändernde Varianten in *CFHR2* mit AMD assoziiert sind, was impliziert, dass dieses Gen eine Rolle in der Pathogenese der AMD spielt (38). Der entsprechende Krankheitsmechanismus muss noch weiter beleuchtet werden, sodass zukünftig eine auf dem Genotyp am *CFH*-Lokus basierende Modulation der FHRs bzw. des Komplementsystems einen möglichen Therapieansatz darstellen könnte (38,210).

5.5 Die Veränderung c.1427T>C, p.Ile476Thr liegt in der MACPF-Domäne von C9

Die in dieser Arbeit nachgewiesene C9-Variante c.1427T>C, p.Ile476Thr (rs141645272) wurde in einer weiteren Studie bereits bei AMD-Betroffenen, jedoch auch bei gesunden Kontrollindividuen nachgewiesen (OR = 1,24; p = 0,23) (43,212). Ebenfalls in der MACPF-Domäne befindet sich die Missensevariante rs34882957. Diese führt zur Verdopplung des AMD-Risikos (41,42) und geht mit einer erhöhten Serumkonzentration von C9 einher (33). Ein Funktionsgewinn mit resultierender gesteigerter MAC-Formation könnte in diesem Fall zu einem erhöhten AMD-Risiko führen (2). Verschiedene Studien sahen entweder eine erhöhte C9-Konzentration (34,213) oder eine stärkere Aktivität (214) als Ursache. Zudem bewirkt rs34882957 eine verstärkte Polymerisation von C9 (213,214). Weiterhin wurden seltene Varianten identifiziert, welche die Serumkonzentration erhöhen, aber nicht zu einer gesteigerten Polymerisation oder MAC-Konzentration führen (213). Funktionelle Auswirkungen können auch bei der in dieser Arbeit nachgewiesenen C9-Variante rs141645272 nicht ausgeschlossen werden. Das Proteinmodell gibt zwar keinen Anhalt für eine Veränderung der Sekundärstruktur durch die Variante, jedoch kann der Austausch des hydrophoben Isoleucins gegen das hydrophile Threonin die lokale Proteinstruktur und Wechselwirkung beeinflussen (151). Funktionelle *in vivo*- und *in vitro*-Studien könnten hier Aufschluss über eine mögliche Auswirkung der Variante auf die Proteinfunktion geben.

In von AMD betroffenen Familien waren seltene Varianten, u. a. rs34882957, mit einem zeitigeren Krankheitsbeginn und stärkeren Fortschreiten der Erkrankung verbunden (215). Ein Screening auch auf seltene Varianten im C9-Gen und anderen mit AMD assoziierten Genen könnte daher sinnvoll sein (180,215). Da insbesondere seltene

Varianten mit einem Funktionsverlust oder einem hohen pathogenetischen Prädiktionsscore, wie einem CADD ≥ 20 , mit einem gesteigerten Risiko verbunden sind (180), könnte auch die in dieser Arbeit nachgewiesene Veränderung rs141645272 (CADD: 26,2) eine solche seltene, risikosteigernde Variante darstellen.

5.6 Varianten in *CFB* sind vorwiegend protektiv

Vermutlich auch aufgrund der sehr niedrigen Frequenz des G-Allels, ist die in dieser Arbeit identifizierte Variante c.1407C>G, p.Ile469Met (rs201798809) in der Literatur nicht beschrieben. Varianten in *CFB*, im paralogen *C2* und im angrenzenden *SKIV2L* haben einen protektiven Effekt bezüglich AMD (45,216–220). So wiesen die in starkem Kopplungsungleichgewicht stehenden Varianten rs4151667 (*CFB*) und rs9332739 (*C2*) eine OR von 0,37 auf (45). Ebenso protektiv sind rs641153 (*CFB*) und rs547154 (*C2*), welche sich ebenfalls in starkem Kopplungsungleichgewicht befinden (45,220). Bei rs641153 könnte der Austausch von Arginin gegen Glutamin an Aminosäureposition 32 die hämolytische Aktivität reduzieren, wodurch das Risiko für eine chronische Komplementaktivierung sinkt (45,221).

Für die Genotypen TA und AA von rs4151667 und auch für protektive Allele von Varianten in *C2*, wurde bei geografischer Atrophie eine Assoziation mit positivem Ansprechen auf antioxidative Therapie festgestellt (222). Dieselbe Studie zeigte allerdings keine Assoziation der protektiven Allele in *CFB/C2* mit dem Therapieansprechen bei neovaskulärer AMD (222).

Die Lage der in dieser Arbeit nachgewiesenen Variante rs201798809 an der Exon-Intron-Grenze, in der funktionell wichtigen C-terminalen Helix der vWF-A-Domäne und die mögliche Auswirkung auf die lokalen non-kovalenten Kräfte sind Anhaltspunkte, dass die Funktion von Faktor B durch die Variante beeinflusst werden könnte. Die in der Literatur bereits beschriebenen genetischen Varianten legen jedoch im Fall von Funktionsverlust eher einen protektiven Effekt nahe. Dennoch ist nicht ausgeschlossen, dass es zu einem Funktionsgewinn und dann einem risikosteigernden Effekt kommt.

5.7 Kein eindeutiger Zusammenhang zwischen *C5* und AMD

Varianten in *C5* standen bisher nicht eindeutig im Zusammenhang mit AMD (223). Die der in dieser Studienpopulation nachgewiesenen Veränderung c.2297G>A, p.Arg766Gln (rs758933855) benachbarte Variante rs17611 war in einer niederländischen Studienpopulation bei heterozygotem Vorliegen protektiv für fortgeschrittene AMD, was sich in den in der Studie genutzten Referenzpopulationen und einer anderen Studie jedoch nicht bestätigte (40,223). In weiteren Studien wurde keine Assoziation der

untersuchten SNPs in C5 mit AMD festgestellt (39,40,224). Jedoch ist es Bestandteil von Drusen (33,225) und ein Knock-out des C5a-Rezeptors führt zu verminderter VEGF-Synthese und weniger laserinduzierten Neovaskularisationen (226). Zudem ist das Plasma-C5a bei AMD erhöht (227,228). Zusammen mit seiner Funktion der Einleitung der MAC-Formation implizieren diese Erkenntnisse, dass C5 eine Rolle in der AMD-Pathogenese spielen könnte. Obwohl häufige C5-Varianten, wie oben beschrieben, keinen Einfluss auf das AMD-Risiko zu haben scheinen (223), könnten seltenere Varianten mit größeren funktionellen Auswirkungen die funktionellen Zusammenhänge zwischen Varianten eines Gens und der Pathogenese der Erkrankung sichtbar machen (43). Das Minorallel von rs758933855 wurde in der Datenbank gnomAD nur einmal gezählt. Die Vorhersage möglicher funktioneller Auswirkungen ist jedoch begrenzt, aber ein Einfluss auf die lokale Proteinstruktur durch den Verlust von Wasserstoffbrückenbindungen ist möglich.

Insgesamt ist eine weitere Forschung zum Einfluss dieser Komplementkomponente und seiner genetischen Varianten auf AMD nötig. Dazu können seltene Varianten einen wichtigen Beitrag leisten, wenn es gelingt, Auswirkungen auf die Proteinfunktion aufzudecken.

5.8 Unklare pathogenetische Relevanz der Variante c.1790G>A, p.Gly597Glu in *ITGAM*

ITGAM kodiert die α -M-Untereinheit des α M β 2-Integrins. Die Integrine sind Adhäsionsmoleküle der Leukozyten (229). Über das C3b-Abbauprodukt iC3b können komplementbedeckte Partikel mittels α M β 2 gebunden und phagozytiert werden (229). Das *ITGAM*-Gen ist nicht mit AMD, aber mit der Autoimmunerkrankung *Lupus erythematoses* assoziiert. Die größte Evidenz liegt dabei für die Missensevariante rs1143679 vor (230,231). Diese Variante beeinträchtigt die Leukozytenadhäsion an iC3b und die Phagozytose (232)

Das Proteinmodell liefert keinen Hinweis auf eine Änderung der Proteinstruktur durch die in dieser Arbeit nachgewiesene Variante c.1790G>A, p.Gly597Glu (rs199700282) und DynaMut prädiziert eine stabilisierende Wirkung. Jedoch ist damit nicht ausgeschlossen, dass rs199700282 trotzdem Proteinstruktur und -funktion verändert.

Dysregulierte Phagozytose, wie sie durch rs1143679 verursacht wird, wird als Teil der Pathogenese der AMD betrachtet. Zudem scheinen Monozyten, die α M β 2 tragen, eine Rolle in der Bildung choroidaler Neovaskularisationen zu spielen und sind bei Patient*innen mit neovaskulärer AMD erhöht (233,234). Eine Korrelation zwischen

$\alpha\text{M}\beta 2^+$ -Monozyten und der Anzahl an benötigten Injektionen von VEGF-Inhibitoren wird vermutet (233). *ITGAM* könnte also durchaus auch zur AMD-Pathogenese beitragen, jedoch gibt es bisher zu wenig Evidenz für einen Zusammenhang.

5.9 Einfluss von Varianten in C3 auf die AMD-Pathogenese

C3 ist der Angriffspunkt der Regulation des Komplementsystems durch Faktor H und Faktor I. Die seltene Variante rs147859257 führt zu einer verminderten Inaktivierung von C3 durch diese Komplementregulatoren und zu einem früheren Krankheitsbeginn sowie einer stärkeren Progression (42,215). Der Grund dafür könnte bei rs147859257, und ebenso bei der häufigeren Variante rs2230199, eine verringerte Bindung von Faktor H an C3 sein (41,235). Insgesamt scheint der Verlust der Regulation von C3 und eine daraufhin gesteigerte Komplementaktivierung eine Rolle in der Pathogenese der AMD zu spielen.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Variante c.2533G>A, p.Val845Met wurde bisher weder beschrieben, noch ist die Variante in Datenbanken hinterlegt. Ebenso wie seltene C9-Varianten, werden seltene Varianten in C3 mit einem Funktionsverlust oder einem hohen prädiktiven Risikoscore mit einem gesteigerten AMD-Risiko in Verbindung gebracht (180). Der CADD-Score von 26,7 spricht hier für eine mögliche Pathogenität von c.2533G>A. Die direkt benachbarte Missensevariante rs1599510478 ist *likely pathogenic* für aHUS mit C3-Anomalie, was zeigt, dass auch Missensevarianten in diesem Bereich des C3-Gens mit komplementvermittelten Erkrankungen assoziiert sein können.

5.10 Stärken und Limitationen der Arbeit

Bisherige pharmakogenetische Untersuchungen einer Assoziation von *VEGFA*-Varianten mit dem Ansprechen auf VEGF-Inhibitoren waren auf die Analyse bestimmter Genotypen im *VEGFA*-Gen beschränkt (Anhang 6) (88,188,192,193,236).

Eine Stärke dieser Arbeit ist daher, dass eine Komplettssequenzierung der kodierenden Abschnitte des *VEGFA*-Gens inklusive eines flankierenden intronischen Bereichs mittels Sanger-Sequenzierung erfolgte, um *VEGFA*-Varianten zu identifizieren. Im Gegensatz zu GWAS, die sich dazu eignen, hypothesenfrei an großen Studienpopulationen Assoziationen aufzudecken, hat die Komplettssequenzierung, wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde, den Vorteil, dass neue oder sehr seltene genetische Varianten detektiert werden können, die durch GWAS normalerweise nicht erfasst werden (34). Identifizierte seltene Varianten können anschließend hinsichtlich ihrer Assoziation an einer großen Studienpopulation untersucht werden. Ein solcher Hybridansatz wurde in

der umfangreichen GWAS von Fritsche *et al.* eingesetzt und es wird betont, dass die Identifizierung von Varianten durch Sequenzierung und eine nachfolgende Assoziationsanalyse an einer großen Studienpopulation mittels Array einen sinnvollen Ansatz zur Untersuchung der Heritabilität komplexer Erkrankungen darstellt (43).

Eine weitere wesentliche Stärke dieser Arbeit ist der Vergleich mit einer Kontrollgruppe nicht an nAMD erkrankter Individuen hinsichtlich der festgestellten *VEGFA*-Varianten. Somit konnten die nachgewiesenen Allelfrequenzen mit einer populationsgematchten und, bei Mittelwerten von 76,95 Jahren bzw. 78,94 Jahren, auch bezüglich des Alters ähnlich zusammengesetzten Kontrollgruppe verglichen werden. Dies ist relevant, da genetische Risikofaktoren in unterschiedlichen Populationen variieren können. Eine vergleichbare Zusammensetzung der Kontrollgruppe hinsichtlich des Alters ist wichtig, da das Erkrankungsrisiko mit steigendem Alter ansteigt und zunächst gesunde Kontrollpersonen im höheren Alter an einer AMD erkranken könnten. Trotz des hohen mittleren Alters der Kontrollgruppe und der augenärztlichen Untersuchung hinsichtlich Anzeichen einer AMD kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Individuen dieser Gruppe zu einem späteren Zeitpunkt noch an einer AMD erkranken.

Die Variantenklassifikation stellt eine besondere Herausforderung dar, erfolgte oft uneinheitlich und wird stetig weiterentwickelt. Mittlerweile sind die ACMG-Kriterien als Standard etabliert. In dieser Arbeit wurden diese bei der Interpretation der identifizierten genetischen Varianten berücksichtigt, was eine strukturierte Auswertung ermöglicht (92). Allerdings wurden die ACMG-Kriterien für monogenetische Erkrankungen entwickelt. Dabei befinden sich viele Erkrankungen hinsichtlich ihrer Ätiologie auf einem Spektrum von monogenetisch bis multifaktoriell bedingt, weshalb Weiterentwicklungen bezüglich der Klassifikation von Risikoallelen komplexer Erkrankungen Gegenstand aktueller Forschung sind (91,233).

