

MTA doktori értekezés tézisei

A H-faktor molekulacsalád tagjainak élettani funkciója és szerepük komplement-közvetítette betegségekben

Józsi Mihály



MTA-ELTE „Lendület” Komplement Kutatócsoport
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Immunológiai Tanszék

Budapest, 2017

1. Bevezetés

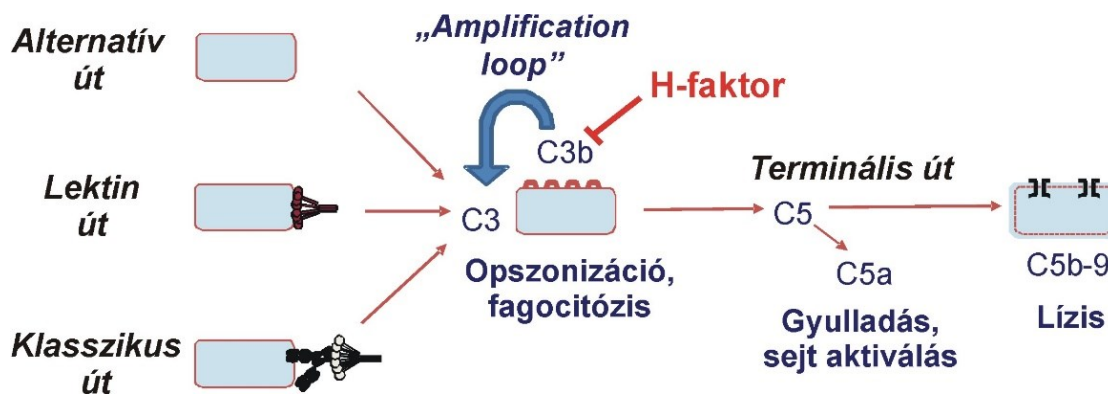
Immunrendszerünk részeként az ún. veleszületett immunitás biztosítja az azonnali hatékony védelmet a kórokozó mikroorganizmusok ellen, valamint számos más élettani folyamatban is fontos szerepet tölt be. A veleszületett immunitás egyik legfontosabb, testszerte jelen lévő és működő molekuláris eleme a komplementrendszer. A fertőzések elleni védelem kívül fontos szerepet játszik többek között az elpusztult sejtek, illetve sejt-törmelékek eltakarításában, gyulladásos folyamatokban, és befolyásolja a veleszületett és az adaptív immunrendszer sejtjeinek aktiválódását. Régóta ismert, hogy a komplement számos betegség kialakulásában vagy lefolyásában is szerepet játszik. Az utóbbi években azonban egyre több szisztémás és szerv-specifikus betegséggel hozták a komplementrendszert kapcsolatba, és megjelent az első, komplementet célzó gyógyszer is. A komplementrendszer, elsősorban az alternatív komplementaktivációs út szabályozásában a H-faktor nevű szérumfehérjének kitüntetett szerepe van, ami emiatt több betegség kapcsán is az érdeklődés középpontjába került. A H-faktor és öt ún. H-faktorról rokon (FHR) fehérje, vagyis a H-faktor fehérjecsalád tagjai genetikai vizsgálatok alapján szerepet játszanak többek között a vaksággal járó időskori makuladegeneráció (AMD), valamint a vesét érintő számos megbetegedés (atípusos hemolitikus urémiás szindróma [aHUS], C3 glomerulopátiák [C3G], CFHR5 nefropátia, IgA nefropátia, szisztémás lupusz eritematózus [SLE]) kialakulásában, de befolyásolják a *Neisseria meningitidis* által okozott fertőzésre való hajlamot is. Az MTA doktori értekezésem a H-faktor molekulacsalád kutatása során elért eredményeket összegzi.

2. Tudományterületi háttér

A komplementrendszer aktivációja és működésének szabályozása

A komplementrendszer több mint 40 molekulából áll, melyek között plazma fehérjék, szabályozófehérjék és az egyes molekulákat vagy azok fragmentumait megkötő receptorok találhatók. Az ide sorolható fehérjék egy része mintázatfelismerő funkcióval rendelkezik, azaz bizonyos testidegen (pl. patogén mikrobák felszínén megtalálható, de a saját sejtjeinkre nem jellemző) molekuláris mintázatokat, köztük mikrobák sejtfalában található jellegzetes szénhidrátsoportokat, vagy a saját szervezetünkben csak bizonyos körülmények között (pl. szöveti sérülés, sejtthál esetén) hozzáférhetővé váló molekulákat ismer fel, azokhoz kötődik. A felismerő molekulák általában enzimatis aktivitású komplementfehérjékkel

kapcsolódnak, amelyek azután bizonyos komplement komponenseket képesek hasítani. Az így aktivált komponensek teszik egyrészt lehetővé a kaszkád tovább vitelét és felerősítését, másrészt különböző biológiai funkciókat közvetíthetnek (Ricklin et al., 2010).



1. ábra. A komplementrendszer aktivációs útjainak és az aktiváció fő funkcionális következményeinek sematikus ábrázolása. Mindhárom komplementaktivációs út a központi molekula, a C3 hasítását eredményezi. Az alternatív út felerősíti a komplementaktivációt a – bármely út aktiválódása során – képződő C3b fragmentumok általi visszacsatolás révén („amplification loop”). A H-faktor az alternatív út fő szabályozó fehérjéje, ami a C3b molekulán hatva gátolja a komplementaktivációt, a C3b-komponensű C3- és C5 konvertázokat, ezáltal az amplifikációt és a terminális utat is.

A komplementrendszer három fő útvonalon aktiválódhat (1. ábra). A klasszikus út aktiválódását a C1 molekulakomplex aktivációja indítja el, melynek során a C1q komponens immunkomplexben lévő immunglobulinhoz, vagy egyes mintázatfelismerő molekulákhoz, így például pentraxinokhoz kötődik, de a C1q kötődhet többek között extracelluláris mátrix fehérjékhez is, vagy közvetlenül az apoptotikus/nekrotikus sejtek vagy mikrobák felszínéhez. A lektin utat a mannózkötő lektin (MBL) vagy a fikolinok szerin proteázokkal alkotott komplexének bizonyos szénhidráts csoportokhoz, illetve acetilált molekulákhoz való kötődése aktiválhatja. A klasszikus és a lektin utak aktivációja több lépésben a C4b2b enzimatis komplex, a klasszikus C3 konvertáz kialakulásához vezet, amely a központi komplement komponens, a C3 hasítását végzi C3a és C3b fragmentumokra. Az alternatív út aktivációja kis mértékben folyamatosan, spontán zajlik, melynek során a C3 molekulában található tioészter kötés hidrolízise révén megváltozik a molekula konformációja, és a folyadék fázisban képessé válik a B-faktor megkötésére. Ezáltal kialakulhat az alternatív út ún. kezdeti C3 konvertáz enzime, amely a C3(H₂O)Bb komplex. Ez az enzim – hasonlóan a klasszikus és lektin út aktivációja során kialakuló C4b2b C3 konvertázhoz – C3 molekulákat

képes hasítani. A C3 molekulát a konvertáz enzimek a kisebb méretű C3a fragmentumra és a nagyobb méretű C3b fragmentumra hasítják. A keletkező C3b reaktív tioészter kötése révén képes szénhidrátokhoz vagy fehérjékhez kapcsolódni észter, illetve amid kötéssel, ezáltal kovalensen kötődhet a környezetében található molekulákhoz vagy sejtekhez. A C3b a B-faktor megkötése révén kialakíthatja az alternatív út C3bBb C3 konvertáz enzimét, ami további C3 molekulákat hasít. Ezáltal az alternatív út jelentősen felerősítheti a komplementaktivációt, és annak zömét adhatja, bármely úton indult is el eredetileg a rendszer aktiválódása. Másfelől a C3b molekula kapcsolódása a C4b2b és C3bBb enzim komplexekhez lehetővé teszi, hogy az immár C4b2b3b és C3bBb3b enzimek a C5 molekulát hasítsák, és ezáltal elinduljon a terminális út, amely végül elvezethet a C5b-9 molekulakomplex felépüléséhez. A C5b-9 komplex a felépülése során a sejtmembránba ágyazódva pórust alakít ki, és a célsejt oldódását, lízisét okozhatja.

A komplementrendszer aktiválódása során keletkező kis molekulatömegű fragmentumok közül a C3a és különösen a C5a tölt be fontos szerepet C3a-, illetve C5a-receptoron hatva a gyulladásos folyamatokban, sejtek aktiválásában. A C3 hasításakor keletkező C3b fragmentum az aktiváló sejtek felszínére leköttödvé a C3bBb konvertáz kialakítása révén helyileg fokozhatja a komplementaktivációt, valamint a C3b és annak további enzimatis feldolgozása során keletkező, a komplementaktivációs kaszkád szempontjából már inaktív fragmentumai (iC3b, C3d) receptorokhoz kötődve fokozhatják a célsejt fagocitózis útján történő eltávolítását (ún. opszonikus hatás, ill. opszonofagocitózis), illetve immunsejtek aktivációját befolyásolhatják. A C5 hasításakor keletkező C5b fragmentum a terminális út beindításához szükséges.

Mivel ez a rendszer a mikroorganizmusok mellett a szervezet saját sejtjeire és szöveteire is potenciális veszélyt jelent, több mechanizmus biztosítja a komplementaktiváció megfelelő szabályozását. A testfolyadékokban az egyes aktivációs utak különböző pontjain ható szabályozó molekulák vannak jelen, valamint sejtjeink felszínén szintén kifejeződnek szabályozó fehérjék, amelyek gátolhatják a rendszer aktivációját vagy a membránkárosító C5b-9 komplex létrejöttét. További biztosíték az aktív C3b molekulában található tioészter kötés gyors hidrolízise, amely során a molekula elveszti a kovalens kapcsolódás lehetőségét, tehát az „időablak”, amikor a C3b valamihez hozzákötődhet, rövid. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a C3b molekula önmagában nem tud különbséget tenni saját és nem-saját között, tehát bármely megfelelő közelségben lévő molekulához vagy sejthez hozzákötődhet.

Amennyiben nem megfelelő felszínen, vagy nem megfelelő ideig (tehát térben és időben nem megfelelően korlátozva) megy végbe a komplementrendszer aktivációja, különböző fertőző és gyulladásos betegségek alakulhatnak ki. Orvosi beavatkozások során, „természetellenesen” is aktiválódhat a komplementrendszer, amely komoly problémát és kockázatot jelenthet. Erre példa a vérkeringés lokális leállítása, majd szervek újra perfundálása során, a beültetett vagy ideiglenesen behelyezett mesterséges anyagok felszínén (pl. kanülök, sztentek), vagy a szervezetbe juttatott gyógyszerek és segédanyagok (pl. liposzomális és micelláris gyógyszerhordozók, kontrasztanyagok) által kiváltott komplementaktiváció (Ricklin et al., 2016).

