

Doktori (PhD.) értekezés

A komplementrendszer aktiválódását gátló H-faktor és az FHR molekulák patológiás szerepének vizsgálata

Cserhalmi Marcell

Témavezető:

Dr. Józsi Mihály

D.Sc., egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola, Immunológia Program

Programvezető:

Prof. Dr. Bajtay Zsuzsa

D.Sc., egyetemi tanár

Doktori Iskolavezető:

Prof. Dr. Erdei Anna

D.Sc., egyetemi tanár
MTA rendes tagja



Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék, MTA-ELTE „Lendület” Komplement Kutatócsoport
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Budapest

2019

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Bevezető.....	5
1. Irodalmi áttekintés.....	6
1.1. A komplementrendszer	6
1.1.1. A komplementrendszer felfedezése	6
1.1.2. A komplementrendszer felépítése.....	6
1.1.2.1. Klasszikus út	8
1.1.2.2. Lektin út.....	11
1.1.2.3. Alternatív út	11
1.2. Komplementreceptorok.....	12
1.2.1. CR1	13
1.2.2. CR2.....	13
1.2.3. CR3 és CR4	14
1.2.4. CR1g	14
1.3. A humán H-faktor molekulacsalád.....	15
1.3.1. H-faktor	16
1.3.2. FHL-1	19
1.3.3. FHR-1	19
1.3.4. FHR-2.....	21
1.3.3.FHR-3.....	22
1.3.4.FHR-4.....	23
1.3.5.FHR-5.....	23
1.4. Az egér H-faktor molekulacsalád.....	24
1.5. Komplementrendszerrel kapcsolatos betegségek	25
1.5.1. Atípusos hemolitikus urémiás szindróma (aHUS).....	26
1.5.2. C3 glomerulopátia	29
2. Célkitűzések.....	31
3. Anyag és módszer	32
3.1. Sejtípusok.....	32
3.2. Pufferek, oldatok.....	32
3.3. Ellenanyagok.....	35
3.4. Fehérjék, reagensek, primerek	35
3.5. Rekombináns fehérjék.....	37
3.5.1. Rekombináns fehérjék előállítása	37
3.5.2. Rekombináns fehérjék tisztítása	38
3.5.3. Rekombináns fehérjék tisztaságának ellenőrzése ezüsfestéssel.....	40
3.6. Kötődés vizsgálati esszék.....	40
3.6.1. ELISA.....	40
3.6.2. Felszíni plazmon rezonancia (SPR).....	40
3.6.3. Áramlási citometria	41
3.7. Kompetíciós esszé.....	41

3.8. C3bBb-„decay” esszé.....	41
3.9. Kofaktor esszé.....	42
3.10. C3 konvertáz esszé.....	42
3.11. Komplement aktivációs esszék:	42
3.12. Hemolízis esszé.....	43
3.12.1. Hemolízis esszé birka vörösvérsejtekkel	43
3.12.2. Hemolízis esszé nyúl vörösvérsejtekkel	44
3.13. Terminális út gátlásának vizsgálata CRiG-IgV_FH18-20 inhibitorral	45
3.14. Statisztikai analízis.....	45
3.15. Szerzői hozzászólás.....	45
3.16. Etikai nyilatkozat	46
4. Eredmények.....	47
4.1. Az FH1-4 _{W198R} funkcionális vizsgálata	47
4.1.1. A mutációt hordozó beteg leírása	47
4.1.2. Az FH1-4 _{WT} és FH1-4 _{W198R} rekombináns fehérjék előállítása.....	48
4.1.3. A mutáns és vad típusú FH1-4 C3b-kötő képességének összehasonlítása.....	49
4.1.4. Az FH1-4 _{W198R} mutáció befolyásolja a fehérje C3 konvertáz szétesését segítő és kofaktor aktivitását	50
4.1.5. Az FH _{W198R} kevésbé képes megvédeni a saját sejteket a komplement mediált lízistől.....	52
4.2. H-faktor alapú komplement inhibitor funkcionális vizsgálata	55
4.2.1. A CRiG-IgV_FH18-20 fehérje rekombináns módon történő előállítása	55
4.2.2. A CRiG-IgV_FH18-20 C3b kötőképessége	56
4.2.3. A CRiG-IgV_FH18-20 képes gátolni a zimozán indukált komplement aktivációt	56
4.2.4. AmBisome, CrEL és Abelcet liposzómális nanogyógyszerek, illetve hordozó által indukált komplement aktiváció	57
4.2.5. A CRiG-IgV_FH18-20 megvédi a saját sejteket a komplement mediált lízistől.....	58
4.3. Az FHR-B funkcionális vizsgálata.....	62
4.3.1. Az egér FHR-B rekombináns fehérje előállítása	62
4.3.2. Az egér FHR-B képes humán C3b-t kötni és kompetálni a humán H-faktoral	62
4.3.3. Az egér FHR-B képes aktiválni az alternatív komplementutat.....	63
4.3.4. Az FHR-B növeli a komplement aktivációt pentraxinokon és az extracelluláris mátrixon	65
4.3.5. Az FHR-B növeli a komplement aktivációt nekrotikus sejteken.....	67
4.3.6. FHR-B képes a sajátához hasonló sejtek lízisét indukálni.....	69
5. Diskusszió	70
5.1. A H-faktor W198R mutáció funkcionális vizsgálata	70
5.2. A CRiG-IgV_FH18-20, mint potenciális komplement inhibitor	73
5.3. Az egér FHR-B elősegíti a komplement aktivációt.....	75
6. Összefoglalás	80
7. Summary	81
8. Köszönetnyilvánítás	82
9. Publikációs lista	83
10. Irodalomjegyzék.....	84

Rövidítésjegyzék

aHUS	atypical hemolytic uremic syndrome / atípusos hemolítikus urémiás szindróma
AMD	Age-related macular degeneration / Időskori makuladegeneráció
C3G	C3 glomerulopathy / C3 glomerulopátia
CCP	Complement control protein
CR1g	Complement receptor of the Immunoglobulin superfamily
CRP	C-reactive protein / C-reaktív fehérje
DDD	Dense deposit disease
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline / Dulbecco-féle foszfát puffer
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	Etilén glikol-tetraecetsav
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay / Enzim kapcsolt immunszorbens esszé
FCS	Fetal calf serum / Magzati borjú szérum
FDA	Amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hatóság
FH	H-faktor
FHL	Factor H-like protein / H-faktorhoz hasonló fehérje
FHR	Factor H-related protein / H-faktorial rokon fehérje
FITC	Fluorescein isothiocyanate / Fluoreszcein izotiocianát
GAG	Glucose-aminoglycan / glükózaminoglikán
HRPO	Horseradish peroxidase / Torma peroxidáz
HSA	Human serum albumin / Humán szérumalbumin
HUVEC	Human umbilical vein endothel cell line / humán köldökvéna endotél sejtvonal
LPS	lipopoliszacharid
MAC	Membrane attack complex / Membrán károsító komplex
MASP	MBL-associated serine protease / Mannózkötő lektin asszociált szerin-proteáz
MBL	Mannose Binding Lectin / Mannóz kötő lektin
PNH	paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / paroxizmális nokturnális hemoglobinuria
PTX3	Pentraxin-3
SCR	Short consensus repeat
Sf9	Spodoptera frugiperda 9 sejtvonal
SLE	systemic lupus erythematosus / szisztémás lupus erythematosus

Bevezető

Az immunrendszer szervezetünk fontos védekező rendszere. Fő funkciója a szervezet saját-, megváltozott saját struktúráinak és a szervezet számára idegen, nem saját struktúrák felismerése, a fertőzések elleni védelem. A sajátként felismert anyagokra toleranciával válaszol, míg a veszélyesként felismert struktúrákat eliminálja a szervezetből. Az immunrendszer felismerő, információát továbbító és végrehajtó funkciókat lát el. A törzsfajlás során kétféle immunrendszer alakult ki, az ősi, veleszületett immunrendszer és az erre ráépült adaptív vagy szerzett immunrendszer. Az immunhomeosztázist a két rendszer egymással együttműködve alakítja ki.

Fertőzés esetén először a veleszületett immunrendszer oldékony és sejtjes elemei próbálják eliminálni a szervezetbe bejutott kórokozót. A veleszületett immunrendszer elsősorban egyes, patogénekkal asszociált molekuláris mintázatokat ismer fel, ez is mutatja a rendszer ősi jellegét; az adaptív immunrendszer elemei viszont nagy specifikussággal a különböző fehérje és nem-fehérje típusú antigén epitópokat ismerik fel. A veleszületett immunválasz percek-órák alatt kialakul, szemben az adaptív immunválasszal, ahol több nap-hét is szükséges lehet a fajlagos T- és B sejt klónok felszaporodásához és az immunológiai memória kialakulásához.

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer fontos humorális eleme, szervezetünk egyik első védelmi vonala. A kórokozók elleni hatékony védelem biztosításán túl szerepet játszik sejtörmelések, elpusztult sejtek eltakarításában, gyulladási folyamatokban. A komplementrendszer nem megfelelő működésének szerepe van különböző betegségek kialakulásában, lefolyásában is. Dolgozatomban célul tűztem ki a komplementrendszer egyik fontos szabályozó molekulájának, a H-faktornak és a H-faktor molekulacsalád más tagjai patológiás szerepének a vizsgálatát.

1. Irodalmi áttekintés

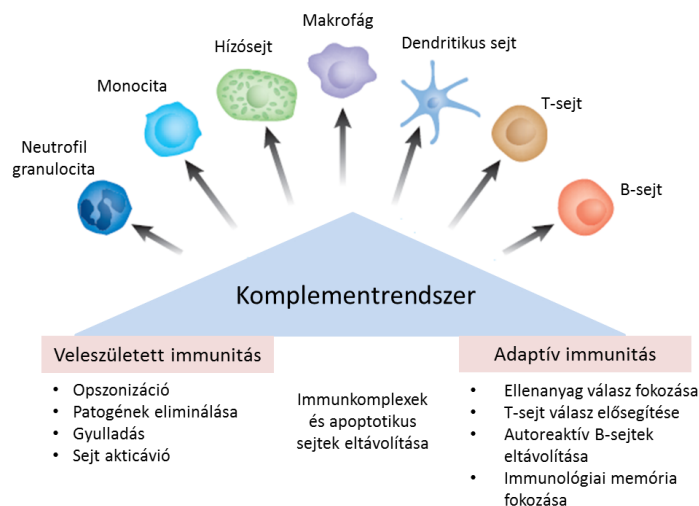
1.1. A komplementrendszer

1.1.1. A komplementrendszer felfedezése

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer humorális eleme. A XIX. század végére tehető a komplementrendszer felfedezése, mely egy magyar kutató, Fodor József nevéhez köthető. Kimutatta, hogy a lépfenét okozó *Bacillus anthracis*-szal immunizált nyulak vérében elpusztul a kórokozó. Ezt követően, Jules Bordet is kimutatta a szérum baktériumölő hatását, illetve azt, hogy a szérumnak az 56°C-on történő hőkezelése inaktíváló hatású erre nézve. A korábban alexinnek (hőérzékeny faktor) elnevezett anyagot – mely a szérum baktériumölő hatásáért felelős - Paul Ehrlich komplementnek nevezett el (1).

1.1.2. A komplementrendszer felépítése:

A komplementrendszer jelenlegi tudásunk szerint közel 40 komponensből áll, ezek egymást láncreakciószerűen aktiváló oldékony faktorok, valamint oldékony és sejt felszínhez kötött szabályozó molekulák, illetve az aktivált komponenseket megkötő sejt felszíni receptorok. A komplementrendszer egy hatékony effektor komponense a veleszületett immunrendszernek, szerepet játszik a mikrobák, kórokozók eltávolításában illetve egyéb veszélyes partikulumok, pl.: immunkomplexek; apoptotikus-, nekrotikus sejtek; megváltozott saját sejtek eliminálásában, egyes sejtek aktiválódásának szabályozásában, továbbá hidat képez az adaptív és a veleszületett immunitás között (**1.1. ábra**). A komplementrendszer inaktív (egészséges egyénekben az alternatív útvonal kismértékű állandó aktivitást mutat [„tickover”] a kórokozók jelenlétének felderítésére) mindaddig, míg különböző veszély szignálok nem aktiválják. Fertőzés következtében a komplement aktiválódása gyulladás kialakulásához, opszonizációhoz, fagocitózishoz, a patogén elpusztításához, végül az adaptív immunválasz aktiválásához vezet (2).



1.1. ábra: A komplementrendszer sokrétű szerepe. A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer része, de képes aktiválni mind a veleszületett, mind az adaptív immunválasz kialakításában résztvevő immunsejteket. A komplement kiváltja és szabályozza a különböző immunfolyamatokat és összekötő szerepet játszik az immunválasz két ága között. Ezen kívül a komplementrendszer fenntartja a sejtek homeosztázisát a sejtörmelékek és az immunkomplexek eltávolítása révén (3).

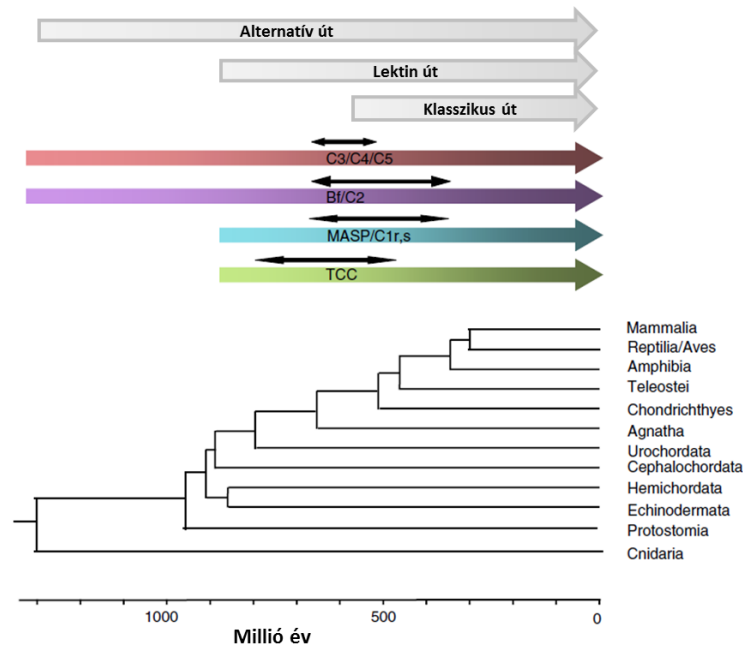
A komplement aktivációt elsősorban a mintázat felismerő molekulák által azonosított sejt felszíni struktúrák felismerése indítja el. Az aktiválási triggerrel függően a komplement kaskád a három útvonal egyikét követi: a klasszikus-, a lektin- vagy az alternatív aktivációs utat. A komplement aktivációt elindító felismerő molekulák a klasszikus út esetében a C1q, a lektin út esetében a mannóz kötő lektin (MBL), fikolinok és a kollektinek. Az alternatív úton történő aktivációnál nincsenek tradicionális felismerő molekulák melyek a komplement aktivációját elindítanák, bár a properdinről egyes kutatók leírtak ilyen funkciót (4). A komplementrendszer a különböző mikroorganizmusokat, a patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) szolubilis mintázat felismerő molekulák (PRM) segítségével ismerik fel. A klasszikus út esetében a C1q elsősorban IgG és IgM immunkomplexeit ismeri fel, de képes a komplementet ellenanyag független módon is aktiválni pentraxinokhoz (C-reaktív fehérje, pentraxin 3), különböző polianionos struktúrákhoz kötődve, pl.: RNS, DNS, LPS stb. Az MBL, a kollektinek és a fikolinok a lektin út mintázat felismerő molekulái, melyek szénhidrát struktúrákhoz kötődnek. A klasszikus- és lektin út mintázat felismerő molekulái a PAMP-hoz vagy veszély indukálta molekuláris mintázatokhoz (DAMP) kötődve a mintázat felismerő molekulák és a zimogén formában levő proteázok komplexének az aktivációját eredményezik. A klasszikus út esetében a C1 komplexben a C1q a mintázat felismerő molekula, a C1r és a C1s a zimogén formában lévő szerin-proteázok. A lektin út mintázat felismerő molekulái elsősorban különböző szénhidrát molekulákat ismernek fel és komplexet képeznek az MBL-asszociált szerin-proteázokkal (MASP). A lektin út MASP-1 és MASP-2 szerin-proteázai funkcionális és strukturális homológjai a klasszikus út C1r és C1s

szerin-proteázoknak. Az alternatív út mintázatfelismerő molekulák, valamint a klasszikus- és a lektin út előzőleges aktivációja nélkül is működésbe hozható. Ez az útvonal állandóan, kismértékű aktivitást mutat, a C3 spontán hidrolízisének köszönhetően, melynek következtében a C3b-hez szerkezetileg hasonló C3(H₂O) keletkezik. A C3(H₂O) molekulához kötődik a B-faktor, ezzel kialakul a fluid fázisú C3(H₂O)B prokonvertáz, melyben a D-faktor a B-faktort elhasítja és így létrejön a C3(H₂O)Bb, az alternatív út kezdeti C3 konvertáz enzime. A lektin- és a klasszikus út aktivációja során kialakult C3 konvertáz (C4bC2a) és az alternatív út C3 konvertáz enzime a központi szerepű komplement komponens, a C3 molekulát hasítja, melynek során C3a és C3b fragmentumok keletkeznek. A C3b molekula és a B-faktor kölcsönhatása révén az alternatív út C3bBb C3 konvertáza alakul ki, amely képes további C3 molekulákat hasítani, ami az újabb C3b molekulák képződése révén egy hatékony visszacsatolást, erősítést jelent („amplification loop”). A C4bC2a és C3bBb konvertázok aktivitása során keletkező C3b molekulák ezekhez az enzimekhez kötődve kialakítják a C4bC2aC3b és C3bBbC3b, C5-öt hasítani képes C5 konvertáz enzimeket. A C3 és C5 hasításakor keletkező C3a és C5a anafilatoxinok a környezetbe diffundálva, gyulladásos folyamatokat idézhetnek elő. A C5 molekula hasításakor keletkező C5b a C6, C7, C8 és C9 komplement komponensekkel összekapcsolódva alakítja ki a C5b-9, membrán károsító komplexet (MAC), mely a célsejtek lízisét okozhatja (**1.3. ábra**) (5, 6).

1.1.2.1. Klasszikus út:

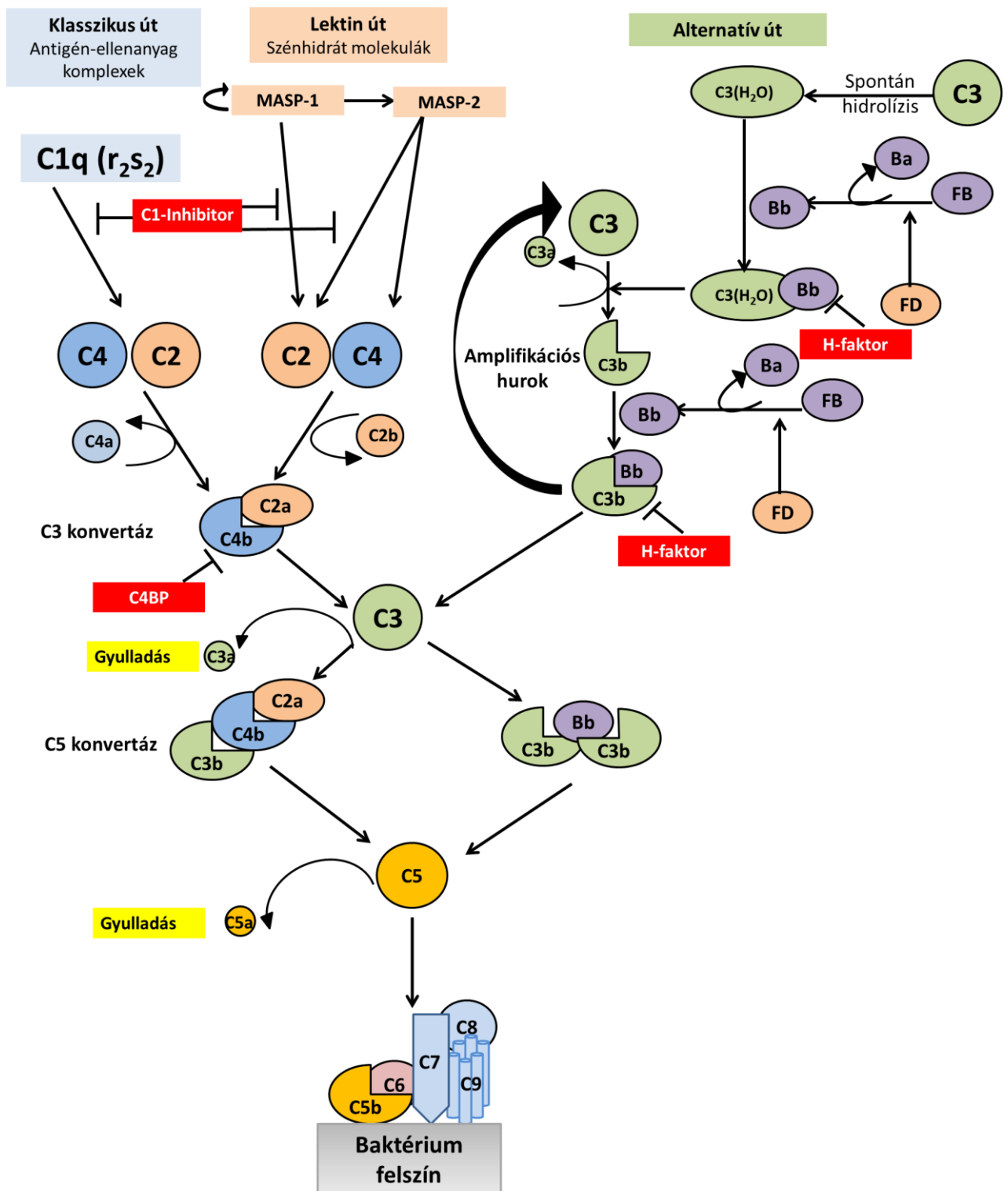
A komplementrendszer aktiváló utak közül a törzsfajlás során legkésőbb fejlődött ki, viszont a komplement kutatások során ezt az aktivációs utat írták le először. A *Chordata* (Gerinchúrosok) megjelenésével (**1.2. ábra**) és az adaptív immunitás kifejlődésével jelent meg a klasszikus út (7). A klasszikus út ellenanyag függő aktivációját IgG-t és IgM-et tartalmazó immunkomplexek indíthatják el. A komplexben lévő ellenanyag molekula Fc-részéhez kötődik a C1q. Ezen kívül a C1q képes ellenanyag független módon is elindítani a komplement aktivációt, mikrobiális felszíneken kifejeződő struktúrákhoz, virális fehérjékhez, DNS- és RNS molekulákhoz, apoptotikus sejtek felszínéhez, különböző pentraxinokhoz (CRP, PTX3) kötődve (8). A C1q 18 polipeptid láncból (6A, 6B és 6C lánc) áll, az egyes A és B láncok között, illetve a C láncok között diszulfid hidak vannak (6 A-B dimer és 3 C-C tetramer). A polipeptidláncok egy feji régióból és egy nyaki, „kollagénszerű” régióból állnak. A C1q szerkezete egy tulipán csokorra is emlékeztet (9). A C1q ellenanyaghoz kötődésekor a molekulakomplex katalitikus alegységében autoaktiválódik a C1r szerin-proteáz, amely a zimogén formában lévő C1s szerin-proteáz alegységet hasítja, így kialakul a C1r₂S₂ komplex. Az aktiváció Ca²⁺-függő, annak hiányában

(divalens kation kelátorok jelenlétében pl.: EDTA) a C1q nem tud interakcióba lépni a C1r₂C1s₂ komplex-szel, ezért a klasszikus- és a lektin út aktivációja nem indul el (2).



1.2. ábra: A komplementrendszer evolúciója (7). A három komplement aktivációs út evolúciós eredetét a szürke nyilak jelölik. A színes nyilak az egyes fő gén családok eredetét és evolúcióját mutatják. A klasszikus út kialakulásához hozzájáruló génduplikációk megjelenését a kettős nyilak jelzik.

A hasítást követően aktív C1s alegység szubsztrátjai a C4 és C2 komplement komponensek, melyek egy nagyobb, C4b; C2a és egy kisebb, C4a; C2b alegységre hasadnak (nincs egységes álláspont arról, hogy a C2a vagy a C2b a kisebb fragmentum, dolgozatomban mindig a C2a fragmentumot említem nagyobbak). A két nagyobb aktivációs fragmentumból kialakul a klasszikus útra jellemző C3 konvertáz enzim (C4bC2a), a hasítást követően felszabaduló kisebb fragmentumok (C4a és C2b) a környezetbe diffundálnak (5, 10). Ezt követően a C4bC2a konvertáz képes a C3 molekula hasítására, majd kialakul a C5 konvertáz enzim (C4bC2aC3b). A keletkező C3a peptid (anafilotoxin) a környezetbe diffundál, a C3b molekula, mint opszonin a szabadon hozzáférhető tioészter csoportja segítségével különböző felszínekhez kovalensen (észter vagy amid kötéssel) kötődik, pl.: bakteriális felszín, extracelluláris mátrix, sejtek felszíne stb. (11). A klasszikus út aktivációját a C4b kötő fehérje (C4BP) illetve a C1-inhibitor (C1-Inh) szabályozza. A C1-Inh köti és inaktíválja a C1r és C1s szerin-proteázokat, ezáltal a C1 komplex disszociálódik a C1q-ről, mely szabaddá válik; a C1-inhibitor kovalensen kapcsolódik az inaktív C1r és C1s komplexhez (12).



1.3. ábra: A komplementrendszer aktivációs útjai. A komplementrendszer három útvonalon keresztül képes aktiválódni: a klasszikus-, lektin- és az alternatív úton. A klasszikus úton keresztüli aktivációt elsősorban immunkomplexek indítják el, a lektin út felismerő molekulái különböző szénhidrát motívumokat ismernek fel. Az alternatív út állandóan kismértékű aktivitást mutat, számos különböző struktúra (pl.: LPS) aktiválja. A három út aktivációja a komplementrendszer központi molekulájánál, a C3 szintjén egyesül. A kialakuló C3, majd C5 konvertázok működésének eredményeként, a terminális út aktiválódásakor kialakuló membránkárosító komplex a sejtek lízisét okozza. Szolubilis és membrán-kötött regulátor fehérjék szabályozzák, tartják kordában a komplement aktivációt, pl.: H-faktor, C1-inhibitor, C4BP, membrán kofaktor fehérje). A (13)-as hivatkozás alapján módosítva.

A C1-inhibitornak a komplement inaktiváción kívül a kinin útvonalhoz kapcsolódó funkciója is van. A C1-Inh örökletes vagy veleszületett hiánya ún. angioödéma kialakulásához vezet. Ennek kezelésére rekombináns vagy szérumból tisztított C1-inhibítort alkalmaznak terápiaként (12).

1.1.2.2. Lektin út:

A lektin utat aktiváló MBL a klasszikus út aktiválódását elindító C1q molekulához hasonlít (globuláris fej és kollagén szerű nyak). A C-típusú lektin doménjei baktériumok felszíni szénhidrát motívumait ismerik fel. A fikolinok (fikolin H, L, M) fibrinogén-szerű doménjeikkel a baktériumok acetilált szénhidrát motívumait ismerik fel (14). A kollektinek (CL-K1/kollektin-10, CL-L1/kollektin-11) kalcium függő módon glükózt, mannózt, N-acetil-glükózamint ismernek fel. Ezek a szénhidrát molekulák ritkán vannak jelen a saját fehérjéken és a sejtek felszínén, de gyakran expresszálódnak baktériumok, vírusok és pusztuló sejtek felszínén (2). Az MBL/fikolinhoz asszociált szerin proteáz 1 és 2 (MASP-1 és MASP-2) a legelső proteázok a lektin útban. Ezen szerin-proteázok és a MASP-3 hasonló funkciókkal és domén struktúrával rendelkeznek. Amikor a mintázat felismerő molekulák (MBL/fikolinok/kollektinek) az aktiváló felszínhez kötődnek, az enzimatikus jelet a hozzájuk kapcsolódó szerin-proteázok generálják. Ezek a szerin-proteázok zimogén (inaktív) formában vannak jelen, akkor aktiválódnak, amint a mintázat felismerő molekula a célmolekulához kötődött (pl.: az MBL egy baktérium felszíni molekulájához kötődik). A lektin út aktivációját a MASP-1 autoaktivációja indítja el, mely a MASP-2-t aktiválja (15). A klasszikus úthoz hasonlóan az aktiváció Ca^{2+} függő folyamat. A MASP-2 képes a C4-et elhasítani és mind a MASP-1, mind a MASP-2 képes a C2 hasítására, melynek eredményeképpen kialakul a klasszikus út C3 konvertázával megegyező C3 konvertáz (C4bC2a) (16). A lektin út aktivációját a MASP-3, Map44 és mAp19 fehérjék szabályozzák, melyek nagymértékű szekvenciális homológiát mutatnak a MASP-1 és MASP-2 fehérjékkel (11).

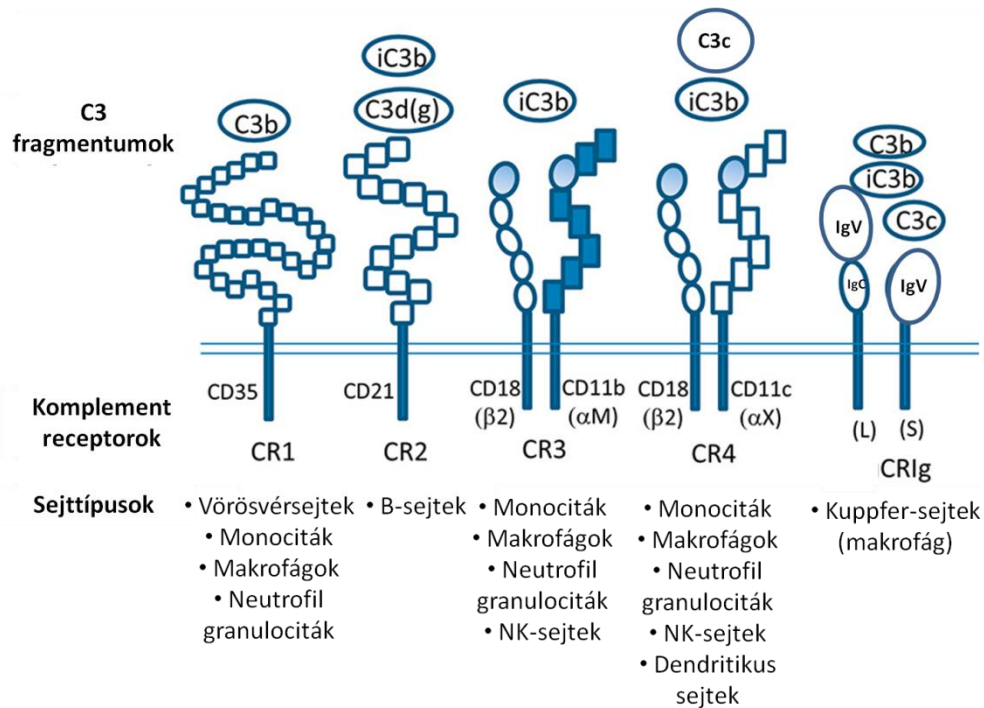
1.1.2.3. Alternatív út:

A törzsfajlás során legkorábban az alternatív útvonal komponensei alakultak ki, már a *Cnidariak*-ban (Csalánozók) jelen van (**1.2. ábra**). A klasszikus út leírását követő, mintegy 50 év múlva Pillemer és munkatársai kezdetben properdin útként nevezték el a ma alternatív útként ismert komplement aktivációs utat (17). Az alternatív út konstans, kismértékű aktivációja folyamatosan megfigyelhető a szérumban normál fiziológiás körülmények között, melynek mechanizmusa még nem pontosan tisztázott; kiváltója olyan patogének felszíne lehet, melyek sztiálsavban szegények, semleges vagy pozitív töltésűek és felszínükön nem találhatóak komplement regulátorok. Gram-negatív baktériumok sejtfalát alkotó lipopoliszacharid, gombák sejtfalát alkotó szénhidrátok is aktiválhatják (18). A folyamatos aktivációt az alternatív út központi

molekulájának, a C3-nak vízzel történő spontán hidrolízise okozza. Ennek során a C3 reverzibilis konformációs változáson megy keresztül, az erősen reaktív tioészter kötést tartalmazó doménje (TED) szabaddá válik és a kötés spontán hidrolízisnek indul, melynek következtében a C3(H₂O) forma alakul ki, mely a C3b-hez szerkezetileg nagyon hasonló. Ezzel, az úgynevezett „tick-over” mechanizmussal kialakult C3(H₂O) molekulához képes a B-faktor kötődni. A C3(H₂O) kötött B-faktort képes a D-faktor egy nagyobb (Bb) aktív és egy kisebb (Ba), inaktív fragmentumra hasítani. Az így kialakuló C3(H₂O)Bb komplex egy instabil, fluid fázisú C3 konvertáz, mely képes natív C3 molekulák hasítására C3a és C3b-vé, mely utóbbi a kialakuló C3 konvertáz aktív magja. Az így generált C3b molekulák tioészter kötése hidrolizálódik, a fehérje patogén vagy aktiváló felszín hiányában degradálódik. Patogén jelenlétében a keletkezett C3b kovalensen kötődik hidroxil- vagy aminocsoportokat tartalmazó felszínhez és Mg²⁺ függő módon megköti a B-faktort (2, 19). A D-faktor elhasítja a B-faktort Bb és Ba fragmentekre, így kialakul az alternatív útra jellemző C3 konvertáz enzim (C3bBb). A kialakult konvertázt a properdin stabilizálja. A C3 konvertáz további C3 molekulákat hasít, újabb C3b molekulák képződnek, melyek újabb C3 konvertázokat alkothatnak. Az alternatív út aktivációja nagyon gyorsan felerősíthető, ezt hívják amplifikációs huroknak (**1.3. ábra**). Az alternatív út aktivációjának gyors felerősíthetősége miatt is szükséges a pontos szabályozása. A H-faktor (FH) az alternatív út fontos regulátor fehérjéje, mely kofaktorként szolgál a C3(H₂O) és C3b molekulák I-faktor általi inaktiválásához, gátolja a C3- és C5 konvertáz kialakulását, valamint elősegíti a konvertázok disszociációját (20).

1.2. Komplementreceptorok

A komplementrendszer részt vesz patogének és elpusztult sejtek opsonizálásában, immunkomplexek eltávolításában. A klasszikus- és lektin utak felismerő molekulái valamint a C3 aktivációs fragmentumai opsonizálják a targetet és hidat képeznek a fagociták sejtfelszíni receptorai közt (2). Három különböző csoportba oszthatóak: CCP doménnel rendelkező (CR1 és CR2), β₂-integrinek családjába tartozó (CR3 és CR4), valamint az Immunglobulin szupercsaládba tartozó CRIg (Complement Receptor of the Immunoglobulin superfamily) (21) (**1.4. ábra**).



1.4. ábra: Komplementreceptorok jellemzői, funkciói és kifejeződésük. A CR1, CR2 és CRiG egyláncú transzmembrán fehérjék, a CR3 és CR4 a β_2 -integrinek családjába tartoznak. A CR1 és a CRiG képes a C3b-t kötni, a CR2, CR3, CR4 és CRiG az iC3b-t képes kötni, a C3d kötődésért a CR2, míg a C3c kötődésért a CRiG felel. A CR1, CR3, CR4 főleg makrofágokon, monocitákon és neutrofil granulocitákon expresszálódik illetve a CR1 a vörösvérsejteken is, a CR2 B-sejteken, a CRiG a makrofágokból differenciálódó Kupfer-sejteken. A CRiG-nek két izoformája van, egy hosszú (L) és egy rövid (S). A (22)-es hivatkozás alapján módosítva.

1.2.1. CR1:

A CR1 (CD35) monocitákon, makrofágokon, neutrofil granulocitákon és vörösvérsejtek felszínén expresszálódó, membránkötött szabályozó fehérje. Allélikus variánsoknak megfelelően 28-34 CCP domént tartalmaz. Nagy affinitással a C3b (és C4b) felismerésére képes. A B-sejtek felszínén a fejlődés korai szakaszában megjelenik, de plazmasejtté éréskor elveszítik; szerepe van a B-sejtek aktiválásának gátlásában. A CR1-et elsőként adherencia receptorként írták le. Vörösvérsejtek esetében immunkomplexek lépbe szállításában van elsődleges szerepük. A neutrofil granulociták és makrofágok felszínén expresszálódó CR1 az opsonikus fagocitózis folyamatában játszik szerepet (21, 23).

1.2.2. CR2

A CR2 (CD21) B-sejtek felszínén expresszálódik. 15 CCP domént tartalmaz. Nagy affinitással köti az iC3b és C3d aktivációs fragmentumokat. A B-sejteken expresszálódó CD19 és CD81 sejtfelszíni molekulákkal a CR2 koreceptor komplexet alkot, a B-sejteket aktiválja (24).

1.2.3. CR3 és CR4:

A β_2 -integrinek családjába tartozik a CR3 (CD11b/CD18; $\alpha_M\beta_2$) és a CR4 (CD11c/CD18; $\alpha_X\beta_2$), heterodimer transzmembrán molekulakomplexek, mely egy egymáshoz nem kovalensen kapcsolódó α -alegységből és egy közös β -láncból (CD18) állnak. Mindkét β_2 -integrin az iC3b fragmentumot képes felismerni (21). Elsősorban monocitákon, makrofágokon, dendritikus sejteken, NK sejteken expresszálódnak. A CR3 elsődleges feladata az iC3b közvetített fagocitózis (25), a CR4-nek elsősorban az adherenciában van domináns szerepe (26). A H-faktor receptoron keresztül történő sejtekhez kötődését a CR3 és CR4 receptorok közvetítik (27). Az FHR-1 és FHL-1 sejtekhez (pl.: neutrofil granulociták) történő kötődését is a CR3 közvetíti (28).

1.2.4. CRIg:

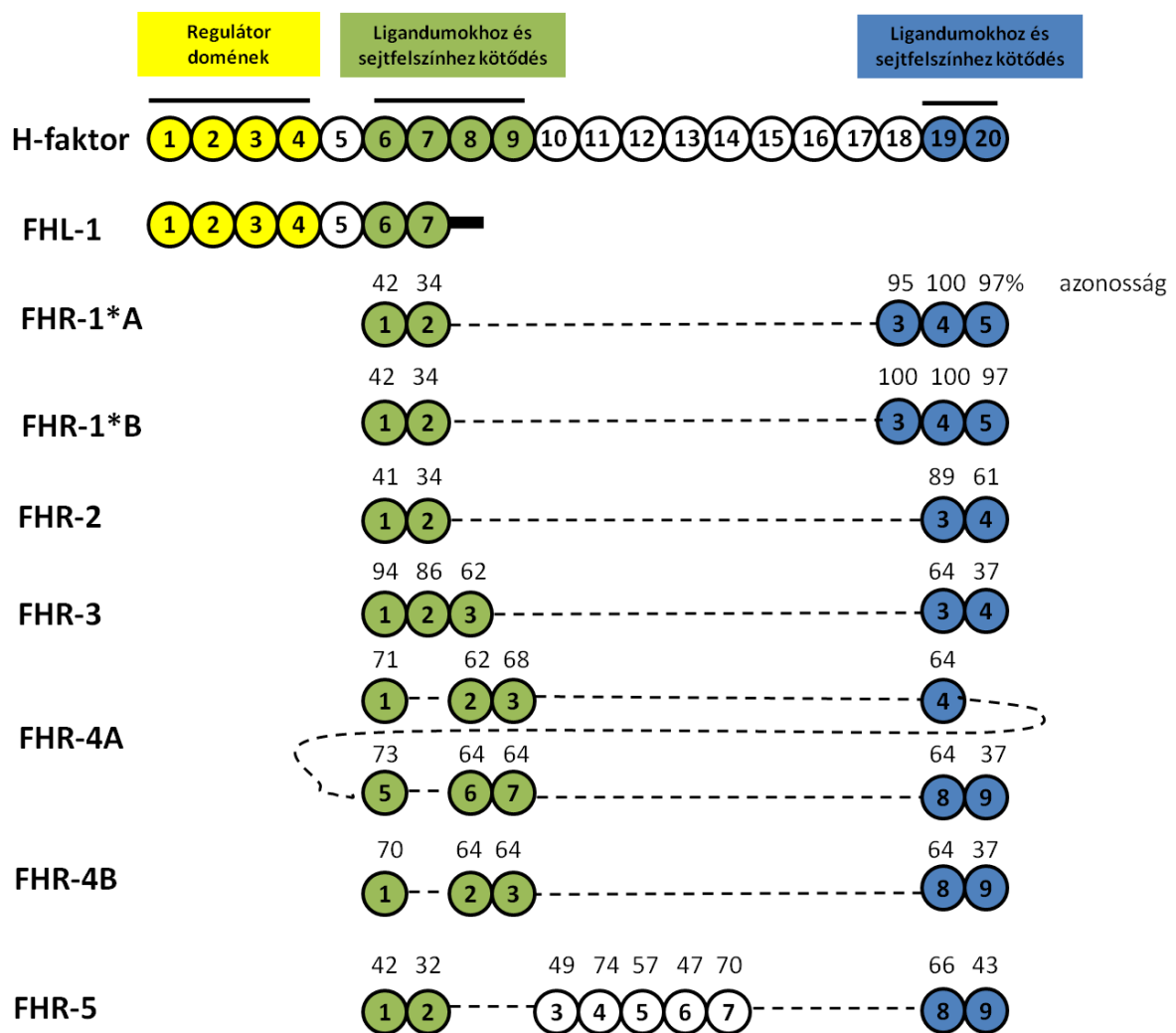
Az immunglobulin szupercsaládba tartozó receptor, membránkötött szabályozó fehérje, a májban, a Kupffer-sejteken expresszálódik, mely C3b, iC3b és C3c kötésére képes. A CRIg-nek két izoformája van: két extracelluláris domént tartalmazó (IgV és IgC) hosszú (L) és egy extracelluláris domént tartalmazó (IgV) rövid (S) formája. Mindkettő tartalmaz egy N-terminális ligandumkötő motívumot, amely az IgV-típusú doménhez tartozik (**1.4. ábra**) (21). A C3 fragmentumok a receptor extracelluláris részéhez, az IgV doménhez kötődnek. A CRIg kötőhelye a C3b-n, szemben más komplement receptorokkal a C3b β -láncán lokalizálódik. A receptor fő funkciója az opsonizált patogének fagocitózisának közvetítése (29). A CRIg az alternatív út egyik inhibitora, kötődik a C3b-hez, mind a klasszikus út, mind az alternatív út C5 konvertáz alegységéhez és szelektíven gátolja *in vitro* az alternatív út C3 és C5 konvertázokat azáltal, hogy blokkolja az interakciót a C3 és C5 szubsztrátokkal. A CRIg-nek sem kofaktor aktivitása, sem a konvertázt szétszedő, ún. „decay” aktivitása nincs. A CRIg nem akadályozza meg a klasszikus út C5 konvertáz (C4bC2aC3b) általi C5 komplement fehérje hasítását. Ennek oka az lehet, hogy a C2a képes a C5 hasítására függetlenül a C3b alegységtől. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a CRIg kötődése a C3b β -láncához szelektíven megakadályozza az alternatív út konvertáz interakcióját a C3 és C5 fehérjékkel, míg a klasszikus út konvertázokét nem (30). Mivel a CRIg a C3b-n keresztül képes az alternatív út aktivációját gátolni, a receptor szolubilis formájának elképzelhető terápiás alkalmazása különböző, komplementrendszerrel összefüggő betegségek kezelésére.