Eine Limitation der Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit ist die Anzahl der Patient*innen in der Studienpopulation. Funktionell relevante Varianten mit einem großen Effekt auf das Erkrankungsrisiko können Gene aufzeigen, die eine Rolle in der Pathogenese der jeweiligen Erkrankung spielen (43). Aufgrund der meist niedrigen Allelfrequenz sind jedoch große Studienpopulationen nötig, um eine Assoziation nachweisen zu können (43). Die in dieser Arbeit ausgewerteten Varianten in den Genen des Komplementsystems konnten funktionell annotiert werden, jedoch kann keine Aussage zu einer Assoziation mit der Erkrankung an AMD getroffen werden, da die Varianten selten sind und jeweils nur einmal in der Studienpopulation nachgewiesen wurden. Die beiden nachgewiesenen Varianten in *VEGFA* sind hingegen häufige

Varianten, sodass sich Hinweise auf potenzielle Zusammenhänge zeigen können, jedoch auch hier keine eindeutige Assoziation nachgewiesen werden kann. Um eine mögliche Assoziation zu bestätigen sind prospektive Studien mit Fallzahlplanung nötig. Zudem könnten seltene, in dieser Arbeit nicht detektierte Varianten in größeren Studienpopulationen nachweisbar sein. Auch genetische Varianten in anderen Genen und Signalwegen, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, können einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko haben. So wurden in einer umfangreichen GWAS neben Varianten in Genen des Komplementsystems und der Angiogenese auch Varianten in Genen des Fettstoffwechsels und des extrazellulären Remodelings identifiziert, die mit AMD assoziiert sind (43).

Aufgrund der eingesetzten Methoden konnten in dieser Arbeit keine exonübergreifenden strukturellen Varianten oder tief intronisch gelegenen Varianten detektiert werden. Diese könnten sich jedoch ebenfalls auf das Erkrankungsrisiko oder Therapieansprechen auswirken. Strukturelle Varianten, die das AMD-Risiko beeinflussen, wurden in den *CFHR*-Genen identifiziert. Hierbei ist die häufigste Kopienzahlveränderung eine kombinierte Deletionen von *CFHR1* und *CFHR3*, welche mit einer OR von 0,47 protektiv bezüglich AMD ist (36,37). Homozygotie führt dabei zur Abwesenheit von FHR-1 und FHR-3 im Serum (36). Zudem wurden in dieser Arbeit ausschließlich genetische Faktoren betrachtet. Das AMD-Erkrankungsrisiko wird jedoch auch durch nicht-genetische Risikofaktoren beeinflusst, welche in dieser Arbeit nicht betrachtet wurden.

5.11 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde erfolgte eine Komplettssequenzierung des kodierenden sowie eines flankierenden intronischen Bereichs im *VEGFA*-Gen, um genetische Varianten zu identifizieren, die möglicherweise mit dem Therapieansprechen in einem Zusammenhang stehen.

Hierbei wurden zwei genetische Varianten in *VEGFA* identifiziert. Die synonyme Variante rs25648 und die intronische Variante rs3025000 sind in der Allgemeinbevölkerung häufige Varianten, die die Aminosäuresequenz nicht verändern. Auswirkungen auf Proteinebene sind dennoch nicht ausgeschlossen, jedoch wurde bisher kein eindeutiger Zusammenhang zwischen diesen *VEGFA*-Varianten und der VEGF-A-Serumkonzentration nachgewiesen (166,171–173).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keinen eindeutigen Zusammenhang der beiden nachgewiesenen *VEGFA*-Varianten mit dem AMD-Risiko, deuten jedoch auf einen möglichen Einfluss von rs25648 auf die Entwicklung einer AMD hin. Es ist möglich, dass

ein Zusammenhang in einer größeren Kohorte nachweisbar wäre. Bisherige Untersuchungen konnten jedoch keine eindeutige Assoziation nachweisen und *in silico* sowie anhand von Untersuchungen zur Genexpression lässt sich bisher kein eindeutiger Wirkmechanismus dieser Varianten ableiten. Vereinzelt wurde ein Zusammenhang zwischen anderen *VEGFA*-Varianten und dem AMD-Risiko hergestellt, wobei die Bedeutung von *VEGFA* für das AMD-Risiko insgesamt unklar ist (3,70), obwohl die Pathogenese der Erkrankung einen möglichen Zusammenhang zwischen *VEGFA* und dem Auftreten von AMD impliziert.

Die beiden identifizierten *VEGFA*-Varianten stehen in dieser kleinen Studienpopulation zudem nicht mit dem Ansprechen auf VEGF-Inhibitoren in Zusammenhang. Es besteht jedoch ebenfalls die Möglichkeit, dass eine Assoziation in größeren Kohorten nachweisbar wäre bzw. sich andere, in dieser Studie nicht detektierte genetische Varianten im *VEGFA*-Gen auf das Therapieansprechen auswirken. Zudem könnte das Therapieansprechen auch mit anderen, in dieser Arbeit nicht untersuchten Genen assoziiert sein, insbesondere im Komplementsystem, welches zentral für die Pathogenese der AMD ist. Weiterhin wirken sich auch nicht-genetische Faktoren auf das Therapieansprechen aus (76), deren Effekt genetische Faktoren auch überwiegen könnte. Detaillierte genetische Untersuchungen von Kandidatengenen hinsichtlich pharmakogenetischer Zusammenhänge liefern einen wichtigen Beitrag für eine bessere Datenbasis für zukünftige personalisierte Therapieansätze.

Die Bedeutung des Komplementsystems für die Pathophysiologie der AMD wird dadurch hervorgehoben, dass viele der mit dem AMD-Risiko assoziierten Varianten in Genen, die für Komponenten der Komplementkaskade kodieren, liegen (25,39,237). So befindet sich die erste identifizierte Hauptrisikovariante für AMD, c.1204T>C, p.Tyr402His, in *CFH* (25). Auch in dieser Arbeit wurden genetische Varianten in den Genen des Komplementsystems nachgewiesen. Sieben Varianten in den Genen *MASP2*, *CFHR2*, *C9*, *CFB*, *C5*, *ITGAM* und *C3* wurden anhand der prädiktierten Pathogenität zur weiteren Analyse ausgewählt und konnten mit einer zweiten Methode verifiziert werden. Alle Varianten lagen dabei jeweils heterozygot bei je einem Individuum aus der Gruppe der AMD-Betroffenen vor. Die *MASP2*-Variante c.359A>G, p.Asp120Gly wurde bereits mit *MASP*-Defizienz in Verbindung gebracht und weist einen Einfluss auf die Proteinfunktion auf (128,129). Die Nonsensevariante c.595G>T, p.Glu199Ter in *CFHR2* beeinflusst die Proteinsynthese und wirkt sich somit ebenfalls auf die Proteinfunktion aus (38,137). *CFHR2* gehört dabei zu derselben Genfamilie wie *CFH* und auch die *CFHR*-Gene implizieren, einen Einfluss auf die AMD-Pathogenese zu haben, wobei der Krankheitsmechanismus noch unzureichend geklärt ist (38). Seltene Varianten mit

funktionellen Auswirkungen auf das Protein können Hinweise auf krankheitsverursachende Gene geben (43) und damit zur weiteren Aufklärung der Pathogenese der AMD und der genetischen Prädisposition beitragen. Im Sinne einer komplexen Erkrankung tragen neben genetischen auch nicht-genetische Faktoren zum Erkrankungsrisiko bei. Daher sind mögliche Risikovarianten und -gene in einem polygenen Kontext zu betrachten. Insbesondere Varianten, die das Risiko nur leicht erhöhen, aber eine relativ hohe Allelfrequenz haben, könnten in einen polygenetischen Risikoscore einbezogen werden. Dies unterstreicht die Notwendigkeit funktioneller Untersuchungen und Studien an größeren Kohorten, um weitere Risikogene für die AMD identifizieren zu können. Zukünftig könnte auf diesem Weg eine individuellere Risikoeinschätzung und eine personalisierte Behandlung ermöglicht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Peters E, Pritzkeleit R, Beske F, Katalinic A. Demografischer Wandel und Krankheitshäufigkeiten: Eine Projektion bis 2050 [Demographic change and disease rates: a projection until 2050]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2010;53(5):417–26. ger. doi:10.1007/s00103-010-1050-y Cited in: PubMed; PMID 20376420.
2. Zhang M, Jiang N, Chu Y, Postnikova O, Varghese R, Horvath A, Cheema AK, Golestaneh N. Dysregulated metabolic pathways in age-related macular degeneration. Sci Rep. 2020;10(1):2464. doi:10.1038/s41598-020-59244-4 Cited in: PubMed; PMID 32051464.
3. Shughoury A, Sevgi DD, Ciulla TA. Molecular Genetic Mechanisms in Age-Related Macular Degeneration. Genes (Basel). 2022;13(7). doi:10.3390/genes13071233 Cited in: PubMed; PMID 35886016.
4. Golestaneh N, Chu Y, Xiao Y-Y, Stoleru GL, Theos AC. Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. Cell Death Dis. 2017;8(1):e2537. doi:10.1038/cddis.2016.453 Cited in: PubMed; PMID 28055007.
5. Mammadzada P, Corredoira PM, André H. The role of hypoxia-inducible factors in neovascular age-related macular degeneration: a gene therapy perspective. Cell Mol Life Sci. 2020;77(5):819–33. doi:10.1007/s00018-019-03422-9 Cited in: PubMed; PMID 31893312.
6. AREDS Research Group. The age-related eye disease study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the age-related eye disease study report number 6. American Journal of Ophthalmology. 2001;132(5):668–81. doi:10.1016/S0002-9394(01)01218-1
7. Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related macular degeneration. N Engl J Med. 2008;358(24):2606–17. doi:10.1056/NEJMra0801537 Cited in: PubMed; PMID 18550876.
8. Brown GC, Brown MM, Sharma S, Stein JD, Roth Z, Campanella J, Beauchamp GR. THE BURDEN OF AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION: A VALUE-BASED MEDICINE ANALYSIS. Trans Am Ophthalmol Soc. 2005;103:173–86. Cited in: PubMed; PMID 17057801.
9. Tosteson AN, Gabriel SE, Grove MR, Moncur MM, Kneeland TS, Melton LJ. Impact of hip and vertebral fractures on quality-adjusted life years. Osteoporos Int. 2001;12(12):1042–9. doi:10.1007/s001980170015 Cited in: PubMed; PMID 11846331.
10. Chapman GB, Elstein AS, Kuzel TM, Sharifi R, Nadler RB, Andrews A, Bennett CL. Prostate cancer patients' utilities for health states: how it looks depends on where you stand. Med Decis Making. 1998;18(3):278–86. doi:10.1177/0272989X9801800304 Cited in: PubMed; PMID 9679992.
11. Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR. Clinical classification of age-related macular degeneration. Ophthalmology. 2013;120(4):844–51. doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.036 Cited in: PubMed; PMID 23332590.
12. Age-Related Eye Disease Study Research Group. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. Ophthalmology. 2000;107(12):2224–32. doi:10.1016/s0161-6420(00)00409-7 Cited in: PubMed; PMID 11097601.
13. Chakravarthy U, Augood C, Bentham GC, Jong PTVM de, Rahu M, Seland J, Soubrane G, Tomazzoli L, Topouzis F, Vingerling JR, Vioque J, Young IS, Fletcher AE. Cigarette smoking and age-related macular degeneration in the EUREYE Study. Ophthalmology. 2007;114(6):1157–63. doi:10.1016/j.ophtha.2006.09.022 Cited in: PubMed; PMID 17337063.

14. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ, Jong PT de. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology*. 2001;108(4):697–704. doi:10.1016/s0161-6420(00)00580-7 Cited in: PubMed; PMID 11297486.
15. Klein R, Klein BE, Jensen SC, Meuer SM. The five-year incidence and progression of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1997;104(1):7–21. doi:10.1016/s0161-6420(97)30368-6 Cited in: PubMed; PMID 9022098.
16. Blumenkranz MS, Russell SR, Robey MG, Kott-Blumenkranz R, Penneys N. Risk factors in age-related maculopathy complicated by choroidal neovascularization. *Ophthalmology*. 1986;93(5):552–8. doi:10.1016/s0161-6420(86)33702-3 Cited in: PubMed; PMID 2425325.
17. Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, Alves D, Cachulo ML, Khawaja AP, Cougnard-Gregoire A, Merle BMJ, Korb C, Erke MG, Bron A, Anastasopoulos E, Meester-Smoor MA, Segato T, Piermarocchi S, Jong PTVM de, Vingerling JR, Topouzis F, Creuzot-Garcher C, Bertelsen G, Pfeiffer N, Fletcher AE, Foster PJ, Silva R, Korobelnik J-F, Delcourt C, Klaver CCW. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. *Ophthalmology*. 2017;124(12):1753–63. doi:10.1016/j.ophtha.2017.05.035 Cited in: PubMed; PMID 28712657.
18. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2014;2(2):e106-e116. doi:10.1016/S2214-109X(13)70145-1
19. Li JQ, Welchowski T, Schmid M, Mauschwitz MM, Holz FG, Finger RP. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol*. 2020;104(8):1077–84. doi:10.1136/bjophthalmol-2019-314422 Cited in: PubMed; PMID 31712255.
20. Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, Bird AC, Gilbert CE, Spector TD. Genetic influence on early age-related maculopathy. *Ophthalmology*. 2002;109(4):730–6. doi:10.1016/s0161-6420(01)01049-1
21. Klein ML, Mauldin WM, Stoumbos VD. Heredity and age-related macular degeneration. Observations in monozygotic twins. *Arch Ophthalmol*. 1994;112(7):932–7. doi:10.1001/archophth.1994.01090190080025 Cited in: PubMed; PMID 8031273.
22. Heiba IM, Elston RC, Klein BE, Klein R. Sibling correlations and segregation analysis of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Genet Epidemiol*. 1994;11(1):51–67. doi:10.1002/gepi.1370110106 Cited in: PubMed; PMID 8013888.
23. Silvestri G, Johnston PB, Hughes AE. Is genetic predisposition an important risk factor in age-related macular degeneration? *Eye (Lond)*. 1994;8 (Pt 5):564–8. doi:10.1038/eye.1994.138 Cited in: PubMed; PMID 7835454.
24. Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, Zareparsis S, Swaroop A, Iyengar SK, Klein BEK, Klein R, Lee KE, Majewski J, Schultz DW, Klein ML, Seddon JM, Santangelo SL, Weeks DE, Conley YP, Mah TS, Schmidt S, Haines JL, Pericak-Vance MA, Gorin MB, Schulz HL, Pardi F, Lewis CM, Weber BHF. Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2005;14(15):2257–64. doi:10.1093/hmg/ddi230 Cited in: PubMed; PMID 15987700.
25. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai J-Y, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385–9. doi:10.1126/science.1109557 Cited in: PubMed; PMID 15761122.
26. Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):421–4. doi:10.1126/science.1110189 Cited in: PubMed; PMID 15761121.

27. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM, Smith RJH, Silvestri G, Russell SR, Klaver CCW, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(20):7227–32. doi:10.1073/pnas.0501536102 Cited in: PubMed; PMID 15870199.
28. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, Spencer KL, Kwan SY, Noureddine M, Gilbert JR, Schnetz-Boutaud N, Agarwal A, Postel EA, Pericak-Vance MA. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):419–21. doi:10.1126/science.1110359 Cited in: PubMed; PMID 15761120.
29. Baird PN, Islam FMA, Richardson AJ, Cain M, Hunt N, Guymer R. Analysis of the Y402H variant of the complement factor H gene in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(10):4194–8. doi:10.1167/iovs.05-1285 Cited in: PubMed; PMID 17003406.
30. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2010;343(1):227–35. doi:10.1007/s00441-010-1034-0 Cited in: PubMed; PMID 20838815.
31. Meri S, Pangburn MK. Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(10):3982–6. doi:10.1073/pnas.87.10.3982 Cited in: PubMed; PMID 1692629.
32. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2001;20(6):705–32. doi:10.1016/S1350-9462(01)00010-6 Cited in: PubMed; PMID 11587915.
33. Johnson LV, Ozaki S, Staples MK, Erickson PA, Anderson DH. A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp Eye Res*. 2000;70(4):441–9. doi:10.1006/exer.1999.0798 Cited in: PubMed; PMID 10865992.
34. Geerlings MJ, Kremlitzka M, Bakker B, Nilsson SC, Saksens NT, Lechanteur YT, Pauper M, Corominas J, Fauser S, Hoyng CB, Blom AM, Jong EK de, Hollander AI den. The Functional Effect of Rare Variants in Complement Genes on C3b Degradation in Patients With Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol*. 2017;135(1):39–46. doi:10.1001/jamaophthalmol.2016.4604 Cited in: PubMed; PMID 27918759.
35. van de Ven JPH, Nilsson SC, Tan PL, Buitendijk GHS, Ristau T, Mohlin FC, Nabuurs SB, Schoenmaker-Koller FE, Smailhodzic D, Campochiaro PA, Zack DJ, Duvvari MR, Bakker B, Paun CC, Boon CJF, Uitterlinden AG, Liakopoulos S, Klevering BJ, Fauser S, Daha MR, Katsanis N, Klaver CCW, Blom AM, Hoyng CB, Hollander AI den. A functional variant in the CFI gene confers a high risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2013;45(7):813–7. doi:10.1038/ng.2640 Cited in: PubMed; PMID 23685748.
36. Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38(10):1173–7. doi:10.1038/ng1890 Cited in: PubMed; PMID 16998489.
37. Kubista KE, Tosakulwong N, Wu Y, Ryu E, Roeder JL, Hecker LA, Baratz KH, Brown WL, Edwards AO. Copy number variation in the complement factor H-related genes and age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2011;17:2080–92. Cited in: PubMed; PMID 21850184.
38. Lorés-Motta L, van Beek AE, Willems E, Zandstra J, van Mierlo G, Einhaus A, Mary J-L, Stucki C, Bakker B, Hoyng CB, Fauser S, Clark SJ, Jonge MI de, Nogoceke E, Koertvely E, Jongerius I, Kuijpers TW, Hollander AI den. Common haplotypes at the CFH locus and low-frequency variants in CFHR2 and CFHR5 associate with systemic FHR

- concentrations and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet.* 2021;108(8):1367–84. doi:10.1016/j.ajhg.2021.06.002 Cited in: PubMed; PMID 34260947.
39. Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, Neale BM, Daly MJ, Seddon JM. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2007;39(10):1200–1. doi:10.1038/ng2131 Cited in: PubMed; PMID 17767156.
 40. Yates JRW, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbricht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2007;357(6):553–61. doi:10.1056/NEJMoa072618 Cited in: PubMed; PMID 17634448.
 41. Zhan X, Larson DE, Wang C, Koboldt DC, Sergeev YV, Fulton RS, Fulton LL, Fronick CC, Branham KE, Bragg-Gresham J, Jun G, Hu Y, Kang HM, Liu D, Othman M, Brooks M, Ratnapriya R, Boleda A, Grassmann F, Strachwitz C v., Olson LM, Buitendijk GHS, Hofman A, van Duijn CM, Cipriani V, Moore AT, Shahid H, Jiang Y, Conley YP, Morgan DJ, Kim IK, Johnson MP, Cantsilieris S, Richardson AJ, Guymer RH, Luo H, Ouyang H, Licht C, Pluthero FG, Zhang MM, Zhang K, Baird PN, Blangero J, Klein ML, Farrer LA, Deangelis MM, Weeks DE, Gorin MB, Yates JRW, Klaver CCW, Pericak-Vance MA, Haines JL, Weber BHF, Wilson RK, Heckenlively JR, Chew EY, Stambolian D, Mardis ER, Swaroop A, Abecasis GR. Identification of a rare coding variant in complement 3 associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2013;45(11):1375–9. doi:10.1038/ng.2758 Cited in: PubMed; PMID 24036949.
 42. Seddon JM, Yu Y, Miller EC, Reynolds R, Tan PL, Gowrisankar S, Goldstein JL, Triebwasser M, Anderson HE, Zerbib J, Kavanagh D, Souied E, Katsanis N, Daly MJ, Atkinson JP, Raychaudhuri S. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2013;45(11):1366–70. doi:10.1038/ng.2741 Cited in: PubMed; PMID 24036952.
 43. Fritsche LG, Igl W, Bailey JNC, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, Burdon KP, Hebbaring SJ, Wen C, Gorski M, Kim IK, Cho D, Zack D, Souied E, Scholl HPN, Bala E, Lee KE, Hunter DJ, Sardell RJ, Mitchell P, Merriam JE, Cipriani V, Hoffman JD, Schick T, Lechanteur YTE, Guymer RH, Johnson MP, Jiang Y, Stanton CM, Buitendijk GHS, Zhan X, Kwong AM, Boleda A, Brooks M, Gieser L, Ratnapriya R, Branham KE, Foerster JR, Heckenlively JR, Othman MI, Vote BJ, Liang HH, Souzeau E, McAllister IL, Isaacs T, Hall J, Lake S, Mackey DA, Constable IJ, Craig JE, Kitchner TE, Yang Z, Su Z, Luo H, Chen D, Ouyang H, Flagg K, Lin D, Mao G, Ferreyra H, Stark K, Strachwitz CN v., Wolf A, Brandl C, Rudolph G, Olden M, Morrison MA, Morgan DJ, Schu M, Ahn J, Silvestri G, Tsironi EE, Park KH, Farrer LA, Orlin A, Brucker A, Li M, Curcio CA, Mohand-Saïd S, Sahel J-A, Audo I, Benchaboune M, Cree AJ, Rennie CA, Goverdhan SV, Grunin M, Hagbi-Levi S, Campochiaro P, Katsanis N, Holz FG, Blond F, Blanché H, Deleuze J-F, Igo RP, Truitt B, Peachey NS, Meuer SM, Myers CE, Moore EL, Klein R, Hauser MA, Postel EA, Courtenay MD, Schwartz SG, Kovach JL, Scott WK, Liew G, Tan AG, Gopinath B, Merriam JC, Smith RT, Khan JC, Shahid H, Moore AT, McGrath JA, Laux R, Brantley MA, Agarwal A, Ersoy L, Caramoy A, Langmann T, Saksens NTM, Jong EK de, Hoyng CB, Cain MS, Richardson AJ, Martin TM, Blangero J, Weeks DE, Dhillon B, van Duijn CM, Doheny KF, Romm J, Klaver CCW, Hayward C, Gorin MB, Klein ML, Baird PN, Hollander AI den, Fauser S, Yates JRW, Allikmets R, Wang JJ, Schaumberg DA, Klein BEK, Hagstrom SA, Chowers I, Lotery AJ, Léveillard T, Zhang K, Brilliant MH, Hewitt AW, Swaroop A, Chew EY, Pericak-Vance MA, DeAngelis M, Stambolian D, Haines JL, Iyengar SK, Weber BHF, Abecasis GR, Heid IM. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet.* 2016;48(2):134–43. doi:10.1038/ng.3448 Cited in: PubMed; PMID 26691988.
 44. Nishiguchi KM, Yasuma TR, Tomida D, Nakamura M, Ishikawa K, Kikuchi M, Ohmi Y, Niwa T, Hamajima N, Furukawa K, Terasaki H. C9-R95X polymorphism in patients with

- neovascular age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(1):508–12. doi:10.1167/iov.11-8425 Cited in: PubMed; PMID 22190594.
45. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Barile GR, Smith RT, Hageman GS, Dean M, Allikmets R. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38(4):458–62. doi:10.1038/ng1750 Cited in: PubMed; PMID 16518403.
 46. Sun C, Zhao M, Li X. CFB/C2 gene polymorphisms and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Curr Eye Res*. 2012;37(4):259–71. doi:10.3109/02713683.2011.635401 Cited in: PubMed; PMID 22440158.
 47. Thakkestant A, McEvoy M, Chakravarthy U, Chakrabarti S, McKay GJ, Ryu E, Silvestri G, Kaur I, Francis P, Iwata T, Akahori M, Arning A, Edwards AO, Seddon JM, Attia J. The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2012;176(5):361–72. doi:10.1093/aje/kws031 Cited in: PubMed; PMID 22869612.
 48. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, La Castruita-De Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24). doi:10.3390/ijms21249739 Cited in: PubMed; PMID 33419373.
 49. Cheng J, Hao X, Zhang Z. Risk of macular degeneration affected by polymorphisms in Matrix metalloproteinase-2: A case-control study in Chinese Han population. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(47). doi:10.1097/MD.00000000000008190 Cited in: PubMed; PMID 29381911.
 50. Deangelis MM, Owen LA, Morrison MA, Morgan DJ, Li M, Shakoor A, Vitale A, Iyengar S, Stambolian D, Kim IK, Farrer LA. Genetics of age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mol Genet*. 2017;26(R1):R45–R50. doi:10.1093/hmg/ddx228 Cited in: PubMed; PMID 28854576.
 51. Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, Ripke S, Thorleifsson G, Tan PL, Souied EH, Richardson AJ, Merriam JE, Buitendijk GHS, Reynolds R, Raychaudhuri S, Chin KA, Sobrin L, Evangelou E, Lee PH, Lee AY, Leveziel N, Zack DJ, Campochiaro B, Campochiaro P, Smith RT, Barile GR, Guymer RH, Hogg R, Chakravarthy U, Robman LD, Gustafsson O, Sigurdsson H, Ortmann W, Behrens TW, Stefansson K, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Vingerling JR, Klaver CCW, Allikmets R, Brantley MA, Baird PN, Katsanis N, Thorsteinsdottir U, Ioannidis JPA, Daly MJ, Graham RR, Seddon JM. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2011;20(18):3699–709. doi:10.1093/hmg/ddr270 Cited in: PubMed; PMID 21665990.
 52. Thakkestant A, Bowe S, McEvoy M, Smith W, Attia J. Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2006;164(9):813–22. doi:10.1093/aje/kwj279 Cited in: PubMed; PMID 16916985.
 53. Chen W, Stambolian D, Edwards AO, Branham KE, Othman M, Jakobsdottir J, Tosakulwong N, Pericak-Vance MA, Campochiaro PA, Klein ML, Tan PL, Conley YP, Kanda A, Kopplin L, Li Y, Augustaitis KJ, Karoukis AJ, Scott WK, Agarwal A, Kovach JL, Schwartz SG, Postel EA, Brooks M, Baratz KH, Brown WL, Brucker AJ, Orlin A, Brown G, Ho A, Regillo C, Donoso L, Tian L, Kaderli B, Hadley D, Hagstrom SA, Peachey NS, Klein R, Klein BEK, Gotoh N, Yamashiro K, Ferris Iii F, Fagerness JA, Reynolds R, Farrer LA, Kim IK, Miller JW, Cortón M, Carracedo A, Sanchez-Salorio M, Pugh EW, Doheny KF, Brion M, Deangelis MM, Weeks DE, Zack DJ, Chew EY, Heckenlively JR, Yoshimura N, Iyengar SK, Francis PJ, Katsanis N, Seddon JM, Haines JL, Gorin MB, Abecasis GR, Swaroop A. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(16):7401–6. doi:10.1073/pnas.0912702107 Cited in: PubMed; PMID 20385819.

54. Merle DA, Sen M, Armento A, Stanton CM, Thee EF, Meester-Smoor MA, Kaiser M, Clark SJ, Klaver CCW, Keane PA, Wright AF, Ehrmann M, Ueffing M. 10q26 - The enigma in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2022;101154. doi:10.1016/j.preteyeres.2022.101154 Cited in: PubMed; PMID 36513584.
55. Zhang L, Lim SL, Du H, Zhang M, Kozak I, Hannum G, Wang X, Ouyang H, Hughes G, Zhao L, Zhu X, Lee C, Su Z, Zhou X, Shaw R, Geum D, Wei X, Zhu J, Ideker T, Oka C, Wang N, Yang Z, Shaw PX, Zhang K. High temperature requirement factor A1 (HTRA1) gene regulates angiogenesis through transforming growth factor- β family member growth differentiation factor 6. *J Biol Chem.* 2012;287(2):1520–6. doi:10.1074/jbc.M111.275990 Cited in: PubMed; PMID 22049084.
56. Vierkotten S, Muether PS, Fauser S. Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components. *PLoS One.* 2011;6(8):e22959. doi:10.1371/journal.pone.0022959 Cited in: PubMed; PMID 21829675.
57. Kortvely E, Hauck SM, Duetsch G, Gloeckner CJ, Kremmer E, Alge-Priglinger CS, Deeg CA, Ueffing M. ARMS2 is a constituent of the extracellular matrix providing a link between familial and sporadic age-related macular degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(1):79–88. doi:10.1167/iovs.09-3850 Cited in: PubMed; PMID 19696174.
58. Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, Olson L, Kenealy SJ, Hauser M, Gilbert JR, Pericak-Vance MA. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(1):329–35. doi:10.1167/iovs.05-0116 Cited in: PubMed; PMID 16384981.
59. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, Weber BHF. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet.* 2005;14(21):3227–36. doi:10.1093/hmg/ddi353 Cited in: PubMed; PMID 16174643.
60. Wang Y, Wang M, Han Y, Zhang R, Le Ma. ABCA1 rs1883025 polymorphism and risk of age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016;254(2):323–32. doi:10.1007/s00417-015-3211-z Cited in: PubMed; PMID 26608582.
61. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 1986;46(11):5629–32. Cited in: PubMed; PMID 3756910.
62. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425(3):540–7. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.021 Cited in: PubMed; PMID 22925671.
63. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.* 2007;19(10):2003–12. doi:10.1016/j.cellsig.2007.05.013 Cited in: PubMed; PMID 17658244.
64. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res.* 1995;77(3):638–43. doi:10.1161/01.res.77.3.638 Cited in: PubMed; PMID 7641334.
65. Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(17):7997–8010. doi:10.1093/nar/gkt539 Cited in: PubMed; PMID 23851566.
66. Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(11):6417–23. doi:10.1074/jbc.273.11.6417 Cited in: PubMed; PMID 9497373.