Az emberi 1-es kromoszóma hosszú karján egy csoportban, az RCA (regulators of complement activation) génklaszterben számos, komplementszabályozó molekulát, illetve komplement receptort kódoló gént azonosítottak. Az itt kódolt komplement fehérjékre jellemző egy globuláris domén, az ún. complement control protein (CCP) domén előfordulása (Sushi-domén és SCR – short consensus repeat – domén néven is ismert), mely különböző számban található meg – esetenként más domén típusokkal együtt – ezekben a molekulákban. A génklaszter sorozatos duplikációk eredményeként jött létre, emiatt a molekulák szerkezetileg és funkcionálisan is egymás rokonai: többük képes a C3b és/vagy a C4b molekula megkötésére, ezáltal a komplementszabályozó, illetve -receptor funkció betöltésére (Krushkal et al., 2000). Hat gén elkülönülve a többi komplementgéntől egy kis csoportot alkot ebben a régióban: ezek a H-faktor molekulacsalád tagjait kódoló gének.

A H-faktor molekulacsalád tagjai és szerepük betegségekben

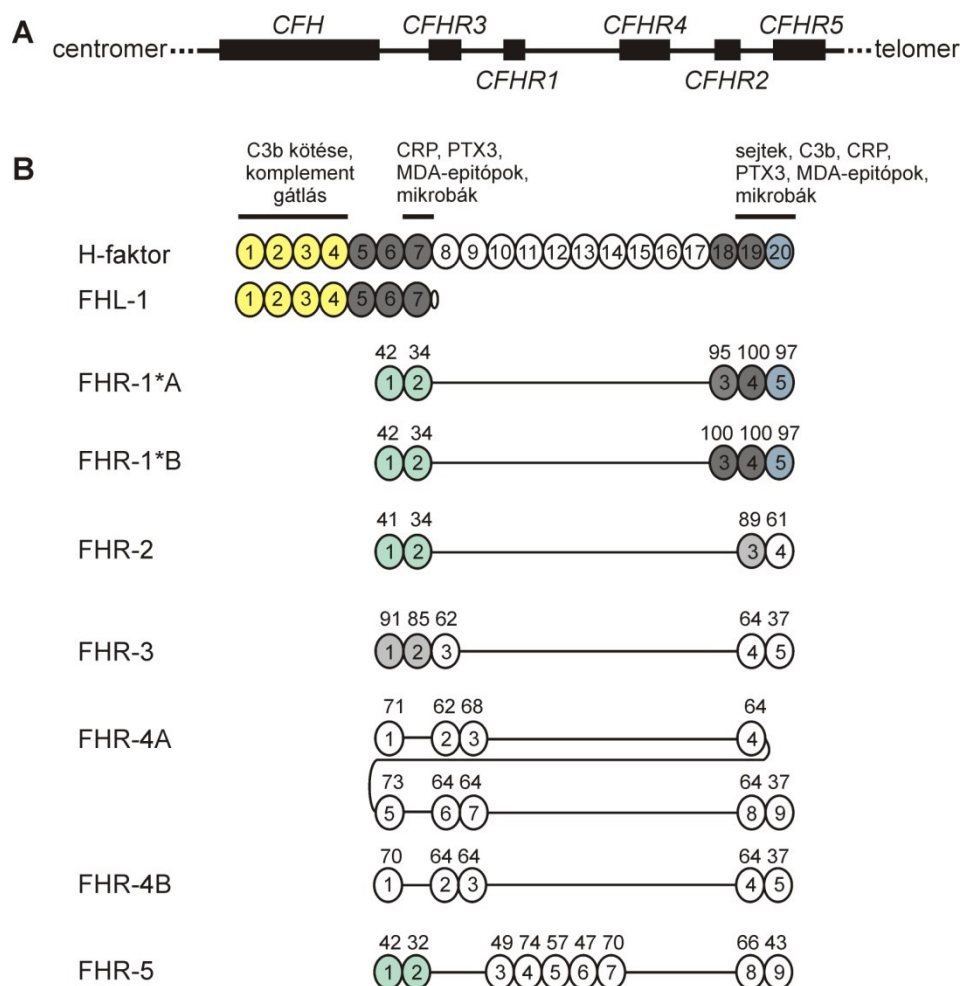
A H-faktor az alternatív út fő szolubilis szabályozó fehérjéje (1. ábra). A H-faktort fehérje szinten 1965-ben azonosították (Nilsson and Müller-Eberhard, 1965), később leírták a molekula fő funkcióját a komplementrendszer aktivációjának szabályozásában (Weiler et al., 1976; Whaley and Ruddy, 1976). Részletes funkcionális jellemzése, az egyes domének szerepének a vizsgálata csak a H-faktor klónozása és rekombináns fehérjeként való előállítását követően vált lehetővé. Ennek során fedezték fel a H-faktor mRNS-éhez nagyon hasonló mRNS-eket, illetve a H-faktor ellen termeltetett ellenanyagokkal való keresztreakció révén szérumban kimutatható kisebb molekulatömegű fehérjéket, amelyekről egy idő után nyilvánvalóvá vált, hogy nem a H-faktor enzimatis hasítással keletkező fragmentumai, hanem önálló génekről átíródó, H-faktor-szerű vagy H-faktorról rokon fehérjék.

A H-faktor egy 155 kDa molekulatömegű glikoprotein, amely a C3b-vel kölcsönhatva három mechanizmus révén tölti be a *komplementaktivációt gátló* szerepét. Egyrészt a C3b-hez kötődve a B-faktorról való kompetíció révén gátolja a C3bBb konvertáz létrejöttét. Másrészt a már kialakult konvertázról le tudja szorítani az enzimatisz aktivitással bíró Bb fragmentumot, ezzel gyorsítja a C3bBb konvertáz enzim egyébként magától is megtörténő szétesését (convertase decay accelerating activity). Harmadrészt, az I-faktor nevű plazma szerin proteáz egyik kofaktoraként szolgál a C3b molekula hasításában, inaktiválásában (cofactor activity) (Rodríguez de Córdoba et al., 2008). A H-faktor 20 CCP doménből épül fel, melyek közül az N-terminális 4 CCP domén felelős a komplementaktivációt gátló hatásokért. Egyes további doméneknek leírták a H-faktornak különböző ligandumokkal, pl. C3b-vel, heparinnal való kölcsönhatásában betöltött szerepét (pl. a C-terminális CCP19-20 doménekben), de a kutatások kezdetben főleg a komplementregulációs szerepre koncentráltak (Kopp et al., 2012).

A H-faktorról rokon fehérjéket öt, a H-faktor génje mellett közvetlenül található gén kódolja, melyek részleges génduplikációk révén jöttek létre. Ezeket felfedezésük sorrendjében nevezték el FHR-1, FHR-2, FHR-3, FHR-4 és FHR-5 molekuláknak. Közülük az FHR-1-nek két allélikus változata, az FHR-4-nek a domének számában is különböző két formája alakult ki, de a glikoziláltság mértékében eltérő FHR-1, FHR-2 és FHR-3 izoformák (glikoformák) is léteznek. Az FHR fehérjék a H-faktorhoz hasonlóan kizárólag CCP doménekből állnak. Általánosan jellemző rájuk, hogy a H-faktor CCP 6-9 és CCP 18-20 doménekkal homológ doméneket tartalmaznak; az FHR-5 ezen túlmenően a H-faktor CCP 10-14 doménjeivel homológ doméneket is tartalmaz (2. ábra). Az FHR fehérjékből tehát *hiányoznak* a komplementgátló aktivitásért felelős H-faktor CCP 1-4 domének. Azonosításukat követően az FHR fehérjéket alig vizsgálták, és a H-faktorhoz hasonló funkciójú, de kevésbé fontos fehérjéknek tekintették őket (Zipfel and Skerka, 1994).

A homológ domének révén az FHR fehérjék kötődhetnek a H-faktor egyes ismert ligandumaihoz is, például C3b-hez, heparinhoz és C-reaktív proteinhez (CRP), illetve bizonyos bakteriális fehérjékhez. Az erre vonatkozó adatok szintén azt a prekonceptiót erősítették, hogy az FHR-ek „ugyanazt csinálják” mint a H-faktor, tehát nem különösebben érdekesek. A szerkezeti hasonlóság miatt nem álltak rendelkezésre olyan specifikus ellenanyagok, amelyek csak ezeket a fehérjéket ismernék fel, ezért a pontos szérumszintjüket sem ismerték, valamint tisztításuk is nehézségekbe ütközött. Bár

rekombináns FHR-3, FHR-4 és FHR-5 esetében leírtak gyenge, a H-faktoréhoz hasonló kofaktor aktivitást, ez azonban csak nagy mennyiségek alkalmazása esetében volt kimutatható (Hellwage et al, 1999; McRae et al. 2005). Az FHR-1-ről a C5 molekulához való kötődést és a terminális út gátlását írták le (Heinen et al., 2009), azonban ez a funkció is ellentmondásos (saját eredményeink [VII, XVI]; Goicoechea de Jorge et al., 2013; Tortajada et al., 2013).



2. ábra. Az emberi H-faktor molekulacsalád. (A) Az 1q32 régióban, a H-faktort kódoló gén (*CFH*) mellett tandem elrendezésben található az öt FHR fehérjét kódoló gén (*CFHR*), melyek részleges génduplikációk útján alakultak ki. (B) Az FHR fehérjék kizárólag CCP doménekből állnak. Az FHL-1 molekula a *CFH* gén alternatív átíratának terméke, az FHR-1 stb. fehérjék a *CFHR1* stb. gének által kódoltak. A *CFHR4* gén két FHR-4 izoformát kódol. A színek az egymással azonos, vagy közel azonos homológ doméneket jelzik. A számok az egyes domének fölött a H-faktor homológ doménjeivel való, százalékosan kifejezett aminosav-szekvencia azonosságot mutatják. CRP, C-reaktív protein; PTX3, pentraxin 3; MDA, malondialdehid.