1.3. A humán H-faktor molekulacsalád:

A humán RCA (regulators of complement activation) génklaszter, mely az 1q32 kromoszómán helyezkedik el, két régióra osztható: az egyik tartalmazza a H-faktort és az FHL1-et kódoló *CFH* gént, valamint a H-faktorról rokon fehérjéket kódoló öt gént (*CFHR1-5*), a másik különböző szabályozó fehérjéket: a C4b-kötő fehérjét (*C4BP*), decay-accelerating faktort (*DAF*), komplement receptorokat (*CR1-2*) és a membrán kofaktor proteint (*MCP*) kódoló géneket. A komplement rendszert különböző felszíneken, például sejtek felszínén is lehet (és kell) szabályozni; ezt a feladatot membránkötött szabályozó fehérjék látják el. A CR1 a membrán kofaktor fehérjéhez hasonlóan (*MCP* vagy *CD46*) kofaktorként elősegíti a C3b és C4b fehérjék I-faktor általi hasítását, inaktiválását. A CR1 ezenkívül rendelkezik „decay” aktivitással is, a *DAF* (*CD55*) molekulához hasonlóan, elősegítve a C3 konvertáz enzim komponensek disszociálását. A komplementrendszer terminális komplexének kialakulását többek között a *CD59* molekula szabályozza (31).

A H-faktor az alternatív út egyik fontos szolubilis regulátor fehérjéje. A H-faktor molekulacsaládba tartozik a H-faktor; a H-faktor alternatív splice variánsa, az FHL-1 valamint az öt H-faktorról rokon fehérje (*FHR-1-5*), melyek a H-faktor génje mellett közvetlenül található *CFHR1-5* gének kódolnak, melyek részleges génduplikációk révén jöttek létre (1.5. ábra). Mind ismétlődő, globuláris egységekből, CCP (complement control protein vagy Sushi-domén, más néven short consensus repeat (SCR)) doménekből állnak, melyeket négy konzervált helyzetű cisztein aminosav képezte két diszulfid-híd stabilizál, illetve minden domént egy konzervált helyzetű triptofán aminosav jellemez (32). A H-faktor génje 23 exonból áll. Az első exon kódolja az mRNS 5' nem kódoló régióját valamint az N-terminális, 18 aminosavból álló szignálszekvenciát. A H-faktor minden doménjét egy exon kódol, ez alól kivétel a második domén (CCP 2), amelyet a 3-as és 4-es exon kódol. A 10-es exon nem íródik át, nem kódol H-faktor CCP domént, ez az exon az FHL-1 utolsó 4 aminosavának (Ser-Phe-Leu-Thr) kódolásáért, valamint az FHL-1 3' nem transzlálódó vég kódolásáért felel. Ezek az elsődlegesen a máj által termelt glikoproteinek közös szerkezeti struktúrát mutatnak. Az FHR fehérjéknél szintén minden exon egy CCP-t kódol, az első exon az mRNS 5' nem kódoló régióját valamint a 18 aminosavból álló N-terminális szignálszekvenciát kódolja, majd sorban a többi exon a soron következő CCP doméneket (pl.: FHR-1 2-es exon a CCP 1, FHR-1 3-as exon a CCP 2 stb. (33)).

1.3.1. H-faktor:



1.5. ábra: A H-faktor molekulacsalád. A H-faktor molekulacsalád tagjai a H-faktor, az FHL-1, mely a H-faktor gén alternatív splice variánsa, valamint az öt FHR fehérje (FHR-1, -2, -3, -4, -5). A H-faktor (és FHL-1) N-terminális CCP 1-4 doménjei felelnek a C3b kötésért és a komplementgátló funkciókért (sárga színnel jelölve), zöld színnel jelölt domének különböző ligandumokhoz (pl.: CRP, PTX3) és felszínhez kötődnek. C-terminális doménjeinek (kék színnel jelölve) a különböző felszínhez való kötődésben van szerepük. Az FHR fehérjék nem tartalmaznak a H-faktoriall homológ komplementgátló doménjeit. Az egyes FHR domének feletti szám a H-faktoriall megfelelő homológ doménjével mutatott aminosavszekvencia azonosságot jelzi százalékban.

A H-faktor elsősorban a májban expresszálandó szérumban glikoprotein (155 kDa), de extrahepatikusan is termelődik, például monociták, endotél sejtek, retina pigment epitél sejtek által (34). A H-faktort először fehérje szinten 1965-ben izolálták, akkor β_{1H} -globulinként írták le (35). 20 egymással homológ CCP domént tartalmaz, melyek egyenként kb. 60 aminosavból állnak (36). Háromféle módon tölti be a komplement aktivációt szabályzó szerepét: (a) C3b-hez kötődve gátolja az alternatív út C3 és C5 konvertázának felépülését a B-faktoriall való kompetíció révén; (b) elősegíti a már felépült konvertáz szétesését, azaz leszorítja az enzimaktivitással

rendelkező Bb fragmentumot a C3b-ről ('decay accelerating activity'); (c) valamint az I-faktor kofaktoraként elősegíti a C3b inaktiválódását (kofaktor aktivitás) (37–39). Ezekért a regulátor funkciókért a H-faktor N-terminális 1-4 domének felelnek (40, 41). A H-faktor C-terminális 19-20 doménjei felelnek a különböző felszínhez való kötődésért, például: polianionos felszíni molekulák (pl.: glükózamino-glikánok, szialinsavak) (42–44). A H-faktorról igazolták, hogy mint rekombináns fehérje, a glikozilációja nem játszik szerepet a komplement szabályozó funkcióban, a deglikozilált H-faktor hasonlóan funkció képes, mint a plazmából tisztított H-faktor. Valószínűleg a glikozilációnak a stabilitás növelésében illetve a fehérje féléletidejének növelésében van szerepe (45). A H-faktor a komplement aktivációt nem csak folyadék fázisban, hanem sejtek felszínén is képes szabályozni (46). A sajátához hasonló polianionos molekulák általában nincsenek jelen a patogének felszínén, ami érzékennyé teszi őket a komplementrendszerrel szemben. A C3b-n és a polianionos molekulákon (pl.: felszíni glükózaminoglikánok) túl a H-faktor más endogén ligandumokkal is kölcsönhatásba lép: CRP, PTX3, extracelluláris mátrix (ECM), DNS. Ezek az interakciók lehetővé teszik, hogy a H-faktor bizonyos saját felszíneken (pl.: glomeruláris alapmembrán, extracelluláris mátrix) gátolja a komplementet. A H-faktor apoptotikus/nekrotikus sejtekhez a CCP 6-20 doméneken keresztül képes kötődni annexin-II, DNS és hisztonok közvetítésével, melyek az apoptotikus sejtek felszínén megjelennek. Mivel az FH regulátor doménjei a sejtekhez való kötődésben nem vesznek részt, ezért képes a sejthez kötődve is a komplement aktiváció szabályozására (47).

A pentraxinok a veleszületett immunrendszer szolubilis mintázat felismerő molekulái. Mikrobák felismerésének következtében illetve gyulladásos citokinek (pl.: IL-6) hatására termelődnek. Ide tartoznak a klasszikus rövid pentraxinok, pl.: C-reaktív fehérje és a szérum amiloid P komponens (egérben). A hosszú pentraxinok közé tartozik például a PTX3, amelyet dendritikus sejtek, endotél sejtek, makrofágok termelnek (48). Mind a CRP-nek, mind a PTX3-nak különböző komplement aktivátorokkal (C1q, MBL) és komplement inhibitorokkal (FH, C4BP) való kölcsönhatását is leírták (32), (49–53). A CRP natív, pentamer formában van jelen a testfolyadékokban, öt azonos alegysége nem kovalens módon kapcsolódik egymáshoz, ciklikus pentamert alkot. Kalcium-függő módon képes különböző ligandumokhoz kötődni, illetve Ca^{2+} ionok jelenlétében tartja meg a pentamer CRP (pCRP) formát (54). A CRP szerkezete pH változás hatására, vagy például különböző felszínhez, membránokhoz kötődve megváltozhat. *In vitro* körülmények közt a Ca^{2+} ionok elvonásával (urea/EDTA kezeléssel) vagy műanyag felszínhez kötve a natív CRP monomerekké eshet szét. Az FH az mCRP-t elsősorban a CCP 7, 8-11 és 19-20 doménjeivel köti (50, 55, 56). A pentamer CRP-vel való interakcióját a CCP 7 és CCP 19-20 doméneken keresztül

akut fázis körülmények közt szintén leírták (57). A CRP monomer formája (mCRP) képes nekrotikus sejtek felszínén lerakódni, ezáltal hozzájárul a sérült sejtek hatékony eltávolításához. A natív CRP nem fokozza az FH nekrotikus/apoptotikus sejtekhez való kötődését (56). A PTX3 nyolc azonos protomerből épül fel, melyek egymáshoz diszulfid-híddal kapcsolódnak (58). A H-faktor képes nem-saját ligandumokhoz is kötődni, pl.: mikrobák felszíni fehérjéi, melyek révén egyes kórokozók képesek megmenekülni a komplement támadás elől, valamint saját sejteken expresszálandó receptorokhoz is képes kötődni a H-faktor (pl.: CR3, CR4) (28).

A H-faktor fő liganduma a C3b. A C3b-FH interakció a H-faktor kulcsfontosságú funkcióihoz különösen fontos, pl.: komplement szabályozás, saját felszínek felismerése. A H-faktornak négy C3b kötőhelye van, CCP 1-4, 6-8, 12-14, 19-20 (59–61), mindezek közül a két legfontosabb (SPR mérések is alátámasztották) az N-terminális CCP 1-4 és a C-terminális CCP 19-20, melyek az intakt C3b-t kötik, emellett a CCP 19-20 a C3d-t is köti. A másik két C3b-kötő hely jelentősége, illetve létezése vitatott; egyes eredmények szerint a CCP 12-14 a C3c molekulát köti (amely a C3b molekula hasításakor keletkezik). A C3b és az FH1-4 komplex kristályszerkezete alapján a H-faktor mind a négy N-terminális doménjével részt vesz a C3b kötésében, illetve ezek a domének szükségesek mind a kofaktor- mind a konvertáz „decay” aktivitáshoz (62). A saját-nem saját struktúrák megkülönböztetéséért a H-faktor C-terminális CCP 19-20 doménjei felelnek, melyek képesek a különböző felszínekhez kötődött C3b és C3d, valamint a saját glükózaminoglikánok (GAG) vagy szialinsavak felismerésére. Az CCP 19-es domén tartalmazza a fő C3d (és egyben C3b) kötőhelyet, a GAG-ok kötődését a CCP 20-as domén közvetíti, azaz a lerakódott C3b és a felszíni GAG molekulák saját sejteken való felismerését a H-faktor CCP 19-20 domének együtt teszik lehetővé, ezáltal mintegy felismeri a H-faktor a komplement támadás alatt álló saját sejteket (63, 64).

Aktivitás	H-faktor	FHR-1	FHR-2	FHR-3	FHR-4A	FHR-5
C3b kötés	+	+	+	+	+	+
C3d kötés	+	+	+	+	+	+
mCRP kötés	+	+	nv.	nv.	-	+
pCRP kötés	-	-	nv.	nv.	+	-
PTX3 kötés	+	+	nv.	nv.	-	+
„Decay” aktivitás	+	-	-	-	-	-
C3 konvertáz gátló aktivitás	+	-	+	-	-	-
Kofaktor aktivitás	+	-	-	+	-	-
C5 konvertáz gátló aktivitás	+	+	-	(+)	-	+
Terminális komplex gátlás	+	+	+	nv.	nv.	+

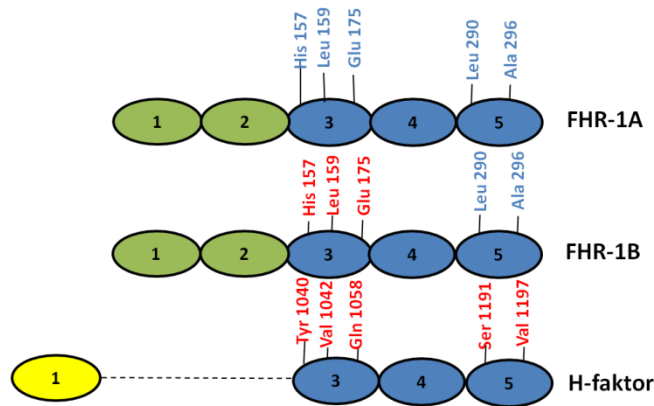
1. táblázat: A H-faktor molekulacsalád főbb funkcióinak összefoglaló táblázata. nv.= nem vizsgált

1.3.2. FHL-1:

Az FHL-1 (H-faktorhoz hasonló fehérje) a *CFH* gén alternatív splice variánsa. A H-faktor N-terminális hét CCP doménjét tartalmazza, majd négy, csak az FHL-1-re jellemző aminosav kapcsolódik az utolsó doménhez (Ser-Phe-Leu-Thr [SFTL]) (65). Az FHL-1 nem tartalmaz H-faktorról homológ C-terminális doméneket, melyeknek a sejtek felszíni kötődésében van szerepe, ezáltal az FHL-1-nek a saját sejtek felszínén a komplement szabályozásban a H-faktorétól eltérő szerepe van. Feltehetőleg részben más felszínhez kötődik az FHL-1, mint a H-faktor, melyben az FHL-1 utolsó 4 aminosavnak lehet szerepe. Leírták, hogy az utolsó négy aminosav az mCRP-hez illetve a PTX3-hoz való kötődést kis mértékben megnöveli (66). Clark SJ. és munkatársai leírták, hogy a szemben található retina pigment epitél sejtek termelnek FHL-1-et (67), illetve az FHL-1 képes passzívan átdiffundálni a szemben található Bruch's membránon (choroid legbelső rétege), míg a H-faktor méretéből kifolyólag erre nem képes. Az FHL-1 valószínűleg a fő komplement szabályozó molekula, mely nagyobb védelmet nyújt az időskori makuladegeneráció (AMD) kulcsfontosságú helyszínén, a szemben található Bruch's membránnak, mint a H-faktor, de a szabályozásban a H-faktor is fontos szerepet játszik (68). Az AMD-re jellemző gyakori H-faktor és FHL1 polimorfizmus az Y402H (CCP 7-ben) (69, 70).

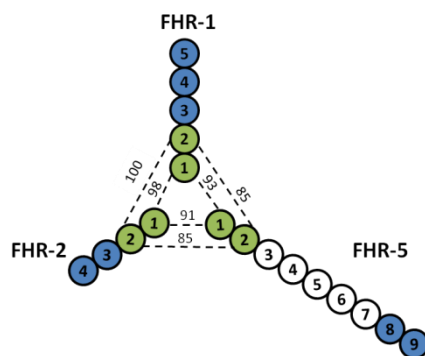
1.3.3. FHR-1:

Az FHR-1 öt CCP doménből épül fel, a szérumban kétféle glikozilált formában van jelen (37- és 43 kDa, egy illetve két szénhidrát oldallánccal) (71, 72). Két allélikus variánsát írták le az FHR-1-nek: FHR-1*A (savas), és az FHR-1*B (bázikus), amelyek között a különbség a harmadik doménben levő aminosavakban van (73). Az FHR-1*B CCP 3-as doménje teljesen megegyezik a H-faktor CCP 18-as doménjével, míg az FHR-1*A CCP 3-as doménje 95%-ban mutat a H-faktorról szekvencia azonosságot, három aminosavnyi eltérés miatt. Az FHR-1 CCP 4 és CCP 5-ös doménjei 100% illetve 97% szekvencia azonosságot mutatnak a H-faktor CCP 19 és 20-as doménjeivel (**1.6. ábra**) (74).



1.6. ábra: A két FHR-1 izoforma összehasonlítása. Az FHR-1 CCP 4-es doménje 100%-ban megegyezik a H-faktor CCP 19 doménjével. Az FHR-1*A és FHR-1*B a CCP 3-as doménben három aminosavban különböznek egymástól, míg az FHR-1*B CCP 3-as doménje 100% aminosav azonosságot mutat a H-faktor CCP 18-as doménjével. Az FHR-1*A és az FHR-1*B CCP 5 doménje egymáshoz 100%-ban azonosak, míg a H-faktor CCP 20-as doménjétől két aminosavban különböznek. (73)-as hivatkozás alapján módosítva.

Az FHR-1 N-terminális két CCP doménje a fehérje dimerizációjában vesz részt; ezek a domének nagymértékben hasonlítanak az FHR-2 és FHR-5 fehérjék CCP 1-2 doménjeire (**1.7. ábra**). A dimerizáció hatással van a ligandumok aviditására, valamint lehetőséget biztosít az FHR-1 homodimerek és FHR-1/FHR-2 heterodimerek kialakulására. *In vitro* azonosítottak FHR-1/FHR-5 heterodimereket is, de *in vivo* létezésük egyelőre tisztázatlan (75–77). A H-faktor és az FHR-1 közötti homológia miatt a két molekulának hasonló funkciója lehet illetve hasonló ligandumok kötésére lehetnek képesek. A H-faktor C terminálisa fontos ligandumok kötőhelyeit tartalmazza, például a C3b, heparin, melyet az FHR-1 is köt (78), valamint a H-faktorhoz hasonlóan az FHR-1 képes az endotél sejtek felszínéhez is kötődni (78, 79). Az FHR-1-nek nincs kofaktor aktivitása illetve a C3 konvertázt szétszedő „decay” aktivitása (71), hiszen az FHR-1 nem tartalmaz a H-faktor N-terminális doménjeihez hasonló doméneket. Leírták, hogy az FHR-1 a C5 konvertáz inhibitora valamint gátolja a terminális komplex kialakulását (79), de más munkacsoportok ezidáig nem tudták ezt igazolni (75, 80). Mivel a H-faktor C-terminális doménjei pentraxin-3 és CRP kötőhelyeket is tartalmaznak, a nagy fokú homológia miatt az FHR-1 képes a PTX3 kötésére (80, 81), valamint az mCRP kötésre a CCP 4-5 doméneken keresztül (80). Az FHR-1-en a C3b kötése révén képes felépülni funkcionális, alternatív útra jellemző C3bBb konvertáz és az FHR-1 aktiválja a komplementet. Az FHR-1-mCRP interakció megnöveli mind a klasszikus-, mind az alternatív út aktivációját, tehát az FHR-1 inkább elősegíti, mint gátolja a komplement aktivációt (80). A *CFHR3* és *CFHR1* gének deléciós polimorfizmusa (del*CFHR3-1* allél) bizonyos betegségekben protektív szereppel bír, pl.: időskori makuladegeneráció (AMD), míg aHUS-ra hajlamosít. A *CFHR3-1* allél homozigóta deléciónak a gyakorisága az etnikummal változik. Európai populációkban 4-5%. Leggyakrabban afrikai populációkban fordul elő, például szubszaharai afrikaiakban 54,7% (82).



1.7. ábra: Az FHR-1, FHR-2 és FHR-5 CCP 1-2 dimerizációs doménjeinek hasonlósága. Az első és második CCP doméneket összekötő szaggatott vonalakon lévő számok az egymással mutatott aminosav azonosságot jelzik százalékban kifejezve.

Az FHR-1 szérumban mérhető koncentrációja vitatott. 2017-ben különböző kutatócsoportok meghatározták az FHR-1 szérumban szintjét. Tortajada és munkatársai 122 µg/ml FHR-1 koncentrációt mértek szérumban, azonban ebben a vizsgálatban nem tettek különbséget az FHR-1 homo- és heterodimerek között (83). Egy holland kutatócsoport olyan, az FHR-1 szérumban koncentráció megállapítására alkalmas esszét állított be, mely különbséget tesz az FHR-1 homo- és az FHR-1/FHR-2 heterodimerek között. Így van Beek és munkatársai kb. 10-szer alacsonyabb FHR-1 szintet mértek szérumban (80). A *CFH::CFHR1* és *CFHR1::CFH* hibrid gének, valamint a *CFHR3-CFHR1* és *CFHR1-CFHR4* kettős géndelációk (84) atípusos hemolitikus urémiás szindrómával (aHUS) asszociáltak (73, 85–87) (**1.10. ábra**), ezek közül a *CFHR1* gén deléciója az aHUS autoimmun formájára hajlamosít (88, 89). Mindezekről részletesebben az 1.5. fejezetben lesz szó.

1.3.4. FHR-2:

A *CFHR2* gént 1995-ben írták le. Az FHR-2, négy CCP doménből épül fel, a szérumban glikozilálatlan formában (24 kDa) és glikoziláltan (N-kapcsolt szénhidrát motívum) van jelen (29 kDa). Az FHR-2 CCP 1-es doménjének szekvenciája 41%-ban mutat hasonlóságot a H-faktor CCP 6-os doménjével. Az FHR-2 CCP 2-es doménje a H-faktor CCP 7-es doménjével 34%-ban, a CCP 3-as doménje 89%-ban hasonló a H-faktor CCP 19-es doménjével. Az FHR-2 CCP 4-es doménje 61%-ban azonos a H-faktor CCP 20-as doménjével (**1.5. ábra**) (90). Az FHR-2 CCP 1 és CCP 2 doménjei nagymértékű hasonlóságot mutatnak az FHR-1 és FHR-5 CCP 1-2 doménekkel (**1.7. ábra**). Ezeknek a doméneknek a fehérjék dimerizációjában van szerepük (75). Az FHR-2 a dimerizációs doménjei révén képes homo- és heterodimereket létrehozni. *Ex vivo* leírtak FHR-2 homodimereket illetve FHR-1/FHR-2 heterodimereket; az FHR-2/FHR-5 heterodimerek léte vitatott. Az FHR-2 homodimerek szérumban koncentrációja kb. 3 µg/ml. A nagyon alacsony

koncentráció miatt az FHR-2 a limitáló tényező az FHR-1/FHR-2 heterodimerek kialakulásában, ezért a legtöbb FHR-2 inkább heterodimer formában van jelen (77). Az FHR-2-ről korábban leírták, hogy nem rendelkezik a H-faktorra jellemző kofaktor és „decay” aktivitással, képes a C3b és C3d kötéseire és gátolja az alternatív út C3 konvertázt, valamint a komplement kaszkád terminális útját (91). Kutatócsoportunk jelenleg további funkcionális vizsgálatokat folytat a fehérjének a komplementrendszerben betöltött szerepéről.

1.3.3. FHR-3:

Az FHR-3 öt CCP doménből áll, az első 2 CCP domén nagyfokú aminosav-szekvencia azonosságot mutat a H-faktor CCP 6-7 (94% és 86%) doménjeivel. Az FHR-3 CCP 3-as doménje 62%-ban azonos a H-faktor CCP 8-as doménjével. A C-terminális két domén (FHR-3 CCP 4-5) 64% és 37%-ban homológ a H-faktor CCP 19-20 doménekkel (**1.5. ábra**). Az FHR-3 C-terminális doménjei (CCP 3-5) nagymértékű szekvenciális azonosságot mutatnak az FHR-4A és FHR-4B C-terminális doménjeivel (98% és 93%). Az FHR-3 CCP 3-as doménje 100%-ban megegyezik az FHR-4A CCP 6-os és az FHR-4B CCP 2-es doménjével (74). Szérumból az FHR-3-at Westernbloton vizsgálva több specifikus jelet is kapunk, melyek négyféle glikozilált formát tükröznek (35 kDa és 56 kDa között). A szérum FHR-3 koncentrációjának meghatározására elsőként Pouw és munkatársai dolgoztak ki egy specifikus ELISA-t. Ez alapján 0,38 µg/ml és 0,83 µg/ml az egészségesekben mérhető FHR-3 szint (vagy 0, ha hiányzik mindkét *CFHR3* gének kópia). Ebben a vizsgálatban figyelembe vették a *CFHR3* gén kópiaszámot, a vizsgált egyének egy vagy két kópiában tartalmazták a *CFHR3* gént (92). Ezeket az eredményeket később egy hasonló esszével megerősítették, átlagosan 1,06 µg/ml FHR-3 koncentrációt mértek (93). Két fontos génváltozatát írták le a *CFHR3* génnek (*CFHR3*A* és *CFHR3*B*). Az FHR-3*A és az FHR-3*B allotípusok egy aminosavban különböznek a CCP 3-as domén 241-es pozíciójában (Pro/Ser). Ennek a funkcionális jelentőségét eddig nem igazolták (94). Ezekről a génváltozatokról később kiderült, hogy mennyiségük mérhető, a *CFHR3*B* variánsnál az FHR-3 szint magasabb volt, mint a *CFHR3*A*-nál (95). Az FHR-3 képes a C3b-t és C3d-t, valamint heparint kötni. A rekombináns FHR-3 (nagy koncentrációban adva) alacsony kofaktor aktivitást mutat az I-faktor jelenlétében történő C3b hasítás során (96). Az FHR-3 C3 konvertázt gátló funkcióját is leírták, valamint kompetál az FHR-1-gyel és a H-faktoral a C3b kötődésért (97). Az FHR-3 a C3b kötődésért kompetál a H-faktoral a CCP 5-ös doménjén keresztül, N-terminális doménjei pedig a heparin kötődésért felelnek (93). Az FHR-3 pontos fiziológiás szerepe a komplement aktivációban egyelőre nem ismert. Kutatócsoportunk jelenleg végez erre irányuló kísérleteket.

1.3.4. FHR-4:

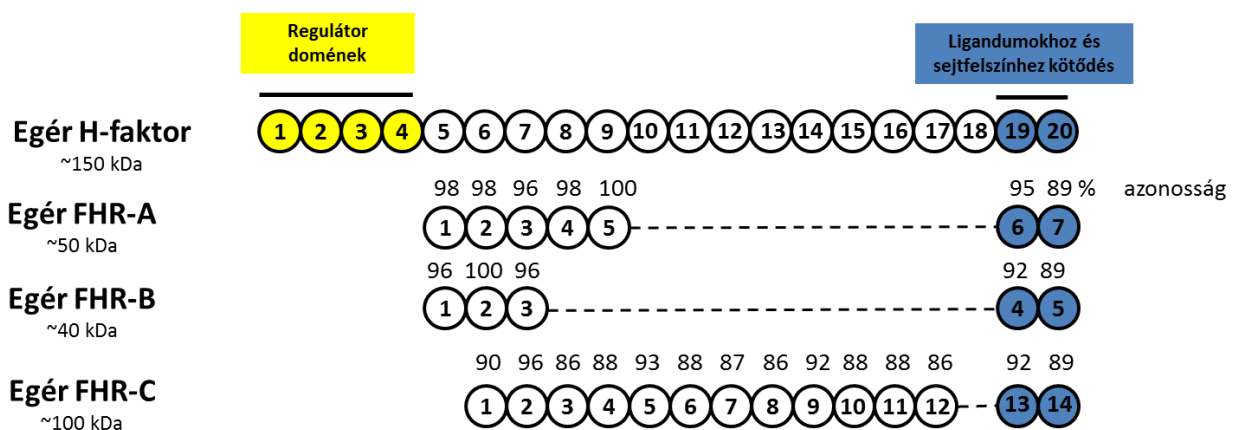
A *CFHR4* az egyetlen *CFHR* gén, amelynek két splice variánsa expresszálódik, az FHR-4A és az FHR-4B (98, 99), bár ez utóbbi léte újabban megkérdőjeleződött (100). Az FHR-4A-t 9 CCP domén alkotja (86 kDa), míg az FHR-4B 5 CCP doménből áll (43 kDa). Az FHR-3-hoz hasonlóan mindkét változathoz hiányzik az FHR-1, 2, 5-re jellemző N-terminális dimerizációs motívum (101). Minden FHR-4B domén jelen van az FHR-4A-ban is. Az FHR-4B CCP 1 szekvenciája 98%-ban azonos az FHR-4A CCP 1, az FHR-4B CCP 2-5 pedig 100%-ban azonos szekvenciájú az FHR-4A 6-9 doménjeivel (**1.5. ábra**). Az FHR-4A valószínűleg egy belső duplikációval jött létre, amire a CCP 1-4 és a CCP 5-8 nagymértékű szekvencia azonossága utal. Az FHR-4A és az FHR-4B együttes mennyiségét szérumban korábban 25 µg/ml koncentrációban határozták meg (102). Nemrég az FHR-4A-ra specifikus monoklonális ellenanyagokkal pontosították a szérumban mérhető koncentrációt, mellyel tízszer kisebb szérum szintet mértek az FHR-4A-ra ($2,55 \pm 1,46$ µg/ml). Csak az FHR-4B-re nehéz ellenanyagot előállítani, mivel több doménje is nagyon hasonló az FHR-4A doménjeivel. Az FHR-4B nem volt detektálható a plazmában különböző monoklonális ellenanyagokkal, amik viszont a rekombináns FHR-4B-t felismerték (100). Ez azt is jelentheti, hogy az FHR-4B szérum koncentrációja olyan alacsony, hogy nem mérhető a szérumból vagy hiányzik a plazmából (nem létezik). Az FHR-4 is képes a komplementrendszer központi molekulájához, a C3b-hez kötődni (96). Leírták, hogy képes a komplementet aktiválni, illetve kötődik a pentamer CRP-hez (103) valamint a pCRP kötés révén részt vesz a nekrotikus sejtek opszonizációjában (104).

1.3.5. FHR-5:

Az FHR-5 kilenc doménből épül fel, 65 kDa-os glikozilált plazmafehérje, melyet főleg a máj termel (105). Az FHR-5 esetében, hasonlóan, mint az FHR-1 és az FHR-2, az N-terminális első két doménnek a fehérje dimerizációjában van szerepe (75). 85-93%-ban homológok az FHR-5 CCP 1-2 doménjei az FHR-1 és az FHR-2 CCP 1-2 doménekkal (**1.7. ábra**). Ez az egyetlen olyan FHR molekula, melyben vannak olyan domének (CCP 3-7), melyek a H-faktor CCP 10-14 doménekkal szekvencia hasonlóságot mutatnak. Az FHR-5 *in vivo* főleg homodimer formában van jelen a szérumban (106). Az FHR-5 szérum koncentrációját korábban 3-6 µg/ml között írták le (107). Nemrégiben, 1,66 µg/ml átlag szérum koncentrációt mértek 115 egyénből egy újonnan fejlesztett FHR-5 ELISA-val (106). Az FHR-5 képes a C3b, heparin és a laminin-521, a glomeruláris alapmembránt alkotó extracelluláris mátrixfehérje kötésére a CCP 5-7 doméneken keresztül, valamint a fehérje ezen régiója képes nekrotikus sejtekhez is kötődni (108). A teljes fehérje PTX3-at is köt, valamint kötődik az extracelluláris mátrix extraktumhoz, a MaxGelhez. Az

FHR-5 az mCRP kötődéséért hatékonyan kompetál az FH-val, ezáltal megnövelve a komplement aktivációt CRP-n (109). Korábban leírták, hogy az FHR-5-nek kofaktor aktivitása van, azonban ezt nem fiziológias körülmények között vizsgálták (107); később igazolták, hogy az FHR-5 fehérjének nincs ilyen aktivitása (109). C5a receptorral transzfektált U937 riporter sejtek segítségével leírták, hogy az FHR-5 képes a klasszikus- és az alternatív út C5 konvertázát gátolni (110). Az FHR-5-öt egy olyan ellenanyaggal fedezték fel, mely a humán glomerulonefritikus veséből származó glomeruláris alapmembrán preparátummal immunizált egérből származott (105). Ezt az ellenanyagot használva, az FHR-5 jelenlétét különböző, glomeruláris immunlerakódásokban írták le különböző vesebetegségeken, pl.: IgA nefropátiában, lupus nefritiszben stb. (111). Különböző *CFHR5* génvariánsokat találtak aHUS-os betegekben és 'dense deposit disease' betegekben is (112–114). Nemrég leírták ciprusiak egy csoportjában a C3 glomerulonefritisz altípusát, mely a *CFHR5* génben lévő mutációval és a fehérje CCP 1-2 doménjeinek duplikációjával kapcsolatos, melyet *CFHR5* nefropátiának neveztek el (115).

1.4. Az egér H-faktor molekulacsalád



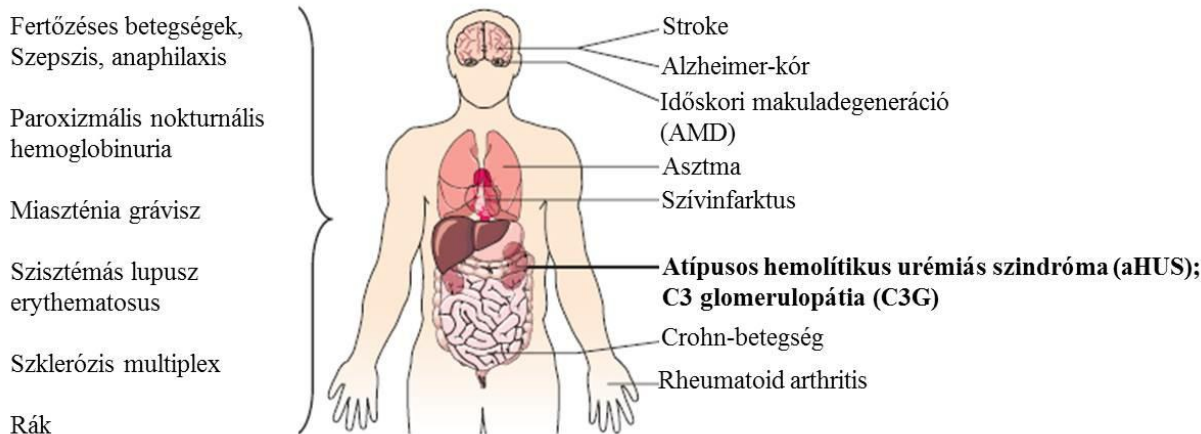
1.8. ábra: Az egér H-faktor és az egér FHR fehérjék. Az egér H-faktor molekulacsalád tagjai a H-faktor, FHR-A, FHR-B és FHR-C. Az egér H-faktor N-terminális CCP 1-4 doménjei felelnek a szabályozó funkciókért, C-terminális doménjeinek (kék színnel jelölve) a különböző felszínhez és ligandumokhoz való kötődésben van szerepük hasonlóan a humán H-faktorhoz. Az egér FHR fehérjék sem tartalmaznak az egér H-faktorról rokon szabályozó doméneket. Az egyes egér FHR domének feletti számok az egér H-faktorról mutatott aminosavszekvencia hasonlóságot jelzik százalékban kifejezve. (116)-os hivatkozás alapján.

A komplement aktivációt szabályozó gén klaszter egérből az 1F kromoszómán lokalizálódik, evolúciósan konzervált. Egérből az RCA génklaszter három csoportra bontható: az egyik a *Cfh* és az összes H-faktor rokon fehérjét kódoló géneket tartalmazza, a második a *C4bp*, *Daf1* és *Daf2*-t, a harmadik az 1-es típusú komplement receptorral rokon fehérjét (*Crry*), *Cr2* és az *Mcp*-t. Az egér H-faktor a humánhoz hasonlóan, szolubilis, egy láncú glikoprotein, 20 CCP doménből áll. SDS-PAGE-n hasonló mérettartományban mozog, mint a humán H-faktor (~155 kDa). A humán- és az

egér H-faktor kb. 62% szekvencia azonosságot mutat, de az egyes CCP domének között ennél magasabb fokú szekvencia-egyezés is megfigyelhető. A humán H-faktor fehérje családdal ellentétben, egérben nincs jelen a H-faktornak splice variánsa illetve a humán FHL-1-gyel homológ fehérje (116). Egérben több FHR molekulát azonosítottak cDNS szinten (117), a humántól való megkülönböztethetőség miatt ezeket a géneket betűkkel jelölik. Ezek közül fehérje szinten az FHR-B és FHR-C fehérjéket vizsgálták csak (118). Az *Fhra* és *Fhrd* valószínűleg csak pszeudogének, fehérje átírás nem történik róluk. Az FHR-B fehérje 5 CCP doménből áll, mely az egér H-faktor CCP 5, 6, 7, 19 és 20-as doménjeivel homológ (**1.8. ábra**). Az egér FHR fehérjék a humánhoz hasonlóan nem tartalmazzák a H-faktor N-terminális CCP 1-4 doménekkel homológ doméneket, de tartalmazzák például az egér és humán C3b kötődésért felelős doméneket (CCP 4-5), mely az egér H-faktor C-terminális doménjeivel (CCP 19-20) homológok (119). Ezen kívül az egér FHR fehérjéknek nincs a humán FHR-1, FHR-2 és FHR-5-tel homológ dimerizációs doménjük. Az *Fhre*-ről valószínűleg átíródik az FHR-E fehérje, de fehérje szinten nem tudták azonosítani. Az FHR-B és FHR-C fehérjék képesek kötődni C3b-hez, heparinhoz, HUVEC (humán köldökvéna endotél sejt vonal) sejtekhez egér szérumból (117, 118). Az egér FHR fehérjék szérum koncentrációit egyelőre nem vizsgálták. Korábban kimutatták, hogy az FHR-B jelen van különböző egér törzsekben (118) valamint az FHR-C hiányát autoimmun betegségekre való hajlamosító tényezőként hozták összefüggésbe (120). Jelenlegi tudásunk az egér FHR-ek funkciójáról meglehetősen kevés. Kutatócsoportunk legfrissebb eredményeit az FHR-B fehérjéről dolgozatomban a 4.3. fejezetben mutatom be.

1.5. Komplementrendszerrel kapcsolatos betegségek

A *CFH/CFHR* gén klaszterben azonosított génváltozatok, deléciók, duplikációk, génátrendeződések, különböző betegségekkel lehetnek kapcsolatosak (**1.9. ábra**), pl.: atípusos hemolitikus urémiás szindróma (aHUS), C3 glomerulopátia (C3G), időskori makuladegeneráció (AMD), szisztémás lupus erythematosus (SLE) (121).



1.9. ábra: Komplement rendszerhez kapcsolódó kóros állapotok. A komplementrendszer nem megfelelő szabályozása vagy hibás aktiválása következtében az immunrendszer saját szöveteinek károsodásához vezethet. Számos autoimmun és gyulladásos betegség kialakulása emiatt a komplementhez kapcsolódik. Míg ezen betegségek egy része specifikus szövetekben, szervekben lokalizálódik, addig számos betegség szisztémás, több szervet, szövetet is érinthet. (121)-es hivatkozás alapján, a teljesség igénye nélkül.

Az alábbi fejezetben két olyan betegségről – az aHUS és a C3G – írok részletesen, amelyeknek a patomechanizmusában a H-faktor molekulacsalád tagjainak szerepét részletesen vizsgálták és a dolgozatomban az eredmények értékeléséhez fontosak lehetnek.

1.5.1. Atípusos hemolítikus urémiás szindróma (aHUS)

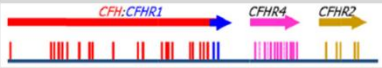
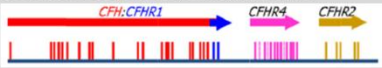
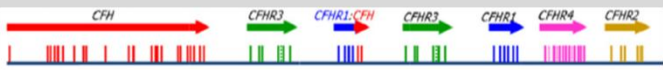





Az aHUS egy nagyon ritka vesebetegség (trombotikus mikroangiopátia), melyet hemolítikus anémia, károsodott vese funkció és alacsony vérlemezkesszám jellemez. Általában kisgyermekkorban jellemző nemtől függetlenül, idősebb korban elsősorban a nőket érinti. Az esetek 50%-ban végső stádiumú vesebetegséget okoz (122).

A típusos hemolítikus urémiás szindróma (HUS) az esetek 90%-ában Shiga toxint termelő *Escherichia coli* törzsek vagy *Streptococcus pneumoniae* fertőzés következtében alakul ki. A Shiga toxin központi szerepet játszik az endotél sejtek sérülésében és hozzájárul a betegség folyamatának elindításához. Az atípusos aHUS formát (kb. 10%) elsősorban az endotél sejtek felszínén kialakuló szabályozatlan komplement aktiváció okozza, bakteriális fertőzés nem jellemző a kialakulására. A HUS és az aHUS közti legfőbb különbség akkor vált nyilvánvalóvá, amikor felfedezték, hogy az aHUS kialakulásában szerepük van H-faktor mutációknak (123). Később más komplement fehérjéket (C3, B-faktor, I-faktor); szabályozó molekulákat (CD46) és a H-faktor molekulacsaládban kialakuló hibrid fehérjéket is összefüggésbe hozták a betegség kialakulásával (124). Nem csak komplement fehérjék mutációi, hanem H-faktor ellenes autoantitestek vagy a thrombomodulin (CD141) - melynek mind a komplement szabályozásban, mind a koagulációs rendszerben szerepe van - mutációi is szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában (125). Az aHUS betegek 30%-a valamilyen H-faktor mutációt (elsősorban

heterozigóta mutáció) hordoz, melyek a H-faktor különböző doménjeit érintik, elsősorban a C-terminális CCP 19-20 doméneket. Különböző C-terminális mutációkat rekombináns fehérjeként vizsgálva leírták, hogy a C3b, heparin, CRP és PTX3 interakcióban és endotél sejtekhez eltérő módon kötődtek (126, 127). Ezeket a mutációkat egy online adatbázisban is összegyűjtötték, illetve folyamatosan gyűjtik (www.fh-hus-org) (128). A H-faktor molekulacsaládra legjellemzőbb aHUS asszociált génátrendeződés a *CFHR3-CFHR1* gének homozigóta deléciója (84). Azokban a betegekben, ahol a *CFHR3-CFHR1* 80 kbp hosszú genomiális génszakasza homozigóta formában hiányzik, megnő a kockázata az aHUS kialakulásának, elsősorban H-faktor autoantitestek jelenlétének következtében (89).