67. Huang C, Xu Y, Li X, Wang W. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms and age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Mol Vis.* 2013;19:211–21. Cited in: PubMed; PMID 23761723.
68. Janik-Papis K, Zaras M, Krzyzanowska A, Wozniak K, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. *Exp Mol Pathol.* 2009;87(3):234–8. doi:10.1016/j.yexmp.2009.09.005 Cited in: PubMed; PMID 19761764.
69. Liu Y, Hou S, Lang W, Dai D, Wang Z, Ji X, Li K, Zhang X, Zou Y, Wang J. Roles of three common VEGF polymorphisms in the risk of age-related macular degeneration. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014;18(4):245–52. doi:10.1089/gtmb.2013.0368 Cited in: PubMed; PMID 24689893.
70. Fang AM, Lee AY, Kulkarni M, Osborn MP, Brantley Jr. MA. Polymorphisms in the VEGFA and VEGFR-2 genes and neovascular age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2009;15:2710–9. Cited in: PubMed; PMID 20019880.
71. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol.* 2001;119(10):1417–36. doi:10.1001/archophth.119.10.1417 Cited in: PubMed; PMID 11594942.
72. Amadio M, Govoni S, Pascale A. Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. *Pharmacol Res.* 2016;103:253–69. doi:10.1016/j.phrs.2015.11.027 Cited in: PubMed; PMID 26678602.
73. Kuo BL, Singh RP. Brolucizumab for the treatment of diabetic macular edema. *Curr Opin Ophthalmol.* 2022;33(3):167–73. doi:10.1097/ICU.0000000000000849 Cited in: PubMed; PMID 35266896.
74. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11393–8. doi:10.1073/pnas.172398299 Cited in: PubMed; PMID 12177445.
75. Ciombor KK, Berlin J, Chan E. Aflibercept. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):1920–5. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2911 Cited in: PubMed; PMID 23444216.
76. Phan LT, Broadhead GK, Hong TH, Chang AA. Predictors of Visual Acuity After Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration - Current Perspectives. *Clin Ophthalmol.* 2021;15:3351–67. doi:10.2147/OPTH.S205147 Cited in: PubMed; PMID 34408393.
77. Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells.* 2019;8(5). doi:10.3390/cells8050471 Cited in: PubMed; PMID 31108880.
78. Shirley M. Faricimab: First Approval. *Drugs.* 2022;82(7):825–30. doi:10.1007/s40265-022-01713-3 Cited in: PubMed; PMID 35474059.
79. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology.* 2009;116(1):57–65.e5. doi:10.1016/j.ophtha.2008.10.018 Cited in: PubMed; PMID 19118696.
80. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2006;355(14):1419–31. doi:10.1056/NEJMoa054481 Cited in: PubMed; PMID 17021318.
81. Muller YA, Chen Y, Christinger HW, Li B, Cunningham BC, Lowman HB, Vos AM de. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure.*

- 1998;6(9):1153–67. doi:10.1016/S0969-2126(98)00116-6 Cited in: PubMed; PMID 9753694.
82. Nischler C, Oberkofler H, Ortner C, Paikl D, Riha W, Lang N, Patsch W, Egger SF. Complement factor H Y402H gene polymorphism and response to intravitreal bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 2011;89(4):e344-9. doi:10.1111/j.1755-3768.2010.02080.x Cited in: PubMed; PMID 21232084.
 83. McKibbin M, Ali M, Bansal S, Baxter PD, West K, Williams G, Cassidy F, Inglehearn CF. CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2012;96(2):208–12. doi:10.1136/bjo.2010.193680 Cited in: PubMed; PMID 21558292.
 84. Hagstrom SA, Ying G, Pauer GJT, Sturgill-Short GM, Huang J, Callanan DG, Kim IK, Klein ML, Maguire MG, Martin DF. Pharmacogenetics for genes associated with age-related macular degeneration in the Comparison of AMD Treatments Trials (CATT). *Ophthalmology.* 2013;120(3):593–9. doi:10.1016/j.optha.2012.11.037 Cited in: PubMed; PMID 23337555.
 85. Ying G, Maguire MG, Pan W, Grunwald JE, Daniel E, Jaffe GJ, Toth CA, Hagstrom SA, Martin DF. Baseline Predictors for Five-Year Visual Acuity Outcomes in the Comparison of AMD Treatment Trials. *Ophthalmol Retina.* 2018;2(6):525–30. doi:10.1016/j.oret.2017.10.003 Cited in: PubMed; PMID 29938247.
 86. Abedi F, Wickremasinghe S, Richardson AJ, Islam AFM, Guymer RH, Baird PN. Genetic influences on the outcome of anti-vascular endothelial growth factor treatment in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2013;120(8):1641–8. doi:10.1016/j.optha.2013.01.014 Cited in: PubMed; PMID 23582991.
 87. Lazzeri S, Figus M, Orlandi P, Fioravanti A, Di Desidero T, Agosta E, Sartini MS, Posarelli C, Nardi M, Danesi R, Bocci G. VEGF-A polymorphisms predict short-term functional response to intravitreal ranibizumab in exudative age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics.* 2013;14(6):623–30. doi:10.2217/pgs.13.43 Cited in: PubMed; PMID 23570466.
 88. Hagstrom SA, Ying G, Pauer GJT, Sturgill-Short GM, Huang J, Maguire MG, Martin DF. VEGFA and VEGFR2 gene polymorphisms and response to anti-vascular endothelial growth factor therapy: comparison of age-related macular degeneration treatments trials (CATT). *JAMA Ophthalmol.* 2014;132(5):521–7. doi:10.1001/jamaophthalmol.2014.109 Cited in: PubMed; PMID 24652518.
 89. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001;11(5):863–74. doi:10.1101/gr.176601 Cited in: PubMed; PMID 11337480.
 90. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248–9. doi:10.1038/nmeth0410-248 Cited in: PubMed; PMID 20354512.
 91. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2018;47(Database issue):D886-94. doi:10.1093/nar/gky1016 Cited in: PubMed; PMID 30371827.
 92. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehman HL. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–24. doi:10.1038/gim.2015.30 Cited in: PubMed; PMID 25741868.
 93. IBM Corp. IBM SPSS Statistics for Windows: IBM Corp; 2020.
 94. NanoDrop 2000: Thermo Fisher Scientific; 2014.
 95. Howe KL, Achuthan P, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Charkhchi M, Cummins C, Da Rin Fioretto L,

- Davidson C, Dodiya K, El Houdaigui B, Fatima R, Gall A, Garcia Giron C, Grego T, Guijarro-Clarke C, Haggerty L, Hemrom A, Hourlier T, Izuogu OG, Juettemann T, Kaikala V, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Gonzalez Martinez J, Marugán JC, Maurel T, McMahon AC, Mohanan S, Moore B, Muffato M, Oheh DN, Paraschas D, Parker A, Parton A, Prosovetskaia I, Sakthivel MP, Salam AIA, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Steed E, Szpak M, Szuba M, Taylor K, Thormann A, Threadgold G, Walts B, Winterbottom A, Chakiachvili M, Chaubal A, Silva N de, Flint B, Frankish A, Hunt SE, Ilsley GR, Langridge N, Loveland JE, Martin FJ, Mudge JM, Morales J, Perry E, Ruffier M, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Cunningham F, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D884-D891. doi:10.1093/nar/gkaa942 Cited in: PubMed; PMID 33137190.
96. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W71-4. doi:10.1093/nar/gkm306 Cited in: PubMed; PMID 17485472.
 97. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13134. doi:10.1186/1471-2105-13-134 Cited in: PubMed; PMID 22708584.
 98. Waters DLE, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol.* 2014;109965–75. doi:10.1007/978-1-62703-715-0_7 Cited in: PubMed; PMID 24243196.
 99. Karunanathie H, Kee PS, Ng SF, Kennedy MA, Chua EW. PCR enhancers: Types, mechanisms, and applications in long-range PCR. *Biochimie.* 2022;197130–43. doi:10.1016/j.biochi.2022.02.009 Cited in: PubMed; PMID 35231536.
 100. Rees WA, Yager TD, Korte J, Hippel PH v. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry.* 1993;32(1):137–44. doi:10.1021/bi00052a019 Cited in: PubMed; PMID 8418834.
 101. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(19):3957–8. doi:10.1093/nar/25.19.3957 Cited in: PubMed; PMID 9380524.
 102. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(14):4008. Cited in: PubMed; PMID 1861999.
 103. Gressner AM, Arndt T. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
 104. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;17(7):2503–16. doi:10.1093/nar/17.7.2503 Cited in: PubMed; PMID 2785681.
 105. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet.* 2001;Chapter 9Unit 9.8. doi:10.1002/0471142905.hg0908s07 Cited in: PubMed; PMID 18428319.
 106. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, Gauthier LD, Brand H, Solomonson M, Watts NA, Rhodes D, Singer-Berk M, England EM, Seaby EG, Kosmicki JA, Walters RK, Tashman K, Farjoun Y, Banks E, Poterba T, Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong JX, Samocha KE, Pierce-Hoffman E, Zappala Z, O'Donnell-Luria AH, Minikel EV, Weisburd B, Lek M, Ware JS, Vittal C, Armean IM, Bergelson L, Cibulskis K, Connolly KM, Covarrubias M, Donnelly S, Ferriera S, Gabriel S, Gentry J, Gupta N, Jeandet T, Kaplan D, Llanwarne C, Munshi R, Novod S, Petrillo N, Roazen D, Ruano-Rubio V, Saltzman A, Schleicher M, Soto J, Tibbetts K, Tolonen C, Wade G, Talkowski ME, Neale BM, Daly MJ, MacArthur DG. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434–43. doi:10.1038/s41586-020-2308-7 Cited in: PubMed; PMID 32461654.

107. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Stanford JL, Isaacs WB, Xu J, Cooney KA, Lange EM, Schleutker J, Carpten JD, Powell IJ, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Giles GG, MacInnis RJ, Maier C, Hsieh C-L, Wiklund F, Catalona WJ, Foulkes WD, Mandal D, Eeles RA, Kote-Jarai Z, Bustamante CD, Schaid DJ, Hastie T, Ostrander EA, Bailey-Wilson JE, Radivojac P, Thibodeau SN, Whittemore AS, Sieh W. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4):877–85. doi:10.1016/j.ajhg.2016.08.016 Cited in: PubMed; PMID 27666373.
108. Steinhaus R, Proft S, Schuelke M, Cooper DN, Schwarz JM, Seelow D. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W446-W451. doi:10.1093/nar/gkab266 Cited in: PubMed; PMID 33893808.
109. Jaganathan K, Kyriazopoulou Panagiotopoulou S, McRae JF, Darbandi SF, Knowles D, Li YI, Kosmicki JA, Arbelaez J, Cui W, Schwartz GB, Chow ED, Kanterakis E, Gao H, Kia A, Batzoglu S, Sanders SJ, Farh KK-H. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. *Cell.* 2019;176(3):535-548.e24. doi:10.1016/j.cell.2018.12.015 Cited in: PubMed; PMID 30661751.
110. Ramani R, Krumholz K, Huang Y-F, Siepel A. PhastWeb: a web interface for evolutionary conservation scoring of multiple sequence alignments using phastCons and phyloP. *Bioinformatics.* 2019;35(13):2320–2. doi:10.1093/bioinformatics/bty966 Cited in: PubMed; PMID 30481262.
111. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D523-D531. doi:10.1093/nar/gkac1052 Cited in: PubMed; PMID 36408920.
112. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009;84(4):524–33. doi:10.1016/j.ajhg.2009.03.010 Cited in: PubMed; PMID 19344873.
113. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D980-5. doi:10.1093/nar/gkt1113 Cited in: PubMed; PMID 24234437.
114. Wasserstein RL, Schirm AL, Lazar NA. Moving to a World Beyond “ $p < 0.05$ ”. *The American Statistician.* 2019;73(sup1):1–19. doi:10.1080/00031305.2019.1583913
115. Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.* 1999;292(2):195–202. doi:10.1006/jmbi.1999.3091 Cited in: PubMed; PMID 10493868.
116. Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W389-94. doi:10.1093/nar/gkv332 Cited in: PubMed; PMID 25883141.
117. Sormanni P, Piovesan D, Heller GT, Bonomi M, Kukic P, Camilloni C, Fuxreiter M, Dosztanyi Z, Pappu RV, Babu MM, Longhi S, Tompa P, Dunker AK, Uversky VN, Tosatto SCE, Vendruscolo M. Simultaneous quantification of protein order and disorder. *Nat Chem Biol.* 2017;13(4):339–42. doi:10.1038/nchembio.2331 Cited in: PubMed; PMID 28328918.
118. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, Beer TAP de, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303. doi:10.1093/nar/gky427 Cited in: PubMed; PMID 29788355.
119. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Web Server issue):W174-81. doi:10.1093/nar/gkv342 Cited in: PubMed; PMID 25883148.