Az utóbbi évek adatai, elsősorban genetikai betegség-asszociációs vizsgálatok viszont egyértelműen arra utalnak, hogy ezeknek a fehérjéknek fontosabb szerepe lehet, mint

korábban gondolták (Rodríguez de Córdoba et al., 2008). A H-faktor és az FHR-ek egyes génváltozatait több betegséggel is kapcsolatba hozták. A H-faktor N-terminális doménjeit érintő mutációk miatti funkcionális, vagy a H-faktor szekréciójának zavarát okozó mutációk miatti kvantitatív H-faktor deficiencia a vérplazmában az alternatív út kontrollálatlan aktiválódásához és glomerulonefritiszhez vezet (Ault et al., 1997). Egy másik ritka vesebetegségben, az atípusos hemolitikus urémiás szindrómában (aHUS) szenvedő betegek kb. 30%-ában azonosíthatók H-faktor mutációk. Ezek általában heterozigóta formában fordulnak elő és a H-faktor C-terminális doménjeit érintik (Caprioli et al., 2001), tehát a molekula képes marad a komplementaktiváció szabályozására. A mutációk azonban hajlamosítanak a vese glomerulusokban fokozott helyi komplementaktivációra, endotélsejtek és vérlemezkék aktivációjára, ami végső soron a veseendotél károsodásához és mikrotrombusok kialakulásához, következményes akut veseelégtelenséghez vezethet (Nester et al., 2015). Ezekben a vesebetegségekben H-faktor autoantitesteket is leírtak (Meri et al., 1992; Dragon-Durey et al., 2005). A *CFHR5* gén változatait ugyancsak kapcsolatba hozták C3 glomerulopátiával, *CFHR5* nefropátiával és aHUS-sal is (Nester et al., 2015; Zipfel et al., 2015). A H-faktor Y402H polimorfizmusa pedig a világszerte kb. 50 millió embert érintő időskori makuladegeneráció (AMD) rizikófaktora (Hageman et al., 2005).

Mivel a H-faktort és az FHR molekulákat kódoló gének számos, nagymértékben hasonló (akár több, mint 99%-ban azonos) szekvenciát tartalmaznak, ezért ez a genom régió hajlamos génátrendeződésekre. Ezek következtében génkonverzió, illetve bizonyos szakaszokon géndarabok (ezáltal hibrid gének létrejötte) vagy teljes gének kiesése, illetve duplikálódása történhet. Mutáció analízis és génkópiaszám-meghatározás segítségével a betegekben és egészséges egyéneknél is számos génváltozatot és különböző génátrendeződéseket mutattak ki ebben a génklaszterben. Különösen gyakori a *CFHR3*-*CFHR1* kettős géndeléción, ami több betegség esetében is előfordul hajlamosító (aHUS, SLE) vagy védő (IgA nefropátia, AMD) tényezőként. Ez a géndeléción az európai populáció kb. 4%-ában fordul elő, de más populációkban ennél jóval gyakoribb is lehet, pl. Afrikában átlagosan kb. 16% (de Nigériában kb. 30%) (Holmes et al., 2013).

A komplementrendszer betegségekben játszott szerepének utóbbi években történt részletesebb megismerése révén egyre több kutatás irányul a rendszer működésébe való célzott beavatkozási lehetőségek feltárására és kihasználására. Kézenfekvő lehetne például a hiányzó vagy hibás komplementfehérje (pl. mutáns H-faktor) pótlására vérplazmából tisztított

vagy mesterségesen előállított fehérjét alkalmazni. Mivel a komplementrendszer egy komplex, más plazma enzim rendszerekkel is kapcsolatban álló fehérjehálózat, és az egyes betegségekben más-más mechanizmussal és mértékben járul hozzá a patológiás folyamatokhoz, többféle célpont elleni és különböző hatásmechanizmusú hatóanyagok kifejlesztése szükséges. Az egyetlen engedélyezett komplement terápia az eculizumab nevű anti-C5 monoklonális ellenanyag a C5 molekulához kötődve annak C5 konvertázok általi hasítását, ezáltal a terminális út aktiválódását akadályozza meg. Számos gyógyszerjelölt van a fejlesztés és a klinikai kipróbálás különböző stádiumaiban (Morgan and Harris, 2015).

A komplementrendszer normális és patológiás működésének felderítése tehát nemcsak alapkutatási szempontból izgalmas, hanem az érintett betegek és kezelőorvosaik számára is reményekkel kecsegtet. A H-faktor és az FHR fehérjék egyértelműen kapcsolatba hozhatók egyes fertőző, gyulladásos és autoimmun betegségekkel, szerepük azonban nem pontosan ismert és több esetben ellentmondásos. Mindezek miatt tehát fontos megismernünk ezeknek a molekuláknak a funkcióját, mert így jobban megérthetjük az említett betegségek kialakulását, és akár új terápia beavatkozási lehetőségeket ismerhetünk meg.

3. Célkitűzések

Az előzőekben bemutattam, hogy a komplementrendszer különböző kóros folyamatokhoz járulhat hozzá, betegségenként eltérő mechanizmussal és mértékben. A komplementaktivációt szabályozó H-faktor és a H-faktorról rokon fehérjék különösen érdekesek ebből a szempontból, hiszen számos betegséggel hozták őket kapcsolatba. Az FHR fehérjék funkciójáról ráadásul nagyon keveset tudunk. Kutatásaim során ezért elsősorban a H-faktor molekulacsalád szerepének vizsgálatával foglalkoztam. Az alábbi fő kérdéseket, célokat foglalmaztuk meg:

1. Mi a szerepe a H-faktor C-terminális doménjeinek?
2. Van-e szerepe a H-faktornak az endotélsejtek védelmében, a sejt felszínen zajló komplementaktiváció gátlásában?
3. A C-terminális mutációk hogyan befolyásolják a H-faktor funkcióját és hogyan járulhatnak hozzá atípusos hemolitikus urémiás szindróma kialakulásához?

4. Célul tűztük ki a H-faktor ellenes autoantitestek kötőhelyének meghatározását, az autoantitestek funkcionális hatásának vizsgálatát, biológiai jellemzőik (izotípus, aviditás) meghatározását, illetve annak vizsgálatát, hogy mutatnak-e keresztreakciót FHR molekulákkal.
5. Célunk volt annak vizsgálata, hogy mi az emberi FHR fehérjék élettani és patológiás szerepe, befolyásolják-e a H-faktor működését, illetve van-e szerepük a komplementrendszer szabályozásában.
6. A H-faktorról nyert ismereteket összegezve és felhasználva célul tűztük ki egy olyan módosított H-faktor molekula előállítását és jellemzését, amelyet – potenciális mesterséges komplementgátló fehérjeként – terápiás célokra lehetne alkalmazni.

4. Alkalmazott módszerek

Az egyes módszerek részletes leírása a saját közleményekben található meg, itt csak az alkalmazott fontosabb módszereket sorolom fel. Zárójelben, római számokkal feltüntettem az egyes módszereket tartalmazó saját publikációimat (ld. 7.1. fejezet).

A H-faktor fragmentumok, mutánsok és FHR fehérjék klónozásához és expressziójához PCR és irányított mutagenézis technikákat használtunk (III-V, VII-IX, XI-XV, XIX). A kísérletekhez Sf9 rovarsejtekben expresszáltunk rekombináns H-faktor fragmentumokat, FHR fehérjéket és azok fragmentumait (II-IX, XII-XVII, XIX-XX). A H-faktor és az FHR-ek szérumból való kötődését, valamint a rekombináns vad típusú és mutáns fehérjék sejtekhez (HUVEC, apoptotikus és nekrotikus Jurkat sejtek, birka vörösvérsejtek) kötődését áramlási citometria, Western blot és mikroszkópos vizsgálatok segítségével végeztük (I-III, VII, XIII).

Funkcionális vizsgálatokban kofaktor aktivitást és konvertáz lebomlást gyorsító aktivitást Western blot és ELISA segítségével mértünk (II, XII, XIX).

Fehérje kölcsönhatásokat ELISA, felszíni plazmon rezonancia és Western blot segítségével vizsgáltunk (II-IV, VII-IX, XII-XV, XVII, XVIII). Ligandum kötőhelyek meghatározásához membránon immobilizált átfedő peptidsorozatokat és mutagenézis vizsgálatokat végeztünk (III, XII, XIV, XV).

A H-faktor autoantitesteket ELISA módszerrel detektáltuk; az autoantitestek kötőhelyének meghatározásához rekombináns fehérje fragmentumokat és mutáns fehérjéket használtunk (IV-IX, XV). Szérumok hemolitikus hatását birka és nyúl vörösvérsejtek segítségével mértük (IV, V, VII, XIX, XX). Az immunkomplexeket ELISA és Western blot, az antitestek aviditását ELISA segítségével mértük (V, VII-IX).

Komplementaktivációt ELISA (C3, C4, C5b-9 lerakódás), birka vörösvérsejtek lízise (a kiszabaduló hemoglobin mérésével), sejteken pedig áramlási citometria és Western blot segítségével vizsgáltunk (II, XII-XIV, XVI, XVII, XIX, XX).

5. Az új tudományos eredmények összefoglalása

(A római számok az értekezés alapjául szolgáló, a 7.1. fejezetben felsorolt saját közlemények sorszámát jelölik.)

Az MTA doktori értekezésemben a PhD fokozat megszerzése óta a H-faktor fehérjecsalád tagjainak élettani és patológiás szerepének vizsgálatára irányuló kutatásaim során elért eredmények egy részét mutatom be. Az értekezéshez felhasznált publikációkban meghatározó szerepet játszottam: az elsőszerzős közleményeknél mind a kísérletes munkát, mind a szellemi hozzájárulást és a cikkek megírását illetően, illetve az utolsó szerzős közleményeknél a saját kutatócsoport és több esetben a más laboratóriumokkal való kollaboráció irányítását, valamint a cikkek megírását tekintve. A kísérletek megtervezése, kivitelezése és az eredményekből született közlemények végső formába öntése a diákjaimmal, kollégáimmal és az együttműködő partnerekkel való közös munka eredménye volt, ezért az értekezésben – ahogy az eredeti közleményekben is – a többes szám első személyt használom.

Az ismertetett eredmények részben a jénai Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut kutatóintézetben végzett posztdoktori tanulmányaim során (2002–2005), valamint később az ott vezetett kutatócsoportomban (2006–2012), részben pedig hazatérésem óta (2012–) az általam vezetett MTA-ELTE „Lendület” Komplement Kutatócsoportban születtek. A kutatások hazai és nemzetközi együttműködések keretében valósultak meg, munkánkat számos szervezet (pl. Deutsche Forschungsgemeinschaft, OTKA, MTA) támogatta.