Az aHUS betegek 10%-ban detektáltak H-faktor ellenes IgG autoantitesteket (129). Ezek az ellenanyagok a H-faktor C-terminálisához kötődnek, mintegy az ebben a régióban leírt mutációk hatását "utánózzák", ezáltal elrontva a H-faktor sejtfelszín felismerő tulajdonságát, kötődését és komplement szabályozását, mely az aHUS kialakulásához vezet (126). Ezek az autoantitestek különböző komplement fehérjék mutációival együtt lehetnek jelen (pl.: MCP (130) és I-faktor (131)).

A *CFHR3-CFHR1* deléció, azoknál is hajlamosító lehet aHUS-ra, akik nem rendelkeznek autoantitestekkel. Nemcsak a *CFHR3-CFHR1* gén deléció, hanem a *CFHR1-CFHR4* deléció (132) is asszociált az aHUS-sal, mindkét kombinációjú gén deléció szerepet játszik autoantitestek képzésében, mert az FHR-1 hiányával járnak. A legtöbb anti-H-faktor autoantitest felismeri az FHR-1-et, mert a fehérje C-terminálisa nagyon hasonló a megfelelő H-faktor doménekhez (133). Ez a tény lehet a legfontosabb annak megértésekor, hogy a legtöbb (kb. 85%) H-faktor autoantitestre pozitív aHUS beteg *CFHR1* deficiens. A *CFHR1* gén hiánya az, ami az autoimmun, H-faktor autoantitest pozitív aHUS-ra hajlamosít. Az hogy a deléció az autoantitestek képződéséhez hogyan járul hozzá egyelőre még nem tisztázott. Különböző FH::FHR és FHR::FH hibrid fehérjéket is azonosítottak aHUS-hoz asszociáltan (**1. 10. ábra**).

Gén	Fehérje	Referencia
CFH(Exon 1-21):CFHR1(Exon 5-6) hibrid gén 	FH(CCP 1-18)-FHR-1(CCP 4-5)	Venables és mtsai., 2006
CFH(Exon 1-22):CFHR1(Exon 6) hibrid gén 	FH(CCP 1-19)-FHR-1(CCP 5)	Maga és mtsai., 2011
CFHR1(Exon1-4):CFH(Exon 22-23) hibrid gén 	FHR-1 (CCP 1-3)-FH (CCP 19-20)	Eyler és mtsai., 2013
CFHR1 (Exon 1-5):CFH(Exon 23) hibrid gén 	FHR-1 (CCP 1-4)-FH (CCP 20)	Valotti és mtsai., 2014
CFH(Exon 1-22):CFHR3(Exon 1-6) hibrid gén 	FH (CCP 1-19)-FHR-3 (CCP 1-5)	Francis és mtsai., 2012
CFH(Exon1-20):CFHR3(Exon 1-6) hibrid gén 	FH (CCP 1-17)-FHR-3 (CCP 1-5)	Challis és mtsai., 2016
CFHR1 és CFHR3 deléció 	FHR-3-FHR-1 deficiencia	Zipfel és mtsai., 2007
CFHR1 és CFHR4 deléció 	FHR-1-FHR-4A deficiencia	Abarrategui-Garrido és mtsai., 2009 Moore és mtsai., 2010

1.10. ábra: A CFH/CFHR1-5 géncsalád genetikai módosulásai aHUS-os betegekben. (124)


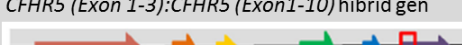
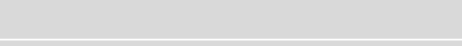

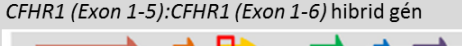
Ilyenek például a H-faktor CCP 1-18 domének és az FHR-1 CCP 4-5 domének alkotta hibrid fehérje (134); a H-faktor CCP 1-19 és az FHR-1 CCP 5 hibrid fehérje (135); az FHR-1 CCP 1-3 és a H-faktor CCP 19-20 hibrid fehérje (136); az FHR-1 CCP 1-4 és a H-faktor CCP 20 hibrid fehérje (137); a H-faktor CCP 1-17 és az FHR-3 CCP 1-5 hibrid fehérje (138), valamint a H-faktor CCP 1-19 és az FHR-3 CCP 1-5 alkotta hibrid fehérje (139). Az FHR-1 és az FHR-3 patológiásan betöltött szerepe nemcsak különböző vesebetegségekben ismert. A $\Delta CFHR3$ - $CFHR1$ deléció előfordulása IgAN-ban (140) és SLE-ben (141) is bizonyított. A különböző FHR-1 izoformák is asszociálódhatnak betegségekkel, az FHR-1*A AMD-ben rizikó faktor (142), az FHR-1*B pedig aHUS-ban (73). Fontos kiemelni, hogy a $CFH::CFHR1$ hibrid gént hordozó betegekben a $CFHR1$ és $CFHR3$ gének deletálódtak; a $CFHR1::CFH$ hibrid gént hordozó allélon a $CFHR3$ gén dupla kópiában van jelen (124).

Az aHUS kezelésére az Amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hatóság (FDA) 2011-ben engedélyezte az eculizumab nevű, anti-C5 terápiás monoklonális ellenanyagot, mely a C5 molekulát köti. Megakadályozza annak hasítását C5a anafilatoxinná és C5b opszoninná, így

meggátolva a MAC kialakulását (143). A C5 gátlásával viszont meningococcus fertőzések jelentkezhetnek a betegekben, melyeket vakcinálással, antibiotikumokkal próbálnak megelőzni.

1.5.2. C3 glomerulopátia

A C3 glomerulopátia (C3G) egy ernyőfogalom, mely különböző vesebetegségeket foglal magába. A betegség kialakulásában autoimmun- vagy genetikai okok játszhatnak szerepet. A betegség egyértelmű leírásakor C3 hasítási termékek lerakódását detektálták immunglobulinok jelenléte nélkül valamint a komplementrendszer alternatív útvonalának hiperaktivációját (144). A C3b tartalmú immunlerakódásokat a komplementrendszer alternatív útvonalának hibás szabályozása okozza mind a folyadék fázisban, a plazmában vagy közvetlenül a glomerulus sejtek felszínén vagy a glomeruláris alapmembránon. Ez az aktiváció eredményezi a C3-nak a glomerulus sejtekben vagy a glomeruláris alapmembránon való lerakódását. A C3G a komplementrendszer alternatív útvonalának, a C3b amplifikáció hibás szabályozásának következményeként alakul ki (145). Szövettani vizsgálatokra alapozva különböző betegcsoportokat különíthetünk el a C3G-n belül: DDD (dense deposit disease/MPGN II), ahol specifikus, elektrondenz lerakódások vannak a glomeruláris alapmembránban vagy a membrán felszínén. Egy másik C3G betegcsoport a C3 glomerulonefritisz, ahol nincsenek C3G-hez hasonló lerakódások (146).

Gén	Fehérje	Referencia
CFHR2 (Exon 1-3):CFHR5 (Exon1-10) hibrid gén 	FHR-2 (CCP 1-2)-FHR-5 (CCP 1-9)	Chen és mtsai., 2014
CFHR5 (Exon 1-3):CFHR5 (Exon1-10) hibrid gén 	FHR-5 (CCP 1-2)-FHR-5 (CCP 1-9)	Gale és mtsai., 2010 Medjeral és mtsai., 2014
CFHR5 (Exon 1-3):CFHR2 (Exon 1-5) hibrid gén 	FHR-5 (CCP 1-2)-FHR-2 (CCP 1-4)	Zhang és mtsai., 2013
CFHR1 (Exon 1-5):CFHR1 (Exon 1-6) hibrid gén 	FHR-1 (CCP 1-4)-FHR-1 (CCP 1-5)	Tortajada és mtsai., 2013
CFHR3 (Exon 1-3):CFHR1 (Exon 1-6) hibrid gén 	FHR-3 (CCP 1-2)-FHR-1 (CCP 1-5)	Malik és mtsai., 2012

1.11. ábra: C3G betegekben azonosított CFHR hibrid fehérjék. (145)–ös hivatkozás alapján módosítva.

A C3G különböző genetikai- és autoimmun faktorokkal asszociált, melyek befolyásolják a C3 konvertázt, a C3 konvertázt reguláló fehérjéket. A hiperaktiváció elsősorban a C3 konvertázt stabilizáló autoantitestek pl.: C3 nefritikus faktor (C3Nef) (39), (147); anti-B-faktor (148); anti-C3b ellenanyagok (149); C5 nefritikus faktor (C5 konvertázt stabilizáló autoantitest) valamint H-faktor ellenes autoantitestek jelenlétének következtében alakul ki, mely utóbbiak a fehérje N-terminális doménjeihez kötődve megakadályozzák a C3bBb konvertáz H-faktor közvetített

szabályozását (150). H-faktor ellenes autoantitestek elsősorban a fehérje funkcionális doménjeit (a regulátor aktivitásért felelős N-terminális doméneket) érintik (147). Ritkábban, különböző C3G-re hajlamosító genetikai tényezőket írtak le betegekben pl.: H-faktor (*CFH*) mutáció (151–153), *CFHR1* mutációk (154), *CFHR5* gén mutációkat (115), (155, 156) és különböző FHR hibrid fehérjéket: FHR3::*FHR1* (157), FHR2::*FHR5* (158), FHR5::*FHR2* (159), FHR1::*FHR5* (160) (**1.11. ábra**). A H-faktor mutációi minőségi- és mennyiségi H-faktor deficiencia kialakulásához vezethetnek, illetve különböző betegségek kialakulásával párosulhatnak (161). Mutációk okozhatnak a H-faktor szekréciójában is zavart vagy korai stop kodont, melyek rövidebb H-faktort vagy a fehérje hiányát eredményezik (162, 163).

Általánosan elmondható, hogy a H-faktor N-terminális regulátor doméneket érintő mutációk és autoantitestek az alternatív út hibás szabályozását okozzák a plazmában, ami elsősorban C3 fragmentumok lerakódását okozzák a glomerulusokban és C3G-vel asszociáltak. A különböző felszínek felismeréséért felelős C-terminális doméneket érintő mutációk és az ezekben a doméneken kötődő autoantitestek elsősorban a felszíneken okoznak az alternatív út működésében zavart pl.: a glomeruláris endotéliumon vagy a glomeruláris alapmembránon, mely aHUS-sal asszociált (124), (145).

2. Célkitűzések:

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer fontos molekuláris eleme. Legfőbb feladata a szervezetbe jutott kórokozók hatékony eliminálása, gyulladásos folyamatok szabályozása. A komplementrendszer nem megfelelő működésének szerepe van különböző betegségek kialakulásában is. Kutatásaim középpontjában a komplement alternatív út egyik fő szabályozó molekulájának, a H-faktornak, valamint a H-faktor molekulacsalád tagjainak funkcionális vizsgálata állt. Doktori munkám során a célkitűzéseim a következők voltak:

1. Két különböző vesebetegséggel (C3G majd aHUS) megnyilvánuló, heterozigóta W198R H-faktor mutáció funkcionális jelentőségét terveztük vizsgálni, mivel egyrészt az irodalomban kevés N-terminális H-faktor mutáció funkcionális jellemzéséről van csak adat, másrészt az N-terminális mutációkat elsősorban C3G-vel hozták összefüggésbe. Ezért célul tűztük ki mutáns FH1-4_{W198R} fragmentum előállítását és a vad típusú FH1-4 H-faktor fragmentummal való összehasonlítását, hogy kiderítsük, a mutáció hogyan befolyásolja a H-faktor komplement szabályozó funkcióját. A mutáns H-faktor fragmentum C3b kötődését, kofaktor- és konvertáz bomlást gyorsító aktivitását terveztük vizsgálni.

2. A komplementrendszer alul- illetve túlműködését a *CFH/CFHR* gén klaszterben kialakult génváltozatok illetve a H-faktor ellen képződő autoantitestek befolyásolják, melyek következményeként különböző betegségek alakulhatnak ki, például: aHUS, C3G. A komplementrendszerrel kapcsolatos betegségek közül az aHUS kezelésére egyelőre az eculizumab az egyedüli engedélyezett biológikum. Célul tűztünk ki egy új, H-faktor alapú hibrid fehérje (CRIg-IgV_{FH18-20}) mint potenciális komplementgátló molekula funkcionális vizsgálatát különböző komplement aktivációs esszéekben.

3. A humán FHR fehérjék kutatása a különböző betegségekkel való, genetikai vizsgálatokban azonosított kapcsolat miatt jelentős érdeklődésre tart számot. Ahhoz, hogy az FHR fehérjék fiziológiás és patológiás funkcióit *in vivo* is vizsgálni és értelmezni lehessen különböző állatmodellek segítségével, célul tűztük ki az egér FHR-B molekula funkcionális vizsgálatát. Hipotézisünk szerint az egér FHR-B az emberi FHR molekulák esetében azonosított ligandumok kötésére és funkcionális aktivitásra képes. Ezért a rekombinánsan előállított FHR-B fehérje C3b-vel, pentraxin molekulákkal, extracelluláris mátrixszal való interakcióját, valamint az FHR-B komplement aktiváló képességét nekrotikus sejteken és sajátos hasonló, birka vörösvérsejteken terveztük vizsgálni.

3. Anyag és módszer

3.1. Sejttípusok

A20: egér eredetű, érett fenotípusú B-limfóma sejtvonal (ATCC - TIB-208). A sejtvonalat 10% FCS-t (magzati marhaszérum) tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban tenyésztettük 37°C-os CO₂-termosztátban.

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell): Humán köldökvéna endotél sejtvonal (Lonza). A sejtvonalat 5% FCS-t tartalmazó EGM-2 tápoldatban (Lonza) tenyésztettük 37°C-os CO₂-termosztátban.

Jurkat: Tumoros T-sejtvonal (ATCC - TIB-152), a sejtvonalat 10% FCS-t tartalmazó RPMI-1640 tápoldatban tenyésztettük 37°C-os CO₂-termosztátban.

Sf9: *Spodoptera frugiperda*, a fehérje termeléshez alkalmazott rovar sejtvonal (Invitrogen). A sejtvonalat 10% FCS-t tartalmazó TNM-FH tápoldatban tenyésztettük 27°C-os száraz termosztátban.

3.2. Pufferek, oldatok

Komplett RPMI tápfolyadék – pH – 7,2 (Sigma Aldrich):

RPMI por (1000 ml ioncserélt vízben beoldva); NaHCO₃, 2 mg/ml; Na-piruvát, 0,22 mg/ml; L-glutamin, 2 mM; 50 µM merkaptóetanol (A 20 sejtek esetén); Streptomycin, 0,1 mg/ml; Penicillin, 100 U/ml

TNM-FH tápfolyadék – pH – 6,1 (Sigma Aldrich):

TNM-FH por (1000 ml ioncserélt vízben beoldva); Na-bikarbonát, 0,25g/l; FCS, 10%; Gentamicin szulfát, 10 µg/ml (Lonza); Amphotericin B, 0,25 µg/ml (Lonza)

Insect-Xpress tápfolyadék – pH – 6,1 (Lonza):

Gentamicin 10 µg/ml; Amphotericin B 0,25 µg/ml

EGM-2 tápfolyadék – (Lonza):

hEGF (humán epidermal growth factor) 0,1%; VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 0,1%; R3-IGF (R3-Insulin-like Growth Factor-1) 0,1%; aszkorbinsav 0,1%; hidrokortizon 0,04%; hFHF-β (human Fibroblast Growth Factor-Beta) 0,4%; FCS 5%; Gentamicin 0,1 %; Amphotericin-B 0,1%

Foszfát puffer (DPBS) pH – 7,2 (Lonza):

NaCl, 8g/l; KCl, 0,2g/l; KH₂PO₄, 0,2 g/l; Na₂HPO₄·7H₂O, 2,16 g/l

Ca²⁺ – Mg²⁺ tartalmú foszfát puffer (DPBS) pH – 7,2 (Lonza):

NaCl, 8g/l; KCl, 0,2g/l; KH₂PO₄, 0,2 g/l; Na₂HPO₄·2H₂O, 2,16 g/l; CaCl₂·2H₂O, 0,13 g/l;
MgCl₂·6H₂O, 0,1 g/l

Veronál puffer (VBS) pH – 7,3:

CaCl₂·2H₂O, 0,882 g/l; MgCl₂·6H₂O, 4,066 g/l; NaCl, 8,5 g/l; Na-dietilbarbiturát, 0,376 g/liter;
5,5-dietil-barbitursav, 0,576 g/l

VBS-Mg²⁺-EGTA pH – 7,3:

Veronál puffer; 10 mM MgCl₂; 10 mM EGTA

Tris puffer (TBS) pH – 7,4:

Tris, 1,21 g/l; NaCl, 8,18 g/l; CaCl₂, 0,22 g/l; MgCl₂, 0,095 g/l

Alsever puffer – pH 7,4:

Citromsav, 0,55 g/l; Nátrium-citrát, 8 g/l; D-glükóz, 20,5 g/l; NaCl, 4,2 g/l

TAE puffer (Tris-acetát-EDTA) – pH 7,2:

Tris, 4,84 g/l; 10 mM EDTA; 1,92%-os ecetsav

LB-médium: LB por, 20 g/l

LB-agar: LB por, 20g/l; Agar, 15g/l

SDS-PAGE-hez futtató puffer:

Tris, 3g/l; SDS (0,1%), 10 ml/l; Glicin, 14,4 g/l

Nem redukáló mintapuffer (5x) SDS-PAGE-hez (pH – 6,8):

Tris-HCl, 313 mM; Glicerol, 50 v/v%; SDS, 5 v/v%; brómfenol kék, 0,002 v/v%

Redukáló mintapuffer (5x) SDS-PAGE-hez (pH – 6,8):

Tris-HCl, 313 mM; Glicerol, 50 v/v%; SDS, 5 v/v%; brómfenol kék, 0,002 v/v%; 2-merkaptoetanol, 5 v/v%

Lízis puffer: Proteáz inhibitor koktél (Complete Ultra tableta, Roche), 1% Triton X-100, DPBS

Ezüstfestéshez használt oldatok:

- Fixáló oldat: 30 v/v% etanol, 30 v/v% ecetsav, desztillált víz
- 20 v/v%-os etanol oldat
- Érzékenyítő oldat: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,4 g/l
- Ezüst-nitrát oldat: AgNO_3 , 2 g/l
- 0,1 M Nátrium-karbonát oldat
- Előhívó oldat: 0,1 M nátrium karbonát, 94,8 v/v%; érzékenyítő oldat, 5 v/v%; formaldehid 0,2 v/v%
- STOP oldat: Tris, 50 g/l; ecetsav, 40 v/v%
- Gélszárító oldat: etanol, 10 v/v%; glicerin, 20 v/v%

Ellenanyag affinitás kromatográfiához használt oldatok:

- Kötő puffer pH-8,3:
NaHCO₃, 0,2 M; NaCl, 0,5 M
- „A” oldat pH-8,3:
Etanolamin, 0,5 M; NaCl, 0,5 M
- „B” oldat pH-4:
Nátrium-acetát, 0,1 M; NaCl, 0,5 M
- Elúciós puffer pH-2,7:
Glicin, 0,1 M; HCl a pH beállításához
- „Storage” (tároló) puffer pH - 7,0:
Na₂HPO₄, 0,05 M; NaN₃, 1%

3.3. Ellenanyagok

Specifititás	Eredet	Gyártó
anti-humán H-faktor (antiszérum)	kecske	Merck
anti-humán B-faktor (antiszérum)	kecske	Merck
anti-humán H-faktor (A254)–klón:90X	egér	Quidel
anti-humán H-faktor (OX24)	egér	Santa Cruz
anti-humán H-faktor (C18/3)	egér	Enzo
anti-egér H-faktor (5C2)	patkány	(164)
anti-oligo-hisztidin (His-tag) (klón:HIS.H8)	egér	Thermo Fischer
biotinilált anti-humán PTX3 (affinitás tisztított)	nyúl	R&D System
biotinilált anti-egér PTX3 (affinitás tisztított)	kecske	R&D System
anti-humán CRP (antiszérum)	kecske	Sigma Aldrich
anti-humán mCRP (klón: CRP-8)	egér	Sigma Aldrich
anti-humán pCRP (klón: C5)	egér	Antibodies-online
anti-humán C1q (antiszérum)	kecske	Merck
anti-CRIg-IgV (antiszérum, klón: SA6213)	nyúl	(Házon belül)
anti-egér C3, FITC (affinitás tisztított F(Ab') ₂)	egér	Cappel
anti-patkány IgG, A488 (affinitás tisztított IgG)	szamár	Invitrogen
anti-egér C3, HRPO (affinitás tisztított IgG)	egér	MP Biomedicals
anti-humán C3, HRPO (affinitás tisztított)	kecske	MP Biomedicals
anti-egér Ig, HRPO (affinitás tisztított)	kecske	Dako
anti-egér Ig, HRPO (affinitás tisztított)	patkány	Thermo Fischer
anti-kecske Ig, HRPO (affinitás tisztított)	nyúl	Dako
anti-nyúl Ig, HRPO (affinitás tisztított)	sertés	Dako

HRPO: Torma peroxidáz;

FITC: Fluoreszcein-izotiocianát;

A488: Alexa-488

3.4. Fehérjék, reagensek, primerek

Név	Gyártó	Név	Gyártó
Abelcet	Gilead Sciences	humán C-reaktív fehérje	Merck
Agar	Appllichem	humán D-faktor	Merck
Agaróz	Lonza	humán I-faktor	Merck
Akrilamid (30%)	Sigma Aldrich	humán properdin (P-faktor)	Merck
AmBisome	Gilead Sciences	human PTX3	R&D System
CrEL	Sigma Aldrich	LB por	Sigma Aldrich
egér C-reaktív fehérje	R&D System	FCS	Euroclone
egér FH15-20	R&D System	Szérum albumin (BSA)	Appllichem
egér Matrigel	Sigma Aldrich	Szérum albumin (HSA)	Sigma Aldrich
egér PTX3	R&D System	Tejpor	Roth
humán H-faktor	Merck	TMB	Biolegend
humán B-faktor	Merck	Tween-20	Sigma Aldrich
humán C1q	Merck	Zimozán	Sigma Aldrich
humán C3b; C3d; C3	Merck		

Oligó neve	Szekvencia (5'-3')
optFH_CCP1_fw	agaataCTGCAGGACTGCAACGAACTGCC
optFH_CCP4_rev	ataataCCCGGGCTCGCAGCTTGGG
pBSV_fw	TTTACTGTTTTCGTAACAGTTT
pBSV_rev	TTCCATCCAACGACAAGCTTCA

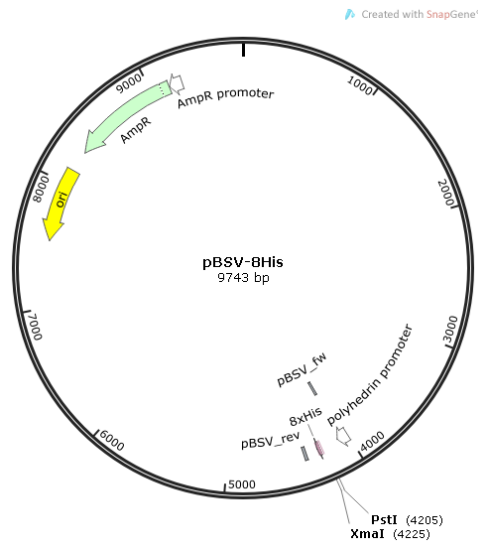
3.5. Rekombináns fehérjék

3.5.1. Rekombináns fehérjék előállítás

A kísérleteinkben használt FH1-4_{WT}, a CRIG-IgV, CRIG-IgV_FH18-20 valamint az egér FHR-B fehérjék már rendelkezésünkre álltak (Dr. Mario Hebecker állította elő).

A kodon optimalizált FH1-4_{W198R}-t szintetikusán állítottuk elő (IDT, Coralville, IA, USA). A bakulovírus expressziós rendszerre optimalizált (opt) optFH_CCP1_fw és optFH_CCP4_rev primerekkel (3.4. fejezet) 2 µM végkoncentrációban (melyek a megfelelő hasítóhelyeket tartalmazták) Phusion Flash master mix-el (Thermo Fischer, Waltham, USA), amely tartalmazta a PCR reakcióhoz szükséges puffert, dNTP-eket és polimeráz enzimet, amplifikáltuk a DNS-t a következő beállításokkal: kezdeti denaturáció 98°C 10 s, denaturáció 98°C 2 s, anelláció 70°C 5 s, extenzió 72°C 25 s (az amplifikálandó szakasz méretétől függően 15 s/1 kilobázis) 35 cikluson át, majd a végső extenzió 72°C 5 perc. Ezt követően hatszoros töménységű DNS festéket hozzáadva a mintákhoz, 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a termék tisztaságát és méretét. A PCR terméket kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével történő tisztítást követően PstI-HF (NEB, Anglia) és az XmaI (NEB, Anglia) restriktív endonukleáz enzimekkel 2 órán keresztül 37°C-on hasítottuk CutSmart pufferben (NEB), majd 65°C-on 20 percig hőinaktiváltuk a mintákat, ezzel leállítva a hasító enzimek működését. Ezt követően ismét PCR tisztító kit segítségével tisztítottuk a DNS-t. 20 µl 65°C-os steril desztillált vízzel eluáltuk a DNS-t, a koncentrációját Nanodropon (Thermo Fischer) megmértük.

A pBSV-8His expressziós vektort (**3.1. ábra**) az inszerttel megegyező restriktív endonukleázokkal emésztettük, mellyel 20 µl térfogatban ligáltuk össze (Quick Ligation kit, NEB, Anglia) a hasított inszertet a gyártó utasítása szerint. Ezt követően a ligált plazmid konstrukciót kompetens *E. coli* sejtekbe (Zymo Research, USA) transzformáltuk és 100 µg/ml koncentrációjú ampicillin antibiotikumot tartalmazó agar lemezre szélesztettük őket (**3.2. ábra**). A felnőtt telepekből minikultúrát készítettünk (50 µg/ml ampicillin tartalmú LB-médiummal), amiből plazmid izoláló kit segítségével (Qiagen, Hilden, Németország) kinyertük az inszertet tartalmazó pBSV expressziós vektort. Vektorra specifikus primerekkel 2 µM végkoncentrációban (pBSV_fw és pBSV_rev) Taq polimerázt tartalmazó master mix-el (Thermo Fischer, Waltham, USA) amplifikáltuk a plazmidot a következő beállításokkal: kezdeti denaturáció 95°C 1 perc, denaturáció 95°C 30 s, anelláció 55°C 30 s, extenzió 72°C 1,5 perc (az amplifikált termék méretétől függően 1 perc/1 kilobázis) 35 cikluson át, majd a végső extenzió 72°C 5 perc. Ezt követően 1%-os agaróz gélen ellenőriztük a termék tisztaságát és méretét.

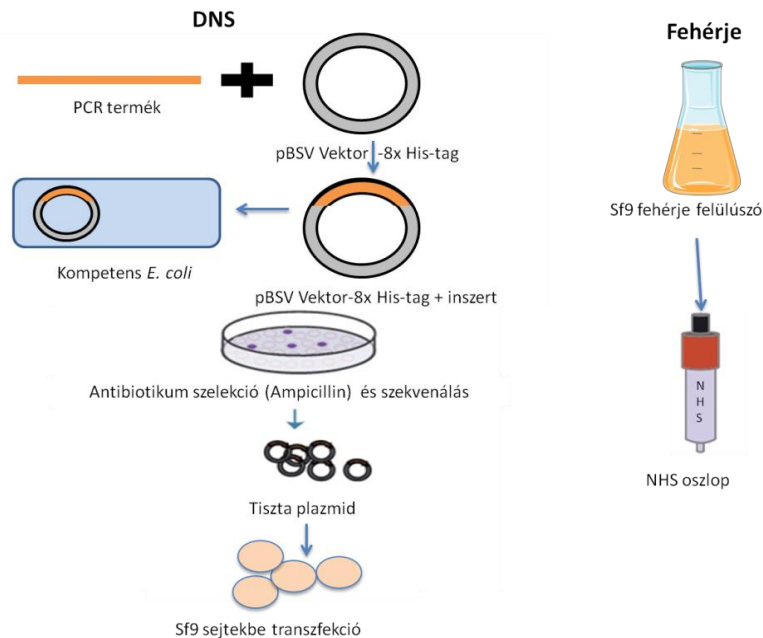


3.1. ábra: A pBSV-8His plazmid sematikus ábrázolása. A pBSV-8His plazmid mérete 9743 bp. A vektorképen láthatóak a pBSV primerek, az ampicillin rezisztencia génszakasz, az ori régió, az enterokináz hasítóhelyek valamint a nyolc hisztidin aminosavból álló His-tag. A vektor térképet a SnapGene programmal készítettük el.

Az előállított plazmid konstrukciókat minden esetben szekvenálással (Biomi, Gödöllő, Magyarország) ellenőriztük vektor specifikus pBSV_fw és pBSV_rev primerekkel. A szekvenálás során kapott szekvenciákat a Finch TV program valamint a Clustal Omega webeszköz (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) segítségével ellenőriztük. A verifikált plazmid konstrukciókat flashBAC bakulovírus DNS-sel kotranszfektáltuk (OET, Oxford, Anglia), a gyártó utasítása alapján Sf9 rovar sejtekbe. A transzfekción során a plazmidban levő inszert homológ rekombinációval kerül be a bakulovírus DNS-be. A transzfekcións kultúráról 5 nap után leszedtük a felülűszót, a transzlált fehérjét His-tag specifikus ellenanyaggal, valamint a fehérjére specifikus poliklonális ellenanyaggal is (kecske anti-H-faktor) Western bloton ellenőriztük. A fehérjék várható méretét a ProtParam webeszköz segítségével becsültük (<https://www.expasy.org/protparam>).

3.5.2. Rekombináns fehérjék tisztítása

Az Sf9 rovarsejteket TNM-FH médiumban tenyésztettük. A vírusfelülűszó és a rekombináns fehérje termeléséhez a sejteket szérumentes Insect Xpress médiumba tettük át. A vírusfelülűszót 75 cm² méretű flaskákban az InsectXpress médiummal 1:1 arányban adva 3-5 napig termeltettük. A fehérje termelést 175 cm² méretű flaskákban a vírusfelülűszót az InsectXpress médiummal 1:10 arányban adva 6-7 napig végeztük.



3.2. ábra: A plazmid konstrukciók- és a fehérje termékek előállítása: Megfelelő primerekkel PCR reakcióval felszaporítottuk az expressziós vektorba (pBSV-8His) ligálandó DNS szakaszt, majd kompetens *E.coli* sejtekbe transzformáltuk. A plazmidban levő antibiotikum rezisztencia alapján agar lemezen szelektáltuk azokat a klónokat, melyek felvették a plazmidot. Az expressziós vektor szekvenciáját szekvenálással ellenőriztük, majd linearizált Baculo DNS-sel Sf9 rovarsejtekbe kotranszfektáltuk. A sejtek által termelt fehérje felülűszókat ellenanyag affinitás kromatográfiával tisztítottuk NHS oszlopon, melyre kovalensen kötöttük fel a korábban protein-G oszlopon tisztított anti-humán H-faktor ellenanyagot. A fehérjét pH eltolással eluáltuk.

Az FH1-4_{W198R} fehérje tisztítását ellenanyag affinitás kromatográfiával végeztük. A fehérje tisztítás során protein-G oszlopon (GE Healthcare) poliklonális humán H-faktor antiszérumból tisztítottuk az IgG frakciót a gyártó utasítása alapján. Az eluált IgG-t kötőpufferrel szemben bekoncentráltuk, majd az IgG koncentrációját Nanodropon ellenőriztük. Az IgG-t a gyártó utasítása alapján NHS (N-hidroxiszukcinimid) oszlopra (GE Healthcare) kovalensen kötöttük fel a 3.2. fejezetben felsorolt pufferek segítségével. Az Sf9 sejtek által termelt felülűszót DPBS-sel 1:2 arányban hígítva, perisztaltikus pumpa segítségével átáramoltattuk az NHS oszlopon 4°C-on. Ezt követően DPBS-sel mostuk az oszlopot, majd Nanodropon ellenőriztük, hogy van-e még fehérje az átfolyó oldatban. Amennyiben 280 nm-en 0,0 OD értéket kaptunk, 1 ml-ként, 0,1M glicin-HCl oldattal eluáltuk a fehérjét. A frakciókhoz 1M-os pH 9,0-s Tris-t adtunk, hogy a pH-t 7 körülire állítsuk vissza. Az egyes fehérje frakciókat, valamint a kiindulási felülűszóból, az oszlopon átfolyt felülűszóból, illetve a mosó frakcióból vett mintákat Western-bloton His-tag specifikus monoklonális ellenanyaggal valamint H-faktor specifikus ellenanyaggal ellenőriztük. A megfelelő mérettartományba eső és tiszta fehérje frakciókat Amicon-ultra koncentrátor csőben bekoncentráltuk. A fehérje koncentrációját BCA kit segítségével határoztuk meg. A bekoncentrált fehérjék tisztaságát PAGE után ezüsfestéssel ellenőriztük.

3.5.3. Rekombináns fehérjék tisztaságának ellenőrzése ezüsfestéssel

Az elektroforézist követően a gélt 30 percig fixáltuk a fixáló oldatban, majd 10 percig 20 v/v%-os etanol oldatban inkubáltuk. Deionizált vízzel történő 10 perces mosást követően nátrium-tioszulfát oldattal 1 percig érzékenyítettük a gélt, majd mosást követően ezüst-nitrát oldattal 30 percig inkubáltuk. Ezt követően kétszer leöblítettük a gélt deionizált vízzel, majd az előhívó oldatba helyeztük és a kívánt színreakció eléréséig inkubáltuk. Ezt követően egy percig stop oldatba raktuk át a gélt leállítva a reakciót, végül a gélt az erre alkalmas keretben gélzsáritó oldattal megszáritottuk.

3.6. Kötődés vizsgálati esszék

3.6.1. ELISA

Az ELISA mérések során a fehérjéket (pl.: C3b, egér CRP) 5 µg/ml koncentrációban 50 µl térfogatban mikrotitráló lemezen (Greiner, High binding) DPBS-ben egy órán át, szobahőmérsékleten immobilizáltuk. A mintákat minden lépést követően 100 µl 0,05% Tween-20 detergenst tartalmazó DPBS-sel mostuk. Az immobilizált minták blokkolása minden esetben 100 µl DPBS-0,05% Tween-20-ban beoldott 5% BSA oldattal szobahőmérsékleten egy órán át történt. A megfelelő arányban DPBS-0,05% Tween-20-ban behígított elsődleges és/vagy másodlagos ellenanyagokat 50 µl végtérfogatban szobahőmérsékleten, egy órán át inkubáltuk. A kötődött antitesteket H₂O₂ szubsztrát és 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) kromogén hozzáadásával mutattuk ki. A színreakciót 2N H₂SO₄ hozzáadásával állítottuk le, az abszorbanciát 450- és 620 nm-en olvastuk le Multiskan spektrofotométerrel (Thermo Scientific). A pontos kísérleti beállítások és inkubálási körülmények az adott eredményt bemutató ábraszövegben kerülnek ismertetésre.

3.6.2. Felszíni plazmon rezonancia (SPR)

Az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjék C3b kötő képességét felszíni plazmon rezonancia (SPR) módszerrel is vizsgáltuk (a mérést Nicolas Merle és Dr. Lubka T. Roumenina végezték el) ProteOn XPR36 készüléken (BioRad). Az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjéket pH 4,0 nátrium-acetát pufferben hígítottuk és párhuzamosan immobilizáltuk a GLC chip felszínére standard amin kötődés segítségével a gyártó utasítása szerint. Az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjék ~3500 RU mennyiségben kötődtek a chip felszínére. Az analitból (C3b) hígítási sort készítettünk 0,005% Tween 20-t tartalmazó DPBS-ben (pH 7,2), az áramlási sebesség 30 µl/perc volt. Az asszociáció 300 s, a disszociáció 600 s hosszú volt. Az eredményeket a ProteOn szoftver segítségével elemeztük.

3.6.3. Áramlási citometria

Az FHR-B sejt felszínhez való kötődését nekrotikus humán Jurkat T sejteken (ATCC - TIB-152) áramlási citofluoriméter (FACS) segítségével vizsgáltuk. A sejtek nekrotizálása 65°C-on 30 percig 400 rpm-en rázatva sejtenyésző médiumban történt. A nekrotizálást propidium jodid festéssel ellenőriztük. Mintánként 10^5 sejtet inkubáltunk 20 µg/ml FHR-B-vel 30 percig 37°C-on. A kötődött FHR-B-t monoklonális 5C2 ellenanyaggal (1:100 v/v%) és mosás után Alexa647-tel konjugált kecske anti-patkány Ig (1:100 v/v%) ellenanyaggal jelöltük. A jelöléseket FACS pufferben 4°C-on, 15 percig végeztük, a sejteket FACS pufferben mostuk (1000 g, 4°C, 5 perc). FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg, Németország) áramlási citométerrel mintánként 10 000 sejtet mértünk le. Az eredményeket FlowJo szoftver (TreeStar, Ashland, OR, USA) segítségével értékeltük ki.

3.7. Kompetíciós esszé

Az FHR-B és a humán H-faktor közötti kompetíciót ELISA módszerrel vizsgáltuk. 5 µg/ml humán C3b-t 50 µl térfogatban immobilizáltunk DPBS-ben mikrotitráló lemezen (Greiner, High binding). A mintákat minden lépést követően 100 µl 0,05% Tween-20 detergenst tartalmazó DPBS-sel mostuk. Blokkolást (5% BSA, DPBS-0,05% Tween 20, 100 µl/lyuk, szobahőmérséklet, egy óra) követően, 40 µg/ml végkoncentrációban FHR-B és 20 µg/ml végkoncentrációban H-faktorról inkubáltuk a mintákat 45 percig, szobahőmérsékleten. A kötődött H-faktort, FH specifikus monoklonális ellenanyaggal (A254, 2 µg/ml, 1 óra, szobahőmérséklet) és a megfelelő HRPO-val konjugált ellenanyaggal (1:1000 v/v%, 1 óra, szobahőmérséklet) detektáltuk. Az előhívás TMB oldattal történt a 3.6.1. fejezetben leírtak szerint.

3.8. C3bBb-„decay” esszé

Összehasonlítottuk az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjék „decay” aktivitását. Az alternatív út C3 konvertázt (C3bBb) mikrotitráló lemezen tisztított konvertáz komponensekből építettük fel. 5 µg/ml C3b-t 50 µl térfogatban immobilizáltunk Ca²⁺-Mg²⁺ tartalmú DPBS-ben mikrotitráló lemezen (Nunc Maxisorp). A mintákat minden lépést követően 100 µl 0,05% Tween-20 detergenst tartalmazó DPBS-sel mostuk. 5% BSA, DPBS-0,05% Tween 20-oldattal blokkoltuk a lemezt 100 µl térfogatban szobahőmérsékleten egy órát. A kikötődött C3b-hez tisztított humán B-faktort (2 µg/ml), D-faktort (0,1 µg/ml) és properdint [FP] (4 µg/ml) 50 µl végtérfogatban adtunk konvertáz pufferben (4% BSA, 2 mM Ni²⁺, 0,05% Tween-20 Ca²⁺-Mg²⁺ tartalmú DPBS-ben) 30 percig 37°C-on. Öttagú felező hígítást készítettünk 500 nM-tól indulva az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjékből. A megmaradt intakt konvertázt anti-B-faktor antiszérummal (1:1000 v/v%, 1 óra, szobahőmérséklet) és HRPO-val konjugált nyúl anti-kecske immunglobulinnal (1:1000 v/v%, 1

óra, szobahőmérséklet) detektáltuk. A kötődött antitestek detektálását a 3.6.1. fejezetben leírt módon végeztük el.

3.9. Kofaktor esszé

Összehasonlítottuk az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjék fluid fázisú kofaktor aktivitását. 220 nM C3b-t, 440 nM I-faktort 10 nM és 50 nM FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R}, pozitív kontrollként 10 nM H-faktorról inkubáltuk egy órán át 37°C-on 28 µl végtérfogatban. A reakciót 5x redukáló SDS mintapufferrel állítottuk le. A mintákat 7,5%-os akrilamid gélen SDS-PAGE-val szeparáltuk majd nitrocellulóz membránra blottoltuk a fehérjéket TransBlot Turbo készülék (BioRad) segítségével. A membrán blokkolása után (1% BSA, 4% tejpor, DPBS-0,05% Tween-20; egy óra) HRPO-val konjugált, poliklonális kecske anti-humán C3 ellenanyaggal (1:1500 v/v%, 1 óra, szobahőmérséklet) detektáluk a C3 fragmentumokat. A vizualizáció a membránt kemilumineszcens peroxidáz szubsztrát oldattal inkubálva (ECL reagens), előhívó és fixáló folyadék (AGFA) segítségével röntgen filmen történt.