120. Klose DP, Wallace BA, Janes RW. 2Struc: the secondary structure server. *Bioinformatics*. 2010;26(20):2624–5. doi:10.1093/bioinformatics/btq480 Cited in: PubMed; PMID 20739308.
121. PyMOL Molecular Graphics System: Schrödinger, LLC.
122. Haddad Y, Adam V, Heger Z. Rotamer Dynamics: Analysis of Rotamers in Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *Biophys J*. 2019;116(11):2062–72. doi:10.1016/j.bpj.2019.04.017 Cited in: PubMed; PMID 31084902.
123. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D439–D444. doi:10.1093/nar/gkab1061 Cited in: PubMed; PMID 34791371.
124. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583–9. doi:10.1038/s41586-021-03819-2 Cited in: PubMed; PMID 34265844.
125. Fairbrother WJ, Champe MA, Christinger HW, Keyt BA, Starovasnik MA. Solution structure of the heparin-binding domain of vascular endothelial growth factor. *Structure*. 1998;6(5):637–48. doi:10.1016/s0969-2126(98)00065-3 Cited in: PubMed; PMID 9634701.
126. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(13):7788–95. doi:10.1074/jbc.271.13.7788 Cited in: PubMed; PMID 8631822.
127. McMurray JC, Schornack BJ, Weskamp AL, Park KJ, Pollock JD, Day WG, Brockshus AT, Beakes DE, Schwartz DJ, Mikita CP, Pittman LM. Immunodeficiency: Complement disorders. *Allergy Asthma Proc*. 2024;45(5):305–9. doi:10.2500/aap.2024.45.240050 Cited in: PubMed; PMID 39294906.
128. Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Møller-Kristensen M, Sørensen R, Jensen LT, Sjøholm AG, Fugger L, Jensenius JC. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med*. 2003;349(6):554–60. doi:10.1056/NEJMoa022836 Cited in: PubMed; PMID 12904520.
129. Thiel S, Kolev M, Degn S, Steffensen R, Hansen AG, Ruseva M, Jensenius JC. Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. *J Immunol*. 2009;182(5):2939–47. doi:10.4049/jimmunol.0802053 Cited in: PubMed; PMID 19234189.
130. Sokolowska A, Szala A, St Swierzko A, Kozinska M, Niemiec T, Blachnio M, Augustynowicz-Kopec E, Dziadek J, Cedzynski M. Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) deficiency in two patients with pulmonary tuberculosis and one healthy control. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(1):119–21. doi:10.1038/cmi.2014.19 Cited in: PubMed; PMID 24658431.
131. García-Laorden MI, García-Saavedra A, Castro FR de, Violán JS, Rajas O, Blanquer J, Borderías L, Rodríguez-Gallego C. Low clinical penetrance of mannose-binding lectin-associated serine protease 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(6):1383–6. doi:10.1016/j.jaci.2006.08.004 Cited in: PubMed; PMID 17137870.
132. Olszowski T, Poziomkowska-Gęsicka I, Jensenius JC, Adler G. Lectin pathway of complement activation in a Polish woman with MASP-2 deficiency. *Immunobiology*. 2014;219(4):261–2. doi:10.1016/j.imbio.2013.10.009 Cited in: PubMed; PMID 24332888.

133. Eberhardt HU, Buhlmann D, Hortschansky P, Chen Q, Böhm S, Kemper MJ, Wallich R, Hartmann A, Hallström T, Zipfel PF, Skerka C. Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation. *PLoS One*. 2013;8(11):e78617. doi:10.1371/journal.pone.0078617 Cited in: PubMed; PMID 24260121.
134. Kurosaki T, Popp MW, Maquat LE. Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(7):406–20. doi:10.1038/s41580-019-0126-2 Cited in: PubMed; PMID 30992545.
135. Losson R, Lacroute F. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(10):5134–7. doi:10.1073/pnas.76.10.5134 Cited in: PubMed; PMID 388431.
136. Lindeboom RG, Supek F, Lehner B. The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers. *Nat Genet*. 2016;48(10):1112–8. doi:10.1038/ng.3664 Cited in: PubMed; PMID 27618451.
137. van Beek AE, Pouw RB, Brouwer MC, van Mierlo G, Geissler J, Ooijevaar-de Heer P, Boer M de, van Leeuwen K, Rispens T, Wouters D, Kuijpers TW. Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and Heterodimers, while FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma. *Front Immunol*. 2017;8:1328. doi:10.3389/fimmu.2017.01328 Cited in: PubMed; PMID 29093712.
138. Hadders MA, Beringer DX, Gros P. Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science*. 2007;317(5844):1552–4. doi:10.1126/science.1147103 Cited in: PubMed; PMID 17872444.
139. Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol*. 2004;11(2-3):377–94. doi:10.1089/1066527041410418 Cited in: PubMed; PMID 15285897.
140. Forneris F, Ricklin D, Wu J, Tzekou A, Wallace RS, Lambris JD, Gros P. Structures of C3b in Complex with Factors B and D Give Insight into Complement Convertase Formation. *Science*. 2010;330(6012):1816–20. doi:10.1126/science.1195821 Cited in: PubMed; PMID 21205667.
141. Spasiano A, Palazzetti D, Dimartino L, Bruno F, Baccaro R, Pesce F, Grandaliano G. Underlying Genetics of aHUS: Which Connection with Outcome and Treatment Discontinuation? *Int J Mol Sci*. 2023;24(19). doi:10.3390/ijms241914496 Cited in: PubMed; PMID 37833944.
142. Gregory LA, Thielens NM, Matsushita M, Sorensen R, Arlaud GJ, Fontecilla-Camps JC, Gaboriaud C. The X-ray structure of human mannan-binding lectin-associated protein 19 (MAp19) and its interaction site with mannan-binding lectin and L-ficolin. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(28):29391–7. doi:10.1074/JBC.M402687200 Cited in: PubMed; PMID 15117939.
143. DiScipio RG, Berlin C. The architectural transition of human complement component C9 to poly(C9). *Mol Immunol*. 1999;36(9):575–85. doi:10.1016/S0161-5890(99)00073-5 Cited in: PubMed; PMID 10499811.
144. Dudkina NV, Spicer BA, Reboul CF, Conroy PJ, Lukyanova N, Elmlund H, Law RHP, Ekkel SM, Kondos SC, Goode RJA, Ramm G, Whisstock JC, Saibil HR, Dunstone MA. Structure of the poly-C9 component of the complement membrane attack complex. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms10588 Cited in: PubMed; PMID 26841934.
145. Bhattacharya AA, Lupher ML, Staunton DE, Liddington RC. Crystal structure of the A domain from complement factor B reveals an integrin-like open conformation. *Structure*. 2004;12(3):371–8. doi:10.1016/j.str.2004.02.012 Cited in: PubMed; PMID 15016353.
146. Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell*. 2000;101(1):47–56. doi:10.1016/S0092-8674(00)80622-4 Cited in: PubMed; PMID 10778855.
147. Cheng J, Randall AZ, Sweredoski MJ, Baldi P. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Web Server issue):W72–6. doi:10.1093/nar/gki396 Cited in: PubMed; PMID 15980571.

148. Ko J, Park H, Heo L, Seok C. GalaxyWEB server for protein structure prediction and refinement. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W294-7. doi:10.1093/nar/gks493 Cited in: PubMed; PMID 22649060.
149. Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, Dauparas J, Ovchinnikov S, Lee GR, Wang J, Cong Q, Kinch LN, Schaeffer RD, Millán C, Park H, Adams C, Glassman CR, DeGiovanni A, Pereira JH, Rodrigues AV, van Dijk AA, Ebrecht AC, Opperman DJ, Sagmeister T, Buhlheller C, Pavkov-Keller T, Rathinaswamy MK, Dalwadi U, Yip CK, Burke JE, Garcia KC, Grishin NV, Adams PD, Read RJ, Baker D. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science.* 2021;373(6557):871-6. doi:10.1126/science.abj8754 Cited in: PubMed; PMID 34282049.
150. Kucukkal TG, Petukh M, Li L, Alexov E. Structural and Physico-Chemical Effects of Disease and Non-Disease nsSNPs on Proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2015;3218-24. doi:10.1016/j.sbi.2015.01.003 Cited in: PubMed; PMID 25658850.
151. Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J Mol Biol.* 1984;179(1):125-42. doi:10.1016/0022-2836(84)90309-7 Cited in: PubMed; PMID 6502707.
152. Bulaj G, Goldenberg DP. Mutational analysis of hydrogen bonding residues in the BPTI folding pathway. *J Mol Biol.* 2001;313(3):639-56. doi:10.1006/jmbi.2001.5046 Cited in: PubMed; PMID 11676545.
153. Pace CN, Shirley BA, McNutt M, Gajiwala K. Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.* 1996;10(1):75-83. doi:10.1096/fasebj.10.1.8566551 Cited in: PubMed; PMID 8566551.
154. Rodrigues CH, Pires DE, Ascher DB. DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W350-W355. doi:10.1093/nar/gky300 Cited in: PubMed; PMID 29718330.
155. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I-W, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* 2007;315(5811):525-8. doi:10.1126/science.1135308 Cited in: PubMed; PMID 17185560.
156. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(10):683-91. doi:10.1038/nrg3051 Cited in: PubMed; PMID 21878961.
157. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet.* 1992;90(1-2):41-54. doi:10.1007/BF00210743 Cited in: PubMed; PMID 1427786.
158. Sun H, Chasin LA. Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol Cell Biol.* 2000;20(17):6414-25. doi:10.1128/mcb.20.17.6414-6425.2000 Cited in: PubMed; PMID 10938119.
159. Homolova K, Zavadakova P, Doktor TK, Schroeder LD, Kozich V, Andresen BS. The deep intronic c.903+469TC mutation in the MTRR gene creates an SF2/ASF binding exonic splicing enhancer, which leads to pseudoexon activation and causes the cblE type of homocystinuria. *Hum Mutat.* 2010;31(4):437-44. doi:10.1002/humu.21206 Cited in: PubMed; PMID 20120036.
160. King K, Flinter FA, Nihalani V, Green PM. Unusual deep intronic mutations in the COL4A5 gene cause X linked Alport syndrome. *Hum Genet.* 2002;111(6):548-54. doi:10.1007/s00439-002-0830-3 Cited in: PubMed; PMID 12436246.
161. Davis RL, Homer VM, George PM, Brennan SO. A deep intronic mutation in FGB creates a consensus exonic splicing enhancer motif that results in afibrinogenemia caused by aberrant mRNA splicing, which can be corrected in vitro with antisense oligonucleotide treatment. *Hum Mutat.* 2009;30(2):221-7. doi:10.1002/humu.20839 Cited in: PubMed; PMID 18853456.
162. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian

- cancer in ten families. *Nat Genet.* 1994;8(4):399–404. doi:10.1038/ng1294-399 Cited in: PubMed; PMID 7894493.
163. Weisschuh N, Buena-Atienza E, Wissinger B. Splicing mutations in inherited retinal diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2021;80:100874. doi:10.1016/j.preteyeres.2020.100874 Cited in: PubMed; PMID 32553897.
 164. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(5):860–71. doi:10.1016/j.bbapap.2009.02.014 Cited in: PubMed; PMID 19285158.
 165. Tsai C-J, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM, Nussinov R. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *J Mol Biol.* 2008;383(2):281–91. doi:10.1016/j.jmb.2008.08.012 Cited in: PubMed; PMID 18722384.
 166. Abdelgalil AA, Monir R, Elmetwally M, Ghattas MH, Bazeed FB, Mesbah NM, Abo-Elmatty DM, Mehanna ET. The Relation of VEGFA, VEGFR2, VEGI, and HIF1A Genetic Variants and Their Serum Protein Levels with Breast Cancer in Egyptian Patients. *Biochem Genet.* 2024;62(1):547–73. doi:10.1007/s10528-023-10419-4 Cited in: PubMed; PMID 37392242.
 167. Choudhuri S, Chowdhury IH, Das S, Dutta D, Saha A, Sarkar R, Mandal LK, Mukherjee S, Bhattacharya B. Role of NF- κ B activation and VEGF gene polymorphisms in VEGF up regulation in non-proliferative and proliferative diabetic retinopathy. *Mol Cell Biochem.* 2015;405(1-2):265–79. doi:10.1007/s11010-015-2417-z Cited in: PubMed; PMID 25956512.
 168. Gray NK, Wickens M. Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:399–458. doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.399 Cited in: PubMed; PMID 9891789.
 169. Awata T, Kurihara S, Takata N, Neda T, Iizuka H, Ohkubo T, Osaki M, Watanabe M, Nakashima Y, Inukai K, Inoue I, Kawasaki I, Mori K, Yoneya S, Katayama S. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(3):679–85. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.167 Cited in: PubMed; PMID 15963467.
 170. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003;34(4):383–94. doi:10.1038/ng1211 Cited in: PubMed; PMID 12847526.
 171. Chionh F, Gebiski V, Al-Obaidi SJ, Mooi JK, Bruhn MA, Lee CK, Chüh AC, Williams DS, Weickhardt AJ, Wilson K, Scott AM, Simes J, Hardingham JE, Price TJ, Mariadason JM, Tebbutt NC. VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 single nucleotide polymorphisms and outcomes from the AGITG MAX trial of capecitabine, bevacizumab and mitomycin C in metastatic colorectal cancer. *Sci Rep.* 2022;12(1):1238. doi:10.1038/s41598-021-03952-y Cited in: PubMed; PMID 35075138.
 172. Sellami N, Lamine LB, Turki A, Sarray S, Jailani M, Al-Ansari AK, Ghorbel M, Mahjoub T, Almawi WY. Association of VEGFA variants with altered VEGF secretion and type 2 diabetes: A case-control study. *Cytokine.* 2018;106:29–34. doi:10.1016/j.cyto.2018.03.003 Cited in: PubMed; PMID 29533820.
 173. Ruggiero D, Dalmaso C, Natile T, Sorice R, Dionisi L, Aversano M, Bröet P, Leutenegger A-L, Bourgain C, Ciullo M. Genetics of VEGF serum variation in human isolated populations of cileto: importance of VEGF polymorphisms. *PLoS One.* 2011;6(2):e16982. doi:10.1371/journal.pone.0016982 Cited in: PubMed; PMID 21347390.

