

A lektin út aktiválódásának jelentősége herediter angioödémában

Doktori értekezés

Csuka Dorottya

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Farkas Henriette, egyetemi tanár, MTA doktora
Dr. Prohászka Zoltán, egyetemi tanár, MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Dérfalvi Beáta, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Papp Krisztián, tudományos munkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Oláh Imre, egyetemi tanár, MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Bajtay Zsuzsa, egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	5
2.1. A komplementrendszer felépítése	5
2.2. A komplementaktiválódás klasszikus útja	6
2.3. A komplementaktiválódás lektin útja	7
2.4. A komplementaktiválódás alternatív útja	8
2.5. A lektin út mintázatfelismerő molekulái	11
2.5.1. MBL	11
2.5.2. Fikolinok	11
2.5.2.1. Fikolin-1	12
2.5.2.2. Fikolin-2	13
2.5.2.3. Fikolin-3	14
2.5.3. A MASP-ok	15
2.5.3.1. MASP-1	16
2.5.3.2. MASP-2	17
2.5.3.3. MASP-3	17
2.5.4. A MASP-gének által kódolt nem enzimatis funkciójú fehérjék	18
2.5.4.1. MAP-1	18
2.5.4.2. sMAP	18
2.6. A komplementrendszer vizsgálatának dimenziói	19
2.6.1. A natív lektin út komponensek szintjének meghatározása	19
2.6.2. A komplementaktivációs komplexek és termékek szintjének mérése	20
2.6.3. A komplementaktivációs útvonalak rész- és összaktivitás mérése	21
2.7. A komplement lektin út kapcsolata betegségekkel	22
2.8. A C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditár angioödéma	26
2.8.1. A hereditár angioödéma etiológiája, típusai és tünetei	26
2.8.2. A hereditár angioödéma diagnózisa	28
2.8.3. A hereditár angioödéma pathofiziológiája	28
2.8.4. A hereditár angioödéma és a komplementrendszer kapcsolata	30
3. CÉLKITŰZÉSEK	32
4. MÓDSZEREK	35
4.1. A vizsgált betegcsoport és az egészséges egyének	35
4.1.1. Hereditár angioödémás betegek	35
4.1.1.1. A hereditár angioödémás betegek kezelése	36
4.1.1.2. A hereditár angioödéma súlyosságának megítélése	36
4.1.2. Egészséges kontroll személyek	37
4.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek	37
4.2.1. Natív lektin út komponensek szintjének meghatározása	37
4.2.2. Komplementaktivációs komplexek és termékek szintjének mérése	41
4.2.3. A komplementaktivációs útvonalak rész- és összaktivitásának mérése	44
4.3. Statisztikai elemzés	48
5. EREDMÉNYEK	49
5.1. A HANO-C1-INH-ra jellemző csökkent C1-INH aktivitás hogyan befolyásolja a klasszikus és a lektin út korai, illetve közös natív komponenseinek szintjét?	49
5.1.1. A klasszikus és a lektin út korai, illetve közös komponenseinek szintje	49
5.1.2. A lektin út paramétereinek közötti összefüggések vizsgálata	50

5.2. A fikolin-3/MASP-2 komplex kvantitatív meghatározása	52
5.2.1. Az új fikolin-3/MASP-2 komplex módszer kifejlesztése.....	52
5.2.2. A fikolin-3/MASP-2 komplex méréséhez alkalmas minták azonosítása	53
5.2.3. A minták ismételt felolvasztásának és kezelési körülményeinek hatása.....	54
5.2.4. A hígító pufferek összetételének vizsgálata	55
5.2.5. Az acetilált BSA hatása a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjére	55
5.2.6. Fikolin-3/MASP-2 komplex képzése fikolin-3-, illetve MASP-2-hiányos szérumban.....	57
5.2.7. A fikolin-3/MASP-2 komplex és komplementfehérjék összefüggései	58
5.3. Milyen hatással van a funkcionális C1-INH hiánya a klasszikus, a lektin, az alternatív és a terminális utakon keletkező komplexek szintjére?.....	59
5.3.1. A C1rC1sC1-INH, C3bBbP, illetve SC5b-9 komplexek szintje.....	59
5.3.2. A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje.....	60
5.4. Befolyásolja-e a funkcionális C1-inhibitor hiánya a korai MBL-lektin út aktiválódását, illetve a fikolin-lektin út összaktivitását tünetmentes HANO-C1- INH-s betegekben?	62
5.4.1. Az MBL-lektin út aktiválhatósága	62
5.4.2. A fikolin-lektin út összaktivitása.....	63
5.5. Van-e összefüggés az MBL-lektin út, illetve a fikolin-lektin út komponenseinek szintje és a HANO-C1-INH súlyossága között?	65
5.5.1. A HANO-C1-INH diagnosztikus paraméterei és a lektin út komponensek közötti összefüggések vizsgálata	65
5.5.2. A lektin út paraméterek és a HANO-C1-INH-s betegek klinikai jellemzői közötti összefüggések elemzése	65
5.6. Megváltozik-e a fikolin-lektin út paramétereinek szintje a HANO-C1-INH-s rohamok során?	67
5.6.1. A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje és a fikolin-3 által mediált TCC- depozíció mértéke HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes és rohamos mintáiban	67
5.6.2. A fikolin-3/MASP-2 komplex és a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció összefüggései a komplement kaskád további komponenseivel	68
6. MEGBESZÉLÉS	71
6.1. A C1-INH szabályozó funkciójának sérülése a fikolin-lektin út egyes komponenseinek konzumpcióját okozhatja	71
6.2. A lektin út paraméterek és a HANO-C1-INH súlyossága közötti összefüggések.....	77
6.3. A fikolin-lektin út paraméterek és aktivációs termékek szintjének változása a HANO-C1-INH-s rohamok során	79
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	84
8. ÖSSZEFOGLALÁS	86
9. SUMMARY	87
10. IRODALOMJEGYZÉK	88
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	112
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk.....	112
11.2. A disszertációtól független publikációk.....	112
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	116

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

α 2M	alfa-2-makroglobulin	HMWK	high-molecular-weight kininogen
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)	LDL	low density lipoprotein
acBSA	acetilált marha szérum albumin	LP	komplement lektin út
ACE	angiotensin-converting-enzyme	LPS	lipopolysaccharide
AE	arbitrális egység	mAb	monoclonal antibody
AH50	alternatív út összkomplement	MAC	membrane attack complex
AP	komplement alternatív út	MAP-1	MBL-associated protein-1
ATIII	antitrombin III	MASP	mannose-binding lectin serine protease
BMI	body mass index	MBL	mannose-binding lectin
BSA	bovine serum albumin	MCP	membrane cofactor protein
C1-INH	C1-inhibitor	OD	optikai denzitás
C4bp	C4b-binding protein	OPD	o-phenylenediamine dihydrochloride
CCP	complement control protein	PBS	phosphate buffered saline
CH50	klasszikus út összkomplement	PBS-T	phosphate buffered saline+0,05% Tween-20
CL-K1	collectin 11	PDGF	platelet-derived growth factor
CP	komplement klasszikus út	PSA	polysaccharide from <i>Aerococcus viridans</i>
CRD	carbohydrate-recognition domain	r-Flk-3	rekombináns fikolin-3
CRP	C-reactive protein	RT	szobahőmérséklet
CUB	complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1	sc-UK	single-chain urokinase
DAF	decay-accelerating factor	SD	standard deviation
DNS	dezoxiribonukleinsav	SLE	systemic lupus erythematosus
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	sMAP	small MBL-associated protein
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid	SP-A	surfactant protein-A
ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay	SP-D	surfactant protein-D
GalNAc	N-Acetylgalactosamine	TBS	Tris-buffered saline
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine	TBS-T	Tris-buffered saline+0,05% Tween-20
HANO-C1-INH	C1-INH hiányában kialakuló hereditár angioödéma	TCC	terminal complement complex
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	t-PA	tissue plasminogen activator
HRF	homologous restriction factor	tc-UK	two-chain urokinase
		TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
		VEGF	vascular endothelial growth factor
		VPR-AMC	Val-Pro-Arg aminomethylcoumarin

2. BEVEZETÉS

2.1. A komplementrendszer felépítése

A komplementrendszer folyamataiban több, mint 40 szolúbilis és membránhoz kötött fehérje vesz részt, melyek a globulinfrakció kb. 12-15%-át alkotják, és kaszkádszerűen lépnek egymással kölcsönhatásba (1). A komplement komponensek fő forrását a májsejtek képezik, ugyanakkor a lokális immunfolyamatokban fontos szerepet játszhatnak a makrofágok, a monociták, és a különböző szövetek epitelsejtjei által termelt komplementfehérjék is. A komplementrendszer elemeinek nagy része zimogén formában keletkezik, majd proteolitikus hasítás eredményeként aktiválódik, és további komponenseket aktivál proteolitikus módon (2). A komplementaktiválódás sokrétű szabályozása számos folyékony fázisban található, illetve sejtfelszínhez kötött inhibitor által valósul meg. A komplementrendszer fontos szerepet játszik a patogének opszonizálásában, melynek során a C3b és hasított fragmentumai a célsejten felhalmozódva megjelölik azt, így a komplementreceptorokkal rendelkező sejtek fagocitózissal elpusztítják az opszonizált sejteket. Az opszonizáció folyamata – az effektor funkción kívül - elősegíti az adaptív immunválasz kialakulását, amely magába foglalja az antigén bemutatását, az immunológiai memória kialakulását, és a B-limfociták antigénreceptorokon keresztül történő kostimulációját (3). A természetes immunitás részeként a komplementrendszer nem antigénspecifikus módon, hanem a C5-től C9-ig aktiválódott komplementfehérjékből felépülő MAC (membrane attack complex; más néven terminal complement complex, TCC) által pusztítja el a patogéneket. A MAC lizálja a mikrobiális membránt, ezáltal a sejtek szétesnek. A komplementrendszer szerepe jelentős a gyulladáshoz való válasz kialakításában, melyhez a vazodilatációt és kemotaxiszt okozó C3a és C5a anafilatoxinok képzése által járul hozzá. A komplementrendszer továbbá részt vesz az immunkomplexek eltakarításában, az apoptotikus sejtek felismerésében és eliminálásában, a szöveti regenerációban, az angiogenezisben, valamint a hematopoetikus progenitor sejtek mobilizálásában (4).

Az aktivátor természetétől függően a komplementrendszer aktivációja három különböző útvonalon mehet végbe, a klasszikus, a lektin-indukált és az alternatív útvonalon keresztül, azonban mindhárom út aktivációja a rendszer központi molekulájának, a C3 limitált proteolíziséhez vezet (1. ábra).

2.2. A komplementaktiválódás klasszikus útja

A komplementrendszer klasszikus aktivációs útját jellemzően IgG vagy IgM izotípusú immunglobulinok antigénnel alkotott komplexe indítja el, de számos nem immunoglobulin természetű anyag, mint pl. vírusok, baktériumok, bakteriális endotoxinok, CRP (C-reactive protein), XII. faktor, illetve húgysavkristályok is aktiválhatják a klasszikus komplement kaskádát (1. ábra). Az aktiválódás kiinduló pontja az aktiváló ágenszt felismerő C1q molekula, amely Ca^{2+} -függő kapcsolódással, egy négy szerin proteázból (C1s-C1r-C1r-C1s) felépülő tetramerrel együtt alkotja a C1-komplexet (5, 6). A C1q globuláris modulja az immunkomplexek immunglobulinjainak Fc részéhez, vagy töltött/hidrofób mintázatokhoz kötődik, így konformációváltozást idéz elő a 18 polipeptid láncból álló makromolekulában. Ennek eredményeként a C1-komplexben levő C1r autoaktiválódik, és elhasítja a C1s proenzimet, ami ezáltal aktív lesz (7). Az aktív C1s képessé válik a következő komplement komponens, a C4 hasítására, így C4b keletkezik, ami kovalensen kötődni tud az aktivátorhoz (pl. az antigén-antitest komplex Fab részéhez), és végül a C2 hasítása is megtörténik. Az aktivátorhoz kapcsolódó C4b megköti a C2 fehérjét, melynek hasítását a C1s végzi, így a keletkezett C4b és C2a fragmentumokból kialakul a C3 hasítását végző klasszikus C3-konvertáz (C4b2b), melynek katalitikus részét a C2 szerin proteáz képezi. Ez az enzim a soron következő C3 fehérjét a C3a és a C3b fragmentumokra hasítja, melyek közül a C3b az aktivátor felszínén levő C3-konvertázhoz kötődve módosítja annak enzim specificitását, így létrejön a klasszikus C5-konvertáz (C4b2a3b) (2). Ebben a helyzetben a C3b kötőhelyül szolgál a C5 számára, amelyet a C5-konvertáz C5a-ra és C5b-re hasít. A kis molekulású, szolúbilis C5a anafilatoxin, míg a nagyobbik hasítási termék, a C5b komplexet képez a C6, C7 és C8 komplementfehérjékkel (a C6-lépéstől további hasítások nem történnek). A végső lépés a C9 komplementfehérjék kapcsolódása, melyek polimerizálódva konformációs változást idéznek elő, így kialakul a célsejt lipid kettősrétegét keresztüljáró terminális komplementkomplex (TCC), mely a célsejt gyors ozmotikus lízisét hozza létre (8). A komplementaktivációval szemben a gazdaszervezet sejtjei védelmet élveznek, a plazmában és a sejtmembránon található regulátor fehérjéknek köszönhetően (9, 10).

Az aktiválódási folyamat egyes lépéseit inhibitorok szabályozzák. A C1r és a C1s aktiválódását úgy gátolja a C1-inhibitor (C1-INH), hogy kovalens kötődése révén stabil C1rC1sC1-INH-komplex alakul ki, amely nem képes további C4, illetve C2 hasításra (11). Bár a C1 fehérje nemcsak immunkomplexek hatására, hanem spontán módon is aktiválódhat, normális C1-INH koncentráció jelenlétében ennek mértéke elenyésző, a C1-INH-nak a szerin proteázokhoz való hatékony kötődése miatt (12). Noha fiziológiásan is folyamatosan keletkezik kis mennyiségű C1rC1sC1-INH-komplex, sem a C1 fehérje, sem a C1-INH nem használódik fel ebben a folyamatban. Elégtelen C1-INH szint esetén a C1-komplexben található C1r spontán aktiválódása előidézi a C1s aktiválódását, így a spontán aktiválódás nagymértékű, mert kevés a C1-INH, ami ezt meggátolná (12). A kevés C1-INH jelentős része felhasználódik C1rC1sC1-INH komplexeket alkotva, így szabad C1-INH alig marad (12, 13). Ugyanakkor a C1-INH hiánya a C3 szintet nem befolyásolja, mert a klasszikus C3-konvertázt alkotó C4b szabályozását más fehérjék végzik: ezen folyamat során a C4b egy része tovább degradálódik a C4b-kötő fehérje (C4bp) és az I-faktor által C4c, illetve C4d fragmentumokra. A terminális szakasz egyes lépéseinek szabályozásáért a CD59, a HRF (homologous restriction factor) és az S-protein felelős.

2.3. A komplementaktiválás lektin útja

A mannóz-kötő lektin (mannose-binding lectin, MBL), fikolin-1, fikolin-2, fikolin-3 és a kollektin-11 a lektinek családjába tartozó szolúbilis mintázat felismerő molekulák, melyek MBL-asszociált szerin proteázokkal (MBL-associated serine protease, MASP; melyek: MASP-1 és MASP-2) a komplementrendszer lektin útvonalát aktiválják emberben (14-17). Előzetes tanulmányok alapján a MASP-3, valamint a nem enzimatis funkciójú MAP-1 és sMAP fehérjék a lektin-út aktiválás szabályozásában vesznek részt (18-20) (21-26) (1. ábra).

A baktériumok, vírusok és más mikroorganizmusok, illetve elhalt gazdasejtek felszínén található szénhidrát molekulákhoz (mannóz, N-acetil-D-glükózamin, fukóz) történő kötődés az MBL/fikolin által aktiválja a MASP-2-t, amely során az egy polipeptidláncos, inaktív MASP-2 proenzim átalakul a diszulfid-híddal összekapcsolt, két polipeptidláncból felépülő aktív MASP-2 enzimmé (27). Az MBL és a fikolinok aktivációs képességét összehasonlítva, a fikolin-3 aktiválja a lektin útvonalat a

legnagyobb mértékben, míg a fikolin-2 és az MBL hasonló kapacitással rendelkezik (24).

A MASP-2 szerepe jól körülírt, aktivált állapotban elhasítja a C4 és C2 komplement komponenseket (hatékonyabban, mint a C1s), így kialakul a C3-konvertáz (C4bC2a) (28-30). A létrejött C3-konvertáz elhasítja a C3 fehérjét C3a és C3b fragmentekre, majd a klasszikus útnál leírtak szerint a komplementaktiválódás a TCC kialakulásába torkollik.

A MASP-1 funkciójának részletes feltárására az utóbbi években került sor, a legfrissebb tanulmányok alapján a MASP-1 aktiválja a MASP-2-t, továbbá hozzájárul a C3-konvertáz képződéséhez a C2 hasítása által (a MASP-1 nem képes a C4 hasítására) (31-33).

A MASP-3, a sMAP és a MAP-1 funkciójának vizsgálata még folyamatban van, bár eddigi tanulmányok alapján úgy tűnik, hogy gátló hatást fejtenek ki a MASP-2 MBL-hez, illetve fikolinokhoz történő kötődésére (17, 20, 26, 31, 34-37).

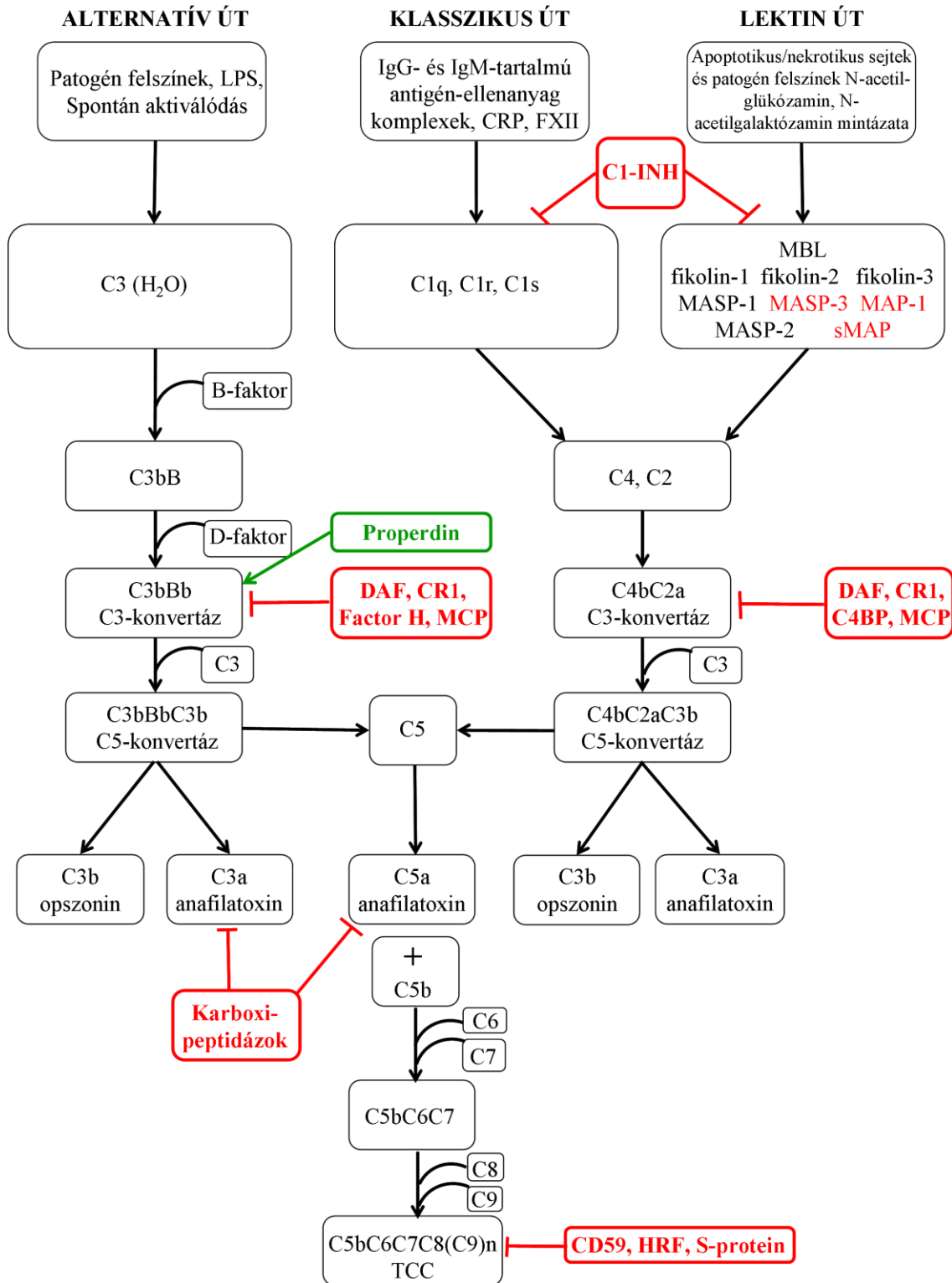
A fikolinokon és az MBL-en kívül a kollektin-11 (CL-K1 vagy CL-11) is képes komplexképzésre a MASP-1, a MASP-2, a MASP-3, illetve a MAP-1 fehérjékkel, és feltételezhetően részt vesz a lektin út aktiválásában (23, 38, 39).

A lektin út szabályozásában fontos szerepet játszik a C1-INH és az alfa-2-makroglobulin ($\alpha 2M$), amelyek a komplementaktiválódást gátló hatásukat a MASP-1 és MASP-2 fehérjékkel komplexeket képezve fejtik ki (28, 40, 41), ugyanakkor ezen inhibitor fehérjék a MASP-3-mal nem képeznek komplexet (29, 42). *Petersen és mtsai.* kimutatták, hogy mannózzal fedett felszínen a C1-INH gátolja az MBL-MASP-2 komplex által közvetített C4-depozíciót (41). Fentiekkel összefüggésben *Presanis és mtsai.* kimutatták, hogy heparin jelenlétében mind a C1-INH, mind az anti-thrombin III (ATIII) hatékonyan gátolta a MASP-1 és a MASP-2 enzimaktivitását (43).

2.4. A komplementaktiválódás alternatív útja

Az alternatív reakció út sajátként érzékeli a szialsavval borított felszínt (így védi a gazdaszervezetet az aktivációval szemben), ugyanakkor a nukleofil csoportokat bemutató felszínek (pl. vírusok által fertőzött sejtek, daganatsejtek, Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok sejtfalkomponensei, gombák, liposzómák) az aktiválódását idézik elő (*1. ábra*). A komplement alternatív útvonal folyamatosan, ellenanyagtól

függetlenül aktiválódik, így a C3 kis intenzitással végbemenő, spontán hidrolízisét és aktivációját eredményezi (44). Ezen útvonal aktiválódásához a C3-ban található instabil tiolészter kötés folyamatos hidrolízise szükséges, melynek eredményeként a keletkezett C3b és a B-faktor között kölcsönhatás jön létre, amennyiben a C3b molekula kovalensen kötődik különböző patogének felszínére (45). Ezt követően az állandóan aktív formában található szerin proteáz D-faktor elhasítja és aktiválja a B-faktort (45). A B-faktor hasítása két fragmentumot eredményez, melyek közül a Ba a folyékony fázisba kerül, míg a Bb (amely a keletkező komplex aktív része) és a C3b létrehozza az alternatív út C3-konvertáz komplexét (C3bBb), amit számos properdin kötődése tesz stabilná (C3bBbP) (8). Mivel az aktivátor felszínéhez kötődött C3-konvertáz egyre több C3 fehérjét hasít C3b-vé (mely lerakódik a célsejten), ezen a ponton a komplementaktiválás nagymértékű felerősödése jöhet létre, függetlenül attól, hogy az aktiválás melyik útvonalon következett be. Fiziológiai körülmények között a H-faktor és az I-faktor teljesen meggátolja az alternatív út minimális aktiválódását a folyékony fázisban. A C3b képződés amplifikációja során újabb és újabb C3b fragmentumok fixálódnak minden C3b köré, így olyanok köré is, amelyek a C3-konvertázt hozták létre, így a C3-konvertáz és a C3b fragmentum kapcsolódása által kialakul az alternatív út C5-konvertáza. A properdin (amely az alternatív út egyetlen pozitív regulátora) ezt az enzimet is képes stabilizálni, továbbá a H-faktor és az I-faktor szabályozza a működését. Az alternatív útvonal további regulátorai közé tartozik a DAF (decay-accelerating factor), amely meggátolja a C3bBb létrejöttét, valamint az MCP (membrane cofactor protein), amely az I-faktor kofaktoraként a C3b és C4b inaktiválását segíti elő (2).



1. ábra. A komplement kaskád klasszikus, alternatív és lektin-indukált útvonalai. Az aktivátor jellegétől függően a komplementrendszer aktivációja három különböző útvonalon mehet végbe, a klasszikus, a lektin-indukált és az alternatív útvonalon keresztül, amelyek mindegyike a C3 limitált proteolíziséhez vezet.

(Sarma és mtsai. ábrája alapján, módosítva)(46)

2.5. A lektin út mintázatfelismerő molekulái

2.5.1. MBL

A kollektinek családjába tartozó MBL monomerek 3-3 azonos polipeptidből épülnek fel. Minden egyes polipeptid tartalmaz egy N-terminális kollagénszerű régiót, és egy C-terminális szénhidrát felismerő domént (CRD) (47, 48). Az MBL szintézisének fő helye a máj, de termelődését a vesében is kimutatták (49). A vad típusú genotípussal rendelkező egyénekben az MBL szérum szintje 1–5 µg/ml (50). *Teillet és mtsai.* eredményei alapján az MBL oligomerek jellemzően csak egy MASP (MASP-1 vagy MASP-2) homodimerrel kapcsolódnak (51), és ez idáig még nem mutattak ki olyan MBL-komplexet, amely egyszerre tartalmazta volna a MASP-1 és a MASP-2 homodimereket. *Mayilyan és mtsai.* kimutatták, hogy a különböző összetételű MBL-MASP komplexek eltérő arányú detektálhatóak a keringésben, továbbá az MBL-hez kötött MASP-1 és MASP-2 mennyisége inverz módon korrelál egymással. A munkacsoport feltételezése szerint az MBL-MASP-1 és az MBL-MASP-2 komplexek aránya egyénre jellemző (52). Az MBL által felismert ligandumok közé a patogén mikroorganizmusok felszínén felismert semleges cukrok (pl. N-acetil-D-glükózamin, D-mannóz) tartoznak (47, 48). Amennyiben az MBL specifikusan felismeri a mikroorganizmusok, illetve elhalt gazdasejtek felszínén található fent említett szénhidrát molekulákat, az autoaktiválódó MASP-1 aktiválja az MBL-lel komplexet alkotó inaktív MASP-2 proenzimet. Az aktív MASP-2 enzim elindítja a lektin út aktiválódását (16, 31), melynek eredményeként a patogén opszonofagocitózissal és komplement-mediált folyamatok révén elpusztul.

Korábbi tanulmányok alapján az MBL fontos szerepet játszik a fertőzések, illetve gyulladásos állapotok során kiváltott citokin-válaszban, valamint az apoptotikus sejtek eltávolításában (53, 54).

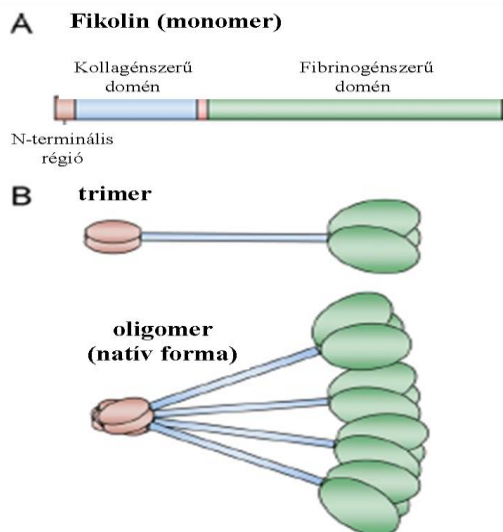
2.5.2. Fikolinok

A fikolinok multimer szerkezetű lektinek, amelyek kollagénszerű és fibrinogénszerű alegységekből épülnek fel (2. ábra). A szerkezet alapját képező trimer egységek oligomerizálódva diszulfid-hidakkal rögzített nagyobb multimereket alkotnak (55) (2. ábra). A fikolinok ligandumokhoz, azaz N-acetil-D-glükózaminhoz (GlcNAc) és N-acetilgalaktózaminhoz (GalNAc) történő kapcsolódásában a globuláris szerkezetű,

fibrinogénszerű alegység vesz részt (56-58). *Garlatti és mtsai.* 4 ligandkötőhelyet (S1 – S4) azonosítottak a fikolin-2 szerkezetében (56), ezek közül az S1 régió mind a három típusú fikolinban homológ, és szorosan a Ca^{2+} -kötőhely közelében található. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a fikolin-2 csak Ca^{2+} jelenlétében tud kapcsolatot létesíteni a GlcNAc motívummal (59, 60). A 4 ligandkötőhely folyamatos felszín biztosít, amely lehetővé teszi acetilált, illetve semleges szénhidrát egységek felismerését a mikrobák elnyúlt szacharidláncaiban. A terminális GlcNAc egység a patogének széles körében megtalálható, míg emberi sejteken nincs jelen.

A fikolinok jelenlétét a gerinces állatok számtalan fájában, és néhány gerinctelen állatban (aszcidíák, fejgerinchúrosok) is kimutatták (61, 62).

Az emberben leírt fikolinok típusait és jellemzőit az 1. táblázat foglalja össze.



2. ábra. A fikolinok domén struktúrája (A), és a trimer, oligomer szerkezetek felépítése (B).

(A) A monomer alegység egy rövid N-terminális régiót (benne intermolekuláris diszulfidhidakkal), egy kollagénszerű alegységet, valamint egy C-terminális fibrinogénszerű domént tartalmaz.

(B) A monomer alegységek a kollagénszerű domén által kapcsolódva hozzák létre a trimer szerkezetet. A multimer (oligomer) szerkezetet 4-8 trimer egység kapcsolódása alkotja, az N-terminális régió diszulfidhidjain keresztül. A fibrinogénszerű domént globuláris szerkezet jellemzi.

(*Endo és mtsai. ábrája alapján, módosítva*)(63)

2.5.2.1. Fikolin-1

A fikolin-1 (M-fikolin) mRNS expresszióját a monocitákban, a tüdőben és a lépben mutatták ki (64-67). A fikolin-1 megtalálható a monociták és a granulociták szekrécións granulumában, és ezen sejtek membránján is (68, 69), valamint szolúbilis formában a szérumban, ahol átlagos koncentrációja 60,5 ng/ml (70, 71). Korábbi tanulmányok szerint a fikolin-1 szerkezete 76%-ban homológ a fikolin-2 elsődleges szerkezetével (65, 66). A fikolin-1 által felismert baktériumok közé tartozik a *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* LT2 és a *Streptococcus agalactiae*, melyekhez az acetilált motívumok (GlcNAc, GalNAc) révén kapcsolódik. Bár rekombináns fikolin-1 és MASP-ok között *in vitro* kimutatható volt a komplexképződés, és a komplementaktiválás a

GlcNAc motívumhoz, valamint *Streptococcus agalactiae* baktériumhoz történő kapcsolódást követően (69, 72, 73), az még nem bizonyított, hogy fiziológiás körülmények között is végbe mennek-e ezek a folyamatok. Korábbi tanulmányok alapján a fikolin-1 a fibrinogénszerű alegysége által kötődik a monociták és a granulociták szialsav motívumához, és feltételezhetően ezáltal fejti ki az immunológiai folyamatokat szabályozó hatását (68, 73).

2.5.2.2. Fikolin-2

A fikolin-2 (L-fikolin, P35, EBP-37, hukolin) a májban termelődik, és kimutatható a szérumban (átlagos koncentrációja 3,3 µg/ml) (59, 74). Feltételezhetően tetramer szerkezettel rendelkezik, amelyet a 12 alegységből felépülő 4 tripla-hélix alkot, amelyek együtt egy „tulipáncsokorra” emlékeztetnek. A fibrinogén-szerű alegység globuláris szerkezettel rendelkezik, amely hasonlít a C-típusú lektinek szénhidrát-felismerő alegységéhez (carbohydrate-recognition domain, CRD). A 35 kDa-os monomer alegység tartalmaz egy rövid N-terminális régiót, egy középső kollagénszerű szakaszt, és egy C-terminális globuláris fibrinogénszerű régiót (59).

A fikolin-2 acetil-csoportokat tartalmazó ágenseket (pl. GlcNAc) (75-77), (1 → 3) – β – D-glukánt (élesztők és gombák sejtfalában) (56, 78), elasztint és DNS-t ismer fel ligandumaként. A baktériumokon található lipopoliszacharid, lipoteikosav és a kapszula poliszacharidok által képes a *Salmonella typhimurium* TV119, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* és *Streptococcus pneumoniae* megkötésére. Fentiekén kívül a fikolin-2 sokrétű funkciójára utal az, hogy a MASP-okkal komplexet képezve képes kötődni acetilált LDL-hez, GlcNAc-tartalmú neoglikolipidhez, a *Streptococcus pyogenes* lipoteikosav motívumához, valamint (1 → 3) – β – D-glukánhoz, és ezáltal kiváltani a C4 fehérje hasítását (77-79). A fikolin-2/MASP-komplex a *Streptococcus agalactiae* N-acetil-neuraminsav motívumával is kapcsolatot tud létesíteni, ami szükséges a komplement-függő, neutrofil-mediált opszonofagocitózis elindításához (80). Érdekes eredmény, hogy a CRP és a fikolin-2 közötti kapcsolat stabilizálja a CRP kötődését a *Salmonella enterica* baktériumhoz, ezáltal fokozva a komplementaktiválódás mértékét (81, 82).

2.5.2.3. Fikolin-3

A fikolin-3 (H-fikolin, Hakata-antigén) mRNS expresszióját kimutatták a tüdőben és a májban is (83): a tüdőben keletkező fikolin-3 a bronchusokba és az alveolusokba szekretálódik, míg a májban termelődő fehérjét az epevezeték epithélsejtjei és a hepatociták választják ki az epébe és a szérumba (átlagos koncentrációja a szérumban 26 µg/ml) (84-86), különböző nagyságú oligomerekként (87). A fikolin-3 elsődleges szerkezete 49%, illetve 48% homológiát mutat a fikolin-2, illetve a fikolin-1 elsődleges szerkezetével (83). Az eddig bemutatott fikolinokhoz hasonlóan a fikolin-3 is acetyl-csoportokat ismer fel (88-90), továbbá kötődni képes az *Aerococcus viridans* egy poliszacharidjához (91), valamint a *Hafnia alvei* bizonyos poliszacharidjaihoz (92).

A fikolin-3/MASP-komplex kötődik az *Aerococcus viridans*-ból származó PSA-hoz, a *Hafnia alvei* LPS-hez és acetylált származékhoz, ezáltal kiváltja a C4 aktiválódását (21, 89, 90, 92). *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy humán szérum jelenlétében a fikolin-3/MASP-komplex baktericid hatású az *Aerococcus viridans* ellen (91). Bár a tüdőben jelen lévő fikolin-3 funkciója még nem tisztázott, valószínűleg opszonin szerepet tölt be, a pulmonáris kollektinekhez (SP-A és SP-D) hasonlóan.

Bár a fikolin-2-höz hasonlóan a fikolin-3 is felismer acetyl-csoportokat, mégsem képes kötődni a *Salmonella typhimurium* TV119 típusához, és a baktériumok szűkebb tartományát ismeri fel (93).

1. táblázat. A humán fikolinok lokalizációja, a felismert ligandumaik és funkcióik.

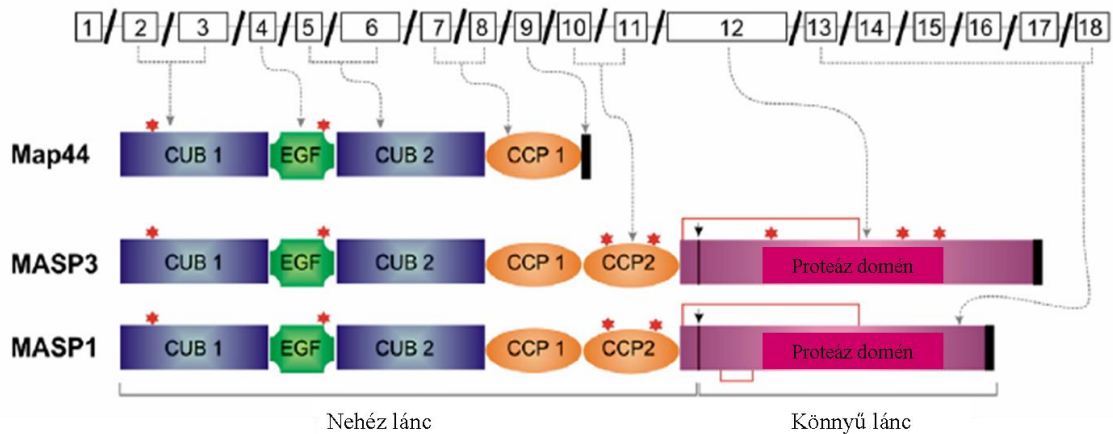
Fikolin típusa	mRNS expresszió	Fehérje kimutathatósága	Felismert ligandum	Funkció
Fikolin-1	Monocita Tüdő Lép	Szérum (~60,5ng/mL) Monocita Granulocita Alveoláris epithélsajt	Acetilált ágensek: GlcNAc GalNAc Sziálsav	Komplementaktiváció Fagocitikus receptor
Fikolin-2	Máj	Szérum (~3,3 µg/mL)	Acetilált ágensek (1→3)-β-D-glukán LPS <i>Streptococcus agalactiae</i> kapszuláris poliszacharidja Lipoteikosav CRP Pentraxin-3 Fibrinogén Fibrin DNS Elasztin Kortikoszteroid	Komplementaktiváció Opszonin
Fikolin-3	Máj Tüdő	Szérum (~26 µg/mL) Epevezeték Bronchus Alveolus	Acetilált ágensek <i>Aerococcus viridens</i> PSA <i>Hafnia alvei</i> LPS	Komplementaktiváció Opszonin

2.5.3. A MASP-ok

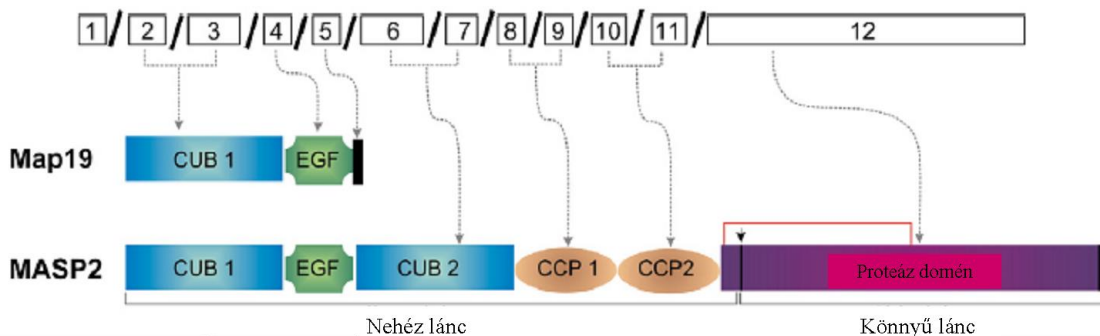
Jelenleg 3 „MASP” (mannose-binding lectin serine protease) szerin proteázt írtak le, amelyek az MBL-lel, illetve a fikolinokkal komplexet képezve a lektin út aktiválódását előidézik, valamint szabályozzák. A MASP-1, a MASP-2 és a MASP-3 enzimatis funkcióval bíró proteázok, míg a nem-enzimatis komponensek közé tartozik a MASP-2-vel azonos génről termelődő MAP19 (más néven sMAP), és a MASP-1/-3 fehérjékkel azonos eredetű MAP-1 (más néven MAP44) (17-20, 26). Összességében tehát a két MASP-génről 5 különböző fehérje képződik, alternative splicing során.

A MASP-1, a MASP-2, és a MASP-3 közös szerkezeti egységei CUB1, EGF, CUB2, CCP1, CCP2 domének, valamint egy kimotripsinszerű szerin proteáz régió (94) (3-4. ábrák), míg az sMAP ezek közül csak a CUB1 és EGF régiókat tartalmazza.

A MASP-1, a MASP-2, a MASP-3, az sMAP és a MAP-1 Ca^{2+} -függő módon képeznek komplexeket az MBL-lel és a fikolinokkal, CUB1-EGF modulok által. A MASP-1 és a MASP-2 szabályozásában fontos szerepet tölt be a C1-INH, amely a C-terminális serpin doménje által, irreverzibilisen kapcsolódik a target proteázaihoz (41).



3. ábra. A MASP-1/3 gén genomialis szerveződése, és a képződő fehérjék szerkezetei. Az ábra legfelső része mutatja a MASP-1/3 gén exon–intron szerkezetét. A Map44 (MAP-1) fehérje két CUB domént, egy EGF domént és egy CCP domént tartalmaz. A MASP-3 felépítésében két CUB domén, egy EGF domén, két CCP domén és egy proteáz domén vesz részt. A MASP-3 proteáz doménjét egy exon kódolja, míg a MASP-1 azonos doménjét hat exon kódolja. A lehetséges glikozilációs helyeket piros csillagok jelölik, míg a piros vonalak a láncokat összekapcsoló diszulfid hidakat ábrázolják. (Yongqing és mtsai. ábrája alapján, módosítva)(95)



4. ábra. A MASP-2 gén genomialis szervezete és az általa kódolt fehérje felépítése. A felső ábra mutatja a MASP-2 gén exon–intron szerkezetét. A Map19 (sMAP) fehérje egy CUB doménből és egy EGF doménből épül fel, míg a MASP-2 fehérjét két CUB domén, egy EGF domén, két CCP domén és egy proteáz domén alkotja. Piros vonal jelöli a láncokat összetartó diszulfid hidakat. (Yongqing és mtsai. ábrája alapján, módosítva)(95)

2.5.3.1. MASP-1

A MASP-1 (mannose-binding lectin serine protease-1) szintézisét a hepatociták végzik (96), átlagos koncentrációja a vérben 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$, így jóval meghaladja a lektin út további szerin proteázainak mennyiségét (97). Az utóbbi évek tanulmányai alapján a MASP-1 részt vesz a C2 fehérje hasításában, így közvetett módon hozzájárul a C3-konvertáz képződéséhez (28, 29, 40), a MASP-2-vel együttműködve (33, 98). Újabb közlemények szerint a MASP-1 a MASP-2 kizárólagos aktivátora, ezáltal kiváltja a lektin út aktiválódását az MBL-MASP, illetve a fikolin-MASP komplexeken keresztül, bár még

nem írtak le olyan modellt, amely megmagyarázhatná a MASP-1 kapcsolódását a zimogén MASP-2 dimerhez (31, 32, 52). Amennyiben a MASP-1 funkciója gátolt, a MASP-2 sem képes aktiválódni, tehát a MASP-1 autoaktiválódása mind az MBL-MASP, mind a fikolin-MASP komplexek aktiválódásához elengedhetetlen.

Fentiekén kívül a MASP-1 képes közvetlenül aktiválni az endotélsejteket, amely az intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedését váltja ki. Végeredményben a MASP-1 aktiválja az NF κ B transzlokációt és a p38 MAPK jelátviteli útvonalakat (99).

Korábbi tanulmányok alapján a MASP-1 trombin-szerű aktivitással is rendelkezik, tehát el tudja hasítani a trombin szubsztrátjait, a XIII. faktort és a fibrinogént (43, 100).

Dobó és mtsai. kimutatták, hogy mind a rekombináns MASP-1, mind a vérből izolált MBL-MASP komplex képes elhasítani a nagy molekulatömegű kininogént, amely bradikinin felszabadulását eredményezi, bár a plazma kallikreinhez képest kisebb hatásfokkal (101).

Korábbi tanulmányok alapján a C1-INH és az α 2M szorosán kontrollálja a MASP-1 aktivitását (28, 29, 41, 102).

2.5.3.2. MASP-2

A MASP-2 (mannose-binding lectin serine protease-2) proenzimként szintetizálódik, és a MASP-2 mRNS expresszióját eddig még csak a májban írták le (103). A MASP-2 átlagos koncentrációja a vérben 534 ng/mL (104). A MASP-2 komplexet képez az MBL-lel, illetve a fikolinokkal, és a patogén szénhidrát-motívumok felismerését követően a MASP-2 aktiválódik (43). Az aktivált MASP-2 elhasítja a szubsztrátjait, a C2 és C4 komplementfehérjéket, és a hasítási termékekből létrejön a C3-konvertáz (30).

Gulla és mtsai. eredményei alapján a MASP-2 képes a protrombin és a XIII. faktor hasítására, amely fibrin képződéséhez vezet (105).

2.5.3.3. MASP-3

A MASP-3 (mannose-binding lectin serine protease-3) mRNS expresszióját kimutatták a májban, a lépben, a tüdőben, a vékonybélben, a hasnyálmirigyben, a vázizomban, a tímuszban, a prosztatában, a petefészekben, és az agyban is (106, 107). A vérben keringő MASP-3 átlagos koncentrációja 5,2 μ g/mL, illetve 6,4 μ g/mL, *Degn és mtsai.*, illetve *Skjoedt és mtsai.* eredményei alapján (36, 108). A MASP-3

komplementaktiválódást szabályozó funkciójára utalnak azok a vizsgálatok, amelyek kimutatták, hogy a MASP-3 csökkentette mind az MBL-mediált, mind a fikolin-3 által közvetített C4-hasítás mértékét (17, 33, 36).

Skjoedt és mtsai. eredményei alapján a MASP-3 elsősorban a fikolin-3-mal képez komplexet, és elenyésző a fikolin-2/MASP-3 komplexek mennyisége (36).

Iwaki és mtsai. eredményei alapján a MASP-3 egerben aktiválni tudja a B-faktort, és a D-faktort, tehát részt vesz az alternatív út korai aktiválódási lépéseiben (109).

2.5.4. A MASP-gének által kódolt nem enzimátikus funkciójú fehérjék

Bár a MAp19 (sMAP) a MASP-2 génről, míg a MAp44 (MAP-1) a MASP-1 génről képződik alternatív splicing révén, közös bennük a lektin út aktiválódását szabályozó funkciójuk. Inhibitor hatásukat feltételezhetően úgy fejtik ki, hogy „versenyeznek” a MASP-2-vel az MBL-hez, illetve a fikolinokhoz való kötődésben (20, 37).

2.5.4.1. MAP-1

A MAP-1 (MBL/ficolin-associated and non-protease protein-1; más néven MAp44) mRNS-e az első 8 exont tartalmazza, amelyek a MASP-1 mRNS-ben is megtalálhatóak, továbbá része egy további exon, amely egy, a MAP-1-re specifikus 17 aminosav hosszúságú szakaszt kódol (20, 26). Végeredményben tehát a MAP-1 a MASP-1/-3 szerkezetének N-terminális első 4 modulját, és egy 17 aminosav hosszúságú szakaszt tartalmaz a C-terminális végen. A MAP-1 mRNS expresszióját kimutatták a szívizomban és a vázizomban, vérben keringő átlagos koncentrációja 240 ng/mL (35). *Skjoedt és mtsai.* kimutatták, hogy a MAP-1 dóziszfüggő módon gátolta mind az MBL által közvetített, mind a fikolin-mediált C4-hasítást. Eredményeik és a MAP-1 harántcsíktolt izombeli lokalizációja alapján feltételezhető, hogy a MAP-1 szövet-specifikus védőhatást fejt ki a helyi gyulladásos folyamatok során (26).

2.5.4.2. sMAP

Az sMAP (small MBL-associated protein; más néven MAp19, MBL Associated Protein 19) tartalmazza a MASP-2-ben megtalálható CUB1 és EGF modulokat, valamint 4 további aminosavat a fehérje C-terminális végén (110). A MAp19 mRNS-ét csak a májban tudták kimutatni (103), szérumban mérhető koncentrációja átlagosan 217 ng/mL

(111). A MASP-2 fehérjéhez hasonlóan homodimereket képez a CUB1 és EGF modulok által, valamint Ca^{2+} -függő komplexeket alkot az MBL-lel, illetve a fikolin-2-vel (110). *Iwaki és mtsai.* feltételezték, hogy a MASP-2 kompetitív inhibitoraként a sMAP szabályozó szerepet játszik a lektin út aktiválódásában, ám ezt a feltételezést *Degn és mtsai.* megcáfolták (37, 111).

2.6. A komplementrendszer vizsgálatának dimenziói

Mivel a komplementrendszer számos kórkép pathomechanizmusában részt vesz, a komplementteszteket gyakran használják egy-egy betegség lefolyásának monitorozására, illetve a terápia hatékonyságának, hatásának ellenőrzésére. Bár a klasszikus és az alternatív utak paramétereinek és aktivációs termékeinek meghatározására számos jól kidolgozott módszer áll rendelkezésre, a lektin út komponensei és aktivációs termékei még tartogathatnak metodikai újdonságokat. Az alábbiakban a komplement rendszer, különös tekintettel az MBL/fikolin-lektin út paramétereinek kimutatására alkalmas módszerek elméleti hátterét és csoportjait mutatom be. Attól függően, hogy a komplement rendszer paramétereit és aktiválódását milyen szempontból szeretnénk vizsgálni, az alábbi metodikai csoportokat különíthetjük el:

- A natív komplement komponensek és regulátorok antigenikus szintjének meghatározása.
- A komplementaktivációs komplexek és termékek szintjének meghatározása.
- A komplementaktivációs útvonalak rész-, illetve összaktivitásának meghatározása.

Ahhoz, hogy átfogó és részletes képet kaphassunk a komplementrendszer állapotáról egy adott egyénben, a háromféle megközelítési mód párhuzamos alkalmazása, és az eredmények együttes értelmezése lehet informatív, ugyanis ezek a módszerek nem helyettesítik egymást.

2.6.1. A natív lektin út komponensek szintjének meghatározása

A lektin út natív komponenseit, illetve regulátorait általában specifikus ellenanyagokon alapuló ELISA módszerekkel (MBL, fikolin-2, fikolin-3, MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP-1, sMAP), illetve radiális immundiffúzióval (antigenikus C1-INH, C4) mutatjuk ki.

Amennyiben az antigenikus MBL koncentrációt határozzuk meg, fontos figyelembe venni, hogy az MBL megváltozott funkciójú genetikai variánsai befolyásolhatják a kapott eredményeket, és így a teszt nem a funkcióképes, vad típusú MBL mennyiségét tükrözi. Az MBL szint meghatározására több, kereskedelmi forgalomban elérhető kit létezik napjainkban. Ezen tesztek többsége funkcionális értékű, ugyanis a mannánnal fedett lemezre felvitt mintákból anti-MBL ellenanyaggal mutatják ki a mannánhoz kapcsolódni képes, funkcióképes MBL-t.

A fikolin-1 (71), a fikolin-2 (112) és a fikolin-3 (85), valamint a MASP-1 (97), a MASP-2 (104), a MASP-3 (36), a MAP-1 (108) és az sMAP (111) szinteket hagyományosan szendvics ELISA módszerekkel, specifikus monoklonális ellenanyagok segítségével határozzák meg. A fent felsorolt fehérjék nagy részének meghatározására már kereskedelmi kitek is forgalomban vannak.

2.6.2. A komplementaktivációs komplexek és termékek szintjének mérése

A komplement meghatározások ezen csoportjában a komplementaktiválódás egy bizonyos pontján keletkező *in vivo* aktivált, nem natív fehérjék, illetve aktivációs komplexek szintjét mérjük, általában EDTA-val fixált mintákban. Az aktivált fehérjék szintjét ajánlott arányosítani a natív fehérje szintjéhez.

Munkacsoportunk kidolgozott egy szendvics ELISA-alapú módszert, amely monoklonális anti-humán-MASP-2 és biotinizált monoklonális anti-humán-fikolin-3 (anti-FCN334) ellenanyagok segítségével alkalmas a fikolin-3/MASP-2 komplex rutinszerű kimutatására szérumban (113), ugyanakkor ezen kívül nem közöltek olyan módszereket a szakirodalomban, amelyek a diszkrét MBL-MASP, illetve fikolin-MASP komplexek kimutatását rutinszerűen lehetővé tennék.

A komplementfehérjékből képződő aktivációs termékek (C1rC1sC1-INH, C4a, C4d, C3a, C3bBbP, SC5b-9) meghatározása általában EDTA-plazmában történik, az adott aktivációs termékre specifikus ellenanyagokon alapuló ELISA módszerek segítségével. Ezen paraméterek meghatározásához már több, kereskedelmi forgalomban elérhető kit rendelkezésünkre áll, a házilag kifejlesztett ELISA módszerek mellett.

2.6.3. A komplementaktivációs útvonalak rész- és összaktivitás mérése

Az egyes komplementaktivációs útvonalak összaktivitásának meghatározása során a mintát *in vitro* aktiváljuk egy specifikus aktivátorral, és ezt követően kontrollált körülmények között vizsgáljuk az adott komplement útvonal aktiválódását, vagy egy köztes pontig (pl. MBL-MASP-2 által közvetített C4-depozíció), vagy a terminális komplementkomplex (TCC) képződéséig (pl. CH50, AH50). *Kuipers és mtsai.* kifejlesztettek egy hemolitikus módszert, amely a funkcióképes MBL meghatározására alkalmas (114). Ezen hemolitikus módszer során a mintákban jelen lévő MBL-t *Saccharomyces cerevisiae*-vel aktiválják, és minden tesztelendő mintához MBL-deficiens szérumot adnak, amely az MBL-en kívül a többi komplementfehérje forrásaként szolgál. Az MBL-által indukált hemolízis hatását csirke vörösvérsejteken mutatják ki. Ez a módszer azért előnyösebb a korábban leírt hemolitikus MBL-meghatározásnál (ahol a mannánnal fedett humán vörösvértettek lízisét mérik) (115), mert egyszerűbben kivitelezhető és megbízható.

Bár az MBL-lel kapcsolatos kutatások hosszú időkre nyúlnak vissza, a diszkrét MBL-MASP komplexek mennyiségi meghatározásáról nem készült metodikai tanulmány. Ugyanakkor azok a megközelítési módok, amelyek az MBL-MASP-1 komplexek aktivitását mérik VPR-AMC (Val-Pro-Arg-aminomethylcoumarin) szubsztrát használatával, illetve az MBL-MASP-2 komplex aktivitását a C4-depozíció révén, széles körben elterjedtek. *Mayilyan és mtsai.* az MBL-MASP komplexek aktivitása alapján következtettek azok relatív koncentrációjára, és megállapították, hogy a kétféle komplex mennyisége inverz módon aránylik egymáshoz a vizsgált egyéneken (52).

Az MBL-MASP komplex aktiválhatóságának meghatározására *Petersen és mtsai.* kifejlesztettek egy funkcionális tesztet, amely a mannánnal (mely az MBL specifikus liganduma) fedett lemezen inkubált szérum mintákban a C4b-depozíció mértékét mutatja ki (116), ezt a módszert laboratóriumunkban adaptáltuk (117). Mivel a klasszikus út is aktiválódhat az esetleg jelen lévő anti-mannán ellenanyagok hatására, a lektin út aktiválódás kizárólagos vizsgálata érdekében a mintákat magas ionerejű pufferben (1 M NaCl-ot és Ca^{2+} -ot tartalmazó hígító puffer), legalább 100-szoros hígításban javasolt alkalmazni, így kizárható a klasszikus út aktiválódása, míg a lektin út funkciója nem sérül (118). Mivel a minták eltérő endogén C4 koncentrációja befolyásolhatja a C4b-depozíció mértékét, ezért minden mintához azonos mennyiségű

tisztított C4-fehérje adása javasolt, majd az 1 órás, 37 °C-on történő inkubációt követően meghatározzuk a felszínhez lekötődött hasítási termék mennyiségét. *Thiel és mtsai.* eredményei alapján ezen meghatározás eredményei jól korrelálnak az MBL koncentrációjával (119).

A fent ismertetett módszer elvét követve kifejlesztettek egy kereskedelmi forgalomban elérhető funkcionális kitet, amely az MBL-lektin út teljes aktiválódását határozza meg, egészen a TCC kialakulásáig (120). Ez a módszer annyiban különbözik elődjétől, hogy a mannánnal fedett lemezen, 37 °C-on inkubált szérum mintákból specifikusan a lektin út aktiválódás hatására képződött TCC mennyiségét mutatja ki, egy a C9 komplementfehérjére specifikus monoklonális ellenanyag által, standardizált körülmények között. A módszer további előnye, hogy segítségével kimutatható a lektin és a terminális út bármely komponensének hiánya, az MBL-től a C9-ig.

Hein és mtsai. kifejlesztettek egy ELISA rendszert (89), amely alkalmas a fikolin-3 által közvetített lektin út aktiválódás vizsgálatára. A módszer azon az elven alapszik, hogy a mikrotitráló lemezt borító acetilált BSA (acetilált marha szérum albumin, amely a fikolin-3 specifikus liganduma) határása a mintában lévő endogén fikolin-3 aktiválódik. A módszer előnye, hogy az aktiválódás mértékét a kaszkád különböző pontjain is meghatározhatjuk, attól függően, hogy a képződött komplementaktivációs termékek közül a C4c-t, a C3c-t, illetve a TCC-t mutatjuk-e ki a specifikus ellenanyagokkal (*részletes leírása megtalálható a 4.2.3. fejezetben*). A fenti metodika alapján bevezetésre került egy kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA kit, amely a fikolin-3 által közvetített lektin út aktiválódás mértékét a képződött TCC mennyisége alapján, egy neoantigén kimutatásával határozza meg.

Bár minimális átfedés fennáll az MBL és a fikolinok szubsztrátspecifitása között, az MBL, illetve a fikolin-3 által mediált lektin út aktiválódás elkülönülten vizsgálható az MBL, illetve a fikolin-3 specifikus ligandumai (mannán, illetve acetilált BSA) segítségével.

2.7. A komplement lektin út kapcsolata betegségekkel

Mivel az eddigi tanulmányokban a vizsgált betegségeket valamely lektin út komponens csökkent szintjével/funkciójával hozták összefüggésbe, az alábbi fejezetben is az egyes fehérjék hiányát, valamint az azzal asszociált kórképet szeretném bemutatni. A

komplementrendszer szerepét kardiovaszkuláris (iszkémia-reperfúzió) (121, 122), neurodegeneratív (Alzheimer-kór, szklerózis multiplex) (123, 124), gyulladásos (vaszkulitisz, nefritisz), fertőzőes és autoimmun kórképekben (SLE, rheumatoid arthritisz, miaszténia grávisz) (125, 126), valamint graft versus host betegségben számtalan tanulmány bizonyítja. A komplement lektin út paramétereit közül az MBL-lel kapcsolatban számos betegségasszociációs vizsgálat jelent meg, ugyanakkor a többi komponens különböző kórképekben betöltött szerepéről még hiányosak az ismereteink.

Az *MBL2* gén szekvenálása során 3 polimorfizmus gyakori előfordulását mutatták ki, melyek a következők: glicin – aszpartátsav csere az 54-es kodonban („B-allél”) (127), glicin – glutaminsav csere az 57-es kodonban („C-allél”) (128) és arginin – cisztein csere az 52-es kodonban („D-allél”) (129). Bármely mutáns allél jelenléte nagy mértékben csökkent MBL koncentrációval jár együtt. A vad típusú allélt az egyezmény szerint „A”-val jelölik. A kaukázusi populáció kb. 35%-ban elégtelen az MBL szintje, míg a populáció 10–15%-a MBL-hiányban (MBL<100 ng/ml) szenved (50). Fontos azonban megemlíteni, hogy az alacsony MBL szint az esetek nagy részében észrevétlen, és további faktorok közreműködése szükséges ahhoz, hogy az MBL-hiánnyal összefüggő kórkép manifesztálódjon (130), illetve felmerül a fikolinok kompenzáló hatása.

Számos tanulmány jelent meg az utóbbi években, amelyek a kemoterápia során fellépő fertőzések és az MBL szint közötti összefüggéseket vizsgálták. Ezen tanulmányok összehasonlítása, és a következtetések levonása azért is nehézkes, mert a malignus betegség típusa, az alkalmazott terápia és az MBL szintek meghatározásának módja vizsgálatonként más és más volt. *Neth és mtsai.* 100 akut limfoid leukémiás, kemoterápiában részesülő gyermekben összefüggést találtak az MBL genotípusok és szintek, valamint a lázas neutropéniás periódusok gyakorisága és hossza között: a variáns MBL alléllal rendelkező (MBL<1µg/mL) gyermekekben kétszer tovább tartott a lázas neutropéniás időszakok hossza, ugyanakkor az MBL genotípusok és a fertőzések gyakorisága között nem találtak összefüggést (131).

Vekemans és mtsai. 255 leukémiás felnőtt beteg bevonásával végeztek prospektív vizsgálatot, amelyben a súlyos infekciók és a bakteriémia gyakoribb előfordulását tapasztalták az MBL-hiányos betegekben (132).

Garred és mtsai. 272, intenzív osztályon ápoltság kapcsán fordított összefüggést találtak az MBL-szintek és a szepszis súlyossága között, továbbá a variáns MBL-alléllal rendelkező betegekben szignifikánsan magasabb volt a halálos kimenetel kockázata (133).

Mivel az ateroszklerózisban az endotélium sérülése miatt gyulladáshoz vezető folyamatok is részt vesznek, felvetődött az MBL szerepének vizsgálata ebben a körképben. Egy norvég és egy izlandi tanulmány egymástól függetlenül a miokardiális infarktus emelkedett kockázatát mutatta ki az MBL-hiányos egyéneknél (134, 135). *Rugonfalvi-Kiss és mtsai.* leírták, hogy MBL-hiányos egyéneknél a *Chlamydia pneumoniae* fertőzés súlyos lefolyású koronária betegségre prediszponál (136). *Szabó és mtsai.* kimutatták, hogy a karotisz endarterektómián átesett betegek közül a VEGF és a PDGF szignifikáns emelkedése csak azokban a betegekben prediktálta a resztenózis kialakulását, akik homozigóta formában hordozták a normál *MBL2* allélt (*A/A*) (137).

Christiansen és mtsai. 146 visszatérő spontán abortuszban szenvedő nőbeteg csoportjában az MBL-hiány gyakoribb előfordulását (15%) tapasztalták, a kontrollokhoz képest (9%), továbbá összefüggést találtak az MBL-hiány gyakorisága és a vetélések száma között (138).

Az alacsony fikolin-2 koncentrációval asszociált betegségekről számtalan tanulmány született. Egy lengyel tanulmányban összefüggést találtak az alacsony fikolin-2 szintek és a perinatális infekciók gyakorisága között, koraszülött csecsemőkben (139), ugyanakkor *Schlapbach és mtsai.* nem találtak összefüggést a fikolin-2 szintek és a szepszis gyakorisága között koraszülött csecsemőkben (140), holott az alacsony fikolin-3 szint és a Gram-pozitív szepszis gyakorisága, valamint az alacsony MBL szint és a Gram-negatív szepszis előfordulása között szignifikáns korreláció állt fenn.

Mivel a fikolin-2 több, felső légúti infekciót okozó patogénhez (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*) kötődni képes, talán nem meglepő *Cedzynski és mtsai.* eredménye, akik összefüggést találtak az alacsony fikolin-2 szintek és a visszatérő légúti fertőzések között, bár ez a kapcsolat főleg az allergiában szenvedő betegekben volt markáns (141). Az egészséges nőkhez képest csökkent fikolin-2 szintekről számolt be egy vizsgálat, amely visszatérő spontán abortuszban szenvedő nők bevonásával készült (142),

valamint egy másik tanulmány preeclampsia betegekben írt le csökkent fikolin-2 szinteket (143).

A fikolin-3 szintek pathofiziológiás jelentőségéről kevés vizsgálat született, ám kutatócsoportunk kimutatta, hogy az alacsony fikolin-3 koncentráció összefüggést mutat a súlyos lefolyású stroke-kal, és a rövid túléléssel (144), továbbá az alacsony fikolin-3 szint kapcsolatban áll a szívelégtelenség súlyosságával és kimenetelével (*eredmények közlése folyamatban*).

Homozigóta fikolin-hiányról eddig csupán egy esetismertetés számolt be: a szóban forgó beteg visszatérő bakteriális fertőzésektől (*Haemophilus influenzae* és *Pseudomonas aeruginosa*) szenvedett, fikolin-3 nem volt detektálható a vérben, és a fikolin-3 génjében egy frameshift mutációt mutattak ki (88).

A *MASP-1/3* és a *COLEC11* génekben bekövetkező mutációk rámutattak a lektin út egyes komponenseinek komplementrendszeren túlmutató funkcióira. Több kutatócsoport egymástól független eredményei alapján mind a *MASP-3*, mind a kollektin-11 szerepet játszik az autoszomális-recesszív 3MC szindróma kialakulásában, amely jellegzetes faciális diszormofizmussal, súlyos testi fejlődési rendellenességekkel és tanulási zavarokkal jár együtt (145-148). Az eddigi tanulmányok alapján azt feltételezik, hogy a *MASP-3* és a kollektin-11 kemoattraktánsként szerepelhetnek az embrionális fejlődés során (149).

A *MASP-2* tekintetében többnyire a fehérje emelkedett szintjét hozták összefüggésbe különböző kórképekkel. *Yting és mtsai.* kolorektális karcinómában szenvedő betegekben szignifikánsan emelkedett *MASP-2* szinteket mutattak ki a kontrollokhoz képest, ugyanakkor nem találtak összefüggést a *MASP-2* szintek és az infekciók gyakorisága között a betegekben (150). Érdekes eredmény, hogy a *MASP-2* koncentráció független prognosztikus markernek bizonyult a tumor visszatérését, illetve a túlélési esélyeket illetően.

Egyes tanulmányok nem találtak kapcsolatot a *MASP-2* hiány és a különböző infekciók gyakorisága között (151, 152), bár egy nemrég megjelent közlemény a csökkent *MASP-2* szinteket gyakoribb megjelenésű lázas neutropeniás időszakokkal hozta összefüggésbe leukémiás gyermekek vizsgálata során (153).

A MASP-2 homozigóta deficienciájáról eddig 2 esetismertetés született, mindkettő a MASP-2 gén 3. exonjában bekövetkező pontmutációról számolt be, amely egy D105G mutációhoz vezetett. Az egyik beteg visszatérő infekcióktól és autoimmun betegségtől szenvedett (154), míg a másik beteg allergiás tünetekről számolt be (155).

2.8. A C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditár angioödéma

A dolgozatban bemutatott vizsgálatainkba C1-INH hiányos, hereditár angioödémában (HANO-C1-INH) szenvedő betegeket vontunk be, így a következő fejezetben bemutatom e kórkép jellemzőit.

2.8.1. A hereditár angioödéma etiológiája, típusai és tünetei

A C1-INH hiányában kialakuló HANO (HANO-C1-INH) egy olyan sajátos állapot, amelyet a koagulációs, a fibrinolitikus, a kontakt rendszer, továbbá a komplementaktiválás klasszikus és lektin útjának szabályozását biztosító C1-INH heterozigóta deficienciája okoz. A betegség autoszomális domináns módon öröklődik, és etiológiájában a *C1-INH* génjében (*SERPING1*) bekövetkező mutációk játszanak szerepet, amely funkcionális C1-INH deficienciához vezet. A kórképnek jelenleg két jól elkülöníthető típusa ismert. Az I-es típusú HANO-ban – amely a betegek 85%-át érinti – az antigenikus C1-INH fehérje szint csökkent, míg a II-es típusú HANO-ban – a betegek 15%-ában - funkcióképtelen C1-INH fehérje termelődik a hibás génszakaszról, így ebben a formában a C1-INH szérumban mérhető antigenikus koncentrációja normális, esetenként kórosan magasnak mutatkozik az albuminhoz való kötődése miatt (156). Mindkét típusban a C1-INH aktivitása 5-30 % körüli, alatta marad a várható 50 %-nak, aminek egyetlen teljesen expresszálandó allél esetében kellene lennie. A különbséget a C1-INH fokozott felhasználódása, vagy a csökkent gén expresszió, illetve a mutáns mRNS által kifejtett transzinhibíció okozhatja (157, 158).

A betegség jellegzetes tünetei a visszatérő, nem gyulladással eredetű, gyakran előzmény nélkül kialakuló angioödémák, melyek lehetnek szubkután, vagy szubmukózus lokalizációjúak (5. ábra). Mivel az ödémás léziók a bőr mélyebb rétegeiben alakulnak ki, ahol kevés a hízósejt és a szenzoros idegvégződés, az ödémák általában nem járnak fájdalommal, bőrpírral, vagy viszketéssel. A legsúlyosabb tünetek közé a felső

légutakban kialakuló angioödémák tartoznak, amelyek a megfelelő kezelés nélkül rövid idő alatt fulladáshoz vezethetnek. A gasztrointesztinális traktus nyálkahártyáján jelentkező ödémákat gyakran kíséri hányinger, hányás, görcsös hasi fájdalom, és a rohamokat követő vizes hasmenés. A szubkután rohamok leggyakrabban a törzsön, a végtagokon, az arcon, a szemhéjakon, a nyakon, a gluteális tájon, illetve a nemi szerveken jelentkeznek. A rohamok megjelenési gyakorisága és súlyossága nem jósolható meg előre, nemcsak egy egyénen belül, hanem egy család érintett tagjait tekintve sem (159, 160), melynek genetikai (161-165), és/vagy környezeti okai (166, 167) lehetnek. A betegek többségében a rohamok általában kisgyermek korban, vagy a pubertáskor kezdetén jelentkeznek először (168, 169). A rohamok keletkezéséhez, illetve súlyosbodásához jellemzően vírusos és bakteriális infekciók (pl. *Helicobacter pylori*), egyéb fertőző ágensek, hormonális hatások, emocionális stressz, valamint bizonyos gyógyszerek (pl. ACE-inhibitorok, ösztrogéntartalmú fogamzásgátlók) járulnak hozzá. Betegeink gyakran számolnak be továbbá rovarcsípés, ütés, műtéti beavatkozás, fizikai munka, szexuális együttlét, sport és mechanikai trauma miatt kialakuló angioödémákról (*Zotter és mtsai, eredmények közzlése folyamatban*).



5. ábra. Arcon, kézfejen, illetve hasi lokalizációban jelentkező ödémák. A hereditár angioödémát visszatérő, nem gyulladásos eredetű, szubkután, vagy szubmukózus lokalizációjú angioödémák jellemzik. A szubkután ödémák (A, B) általában nem járnak fájdalommal, bőrpírral, vagy viszketéssel, mivel az ödémás léziók a bőr mélyebb rétegeiben alakulnak ki, ahol kevés a hízósejt és a szenzoros idegvégződés. A C. panel hasi ultrahangfelvételén szabad hasúri folyadék látható, hasi ödémás roham során. A bélrendszer nyálkahártyáján jelentkező ödéma akut has tüneteit utánozhatja.

(Dr. Farkas Henriette képanyaga, engedélyével felhasználva)

2.8.2. A herediter angioödéma diagnózisa

Mivel a C1-INH hiány következtében kialakuló herediter angioödéma esetenként életveszélyes (pl. felső légúti ödéma), ám kezelhető állapothoz vezethet, fontos a diagnózis korai felállítása. A diagnózis legfontosabb pillére a diagnosztikus értékű komplement paraméterek meghatározása (antigenikus és funkcionális C1-INH szintek, C4 koncentráció), és ezen túl a családi anamnézis, valamint a tünetek megjelenési formája és gyakorisága (170). Mind a markánsan csökkent, mind a normális értéknél magasabb C1-INH koncentráció diagnosztikus értékű lehet, ugyanis HANO I-es típusban a C1-INH antigenikus plazma szintje és funkcionális aktivitása csökkent, míg HANO II-es típusban az alacsony mértékű funkcionális C1-INH aktivitást normális, vagy akár emelkedett antigenikus C1-INH plazma koncentráció kíséri, a mutáns C1-INH albuminhoz való kötődése miatt (2. táblázat). Bizonyos esetekben – ahol a komplement analízis alapján nem egyértelmű a diagnózis - érdemes megvizsgálni a *C1-INH* gén lehetséges mutációját, ugyanis ez kortól függetlenül utalhat a kórképre, ugyanakkor az esetek 5-10%-ában nem mutatható ki mutáció a betegség hátterében. A C3 szint jellemzően a normális tartományban van, ugyanakkor a csökkent C4 szint az egyik legjellemzőbb mutatója a betegségnek (2. táblázat).

2. táblázat. A komplement paraméterek szintje a C1-INH-hiány különböző típusaiban. A herediter angioödéma komplement diagnosztikai paraméterei az antigenikus és funkcionális C1-INH szintek, valamint a C4 koncentráció.

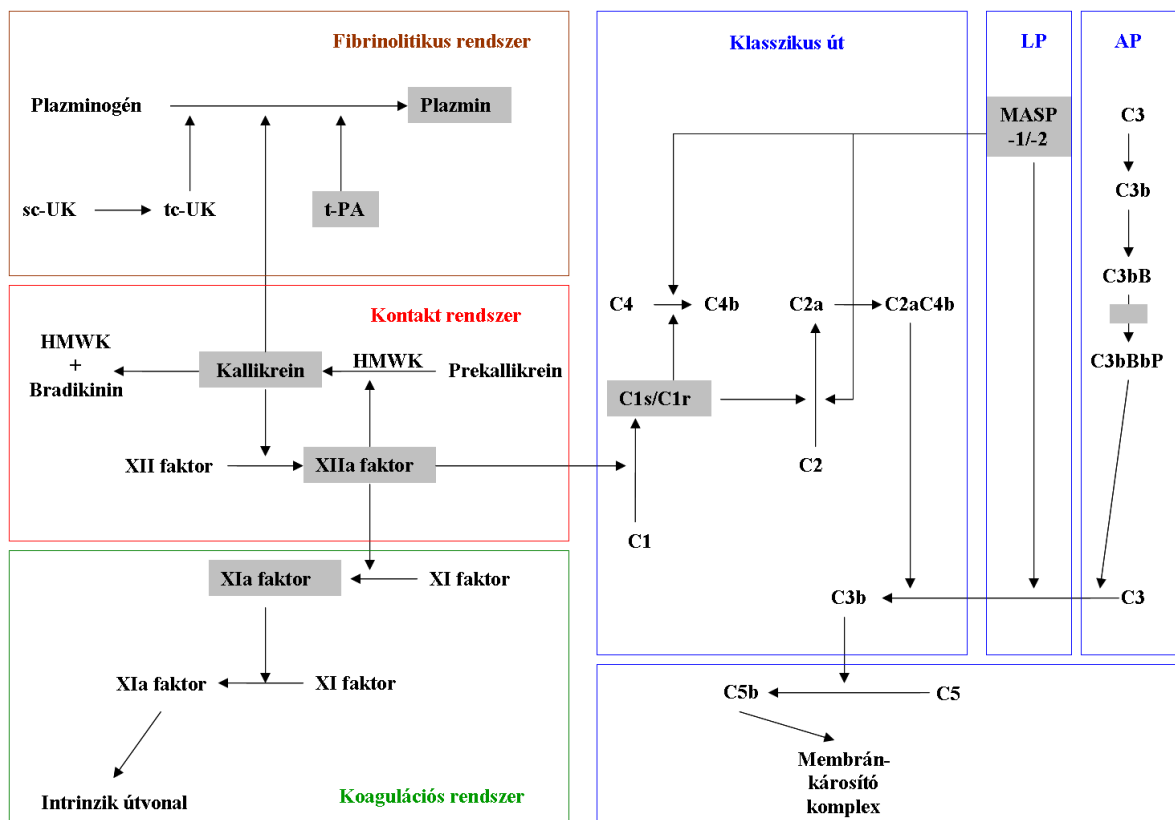
C1-INH hiány típusa	Antigenikus C1-INH koncentráció	Funkcionális C1-INH aktivitás	C1q	C4	C3
HANO I-es típus	↓	↓	Normális	↓	Normális
HANO II-es típus	Normális vagy ↑	↓	Normális	↓	Normális

2.8.3. A herediter angioödéma pathofiziológiája

A HANO-C1-INH I-es és II-es típus tüneteinek hátterében a funkcióképes C1-INH hiánya áll, amely a plazma-enzimrendszerek kontrollálatlan aktiválódásához vezet (6. ábra). A kinin rendszer fokozott aktiválódása bradikinin felszabadulását idézi elő, amely a vaszkuláris permeabilitás növekedését eredményezi (169, 171-174). Az intravaszkuláris térből az extravaszkuláris térbe áramló folyadék ödéma kialakulásához vezet. A kinin rendszer a megfelelő C1-INH szabályozás hiányában már enyhe

stimulustól is aktiválódhat, így amennyiben valamilyen okból szövethárosodás jön létre, a Hageman-faktor hatására a prekallikreinből kallikrein, és ennek hatására a nagy molekulatömegű kininogénből bradikinin szabadul fel (175, 176) (6. ábra). A HANO-C1-INH-s betegek ödémás folyadékában aktív kallikrein mutatható ki, melynek legfőbb inhibitora a C1-INH (177). A C1-INH *in vitro* gátolja a plazmint is, amely a fibrinolitikus rendszer fő komponenseként képes hasítani a nagy molekulatömegű kininogént, de bradikinin felszabadítására önmagában nem képes (173, 178). A XIIa faktor aktiválhatja a koagulációs rendszert is, melynek fő enzime, a trombin aktivációja önmagában nem generál ödémát, de C1-INH hiányban a komplement- és a kontaktrendszerek konkomittáló aktivációja során felszabadult vazoaktív anyagok hatását növelheti. Ennek megfelelően a HANO-C1-INH-s betegek ödémás rohamai során fokozott trombin termelés figyelhető meg (174). Mindezen folyamatok mellett a komplement kaskád klasszikus útja autoaktiválódik C1-INH hiányában, amely a plazma C2 és C4 szintjének csökkenését eredményezi (12, 170, 179, 180).

Összegezve elmondható, hogy az angioödéma kialakulásában a bradikininint tartják a fő mediátornak, amit *knock-out* egerekkel végzett kísérletek is alátámasztanak (181), így a HANO-C1-INH új terápiás lehetőségeinek kutatásai (kallikrein-inhibitorok, bradikinin receptor-gátlók) elsősorban a bradikinin mechanizmusra irányulnak.



6. ábra. A C1-INH kapcsolatai a fibrinolitikus, a kontakt és a koagulációs rendszerekkel, valamint a komplement kaskád klasszikus, lektin-indukált és alternatív útvonalaival. Szürke négyzetek jelzik azon pontokat, ahol a C1-INH kifejti szabályozó funkcióját.

AP: alternatív út; HMWK: nagy molekulatömegű kininogén; LP: lektin-indukált út; sc-UK: egyláncú urokináz; tc-UK: kétláncú urokináz; t-PA: szöveti plazminogén-aktivátor (Zeerleder ábrája nyomán, módosítva) (182)

2.8.4. A hereditár angioödéma és a komplementrendszer kapcsolata

A C1-INH hiány következtében kialakuló hereditár angioödémában a komplement klasszikus aktivációs út szerepe jól feltárt (13, 183, 184), ugyanakkor az MBL által közvetített lektin út aktiválódásáról csak az utóbbi években jelentek meg közlemények (168, 185), míg a fikolinok HANO-C1-INH-ban betöltött szerepéről eddig csupán egy cikk jelent meg (186). Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy hereditár angioödémában a C1-INH, C4, C2 és MASP-2 szintek, továbbá az MBL-lektin út összaktivitása csökkentek (185), ám a fikolinokról és a társuló szerin proteázok, illetve szerin proteázszerű fehérjék szintjéről még keveset tudunk ebben a kórképben.

Feltételezésünk szerint a teljes lektin út csökkent aktivitását az alacsony MASP-2 szint és/vagy a HANO-C1-INH-ra jellemző csökkent C4 koncentráció okozhatja. A HANO-C1-INH-ban diagnosztikus értékű alacsony C4 szint a funkcionális C1-INH hiányában bekövetkező szabályozatlan és spontán klasszikus és/vagy lektin út aktiválódás

következménye, amely során a C1 komplex, illetve a MASP-1 és a MASP-2 kontrollálatlanul aktiválódik, a C4 fokozott hasítását eredményezve (12, 170, 180, 185). A klasszikus, illetve a lektin út autoaktiválódhat (aktiváló ágens hiányában) (187, 188), illetve az egyes útvonalak specifikus aktivátorai hatására fokozott mértékben aktiválódhat a funkcionális C1-INH hiányában. Arról, hogy a HANO-C1-INH-s betegekben tapasztalt alacsony MASP-2 szintet mi okozza, csak feltételezéseink vannak. Mivel a MASP-2 deficiencia nagyon ritkán fordul elő (becsült adatok alapján a populáció 0.3%-át érinti) (154), sokkal valószínűbb, hogy a MASP-2 alacsony koncentrációja az MBL, illetve a fikolinok által végbemenő kontrollálatlan konzumpciós mechanizmus(ok) következménye.

Dobó és mtsai. kimutatták, hogy mind a MASP-1, mind a MASP-2 képes elhasítani a nagy molekulatömegű kininogént a plazma kallikreinhez hasonlóan, ugyanakkor bradikinin felszabadulás csak a MASP-1 hatására keletkezett, a MASP-2 hatására nem (101). Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy HANO-C1-INH-ban, a C1-INH sérült szabályozó funkciója következtében a MASP-1 autoaktiválódása hozzájárul az emelkedett bradikinin szinthez, még a kontakt rendszert aktiváló ágensek hiányában is, a XII. faktortól és a kallikreintől független mechanizmus által (101). Mivel a MASP-1 és a MASP-2 is aktiválódhat infekciók során (16), illetve nagy stresszel járó körülmények között (189) (amely tényezők gyakran váltanak ki ödémás rohamot) (*Zotter és mtsai., eredmények közlése folyamatban*), lehetséges, hogy a bradikinin képződés ezen XII. faktortól és a kallikreintől független útvonala fontos szerepet játszik a HANO-C1-INH-ra jellemző rohamok egy részében.

Bár a klasszikus és az MBL-lektin út összaktivitása csökkentnek mutatkozott HANO-C1-INH-ban (184, 185), a fikolin-lektin út teljes aktivitását még nem vizsgálták, így vizsgálataink során elemeztük ezen aktivációs út paramétereit.

3. CÉLKITŰZÉSEK

3.1. Milyen hatása van a funkcionális C1-INH hiánynak a komplement lektin útra?

Tekintettel a komplementrendszer bonyolult felépítésére, a kérdés megválaszolására a komplement diagnosztikában szokásos háromféle megközelítést alkalmaztunk egészséges egyének, és C1-INH hiányos HANO-s betegek vérmintáinak vizsgálata során:

- 1) Meghatároztuk a klasszikus és a lektin úthoz tartozó natív komplementfehérjék szintjét;
- 2) Megvizsgáltuk a komplementaktiválódás során keletkező komplexek szintjét, kiterjesztve az alternatív és a terminális úton keletkező aktivációs komplexek szintjére; továbbá
- 3) Megfelelő aktivátorok alkalmazásával megmértük a klasszikus és a lektin utak aktiválhatóságát a teljes úton (összkomplement, TCC-depozíció), illetve annak csak egy szakaszán (C4-depozíció).

3.1.1. A HANO-C1-INH-ra jellemző csökkent C1-INH aktivitás hogyan befolyásolja a klasszikus és a lektin út korai, illetve közös natív komponenseinek szintjét?

Eddig csupán két közlemény vizsgálta az MBL-lektin út szerepét HANO-C1-INH-ban (168, 185), ugyanakkor a fikolin-lektin út HANO-C1-INH-ban betöltött funkciójával kapcsolatban még hiányosak ismereteink. Korábbi tanulmányok alapján azt feltételeztük, hogy az MBL-nél nagyobb mennyiségben jelen lévő fikolinokon (190) keresztül bekövetkező kontrollálatlan komplementaktiválódás az egészséges egyénektől eltérően, markánsan hozzájárulhat a C1-INH konzumpcióhoz. Feltételezésünk vizsgálata érdekében elemeztük a klasszikus és a lektin út korai és közös komponenseinek szintjét tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben, és egészséges egyénekekben.

3.1.2. Milyen hatással van a funkcionális C1-INH hiánya a klasszikus, a lektin, az alternatív és a terminális utakon keletkező komplexek szintjére?

Jelenlegi tudásunk szerint a C1-INH a komplementrendszer klasszikus és lektin-indukált útjain belül a komplement komplexek (C1 komplex, MBL-MASP-2, fikolin-3/MASP-2) legfontosabb inhibitora, ezért azt feltételeztük, hogy a funkcionális C1-INH csökkent koncentrációja kihat a komplement kaszkád során keletkező komplexek szintjére, illetve funkcionális aktivitására. Ennek megfelelően vizsgálataink célja az volt, hogy elemezzük a C1rC1sC1-INH (klasszikus út), a fikolin-3/MASP-2 (fikolin-lektin út), a C3bBbP (alternatív út), és az SC5b-9 (terminális út) komplexek szintjét a C1-INH hiányában kialakuló hereditér angioödémában. A C1rC1sC1-INH, C3bBbP és SC5b-9 szintek meghatározásához korábban közölt módszereket adaptáltunk (191, 192), míg a fikolin-3/MASP-2 komplex kvantitatív méréséhez kifejlesztettünk egy új metodikát (113).

3.1.3. Befolyásolja-e a funkcionális C1-inhibitor hiánya a korai MBL-lektin út aktiválódását, illetve a fikolin-lektin út összaktivitását tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben?

Munkacsoportunk korábban leírta, hogy a klasszikus út teljes aktiválódásának mértéke (184), továbbá a MASP-2 koncentráció, és a komplement MBL-lektin út összaktivitása is csökkent HANO-C1-INH-s betegekben, de az MBL szint nem (185). Az MBL-lektin út aktiválódásának hozzájárulását a C4 szintjének csökkenéséhez úgy határoztuk meg, hogy a mannánnal aktivált MBL-MASP-2 komplex általi C4-depozíció mértékét vizsgáltuk. A fikolin-lektin út szerepének elemzésére meghatároztuk az acetilált BSA-hoz kötődött fikolin-3-on keresztül végbemenő TCC-depozíció mértékét, HANO-C1-INH-s betegekben és egészséges kontrollokban.

3.2. Szerepet játszik-e a HANO-C1-INH pathomechanizmusában a lektin út spontán aktiválódása?

3.2.1. Van-e összefüggés az MBL-lektin út, illetve a fikolin-lektin út komponenseinek szintje és a HANO-C1-INH súlyossága között?

Cedzynski és mtsai. eredményei alapján az MBL-lektin út aktiválódásának mértéke nem befolyásolja a HANO-C1-INH tüneteinek súlyosságát (168), ugyanakkor az MBL-nél nagyságrendekkel nagyobb mennyiségben jelen lévő fikolin-2 és fikolin-3, valamint az általuk közvetített fikolin-lektin út aktiválódás szerepét HANO-C1-INH-ban még nem vizsgálták. Mivel a lektin út egyes komponenseinek szintje szignifikánsan különbözött az egészséges egyének értékeitől, ezért feltételeztük, hogy összefüggést mutathatnak a HANO-C1-INH súlyossági paramétereivel.

3.2.2. Megváltozik-e a fikolin-lektin út paramétereinek szintje a HANO-C1-INH-s rohamok során?

A fikolinokhoz kapcsolódó MASP-1 és MASP-2 aktiválódása konzumpciós mechanizmussal hozzájárulhat a csekély mennyiségű funkcióképes C1-INH felhasználódásához, ezáltal a C1-INH által szabályozott rendszerek kontrollálatlan aktiválódásához, és az ödéma képződéshez. *Dobó és mtsai.* nemrég megjelent közleménye szerint a MASP-1 szerepet játszik a nagy molekulatömegű kininogén bradikininné történő hasításában, tehát ez a megfigyelés is arra utal, hogy a lektin út közreműködhet a HANO-C1-INH pathomechanizmusában (101). A kérdés megválaszolása érdekében ugyanazon betegek tünetmentes időszakban, illetve roham során gyűjtött mintáiban vizsgáltuk a fikolin-lektin út fehérjéinek szintjét, illetve a fikolin-lektin út aktiválódás mértékét.

4. MÓDSZEREK

4.1. A vizsgált betegcsoport és az egészséges egyének

4.1.1. Hereditár angioödémás betegek

Vizsgálatainkhoz az Országos Angioödéma Központban nyilvántartott 138 HANO-C1-INH-s beteg (60 férfi, 78 nő; medián életkor: 35,3 év) 2004 és 2010 között, tünetmentes időszakokban gyűjtött vérmintáját használtuk fel, akiknél az összes figyelembe vett klinikai paraméter is rögzítve volt. Az I-es típusú (127 fő) és a II-es típusú (11 fő) HANO-C1-INH-s betegek laboratóriumi és klinikai adatait együtt elemeztük, csupán az antigenikus C1-INH szinttel kapcsolatos elemzések során zártuk ki a II-es típusú betegek értékeit, mivel a kórkép ezen formájában az antigenikus C1-INH szint normális, illetve esetenként emelkedett. A betegek legalább évente egyszer kontroll vizsgálaton vettek részt, amelynek során vérvétel is történt, ez adott lehetőséget a szérum- és plazmabank létrehozására. A betegek angioödémás rohamaik számát és lokalizációját, valamint a súlyos rohamok kezelésére felhasznált humán plazma eredetű C1-INH koncentrátum mennyiségét betegnaplóban vezették, amely forrásként szolgált a betegség súlyosságának megbecsülésére. Minden beteg esetében a klinikai és laboratóriumi kritériumok (pozitív családtörténet, angioödéma klinikai tünetei, csökkent funkcionális C1-INH aktivitás) alapján állítottuk fel a HANO-C1-INH diagnózist, amelyet molekuláris genetikai vizsgálattal is alátámasztottunk. A betegek klinikai tüneteit folyamatosan kontrolláltuk; danazol és tranexámsavat alkalmaztunk hosszú távú profilaxisban, míg a humán plazma eredetű C1-INH-koncentrátumot (Berinert[®], CSL Behring, Marburg, Németország) az ödémás rohamok kezelésére használtuk.

A fent bemutatott 138 beteg közül 35 betegtől az ödémás rohamok során is lehetőségünk nyílt vérminták gyűjtésére, a C1-INH koncentrátum beadása előtt. Összesen 112 rohamos mintát vizsgáltunk, melyek közül 41-et szubkután, 18-at felső légúti és 53-at hasi rohamok során gyűjtöttünk. A tünetek első megjelenésétől a vérvétel időpontjáig eltelt idő medián értéke 3,25 óra volt (25 - 75. percentilisek: 2,0-7,5 óra; továbbá minimum 0,5 óra, maximum 72,0 óra).

4.1.1.1. A hereditár angioödémás betegek kezelése

Bár a végleges terápiás megoldást jelentő génterápia HANO-C1-INH-ban még nem érhető el, megfelelő profilaktikus kezeléssel (attenuált anabolikus androgének, antifibrinolitikumok) a tünetek gyakorisága és súlyossága jelentősen csökkenthető. A HANO-C1-INH- s betegek ellátása magában foglalja az ödémás rohamok kezelését, valamint a rövid-, illetve hosszú-távú profilaktikus terápiát.

Súlyos rohamok **akut kezelésére** tisztított, pasztörizált humán plazmából előállított C1-INH koncentrátumot alkalmaztunk, amennyiben ödéma jelentkezett a felső légutak nyálkahártyáján, mivel ez fulladáshoz vezethet. Akut kezelést vezettünk be akkor is, ha a roham az arcon, az ajakon, vagy a nyakon jelentkezett, mivel az említett régiókból az ödéma könnyen áttérjedhet a felső légutakra, életveszélyes állapothoz vezetve. A törzset, a végtagokat, illetve a nemi szerveket érintő fájdalmas ödémát, továbbá a közepes, illetve súlyos gasztrointesztinális ödémát is C1-INH koncentrátummal kezeltük, az akut klinikai tünetek (görcsös hasi fájdalom, hányinger, hányás, hasmenés) enyhítése érdekében.

Rendszeres, hosszú távú megelőző gyógyszeres kezelést akkor alkalmaztunk, ha havonta egynél több súlyos (hasi, légúti, nemi szerveken lokalizálódó) roham jelentkezett. Erre a célra leggyakrabban attenuált androgéneket, illetve nők és gyermekek esetében antifibrinolitikus hatású tranexámsavat alkalmaztunk.

Rövid távú profilaxist vezettünk be C1-INH koncentrátum, tranexámsav, illetve attenuált androgének felhasználásával, az előreláthatóan jelentkező kiváltó okok esetében, mint pl. fogászati/szájsebészeti beavatkozások, gasztroszkópia, endotracheális narkózisban végzett műtétek, mivel ezek gyakran ödémát provokálnak (193).

4.1.1.2. A hereditár angioödéma súlyosságának megítélése

A vérvételt követő évben átélt ödémás rohamok súlyosságát, lokalizációját, lefolyását, valamint az alkalmazott kezelés típusát és dózist betegeink folyamatosan rögzítették a kiadott betegnaplókban. Minden súlyos ödémás rohamot C1-INH koncentrátummal kezeltünk, így a vizsgálati év alatt felhasznált C1-INH koncentrátum mennyiségét a kórkép súlyossági markerének tekintettük.

4.1.2. Egészséges kontroll személyek

A korban és nemben illesztett kontroll csoportot 104 egészséges felnőtt (45 férfi, 59 nő, medián: 57,2 év) alkotta, akik írásos beleegyezésüket adták vizsgálatunkhoz (Tudományos és Kutatás Etikai Bizottság engedély száma: TUKEB 65/2008). A kontroll személyek egészségügyi szűrésen vettek részt, és informáltuk őket vizsgálatunkról. Egyik egyén esetében sem találtunk HANO-C1-INH-ra utaló klinikai vagy laboratóriumi adatot.

4.2. Laboratóriumi vizsgálati módszerek

A 7. ábra mutatja be, hogy a komplementrendszer klasszikus, lektin, illetve alternatív útjain belül mely natív fehérjék, illetve aktivációs termékek szintjét határoztuk meg, továbbá ábrázoltuk, hogy a funkcionális aktivitás tesztek a lektin út mely szakaszát ölelik fel.

4.2.1. Natív lektin út komponensek szintjének meghatározása

A natív komplementfehérjék koncentrációjának meghatározásához szérumot használtunk. A vérmintákat alvadás után, a vérvételtől számított 2 órán belül centrifugáltuk, a szérumot elválasztottuk, aliquotokba osztottuk, és -70°C -on tároltuk.

Antigenikus C1-INH és C4 szintek meghatározása

A szérum antigenikus C1-INH és C4 koncentrációját radiális immundiffúzió alapuló módszerrel határoztuk meg (194). 15 mL 1,5%-os töménységű agaróz oldatot (pH 8,6; 0,1 M EDTA, veronál pufferben oldva) 56°C -ra melegítettünk, majd hozzákevertünk 120 μL kecskében termelt anti-humán-C1-INH ellenanyagot (Quidel, San Diego, USA), vagy 70 μL nyúlban termelt anti-humán-C4 ellenanyagot (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia). Az ellenanyagot tartalmazó gélt megfelelően zsírtalanított 10x10 cm-es üveglemezre öntöttük vízszintező asztalon, és miután a gél megdermedt, 2,5 mm átmérőjű lyukakat vágunk bele. A fiziológiás sóoldatban kihígított standardból, valamint az 1:2 arányban hígított alacsony és magas kontrollokból, továbbá a szérummintákból 5-5 μL -t mértünk be a lyukakba, majd a lemezeket vízszintező asztalon, szobahőmérsékleten 24 órán át inkubáltuk. A nem precipitálódott fehérjék eltávolítása érdekében a lemezeket fiziológiás sóoldatban mostuk, a mosófolyadékot 2

óránként háromszor cserélve. Ezt követően a gélt nedves szűrőpapírral lefedtük, és szobahőmérsékleten rászárítottuk a lemezre. A precipitációs gyűrűket Amidoblack fehérjefestékkel (2 g Amidoblack, 500 mL metilalkohol, 100 mL koncentrált ecetsav, 400 mL desztillált víz) tettük láthatóvá, a felesleges festéket festékmentesítő oldattal (500 ml metilalkohol, 100 mL koncentrált ecetsav, 400 mL desztillált víz) távolítottuk el, majd automata mikrométerrel leolvastuk a precipitációs gyűrűk átmérőjét, amelynek négyzete egyenesen arányos a minták C1-INH, illetve C4 koncentrációjával. A vizsgálandó szérumminták C4 koncentrációját a standardként bemért, ismert koncentrációjú kontrolloldat (Human Serum Protein Calibrator, DAKO AS, Glostrup, Dánia) hígítási sorából határoztuk meg. Az antigenikus C1-INH mérés esetében tisztított, ismert koncentrációjú C1-INH oldatot (Berinert[®], CSL Behring, Marburg, Németország) használtunk standardként.

A funkcionális C1-INH szint meghatározása

A funkcionális C1-INH szintet a MicroVue C1-Inhibitor Enzyme Immunoassay kittel (Quidel, San Diego, USA) határoztuk meg, a gyártó útmutatása szerint. Az első lépés során a standardokat, a kontrollokat, és a szérum mintákat biotinilált, aktivált C1s-sel inkubáltuk, 30 percig, szobahőmérsékleten (az inkubálás során a mintában lévő funkcionálisan aktív C1-INH az aktivált, biotinilált C1s-hez kötődve komplexeket képez). A második lépésben az előkezelt mintákat avidinnel fedett mikrotitráló lemezen inkubáltuk 10 percig, szobahőmérsékleten, így a mintákból a biotinilált C1s-sel alkotott komplexek kikötődnek a lemezre. Az aspecifikus kötődés kiküszöbölésére a lemezeket ötször mostuk, majd kecskében termelt, tormaperoxidázzal jelölt anti-humán-C1-INH ellenanyaggal inkubáltuk, 1 órán át, szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően kromogénikus enzim-szubsztrátot alkalmaztunk, majd a színreakciót oxálsav oldattal állítottuk le. Az optikai denzitást – amely arányos a mintákban lévő funkcionális C1-INH koncentrációjával - 405 nm-en határoztuk meg.

Az MBL koncentráció meghatározása

Az MBL szintek meghatározásához (195) mikrotitráló lemezeket (Nunc, Roskilde, Dánia) 1:200 hígítású monoklonális egér anti-humán-MBL ellenanyaggal (HYB131-01; AntibodyShop, Gentofte, Dánia) fedtünk, 0,1 M NaHCO₃ pufferben, 2 órán át, 25°C-on.

Miután mosó pufferrel (PBS, 0,5% BSA, 0,05% Tween-20) mostuk a lemezt, az 1:20 arányban hígított szérum mintákat és a kalibrátor MBL oldatot 16 órán át, 4 °C-on inkubáltuk. A mosási lépéseket követően 1:2000 arányban hígított biotinilált anti-humán-MBL ellenanyaggal (HYB131-01; AntibodyShop, Gentofte, Dánia) inkubáltuk a lemezt 2 órán át, szobahőmérsékleten, majd 1:5000 hígítású sztreptavidin-torma-peroxidáz konjugátumot (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA) alkalmaztunk, 2 órán át, szobahőmérsékleten. Szubsztrátként TMB-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) használtunk, és az optikai denzitást 450 nm-en határoztuk meg.

A fikolin-2 és a fikolin-3 szintek meghatározása

A fikolin-2, illetve a fikolin-3 szintek meghatározása (85, 112) érdekében mikrotitráló lemezeket (Nunc, Roskilde, Denmark) 2,5 µg/ml fikolin-2-re specifikus (FCN216), illetve fikolin-3-ra specifikus (FCN334) monoklonális ellenanyagokkal fedtünk karbonát, illetve PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM, KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) pufferben, 16 órán át, 4°C-on. Az 1:160, illetve 1:640 arányban hígított mintákat és a standardot (normál humán szérum keverék, amely ismert koncentrációban tartalmazott fikolin-2, vagy fikolin-3 fehérjéket) 3 órán át, 37 °C-on inkubáltuk. A PBS-T pufferrel (0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS puffer) történő mosási lépéseket követően a lemezeket 2,5 µg/mL biotinilált anti-humán-fikolin-2 (FCN219-Biotin), illetve anti-humán-fikolin-3 (FCN334-Biotin) ellenanyagokkal inkubáltuk 16 órán át, 4°C-on. Másodlagos ellenanyagként 1:5000 hígítású sztreptavidin-torma-peroxidáz konjugátumot (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA) alkalmaztunk 1 órán át, 37 °C-on. A mosási ciklusok után OPD szubsztrátot (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) használtunk a színreakció előidézésére, majd 10-15 perc múlva kénsav oldattal állítottuk le az enzimátikus folyamatot, és 490 nm-en határoztuk meg az optikai denzitást.

A MASP-2 szintek meghatározása

A MASP-2 koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható, ELISA módszeren alapuló kittel határoztuk meg, a gyártó útmutatása szerint (Hycult Biotech, Uden, Hollandia). Az első lépés során a standardokat, a kontrollokat, és az 1:4 arányban hígított szérum mintákat az anti-humán-MASP-2 ellenanyaggal fedett mikrotitráló lemezen inkubáltuk, 1 órán át, szobahőmérsékleten. Négy mosási lépést követően

biotinilált anti-humán-MASP-2 ellenanyagot alkalmaztunk, 1 órán át, szobahőmérsékleten, majd újabb 1 órán át tormapeoxidáz-konjugátummal inkubáltuk a lemezeket. A mosási lépéseket követően kromogénikus TMB enzim-szubsztrátot alkalmaztunk, majd a színreakciót stop pufferrel állítottuk le. Az optikai denzitást – amely arányos a mintákban lévő MASP-2 koncentrációjával - 450 nm-en határoztuk meg.

A MASP-3 szintek meghatározása

A MASP-3 koncentráció meghatározása (36) érdekében a mikrotitráló lemezeket (Nunc, Roskilde, Dánia) 4 µg/mL anti-humán-MASP-3 ellenanyaggal (7D8) fedtük fedő pufferben (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH9,5), 16 órán át, 4°C-on. A mosási lépéseket követően a hígító pufferben (2 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% BSA) hígított szérum mintákkal inkubáltuk a lemezt 2 órán át, szobahőmérsékleten. Kalibrátorként tisztított MASP-3 fehérjével kiegészített depletált szérumot használtunk, melyben a MASP-3 végső koncentrációja 10 mg/mL volt. Miután TBS/Tw/Ca pufferrel (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5) mostuk a lemezt, 2 mg/mL biotinilált anti-humán-MASP-1/3 ellenanyaggal (mAb-7B7) inkubáltuk a lemezt 16 órán át, 4°C-on. Másnap 1:5000 hígítású sztreptavidin-torma-peroxidáz konjugátumot (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA) használtunk, 2 órán át, szobahőmérsékleten, majd OPD szubsztrátot (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) alkalmaztunk, és az enzimátikus reakciót 1 M kénsav oldattal állítottuk le. Az optikai denzitást 490 és 650 nm-en határoztuk meg.

A MAP-1 szintek meghatározása

A MAP-1 szintek meghatározásához (26) a mikrotitráló lemezt (Nunc, Roskilde, Dánia) 6 µg/mL monoklonális anti-humán-MAP-1 ellenanyaggal (20C4) fedtük 16 órán át, 4°C-on. A hígító pufferben (PBS, 0,05% Tween-20, 0,5% BSA, 10 mM EDTA) hígított szérum mintákat és a kalibrátort (rekombináns MAP-1 fehérjével kiegészített MAP-1-depletált szérum) 2 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltuk a lemezen. Detektáló ellenanyagként 3 µg/mL biotinilált ellenanyagot használtunk, amely specifikusan felismeri a MASP-1, MASP-3 és MAP-1 közös láncát (mAb 8B3). Ezt követően 1:5000 hígítású sztreptavidin-torma-peroxidáz konjugátumot (Jackson ImmunoResearch Inc.,

West Grove, USA) alkalmaztunk, 2 órán át, szobahőmérsékleten, majd OPD szubsztráttal (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) idéztük elő a színreakciót, és 1 M kénsav oldattal állítottuk le. Az optikai denzitást 490 és 650 nm-en határoztuk meg.

4.2.2. Komplementaktivációs komplexek és termékek szintjének mérése

A komplementaktivációs termékek vizsgálatához EDTA-val alvadásgátolt vérmintákat gyűjtöttünk. A plazmát a vérvételtől számított 1 órán belül centrifugálással elválasztottuk, aliquotokba osztottuk, és -70°C-on tároltuk a mérésekig.

A C1rC1sC1-INH komplex szintjének meghatározása

A C1rC1sC1-INH komplex koncentrációját a *Kerényi és mtsai.* által közölt módszer alapján (191), kisebb módosításokkal végeztük el (183). Mikrotitráló lemezt (Nunc, Roskilde, Dánia) 1:500 hígítású, nyúlban termelt anti-humán C1-INH ellenanyaggal (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) fedtünk, 16 órán át, 4 °C-on. A mosási lépéseket (PBS, 0,1 % Tween 20, pH 7,4) követően a lemezt 1% BSA-t tartalmazó PBS-oldattal blokkoltuk, majd 1:200 hígítású EDTA-plazma mintákkal és standarddal (hőaggregált IgG-vel aktivált normal humán szérum, 1:500-1:32000 felező hígítási sora) inkubáltuk 1 órán át. Detektáló ellenanyagként 1:500 hígítású, kecskében termelt anti-humán C1s ellenanyagot (Atlantic Antibodies, Stillwater, USA) alkalmaztunk, majd másodlagos ellenanyagként 1:1000 hígítású, nyúlban termelt, peroxidázzal konjugált anti-kecske IgG ellenanyagot (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA). ABTS szubsztrátot (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) használtunk, és a reakciót 0,2 M oxálsavval állítottuk le. Az optikai denzitás értékeket 405 és 492 nm-en olvastuk le. A minták C1rC1sC1-INH tartalmát egység/ml-ben fejeztük ki (1000 egység felel meg 1 mL hígítatlan, hőaggregált IgG-vel aktivált normál humán szérum C1rC1sC1-INH tartalmának).

A fikolin-3/MASP-2 komplex szintjének meghatározása

A fikolin-3/MASP-2 komplex mennyiségi meghatározása céljából kifejlesztettünk egy kvantitatív ELISA módszert (113). Maxisorb ELISA lemezeket (Nunc, Roskilde, Dánia) 2 µg/mL patkányban termelt anti-humán-MASP-2 monoklonális ellenanyaggal (patkány 8B5 klón, IgG1 izotípus; Hycult Biotech, Uden, Hollandia) fedtünk PBS-

pufferben (16 órán át, 4°C-on). A szérum mintákat és a negatív kontrollokat (MASP-2- illetve fikolin-3-hiányos egyén széruma) 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS-pufferben (PBS-T) hígítottuk 1:20 arányban, majd a hígított mintákat duplikátumokban vittük fel a lemezre, és 16 órán át, 4°C-on inkubáltuk. A standard hígítási sort normál humán szérum keverék kétszeres hígítási sorozatával (1:2.5 – 1:320) készítettük el, és minden lemezen alkalmaztuk. A lemezt négyszer mostuk PBS-T pufferrel, majd 0,5 µg/ml biotinilált anti-humán-fikolin-3 ellenanyaggal (FCN334-Bio) inkubáltuk 16 órán át, 4°C-on. Másnap 1:1500 hígítású sztreptavidin-torma-peroxidáz konjugátummal (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) inkubáltuk a lemezt (2 órán át, szobahőmérsékleten), majd a mosási lépéseket követően szubsztrátként TMB Sensitive Substrate Solution-t (Kem-En-Tec Diagnostics AS, Taastrup, Dánia) alkalmaztunk. Az enzimatis reakciót 1 M kénsav oldattal állítottuk le, és az optikai denzitást 450 nm-en határoztuk meg. A vizsgált minták fikolin-3/MASP-2 tartalmát arbitrális egységben fejeztük ki (AE/ml); 100 arbitrális egység felel meg 1 mL hígítatlan normál humán szérum keverék fikolin-3/MASP-2 komplex tartalmának.

A C3bBbP aktivációs komplex szintjének meghatározása

A C3bBbP komplex szintjét a *Kerényi és mtsai.* által közölt módszer alapján (191), kisebb módosításokkal végeztük el (183). Mikrotitráló lemezt (Nunc, Roskilde, Dánia) 1:1000 hígítású, kecskében termelt anti-humán properdin-faktor B ellenanyaggal (Incstar Corporation, Stillwater, USA) fedtünk, 16 órán át, 4 °C-on. A mosási lépéseket (PBS, 0,1 % Tween 20, pH 7,4) követően a lemezt 1% BSA-t tartalmazó PBS-oldattal blokkoltuk, majd 1:10 hígítású EDTA-plazma mintákkal és standarddal (zimozánnal aktivált normal human szérum, 1:100-1:12800 hígítási sora) inkubáltuk 1 órán át. Detektáló ellenanyagként 1:2000 hígítású, biotinnal konjugált, nyúlban termelt anti-humán C3c (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) ellenanyagot alkalmaztunk, majd másodlagos ellenanyagként 1:1000 hígítású, sztreptavidin-peroxidázt (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA). OPD szubsztrátot (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) használtunk, és a reakciót 0,5 M kénsavval állítottuk le. Az optikai denzitás értékeket 492 és 620 nm-en olvastuk le. A minták C3bBbP tartalmát egység/ml-ben fejeztük ki (1000 egység felel meg 1 mL hígítatlan, zimozánnal aktivált normál humán szérum C3bBbP tartalmának).

A SC5b-9 aktivációs komplex szintjének meghatározása

Az SC5b-9 koncentrációját *Deppisch és mtsai.* leírása szerint (192), kisebb módosításokkal mértük meg EDTA plazmából (183). Mikrotitráló lemezt (Nunc, Roskilde, Dánia) 1:500 hígítású, egérben termelt anti-humán C5b-9 IgG monoklonális ellenanyaggal (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) fedtünk (16 h, 4 °C). A mosási lépések (PBS, 0,1 % Tween 20, pH 7,4), majd a blokkolás (PBS, 1% BSA) után 1:3 hígítású EDTA plazmával inkubáltuk a lemezt (1h, RT). Standardként zimozánnal aktivált normál humán szérumot használtunk, 1:25-1:3200 felező hígítási sorban alkalmazva. A lemezt háromszor mostuk, majd másodlagos ellenanyagként 1:500 hígítású, nyúlban termelt anti-humán C5 ellenanyagot (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) használtunk (1h, RT). Az SC5b-9 komplexhez kötődött ellenanyagokat 1:500 hígítású, peroxidázhoz kapcsolt, kecskében termelt anti-nyúl IgG, F(ab)₂ AffiniPure ellenanyaggal (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA) detektáltuk (30 percig, szobahőmérsékleten). A mosási lépéseket követően OPD szubsztráttal (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) idéztük elő a színreakciót, melyet 20 perc után 0,5M kénsavval állítottuk le. Az OD értékeket 492 és 620 nm-en határoztuk meg. Az SC5b-9 koncentrációkat egység/mL-ben fejeztük ki: 1000 egység felelt meg 1 mL hígítatlan, zimozánnal aktivált normál humán szérum SC5b-9- tartalmának.

A C4a, C4d és C3a komplementaktivációs termékek meghatározása

A komplementaktivációs termékek közül a C4a, a C4d és a C3a szinteket kereskedelmi forgalomban kapható, ELISA módszeren alapuló kitekkel határoztuk meg, a gyártó által mellékelt útmutatások szerint (Quidel, San Diego, USA). Mivel a három módszer hasonló elveken alapszik, ezért a meghatározások lépéseit együtt taglalom. A C3a, C4a és C4d szintek meghatározásához a MicroVue Enzyme Immunoassay kitek egérben termelt, monoklonális anti-humán-C3a, anti-humán-C4a, illetve anti-humán-C4d ellenanyagokkal fedett lemezeit használtunk, melyeken a standardokat, a kontrollokat és a hígított (1:200, 1:40, illetve 1:70 arányban, az említés sorrendjében) EDTA-plazma mintákat 60 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mosási lépéseket követően C3a-ra, C4a-ra, illetve C4d-re specifikus, tormaperoxidázzal jelölt monoklonális ellenanyagokat alkalmaztunk, 60 percig, szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően enzimatisztráttal idéztük elő a színreakciót, amit oxálsav oldattal

állítottunk le. Az optikai denzitást - amely arányos a mintákban lévő C3a, C4a, illetve C4d koncentrációval – 405, illetve 450 nm-en határoztuk meg.

4.2.3. A komplementaktivációs útvonalak rész- és összaktivitásának mérése

A komplementaktivációs útvonalak rész-, illetve összaktivitásának meghatározásához szérumot használtunk. A vérmintákat alvadás után, a vérvételtől számított 2 órán belül centrifugáltuk, a szérumot elválasztottuk, aliquotokba osztottuk, és -70°C-on tároltuk a mérésekig.

Az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóságának meghatározása

Az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóságának mértékét *Petersen és mtsai.* C4-depozíción alapuló módszere alapján határoztuk meg (116), módosításokkal (117). A módszer során alkalmazott pufferek összetételét a 3. táblázat mutatja be. Mikrotitráló ELISA lemezeket (Nunc, Roskilde, Denmark) 1 mg/mL *Saccharomyces cerevisiae* eredetű mannánnal fedtünk (Sigma–Aldrich, St.Louis, USA) fedőpufferben, 1 órán át, 37 °C-on. A lemezt háromszor mostuk blokkoló pufferrel, majd 2 órán át, 4 °C-on blokkoltuk. Háromszor mostuk a lemezt mosópufferrel, majd az MBL-MASP-2 komplexek kikötése érdekében 1 órán át, 4 °C-on inkubáltuk a hígító pufferben 1:1 arányban hígított szérum mintákkal, duplikátumokban. Standardként normál humán szérum keverék (25-50-75-100%) felező hígítási sorát alkalmaztuk. Ezt követően kétszer magas ionerejű, majd háromszor alacsony ionerejű mosópufferrel mostuk a lemezt, és C4-pufferben 0,02 mg/mL humán szérumból tisztított C4 fehérjével inkubáltuk 1 órán át, 37 °C-on. Ezt követően 1:1000 hígítású, kecskében termelt anti-humán-C4 ellenanyaggal (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) inkubáltuk a lemezt 1 órán át, szobahőn. Háromszori blokkoló pufferes mosást követően tormaperoxidázzal jelölt 1:8000 hígítású anti-kecske-IgG ellenanyagot (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) alkalmaztunk 1 órán át, szobahőn. Három mosási lépést követően OPD szubsztrátot (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) használtunk, majd 5 perc elteltével 0,5 M H₂SO₄ oldattal állítottuk le a színreakciót. Az optikai denzitás értékeket 492 és 620 nm-en olvastuk le. Az egyes mintákban a mannán hatására mért MBL–MASP-2 aktiválhatóság mértékét (melyet az elhasított exogén C4 mennyiségével jellemeztünk), a normál humán szérumra jellemző érték százalékában fejeztük ki.

3. táblázat. Az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóságának meghatározása során használt pufferek.

Puffer neve	Puffer összetevői
Fedőpuffer	0,1 M Na ₂ CO ₃ pH9,6
Blokkoló puffer	20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% Tween-20 pH7,4
Mosópuffer	20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,1% Tween-20 pH7,4
Hígító puffer	40 mM HEPES, 2 M NaCl, 10 mM CaCl ₂ pH7,4
Magas ionerejű mosópuffer	20 mM HEPES, 1 M NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,1% Tween-20 pH7,4
Alacsony ionerejű mosópuffer	20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,1% Tween-20 pH7,4
C4-puffer	20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ pH7,4

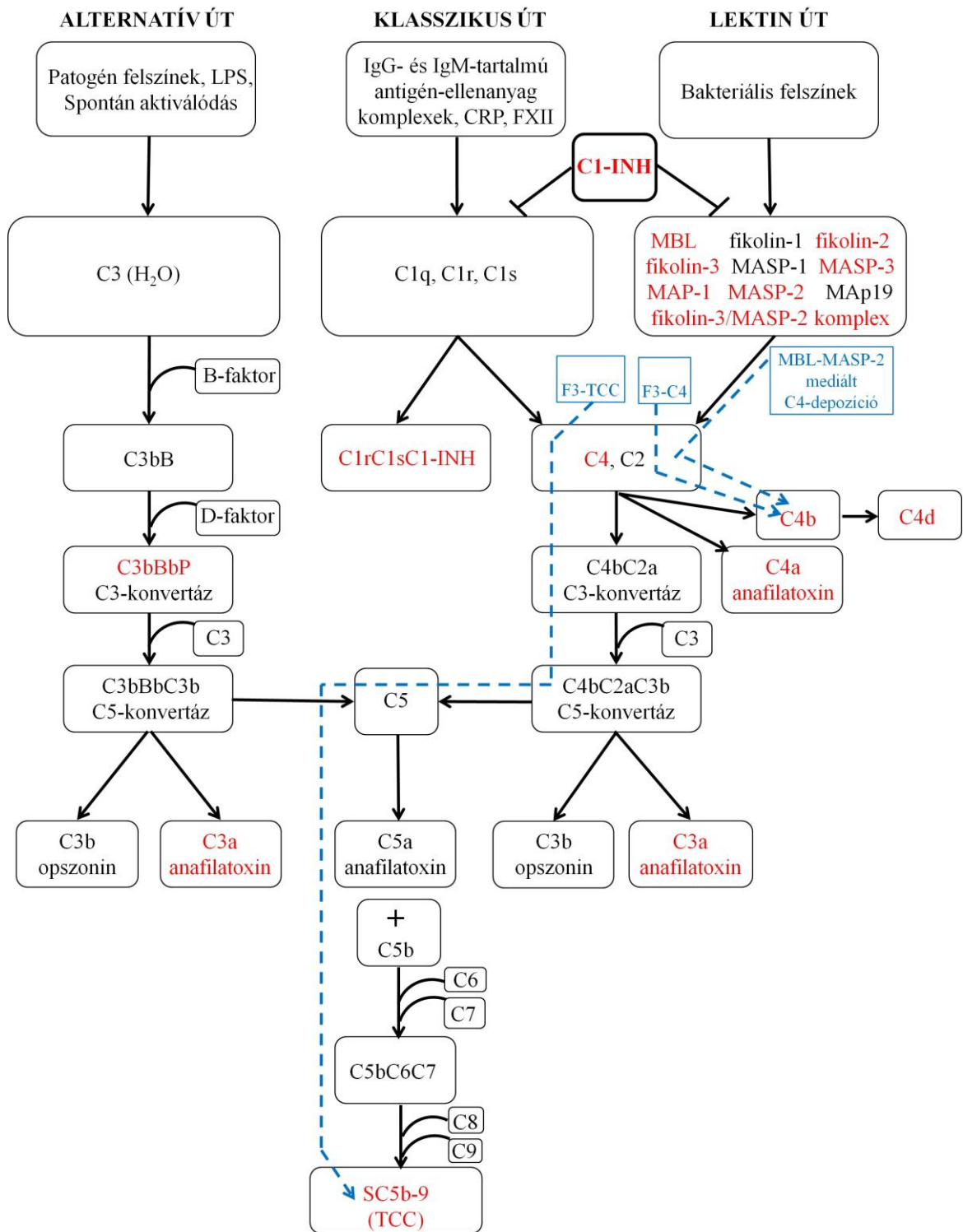
A fikolin-3 által közvetített C4-depozíció meghatározása

A *Hein és mtsai.* által leírt (89) fikolin-3 által közvetített C4-depozíció mértékének meghatározása érdekében a mikrotitráló lemezt (Nunc, Roskilde, Dánia) 5 µg/mL acetilált BSA-val (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) fedtük, PBS pufferben, 16 órán át, 4 °C-on. A fedést követően a lemezt barbitál-T pufferrel (4 mM C₈H₁₁N₂NaO₃, 145 mM NaCl, 2,6 mM CaCl₂, 2,1 mM MgCl₂, 0,05% Tween-20, pH 7,4) fedtük 1 órán át, 4 °C-on, majd háromszor mostuk barbitál-T pufferrel. A szérum mintákat 1:25 arányban hígítottuk barbitál-T pufferben, majd 30 percen át, 37 °C-on inkubáltuk a lemezen. A lemezt háromszor mostuk barbitál-T pufferrel, majd 2 µg/mL biotinilált anti-C4c ellenanyaggal (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) inkubáltuk rázva, 2 órán át, szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően a lemezt barbitál-T pufferben, 1:2000 arányban hígított sztreptavidin-torma-peroxidáz konjugátummal (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) inkubáltuk rázva, egy órán át, szobahőmérsékleten, majd szubsztrátként TMB-t (Kem-En-Tec Diagnostics AS, Taastrup, Dánia) alkalmaztunk, és a reakciót 1 M kénsav oldattal állítottuk le. Az optikai denzitást 450 nm-en határoztuk meg.

A fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció meghatározása

A *Hein és mtsai.* által leírt (89) fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértékének meghatározása érdekében a mikrotitráló lemezt (Nunc, Roskilde, Dánia) 5 µg/mL acetilált BSA-val fedtük, PBS pufferben, 16 órán át, 4 °C-on. A fedést követően a

lemezt barbitál-T pufferrel fedtük 1 órán át, 4 °C-on, majd háromszor mostuk barbitál-T pufferrel. A szérum mintákat 1:25 arányban hígítottuk barbitál-T pufferben, majd 45 percen át, 37 °C-on inkubáltuk a lemezen. A lemezt háromszor mostuk barbitál-T pufferrel, majd 1 µg/mL egérben termelt, monoklonális anti-humán-C5b-C9 (Dako Denmark AS, Glostrup, Dánia) ellenanyaggal inkubáltuk rázva, 2 órán át, szobahőmérsékleten. A mosási lépéseket követően a lemezt barbitál-T pufferben, 1:2000 arányban hígított, kecskében termelt anti-egér IgG ellenanyaggal (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, USA) inkubáltuk rázva, egy órán át, szobahőmérsékleten, majd szubsztrátként TMB-t (Kem-En-Tec Diagnostics AS, Taastrup, Dánia) alkalmaztunk. Az optikai denzitást 450 nm-en határoztuk meg.



7. ábra. A komplement klasszikus, lektin-indukált és alternatív út vizsgált komponensei.

Piros szín jelzi az egyes útvonalak azon natív fehérjéit, illetve aktivációs termékeit, melyek mennyiségét a vizsgálataink során meghatároztuk. Kék szaggatott vonalak jelzik azt, hogy az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóság, illetve a fikolin-3 által közvetített C4- depozíció (F3-C4), vagy a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció (F3-TCC) mértékének meghatározása során a lektin út mely szakaszát vizsgáltuk.

4.3. Statisztikai elemzés

A Prism for Windows 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, www.graphpad.com) elnevezésű statisztikai program felhasználásával végeztük statisztikai számításainkat. Abban az esetben, ha egy beteghez több tünetmentes időszakban, illetve több roham során gyűjtött minta is tartozott, kiszámítottuk az egyes komplement paraméterek átlagát, és az átlagértékeket használtuk a statisztikai elemzések során, tehát minden beteghez egy-egy tünetmentes, illetve rohamos érték tartozott paraméterenként. Mivel legtöbb eredményünk nem mutatott normál eloszlást, nem-parametrikus tesztek alkalmaztunk. Két független minta folytonos változói közötti összehasonlításhoz a Mann-Whitney U-tesztet, míg párosított minták folytonos változói közötti összehasonlításhoz a Wilcoxon-tesztet használtuk. A változók közötti korrelációkat Spearman-féle Rho-teszttel számítottuk ki, míg a Khí-négyzet próbával egy kategórián belüli változókat hasonlítottunk össze. Csoporton belüli variancia analízishez a Friedman-féle tesztet használtuk Dunn-féle post hoc teszttel kiegészítve. Minden statisztikai elemzés kétoldalas volt, és $p < 0,05$ jelentett szignifikáns különbséget vagy korrelációt. Az eredményeinkben feltüntetett értékek medián (interkvartilis tartomány) értékeknek felelnek meg, ettől eltérő esetben ezt a szövegben feltüntettem.

5. EREDMÉNYEK

Az eredmények a Célkitűzések pontjainak megfelelően kerülnek részletezésre.

5.1. A HANO-C1-INH-ra jellemző csökkent C1-INH aktivitás hogyan befolyásolja a klasszikus és a lektin út korai, illetve közös natív komponenseinek szintjét?

5.1.1. A klasszikus és a lektin út korai, illetve közös komponenseinek szintje

A klasszikus és a lektin út paraméterei tekintetében különbségeket találtunk a HANO-C1-INH-s betegek és az egészséges kontrollok között (4. táblázat). A HANO-C1-INH diagnosztikus kritériumainak megfelelően a betegekben csökkent volt az antigenikus és a funkcionális C1-INH szint, és a C4 koncentráció is, az egészséges egyének értékeihez képest. Míg a HANO-C1-INH-s betegekben a fikolin-2 és MASP-2 szintek csökkentek mutatkoztak a kontrollokhoz képest, az MBL és a MASP-3 szintek emelkedettnek bizonyultak a betegekben. A fikolin-3, illetve a MAP-1 koncentrációja nem különbözött a HANO-C1-INH-s betegek és a kontroll személyek között (4. táblázat).

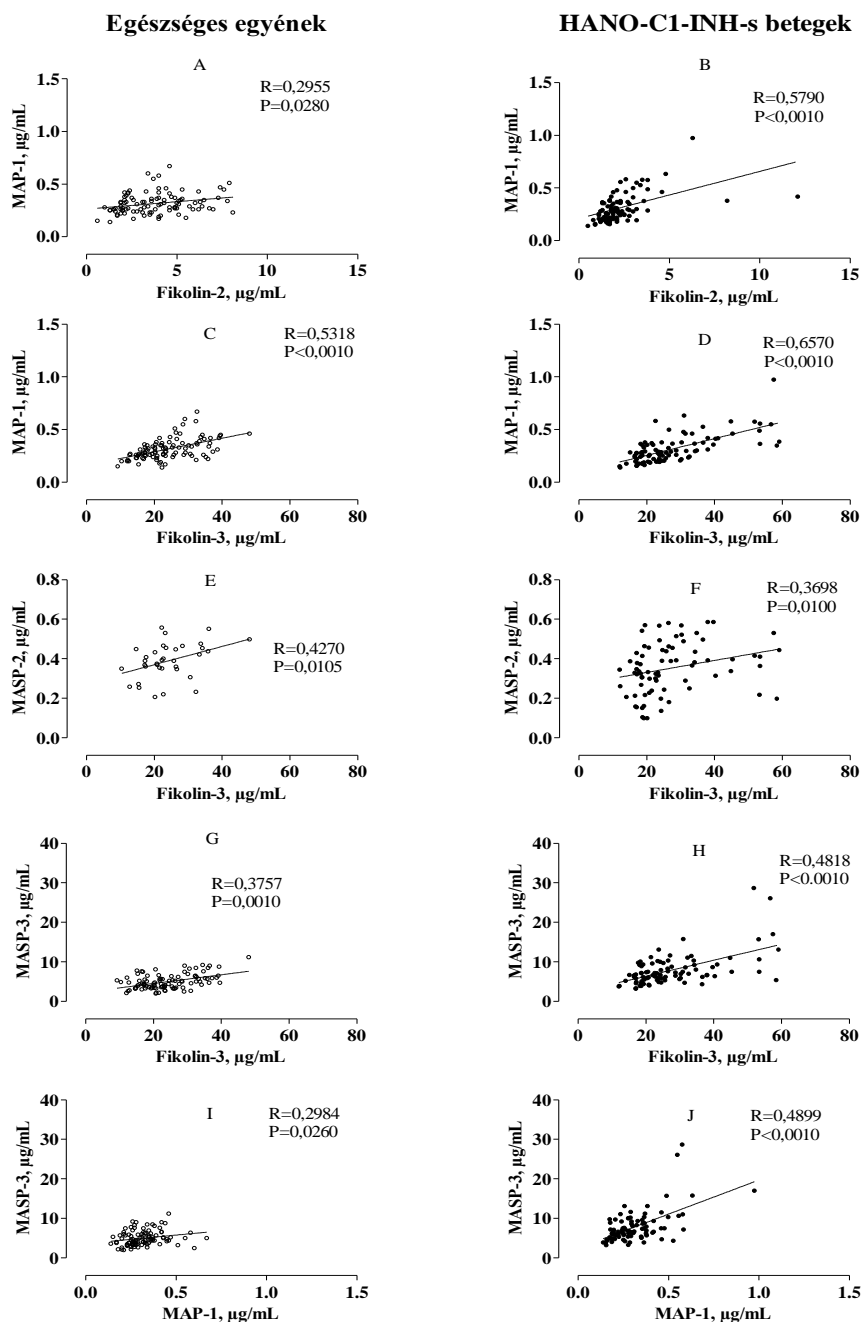
4. táblázat. A klasszikus és a lektin út korai, illetve közös komponenseinek szintje egészséges személyekben és HANO-C1-INH-s betegekben. Az egyes komplement paraméterek szintjét Mann-Whitney U-tesztel hasonlítottuk össze. A táblázatban megadott értékek medián [interkvartilis tartomány] értékeknek felelnek meg.

*Az antigenikus C1-INH szint összehasonlítása során a II-es típusú HANO-C1-INH-s betegek (N=11) értékeit nem vettük figyelembe, mert ebben a kórképben az antigenikus C1-INH szint normális (további komplement paraméterek tekintetében nem találtunk különbséget a két betegcsoport között).

	Egészséges egyének (N=104)	HANO-C1-INH-s betegek (N=138)	P-érték
Antigenikus C1-INH, g/L	0,23 [0,20 – 0,25]	0,03* [0,01 – 0,07]	<0,0001
C1-INH aktivitás, %	100,00 [95,00 – 102,00]	30,50 [1,75 – 43,00]	<0,0001
C4, g/L	0,38 [0,27 – 0,47]	0,05 [0,01 – 0,09]	<0,0001
MBL, µg/mL	0,79 [0,27 – 1,77]	1,96 [0,34 – 3,59]	0,0028
Fikolin-2, µg/mL	3,60 [2,20 – 4,97]	2,00 [1,60 – 2,70]	<0,0001
Fikolin-3, µg/mL	22,70 [17,68 – 29,88]	23,80 [18,80 – 32,30]	n.sz.
MAP-1, µg/mL	0,31 [0,26 – 0,39]	0,28 [0,24 – 0,38]	n.sz.
MASP-2, µg/mL	0,40 [0,35 – 0,47]	0,34 [0,27 – 0,44]	0,0238
MASP-3, µg/mL	4,65 [3,60 – 6,00]	6,80 [5,60 – 9,30]	<0,0001

5.1.2. A lektin út paramétereinek közötti összefüggések vizsgálata

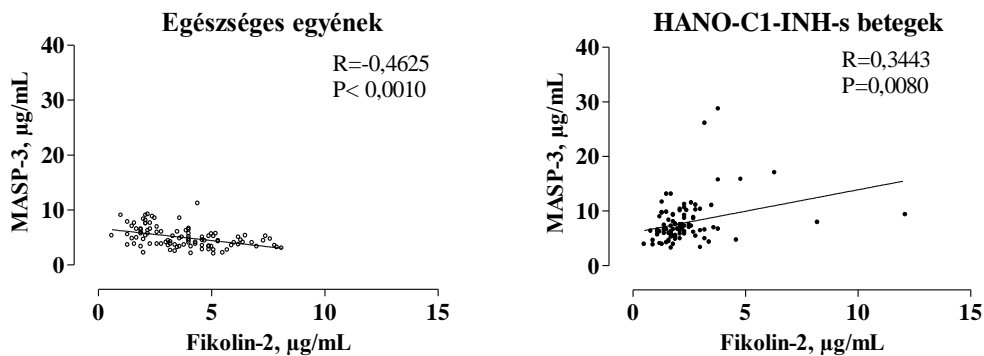
A HANO-C1-INH-s betegekben és az egészséges kontrollokban szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a fikolin-2 és a MAP-1, valamint a MASP-3 és a MAP-1 szintek között, bár ezek az összefüggések erősebbek voltak a betegekben. A fikolin-3 szintek hasonló mértékű, szignifikáns pozitív korrelációt mutattak a MAP-1, MASP-2, és MASP-3 szintekkel, mindkét vizsgálati csoportban (8. ábra).



8. ábra. A fikolin-lektin út komponensek korrelációi egészséges egyénekben és HANO-C1-INH-s betegekben. A változók közötti korrelációkat a Spearman-féle korrelációs koefficienssel határoztuk meg.

A fikolin-2 és fikolin-3 szintek erős korrelációt mutattak HANO-C1-INH-s betegekben ($r=0,5040$, $p<0,0001$), ám az egészséges személyekben nem tapasztaltunk összefüggést e két paraméter között.

Érdekes módon a fikolin-2 és a MASP-3 szintek negatív korrelációt ($R=-0,4625$, $P<0,0010$) mutattak az egészséges személyekben, ugyanakkor pozitívan korreláltak egymással a HANO-C1-INH-s betegekben ($r=0,3443$, $p=0,0008$) (9. ábra).



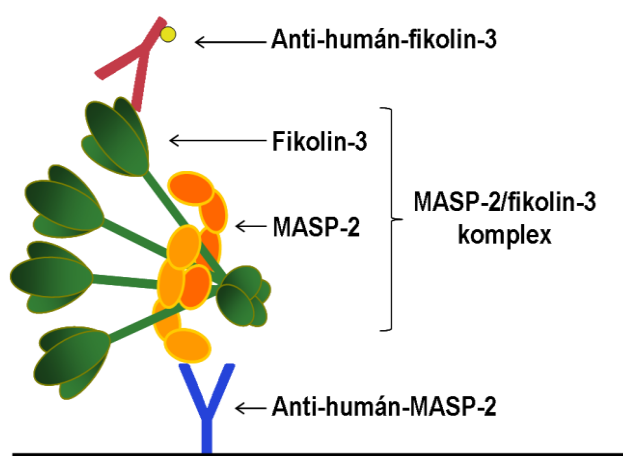
9. ábra. Eltérő irányú korrelációk egészséges kontrollokban és HANO-s betegekben. A változók közötti korrelációk vizsgálatára a Spearman-féle Rho korrelációs koefficiens értékét határoztuk meg.

5.2. A fikolin-3/MASP-2 komplex kvantitatív meghatározása

A fikolin-lektin út szerepének behatóbb tanulmányozása érdekében *Peter Garred (Rigshospitalet, University Hospital of Copenhagen, Dánia)* munkacsoportjával együttműködve kifejlesztettünk egy új, kvantitatív szendvics ELISA-alapú módszert, amely alkalmas a keringő fikolin-3/MASP-2 komplexek (a fikolin-lektin út egyik iniciátor-komplexe) mennyiségi meghatározására, és tükrözi a fikolin-3 által közvetített lektin út aktiválhatóság mértékét, függetlenül a komplement kaskádban részt vevő down-stream komponensek esetlegesen csökkent szintjétől.

5.2.1. Az új fikolin-3/MASP-2 komplex módszer kifejlesztése

A módszer alapját egy kereskedelmi forgalomban kapható monoklonális anti-humán-MASP-2 ellenanyag képezi, amely a MASP-2 fehérje CCP1/2-SP fragmentumát ismeri fel. Detektáló ellenanyagként egerben termelt biotinilált anti-humán-fikolin-3 ellenanyagot (FCN334*Bio) használtunk (10. ábra).

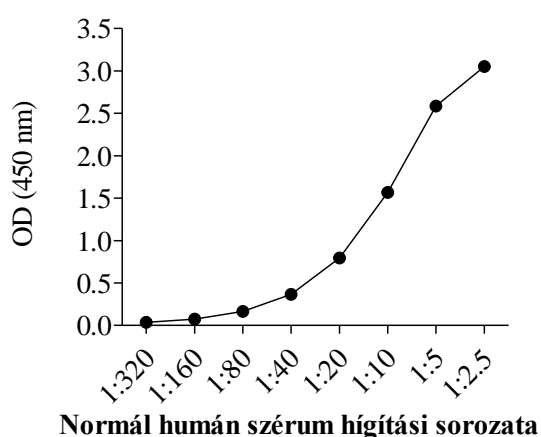


10. ábra. Sematikus ábra a kifejlesztett fikolin-3/MASP-2 komplex szendvics ELISA-alapú módszerről.

A fent bemutatott ELISA rendszer a komplement lektin utat aktiváló fikolin-3/MASP-2 komplex kvantitatív kimutatására alkalmas. A módszer alapját képező monoklonális anti-humán-MASP-2 ellenanyag a MASP-2 fehérje CCP1/2-SP fragmentumát ismeri fel. Detektáló ellenanyagként egerben termelt biotinilált anti-humán-fikolin-3 (FCN334*Bio) ellenanyagot használtunk.

Minden mérés során ugyanazon normál humán szérum keverék kétszeres hígítási sorozatát (1:2.5 – 1:320) alkalmaztuk, amely az eredmények kiértékelésekor kalibrációs görbeként szolgált (11. ábra). A normál humán szérum keveréket olyan egészséges egyének (n=20) szérumából készítettük, akiknek a mintája az előkísérletek során nagy mennyiségben tartalmazott fikolin-3/MASP-2 komplexet. A vizsgált minták fikolin-3/MASP-2 komplex tartalmát arbitrális egységben fejeztük ki (AE/ml); 100 arbitrális

egység felel meg 1 ml hígítatlan normál humán szérum keverék fikolin-3/MASP-2 komplex tartalmának. Az általunk bevezetett módszer precizitását és reprodukálhatóságát 6% intra-assay variációs koefficiens és 8% inter-assay variációs koefficiens jellemezte, melyeket ugyanazon egyedi szérum ismételt meghatározott (15 mérési napon megmérve, illetve egy lemezen 15-ször feltéve külön-külön hígítva) fikolin-3/MASP-2 komplex eredményei alapján számoltunk.

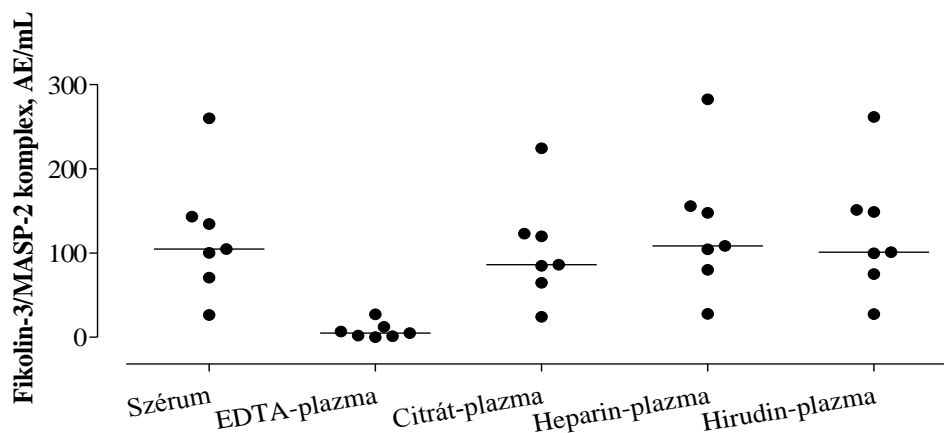


11. ábra. A fikolin-3/MASP-2 komplex meghatározás során használt kalibrációs görbe.

A kalibrációs görbét normál humán szérum keverék felező hígítási sorából készítettük, amelyet minden mérés során standardként használtunk, és ehhez viszonyítottuk a minták fikolin-3/MASP-2 komplex tartalmát.

5.2.2. A fikolin-3/MASP-2 komplex méréséhez alkalmas minták azonosítása

A keringő fikolin-3/MASP-2 komplexek szintjét 7-7 egészséges egyéntől gyűjtött szérum, valamint EDTA-, citrát-, hirudin- és heparin-plazma mintákban határoztuk meg. A fikolin-3/MASP-2 komplexek szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az EDTA-plazma mintákban (medián: 5,0 AE/mL, és 25% – 75% percentilisek [1,1 – 12,2] AE/mL), összehasonlítva ugyanazon egyének szérumban (104,7 [70,6-143,2] AE/mL; $p=0,0012$), citrát-plazmában (86,1 [64,5-122,9] AE/mL; $p=0,0012$), heparin-plazmában (108,2 [79,9-155,6] AE/mL; $p=0,0006$), illetve hirudin-plazmában (100,9 [75,0-151,1] AE/mL; $p=0,0006$, párosított t-próba) mért értékeivel. Ugyanazon egyének citrát-, hirudin- és heparin-plazmájában, valamint szérumában hasonló fikolin-3/MASP-2 szinteket tapasztaltunk (12. ábra).



12. ábra. A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje ugyanazon egyének különböző típusú vérmintáiban. Ugyanazon egyének (N=7) szérumában, valamint citrát-, hirudin- és heparin-plazmájában hasonló fikolin-3/MASP-2 szinteket tapasztaltunk, míg az EDTA-plazma szignifikánsan kevesebb komplexet tartalmazott, mint a szérum. Az egy egyénhez tartozó különböző típusú minták fikolin-3/MASP-2 komplex szintjét Wilcoxon párosított t-próbával hasonlítottuk össze.

5.2.3. A minták ismételt felolvasztásának és kezelési körülményeinek hatása

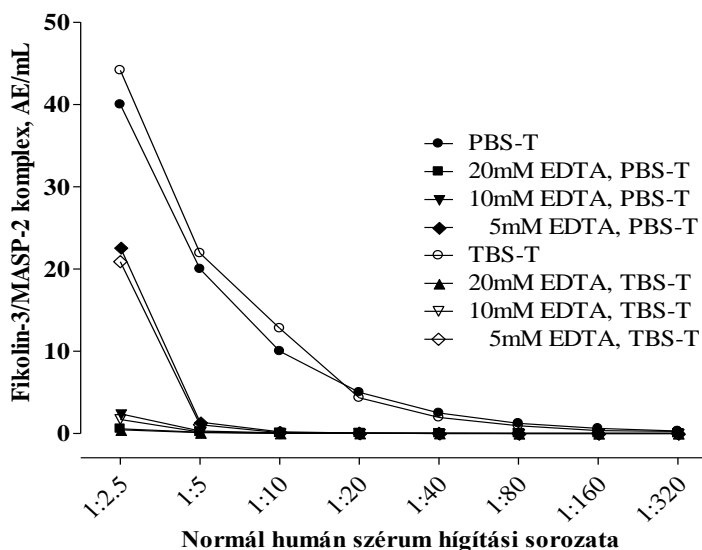
Megvizsgáltuk azt, hogy ugyanazon minta ismételt felolvasztása és lefagyasztása befolyásolja-e a módszer megbízhatóságát, és ezáltal a mérési eredményeket. Miután hét egészséges egyén szérum mintáit 1-9 alkalommal (egyszer és azt követően még 8 alkalommal) lefagyasztottuk, majd felolvasztottuk, nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ugyanazon egyén 1-9 alkalommal lefagyasztott, majd felolvasztott mintái között, a fikolin-3/MASP-2 szintek tekintetében.

Hasonló és állandó fikolin-3/MASP-2 koncentrációt tapasztaltunk akkor is, ha ugyanazon egyén szérum mintáit 4°C-on tároltuk 1 vagy 2 napig, ha szobahőmérsékleten 1 vagy 2 napig, illetve ha 37°C-on 1 vagy 2 óráig.

A fenti 7 egészséges személytől gyűjtött teljes vérminták felhasználásával megvizsgáltuk azt is, hogy az elnyúlt kezelési idő befolyásolja-e a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjét. Ennek érdekében a teljes vért a vérvételt követően 30 perccel, illetve 24, 48, 72 órával később centrifugáltuk le. Az így gyűjtött szérum mintákban ugyancsak hasonló fikolin-3/MASP-2 komplex szinteket tapasztaltunk, mint ugyanazon egyének rutin eljárás szerint eltett mintáiban.

5.2.4. A hígító pufferek összetételének vizsgálata

Az EDTA-plazmában tapasztalt alacsony fikolin-3/MASP-2 szinttel kapcsolatos eredmények arra ösztönöztek minket, hogy megvizsgáljuk a fikolin-3/MASP-2 komplex feltételezett kalcium-függését. Ennek érdekében normál humán szérum keveréket 5 mM, 10 mM vagy 20 mM EDTA-t tartalmazó PBS-T, illetve TBS-T pufferben hígítottunk. Eredményeink arra utalnak, hogy a MASP-2 és a fikolin-3 közötti komplex stabilitásához elengedhetetlen a Ca^{2+} jelenléte, hiszen 5 mM, 10 mM, illetve 20 mM EDTA jelenlétében dóziszfüggő módon csökkent a kimutatható fikolin-3/MASP-2 komplex szintje normál humán szérum keverékben, összehasonlítva az EDTA nélküli PBS-T pufferrel, illetve TBS-T pufferrel hígított normál humán szérum keverék értékeihez képest (13. ábra). A PBS-T, illetve a TBS-T pufferrel hígított normál humán szérum keverékben azonos mennyiségű fikolin-3/MASP-2 komplexet tudtunk kimutatni.



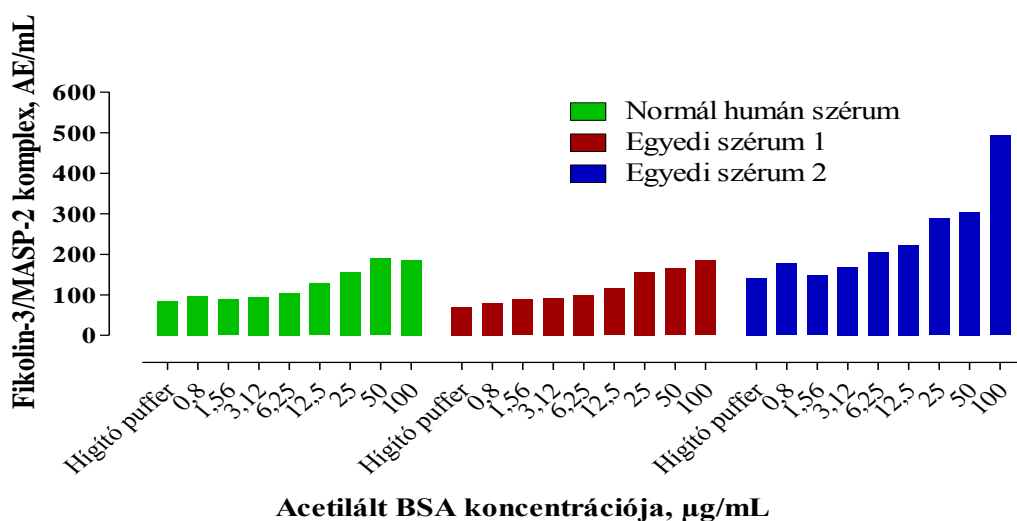
13. ábra. Pufferek összetételének hatása a fikolin-3/MASP-2 komplexek szintjére.

A PBS-T, illetve TBS-T pufferrel hígított normál humán szérum keverékben azonos mennyiségű fikolin-3/MASP-2 komplexet tudtunk kimutatni. Ha a kétféle hígító pufferhez EDTA-t adtunk, 5 mM, 10 mM, illetve 20 mM EDTA jelenlétében dóziszfüggő módon csökkent a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje.

5.2.5. Az acetilált BSA hatása a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjére

Mivel korábbi tanulmányok eredményei alapján az acetilált BSA (acBSA) aktiválja a fikolin-3 által közvetített komplementaktiválódást, megvizsgáltuk, hogy változik-e a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje, ha a szérumot acBSA-val inkubáljuk. Ennek érdekében hígítatlan szérum mintákat (normál humán szérum keverék, és két egyedi

szérum minta) acBSA, vagy BSA növekvő koncentrációival (0,78 – 1,56 – 3,12 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 µg/mL), illetve azonos mennyiségű hígító pufferrel inkubáltuk 16 órán át, 4 °C-on. Az inkubálást követően a korábban beállított ELISA módszerrel (leírása: 4.2.2. szekció) meghatároztuk a fikolin-3/MASP-2 komplexek szintjét. A 100 µg/ml acBSA-val történő kezelés hatására kb. kétszeresére nőtt a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje a normál humán szérum keverékben (185,9 AE/mL) és a két egyedi mintában (184,6 AE/mL és 492,7 AE/mL), összehasonlítva a 100 µg/mL BSA-val kezelt mintákkal (normál humán szérum keverék: 74,6 AE/mL, egyedi minták: 75,6 AE/mL és 185,5 AE/mL), illetve az azonos mennyiségű hígító pufferrel inkubált mintákkal (normál humán szérum keverék: 84,9 AE/mL, egyedi minták: 69,7 AE/mL és 140,8 AE/mL). Ha növekvő koncentrációjú acBSA-val inkubáltuk a mintákat, dóziszfüggő módon emelkedett a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje mind a normál humán szérum keverékben, mind az egyedi mintákban (14. ábra). Különböző mennyiségű BSA-val, illetve hígító pufferrel történő inkubálás hatására egyik mintában sem tapasztaltunk változást a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjében.

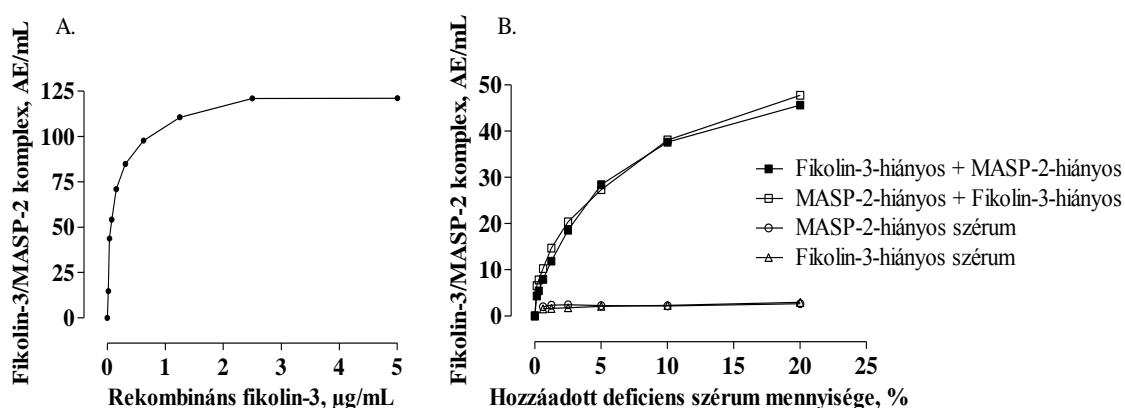


14. ábra. Az acetilált BSA hatása a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjére. Növekvő koncentrációjú acBSA hatására dóziszfüggő módon emelkedett a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje, mind a normál humán szérum keverékben, mind az egyedi mintákban.

5.2.6. Fikolin-3/MASP-2 komplex képzése fikolin-3-, illetve MASP-2-hiányos szérumban

Megvizsgáltuk, hogy fikolin-3-hiányos szérumban helyreállítható-e a fikolin-3/MASP-2 komplex képződése, ezért a fikolin-3-hiányos szérumot növekvő koncentrációjú rekombináns fikolin-3 (r-FIK-3) fehérjével inkubáltuk (végkoncentráció: 5 $\mu\text{g/ml}$). A rekombináns fikolin-3-mal kezelt deficiens szérumban dóziszfüggő módon r-FIK-3/MASP-2 komplexek keletkezését tapasztaltuk; a rekombináns fikolin-3 még kis koncentrációban is képes volt komplex képzésére a MASP-2-vel (15. A. ábra).

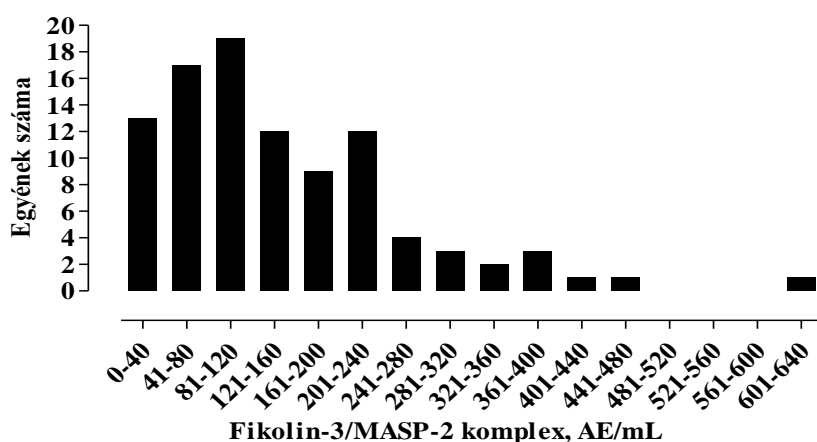
Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a fikolin-3-hiányos és a MASP-2-hiányos szérumok képesek-e egymást “kiegészíteni”, tehát a két deficiens szérum különböző arányú együttes inkubálása során keletkezik-e fikolin-3/MASP-2 komplex. Az első megközelítésben fikolin-3-hiányos szérummal növekvő arányban kezeltük a MASP-2-hiányos szérumot, míg a második megközelítésben növekvő koncentrációjú MASP-2-hiányos szérummal kezeltük a fikolin-3-hiányos szérumot. Mindkét kísérlet során hasonló mértékű, dóziszfüggő fikolin-3/MASP-2 komplex képződést tapasztaltunk a kétféle deficiens szérum együttes inkubálását követően (15. B. ábra). Ha a MASP-2-hiányos, illetve a fikolin-3-hiányos szérumot 20 mM EDTA jelenlétében inkubáltuk, nem képződött fikolin-3/MASP-2 komplex. A komplexet akkor sem tudtuk kimutatni, ha külön-külön a MASP-2-hiányos, vagy fikolin-3-hiányos szérumot, illetve a r-fikolin-3 fehérjét vizsgáltuk a beállított ELISA módszerrel.



15. ábra. A fikolin-3/MASP-2 komplex képződésének helyreállítása fikolin-3-hiányos, illetve MASP-2-hiányos szérumban. (A) Homozigóta fikolin-3-hiányos beteg szérumához rekombináns fikolin-3 fehérjét adtunk, amely a szérumban lévő MASP-2 fehérjével dóziszfüggő módon komplexet képzett. (B) Egy MASP-2-hiányos, illetve egy fikolin-3-hiányos beteg szérumát különböző arányokban együtt inkubáltuk, melynek hatására dóziszfüggő módon fikolin-3/MASP-2 komplex keletkezett, a két deficiens szérum “kiegészítette” egymást. Külön-külön a deficiens szérumokban nem tudtunk kimutatni fikolin-3/MASP-2 komplexet.

5.2.7. A fikolin-3/MASP-2 komplex és komplementfehérjék összefüggései

A beállított kvantitatív fikolin-3/MASP-2 ELISA validálásaként megvizsgáltuk, hogy a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje milyen eloszlást mutat az egészséges populációban, és mutat-e összefüggést a releváns komplementfehérjékkel. Elemzésünkhöz 97 egészséges véradó szérumból mintákat használtunk fel, melyekben a fikolin-3/MASP-2 komplex medián szintje 119,7 AE/mL volt (25% - 75% percentilisek: 57,3 – 204,6 AE/mL), míg átlagos értéke 144,8 AE/mL-nek adódott (minimum: 2,9 AE/mL, maximum: 615,5 AE/mL) (16. ábra).



16. ábra. A fikolin-3/MASP-2 komplexek szintje 97 egészséges véradó eredményei alapján. A fikolin-3/MASP-2 komplex átlagos szintje 144,8 AE/mL-nek adódott (minimum értéke: 2,9 AE/mL, maximum értéke: 615,5 AE/mL).

Ugyanazon 97 egészséges véradó szérumban meghatároztuk a MASP-2 és a fikolin-3 koncentrációkat, valamint a fikolin-3 által közvetített C4-depozíció mértékét is. Szignifikáns korrelációt találtunk a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje, valamint a fikolin-3 által közvetített C4-depozíció mértéke között (Spearman $r = 0,671$, $p < 0,0001$). A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje korrelált a komplexet alkotó komplementfehérjék, a fikolin-3 (Spearman $r = 0,2532$, $p = 0,0124$) és a MASP-2 (Spearman $r = 0,4505$, $p < 0,0001$) szintjével is.

5.3. Milyen hatással van a funkcionális C1-INH hiánya a klasszikus, a lektin, az alternatív és a terminális utakon keletkező komplexek szintjére?

Vizsgálataink során elemeztük, hogy a C1-INH hiánya befolyásolja-e az általa szabályozott komplementaktivációs útvonalakon képződő komplexek szintjét? A C1rC1sC1-INH, a C3bBbP és a SC5b-9 komplex szintek meghatározásához korábban közölt módszereket adaptáltunk, míg a fikolin-3/MASP-2 komplex kvantitatív méréséhez kifejlesztettünk egy új módszert, amely validálásának és kifejlesztésének lépéseit a fentiekben ismerttettem.

A C1rC1sC1-INH, a C3bBbP, illetve a SC5b-9 komplex szintje azt jelzi, hogy a komplementrendszer klasszikus, alternatív, illetve terminális útja milyen mértékben aktiválódott *in vivo*. A fikolin-3/MASP-2 komplex meghatározása során a fentiekhez hasonlóan az *in vivo* képződött iniciátor komplex koncentrációját határoztuk meg, amelynek mennyiségéből következtethetünk a fikolin-lektin út aktiválhatóságának mértékére. Ezen komplexek szintjét összehasonlítottuk HANO-C1-INH-s betegekben és egészséges személyekben.

5.3.1. A C1rC1sC1-INH, C3bBbP, illetve SC5b-9 komplexek szintje

A HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes időszakban gyűjtött mintáiban kb. 10-szer magasabb C1rC1sC1-INH koncentrációt tapasztaltunk, az egészséges egyének értékeihez viszonyítva (5. táblázat). A C1rC1sC1-INH szint hasonló volt az I-es és a II-es típusú HANO-C1-INH-s betegeket összehasonlítva (35,00 [20,31 –56,07] AE/mL vs. 26,63 [17,57 –33,92] AE/mL), továbbá nem találtunk különbséget a danazollal kezelt, illetve nem kezelt betegek között a C1rC1sC1-INH komplex szint tekintetében (23,81 [16,59 – 43,07] AE/ml vs. 34,13 [17,77 – 51,30] AE/ml). A C3bBbP és SC5b-9 szintek tekintetében nem találtunk különbséget a HANO-C1-INH-s betegek és az egészséges egyének között.

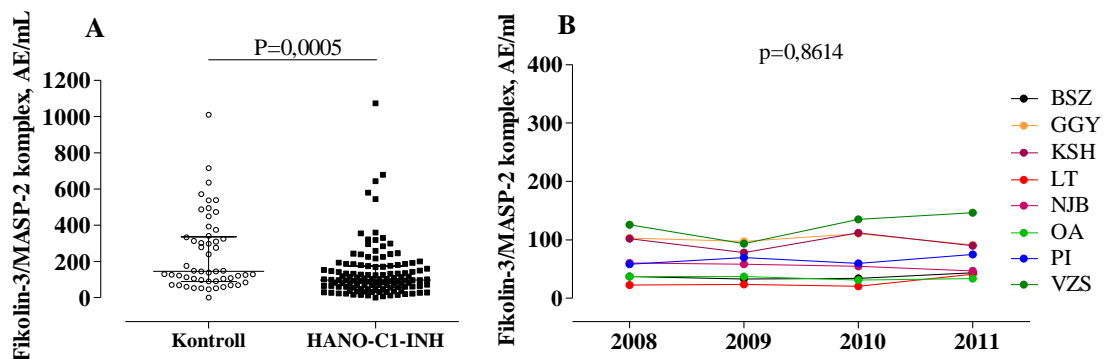
5. táblázat. A klasszikus, az alternatív és a terminális utak aktiválódása során keletkező komplexek szintje egészséges személyekben és HANO-C1-INH-s betegekben.

Az egyes komplement aktivációs komplexek szintjét Mann-Whitney U-tesztel hasonlítottuk össze. A táblázatban megadott értékek medián [interkvartilis tartomány] értékeknek felelnek meg.

	Egészséges egyének (N=104)	HANO-C1-INH-s betegek (N=138)	P-érték
C1rC1sC1-INH, AE/mL	3,37 [2,84 – 3,94]	32,84 [18,26 – 50,73]	<0,0001
C3bBbP, AE/mL	4,00 [2,87 – 5,74]	3,40 [2,80 – 4,72]	n.sz.
SC5b-9, AE/mL	1,82 [1,33 – 2,50]	1,80 [1,17 – 2,32]	n.sz.

5.3.2. A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje

Az egészséges kontroll csoport mintáiban szignifikánsan magasabb koncentrációban volt jelen a fikolin-3/MASP-2 komplex, a HANO-C1-INH-s betegekhez képest (medián és 25% - 75% percentilisek: 144,90 [89,87 – 336,20] AE/ml vs. 97,41 [58,58 – 174,30] AE/ml; $p=0,0005$) (17. A. ábra). Mivel előzetes eredményeink alapján feltételezhető, hogy a fikolin-lektin út aktiválódása részt vesz a HANO-C1-INH pathomechanizmusában, megvizsgáltuk, hogy vajon egy-egy betegre jellemző-e egy viszonylag állandó fikolin-3/MASP-2 komplex szint. Elemzésünkbe olyan HANO-C1-INH-s betegeket vontunk be, akiktől rendelkezésünkre állt legalább 4 egymást követő évből származó tünetmentes minta. A fikolin-3/MASP-2 komplex szintek tekintetében nem tapasztaltunk különbséget a betegek különböző tünetmentes időszakokban gyűjtött mintái között ($p=0,8614$, Friedman-teszt), a komplex szintje csak kis mértékben változott egy egyénen belül a tünetmentes időszakokban (17. B. ábra).



17. ábra. A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje egészséges kontrollokban és tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben. (A) Az egészséges kontrollok és a HANO-C1-INH-s betegek fikolin-3/MASP-2 szintjét a Mann-Whitney U-tesztel hasonlítottuk össze. (B) A HANO-C1-INH-s betegek 4 egymást követő évben gyűjtött mintáinak variancia analízishez a Friedman-tesztet használtuk Dunn-féle *post hoc* tesztel kiegészítve.

Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy a funkcionális C1-INH hiánya különböző módon befolyásolta a szabályozása alatt álló komplementaktivációs útvonalakon képződő komplexek koncentrációját. HANO-C1-INH-s betegekben a klasszikus út aktiválódása során keletkező C1rC1sC1-INH komplex szintje nőtt, ugyanakkor a lektin út komplexei közül a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje csökkentnek mutatkozott az egészséges egyénekhez képest. A C3bBbP és SC5b-9 komplex szintek tekintetében nem találtunk különbséget a HANO-C1-INH-s betegek és az egészséges személyek között.

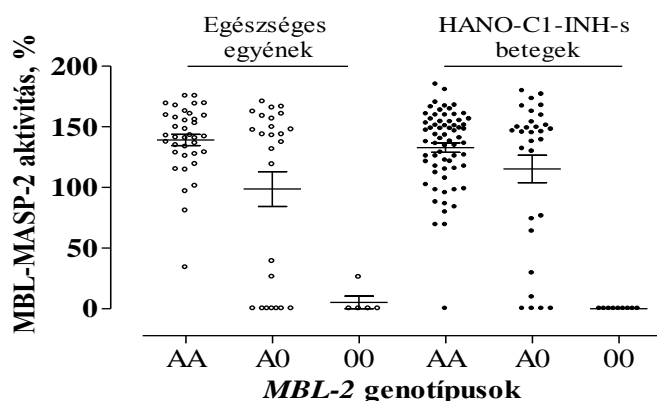
5.4. Befolyásolja-e a funkcionális C1-inhibitor hiánya a korai MBL-lektin út aktiválódását, illetve a fikolin-lektin út összaktivitását tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben?

5.4.1. Az MBL-lektin út aktiválhatósága

Először megvizsgáltuk a „lecsonkított” (C4-től független) MBL-lektin út aktiválhatóságát, vagyis az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóságát. A módszer során a szérum mintát *in vitro* mannánnal (amely az MBL-lektin út aktivátora) aktiváltuk, és a hozzáadott tisztított C4 fehérje hasításának mértéke alapján következtettünk az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóságának mértékére.

Az MBL-MASP-2 aktivitás tekintetében – amely a mannánnal aktivált MBL-MASP-2 komplex C4-hasító képességét jelenti – nem találtunk különbséget a HANO-C1-INH-s betegek és a kontrollok között ($p=0,9325$). Mivel az *MBL2* genotípusok lehetséges eltérő megoszlása a két csoporton belül befolyásolhatja az MBL szinteket, valamint az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóságának mértékét, megvizsgáltuk az *MBL2* genotípusokat, de nem találtunk eltérő megoszlást az *MBL2* AA, AO, vagy OO genotípusai tekintetében a betegek és a kontrollok között ($p=0,4551$, χ^2 -teszt).

Ezt követően 3-3 alcsoportra osztottuk a betegeket és az egészséges egyéneket az AA, AO, illetve OO genotípusok alapján. Az MBL-MASP-2 komplex C4-hasító képessége az *MBL2* genotípusok alapján képzett alcsoportokban sem különbözött az egészséges egyének és a HANO-C1-INH-s betegek között (18. ábra). Az MBL-MASP-2 komplex aktivitása szignifikánsan csökkent volt a OO genotípusú egyénekből (mind a betegekben, mind a kontrollokban). Az *MBL2* szempontjából heterozigóta AO és homozigóta AA genotípusú egyénekből (HANO-C1-INH-s betegekben és egészségesekben egyaránt) hasonló mértékű MBL-MASP-2 aktiválhatóságot találtunk.



18. ábra. A mannánnal aktivált MBL-MASP-2 komplex C4 hasító képességének vizsgálata egészséges egyénekből és HANO-C1-INH-s betegekben.

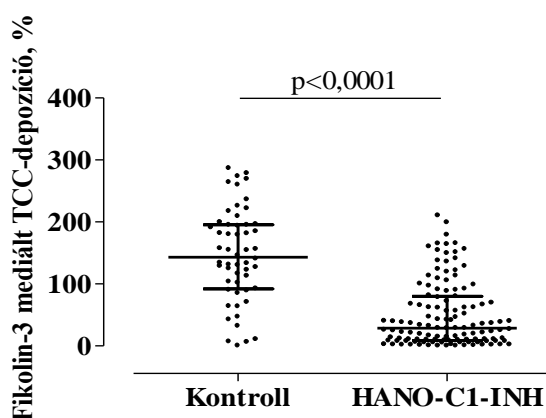
Az AA, illetve az AO *MBL2* genotípusú egészséges egyénekből, illetve HANO-C1-INH-s betegekben hasonló mértékű volt az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatósága.

Mivel az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatósága nem mutatkozott csökkenteni a HANO-C1-INH-s betegekben, az egészséges kontrollokhoz képest, továbbá a MASP-2 szintje sem az MBL koncentrációval ($R=-0,05031$, $p= 0,6930$), sem az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóságának mértékével ($R= -0,02041$, $p= 0,8370$) nem korrelált, nem valószínű, hogy a HANO-C1-INH-s betegekben tapasztalt csökkent MASP-2 szintet az MBL-lektin út aktiválódásán keresztül bekövetkező konzumpció okozza.

5.4.2. A fikolin-lektin út összaktivitása

A korábban bemutatott eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a fikolinok szerepe hangsúlyosabb a MASP-2 konzumpciójában, az MBL-hez képest, ezért megvizsgáltuk, hogy milyen mértékű a fikolin-lektin út összaktivitása. Bár a fikolin-lektin út egyes komponensei szignifikáns különbségeket mutattak az egészséges egyének értékeihez képest, a fikolinok által mediált komplementaktiváció HANO-C1-INH- ban betöltött szerepének vizsgálatához funkcionális tesztek szükségesek. E célból meghatároztuk az acBSA-val aktivált fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértékét (fikolin-3 összkomplement) egészséges kontrollokban, valamint az összes HANO-C1-INH-s beteg tünetmentes időszakban gyűjtött mintáiban.

A fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben, mint az egészséges kontrollokban (28,64 [8,72 – 80,16] % vs. 143,31 [91,92 – 195,28] %, $p<0,0001$) (19. ábra).

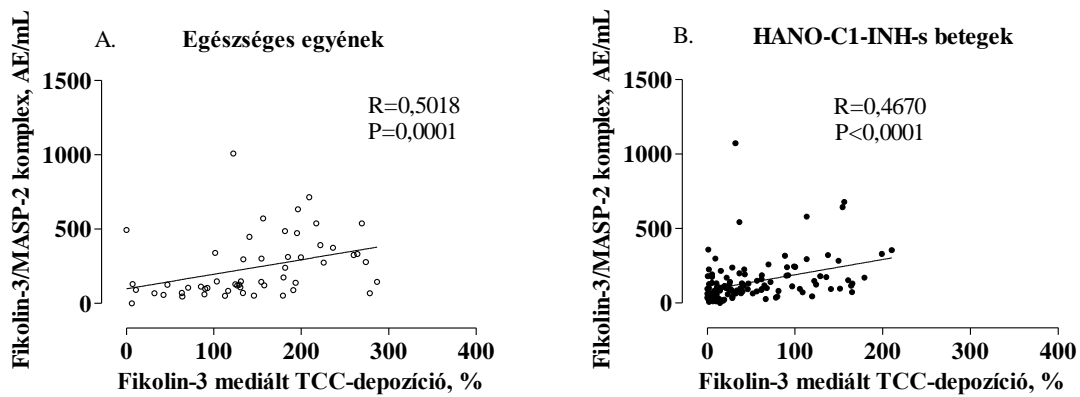


19. ábra. A fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke egészséges egyének, valamint HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes időszakban gyűjtött mintáiban.

A HANO-C1-INH-s betegekre és az egészséges egyénekre jellemző fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértékét a Mann-Whitney U-tesztel hasonlítottuk össze.

Az újonnan bevezetett kvantitatív módszer segítségével meghatároztuk a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjét egészséges egyének, valamint HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes időszakban gyűjtött mintáiban, és a kapott eredményeket csoportonként összevetettük a fikolin-3 által mediált TCC-depozíció mértékével.

Az egészséges személyek és a tünetmentes HANO-C1-INH-s betegek korrelációs mintázatát összehasonlítva hasonló összefüggéseket tapasztaltunk: a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje és a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke hasonló mértékben, szignifikánsan korrelált egymással mind az egészséges egyéneknél ($R=0,5018$, $p=0,0001$), mind a tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben ($R=0,4670$, $p<0,0001$) (20. ábra).



20. ábra. A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje és a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke közötti összefüggés.

A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje és a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke közötti korrelációk vizsgálatára a Spearman-féle Rho korrelációs koefficiens értékét határoztuk meg.

5.5. Van-e összefüggés az MBL-lektin út, illetve a fikolin-lektin út komponenseinek szintje és a HANO-C1-INH súlyossága között?

5.5.1. A HANO-C1-INH diagnosztikus paraméterei és a lektin út komponensek közötti összefüggések vizsgálata

Munkánk során elemeztük, hogy fennáll-e összefüggés a lektin út komponensei és a HANO-C1-INH diagnosztikus markerei (antigenikus C1-INH és C4 szintek, funkcionális C1-INH aktivitás) között. A MASP-3 szintek szignifikánsan, negatív irányban korreláltak a funkcionális C1-INH szintekkel ($r = -0,3626$; $p = 0,0105$), de az antigenikus C1-INH koncentrációval nem találtunk összefüggést. A C4 szint gyenge pozitív korrelációt mutatott a fikolin-3 koncentrációval ($r = 0,2135$; $p = 0,0471$), és negatív összefüggést az MBL ($r = -0,2983$; $p = 0,0059$), illetve a MASP-3 ($r = -0,2337$; $p = 0,0304$) szintekkel. A fikolin-2, MASP-2, MAP-1, illetve MBL-MASP-2 aktivitás értékek nem korreláltak a HANO-C1-INH diagnosztikus paramétereinek szintjével.

5.5.2. A lektin út paraméterek és a HANO-C1-INH-s betegek klinikai jellemzői közötti összefüggések elemzése

Megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a lektin út egyes paramétereinek szintje, valamint a HANO-C1-INH súlyosságát jellemző markerek, és a vérvételkori életkor között. A súlyossági markerek közé soroltuk a szubkután/hasi/felső légúti ödémás rohamok átlagos éves számát, az átlagos éves összrohamszámot, valamint az elfogyasztott C1-INH koncentrációt átlagos éves mennyiségét. A legerősebb összefüggéseket a klasszikus és a lektin út közös komponensei, a funkcionális C1-INH, valamint az antigenikus C1-INH és C4 szintek mutatták, melyek szignifikánsan korreláltak a szubkután/hasi/felső légúti ödémás rohamok átlagos éves számával, az átlagos éves összrohamszámmal, valamint az elfogyasztott C1-INH koncentrációt átlagos éves mennyiségével (6. táblázat). A fikolin-2 szintek szignifikáns negatív korrelációt mutattak a hasi rohamok éves számával, és az elfogyasztott C1-INH koncentrációt mennyiségével. A fikolin-3 koncentrációval kapcsolatban más jellegű összefüggéseket találtunk; a fikolin-3 szintek szignifikáns negatív korrelációt mutattak az átlagos éves összrohamszámmal, a szubkután, illetve felső légúti rohamok gyakoriságával, valamint az átlagos éves C1-INH koncentrációt fogyasztással (6.

táblázat). A felhasznált C1-INH koncentráció mennyisége további összefüggéseket mutatott a MAP-1 szintjével, illetve az MBL-MASP-2 komplex aktiválhatóságával (6. táblázat). A fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke a HANO-C1-INH minden súlyossági markerével mérsékelt, pozitív korrelációt mutatott. Az MBL, a MASP-2, a MASP-3 és a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje egyik súlyossági paraméterrel sem korrelált szignifikánsan. Bár a komplementkaskád komplexei közül a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje nem korrelált a HANO-C1-INH súlyossági paramétereivel, a klasszikus út C1rC1sC1-INH komplexe szignifikáns, pozitív korrelációt mutatott a HANO-C1-INH súlyosságát jelző markerekkel.

A vérvételkori életkor szignifikáns negatív korrelációt mutatott a fikolin-2 ($R = -0,3012$, $p = 0,0037$) és a MASP-3 ($R = -0,2933$, $p = 0,0048$) szintekkel, ugyanakkor pozitívan korrelált a fikolin-3 által mediált TCC-depozíció mértékével ($R = 0,2924$, $p = 0,0011$).

6. táblázat. Összefüggések a klasszikus és a lektin út paraméterei és a HANO-C1-INH-s betegek súlyossági indexei között. Az elemzéshez a Spearman-féle Rho korrelációs koefficiens számoltuk ki.

*Az antigenikus C1-INH szinttel kapcsolatos elemzések során a II-es típusú HANO-C1-INH-s betegek ($N = 11$) értékeit nem vettük figyelembe.

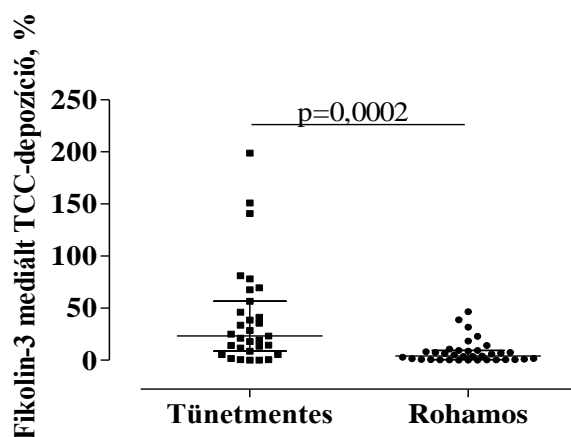
Spearman-féle Rho (p-érték)	Összes roham száma/év	Szubkután rohamok száma/év	Hasi rohamok száma/év	Felső légúti rohamok száma/év	C1-INH koncentráció fogyasztás/év
Antigenikus C1-INH*	-0,3085 (0,0008)	-0,2486 (0,0071)	-0,3104 (0,0007)	-0,2010 (0,0305)	-0,3186 (0,0005)
Funkcionális C1-INH	-0,3427 (0,0002)	-0,3017 (0,0010)	-0,2602 (0,0048)	-0,2928 (0,0014)	-0,3842 ($<0,0001$)
MBL	0,0780 (0,4700)	0,0420 (0,6976)	-0,0594 (0,5821)	0,2045 (0,0560)	0,1894 (0,0772)
Fikolin-2	-0,1425 (0,1777)	-0,0944 (0,3731)	-0,2263 (0,0310)	-0,1821 (0,0840)	-0,2863 (0,0059)
Fikolin-3	-0,2478 (0,0179)	-0,2487 (0,0174)	-0,1090 (0,3039)	-0,2295 (0,0286)	-0,2654 (0,0110)
MASP-2	-0,0271 (0,7949)	-0,0785 (0,4519)	0,1394 (0,1804)	-0,1767 (0,0885)	-0,0682 (0,5133)
MASP-3	-0,0004 (0,9969)	0,0034 (0,9745)	-0,0456 (0,6672)	-0,0470 (0,6576)	-0,0953 (0,3687)
MAP-1	-0,1913 (0,0693)	-0,1890 (0,0727)	-0,1173 (0,2682)	-0,1395 (0,1871)	-0,2501 (0,0168)
C4	-0,3335 (0,0001)	-0,2954 (0,0008)	-0,2336 (0,0085)	-0,2535 (0,0042)	-0,3871 ($<0,0001$)
C1rC1sC1-INH	0,3638 ($<0,001$)	0,3101 (0,0046)	0,2779 (0,0115)	0,2264 (0,0372)	0,4219 ($<0,001$)
MBL-MASP-2	0,1239 (0,2057)	0,0653 (0,5055)	0,0861 (0,3799)	0,1535 (0,1163)	0,1931 (0,0474)
Fikolin-3/MASP-2 komplex	0,02061 (0,8363)	0,02928 (0,7690)	0,07171 (0,4716)	-0,04348 (0,6628)	-0,1185 (0,2334)
Fikolin-3 mediált TTC-depozíció	-0,2391 (0,0150)	-0,2056 (0,0382)	-0,1989 (0,0440)	-0,2333 (0,0177)	-0,2274 (0,0209)

5.6. Megváltozik-e a fikolin-lektin út paramétereinek szintje a HANO-C1-INH-s rohamok során?

Mivel korábbi tanulmányok alapján felmerült a lektin út szerepe az ödémás rohamok kialakulásában, és mivel az egészséges egyének és a tünetmentes HANO-C1-INH-s betegek korrelációs mintázata eltérő összefüggéseket mutatott, következő elemzéseink az ödémás rohamok során a lektin utat érintő változások elemzésére fókuszáltak. Annak érdekében, hogy felmérjük a lektin út lehetséges szerepét az ödémás rohamok kialakulásában, ugyanazon HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes időszakban, illetve roham során gyűjtött mintáiban funkcionális tesztekkel vizsgáltuk a fikolin-lektin út aktiválódásának mértékét, tehát meghatároztuk a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjét és a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértékét. Ezen paramétereket összevetettük további komplement komponensek és aktivációs termékek szintjével.

5.6.1. A fikolin-3/MASP-2 komplex szintje és a fikolin-3 által mediált TCC-depozíció mértéke HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes és rohamos mintáiban

Elemzésünket leszűkítettük azon HANO-C1-INH-s betegekre (n=35 fő), akiktől rendelkezésünkre állt tünetmentes időszakban, illetve roham során gyűjtött minta is. Ugyanazon betegek mintáit összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a rohamok során mérsékelten megemelkedett a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje a tünetmentes állapothoz képest (93,8 [47,7 – 163,8] AE/mL vs. 88,3 [53,5 – 117,3] AE/mL; p=0,0224, Wilcoxon-teszt). A fikolin-3/MASP-2 komplex-szel ellentétben a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke markánsan csökkentnek mutatkozott roham során, a tünetmentes állapothoz képest (3,9 [0,5 – 9,3] AE/mL vs. 23,2 [8,8 – 56,6] AE/mL; p=0,0002, Wilcoxon-teszt) (21. ábra). A korábbi – egészséges egyénekben, illetve tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben tapasztalt - eredményekkel ellentétben (5.4.2. fejezet) nem találtunk szignifikáns összefüggést a rohamok során gyűjtött mintákban a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje és a fikolin-3 által mediált TCC-depozíció mértéke között (R=0,1781, p=0,2986).



21. ábra. A fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke ugyanazon HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes időszakban, illetve rohamok során gyűjtött mintáiban. Az ugyanazon egyénhez tartozó tünetmentes és rohamos értékeket párosított t-próbával, Wilcoxon-teszttel hasonlítottuk össze.

5.6.2. A fikolin-3/MASP-2 komplex és a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció összefüggései a komplement kaskád további komponenseivel

HANO-C1-INH-s betegek ödémás roham során gyűjtött mintáin végzett tanulmányunkban azt tapasztaltuk, hogy rohamos mintákban szignifikánsan ($p=0,0009$), kb. 50%-kal emelkedett a funkcionális C1-INH aktivitása a tünetmentes állapothoz képest, ugyanakkor az antigenikus C1-INH szintje nem változott (7. táblázat). A C4 koncentráció nem mutatott különbséget ugyanazon betegek tünetmentes, illetve rohamos mintáiban, és szintje mindkét állapotban csökkent volt az egészséges személyekhez képest. Bár a klasszikus út aktiválódását jellemző paraméterek (C1rC1sC1-INH, C4a, C4d) szintje nem változott a tünetmentes és a rohamos állapotok között, az egészséges egyének értékeihez képest szignifikáns különbségeket találtunk ezen paraméterek szintjében (7. táblázat). Ezzel párhuzamosan az ödémás rohamok során gyűjtött mintákban csökkent mértékű komplementaktiválódást figyeltünk meg a C3 hasítási lépést követően, a tünetmentes állapothoz képest csökkent C3a és C3bBbP szintek alapján. A C3 aktiválódását követő lépések komplementaktivációs markerei az egészséges egyénekhez képest is szignifikáns különbségeket mutattak: a C3bBbP és SC5b-9 szintek némileg csökkentek a roham alatti időszakban az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (7. táblázat). A fikolin-2, fikolin-3 és MAP-1 szintek nem különböztek a tünetmentes és a rohamos állapot között, ugyanakkor a rohamok során szignifikánsan csökkent a fikolin-3 szintje az egészséges egyének értékeihez képest ($p=0,0089$).

7. Táblázat. A komplementfehérjék és a komplementaktivációs termékek szintje HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes időszakban, illetve roham során gyűjtött mintáiban, valamint egészséges személyekben. Az ugyanazon egyénhez tartozó tünetmentes és rohamos értékeket párosított t-próbával, Wilcoxon-tesztel hasonlítottuk össze, míg a HANO-C1-INH-s betegek és az egészséges egyének közötti különbségek elemzésére a Mann-Whitney U-tesztet használtuk.

*Az antigenikus C1-INH szint összehasonlítása során a II-es típusú HANO-C1-INH-s betegek (N=5) értékeit nem vettük figyelembe, mert ebben a kórképben az antigenikus C1-INH szint normális, illetve esetenként emelkedett lehet.

	HANO-C1-INH-s betegek (N=35)		Egészséges egyének (N=104)	p-érték
	Tünetmentesen	Roham során		
Antigenikus C1-INH, g/L*	0,05 (0,04-0,09)	0,04 (0,04-0,07)	0,25 (0,21-0,27)	^{a,b} < 0,0001
Funkcionális C1-INH, %	16,62 (9,81-25,63)	26,48 (15,78-38,76)	99,00 (83,02-105,07)	^{a,b} < 0,0001 ^c 0,0009
C1rC1sC1-INH, AE/mL	45,00 (22,15-86,87)	50,25 (29,66-94,59)	7,64 (4,14-9,63)	^{a,b} < 0,0001
Fikolin-2, µg/mL	5,09 (3,62 – 8,00)	4,84 (3,32 – 6,71)	5,75 (4,17 – 8,02)	n.sz.
Fikolin-3, µg/mL	19,97 (13,40 – 27,40)	17,20 (13,80 – 24,72)	24,10 (18,25 – 30,10)	^b 0,0089
MAP-1, µg/mL	0,17 (0,14 – 0,25)	0,21 (0,14 – 0,25)	0,19 (0,15 – 0,28)	n.sz.
C4, g/L	0,06 (0,03-0,12)	0,05 (0,02-0,09)	0,30 (0,23-0,36)	^{a,b} < 0,0001
C4a, ng/mL	3021,53 (1567,58-3136,45)	2610,45 (1569,55-3058,40)	1911,91 (1298,90-2555,61)	^a 0,0252
C4d, ng/mL	22,90 (9,60-36,00)	15,70 (5,70-28,90)	63,45 (45,05-87,90)	^{a,b} < 0,0001
C3a, ng/mL	261,22 (109,12-419,66)	105,32 (71,63-260,92)	142,20 (102,87-220,27)	^a 0,0370 ^c 0,0048
C3bBbP, AE/mL	9,90 (6,41-18,68)	3,25 (1,86-4,89)	7,32 (5,38-15,38)	^b < 0,0001 ^c 0,0180
SC5b-9, AE/mL	0,54 (0,39-1,24)	0,51 (0,35-0,63)	1,53 (0,73-2,70)	^{a,b} < 0,0001 ^c 0,0448

A vizsgált csoportok közötti különbségeket az alábbiak szerint jelöltük:

^aTünetmentes HANO-C1-INH-s beteg vs. Egészséges egyén (Mann-Whitney teszt)

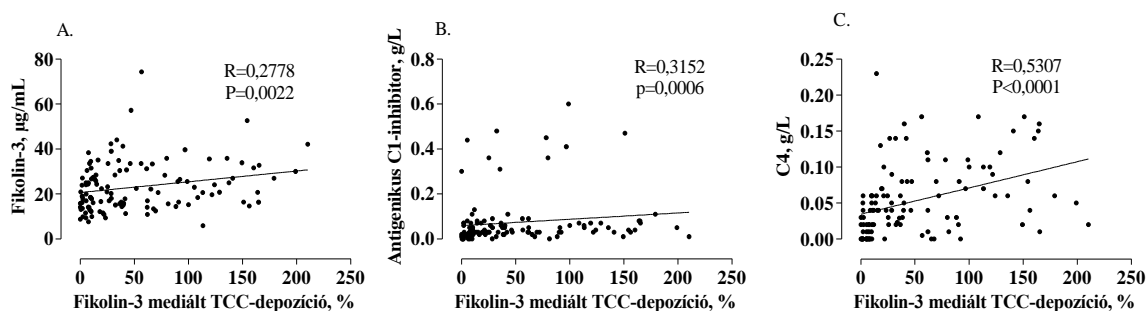
^bRohamos HANO- C1-INH-s beteg vs. Egészséges egyén (Mann-Whitney teszt)

^cTünetmentes HANO- C1-INH-s beteg vs. Rohamos HANO- C1-INH-s beteg (Wilcoxon-teszt)

Fenti eredményeinkből kiindulva elemeztük, hogy a fikolin-lektin út aktivációs komponense (fikolin-3/MASP-2 komplex) és aktivációs markere (fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció) mutat-e összefüggést a komplementaktiválódás további paramétereivel.

HANO-C1-INH-s betegekben, tünetmentes időszakban a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke szignifikánsan korrelált a fikolin-3 ($R=0,2778$, $p=0,0022$), az antigenikus C1-INH ($R=0,3152$, $p=0,0006$), valamint a C4 ($R=0,5307$, $p<0,0001$) koncentrációval (23. ábra), továbbá mérsékelten a funkcionális C1-INH ($R=0,2011$, $p=0,0397$), a C4d ($R=0,8333$, $p=0,0154$) és a MAP-1 ($R=0,1948$, $p=0,0330$) szintjével.

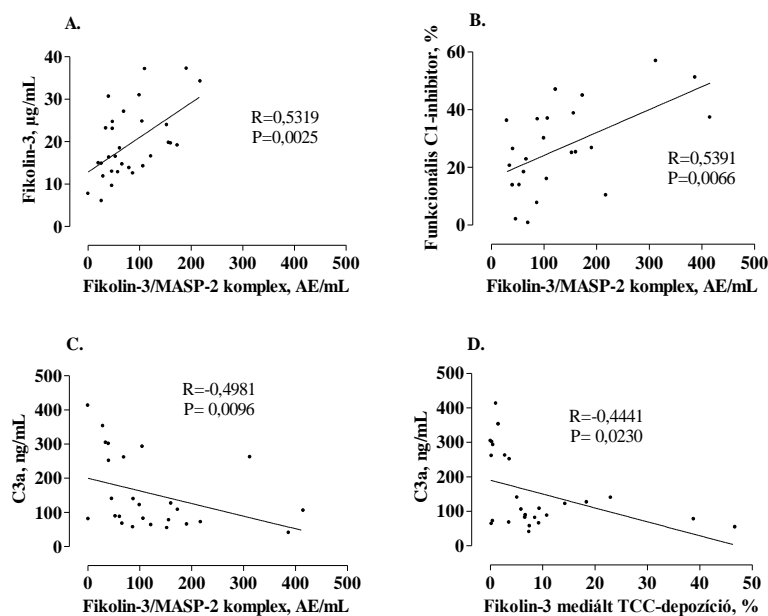
Tünetmentes időszakban a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje mérsékelt összefüggést mutatott a C4a ($R=0,7306$, $p=0,0458$) és a C4d ($R=0,8571$, $p=0,0107$) koncentrációkkal.



22. ábra. A klasszikus és a fikolin-lektin út paramétereinek közötti összefüggések tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben. Az elemzésekhez a Spearman-féle Rho korrelációs koefficienszt számoltuk ki.

*Az antigenikus C1-INH szinttel kapcsolatos elemzés során a II-es típusú HANO-C1-INH-s betegek ($N=11$) értékeit nem vettük figyelembe, mert ebben a kórképben az antigenikus C1-INH szint normális, illetve esetenként emelkedett lehet az albuminhoz való kóros kötődése miatt.

A HANO-C1-INH-s rohamok során gyűjtött mintákban más jellegű összefüggéseket tapasztaltunk: a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje szorosan, szignifikánsan korrelált a fikolin-3 ($R=0,5319$, $p=0,0025$) és a funkcionális C1-INH szintjével ($R=0,5391$, $p=0,0066$), valamint a C3a komplementaktivációs termék koncentrációjával ($R=-0,4981$, $p=0,0096$). A MAP-1 és a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje között mérsékelt korrelációt találtunk ($R=0,3675$, $p=0,0325$). További összefüggést találtunk a C3a szintek és a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke között ($R=-0,4441$, $p=0,0230$) (24. ábra).



23. ábra. A komplement klasszikus és a fikolin-lektin út egyes közös paramétereinek közötti összefüggések a HANO-C1-INH-s betegekben, ödémás rohamok során. Rohamok során a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje szignifikánsan korrelált a fikolin-3, a funkcionális C1-INH és a C3a szintekkel, míg a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke szignifikánsan korrelációt mutatott a C3a koncentrációval. Az elemzésekhez a Spearman-féle Rho korrelációs koefficienszt számoltuk ki.

6. MEGBESZÉLÉS

Az eredmények tárgyalása a célkitűzésekben megfogalmazott pontoknak megfelelően kerül részletezésre.

6.1. A C1-INH szabályozó funkciójának sérülése a fikolin-lektin út egyes komponenseinek konzumpcióját okozhatja

Vizsgálatunk megerősítette azt a korábbi feltételezést, miszerint a C1-INH hiányában kialakuló hereditár angioödémában a lektin út kontrollálatlanul aktiválódik, még a tünetmentes időszakokban is (185). Bár az MBL-lektin út HANO-C1-INH-ban betöltött szerepét *Cedzynski és mtsai.*, valamint *Varga és mtsai.* is vizsgálták (168, 185), Peter Garred munkacsoportjával együttműködve először vizsgáltuk a fikolin-lektin út szerepét ebben a kórképben.

A lektin út aktiválódását jelezheti az egyedi komplement komponensek csökkent szintje, a komplementaktivációs termékek koncentrációjának emelkedése, továbbá a funkcionális teszttel mért összkomplement aktivitás csökkent mértéke (196). A HANO-C1-INH tünetmentes időszakában végbemenő fikolin-lektin út aktiválódására utalhatnak azon megfigyeléseink, melyek szerint a HANO-C1-INH-s betegekben csökkent a fikolin-2, a MASP-2 és a C4 szint, az egészséges egyénekhez képest (4. táblázat) (186). Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a fikolin-lektin út komponensek termelésének szabályozásáról, intenzitásáról és eliminációjukról még hiányosak az ismereteink, nemcsak a különböző kórképekben, de még egészséges egyénekben is. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a fikolin-2, a fikolin-3, a MASP-1, a MASP-2 és az sMAP mRNS-e jellemzően a májban expresszálódik (59, 83, 96, 103), ugyanakkor számtalan szervben, szövetben, illetve sejttípusban detektálható volt a fikolin-1 (monocita, tüdő, lép) (67), a MASP-3 (máj, lép, tüdő, vékonybél, hasnyálmirigy, vázizom, tímusz, prosztata, petefészek, agy) (107), valamint a MAP-1 (szívizom, vázizom) mRNS expressziója (35).

Csupán a MASP-1 szerin proteázzal kapcsolatban jelent meg egy közlemény, melyben *Thiel és mtsai.* leírták, hogy koncentrációja 2 hónapon át stabilnak bizonyult egészséges egyénekben (97), ám a fikolin-lektin út komponenseinek katabolizmusával kapcsolatban nem rendelkezünk részletes adatokkal.

A fikolin-lektin út aktiválódására utalhat az a jelenség is, hogy a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció szintje szignifikánsan csökkent volt a HANO-C1-INH-s betegekben, a kontrollokhoz képest (19. ábra). Ez a megfigyelésünk alátámasztja, és összefügg munkacsoportunk korábbi eredményeivel, ahol *Varga és mtsai.* kimutatták, hogy az MBL-lektin út összaktivitása csökkent HANO-C1-INH-s betegekben (185). Mivel az alacsony MASP-2 szinten kívül a HANO-C1-INH-s betegekre jellemző csökkent C4 csökkent szint is markánsan hozzájárulhat az alacsony mértékű fikolin-3 által közvetített TCC-depozícióhoz, bevezettünk egy olyan kvantitatív módszert, amely a fikolin-3/MASP-2 komplex mennyiségi meghatározására alkalmas, tehát úgy teremt lehetőséget a fikolin-lektin út aktivációs potenciáljának megbecsülésére, hogy a kaszkád soron következő komponenseinek csökkent szintje nem befolyásolja (5.2. fejezet) (113). Az újonnan bevezetett módszer jól kiegészíti a *Hein és mtsai.* által korábban kifejlesztett funkcionális tesztet, amely a fikolin-3 által közvetített komplementaktiválódás meghatározására alkalmas (89), továbbá a fikolin-3 által közvetített C4-depozíció mértéke és a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje szignifikáns összefüggést mutatott vizsgálatunkban (5.2.7. fejezet). Érdekes megfigyelés, hogy HANO-C1-INH-s betegekben tünetmentes időszakban a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje állandó, az adott egyénre jellemző szintet mutatott, a 4 egymást követő évben gyűjtött mintákban (17. ábra).

A fikolin-lektin út aktiválhatóságának további markere a fikolin-3/MASP-2 komplex emelkedett szintje lehetne, ám tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben ezen komplex szintje meglepő módon csökkentnek mutatkozott az egészséges személyekhez képest (17. ábra). A látszólagos ellentmondás lehetséges magyarázatául szolgálhatnak az alábbi tények és megfigyelések:

1. Jelen vizsgálatunkban nagyobb számú HANO-C1-INH-s beteg bevonásával megerősítettük azt a korábbi eredményünket, hogy HANO-C1-INH-s betegekben szignifikánsan csökkent a MASP-2 szintje (4. táblázat) (185). Mivel a MASP-2 hiány meglehetősen ritka (csupán egy eset kapcsán írták le) (154), a MASP-2 alacsony szintje valószínűleg a kontrollálatlan, fokozott komplement konzumpció következménye. Az alacsony MASP-2 szint miatt – mint limitáló tényező - a fikolin-3 (melynek szintje hasonló volt betegekben és egészséges egyéneknél) feltehetően kevesebb fikolin-3/MASP-2 komplexet tud alkotni.

2. A fikolin-3/MASP-2 komplex meghatározására alkalmas módszer kifejlesztése során kimutattuk, hogy acBSA jelenlétében – amely a fikolin-3 specifikus liganduma – dóziszfüggő módon emelkedik a komplex szintje, holott azt feltételeztük, hogy a fikolin-3/MASP-2 komplex preformáltan van jelen a keringésben (14. ábra) (113). A jelenség magyarázata még további vizsgálatokat igényel, a szakirodalomban sem találtunk arra vonatkozó megfigyeléseket, hogy egy ligandum befolyásolná a lektin/szerin proteáz komplexek létrejöttét. A tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben viszont nem emelkedett a komplex szintje (17. ábra), ami arra utalhat, hogy nincs jelen egy speciális aktiváló ágens, hanem a C1-INH szabályozás hiányában, spontán aktiválódik a fikolin-lektin út, ezáltal konzumpciós mechanizmussal alacsony fikolin-2, MASP-2 és C4 szinteket, valamint alacsony összkomplement aktivitást okozva.

3. Fontos figyelembe venni azt a megfigyelésünket, hogy HANO-C1-INH-s betegekben emelkedett MASP-3 szintet tapasztaltunk, a kontrollokhöz képest (4. táblázat). Ha figyelembe vesszük *Skjoedt és mtsai.* eredményeit, miszerint a fikolin-3 a MASP-3 fő akceptor molekulája (36), feltételezhető, hogy a HANO-C1-INH-s betegekben nagy mennyiségben jelen lévő, szabályozó funkciójú MASP-3 kompetitíven jelentősen gátolja a MASP-1, illetve a MASP-2 kötődését a fikolin-3-hoz, ahogy azt az MBL-komplexekkel kapcsolatban korábban leírták (bár a hipotézisünk igazolásához nagy szükség lenne a MASP-1 szintek meghatározására, mely jelenleg még nem elérhető) (197).

Eredményeink alapján – melyeket az MBL-lektin út és a fikolin-lektin út párhuzamos vizsgálata kapcsán kaptunk – feltételezhető, hogy HANO-C1-INH-s betegekben a fikolinokon keresztül bekövetkező lektin út aktiválódás szerepet játszhat a betegség pathomechanizmusában. Az MBL-lektin út funkcionális vizsgálatára adaptáltunk egy olyan módszert, amely az MBL által közvetített C4-depozíció meghatározására alkalmas, és a hozzáadott exogén C4 segítségével küszöböli ki a minták eltérő C4-tartalmából fakadó különbségeket (4.2.3. fejezet) (117). Nagyobb számú beteg bevonásával megerősítettük *Cedzynski és mtsai.* eredményeit (168), ugyanis az MBL koncentráció, illetve az MBL-MASP-2 komplex által közvetített C4-depozíció mértéke a mi vizsgálatunkban sem különbözött a HANO-C1-INH-s betegek és a kontrollok között (4. táblázat és 18. ábra). Mivel az MBL szint nem korrelált a MASP-2

koncentrációjával, ugyanakkor összefüggést találtunk a fikolin-3 és a MASP-2, valamint a fikolin-2 szintek között (8. ábra), feltehetőleg a fikolin-2 és a fikolin-3 járul hozzá döntő mértékben a MASP-2 csökkent szintjéhez, konzumpciós mechanizmussal (186). Ezzel kapcsolatban fontos megemlíteni *Thiel és mtsai.* vizsgálatát, amely szerint a MASP-2 kevesebb, mint csupán 10%-a alkot komplexet az MBL-lel (198).

Érdekes megfigyelés, hogy fikolin-2 és a MASP-3 szintek negatív korrelációt mutattak az egészséges személyekben, ugyanakkor pozitívan korreláltak egymással a HANO-C1-INH-s betegekben (9. ábra). A különböző irányú korrelációk magyarázata további vizsgálatokat igényel, de feltehetőleg a C1-INH hiányában bekövetkező, sérült szabályozású lektin út aktiválódás állhat a jelenség hátterében.

Összegezve tehát elmondhatjuk, hogy a tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben tapasztalt alacsony fikolin-2, MASP-2 és C4 szint feltételezhetően a fikolin-lektin út (és a klasszikus út) folyamatos, aktiválódásának a következménye, amely vagy spontán módon, vagy egy eddig nem definiált specifikus aktiváló ágens hatására, a sérült C1-INH általi szabályozás miatt indul el (186). Eredményeink pontosabb és átfogóbb értelmezéséhez szükséges lenne a MASP-1 szintek meghatározása is, ám sajnos még nem elérhető a megfelelő monoklonális anti-humán-MASP-1 ellenanyag. Eredményeink alapján – ahogy azt a betegekben emelkedett C1rC1sC1-INH komplex jelzi (5. táblázat) (183) - tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben a klasszikus út spontán, kontrollálatlan aktiválódása is bekövetkezik, amely szintén hozzájárul a C4 szint csökkenéséhez, konzumpciós mechanizmus révén, és ezáltal a klasszikus és a lektin út csökkent összkomplement aktivitáshoz (183). Az a jelenség, hogy a C1rC1sC1-INH komplex szintje szignifikánsan magasabb HANO-C1-INH-s betegekben az egészséges egyénekhez képest, ellentmondásos eredménynek tűnhet egy olyan kórképben, amelyet a funkcionális C1-INH hiánya jellemez, bár hasonló megfigyelést tettek *Ziccardi és mtsai.*, illetve *Nielsen és mtsai.* is (12, 13). A látszólagos ellentmondás feloldása abban rejlik, hogy HANO-C1-INH-ban a C1-INH hiánya heterozigóta állapot, így csekély, 10 – 30%-os C1-INH aktivitás még kimutatható, míg a C1 fehérjekomplex szintje normális (199). A „sérült”, csökkent C1-INH aktivitás miatt kialakuló helyzet kedvez a jelen lévő, normál mennyiségű C1 komplex autoaktiválódásának (12), és a C1rC1sC1-INH komplex létrejötte során konzumpciós

mechanizmussal elfogyasztja a kis mennyiségű, rendelkezésre álló C1-INH fehérjét (13).

Annak érdekében, hogy részletesebb képet kaphassunk a klasszikus és a lektin út komplement komplexeinek sztöchiometriájáról és arányairól egészséges egyénekből, illetve a funkcionális C1-INH hiányában, dolgozunk olyan metodikák kifejlesztésén, melyek alkalmasak lehetnek a klasszikus és a lektin út „analóg”, egymásnak megfeleltethető komplexeinek meghatározására. Jövőbeli terveink között szerepel a MASP-1/C1-INH, illetve a MASP-2/C1-INH komplexek meghatározása (amelyek a klasszikus út C1rC1sC1-INH komplexével lehetnek analógok), valamint a C1qC1rC1s komplex mérése, amely funkcionális szempontból feltételezhetően a fikolin-lektin út MBL-MASP, illetve fikolin-MASP komplexeinek feleltethető meg.

6.2. A lektin út paraméterek és a HANO-C1-INH súlyossága közötti összefüggések

Vizsgálatunkban először igazoltuk, hogy a fikolin-lektin út paramétereinek szintje összefüggést mutat a HANO-C1-INH súlyosságával (186). A HANO-C1-INH tüneteinek súlyossága (melyet az ödémás rohamok számával, továbbá a rohamok kezelésére alkalmazott C1-INH koncentrációjával jellemeztünk) fordított összefüggést mutatott a fikolin-2 és a fikolin-3 szintekkel, ugyanakkor az MBL szint nem mutatott összefüggést a betegség súlyossági paramétereivel (6. táblázat), ahogy azt *Cedzynski és mtsai.* is leírták (168). Eredményeink alapján a gyakoribb és súlyosabb ödémás rohamok alacsony fikolin-2 és fikolin-3 szintekkel járnak együtt (186), ám az a kérdés még nem tisztázott, hogy a fikolin-2 és a fikolin-3 csökkent szintje ok, vagy következmény-e a kórkép pathomechanizmusában?

Érdekes megfigyelés, hogy a fikolin-2 és a MASP-3 szintek szignifikáns negatív összefüggést mutattak a vérvételkori életkorral (5.5.2. fejezet). Mivel a szakirodalomban nem találtunk arra vonatkozóan adatokat, hogy a lektin út paraméterei eltérő szintet mutatnak különböző felnőtt korosztályokban, a jelenséget érdemes lenne tovább vizsgálni. Az életkor és a komplementfehérjék szintje közötti összefüggéseket csupán néhány tanulmány elemezte: *Hecker és mtsai.* közleménye szerint a B-faktor és a D-faktor koncentrációja pozitívan korrelál az életkorral (200), míg *Esparza-Gordillo és mtsai.* eredményei szerint a C4bp és a H-faktor szintje magasabb idősebb életkorban (201, 202).

Munkacsoportunk kimutatta, hogy a klasszikus út aktiválódását jellemző C1rC1sC1-INH komplex szintje és a funkcionális C1-INH, valamint C4 koncentráció szignifikáns összefüggést mutat a HANO-C1-INH rohamok gyakoriságával, valamint a rohamok kezelésére felhasznált C1-INH ampullák számával (6. táblázat), továbbá a C1rC1sC1-INH komplex emelkedett szintje súlyosabb és gyakoribb tünetekre predisponál HANO-C1-INH-ban (183). Mivel a lektin út több ponton szerkezeti és működésbeli hasonlóságokat mutat a komplement klasszikus úttal, továbbá kezdeti lépéseit a C1-INH szabályozza, feltételeztük, hogy a lektin út bizonyos komponensei és a HANO-C1-INH súlyossága között összefüggés áll fenn. A klasszikus út korábban prediktív értékűnek talált C1rC1sC1-INH komplexe (183) hasonló funkciója és felépítése alapján megfeleltethető a lektin út MASP-1/C1-INH és MASP-2/C1-INH komplexeinek, amelyek meghatározására új módszereket szeretnénk bevezetni a jövőben (specifikus

monoklonális anti-humán-MASP-1 ellenanyag sajnos még nem elérhető). A komplex C1r és C1s alegységei a MASP-1-nek és a MASP-2-nek feleltethetők meg (a MASP-1 szintekről nincs információnk, míg a MASP-2 szintje csökkent HANO-C1-INH-s betegekben, de a C1r és a C1s nem) (185, 199), továbbá a C1q a fikolin-3-mal homológ (ezen két felismerő funkciójú fehérje szintje nem csökkent HANO-C1-INH-ban) (170). Mindkét komplexnek fontos regulátora a C1-INH, bár *in vitro* tanulmányok alapján a MASP-2-t hatékonyabban gátolja, mint a C1r és C1s szerin proteázokat (40, 157, 177). Fontos azonban figyelembe venni, hogy *in vivo* eltérő koncentrációkban van jelen a C1r (átlagosan 31 µg/mL), a C1s (átlagosan 34 µg/mL) és a MASP-2 (átlagosan 534 ng/mL), továbbá ez utóbbit nem csak a C1-INH tudja gátolni.

Bár a fikolin-2 és a fikolin-3 szintek, valamint a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke szignifikáns összefüggést mutattak a HANO-C1-INH súlyossági markereivel, a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje nem korrelált a HANO-C1-INH súlyosságát jelző paraméterekkel (6. táblázat). A jelenség magyarázata az lehet, hogy a lektin út aktiválódásában számtalan iniciátor komplex vesz részt (amelyek pontosan körülhatárolt funkciója még nem ismert), így a fikolin-2 és a fikolin-3 (valamint az MBL és a kollektin-11) eltérő összetételű és arányú komplexeket képeznek a MASP-1, a MASP-2, a MASP-3, a MAP-1 és az sMAP fehérjékkel (14-20). Ezen változatos – és még csak részleteiben ismert – kölcsönhatások eredményeként a lektin utat nagyságrendekkel nagyobb komplexitás jellemzi, mint a klasszikus utat, amely jellemzően a C1 fehérjekomplex által aktiválódik. Bár a C1 komplex sztöchiometriája és funkcionális szerepe jól ismert, az MBL-MASP, illetve fikolin-MASP komplexekről még hiányosak ismereteink. Érdekes eredmény, hogy a funkcionális C1-INH szintje szignifikáns, negatív összefüggést mutatott a MASP-3 koncentrációval (5.5.1. fejezet). Bár a C1-INH ekvimoláris komplexeket képez az aktivált MASP-1 és MASP-2 fehérjékkel, és gátolja őket *Matsushita és mtsai.* eredményei alapján (29), a MASP-3 fehérjével nem lép kölcsönhatásba (42). A lektin út aktivátor komplexeinek sokfélesége alapján feltételezhető, hogy a lektin út aktiválódása (különös tekintettel a MASP-1 és a MASP-2 autoaktiválódására) – és ezáltal komponenseinek fokozott konzumpciója – nagy mértékben hozzájárul a C1-INH elhasználásához a MASP-1 és MASP-2 által, így a lektin út fokozott C1-INH konzumpciója elvezethet az érzékeny „C1-INH-egyensúly” sérüléséhez, és a HANO-C1-INH tüneteinek kialakulásához.

6.3. A fikolin-lektin út paraméterek és aktivációs termékek szintjének változása a HANO-C1-INH-s rohamok során

Tanulmányunk alapján – amelyben elsőként, nagy számú HANO-C1-INH-s beteg párosított tünetmentes és rohamos mintái – alapján kimutattuk, hogy az ödémás rohamok együtt járhatnak a fikolin-lektin út aktiválódásával. Ugyanazon betegek tünetmentes időszakban, illetve rohamok során gyűjtött mintáit összehasonlítva a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjének szignifikáns, bár kis mértékű emelkedését figyeltük meg a rohamok során, melynek biológiai jelentősége még bizonytalan (21. ábra). Ha a jelenséget párhuzamba állítjuk előkísérleteinkkel, ahol a növekvő koncentrációjú acBSA-val történő inkubálás során a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje dóziszfüggő módon emelkedett (14. ábra) (113), akkor feltételezhető, hogy az ödémás roham során egy aktiváló ágens jelenléte okozhatja az iniciátor komplex koncentrációjának emelkedését, legalább a rohamok egy részében (pl. azon esetekben, amikor valamilyen mikrobiális hatáshoz, infekcióhoz köthető az ödémás roham kialakulása). A fikolin-3/MASP-2 komplex-szel ellentétben a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke szignifikánsan csökkentek mutatkozott roham során, a tünetmentes állapothoz képest (21. ábra). Mivel a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció meghatározása során a mintákat *in vitro* a fikolin-3 specifikus ligandumával, acBSA-val aktiváljuk, és az így keletkező TCC-depozíciót olvassuk le (4.2.3. fejezet), a mérés során tapasztalt kis mértékű TCC-depozíció azt jelzi, hogy *in vivo* már lezajlott a fikolin-lektin út aktiválódása, így *in vitro* már csak csökkent, reziduális TCC-depozíciót tudunk kiváltani. Fentiek figyelembevételével a rohamok során tapasztalt fikolin-3/MASP-2 komplex szint emelkedése, és az alacsony mértékű fikolin-3 által mediált TCC-depozíció arra utalnak, hogy rohamok során (auto)aktiválódik a fikolin-lektin út. Azon kérdés megválaszolására, hogy a fikolin-lektin út aktiválódása az ödémás rohamok oka, vagy következménye-e, további vizsgálatok szükségesek.

Bár az egészséges egyének és a tünetmentes HANO-C1-INH-s betegek mintáiban szignifikáns korrelációt találtunk a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje és a fikolin-3 által mediált TCC-depozíció mértéke között (20. ábra), a rohamos mintákban nem tapasztaltunk összefüggést e két paraméter között (5.6.1. fejezet), ami utalhat arra, hogy az ödémás rohamok során a fikolin-lektin út felfokozott aktiválódása megy végbe,

amely felborítja a fikolin-lektin út kiindulópontja (fikolin-3/MASP-2 komplex) és a végpontja (fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció) közötti összefüggést.

Tanulmányunkban azt a megdöbbentő jelenséget tapasztaltuk, hogy a rohamos mintákban szignifikánsan, kb. 50%-kal emelkedett a funkcionális C1-INH szintje a tünetmentes állapothoz képest, ugyanakkor sem az antigenikus C1-INH, sem a C4 koncentrációja nem nőtt (7. táblázat). A funkcionális C1-INH rohamok során tapasztalt emelkedése ellentmond a korábban közölt tanulmányoknak, melyek azt sugallták, hogy az ödémás rohamok során tovább gyengül a C1-INH általi szabályozás, a tünetmentes állapothoz képest (203). Más munkákban a szerzők nem találtak különbséget a funkcionális C1-INH és a C4 szintek tekintetében, rohamos illetve tünetmentes időszak között (171, 181, 204). Fontos azonban megemlíteni, hogy a fent említett tanulmányok mindegyike más-más HANO-C1-INH-s betegek tünetmentes és rohamos mintáit vizsgálta. Tudomásunk szerint jelen tanulmányunk az első, amely ugyanazon betegek tünetmentes és rohamos mintáit hasonlítja össze (*eredmények publikálása folyamatban*). Azt, hogy a rohamok során az antigenikus C1-INH szint nem követte a C1-INH aktivitás növekedését, nehéz megmagyarázni. Az ellentmondás feloldására több feltevésünk is van, melyek a következők:

1. Korábbi tanulmányok alapján az *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 StcE metalloproteináza elhasítja a C1-INH fehérjét az amino-terminális domainnél, amely növeli a C1-INH-t gátlás mértékét a klasszikus út irányába, továbbá a sejtmembránhoz rögzíti a C1-INH-t, ezáltal növelve a C1-INH lokális koncentrációját (205).

2. Korábbi tanulmányok alapján felmerül a heparin szerepe, amely potenciózza a funkcionális C1-INH aktivitását (206). A feltételezett heparin származhat az aktiválódott hízósejtekből, melyek a HANO-C1-INH-ban betöltött feltételezett szerepét *Oschatz és mtsai.* vizsgálták (207).

3. Munkacsoportunk eddig nem közölt, előzetes eredményei alapján az endotélsejtekben C1-INH raktározódik, amely feltételezhetően egy megfelelő stimulus hatására fel tud szabadulni (*eredmények publikálása folyamatban*). Ha hipotézisünk helytálló, akkor az ödémás rohamok során az endotélsejtekből kiürülő C1-INH lehet az a feltételezett kompenzáló mechanizmus, amely megmagyarázza az emelkedett C1-INH aktivitást. Munkacsoportunk jövőbeni tervei között szerepel azon mechanizmusok feltárása, amelyek a C1-INH endotélsejtből való kijutását stimulálják.

Azt, hogy az antigenikus C1-INH szintje nem követte a funkcionális C1-INH szint növekedését (utóbbit kereskedelmi kittel mutattuk ki), magyarázhatja az, hogy a rendelkezésünkre álló radiális immunodiffúziós módszer nem eléggé érzékeny ilyen alacsony koncentráció tartományban. Fontos figyelembe venni azt a tényt is, hogy jelenleg nincs alkalmas módszer a valódi antigenikus C1-INH koncentráció kimutatására, mert a rendelkezésre álló metodikák a C1-INH egyes tulajdonságain (antigenikus szint, C1s gátlás) alapulnak, és nem veszik figyelembe a fehérje különböző megjelenési formáit (natív és inaktív C1-INH, enzimkomplexek), illetve egyéb nem enzimatis kölcsönhatásokat. Ebből kifolyólag munkacsoportunk távlati tervei között szerepel a C1-INH egyidejűleg fennálló funkcióinak, és az ezeket befolyásoló fontosabb tényezőknek a tanulmányozása a fiziológiás, illetve a patológiás helyzetre jellemző, aktivált *in vitro* rendszerekben.

4. A funkcionális C1-INH szint emelkedését magyarázhatja az is, hogy a C1-INH degradációjában résztvevő faktorok (ilyen pl. a neutrofil elasztáz) (208) hatása csökken az ödéma kifejlődése során, és ezáltal több funkcióképes C1-INH marad a rendszerben.

További tanulmányok szükségesek annak felderítésére, hogy a feltételezett mechanizmusok közül melyek állnak a háttérben, amelyek az ödémás roham kifejlődését, és annak spontán visszahúzódását irányítják.

Ami a klasszikus út komplementaktivációs termékeit (C1rC1sC1-INH komplex, C4a, C4d) illeti, nem találtunk különbséget a rohamos és a rohammentes időszakból származó minták között, csak az egészséges kontrollokhoz képest tapasztaltunk eltéréseket (7. táblázat). *Nielsen és mtsai.*, akik az eddigi legrészletesebb komplementpanelt vonták vizsgálat alá HANO-C1-INH-s betegekben, nem vizsgálták a C1-INH szinteket, ugyanakkor a C1-C1-INH komplex szint emelkedését mutatták ki a rohamok során - megjegyzendő, hogy a szerzők más módszert alkalmaztak a C1-C1-INH komplex mérésére, és csupán 5 beteget vizsgáltak (13). Nagyobb számú beteg bevonásával készült tanulmányunkban nem tapasztaltuk a C1rC1sC1-INH komplex szint emelkedését a remisszióban mért értékekhez képest (7. táblázat), noha ez a marker is jól korrelál a betegség súlyosságával (6. táblázat) (183). A C4 hasítási termékek koncentrációja - a korábban közölt eredményekkel egyezésben - a jelen tanulmányban sem mutatott szignifikáns eltérést rohamok során a remisszióhoz képest

(7. táblázat) (13). Különbség *Nielsen és mtsai.*, valamint a tanulmányunk között, hogy *Nielsen és mtsai.* az SC5b-9 szint emelkedését tapasztalták az általuk vizsgált 5 betegben (13), ugyanakkor mi 35 beteg 112 rohama kapcsán a C3 ponttól csökkent mértékű komplementaktiválódást mutattunk ki, tehát a C3a és C3bBbP szintek egybehangzóan csökkentek roham során a tünetmentes állapothoz képest (7. táblázat). Azt, hogy a HANO-C1-INH-s betegekben, C1-INH hiányában a C3 lépést követően nem tapasztaltunk felfokozott komplementaktiválódást az egészséges egyénekhez képest, magyarázhatja *Gronsky és mtsai.* eredményei, akik leírták, hogy HANO-C1-INH-s betegekben kb. 6-8-szor nagyobb a C4b-kötő fehérje (C4bp) és a C4 aránya az egészséges egyénekhez képest, így a C1-INH sérült regulátor funkciója nem vezet a C3 fokozott hasításához (209), szemben a kaszkád korábbi lépéseiben részt vevő C4 fokozott konzumpciójával (180).

A rohamok során tapasztalt C3 lépést követő csökkent komplementaktiválódás kapcsán felmerülhet a plazmin szerepe is, amelynek szintje szignifikánsan emelkedett az ödémás rohamok során, a tünetmentes állapothoz képes (173). Az aktív szerin proteáz plazmin a plazminogénből keletkezik a humán aktivátorok (urokináz-típusú plazminogén aktivátor, szöveti plazminogén aktivátor) (210), illetve a bakteriális aktivátorok (sztafilokináz, sztreptokináz) hatására (211-215). Eredményeinket magyarázhatja *Barthel és mtsai.* tanulmánya is, akik leírták, hogy a plazmin képes kötődni a C3 komplementfehérjéhez és annak hasítási termékeihez (C3b, C3c, C3d), valamint a C5 komponenshez, ezáltal a komplement aktiválódást szabályozza a C3 és a C5 szintjén, blokkolva C3- és C5-konvertázok funkcióját, majd végül megakadályozva a TCC kialakulását (216). Érdekes megfigyelés továbbá, hogy *in vitro* a plazmin fiziológiás koncentrációban normál humán szérumhoz adva különböző mértékben gátolta az egyes komplement útvonalakat: a klasszikus és az alternatív utak aktiválódását kb. 40%-kal, míg a lektin út aktiválódását kb. 60%-kal csökkentette (216). Figyelembe véve azokat a tanulmányokat, melyek szerint számtalan patogén (pl. *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Candida albicans*) képes speciális fehérjékkel kötődni a plazminogénhez, és aktiválni azt (211-215), feltételezhető, hogy ez a mechanizmus (részben) magyarázza az infekciók által kiváltott ödémás rohamokat (*Zotter és mtsai. eredmények közlése folyamatban*), és az ödémák során általunk tapasztalt csökkent terminális komplementaktiválódást.

A HANO-C1-INH-s betegek mintáiban jelentősen eltérő korrelációs mintázatot láthattunk az általunk vizsgált komplement paraméterek között, az egészséges egyénekhez képest, és érdekes módon ez a mintázat további „eltolódást” mutatott a roham során a rohammentes helyzethez képest (23. és 24. ábrák). Ezek a különbségek is azt sejtetik, hogy a klasszikus és a lektin aktivációs utak C1-INH által kontrollált kezdeti szakasza átrendeződik az ödémás rohamok során.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a különböző angioödémás rohamok kiváltásában, illetve lefolyásában szerepe lehet egy eddig nem definiált aktiváló ágens hatására bekövetkező fikolin-3 által közvetített komplementaktiválódásnak. A funkcionális C1-INH szint és a fikolin-3/MASP-2 komplex között tapasztalt erős pozitív korreláció (24. ábra) felveti annak a lehetőségét, hogy a rohamok során az iniciátor komplex szintjének (egy aktiváló ágenstől bekövetkező) emelkedését követi a C1-INH aktivitásának növekedése, egy eddig nem definiált kompenzációs mechanizmus által.

Korábbi tanulmányok alapján a fikolinokhoz kapcsolódó, viszonylag nagy koncentrációban jelen lévő MASP-1, valamint a MASP-2 aktiválódása konzumpciós mechanizmussal hozzájárulhat az eleve csekély mennyiségű funkcióképes C1-INH felhasználódásához, ezáltal a C1-INH által szabályozott rendszerek kontrollálatlan aktiválódásához, és az ödéma képződéshez (101). További fontos összekötő pont a komplementrendszer és az ödémaképződés folyamatai között, hogy *Dobó és mtsai.* nemrég megjelent közleménye szerint a MASP-1 szerepet játszik a nagy molekulatömegű kininogén bradikininné történő hasításában, tehát ez a megfigyelés is arra utal, hogy a lektin út szerepet játszhat a HANO-C1-INH pathomechanizmusában (101). Korábbi tanulmányok fentiekkel összefüggésben azt is kimutatták, hogy a MASP-1 a komplementaktiválódást „amplifikáló” funkcióján kívül elhasítja a fibrinogént fibrinné (217), továbbá a MASP-2 képes aktív trombin képzésére a protrombin elhasítása által (218).

7. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

- 1) Vizsgálatunk megerősítette azt a feltételezést, miszerint a funkcionális C1-INH hiányában a klasszikus és a lektin út folyamatosan (auto)aktiválódik, még a tünetmentes időszakokban is (*11.1.2. és 11.1.4.*). A kontrollálatlan, folyamatos komplementaktiválódás eredményezheti az egészséges egyénekhez képest csökkent fikolin-2, MASP-2 és C4 szinteket, ugyanakkor a feltételezhetően szabályozó funkciójú MASP-3 koncentrációja emelkedettnek bizonyult tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben (*11.1.2. és 11.1.4.*). A lektin út paramétereit között tapasztalt korrelációk alapján a csökkent MASP-2 szintet a fikolinokon keresztül bekövetkező komplementaktiválódás okozhatja.
- 2) Tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben a klasszikus és a lektin út komplexei közül a C1rC1sC1-INH komplex szintje emelkedett (*11.1.2.*), ugyanakkor a fikolin-3/MASP-2 komplex szintje (amely meghatározására új módszert vezetünk be, *11.1.3.*) csökkentnek bizonyult, az egészséges kontrollokhoz képest. A C3bBbP és SC5b-9 komplexek szintje nem emelkedett tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben az egészséges egyénekhez képest (*11.1.2.*), tehát a komplementkaskád C3 lépését követően nem tapasztaltunk fokozott mértékű komplementaktiválódást a C1-INH hiányában.
- 3) Bár tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben az MBL-MASP-2 aktiválhatóság mértéke – amelynek meghatározására egy új funkcionális tesztet vezetünk be laboratóriumunkban (*11.1.1*) – nem különbözött tünetmentes HANO-C1-INH-s betegekben és az egészséges egyéneknél, a fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció mértéke szignifikánsan csökkentnek mutatkozott tünetmentes időszakban a HANO-C1-INH-s betegekben, az egészséges egyénekhez képest, amely feltehetőleg a csökkent MASP-2 és C4 szintek következménye.

- 4) Vizsgálatunkban először igazoltuk, hogy a fikolin-lektin út paramétereinek szintje összefüggést mutat a HANO-C1-INH súlyosságával, ugyanakkor az MBL-lektin út komponensei nem korreláltak a súlyossági markerekkel (11.1.4.). A HANO-C1-INH tüneteinek súlyossága fordított összefüggést mutatott a fikolin-2 és a fikolin-3 szintekkel, tehát eredményeink alapján a gyakoribb és súlyosabb ödémás rohamok alacsony fikolin-2 és fikolin-3 szintekkel járnak együtt (11.1.4.). Azon kérdés megválaszolása, hogy az alacsony fikolin-2 és fikolin-3 szint ok, vagy következmény-e a kórkép pathomechanizmusában, további vizsgálatokat igényel.

- 5) Elsőként vizsgáltuk ugyanazon HANO-C1-INH-s betegek párosított tünetmentes és rohamos mintáiban a rohamok során fellépő komplementaktiválódás lefolyását. Kimutattuk, hogy az ödémás rohamok együtt járhatnak a fikolin-lektin út aktiválódásával, amit a fikolin-3/MASP-2 komplex szint emelkedése, és a csökkent mértékű fikolin-3 által közvetített TCC-depozíció jelzett. Meglepő eredmény, hogy a rohamok során kb. 50%-kal emelkedett a funkcionális C1-INH szintje a tünetmentes állapothoz képest, és szignifikánsan korrelált a fikolin-3/MASP-2 komplex szintjével (*eredmények közzlése folyamatban*). Azon kérdés megválaszolására, hogy a fikolin-lektin út aktiválódása az ödémás rohamok oka, vagy következménye-e, további vizsgálatok szükségesek.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A C1-INH hiányában kialakuló hereditár angioödémát (HANO-C1-INH) a funkcionális C1-INH fehérje deficienciája okozza, így a koagulációs, a fibrinolitikus, és a kontakt rendszerek, továbbá a komplementaktiválódás klasszikus és lektin útjának szabályozása sérül. A betegség jellegzetes tünetei a rohamokban fellépő szubkután, illetve szubmukózus angioödémák. HANO-C1-INH-ban a komplement MBL-lektin út aktiválódásáról az utóbbi években jelentek meg közlemények, ugyanakkor a fikolinok és a társuló szerin proteázok funkciójáról még keveset tudunk.

Munkánk célja az volt, hogy elemezzük a fikolin-lektin út fehérjéinek szerepét a HANO-C1-INH klinikai lefolyásának súlyosságában, illetve az ödémás rohamok kialakulása során. Vizsgálatunk első fázisában összehasonlítottuk a lektin út fehérjéinek szintjét HANO-C1-INH-s betegekben és egészséges egyéneknél, továbbá mindkét csoportban elemeztük a közöttük fennálló összefüggéseket. Ezt követően megvizsgáltuk a lektin út komponensek és a HANO-C1-INH súlyossági markerei közötti összefüggéseket, majd tanulmányunk befejező részében a betegek roham során, illetve tünetmentes időszakban gyűjtött párosított mintáit hasonlítottuk össze.

Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy C1-INH hiányában a lektin út folyamatosan aktiválódik, amely konzumpciós mechanizmus által az alacsony fikolin-2, MASP-2 és C4 szinteket, valamint a csökkent mértékű fikolin-3-mediált TCC-depozíciót eredményezheti. A lektin út komponensei közötti korrelációk alapján megállapítottuk, hogy az alacsony MASP-2 szintet főleg a fikolinokon, és kevésbé az MBL-en keresztül bekövetkező aktiválódás okozhatja.

Összefüggéseket találtunk a klasszikus, valamint a fikolin-lektin út paramétereinek szintje és a HANO-C1-INH súlyossága között, ugyanakkor az MBL-lektin út komponensei nem korreláltak a betegség súlyossági markereivel. Mivel a HANO-C1-INH tüneteinek súlyossága negatívan korrelált a fikolinok szintjével, eredményeink alapján az alacsony fikolin-2 és fikolin-3 szintek gyakoribb rohamokkal járhatnak együtt. Kimutattuk, hogy az ödémás rohamok együtt járhatnak a fikolin-lektin út aktiválódásával, valamint a funkcionális C1-INH szint emelkedésével.

Eredményeink arra utalnak, hogy a fikolin-lektin út aktiválódása konzumpció révén fokozhatja az eleve kis mennyiségű C1-INH felhasználódását, amely a C1-INH által szabályozott rendszerek kontrollálatlan aktiválódásához, és ödéma képződéséhez vezet.

9. SUMMARY

Hereditary angioedema (HAE-C1-INH) is a disorder resulting from the deficiency of the functional C1-inhibitor protein. It is associated with the impaired regulation of the coagulation, the fibrinolytic, the contact systems, as well as of the complement classical and lectin pathways. The characteristic symptoms of the disease include episodes of subcutaneous or submucosal oedema formation. Reports on the activation of the MBL-lectin complement pathway in HAE-C1-INH have been published in recent years, but little is known yet about the functions of ficolins and associated serine-proteases.

We analyzed the role of the proteins of the ficolin-lectin pathway in the severity of HAE-C1-INH symptoms – both during the clinical course of the disease in general, and during the oedematous episodes in particular. In the initial stage of our study, we compared the levels of lectin pathway proteins in patients with HAE-C1-INH and in healthy controls, as well as analysed their relationships with each other. Then, we studied the correlations among lectin pathway components and the severity markers of HAE-C1-INH. Finally, we compared paired blood samples obtained from the patients during oedematous attacks, as well as during symptom-free periods.

Based on our results, we assume that in the lack of C1-INH, the lectin pathway is in a state of permanent activation, which may result in low ficolin-2, MASP-2, and C4 levels, as well as reduced ficolin-3-mediated TCC deposition through a consumptive mechanism. In view of the correlations found between the lectin pathway components, we concluded that low MASP-2 level results from activation through ficolins in the first place, as well as through MBL to a lower extent. We showed correlations among the levels of the parameters of the classical and ficolin-lectin pathways, and the severity of HAE-C1-INH. However, the components of the MBL-lectin pathway were not related to the disease severity markers. In view of the negative correlation between the latter and ficolin levels, our results suggest that reduced levels of ficolin-2 and ficolin-3 may be associated with an increased occurrence of oedematous attacks. We demonstrated that the activation of the ficolin-lectin pathway, as well as the elevation of functional C1-INH level might occur during oedematous episodes.

Our results indicate that activation of the ficolin-lectin pathway may deplete the already small quantity of C1-INH. This leads to the uncontrolled activation of the systems regulated by C1-INH, resulting in oedema formation.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Mayilyan KR. (2012) Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein & Cell*, 3: 487-496.
2. Sim RB, Tsiftoglou SA. (2004) Proteases of the complement system. *Biochem Soc T*, 32: 21-27.
3. Frank MM, LF Fries. (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, 12: 322-326.
4. Ricklin D, Hajishengallis K, Yang K, Lambris JD. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11: 785-797.
5. Arlaud GJ, Reboul A, Sim RB, Colomb MG. (1979) Interaction of C1-inhibitor with the C1r and C1s subcomponents in human C1. *Biochim Biophys Acta Protein Struct*, 576: 151-162.
6. Sim RB, Malhotra R. (1994) Interactions of carbohydrates and lectins with complement. *Biochem Soc T*, 22: 106-111.
7. Ziccardi RJ, Cooper NR. (1976) Activation of C1r by proteolytic cleavage. *J Immunol*, 116: 504-509.
8. Kirschfink M., Mollnes TE. (2003) Modern complement analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10: 982-989.
9. Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP. (1996) Control of the complement system. *Adv Immunol*, 61: 201-283.
10. Zipfel PF, Skerka C. (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*, 9: 729-740.
11. Wagenaar-Bos IG, Hack CE. (2006) Structure and function of C1-inhibitor. *Immunol Allergy Clin*, 26: 615-632.
12. Ziccardi RJ. (1982) A new role for C-1-inhibitor in homeostasis: control of activation of the first component of human complement. *J Immunol*, 128: 2505-2508.
13. Nielsen EW, Johansen HT, Hogasen K, Wuillemin W, Hack CE, Mollnes TE. (1996) Activation of the complement, coagulation, fibrinolytic and kallikrein-kinin systems during attacks of hereditary angioedema. *Scand J Immunol*, 44: 185-192.

14. Matsushita M., Fujita T. (1992) Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med*, 176: 1497-1502.
15. Sato T, Endo Y, Matsushita M, Fujita T. (1994) Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Int Immunol*, 6: 665-669.
16. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaeble W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid KB, Jensenius JC. (1997) A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nat Immunol*, 386: 506-510.
17. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. (2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*, 15: 127-135.
18. Takahashi M., Endo Y, Fujita T, Matsushita M. (1999) A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol*, 11: 859-863.
19. Stover CM, Thiel S, Thelen M, Lynch NJ, Vorup-Jensen T, Jensenius JC, WJ Schwaeble. (1999) Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol*, 162: 3481-3490.
20. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S. (2009) MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol*, 183: 7371-7378.
21. Matsushita M, Kuraya M, Hamasaki N, Tsujimura M, Shiraki H, Fujita T. (2002) Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J Immunol*, 168: 3502-3506.
22. Matsushita M. (2013) Ficolins in complement activation. *Mol Immunol*, 55: 22-26.

23. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, Jonasson M, Skjoedt MO, Nielsen O, Hartshorn K, Jorgensen TJ, Skjodt K, Holmskov U. (2010) Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol*, 185: 6096-6104.
24. Hummelshoj T, Fog LM, Madsen HO, Sim RB, Garred P. (2008) Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen). *Mol Immunol*, 45: 1623-1632.
25. Schwaeble W, Dahl MR, Thiel S, Stover C, Jensenius JC. (2002) The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP-19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology*, 205: 455-466.
26. Skjoedt MO, Hummelshoj T, Palarasah Y, Honore C, Koch C, Skjodt K, Garred P. (2010) A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J Biol Chem*, 285: 8234-8243.
27. Vorup-Jensen T, Petersen SV, Hansen AG, Poulsen K, Schwaeble W, Sim RB, Reid KB, Davis SJ, Thiel S, Jensenius JC. (2000) Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J Immunol*, 165: 2093-2100.
28. Rossi V, Cseh S, Bally I, Thielens NM, Jensenius JC, Arlaud GJ. (2001) Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem*, 276: 40880-40887.
29. Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol*, 165: 2637-2642.
30. Harmat V, Gal P, Kardos J, Szilagy K, Ambrus G, Vegh B, Naray-Szabo G, Zavodszky P. (2004) The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. *J Mol Biol*, 342: 1533-1546.

31. Heja D, Kocsis A, Dobo J, Szilagyi K, Szasz R, Zavodszky P, Pal G, Gal P. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *P Natl Acad Sci USA*, 109: 10498-10503.
32. Degn SE, Jensen L, Hansen AG, Duman D, Tekin M, Jensenius JC, Thiel S. (2012) Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J Immunol*, 189: 3957-3969.
33. Moller-Kristensen M, Thiel S, Sjöholm A, Matsushita M, Jensenius JC. (2007) Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *Int Immunol*, 19: 141-149.
34. Pavlov VI, Skjoedt MO, Siow Tan Y, Rosbjerg A, Garred P, Stahl GL. (2012) Endogenous and natural complement inhibitor attenuates myocardial injury and arterial thrombogenesis. *Circulation*, 126: 2227-2235.
35. Skjoedt MO, Hummelshoj T, Palarasah Y, Hein E, Munthe-Fog L, Koch C, Skjodt K, Garred P. (2011). Serum concentration and interaction properties of MBL/ficolin associated protein-1. *Immunobiology*, 216: 625-632.
36. Skjoedt MO, Palarasah Y, Munthe-Fog L, Jie Ma Y, Weiss G, Skjodt K, Koch C, Garred P. (2010) MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation. *Immunobiology*, 215: 921-931.
37. Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Lynch NJ, Schwaeble WJ, Matsushita M, Okabe M, Fujita T. (2006) Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. *J Immunol*, 177: 8626-8632.
38. Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, Ohtani K, Katoh T, Jang SJ, Motomura W, Yoshizaki T, Fukuda M, Koyama S, Fukuzawa J, Fukuoh A, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N. (2006) Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol*, 50: 1001-1013.

39. Ma YJ, Skjoedt MO, Garred P. (2013) Collectin-11/MASP Complex Formation Triggers Activation of the Lectin Complement Pathway - The Fifth Lectin Pathway Initiation Complex. *J Innate Immun*
40. Ambrus G, Gal P, Kojima M, Szilagyi K, Balczer J, Antal J, Graf L, Laich A, Moffatt BE, Schwaeble W, Sim RB, Zavodszky P. (2003) Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. *J Immunol*, 170: 1374-1382.
41. Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Vorup-Jensen T, Koch C, Jensenius JC. (2000) Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Mol Immunol*, 37: 803-811.
42. Zundel S, Cseh S, Lacroix M, Dahl MR, Matsushita M, Andrieu JP, Schwaeble WJ, Jensenius JC, Fujita T, Arlaud GJ, Thielens NM. (2004) Characterization of recombinant mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-3 suggests an activation mechanism different from that of MASP-1 and MASP-2. *J Immunol*, 172: 4342-4350.
43. Presanis JS, Hajela K, Ambrus G, Gal P, Sim RB. (2004) Differential substrate and inhibitor profiles for human MASP-1 and MASP-2. *Mol Immunol*, 40: 921-929.
44. Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. (1984) The alternative pathway of complement. *Springer Semin Immun*, 7: 163-192.
45. Xu Y, Narayana SV, Volanakis JE. (2001) Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunol Rev*, 180: 123-135.
46. Sarma JV, Ward PA. (2011) The complement system. *Cell Tissue Res*, 343: 227-235.
47. Dommett RM, Klein N, Turner MW. (2006) Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*, 68: 193-209.
48. Turner MW. (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*, 17: 532-540.
49. Morio H, Kurata H, Katsuyama R, Oka S, Kozutsumi Y, Kawasaki T. (1997) Renal expression of serum-type mannan-binding protein in rat. *Eur J Biochem*, 243: 770-774.

50. Madsen HO, Garred P, Thiel T, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. (1995) Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol*, 155: 3013-3020.
51. Teillet F, Dublet B, Andrieu JP, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Thielens NM. (2005) The two major oligomeric forms of human mannan-binding lectin: chemical characterization, carbohydrate-binding properties, and interaction with MBL-associated serine proteases. *J Immunol*, 174: 2870-2877.
52. Mayilyan KR, Presanis JS, Arnold JN, Hajela K, Sim RB. (2006) Heterogeneity of MBL-MASP complexes. *Mol Immunol*, 43: 1286-1292.
53. Fraser DA, Bohlson SS, Jasinskiene N, Rawal N, Palmarini G, Ruiz S, Rochford R, Tenner AJ. (2006) C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression. *J Leukocyte Biol*, 80: 107-116.
54. Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. (1989) Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet*, 2: 1236-1239.
55. Matsushita M. (2010) Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity. *J Innate Immun*, 2: 24-32.
56. Garlatti V, Belloy N, Martin L, Lacroix M, Matsushita M, Endo Y, Fujita T, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ, Thielens NM, Gaboriaud C. (2007) Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *EMBO J*, 26: 623-633.
57. Garlatti V, Martin L, Gout E, Reiser JB, Fujita T, Arlaud GJ, Thielens NM, Gaboriaud C. (2007) Structural basis for innate immune sensing by M-ficolin and its control by a pH-dependent conformational switch. *J Biol Chem*, 282: 35814-35820.
58. Tanio M, Kondo S, Sugio S, Kohno T. (2007) Trivalent recognition unit of innate immunity system: crystal structure of trimeric human M-ficolin fibrinogen-like domain. *J Biol Chem*, 282: 3889-3895.
59. Matsushita M, Endo Y, Taira S, Sato Y, Fujita T, Ichikawa N, Nakata M, Mizuoichi T. (1996) A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem*, 271: 2448-2454.

60. Endo Y, Takahashi M, Fujita T. (2006) Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, 211: 283-293.
61. Huang H, Huang S, Yu Y, Yuan S, Li R, Wang X, Zhao H, Li J, Yang M, Xu L, Chen S, Xu A. (2011) Functional characterization of a ficolin-mediated complement pathway in amphioxus. *J Biol Chem*, 286: 36739-36748.
62. Garred P, Honore C, Ma YJ, Rorvig S, Cowland J, Borregaard N, Hummelshoj T. (2010) The genetics of ficolins. *J Innate Immun*, 2: 3-16.
63. Endo Y, Matsushita M, Fujita T. (2011) The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell B*, 43: 705-712.
64. Lu J, Tay PN, Kon OL, Reid KB. (1996) Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9. *Biochem J*, 313 (Pt 2): 473-478.
65. Lu J, Le Y, Kon OL, Chan J, Lee SH. (1996) Biosynthesis of human ficolin, an Escherichia coli-binding protein, by monocytes: comparison with the synthesis of two macrophage-specific proteins, C1q and the mannose receptor. *Immunology*, 89: 289-294.
66. Endo Y, Sato Y, Matsushita M, Fujita T. (1996) Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene. *Genomics*, 36: 515-521.
67. Teh C, Le Y, Lee SH, Lu J. (2000) M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of Escherichia coli. *Immunology*, 101: 225-232.
68. Honore C, Rorvig S, Hummelshoj T, Skjoedt MO, Borregaard N, Garred P. (2010) Tethering of Ficolin-1 to cell surfaces through recognition of sialic acid by the fibrinogen-like domain. *J Leukocyte Biol*, 88: 145-158.
69. Liu Y, Endo Y, Iwaki D, Nakata M, Matsushita M, Wada I, Inoue K, Munakata M, Fujita T. (2005) Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. *J Immunol*, 175: 3150-3156.
70. Honore C, Rorvig S, Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Madsen HO, Borregaard N, Garred P. (2008) The innate pattern recognition molecule Ficolin-1 is secreted by monocytes/macrophages and is circulating in human plasma. *Mol Immunol*, 45: 2782-2789.

71. Wittenborn T, Thiel S, Jensen L, Nielsen HJ, Jensenius JC. (2010) Characteristics and biological variations of M-ficolin, a pattern recognition molecule, in plasma. *J Innate Immun*, 2: 167-180.
72. Frederiksen PD, Thiel S, Larsen CB, Jensenius JC. (2005) M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand J Immunol*, 62: 462-473.
73. Kjaer TR, Hansen AG, Sorensen UB, Nielsen O, Thiel S, Jensenius JC. (2011) Investigations on the pattern recognition molecule M-ficolin: quantitative aspects of bacterial binding and leukocyte association. *J Leukocyte Biol*, 90: 425-437.
74. Kilpatrick DC, McLintock LA, Allan EK, Copland M, Fujita T, Jordanides NE, Koch C, Matsushita M, Shiraki H, Stewart K, Tsujimura M, Turner ML, Franklin IM, Holyoake TL. (2003) No strong relationship between mannan binding lectin or plasma ficolins and chemotherapy-related infections. *Clin Exp Immunol*, 134: 279-284.
75. Krarup A, Thiel S, Hansen A, Fujita T, Jensenius JC. (2004) L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. *J Biol Chem*, 279: 47513-47519.
76. Krarup A, Mitchell DA, Sim RB. (2008) Recognition of acetylated oligosaccharides by human L-ficolin. *Immunol Lett*, 118: 152-156.
77. Faro J, Chen Y, Jhaveri P, Oza P, Spear GT, Lint TF, Gewurz H. (2008) L-ficolin binding and lectin pathway activation by acetylated low-density lipoprotein. *Clin Exp Immunol*, 151: 275-283.
78. Ma YG, Cho MY, Zhao M, Park JW, Matsushita M, Fujita T, Lee BL. (2004) Human mannose-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin activation pathway of complement. *J Biol Chem*, 279: 25307-25312.
79. Inoshita H, Matsushita M, Koide S, Kusaba G, Ishii M, Onda K, Gi MJ, Nakata M, Ohsawa I, Horikoshi S, Ohi H, Tomino Y. (2009) A novel measurement method for activation of the lectin complement pathway via both mannose-binding lectin (MBL) and L-ficolin. *J Immunol Methods*, 349: 9-17.

80. Aoyagi Y, Adderson EE, Rubens CE, Bohnsack JF, Min JG, Matsushita M, Fujita T, Okuwaki Y, Takahashi S. (2008) L-Ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes bind to group B streptococci primarily through N-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide and activate the complement pathway. *Infect Immun*, 76: 179-188.
81. Ng PM, Le Saux A, Lee CM, Tan NS, Lu J, Thiel S, Ho B, Ding JL. (2007) C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. *EMBO J*, 26: 3431-3440.
82. Zhang J, Koh J, Lu J, Thiel S, Leong BS, Sethi S, He CY, Ho B, Ding JL. (2009) Local inflammation induces complement crosstalk which amplifies the antimicrobial response. *PLoS Pathog*, 5: e1000282.
83. Sugimoto R, Yae Y, Akaiwa M, Kitajima S, Shibata Y, Sato H, Hirata J, Okochi K, Izuhara K, Hamasaki N. (1998) Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J Biol Chem*, 273: 20721-20727.
84. Akaiwa M, Yae Y, Sugimoto R, Suzuki SO, Iwaki T, Izuhara K, Hamasaki N. (1999) Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. *J Histochem Cytochem*, 47: 777-786.
85. Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Ma YJ, Hansen BE, Koch C, Madsen HO, Skjodt K, Garred P. (2008) Characterization of a polymorphism in the coding sequence of FCN3 resulting in a Ficolin-3 (Hakata antigen) deficiency state. *Mol Immunol*, 45: 2660-2666.
86. Inaba S, Okochi K, Yae Y, Niklasson F, de Verder CH. (1990) Serological studies of an SLE-associated antigen-antibody system discovered as a precipitation reaction in agarose gel: the HAKATA antigen-antibody system. *Hukuoka Acta Medica*, 81: 284-291.
87. Yae Y, Inaba S, Sato H, Okochi K, Tokunaga F, Iwanaga S. (1991) Isolation and characterization of a thermolabile beta-2 macroglycoprotein ('thermolabile substance' or 'Hakata antigen') detected by precipitating (auto) antibody in sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Biochim Biophys Acta*, 1078: 369-376.

88. Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Honore C, Madsen HO, Permin H, and Garred P. (2009) Immunodeficiency associated with FCN3 mutation and ficolin-3 deficiency. *New Engl J Med*, 360: 2637-2644.
89. Hein E, Honore C, Skjoedt MO, Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Garred P. (2010) Functional analysis of Ficolin-3 mediated complement activation. *PloS One*, 5: e15443.
90. Zacho RM, Jensen L, Terp R, Jensenius JC, Thiel S. (2012) Studies of the pattern recognition molecule H-ficolin: specificity and purification. *J Biol Chem*, 287: 8071-8081.
91. Tsujimura M., Ishida C, Sagara Y, Miyazaki T, Murakami K, Shiraki H, Okochi K, Maeda Y. (2001) Detection of serum thermolabile beta-2 macroglycoprotein (Hakata antigen) by enzyme-linked immunosorbent assay using polysaccharide produced by *Aerococcus viridans*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8: 454-459.
92. Swierzko A, Lukasiewicz J, Cedzynski M, Maciejewska A, Jachymek W, Niedziela T, Matsushita M, Lugowski C. (2012) New functional ligands for ficolin-3 among lipopolysaccharides of *Hafnia alvei*. *Glycobiology*, 22: 267-280.
93. Krarup A, Sorensen UB, Matsushita M, Jensenius JC, Thiel S. (2005) Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect Immun*, 73: 1052-1060.
94. Takayama Y, Takada F, Takahashi A, Kawakami M. (1994) A 100-kDa protein in the C4-activating component of Ra-reactive factor is a new serine protease having module organization similar to C1r and C1s. *J Immunol*, 152: 2308-2316.
95. Yongqing T, Drentin N, Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. (2012) Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions? *Biochim Biophys Acta*, 1824: 253-262.
96. Ezekowitz RA, Day LE, Herman GA. (1988) A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins. *J Exp Med*, 167: 1034-1046.

97. Thiel S, Jensen L, Degn SE, Nielsen HJ, Gal P, Dobo J, Jensenius JC. (2012) Mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease-1 (MASP-1), a serine protease associated with humoral pattern-recognition molecules: normal and acute-phase levels in serum and stoichiometry of lectin pathway components. *Clin Exp Immunol*, 169: 38-48.
98. Chen CB, Wallis R. (2004) Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J Biol Chem*, 279: 26058-26065.
99. Megyeri M, Mako V, Beinrohr L, Doleschall Z, Prohaszka Z, Cervenak L, Zavodszky P, Gal P. (2009) Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *J Immunol*, 183: 3409-3416.
100. Hajela K, Kojima M, Ambrus G, Wong KH, Moffatt BE, Ferluga J, Hajela S, Gal P, Sim RB. (2002) The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). *Immunobiology*, 205: 467-475.
101. Dobo J, Major B, Kekesi KA, Szabo I, Megyeri M, Hajela K, Juhasz G, Zavodszky P, Gal P. (2011) Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1. *PloS One*, 6: e20036.
102. Terai I, Kobayashi K, Matsushita M, Fujita T, Matsuno K. 1995. alpha 2-Macroglobulin binds to and inhibits mannose-binding protein-associated serine protease. *Int Immunol*, 7: 1579-1584.
103. Stover CM, Lynch NJ, Hanson SJ, Windbichler M, Gregory SG, Schwaeble WJ. (2004) Organization of the MASP2 locus and its expression profile in mouse and rat. *Mamm Genome*, 15: 887-900.
104. Moller-Kristensen M, Jensenius JC, Jensen L, Thielens N, Rossi V, Arlaud G, Thiel S. (2003) Levels of mannan-binding lectin-associated serine protease-2 in healthy individuals. *J Immunol Methods*, 282: 159-167.
105. Gulla KC, Gupta K, Krarup A, Gal P, Schwaeble WJ, Sim RB, O'Connor CD, Hajela K. (2010) Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology*, 129: 482-495.

106. Wong NK, Kojima M, Dobo J, Ambrus G, Sim RB. (1999) Activities of the MBL-associated serine proteases (MASPs) and their regulation by natural inhibitors. *Mol Immunol*, 36: 853-861.
107. Seyfarth J, Garred P, Madsen HO. (2006) Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (*mb12*) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. *Mol Immunol*, 43: 962-971.
108. Degn SE, Jensen L, Gal P, Dobo J, Holmvad SH, Jensenius JC, Thiel S. (2010) Biological variations of MASP-3 and MAp44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system. *J Immunol Methods*, 361: 37-50.
109. Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Matsushita M, Fujita T. (2011) The role of mannose-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *J Immunol*, 187: 3751-3758.
110. Gregory LA, Thielens NM, Matsushita M, Sorensen R, Arlaud GJ, Fontecilla-Camps JC, Gaboriaud C. (2004) The X-ray structure of human mannan-binding lectin-associated protein 19 (MAp19) and its interaction site with mannan-binding lectin and L-ficolin. *J Biol Chem*, 279: 29391-29397.
111. Degn SE, Thiel S, Nielsen O, Hansen AG, Steffensen R, Jensenius JC. (2011) MAp19, the alternative splice product of the MASP2 gene. *J Immunol Methods*, 373: 89-101.
112. Munthe-Fog L, Hummelshoj T, Hansen BE, Koch C, Madsen HO, Skjodt K, Garred P. (2007) The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the Ficolin-2 serum levels. *Scand J Immunol*, 65: 383-392.
113. Csuka D, Munthe-Fog L, Skjoedt MO, Hein E, Bay JT, Varga L, Fust G, Garred P. (2013) A novel assay to quantitate MASP-2/ficolin-3 complexes in serum. *J Immunol Methods*, 387: 237-244.
114. Kuipers S, Aerts PC, Sjöholm AG, Harmsen T, van Dijk H. (2002) A hemolytic assay for the estimation of functional mannose-binding lectin levels in human serum. *J Immunol Methods*, 268: 149-157.
115. Suankratay C, Zhang XH, Zhang Y, Lint TF, Gewurz H. (1998) Requirement for the alternative pathway as well as C4 and C2 in complement-dependent hemolysis via the lectin pathway. *J Immunol*, 160: 3006-3013.

116. Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Steffensen R, Jensenius JC. (2001) An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J Immunol Methods*, 257: 107-116.
117. Csuka D, Molvarec A, Derzsy Z, Varga L, Fust G, Rigo J, Prohaszka Z. (2010) Functional analysis of the mannose-binding lectin complement pathway in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 87: 90-96.
118. Super M, Levinsky RJ, Turner MW. (1990) The level of mannan-binding protein regulates the binding of complement-derived opsonins to mannan and zymosan at low serum concentrations. *Clin Exp Immunol*, 79: 144-150.
119. Thiel S, Moller-Kristensen M, Jensen L, Jensenius JC. (2002) Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Immunobiology*, 205: 446-454.
120. Seelen MA, van der Bijl EA, Trouw LA, Zuiverloon TC, Munoz JR, Fallaux-van den Houten FC, Schlagwein N, Daha MR, Huizinga TW, Roos A. (2005) A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 44: 111-119.
121. Horvath Z, Csuka D, Vargova K, Kovacs A, Molnar AA, Gulacsi-Bardos P, Lee S, Varga L, Kiss RG, Preda I, Fust G. (2013) Elevated C1rC1sC1inh levels independently predict atherosclerotic coronary heart disease. *Mol Immunol*, 54: 8-13.
122. Shields KJ, Stolz D, Watkins SC, Ahearn JM. (2011) Complement proteins C3 and C4 bind to collagen and elastin in the vascular wall: a potential role in vascular stiffness and atherosclerosis. *Clin Transl Sci*, 4: 146-152.
123. Mukherjee P, Pasinetti GM. (2000) The role of complement anaphylatoxin C5a in neurodegeneration: implications in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, 105: 124-130.
124. Sellebjerg F, Jaliashvili I, Christiansen M, Garred P. (1998) Intrathecal activation of the complement system and disability in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 157: 168-174.
125. Walport MJ, Lachmann PJ. (1990) Complement deficiencies and abnormalities of the complement system in systemic lupus erythematosus and related disorders. *Curr Opin Rheumatol*, 2: 661-663.

126. Linton SM, Morgan BP. (1999) Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis. *Mol Immunol*, 36: 905-914.
127. Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, Summerfield JA. (1991) Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet*, 337: 1569-1570.
128. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW. (1992) High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet*, 1: 709-715.
129. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A. (1994) A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics*, 40: 37-44.
130. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. (2004) A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. *J Exp Med*, 199: 1391-1399.
131. Neth O, Hann I, Turner MW, Klein NJ. (2001) Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *Lancet*, 358: 614-618.
132. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M, Klastersky J, Barette M, Meuleman N, Huet F, Calandra T, Costantini S, Ferrant A, Mathissen F, Axelsen M, Marchetti O, Aoun M. (2007) Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. *Clin Infect Dis*, 44: 1593-1601.
133. Garred P, Strom J, Quist L, Taaning E, Madsen HO. (2003) Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Dis*, 188: 1394-1403.

134. Madsen JK, Pedersen F, Nielsen H, Jensen GV, Hansen JF. (1998) Improvement in long-term prognosis of elderly patients with acute myocardial infarction after the introduction of intravenous thrombolytic therapy. *Scand Cardiovasc J*, 32: 365-370.
135. Saevarsdottir S, Oskarsson OO, Aspelund T, Eiriksdottir G, Vikingsdottir T, Gudnason V, Valdimarsson H. (2005) Mannan binding lectin as an adjunct to risk assessment for myocardial infarction in individuals with enhanced risk. *J Exp Med*, 201: 117-125.
136. Rugonfalvi-Kiss S, Endresz V, Madsen HO, Burian K, Duba J, Prohaszka Z, Karadi I, Romics L, Gonczol E, Fust G, Garred P. (2002) Association of *Chlamydia pneumoniae* with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *Circulation*, 106: 1071-1076.
137. Szabo A, Laki J, Madsen HO, Dosa E, Prohaszka Z, Rugonfalvi-Kiss S, Kokai M, Acsadi G, Karadi I, Entz L, Selmecci L, Romics L, Fust G, Garred P, Cervenak L. (2007) Early rise in serum VEGF and PDGF levels predisposes patients with a normal MBL2 genotype to restenosis after eversion endarterectomy. *Stroke*, 38: 2247-2253.
138. Christiansen OB, Kilpatrick DC, Souter V, Varming K, Thiel S, Jensenius JC. (1999) Mannan-binding lectin deficiency is associated with unexplained recurrent miscarriage. *Scand J Immunol*, 49: 193-196.
139. Swierzko AS, Atkinson AP, Cedzynski M, Macdonald SL, Szala A, Domzalska-Popadiuk I, Borkowska-Klos M, Jopek A, Szczapa J, Matsushita M, Szemraj J, Turner ML, Kilpatrick DC. (2009) Two factors of the lectin pathway of complement, I-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates. *Mol Immunol*, 46: 551-558.
140. Schlapbach LJ, Mattmann M, Thiel S, Boillat C, Otth M, Nelle B, Wagner B, Jensenius JC, Aebi C. (2010) Differential role of the lectin pathway of complement activation in susceptibility to neonatal sepsis. *Clin Infect Dis*, 51: 153-162.

141. Cedzynski M, Szemraj J, Swierzko AS, Bak-Romaniszyn L, Banasik M, Zeman K, Kilpatrick DC. (2004) Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. *Clin Exp Immunol*, 136: 304-311.
142. Kilpatrick DC, Fujita T, Matsushita M. (1999) P35, an opsonic lectin of the ficolin family, in human blood from neonates, normal adults, and recurrent miscarriage patients. *Immunol Lett*, 67: 109-112.
143. Wang CC, Yim KW, Poon TC, Choy KW, Chu CY, Lui WT, Lau TK, Rogers MS, Leung TN. (2007) Innate immune response by ficolin binding in apoptotic placenta is associated with the clinical syndrome of preeclampsia. *Clin Chem*, 53: 42-52.
144. Fust G, Munthe-Fog L, Illes Z, Szeplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Szeplaki Z, Prohaszka Z, Skjoedt MO, Garred P. (2011) Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. *J Neuroinflamm*, 8: 185.
145. Sirmaci A, Walsh T, Akay H, Spiliopoulos M, Sakalar YB, Hasanefendioglu-Bayrak A, Duman D, Farooq A, King MC, Tekin M. (2010) MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. *Am J Hum Genet*, 87: 679-686.
146. Mingarelli R, Castriota Scanderbeg A, Dallapiccola B. (1996) Two sisters with a syndrome of ocular, skeletal, and abdominal abnormalities (OSA syndrome). *J Med Genet*, 33: 884-886.
147. Malpuech G, Demeocq F, Palcoux JB, Vanlieferinghen P. (1983) A previously undescribed autosomal recessive multiple congenital anomalies/mental retardation (MCA/MR) syndrome with growth failure, lip/palate cleft(s), and urogenital anomalies. *Am J Med Genet*, 16: 475-480.
148. Titomanlio L, Bennaceur S, Bremond-Gignac D, Baumann C, Dupuy O, Verloes A. (2005) Michels syndrome, Carnevale syndrome, OSA syndrome, and Malpuech syndrome: variable expression of a single disorder (3MC syndrome)? *Am J Med Genet. Part A* 137A: 332-335.

149. Rooryck C, Diaz-Font A, Osborn DP, Chabchoub E, Hernandez-Hernandez V, Shamseldin H, Kenny J, Waters A, Jenkins D, Kaissi AA, Leal GF, Dallapiccola B, Carnevale F, Bitner-Glindzicz M, Lees M, Hennekam R, Stanier P, Burns AJ, Peeters H, Alkuraya FS, Beales PL. (2011) Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet*, 43: 197-203.
150. Ytting H, Christensen IJ, Thiel S, Jensenius JC, Nielsen HJ. (2005) Serum mannan-binding lectin-associated serine protease 2 levels in colorectal cancer: relation to recurrence and mortality. *Clin Cancer Res*, 11: 1441-1446.
151. Swierzko AS, Szala A, Cedzynski M, Domzalska-Popadiuk I, Borkowska-Klos M, Jopek A, Szczapa J, Szemraj J, Atkinson AP, MacDonald SL, Turner ML, Kilpatrick DC. (2009) Mannan-binding lectin genotypes and genotype-phenotype relationships in a large cohort of Polish neonates. *Hum Immunol*, 70: 68-72.
152. Garcia-Laorden MI, Sole-Violan J, Rodriguez de Castro F, Aspa J, Briones ML, Garcia-Saavedra A, Rajas O, Blanquer J, Caballero-Hidalgo A, Marcos-Ramos JA, Hernandez-Lopez J, Rodriguez-Gallego C. (2008) Mannose-binding lectin and mannan-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults. *J Allergy Clin Immunol*, 122: 368-374, 374 e361-362.
153. Nazari S, Ebrahimi M, Abdollah Gorji F, Abadi A, Fahimzad A. (2012) Association between serum levels of MASP-2 and neutropenic febrile attacks in children with leukemia. *Arch Iran Med*, 15: 625-628.
154. Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Moller-Kristensen M, Sorensen R, Jensen LT, Sjolholm AG, Fugger L, Jensenius JC. (2003) Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *New Engl J Med*, 349: 554-560.
155. Sorensen R, Thiel S, Jensenius JC. (2005) Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations. *Springer Semin Immunol*, 27: 299-319.
156. Davis AE, 3rd. (1988) C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol*, 6: 595-628.

157. Donaldson VH, Evans RR. (1963) A Biochemical Abnormality in Herediatry Angioneurotic Edema: Absence of Serum Inhibitor of C' 1-Esterase. *Am J Med*, 35: 37-44.
158. Kramer J, Rosen FS, Colten HR, Rajczy K, Strunk RC. (1993) Transinhibition of C1 inhibitor synthesis in type I hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest*, 91: 1258-1262.
159. Bork K, Meng G, Staubach P, Hardt J. (2006) Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am J Med*, 119: 267-274.
160. Frank MM, Gelfand JA, Atkinson JP. (1976) Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management. *Ann Intern Med*, 84: 580-593.
161. Agostoni A. (1989) Inherited C1 inhibitor deficiency. *Complement Inflamm*, 6: 112-118.
162. Lung CC, Chan EK, Zuraw BL. (1997) Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 99: 134-146.
163. Duponchel C, Djenouhat K, Fremeaux-Bacchi V, Monnier N, Drouet C, Tosi M. (2006) Functional analysis of splicing mutations and of an exon 2 polymorphic variant of SERPING1/C1NH. *Hum Mutat*, 27: 295-296.
164. Blasko B, Szeplaki G, Varga L, Ronai Z, Prohaszka Z, Sasvari-Szekely M, Visy B, Farkas H, Fust G. (2007) Relationship between copy number of genes (C4A, C4B) encoding the fourth component of complement and the clinical course of hereditary angioedema (HAE). *Mol Immunol*, 44: 2667-2674.
165. Drouet C, Desormeaux A, Robillard J, Ponard D, Bouillet L, Martin L, Kanny G, Moneret-Vautrin DA, Bosson JL, Quesada JL, Lopez-Trascasa M, Adam A. (2008) Metallopeptidase activities in hereditary angioedema: effect of androgen prophylaxis on plasma aminopeptidase P. *J Allergy Clin Immunol*, 121: 429-433.
166. Farkas H, Fust G, Fekete B, Karadi I, Varga L. (2001) Eradication of *Helicobacter pylori* and improvement of hereditary angioneurotic oedema. *Lancet*, 358: 1695-1696.

167. Visy B, Fust G, Varga L, Szendei G, Takacs E, Karadi I, Fekete B, Harmat G, Farkas H. (2004) Sex hormones in hereditary angioneurotic oedema. *Clin Endocrinol*, 60: 508-515.
168. Cedzynski M, Madalinski K, Gregorek H, Swierzko AS, Nowicka E, Obtulowicz K, Dzierzanowska-Fangrat K, Wojda U, Rabczenko D, and Kawakami M. (2008) Possible disease-modifying factors: the mannan-binding lectin pathway and infections in hereditary angioedema of children and adults. *Arch Immunol Ther Exp*, 56: 69-75.
169. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. 1998. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet*, 351: 1693-1697.
170. Agostoni A, Aygoren-Pursun E, Binkley KE, Blanch A, Bork K, Bouillet L, Bucher C, Castaldo AJ, Cicardi M, Davis AE, De Carolis C, Drouet C, Duponchel C, Farkas H, Fay K, Fekete B, Fischer B, Fontana L, Fust G, Giacomelli R, Groner A, Hack CE, Harmat G, Jakenfelds J, Juers M, Kalmar L, Kaposi PN, Karadi I, Kitzinger A, Kollar T, Kreuz W, Lakatos P, Longhurst HJ, Lopez-Trascasa M, Martinez-Saguer I, Monnier N, Nagy I, Nemeth E, Nielsen EW, Nuijens JH, O'Grady C, Pappalardo E, Penna V, Perricone C, Perricone R, Rauch U, Roche O, Rusicke E, Spath PJ, Szendei G, Takacs E, Tordai A, Truedsson L, Varga L, Visy B, Williams K, Zanichelli A, Zingale L. (2004) Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol*, 114: S51-131.
171. Schapira M, Silver LD, Scott CF, Schmaier AH, Prograis LJ, Curd JG, Colman RW. (1983) Prekallikrein activation and high-molecular-weight kininogen consumption in hereditary angioedema. *N Engl J Med*, 308: 1050-1053.
172. Curd JG, Prograis LJ, Cochrane CG. (1980) Detection of active kallikrein in induced blister fluids of hereditary angioedema patients. *J Exp Med*, 152: 742-747.
173. Cugno M, Hack CE, de Boer JP, Eerenberg AJ, Agostoni A, Cicardi M. (1993) Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *J Lab Clin Med*, 121: 38-43.

174. Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, Mannucci PM, Agostoni A. (1997) Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood*, 89: 3213-3218.
175. Schmaier AH. (2008) The elusive physiologic role of Factor XII. *J Clin Invest*, 118: 3006-3009.
176. Sainz IM, Pixley RA, Colman RW. (2007) Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost*, 98: 77-83.
177. Hoffmann H, Siebeck M, Thetter O, Fink E, Philapitsch A. (1987) Effect of aprotinin and C1-esterase inhibitor on activation of the plasma kallikrein-kinin system in vivo. *Prog Clin Biol Res*, 236A: 159-164.
178. Kleniewski J, Blankenship DT, Cardin AD, Donaldson V. (1992) Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin. *J Lab Clin Med*, 120: 129-139.
179. Cugno M, Zanichelli A, Foieni F, Caccia S, Cicardi M. (2009) C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends Mol Med*, 15: 69-78.
180. Donaldson VH, Rosen FS. (1964) Action of Complement in Hereditary Angioneurotic Edema: The Role of C'1-Esterase. *J Clin Invest*, 43: 2204-2213.
181. Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE. (2002) Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest*, 109: 1057-1063.
182. Zeerleder S. (2011) C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin Thromb Hemost*, 37: 362-374.
183. Csuka D, Fust G, Farkas H, Varga L. (2011) Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. *Clin Immunol*, 139: 85-93.
184. Kelemen Z, Moldovan D, Mihaly E, Visy B, Szeplaki G, Csuka D, Fust G, Farkas H, Varga L. (2010) Baseline level of functional C1-inhibitor correlates with disease severity scores in hereditary angioedema. *Clin Immunol*, 134: 354-358.

185. Varga L, Szeplaki G, Laki J, Kocsis A, Kristof K, Gal P, Bajtay Z, Wieslander J, Daha MR, Garred P, Madsen HO, Fust G, Farkas H. (2008) Depressed activation of the lectin pathway of complement in hereditary angioedema. *Clin Exp Immunol*, 153: 68-74.
186. Csuka D, Munthe-Fog L, Skjoedt MO, Kocsis A, Zotter Z, Gal P, Varga L, Farkas H, Fust G, Garred P. (2013) The role of ficolins and MASPs in hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Mol Immunol*, 54: 271-277.
187. Dobo J, Harmat V, Beinrohr L, Sebestyen E, Zavodszky P, Gal P. (2009) MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity. *J Immunol*, 183: 1207-1214.
188. Dobo J, Harmat V, Sebestyen E, Beinrohr L, Zavodszky P, Gal P. (2008) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human mannan-binding lectin-associated serine protease-1 (MASP-1) catalytic region. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 64: 781-784.
189. Ytting H, Christensen IJ, Basse L, Lykke J, Thiel S, Jensenius JC, Nielsen HJ. (2006) Influence of major surgery on the mannan-binding lectin pathway of innate immunity. *Clin Exp Immunol*, 144: 239-246.
190. Sallenbach S, Thiel S, Aebi C, Otth M, Bigler S, Jensenius JC, Schlapbach LJ, Ammann RA. (2011) Serum concentrations of lectin-pathway components in healthy neonates, children and adults: mannan-binding lectin (MBL), M-, L-, and H-ficolin, and MBL-associated serine protease-2 (MASP-2). *Pediatr Allergy Immunol*, 22: 424-430.
191. Kerenyi A, Nagy G, Veres A, Varga L, Fust A, Nagymihany A, Czumbel N, Suveges I, Fust G. (2002) C1r-C1s-C1inhibitor (C1rs-C1inh) complex measurements in tears of patients before and after penetrating keratoplasty. *Curr Eye Res*, 24: 99-104.
192. Deppisch R, Schmitt V, Bommer J, Hansch GM, Ritz E, Rauterberg EW. (1990) Fluid phase generation of terminal complement complex as a novel index of bioincompatibility. *Kidney Int*, 37: 696-706.

193. Farkas H, Zotter Z, Csuka D, Szabo E, Nebenfuhrer Z, Temesszentandras G, Jakab L, Varga L, Harmat G, Karadi I. (2012) Short-term prophylaxis in hereditary angioedema due to deficiency of the C1-inhibitor--a long-term survey. *Allergy*, 67: 1586-1593.
194. Kohler PF, Muller-Eberhard HJ. (1967) Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentrations in the serum of healthy adults. *J Immunol*, 99: 1211-1216.
195. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. (2003) Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol*, 40: 73-84.
196. Oppermann M, Wurzner R. (2010) Modern determination of complement activation. *Semin Thromb Hemost*, 36: 611-619.
197. Xu W, Berger SP, Trouw LA, de Boer HC, Schlagwein N, Mutsaers C, Daha MR, van Kooten C. (2008) Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation. *J Immunol*, 180: 7613-7621.
198. Thiel S, Petersen SV, Vorup-Jensen T, Matsushita M, Fujita T, Stover CM, Schwaebler WJ, Jensenius JC. (2000) Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MASP-1. *J Immunol*, 165: 878-887.
199. Ziccardi RJ, Cooper NR. (1980) Development of an immunochemical test to assess C1 inactivator function in human serum and its use for the diagnosis of hereditary angioedema. *Clin Immunol Immunopathol*, 15: 465-471.
200. Hecker LA, Edwards AO, Ryu E, Tosakulwong N, Baratz KH, Brown WL, Charbel Issa P, Scholl HP, Pollok-Kopp B, Schmid-Kubista KE, Bailey KR, Oppermann M. (2010) Genetic control of the alternative pathway of complement in humans and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*, 19: 209-215.
201. Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, Rodriguez de Cordoba S. (2004) Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics*, 56: 77-82.

202. Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Souto JC, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, de Cordoba SR. (2003) Genetic determinants of variation in the plasma levels of the C4b-binding protein (C4BP) in Spanish families. *Immunogenetics*, 54: 862-866.
203. van Geffen M, Cugno M, Lap P, Loof A, Cicardi M, van Heerde W. (2012) Alterations of coagulation and fibrinolysis in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Clin Exp Immunol*, 167: 472-478.
204. Cugno M, Zanichelli A, Bellatorre AG, Griffini S, Cicardi M. (2009) Plasma biomarkers of acute attacks in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergy*, 64: 254-257.
205. Lathem WW, Bergsbaken T, Welch RA. (2004) Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. *J Exp Med*, 199: 1077-1087.
206. Caldwell EE, Andreasen AM, Blietz MA, Serrahn JN, VanderNoot V, Park Y, Yu G, Linhardt RJ, Weiler JM. (1999) Heparin binding and augmentation of C1 inhibitor activity. *Arch Biochem Biophys*, 361: 215-222.
207. Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Bjorkqvist J, Tradler T, Sedlmeier R, Burfeind P, Cichon S, Hammerschmidt S, Muller-Esterl W, Wullemin WA, Nilsson G, Renne T. (2011) Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity*, 34: 258-268.
208. de Agostini A, Patston PA, Marottoli V, Carrel S, Harpel PC, Schapira M. (1988) A common neopeptide is created when the reactive center of C1-inhibitor is cleaved by plasma kallikrein, activated factor XII fragment, C1 esterase, or neutrophil elastase. *J Clin Invest*, 82: 700-705.
209. Gronski P, Bodenbender L, Kanzy EJ, Seiler FR. (1988) C4-binding protein prevents spontaneous cleavage of C3 in sera of patients with hereditary angioedema. *Complement*, 5: 1-12.
210. Miyashita C, Wenzel E, Heiden M. (1988) Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function. *Haemostasis*, 18 Suppl 1: 7-13.
211. Barthel D, Singh B, Riesbeck K, Zipfel PF. (2012) *Haemophilus influenzae* uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity. *J Immunol*, 188: 379-385.

212. Hallstrom T, Haupt K, Kraiczky P, Hortschansky P, Wallich R, Skerka C, Zipfel PF. (2010) Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *J Infect Dis*, 202: 490-498.
213. Kunert A, Losse J, Gruszyn C, Huhn M, Kaendler K, Mikkat S, Volke D, Hoffmann R, Jokiranta TS, Seeberger H, Moellmann U, Hellwage J, Zipfel PF. (2007) Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J Immunol*, 179: 2979-2988.
214. Luo S, Poltermann S, Kunert A, Rupp S, Zipfel PF. (2009) Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol Immunol*, 47: 541-550.
215. Agarwal V, Asmat TM, Luo S, Jensch I, Zipfel PF, Hammerschmidt S. (2010) Complement regulator Factor H mediates a two-step uptake of *Streptococcus pneumoniae* by human cells. *J Biol Chem*, 285: 23486-23495.
216. Barthel D, Schindler S, Zipfel PF. (2012) Plasminogen is a complement inhibitor. *J Biol Chem*, 287: 18831-18842.
217. Krarup A, Gulla KC, Gal P, Hajela K, Sim RB. (2008) The action of MBL-associated serine protease 1 (MASP1) on factor XIII and fibrinogen. *Biochim Biophys Acta*, 1784: 1294-1300.
218. Krarup A, Wallis R, Presanis JS, Gal P, Sim RB. (2007) Simultaneous activation of complement and coagulation by MBL-associated serine protease 2. *PloS One* 2: e623.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- 1) Csuka D., Molvarec A, Derzsy Z, Varga L, Füst G, Rigó J, Prohászka Z. (2010) Functional analysis of the mannose-binding lectin complement pathway in normal pregnancy and preeclampsia. J Reprod Immunol, 87:(1-2) 90-96.
IF: 2,204 (2010)
- 2) Csuka D., Füst G, Farkas H, Varga L. (2011) Parameters of the classical complement pathway predict disease severity in hereditary angioedema. Clin Immunol, 139:(1) 85-93.
IF: 4,046 (2011)
- 3) Csuka D., Munthe-Fog L, Skjoedt MO, Hein E, Bay JT, Varga L, Füst G, Garred P. (2013) A novel assay to quantitate MASP-2/ficolin-3 complexes in serum. J Immunol Methods, 387:(1-2) 237-244.
IF: 2,203* (2011)
- 4) Csuka D., Munthe-Fog L, Skjoedt MO, Kocsis A, Zotter Z, Gál P, Varga L, Farkas H, Füst G, Garred P. (2013) The role of ficolins and MASPs in hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. Mol Immunol, 54:(3-4) 271-277.
IF: 2,897* (2011)

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: **11,352.**

**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el.*

11.2. A disszertációtól független publikációk

- 1) Maus M, Medgyesi D, Kövesdi D, Csuka D., Koncz G, Sármay G. (2009) Grb2 associated binder 2 couples B-cell receptor to cell survival. Cell Signal, 21:(2) 220-227.
IF: 4,094 (2009)
- 2) Csuka D., Kókai M, Varga L. (2009) Hemolitikus összkomplement helyett ELISA? Klin Kísérl Lab Med, 34:(1) 4-10
- 3) Kelemen Z, Moldovan D, Mihály E, Visy B, Széplaki G, Csuka D., Füst G, Farkas H, Varga L. (2010) Baseline level of functional C1 inhibitor correlates with disease severity scores in hereditary angioedema. Clin Immunol, 134:(3) 354-358.
IF: 3,932 (2010)
- 4) Csuka D., Zotter Z, Varga L, Füst G, Farkas H. (2010) Profilaktikus kezelés hereditár angioödémás gyermekekben – Mikor, mit és hogyan? Gyermekorvos Továbbképzés, 9:(4) 213-217.

- 5) Farkas H, Czaller I, Csuka D, Vas A, Walentin S, Varga L, Széplaki G, Jakab L, Füst G, Prohászka Z, Harmat G, Visy B, Karádi I. (2010) The effect of long-term danazol prophylaxis on liver function in hereditary angioedema – a longitudinal study. *Eur J Clin Pharmacol*, 66:(4) 419-426. IF: 3,032 (2010)
- 6) Czaller I, Visy B, Csuka D, Füst G, Tóth F, Farkas H. (2010) The natural history of hereditary angioedema and the impact of treatment with human C1-inhibitor concentrate during pregnancy - a long-term survey. *Eur J Obstet Gyn R B*, 152:(1) 44-49. IF: 1,764 (2010)
- 7) Kelemen Z, Visy B, Csuka D, Czaller I, Füst G, Farkas H. (2010) Abdominal symptoms of hereditary angioedema and early weaning. *Eur J Clin Nutr*, 64:(9) 1025-1027. IF: 2,563 (2010)
- 8) Farkas H, Kelemen Z, Csuka D, Varga L, Rajczy K, Bors A, Miklós K. (2010) Recurrent neurological abnormalities in children suffering from hereditary C1 inhibitor deficiency – A rare manifestation of HAE or something else? *Angioedema*, 1:(3) 17-21.
- 9) Zotter Z, Csuka D, Varga L, Füst G, Farkas H. (2010) WBC elevation and the resulting neutrophilia characterize hereditary angioedema attacks. *Angioedema*, 1:(3) 10-16.
- 10) Czaller I, Molnár K, Csuka D, Varga L, Farkas H. (2011) Successful outcome using C1-inhibitor concentrate in acute pancreatitis caused by hereditary angioedema. *Gastroenterol Nurs*, 34:(1) 60-63 IF: 0,705 (2011)
- 11) Varga L, Füst G, Csuka D, Farkas H. (2011) Treatment with C1-inhibitor concentrate does not induce IgM type anti-C1Inhibitor antibodies in patients with hereditary angioedema. *Mol Immunol*, 48:(4) 572-576. IF: 2,897 (2011)
- 12) Füst G, Farkas H, Csuka D, Varga L, Bork K. (2011) Long-term efficacy of danazol treatment in hereditary angioedema. *Eur J Clin Invest*, 41:(3) 256-262 IF: 3,018 (2011)
- 13) Csuka D, Kelemen Z, Czaller I, Molnár K, Füst G, Varga L, Rajczy K, Szabó Z, Miklós K, Bors A, Farkas H. (2011) Association of celiac disease and hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. Screening patients with hereditary angioedema for celiac disease: is it worth the effort? *Eur J Gastroen Hepat*, 23:(3) 238-244. IF: 1,757 (2011)
- 14) Farkas H, Csuka D, Gács J, Czaller I, Zotter Z, Füst G, Varga L, Gergely P. (2011) Lack of increased prevalence of immunoregulatory disorders in hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Clin Immunol*, 141:(1) 58-66. IF: 4,046 (2011)

- 15) Csuka D, Varga L, Farkas H, Füst G. (2012) Strong correlation of high EBNA-1-IgG levels with edematous attacks involving upper airway mucosa in hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Mol Immunol*, 49:(4) 649-654. IF: 2,897* (2011)
- 16) Czúcz J, Schaffer G, Csuka D, Walentin S, Kunde J, Prohászka Z, Farkas H, Cervenak L. (2012) Endothelial Cell Function in Patients with Hereditary Angioedema: Elevated Soluble E-selectin Level During Inter-attack Periods. *J Clin Immunol*, 32:(1) 61-69. IF: 3,077* (2011)
- 17) Csuka D, Varga L, Füst G, Prohászka Z, Farkas H. (2012) A komplement paraméterek előre jelzik a C1-inhibitor hiányában kialakuló hereditaer angioedema súlyosságát. *Orvosképzés*, 1: 21-28.
- 18) Farkas H, Csuka D, Zotter Z, Varga L, Böröcz Z, Temesszentandrás G, Jakab L, Karádi I. (2012) Home treatment of hereditary angioedema with icatibant administered by healthcare professionals. *J Allergy Clin Immun*, 129:(3) 851-852.e2. [Letter to Editor, IF: 9,273* (2011)]
- 19) Réti M, Farkas P, Csuka D, Rázsó K, Schlammadinger Á, Udvardy ML, Madách K, Domján G, Bereczki C, Reusz GS, Szabó AJ, Prohászka Z. (2012) Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Hemost*, 10:(5) 791-798. IF: 5,731* (2011)
- 20) Csuka D, Banati M, Rozsa C, Füst g, Illes Z. (2012) High anti-EBNA-1 IgG levels are associated with early-onset myasthenia gravis. *Eur J Neurol*, 19:(6) 842-846. IF:3,692* (2011)
- 21) Farkas H, Csuka D, Tóth F, Kőszegi L, Varga L. (2012) Successful pregnancy outcome after treatment with C1-inhibitor concentrate in a patient with hereditary angioedema and a history of four miscarriages. *Eur J Obstet Gyn R B*, 165:(2) 366-367 IF: 1,974* (2011)
- 22) Füst Á, Csuka D, Süveges I, Imre L, Bausz M, Nagymihály A, Csorvási Á, Füst G, Németh J. (2012) Complement activation in the aqueous humor of pseudophakic bullous keratopathy patients. *Ophthalm Res*, 49:(3) 161-166. IF: 1,561* (2011)
- 23) Farkas H, Zotter Z, Csuka D, Szabó E, Zotter Z, Nébenführer Z, Temesszentandrás G, Jakab L, Varga L, Harmat G, Karádi I. (2012) Short-term prophylaxis in hereditary angioedema due to deficiency of the C1-inhibitor - A long-term survey. *Allergy*, 67:(12) 1586-1593. IF: 6,271* (2011)
- 24) Farkas H, Csuka D, Zotter Z, Varga L, Füst G. (2013) Prophylactic therapy in children with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immun*, 131:(2) 579-582.e2. [Letter to Editor, IF: 11,003* (2011)]

- 25) Csuka D, Simon D, Hóbor R, Uray K, Prohászka Z, Bánlaki Z, Jani PK, Szilágyi Á, Hudecz F, Rajczy K, Beke G, Boros Major A, Tordai A, Illés Z, Berki T, Czirják L, Füst G. (2013) Serum concentration of IgG type antibodies against the whole EBNA-1 and its aa35-58 or aa398-404 fragments in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol*, 171:(3) 255-262. IF: 3,360* (2011)
- 26) Farkas H, Csuka D, Zotter Z, Szabó E, Czaller I, Varga L, Fejes J, Füst G, Harmat G. (2013) Treatment of attacks with plasma-derived C1-inhibitor concentrate in pediatric hereditary angioedema patients. *J Allergy Clin Immunol*, 131:(3) 909-911. [*Letter to Editor, IF: 11,003* (2011)*]
- 27) Horváth Z, Csuka D, Vargova K, Kovács A, Molnár AÁ, Lee S, Varga L, Kiss RG, Préda I, Füst G. (2013) Elevated C1rC1sC1inh levels independently predict atherosclerotic coronary heart disease. *Mol Immunol*, 54:(1) 8-13
IF: 2,897* (2011)
- 28) Csuka D, Czirják L, Hóbor R, Illes Z, Bánáti M, Rajczy K, Tordai A, Füst G. (2013) Effective humoral immunity against diphtheria and tetanus in patients with systemic lupus erythematosus or myasthenia gravis. *Mol Immunol*, 54:(3-4) 453-456. IF: 2,897* (2011)

A disszertáció témájától független publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: **62,165**.

**A folyóirat adott évre vonatkozó impakt faktora még nem érhető el.*

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném kifejezni köszönetem és hálám Témavezetőimnek, Prof. Farkas Henriette-nek és Prof. Prohászka Zoltánnak, munkám odaadó irányításáért, szakmai és emberi támogatásukért, valamint a rengeteg lehetőségért, hogy részt vehettem mind magyar, mind nemzetközi konferenciákon és publikációkban.

Külön köszönettel tartozom Témavezetőimnek azért, hogy biztosították a kutatáshoz szükséges anyagi és szakmai háttérrel, és hasznos kritikáikkal segítették fejlődésemet.

Témavezetőim és egyben példaképeim megmutatták, hogy mekkora áldás, ha az ember szereti a munkáját, és megismertették velem a kutatói hivatás szépségeit.

Végtelen hálával tartozom Dr. Varga Liliannak, korábbi tudományos diákköri témavezetőmnek, hogy bevezetett a komplement kutatások rejtelseibe, és bármikor fordulhattam Hozzá kérdéseimmel, mindvégig mellettem állt munkám során.

Fájdalommal átszőtt hálával gondolok Füst György Professzor Úrra, aki megelőlegezett bizalmával, aki által számtalan érdekes kutatásban és gyümölcsöző kollaborációban részt vehettem, aki újabb és újabb ötleteivel lelkesítően hatott rám, de aki sajnos már nincs közöttünk e sorok írásakor. Sosem felejttem el azokat az éveket, amikor szerencsém volt Füst György Professzor Úrral együtt dolgozni, és mindig emlékezni fogok optimista, kitaláló és példamutató szellemiségére.

Hálával tartozom Karádi István Professzor Úrnak, hogy lehetőséget teremtett PhD munkám elvégzéséhez a Semmelweis Egyetem III. Számú Belgyógyászati Klinikáján.

Külön köszönettel tartozom Dr. Cervenák Lászlónak és Dr. Szilágyi Ágnesnek hasznos tanácsaikért, akikhez mindig fordulhattam kérdéseimmel.

Végtelen köszönettel tartozom Prof. Peter Garred-nek és munkatársainak a koppenhágai laborban eltöltött hasznos hónapokért, valamint Marianne és Bernt Østergaard-nak értékes tanácsaikért, bátorításukért.

Hálásan köszönöm kollaborációs Partnereinknek, hogy bekapcsolódhattam rengeteg érdekes munkába: Prof. Illés Zsolt, Prof. Gergely Péter, Prof. Préda István, Prof. Hudecz Ferenc, Prof. Berki Tímea, Prof. Czirják László, Dr. Molvarec Attila, Dr. Gál Péter, Dr. Kádár Kata, Dr. Uray Katalin, Dr. Rajczy Katalin, Dr. Miklós Kata, Dr. Füst Ágnes, Dr. Horváth Zsófia, Prof. Konrad Bork, Prof. Rudolf Valenta, Dr. Teresa Caballero.

Szeretnék köszönetet mondani a vizsgálatban résztvevő betegeknek, hogy önzetlenül vállalták a kellemetlenségeket, és beleegyezésüket adták a vizsgálatokhoz.

Hálásan köszönöm Dóczy Andrásnének, Szendrei Zsuzsannának és Szigeti Antalnénak a laborban nyújtott türelmes és kimeríthetetlen segítséget; Bali Juditnak, hogy önzetlenül segített a klinikai adatok feldolgozásában; valamint Holeczky Rudolfnének a kedves szavakat, és folyamatos segítségét a hivatalos ügyek intézésében.

Végtelenül köszönöm kollégáimnak, hogy együtt dolgozhattam Velük rengeteg szerteágazó témában, és hálás vagyok minden jellegű támogatásukért, a baráti beszélgetésekért, és a jó hangulat megteremtéséért az évek során: Dr. Zotter Zsuzsanna, Kőhalmi Kinga Viktória, Takács Bea, Veszeli Nóra, Kajdácsi Erika, Dobi Mariann, Kiss Nóra, Dr. Jenei Zsigmond, Dr. Czaller Ibolya, Dr. Szabó Erika, Dr. Kelemen Zsuzsanna, Dr. Makó Vera, Dr. Bánlaci Zsófia, Dr. Gombos Tímea, Aladzsity István, Dr. Doleschall Márton, Dr. Széplaki Gábor, Jani Péter Károly, Dr. Harmat György.

Végül, de nem utolsó sorban hálás köszönettel tartozom a kitartó és pótolhatatlan támogatásért családomnak: Szüleimnek, Scher Gabriellának és Csuka Józsefnek; Testvéremnek, Csuka Zsófiának; Nagymamámnak, Scher Józsefnének; Nagypapámnak, Scher Józsefnek; valamint Keresztszüleimnek, Scher Ágotának, Csuka Györgynek és File Editnek.

Disszertációm nem jöhetett volna létre családom és barátaim támogatása, megértése, biztatása és gondoskodása nélkül, köszönöm Nektek a türelmet és a szeretetet!