3.10. C3 konvertáz esszé

Az alternatív út C3bBb konvertáz enzim kiépülésének a vizsgálata. 5 µg/ml egér FHR-B-t, humán FHR-4B-t, BSA-t és humán C3b-t 50 µl térfogatban immobilizáltunk Ca²⁺-Mg²⁺ tartalmú DPBS-ben Nunc mikrotitráló lemezen (Nunc Maxisorp). A mintákat minden lépést követően 100 µl 0,05% Tween-20 detergenst tartalmazó DPBS-sel mostuk. Blokkolást (5% BSA, DPBS-0,05% Tween-20, 100 µl/lyuk, szobahőmérséklet, egy óra) követően 50 µl térfogatban 10 µg/ml humán C3b-vel inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten egy órát. A konvertázt tisztított komponensekből a 3.8. fejezetben leírtak szerint építettük fel. Az immobilizált fehérjéken felépült C3bBb konvertázt kecske anti-humán B-faktor antiszérummal (1:1000 v/v%, 1 óra, szobahőmérséklet) és HRPO-val konjugált nyúl anti-kecske immunglobulinnal (1:1000 v/v%, 1 óra, szobahőmérséklet) detektáltuk. A kötődött antitestek detektálását a 3.6.1. fejezetben leírt módon végeztük el. A konvertáz aktivitását párhuzamos kísérletekben 10 µg/ml tisztított humán C3 hozzáadásával ellenőriztük. A felülűszóban keletkező C3a mennyiségét mértük C3a ELISA kit (Quidel) segítségével a gyártó utasítása alapján.

3.11. Komplement aktivációs esszék

A komplement aktivációs mérések során a fehérjéket (FHR-B, egér PTX3, egér CRP) 5 µg/ml koncentrációban-, az egér extracelluláris mátrix extraktumot (MatriGel) 1:30 hígításban 50 µl térfogatban mikrotitráló lemezen (Nunc Maxisorp) DPBS-ben egy órán át, szobahőmérsékleten immobilizáltuk. A mintákat minden lépést követően 0,05% Tween-20 detergenst tartalmazó

DPBS-sel mostuk. Az immobilizált minták blokkolása minden esetben DPBS-0,05% Tween 20-ban beoldott 5% BSA oldattal szobahőmérsékleten egy órán át történt. Blokkolást követően 5 mM Mg^{2+} -EGTA- vagy 20 mM EDTA-PBS-ben hígított 10% komplement aktív egér szérummal inkubáltuk a mintákat 10 μ g/ml FHR-B vagy 10 μ g/ml HSA (negatív kontroll) hozzáadásával vagy anélkül 37°C-on 30 percig. Az egér C3 fragmentumok depozícióját HRPO konjugált egér C3 specifikus ellenanyaggal (1:1000 v/v%, 1 óra, szobahőmérséklet) detektáltuk. A kötődött antitestek kimutatását a 3.6.1. fejezetben leírt módon végeztük el.

HUVEC sejtek által termelt extracelluláris mátrixon (ECM) is vizsgáltuk az egér FHR-B hatását a komplement aktivációra. $2,5 \times 10^3$ HUVEC sejt/cm² 0,2% gelatinnal fedett 96-lyukú sejtenyészítő lemezen (Greiner Cellstar) tenyésztettük 37°C-on, CO₂ termosztátban 7 napig. Ezt követően a sejteket 20 mM EDTA-DPBS-es inkubálás után leszedtük. A sejtek eltávolítását mikroszkóppal ellenőriztük. Az ECM fehérjéket nem tartalmazó felületrészt 4% BSA-val, DPBS-0,05% Tween 20-ban, szobahőmérsékleten egy órán át 100 μ l térfogatban blokkoltuk. Az ECM-et Ca^{2+} - Mg^{2+} -tartalmú DPBS-ben vagy 5 mM Mg^{2+} -EGTA- vagy 20 mM EDTA-PBS-ben hígított 5% komplement aktív egér szérummal 50 μ l végtérfogatban inkubáltuk a mintákat 37°C-on 30 percig 5- és 10 μ g/ml FHR-B vagy 10 μ g/ml HSA (negatív kontroll) hozzáadásával vagy anélkül. Az egér C3 fragmentumok depozícióját 100 μ l HRPO-konjugált egér C3 specifikus ellenanyaggal (1:1000 v/v%, 1 óra, szobahőmérséklet) detektáltuk. A kötődött antitestek detektálását a 3.6.1. fejezetben leírt módon végeztük el.

Az FHR-B komplement depozícióra kifejtett hatását nekrotikus Jurkat T sejteken és egér A20 B-sejteken vizsgáltuk áramlási citofluoriméter segítségével. A sejteket a 3.6.3. fejezetben leírtak szerint nekrotizáltuk. Mintánként 10^5 sejtet inkubáltunk 50 μ l végtérfogatban 20% komplement aktív egér szérummal 20 μ g/ml FHR-B jelenlétében vagy anélkül sejtenyészítő médiumban 37°C-on 30 percig, majd FACS pufferrel mostuk a mintákat. A sejtfelszínen lerakódott C3 fragmentumokat egér C3-ra specifikus FITC-el jelölt ellenanyaggal detektáltuk (1:100 v/v%, 15 perc, 4°C). A mérést a 3.6.3. fejezetben leírtak szerint végeztük el.

3.12. Hemolízis esszé

3.12.1. Hemolízis esszé birka vörösvérsejtekkel

A birka vörösvérsejteket (Culex Bt., Budapest) háromszor mostuk (400 g, 5 perc, 20°C) 10 mM Mg^{2+} -EGTA-t tartalmazó veronál pufferben (Lonza). Mosást követően a birka vörösvérsejteket 60 μ l végtérfogatban 37°C-on, 30 percig 400 rpm-en inkubáltuk komplement aktív szérum jelenlétében. Negatív kontroll a csak veronál puffert és sejteket tartalmazó minta volt, pozitív

kontroll a csak vizet és birka vörösvérsejteket tartalmazó minta volt. Inkubálás után a mintákat centrifugáltuk (780 g, 8 perc, 20°C), majd a felülúszóban a felszabadult hemoglobint 405 nm hullámhosszon Multiskan spektrofotométeren (Thermo Scientific) mértük le.

Az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjék esetében 15% komplement aktív humán szérumot használtunk, a lízist 1 µg OX24 monoklonális anti-H-faktor ellenanyaggal idéztük elő. A fehérjéket 125-1000 nM végkoncentrációban adtuk a mintákhoz. A CRIG-IgV, CRIG-IgV_FH18-20 és H-faktor fehérjék esetében 5% komplement aktív humán szérumot használtunk, a lízist 1 µg C18 vagy OX24 monoklonális anti-H-faktor ellenanyagok adásával idéztük elő. A fehérjéket 250 nM végkoncentrációban használtuk. Az FHR-B és az egér FH15-20 fehérjék esetében 20% komplement aktív egér szérumot használtunk, a lízist az egér FHR-B és az egér FH15-20 hozzáadásával idéztük elő, melyeket 0,5-2 µM végkoncentrációban adtunk a mintákhoz. Párhuzamos kísérletekben a vörösvérsejteket mostuk és lízis pufferrel (proteáz inhibitor koktél (Complete Ultra tableta, Roche); 1% Triton X-100, DPBS) lizáltuk egy órán át jégen. Centrifugálást követően (10 000 g, 10 perc, 4°C) a felülúszót leszívtuk, 5x nem redukáló mintapufferrel hígítottuk. A mintákat 10%-os SDS gélen futattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk a fehérjéket TransBlot Turbo készülék segítségével. A membránt a 3.9. fejezetben ismertetett módon blokkoltuk, majd a CRIG-IgV_FH18-20 sejtekhez kötődésének vizsgálatokor monoklonális nyúl anti-CRIG ellenanyagot (SA 6213) (1:1000 v/v%) és HRPO-konjugált, sertés anti-nyúl Ig-t (1:1000 v/v%) használtunk, valamint poliklonális kecske anti-H-faktor (1:5000 v/v%) és HRPO-konjugált nyúl anti-kecske Ig-vel (1:5000 v/v%) detektáltunk. Az FHR-B esetén monoklonális egér anti-H-faktor (5C2) ellenanyaggal (1:1000 v/v%) és HRPO-konjugált, poliklonális patkány anti-egér Ig-vel (1:1000 v/v%) detektáltunk. A fehérjék vizualizációját a 3.9. fejezetben leírt módon végeztük el.

3.12.2. Hemolízis esszé nyúl vörösvérsejtekkel

Az FH1-4_{W198R} és CRIG-IgV_FH18-20 fehérjék komplement gátló hatását vizsgáltuk nyúl vörösvérsejtek segítségével. Ehhez a nyúl vörösvérsejteket (Culex Bt, Budapest) háromszor mostuk (400 g, 5 perc, 20°C) 10 mM Mg²⁺-EGTA-t tartalmazó veronál pufferben. 2% nyúl vörösvérsejtet inkubáltunk 5% komplement aktív humán szérumban a következő koncentrációkban hozzáadott fehérjékkel: az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjéket 1 µM végkoncentrációban, a CRIG-IgV és CRIG-IgV_FH18-20 fehérjéket 120-480 nM végkoncentrációban. Pozitív kontroll a csak deionizált vizet és nyúl vörösvérsejteket tartalmazó minta volt, negatív kontroll a veronál pufferben levő nyúl vörösvérsejtek voltak. Az inkubálást és a felszabadult hemoglobin detektálását a 3.12.1. fejezetben leírt módon végeztük el.

3.13. Terminális út gátlásának vizsgálata CRIG-IgV_FH18-20 inhibitorral

A CRIG-IgV_FH18-20-nak a komplementrendszer terminális útjára gyakorolt gátló hatásának vizsgálatához 30% normál szérumot 20 µg/ml zimozánnal (élesztő sejtfal extraktum) inkubáltunk 125-1000 nM CRIG-IgV, CRIG-IgV_FH18-20 és H-faktor jelenlétében vagy anélkül 20 µl végtérfogatban 37°C-on 30 percig. Az inkubálást követően a mintákat hússzorosára hígítottuk az sC5b-9 ELISA kithez tartozó hígító oldattal, majd a keletkezett szolubilis C5b-9 komplexek detektálását az sC5b-9 ELISA kit-tel (Quidel) végeztük el a gyártó utasítása szerint.

Különböző liposzómális és micelláris gyógyszerek valamint terápiás ellenanyagok képesek aktiválni a komplementet, és ezáltal komplement aktiváció indukált pszeudoallergiás reakciót (CARPA) válthatnak ki (165). Ehhez 60% normál szérumot 10,54 mg/ml CrEL (micelláris hordozóanyag), 20 mg/ml AmBisome liposzómális gombaellenes gyógyszerekkel inkubáltunk 1,3 µM CRIG-CRIGV, CRIG-CRIGV_FH18-20 és H-faktor jelenlétében 20 µl végtérfogatban. Ezen kívül egy másik kísérletben 196 µg/ml Abelcet liposzómális gyógyszert a három különböző kutatócsoport által előállított mini-H-faktorok (166–168) és a két CRIG alapú molekula 1 µM-tól kiindulva, ötagú felező hígításával inkubáltuk 25 µl végtérfogatban 37°C-on 30 percig. Az inkubálást követően a mintákat a CrEL esetében kétszeresre, az AmBisome és Abelcet esetében ötszörösre hígítottuk az sC5b-9 ELISA kithez tartozó hígító oldattal, majd a keletkezett szolubilis C5b-9 komplexek detektálását az sC5b-9 ELISA kit-tel (Quidel) végeztük el a gyártó utasítása szerint. A CARPA mérések elvégzésében Mészáros Tamás nyújtott segítséget (Semmelweis Egyetem, Kórleletani Intézet, Nanomedicina Kutató és Oktató Központ).

3.14. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzésekhez One-way ANOVA, Two-way ANOVA, t-próba teszteket alkalmaztunk. Az analíziseket GraphPad Prism 5.0 programmal (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) végeztük. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) esetén a csoportok közötti különbséget szignifikánsnak tekintettük.

3.15. Szerzői hozzájárulás

Az FHR-B, a CRIG-IgV és CRIG-FH18-20 fehérjéket Dr. Mario Hebecker (Junior Research Group for Cellular Immunobiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knöll Institute, Jena, Németország) állította elő. Az FH1-4_{W198R} mutációt hordozó betegről származó adatokat Prof. Dr. Prohászka Zoltán és Dr. Csuka Dorottya bocsátotta rendelkezésemre (Semmelweis Egyetem III.sz. Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium). Az FH1-4_{W198R} C3b-kötő képességének SPR-rel történő meghatározását Nicolas Merle és Dr. Lubka

T. Roumenina (French Institute of Health and Medical Research, Párizs) végezték. A CARPA esszé méréseket Mészáros Tamás és Prof. Dr. Szebeni János (Semmelweis Egyetem, Kórélettani Intézet, Nanomedicina Kutató és Oktató Központ) végezték.

3.16. Etikai nyilatkozat

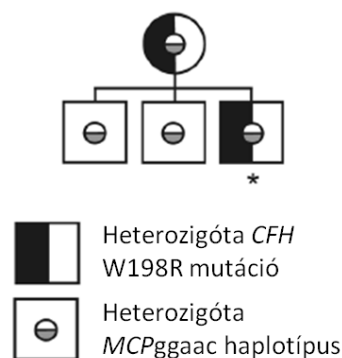
A W198R H-faktor mutációt hordozó páciens írásos tájékoztatáson alapuló hozzájárulást adott a diagnosztikai vizsgálatokhoz és a genetikai elemzéshez, valamint a kísérleteinkben használt, egészséges egyénekből gyűjtött, majd egyesített komplement aktív humán szérumot az egyének írásbeli jóváhagyását követően a Helsinkai Nyilatkozattal összhangban kezeltük. A klinikai és laboratóriumi adatokat a kórházi nyilvántartásokból gyűjtöttük össze a Semmelweis Egyetem intézményi felülvizsgálati testülete és az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottság által jóváhagyott protokoll szerint.

4. Eredmények

4.1. Az FH1-4_{W198R} funkcionális vizsgálata

4.1.1. A mutációt hordozó beteg leírása

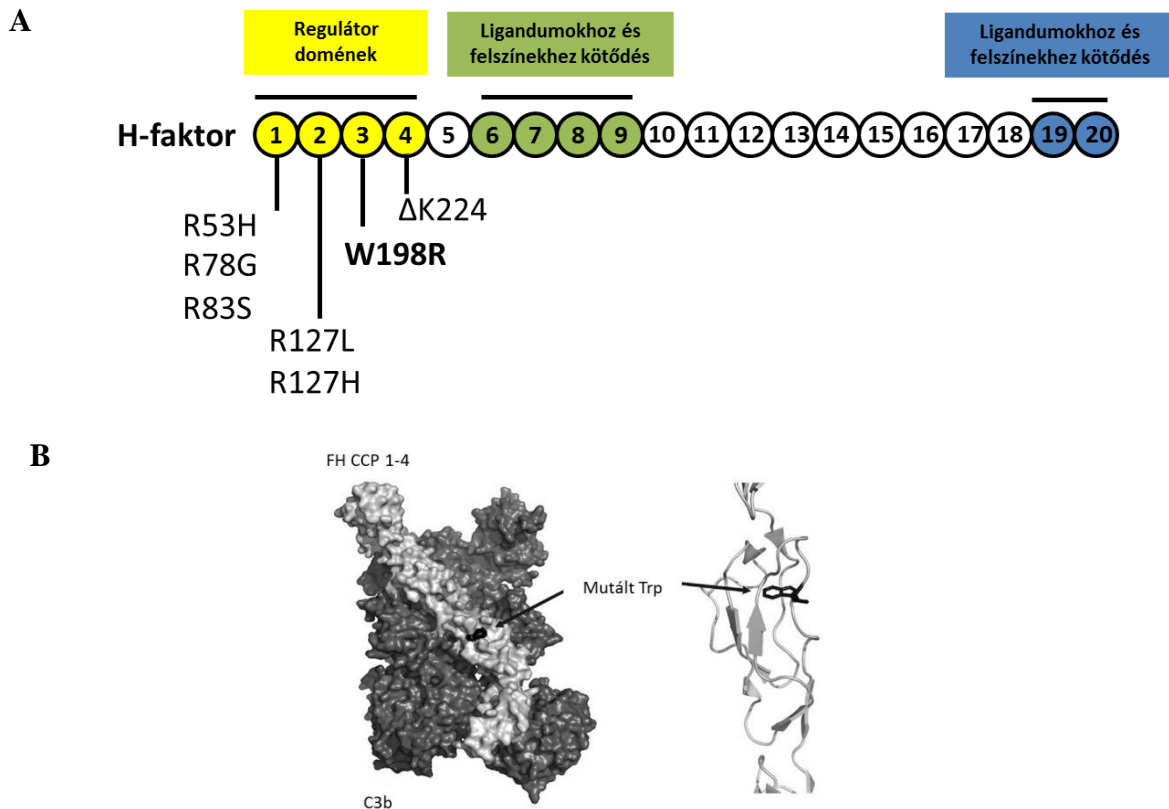
2006-ban egy 20 éves férfit krónikus glomerulonefritisszel (C3GN) diagnosztizáltak, akiben a vizsgált komplement markerek közül csak a C3c szintje mutatott eltérést a referencia tartományhoz képest (0,872 mg/ml; normál tartomány: 0,9 – 1,8 mg/ml). A beteget ACE (angiotenzin-konvertáló enzim) inhibitorral kezelték, de a későbbi, tervezett kontroll vizsgálatokon már nem jelent meg. Legközelebb 2012-ben végstádiumú vesebetegséggel került intenzív osztályra. Labor eredményei alapján TMA-t (trombotikus mikroangiopátia) diagnosztizáltak nála, a C3c szintje tovább csökkent (0,49 mg/ml). A tünetek hátterében felmerült az aHUS diagnózisa és a beteg dialízisre került. 2013 októberében a beteg mintái a Semmelweis Egyetem, 3. számú Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratóriumába kerültek, ahol további komplement fehérjék mennyiségi vizsgálatát végezték el, és az alábbi szérum koncentrációkat mérték (normál tartomány): 0,8 mg/ml C3 (0,9-1,8 mg/ml), 400 mg/ml H-faktor (250-880 mg/ml). 2015 márciusában a beteg HLA azonos vese transzplantációban részesült. A beteg genetikai analízisét követően heterozigóta formában azonosították az *MCPggaac* (membrán kofaktor fehérje) rizikó haplotípust, mely aHUS-ra hajlamosító tényező (169). Ez a haplotípus a betegen kívül az anyában és a két testvérben volt jelen, valamint a betegben és az anyában azonosították a W198R H-faktor gén mutációt (170). Az anya C3 szintje kis mértékben csökkent (0,82 mg/ml), nála semmilyen jel nem utalt betegségre. A beteg két testvére nem hordozta a *CFH* W198R mutációt.



4.1.1. ábra: A beteg családfája. A családfa a heterozigóta H-faktor (*CFH*) W198R mutáció jelenlétét mutatja az anyában és a csillaggal jelölt betegben. Minden megvizsgált családtag hordozza a membrán kofaktor fehérje (*MCPggaac*) rizikó haplotípusát heterozigóta formában. A család többi tagja egészséges.

4.1.2. Az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} rekombináns fehérjék előállítás

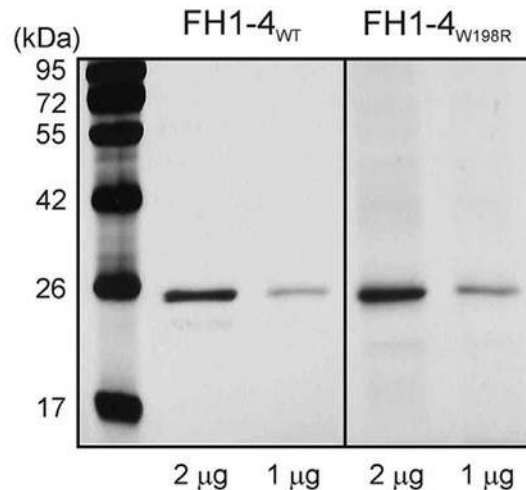
Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a W198R mutáció funkcionális hatását, előállítottuk rekombináns fehérjeként a H-faktor komplement regulátor doménjeinek a vad típusú (FH1-4_{WT}) és a mutáns (FH1-4_{W198R}) formáját. A W198R mutáció a H-faktor CCP 3-as doménjében található és a doménben lévő konzervált triptofán (W) aminosav argininre (R) cserélődik (**4.1.2/A ábra**). Ez az aminosavcsere valószínűleg befolyásolja a fehérje lokális feltekeredését (**4.1.2/B ábra**).



4.1.2. ábra: A W198R mutáció lokalizációja a H-faktor CCP 1-4 doménben. A H-faktor CCP 1-4 doménjei felelnek a komplement szabályozásért, míg a CCP 19-20 doméneknek a különböző felszínekhez való kötődésben van szerepük. **(A)** A vizsgált mutáció helyzete valamint más, korábban jellemzett H-faktor N-terminális mutációk vannak sematikus ábrázolva (151), (170), (171–176). A W198R mutáció a CCP 3 doménben lokalizálódik. **(B)** Az ábra bal oldalán látható a H-faktor CCP 1-4 (világosszürke) domének a C3b molekulával (szürke) való interakcióban (Az ábrát a PyMol program segítségével készítettük el [PDB: 2WII]). A Trp felszíni elhelyezkedését nyíllal jelöltük. Az ábra jobb oldalán az FH CCP 1-4 domének harmadlagos szerkezete látható, melyen szintén jelöltük a Trp helyzetét. A Trp aminosav csak részben hozzáférhető a molekula felszínén. Az Arg-nel való szubsztitúció befolyásolhatja a fehérje lokális feltekeredését.

A klónozást a mutációt tartalmazó, szintetizált DNS-sel végeztük. A vad típusú H-faktor fragmentumot kutatócsoportunk már korábban klónozta, így az rendelkezésünkre állt a kísérletekhez. A mutáns H-faktor fragmentumot Sf9 rovarsejtekkel termeltettük, majd affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Az Sf9 rovarsejtek általt termelt fehérjék glikozilációja az eukarióta

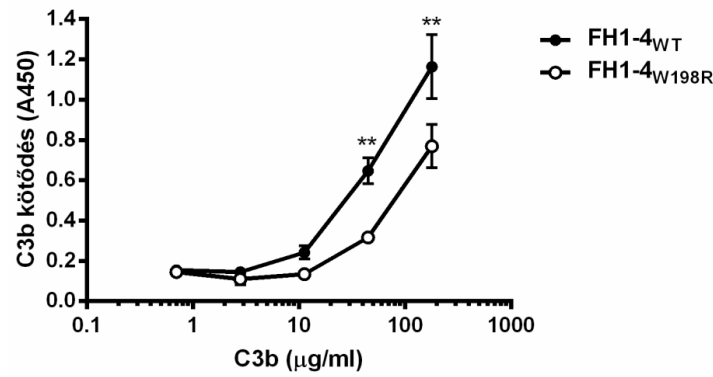
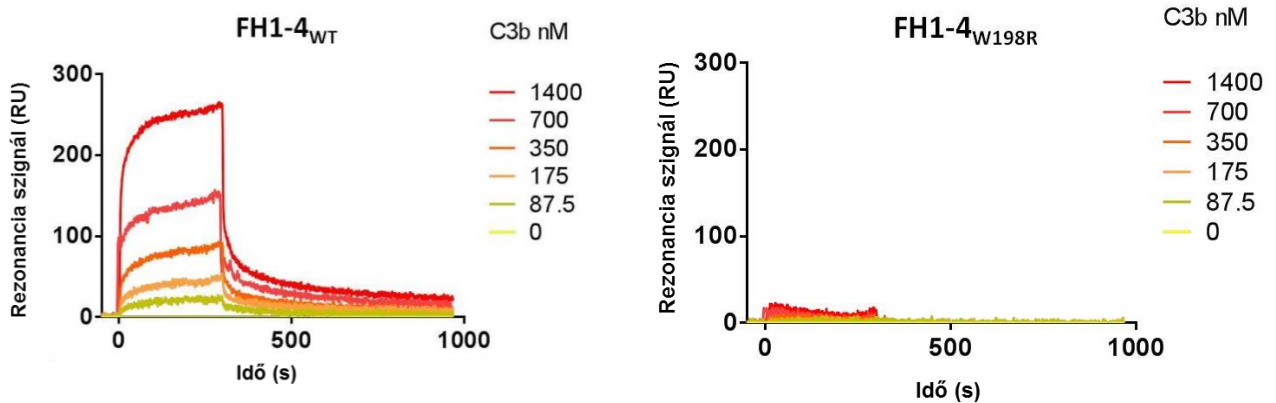
sejtekben termelt fehérjékéhez hasonló (az FH CCP 1-4 egyébként nem tartalmaz glikozilációt). A fehérjék tisztaságát ezüstoffestéssel ellenőriztük (**4.1.3. ábra**). Szekréción defektust vagy a fehérje instabilitását nem tapasztaltuk. Mivel a betegek a H-faktor szintje normális volt (400 µg/ml), a mutáció nem valószínű, hogy részleges H-faktor hiányhoz vezet.



4.1.3. ábra: Az FH_{W198R} fehérje expressziója. A mutáns FH1-4 fragmentumot Sf9 rovarsejtekben expresszáztattuk, majd a fehérje felüliszót anti-H-faktor ellenanyag segítségével, affinitás kromatográfiával tisztítottuk. 1 és 2 µg vad típusú és mutáns tisztított fehérjét 12%-os poliakrilamid gélen futtattunk, majd ezüstoffestéssel ellenőriztük tisztaságukat; koncentrációjukat BCA kit-tel határoztuk meg. A molekulásúly marker a baloldalon látható (a fehérjék tömege: 29,8 kDa).

4.1.3. A mutáns és vad típusú FH1-4 C3b-kötő képességének összehasonlítása

Megvizsgáltuk, hogy a mutáció befolyásolja-e a C3b-hez való kötődést, ehhez ekvimolárisan 100 nM koncentrációban immobilizáltuk az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjéket, majd növekvő koncentrációban tisztított C3b-vel inkubáltuk őket. A kötődött C3b mennyiségét poliklonális, HRPO-konjugált humán anti-C3 ellenanyaggal detektáltuk. Mind a vad típusú, mind a mutáns H-faktor fragmentum dóziszfüggő módon kötötte a C3b-t, de a mutáns fehérje C3b kötőképessége szignifikánsan csökkent volt szemben a vad típusal (**4.1.4/A ábra**). A vad típusú és a mutáns H-faktor fragmentumok C3b-vel történő kölcsönhatását kollaborációs partnerünk segítségével felszíni plazmon rezonancia módszerrel (SPR) is megvizsgáltuk. Az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjéket immobilizáltuk GLC chip felszínére, majd C3b-t áramoltattunk át rajta. Ebben az elrendezésben az adott kísérleti körülmények között a mutáns H-faktor fragmentum nem mutatott C3b kötődést, míg a vad típusú FH1-4 dóziszfüggő módon kötötte a C3b molekulát (**4.1.4/B ábra**). Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy a W198R mutáció nagymértékben csökkent C3b kötődést okoz.

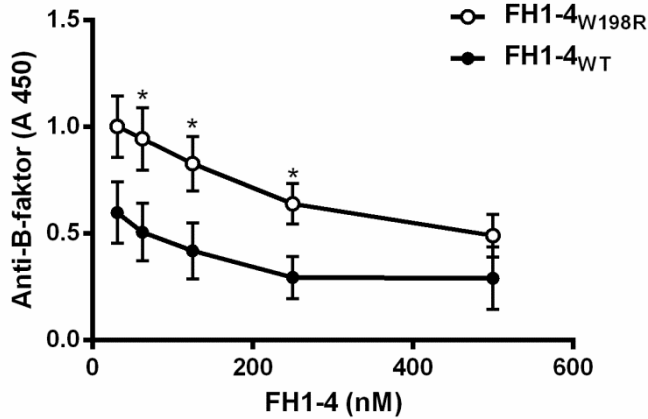
A**B**

4.1.4. ábra: Az FH1-4_{W198R} C3b kötődés vizsgálata ELISA és SPR módszerrel. (A) 100 nM koncentrációban immobilizáltuk mikrotitráló lemezen az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjéket DPBS-ben. Blokkolást követően DPBS-ben hígított C3b öttagú felező hígítási sorával (0,7-180 µg/ml) inkubáltuk a mintákat. A kötődött C3b-t poliklonális, HRPO-konjugált kecske anti-humán C3 ellenanyaggal (1:1500 v/v%) detektáltuk. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják. A FH1-4_{W198R} szignifikánsan gyengébben kötötte a C3b-t, mint a vad típusú FH1-4 fragmentum (two-way ANOVA, **p<0,01). (B) 3500 RU (rezonancia szignál) mennyiségben immobilizált FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjék C3b-vel történő kölcsönhatását vizsgáltuk felszíni plazmon rezonancia módszerrel. DPBS-0,005% Tween 20-at használtunk pufferként, az áramlási sebesség 30 µl/perc volt.

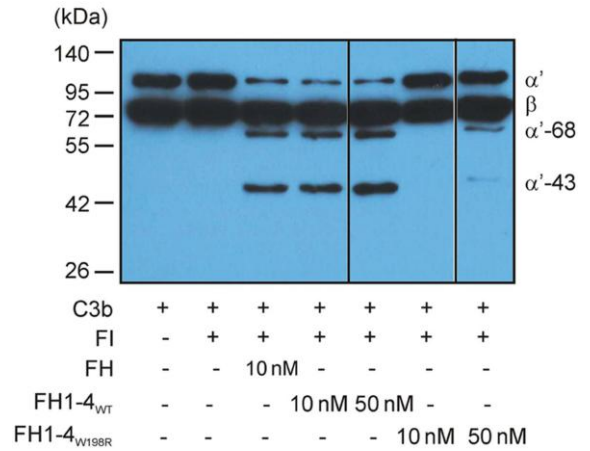
4.1.4. Az FH1-4_{W198R} mutáció befolyásolja a fehérje C3 konvertáz széttesést segítő és kofaktor aktivitását

Mivel a mutáns H-faktor fragmentumnál csökkent C3b kötődést tapasztaltunk, ezért megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a mutáció a H-faktor regulátor funkcióit. Először az alternatív út C3 konvertáz (C3bBb) szétbomlását segítő hatást (decay accelerating activity) vizsgáltuk meg ELISA módszerrel. Ehhez mikrotitráló lemezre 5 µg/ml koncentrációban tisztított humán C3b-t immobilizáltunk, majd a kikötődött C3b-hez tisztított humán B-faktort (FB), D-faktort (FD) és properdint (FP) adtunk 37°C-on 30 percig. Az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjékből öttagú felező hígítást készítettünk 500 nM-tól. A H-faktor fragmentumokkal való inkubáció után a megmaradt intakt konvertázt poliklonális anti-humán B-faktor ellenanyaggal detektáltuk. Mind az FH1-4_{WT} és az FH1-4_{W198R} képes volt a C3b-n felépült konvertáz dóziszfüggő módon történő disszociációjára, de a mutáns fragmentum szignifikánsan kevésbé tudta a konvertázt szétszedni (**4.1.5/A ábra**).

A



B



4.1.5. ábra: FH1-4_{W198R} konvertáz szétesést segítő- és kofaktor aktivitása. (A) Konvertáz esszé. Mikrotráló lemezen 5 µg/ml C3b-t immobilizáltunk, majd blokkolást követően tisztított konvertáz komponensekből (FB: 2 µg/ml, FD: 0,1 µg/ml, FP: 4 µg/ml) építettük fel az alternatív út C3 konvertázt (C3bBb). Az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjékkel (öttagú felező hígításban, 500 nM-tól) egy órát inkubáltuk a mintákat, majd a megmaradt intakt konvertázt anti-humán B-faktor ellenanyaggal detektáltuk. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (p<0,0005, two-way ANOVA, *p<0,05). **(B)** Az FH1-4_{W198R} kofaktor aktivitása folyadék fázisban. 220 nM C3b, 440 nM I-faktort inkubáltunk 10- és 50 nM FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjékkel és 10 nM H-faktorról (pozitív kontroll) 37°C-on egy órát. A reakciót 5x redukáló SDS mintapufferrel állítottuk le, majd a mintákat 10%-os SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk. A C3b hasítást HRPO-konjugált anti-humán C3 ellenanyaggal detektáltuk. Két kísérletből egy reprezentatív blot látható.

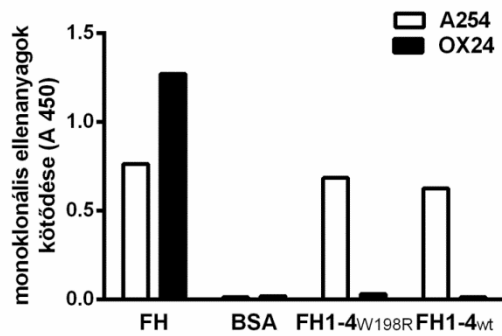
Ezt követően megvizsgáltuk a mutáció hatását a H-faktor folyadék fázisú kofaktor aktivitására. A H-faktor I-faktor jelenlétében képes a C3b-t inaktíválni, azaz a C3b α'-láncát kettéhasítani, egy 68 kDa-os α' és egy 43 kDa-os α' fragmentumra. 220 nM C3b-t, 440 nM I-faktort, 10 nM és 50 nM FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjékkel, pozitív kontrollként 10 nM H-faktorról inkubáltuk egy órát 37°C-on. A mintákat 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk, majd a C3 fragmentumokat HRPO-konjugált anti-humán C3 ellenanyaggal detektáltuk Western blot módszerrel. 10 nM koncentrációban az FH1-4_{WT} és a H-faktor jelenlétében képes volt az I-faktor C3b-t hasítani, míg még 50 nM koncentrációban is az FH1-4_{W198R} csak gyenge kofaktor aktivitást mutatott szemben a 10 nM koncentrációjú FH1-4_{WT}-vel (**4.1.5/B ábra**).

Összességében ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a W198R aminosavcsere csökkent C3b kötődést mutat folyadék fázisban, ebből következően a folyadék fázisú kofaktor aktivitása is csökkent, valamint kisebb mértékű a felszínhez kötött C3 konvertáz bomlását gyorsító aktivitása is a mutáns H-faktor fragmentumnak.

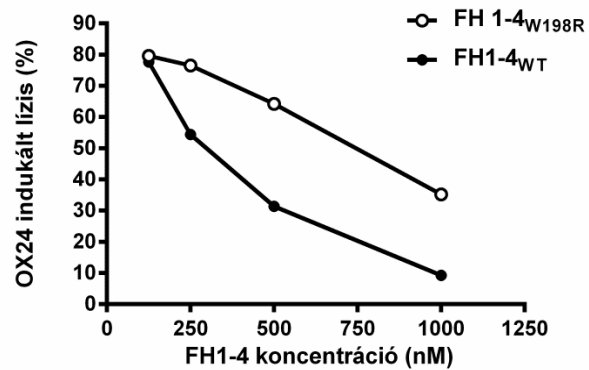
4.1.5. Az FH_{W198R} kevésbé képes megvédeni a saját sejteket a komplement mediált lízistől

Megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja ez a H-faktor mutáció a sejtek komplement rendszer elleni védelmét; ehhez különböző hemolízis esszéket alkalmaztunk. Kísérleteinkhez nyúl- és birkavörösvérsejteket használtunk. A birkavörösvérsejteket általánosan használják annak felderítésére, hogy a H-faktor mennyire képes a saját sejteket megvédeni a komplement mediált lízistől. A birka vörösvérsejtek felszínén olyan polianionos molekulák vannak, mint pl.: szialsavak – hasonlóan a humán sejtekhez –, melyekhez a H-faktor képes kötődni, és ott a komplementaktiváció gátlásával megvédeni a sejteket a lízistől. Először egy monoklonális ellenanyaggal (OX24) indukáltuk a sejtek lízisét. Az ellenanyag a H-faktor CCP 5-ös doménjéhez kötődik és gátolja a H-faktor komplement regulátor aktivitását szérumban, illetve akkor is ha a H-faktor a sejtek felszínéhez már kikötődött. ELISA módszerrel ellenőriztük, hogy az általunk vizsgált FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjéket az OX24 ellenanyag nem képes megkötni (**4.1.6/A ábra**). A humán szérumban (15%) a H-faktor CCP 5-ös doménjét gátoltuk 1 µg OX24 ellenanyaggal (5 mM Mg²⁺-EGTA tartalmú veronál pufferben - így csak az alternatív út aktív), ezáltal nem vagy kevés funkcionálisan aktív H-faktor volt jelen a szérumban. Ezt pótoltuk rekombináns FH1-4 fragmentumokkal (125 nM – 1000 nM), ami a szérumban gátolja a komplementaktivációt. A birka vörösvérsejteket ezzel inkubáltuk. Mindkét H-faktor fragmentum képes volt dóziszfüggő módon gátolni a komplement aktivációt a szérumban, ezáltal a birka vörösvérsejtek felszínén is, de a mutáns fragmentum kevésbé hatékonyan volt képes a komplement aktiváció gátlására, így a sejteket megvédeni a lízistől, mint a vad típusú H-faktor fragmentum (**4.1.6/B ábra**). 1 µM koncentrációjú vad típusú és mutáns jelenlétében, az FH1-4_{W198R} kis mértékben tudta csak gátolni a hemolízist, mely szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint az FH1-4_{WT} esetében (**4.1.6/C ábra**).

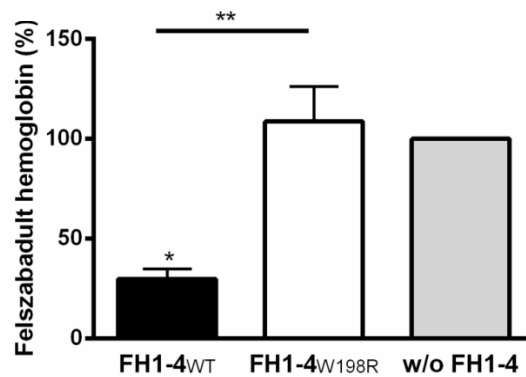
A



B



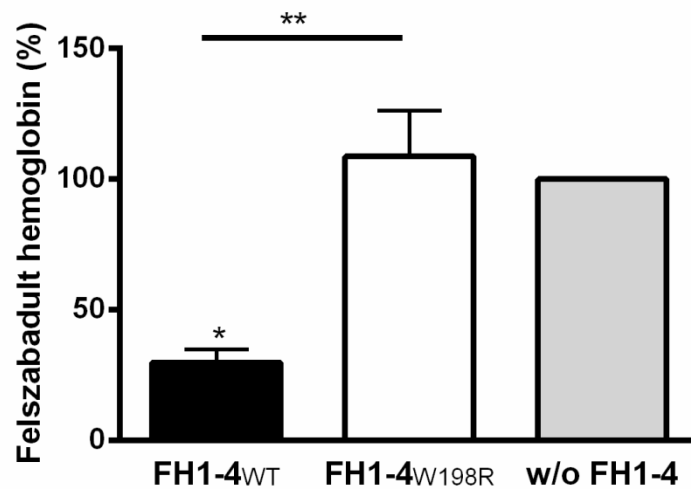
C



4.1.6. ábra: A FH1-4_{W198R} komplement szabályozó aktivitása szérumban. (A) ELISA módszerrel ellenőriztük, hogy a monoklonális OX24 ellenanyag (ami a H-faktor CCP 5-ös doménjét ismeri fel), amivel a birka vörösvérsejtek lízisét kiváltottuk, felismeri-e az FH1-4_{W198R} fehérjét. Ehhez 5 µg/ml FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R}, BSA (negatív kontroll) és H-faktort (pozitív kontroll) immobilizáltunk. Blokkolást követően OX24 ellenanyaggal, kontrollként A254 ellenanyaggal (monoklonális anti-H-faktor ellenanyag, mely a H-faktor CCP 1 doménjéhez kötődik) detektáltuk a kötődést. Három kísérletből egy reprezentatív eredmény látható. (B) 125-1000 nM végkoncentrációban inkubáltunk birka vörösvérsejteket (2%) 15% humán szérumban, az FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjék, 1 µg monoklonális anti-H-faktor ellenanyag (OX24) jelenlétében 10 mM Mg²⁺-EGTA veronál pufferben (így csak az alternatív útvonal aktív) 30 percig 37°C-on 400 rpm rázatás mellett. A felszabadult hemoglobin mennyiségét 405 nm-en mértük le. Három kísérletből egy reprezentatív eredmény látható. (C) A komplement aktiváció szérumban történő vizsgálatára összehasonlítottuk az OX24 ellenanyag indukált birka vörösvérsejtek lízisét a vad típusú és a mutáns H-faktor fragmentumok 1 µM-os végkoncentrációja jelenlétében. Az egyik FH fragmentumot sem tartalmazó (csak szérumot és az OX24 ellenanyagot) mintát tekintettük 100%-nak. Az adatok négy független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, *p<0,05, ***p<0,001).

Megvizsgáltuk az alternatív út közvetített lízist nyúl vörösvérsejteken is. A H-faktor nem képes a nyúl vörösvérsejtek felszínéhez kötődni, mert azok felszínén nincs jelen szialinsav, tehát a humán szérum önmagában komplement-közvetített lízist okoz, amennyiben a nyúl vörösvérsejtekkel együtt inkubáljuk. Azonban a mintákhoz nagyobb mennyiségben H-faktort adva megvédi a sejteket a lízistől, mivel a H-faktor gátolja a szérumban a komplement aktivációt. A nyúl vörösvérsejteket 5% humán szérummal és 1 µM FH1-4_{WT} és FH1-4_{W198R} fehérjékkel inkubáltuk 5 mM Mg²⁺-EGTA tartalmú veronál pufferben. A mutáns H-faktor fragmentum ilyen magas

koncentrációban sem volt képes megvédeni a nyúl vörösvérsejteket a komplement közvetített lízistől, míg az FH1-4_{WT} erősen gátolta a sejtek lízisét (4.1.7. ábra).