174. Wang J, Shete S. Testing Departure from Hardy-Weinberg Proportions. *Methods Mol Biol.* 2017;166683–115. doi:10.1007/978-1-4939-7274-6_6 Cited in: PubMed; PMID 28980243.
175. Suganthalakshmi B, Anand R, Kim R, Mahalakshmi R, Karthikprakash S, Namperumalsamy P, Sundaresan P. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2006;12336–41. Cited in: PubMed; PMID 16636650.
176. Yang Q, Zhang Y, Zhang X, Li X, Liu J. Association of VEGF Gene Polymorphisms with Susceptibility to Diabetic Retinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Horm Metab Res.* 2020;52(5):264–79. doi:10.1055/a-1143-6024 Cited in: PubMed; PMID 32403142.
177. Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE. A Systematic Meta-Analysis of Genetic Association Studies for Diabetic Retinopathy. *Diabetes.* 2009;58(9):2137–47. doi:10.2337/db09-0059 Cited in: PubMed; PMID 19587357.
178. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(5):1635–9. doi:10.2337/diabetes.51.5.1635 Cited in: PubMed; PMID 11978667.
179. Blázquez-Martínez D, Díaz-Villamarín X, Antúnez-Rodríguez A, Pozo-Agundo A, Muñoz-Ávila JI, Martínez-González LJ, Dávila-Fajardo CL. Genetic Polymorphisms Affecting Ranibizumab Response in High Myopia Patients. *Pharmaceutics.* 2021;13(11). doi:10.3390/pharmaceutics13111973 Cited in: PubMed; PMID 34834388.
180. Breuk A de, Acar IE, Kersten E, Schijvenaars MMVAP, Colijn JM, Haer-Wigman L, Bakker B, Jong S de, Meester-Smoor MA, Verzijden T, Missotten TOAR, Monés J, Biarnés M, Pauleikhoff D, Hense HW, Silva R, Nunes S, Melo JB, Fauser S, Hoyng CB, Ueffing M, Coenen MJH, Klaver CCW, Hollander AI den. Development of a Genotype Assay for Age-Related Macular Degeneration: The EYE-RISK Consortium. *Ophthalmology.* 2021;128(11):1604–17. doi:10.1016/j.ophtha.2020.07.037 Cited in: PubMed; PMID 32717343.
181. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(2):328–35. doi:10.1016/j.bbrc.2005.05.132 Cited in: PubMed; PMID 15961063.
182. Formica V, Palmirotta R, Del Monte G, Savonarola A, Ludovici G, Marchis ML de, Grenga I, Schirru M, Guadagni F, Roselli M. Predictive value of VEGF gene polymorphisms for metastatic colorectal cancer patients receiving first-line treatment including fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab. *Int J Colorectal Dis.* 2011;26(2):143–51. doi:10.1007/s00384-010-1108-1 Cited in: PubMed; PMID 21188390.
183. Loupakis F, Ruzzo A, Salvatore L, Cremolini C, Masi G, Frumento P, Schirripa M, Catalano V, Galluccio N, Canestrari E, Vincenzi B, Santini D, Bencardino K, Ricci V, Manzoni M, Danova M, Tonini G, Magnani M, Falcone A, Graziano F. Retrospective exploratory analysis of VEGF polymorphisms in the prediction of benefit from first-line FOLFIRI plus bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2011;11247. doi:10.1186/1471-2407-11-247 Cited in: PubMed; PMID 21669012.
184. Ulivi P, Scarpi E, Passardi A, Marisi G, Calistri D, Zoli W, Del Re M, Frassinetti GL, Tassinari D, Tamperi S, Vertogen B, Amadori D. eNOS polymorphisms as predictors of efficacy of bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer: data from a randomized clinical trial. *J Transl Med.* 2015;13258. doi:10.1186/s12967-015-0619-5 Cited in: PubMed; PMID 26259598.
185. Scartozzi M, Faloppi L, Svegliati Baroni G, Loretelli C, Piscaglia F, Iavarone M, Toniutto P, Fava G, Minicis S de, Mandolesi A, Bianconi M, Giampieri R, Granito A, Facchetti F, Bitetto D, Marinelli S, Venerandi L, Vavassori S, Gemini S, D'Errico A, Colombo M, Bolondi L, Bearzi I, Benedetti A, Cascinu S. VEGF and VEGFR genotyping in the prediction of clinical outcome for HCC patients receiving sorafenib: the ALICE-1 study. *Int*

- J Cancer. 2014;135(5):1247–56. doi:10.1002/ijc.28772 Cited in: PubMed; PMID 24510746.
186. Bécouarn Y, Cany L, Pulido M, Beyssac R, Texereau P, Le Morvan V, Béchade D, Brunet R, Aitouferoukh S, Lalet C, Mathoulin-Pélissier S, Fonck M, Robert J. FOLFIRI® and bevacizumab in first-line treatment for colorectal cancer patients: safety, efficacy and genetic polymorphisms. *BMC Res Notes*. 2014;7260. doi:10.1186/1756-0500-7-260 Cited in: PubMed; PMID 24758527.
 187. Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug Des Devel Ther*. 2016;101857–67. doi:10.2147/DDDT.S97653 Cited in: PubMed; PMID 27330279.
 188. Lotery AJ, Gibson J, Cree AJ, Downes SM, Harding SP, Rogers CA, Reeves BC, Ennis S, Chakravarthy U. Pharmacogenetic associations with vascular endothelial growth factor inhibition in participants with neovascular age-related macular degeneration in the IVAN Study. *Ophthalmology*. 2013;120(12):2637–43. doi:10.1016/j.ophtha.2013.07.046 Cited in: PubMed; PMID 24070809.
 189. Brantley MA, Fang AM, King JM, Tewari A, Kymes SM, Shiels A. Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to intravitreal bevacizumab. *Ophthalmology*. 2007;114(12):2168–73. doi:10.1016/j.ophtha.2007.09.008 Cited in: PubMed; PMID 18054635.
 190. Chen H, Yu K-D, Xu G-Z. Association between variant Y402H in age-related macular degeneration (AMD) susceptibility gene CFH and treatment response of AMD: a meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(8):e42464. doi:10.1371/journal.pone.0042464 Cited in: PubMed; PMID 22905135.
 191. Hong N, Shen Y, Yu C-Y, Wang S-Q, Tong J-P. Association of the polymorphism Y402H in the CFH gene with response to anti-VEGF treatment in age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Acta Ophthalmol*. 2016;94(4):334–45. doi:10.1111/aos.13049 Cited in: PubMed; PMID 27151934.
 192. Park UC, Shin JY, Kim SJ, Shin ES, Lee JE, McCarthy LC, Newcombe PJ, Xu C-F, Chung H, Yu HG. Genetic factors associated with response to intravitreal ranibizumab in Korean patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina*. 2014;34(2):288–97. doi:10.1097/IAE.0b013e3182979e1e Cited in: PubMed; PMID 23842101.
 193. Cruz-Gonzalez F, Cabrillo-Estévez L, López-Valverde G, Cieza-Borrella C, Hernández-Galilea E, González-Sarmiento R. Predictive value of VEGF A and VEGFR2 polymorphisms in the response to intravitreal ranibizumab treatment for wet AMD. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252(3):469–75. doi:10.1007/s00417-014-2585-7 Cited in: PubMed; PMID 24522370.
 194. Nudleman E, Wolfe JD, Woodward MA, Yonekawa Y, Williams GA, Hassan TS. Worsening anatomic outcomes following aflibercept for neovascular age-related macular degeneration in eyes previously well controlled with ranibizumab. *Clin Ophthalmol*. 2016;101053–7. doi:10.2147/OPHTH.S109894 Cited in: PubMed; PMID 27354759.
 195. Lambert NG, ElShelmani H, Singh MK, Mansergh FC, Wride MA, Padilla M, Keegan D, Hogg RE, Ambati BK. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2016;5464–102. doi:10.1016/j.preteyeres.2016.04.003 Cited in: PubMed; PMID 27156982.
 196. Lorés-Motta L, Paun CC, Corominas J, Pauper M, Geerlings MJ, Altay L, Schick T, Dahan MR, Fauser S, Hoyng CB, Hollander AI den, Jong EK de. Genome-Wide Association Study Reveals Variants in CFH and CFHR4 Associated with Systemic Complement Activation: Implications in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2018;125(7):1064–74. doi:10.1016/j.ophtha.2017.12.023 Cited in: PubMed; PMID 29398083.
 197. Kitchens JW, Kassem N, Wood W, Stone TW, Isernhagen R, Wood E, Hancock BA, Radovich M, Waymire J, Li L, Schneider BP. A pharmacogenetics study to predict

- outcome in patients receiving anti-VEGF therapy in age related macular degeneration. *Clin Ophthalmol.* 2013;7:1987–93. doi:10.2147/OPHTH.S39635 Cited in: PubMed; PMID 24143065.
198. Derveniz N, Derveniz P, Agorogiannis E. Neovascular age-related macular degeneration: disease pathogenesis and current state of molecular biomarkers predicting treatment response-a scoping review. *BMJ Open Ophthalmol.* 2024;9(1). doi:10.1136/bmjophth-2023-001516 Cited in: PubMed; PMID 38341189.
 199. Thielens NM, Cseh S, Thiel S, Vorup-Jensen T, Rossi V, Jensenius JC, Arlaud GJ. Interaction properties of human mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases-1 and -2, MBL-associated protein 19, and MBL. *J Immunol.* 2001;166(8):5068–77. doi:10.4049/jimmunol.166.8.5068 Cited in: PubMed; PMID 11290788.
 200. Wallis R, Dodd RB. Interaction of mannose-binding protein with associated serine proteases: effects of naturally occurring mutations. *J Biol Chem.* 2000;275(40):30962–9. doi:10.1074/jbc.M004030200 Cited in: PubMed; PMID 10913141.
 201. Chen CB, Wallis R. Stoichiometry of complexes between mannose-binding protein and its associated serine proteases. Defining functional units for complement activation. *J Biol Chem.* 2001;276(28):25894–902. doi:10.1074/jbc.M103539200 Cited in: PubMed; PMID 11337510.
 202. St Swierzko A, Cedzynski M, Domzalska-Popadiuk I, MacDonald SL, Borkowska-Klos M, Atkinson APM, Szala A, Jopek A, Jensenius JC, Kawakami M, Szczapa J, Matsushita M, Szemraj J, Turner ML, Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) in a large cohort of neonates and its clinical associations. *Mol Immunol.* 2009;46(8-9):1696–701. doi:10.1016/j.molimm.2009.02.022 Cited in: PubMed; PMID 19307021.
 203. Thiel S, Steffensen R, Christensen IJ, Ip WK, Lau YL, Reason IJM, Eiberg H, Gadjeva M, Ruseva M, Jensenius JC. Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun.* 2007;8(2):154–63. doi:10.1038/sj.gene.6364373 Cited in: PubMed; PMID 17252003.
 204. Omori T, Oguchi Y, Machida T, Kato Y, Ishida Y, Ojima A, Itagaki K, Shintake H, Tomita R, Kasai A, Sugano Y, Ogasawara M, Sekine H, Sekiryu T. Evidence for Activation of Lectin and Classical Pathway Complement Components in Aqueous Humor of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Res.* 2020;63(3):252–8. doi:10.1159/000503258 Cited in: PubMed; PMID 31645047.
 205. Rodriguez de Cordoba S, Lublin DM, Rubinstein P, Atkinson JP. Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *J Exp Med.* 1985;161(5):1189–95. doi:10.1084/jem.161.5.1189 Cited in: PubMed; PMID 3157763.
 206. Cantsilieris S, Nelson BJ, Huddleston J, Baker C, Harshman L, Penewit K, Munson KM, Sorensen M, Welch AE, Dang V, Grassmann F, Richardson AJ, Guymer RH, Graves-Lindsay TA, Wilson RK, Weber BHF, Baird PN, Allikmets R, Eichler EE. Recurrent structural variation, clustered sites of selection, and disease risk for the complement factor H (CFH) gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(19):E4433–E4442. doi:10.1073/pnas.1717600115 Cited in: PubMed; PMID 29686068.
 207. Ripoche J, Day AJ, Harris TJ, Sim RB. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem J.* 1988;249(2):593–602. doi:10.1042/bj2490593 Cited in: PubMed; PMID 2963625.
 208. Cserhalmi M, Papp A, Brandus B, Uzonyi B, Józsi M. Regulation of regulators: Role of the complement factor H-related proteins. *Semin Immunol.* 2019;45:101341. doi:10.1016/j.smim.2019.101341 Cited in: PubMed; PMID 31757608.
 209. Lemaire M, Noone D, Lapeyraque A-L, Licht C, Frémeaux-Bacchi V. Inherited Kidney Complement Diseases. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021;16(6):942–56. doi:10.2215/CJN.11830720 Cited in: PubMed; PMID 33536243.
 210. Zipfel PF, Wiech T, Stea ED, Skerka C. CFHR Gene Variations Provide Insights in the Pathogenesis of the Kidney Diseases Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3

- Glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(2):241–56. doi:10.1681/ASN.2019050515 Cited in: PubMed; PMID 31980588.
211. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*. 2005;1(6):e49. doi:10.1371/journal.pgen.0010049 Cited in: PubMed; PMID 16444292.
 212. Geerlings MJ. Studies of rare genetic variants in age-related macular degeneration [Dissertation]: Radboud University; 2018. Available from: <https://hdl.handle.net/2066/182799>
 213. Kremlitzka M, Geerlings MJ, Jong S de, Bakker B, Nilsson SC, Fauser S, Hoyng CB, Jong EK de, Hollander AI den, Blom AM. Functional analyses of rare genetic variants in complement component C9 identified in patients with age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2018;27(15):2678–88. doi:10.1093/hmg/ddy178 Cited in: PubMed; PMID 29767720.
 214. McMahon O, Hallam TM, Patel S, Harris CL, Menny A, Zelek WM, Widjajahakim R, Java A, Cox TE, Tzoumas N, Steel DHW, Shuttleworth VG, Smith-Jackson K, Brocklebank V, Griffiths H, Cree AJ, Atkinson JP, Lotery AJ, Bubeck D, Morgan BP, Marchbank KJ, Seddon JM, Kavanagh D. The rare C9 P167S risk variant for age-related macular degeneration increases polymerization of the terminal component of the complement cascade. *Hum Mol Genet*. 2021;30(13):1188–99. doi:10.1093/hmg/ddab086 Cited in: PubMed; PMID 33783477.
 215. Saksens NTM, Geerlings MJ, Bakker B, Schick T, Daha MR, Fauser S, Boon CJF, Jong EK de, Hoyng CB, Hollander AI den. Rare Genetic Variants Associated With Development of Age-Related Macular Degeneration. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134(3):287–93. doi:10.1001/jamaophthalmol.2015.5592 Cited in: PubMed; PMID 26767664.
 216. McKay GJ, Silvestri G, Patterson CC, Hogg RE, Chakravarthy U, Hughes AE. Further assessment of the complement component 2 and factor B region associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(2):533–9. doi:10.1167/iovs.08-2275 Cited in: PubMed; PMID 18806297.
 217. Liu K, Chen LJ, Tam POS, Shi Y, Lai TYY, Liu DTL, Chiang SWY, Yang M, Yang Z, Pang CP. Associations of the C2-CFB-RDBP-SKIV2L locus with age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmology*. 2013;120(4):837–43. doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.003 Cited in: PubMed; PMID 23260260.
 218. Nakata I, Yamashiro K, Yamada R, Gotoh N, Nakanishi H, Hayashi H, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Otani A, Saito M, Iida T, Oishi A, Matsuo K, Tajima K, Matsuda F, Yoshimura N. Significance of C2/CFB variants in age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in a Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(2):794–8. doi:10.1167/iovs.11-8468 Cited in: PubMed; PMID 22232432.
 219. Neto JM, Vitorino MG, Ananina G, Bajano FF, Da Costa SMS, Roque AB, Borges GF, Franchi R, Rim PH, Medina FM, Costa FF, Melo MB de, Vasconcellos JP de. Association of genetic variants rs641153 (CFB), rs2230199 (C3), and rs1410996 (CFH) with age-related macular degeneration in a Brazilian population. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021;246(21):2290–6. doi:10.1177/15353702211024543 Cited in: PubMed; PMID 34233521.
 220. Kaur I, Katta S, Reddy RK, Narayanan R, Mathai A, Majji AB, Chakrabarti S. The involvement of complement factor B and complement component C2 in an Indian cohort with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(1):59–63. doi:10.1167/iovs.09-4135 Cited in: PubMed; PMID 19696172.
 221. Lokki ML, Koskimies SA. Allelic differences in hemolytic activity and protein concentration of BF molecules are found in association with particular HLA haplotypes. *Immunogenetics*. 1991;34(4):242–6. doi:10.1007/BF00215259 Cited in: PubMed; PMID 1916952.

222. Gourgouli K, Gourgouli I, Tsaousis G, Spai S, Niskopoulou M, Efthimiopoulos S, Lamnissou K. Investigation of genetic base in the treatment of age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol*. 2020;40(4):985–97. doi:10.1007/s10792-019-01274-7 Cited in: PubMed; PMID 31916060.
223. Baas DC, Ho L, Ennis S, Merriam JE, Tanck MWT, Uitterlinden AG, Jong PTVM de, Cree AJ, Griffiths HL, Rivadeneira F, Hofman A, van Duijn C, Smith RT, Barile GR, Gorgels TGMF, Vingerling JR, Klaver CCW, Lotery AJ, Allikmets R, Bergen AAB. The complement component 5 gene and age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2010;117(3):500–11. doi:10.1016/j.ophtha.2009.08.032 Cited in: PubMed; PMID 20022638.
224. Liu K, Ma L, Lai TYY, Brelen ME, Tam POS, Tham CC, Pang CP, Chen LJ. Evaluation of the association of C5 with neovascular age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy. *Eye Vis (Lond)*. 2019;634. doi:10.1186/s40662-019-0161-2 Cited in: PubMed; PMID 31720301.
225. Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J*. 2000;14(7):835–46. Cited in: PubMed; PMID 10783137.
226. Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2328–33. doi:10.1073/pnas.0408835103 Cited in: PubMed; PMID 16452172.
227. Reynolds R, Hartnett ME, Atkinson JP, Giclas PC, Rosner B, Seddon JM. Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(12):5818–27. doi:10.1167/iovs.09-3928 Cited in: PubMed; PMID 19661236.
228. Scholl HPN, Charbel Issa P, Walier M, Janzer S, Pollok-Kopp B, Börncke F, Fritsche LG, Chong NV, Fimmers R, Wienker T, Holz FG, Weber BHF, Oppermann M. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2008;3(7):e2593. doi:10.1371/journal.pone.0002593 Cited in: PubMed; PMID 18596911.
229. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
230. Fan Y, Li L-H, Pan H-F, Tao J-H, Sun Z-Q, Ye D-Q. Association of ITGAM polymorphism with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25(3):271–5. doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03776.x Cited in: PubMed; PMID 20629846.
231. Nath SK, Han S, Kim-Howard X, Kelly JA, Viswanathan P, Gilkeson GS, Chen W, Zhu C, McEver RP, Kimberly RP, Alarcón-Riquelme ME, Vyse TJ, Li Q-Z, Wakeland EK, Merrill JT, James JA, Kaufman KM, Guthridge JM, Harley JB. A nonsynonymous functional variant in integrin- α (M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008;40(2):152–4. doi:10.1038/ng.71 Cited in: PubMed; PMID 18204448.
232. MacPherson M, Lek HS, Prescott A, Fagerholm SC. A systemic lupus erythematosus-associated R77H substitution in the CD11b chain of the Mac-1 integrin compromises leukocyte adhesion and phagocytosis. *J Biol Chem*. 2011;286(19):17303–10. doi:10.1074/jbc.M110.182998 Cited in: PubMed; PMID 21454473.
233. Subhi Y, Krogh Nielsen M, Molbech CR, Krüger Falk M, Singh A, Hviid TVF, Nissen MH, Sørensen TL. Association of CD11b+ Monocytes and Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Injections in Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *JAMA Ophthalmol*. 2019;137(5):515–22. doi:10.1001/jamaophthalmol.2019.0010 Cited in: PubMed; PMID 30844038.
234. Subhi Y, Krogh Nielsen M, Molbech CR, Oishi A, Singh A, Nissen MH, Sørensen TL. CD11b and CD200 on Circulating Monocytes Differentiate Two Angiographic Subtypes of

- Polypoidal Choroidal Vasculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(12):5242–50. doi:10.1167/iov.17-22479 Cited in: PubMed; PMID 29049725.
235. Heurich M, Martínez-Barricarte R, Francis NJ, Roberts DL, Rodríguez de Córdoba S, Morgan BP, Harris CL. Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(21):8761–6. doi:10.1073/pnas.1019338108 Cited in: PubMed; PMID 21555552.
 236. Guymer RH, Silva R, Ghadessi M, Leal S, Gashaw I, Damask A, Paulding C, Rittenhouse KD. ANO2 Genetic Variants and Anti-VEGF Treatment Response in Neovascular AMD: A Pharmacogenetic Substudy of VIEW 1 and VIEW 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2024;65(8):17. doi:10.1167/iov.65.8.17 Cited in: PubMed; PMID 38980270.
 237. Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, Seddon JM. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(9):1055–9. doi:10.1038/ng1873 Cited in: PubMed; PMID 16936732.
 238. Kozhevnikova OS, Fursova AZ, Derbeneva AS, Nikulich IF, Tarasov MS, Devyatkin VA, Rumyantseva YV, Telegina DV, Kolosova NG. Association between Polymorphisms in CFH, ARMS2, CFI, and C3 Genes and Response to Anti-VEGF Treatment in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Biomedicines.* 2022;10(7). doi:10.3390/biomedicines10071658 Cited in: PubMed; PMID 35884963.
 239. Kubicka-Trzaska A, Żuber-Łaskawiec K, Dziedzina S, Sanak M, Romanowska-Dixon B, Karska-Basta I. Genetic Variants of Complement Factor H Y402H (rs1061170), C2 R102G (rs2230199), and C3 E318D (rs9332739) and Response to Intravitreal Anti-VEGF Treatment in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Medicina (Kaunas).* 2022;58(5). doi:10.3390/medicina58050658 Cited in: PubMed; PMID 35630075.
 240. Zhao L, Grob S, Avery R, Kimura A, Pieramici D, Lee J, Rabena M, Ortiz S, Quach J, Cao G, Luo H, Zhang M, Pei M, Song Y, Tornambe P, Goldbaum M, Ferreyra H, Kozak I, Zhang K. Common variant in VEGFA and response to anti-VEGF therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Mol Med.* 2013;13(6):929–34. doi:10.2174/15665240113139990048 Cited in: PubMed; PMID 23745581.
 241. Boltz A, Rieß M, Jonas JB, Tao Y, Rensch F, Weger M, Garhöfer G, Frantal S, El-Shabrawi Y, Schmetterer L. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in the treatment success in patients with wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2012;119(8):1615–20. doi:10.1016/j.ophtha.2012.02.001 Cited in: PubMed; PMID 22521084.
 242. Strunz T, Pöllmann M, Gamulescu M-A, Tamm S, Weber BHF. Genetic Association Analysis of Anti-VEGF Treatment Response in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11). doi:10.3390/ijms23116094 Cited in: PubMed; PMID 35682771.
 243. Orlin A, Hadley D, Chang W, Ho AC, Brown G, Kaiser RS, Regillo CD, Godshalk AN, Lier A, Kaderli B, Stambolian D. Association between high-risk disease loci and response to anti-vascular endothelial growth factor treatment for wet age-related macular degeneration. *Retina.* 2012;32(1):4–9. doi:10.1097/IAE.0b013e31822a2c7c Cited in: PubMed; PMID 21878851.

7 Thesen

1. In dieser Studienpopulation deutet sich an, dass NM_003376.6:c.534C>T, p.Ser178= im *VEGFA*-Gen mit dem Risiko der Entwicklung einer AMD in einem Zusammenhang stehen könnte.
2. Zum Nachweis einer möglichen Assoziation der nachgewiesenen *VEGFA*-Varianten mit dem AMD-Risiko sind prospektive Studien mit größeren Fallzahlen nötig.
3. Es ergeben sich anhand dieser Studie keine eindeutigen Assoziationen der detektierten *VEGFA*-Varianten mit einem veränderten Therapieansprechen. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass ein Zusammenhang in einer größeren Kohorte nachweisbar wäre.
4. Kodierende Varianten in *VEGFA* wurden in dieser Studienpopulation nicht nachgewiesen. Andere, in dieser Studie nicht detektierte genetische Varianten im *VEGFA*-Gen oder Varianten in anderen Genen können sich auf das Therapieansprechen auswirken. Zudem ist es möglich, dass nicht-genetische Faktoren einen größeren Einfluss auf das Therapieansprechen aufweisen als genetische.
5. In dieser Arbeit wurde eine Komplettssequenzierung der kodierenden und flankierenden intronischen Abschnitte des *VEGFA*-Gens durchgeführt. Dieser Ansatz erlaubt die Detektion neuer und möglicherweise pharmakogenetisch relevanter Varianten und liefert eine wichtige Grundlage für zukünftige personalisierte pharmakogenetische Therapieansätze.
6. Das Komplementsystem steht im Zusammenhang mit der Pathogenese der AMD. Falls die in dieser Arbeit nachgewiesenen Varianten NM_006610:c.359A>G, p.Asp120Gly in *MASP2* und NM_005666:c.595G>T, p.Glu199Ter in *CFHR2* in größeren Kohorten eine Assoziation mit AMD aufweisen, könnte das zu einem besseren Verständnis der Bedeutung von *MASP2* und *CFHR2* für die Pathogenese der AMD beitragen.
7. Die Identifikation von Risikovarianten und -genen ist relevant für ein besseres Verständnis der AMD-Pathogenese und eine zukünftig individuellere Risikoeinschätzung und Behandlung.

Anhang

A MASP-2 p.Asp120Gly		111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
AA-Position		S	S	L	D	I	T	F	R	S	D/G	Y	S	N	E	K
Residuum		S	S	L	D	I	T	F	R	S	D/G	Y	S	N	E	K
UniProt		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120D PSIPRED		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120D Jpred4		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120D s2D		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120D SWISS-MODEL		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120D I-TASSER		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
Wildtyp																
120G PSIPRED		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120G Jpred4		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120G s2D		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120G SWISS-MODEL		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
120G I-TASSER		S	S	S	S	S	S	S	S	S						
Mutation																

B C3 p.Val845Met		839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854
AA-Position		V	V	R	N	E	Q	V/M	E	I	R	A	V	L	Y	N	Y
Residuum		V	V	R	N	E	Q	V/M	E	I	R	A	V	L	Y	N	Y
UniProt		S	S					S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845V PSIPRED		S	S				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845V Jpred4		S	S	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845V s2D		S	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845V SWISS-MODEL		S	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845V I-TASSER		S	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Wildtyp																	
845M PSIPRED		S	S				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845M Jpred4		S	S	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845M s2D		S	S				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845M SWISS-MODEL		S	S				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
845M I-TASSER		S	S	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Mutation																	

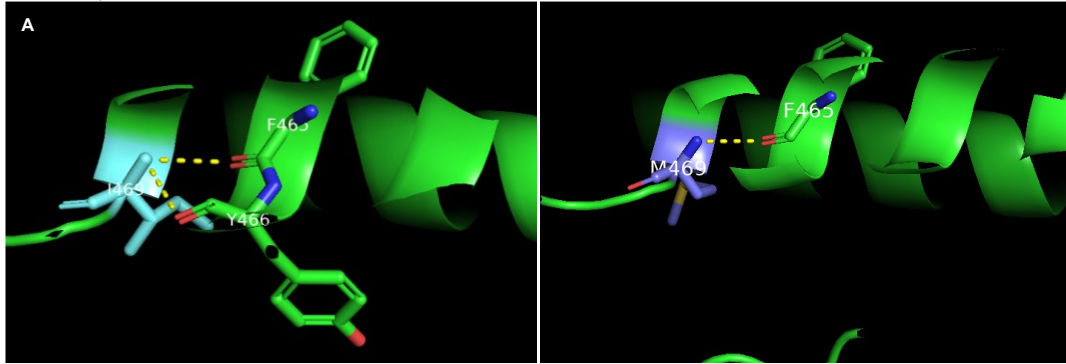
C C9 p.Ile476Thr		466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482
AA-Position		P	V	L	I	S	Q	K	L	S	P	I/T	Y	N	L	V	P	V
Residuum		P	V	L	I	S	Q	K	L	S	P	I/T	Y	N	L	V	P	V
UniProt		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H			S
476I PSIPRED		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H			
476I Jpred4		H	H	H	H	H	H		H	H	H	H	H	H	H	H		
476I s2D												H	H	H	H			
476I SWISS-MODEL		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H			
476I I-TASSER		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H			
Wildtyp																		
476T PSIPRED		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H			
476T Jpred4			H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H			
476T s2D												H	H	H	H			
476T SWISS-MODEL		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H			
476T I-TASSER					S	S	S	S	S	S	S	H	H	H	H			
Mutation																		