5.1. A H-faktor szerepe a komplementaktiváció gátlásában és ennek összefüggése vesebetegségekkel.

Mivel az endotélsejtek aktivációjának és károsodásának szerepe van az aHUS patomechanizmusában, továbbá a H-faktor egyes mutációit leírták aHUS-betegekben, vizsgáltuk, hogy milyen kölcsönhatás játszódhat le a H-faktor és az endotélsejtek között, illetve ez hogyan magyarázhatja a mutációk összefüggését a betegséggel.

5.1.1. A H-faktor endotélsejtekhez kötődése

Áramlási citofluorimetriás és mikroszkópos vizsgálatokkal sikerült kimutatnunk, hogy a tisztított H-faktor kötődik emberi köldökzsinór-véna eredetű endotélsejtekhez (HUVEC-hez). A H-faktor ellen készített egér monoklonális antitestek kötőhelyét rekombináns H-faktor fragmentumok felhasználásával sikerült meghatároznunk. Az így már ismert kötőhelyű monoklonális antitestek segítségével kimutattuk, hogy a H-faktor C-terminális doménjei felelősek a H-faktor endotél sejtekhez való kötődéséért. A C18 jelű, a H-faktor CCP20 doménjében kötődő antitest gátolta a tisztított H-faktor HUVEC-hez kötődését (I). Kimutattuk, hogy a H-faktor relatíve gyengén kötődik a sejtek felszínéhez (polianionos természetű molekulákon keresztül, mint például glükózaminoglikánok), viszont komplementaktiváció esetén a lerakódó C3b miatt fokozódik a H-faktor kötődése (II). A C-terminális doménekben kötődő antitestek nemcsak a H-faktor HUVEC-hez szérumból való kötődését, hanem immobilizált C3b-hez való kötődését is gátolták. A kontrollként használt C21 jelű antitest, ami a H-faktor CCP 15-18 doménjeiben kötődik, nem gátolta a H-faktornak sem a sejtekhez, sem a C3b-hez való kötődését. A folyadék fázisban, ahogy az várható is volt, egyik vizsgált antitest sem gátolta a H-faktornak a C3b I-faktor általi enzimátikus inaktiválását segítő képességét (kofaktor aktivitását). A sejtfelszínre komplementaktiváció során kovalensen kötődő C3b molekula különböző részeit felismerő ellenanyagok segítségével nyomon tudtuk követni a C3b hasítását a sejtfelszínen. A C18 antitest jelenlétében a szérumból az endotélsejtekre kötődő C3b degradációja csökkent mértékű volt, amit a kezeletlen kontrollhoz és a C21 antitest jelenlétében inkubált sejtekhez képest nagyobb C3c/C3d arány mutatott. Ez azzal magyarázható, hogy több intakt C3b molekula maradt a C21 jelenlétében a sejteken, míg normál esetben a C3d fragmentum a sejtekhez kötődve marad, a C3c pedig lehasítódik. H-faktor depletált szérumot használva kimutattuk, hogy amennyiben visszaadjuk a H-faktort a szérumba, fokozott H-faktor kötődést és csökkent C3 és

terminális komplement komplex (C5b-9) lerakódást detektálhatunk a sejteken. Normál humán szérumban a C-terminálisan kötődő antitestek jelenlétében fokozott C5b-9 lerakódást mértünk a sejteken. Azt vizsgálándó, hogy szérumban mennyire járul hozzá a H-faktor az endotélsejteknek a komplement károsító hatása elleni védelméhez, részben leemésztettük a sejtekről a GPI-horgonyzott CD55 és CD59 komplementszabályozó molekulákat. Az így kezelt sejteket H-faktor depletált szérumban inkubálva bizonyítottuk, hogy H-faktor jelenlétében a sejtek komplement általi lízise gátolt (II).

Mindezek az eredmények arra utaltak, hogy a H-faktor C-terminális doménjének vagy doménjeinek korábban alulbecsült, ám alapvetően fontos szerepe van abban, hogy a sejtekhez és más felszínekhez (pl. extracelluláris mátrix) kötődve a H-faktor hozzá tudjon járulni a komplementaktiváció megfelelő kontroll alatt tartásához. *A membránkötött komplement-szabályozó fehérjék mellett tehát a H-faktor is szerepet játszhat az endotélsejtek komplement általi károsodásának megakadályozásában.*

Eredményeinket mások is megerősítették. Saját publikációnkkal egyidőben egy spanyol kutatócsoport szintén kimutatta a H-faktor szerepét a sejtek védelmében. Hemolitikus teszttel igazolták, hogy C-terminális H-faktor mutációt hordozó aHUS betegek szérumában a birka vörösvérsejtek lízise figyelhető meg (Sánchez-Corral et al., 2004). Később amerikai kutatók is igazolták, hogy a H-faktor a C-terminális doménjeivel tud vörösvérsejtekhez kötődni (Ferreira et al., 2006).

5.1.2. H-faktor mutációk funkcionális vizsgálata

A H-faktor vesebetegségekben játszott szerepét, illetve az egyes leírt mutációk funkcionális következményeit is tanulmányoztuk. Mivel a H-faktor CCP 19-20 doménjeit aHUS esetében mutációs „hot spot”-ként azonosították, az ezeket a doméneket lefedő átfedő peptidek segítségével vizsgáltuk egyes ligandumok, így a heparin mint polianion, valamint a C3b és a C3d mint komplement ligandumok kötődését. A peptideket hordozó membránokat a különböző ligandumok oldatában való inkubálás után megfelelő reagensekkel előhívtuk. Az eredmények alapján több ligandumkötő régiót azonosítottunk, melyek részben azonosak voltak a heparin, C3b és C3d esetében is. Ezt az magyarázza, hogy ezek a kötőhelyek a CCP domének felszínén levő hurok régiók területére esnek. A mutációk egy része ezekben a felszíni aminosavakban található, más részük a domén belsejében, és a doménszerkezetet befolyásolhatják.

Az aHUS-ban leírt C-terminális mutációk (W1157R, W1183L, V1197A, R1210C, R1215G és P1226S) vizsgálatához a H-faktor klónozott CCP 8-20 fragmentumát és annak mutagenézissel előállított változatait expresszáltuk. A rekombináns mutáns fehérjéket vizsgálva azt találtuk, hogy azok különböző mértékben, de csökkent kötődést mutattak heparinhoz, valamint endotélsejtekhez is. A vizsgált mutánsok közül a W1157R mutatta a legkisebb funkciókárosodást, ami a heparinhoz és HUVEC-hez való kötődést illeti, ugyanakkor ez a mutáns (a P1226S-sel együtt) a többihez képest gyengébben kötődött C3b-hez és C3d-hez is (III).

További H-faktor mutációk más munkacsoportok és saját csoportunk általi jellemzése is hasonló eredményekre vezetett (Manuelian et al., 2003; Heinen et al. 2007; Sánchez-Corral et al., 2002). Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a C-terminális doménekben létrejött mutációk következtében megváltozik a H-faktor sejtfelszíni polianionos molekulákkal és/vagy a lekötődött C3b-vel, vagy annak C3d fragmentumával való kölcsönhatásának természete, ami a sejtek felszínén csökkent H-faktor aktivitást eredményez, így megmagyarázhatja ezen mutációk szerepét a betegség kialakulásában. A H-faktor túl erős kötődése, amely egyes mutánsok esetében megfigyelhető, ugyanúgy a komplement szabályozás zavarához vezet, mint a gyakrabban megfigyelhető gyengébb kötődés a komplement támadás alatt álló sejtek felszínén (Lehtinen et al., 2009; Kajander et al., 2011).

5.2. H-faktor autoantitestek funkcionális jellemzése

A H-faktor autoantitestek mérésére adaptáltuk a Dragon-Durey és munkatársai (2005) által leírt ELISA módszert, aminek a segítségével kezdetben német betegek szérum mintáinak szűrését végeztük el. Rövid időn belül 5 olyan aHUS beteget azonosítottunk, akiknél nem volt ismert komplement mutáció, szérumuk viszont erős reaktivitást mutatott a mikrotiter lemezeken immobilizált tisztított H-faktoral. Rekombináns H-faktor fragmentumok, valamint a korábban vizsgált, ismert kötőhelyű monoklonális antitestek segítségével megállapítottuk, hogy mind az öt beteg autoantitestjei a H-faktor CCP 19-20 doménjeihez kötődnek (IV). A betegek szérumából tisztított IgG a H-faktor C3b-hez való kötődését gátolta. Kimutattuk továbbá, hogy a vizsgált betegek szérumában a normál szérumokkal ellentétben feloldódtak a birka vörösvérsejtek; ez tisztított H-faktor feleslegben adásával gátolható volt (IV, V). *Ezekkel az adatokkal elsőként bizonyítottuk, hogy az aHUS betegekben előforduló H-faktor*

autoantitestek az aHUS-asszociált mutációkhoz hasonlóan a H-faktor sejtekhez kötődését akadályozva fogékonyabbá teszik a sejteket a komplement általi károsító hatásra.

Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a *CFHR3-CFHR1* gének deléciója az aHUS-ra hajlamosító tényező (Zipfel et al., 2007). A beteg szérumok ELISA-val és Western blottal történő vizsgálata során kiderült, hogy a H-faktor autoantitestekre pozitív betegek kb. 90%-ában hiányzik mind az FHR-1, mind az FHR-3 fehérje, ezzel az autoantitestek képződésével kapcsolatos genetikai tényezőt azonosítottunk (VI). Ezeket az eredményeket később más munkacsoportok is megerősítették (Abarrategui-Garrido et al., 2009; Dragon-Durey et al., 2009; Moore et al., 2010).

Az autoantitestek biológiai jellemzőit (izotípus, kötőhely, aviditás stb.) is részletesen vizsgáltuk. Ezen kutatások során elsőként azonosítottunk IgA típusú H-faktor autoantitesteket. Kimutattuk az autoantitestek keresztreakcióját az FHR-1 fehérjével, az immunkomplexben jelen lévő natív H-faktor és FHR-1 molekulákat, valamint azt is, hogy az autoantitestek befolyásolhatják a H-faktor antigén szinteket mérő ELISA vizsgálatokat (VII). Klinikusokkal együttműködve leírtuk betegek kezelését, a kezelése során az autoantitest szintek változását, valamint az autoantitestek funkcionális hatásának kimutatását egy hemolitikus teszt segítségével (V). Részletesen jellemeztük a H-faktor azon epitópjait, ahol az autoantitestek kötődnek. Kimutattuk, hogy az autoantitestek a H-faktor CCP20 doménjének egy olyan felszíni hurok régiójában kötődnek, amely a homológ FHR-1 molekulában eltérő konformációt vesz fel; ehhez hasonló konformáció a H-faktorban bizonyos (pl. mikrobiális) ligandumok megkötésekor alakulhat ki. Ezen adatok alapján egy új modellt dolgoztunk ki az FHR-1 hiányának a H-faktor autoantitestek kialakulásában játszott szerepére vonatkozóan (VIII). Megállapítottuk, hogy az egyes betegekben lényegesen nem változnak az autoantitestek biológiai jellemzői (izotípus, kötőhely, aviditás) (IX). Mindezeket a vizsgálatokat külföldi és hazai együttműködések keretében végeztük.

5.3. Az FHR molekulák funkciója

Az FHR fehérjék léte 1990 óta ismert volt. A H-faktoral való szerkezeti hasonlóság miatt egyesek „kis H-faktoroknak”, azaz a komplementaktivációt gátló H-faktoral azonos funkciójú molekuláknak (Zipfel and Skerka, 1994), míg mások a komplementszabályozó CCP 1-4 doménekkal homológ domének hiánya miatt a komplementaktiváció szempontjából jelentéktelen fehérjéknek tartották őket. Kismértékű kofaktor aktivitást leírtak az FHR-3,

FHR-4 és FHR-5 molekulákról is (Hellwage et al., 1999; McRae et al., 2005), bár ezek nagy, minden valószínűség szerint nem fiziológiás koncentrációkat igényeltek ezekből a fehérjékből.

Genetikai vizsgálatok alapján azonban kiderült, hogy az FHR fehérjék szerepét alábecsülték, és nem valószínű, hogy csak élettanilag jelentéktelen evolúciós melléktermékek lennének. Mind a H-faktorról, mind az FHR-ekről igazolták elsősorban egyes vesebetegségekkel és az időskori makuladegenerációval való kapcsolatukat. A fehérjék domén-szerkezete és az addigi adatok alapján három fő lehetőséget vázoltunk fel az FHR-ek szerepére vonatkozóan: (1) a H-faktort segítő, szinergisztikus, komplementaktivációt gátló hatást, (2) a H-faktoral antagonista hatást, és (3) a H-faktorétól független komplementszabályozó vagy más funkciót (X). A funkciójuk tisztázása és betegségekben játszott szerepük megértése céljából egyes FHR fehérjéket állítottunk elő rekombináns DNS-technika és rovarsejtekben való expresszió útján. Vizsgáltuk a H-faktor ismert ligandumaival való kölcsönhatásukat: C3b-vel, a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó pentraxinokkal (C-reaktív fehérje és pentraxin 3), valamint az extracelluláris mátrixszal, és tanulmányoztuk a H-faktor kötődését és aktivitását befolyásoló képességüket.

5.3.1. Az FHR-4A molekula és funkciójának vizsgálata

Mivel az ismert FHR fehérjék mindegyike a májban expresszálódik, emberi máj expressziós fág könyvtár szűrését végeztük el, H-faktor és már ismert FHR alapú, radioaktívan jelzett próbák segítségével. Ennek során sikerült izolálni egy olyan klónt, amelynek szekvenciája a korábban leírt FHR-4 molekulára nagymértékben hasonlított. Ez az FHR-4 molekula hosszú izoformája (FHR-4A), amely gyakorlatilag tartalmazza a rövidebb, FHR-4B-nek elnevezett izoforma doménjeit, illetve négy, duplikáció útján létrejött extra domént. Az FHR-4 fehérjére vonatkozó korábbi irodalmi adatok, illetve saját Western blot vizsgálatok is megerősítették az „új” izoforma létezését. Szérumban ugyanis egy kb. 86-kDa molekulatömegű glikoprotein azonosítható FHR-4 antiszérummal, amely deglikoziláció után jó egyezést mutat a szekvencia alapján jósolt molekulatömeggel. A korábban elvégzett fehérjeanalízisből származó peptidek pedig teljes egyezést mutattak a jósolt aminosav-szekvenciával. A szérumban domináns izoformaként azonosítottuk az FHR-4A-nak elnevezett molekulát (XI).

Az FHR-4 mindkét izoformáját előállítottuk rekombináns fehérje formájában. A komplementaktivációban játszott szerepének vizsgálatához a C3b-vel, valamint az egyik fő

akut fázis fehérjével, a gyulladás és fertőzés során a szérumban nagy koncentrációban megjelenő C-reaktív fehérjével (CRP) való kölcsönhatását, és ezek funkcionális jelentőségét vizsgáltuk. A korábbi adatokkal megegyezően nem sikerült fiziológiásan releváns FHR-4 koncentrációt használva kofaktor aktivitást kimutatni. A C3b az FHR-4A és FHR-4B C-terminális doménjeiben kötődött, melyekkel homológ domének a H-faktorban is kötnek C3b-t. Ugyanakkor eredményeink szerint az FHR-4-hez kötődő C3b molekulához kötődni tud a B-faktor, és D-faktor jelenlétében aktív C3bBb konvertáz alakul ki. *In vitro* körülmények között az FHR-4 szérumban is képes volt aktiválni az alternatív utat, amit a C3 depozíció fokozódásával, valamint a kialakuló konvertáz komponenseinek (C3b, Bb és properdin) kimutatásával igazoltunk. Mutáns fehérjék előállításával és vizsgálatával igazoltuk a specifikus C3b-kötés szerepét az FHR-4 által kiváltott alternatív út aktivációban. Ezáltal elsőként sikerült kimutatnunk egy FHR molekuláról, hogy a H-faktoral ellentétben fokozza a komplementaktivációt (XII).

Kimutattuk továbbá, hogy a H-faktor a módosult, monomer (vagy denaturált) CRP formát (mCRP) köti, ezzel szemben az FHR-4 mindkét izoformája a natív, pentamer CRP formát (pCRP) (XIII). A kötődést nemcsak tisztított fehérjékkel, hanem szepszises betegek emelkedett CRP mennyiséget tartalmazó szérumból is igazoltuk. A pCRP kötőhelye az FHR-4A és FHR-4B molekulákban közös CCP1 doménben található, amit rekombináns FHR-4 fragmentumok előállításával és CRP-kötésük vizsgálatával igazoltunk. Az ismert szekvenciák alapján tervezett, nitrocellulóz membránon immobilizált átfedő peptidsorozatok segítségével bizonyítottuk a CCP1 domén ún. hipervariábilis hurkának szerepét a CRP kötésében (XIV). A homológ szekvenciák vizsgálatával kiderült, hogy ez a rövid molekulaszakasz ilyen formában csak az FHR-4 CCP1-ben található meg, a homológ domének megfelelő szekvenciáiban található eltérések (elsősorban negatív töltésű aminosavak jelenléte miatt) magyarázzák, hogy a többi FHR és a H-faktor homológ doménjei nem kötik a pCRP-t. A kötőhelyet egyszeres (K37A) és háromszoros (K37A, R40A, R41A) rekombináns mutáns fehérje vizsgálatával is bizonyítottuk. Azt is kimutattuk, hogy a CRP kötődése az FHR-4-hez lehetővé teszi a klasszikus és/vagy lektin úton elinduló komplementaktivációt, amit szérumból történő C4 depozíció mérésével bizonyítottunk (XIV). Kimutattuk továbbá, hogy az FHR-4 képes nekrotikus sejtek felszínéhez kötődni és oda CRP-t toborozni szérumból (XIII).

Eredményeink szerint tehát az FHR-4 molekula nem a komplementaktivációt gátolja, mint a H-faktor, hanem ezzel ellenkezőleg, képes a komplementaktivációt fokozni, több

mechanizmus révén is. A C3b megkötése révén az alternatív, a CRP megkötése révén pedig a klasszikus/lektin út aktivációját képes elindítani, ezáltal az opszonizációt helyileg fokozni.

5.3.2. Az FHR-1 jellemzése

Mivel az FHR-1 molekula C-terminális doménjei nagyfokú hasonlóságot mutatnak a H-faktor homológ doménjeivel, ezért vizsgáltuk, hogy ez a molekula mennyiben rendelkezik a H-faktorhoz hasonló, illetve attól eltérő biológiai funkcióval.

Megállapítottuk, hogy az FHR-1 is képes a C-terminális doménjein keresztül vörösvérsejtekhez, endotélsejtekhez kötődni. Az FHR-1 CCP4 doménje aminosav szinten 100%-ban megegyezik a H-faktor CCP19 doménjével, az FHR-1 CCP5 doménje pedig 97%-ban a H-faktor CCP20 doménjével. A két aminosavnyi különbség a C-terminális doménekben azonban ahhoz vezet, hogy *az FHR-1 nem olyan erősen kötődik a sejtfelszínnekhez, mint a H-faktor, és nem is tudja hatékonyan leszorítani onnan, ahhoz a fiziológiához képest irreálisan magas FHR-1 koncentráció kellene (VII).*

Kimutattuk, hogy az FHR-1 kötődik a pentraxin 3-hoz (PTX3), de gyengébben, mint a H-faktor (XV). Megállapítottuk, hogy az FHR-1 aHUS-sal asszociált izoformája gyengébben kötődik a PTX3-hoz, mint a másik izoformája. A H-faktorral ellentétben alacsonyabb kémhatáson – ami fiziológiásan például gyulladás helyszínén fordulhat elő – az FHR-1 nem kötődik erősebben a PTX3-hoz. Peptid array segítségével azonosítottuk a H-faktor és az FHR-1 C-terminális doménjeiben a PTX3-kötésben részt vevő aminosavakat. Kimutattuk, hogy az aHUS betegek autoantitestjei gátolják a PTX3 kötődését H-faktorhoz és FHR-1-hez is (XV).

Mivel az FHR-1-ről leírták, hogy a C5-höz kötődve a terminális út aktivációját gátolja (Heinen et al., 2009), ebben az irányban is végeztünk vizsgálatokat. Ismert, hogy egyes gyógyszerek vagy azok hordozói (pl. liposzómák) képesek a komplementrendszer aktiválására, és részben ennek a mechanizmusnak köszönhetően ún. infúziós reakció (egyfajta túlérzékenységi reakció) kiváltására. Ezt a jelenséget komplementaktivációval kapcsolatos pszeudoallergiás reakciónak (complement activation-related pseudoallergy, CARPA) nevezték el (Szebeni, 2005). Amennyiben például liposzomális amphotericin B-t, egy gombaellenes szert, inkubálunk szérumban, a kontrollhoz képest megnő a szérumban mérhető szolubilis C5b-9 terminális komplement komplex mennyisége. Ezt a növekedést a komplementaktiváció gátlása révén a H-faktor szignifikánsan csökkenteni képes, ugyanakkor az FHR-1-nek semmiféle hatását nem tapasztaltuk (XVI). *Eredményeink tehát cáfolják az*

FHR-1 korábban leírt, komplementgátló hatását. Más kutatócsoportok ugyancsak megkérdőjelezték a Heinen és munkatársai által közölt hatást, ellenben azt találták, hogy az *FHR-1* a *C3b*-hez kötődve gátolni tudja a *H*-faktor hatását, ezzel a komplementaktivációt inkább fokozza (Goicoechea de Jorge et al., 2013; Tortajada et al., 2013).

5.3.3 Az *FHR-5* molekula funkciójának vizsgálata

Mivel az utóbbi években genetikai vizsgálatok alapján a *CFHR5* gént egyértelműen összefüggésbe hozták egyes vesebetegségekkel, de a molekula funkciója ismeretlen volt, célul tűztük ki az *FHR-5* funkcionális jellemzését. Ehhez rekombináns *FHR-5* molekulát használtunk. Megállapítottuk, hogy a *CRP* natív, pentamer formáját nem köti, ellenben a módosult *mCRP* formát igen. Mind emberi szérumot, mind a rekombináns *FHR-5*-öt használva kimutattuk, hogy az *FHR-5* köti a *PTX3*-at, ráadásul a *H*-faktornál nagyobb aviditással. Az *FHR-5* képes volt a *H*-faktor kötődését gátolni *CRP*-hez és *PTX3*-hoz is, és ezáltal a pentraxinok által beindított komplementaktivációt fokozni, amit a nagyobb mértékű *C3* depozíció kimutatásával igazoltunk. Hasonlóképpen, azt találtuk, hogy az *FHR-5* kötődik az extracelluláris mátrixhoz (amit *MaxGel* mátrix kivonattal modelleztünk), és dóziszfüggően gátolja a *H*-faktor kötődését, csökkentve ezáltal a mátrixon az alternatív út gátlását. Ez ugyancsak a *C3* lerakódásának növekedésében mutatkozott meg, amikor a *MaxGel*-hez adott szérumban az *FHR-5* koncentrációt rekombináns fehérje hozzáadásával növeltük. *Az FHR-5 tehát a H-faktor bizonyos ligandumokhoz való kötődésének kompetitív gátlása útján fokozhatja a komplementaktivációt (XVII).* Kimutattuk továbbá, hogy az *FHR-5* az extracelluláris mátrixhoz kötődve meg tudja kötni a *PTX3*-at, és az *FHR-5*-höz kötődött *PTX3* képes a *C1q* kötésére. Ezáltal a klasszikus út aktiválása révén szintén hozzájárulhat a komplementaktiváció helyi növekedéséhez (XVII).

Vizsgáltuk az *FHR-5* *C3b*-vel való kölcsönhatásának funkcionális jelentőségét is. Mások korábban kimutatták, hogy az általunk a pentraxinokra és *MaxGel*-re leírt kompetíció a *H*-faktoral a felszínen lekötődött *C3b*-re is igaz (Goicoechea de Jorge et al., 2013). Mi ezért azt tanulmányoztuk, hogy az általunk az *FHR-4*-re leírt, az alternatív utat aktiváló mechanizmus igaz-e az *FHR5*-re is. Azt találtuk, hogy az *FHR-5*-höz kötődő *C3b*-n is képes kialakulni aktív *C3bBb* konvertáz, illetve ehhez a konvertázhoz properdin is kötődik, és azt stabilizálja. Ki tudtuk mutatni a felépülő *FHR-5/C3bBbFP* konvertáz aktivitását tisztított fehérjéket használva, az *ELISA* lemezen felépített konvertáz enzim *C3*-at hasító képességének

bizonyításával. Szérum felhasználásával végzett *kísérleteink igazolták az FHR-5 alternatív utat aktiváló képességét (XVII).*

5.3.4. Az FHR molekulák feltételezett szerepe

Összefoglalva elmondhatjuk tehát, hogy a H-faktorról ellentétben az FHR molekulákról nem sikerült meggyőzően kimutatni, hogy a komplementaktivációt gátolni tudnák. Az újabb adatok arra utalnak, hogy bizonyos körülmények között a H-faktorról való kompetíció révén indirekt módon fokozhatják a komplementaktivációt, valamint – saját adataink szerint – direkt módon is, a C3b vagy a CRP/PTX3 megkötése révén. Ezek az adatok megmagyarázhatják az *CFHR3-CFHR1* géndeléción szerepét több betegség esetében is: a hiányzó kompetitor molekulák miatt a H-faktor jobban tud kötődni például malondialdehid epitópokhoz (ezért a védő szerep AMD esetén), ugyanakkor jobban kötődhet egyes mikrobákhoz is (XVIII).

5.4. Rekombináns mini H-faktor előállítás, jellemzése

Amint az az előzőekből is kiderült, a H-faktor két fő funkcionális egysége a molekula két végén elhelyezkedő, a komplementgátlásért (CCP 1-4) és a sejtekhez kötődésért (CCP 19-20) felelős rész. Felmerült ezért, hogy elegendő-e ezek a domének a teljes molekula funkciójának az ellátásáért. Előállítottuk tehát azt a mini H-faktornak elnevezett molekulát, amelyben ezt a két funkcionális egységet közvetlenül összekapcsoltuk.

Az előállított rekombináns fehérjét részletesen jellemeztük egyes ligandumokhoz való kötődését és komplementgátló aktivitását illetően. Megállapítottuk, hogy ez a mesterséges molekula hasonlóképpen kötődik C3b-hez, mint a H-faktor, amit az magyarázhat, hogy a H-faktor két fő C3b-kötő helye a mini H-faktorban is megtalálható. Ugyancsak a H-faktorhoz hasonló kötődést tapasztaltunk a PTX3 és MaxGel esetében is. A CRP esetében azonban a H-faktor erősebben kötődött, mint a mini H-faktor, amit az magyaráz, hogy a H-faktor CCP7 doménjében is van egy CRP-kötő hely, ami viszont a mesterséges molekulából hiányzik (XIX). *A mini H-faktor esetében a természetes molekulához képest hatékonyabb komplementgátló hatást tapasztaltunk funkcionális esszéiben, amikor humán szérum birkavörösvérsejteket lizáló hatását vizsgáltuk. Mind mutáns H-faktort, mind autoantitesteket tartalmazó, aHUS betegekből származó szérum kezelés esetén a mini H-faktor kb. négyszer kisebb moláris koncentrációban érte el ugyanazt a mértékű gátló hatást, mint a tisztított H-faktor. Ez feltehetőleg annak köszönhető, hogy a kompakt molekula térszerkezete eltérő, és a*

C-terminális C3b-kötő hely jobban hozzáférhető, mint a természetes, 20 doménből álló molekulában. Kimutattuk, hogy liposzomális amphotericin B, cremophor EL micellák és a rituximab terápiás monoklonális antitest által szérumban kiváltott komplementaktiváció esetében is *in vitro* a mini H-faktor a H-faktorénál kb. kétszer hatékonyabban gátolja a szolubilis terminális C5b-9 komplex képződését (XVI).

A mi munkacsoportunkkal párhuzamosan két másik kutatócsoport is előállított hasonló mini H-faktor molekulákat. Az egyik a két funkcionális egység közötti összekötő szekvenciában különbözik, miáltal nagyobb az egységek közötti flexibilitás, és ez a molekula az általunk előállítottnál még hatékonyabban gátolja a komplementaktivációt. A másik a H-faktor CCP 1-5 és CCP 18-20 doménjeiből áll, egerekben *in vivo* is képes a komplementaktiváció gátlására, és arra fogékony egerekben a vesében történő C3 fragmentum lerakódás csökkentésére. Közös kutatás keretében összehasonlítottuk a háromféle mini H-faktor molekulát, valamint egy másik rekombináns fehérjét, ami a H-faktor CCP 1-5 doménjeit és a CR2 komplement receptor iC3b/C3d-kötő doménjeit tartalmazza. Az eredmények szerint a flexibilis kapocs régióval rendelkező mini H-faktor molekula a leghatékonyabb komplement inhibitor a vizsgáltak közül a paroxizmális nokturnális hemoglobinuriában szenvedő betegek vörösvérsejtjein zajló komplementaktiváció megakadályozásában (XX). Ezeken a vörösvérsejteken egy szerzett génhiba miatt különböző mértékben csökkent két komplementszabályozó membránfehérje (a DAF és a CD59) expressziója, ezáltal folyamatos komplementaktiváció zajlik a felszínükön, ami a vörösvérsejtek pusztulásához vezet. Az anti-C5 terápiás ellenanyag, az eculizumab megakadályozza a vörösvérsejtek C5b-9 komplex általi lízisét, de a folyamatos komplementaktivációt és C3 fragmentum lerakódást nem, ami a vörösvérsejtek komplement receptorokon keresztüli opszonofagocitózisához és így extravaszkuláris pusztulásukhoz vezet. Megemlítendő még az is, hogy a terminális út teljes gátlása miatt jelentősen nő a meningococcus fertőzés okozta agyhártyagyulladás kockázata is, amit a profilaktikusan alkalmazott védőoltás vagy antibiotikumos kezelés nem minden esetben tud megakadályozni. Ezért tehát mindenképpen indokolt más hatásmechanizmusú komplement inhibitorok fejlesztése, amelyek a mikrobák opszonizációját lehetővé teszik, de a saját sejteken lezajló komplementaktivációt gátolják. A mini H-faktorok optimalizálása és alkalmazása egy ilyen terápiás beavatkozást jelenthet.

5.5. Az új tudományos eredmények rövid összefoglalása

A PhD fokozat megszerzése óta végzett kutatásokból a H-faktor molekulacsalád egyes tagjainak a komplementrendszer szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata során elért új tudományos eredményeket az alábbiakban foglalom össze.

1. Kimutattuk, hogy a H-faktor C-terminális doménjei a molekula endotélsejtekhez való kötődéséért felelősek **(I)**. Igazoltuk, hogy a sejtmembránban található komplementszabályozó fehérjék mellett a szérumból a sejtek felszínére kötődő H-faktornak is lényeges szerepe van a sejtek komplement támadás elleni védelmében **(II)**. Jellemeztünk több, a C-terminális doméneket érintő, aHUS betegekben leírt mutációt, amelyekről kimutattuk, hogy a H-faktor endotélsejtekhez és felszínhez kötött C3b-hez való kötődésének csökkenéséhez vagy elmaradásához vezethetnek **(III)**.
2. Kimutattuk, hogy az aHUS betegek H-faktor ellenes autoantitestjei főként a H-faktor C-terminális doménjeihez kötődnek **(IV)**. Az aHUS betegek H-faktor ellenes autoantitestjei jelenlétében csökkent mértékű a sejtek védelme a szérum komplement sejtkárosító hatásával szemben **(IV, V)**.
3. Megállapítottuk, hogy az aHUS-sal asszociált H-faktor ellenes autoantitestek jelenléte szoros összefüggést mutat a *CFHR3-CFHR1* géndelécióval; az FHR-1 molekula hiánya hajlamosít az autoantitestek képződésére **(VI, VIII)**.
4. Kimutattuk, hogy aHUS esetében a H-faktor ellenes autoantitestek nagy része keresztreagál az FHR-1 molekulával. Megmutattuk, hogy az FHR-1 molekula ezáltal blokkolni képes az autoantitesteket, elvonva őket a H-faktortól, viszont fiziológiás körülmények között nem gátolja a H-faktor sejtekhez kötődését **(VII)**.
5. A H-faktor CCP20 doménjében azonosítottuk az aHUS betegek H-faktor ellenes autoantitestjeinek fő kötőhelyét. Kimutattuk, hogy az autoantitestek aviditása a H-faktorhoz és az FHR-1 molekulához eltérő, és az FHR-1 C-terminális doménjének szerkezete az autoantitest kötőhellyel homológ részben különbözik a H-faktor CCP20 szerkezetétől. Az eredmények és irodalmi adatok alapján egy új modellt állítottunk fel az FHR-1 hiányának szerepére vonatkozóan a H-faktor ellenes autoantitestek létrejöttében aHUS betegekben **(VIII)**.

6. Kimutattuk, hogy az aHUS-asszociált H-faktor ellenes autoantitestek biológiai jellemzői (izotípus, kötőhely, aviditás) az egyedi különbségek mellett az egyes betegekben nem változnak lényegesen a kezelések és a követés során (IX).
7. Felfedeztük és klónoztuk az FHR-4A molekulát (XI). Kimutattuk, hogy – szemben a H-faktoral, ami a CRP módosult, monomer formáját köti meg – az FHR-4 a natív, pentamer CRP-t köti, és ezáltal képes a klasszikus utat aktiválni (XII). Azonosítottuk az FHR-4 CRP-kötő doménjét (CCP1) és a CRP-kötésben szerepet játszó aminosavakat (XIII). Kimutattuk, hogy a C3b kötődése az FHR-4-hez – a H-faktoral ellentétben – nem a komplementaktiváció gátlásához vezet, hanem aktív C3bBb konvertáz felépülését teszi lehetővé, ezáltal az FHR-4 aktiválhatja az alternatív utat (XIV).
8. Az FHR-1 molekula ligandumaként leírtuk a PTX3-at, és azonosítottuk az FHR-1 C-terminális doménjeiben a PTX3-kötésben részt vevő aminosavakat. Kimutattuk, hogy az aHUS-ban gyakoribb FHR-1*B izoforma gyengébben kötődik a PTX3-hoz, mint az FHR-1*A izoforma, valamint hogy a H-faktor autoantitestek is gátolják az FHR-1–PTX3 kölcsönhatást (XV). Cáfoltuk az FHR-1 mások által leírt, terminális komplementutat gátló hatását (XVI).
9. Kimutattuk, hogy az FHR-5 kötődik a monomer CRP-hez, a PTX3-hoz és az extracelluláris mátrixhoz is. Ezekhez a ligandumokhoz kötődve a H-faktor kompetitív gátlása révén indirekt módon, a C3b kötése révén pedig – az FHR-4 molekulához hasonlóan, a C3bBb konvertáz enzim felépülésének lehetővé tételével – közvetlenül fokozza az alternatív út aktivációját (XVII).
10. Létrehoztunk egy mesterséges mini H-faktor molekulát, ami a H-faktornak csak a fő funkcionális doménjeit tartalmazza, és jellemeztük mint mesterséges komplement inhibitor. A mini H-faktor a natív molekulánál hatékonyabban képes a komplementaktivációt gátolni *in vitro* (XVI, XIX, XX). Kimutattuk, hogy a H-faktor és a mini H-faktor képes gátolni liposzómák, Cremophor EL micellák és rituximab által okozott komplement aktivációt humán szérumban *in vitro* (XVI).

A H-faktor és az FHR fehérjék mennyiségi viszonyai, valamint affinitásuk különböző ligandumokhoz együttesen képesek a komplementaktiváció, ezáltal az opszonizáció és gyulladásos folyamatok finom szabályozására. Egyes H-faktor- és FHR fehérje változatok,

autoantitestek, illetve kóros körülmények között megjelenő ligandumok (pl. az oxidatív stressz során képződő malondialdehid adduktumok, extracelluláris mátrix fehérjék, pentraxinok) hatására megváltozhat ez az egyensúly, aminek túlzott komplementaktiváció és a szövetek károsodása lehet a következménye. Ez adott esetben mesterségesen is befolyásolható lehet, például a mini H-faktor és más komplementgátló molekulák vagy ellenanyagok segítségével. Bizonyos esetekben azonban éppen a komplementaktiváció fokozása lehet a cél, pl. tumorsejtek és kórokozó mikrobák felszínén.

Egyre többet tudunk meg a komplementrendszer működéséről, a komplementtel összefüggő betegségek kialakulásának és lefolyásának molekuláris mechanizmusairól. Eredményeink jelentősen hozzájárultak a H-faktor molekulacsalád tagjainak élettani és patológiás körülmények között játszott szerepének jobb megismeréséhez. Ezeket az ismereteket az irodalmi adatokkal együtt összefoglaló közleményekben kritikusan értékeltük, rendszereztük (**I, X, XVIII**).

6. Kitekintés, jövőbeni tervek

Számos nyitott és érdekes kérdés vár még válaszra a komplementrendszer működésével, köztük a vizsgált fehérjék szerepével kapcsolatban. A továbbiakban tervezzük az eddigi kutatások folytatását, a klinikusokkal való együttműködés fenntartását és komplement gének mutációinak, valamint komplement fehérjék elleni autoantitestek biológiai jellemzőinek és funkcionális következményeinek vizsgálatát. Így például célunk egyes, DDD betegekben is leírt *CFHR5* génváltozatok jellemzése, szerepük tisztázása. Az FHR fehérjék kutatását folytatjuk új ligandumok és funkciók azonosításával, jellemzésével, például egyes immunsejtekkel való kölcsönhatásuknak, a kötődés sejtek aktivációjára gyakorolt hatásának vizsgálatával, különös tekintettel az eddig kevésbé kutatott FHR-2 és FHR-3 fehérjékre.

Az eredmények ezen kívül hozzájárulhatnak új gyógyszerek fejlesztéséhez is. Tovább vizsgáljuk a CARPA reakció gátlásában a H-faktor és más komplement inhibitorok szerepét, a liposzómák célzott módosítási lehetőségeit. A mini H-faktor és hozzá hasonló komplement inhibitorok ígéretes molekulák abból a szempontból is, hogy szelektíven a komplement támadás alatt álló saját sejtek, szövetek felszínén tudnak kötődni, és nem gátolják teljesen (pl. baktériumokon) az opszonizációt, a terminális út működését.

7. Hivatkozások

7.1. Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. **Józsi M**, Manuelian T, Heinen S, Oppermann M, Zipfel PF. 2004. Attachment of the soluble complement regulator factor H to cell and tissue surfaces: relevance for pathology. *Histol Histopathol.* 19:251-258. *(összefoglaló közlemény)* IF: 1.931
- II. **Józsi M**, Oppermann M, Lambris JD, Zipfel PF. 2007. The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Mol Immunol.* 44:2697-2706. IF: 3.742
- III. **Józsi M**, Heinen S, Hartmann A, Ostrowicz CW, Hälbich S, Richter H, Kunert A, Licht C, Saunders RE, Perkins SJ, Zipfel PF, Skerka C. 2006. Factor H and atypical hemolytic uremic syndrome: mutations in the C-terminus cause structural changes and defective recognition functions. *J Am Soc Nephrol.* 17:170-177. IF: 7.371
- IV. **Józsi M**, Strobel S, Dahse HM, Liu WS, Hoyer PF, Oppermann M, Skerka C, Zipfel PF. 2007. Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 110:1516-1518. IF: 10.896
- V. Strobel S, Hoyer PF, Mache CJ, Sulyok E, Liu WS, Richter H, Oppermann M, Zipfel PF, **Józsi M**. 2010. Functional analyses indicate a pathogenic role of factor H autoantibodies in atypical haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 25:136-44. IF: 3.564
- VI. **Józsi M**,* Licht C,* Strobel S, Zipfel SL, Richter H, Heinen S, Zipfel PF, Skerka C. 2008. Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood.* 111:1512-1514. * *megosztott első szerzőség* IF: 10.432
- VII. Strobel S, Abarrategui-Garrido C, Fariza-Requejo E, Seeberger H, Sánchez-Corral P,* **Józsi M**,* 2011. Factor H-related protein 1 neutralizes anti-factor H autoantibodies in autoimmune hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 80:397-404. * *megosztott utolsó szerzőség* IF: 6.606
- VIII. Bhattacharjee A,* Reuter S, Trojnár E, Kolodziejczyk R, Seeberger H, Hyvärinen S, Uzonyi B, Szilágyi Á, Prohászka Z, Goldman A, **Józsi M**,* Jokiranta TS. 2015. The major autoantibody epitope on factor H in atypical hemolytic uremic syndrome is structurally different from its homologous site in factor H-related protein 1, supporting a novel model for induction of autoimmunity in this disease. *J Biol Chem.* 290:9500-9510. * *levezető szerzők* IF: 4.573
- IX. Nozal P, Bernabéu-Herrero ME, Uzonyi B, Szilágyi Á, Hyvärinen S, Prohászka Z, Jokiranta TS, Sánchez-Corral P,* López-Trascasa M,* **Józsi M**,* 2016. Heterogeneity but individual constancy of epitopes, isotypes and avidity of factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol.* 70:47-55. * *megosztott utolsó szerzőség* IF: 2.973

- X. **Józsi M**, Zipfel PF. 2008. Factor H family proteins and human diseases. Trends Immunol. 29:380-387. *(összefoglaló közlemény)* IF: 9.91
- XI. **Józsi M**, Richter H, Löschmann I, Skerka C, Buck F, Beisiegel U, Erdei A, Zipfel PF. 2005. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. Eur J Hum Genet. 13:321-329. IF: 3.251
- XII. Hebecker M, **Józsi M**. 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. 287:19528-19536. IF: 4.651
- XIII. Mihlan M, Hebecker M, Dahse HM, Hälbig S, Huber-Lang M, Dahse R, Zipfel PF, **Józsi M**. 2009. Human complement factor H-related protein 4 binds and recruits native pentameric C-reactive protein to necrotic cells. Mol Immunol. 46:335-344. IF: 3.202
- XIV. Hebecker M, Okemefuna AI, Perkins SJ, Mihlan M, Huber-Lang M, **Józsi M**. 2010. Molecular basis of C-reactive protein binding and modulation of complement activation by factor H-related protein 4. Mol Immunol. 47:1347-1355. IF: 2.916
- XV. Kopp A, Strobel S, Tortajada A, Rodríguez de Córdoba S, Sánchez-Corral P, Prohászka Z, López-Trascasa M, **Józsi M**. 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. IF: 5.520
- XVI. Mészáros T, Csincsi ÁI, Uzonyi B, Hebecker M, Fülöp TG, Erdei A, Szebeni J,* **Józsi M**.* 2016. Factor H inhibits complement activation induced by liposomal and micellar drugs and the therapeutic antibody rituximab in vitro. Nanomedicine. 12:1023-1031. * *megosztott utolsó szerzőség* IF: 6.155
- XVII. Csincsi ÁI, Kopp A, Zöldi M, Bánlaki Z, Uzonyi B, Hebecker M, Caesar JJ, Pickering MC, Daigo K, Hamakubo T, Lea SM, Goicoechea de Jorge E, **Józsi M**. 2015. Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation. J Immunol. 194:4963-4973. IF: 4.922
- XVIII. **Józsi M**, Tortajada A, Uzonyi B, Goicoechea de Jorge E, Rodríguez de Córdoba S. 2015. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. Trends Immunol. 36:374-384. *(összefoglaló közlemény)* IF: 10.399
- XIX. Hebecker M, Alba-Domínguez M, Roumenina LT, Reuter S, Hyvärinen S, Dragon-Durey MA, Jokiranta TS, Sánchez-Corral P, **Józsi M**. 2013. An engineered construct combining complement regulatory and surface-recognition domains represents a minimal-size functional factor H. J Immunol. 191:912-921. IF: 5.362
- XX. Schmidt CQ, Harder MJ, Nichols EM, Hebecker M, Anliker M, Höchsmann B, Simmet T, Csincsi ÁI, Uzonyi B, Pappworth IY, Ricklin D, Lambris JD, Schrezenmeier H, **Józsi M**,* Marchbank KJ.* 2016. Selectivity of C3-opsonin targeted complement inhibitors: A distinct advantage in the protection of erythrocytes from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. Immunobiology. 221:503-511. * *megosztott utolsó szerzőség* IF: 3.044

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

1. Manuelian T, Hellwage J, Meri S, Caprioli J, Noris M, Heinen S, **Józsi M**, Neumann HP, Remuzzi G, Zipfel PF. 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. IF: 14.307
2. Jokiranta TS, Cheng ZZ, Seeberger H, **Józsi M**, Heinen S, Noris M, Remuzzi G, Ormsby R, Gordon DL, Meri S, Hellwage J, Zipfel PF. 2005. Binding of complement factor H to endothelial cells is mediated by the carboxy-terminal glycosaminoglycan binding site. *Am J Pathol.* 167:1173-1181. IF: 5.796
3. Oppermann M, Manuelian T, **Józsi M**, Brandt E, Jokiranta TS, Heinen S, Meri S, Skerka C, Götze O, Zipfel PF. 2006. The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clin Exp Immunol.* 144:342-352. IF: 2.747
4. Hellwage J, Eberle F, Babuke T, Seeberger H, Richter H, Kunert A, Härtl A, Zipfel PF, Jokiranta TS, **Józsi M**. 2006. Two factor H-related proteins from the mouse: expression analysis and functional characterization. *Immunogenetics.* 58:883-893. IF: 2.852
5. Zipfel PF, Heinen S, **Józsi M**, Skerka C. 2006. Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol Immunol.* 43:97-106. *(összefoglaló közlemény)* IF: 4.768
6. Zipfel PF, Edey M, Heinen S, **Józsi M**, Richter H, Misselwitz J, Hoppe B, Routledge D, Strain L, Hughes AE, Goodship JA, Licht C, Goodship TH, Skerka C. 2007. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet.* 3(3):e41. IF: 8.721
7. Heinen S, **Józsi M**, Hartmann A, Noris M, Remuzzi G, Skerka C, Zipfel PF. 2007. Hemolytic uremic syndrome: a factor H mutation (E1172Stop) causes defective complement control at the surface of endothelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 18:506-514. IF: 7.111
8. Mihlan M, Stippa S, **Józsi M**, Zipfel PF. 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. IF: 8.204
9. Skerka C, Licht C, Mengel M, Uzonyi B, Strobel S, Zipfel PF, **Józsi M**. 2009. Autoimmune forms of thrombotic microangiopathy and membranoproliferative glomerulonephritis: Indications for a disease spectrum and common pathogenic principles. *Mol Immunol.* 46:2801-2807. *(összefoglaló közlemény)* IF: 3.202
10. Skerka C, **Józsi M**, Zipfel PF, Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V. 2009. Autoantibodies in haemolytic uraemic syndrome (HUS). *Thromb Haemost.* 101:227-232. *(összefoglaló közlemény)* IF: 4.451
11. Kopp A, Hebecker M, Svobodová E, **Józsi M**. 2012. Factor H: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules.* 2:46-75. *(összefoglaló közlemény)* IF: -

12. Hofer J, Giner T, **Józsi M**. 2014. Complement factor H-antibody-associated hemolytic uremic syndrome: pathogenesis, clinical presentation, and treatment. *Semin Thromb Hemost.* 40:431-443. *(összefoglaló közlemény)* IF: 3.876
13. **Józsi M**, Reuter S, Nozal P, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, Prohászka Z, Uzonyi B. 2014. Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome. *Immunol Lett.* 160:163-171. *(összefoglaló közlemény)* IF: 2.512

7.2. Irodalmi hivatkozások

- Abarrategui-Garrido C et al. 2009. *Blood.* 114(19):4261-71.
- Ault BH et al. 1997. *J Biol Chem.* 272(40):25168-75
- Caprioli J et al. 2001. *J Am Soc Nephrol.* 12(2):297-307.
- Dragon-Durey MA et al. 2005. *J Am Soc Nephrol.* 16(2):555-63.
- Dragon-Durey MA et al. 2009. *J Med Genet.* 46(7):447-50.
- Ferreira VP et al. 2006. *J Immunol.* 177(9):6308-16.
- Goicoechea de Jorge E et al. 2013. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(12):4685-90.
- Hageman GS et al. 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(20):7227-32.
- Heinen S et al. 2009. *Blood.* 114(12):2439-47.
- Hellwege J et al. 1999. *FEBS Lett.* 462(3):345-52.
- Holmes LV et al. 2013. *PLoS One.* 8(4):e60352.
- Kajander T et al. 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(7):2897-902.
- Krushkal et al. 2000. *Mol Biol Evol.* 17(11):1718-30.
- Lehtinen MJ et al. 2009. *J Biol Chem.* 284(23):15650-8.
- McRae JL et al. 2005. *J Immunol.* 174(10):6250-6.
- Meri S et al. 1992. *J Exp Med.* 175(4):939-50.
- Moore I et al. 2010. *Blood.* 115(2):379-87.
- Morgan BP, Harris CL. 2015. *Nat Rev Drug Discov.* 14(12):857-77.
- Nester CM et al. 2015. *Mol Immunol.* 67(1):31-42.
- Nilsson UR, Müller-Eberhard HJ. 1965. *J. Exp. Med.* 122:277-298.
- Ricklin D et al. 2010. *Nat Immunol.* 11(9):785-97.
- Ricklin D et al. 2016. *Nat Rev Nephrol.* 12(7):383-401.
- Rodríguez de Córdoba S, Goicoechea de Jorge E. 2008. *Clin Exp Immunol.* 151(1):1-13.
- Sánchez-Corral P et al. 2002. *Am J Hum Genet.* 71(6):1285-95.
- Sánchez-Corral P et al. 2004. *Mol Immunol.* 41(1):81-4.
- Szebeni J. 2005. *Toxicology.* 216(2-3):106-21.
- Tortajada A et al. 2013. *J Clin Invest.* 123(6):2434-46.
- Warwicker P et al. 1998. *Kidney Int.* 53(4):836-44.
- Weiler JM et al. 1976. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3268-3272.
- Whaley K, Ruddy S. 1976. *J. Exp. Med.* 144:1147-1163.
- Zipfel PF, Skerka C. 1994. *Immunol Today.* 15(3):121-6.
- Zipfel PF et al. 2015. *Mol Immunol.* 2015 Sep;67(1):21-30.

8. Tudománymetriai adatok

Teljes pályafutásra vonatkozóan:

Közlemények száma: 54

Ebből első vagy utolsó szerzőként: 34

Független hivatkozások száma: 1635

Összesített impakt faktor: 255,364

Hirsch-index: 25

A Ph.D. fokozat megszerzése (2002) óta:

Közlemények száma: 49

Ebből első vagy utolsó szerzőként: 32

Független hivatkozások száma: 1516

Összesített impakt faktor: 233,397

Hirsch-index: 23

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm családomnak, hogy lehetővé tették és támogatták tanulmányaimat, valamint a kutatómunkámat, és elviselték az ezzel járó nehézségeket. Különösen Barbarának köszönöm a sok türelmet és segítséget.

Köszönöm Erdei Annának, hogy elindított a kutatói pályán, szakdolgozó koromtól fogva támogatott, a doktori tanulmányok alatt és azóta is folyamatosan segítette és figyelemmel kísérte pályafutásomat.

Köszönöm Peter Zipfel segítségét a posztdoktori évek alatt és első önálló csoportom megalakításában.

Köszönöm tanárain, kollégáim, mentoraim és közvetlen munkatársaim, diákjaim és a kollaborációs partnerek segítségét, akik iránymutatásukkal, támogatásukkal és közreműködésükkel hozzájárultak biológussá és kutatóvá válásomhoz, valamint részt vettek a dolgozatban is bemutatott eredmények elérésében.

Köszönöm továbbá az ösztöndíjakat és a kutatási pályázatokat az egyes támogató szervezeteknek.