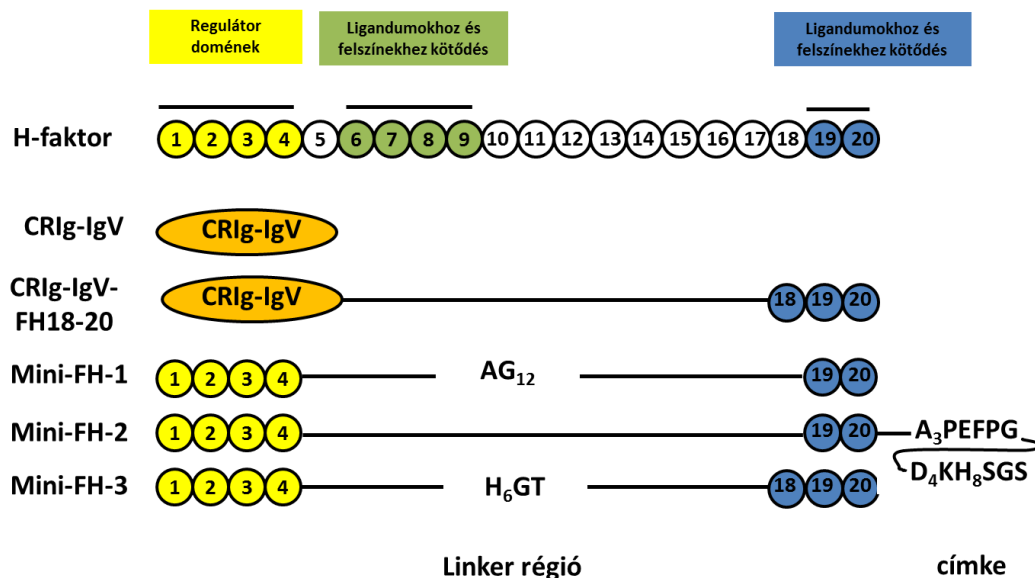
4.1.7. ábra: Az FH 1-4_{W198R} hatása a nyúl vörösvérsejtek komplement közvetített lízisére. A nyúl vörösvérsejtek felszínére nem képes a H-faktor kikötődni, mert szialsavak nem találhatóak a felszínükön, illetve nem található rajtuk más, a humán komplementet gátló molekula, ezért ezeket a sejteket a szérumban a komplement lizálhatja. Az FH1-4_{W198R} komplement szabályozó aktivitását vizsgálva 5% komplement aktív humán szérumban az FH1-4_{WT}/FH1-4_{W198R} fehérjéket 1 μ M végkoncentrációban inkubáltuk a 2%-os nyúl vörösvérttestekkel 5 mM Mg²⁺-EGTA tartalmú veronál pufferben, 37°C-on 30 percig és a felszabadult hemoglobin mennyiségét 405 nm-en mértük le. Az egyik H-faktor fragmentumot sem tartalmazó (csak szérumot) mintát tekintettük 100%-os lízisnek. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit \pm SD mutatják (one-way ANOVA, * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$).

4.2. H-faktor alapú komplement inhibitor funkcionális vizsgálata

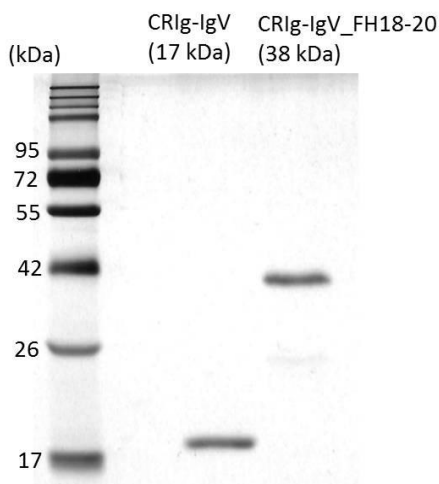
4.2.1. A CRiG-IgV_FH18-20 fehérje rekombináns módon történő előállítása

Kutatócsoportunk korábban előállította a CRiG komplementreceptor extracelluláris IgV doménjét (CRiG-IgV), valamint a CRiG-IgV domént és a H-faktornak a felszínek felismeréséért felelős C-terminális CCP 18-20 doménjeit tartalmazó hibrid fehérjét (CRiG-IgV_FH18-20) a bakulovírus expressziós rendszerben, pBSV-8His plazmid segítségével (4.2.1/A ábra). A fehérjét Sf9 rovarsejtekkel termeltettük és Ni^{2+} affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk. Az izolált rekombináns fehérjék tisztaságát ezüstoffestéssel ellenőriztük (4.2.1/B ábra.) A CRiG-IgV fehérje számított molekula tömege 17,081 kDa, a CRiG-IgV_FH18-20 fehérje molekula tömege 38,448 kDa. A három különböző kutatócsoport által előállított mesterséges mini-H-faktor molekulák (166, 167, 177) sematikus ábrázolása a 4.2.1/A ábrán látható.

A



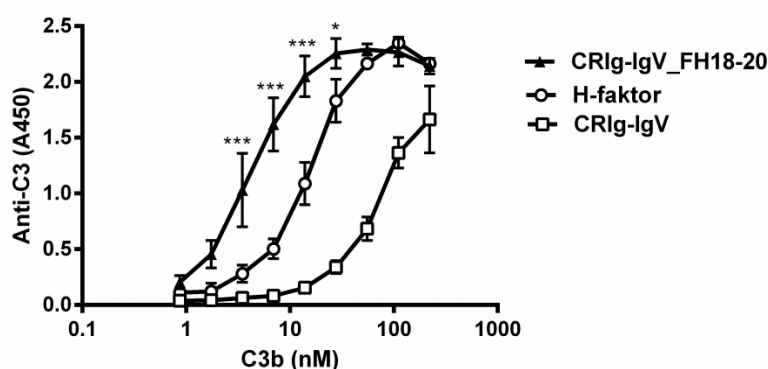
B



4.2.1. ábra: A CRiG-IgV és a CRiG-IgV_FH18-20 fehérje expressziója. (A) A CRiG-IgV_FH18-20 hibrid fehérje sematikus ábrázolása. A fehérje egyrészt a CRiG komplement receptor extracelluláris IgV doménjét és a H-faktor C terminális CCP 18-20 doménjeit tartalmazza. Az ábrán még látható három különböző munkacsoport által előállított mini-H-faktor (Mini-FH-1 [43,3 kDa], Mini-FH-2 [44,891 kDa] és Mini-FH-3 [58,9 kDa]) komplement inhibitor fehérjék, melyeket a későbbi kísérletekben a CRiG-IgV_FH18-20 fehérjével hasonlítottunk össze (166, 167, 177). (B) A CRiG-IgV fragmentumot és a CRiG-IgV_FH18-20 fehérjét Sf9 rovarsejtekben expresszáztattuk, majd a fehérje felülűszót Ni^{2+} affinitás kromatográfiával tisztítottuk. 1 μg tisztított fehérjéket 10%-os akrilamid gélen futtattunk, majd ezüstoffestéssel ellenőriztük tisztaságukat, koncentrációjukat BCA kit-tel határoztuk meg. A molekulásúly marker a baloldalon látható (kDa).

4.2.2. A CRIG-IgV_FH18-20 C3b kötőképessége

Megvizsgáltuk, hogy a CRIG-IgV_FH18-20 fehérje képes-e jobban kötődni a C3b-hez, mint a H-faktorhoz, ehhez 5 µg/ml koncentrációban immobilizáltuk a CRIG-IgV, CRIG-IgV_FH18-20 és a H-faktor fehérjéket, majd 222 nM-tól csökkenő, kilenc tagú felező hígításban, tisztított C3b-vel inkubáltuk a mintákat. A kötődött C3b mennyiségét poliklonális HRPO-konjugált anti-humán C3 ellenanyaggal detektáltuk. Mind a három fehérje dózisfüggő módon kötötte a C3b-t, de a CRIG-H-faktor hibrid fehérje C3b-kötő képessége szignifikánsan emelkedett volt a H-faktorhoz képest szemben a CRIG-IgV és a H-faktor fehérjékhez (4.2.2. ábra).

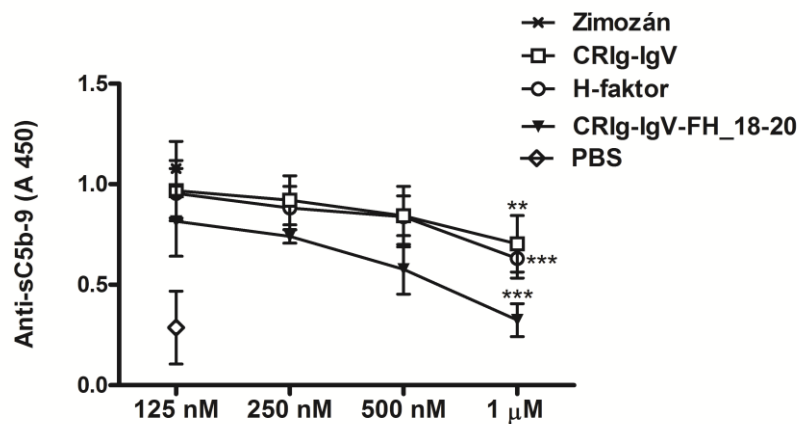


4.2.2. ábra: A CRIG-IgV_FH18-20 C3b kötődés vizsgálata ELISA módszerrel. 5 µg/ml koncentrációban immobilizáltuk mikrotitráló lemezen a H-faktor, CRIG-IgV és a CRIG-IgV_FH18-20 fehérjéket. Blokkolást követően DPBS-ben hígított C3b kilenc tagú felező hígítási sorával (222 nM-tól) inkubáltuk a mintákat. A kötődött C3b-t poliklonális, HRPO-konjugált anti-humán C3 ellenanyaggal (1:1500 v/v%) detektáltuk. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (two-way ANOVA, *p<0,05; ***p<0,001).

4.2.3. A CRIG-IgV_FH18-20 képes gátolni a zimozán indukált komplement aktivációt

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a CRIG-IgV_FH18-20 hibrid fehérje hatását a terminális útra, 20 µg/ml zimozánnal (élesztő sejtfal extraktum) aktiváltuk az alternatív utat 30% komplement aktív humán szérumban jelenlétében. A különböző inhibitorokat (CRIG-IgV, CRIG-IgV_FH18-20, H-faktor) ekvimoláris koncentrációban (125 - 1000 nM) adtuk a mintákhoz. Pozitív kontrollként zimozánt alkalmaztunk inhibitorok nélkül, negatív kontroll a csak szérumbot tartalmazó minta (DPBS) volt. A zimozán erősen aktiválta a komplementet és fokozott szolubilis C5b-9 (sC5b-9) komplexek kialakulását indukálta a szérumban. A CRIG-IgV_FH18-20 inhibitor molekula 1 µM-os koncentrációban hatékonyan gátolta a zimozánhoz önmagában valamint a H-faktorhoz képest is a szolubilis C5b-9 komplexek kialakulását, azaz a terminális utat. A szolubilis C5b-9 komplex detektálását sC5b-9 ELISA kit (Quidel) segítségével mértük. A szérumbot egyedüli alkalmazása az sC5b-9 képződés alapjelét mutatja, a zimozán pedig szignifikánsan emelkedett sC5b-9 szintet

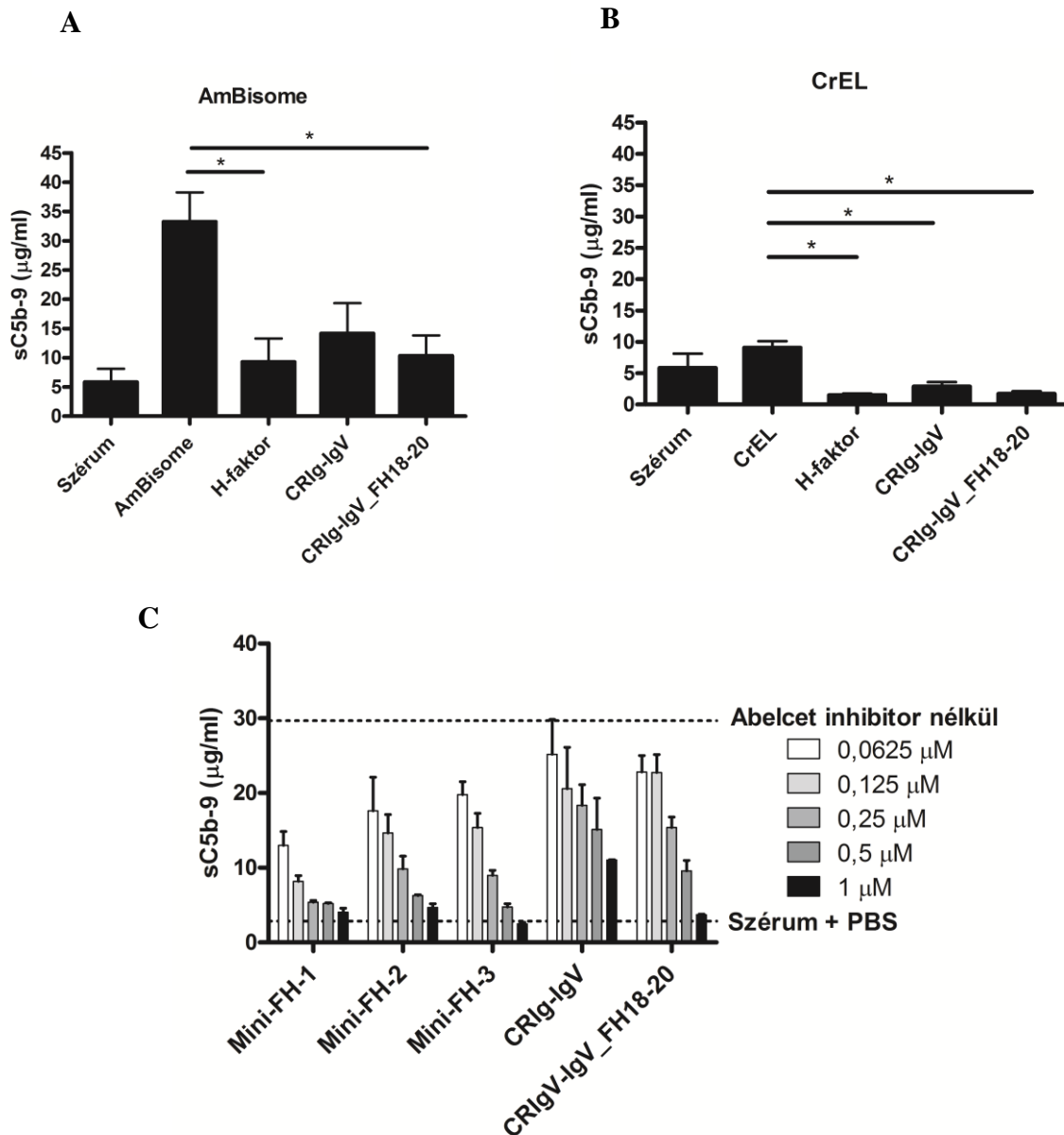
eredményezett, melyet a CRiG-IgV_FH18-20 inhibitor fehérje szignifikánsan csökkentett (4.2.3. ábra).



4.2.3. ábra: A CRiG-IgV_FH18-20 gátolja a zimozán indukált komplement aktivációt. 30% normál humán szérumot 20 μg/ml zimozánnal inkubáltunk 125-1000 nM CRiG-IgV, CRiG-IgV_FH18-20 és H-faktor jelenlétében vagy anélkül 20 μl végtérfogatban 37°C-on 30 percig. A keletkező szolubilis C5b-9 komplexek detektálását az sC5b-9 ELISA kit-tel (Quidel) végeztük el a gyártó utasítása szerint. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, **p<0,01; ***p<0,001). A szignifikancia értékek a zimozán értékéhez vannak hasonlítva.

4.2.4. AmBisome, CrEL és Abelcet liposzómális nanogyógyszerek, illetve hordozó által indukált komplement aktiváció

Különböző liposzómális (AmBisome, Abelcet) és micelláris (CrEL) gyógyszerek képesek a komplementrendszer alternatív útvonalát aktiválni és képesek a komplement aktivációhoz kötődő pszeudoallergiás reakció (CARPA) kiváltására (178, 179). A CARPA reakció során a vérbe kerülő nanogyógyszerek aktiválják a komplementrendszert, a képződő C3a és C5a anafilatoxinok stimulálják a hízósejteket és bazofil granulocitákat a felszínükön expresszálódó C3a- és C5a receptoraikon. A sejtaktiváció hatására különböző mediátorok szabadulnak fel a sejtek granulumaiból (pl.: hisztamin, tromboxán, prosztaglandinok), melyek különböző kardiopulmonáris változásokat idézhetnek elő (180). Nemrég kutatócsoportunk leírta, hogy a H-faktor illetve a mesterséges H-faktor alapú inhibitor (mini-H-faktor) képes a CrEL és az AmBisome indukált CARPA reakció gátlására (181). A mi vizsgálatainkban 60% komplement aktív humán szérumot 20 mg/ml AmBisome (4.2.4/A ábra) és 10,54 mg/ml CrEL (micelláris hordozóanyag) (4.2.4/B ábra) liposzómákkal inkubáltuk mintáinkat 1,3 μM CRiG-CRiGv, CRiG-CRiGv_FH18-20 és H-faktor jelenlétében. Ezen kívül egy másik kísérletben 196 μg/ml Abelcet liposzómális gyógyszert a három különböző kutatócsoport által előállított mini-H-faktorok (166–168) és a két CRiG molekula 1 μM-tól kiinduló, öttagú felező hígításával inkubáltuk 25 μl végtérfogatban 37°C-on 30 percig a 3.13. fejezetben leírt módon (4.2.4/C ábra).

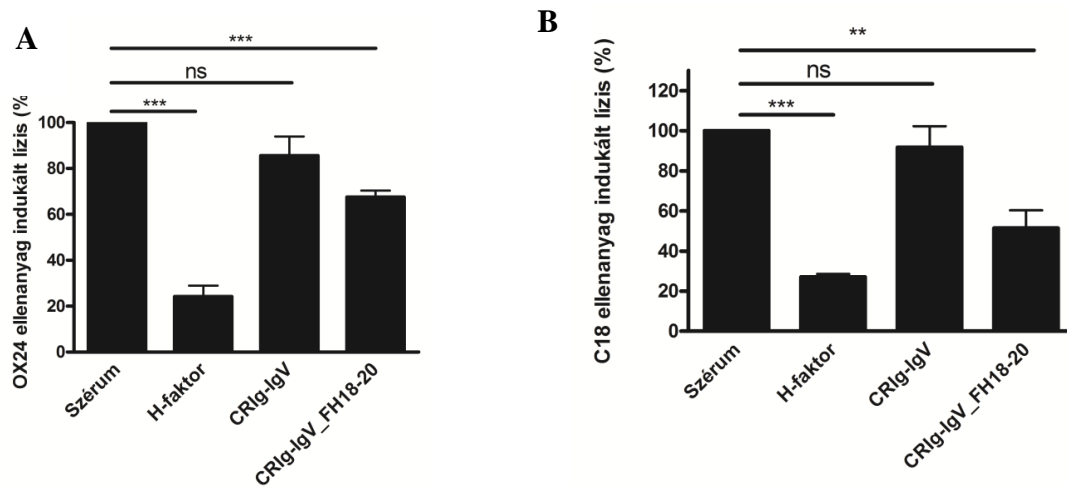


4.2.4. ábra: A CR1g-IgV_FH18-20 szignifikánsan gátolja a nanogyógyszerek által indukált komplement aktivációt. 60% komplement aktív humán szérumot 1,3 µM CR1g-IgV; CR1g-IgV_FH18-20 és H-faktor inhibitorokkal valamint az (A) AmBisome liposzómával és (B) CrEL micellával inkubáltuk 45 percig 37°C-on, majd ezt követően a kialakult sC5b-9 mennyiséget az sC5b-9 ELISA kit (Quidel) segítségével mértük. Az adatok (A, B) három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, *p<0,05). (C) 60 % komplement aktív humán szérumot Abelcet liposzómával valamint különböző komplement inhibitorok öttagú felező hígítási sorával (0,0625-1 µM) együtt inkubáltuk 45 percig 37°C-on, majd ezt követően a kialakult sC5b-9 mennyiséget a sC5b-9 ELISA kit (Quidel) segítségével mértük. Az adatok (C) két független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (two-way ANOVA, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.2.5. A CR1g-IgV_FH18-20 megvédi a saját sejteket a komplement mediált lízistől

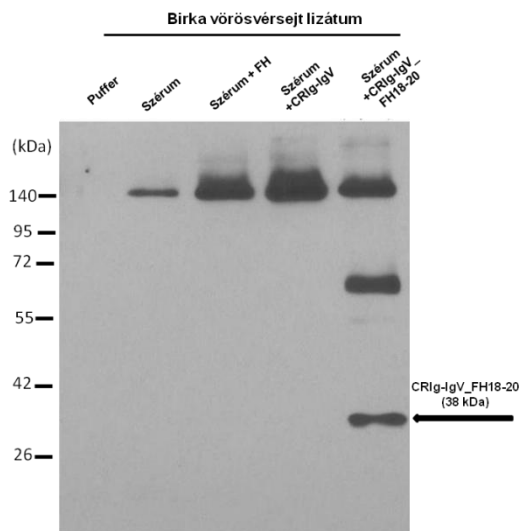
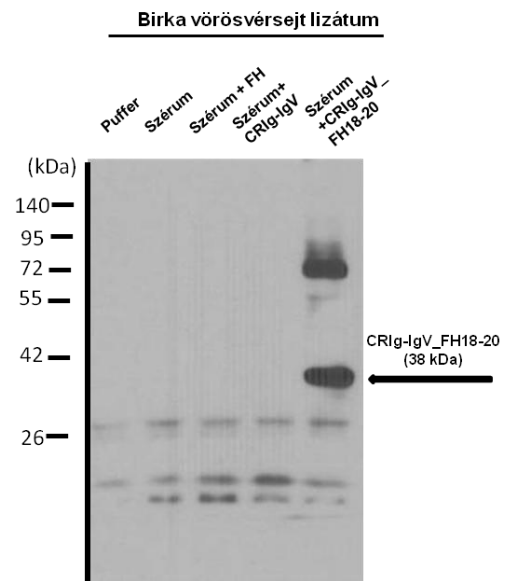
Megvizsgáltuk milyen hatással van a CR1g-IgV_FH18-20 inhibitor fehérje a sajátához hasonló sejtek védelmére, ehhez különböző hemolízis esszéket alkalmaztunk. Kísérleteinkhez nyúl- és birkavörösvérsejteket használtunk. A hemolízis rendszerek általános bemutatását és a kísérletekben használt sejtek jellemzőit a 4.1.5. fejezetben illetve a 3.12. fejezetben mutattam be. A birka vörösvérsejtek felszínén levő szialinsav molekulákhoz a H-faktor képes kötődni, ezzel

megvédve a sejteket a lízistől. A birka vörösvérsejtek lízisét a H-faktor CCP 5-ös doménjéhez kötődő OX24 monoklonális ellenanyaggal (**4.2.5/A ábra**) valamint a H-faktor CCP 20-as doménjéhez kötődő C18 monoklonális ellenanyaggal indukáltuk (**4.2.5/B ábra**). Az OX24 ellenanyag a H-faktorhoz a CCP 5-ös doménjén keresztül képes kötődni, ezáltal nem engedi, hogy a H-faktor a sejteket megvédje a lízistől, aminek következtében a sejtek lizálódnak. A C18 ellenanyag a H-faktor CCP 20-as doménjéhez képes kötődni, ezáltal megakadályozza a H-faktor sejtekhez kötődését, a sejtek lízisét okozva.



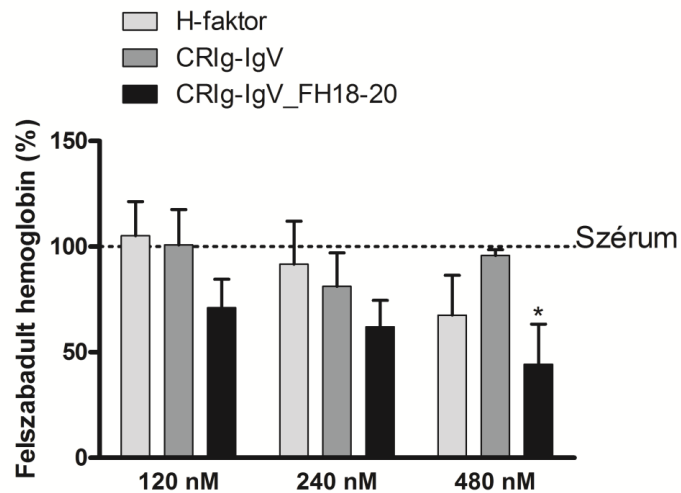
4.2.5. ábra: A CR1g-IgV_FH18-20 megvédi a vörösvérsejteket a komplement közvetített lízistől. 250 nM végkoncentrációban inkubáltuk a H-faktor, CR1g-IgV, CR1g-IgV_FH18-20 fehérjéket 5% komplement aktív humán szérum, 1 μ g (A) OX24 vagy (B) C18 monoklonális anti-humán H-faktor ellenanyag és 2% birka vörösvérsejt jelenlétében 10 mM Mg^{2+} -EGTA veronál pufferben (csak az alternatív útvonal aktív) 30 percig 37°C-on 400 rpm rázatás mellett. A felszabadult hemoglobin mennyiségét 405 nm-en mértük le. A csak szérumot és a monoklonális ellenanyagot tartalmazó mintát tekintettük 100%-nak. Az adatok öt (A) illetve négy (B) független kísérlet átlag értékeit \pm SD mutatja (one-way ANOVA, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

A komplement aktiváció gátlására a birka vörösvérsejteket 5% komplement aktív humán szérum jelenlétében a CR1g-IgV, CR1g-IgV_FH18-20 és a H-faktor fehérjékkel inkubáltuk 250 nM végkoncentrációban. A CR1g-IgV_FH18-20 mind az OX24, mind a C18 monoklonális ellenanyagokkal indukált lízist képes volt szignifikánsan gátolni. Ezek a monoklonális ellenanyagok a H-faktor N- és C-terminálisához kötődő autoantitestek működését is utánozzák. A pozitív kontrollként használt H-faktor a hibrid fehérjénél hatékonyabban védte meg a sejteket a lízistől. A CR1g-IgV_FH18-20 birka vörösvérsejtekhez kötődését Western-blot segítségével detektáltuk (**4.2.6. ábra**).

A**B**

4.2.6. ábra: A CRlg-IgV_FH18-20 kötődése a birka vörösvérsejtekhez. A birka vörösvérsejteket 10 mM Mg^{2+} -EGTA veronál pufferben, 5% komplement aktív humán szérummal, illetve a szérumhoz adott 1 μ M rekombináns CRlg-IgV vagy CRlg-IgV_FH18-20 jelenlétében inkubáltuk. Pozitív kontrollként 250 nM H-faktort adtunk a sejtekhez. A birka vörösvérsejteket mostuk majd lizáltuk, és a lizátumokat 10%-os SDS-PAGE-val szeparáltuk. A sejtekhez kötődött CRlg-IgV_FH18-20-t (A) kecske anti-H-faktor antiszérummal valamint (B) nyúl anti-CRlg antiszérummal detektáltuk. Jól látható a H-faktor (150 kDa) és a CRlg-IgV_FH18-20 (38 kDa) sejtekhez kötődése. Két kísérletből egy reprezentatív blot látható.

Megvizsgáltuk az alternatív út közvetített lízist nyúl vörösvérsejteken is. Ahogy korábban említettem, a H-faktor nem képes a nyúl vörösvérsejtek felszínéhez kötődni, mert azok felszínén nincs jelen szialsav, tehát a humán szérum önmagában lízist okoz, amennyiben a nyúl vörösvérsejtekkel együtt inkubáljuk. A nyúl vörösvérsejteket 5% komplement aktív humán szérummal és 120-480 nM koncentrációban CRlg-IgV, a CRlg-IgV_FH18-20 és H-faktor fehérjékkel inkubáltuk. A hibrid CRlg inhibitor molekula csak 480 nM koncentrációban fejtett ki szignifikáns gátlást, képes volt megvédeni a nyúl vörösvérsejteket a komplement közvetített lízistől, míg a CRlg-IgV egyáltalán nem mutatott gátlást (4.2.7. ábra).

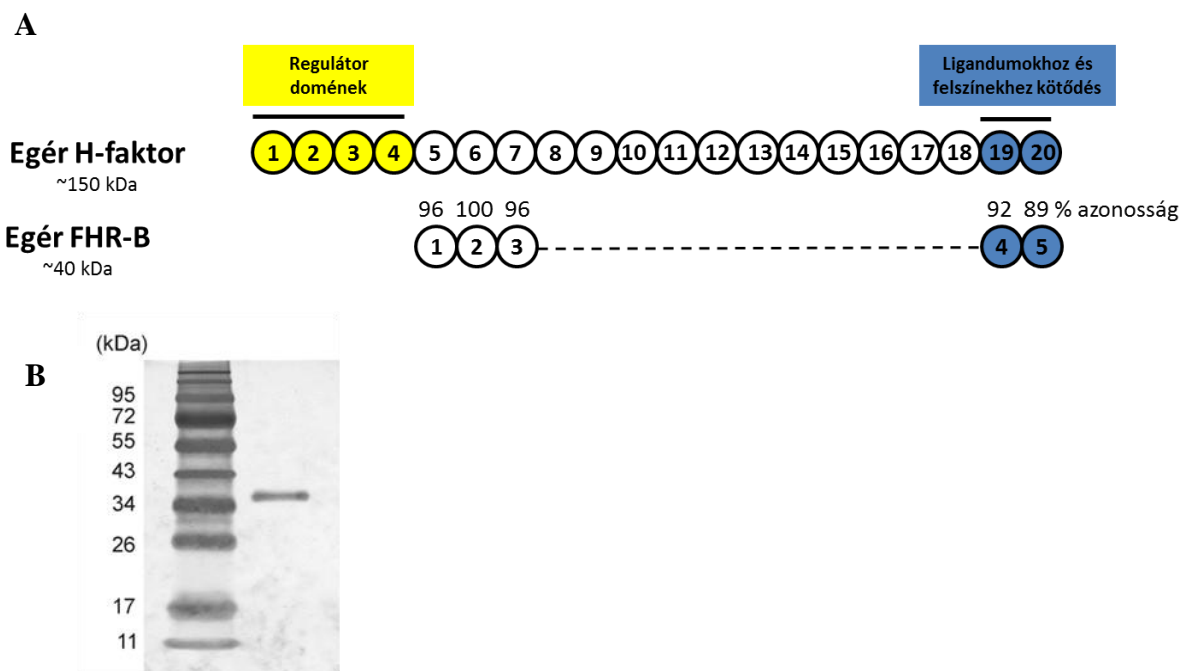


4.2.7. ábra: A CRlg-IgV_FH18-20 komplement szabályozó aktivitása nyúl vörösvérsejteken. A nyúl vörösvérsejteket 5% komplement aktív humán szérummal inkubáltuk. A nyúl vörösvérsejtek felszínére nem képes a H-faktor kikötődni, mert szialsavak nem találhatóak a felszínükön, ezért ezek a sejtek a szérumban található komplement komponensekkel lizálhatóak. A CRlg-IgV_FH18-20 komplement szabályozó aktivitását vizsgálva szérumban a CRlg-IgV, CRlg-IgV_FH18-20, H-faktor fehérjét 120-480 nM végkoncentrációban inkubáltuk a 2%-os nyúl vörösvérsejtekkel 37°C-on 30 percig, majd a felszabadult hemoglobin mennyiségét 405 nm-en mértük le. A csak szérumot tartalmazó mintát tekintettük 100%-nak. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit \pm SD mutatják (one-way ANOVA, * $p < 0,05$).

4.3. Az FHR-B funkcionális vizsgálata

4.3.1. Az egér FHR-B rekombináns fehérje előállítása

Kutatócsoportunk korábban már előállította az FHR-B fehérjét élesztő expressziós rendszerben, de a fehérje erős glikoziláltsága miatt szükséges volt a glikán láncok eltávolítása (118). Ezért a munkacsoportunk az FHR-B szekvenciáját átklónoztta a bakulovírus expressziós rendszerhez alkalmazható pBSV-8His plazmidba. A fehérjét Sf9 rovarsejtekkel termeltettük és Ni^{2+} affinitás kromatográfia segítségével tisztítottuk. A tisztított fehérje tisztaságát ezüsfestéssel ellenőriztük (4.3. 1. ábra.) A fehérje számított molekulatömege 38,378 Da.



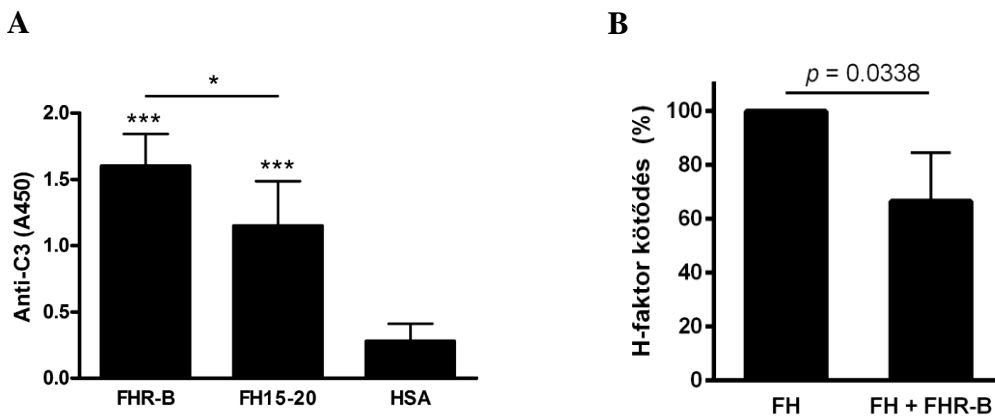
4.3.1. ábra: Az egér FHR-B rekombináns módon történő előállítása és tisztítása. (A) Az egér FHR-B fehérje és az egér H-faktor sematikus ábrázolása. Az egér H-faktor 20 CCP doménből épül fel, N-terminális doménjei hasonlóan a humán H-faktorhoz szabályozó funkcióval bírnak, míg a C-terminális doménjei különböző felszínekhez és ligandumokhoz való kötődésért felelnek. (B) Az egér FHR-B fehérjét Sf9 rovarsejtekben expresszáztattuk, majd a fehérje felülúszót Ni^{2+} affinitás kromatográfiával tisztítottuk. 1 μg tisztított fehérjét 10%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattunk, majd a tisztaságot ezüsfestéssel ellenőriztük, a koncentrációt BCA kit-tel határoztuk meg. A molekulásúly marker a baloldalon látható (kDa).

4.3.2. Az egér FHR-B képes humán C3b-t kötni és kompetálni a humán H-faktoral

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy az FHR-B szérumból és az élesztőben termeltetett rekombináns FHR-B is képes a humán C3b-hez kötődni (118). Az egér H-faktor és annak C-terminális fragmentuma (CCP 18-20) mind az egér- és mind a humán C3b-t kötötte (164). Ezeket a korábbi eredményeket alapul véve, és mivel nem állt rendelkezésünkre egér C3b, megvizsgáltuk a rovarsejtekben termelt egér FHR-B fehérje és a humán C3b fehérje közötti kölcsönhatást ELISA rendszerben. Az egér FHR-B és az egér FH15-20 fehérjéket, valamint negatív kontrollként HSA-t

immobilizáltunk. A kötődött tisztított humán C3b mennyiségét HRPO-konjugált anti-humán C3 ellenanyaggal detektáltuk (**4.3.2/A ábra**). Mindkét egér fehérje kötötte a humán C3b-t, ezzel megerősítettük az FHR-B C3b-vel való kölcsönhatását leíró korábbi eredményt. A C3b ezen kísérleti körülményekben jobban kötődött az FHR-B-hez, mint az egér FH15-20-hoz.

Mivel néhány humán FHR fehérjéről korábban kimutatták, hogy a C3b kötődésért kompetál a H-faktorral (80, 109), ezért ELISA rendszerben megvizsgáltuk, hogy az egér FHR-B is képes-e kompetálni a H-faktorral. 5 µg/ml koncentrációban immobilizáltuk a humán C3b-t, majd a humán H-faktor kötődését monoklonális anti-H-faktor (A254) ellenanyaggal detektáltuk az FHR-B jelenlétében vagy anélkül. Az A254 ellenanyag a H-faktor CCP 1-et képes felismerni, ezáltal az FHR-B-t nem ismeri fel. Az FHR-B C3b kötőképességének következtében, FHR-B jelenlétében a humán H-faktor C3b kötése csökkent volt (**4.3.2/B ábra**), tehát az egér FHR-B is képes kompetálni a H-faktorral a C3b kötődésért.

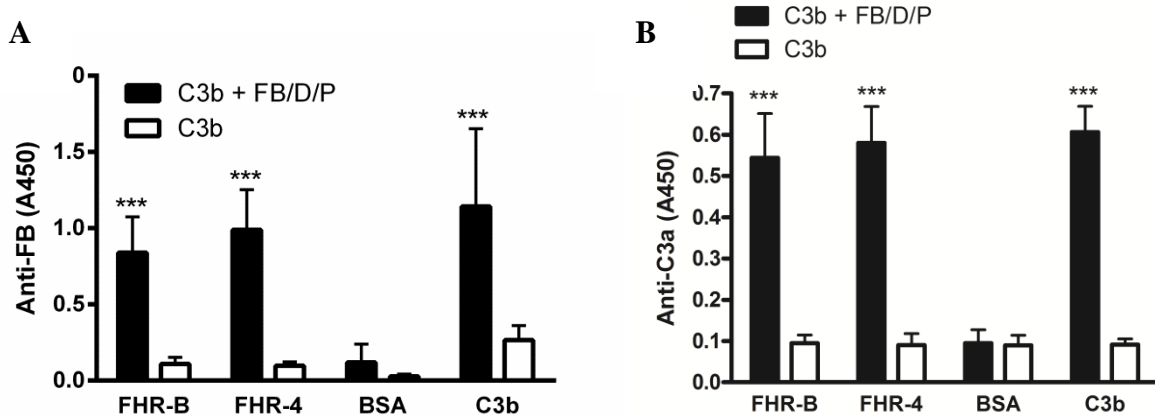


4.3.2. ábra: Az FHR-B képes C3b-t kötni és kompetálni a H-faktorral. (A) Humán C3b kötődése rekombináns FHR-B-hez és egér FH15-20-hoz. 5 µg/ml FHR-B-t, egér FH15-20-at és negatív kontrollként HSA-t immobilizáltunk, majd blokkolást követően 10 µg/ml tisztított humán C3b-vel inkubáltuk a mintákat. A kötődött C3b-t HRPO-konjugált kecske poliklonális anti-humán C3 ellenanyaggal (1:1500 v/v%) detektáltuk. Az adatok öt független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, *p<0,05, ***p<0,01). (B) 5 µg/ml humán C3b-t immobilizáltunk mikrotitráló lemezen, majd blokkolást követően 20 µg/ml végkoncentrációban humán H-faktorral és 40 µg/ml végkoncentrációban FHR-B-vel vagy anélkül inkubáltuk a mintákat 45 percig szobahőmérsékleten. A kötődött H-faktort monoklonális anti-humán H-faktor ellenanyaggal (A254) majd HRPO-konjugált kecske anti-egér immunoglobulinnal detektáltuk. Az adatok négy független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (párosított t-teszt, *p<0,05)

4.3.3. Az egér FHR-B képes aktiválni az alternatív komplementutat

Az FHR fehérjék nem tartalmazzak a H-faktor N terminálisával homológ regulátor doméneket, de korábban leírták, hogy a humán FHR-1, FHR-4 és FHR-5 fehérjék kötik a C3b-t, ezáltal lehetővé teszik a felszínükön az alternatív út C3bBb konvertázának felépülését (104, 105). Ezért megvizsgáltuk, hogy az egér FHR-B felszínén is ki tud-e épülni a funkcionálisan aktív C3 konvertáz. Ehhez 5 µg/ml FHR-B-t, pozitív kontrollként FHR-4B és C3b-t, negatív kontrollként BSA-t immobilizáltunk. Blokkolást követően 10 µg/ml C3b-t adtunk, majd tisztított konvertáz

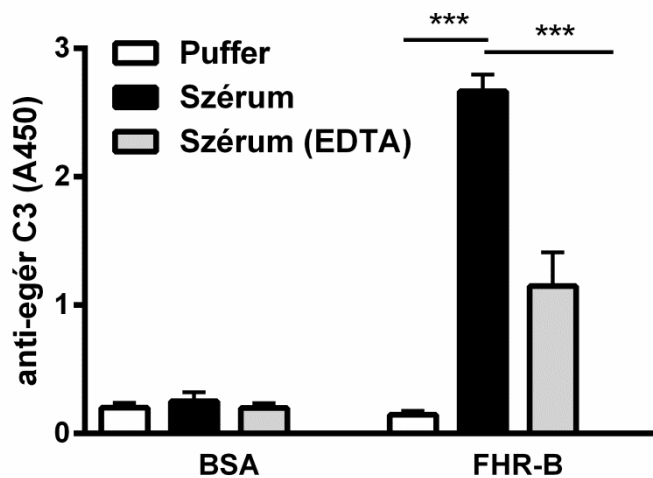
komponensek: humán FB, FD, FP jelenlétében vagy anélkül inkubáltuk a mintákat. A felépült konvertázt anti-humán B-faktor ellenanyaggal detektáltuk. Az FHR-B-n szignifikáns mennyiségben épült fel az alternatív út C3bBb konvertáza, ahogy a pozitív kontrollként használt fehérjéken, az FHR-4B-n és a C3b-n is. Azon minták esetében, ahova a tisztított konvertáz komponenseket nem adtuk, ott nem tudtunk konvertáz kiépülést detektálni (4.3.3/A ábra). Megvizsgáltuk, hogy az FHR-B-n felépült C3 konvertáz funkcionálisan aktív-e. Ehhez a fent leírt kísérletet ismételtük meg, és a konvertáz felépítését követően 10 µg/ml humán C3-at adtunk a mintákhoz, majd a konvertáz C3 általi hasítása során képződött C3a mennyiségét mértük meg C3a ELISA kit segítségével. Hasonlóan az FHR-1, FHR-4A és FHR-5 fehérjékhez, az FHR-B-n felépült C3bBb konvertáz is képes a C3 molekulát C3b és C3a fragmentumokra hasítani (4.3.3/B ábra).



4.3.3. ábra: Az FHR-B fehérjén képes felépülni az alternatív út C3 konvertáza. (A) FHR-B-n a C3bBb konvertáz felépülése. 5 µg/ml rekombináns FHR-B, humán FHR-4B (FHR-4), C3b (pozitív kontroll) és BSA (negatív kontroll) fehérjéket immobilizáltunk 96-lyukú Nunc mikrotitráló lemezen. Blokkolást követően 10 µg/ml humán C3b-vel inkubáltuk a mintákat 37°C-on egy órán át. A C3bBb konvertázt tisztított komponensekből [B-faktor (2 µg/ml), D-faktor (0,1 µg/ml) és properdin (4 µg/ml)] építettük fel 37°C-on 30 percig. A felépült alternatív út C3 konvertázt poliklonális kecske anti-humán B-faktor és HRPO-konjugált nyúl anti-kecske immunglobulinnal detektáltuk. Az adatok négy független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, ***p<0,001). (B) A konvertáz aktivitásának detektálásához a felépült konvertázhoz 10 µg/ml tisztított humán C3-at adtunk és 37°C-on egy órát inkubáltuk, majd a felülészóban keletkező C3a mennyiségét C3a ELISA kit (Quidel) segítségével mértük meg a gyártó utasítása alapján. Az adatok négy független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, ***p<0,001).