D C5 p.Arg766Gln		760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771
AA-Position		V	S	K	P	E	I	R/Q	S	Y	F	P	E
Residuum		V	S	K	P	E	I	R/Q	S	Y	F	P	E
UniProt						S	S	S					
766R PSIPRED													
766R Jpred4													
766R s2D													
766R SWISS-MODEL													
766R I-Tasser													
Wildtyp													
766Q PSIPRED													
766Q Jpred4													
766Q s2D													
766Q SWISS-MODEL													
766Q I-TASSER													
Mutation													

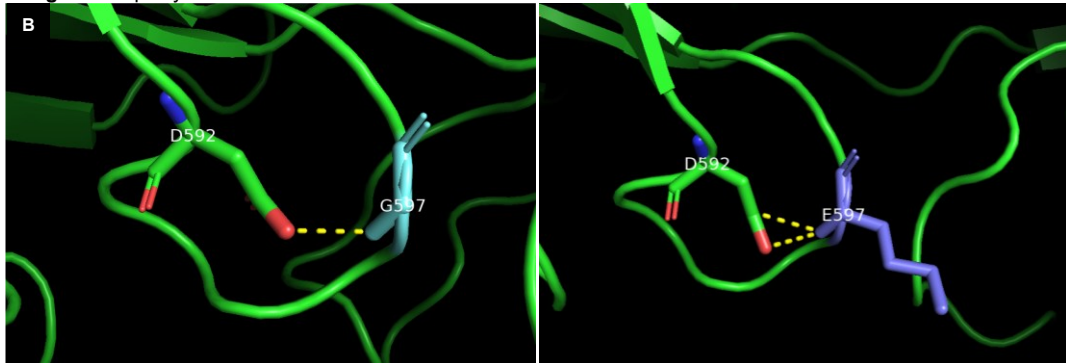
E Integrin α-M p.Gly597Glu		593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605
AA-Position		L	T	M	D	G/E	L	V	D	L	T	V	G	A
Residuum		L	T	M	D	G/E	L	V	D	L	T	V	G	A
UniProt		S	S	S	S	S			S	S	S	S	S	S
597G PSIPRED									S	S	S	S	S	
597G Jpred4									S	S	S	S	S	
597G s2D									S	S	S	S	S	
597G SWISS-MODEL									S	S	S	S	S	
597G I-TASSER									S	S	S	S	S	
Wildtyp														
597E PSIPRED									S	S	S	S	S	
597E Jpred4									S	S	S	S	S	
597E s2D									S	S	S	S	S	
597E SWISS-MODEL									S	S	S	S	S	
597E I-TASSER									S	S	S	S	S	
Mutation														

Anhang 1: **Ausschnitte der Sekundärstrukturanalysen von MASP-2, C3, C9, C5 und Integrin α-M.** (A) Asp120Gly befindet sich am Übergang eines β-Faltblattes in einen Random Coil. (B) Val845Met befindet sich in einem β-Faltblatt. (C) Ile476Thr liegt in einer α-Helix. (D), (E) Arg766Gln sowie Gly597Glu liegen in einem Random Coil. Es werden keine Änderungen der Sekundärstruktur durch die Aminosäuresubstitutionen prädiziert. S (gelb): β-Faltblatt; H (rot): α-Helix; weiß: Random Coil; grün markiert: Position der Variante.

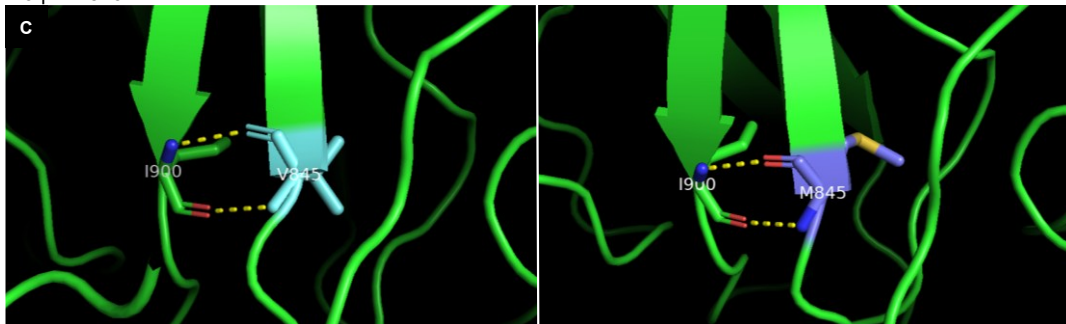
Faktor B p.Ile469Met



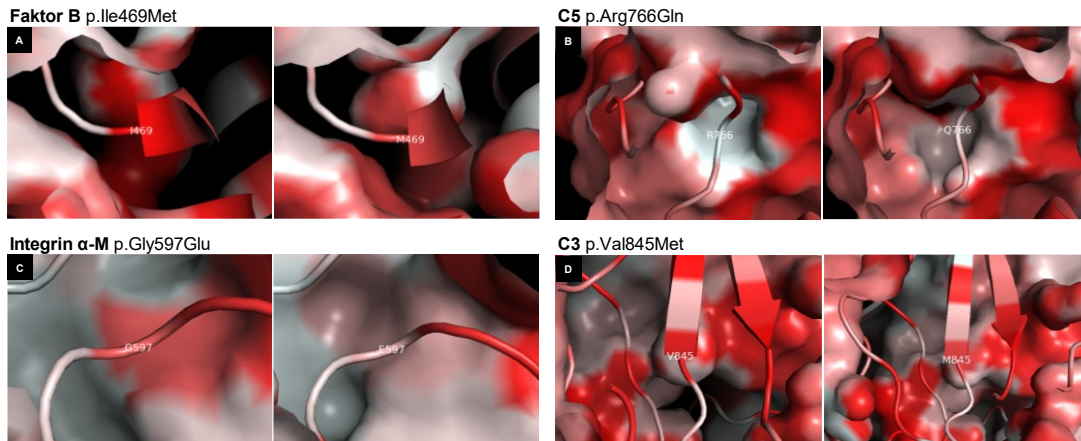
Integrin α -M p.Gly597Glu



C3 p.Val845Met



Anhang 2: **Ausschnitte aus der grafischen Darstellung von Faktor B, Integrin α -M und C3 im 3D-Modell.** **(A)** Isoleucin (hellblau eingefärbt) an Position 469 bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu Phe465 und Tyr466. Die Substitution Ile469Met könnte zum Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zu Tyr466 führen. **(B)** Durch den Austausch von Glycin gegen Glutaminsäure bildet sich eine zweite Wasserstoffbrückenbindung zu Asp592. **(C)** Val845Met wirkt sich nicht auf die Wasserstoffbrückenbindungen aus.



Anhang 3: **Darstellung der Hydrophobizität nach der normalisierten Eisenberg-Konsensusskala.** Je stärker die Rotfärbung, umso stärker ist die Hydrophobizität. **(A)** Die hydrophobe Aminosäure Isoleucin wird gegen die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Methionin ausgetauscht. **(B)** Durch den Austausch von Arginin an Position 766 gegen Glutamin nimmt die Hydrophobizität leicht zu. **(C)** Gly597Glu befindet sich an der Oberfläche des Proteins. Die Hydrophobizität nimmt durch die Mutation leicht ab. **(D)** Substitution der hydrophoben Aminosäure Valin gegen das ebenfalls hydrophobe Methionin.

Anhang 4: **Durch Pymol angegebene Frequenz der Rotamere.** Bei der Modifizierung des Proteins wurde von den vorgeschlagenen Rotameren das Rotamer mit der höchsten Frequenz ausgewählt. Da Glycin keine Rotamere besitzt, ist keine Frequenz angegeben.

Protein	Mutation	Frequenz Rotamer (%)
MASP-2	Asp120Gly	/
C9	Ile476Thr	54,3
Faktor B	Ile469Met	21,0
C5	Arg766Gln	26,7
Integrin α-M	Gly597Glu	17,6
C3	Val845Met	19,3

Anhang 5: **Prädiktion des Einflusses der Variante auf die Stabilität der Proteinstruktur durch Dynamut.** *Destabilizing:* $\Delta\Delta G < 0$ kcal/mol, *stabilizing:* $\Delta\Delta G \geq 0$ kcal/mol.

Protein	Mutation	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	Vorhersage
MASP-2	Asp120Gly	-1,119	<i>destabilizing</i>
C9	Ile476Thr	-1,692	<i>destabilizing</i>
Faktor B	Ile469Met	0,474	<i>stabilizing</i>
C5	Arg766Gln	-0,412	<i>destabilizing</i>
Integrin α-M	Gly597Glu	0,422	<i>stabilizing</i>
C3	Val845Met	-0,257	<i>destabilizing</i>

Anhang 6: **Studien zum Einfluss genetischer Varianten auf das Therapieansprechen.** Die Tabelle gibt einen Überblick über bisherige Studien zum Einfluss genetischer Varianten auf das Ansprechen auf VEGF-Inhibitoren und deren Ergebnis. Die ersten beiden Studien haben zusätzlich eine Kontrollgruppe nicht von AMD betroffener Proband*innen untersucht, wie es auch in dieser Arbeit erfolgt ist. Die Anzahl der Proband*innen der Kontrollgruppe ist in diesem Fall in Klammern dargestellt. PMID: PubMed ID, F: Anzahl Individuen der Studienpopulation, K: Kontrollgruppe, Med: verwendetes Anti-VEGF-Medikament, AFL: Aflibercept, RAN: Ranibizumab, BEV: Bevacizumab.

Studie (PMID)	F (K)	Gene	Unter-suchung	Med	Ergebnis
Kozhevnikova et al., 2022 (238) PMID: 35884963	193 (147)	5 SNPs in <i>CFI</i> , <i>ARMS2</i> , <i>C3</i> , <i>CFH</i>	SNP Assay	AFL	rs2285714 (<i>CFI</i>): T schlechteres Ansprechen
Kubicka-Trzaska et al., 2022 (239) PMID 35630075	111 (58)	3 SNPs in <i>CFH</i> , <i>C2</i> , <i>C3</i>	SNP Assay	RAN, BEV	rs1061170 (<i>VEGFA</i>): CC besseres Ansprechen; CC und C-Allel höheres AMD-Risiko
Hagstrom et al., 2013 (84) PMID 23337555	834	4 SNPs in <i>CFH</i> , <i>ARMS2</i> , <i>HTRA1</i> und <i>C3</i>	SNP Assay	RAN, BEV	keine Assoziation
Guymet et al., 2024 (236) PMID 38980270	780	33 Gene inklusive <i>VEGFA</i>	GWAS	AFL, RAN	keine Assoziation
Lotery et al., 2013 (188) PMID 24070809	509	485 SNPs	SNP Assay	RAN, BEV	rs10490924 (<i>HTRA1/ARMS2</i>): T grenzwertige Assoziation mit besserem Ansprechen
Park et al., 2014 (192) PMID 25558172	273	17 SNPs in 13 Genen inklusive <i>VEGFA</i>	SNP Assay	RAN	rs302539 (<i>VEGFA</i>): TT stärkere Visuszunahme; rs10490924 (<i>ARMS2</i>) und rs1100638 (<i>HTRA1</i>): GG größere Reduktion der zentralen Makuladicke
Zhao et al., 2013 (240) PMID 23745581	223	rs943080 in <i>VEGFA</i>	SNP Assay	RAN, BEV	rs943080 (<i>VEGFA</i>): T und TT schlechtes Ansprechen
Abedi et al., 2013 (86) PMID 23149126	201	7 SNPs in <i>VEGFA</i> inklusive rs3025000	SNP Assay	RAN, BEV	rs3025000 (<i>VEGFA</i>): T besseres Ansprechen
Boltz et al., 2012 (241) PMID 22521084	185	7 SNPs in <i>VEGFA</i>	einzelne SNPs (Schmelz-kurvenanalyse)	BEV	rs3024997, rs2010963 (beide <i>VEGFA</i>): GG geringere Visusverbesserung
Strunz et al., 2022 (242) PMID 35682771	179	30 SNPs inklusive rs3025000 in <i>VEGFA</i>	GWAS, Replikation 30 Varianten inklusive rs3025000 (<i>VEGFA</i>)	AFL, RAN	keine Assoziation
Orlin et al., 2012 (243) PMID 21878851	150	7 SNPs in <i>CFH</i> , <i>ARMS2</i> , <i>HTRA1</i>	SNP Assay	RAN, BEV	keine Assoziation
McKibbin et al., 2012 (83) PMID 21558292	104	3 SNPs in <i>HTRA1</i> , <i>CFH</i> , <i>VEGFA</i>	Genotypisierung einzelner Varianten (Sequenzierung)	RAN	Trend für besseres Ansprechen bei AMD-Risikogenotypen
Kitchens et al., 2013 (197) PMID 24143065	101	<i>VEGFA</i> inklusive rs25648 , <i>CFH</i> , <i>LOC387715</i>	SNP Assay	RAN, BEV	rs10490924 (<i>LOC387715</i>): TT schlechteres Ergebnis im OCT

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Datum, Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Art und Weise bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Katrin Hoffmann und Frau Prof. Dr. med. Claudia Grünauer-Kloevekorn für die ausgezeichnete Betreuung. Zudem bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Sevidmaa Baasanjav und Frau Kerstin Körber-Ferl, die mich in die Arbeit im Labor eingeführt und bei der Durchführung der Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Pablo Villavicencio Lorini für die bereichernden Gespräche. Vielen Dank für den konstruktiven Austausch.

Mein großer Dank gilt Frau Jasmine Hillmer, die mich an die bioinformatischen Aspekte der Arbeit herangeführt hat.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, die mich in meiner Neugier für die Naturwissenschaften unterstützt und mir mein Studium ermöglicht hat. Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, meinem Vater und meinem Bruder, die mir immer ermunternd und verständnisvoll zur Seite standen. Ich danke Simon, der die Arbeit des Korrekturlesens übernommen und mich oft ermutigt hat.