

O papel das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59 em células de sangue periférico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Ana Paula Alegretti¹, Tamara Mucenic², João Carlos Tavares Brenol³, Ricardo Machado Xavier³

RESUMO

CD55 e CD59 são proteínas de membrana ancoradas por glicosilfosfatidilinositol que apresentam propriedades reguladoras da ativação da cascata do complemento. Essa regulação ocorre através da inibição da C3 convertase pelo CD55 e prevenção da etapa final de polimerização do complexo de ataque à membrana pelo CD59. Deficiência na expressão dessas proteínas pode estar associada a uma maior ativação do sistema complemento, inclusive do complexo de ataque à membrana, levando à morte celular. Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, com anemia hemolítica e linfopenia, parecem apresentar uma deficiência adquirida de CD55 e CD59. Contudo, os mecanismos que modulam essa diminuída expressão continuam desconhecidos e o seu impacto nas manifestações do lúpus eritematoso sistêmico precisa ser mais bem estudado.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico (LES), CD55, CD59, complemento.

INTRODUÇÃO

Sistema complemento

O sistema complemento (SC) é definido tradicionalmente como uma cascata de proteínas séricas solúveis ativadas sequencialmente, resultando em morte celular através da lise direta e/ou ativação de fagócitos. O SC dos mamíferos consiste em mais de 30 proteínas séricas e de membrana celular produzidas principalmente pelo fígado. Contudo, muitos tipos celulares como monócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais também podem sintetizar a maioria dos componentes do sistema complemento.¹

As evidências na literatura sugerem que o SC tem a capacidade de desempenhar função imunorregulatória importante através do seu papel na imunidade humoral,² modulação da imunidade de células T³ e regulação da tolerância para antígenos próprios nucleares.⁴ Apesar de ser bem reconhecido pelo seu papel altamente eficiente na defesa contra patógenos como bactérias, células infectadas por vírus e parasitas, o SC também vem chamando a atenção dos pesquisadores pelo seu potencial de dano às células do próprio organismo.⁵

A ativação da cascata do complemento pode ser iniciada através da via clássica (dependente de anticorpo), via alternativa (espontânea), ou via da lectina (mediada pela ligação da

Recebido em 14/10/2008. Aprovado, após revisão, em 18/02/2009. Declaramos a inexistência de conflitos de interesse.

Trabalho realizado na Unidade de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica e no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

1. Farmacêutica Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

2. Médica Reumatologista do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

3. Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da UFRGS

Endereço para correspondência: R. Ramiro Barcelos, 2.350, 2º andar – Serviço de Patologia Clínica – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). CEP 90035-003. Porto Alegre – RS. Telefone: (51) 2101-8315 E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

lectina-manose). Após a sua ativação, os fragmentos gerados do complemento atuam modulando as reações humorais e celulares, principalmente quimiotaxia e anafilaxia, através da interação desses fragmentos de ativação com receptores celulares ou pela deposição dos complexos proteicos na membrana celular.⁶

A via clássica, um potente mecanismo efetor da imunidade humoral, é ativada através da interação do componente C1 do complemento aos domínios da fração constante (FC) das imunoglobulinas (Ig) IgM ou IgG complexadas ao antígeno (complexo imune antígeno-anticorpo). O C1 é formado por três proteínas (C1q, C1r, C1s), e para que ocorra a ativação do complexo C1, pelo menos dois dos seus seis sítios globulares devem ligar-se às moléculas de Ig ligadas ao patógeno. Após essa ligação, o C1q sofre uma mudança conformacional que gera ativação do C1r e clivagem do C1s que, por sua vez, é capaz de clivar C4 e C2. O fragmento C4b liga-se à membrana celular do patógeno e permite a ligação de C2a; o complexo formado C4b2a é a C3 convertase da via clássica.^{7,8}

A via alternativa é ativada na ausência de anticorpo diretamente por partículas ricas em carboidratos presentes na superfície do micro-organismo invasor, envolvendo a ligação de C3b (presente de forma solúvel no plasma) e demais componentes da via alternativa: o fator B, o fator D e a properdina (fator P).⁹ O fator B consiste em uma serina protease, homóloga a C2. O fator B, após sua clivagem pelo fator D, liga-se ao C3b formando C3bBb (C3 convertase da via alternativa). A properdina tem a capacidade de estabilizar o complexo C3bBb, que pode clivar outras moléculas de C3.¹⁰

A via das lectinas é ativada através da ligação da lectina ligante da manose (MBL – *mannose-binding lectin*), um componente solúvel no nosso organismo, com carboidratos presentes na superfície do micro-organismo alvo. A MBL é membro da família das lectinas dependentes de cálcio e possui a estrutura semelhante ao C1q. Após sua ativação, ocorre a interação com serino-proteases associadas à MBL (MASPs – *MBL-associated serine protease*), que incluem MASP-1, MASP-2 e MASP-3, que clivam estruturas do complemento C4 e C2 gerando a C3 convertase (C4b2a) e C5 convertase (C4b2a3b).^{11,12}

Portanto, as três vias de ativação convergem para a geração de enzimas proteolíticas, denominadas C3 convertases, que clivam a proteína C3 em C3a e C3b. O fragmento C3b gerado se combina com a C3-convertase, dando origem à C5-convertase, a qual cliva C5 em C5a e C5b. Os fragmentos C3a e C5a são potentes anafilatoxinas. O fragmento C5b se agrega com C6 e C7 para formar o complexo de inserção C5b-7; após esta etapa, ocorre o recrutamento de C8 e múltiplas unidades de C9 na membrana da célula-alvo, formando o complexo de ataque à membrana

(MAC – *membrane attack complex*).^{13,14} A unidade funcional do MAC (Figura 1) é um poro inserido na bicamada fosfolipídica que interfere na propriedade de permeabilidade seletiva da membrana, permitindo a entrada de água, íons e pequenas moléculas para o citosol da célula-alvo, levando à sua ruptura.¹⁵

Além de uma ação efetora contra os patógenos, o complemento tem outras atividades biológicas no organismo, como opsonização e fagocitose, solubilização e remoção de complexos imunes e de células apoptóticas, interface entre a imunidade inata e adaptativa, e ação pró-inflamatória. Esses efeitos ocorrem através da ligação dos produtos de ativação com receptores de membrana específicos presentes em diferentes tipos de células.^{1,6,13}

Quando o complemento é ativado por anticorpos direcionados a antígenos de origem externa, mas também eventualmente a antígenos próprios, a ativação explosiva e inespecífica da via comum final e a formação excessiva de mediadores da inflamação podem causar danos a tecidos e células autólogas. Para proteger ou conter esses danos, o SC é fortemente regulado por substâncias solúveis ou ligadas à membrana celular.¹⁶

PROTEÍNAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO CD55/CD59

As células normais, que são resistentes à lise autóloga mediada pelo complemento, possuem um sistema regulador do comple-

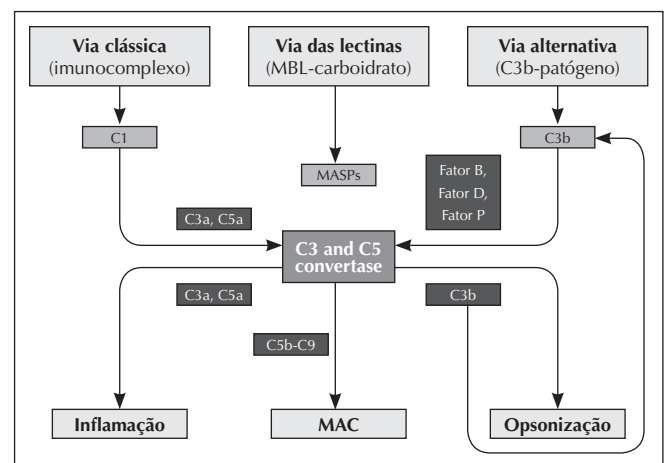


Figura 1. O complemento pode ser ativado através da via clássica, da via das lectinas e da via alternativa. O componente C1 é composto de C1q, C1r e C1s e reconhece o imunocomplexo ligado à membrana celular; a lectina ligante da manose (MBL) reconhece certos carboidratos na membrana de alguns patógenos específicos; e o C3b reconhece carboidratos presentes na membrana dos patógenos. Todas as vias de ativação originam a formação da C3 e C5 convertase, que geram as anafilatoxinas C3a e C5a, a opsonina C3b e o complexo de ataque à membrana (MAC). O C3b também amplifica a via alternativa. Figura adaptada de *Nature Reviews Immunology*.⁷⁰

mento na membrana celular constituído por proteínas, sendo as principais o CD55, o fator acelerador de degradação (DAF – *decay accelerating factor*), e o CD59, ou inibidor da lise de membrana (MIRL – *membrane inhibitor of reactive lysis*) (Tabela 1). O CD55 inibe a formação de novas C3 e C5 convertases, prevenindo a clivagem de C3 e C5, além de acelerar a degradação dessas enzimas pré-formadas.¹⁷ A proteína CD59 é o único regulador de membrana que interfere diretamente na estruturação do MAC através de sua incorporação física ao complexo em formação, impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8¹⁸ (Figura 2).

O CD55, revisado em Mikesch *et al.*,¹⁹ é uma glicoproteína globular ancorada à membrana celular pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI), com peso molecular que varia de 50 a 100 kDa em diferentes tipos celulares. É detectado de forma solúvel no plasma, lágrima, saliva, urina, líquido sinovial e líquor.²⁰ Além de regulador do complemento, o CD55 parece proteger as células contra a lise mediada por células matadoras naturais

Tabela 1

Principais funções inibidoras das proteínas reguladoras do complemento CD55/CD59:

| Proteína | Função reguladora do complemento |
|----------|--|
| CD55 | Previne a formação de novas enzimas C3 e C5 convertases, além de acelerar a degradação dessas enzimas pré-formadas. |
| CD59 | Interfere na estruturação do MAC através de sua incorporação física ao complexo em formação, impedindo a ligação das unidades de C9 ao complexo C5b-8. |

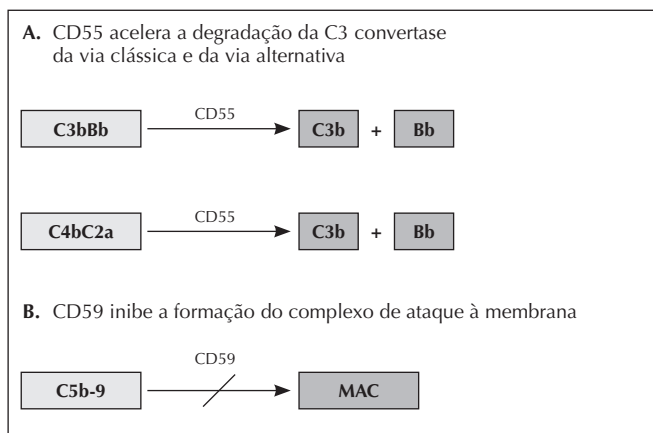


Figura 2. As glicoproteínas de membrana CD55 e CD59 regulam o sistema complemento do ataque às células do próprio organismo: CD55 promove a degradação da C3 convertase da via alternativa (C3bBb) e da via clássica e da via das lectinas (C4bC2a), e também a degradação das C5 convertases (não apresentadas); o CD59 inibe a formação do MAC (C5b-9) através da inserção da molécula durante a junção dos componentes C5b, C6, C7, C8 e C9 na membrana celular. Figura adaptada de *Nature Reviews Immunology*.⁷⁰

(células NK – *natural killers*). O CD55 pode também atuar como um ligante de adesão intercelular, interagindo com o CD97 nos leucócitos, e como um receptor para certos vírus e micro-organismos.²¹

O CD59, revisado por Kimberley *et al.*,¹⁶ é uma glicoproteína globular pequena, também ancorada pelo GPI, de aproximadamente 20 kDa, pertencente à família do antígeno leucocitário 6 (Ly-6). Devido ao papel crucial na prevenção de danos ao próprio organismo através da deposição inapropriada do complexo lítico MAC, essa proteína é amplamente expressa na maioria dos tecidos e em todas as células circulantes.

A consequência patológica da deficiência de reguladores do complemento presentes na membrana foi inicialmente reconhecida na hemoglobinúria paroxística noturna (HPN). Essa doença hematológica adquirida foi primeiramente descrita em 1866, por William Gull, e por Paul Strubing, em 1882, como uma forma distinta de anemia hemolítica rara, associada à hemoglobinúria durante a noite.²² A HPN é caracterizada pelo aumento da lise dos eritrócitos devido à diminuição de proteínas de membrana ligada a GPI, principalmente CD55 e CD59, responsáveis por inibir a lise celular autóloga do complemento.²³

A HPN é uma desordem clonal na qual ocorre uma mutação no gene PIG-A (*fosfatidilinositolglican A*) do cromossomo X, acarretando a biossíntese anormal da âncora GPI para membrana lipídica.²² Por se tratar de uma desordem clonal nas células-tronco hematopoéticas, todas as linhagens celulares do sangue são afetadas, sendo que nos pacientes com HPN normalmente são encontradas subpopulações de células deficientes e normais. Dentre as proteínas ancoradas pela GPI estão as regulatórias do complemento, como CD55, CD59 e CD46 (proteína cofator de membrana); e outras proteínas envolvidas na função imune,^{24,25} como o receptor FC (CD16) em granulócitos e células NK, receptor lipopolissacarídeo (CD14) em monócitos, molécula de adesão celular (CD58) em todas as células hematopoéticas e o CD24 em linfócitos, com atividade ainda desconhecida.

Há poucos relatos na literatura sobre o padrão de expressão normal dessas proteínas nas células sanguíneas. Araten *et al.*,²⁶ em 1999, e Hu *et al.*,²⁷ em 2005, demonstraram que clones com mutação no gene da PIG-A são encontrados em indivíduos normais. Oelschlaegel *et al.*,²³ em 2001, analisaram por citometria de fluxo (CF) amostras de sangue de 52 doadores saudáveis e observaram 3% de deficiência de CD55/CD59 nos eritrócitos e granulócitos normais. A deficiência isolada de CD55 em humanos não foi associada à hemólise intravascular ou a outra evidência de falha na regulação do complemento. Contudo, a deficiência isolada de CD59 esteve associada a sinais e sintomas semelhantes à HPN²⁸ devido ao fato de o CD59 ser um inibidor

mais efetivo do complemento, pois bloqueia a formação do complexo de ataque à membrana.

A deficiência de CD55 e CD59 tem sido estudada em outras doenças e correlacionada com sua gravidade.²⁹⁻³⁶ Yamaguchi *et al.*,³⁷ demonstraram que 28,6% dos pacientes com anemia aplásica (AA) e 27,8% dos pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) apresentaram uma população deficiente de CD59 nos eritrócitos. Wang *et al.*³⁸ observaram uma diminuição significativa de CD55 e CD59 em 52% dos neutrófilos de pacientes com AA não tratados. Essa deficiência acarreta processos hemolíticos mediados pelo complemento semelhantes aos encontrados na HPN.

Isoda *et al.*,³⁹ em 2007, avaliaram 40 indivíduos saudáveis por citometria de fluxo como controle para avaliar se pacientes com DLLG (doença linfoproliferativa de linfócitos granulares) compartilhavam um fenótipo HPN. O valor de corte (*cutoff*) obtido para a proporção de células negativas em indivíduos saudáveis foi abaixo de 0,04% em granulócitos e abaixo de 0,07% nos eritrócitos, tanto para CD55 como para CD59. As células dos pacientes com DLLG não demonstraram alteração da expressão de CD55 e CD59, com exceção dos linfócitos granulares com fenótipo CD16+CD56-, os quais apresentaram deficiência dessas proteínas.

A resistência de células cancerígenas à lise mediada pelo complemento é uma das estratégias adquiridas por essas células, caracterizando um obstáculo no desenvolvimento de imunoterapias baseadas em anticorpos antitumor que fixam complemento.⁴⁰ Recentemente, estudos avaliaram a superexpressão de proteínas reguladoras do complemento em células e tecidos como um mecanismo de defesa celular contra um ataque exacerbado do sistema complemento.⁴¹⁻⁴⁵ Esse mecanismo pode gerar resistência a drogas utilizadas na imunoterapia com ação mediada pelo complemento, como é o caso do rituximabe, anticorpo monoclonal quimérico direcionado à molécula CD20, que promove a depleção de linfócitos B. Acredita-se que um dos mecanismos de ação seja a sinalização e indução de apoptose da célula B mediada pelo complemento. Esta droga tem sido cada vez mais utilizada como um tratamento eficiente e específico, principalmente em linfoproliferações B (especialmente linfomas) e doenças autoimunes.⁴⁶⁻⁴⁹

PROTEÍNAS REGULADORAS DO COMPLEMENTO CD55/CD59 EM DOENÇAS AUTOIMUNES

Os recentes estudos em modelos animais de doenças autoimunes concomitante com a remoção de proteínas reguladoras do complemento, através da adição de anticorpos monoclonais ou

da deleção gênica.⁵⁰⁻⁵³ têm avaliado o papel do CD55 e CD59 nas células do organismo.⁵⁴

Dentre as patologias estudadas neste contexto está a esclerose múltipla (EM), que é uma das doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC), mais frequentemente em adultos jovens. Sua etiologia é ainda desconhecida, mas há evidências de formação de autoanticorpos contra antígenos presentes na camada de mielina. Na EM, a perda de mielina (desmielinização) interfere na transmissão dos impulsos, provocando sintomas variados da doença.⁵⁵ Alguns experimentos com deficiência gênica de CD55 e CD59^{50,51} em modelo de encefalomielite autoimune experimental (modelo animal para estudos de EM) têm demonstrado que esses animais apresentaram um grau mais grave da doença quando comparados aos controles. Mead *et al.* também reportaram que ratos deficientes de C6, incapazes de formar o MAC, não apresentaram dano de axônio nem desmielinização, e as manifestações clínicas foram menos intensas.⁵⁶

Os autoanticorpos contra citoplasma de neutrófilos (ANCA – *anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies*) são antiproteínas citoplasmáticas específicas de neutrófilos e monócitos, sendo a mieloperoxidase e a proteinase 3 os principais antígenos-alvo em pacientes com vasculites e glomerulonefrites. Xiao *et al.*⁵⁷ sugerem que a estimulação de neutrófilos por ANCA causa a liberação de fatores que ativam o complemento através da via alternativa, levando a amplificação inflamatória da doença. Matsuo *et al.*⁵⁸ relataram que a neutralização com anticorpos monoclonais anti-CD59 em células renais de ratos confere uma exacerbação da doença em modelos experimentais de glomerulonefrite.

Na miastenia grave (mg) o sistema imune produz anticorpos contra os receptores nicotínicos de acetilcolina localizados na junção neuromuscular, impedindo a ativação muscular. Sugere-se que haja participação do sistema complemento na patologia da mg com base na identificação de produtos de ativação do complemento no plasma e depósito na placa motora dos pacientes.⁵⁹ Kaminski *et al.* demonstraram em estudos com camundongos que o aumento da expressão de CD55 e CD59 protege contra a perda de receptores de acetilcolina e diminui o sintoma de fraqueza muscular.³¹

O PAPEL DO COMPLEMENTO E DAS PROTEÍNAS CD55/CD59 EM CITOPENIAS SECUNDÁRIAS AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES)

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica que acomete principalmente mulheres jovens. É caracterizada por acometer múltiplos órgãos e apresentar alterações da resposta imunológica, com presença de anticorpos dirigidos

contra proteínas do próprio organismo.⁶⁰ Anormalidades hematológicas são comumente encontradas em pacientes com LES, sendo anemia e linfopenia as alterações mais frequentes.⁶¹⁻⁶³ A anemia de doença crônica, por deficiência de ferro, e a anemia hemolítica autoimune (AHAI) são as formas mais comuns em pacientes com LES, podendo ocorrer ainda mielotoxicidade induzida por drogas e anemia devido à falência renal crônica.⁶⁴ A linfopenia está presente particularmente durante a doença ativa e é fortemente associada a crioglobulinas IgM, fixação do complemento e anticorpos antilinfócitos. Autoanticorpos direcionados contra as células sanguíneas podem causar lise celular por mecanismos de citotoxicidade dependente de anticorpo, opsonização, bloqueio de receptores e apoptose, entre outros.⁴²

Os anticorpos produzidos nas doenças autoimunes podem se ligar a antígenos de superfícies celulares ou formar complexos imunes após a ligação com antígenos circulantes. Esses complexos imunes tendem a se depositar em órgãos, como o glomérulo renal, com subsequente ativação do sistema complemento através da via clássica, causando dano aos tecidos.⁶ Apesar da reconhecida ação efetora do complemento no dano aos órgãos em doenças autoimunes, pouco se conhece sobre o mecanismo das proteínas reguladoras de membrana do complemento na modulação da gravidade desse dano.⁶⁵

Um trabalho publicado por Miwa *et al.*⁶⁶ demonstrou que a deleção do gene *Daf-1*, que codifica a molécula CD55, em camundongos MRL/lpr, modelo experimental amplamente utilizado para estudar LES, exacerbou a gravidade da doença autoimune. Esses animais apresentaram linfadenopatia e esplenomegalia acentuadas, maiores níveis de anticorpos anticromatina e dermatite mais grave do que os controles.

Pouco se tem estudado até hoje sobre o perfil de expressão de CD55 e CD59 nos linfócitos e eritrócitos de pacientes com LES,⁶⁷ e nenhum estudo avaliou expressão nos granulócitos e monócitos. Richaud-Patin *et al.*,⁶⁸ por exemplo, avaliaram a intensidade de expressão de CD55 e CD59 na membrana de eritrócitos de pacientes com AHAI, e foi encontrada uma redução destas proteínas nos eritrócitos de pacientes lúpicos que apresentam AHAI secundária. Nesse estudo, os autores avaliaram a presença de anticorpos antifosfolípidios IgG e IgM, e não foi encontrada nenhuma correlação entre a presença dessas imunoglobulinas e a expressão de CD55 e CD59.

Posteriormente, os mesmos autores⁴² investigaram a intensidade de expressão de CD55 e CD59 em linfócitos T e B de pacientes com LES com e sem linfopenia e demonstraram que as células de pacientes com linfopenia apresentavam diminuição de expressão de CD55 e CD59 quando comparados com os controles. De maneira interessante, encontraram que, nos pacientes com LES que não apresentaram linfopenia, os

linfócitos apresentavam maior intensidade dessas proteínas do que os controles. Outro achado do estudo é que a titulação dos autoanticorpos testados (anti-SSA, anti-dsDNA e anti-P ribossomal) foi maior nos pacientes linfopênicos. Contudo, a prevalência de positividade dos anticorpos foi igual, com exceção do anti-SSA, que foi significativamente maior no grupo dos pacientes com linfopenia, achados que corroboram os relatados previamente na literatura.^{63,65,67,68}

Com o objetivo de avaliar a apoptose *in vitro* nas doenças autoimunes, Tsunoda *et al.*⁶⁹ observaram uma expressão diminuída de CD59 nos linfócitos T CD8+, mas não em linfócitos T CD4+, tanto nos pacientes com LES quanto nos pacientes com síndrome de Sjögren, e de forma predominante nas células T CD8+ ativadas expressando CD45RO+ e HLADR+. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que células T CD8+CD59^{dim} (baixa expressão) foram mais suscetíveis à apoptose *in vitro*. De acordo com os dados encontrados nesse estudo, os autores sugerem que a diminuição da expressão de CD59 em células T CD8+ ativadas poderia se relacionar com a atividade da doença e a ativação ou indução da apoptose nesses pacientes.

Arora *et al.*⁴³ avaliaram a expressão de CR1 (receptor 1 do complemento), CD55 e CD59 em eritrócitos e células do glomérulo de pacientes lúpicos com glomerulonefrite proliferativa difusa (GPD); a expressão de CR1 estava diminuída nos pacientes com LES e GPD, tanto nos eritrócitos, quanto nas células do glomérulo, e, de forma interessante, CD55 e CD59 estavam aumentados nessas células. Os autores sugerem que esse aumento de CD55 e CD59 acontece por compensação da expressão reduzida de CR1 (regulador do complemento C3 e C5 convertase) e como uma tentativa da célula para se proteger contra a ação do complemento.

CONCLUSÃO

Poucos estudos sobre o perfil de expressão de CD55 e CD59 em pacientes com LES são encontrados na literatura. A deficiência adquirida dessas proteínas no LES não parece ser dependente de mutações genéticas, como ocorre na HPN, e também não foi correlacionada à produção de autoanticorpos. Por outro lado, parece haver uma associação com a atividade da doença. Além disso, o papel destas proteínas na indução de citopenias do LES não está ainda bem definido. Contudo, estudos sugerem que níveis de expressão celular de CD55 e CD59 abaixo do normal conferem uma baixa proteção à lise exacerbada mediada pelo complemento. De maneira interessante, células que expressam níveis elevados dessas proteínas parecem estar envolvidas com mecanismo de proteção às ações citolíticas do complemento.

REFERÊNCIAS

REFERENCES

1. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(14):1058-66.
2. Molina H, Holers VM, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner J *et al*. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(8):3357-61.
3. Kaya Z, Afanasyeva M, Wang Y, Dohmen KM, Schlichting J, Tretter T *et al*. Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. *Nat Immunol* 2001;2(8):739-45.
4. Carroll MC. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol* 2000;74:61-88.
5. Welch TR. Complement in glomerulonephritis. *Nat Genet* 2002;31(4):333-4.
6. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001;344(15):1140-4.
7. Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH. Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol* 1987;5:21-42.
8. Gewurz H, Ying SC, Jiang H, Lint TF. Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst Mitt* 1993;(93):138-47.
9. Farries TC, Lachmann PJ, Harrison RA. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. *Biochem J* 1988;252(1):47-54.
10. Gupta R, Ahuja T, Agraharkar M. Disorders of the complement system: an overview. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2002;13(2):119-25.
11. Monticielo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA. The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008;27(4):413-9.
12. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T *et al*. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 2001;15(1):127-35.

13. Song WC, Sarrrias MR, Lambris JD. Complement and innate immunity. *Immunopharmacology* 2000;49(1-2):187-98.
14. Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends in immunology* 2002;23(2):61-4.
15. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J* 1989;264(1):1-14.
16. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Molecular immunology* 2007;44(1-3):73-81.
17. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol* 1989;7:35-58.
18. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D *et al.* CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol* 2002;539(Pt 2):537-45.
19. Mikesch JH, Buerger H, Simon R, Brandt B. Decay-accelerating factor (CD55): a versatile acting molecule in human malignancies. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766(1):42-52.
20. Medof ME, Walter EI, Rutgers JL, Knowles DM, Nussenzweig V. Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. *J Exp Med* 1987;165(3):848-64.
21. Hamann J, Vogel B, van Schijndel GM, van Lier RA. The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *J Exp Med* 1996;184(3):1185-9.
22. Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455(2-3):269-86.
23. Oelschlaegel U, Besson I, Arnoulet C, Sainy D, Nowak R, Naumann R *et al.* A standardized flow cytometric method for screening paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) measuring CD55 and CD59 expression on erythrocytes and granulocytes. *Clin Lab Haematol* 2001;23(2):81-90.
24. Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1989;84(1):7-17.
25. Blanchard D, Navenot JM, Petit-Le Roux Y, Willem C, Loirat MJ. Flow cytometry and immunoblotting analysis of monoclonal antibodies directed to complement regulatory proteins. *Transfus Clin Biol* 1997;4(1):131-4.
26. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(9):5209-14.
27. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005;105(10):3848-54.
28. Motoyama N, Okada N, Yamashina M, Okada H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria due to hereditary nucleotide deletion in the HRF20 (CD59) gene. *Eur J Immunol* 1992;22(10):2669-73.
29. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Konstantopoulos K, Komninaka V *et al.* Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anaemia, myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. *Haematologia (Budap)* 2001;31(1):7-16.
30. Azenishi Y, Ueda E, Machii T, Nishimura J, Hirota T, Shibano M *et al.* CD59-deficient blood cells and PIG-A gene abnormalities in Japanese patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1999;104(3):523-9.
31. Kaminski HJ, Kusner LL, Richmonds C, Medof ME, Lin F. Deficiency of decay accelerating factor and CD59 leads to crisis in experimental myasthenia. *Exp Neurol* 2006;202(2):287-93.
32. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Apostolidou E, Komninaka V *et al.* Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with plasma cell dyscrasias. *Int J Hematol* 2002;75(1):40-4.
33. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Apostolidou E, Komninaka V *et al.* Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with lymphoproliferative syndromes. *Hematol J* 2001;2(1):33-7.
34. Ruiz P, Wepler D, Tryphonopoulos P, Nishida S, Moon J, Kato T *et al.* CD55 and CD59 deficiency in transplant patient populations: possible association with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-like symptoms in Campath-treated patients. *Transplant Proc* 2006;38(6):1750-2.
35. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M *et al.* Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107(4):1308-14.
36. Yang LB, Li R, Meri S, Rogers J, Shen Y. Deficiency of complement defense protein CD59 may contribute to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2000;20(20):7505-9.
37. Yamaguchi M, Machii T, Azenishi Y, Nishimura J, Shibano M, Kanakura Y *et al.* Detection of small populations of CD59-deficient erythrocytes in patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome and normal individuals. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26(3):247-54.
38. Wang H, Chuhjo T, Yamazaki H, Shiobara S, Teramura M, Mizoguchi H *et al.* Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal hemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: the high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol* 2001;66(3):200-5.
39. Isoda A, Tsukamoto N, Mitsui T, Yamane A, Hatsumi N, Matsushima T *et al.* Expression of CD55 and CD59 on peripheral blood cells in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Int J Lab Hematol* 2007;29(1):52-7.
40. Green MC, Murray JL, Hortobagyi GN. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat Rev* 2000;26(4):269-86.
41. Li SH, Szmítko PE, Weisel RD, Wang CH, Fedak PW, Li RK *et al.* C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation* 2004;109(7):833-6.
42. Garcia-Valladares I, Atisha-Fregoso Y, Richaud-Patin Y, Jaquez-Ocampo J, Soto-Vega E, Elias-Lopez D *et al.* Diminished expression of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Lupus* 2006;15(9):600-5.
43. Arora M, Arora R, Tiwari SC, Das N, Srivastava LM. Expression of complement regulatory proteins in diffuse proliferative glomerulonephritis. *Lupus* 2000;9(2):127-31.
44. Cuida M, Legler DW, Eidsheim M, Jonsson R. Complement regulatory proteins in the salivary glands and saliva of Sjogren's syndrome patients and healthy subjects. *Clin Exp Rheumatol* 1997;15(6):615-23.

45. Qin C, Cai XY. [Research progression on complement regulatory proteins CD46, CD55, and CD59 in tumor immunotherapy]. *Ai Zheng* 2006;25(11):1450-3.
46. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V, Bernasconi S, Borleri G, Barbui T *et al*. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001;98(12):3383-9.
47. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, Lazzari M, Borleri GM, Bernasconi S *et al*. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000;95(12):3900-8.
48. Takei K, Yamazaki T, Sawada U, Ishizuka H, Aizawa S. Analysis of changes in CD20, CD55, and CD59 expression on established rituximab-resistant B-lymphoma cell lines. *Leuk Res* 2006;30(5):625-31.
49. Thatayatikom A, White AJ. Rituximab: a promising therapy in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006;5(1):18-24.
50. Mead RJ, Neal JW, Griffiths MR, Linington C, Botto M, Lassmann H *et al*. Deficiency of the complement regulator CD59a enhances disease severity, demyelination and axonal injury in murine acute experimental allergic encephalomyelitis. *Lab Invest* 2004;84(1):21-8.
51. Liu J, Miwa T, Hilliard B, Chen Y, Lambris JD, Wells AD *et al*. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo. *J Exp Med* 2005;201(4):567-77.
52. Tuzun E, Saini SS, Morgan BP, Christadoss P. Complement regulator CD59 deficiency fails to augment susceptibility to actively induced experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2006;181(1-2):29-33.
53. Lin F, Salant DJ, Meyerson H, Emancipator S, Morgan BP, Medof ME. Respective roles of decay-accelerating factor and CD59 in circumventing glomerular injury in acute nephrotoxic serum nephritis. *J Immunol* 2004;172(4):2636-42.
54. Holt DS, Botto M, Bygrave AE, Hanna SM, Walport MJ, Morgan BP. Targeted deletion of the CD59 gene causes spontaneous intravascular hemolysis and hemoglobinuria. *Blood* 2001;98(2):442-9.
55. Lutterotti A, Berger T, Reind LM. Biological markers for multiple sclerosis. *Curr Med Chem* 2007;14(18):1956-65.
56. Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H, Morgan BP. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 2002;168(1):458-65.
57. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 2007;170(1):52-64.
58. Matsuo S, Nishikage H, Yoshida F, Nomura A, PiddLesden SJ, Morgan BP. Role of CD59 in experimental glomerulonephritis in rats. *Kidney Int* 1994;46(1):191-200.
59. Chamberlain-Banoub J, Neal JW, Mizuno M, Harris CL, Morgan BP. Complement membrane attack is required for endplate damage and clinical disease in passive experimental myasthenia gravis in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2006;146(2):278-86.
60. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2007;369(9561):587-96.
61. Keeling DM, Isenberg DA. Haematological manifestations of systemic lupus erythematosus. *Blood Rev* 1993;7(4):199-207.
62. Nossent JC, Swaak AJ. Prevalence and significance of haematological abnormalities in patients with systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1991;80(291):605-12.
63. Wenzel J, Gerdson R, Uerlich M, Bauer R, Tueting T, Bieber T. Lymphocytopenia in lupus erythematosus: close in vivo association to autoantibodies targeting nuclear antigens. *Br J Dermatol* 2004;150(5):994-8.
64. Voulgarelis M, Kokori SI, Ioannidis JP, Tzioufas AG, Kyriaki D, Moutsopoulos HM. Anaemia in systemic lupus erythematosus: aetiological profile and the role of erythropoietin. *Ann Rheum Dis* 2000;59(3):217-22.
65. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 2006;118(2-3):127-36.
66. Miwa T, Maldonado MA, Zhou L, Sun X, Luo HY, Cai D *et al*. Deletion of decay-accelerating factor (CD55) exacerbates autoimmune disease development in MRL/lpr mice. *Am J Pathol* 2002;161(3):1077-86.
67. Ruiz-Arguelles A, Llorente L. The role of complement regulatory proteins (CD55 and CD59) in the pathogenesis of autoimmune hemocytopenias. *Autoimmun Rev* 2007;6(3):155-61.
68. Richaud-Patin Y, Perez-Romano B, Carrillo-Maravilla E, Rodriguez AB, Simon AJ, Cabiedes J *et al*. Deficiency of red cell bound CD55 and CD59 in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology letters* 2003;88(2):95-9.
69. Tsunoda S, Kawano M, Koni I, Kasahara Y, Yachie A, Miyawaki T *et al*. Diminished expression of CD59 on activated CD8+ T cells undergoing apoptosis in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* 2000;51(3):293-9.
70. Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2007;7(1):9-18.