Ez után megvizsgáltuk, hogy milyen hatással van az FHR-B a komplementaktivációra szérumban. Ehhez 5 µg/ml-ben immobilizáltuk az FHR-B-t, negatív kontrollként pedig BSA-t. Majd 10% komplement aktív egér szérumot adtunk a mintákhoz 5 mM Mg²⁺-EGTA tartalmú DPBS-ben (így csak az alternatív út aktív) vagy 20 mM EDTA-DPBS-ben (egyik komplement út sem működik, a komplement aktiváció gátolt). Az egér C3 fragmentumok lerakódását HRPO-val konjugált anti-egér C3 ellenanyaggal detektáltuk. Az immobilizált FHR-B-n szignifikáns C3 fragmentum

lerakódást tapasztaltunk az 5 mM Mg²⁺-EGTA tartalmú pufferben, szemben a negatív kontroll BSA-val illetve az EDTA-t tartalmazó pufferrel (4.3.4. ábra).



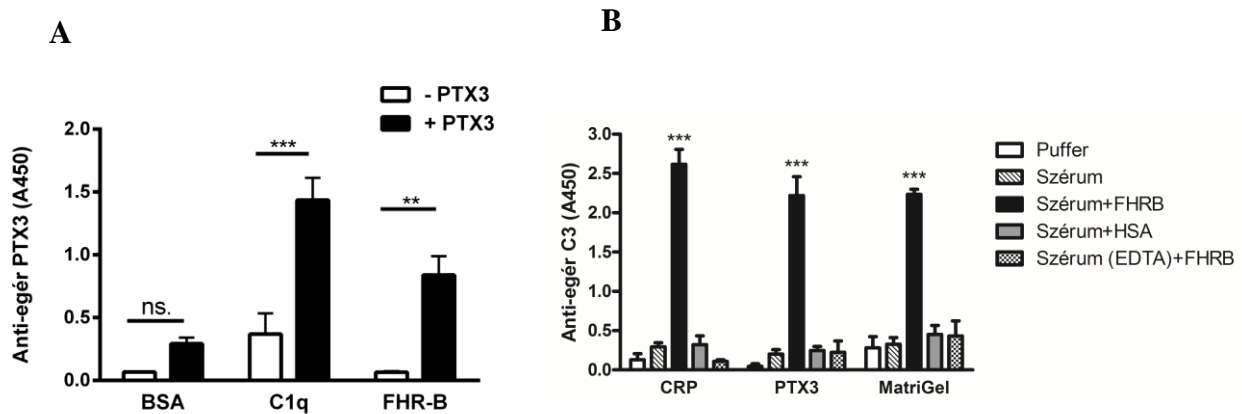
4.3.4. ábra: Az FHR-B képes a komplementrendszer alternatív útvonalát aktiválni. 5 µg/ml rekombináns FHR-B-t, negatív kontrollként BSA-t immobilizáltunk, majd 5 mM Mg²⁺-EGTA-DPBS-ben vagy 20 mM EDTA-DPBS-ben hígított 10% komplement aktív egér szérummal inkubáltuk a mintákat 37°C-on 30 percig. Az egér C3 fragmentumok lerakódását HRPO-konjugált anti-egér C3 ellenanyaggal (1:1000 v/v%) detektáltuk. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, ***p<0,001).

4.3.4. Az FHR-B növeli a komplement aktivációt pentraxinokon és az extracelluláris mátrixon

Korábbi eredmények szerint a humán FHR-1 és a H-faktor C-terminális doménjei valamint a H-faktor CCP 7-es doménje részt vesz a PTX3 kötésben (49), (73-74), ezért ELISA módszerrel megvizsgáltuk, hogy az egér FHR-B is képes-e PTX3-at kötni. Ehhez 5 µg/ml FHR-B-t immobilizáltunk, majd 5 µg/ml egér PTX3-mal inkubáltuk a mintákat. A kötődött PTX3 mennyiségét biotinizált anti-egér PTX3 ellenanyaggal detektáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a PTX3 képes az FHR-B-hez kötődni, hasonlóan a humán C1q-hoz, amit pozitív kontrollként, míg a BSA-hoz nem, amit negatív kontrollként használtunk (4.3.5/A ábra).

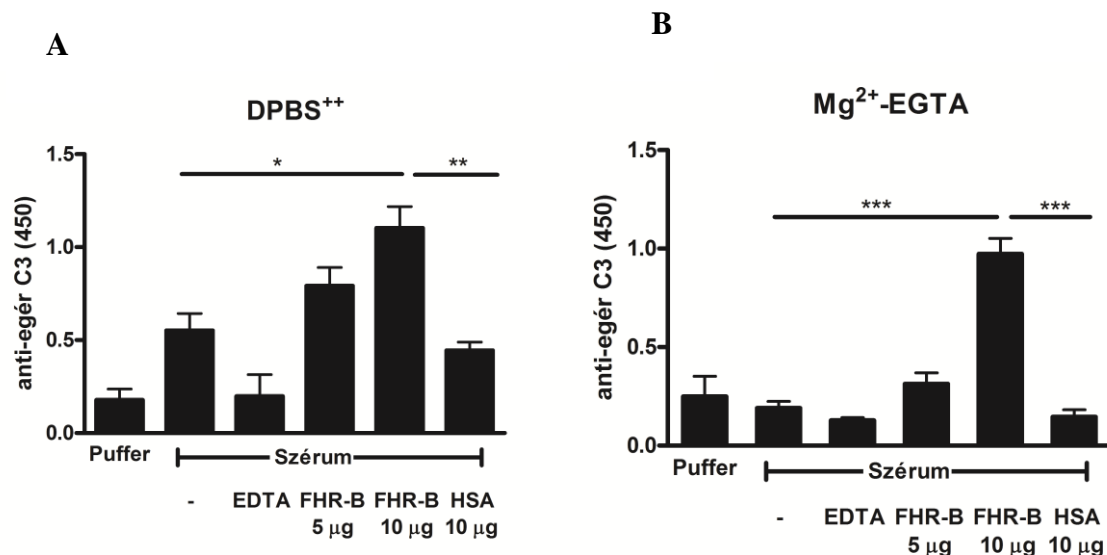
Nemrégiben kimutatták, hogy néhány humán FHR fehérje kompetitív inhibitora a H-faktornak bizonyos ligandumokon, például C3b-n, pentraxinokon és az extracelluláris mátrixon (80, 93, 109). Ezért megvizsgáltuk, hogy az FHR-B képes-e pentraxinokon és extracelluláris mátrixon a C3 depozíciót növelni, azaz képes-e aktiválni a komplementet ezeken a felszíneken. Ehhez egér PTX3-at immobilizáltunk, majd 10% komplement aktív egér szérummal, 10 µg/ml FHR-B jelenlétében vagy anélkül inkubáltuk a mintákat és a lerakódott C3 fragmentumok mennyiségét HRPO-val konjugált anti-egér C3 ellenanyaggal detektáltuk. Csak az alternatív út aktivációját megengedő 5 mM Mg²⁺-EGTA-t tartalmazó DPBS-ben hígított szérum szignifikánsan növelte

a C3 fragmentumok lerakódását PTX3-on, míg az EDTA-DPBS-ben hígított szérum és az FHR-B nem aktiválta a komplementet (4.3.5/B ábra). Hasonlóképpen, az FHR-B az egér CRP-n és az egér extracelluláris mátrix extraktumon (Matrigel) is képes volt szignifikánsan megnövelni a C3 fragmentumok lerakódását (4.3.5/B. ábra). Az egér szérumot EDTA-DPBS-ben hígítva a komplement aktiváció nem indult el, azaz az FHR-B önmagában nem növelte meg a C3 fragmentumok lerakódását.



4.3.5. ábra: Az FHR-B kötődik egér PTX3-hoz és a C3 lerakódást megnöveli pentraxinokon és Matrigel-en. (A) 5 µg/ml rekombináns FHR-B, C1q (pozitív kontroll) és BSA (negatív kontroll) fehérjéket mikrotitráló lemezre immobilizáltunk, majd blokkolást követően 5 µg/ml egér PTX3-mal inkubáltuk a mintákat. A kötődött egér PTX3-at biotinilált anti-egér PTX3 ellenanyaggal (1:1000 v/v%) majd HRPO-konjugált streptavidin segítségével (1:1000 v/v%) detektáltuk. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, **p<0,01, ***p<0,001). (B) Nunc mikrotitráló lemezen immobilizáltunk 5 µg/ml egér PTX3-at és egér CRP-t, valamint 1:30 arányban hígított Matrigel-t (egér extracelluláris mátrix extraktum) DPBS-ben. Blokkolást követően 5 mM Mg²⁺-EGTA- vagy 20 mM EDTA-DPBS-ben hígított 10% komplement aktív egér szérummal inkubáltuk a mintákat 10 µg/ml FHR-B vagy 10 µg/ml HSA (negatív kontroll) hozzáadásával vagy nélküle 37°C-on 30 percig. Az egér C3 fragmentumok lerakódását HRPO-konjugált anti-egér C3 ellenanyaggal (1:1000 v/v %) detektáltuk. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, ***p<0,001).

A komplement aktivációt humán köldökzsinórvéna endotél sejtek (HUVEC) által termelt extracelluláris mátrixon is megvizsgáltuk. A HUVEC sejteket, miután eltávolítottuk az általuk termelt extracelluláris mátrixról, Ca²⁺-Mg²⁺-tartalmú DPBS-ben hígított 10%-os komplement aktív egér szérummal inkubáltuk. Kismértékű C3 depozíciót tapasztaltunk, melyet a szérumhoz adott rekombináns FHR-B szignifikánsan megnövelt, míg a negatív kontrollként adott HSA nem (4.3.6/A.ábra).

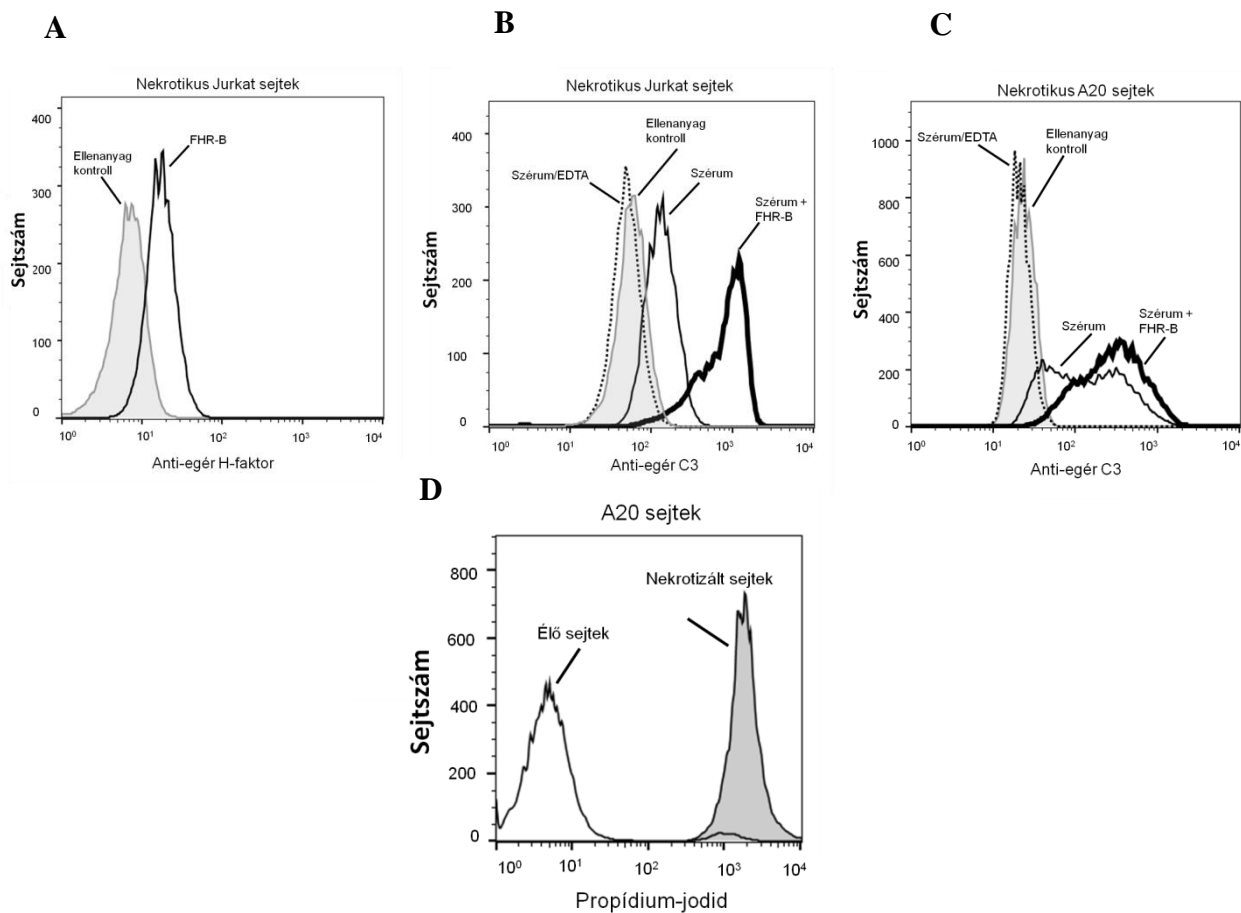


4.3.6. ábra: Az FHR-B képes az extracelluláris mátrixon aktiválni a komplementet. A HUVEC sejteket zselatinnal fedett 96-lyukú lemezen tenyésztettük 7 napig. A sejtek 20 mM EDTA-DPBS-sel való eltávolítása után az ECM fehérjéket nem tartalmazó felületrészt BSA-oldattal blokkoltuk. Ezt követően **(A)** Ca²⁺-Mg²⁺-tartalmú DPBS-ben vagy **(B)** 5 mM Mg²⁺-EGTA tartalmú DPBS-ben hígított 10% komplement aktív egér szérummal inkubáltuk a mintákat 37°C-on 30 percig 5- és 10 µg/ml FHR-B vagy 10 µg/ml HSA (negatív kontroll) hozzáadásával vagy anélkül. További negatív kontrollként 20 mM EDTA-DPBS-ben hígított egér szérumot adtunk a mintákhoz, mellyel gátoltuk a komplement aktiválását. Az egér C3 fragmentumok depozícióját HRPO-konjugált egér C3 specifikus ellenanyaggal detektáltuk. Az adatok három független kísérlet átlag értékeit ± SD mutatják (one-way ANOVA, *p<0,05 ***p<0,001).

Hasonlóképp, a HUVEC-ECM-et 5 mM Mg²⁺-EGTA tartalmú pufferben hígított 10% komplement aktív egér szérummal inkubáltunk. Ekkor csak a komplementrendszer alternatív útja működik; az FHR-B megnövelte a C3 fragmentumok depozícióját, míg a negatív kontrollként adott HSA nem **(4.3.6/B. ábra)**. Az FHR-B tehát képes a HUVEC sejtek által termelt extracelluláris mátrixon az alternatív komplementutat aktiválni.

4.3.5. Az FHR-B növeli a komplement aktivációt nekrotikus sejteken

Leírták, hogy a H-faktor (56) és egyes humán FHR fehérjék (104) képesek a nekrotikus sejtek felszínéhez kötődni és ott megnövelni a C3 depozíciót. Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy az egér FHR-B is képes-e erre, nekrotikus Jurkat T-sejteken és egér A20, érett fenotípusú B-sejtvonalon vizsgáltuk a C3 depozíciót. Először áramlási citofluorimetriával (FACS) megnéztük, hogy az egér rekombináns FHR-B képes-e a nekrotikus Jurkat sejtekhez kötődni. 20 µg/ml rekombináns FHR-B-vel inkubáltuk a hőkezeléssel nekrotizált Jurkat sejteket. Specifikus FHR-B kötődést tapasztaltunk a Jurkat sejtekhez **(4.3.7/A ábra)**.

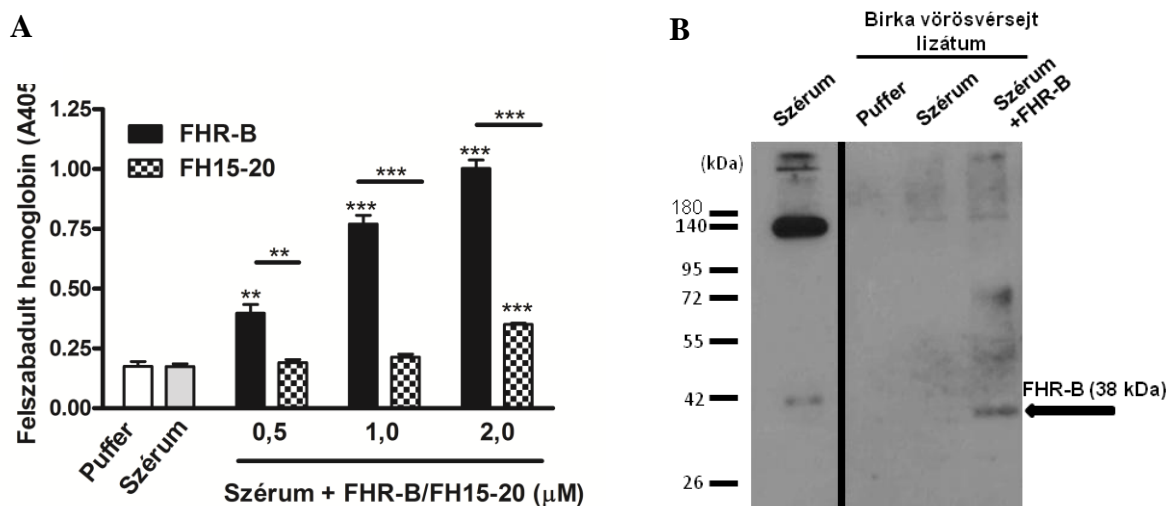


4.3.7. ábra: Az FHR-B kötődik nekrotikus sejtekhez és megnöveli a C3 fragmentumok lerakódását szérumból. **(A)** 20 µg/ml (~0,5 µM) FHR-B kötődését nekrotikus Jurkat sejtekhez áramlási citofluorimetriával (FACS) vizsgáltuk, az FHR-B sejtekhez való kötődését 5C2 monoklonális anti-egér H-faktor ellenanyaggal detektáltuk. Két kísérletből egy reprezentatív eredmény látható. Nekrotikus Jurkat T sejtek **(B)** és nekrotikus A20 egér B sejtek **(C)** 20 % komplement aktív egér szérummal lettek inkubálva 20 µg/ml FHR-B jelenlétében vagy anélkül 30 percig 37°C-on. Mosást követően a komplement aktivációt FACS-on vizsgáltuk FITC-el konjugált egér C3 specifikus ellenanyaggal. Két kísérletből egy reprezentatív eredmény látható. **(D)** A nekrotizálást propidium-jodid festéssel ellenőriztük mindkét sejt típuson. Az ábrán az A20 sejtek nekrotizálásának ellenőrzésének egy reprezentatív eredménye látható.

A nekrotikus sejtek opszonizációjának vizsgálatokor a nekrozist szintén hőkezeléssel indukáltuk Jurkat T-sejteken és egér A20, fenotípusos B-sejteken. A nekrotikus sejteket 20% komplement aktív egér szérummal inkubáltuk 20 µg/ml rekombináns FHR-B jelenlétében vagy anélkül. A C3 fragmentumok lerakódását FITC-el konjugált anti-egér C3 ellenanyaggal detektáltuk áramlási citofluorimetriával. Mindkét esetben a szérumkezelést követően C3 depozíciót tapasztaltunk összehasonlítva az EDTA-t is tartalmazó szérum mintával, ahol nem indult el a komplement aktiváció. Az FHR-B jelenléte pedig tovább növelte a C3 fragmentumok lerakódását **(4.3.7/B, C ábra)**. Egy másik kutatócsoport eredményeink megjelentetését követően szintén kimutatta, hogy egér vese proximális tubulus sejt vonalon (TEC) és humán retina pigment epitel (ARPE-19) sejt vonalon az egér FHR-B képes a komplementet aktiválni és megnövelni a C3 depozíciót (183).

4.3.6. FHR-B képes a sajátához hasonló sejtek lízisét indukálni

Végül kíváncsiak voltunk arra, hogyan befolyásolja az FHR-B a komplement közvetített hemolízist. Ehhez birka vörösvérsejteket használtunk. A sejteket komplement aktív egér szérummal rekombináns FHR-B jelenlétében vagy anélkül inkubáltuk. Az FHR-B dóziszfüggő lízist indukált a birkavörösvérsejteken (4.3.8/A ábra). Kontrollként egér FH15-20 fragmentumot használtunk, mely csak kismértékben volt képes lízist indukálni. Korábban kimutatták, hogy az FH15-20-at szérumhoz adva a birka vörösvérsejtek lízisét indukálja a H-faktor kötődés gátlása miatt (78). A H-faktor leszorítása révén az FHR-B is gátolhatja a saját sejtek komplement mediált lízissel szembeni védelmét. Az egér FHR-B birka vörösvérsejtekhez kötődését Western-blot segítségével detektáltuk (4.3.8/B ábra).



4.3.8. ábra: Az FHR-B komplement közvetített lízist indukál birka vörösvérsejteken. (A) 2% birka vörösvérsejtet 10 mM Mg^{2+} -EGTA tartalmú veronál pufferben inkubáltunk 20% komplement aktív egér szérum jelenlétében önmagában, vagy a szérumhoz növekvő koncentrációban adott rekombináns egér FHR-B és egér FH15-20 jelenlétében 30 percig 37°C-on. A felszabadult hemoglobin mennyiségét 405 nm-en mértük le. Az ábra három független kísérlet átlag értékeit \pm SD mutatják (two-way ANOVA, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (B) Az FHR-B kötődése a birka vörösvérsejtekhez. A birka vörösvérsejteket 10 mM Mg^{2+} -EGTA tartalmú veronál pufferben, 20% komplement aktív egér szérummal, illetve 0,5 μ M rekombináns FHR-B jelenlétében vagy anélkül inkubáltuk. A birka vörösvérsejteket mostuk majd lizáltuk, és a lizátumokat 10%-os SDS-PAGE-val szeparáltuk. A sejtekhez kötődött FHR-B-t az 5C2 jelű, anti-egér H-faktor monoklonális ellenanyaggal detektáltuk. A bal oldali minta 1:50 arányban hígított egér szérum futtatásával és az 5C2 antitesttel való előhívásával készült; jól látható az egér H-faktor és az FHR-B kötődése a sejtekhez (kb. 150 kDa) és FHR-B (kb. 40 kDa); a rekombináns FHR-B a natív molekulához képest (feltehetően glikozilációs különbség miatt) kissé eltérő sebességgel halad a gélyben, ezért annál kisebb molekulatömegűnek látszik. Két kísérletből egy reprezentatív blot látható.

5. Diszkusszió:

Doktori dolgozatomban több irányból megközelítve vizsgáltuk a H-faktor molekulacsalád egyes tagjainak szerepét a komplementrendszer aktiválódásában, szabályozásában normál és patológiás vonatkozásokban is. Egyrészt megvizsgáltuk egy betegség asszociált H-faktor mutáció funkcionális következményeit különböző komplement aktivációs esszékben. Másrészt egy potenciálisan terápiás lehetőséggel bíró, CRiG-H-faktor alapú hibrid komplement inhibitor molekula funkcionális vizsgálatát végeztük el. Harmadrészt az ez idáig kevésbé tanulmányozott egér FHR-B fehérjének a szerepét vizsgáltuk: a komplementrendszer központi molekulájával, a C3b-vel, továbbá különböző pentraxinokkal, extracelluláris mátrixszal, nekrotikus sejtekkel való interakcióját és a komplement aktivációban betöltött szerepét.

5.1. A H-faktor W198R mutáció funkcionális vizsgálata:

A komplementrendszer alternatív útvonalának hibás működése, valamint a *CFHR* génklaszterben kialakuló mutációk és génátrendeződések különböző betegségekkel lehetnek összefüggésben (184). A legtöbb funkcionálisan karakterizált H-faktor mutáció jelenleg olyan aminosavcsere, mely a fehérje C-terminálisát érinti és relatíve kevés olyan mutációt vizsgáltak meg funkcionálisan, melyek a H-faktor CCP 1-4 doménjeiben vannak (185). Azok a mutációk és autoantitestek, melyek a H-faktor C-terminálisát érintik elsősorban aHUS-sal asszociáltak, míg azok, melyek a fehérje N-terminális CCP 1-4 doménjeit érintik C3G betegség kialakításában játszanak szerepet (186), (147). Az N-terminális H-faktor mutációk miatt az alternatív út abnormális működése különböző betegségekkel lehet összefüggésben.

Doktori munkám során megvizsgáltam a H-faktor W198R mutáció okozta funkcionális következményeket összehasonlítva a rekombináns vad típusú és a mutációt hordozó komplement szabályozó H-faktor doméneket (CCP 1-4). Az aminosavcsérés mutáció a komplement szabályozó aktivitás erős csökkenését eredményezte.

A H-faktor fontos szerepet játszik a komplementrendszer, elsősorban az alternatív út szabályozásában a plazmában illetve különböző felszíneken, pl.: a vese glomeruláris alapmembránján (187). A H-faktor deficienciája, illetve ebből következően a szabályozatlan alternatív út aktiváció különböző betegségek kialakulásához vezethet az aHUS-tól a C3G-ig (188), (145). A H-faktor alacsony szintje, teljes hiánya a plazmából vagy a H-faktor funkcionális inaktivitása a glomerulusokban állandó C3 fragmentum lerakódást eredményez és általában C3G-ként jelentkezik (163), (172). A W198R N-terminális H-faktor mutáció egymást követően előbb glomerulonefritisként (valószínűleg C3G-ként), majd ugyanabban a betegben aHUS-ként

jelentkezett. A betegben a W198R mutáció heterozigóta formában van jelen; a H-faktor mennyiségi hiányát nem eredményezte, mert a beteg szérumában mért H-faktor szérumszint normális tartományban volt. A vad típusú és a mutáns H-faktor allélek eltérő módon történő expresszáldását nem volt lehetséges meghatározni. Azonban a részleges funkcionális H-faktor deficiencia a mutáns fehérje *in vitro* jellemzéséből adódik (**4.1.4-4.1.7. ábra**). A korábbi *in silico* vizsgálat a mutáció káros hatását jósolta, a hemolitikus vizsgálat a beteg szérumának jelenlétében rendellenesen, de nem drasztikusan, megemelte a birka vörösvérsejtek lízisét (170). Vizsgálataink során a mutáns fehérje C3b kötőképessége erősen csökkent volt (**4.1.4. ábra**). Az ELISA-hoz hasonlítva az SPR-rel végzett mérés során az FH1-4_{W198R} egyáltalán nem kötötte a C3b-t. A két vizsgálati eljárás során tapasztalt különbség oka valószínűleg a különböző felületeken a fehérjék eltérő sűrűsége, a különböző pufferek (az ionerősség hasonló volt, az SPR kísérletekben a DPBS puffer 0,005% Tween-20 detergenst tartalmazott) valamint az SPR mérés során az immobilizált fehérje és az analit (C3b) közti rövidebb érintkezési idő (300 másodperc), szemben az ELISA módszernél alkalmazott hosszabb inkubációs idővel (1 óra), és a C3b-t tartalmazó puffer áramlása az SPR esetében. Az ELISA-ban a hosszabb inkubációs idő és az egyensúlyi állapot lehetővé teszi az alacsony affinitású FH1-4_{W198R}-C3b komplexek kimutatható mennyiségének kialakulását, amelyet az SPR mérés szigorú feltételei nem tesznek lehetővé. Ezen kívül az ELISA-ban a képződött komplexek kimutatását egy további lépésben fokozzuk az anti-C3 antitest és az antitesthez konjugált enzim alkalmazásával. Mindenesetre az FH1-4_{W198R}-rel szemben az FH1-4_{WT}-hez viszonyított C3b-kötődés szignifikáns csökkenése nyilvánvaló volt, ami a komplement szabályozó H-faktor funkcionális károsodásához vezetett mind folyadék fázisú-, mind szilárd fázisú, valamint sejtfelszíni vizsgálatainkban. A mutáció a H-faktor CCP 3-as doménjének a felszínén helyezkedik el, a C3b kötés kialakításáért felelős felszínnel szemben. A csökkent C3b-kötés magyarázható egy jelentős konformációs változással, amely az egész domént befolyásolja, egy aromás aminosav (triptofán – W) töltött aminosavra (arginin – R) cserélődött (**4.1.2. ábra**). A kofaktor aktivitás zavarára szinergikus hatást jelenthet a csökkent C3b kötés és az I-faktornak az FH1-4_{W198R}-C3b komplexhez való feltételezett csökkent kötődése, mivel a mutáció nagyon közel van az FH CCP 3-as domén I-faktor kötőhelyéhez (189). A birka vörösvérsejtekkel a páciens szérumának felhasználásával végzett korábbi hemolízis esszé eredményei azt jelezték, hogy mindkét H-faktor variáns expresszáldik (170). Valószínű, hogy a funkcionálisan aktív H-faktor csökkent mennyisége nem képes megbirkózni a túlzott mértékű komplement aktivációval a plazmában, és az egyensúlyt a gátlás helyett az aktiválás javára tolja el.

Ez a mutáció a H-faktor N-terminálisán van, és nem a C-terminális CCP 18-20 doméneken, amelyek elsősorban a saját felszínük felismeréséért felelősek valamint az ezen doméneken leírt mutációk elsősorban aHUS-sal asszociáltak (188), így mind a mutáns H-faktor, mind a vad típusú H-faktor a betegben kötődhet különböző felszínűkhez, például a glomeruláris endoteliális sejtekhez és a glomeruláris alapmembránhoz. Figyelemre méltó, hogy a beteg 2012-ben magas vérnyomással és mérsékelt hematológiai aktivitással rendelkezett. A magas vérnyomással összefüggő TMA-val rendelkező betegek egy csoportja a komplement-közvetített TMA (190) spektrumába tartoznak, és ennek példája a vizsgált beteg. Korábban leírtak különböző betegség fenotípus átmeneteket, például a mesangio-kapilláris glomerulonefritist az aHUS (191) kezdeti megjelenésével, illetve glomerulonefritist a H-faktor mutációkhoz (R53C [CCP 1] és I216T [CCP 4]) (192, 193) társított aHUS-sal. A H-faktor részleges hiánya különböző rendellenességekre hajlamosít, ezekben az esetekben a betegség fenotípusát a további genetikai vagy környezeti kockázati tényezők határozzák meg (194).

A mai napig csak néhány N-terminális H-faktor mutációt jellemeztek részletesen, rekombináns fehérjeként előállítva. A K224 homozigóta deléció a CCP 4-ben funkcionálisan inaktív H-faktort eredményezett, és dense deposit disease megbetegedést okozott (151). Kimutatták, hogy a CCP 1 doménben a C3G-hez asszociált heterozigóta R83S mutációja csökkent C3b kötődést és csökkent kofaktor- és a konvertáz szétbomlást gyorsító aktivitást eredményezett (171). Két mutációt, az R53H-t és az R78G-t, amelyek az FH CCP 1 doménjét érintik, aHUS-os betegekben azonosították, az utóbbit homozigóta formában írták le és hasonlóan hibás komplement szabályozó aktivitást találtak a mutáns fehérjéknél (173, 174). A homozigóta R127L mutációt az FH CCP 2-ben két olyan testvérnél írták le, akiknek a H-faktor szérum szintje detektálhatatlan volt, a mutáció C3G-vel asszociált (172). A homozigóta R127H mutáció a H-faktor teljes hiányát okozta egy súlyos, visszatérő tüdőgyulladásban szenvedő fiúban, de a vesét érintő megbetegedés nélkül. A mutáns fehérje jellemzésekor kimutatták, hogy habár normális kofaktor aktivitással rendelkezik, a mutációt hordozó H-faktor az endoplazmatikus retikulumban maradt, nem szekretálódott (175, 176). Nemrégiben négy, aHUS-sal asszociált N-terminális (CCP 1) H-faktor mutáció (R53C, R53P, R53S, S58A) funkcionális vizsgálatát írták le. Ezen mutáns H-faktor variánsok csökkent kofaktor aktivitást (R53C, R53S, R58A), a konvertáz szétesést gyorsító aktivitás csökkenését (R53P, R58A) vagy teljes hiányát (R53C, R53S) okozták, illetve a birka vörösvérsejteken elvégzett hemolízis vizsgálatokban az R53S és R58A mutáns H-faktorok kevésbé védték meg a sejteket a lízistől (195).

Különböző genetikai változatok azonosítása – akár a H-faktor molekulacsalád tagjainak, de egyéb komplement fehérjéknek is – mellett, ezek rekombináns fehérjeként történő előállítása vagy betegszérumból történő tisztítása és funkcionális jellemzése is fontos, hiszen nemcsak közvetlenül a betegség kialakításában lehet szerepük, de olyan polimorfizmusokat is képviselhetnek, melyeknek nincsen funkcionális jelentősége (196).

Összefoglalva a rekombinánsan előállított mutáns H-faktor fragmentummal kapott eredményeinkről elmondható, hogy az FH_{W198R} mutáció a komplement rendszer alternatív útvonal szabályozásának csökkenéséhez vezet. Ennek a mutációnak a heterozigóta jellege magyarázhatja egyazon betegben két különböző komplement közvetített vesebetegség több év elteltével, egymást követően történő megnyilvánulását.

5.2. A CRIg-IgV_FH18-20, mint potenciális komplement inhibitor

A komplementrendszer számos kóros állapot kialakulásában játszik szerepet, ahol a megfelelő szabályozás helyreállítása vagy a patológiás komplement aktiváció gátlása terápiás potenciállal rendelkezik. A homeosztázis fenntartása szempontjából fontos az alternatív komplement útvonal megfelelő szabályozása a testfolyadékokban és a sejtes- valamint a nem sejtes felszíneken, mivel az alternatív útvonal bármely komplement aktivációs út beindulása során tovább fokozhatja a komplement aktivációt. A betegségek különböző mechanizmusai miatt hasznos a komplement inhibitorok készletének bővítése különböző molekulák és mechanizmusok célzására. Az elmúlt évtizedekben számos, a komplementrendszert célzó gyógyszerjelölt molekulát fejlesztettek ki (3), például proteáz inhibitorokat (C1-inhibitor) (197), szolubilis komplement regulátorokat (pl. a TP10, mely egy szolubilis CR1 alapú inhibitor, mely a CR1 révén fejt gátló hatását) (198). Mivel a C3 az összes útvonal találkozási pontján van, célunk volt a kutatócsoportunk által korábban előállított CRIg és H-faktor alapú komplement inhibitor funkcionális vizsgálata. Az új generációs komplement inhibitorok, melyek a komplementrendszert a C3 szintjén gátolják (pl.: fúziós fehérjék: TT30 (H-faktor és CR2 fúziós fehérje (199)) vagy a TT32, mely egy CR1-CR2 fúziós fehérje (200), mini-H-faktor molekulák (166–168), midi-H-faktor (201), compstatin és módosításai (202, 203) jelenleg is fejlesztés alatt állnak.

Az általunk vizsgált CRIg-IgV_FH18-20 fehérje N-terminális része (a CRIg receptor extracelluláris IgV doménje) képes a C3b-hez kötődni és hatékonyan gátolni a komplementrendszer alternatív útvonalát (29). A H-faktor C-terminális doménjei különböző felszínekhez képesek kötődni, ezáltal megvédve a sejteket a komplement támadástól. Ezért ebben a molekulában a H-faktor CCP 18-20 doméneket használtuk ki a CRIg-IgV doménjének a

komplement támadás helyszínére történő irányítására **(4.2.1. ábra)**. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a CRIg-IgV_FH18-20 C3b-kötő képessége, mind a H-faktorhoz valamint a CRIg-IgV-hez képest is nagyobb volt **(4.2.2. ábra)**. A CRIg-H-faktor hibrid fehérje szignifikánsan jobban gátolta a zimozán indukált komplement aktivációt, azaz a szolubilis C5b-9 komplexek képződését, mint a kontroll H-faktor illetve a CRIg-IgV molekula **(4.2.3. ábra)**. Egy nemrégiben publikált MFHR1 komplement gátló molekuláról (az FHR-1 dimerizációjában résztvevő CCP 1-2 doméneket és a már korábban publikált mini-FH fehérjét (167) tartalmazta) szintén leírták, hogy a mini-H-faktornál (167) és a gyógyászatban már alkalmazott anti-humán C5 ellenanyagnál (eculizumab) hatékonyabban gátolta a C5b-9 komplexek képződését (204).

A CRIg-H-faktor hibrid fehérje kofaktor- és konvertáz bomlást gyorsító aktivitását nem vizsgáltuk, mert a CRIg nem rendelkezik ilyen funkciókkal. A CRIg kötődik az alternatív út C3 konvertáz C3b alegységéhez, mely mind a C3-, mind a C5 konvertáz szintjén a komplement aktiváció gátlását eredményezi (30), (110). Megvizsgáltuk, hogy a zimozán indukált komplement aktivációt hogyan képes gátolni a CRIg-H-faktor inhibitor molekula. Az sC5b-9 a komplement aktiváció folyamatának egy stabil végterméke, mely párhuzamosan termelődik a C5a anafilatoxinnal, mely a CARPA hatás kialakításában vesz részt. A CRIg-H-faktor hibrid inhibitor a H-faktorhoz képest szignifikánsan gátolta az sC5b-9 komplexek képződését **(4.2.3. ábra)**. Kutatócsoportunk Prof. Dr. Szebeni János kutatócsoportjával együttműködve korábban kimutatta, hogy egyes nanogyógyszerek által indukált CARPA reakciót a H-faktor és a mesterséges mini-H-faktor fehérjék gátolni képesek (181). Kimutattuk, hogy a CRIg-IgV_FH18-20 szignifikánsan gátolja a H-faktorhoz és a CRIg-IgV fragmentumhoz hasonlóan a CrEL micellák és az AmBisome liposzómák által kiváltott komplement aktivációt **(4.2.4/A-B ábra)**. Az Abelcet által indukált – ami az AmBisome-hoz hasonlóan gombaellenes nanogyógyszer – komplement aktivációt a CRIg-H-faktor hibrid fehérje szignifikánsan gátolta, az sC5b-9 komplexek képződését a mini-H-faktorokhoz hasonló mértékben (1 μ M-os koncentrációban) csökkentette **(4.2.4/C ábra)**. A H-faktor egyik fontos funkciója a saját sejtek védelme a komplement közvetített lízistől. Birka vörösvérsejteken C18 és OX24 ellenanyagokkal (melyek a H-faktor C- és N-terminálisához kötődő autoantitestek működését is utánozzák) indukáltuk komplement aktív szérum hozzáadásával a sejtek lízisét. *In vitro* kimutattuk, hogy a CRIg-H-faktor inhibitor képes megmenteni a saját sejteket a komplement mediált lízistől **(4.2.5. ábra)**. Ugyanezt igazoltuk nyúl vörösvérsejteken is **(4.2.7. ábra)**. A hibrid inhibitor a H-faktor CCP 18-20 doménjeivel képes volt a birka vörösvérsejtek felszínére kikötödni, mivel a CRIg-IgV esetében kötődést nem tapasztaltunk **(4.2.6. ábra)**. Egy nemrégiben megjelent publikációban szintén az OX24

monoklonális ellenanyaggal indukált lízisre gyakorolt hatást vizsgálták a legújabb módosított mini-H-faktor (az FHR1 CCP 1-2 doménjeivel homodimerizált mini-H-faktor molekulát) konstrukción, mely a birka vörösvérsejteket hatékonyan védte meg a lízistől (177).

A CRIg alapú inhibitorok fejlesztésében az elmúlt években több előrelépés is történt. Weiguo és munkatársai létrehozta egy CRIg-IgV és a H-faktor CCP 1-5 doméneket tartalmazó molekulát, melyről leírták, hogy hatékonyan védi meg a paroxizmális nokturnális hemogloburiás (PNH) betegből izolált eritrocitákat a komplement mediált lízistől, valamint *in vivo* MPGN patkány modellben gátolta a komplement aktivációt (205). Ugyanez a kutatócsoport ezt az inhibitor tovább vizsgálva megállapította, hogy egérben *in vivo* az ischaemia-reperfúziós károsodástól is véd (206). Harris és munkatársai egy a CRIg és CD59 felhasználásával készített hibrid fehérjét állítottak elő a membrán károsító komplex (MAC) gátlására (207).

Az elmúlt két évtizedben kutatók felismerték az alternatív út amplifikációs hurok szintjén alkalmazható terápia szükségességét. Ezeknek az inhibitor molekuláknak egy része a klinikai vizsgálatok fázisaiban is megfelelően szerepeltek, de egyik sem jutott még túl a harmadik fázisú klinikai vizsgálatokon (208).

5.3. Az egér FHR-B elősegíti a komplement aktivációt

Az elmúlt években egyre nagyobb figyelmet kaptak az emberi FHR fehérjék, illetve lehetséges biológiai szerepük, a különböző betegségekkel való genetikai asszociációjuk miatt. A humán FHR fehérjékkel ellentétben az egér FHR fehérjéket funkcionálisan még nem vizsgálták. A különböző betegségek állatmodelljeinek megfelelő értelmezéséhez azonban szükség van a nem humán FHR-ek funkcióinak jobb megértéséhez, felderíteni a humán FHR fehérjékhez hasonló és különböző funkcióikat. Bár vannak ellentmondások a humán FHR fehérjék szerepének tekintetében, a legújabb kutatási eredmények által azonosított fő funkciójuk a H-faktoral való kompetíció különböző saját- és nem saját ligandumokon, például a felszíneken lerakódó C3b-n, pentraxinokon, extracelluláris mátrixon. Ez a komplement aktiváció fokozásában megnyilvánuló közvetett szerep mellett az FHR fehérjék képesek közvetlenül is aktiválni a komplementet azáltal, hogy felszínként szolgálnak az alternatív út konvertáz enzimének kialakulásához és képesek elősegíteni a komplement aktivációt a szervezet egyes ligandumain és felszínein.

Doktori munkám során funkcionálisan jellemeztem a rekombinánsan előállított egér FHR-B fehérjét, melynek ezidáig részletes jellemzése nem állt rendelkezésre a szakirodalomban. Az FHR-B fehérje új ligandumait azonosítottuk, például az egér pentraxinokat, extracelluláris mátrixokat és a nekrotikus sejteket, melyek valószínűleg a humán betegségek egérmodelljei szempontjából

relevánsak lehetnek. Korábban a *Pichia pastoris* expressziós rendszerben előállított egér FHR-B humán C3b-hez kötődését írták le (118). Kimutattuk, hogy a bakulovírus expressziós rendszerben előállított egér FHR-B is képes a C3b kötésért versenyezni a H-faktoral, hasonlóan, ahogy a humán FHR-1 és az FHR-5 fehérjék. Nemrégiben megjelent publikációban rekombinánsan előállították a Vik és munkatársai által leírt *Fhra* gén fehérje termékét, mely az FHR-1 és az FHR-5-höz valamint az FHR-B-hez hasonlóan kompetál az egér H-faktoral a C3b/C3d kötődésért a sejt felszínen, valamint leírták, hogy az FHR-B az egér H-faktor potenciális inhibitora (183). A kompetíciós kísérletünk során szignifikánsan több C3b kötődött az FHR-B-hez, mint a kontroll fehérjeként használt egér FH15-20 fragmentumhoz (**4.3.2/A.ábra**), mely magyarázza az FHR-B erős lízist indukáló hatását egér szérum jelenlétében a birka vörösvérsejteken végzett hemolízis esszében (**4.3.8. ábra**). Az előzőekben említett amerikai kutatócsoport ugyancsak azt találta, hogy az FHR-B az egér H-faktorhoz képest erősebben köti a C3b-t (183). Az FHR-B, hasonlóan a humán FHR-1, FHR-4 és FHR-5 fehérjékhez, képes elősegíteni az alternatív útvonal C3 konvertáz kialakulását a C3b kötése révén, hozzájárulva a komplementrendszer aktiválásához (**4.3.3/A.ábra**).

Eredményeink rávilágítanak arra, ahogy a legújabb kutatási eredményekből is látszik, hogy az FHR-ek, a H-faktoral ellentétben inkább elősegítik a komplement aktivációt (74, 75, 80, 109). Holers és munkatársai egy nemrég megjelent publikációjukban az FHR-B és a C3d kölcsönhatását vizsgálták, mind ELISA, mind SPR módszerrel. Az FHR-B erősebben kötötte az egér C3d-t, mint az FHR-A (183). Az FHR fehérjék részt vehetnek a komplement aktiváció finomszabályozásában különböző ligandumokon, megváltozott saját struktúrákon, gyulladási folyamatok során, mint például a lerakódott C3b, pentraxinok (pl.: PTX3, CRP), extracelluláris mátrix komponensek és halott sejtek. Ezek a funkciók főleg azokra a konzervált doménekre igazak, melyek a H-faktor főbb saját- és nem saját ligandum kötőhelyeivel homológok (**4.3.1. ábra**) (116),(74).

Az elmúlt években elért eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a *CFH* génklaszter evolúciója és a *CFHR* gének megjelenése mikroorganizmusok által vezérelt folyamat lehet a mikrobákkal történő koevolúció következtében. Az FHR fehérjék csaliként működhetnek, megakadályozva a H-faktor patogének által történő megkötését, ezáltal blokkolva a mikroorganizmusok, patogének komplementrendszer elől történő menekülését (209). Az FHR-ek is képesek versenyezni a H-faktoral különböző saját ligandumokért például különböző pentraxinokért (80, 109). Hasonlóan az irodalomban már jól jellemzett pozitív komplement szabályozó properdinhez (210), az FHR fehérjék felszínként szolgálnak az alternatív út konvertáz enzimek kialakításához (pl.: C3bBb) és képesek elősegíteni a komplement aktivációt a saját

ligandumokon, amikhez a fehérjék előzetesen kötődtek (80, 109). Az FHR-B is rendelkezik ilyen aktivitással, aktiválja az egér komplementet valamint elősegíti a komplement aktivációt, C3 fragmentumok lerakódását egér PTX3-on, egér CRP-n és Matrigelen (**4.3.5. ábra**).

A H-faktor hozzájárul a különböző saját sejt felszínek és nem sejt felszínek védelméhez a túlzott komplement aktiválás káros hatásaival szemben. A H-faktor extracelluláris mátrixhoz és az endotélsejtekhez való kötődésének védő szerepe különböző, betegséggel asszociált H-faktor mutációk és H-faktor autoantitestek funkcionális vizsgálatából, *in vitro* kísérletek eredményeiből és betegségek *in vivo* egérmodelljeiből ismert (50, 85, 130, 204, 205, 206). Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a komplementrendszer megfelelő mértékű aktivációja és gátlása (pl. az elpusztult sejtek opsonofagocitózisának elősegítéséhez, de a sejtek lízisének megakadályozásához) szükséges a homeosztázishoz és a káros gyulladás kialakulásának megelőzéséhez. A H-faktor C-terminális doménjei, de különösen a CCP 20-as doménje fontos a sejt felszíni glükózaminoglikánokhoz és szialavakhoz való kötődésben, valamint a komplement aktiváció során lerakódott C3b-vel történő kölcsönhatás kialakításához (42, 214, 215). A C-terminális domének az FHR fehérjék esetében konzerválódtak, beleértve az FHR-B-t is (**4.3.1. ábra**). Korábban kimutatták, hogy az egér FHR-ek szérumból kötődnek a HUVEC sejtek felszínéhez (118). Ezeket az eredményeket kiterjesztettük, és megvizsgáltuk a komplement aktiváció hatását HUVEC eredetű extracelluláris mátrixon, ahol az FHR-B szignifikánsan növelte a komplement aktivációt és a C3 fragmentumok lerakódását (**4.3.6. ábra**).

A H-faktor mutációi (212) vagy a C-terminális doméneket felismerő autoantitestek csökkent H-faktor kötődést okoznak a saját sejtek felszínéhez. Ez a csökkent védelem komplement mediált károsodáshoz vezethet. Ez *in vitro* mérhető birka vörösvérsejtek alkalmazásával végzett hemolízis vizsgálattal (212, 216). Ezt a kísérletet az egér FH15-20 és az FHR-B hatásának összehasonlítására is használtuk, melyeket exogén módon adtunk a hemolitikus rendszerhez. Mindkét molekula szignifikánsan megnövelte a birka vörösvérsejtek lízisét komplement aktív egér szérum jelenlétében, de az FHR-B szignifikánsan hatékonyabb volt, mint az FH15-20 fragmentum (**4.3.8. ábra**). Holers és munkatársai nemrégiben kimutatták, hogy az FHR-B (és az FHR-A is) a H-faktoriall ellentétes funkcióval bír a birka vörösvérsejteken elvégzett hemolízis vizsgálatban a sejtek védelmét tekintve, tehát fokozzák a lízist, valamint hogy az FHR-C nem képes indukálni a hemolízist. Az FHR-A és az FHR-B ebben az esszében lízist indukált (183), mely a saját eredményeinkkel egybevág.

Az FHR-B és az FH15-20 is képes kötődni a C3b-hez és a saját sejtek felszínéhez, valamint az FHR-B a C3b kötődésért kompetál a H-faktossal (**4.3.2/B ábra**). Ugyanerre az eredményre jutott egy másik kutatócsoport is, kimutatva hogy a humán FHR-1-hez és FHR-5-höz hasonlóan az FHR-A és az FHR-B is kompetál a H-faktossal a C3b és C3d kötésért a sejtek felszínén (183). Továbbá az FHR-B szignifikánsan jobban kötődött a C3b-hez, mint az FH15-20 (**4.3.2/A ábra**) valamint a komplement aktivációt közvetlenül is elősegítette (**4.3.4. ábra**), ami a saját eredményeinkkel összhangban magyarázhatja az FHR-B jelentős lítikus hatását.

A komplementrendszer a mikroorganizmusok és patogének eliminálása mellett részt vesz a szervezetben keletkező apoptotikus- és nekrotikus sejtek opszonofagocitózis általi eliminálásában. A H-faktor ezen sejtek felszínéhez kötődve hozzájárul a megfelelő mennyiségű opszonin előállításához anélkül, hogy a komplementrendszer túlzottan aktiválódna, illetve megelőzi az apoptotikus- és nekrotikus sejtek lízisét és az ezáltal okozott gyulladást (56). Nemrégiben leírták, hogy a humán FHR-1 és FHR-5 fehérjék képesek a nekrotikus sejtek felszínéhez kötődni és fokozzák a komplement aktiválódást, ezáltal a nekrotikus sejtek opszonizálását (24, 27). Eredményeink azt mutatják, hogy az FHR-B is képes kötődni a nekrotikus sejtekhez (**4.3.7/A ábra**) mind az egér A20- (érett fenotípusú B sejt vonal), mind a Jurkat T sejtekhez (**4.3.7/B-C ábra**), valamint a kötődött FHR-B képes ezen sejtek felszínén az alternatív komplementút aktivációját indukálni, mely C3 fragmentumok lerakódásához vezet egér szérumból. Nemrég megjelent publikációban vizsgálták az FHR-B komplement aktivációra kifejtett hatását egér vesetubuláris sejt vonalon (TEC), melyen megnövelte a sejt felszíni C3b depozíciót (183).

A vizsgálataink során limitáló tényezőként szerepelt, hogy nem álltak rendelkezésünkre a kísérletek során alkalmazott C3b és nekrotikus sejt egér megfelelői. Jól jellemzett, tisztított egér C3b-hez való nehéz hozzáférés miatt döntöttünk úgy, hogy az FHR-B és a C3b interakciót humán C3b-vel valamint a HUVEC ECM-hez történő kötődését és a mátrixon történő komplement aktivációt humán sejt vonalon végezzük el, mely funkcionális aktivitást mutatott az egér rendszerben. Ezt a megközelítést támasztják alá azok a korábbi közlemények, melyek az egér H-faktor, egér H-faktor CCP 18-20 fragmentum és az FHR-B-nek az emberi C3b és a HUVEC sejt vonal között történő kölcsönhatását vizsgálták (118, 164).

Az FHR-B fehérjével kapcsolatos eredményeink az első bizonyíték a H-faktor és az FHR fehérjék közötti kompetícióra egy nem humán FHR fehérje esetében. Az eredményeink alátámasztják azt az általános elképzelést, hogy az FHR fehérjék a H-faktor antagonistái és deregulálják a komplementet (75). Leírtuk az FHR-B új ligandumait pl.: egér PTX3, egér CRP, extracelluláris

mátrix valamint a nekrotikus sejteket. Fontos, hogy az FHR-B önmaga is képes a komplementet aktiválni, valamint pentraxinokhoz, ECM-hez és nekrotikus sejtekhez kötődve is. Ezek az adatok alátámasztják a humán- és az egér FHR fehérjék közötti konzervált funkciókat.

Összefoglalva, a dolgozatban bemutatott eredményeink alátámasztják azt az általános elképzelést, hogy az FHR fehérjék a H-faktor antagonistái és deregulálják a komplementet. Eredményeink segítségével jobban megérthetjük a H-faktor és az FHR-ek élettani szerepét, egyes betegségekben betöltött funkciójukat. Eredményeink arra utalnak, hogy az új CRIg-IgV_FH18-20 inhibitor molekulával lehetőség van a C3 szintjén gátolni az alternatív út működését, valamint hasznos lehet a sejt felszínen való komplementgátlásra illetve a nanogyógyszerek okozta komplement aktiváció gátlására is. Mivel jelenleg nem áll rendelkezésre publikált *in vivo* állatmodell az FHR fehérjék szerepének vizsgálatára, eredményeink lehetőséget adhatnak különböző állatmodellek kifejlesztésére az FHR fehérjék *in vivo* funkcióinak tanulmányozására.

6. Összefoglalás

Doktori dolgozatomban több irányból megközelítve vizsgáltuk a komplementrendszer szerepét. Arra kerestük a választ, hogy milyen funkcionális következményeket okoz a C3G-vel és az aHUS-sal is asszociált mutáció a H-faktor regulátor doménjeiben. Másrészt kíváncsiak voltunk, hogy az ezidáig kevésbé tanulmányozott egér FHR-B fehérjének mi lehet a szerepe, illetve a humán FHR-ekéhez hasonló-e a funkciója a komplement aktiváció során. Végül egy CRiG-H-faktor hibrid fehérjének a komplement aktivációra kifejtett potenciális gátló hatását vizsgáltuk. Ehhez a rekombinánsan előállított fehérjék (FH1-4_{W198R}, FHR-B, CRiG-IgV_FH18-20) C3b-vel, pentraxinokkal, ECM-mel való kölcsönhatását jellemeztük ligandum kötési és különböző komplement aktivációs esszékben *in vitro*.

Kimutattuk, hogy az FH_{W198R} mutáció nagymértékben csökkent C3b kötődést mutat ELISA és SPR mérések során, valamint a mutáns fehérjének csökkent kofaktor aktivitása van és a konvertáz bomlást gyorsító aktivitása is kisebb mértékű. A mutáns fragmentum kevésbé hatékonyan volt képes megvédeni a birka- és nyúl vörösvérsejteket a komplement közvetített lízistől.

Az FHR-B ligandumaként azonosítottuk az egér CRP-t, egér PTX3-at és az ECM-et. Ezen kívül C3b kötése révén képes funkcionálisan aktív, alternatív útra jellemző C3bBb konvertáz felépítésére. Kimutattuk, hogy az egér FHR-B is képes aktiválni a komplementet, illetve nekrotikus sejtekhez kötődve megnöveli a sejteken a C3 fragmentumok lerakódását, hasonlóan a humán FHR fehérjékhez.

A komplement inhibitorként jellemzett CRiG-H-faktor fúziós fehérje C3b-kötő képessége szignifikánsan emelkedett volt a H-faktorhoz képest. Kimutattuk, hogy az inhibitor fehérje képes a zimosán illetve liposzómális nanogyógyszerek által indukált komplement aktiváció gátlására, és képes megvédeni a sajátához hasonló sejteket a lízistől.

Eredményeink segítségével jobban megérthetjük a H-faktor és az FHR-ek élettani szerepét, egyes betegségekben betöltött funkciójukat, valamint az adott betegségek patomechanizmusát is. Eredményeink segíthetik továbbá a különböző, komplementrendszerrel összefüggő betegségek állatmodelljeinek továbbfejlesztését az FHR fehérjék *in vivo* funkcióinak tanulmányozására valamint potenciális terápiás célpontként történő vizsgálatára, és az így kapott eredmények értelmezését is.

7. Summary

In my doctoral dissertation we examined the role of the complement system from several directions. We searched for the functional consequences of a C3G and aHUS associated mutation in the factor H regulatory domains. We also investigated the function of the FHR-B protein, which has not been studied so far, and whether its role in complement activation is similar to that of the human FHRs. Finally, we investigated the potentially inhibitory effect of a CRiG-Factor H hybrid protein on complement activation. For this we characterized the interactions of recombinantly produced proteins (FH1-4_{W198R}, FHR-B, CRiG-IgV_FH18-20) with C3b, pentraxins, and ECM in ligand binding and various complement activation assays *in vitro*.

We have shown that the FH_{W198R} mutation resulted in decreased C3b binding in ELISA and SPR assays, and the mutant protein had a reduced cofactor activity and a lower rate of decay accelerating activity compared to the wild type protein. The mutant fragment was less effective in protecting sheep and rabbit red blood cells from complement mediated lysis.

Mouse CRP, mouse PTX3 and ECM were identified as ligands for FHR-B. In addition, C3b when bound to FHR-B is capable of generating a functionally active C3bBb convertase on FHR-B. FHR-B was shown to be capable of activating complement and by binding to necrotic cells, increases the deposition of C3 fragments on these cells, similarly to human FHR proteins.

The C3b binding capacity of the CRiG-Factor H complement inhibitor protein was significantly increased compared to that of factor H. We found that the hybrid protein is capable of inhibiting complement activation induced by zymosan or liposomal nanodrugs and it is able to protect the host-like cells from complement-mediated lysis.

Our results contribute to a better understanding of the physiological role of factor H and FHRs, their functions and the pathomechanism of certain diseases. In addition, our results may help to further develop animal models of various complement-related diseases to study the *in vivo* functions of FHR proteins, to examine them as potential therapeutic targets, and to interpret the results.

8. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Józsi Mihálynak, aki doktori tanulmányaim alatt hasznos tanácsaival segített, észrevételeivel támogatott munkám során. Köszönöm, hogy bevezetett a komplementrendszer rejtelseibe, megtanította a kísérletek szakszerű és pontos megtervezését.

Köszönöm az együttműködő partnereknek: Prof. Dr. Prohászka Zoltánnak, Dr. Csuka Dorottyának a Semmelweis Egyetem III.sz. Belgyógyászati Klinika, Kutatólaboratórium tagjainak a H-faktor mutációt hordozó fragmentummal kapcsolatos beteg adatokat. Prof. Dr. Szebeni Jánosnak és Mészáros Tamásnak a Semmelweis Egyetem, Kóréletani Intézet, Nanomedicina Kutató és Oktató Központ munkatársainak a CR1g-FH hibrid fehérjével kapcsolatos CARPA mérésekben nyújtott segítséget. Dr. Mario Hebeckernek, a jénai Hans Knöll Intézet „Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology” korábbi munkatársának a kísérletekben használt fehérjék előállítását. Dr. Lubka Roumeninának és Nicolas Merle-nek, a párizsi „French Institute of Health and Medical Research” munkatársainak a H-faktor mutációt hordozó fragmentummal kapcsolatos SPR méréseket.

Köszönöm a Dr. Józsi Mihály vezette komplement kutatócsoport összes jelenlegi és korábbi tagjának (Dr. Csincsi Ádám, Espárné Dr. Schneider Andrea, Kárpáti Éva, Dr. Kremlitzka Mariann, Matola Alexandra, Papp Alexandra, Dr. Sándor Noémi, Dr. Szabó Zsóka), hogy mindig fordulhattam hozzájuk, ha szakmai segítségre volt szükségem valamint a jó hangulatot. Külön kiemelném a csoportból Dr. Uzonyi Barbarát, aki nagyban hozzájárult eredményeim eléréséhez, valamint megtanított számos új módszer alkalmazására.

Köszönöm az ELTE Immunológiai Tanszék valamennyi munkatársának, hogy kérdéseimmel fordulhattam hozzájuk valamint a jó hangulatot, ami a munkám során körülvett. Továbbá köszönöm az elvégzett kutatásokat támogató szervezeteknek az anyagi segítséget: MTA „Lendület” Program (LP2012-43), Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K 109055 és K 125219), Kidneeds Foundation (Iowa, US).

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom Családomnak, Barátaimnak és Gidának, hogy az elmúlt évek során támogattak és mindig mellettem álltak. Nélkülük nem jutottam volna el idáig. Külön köszönöm Anyukámnak, aki sajnos nem érthette meg ezt a pillanatot. Ezt a dolgot neki ajánlom.

9. Publikációs lista:

Az értekezés alapját képező saját közlemények:

Cserhalmi M, Uzonyi B, Merle NS, Csuka D, Meusburger E, Lhotta K, Prohászka Z, Józsi M. **Functional Characterization of the Disease-Associated N-Terminal Complement Factor H Mutation W198R.**

Frontiers in Immunology. 2017 Dec 13;8:1800. (IF: 5.511)

Cserhalmi M, Csincsi ÁI, Mezei Z, Kopp A, Hebecker M, Uzonyi B, Józsi M. **The Murine Factor-H related protein B promotes complement activation.**

Frontiers in Immunology, 2017 Sep 19;8:1145. (IF: 5.511)

Egyéb közlemények:

Csincsi ÁI, Szabó Z, Bánlaki Z, Uzonyi B, Cserhalmi M, Kárpáti É, Tortajada A, Caesar JJE., Prohászka Z, Jokiranta TS, Lea SM, Rodríguez de Córdoba S, Józsi M. **FHR-1 binds to C-reactive protein and enhances rather than inhibits complement activation.**

Journal of Immunology, 2017 199:292-303. (IF: 4.539)

Szili D, Cserhalmi M, Bankó Z, Nagy G, Szymkowski DE, Sarmay G. **Suppression of innate and adaptive B cell activation pathways by antibody coengagement of FcγRIIb and CD19. MAbs.** 2014 Jul-Aug;6(4):991-9 (IF: 4.558)

Publikált absztraktok:

Cserhalmi M, Uzonyi B, Csuka D, Uray K, Iliás A, Prohászka Z, Józsi M. **Functional characterization of disease-associated variants of human factor H-related protein 5.** *Molecular Immunology* 2018, 102 pp. 170-171.

Papp A, Brandus B, Cserhalmi M, Uzonyi B, Ermert D, Barbosa AS, Blom AM, Isaac L, Meri S, Józsi M. **FHR1 and FHR5 compete with factor H for the binding to bacterial proteins and enhance complement activation.** *Molecular Immunology* 2018, 102 pp. 196-196.

Kárpáti É, Cserhalmi M, Csincsi ÁI, Hajnal D, Papp A, Uzonyi B, Józsi M. **Interaction of factor H family proteins with DNA and dead cells: Implications for the regulation of opsonization.** *Molecular Immunology* 2017, 89:140-141.

Papp A, Cserhalmi M, Csincsi ÁI, Uzonyi B, Ermert D, Blom AM, Józsi M. **Mapping of ligand binding sites provides insight into the function of factor H-related protein 5.** *Molecular Immunology* 2017, 89:145.

Cserhalmi M, Hebecker M, Mászáros T, Szebeni J, Józsi M. **In vitro evaluation of a CRiG-factor H hybrid complement inhibitor.** *Immunobiology* 2016, 221:10 pp. 1176-1176.

Weiszhar Z, Cserhalmi M, Csincsi ÁI, Lázár J, Takács L, Józsi M. **Novel monoclonal antibodies against human factor H allow mapping of functional domains and binding sites of autoantibodies.** *Molecular Immunology* 2015, 67:1 pp. 191-191.

10. Irodalomjegyzék:

1. Sim, R. B., W. Schwaeble, and T. Fujita. 2016. Complement research in the 18th-21st centuries: Progress comes with new technology. *Immunobiology* 221: 1037–45.
2. Merle, N. S., S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. 2015. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front. Immunol.* 6: 262.
3. Ricklin, D., and J. D. Lambris. 2007. Complement-targeted therapeutics. *Nat. Biotechnol.* 25: 1265–75.
4. Saggi, G., C. Cortes, H. N. Emch, G. Ramirez, R. G. Worth, and V. P. Ferreira. 2013. Identification of a Novel Mode of Complement Activation on Stimulated Platelets Mediated by Properdin and C3(H₂O). *J. Immunol.* .
5. Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang, and J. D. Lambris. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11: 785–797.
6. Bajic, G., S. E. Degn, S. Thiel, and G. R. Andersen. 2015. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J.* 34: 2735–57.
7. Nonaka, M., and A. Kimura. 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics* 58: 701–13.
8. Kishore, U., R. Ghai, T. J. Greenhough, A. K. Shrive, D. M. Bonifati, M. G. Gadjeva, P. Waters, M. S. Kojouharova, T. Chakraborty, and A. Agrawal. 2004. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol. Lett.* 95: 113–128.
9. Reid, K. B., and R. R. Porter. 1976. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem. J.* 155: 19–23.
10. Ehrnthaller, C., A. Ignatius, F. Gebhard, and M. Huber-Lang. 2011. New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol. Med.* 17: 317–29.
11. Dobó, J., A. Kocsis, and P. Gál. 2018. Be on Target: Strategies of Targeting Alternative and Lectin Pathway Components in Complement-Mediated Diseases. *Front. Immunol.* 9: 1851.
12. Beinrohr, L., J. Dobó, P. Závodszy, and P. Gál. 2008. C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. *Trends Mol. Med.* 14: 511–21.
13. Kolev, M., G. Le Friec, and C. Kemper. 2014. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 811–20.
14. Degn, S. E., and S. Thiel. 2013. Humoral pattern recognition and the complement system. *Scand. J. Immunol.* 78: 181–93.
15. Héja, D., A. Kocsis, J. Dobó, K. Szilágyi, R. Szász, P. Závodszy, G. Pál, and P. Gál. 2012. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 10498–503.
16. Ambrus, G., P. Gál, M. Kojima, K. Szilágyi, J. Balczér, J. Antal, L. Gráf, A. Laich, B. E. Moffatt, W. Schwaeble, R. B. Sim, and P. Závodszy. 2003. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. *J. Immunol.* 170: 1374–82.
17. PILLEMER, L., L. BLUM, I. H. LEPOW, O. A. ROSS, E. W. TODD, and A. C. WARDLAW. 1954. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* 120: 279–85.
18. HOLERS, V., and J. M. Thurman. 2004. The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting. *Mol. Immunol.* 41: 147–152.
19. Forneris, F., D. Ricklin, J. Wu, A. Tzekou, R. S. Wallace, J. D. Lambris, and P. Gros. 2010. Structures of C3b in Complex with Factors B and D Give Insight into Complement Convertase Formation. *Science* (80-.). 330: 1816–1820.

20. Schmidt, C. Q., A. P. Herbert, H. G. Hocking, D. Uhrin, and P. N. Barlow. 2008. Translational mini-review series on complement factor H: structural and functional correlations for factor H. *Clin. Exp. Immunol.* 151: 14–24.
21. He, J. Q., C. Wiesmann, and M. van Lookeren Campagne. 2008. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. *Mol. Immunol.* 45: 4041–7.
22. Small, A. G., M. Al-Baghdadi, A. Quach, C. Hii, and A. Ferrante. 2016. Complement receptor immunoglobulin: a control point in infection and immunity, inflammation and cancer. *Swiss Med. Wkly.* 146: w14301.
23. Anna Erdei. 2015. Immunológia. In *Medicina.* 187–210.
24. Erdei, A., N. Sándor, B. Mácsik-Valent, S. Lukácsi, M. Kremlitzka, and Z. Bajtay. 2016. The versatile functions of complement C3-derived ligands. *Immunol. Rev.* 274: 127–140.
25. Lukácsi, S., Z. Nagy-Baló, A. Erdei, N. Sándor, and Z. Bajtay. 2017. The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes. *Immunol. Lett.* 189: 64–72.
26. Sándor, N., S. Lukácsi, R. Ungai-Salánki, N. Orgován, B. Szabó, R. Horváth, A. Erdei, and Z. Bajtay. 2016. CD11c/CD18 Dominates Adhesion of Human Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells over CD11b/CD18. *PLoS One* 11: e0163120.
27. Losse, J., P. F. Zipfel, and M. Józsi. 2010. Factor H and factor H-related protein 1 bind to human neutrophils via complement receptor 3, mediate attachment to *Candida albicans*, and enhance neutrophil antimicrobial activity. *J. Immunol.* 184: 912–21.
28. Józsi, M., A. E. Schneider, É. Kárpáti, and N. Sándor. 2018. Complement factor H family proteins in their non-canonical role as modulators of cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* .
29. Helmy, K. Y., K. J. Katschke, N. N. Gorgani, N. M. Kljavin, J. M. Elliott, L. Diehl, S. J. Scales, N. Ghilardi, and M. van Lookeren Campagne. 2006. CR1g: A Macrophage Complement Receptor Required for Phagocytosis of Circulating Pathogens. *Cell* 124: 915–927.
30. Wiesmann, C., K. J. Katschke, J. Yin, K. Y. Helmy, M. Steffek, W. J. Fairbrother, S. A. McCallum, L. Embuscado, L. DeForge, P. E. Hass, and M. van Lookeren Campagne. 2006. Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation. *Nature* 444: 217–220.
31. Wagner, E., and M. M. Frank. 2010. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9: 43–56.
32. Medjeral-Thomas, N., and M. C. Pickering. 2016. The complement factor H-related proteins. *Immunol. Rev.* 274: 191–201.
33. De Córdoba, S. R., and E. G. De Jorge. 2007. Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin. Exp. Immunol.* 151: 1–13.
34. Schwaeble, W., H. Schwaiger, R. A. Brooimans, A. Barbieri, J. Möst, M. Hirsch-Kauffmann, M. Tiefenthaler, D. F. Lappin, M. R. Daha, and K. Whaley. 1991. Human complement factor H. Tissue specificity in the expression of three different mRNA species. *Eur. J. Biochem.* 198: 399–404.
35. NILSSON, U. R., and H. J. MUELLER-EBERHARD. 1965. ISOLATION OF BETA IF-GLOBULIN FROM HUMAN SERUM AND ITS CHARACTERIZATION AS THE FIFTH COMPONENT OF COMPLEMENT. *J. Exp. Med.* 122: 277–98.
36. Ripoché, J., A. J. Day, T. J. Harris, and R. B. Sim. 1988. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem. J.* 249: 593–602.
37. Whaley, K., and S. Ruddy. 1976. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J. Exp. Med.* 144: 1147–63.
38. Whaley, K., P. H. Schur, and S. Ruddy. 1979. Relative importance of C3b inactivator and beta 1H globulin in the modulation of the properdin amplification loop in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 36: 408–14.

39. Weiler, J. M., M. R. Daha, K. F. Austen, and D. T. Fearon. 1976. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 3268–72.
40. Kühn, S., C. Skerka, and P. F. Zipfel. 1995. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J. Immunol.* 155: 5663–70.
41. Gordon, D. L., R. M. Kaufman, T. K. Blackmore, J. Kwong, and D. M. Lublin. 1995. Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J. Immunol.* 155: 348–56.
42. Blaum, B. S., J. P. Hannan, A. P. Herbert, D. Kavanagh, D. Uhrin, and T. Stehle. 2015. Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H. *Nat. Chem. Biol.* 11: 77–82.
43. Pangburn, M. K. 2002. Cutting edge: localization of the host recognition functions of complement factor H at the carboxyl-terminal: implications for hemolytic uremic syndrome. *J. Immunol.* 169: 4702–6.
44. Oppermann, M., T. Manuelian, M. Józsi, E. Brandt, T. S. Jokiranta, S. Heinen, S. Meri, C. Skerka, O. Götze, and P. F. Zipfel. 2006. The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clin. Exp. Immunol.* 144: 342–52.
45. Schmidt, C. Q., F. C. Slingsby, A. Richards, and P. N. Barlow. 2011. Production of biologically active complement factor H in therapeutically useful quantities. *Protein Expr. Purif.* 76: 254–263.
46. Józsi, M., M. Oppermann, J. D. Lambris, and P. F. Zipfel. 2007. The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Mol. Immunol.* 44: 2697–706.
47. Leffler, J., A. P. Herbert, E. Norström, C. Q. Schmidt, P. N. Barlow, A. M. Blom, and M. Martin. 2010. Annexin-II, DNA, and histones serve as factor H ligands on the surface of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 285: 3766–76.
48. Deban, L., S. Jaillon, C. Garlanda, B. Bottazzi, and A. Mantovani. 2011. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res.* 343: 237–249.
49. Deban, L., H. Jarva, M. J. Lehtinen, B. Bottazzi, A. Bastone, A. Doni, T. S. Jokiranta, A. Mantovani, and S. Meri. 2008. Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J. Immunol.* 181: 8433–40.
50. Jarva, H., T. S. Jokiranta, J. Hellwage, P. F. Zipfel, and S. Meri. 1999. Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11. *J. Immunol.* 163: 3957–62.
51. Braunschweig, A., and M. Józsi. 2011. Human pentraxin 3 binds to the complement regulator c4b-binding protein. *PLoS One* 6: e23991.
52. Sjöberg, A. P., L. A. Trouw, F. D. G. McGrath, C. E. Hack, and A. M. Blom. 2006. Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting of the inhibitory activity of C4b-binding protein. *J. Immunol.* 176: 7612–20.
53. Ma, Y. J., A. Doni, M.-O. Skjoedt, C. Honoré, M. Arendrup, A. Mantovani, and P. Garred. 2011. Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system. *J. Biol. Chem.* 286: 3405–17.
54. Pepys, M. B., and G. M. Hirschfield. 2003. C-reactive protein: a critical update. *J. Clin. Invest.* 111: 1805–12.
55. Hakobyan, S., C. L. Harris, C. W. van den Berg, M. C. Fernandez-Alonso, E. G. de Jorge, S. R. de Cordoba, G. Rivas, P. Mangione, M. B. Pepys, and B. P. Morgan. 2008. Complement factor H binds to denatured rather than to native pentameric C-reactive protein. *J. Biol. Chem.* 283: 30451–60.
56. Mihlan, M., S. Stippa, M. Józsi, and P. F. Zipfel. 2009. Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H. *Cell Death Differ.* 16: 1630–1640.
57. Okemefuna, A. I., R. Nan, A. Miller, J. Gor, and S. J. Perkins. 2010. Complement Factor H Binds at Two Independent Sites to C-reactive Protein in Acute Phase Concentrations. *J. Biol. Chem.* 285: 1053–1065.

58. Inforzato, A., V. Riviuccio, A. P. Morreale, A. Bastone, A. Salustri, L. Scarchilli, A. Verdoliva, S. Vincenti, G. Gallo, C. Chiapparino, L. Pacello, E. Nucera, O. Serlupi-Crescenzi, A. J. Day, B. Bottazzi, A. Mantovani, R. De Santis, and G. Salvatori. 2008. Structural Characterization of PTX3 Disulfide Bond Network and Its Multimeric Status in Cumulus Matrix Organization. *J. Biol. Chem.* 283: 10147–10161.
59. Schmidt, C. Q., A. P. Herbert, D. Kavanagh, C. Gandy, C. J. Fenton, B. S. Blaum, M. Lyon, D. Uhrin, and P. N. Barlow. 2008. A new map of glycosaminoglycan and C3b binding sites on factor H. *J. Immunol.* 181: 2610–9.
60. Jokiranta, T. S., J. Hellwage, V. Koistinen, P. F. Zipfel, and S. Meri. 2000. Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J. Biol. Chem.* 275: 27657–62.
61. Sharma, A. K., and M. K. Pangburn. 1996. Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 10996–1001.
62. Wu, J., Y.-Q. Wu, D. Ricklin, B. J. C. Janssen, J. D. Lambris, and P. Gros. 2009. Structure of complement fragment C3b–factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat. Immunol.* 10: 728–733.
63. Kajander, T., M. J. Lehtinen, S. Hyvärinen, A. Bhattacharjee, E. Leung, D. E. Isenman, S. Meri, A. Goldman, and T. S. Jokiranta. 2011. Dual interaction of factor H with C3d and glycosaminoglycans in host-nonhost discrimination by complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 2897–902.
64. Morgan, H. P., C. Q. Schmidt, M. Guariento, B. S. Blaum, D. Gillespie, A. P. Herbert, D. Kavanagh, H. D. T. Mertens, D. I. Svergun, C. M. Johansson, D. Uhrin, P. N. Barlow, and J. P. Hannan. 2011. Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: 463–470.
65. Schwaeble, W., J. Zwirner, T. F. Schulz, R. P. Linke, M. P. Dierich, and E. H. Weiss. 1987. Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver. *Eur. J. Immunol.* 17: 1485–9.
66. Swinkels, M., J. H. Zhang, V. Tilakaratna, G. Black, R. Perveen, S. McHarg, A. Inforzato, A. J. Day, and S. J. Clark. 2018. C-reactive protein and pentraxin-3 binding of factor H-like protein 1 differs from complement factor H: Implications for retinal inflammation. *Sci. Rep.* .
67. Weinberger, A. W. A., C. Eddahabi, D. Carstesen, P. F. Zipfel, P. Walter, and C. Skerka. 2014. Human complement factor H and factor H-like protein 1 are expressed in human retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 51: 59–66.
68. Clark, S. J., C. Q. Schmidt, A. M. White, S. Hakobyan, B. P. Morgan, and P. N. Bishop. 2014. Identification of factor H-like protein 1 as the predominant complement regulator in Bruch’s membrane: implications for age-related macular degeneration. *J. Immunol.* 193: 4962–70.
69. Laine, M., H. Jarva, S. Seitsonen, K. Haapasalo, M. J. Lehtinen, N. Lindeman, D. H. Anderson, P. T. Johnson, I. Järvelä, T. S. Jokiranta, G. S. Hageman, I. Immonen, and S. Meri. 2007. Y402H polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein. *J. Immunol.* 178: 3831–6.
70. Haines, J. L., M. A. Hauser, S. Schmidt, W. K. Scott, L. M. Olson, P. Gallins, K. L. Spencer, S. Y. Kwan, M. Noureddine, J. R. Gilbert, N. Schnetz-Boutaud, A. Agarwal, E. A. Postel, and M. A. Pericak-Vance. 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308: 419–21.
71. Timmann, C., M. Leippe, and R. D. Horstmann. 1991. Two major serum components antigenically related to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no factor H-like complement regulatory functions. *J. Immunol.* 146: 1265–70.
72. Estaller, C., V. Koistinen, W. Schwaeble, M. P. Dierich, and E. H. Weiss. 1991. Cloning of the 1.4-kb mRNA species of human complement factor H reveals a novel member of the short consensus repeat family related to the carboxy terminal of the classical 150-kDa molecule. *J. Immunol.* 146: 3190–6.
73. Abarrategui-Garrido, C., R. Martinez-Barricarte, M. Lopez-Trascasa, S. Rodriguez de Cordoba, and P. Sanchez-Corral. 2009. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 114: 4261–4271.
74. Józsi, M., A. Tortajada, B. Uzonyi, E. Goicoechea de Jorge, and S. Rodriguez de Córdoba. 2015. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol.* 36: 374–84.

75. Goicoechea de Jorge, E., J. J. E. Caesar, T. H. Malik, M. Patel, M. Colledge, S. Johnson, S. Hakobyan, B. P. Morgan, C. L. Harris, M. C. Pickering, and S. M. Lea. 2013. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 4685–90.
76. Tortajada, A., H. Yébenes, C. Abarrategui-Garrido, J. Anter, J. M. García-Fernández, R. Martínez-Barricarte, M. Alba-Domínguez, T. H. Malik, R. Bedoya, R. Cabrera Pérez, M. López Trascasa, M. C. Pickering, C. L. Harris, P. Sánchez-Corral, O. Llorca, and S. Rodríguez de Córdoba. 2013. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *J. Clin. Invest.* 123: 2434–46.
77. van Beek, A. E., R. B. Pouw, M. C. Brouwer, G. van Mierlo, J. Geissler, P. Ooijevaar-de Heer, M. de Boer, K. van Leeuwen, T. Rispens, D. Wouters, and T. W. Kuijpers. 2017. Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and Heterodimers, while FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma. *Front. Immunol.* 8: 1328.
78. Strobel, S., C. Abarrategui-Garrido, E. Fariza-Requejo, H. Seeberger, P. Sánchez-Corral, and M. Józsi. 2011. Factor H-related protein 1 neutralizes anti-factor H autoantibodies in autoimmune hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 80: 397–404.
79. Heinen, S., A. Hartmann, N. Lauer, U. Wiehl, H.-M. Dahse, S. Schirmer, K. Gropp, T. Enghardt, R. Wallich, S. Halbich, M. Mihlan, U. Schlotzer-Schrehardt, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2009. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* 114: 2439–2447.
80. Csincsi, Á. I., Z. Szabó, Z. Bánlaki, B. Uzonyi, M. Cserhalmi, É. Kárpáti, A. Tortajada, J. J. E. Caesar, Z. Prohászka, T. S. Jokiranta, S. M. Lea, S. Rodríguez de Córdoba, and M. Józsi. 2017. FHR-1 Binds to C-Reactive Protein and Enhances Rather than Inhibits Complement Activation. *J. Immunol.* 199: 292–303.
81. Kopp, A., S. Strobel, A. Tortajada, S. Rodriguez de Cordoba, P. Sanchez-Corral, Z. Prohaszka, M. Lopez-Trascasa, and M. Jozsi. 2012. Atypical Hemolytic Uremic Syndrome-Associated Variants and Autoantibodies Impair Binding of Factor H and Factor H-Related Protein 1 to Pentraxin 3. *J. Immunol.* 189: 1858–1867.
82. Holmes, L. V., L. Strain, S. J. Staniforth, I. Moore, K. Marchbank, D. Kavanagh, J. A. Goodship, H. J. Cordell, and T. H. J. Goodship. 2013. Determining the population frequency of the CFHR3/CFHR1 deletion at 1q32. *PLoS One* 8: e60352.
83. Tortajada, A., E. Gutiérrez, E. Goicoechea de Jorge, J. Anter, A. Segarra, M. Espinosa, M. Blasco, E. Roman, H. Marco, L. F. Quintana, J. Gutiérrez, S. Pinto, M. Lopez-Trascasa, M. Praga, and S. Rodríguez de Córdoba. 2017. Elevated factor H-related protein 1 and factor H pathogenic variants decrease complement regulation in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 92: 953–963.
84. Zipfel, P. F., M. Edey, S. Heinen, M. Józsi, H. Richter, J. Misselwitz, B. Hoppe, D. Routledge, L. Strain, A. E. Hughes, J. A. Goodship, C. Licht, T. H. J. Goodship, and C. Skerka. 2007. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet.* 3: e41.
85. Valoti, E., M. Alberti, A. Tortajada, J. Garcia-Fernandez, S. Gastoldi, L. Besso, E. Bresin, G. Remuzzi, S. Rodriguez de Cordoba, and M. Noris. 2015. A novel atypical hemolytic uremic syndrome-associated hybrid CFHR1/CFH gene encoding a fusion protein that antagonizes factor H-dependent complement regulation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 209–19.
86. Venables, J. P., L. Strain, D. Routledge, D. Bourn, H. M. Powell, P. Warwicker, M. L. Diaz-Torres, A. Sampson, P. Mead, M. Webb, Y. Pirson, M. S. Jackson, A. Hughes, K. M. Wood, J. A. Goodship, and T. H. J. Goodship. 2006. Atypical haemolytic uraemic syndrome associated with a hybrid complement gene. *PLoS Med.* 3: e431.
87. Eyler, S. J., N. C. Meyer, Y. Zhang, X. Xiao, C. M. Nester, and R. J. H. Smith. 2013. A novel hybrid CFHR1/CFH gene causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 28: 2221–5.
88. Dragon-Durey, M.-A., C. Blanc, F. Marliot, C. Loirat, J. Blouin, C. Sautes-Fridman, W. H. Fridman, and V. Fremeaux-Bacchi. 2009. The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Genet.* 46: 447–450.
89. Józsi, M., C. Licht, S. Strobel, S. L. H. Zipfel, H. Richter, S. Heinen, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2008. Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood* 111: 1512–4.
90. Skerka, C., J. M. Moulds, P. Taillon-Miller, D. Hourcade, and P. F. Zipfel. 1995. The human factor H-related gene

2 (FHR2): structure and linkage to the coagulation factor XIIIb gene. *Immunogenetics* 42: 268–74.

91. Eberhardt, H. U., D. Buhlmann, P. Hortschansky, Q. Chen, S. Böhm, M. J. Kemper, R. Wallich, A. Hartmann, T. Hallström, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2013. Human Factor H-Related Protein 2 (CFHR2) Regulates Complement Activation. *PLoS One* 8: e78617.

92. Pouw, R. B., M. C. Brouwer, J. Geissler, L. V van Herpen, S. S. Zeerleder, W. A. Wuillemijn, D. Wouters, and T. W. Kuijpers. 2016. Complement Factor H-Related Protein 3 Serum Levels Are Low Compared to Factor H and Mainly Determined by Gene Copy Number Variation in CFHR3. *PLoS One* 11: e0152164.

93. Schäfer, N., A. Grosche, J. Reinders, S. M. Hauck, R. B. Pouw, T. W. Kuijpers, D. Wouters, B. Ehrenstein, V. Enzmann, P. F. Zipfel, C. Skerka, and D. Pauly. 2016. Complement Regulator FHR-3 Is Elevated either Locally or Systemically in a Selection of Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 7: 542.

94. Bernabéu-Herrero, M. E., M. Jiménez-Alcázar, J. Anter, S. Pinto, D. Sánchez Chinchilla, S. Garrido, M. López-Trascasa, S. Rodríguez de Córdoba, and P. Sánchez-Corral. 2015. Complement factor H, FHR-3 and FHR-1 variants associate in an extended haplotype conferring increased risk of atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol. Immunol.* 67: 276–86.

95. Pouw, R. B., I. Gómez Delgado, A. López Lera, S. Rodríguez de Córdoba, D. Wouters, T. W. Kuijpers, and P. Sánchez-Corral. 2018. High Complement Factor H-Related (FHR)-3 Levels Are Associated With the Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome-Risk Allele CFHR3*B. *Front. Immunol.* 9: 848.

96. Hellwege, J., T. S. Jokiranta, V. Koistinen, O. Vaarala, S. Meri, and P. F. Zipfel. 1999. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* 462: 345–52.

97. Fritsche, L. G., N. Lauer, A. Hartmann, S. Stippa, C. N. Keilhauer, M. Oppermann, M. K. Pandey, J. Köhl, P. F. Zipfel, B. H. F. Weber, and C. Skerka. 2010. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum. Mol. Genet.* 19: 4694–704.

98. Skerka, C., J. Hellwege, W. Weber, A. Tilkorn, F. Buck, T. Marti, E. Kampen, U. Beisiegel, and P. F. Zipfel. 1997. The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 272: 5627–34.

99. Józsi, M., H. Richter, I. Löschnann, C. Skerka, F. Buck, U. Beisiegel, A. Erdei, and P. F. Zipfel. 2005. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 13: 321–9.

100. Pouw, R. B., M. C. Brouwer, A. E. van Beek, M. Józsi, D. Wouters, and T. W. Kuijpers. 2018. Complement Factor H-Related Protein 4A Is the Dominant Circulating Splice Variant of CFHR4. *Front. Immunol.* 9: 729.

101. Skerka, C., Q. Chen, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. 2013. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol. Immunol.* 56: 170–80.

102. Hebecker, M., and M. Józsi. 2012. Factor H-related protein 4 activates complement by serving as a platform for the assembly of alternative pathway C3 convertase via its interaction with C3b protein. *J. Biol. Chem.* 287: 19528–36.

103. Hebecker, M., A. I. Okemefuna, S. J. Perkins, M. Mihlan, M. Huber-Lang, and M. Józsi. 2010. Molecular basis of C-reactive protein binding and modulation of complement activation by factor H-related protein 4. *Mol. Immunol.* 47: 1347–55.

104. Mihlan, M., M. Hebecker, H.-M. Dahse, S. Hälbig, M. Huber-Lang, R. Dahse, P. F. Zipfel, and M. Józsi. 2009. Human complement factor H-related protein 4 binds and recruits native pentameric C-reactive protein to necrotic cells. *Mol. Immunol.* 46: 335–344.

105. McRae, J. L., P. J. Cowan, D. A. Power, K. I. Mitchelhill, B. E. Kemp, B. P. Morgan, and B. F. Murphy. 2001. Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *J. Biol. Chem.* 276: 6747–54.

106. van Beek, A. E., R. B. Pouw, M. C. Brouwer, G. van Mierlo, J. Geissler, P. Ooijevaar-de Heer, M. de Boer, K. van Leeuwen, T. Rispens, D. Wouters, and T. W. Kuijpers. 2017. Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and Heterodimers, while FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma. *Front. Immunol.* 8: 1328.

107. McRae, J. L., T. G. Duthy, K. M. Griggs, R. J. Ormsby, P. J. Cowan, B. A. Cromer, W. J. McKinstry, M. W.

- Parker, B. F. Murphy, and D. L. Gordon. 2005. Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J. Immunol.* 174: 6250–6.
108. Rudnick, R. B., Q. Chen, E. D. Stea, A. Hartmann, N. Papac-Milicevic, F. Person, M. Wiesener, C. J. Binder, T. Wiech, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2018. FHR5 Binds to Laminins, Uses Separate C3b and Surface-Binding Sites, and Activates Complement on Malondialdehyde-Acetaldehyde Surfaces. *J. Immunol.* 200: 2280–2290.
109. Csincsi, Á. I., A. Kopp, M. Zöldi, Z. Bánlaki, B. Uzonyi, M. Hebecker, J. J. E. Caesar, M. C. Pickering, K. Daigo, T. Hamakubo, S. M. Lea, E. Goicoechea de Jorge, and M. Józsi. 2015. Factor H-Related Protein 5 Interacts with Pentraxin 3 and the Extracellular Matrix and Modulates Complement Activation. *J. Immunol.* 194: 4963–4973.
110. Zwarthoff, S. A., E. T. M. Berends, S. Mol, M. Ruyken, P. C. Aerts, M. Józsi, C. J. C. de Haas, S. H. M. Rooijackers, and R. D. Gorham. 2018. Functional Characterization of Alternative and Classical Pathway C3/C5 Convertase Activity and Inhibition Using Purified Models. *Front. Immunol.* 9: 1691.
111. Murphy, B., T. Georgiou, D. Machet, P. Hill, and J. McRae. 2002. Factor H-related protein-5: A novel component of human glomerular immune deposits. *Am. J. Kidney Dis.* 39: 24–27.
112. Abrera-Abeleda, M. A., C. Nishimura, J. L. H. Smith, S. Sethi, J. L. McRae, B. F. Murphy, G. Silvestri, C. Skerka, M. Józsi, P. F. Zipfel, G. S. Hageman, and R. J. H. Smith. 2006. Variations in the complement regulatory genes factor H (CFH) and factor H related 5 (CFHR5) are associated with membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease). *J. Med. Genet.* 43: 582–9.
113. Monteferrante, G., S. Brioschi, J. Caprioli, G. Pianetti, P. Bettinaglio, E. Bresin, G. Remuzzi, and M. Noris. 2007. Genetic analysis of the complement factor H related 5 gene in haemolytic uraemic syndrome. *Mol. Immunol.* 44: 1704–1708.
114. Westra, D., K. A. Vernon, E. B. Volokhina, M. C. Pickering, N. C. A. J. van de Kar, and L. P. van den Heuvel. 2012. Atypical hemolytic uremic syndrome and genetic aberrations in the complement factor H-related 5 gene. *J. Hum. Genet.* 57: 459–64.
115. Gale, D. P., E. G. de Jorge, H. T. Cook, R. Martinez-Barricarte, A. Hadjisavvas, A. G. McLean, C. D. Pusey, A. Pierides, K. Kyriacou, Y. Athanasiou, K. Voskarides, C. Deltas, A. Palmer, V. Frémeaux-Bacchi, S. R. de Cordoba, P. H. Maxwell, and M. C. Pickering. 2010. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet (London, England)* 376: 794–801.
116. Pouw, R. B., D. W. Vredevoogd, T. W. Kuijpers, and D. Wouters. 2015. Of mice and men: The factor H protein family and complement regulation. *Mol. Immunol.* 67: 12–20.
117. Vik, D. P., P. Muñoz-Cánoves, H. Kozono, L. G. Martin, B. F. Tack, and D. D. Chaplin. 1990. Identification and sequence analysis of four complement factor H-related transcripts in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 265: 3193–201.
118. Hellwage, J., F. Eberle, T. Babuke, H. Seeberger, H. Richter, A. Kunert, A. Härtl, P. F. Zipfel, T. S. Jokiranta, and M. Józsi. 2006. Two factor H-related proteins from the mouse: expression analysis and functional characterization. *Immunogenetics* 58: 883–893.
119. Cheng, Z.-Z., J. Hellwage, H. Seeberger, P. F. Zipfel, S. Meri, and T. S. Jokiranta. 2006. Comparison of surface recognition and C3b binding properties of mouse and human complement factor H. *Mol. Immunol.* 43: 972–979.
120. Mehta, G., V. P. Ferreira, C. Skerka, P. F. Zipfel, and N. K. Banda. 2014. New insights into disease-specific absence of complement factor H related protein C in mouse models of spontaneous autoimmune diseases. *Mol. Immunol.* 62: 235–48.
121. Ricklin, D., and J. D. Lambris. 2007. Complement-targeted therapeutics. *Nat. Biotechnol.* 25: 1265–75.
122. Noris, M., and G. Remuzzi. 2009. Atypical Hemolytic–Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 361: 1676–1687.
123. Warwicker, P., T. H. J. Goodship, R. L. Donne, Y. Pirson, A. Nicholls, R. M. Ward, P. Turnpenny, and J. A. Goodship. 1998. Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 53: 836–844.
124. Nester, C. M., T. Barbour, S. R. de Cordoba, M. A. Dragon-Durey, V. Fremeaux-Bacchi, T. H. J. Goodship, D. Kavanagh, M. Noris, M. Pickering, P. Sanchez-Corral, C. Skerka, P. Zipfel, and R. J. H. Smith. 2015. Atypical aHUS: State of the art. *Mol. Immunol.* 67: 31–42.

125. Delvaeye, M., M. Noris, A. De Vriese, C. T. Esmon, N. L. Esmon, G. Ferrell, J. Del-Favero, S. Plaisance, B. Claes, D. Lambrechts, C. Zoja, G. Remuzzi, and E. M. Conway. 2009. Thrombomodulin Mutations in Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 361: 345–357.
126. Józsi, M., S. Heinen, A. Hartmann, C. W. Ostrowicz, S. Hälbig, H. Richter, A. Kunert, C. Licht, R. E. Saunders, S. J. Perkins, P. F. Zipfel, and C. Skerka. 2006. Factor H and atypical hemolytic uremic syndrome: mutations in the C-terminus cause structural changes and defective recognition functions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 170–7.
127. Manuelian, T., J. Hellwage, S. Meri, J. Caprioli, M. Noris, S. Heinen, M. Jozsi, H. P. H. Neumann, G. Remuzzi, and P. F. Zipfel. 2003. Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Invest.* 111: 1181–1190.
128. Saunders, R. E., C. Abarrategui-Garrido, V. Frémeaux-Bacchi, E. Goicoechea de Jorge, T. H. J. Goodship, M. López Trascasa, M. Noris, I. M. Ponce Castro, G. Remuzzi, S. Rodríguez de Córdoba, P. Sánchez-Corral, C. Skerka, P. F. Zipfel, and S. J. Perkins. 2007. The interactive Factor H-atypical hemolytic uremic syndrome mutation database and website: update and integration of membrane cofactor protein and Factor I mutations with structural models. *Hum. Mutat.* 28: 222–34.
129. Dragon-Durey, M.-A., C. Loirat, S. Cloarec, M.-A. Macher, J. Blouin, H. Nivet, L. Weiss, W. H. Fridman, and V. Frémeaux-Bacchi. 2005. Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 555–63.
130. Noris, M., S. Brioschi, J. Caprioli, M. Todeschini, E. Bresin, F. Porrati, S. Gamba, G. Remuzzi, and International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP. 2003. Familial haemolytic uraemic syndrome and an MCP mutation. *Lancet (London, England)* 362: 1542–7.
131. Kavanagh, D., E. J. Kemp, E. Mayland, R. J. Winney, J. S. Duffield, G. Warwick, A. Richards, R. Ward, J. A. Goodship, and T. H. J. Goodship. 2005. Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 2150–5.
132. Abarrategui-Garrido, C., R. Martínez-Barricarte, M. López-Trascasa, S. R. de Córdoba, and P. Sánchez-Corral. 2009. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 114: 4261–71.
133. Moore, I., L. Strain, I. Pappworth, D. Kavanagh, P. N. Barlow, A. P. Herbert, C. Q. Schmidt, S. J. Staniforth, L. V. Holmes, R. Ward, L. Morgan, T. H. J. Goodship, and K. J. Marchbank. 2010. Association of factor H autoantibodies with deletions of CFHR1, CFHR3, CFHR4, and with mutations in CFH, CFI, CD46, and C3 in patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 115: 379–387.
134. Venables, J. P., L. Strain, D. Routledge, D. Bourn, H. M. Powell, P. Warwicker, M. L. Diaz-Torres, A. Sampson, P. Mead, M. Webb, Y. Pirson, M. S. Jackson, A. Hughes, K. M. Wood, J. A. Goodship, and T. H. J. Goodship. 2006. Atypical Haemolytic Uraemic Syndrome Associated with a Hybrid Complement Gene. *PLoS Med.* 3: e431.
135. Maga, T. K., N. C. Meyer, C. Belsha, C. J. Nishimura, Y. Zhang, and R. J. H. Smith. 2011. A novel deletion in the RCA gene cluster causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant* 26: 739–41.
136. Eyler, S. J., N. C. Meyer, Y. Zhang, X. Xiao, C. M. Nester, and R. J. H. Smith. 2013. A novel hybrid CFHR1/CFH gene causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 28: 2221–2225.
137. Valoti, E., M. Alberti, A. Tortajada, J. Garcia-Fernandez, S. Gastoldi, L. Besso, E. Bresin, G. Remuzzi, S. Rodriguez de Cordoba, and M. Noris. 2015. A Novel Atypical Hemolytic Uremic Syndrome-Associated Hybrid CFHR1/CFH Gene Encoding a Fusion Protein That Antagonizes Factor H-Dependent Complement Regulation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 209–219.
138. Challis, R. C., G. S. R. Araujo, E. K. S. Wong, H. E. Anderson, A. Awan, A. M. Dorman, M. Waldron, V. Wilson, V. Brocklebank, L. Strain, B. P. Morgan, C. L. Harris, K. J. Marchbank, T. H. J. Goodship, and D. Kavanagh. 2016. A De Novo Deletion in the Regulators of Complement Activation Cluster Producing a Hybrid Complement Factor H/Complement Factor H-Related 3 Gene in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* .
139. Francis, N. J., B. McNicholas, A. Awan, M. Waldron, D. Reddan, D. Sadlier, D. Kavanagh, L. Strain, K. J. Marchbank, C. L. Harris, and T. H. J. Goodship. 2012. A novel hybrid CFH/CFHR3 gene generated by a microhomology-mediated deletion in familial atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 119: 591–601.

140. Gharavi, A. G., K. Kiryluk, M. Choi, Y. Li, P. Hou, J. Xie, S. Sanna-Cherchi, C. J. Men, B. A. Julian, R. J. Wyatt, J. Novak, J. C. He, H. Wang, J. Lv, L. Zhu, W. Wang, Z. Wang, K. Yasuno, M. Gunel, S. Mane, S. Umlauf, I. Tikhonova, I. Beeran, S. Savoldi, R. Magrioni, G. M. Ghiggeri, M. Bodria, F. Lugani, P. Ravani, C. Ponticelli, L. Allegri, G. Boscutti, G. Frasca, A. Amore, L. Peruzzi, R. Coppo, C. Izzi, B. F. Viola, E. Prati, M. Salvadori, R. Mignani, L. Gesualdo, F. Bertinetto, P. Mesiano, A. Amoroso, F. Scolari, N. Chen, H. Zhang, and R. P. Lifton. 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat. Genet.* 43: 321–7.
141. Zhao, J., H. Wu, M. Khosravi, H. Cui, X. Qian, J. A. Kelly, K. M. Kaufman, C. D. Langefeld, A. H. Williams, M. E. Comeau, J. T. Ziegler, M. C. Marion, A. Adler, S. B. Glenn, M. E. Alarcón-Riquelme, B. A. Pons-Estel, J. B. Harley, S.-C. Bae, S.-Y. Bang, S.-K. Cho, C. O. Jacob, T. J. Vyse, T. B. Niewold, P. M. Gaffney, K. L. Moser, R. P. Kimberly, J. C. Edberg, E. E. Brown, G. S. Alarcon, M. A. Petri, R. Ramsey-Goldman, L. M. Vilá, J. D. Reveille, J. A. James, G. S. Gilkeson, D. L. Kamen, B. I. Freedman, J.-M. Anaya, J. T. Merrill, L. A. Criswell, R. H. Scofield, A. M. Stevens, J. M. Guthridge, D.-M. Chang, Y. W. Song, J. A. Park, E. Y. Lee, S. A. Boackle, J. M. Grossman, B. H. Hahn, T. H. J. Goodship, R. M. Cantor, C.-Y. Yu, N. Shen, B. P. Tsao, N. Shen, and B. P. Tsao. 2011. Association of Genetic Variants in Complement Factor H and Factor H-Related Genes with Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility. *PLoS Genet.* 7: e1002079.
142. Martínez-Barricarte, R., S. Recalde, P. Fernández-Robredo, I. Millán, L. Olavarrieta, A. Viñuela, J. Pérez-Pérez, A. García-Layana, S. Rodríguez de Córdoba, and Spanish Multicenter Group on AMD. 2012. Relevance of complement factor H-related 1 (CFHR1) genotypes in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53: 1087–94.
143. Mache, C. J., B. Acham-Roschitz, V. Fremeaux-Bacchi, M. Kirschfink, P. F. Zipfel, S. Roedl, U. Vester, and E. Ring. 2009. Complement Inhibitor Eculizumab in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4: 1312–1316.
144. D'Agati, V. D., and A. S. Bomback. 2012. C3 glomerulopathy: what's in a name? *Kidney Int.* 82: 379–81.
145. Zipfel, P. F., C. Skerka, Q. Chen, T. Wiech, T. Goodship, S. Johnson, V. Fremeaux-Bacchi, C. Nester, S. R. de Córdoba, M. Noris, M. Pickering, and R. Smith. 2015. The role of complement in C3 glomerulopathy. *Mol. Immunol.* 67: 21–30.
146. Fakhouri, F., V. Frémeaux-Bacchi, L.-H. Noël, H. T. Cook, and M. C. Pickering. 2010. C3 glomerulopathy: a new classification. *Nat. Rev. Nephrol.* 6: 494–9.
147. Józsi, M., S. Reuter, P. Nozal, M. López-Trascasa, P. Sánchez-Corral, Z. Prohászka, and B. Uzonyi. 2014. Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome. *Immunol. Lett.* 160: 163–171.
148. Strobel, S., M. Zimmering, K. Papp, J. Prechl, and M. Józsi. 2010. Anti-factor B autoantibody in dense deposit disease. *Mol. Immunol.* 47: 1476–83.
149. Marinozzi, M. C., L. T. Roumenina, S. Chauvet, A. Hertig, D. Bertrand, J. Olagne, M. Frimat, T. Ulinski, G. Deschênes, S. Burtey, M. Delahousse, B. Moulin, C. Legendre, V. Frémeaux-Bacchi, and M. Le Quintrec. 2017. Anti-Factor B and Anti-C3b Autoantibodies in C3 Glomerulopathy and Ig-Associated Membranoproliferative GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* 28: 1603–1613.
150. Goodship, T. H. J., I. Y. Pappworth, T. Toth, M. Denton, K. Houlberg, F. McCormick, D. Warland, I. Moore, E.-M. Hunze, S. J. Staniforth, C. Hayes, D. P. Cavalcante, D. Kavanagh, L. Strain, A. P. Herbert, C. Q. Schmidt, P. N. Barlow, C. L. Harris, and K. J. Marchbank. 2012. Factor H autoantibodies in membranoproliferative glomerulonephritis. *Mol. Immunol.* 52: 200–206.
151. Licht, C., S. Heinen, M. Józsi, I. Löschmann, R. E. Saunders, S. J. Perkins, R. Waldherr, C. Skerka, M. Kirschfink, B. Hoppe, and P. F. Zipfel. 2006. Deletion of Lys224 in regulatory domain 4 of Factor H reveals a novel pathomechanism for dense deposit disease (MPGN II). *Kidney Int.* 70: 42–50.
152. Abrera-Abeleda, M. A., C. Nishimura, K. Frees, M. Jones, T. Maga, L. M. Katz, Y. Zhang, and R. J. H. Smith. 2011. Allelic variants of complement genes associated with dense deposit disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22: 1551–9.
153. Servais, A., L.-H. Noël, L. T. Roumenina, M. Le Quintrec, S. Ngo, M.-A. Dragon-Durey, M.-A. Macher, J. Zuber, A. Karras, F. Provot, B. Moulin, J.-P. Grünfeld, P. Niaudet, P. Lesavre, and V. Frémeaux-Bacchi. 2012. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3

glomerulopathies. *Kidney Int.* 82: 454–464.

154. Tortajada, A., H. Yébenes, C. Abarategui-Garrido, J. Anter, J. M. García-Fernández, R. Martínez-Barricarte, M. Alba-Domínguez, T. H. Malik, R. Bedoya, R. Cabrera Pérez, M. López Trascasa, M. C. Pickering, C. L. Harris, P. Sánchez-Corral, O. Llorca, and S. Rodríguez de Córdoba. 2013. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *J. Clin. Invest.* 123: 2434–46.

155. Abrera-Abeleda, M. A., C. Nishimura, J. L. H. Smith, S. Sethi, J. L. McRae, B. F. Murphy, G. Silvestri, C. Skerka, M. Józsi, P. F. Zipfel, G. S. Hageman, and R. J. H. Smith. 2006. Variations in the complement regulatory genes factor H (CFH) and factor H related 5 (CFHR5) are associated with membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease). *J. Med. Genet.* 43: 582–9.

156. Monteferrante, G., S. Briosci, J. Caprioli, G. Pianetti, P. Bettinaglio, E. Bresin, G. Remuzzi, and M. Noris. 2007. Genetic analysis of the complement factor H related 5 gene in haemolytic uraemic syndrome. *Mol. Immunol.* 44: 1704–8.

157. Malik, T. H., P. J. Lavin, E. Goicoechea de Jorge, K. A. Vernon, K. L. Rose, M. P. Patel, M. de Leeuw, J. J. Neary, P. J. Conlon, M. P. Winn, and M. C. Pickering. 2012. A hybrid CFHR3-1 gene causes familial C3 glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23: 1155–60.

158. Chen, Q., M. Wiesener, H. U. Eberhardt, A. Hartmann, B. Uzonyi, M. Kirschfink, K. Amann, M. Buettner, T. Goodship, C. Hugo, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2014. Complement factor H-related hybrid protein deregulates complement in dense deposit disease. *J. Clin. Invest.* 124: 145–55.

159. Xiao, X., C. Ghossein, A. Tortajada, Y. Zhang, N. Meyer, M. Jones, N. G. Borsa, C. M. Nester, C. P. Thomas, S. R. de Córdoba, and R. J. H. Smith. 2016. Familial C3 glomerulonephritis caused by a novel CFHR5-CFHR2 fusion gene. *Mol. Immunol.* 77: 89–96.

160. Togarsimalemath, S. K., S. K. Sethi, R. Duggal, M. Le Quintrec, P. Jha, R. Daniel, F. Gonnet, S. Bansal, L. T. Roumenina, V. Frémeaux-Bacchi, V. Kher, and M.-A. Dragon-Durey. 2017. A novel CFHR1-CFHR5 hybrid leads to a familial dominant C3 glomerulopathy. *Kidney Int.* 92: 876–887.

161. Boon, C. J. F., N. C. van de Kar, B. J. Klevering, J. E. E. Keunen, F. P. M. Cremers, C. C. W. Klaver, C. B. Hoyng, M. R. Daha, and A. I. den Hollander. 2009. The spectrum of phenotypes caused by variants in the CFH gene. *Mol. Immunol.* 46: 1573–94.

162. Dragon-Durey, M.-A., C. Loirat, S. Cloarec, M.-A. Macher, J. Blouin, H. Nivet, L. Weiss, W. H. Fridman, and V. Frémeaux-Bacchi. 2005. Anti-Factor H Autoantibodies Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 555–563.

163. Ault, B. H., B. Z. Schmidt, N. L. Fowler, C. E. Kashtan, A. E. Ahmed, B. A. Vogt, and H. R. Colten. 1997. Human factor H deficiency. Mutations in framework cysteine residues and block in H protein secretion and intracellular catabolism. *J. Biol. Chem.* 272: 25168–75.

164. Cheng, Z.-Z., J. Hellwege, H. Seeberger, P. F. Zipfel, S. Meri, and T. S. Jokiranta. 2006. Comparison of surface recognition and C3b binding properties of mouse and human complement factor H. *Mol. Immunol.* 43: 972–9.

165. Szebeni, J. 2001. Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs, and radiocontrast agents. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 18: 567–606.

166. Nichols, E.-M., T. D. Barbour, I. Y. Pappworth, E. K. S. Wong, J. M. Palmer, N. S. Sheerin, M. C. Pickering, and K. J. Marchbank. 2015. An extended mini-complement factor H molecule ameliorates experimental C3 glomerulopathy. *Kidney Int.* 88: 1314–1322.

167. Schmidt, C. Q., H. Bai, Z. Lin, A. M. Risitano, P. N. Barlow, D. Ricklin, and J. D. Lambris. 2013. Rational Engineering of a Minimized Immune Inhibitor with Unique Triple-Targeting Properties. *J. Immunol.* 190: 5712–5721.

168. Hebecker, M., M. Alba-Dominguez, L. T. Roumenina, S. Reuter, S. Hyvarinen, M.-A. Dragon-Durey, T. S. Jokiranta, P. Sanchez-Corral, and M. Jozsi. 2013. An Engineered Construct Combining Complement Regulatory and Surface-Recognition Domains Represents a Minimal-Size Functional Factor H. *J. Immunol.* 191: 912–921.

169. Esparza-Gordillo, J., E. Goicoechea de Jorge, A. Buil, L. Carreras Berges, M. López-Trascasa, P. Sánchez-

- Corral, and S. Rodríguez de Córdoba. 2005. Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Hum. Mol. Genet.* 14: 703–12.
170. Szarvas, N., Á. Szilágyi, D. Csuka, B. Takács, K. Rusai, T. Müller, K. Arbeiter, M. Réti, Á. Haris, L. Wagner, S. Török, K. Kelen, A. J. Szabó, G. S. Reusz, B. P. Morgan, and Z. Prohászka. 2016. Genetic analysis and functional characterization of novel mutations in a series of patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol. Immunol.* 71: 10–22.
171. Wong, E. K. S., H. E. Anderson, A. P. Herbert, R. C. Challis, P. Brown, G. S. Reis, J. O. Tellez, L. Strain, N. Fluck, A. Humphrey, A. Macleod, A. Richards, D. Ahlert, M. Santibanez-Koref, P. N. Barlow, K. J. Marchbank, C. L. Harris, T. H. J. Goodship, and D. Kavanagh. 2014. Characterization of a factor H mutation that perturbs the alternative pathway of complement in a family with membranoproliferative GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25: 2425–33.
172. Dragon-Durey, M.-A., V. Frémeaux-Bacchi, C. Loirat, J. Blouin, P. Niaudet, G. Deschenes, P. Coppo, W. Herman Fridman, and L. Weiss. 2004. Heterozygous and homozygous factor h deficiencies associated with hemolytic uremic syndrome or membranoproliferative glomerulonephritis: report and genetic analysis of 16 cases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 787–95.
173. Kerr, H., E. Wong, E. Makou, Y. Yang, K. Marchbank, D. Kavanagh, A. Richards, A. P. Herbert, and P. N. Barlow. 2017. Disease-linked mutations in factor H reveal pivotal role of cofactor activity in self-surface-selective regulation of complement activation. *J. Biol. Chem.* 292: 13345–13360.
174. Pechtl, I. C., D. Kavanagh, N. McIntosh, C. L. Harris, and P. N. Barlow. 2011. Disease-associated N-terminal complement factor H mutations perturb cofactor and decay-accelerating activities. *J. Biol. Chem.* 286: 11082–90.
175. Falcão, D. A., E. S. Reis, D. Paixão-Cavalcante, M. T. Amano, M. I. M. V Delcolli, M. P. C. Florido, J. A. T. Albuquerque, D. Moraes-Vasconcelos, A. J. Duarte, A. S. Grumach, and L. Isaac. 2008. Deficiency of the human complement regulatory protein factor H associated with low levels of component C9. *Scand. J. Immunol.* 68: 445–55.
176. Albuquerque, J. A. T., M. L. Lamers, M. M. Castiblanco-Valencia, M. Dos Santos, and L. Isaac. 2012. Chemical chaperones curcumin and 4-phenylbutyric acid improve secretion of mutant factor H R127H by fibroblasts from a factor H-deficient patient. *J. Immunol.* 189: 3242–8.
177. Yang, Y., H. Denton, O. R. Davies, K. Smith-Jackson, H. Kerr, A. P. Herbert, P. N. Barlow, M. C. Pickering, and K. J. Marchbank. 2018. An Engineered Complement Factor H Construct for Treatment of C3 Glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 29: 1649–1661.
178. Szebeni, J., P. Bedocs, Z. Rozsnyay, Z. Weiszhar, R. Urbanics, L. Rosivall, R. Cohen, O. Garbuzenko, G. Báthori, M. Tóth, R. Bünger, and Y. Barenholz. 2012. Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: Factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* .
179. Szebeni, J., F. M. Muggia, and C. R. Alving. 1998. Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: An in vitro study. *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 300–306.
180. Szebeni, J. 2012. Hemocompatibility testing for nanomedicines and biologicals: Predictive assays for complement mediated infusion reactions. In *European Journal of Nanomedicine*.
181. Mészáros, T., Á. I. Csincsi, B. Uzonyi, M. Hebecker, T. G. Fülöp, A. Erdei, J. Szebeni, and M. Józsi. 2016. Factor H inhibits complement activation induced by liposomal and micellar drugs and the therapeutic antibody rituximab in vitro. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* .
182. Hebecker, M., A. I. Okemefuna, S. J. Perkins, M. Mihlan, M. Huber-Lang, and M. Józsi. 2010. Molecular basis of C-reactive protein binding and modulation of complement activation by factor H-related protein 4. *Mol. Immunol.* 47: 1347–1355.
183. Antonioli, A. H., J. White, F. Crawford, B. Renner, K. J. Marchbank, J. P. Hannan, J. M. Thurman, P. Marrack, and V. M. Holers. 2018. Modulation of the Alternative Pathway of Complement by Murine Factor H-Related Proteins. *J. Immunol.* 200: 316–326.
184. Sánchez-Corral, P., R. B. Pouw, M. López-Trascasa, and M. Józsi. 2018. Self-Damage Caused by Dysregulation

of the Complement Alternative Pathway: Relevance of the Factor H Protein Family. *Front. Immunol.* .

185. Rodriguez, E., P. M. Rallapalli, A. J. Osborne, and S. J. Perkins. 2014. New functional and structural insights from updated mutational databases for complement factor H, Factor I, membrane cofactor protein and C3. *Biosci. Rep.* .

186. Goodship, T. H. J., H. T. Cook, F. Fakhouri, F. C. Fervenza, V. Frémeaux-Bacchi, D. Kavanagh, C. M. Nester, M. Noris, M. C. Pickering, S. Rodríguez de Córdoba, L. T. Roumenina, S. Sethi, R. J. H. Smith, C. E. Alpers, G. B. Appel, G. Ardissino, G. Ariceta, M. Arici, A. Bagga, I. M. Bajema, M. Blasco, L. Burke, T. D. Cairns, M. Carratala, V. D. D'Agati, M. R. Daha, A. S. De Vriese, M. A. Dragon-Durey, A. B. Fogo, M. Galbusera, D. P. Gale, H. Haller, S. Johnson, M. Józsi, D. Karpman, L. Lanning, M. Le Quintrec, C. Licht, C. Loirat, F. Monfort, B. P. Morgan, L. H. Noël, M. M. O'Shaughnessy, M. Rabant, E. Rondeau, P. Ruggenti, N. S. Sheerin, J. Smith, F. Spoletti, J. M. Thurman, N. C. A. J. van de Kar, M. Vivarelli, and P. F. Zipfel. 2017. Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. In *Kidney International*.

187. Kopp, A., M. Hebecker, E. Svobodová, and M. Józsi. 2012. Factor H: A complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules* .

188. Nester, C. M., T. Barbour, S. R. de Cordoba, M. A. Dragon-Durey, V. Fremeaux-Bacchi, T. H. J. Goodship, D. Kavanagh, M. Noris, M. Pickering, P. Sanchez-Corral, C. Skerka, P. Zipfel, and R. J. H. Smith. 2015. Atypical aHUS: State of the art. *Mol. Immunol.* 67: 31–42.

189. Xue, X., J. Wu, D. Ricklin, F. Forneris, P. Di Crescenzo, C. Q. Schmidt, J. Granneman, T. H. Sharp, J. D. Lambris, and P. Gros. 2017. Regulator-dependent mechanisms of C3b processing by factor i allow differentiation of immune responses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* .

190. Timmermans, S. A. M. E. G., M. A. Abdul-Hamid, J. Vanderlocht, J. G. M. C. Damoiseaux, C. P. Reutelingsperger, P. van Paassen, F. de Heer, M. Krekels, F. Stiff, G. Verseput, S. Boorsma, W. Grave, J. Huitema, J. Wirtz, N. ter Braak, L. Frenken, S. Gaertner, M. Christiaans, T. Fung, M. Gelens, J. Kooman, K. Leunissen, E. Litjens, J. van der Net, F. van der Sande, and E. van Duijnhoven. 2017. Patients with hypertension-associated thrombotic microangiopathy may present with complement abnormalities. *Kidney Int.* .

191. Cooper, M., M. E. McGraw, D. J. Unsworth, and P. Mathieson. 2004. Familial mesangio-capillary glomerulonephritis with initial presentation as haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.* .

192. Gnappi, E., M. Allinovi, A. Vaglio, E. Bresin, A. Sorosina, F. P. Pilato, L. Allegri, and L. Manenti. 2012. Membrano-proliferative glomerulonephritis, atypical hemolytic uremic syndrome, and a new complement factor H mutation: Report of a case. *Pediatr. Nephrol.* .

193. Janssen Van Doorn, K., E. Dirinck, G. A. Verpooten, and M. M. Couttenye. 2013. Complement factor H mutation associated with membranoproliferative glomerulonephritis with transformation to atypical haemolytic uraemic syndrome. *Clin. Kidney J.* .

194. de Córdoba, S. R. 2016. Complement genetics and susceptibility to inflammatory disease. Lessons from genotype-phenotype correlations. *Immunobiology* .

195. Merinero, H. M., S. P. García, J. García-Fernández, E. Arjona, A. Tortajada, and S. Rodríguez de Córdoba. 2018. Complete functional characterization of disease-associated genetic variants in the complement factor H gene. *Kidney Int.* .

196. Tortajada, A., S. Pinto, J. Martínez-Ara, M. López-Trascasa, P. Sánchez-Corral, and S. R. De Córdoba. 2012. Complement factor H variants I890 and L1007 while commonly associated with atypical hemolytic uremic syndrome are polymorphisms with no functional significance. *Kidney Int.* .

197. Longhurst, H. J., S. Carr, and K. Khair. 2007. C1-inhibitor concentrate home therapy for hereditary angioedema: A viable, effective treatment option. *Clin. Exp. Immunol.* .

198. Li, J. S., J. Jagers, and P. A. W. Anderson. 2006. The use of TP10, soluble complement receptor 1, in cardiopulmonary bypass. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* .

199. Fridkis-Hareli, M., M. Storek, I. Mazsaroff, A. M. Risitano, A. S. Lundberg, C. J. Horvath, and M. V. Holers.

2011. Design and development of TT30, a novel C3d-targeted C3/C5 convertase inhibitor for treatment of human complement alternative pathway-mediated diseases. *Blood* .
200. Holers, M., N. Banda, G. Mehta, M. Fridkis-Hareli, E. Or, M. Storek, R. Altman, K. Johnson, and S. Katti. 2012. The human complement receptor type 2 (CR2)/CR1 fusion protein TT32, a targeted inhibitor of the classical and alternative pathway C3 convertases, prevents arthritis in active immunization and passive transfer models and acts by CR2-dependent targeting of . *Immunobiology* 217: 1210.
201. Harder, M. J., M. Anliker, B. Höchsmann, T. Simmet, M. Huber-Lang, H. Schrezenmeier, D. Ricklin, J. D. Lambris, P. N. Barlow, and C. Q. Schmidt. 2016. Comparative Analysis of Novel Complement-Targeted Inhibitors, MiniFH, and the Natural Regulators Factor H and Factor H-like Protein 1 Reveal Functional Determinants of Complement Regulation. *J. Immunol.* .
202. Mastellos, D. C., D. Yancopoulou, P. Kokkinos, M. Huber-Lang, G. Hajishengallis, A. R. Biglarnia, F. Lupu, B. Nilsson, A. M. Risitano, D. Ricklin, and J. D. Lambris. 2015. Compstatin: A C3-targeted complement inhibitor reaching its prime for bedside intervention. *Eur. J. Clin. Invest.* .
203. Qu, H., P. Magotti, D. Ricklin, E. L. Wu, I. Kourtzelis, Y. Q. Wu, Y. N. Kaznessis, and J. D. Lambris. 2011. Novel analogues of the therapeutic complement inhibitor compstatin with significantly improved affinity and potency. *Mol. Immunol.* .
204. Michelfelder, S., F. Fischer, A. Wäldin, K. V. Hörle, M. Pohl, J. Parsons, R. Reski, E. L. Decker, P. F. Zipfel, C. Skerka, and K. Häffner. 2018. The MFHR1 Fusion Protein Is a Novel Synthetic Multitarget Complement Inhibitor with Therapeutic Potential. *J. Am. Soc. Nephrol.* .
205. Qiao, Q., X. Teng, N. Wang, R. Lu, L. Guo, X. Zhang, Y. Du, W. Wang, S. Chen, Q. Wu, G. He, Y. Wang, and W. Hu. 2014. A novel CR1g-targeted complement inhibitor protects cells from complement damage. *FASEB J.* .
206. Hu, C., L. Li, P. Ding, L. Li, X. Ge, L. Zheng, X. Wang, J. Wang, W. Zhang, N. Wang, H. Gu, F. Zhong, M. Xu, R. Rong, T. Zhu, and W. Hu. 2018. Complement Inhibitor CR1g/FH Ameliorates Renal Ischemia Reperfusion Injury via Activation of PI3K/AKT Signaling. *J. Immunol.* ji1800987.
207. Ruseva, M. M., V. Ramaglia, B. P. Morgan, and C. L. Harris. 2015. An anticomplement agent that homes to the damaged brain and promotes recovery after traumatic brain injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* .
208. Harris, C. L. 2018. Expanding horizons in complement drug discovery: challenges and emerging strategies. *Semin. Immunopathol.* .
209. Józsi, M. 2017. Factor H family proteins in complement evasion of microorganisms. *Front. Immunol.* .
210. Spitzer, D., L. M. Mitchell, J. P. Atkinson, and D. E. Hourcade. 2007. Properdin Can Initiate Complement Activation by Binding Specific Target Surfaces and Providing a Platform for De Novo Convertase Assembly. *J. Immunol.* .
211. Vernon, K. A., E. Goicoechea de Jorge, A. E. Hall, V. Fremeaux-Bacchi, T. J. Aitman, H. T. Cook, R. Hangartner, A. Koziell, and M. C. Pickering. 2012. Acute presentation and persistent glomerulonephritis following streptococcal infection in a patient with heterozygous complement factor H-related protein 5 deficiency. *Am. J. Kidney Dis.* 60: 121–5.
212. Cserhalmi, M., B. Uzonyi, N. S. Merle, D. Csuka, E. Meusburger, K. Lhotta, Z. Prohászka, and M. Józsi. 2017. Functional characterization of the disease-associated N-terminal complement factor H Mutation W198R. *Front. Immunol.* .
213. Banda, N. K., G. Mehta, V. P. Ferreira, C. Cortes, M. C. Pickering, M. K. Pangburn, W. P. Arend, and V. M. Holers. 2013. Essential Role of Surface-Bound Complement Factor H in Controlling Immune Complex-Induced Arthritis. *J. Immunol.* .
214. Jokiranta, T. S., Z. Z. Cheng, H. Seeberger, M. Józsi, S. Heinen, M. Noris, G. Remuzzi, R. Ormsby, D. L. Gordon, S. Meri, J. Hellwege, and P. F. Zipfel. 2005. Binding of complement factor H to endothelial cells is mediated by the carboxy-terminal glycosaminoglycan binding site. *Am. J. Pathol.* .
215. Józsi, M., S. Strobel, H. M. Dahse, W. S. Liu, P. F. Hoyer, M. Oppermann, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2007.

Anti-factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome. *Blood* .

216. Strobel, S., P. F. Hoyer, C. J. MacHe, E. Sulyok, W. S. Liu, H. Richter, M. Oppermann, P. F. Zipfel, and M. Józsi. 2010. Functional analyses indicate a pathogenic role of factor H autoantibodies in atypical haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.* .

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Cserhalmi Marcell.....

MTMT-azonosító: 10048505.....

A doktori értekezés címe és alcíme: A komplementrendszer aktiválódását gátló H-faktor és az FHR molekulák patológias szerepének vizsgálata

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2018.263

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola.....

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Immunológia Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Józsi Mihály Krisztián, Ph.D., D.Sc.

A témavezető munkahelye: ELTE-TTK Immunológiai Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatali Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (dátum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2019. január 3.



.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet