

# A komplement alternatív út regulációjának szerepe hemolitikus urémiás szindrómában

Doktori értekezés

**Szarvas Nóra**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Tory Kálmán, PhD, adjunktus

Dr. Haris Ágnes, PhD, főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Ligeti Erzsébet, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Prechl József, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest  
2015

## TARTALOMJEGYZÉK

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2. BEVEZETÉS .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2.1. A trombotikus mikroangiopátiák klasszifikációja .....</b>                   | <b>6</b>  |
| 2.1.1. HUS fertőzéses eredettel.....  | 8         |
| 2.1.1.1. <i>Shiga-like toxint termelő baktériumok okozta HUS</i> .....              | 8         |
| 2.1.1.2. <i>Neuraminidázt termelő kórokozók okozta HUS</i> .....                    | 8         |
| 2.1.2. Atípusos HUS a komplement-reguláció károsodása miatt.....                    | 9         |
| 2.1.2.1. <i>Szerzett komplement-regulációs zavarok okozta HUS</i> .....             | 10        |
| 2.1.2.2. <i>A komplement-reguláció zavara genetikai eltérések miatt</i> .....       | 10        |
| 2.1.3. TTP a von Willebrand faktor hasító proteáz (ADAMTS13) károsodása miatt ..... | 12        |
| 2.1.4. HUS, egyéb formák .....  | 13        |
| 2.1.5. Kinin-indukált formák .....  | 13        |
| 2.1.6. Szekunder TTP/HUS szindróma.....   | 13        |
| <b>2.2. A komplementrendszer működése .....</b>                                     | <b>14</b> |
| 2.2.1. A komplement-aktiválódás klasszikus útja.....                                | 15        |
| 2.2.2. A komplement-aktiválódás lektin útja .....                                   | 16        |
| 2.2.3. A komplement-aktiválódás alternatív útja .....                               | 16        |
| 2.2.4. A komplement-aktiválódás szabályozása .....                                  | 17        |
| <b>2.3. Az alternatív út diszregulációjának okai aHUS-ban .....</b>                 | <b>19</b> |
| 2.3.1. H-faktor.....  | 19        |
| 2.3.2. MCP.....   | 21        |
| 2.3.3. I-faktor.....  | 23        |
| 2.3.4. C3.....  | 24        |
| 2.3.5. B-faktor.....  | 25        |
| 2.3.6. Trombomodulin .....  | 26        |
| <b>3. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>4. MÓDSZEREK .....</b>   | <b>29</b> |
| 4.1. Vizsgált személyek .....   | 29        |
| 4.2. Mintavétel és tárolás.....   | 30        |
| 4.3. DNS izolálás.....  | 30        |
| 4.4. A DNS koncentráció meghatározása.....  | 30        |
| 4.5. Mutációanalízis .....  | 31        |
| 4.5.1. PCR.....   | 31        |
| 4.5.2. Agaróz gélelektroforézis .....   | 34        |
| 4.5.3. A PCR termékek tisztítása .....  | 35        |
| 4.5.4. Szekvenálási reakció.....  | 35        |
| 4.5.5. Na-acetát-etanolos tisztítás .....   | 38        |
| 4.5.6. A minták feloldása, denaturálás, kapilláris elektroforézis .....             | 38        |
| 4.5.7. A szekvenciák értékelése .....   | 38        |
| 4.6. A H-faktor polimorfizmusok genotipizálása PCR-RFLP-vel .....                   | 39        |
| 4.6.1. PCR amplifikáció.....  | 39        |
| 4.6.2. A PCR termékek restrikciós emésztése .....                                   | 40        |
| 4.7. Valós idejű PCR (Real Time PCR).....   | 41        |
| 4.8. Multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (MLPA) .....                        | 41        |
| 4.9. Az aktivációs utak és komplementfehérjék mérése .....                          | 41        |
| 4.10. Allélspecifikus H-faktor szint mérése.....                                    | 42        |
| 4.11. H-faktor hemolitikus teszt.....   | 43        |
| 4.12. Statisztikai módszerek.....   | 43        |
| 4.13. In silico predikciók .....  | 44        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>5. EREDMÉNYEK</b> .....  | <b>45</b>  |
| <b>5.1. Az aHUS betegek klinikai jellemzői és laboratóriumi paramétere</b> .....            | <b>45</b>  |
| 5.1.1. A betegség lefolyásának vizsgálata.....  | 45         |
| 5.1.2. A betegek komplementprofiljának vizsgálata.....                                      | 49         |
| <b>5.2. Az aHUS betegek genetikai vizsgálata</b> .....                                      | <b>50</b>  |
| 5.2.1. A szekvenálási reakciók beállítása.....  | 50         |
| 5.2.1.1. PCR primerek tervezése.....  | 50         |
| 5.2.1.2. A PCR reakciók optimalizálása.....   | 50         |
| 5.2.1.3. Szekvenáló primerek tervezése.....   | 52         |
| 5.2.1.4. A kromatogramok feldolgozása.....  | 52         |
| 5.2.2. Az aHUS betegek genetikai vizsgálatainak eredményei.....                             | 53         |
| 5.2.3. Az újonnan azonosított mutációk várható hatásának <i>in silico</i> prediktálása..... | 58         |
| <b>5.3. A H-faktor mutációk funkcionális hatásának vizsgálata</b> .....                     | <b>60</b>  |
| 5.3.1. A H-faktor hemolitikus teszt eredményei .....  | 60         |
| 5.3.2. Allél-specifikus H-faktor fehérjeszint mérése .....                                  | 62         |
| 5.3.2.1. Az allélspecifikus H-faktor ELISA optimalizálása.....                              | 62         |
| 5.3.2.2. Az allél-specifikus H-faktor fehérjeszint mérés eredményei .....                   | 65         |
| <b>5.4. A H3 haplotípus kapcsolata a H-faktor fehérjeszinttel</b> .....                     | <b>66</b>  |
| <b>5.5. Komplement- és genetikai analízis pHUS betegekben</b> .....                         | <b>67</b>  |
| 5.5.1. A pHUS betegek komplementprofilja.....   | 68         |
| 5.5.2. A pHUS betegek genetikai vizsgálata.....   | 69         |
| <b>6. MEGBESZÉLÉS</b> .....   | <b>71</b>  |
| 6.1. Az aHUS betegek klinikai jellemzőinek és laboratóriumi paramétereinek vizsgálata ...   | 71         |
| 6.2. Az aHUS betegek genetikai vizsgálata .....   | 75         |
| 6.3. A H-faktor mutációk funkcionális vizsgálata.....                                       | 78         |
| 6.4. A H3 haplotípus kapcsolata a H-faktor fehérjeszinttel .....                            | 84         |
| 6.5. A komplement diszreguláció szerepének vizsgálata pHUS-ban .....                        | 85         |
| <b>7. KÖVETKEZTETÉSEK</b> .....   | <b>88</b>  |
| <b>8. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....   | <b>90</b>  |
| <b>9. SUMMARY</b> .....   | <b>91</b>  |
| <b>10. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....  | <b>92</b>  |
| <b>11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE</b> .....   | <b>115</b> |
| 11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények .....  | 115        |
| 11.2. A disszertációtól független közlemények .....   | 116        |
| <b>12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....  | <b>117</b> |

**1. Rövidítések jegyzéke**

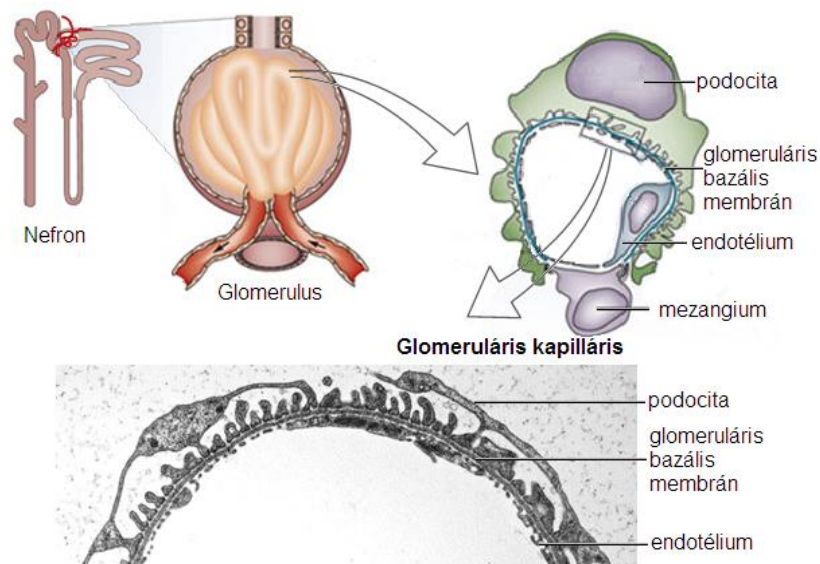
|           |   |
|-----------|---|
| ADAMTS13: | a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 |
| ANA:      | anafilatoxin  |
| AP:       | alternatív reakcióút  |
| BF:       | B-faktor  |
| bp:       | bázispár  |
| C1-INH:   | C1-inhibítor  |
| C4BP:     | C4-kötő fehérje   |
| CCP:      | komplement kontroll protein domén   |
| CFB:      | a komplement B-faktort kódoló gén   |
| CFH:      | a komplement H-faktort kódoló gén   |
| CFHL-1:   | factor H like-1 fehérje   |
| CFHR1-5:  | H-faktorra rokon fehérjék (complement factor H-related protein 1-5)               |
| CFI:      | a komplement I-faktort kódoló gén   |
| CKD:      | krónikus veseelégtelenség   |
| CR1:      | komplement receptor-1   |
| CRP:      | C-reaktív protein   |
| D+HUS:    | diarrhea-asszociált HUS   |
| DAF:      | decay accelerating factor   |
| ddNTP:    | didezoxinukleozid-trifoszfát  |
| DGKE:     | diacilglicerol-kináz-epszilon   |
| DIC:      | disszeminált intravaszkuláris koaguláció  |
| DNS:      | dezoxiribonukleinsav  |
| dNTP:     | dezoxinukleozid-trifoszfát  |
| EDTA:     | etilén-diamin-tetraecetsav  |
| EGF:      | epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)                           |
| ELISA:    | enzyme linked immunosorbent assay   |
| ESP:      | exome sequencing project  |
| ESRD:     | végállapotú veseelégtelenség (end stage renal disease)                            |
| EVS:      | exome variant server  |
| FFP:      | friss fagyasztott plazma  |
| FIMAC:    | factor I membrane attack complex  |
| het.:     | heterozigóta  |
| HF:       | H-faktor  |
| hom.:     | homozigóta  |
| HRP:      | tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)   |
| HUS:      | hemolitikus urémiás szindróma   |
| IF:       | I-faktor  |
| IPD:      | invazív pneumococcus betegség   |
| kb:       | kilobázis   |

|            |   |
|------------|---|
| kDa:       | kilodalton  |
| LD:        | kapcsoltsági egyensúlytalanság  |
| LDLR:      | low-density lipoprotein receptor  |
| MAC:       | membrane attack complex   |
| MASP:      | MBL-asszociált szerin proteáz   |
| MBL:       | mannózkötő lektin   |
| MCP:       | membrán-kofaktor protein  |
| MHC:       | fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)             |
| MLPA:      | multiplex ligáció-függő próba amplifikáció                                      |
| MODS:      | többszervi elégtelenség (multiple organ dysfunction syndrome)                   |
| NCBI:      | National Center for Biotechnology Information                                   |
| ND:        | nincs adat  |
| nm:        | nanométer   |
| OD:        | optikai denzitás  |
| OPD:       | o-phenylenediamin   |
| PCR:       | polimeráz láncreakció   |
| PCR-RFLP:  | polimeráz láncreakciót követő restrikciós fragment hossz polimorfizmus technika |
| PEX:       | plazmacsere   |
| pHUS:      | pneumococcus-asszociált HUS   |
| PT:        | plazma transzfúzió  |
| RCA:       | regulators of complement activation, RCA gene cluster                           |
| rpm:       | fordulat/perc (revolutions per minute)  |
| scr:       | short consensus repeat  |
| SLE:       | szisztémás lupus erythematosus  |
| SNP:       | egyponos nukleotid-polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)               |
| STP:       | szerin-, treonin- és prolin-gazdag régió  |
| SRCR:      | scavenger receptor cysteine-rich  |
| TAFI:      | thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor                                     |
| T-antigén: | Thomsen–Friedenreich-antigén  |
| TBE:       | trisz/borát/EDTA puffer   |
| TED:       | thioester-containing domain   |
| THBD:      | a trombomodulint kódoló gén   |
| TMA:       | trombotikus mikroangiopátia   |
| TMB:       | 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin   |
| TTP:       | trombotikus trombocitopéniás purpura  |
| UTR:       | nem transzlálódó régió  |
| vWF:       | von Willebrand faktor   |

## 2. Bevezetés

A gyermekkorban kialakuló akut veseelégtelenség leggyakoribb oka a hemolitikus urémiás szindróma (HUS), mely a trombotikus mikroangiopátiák (TMA) közé tartozó ritka, súlyos, potenciálisan halálos kimenetelű betegség (1). Ritka betegségnek azokat nevezzük, amelyek Európában 2000-ből egy embert érintenek; ma több mint hatezer ilyen betegség ismert (2). A legtöbb visszavezethető genetikai okokra és a tünetek sokszor már gyermekkorban megjelennek. A hemolitikus urémiás szindróma hátterében a vese kisereiben érfalsérülés hatására kialakuló mikrotrombusok képződése áll.

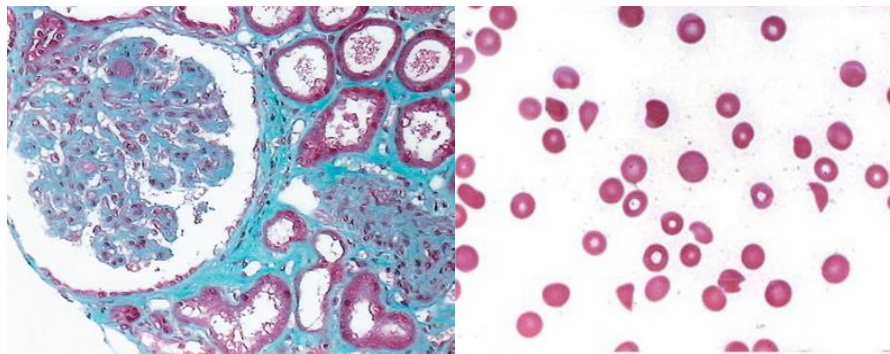
A vese felelős a szervezet víz- és elektrolit homeosztázisának fenntartásáért, és számos toxikus metabolit kiválasztásáért. A felnőtt vesén percenként 1,1 liter vér áramlik át, melyből naponta 180 liter elsődleges szűrlet, majd 1,5-2 liter vizelet képződik. Ez a nagyfokú visszaszívódás a vese működési egységeiben, a nefronokban megy végbe, melyből egy-egy vesében kb. egymillió található (3). A vese artériás rendszere dúsan elágazik, a kisartériák a nefronok glomerulusaiban kapillárisokra oszlanak, melyek falának szerkezete és a kapillárisokban uralkodó nagy nyomás teszi lehetővé az áthaladó folyadék szűrését. A glomeruláris kapillárisokat három réteg alkotja: az endotélium, a bazális membrán és a podociták által kialakított epitélium (1. ábra).



**1. ábra**

*A glomeruláris kapillárisok elhelyezkedése és felépítése (Chiang és mtsai (4)és George és mtsai (5) alapján)*

Az endotélium és az epitélium szerkezete porózus, ez teszi lehetővé a membrán átjárhatóságát. Az egészséges kapillárisokban a pórusok mérete 8 nm, és a membrán negatív töltésű, így azon a vörösvértestek, a fehérjék vagy a pozitívan töltött ionok nem jutnak át. Ezek megjelenése a vizeletben glomeruláris betegségre utalhat (3). A hemolitikus urémiás szindrómában az endotél sejtréteg károsodik, következményeként a kapillárisokban és kisereken mikrotrombusok keletkeznek, ami intravaszkuláris hemolízishez vezet. Ennek megfelelően a betegség fő tünetei a hemolitikus anémia, a súlyos trombocitopénia és a hirtelen kezdetű, oligo-anuriás veseelégtelenség (csökkent glomeruláris filtrációs ráta, emelkedett szérum kreatinin szint) (6). A csökkent haptoglobinszint, az emelkedett indirekt bilirubinszint, a plazmában megjelenő szabad hemoglobin és a magas LDH aktivitás a betegek nagy részében megerősíti az intravaszkuláris hemolízist. A perifériás vérkenetben fragmentociták figyelhetők meg (1, 6, 7) (2. ábra).



**2. ábra**

*TMA jelei a glomerulusok szöveti képén (8) és a vérkenetben (9)*

*A: Egy TMA beteg glomerulusának fénymikroszkópos képe. Intrakapilláris trombózis és kapilláris elzáródás, valamint érfalvastagodás jelei figyelhetők meg.*

*B: Fragmentált vörösvértestek*

### **2.1. A trombotikus mikroangiopátiák klasszifikációja**

A HUS-t hagyományosan típusos vagy diarrhea-pozitív (D+) és atípusos vagy diarrhea- negatív (D-) formákra osztották fel. A kezelések során szerzett tapasztalatok és a molekuláris mechanizmusok megismerése elvezettek a molekuláris szemléletű klasszifikáció megalkotásához, melyben a különböző formákat etiopatológiájuk szerint

osztályozzák (10). Ez alapján a trombotikus mikroangiopátiák közé a trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) és a hemolitikus urémiás szindróma (HUS) különböző formái tartoznak, melyek ugyan változatos klinikai képet mutatnak, azonban patológiájukban közös a fokozott trombocita-aggregáció és trombus képződés, ami végül különböző szervek mikrokeringésének zavarához és csökkent szöveti perfúzióhoz vezet (11). A trombotikus mikroangiopátiák molekuláris etiológia szerinti klasszifikációját az 1. táblázat foglalja össze. Dolgozatomban a hemolitikus urémiás szindróma két formájának patomechanizmusával kapcsolatos vizsgálatokat végeztem, így ezeket nagyobb részletességgel mutatom be.

### 1. táblázat

#### *A trombotikus mikroangiopátiák klasszifikációja etiopatológiájuk alapján*

|   |
|---|
| <p>1. HUS fertőzőes eredettel</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Shiga- like toxint termelő baktériumok okozta HUS</li> <li>- Neuraminidázt termelő kórokozók okozta HUS</li> </ul>   |
| <p>2. Atípusos HUS a komplement-reguláció károsodása miatt</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A komplement-reguláció zavara genetikai eltérések miatt</li> <li>- Szerzett komplement-regulációs zavarok</li> </ul>  |
| <p>3. TTP a von Willebrand faktor hasító proteáz (ADAMTS13) károsodása miatt</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Az ADAMTS13 zavara genetikai eltérések miatt</li> <li>- Szerzett ADAMTS13 zavar autoantitest miatt</li> </ul>   |
| <p>4. HUS, egyéb formák</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Károsodott kobalamin-C metabolizmus</li> <li>-Diacil-glicerol kináz <math>\epsilon</math> mutációk</li> </ul>   |
| <p>5. Kinin indukált formák</p>   |
| <p>6. Szekunder TTP/HUS szindróma a következő állapotok, betegségek vagy kezelések szövődményeként</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- HIV-fertőzés</li> <li>- Malignus betegségek</li> <li>- Gyógyszeres kezelés, motoros szívműtét, keringéstámogató eszközök</li> <li>- Transzplantáció (szív, tüdő, csontvelő)</li> <li>- Kóros terhesség, HELLP-szindróma, DIC, pancreatitis, szepszis</li> <li>- Autoimmun betegségek (SLE, SSc, antifoszfolipid szindróma)</li> <li>- Glomerulopátiák, fehérjevesztő állapotok</li> <li>- Egyéb familiáris formák</li> <li>- Nem klasszifikált</li> </ul> |



### 2.1.1. HUS fertőzéses eredettel

#### 2.1.1.1. Shiga-like toxint termelő baktériumok okozta HUS

A diarrhea-asszociált vagy D+HUS a betegség klasszikus, relatíve jó prognózisú formája, az összes HUS-sal diagnosztizált beteg 90%-ában ez a forma áll fenn. Shiga-like toxint termelő baktériummal való fertőzés következtében alakul ki, ilyenek az enterohaemorrhagiás *Escherichia coli* törzsek (12), a *Shigella dysantheriae* 1-es típus (13, 14) és a *Citrobacter freundii* (15). Az enteropatogén kórokozók által termelt toxinok az endotélsejteket károsítva a trombociták aktiválódását okozzák, ami mikrotrombusok kialakulásához és hemolízishez vezet.

Az *Escherichia coli* expozíció és a betegség megjelenése között eltelt idő átlagosan 3 nap (1-8 nap). Jellemzően hasi görcsökkel és nem véres hasmenéssel kezdődik, ami az esetek 70%-ánál 1-2 nap alatt véressé válik. Hányás a fertőzöttek 30-60%-ában, láz 30%-ban fordul elő (1). A fertőzöttek körülbelül 5%-ában szövődményként jelentkezik HUS (16): a gastroenteritist hirtelen kialakuló hemolitikus anémia, trombocitopénia és akut veseelégtelenség követi. A betegség lezajlása után a vesefunkció jellemzően helyreáll, relapszus kifejezetten ritka ebben a formában. A betegséget leggyakrabban az enterohemorragiás *Escherichia coli* O157:H7 szerotípusa váltja ki, és elsősorban 5 év alatti gyermekekben jelentkezik (6). Ezzel szemben a közelmúltban Németországban fellépett *Escherichia coli* O104:H4 járvány többnyire felnőtteket érintett, a HUS kialakulása a fertőzöttek körében elérte a 22%-ot (17).

#### 2.1.1.2. Neuraminidázt termelő kórokozók okozta HUS

A *Streptococcus pneumoniae* vagy pneumococcus, egy Gram-pozitív, fakultatív anaerob, tokos baktérium, mely tünetmentesen kolonizálódhat a felső légutakban, leggyakrabban az orrgaratban. Egészségesekben a baktérium hordozásának aránya születés után emelkedik, majd kétéves kor után csökken (18). A *Streptococcus pneumoniae* esetenként azonban akár életveszélyes betegségeket is okozhat, mint a tüdőgyulladás pulmonális tályoggal, a septicémia vagy az agyhártyagyulladás. Ezeket összefoglalva invazív pneumococcus betegségnek nevezzük (IPD) (19), melyben leggyakrabban 2 év alatti gyermekek és idősek érintettek. Az invazív pneumococcus fertőzések ritka szövődménye lehet hemolitikus urémiás szindróma is; megjelenése az IPD betegek között a 2 év alatti gyermekekben jellemzőbb, felnőtt korban extrém ritka.

Az akut mortalitás igen magas, 25% körüli, relapszust azonban ebben a formában nem írtak le (6, 20). A pHUS előfordulása extrém ritka, az összes gyermekkori HUS 5–15%-a asszociált pneumococcus fertőzéshez. Invazív pneumococcus betegséget követően 0,4–0,6%-ban alakul ki szövődményként HUS (21).

A pneumococcus-asszociált HUS (pHUS) patogenezisének hátterében a kórokozó neuraminidáz termelése áll, amely az IPD betegek kb. 50%-ánál jelen lehet, de csak kis részükben progrediál a betegség HUS-sá (22). A neuraminidáz az endotélsejtek, a vörösvértestek és a trombociták felszínéről lehasítja a szíalsavtartalmú oldalláncokat (N-acetil-neuraminsav), ennek hatására felszínre kerül a Thomsen–Friedenreich- (T-) antigén. A T-antigének ellen csaknem minden emberben megtalálhatók természetes, IgM-izotípusú, poliagglutinációt okozó anti-T antitestek, melyek kötődnek a felszínre került T-antigénhez. Ez a vörösvértestek agglutinációját eredményezi, ami hemolízishez és mikrovaszkuláris trombozishoz, majd trombocitopéniához vezet, és kialakul a HUS-ra jellemző klinikai kép (23). Más neuraminidáz termelő mikrobákkal való fertőzés következtében is kialakulhat a HUS ezen formája, mint az influenza-A vírus (24) és a *Capnocytophaga canimorsus* (25, 26).

A *Streptococcus pneumoniae*-nek több mint 90 szerotípusa ismert, mindegyik képes neuraminidáz termelésre (27). Jelenleg többféle védőoltás létezik, a leggyakrabban alkalmazott konjugált vakcinában (Prevenar13) a 13 leggyakoribb típus található meg, mely 2 hónapos kortól adható, a poliszacharid vakcinában (Pneumovax23) 23 szerotípus található meg, azonban csak 2 éves kor felett alkalmazva alakít ki kellő védettséget. A konjugált vakcina 2008-tól Magyarországon is elérhető, 2014 óta az oltási rendbe illesztve kötelező oltás lett. Az USA-ban az oltás kötelezővé tétele után az invazív pneumococcus betegségek előfordulása 75%-al visszaesett (28).

A pHUS diagnosztizálását a direkt Coombs teszt segítheti. Lényege, hogy az eritrociták felületén kötött immunglobulinok a Coombs savóval (anti-humán antitestek) reagáltatva agglutinációt okoznak, a pozitív teszt tehát pHUS esetében a T-antigénekhez kötött anti-T antitestek jelenlétére utal.

### **2.1.2. Atípusos HUS a komplement-reguláció károsodása miatt**

Az atípusos HUS (aHUS) hátterében elsődlegesen a komplement-reguláció zavara áll; így az etiológián alapuló klasszifikáció szerint a pHUS nem tartozik bele, bár a

hagyományos nevezéktan minden diarrhea-negatív formát atípusosnak nevez. Az atípusos forma a gyermekkori HUS esetek 5-10%-ában fordul elő, míg a felnőtt HUS betegekben leggyakrabban ez a forma merül fel (29). Kimenetele súlyosabb, mint a típusos formáé, gyakoriak a relapszusok, az esetek 20%-ának extrarenális manifesztációja is van, a végállapotú veseelégtelenség kialakulásának kockázata magas, ezáltal tartós dialízis vagy transzplantáció válhat szükségessé (30, 31). 1981-ben írták le, hogy a betegség összefüggésbe hozható a komplement C3 fehérje alacsony szintjével (32), majd 1998-ban kapcsolatot találtak a betegség és a 1-es kromoszóma q32-es régiója között (33), mely olyan gének csoportját tartalmazza, amik a komplement-aktiváció szabályozásában vesznek részt (regulators of complement activation, RCA gene cluster). Ezt a felismerést számos mutáció leírása követte a komplement-regulátor génekben (34-36), így egyre világosabbá vált, hogy az atípusos HUS patogenezisének háttérében a komplementrendszer alternatív útjának diszregulációja áll (37).

#### **2.1.2.1. Szerzett komplement-regulációs zavarok okozta HUS**

Az atípusos HUS-ban szenvedők 6-10%-ában fordul elő a komplement-reguláció szerzett zavara. Ebben a formában a komplement H-faktor ellen autoantitestek képződnek (38), amik a H-faktor C-terminális végéhez kötődve gátolják annak sejt felszínhez való kötődését (39). Az autoantitestek képződése kapcsoltságot mutat a *CFHR1* és *CFHR3* H-faktorral rokon fehérjéket kódoló gének homozigóta deléciójával (40).

#### **2.1.2.2. A komplement-reguláció zavara genetikai eltérések miatt**

A szabályozási zavar okai lehetnek genetikai eltérések, mint mutációk, haplotípusok (41, 42) és kópiaszám-variációk (43-45), melyek a legtöbb érintett betegeknél azonosíthatók a komplementrendszer alternatív útjának különböző fehérjéit kódoló génekben. A funkcióvesztéses mutációk a komplement-regulátorok csökkent, a funkciónyeréses mutációk pedig az aktivátorok túlzott működését eredményezik. A reguláció felborulása mindkét esetben a komplementrendszer alternatív útjának túlaktiválódásához vezet, melynek következményeként a saját sejtek membránja károsodik, sérül az endotél funkció és trombózis alakul ki. A komplementrendszer működését a 2.2 fejezetben, az atípusos HUS patogenezisét a 2.3. fejezetben részletezem. Az eddig közölt tanulmányok a betegek 50-70%-ában találtak eltérést vizsgált génekben

(46). A betegekben talált mutációk nagy része heterozigóta formában fordul elő és penetranciájuk nem teljes, körülbelül 50%, így tünetmentes hordozók fordulnak elő a betegek családtagjai között (46). Mindezek alapján feltételezhető, hogy egy-egy mutáción kívül más, eddig nem ismert genetikai vagy környezeti kiváltó hatás is szükséges a betegség kialakulásához.

Az atípusos HUS kezelés nélkül nagy mortalitású, progresszív betegség. Irodalmi adatok szerint az első epizód után a betegek 33-40%-ánál fordul elő végstádiumú veseelégtelenség (end-stage renal disease, ESRD) kialakulása vagy elhalálozás, az egyéves követéses adatok alapján a kezelés alatt álló betegek 65%-ánál ESRD alakul ki vagy meghalnak (47). A betegek a különböző génekben előforduló mutációk miatt igen heterogén csoportot alkotnak. A *CFH*, *CFI*, *C3*, *CFB* és *THBD* génekben mutációt hordozó betegek 40-70%-a meghal vagy végállapotú veseelégtelenség alakul ki az első epizód vagy az ezt követő három év során (48). A membrán kofaktor proteinben (MCP, *CD46* gén) mutációt hordozó betegek prognózisa jobb, bár a relapszusok gyakoribbak, a betegek kb. 80%-a egy-egy epizód után teljes remisszióba kerül és nem igényel dialízist (49).

A 2009-ben kiadott ajánlás szerint (50) az aHUS elsővonalbeli kezelése a plazmaterápia. Néhány kivételtől eltekintve a plazmacsere (PEX) ajánlott, ha erre nincs lehetőség- pl. csecsemőknél technikailag nehezen megoldható az erekhez való nehéz hozzáférés miatt- plazma transzfúzió (PT) friss fagyasztott plazmával (FFP) is kielégítő lehet. A plazmakezelés eltávolítja a mutáns komplementfehérjéket és az autoantitesteket, és működő fehérjékkel pótolja azokat. Hatására a hematológiai remisszió létrejön, de nem gátolja a komplement-mediált patogén mechanizmusokat, így nem előzi meg a szöveti károsodást. Bár a betegek nagy része jól reagál a plazmakezelésre, irodalmi adatok alapján a betegség mortalitása még így is 25% körüli (47).

A betegség következtében gyakran végállapotú veseelégtelenség alakul ki, így ezek a betegek tartósan dialízisre szorulnak, és felmerül a transzplantáció lehetősége. Az eddig vesetranszplantáción átesett aHUS betegek 60-90%-ánál egy éven belül egy újabb HUS epizód okozta graft rejekció jelentkezett (47). Ha a mutáció valamelyik májban termelődő komponenst érinti a szülő vesetranszplantációkor a mutáns fehérjék továbbra is a szervezetben maradnak, és gyakran újabb relapszushoz és veseelégtelenséghez vezetnek. A H-faktor és I-faktor fehérjékben lévő mutációk esetén kombinált máj-vese

transzplantáció ajánlott abban az esetben, ha a betegnek már volt sikertelen szülő vesetranszplantációja, valamint kombinált mutációk esetében is ez az ajánlás. Ezek a beavatkozások jelentős rizikóval, magas morbiditással és mortalitással járnak. A C3 és B-faktor mutációkat hordozók esetében jelenleg nincs elegendő transzplantációs tapasztalat ilyen ajánláshoz (51). Kedvezőbb transzplantációs kimenetel várható a sejt felszínen kifejeződő membrán kofaktor fehérje mutációknál. A 2009-es transzplantációs protokoll ajánlása szerint az aHUS talaján kialakuló veseelégtelenség esetén a transzplantációt megelőzően molekuláris genetikai vizsgálatot kell végezni.

Az elmúlt években az eculizumab megjelenésével új lehetőségek nyíltak meg az atípusos HUS kezelésében. Az eculizumab (Soliris®, Alexion Pharmaceuticals Inc., Cheshire, CT, USA) egy humanizált monoklonális anti C5-antitest, ami a komplement C5-öt gátolja, ezáltal megakadályozva a C5a létrejöttét és a terminális komplement komplex kialakulását. Az eddig megjelent klinikai tanulmányok megerősítették az eculizumab hatékonyságát és biztonságosságát plazma-dependens aHUS betegekben és transzplantáció utáni HUS rekurrenciában, valamint első vonalbeli kezelésként is alkalmazták az eculizumabot aHUS betegeknél (52, 53). Az eculizumab elérhetősége az elmúlt években jelentősen megnőtt, a legújabb ajánlások a fenti klinikai tanulmányok és esetsorozatok alapján (54) alkalmazását elsődleges kezelésként javasolják aHUS betegeknél (55). A kétéves követéses vizsgálat eredményeit 2015-ben publikálták, melyek megerősítették az eculizumab biztonságosságát és hatékonyságát (56).

### **2.1.3. TTP a von Willebrand faktor hasító proteáz (ADAMTS13) károsodása miatt**

A trombotikus trompcitopéniás purpura (TTP) kialakulásáért az ADAMTS13 fehérje (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13) hiánya felelős. Az ADAMTS13 a von Willebrand faktort (vWF) hasító proteáz, az endotélsejtekből szekretálódó vWF óriás multimereket hasítja kisebb fragmentumokra. Hiánya esetén az ultranagy vWF faktorok az endotélsejtekhez kötődve maradnak, és tapadási felületet biztosítanak a trombociták számára, melyek ezáltal aktiválódnak és aggregálódnak, míg nem elfogynak. Az ADAMTS13 hiány hátterében a veleszületett formában (Upshaw-Schulman szindróma) mutációk, míg a szerzett formában ADAMTS13-ellen termelődő gátló autoantitestek állnak (57).

#### 2.1.4. HUS, egyéb formák

A cobalamin-C deficiencia autoszomális, recesszív öröklésmenetű betegség, mely általában az első életévben jelentkezik, táplálkozási nehézséggel, növekedési elmaradással, hipotóniával, neurológiai tünetekkel, leukopéniával és megaloblasztos vérszegénységgel, de következménye lehet HUS kialakulása is (58).

2013-ban HUS betegek teljes exom szekvenálása során mutációkat találtak a diacil-glicerol kináz  $\epsilon$  génjében (*DGKE*) (59). A vizsgált betegekben az első epizód 1 éves kor alatt jelent meg, és a betegség klinikai megjelenése eltért a korábban ismert formáktól, tartósan magas vérnyomással járt (59). Ezekben a betegekben a diacil-glicerol kináz  $\epsilon$  expressziójának vagy aktivitásának csökkenése endotélsejt aktivációt és trombotikus mikroangiopátiát okoz (60). 2015-ben leírtak három *DGKE*-deficiens beteget, akikben komplementeltérések is kimutathatók voltak, ezek a betegek a *DGKE* mutációk mellett komplement géneket érintő mutációkat is hordoztak (61).

#### 2.1.5. Kinin-indukált formák

A kinin gyógyszerként vagy táplálék-adalékanyagként kerülhet a szervezetbe. Az erre érzékeny személyekben a trombociták glikoproteinjeit felismerő autoantitestek keletkeznek (62). Az érintett betegekben leírtak különböző IgG és IgM antitesteket is, nem csak trombociták, de leukociták, eritrociták és az endotélsejtek ellen is. Ennek megfelelően a betegség klinikai spektruma széles: enyhe, átmeneti trombocitopénia, intravaszkuláris hemolízis, veseelégtelenség, véralvadási zavar vagy disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC) is lehet (63).

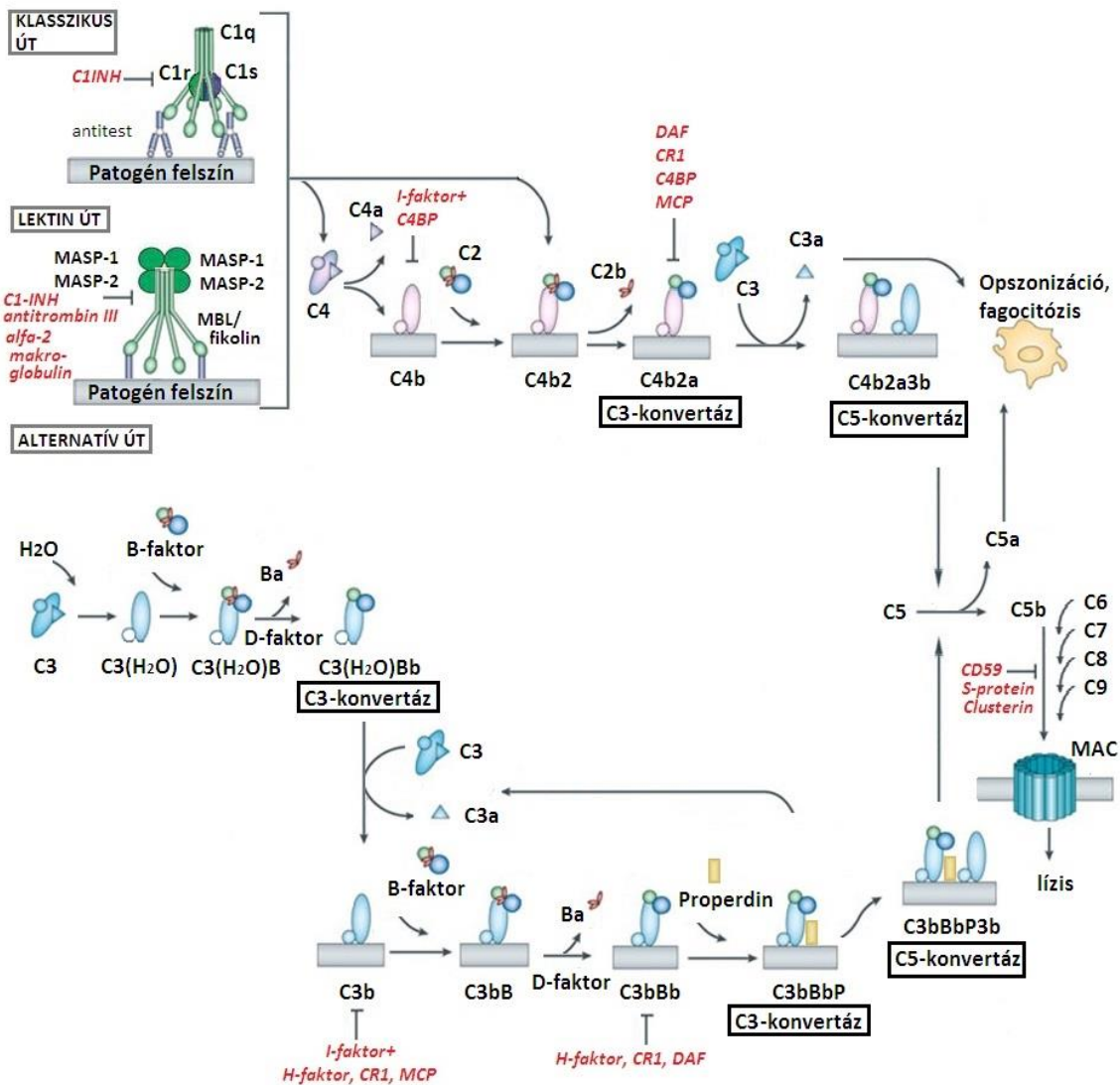
#### 2.1.6. Szekunder TTP/HUS szindróma

Az ismeretlen etiológiájú szekunder formák (szekunder TTP/HUS) általában immunszupresszált állapot, például HIV fertőzés (64), malignus betegségek (65), terhesség, gyógyszerek pl. calcineurinh inhibitorok (66), egyéb betegségek pl. SLE vagy HELLP-szindróma következtében alakulnak ki (67). Közös jellemzője a szekunder TMA formáknak, hogy egyszerre mutatható ki zavar az ADAMTS13-vWF-rendszerben és a komplement-konzumpció, melynek hátterében az endotélsejtek károsodása áll.

## 2.2. A komplementrendszer működése

A szervezetbe jutó kórokozók elleni elsődleges védelmi vonalat a veleszületett vagy természetes immunrendszer biztosítja. Ennek egyik elsőként aktiválódó eleme a komplementrendszer, mely 35-40 különböző, szolubilis és membránhoz kötött fehérjét tartalmaz (68). Többségüket a máj hepatocitái termelik, azonban a monociták, makrofágok, endotélsejtek és különböző szöveti epitélisejtek is termelnek komplementfehérjéket (68). A komplementfehérjék nagy része zimogén formában keletkezik, inaktív állapotú prekursor molekulaként kering. Aktiváció hatására egy kaszkádreakció alakul ki, mely során az inaktív komplementfehérjék limitált proteolízisen alapuló hasítás által enzimatis aktivitást nyernek, és további fehérjéket aktiválnak. A komplementkomponensek hasítási termékeit „a” -val és „b”-vel jelöljük, általában a nagyobb, aktív termék a „b”, míg a kisebb, lehasadó fragmens az „a”. Az egymásután aktiválódó komplementfehérjék proteáz-enzimkomplexeket alakítanak ki, majd a kaszkád végén egy terminális komplement komplex alakul ki, mely az aktivációt beindító felszínen a membránba süllyedve a sejt lízisét okozza. Egyes komplementfehérjék aktiválódása során lehasadó kis molekulatömegű anafilatoxinok vazodilatációt és kemotaxist okozva a gyulladásos válasz kialakításában játszanak szerepet. A komplementrendszer harmadik fontos szerepe a patogének opszonizálása, mely során a C3b molekulák a célsejten felhalmozódva megjelölik azt a komplementreceptorokkal rendelkező sejtek számára, amik fagocitózissal elpusztítják az opszonizált sejteket, ez elősegíti az antigén bemutatását és az adaptív immunválasz kialakulását. A komplementrendszer nemcsak az idegen struktúrákat ismeri fel, de részt vesz a saját károsodott komponensek, mint az apoptotikus és nekrotikus sejtek felismerésében és eliminálásában, az abnormális fehérjeaggregátumok és az immunkomplexek eltakarításában is (68).

Az aktivátor természetétől függően a komplementrendszer aktivációja három különböző útvonalon mehet végbe, a klasszikus, a lektin-indukált és az alternatív úton. Mindhárom út aktivációja a rendszer központi molekulájának, a C3-nak az aktiválásához vezet, majd a közös terminális úton fejtik ki hatásukat. A három aktivációs útvonalat a 3.ábra foglalja össze.



3. ábra

*A komplementrendszer aktivációs útvonalai, komponensei és regulátorai*

*Serruto és mtsai alapján (69), módosítva*

### 2.2.1. A komplement-aktiválódás klasszikus útja

A komplementrendszer klasszikus aktivációs útját IgG vagy IgM izotípusú immunglobulinok antigénnel alkotott komplexe indítja el, de vírusok és baktériumok is aktiválhatják az útvonalat. Az immunkomplexet a C1 molekulakomplex ismeri fel, amely négy szerin proteázból épül fel. A C1 komplex az immunkomplexhez kötődve aktiválódik, így képes lesz a C4 molekula hasítására, amiből aktív C4b keletkezik. A C4b



kovalensen kötődni tud az aktivátorhoz, majd megköti a C2 fehérjét, melynek hasítását szintén a C1 végzi. Az így keletkezett C4b és C2a fragmentumokból kialakul a C4b2a komplex, melyet C3-konvertáznak nevezünk, ez végzi a C3 molekula hasítását. A C3 hasítása és az aktivált C3b fragmentum kötődése után létrejön a C4b2a3b komplex, a C5-konvertáz enzim (68).

A komplement-aktiválás három útja a C5 aktiválásánál találkozik és a terminális úton folytatódik. Az aktivált C5b komplexet képez a C6-tal, majd a C5b6 komplex reverzibilisen a sejtmembránhoz köt. Ezt követően hozzákötődnek a C7 és C8 komplementfehérjék, a komplex így a sejt membránján egy kisebb pórust hoz létre. A C9 komplementfehérjék polimerizálódva kötődnek ehhez a komplexhez, melynek eredményeként létrejön az ún. membránkárosító komplex (MAC, membrane attack complex), ez a nagyméretű pórus már a sejt líziséhez vezet (70).

### **2.2.2. A komplement-aktiválódás lektin útja**

A komplementrendszer lektin útvonalát a mannózkötő lektin (MBL), a fikolinok és a collectin-11 aktiválhatják, melyek szénhidrát-felismerő doménekkal rendelkező szolubilis molekulák, és az MBL-asszociált szerin proteázokkal (MASP-1 és MASP-2) képeznek komplexet. Az MBL-MASP komplex a patogének felszínén található szénhidrát molekulákhoz kötődik, ez képes a C4, majd a C2 hasítására. Így kialakul a C4bC2a C3-konvertáz, ami elhasítja a C3 fehérjét, majd a komplement-aktiválódás a klasszikus útnál leírtak szerint folytatódik.

### **2.2.3. A komplement-aktiválódás alternatív útja**

Az alternatív úton történő komplement-aktiváció a C3 molekula spontán hidrolízisének és aktivációjának alapszik. Ez a reakció kis intenzitással, de folyamatosan végbemegy (71). A C3 hidrolízise során keletkező C3(H<sub>2</sub>O) molekula szerkezete és funkciója hasonló a C3b-hez, Mg<sup>2+</sup> jelenlétében komplexet képezhet a B-faktossal, ami ezután egy állandóan aktív formában keringő szerin proteáz, a D-faktor által elhasad és aktiválódik. A B-faktor hasítása két fragmentumot eredményez, melyek közül a Bb a keletkező C3(H<sub>2</sub>O)Bb komplex aktív része lesz. Ez a komplex lesz az alternatív reakcióút instabil, fluid fázisú C3-konvertáza, mely képes további C3 molekulák hasítására (72). A keletkezett C3b-k kovalensen kötnek a szomszédos sejtek felszínén lévő amino- vagy hidroxil-

csoportokhoz (73). A felszínhez kötődött C3b-hez  $Mg^{2+}$  jelenlétében újabb B-faktor kötődik, és létrejön a stabil, membránkötött C3-konvertáz, a C3bBb (74). A C3-konvertázt, mind a fluid fázisban, mind a membránkötött formában a properdin stabilizálja, mely az egyetlen pozitív regulátora az alternatív útnak (75). A membránkötött C3-konvertáz egyre több C3 fehérjét hasít C3b-vé, melyek lerakódnak a célsejten, így ezen a ponton a komplement-aktiválódás nagymértékű felerősödése egy ún. amplifikációs hurok jöhet létre. A C3b képződés amplifikációja során újabb és újabb C3b fragmentumok fixálódnak minden C3b köré, így a C3bBb és egy újabb C3b fragmentum kapcsolódása által kialakul az alternatív út C5-konvertáza. A C5 aktiválásától a reakcióút a közös terminális úton folytatódik.

Fiziológiás körülmények között az alternatív út minimális aktiválódását a H-faktor és az I-faktor regulátor fehérjék teljesen meggátolják. A gazdaszervezet az aktivációval szemben úgy védekezik, hogy a H-faktor nagyobb affinitással kötődik a C3b-hez a sziálsavval (76) vagy polianionokkal (77) borított felszínen. A H-faktor affinitása azonban csökken a mikrobiális sejtfal-poliszaharidokkal borított felszíneken, mint a zimozán (78) és a lipopoliszaharid (79), ezáltal az alternatív út aktiválódhat.

#### **2.2.4. A komplement-aktiválódás szabályozása**

A komplement-aktiválódás nagymértékű felerősödése mindhárom aktivációs útvonalon létrejöhet. Hogy a zimogén formában jelenlévő készletek ne használódjanak fel, és a rendszer ne merüljön ki (konszumpció), regulátorfehérjékre van szükség, amik megelőzik a gazdasejtek károsodását. Regulátorfehérjék a gazdasejtek membránján és a fluid fázisban is találhatóak.

A klasszikus útvonalon a C1 komplex aktiválódását a C1-inhibitor (C1-INH) gátolja, melynek kovalens kötődése révén stabil C1rC1sC1-INH-komplex alakul ki, amely nem képes további C4 illetve C2 hasításra (80). A C1-INH a C1 inaktiválásán kívül gátolja a MASP-1-et és MASP-2-t is, így a C3-konvertáz kialakulását a klasszikus és a lektin útvonalon is megakadályozza. A MASP-1 és MASP-2 fehérjékkel komplexeket képezve az antithrombin III és az alfa-2-makroglobulin ( $\alpha 2M$ ) is gátolja a komplement-aktiválódást. A klasszikus és lektin útvonalak C3-konvertázát alkotó C4b szabályozását a C4b-kötő fehérje (C4BP) és az I-faktor végzik, a folyamat során a C4b tovább degradálódik C4c és C4d fragmentumokra.

A C3 konverázok működésének szabályozást az MCP (membrán kofaktor protein), a DAF (decay accelerating factor) és a CR1 (komplement receptor 1) végzik. Az MCP és a DAF a legtöbb sejten expresszálandó membránkötött fehérjék. Az MCP C3b-t vagy C4b-t köt, valamint az I-faktor általi degradációt segíti elő. A DAF képes disszociálni a C2a-t a klasszikus C3-konvertáztól, a C4b2a-ról, ezen kívül a C3bBb-ről eltávolítja a C3b-t. A CR1 (*CD35*) a polimorfonukleáris leukocitákon, a monocita sejtvonal sejtein, eritrocitákon, B-limfocitákon, a vese podocitákon és a follikuláris dentritikus sejteken expresszálandó; szintén a C3-konvertázok disszociációját segíti elő valamint az I-faktor kofaktoraként működik.

Az I-faktor egy szerin proteáz, mely aktív formában kering és nincs endogén inhibitora. A C3b-hez és a C4b-hez tud kötődni (81, 82) egy kofaktorral komplexben inaktiválja ezeket. A terminális útvonalon a CD59 (protectin, HRF, homologous restriction factor) a C5b678 komplexhez kötődve gátolja a C9 molekulák összerendeződését, így megakadályozza a MAC kialakulását (83). Az S-protein (vitronectin) és a clusterin két szolubilis regulátor, melyek a terminális utat úgy gátolják, hogy a C5b67-hez kötnek és így az nem képes a foszfolipid kettős rétegbe ágyazódni (84, 85).

Az alternatív útvonal legfőbb regulátora a H-faktor, mely háromféleképp szabályozza a komplement-aktivációt: a B-faktorral verseng a C3b kötésért, így megakadályozza a C3bBb komplex kialakulását és további C3 molekulák aktiválását; képes disszociálni a Bb-t a C3bBb komplexről, ezzel elősegíti a konvertáz szétesését ('decay accelerating activity'); valamint az I-faktor kofaktoraként működik a C3b inaktiválása során (86-88). Az CFHL-1 (factor H like-1) fehérje a H-faktort kódoló *CFH* gén alternatív splicing terméke, ami hét scr domaint tartalmaz. Ezek szekvenciája megegyezik a *CFH* gén első hét scr doménjével, továbbá a fehérje tartalmaz egy négy aminosavból álló egyedi szekvenciát a C-terminális végén. A CFHL-1 a H-faktorhoz hasonlóan részt vesz a komplement alternatív út regulációjában, de sokkal kisebb koncentrációban van jelen a plazmában. A H-faktorral rokon fehérjék (complement factor H-related protein 1-5, CFHR1-5) öt különböző génről keletkeznek (*CFHR1-5*), szekvenciájuk csak hasonló a H-faktorhoz. Funkciójuk nem pontosan ismert, de mindegyik képes C3b és C3d kötésre. A CFHR1 a C5 konvertáz C3b molekuláit köti, ezáltal megakadályozva a C5 aktiválását. A CFHR2 a C3 konveráz (amplifikációs loop)

aktivitást gátolja. A CFHR5 heparint, C3-t és iC3b-t képes kötni, az I-faktor kofaktoraként komplement-regulátor aktivitása van, valamint képes CRP kötésre is. A CFHR3 és a CFHR4 pontos szerepe nem tisztázott (89).

A komplement-regulációban rész vesznek olyan fehérjék is, melyek más mechanizmusokat is szabályoznak. Ilyen a thrombomodulin is, az endotélsejtek transzmembrán glikoproteinje, mely kofaktorként rész vesz a protein C thrombin-indukált aktivációjában. Továbbá a thrombin kötése által megakadályozza a C5 aktivációt, valamint a TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, vagy prokarboxipeptidáz B) aktiválásán keresztül gátolja a fibrinolízist és inaktíválja a C3a-t és a C5b-t. Ezen kívül segíti az I-faktor-mediált C3b inaktivációt H-faktor vagy C4BP jelenlétében.

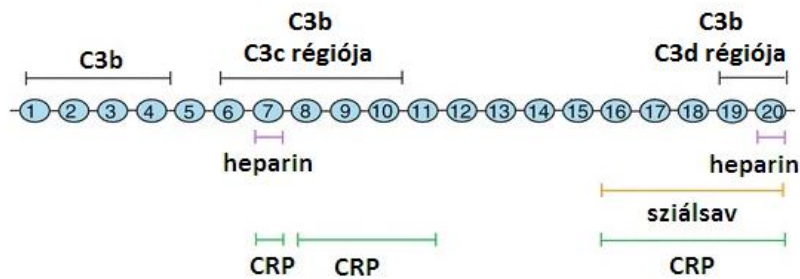
### **2.3. Az alternatív út diszregulációjának okai aHUS-ban**

Az atípusos HUS háttérben az alternatív út szabályozásának zavara áll. A betegséggel kapcsolatba hozható mutációk az érintett szabályozó faktorok (H-faktor, MCP, I-faktor, thrombomodulin) funkcióvesztéses vagy az alternatív út C3-konvertáz komponenseinek (B-faktor, C3) funkciónyeréses mutációi, melyek egyaránt az alternatív út szabályozásának sérüléséhez és aHUS kialakulásához vezethetnek. A H-faktor és az MCP nem megfelelő működése a C3b tartós sejtfelszínhez tapadását eredményezi, mivel a kóros kofaktorok miatt az I-faktor nem lesz képes a C3b-t inaktíválni és megszüntetni a sejtfelszíni depozíciót. Csökkent mennyiségű vagy működésű I-faktor pedig ép kofaktorok mellett sem lesz képes megfelelő mértékben végrehajtani a C3b inaktivációját. A C3 vagy a B-faktor funkciónyeréses mutációja esetén pedig felerősödhet a két fehérje egymás iránti affinitása, vagy a regulátorok kötődése csökken, így nem lesznek képesek az aktivációt megfelelően szabályozni.

#### **2.3.1. H-faktor**

A H-faktor egy májban termelődő, szolubilis, 155 kDa nagyságú, egyszálú polipeptid láncból álló glikoprotein. Szintjét számos környezeti és genetikai tényező befolyásolhatja, szérum koncentrációja 500 mg/L körüli, de viszonylag széles határok között mozog. A H-faktort kódoló *CFH* gén az 1-es kromoszóma 1q32 régiójában a RCA génklaszterben található, 94 kb hosszú és 23 exonból áll. A H-faktor fehérjét ebből huszonnégy exon kódolja, mely húsz scr (short consensus repeat) régiót vagy más néven

komplement kontrol protein domént (CCP) alkot. Egy scr globuláris domén kialakításában kb. 60 aminosav vesz részt. A domének szerkezete konzervált, mindegyiket két diszulfid-híd stabilizálja (90). A H-faktor egyes scr doménjei különböző molekulák megkötésére képesek (4. ábra). Az N-terminális végén elhelyezkedő scr 1-4 régió képes a C3b molekula megkötésére. Az scr 1-4-en kívül még két C3-kötőhely van, ezek a C3b inaktivációs termékeit kötik (C3c és C3d) (91). A H-faktor képes különböző polianionok kötésére is, mint a heparin, glükózaminoglikánok és a szialinsav (92). A fehérje C-terminális vége (scr19 és 20) a szialinsavtartalmú sejtek felszínéhez köt (76).



#### 4. ábra

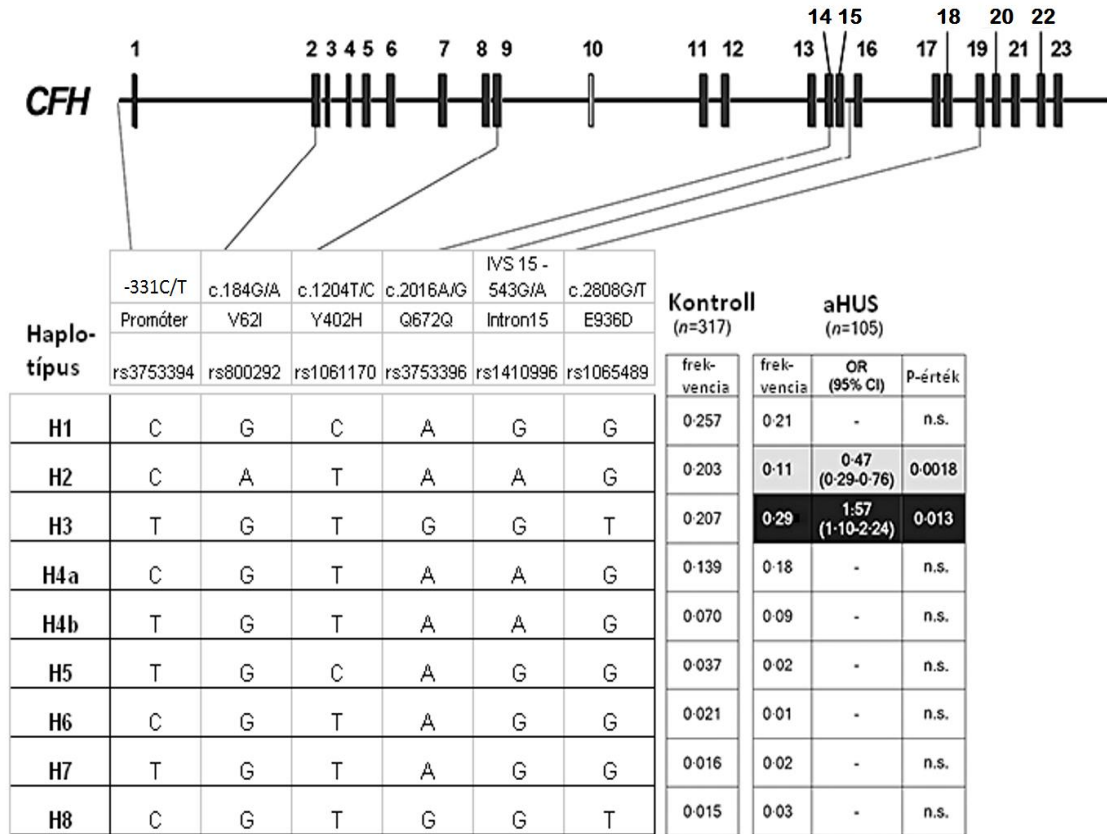
*A H-faktor doménszerkezete és ligandkötőhelyei,*

*Gordon C.K Roberts (szerk.): Encyclopedia of biophysics (93) alapján*

H-faktor mutációk az aHUS betegek kb. 30%-ában fordulnak elő, míg a gyermekkori esetek kb. 70%-ában azonosíthatók (94). A H-faktor mutációt hordozó betegeknél gyakran fordulnak elő relapszusok, és az esetek 60-80%-ában végállapotú veseelégtelenség alakul ki, vagy az epizód letális kimenetelű.

Az NCBI (National Center for Biotechnology Information) SNP (single nucleotide polymorphism) adatbázisa több mint 500 polimorfizmust tart számon a *CFH* gén régiójában. Egyes polimorfizmusok erős kapcsoltságot mutatnak egymással, és haplotípusokat alkotnak (41). A kilenc ismert H-faktor haplotípus és az ezeket alkotó polimorfizmusok alléljai az 5. ábrán láthatók, valamint Cordoba és mtsai tanulmánya alapján a haplotípusok előfordulása kontroll populációban és aHUS betegeknél is. A két csoport között szignifikáns különbség volt a H2 haplotípus esetében, ez ritkábban fordult

elő aHUS betegekben, míg a H3 haplotípus gyakrabban; ezek alapján a H2 védő, míg a H3 rizikónak mondható az aHUS kialakulására nézve (95, 96).



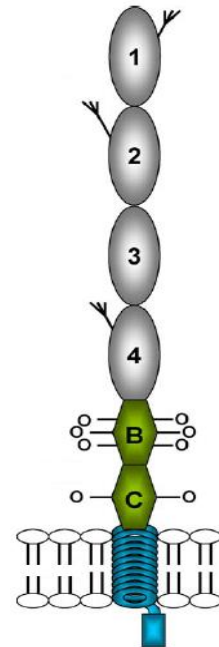
5. ábra

*A H-faktor haplotípusai és frekvenciájuk egészséges kontroll populációban és aHUS betegekben, Cordoba és munkatársai (41) alapján*

### 2.3.2. MCP

A membrán kofaktor protein (MCP) egy egyszálú 45–70 kDa-os transzmembrán glikoprotein, ami a legtöbb humán sejt felszínén expresszálódik (97). Az MCP-t kódoló gén, a *CD46* a *CFH*-hoz hasonlóan az 1-es kromoszómán, az *RCA* génklaszterben helyezkedik el (98). Ez a régió tartalmazza a *CR1* és a *C4BP* regulátorok génjét is, ezek a fehérjék együttműködve szabályozzák a sejt felszíni komplement-aktivitást (99). A 46 kb-os gén 14 exont tartalmaz, melyről alternatív splicing eredményeként perifériás vérésejtben négy fő MCP izoforma keletkezik (100). A fehérje extracelluláris része

négy, egyenként kb. 60 aminosavat tartalmazó komplement kontroll protein (CCP) vagy scr domainból épül fel, az scr 1, 2 és 4 egy-egy *N*-glikozilációs helyet tartalmaz (6. ábra). Ez a négy scr domént tartalmazó amino-terminális rész, amely a komplement-regulációért felelős, minden izoformában azonos. Ezt követi egy ún STP régió (szerin-, treonin- és prolin-gazdag régió), mely *O*-glikozilációs helyeket tartalmaz. Ezt a régiót három exon kódolja (7-9) melyről A, B, és C-vel jelölt domének expresszálódhatnak, A-C), de a leggyakoribb izoformák a B-t és C-t vagy csak a C-t tartalmazzák, ami annak az eredménye, hogy a 7-es és 8-as exonok alternatív splicinggal kivágódnak. Az STP régió után egy 12 aminosavas csoport helyezkedik el, melynek funkciója ismeretlen. Ezt egy hidrofób domén, egy töltött transzmembrán anchor és egy citoplazmatikus farok követi (101). Az aHUS betegekben talált MCP mutációk nagy része valamelyik extracelluláris doménbe esik, amelyek a komplement-regulációért felelősek, de leírtak mutációt a transzmembrán doménben és a citoplazmatikus farokban is. Az eddig leírt aHUS betegek kb. 10%-ában találtak MCP mutációt (46). Az eddig vizsgált mutációkról kimutatták, hogy csökkent MCP expressziót okoznak vagy szekretált, de funkcionálisan hibás fehérjét eredményeznek (46). Az MCP-mutációt hordozó aHUS betegeknél a legtöbb esetben gyermekkorban jelentkezik a betegség, de az epizódok lefolyása a H-faktor mutációt hordozókénál enyhébb, a betegek 80% teljes remisszóba kerül. A rekurrencia gyakori, de a hosszútávú prognózisra nincs nagy hatása, 60-70%-uk több epizód után sem szorul dialízisre (94).



## 6. ábra

*Az MCP fehérje doménszerkezete (BC izoforma)*

*Anna Richards és munkatársai (101) alapján*

Az MCP egyes polimorfizmusai is kapcsoltságot mutatnak egymással, és haplotípusokat alkotnak (2. táblázat).

## 2. táblázat

*MCP haplotípusok és frekvenciák aHUS betegekben és kontroll populációban, Ermini és munkatársai, Servais és munkatársai, Esparza-Gordillo és munkatársai, Fremeaux-Bacchi és munkatársai (42, 102-104) alapján*

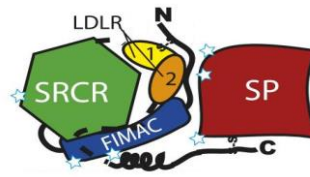
| haplotípus           | rs2796267 | rs2796268 | rs1962149 | rs859705 | rs7144 | Frekvencia kontroll | Frekvencia aHUS |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|----------|--------|---------------------|-----------------|
| MCP <sub>AAGGT</sub> | A         | A         | G         | G        | T      | 0,49-0,54           | 0,33-0,36       |
| MCP <sub>GGAAC</sub> | G         | G         | A         | A        | C      | 0,21-0,25           | 0,43-0,44       |
| MCP <sub>GAGGT</sub> | G         | A         | G         | G        | T      | 0,1-0,12            | 0,09- 0,11      |
| MCP <sub>AGAAC</sub> | A         | G         | A         | A        | C      | 0,07-0,1            | 0,05            |

A négy ismert haplotípus közül az MCP<sub>GGAAC</sub> haplotípus (mely az rs2796267, rs2796268, rs1962149, rs859705 és rs7144 polimorfizmusok ritka alléljait tartalmazza) előfordulása szignifikánsan magasabb aHUS betegekben a kontroll populációkhoz viszonyítva (42, 103). A promóter régióban található két polimorfizmus (rs2796267, rs2796268) ritka alléljai riporter gén elé klónozva a vad típushoz képest 25%-kal csökkent transzkripciós aktivitást mutattak, ez alapján az MCP<sub>GGAAC</sub> haplotípus feltehetően hatással van a sejtfelszíni MCP expresszió szintjére (42).

### 2.3.3. I-faktor

Az I-faktor egy szérum glikoprotein, mely a májban szintetizálódik. Szérumkoncentrációja kb. 35 mg/L. Az I-faktor inaktív, 88 kDa-os termék formájában szekretálódik, majd ebből a prekuzorból képződik az érett fehérje, ami egy heterodimer: egy 51 kDa-os nehéz és egy 37 kDa-os könnyű láncból áll, ezeket egy diszulfid-híd kapcsolja össze (86). Az inaktív formát a nem katalitikus nehéz lánc tartja fenn, mely allosztérikusan modulálja a könnyű láncot. A nehéz lánc tartalmaz egy FIMAC (factor I membrane attack complex) domént, egy SRCR (scavenger receptor cysteine-rich) domént és két LDLR (low-density lipoprotein receptor) domént. A könnyű lánc tartalmazza a szerin proteáz katalitikus domént, mely a C3b és a C4b hasítást katalizálja (105) (7. ábra).





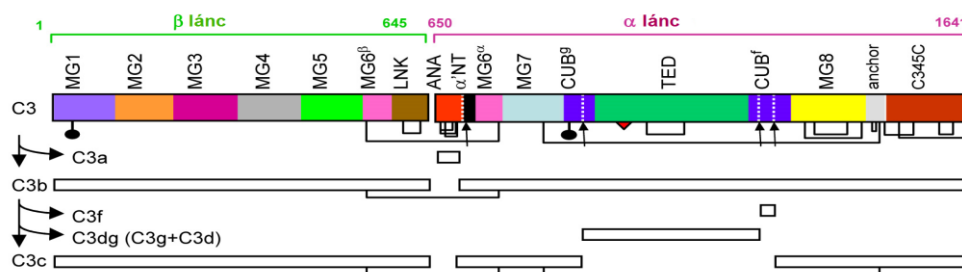
7. ábra

*Az I-faktor fehérje doménszerkezete Roversi és munkatársai (105)alapján*

Az I-faktor génje (*CFI*) a 4-es kromoszómán található, 63 kb hosszú és 13 exont tartalmaz. Az I-faktort érintő mutációk az aHUS betegek 5-10%-ában ismertek, a legtöbb a szerin proteáz doménben található. A funkcionális vizsgálatok több mutáns esetében is kimutatták, hogy hordozóikban mind az alternatív, mind a klasszikus út regulációja sérül (106-108).

### 2.3.4. C3

A C3 a komplement-aktiváció központi molekulája, 90%-a a májban termelődik, de a monociták, asztrociták és B-limfociták is termelik. Egyszálú prekursor alakban szekretálódik, majd érése során egy 115 kDa-os  $\alpha$  és egy 70 kDa-os  $\beta$  láncból álló, diszulfid-híddal összekapcsolt dimer keletkezik. A C3 szérumkoncentrációja 0,52-15 mg/L (109). A C3 fehérjét összesen 13 domén alkotja (8. ábra). A reaktív tioészter-kötés a TED doménben található (thioester-containing domain). Az ANA (anaphylatoxin) domén, mely az  $\alpha$  lánc elején található, az aktiváció során lehasad és a C3a fragmentet alkotja. Az MG7 és az MG8 közötti fragmenst hasítja ki az I-faktor. A legtöbb domén funkciója ismeretlen (MG1–MG7, LNK és CUB domének) (110).



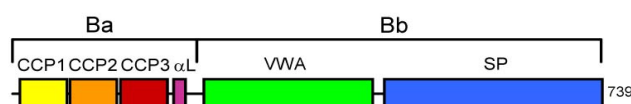
8. ábra

*A C3 fehérje doménszerkezete Janssen és munkatársai (110)alapján*

A C3 gén a 19-es kromoszómán található 42,8 kb hosszú és 41 exont tartalmaz. A C3-at érintő mutációk aHUS betegek körében ritkák, frekvenciájuk 2-10%. Funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy egyes C3 mutációk esetében csökken az MCP kötés affinitása, ezáltal csökken a C3b inaktiválás hatékonysága (111), egy nonszensz és egy misszensz mutációról leírták, hogy hordozókban a C3 nem vagy csak minimálisan szekretálódik (111). Két mutáció hatását vizsgálva trombocitákon (112) és a glomeruláris endotélsejteken (113) kimutatták, hogy a mutáns C3 nagyobb affinitással köt a B-faktorhoz, így a C3-konvertáz tovább aktív marad.

### 2.3.5. B-faktor

A B-faktor egy szerin proteáz mely zimogén formában van jelen a szérumban, kb. 180 ug/ml koncentrációban. Aktiválása egy peptidkötés hasításával történik. Főként a májban termelődik, de kis mennyiségben termelik monociták, fibroblasztok, endotél- és epitélsejtek is (114, 115). A B-faktor egyszálú 90 kDa-os molekula, ezt egy 30 kDa-os N-terminális Ba fragmensre és egy 57kDa-os C-terminális Bb fragmensre hasítja a D-faktor. A fehérje tartalmaz három CCP domént, egy vonWillebrandt-faktor1-es típusú domént és egy SP (szerin proteáz) domént (116) (9.ábra).



9. ábra

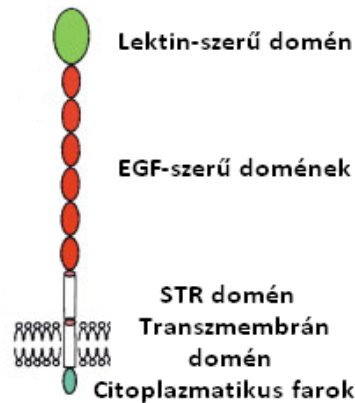
*A B-faktor fehérje doménszerkezete Milder és munkatársai (117) alapján*

A B-faktort kódoló *CFB* gén 6 kb hosszú és 18 exont tartalmaz. A 6-os kromoszóma fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) régiójában helyezkedik el (6q24). A B-faktor mutációk aHUS betegekben extrém ritkák (1-4%) (30, 48). Funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy egyes B-faktor mutációk elősegítik a C3bBb komplex kialakulását, ezáltal a C3b képződés fokozódását eredményezik (118, 119), más mutációk az I-faktor hasítással szemben ellenállóvá teszik a komplexet, és olyat is találtak, ami egy olyan mutáns fehérjét eredményez, aminek nincs ligandkötő vagy funkcionális aktivitása (119).

### 2.3.6. Trombomodulin

A trombomodulin az endotélsejtek 74kDa-os transzmembrán glikoproteinje. Doménszerkezete a 10. ábrán látható. A lektinszerű domén más C-típusú lektinekkel homológ, gyulladásgátló folyamatokban játszik szerepet és ennek van szerepe a komplement-regulációban is. A trombomodulin hat EGF (epidermal growth factor) -szerű domént tartalmaz, ezek a protein C thrombin általi aktiválásában és a TAFI aktiválásában vesznek részt (120). A szerin-treonin gazdag régió (STR domén) a protein C aktiválásában játszik szerepet (121). A membránba egy hidrofób transzmembrán domén és egy rövid citoplazmatikus farok rögzíti a fehérjét (10. ábra).

10. ábra



*A trombomodulin doménszerkezete*

*Fuentes-Prior és munkatársai(122) alapján*

A trombomodulin génje (*THBD*) 4,03 kb hosszú és egyetlen exon alkotja. Az aHUS betegeknél trombomodulin mutációk igen ritkák, 3-5%-ukban lehet azonosítani. Eddig a lektinszerű doménben és az STR régióban találtak aHUS-sal összefüggésbe hozható mutációkat (123, 124), ezek a mutációk a kofaktor-aktivitás elvesztését eredményezik (123). A trombomodulin főként membránkötött formában fordul elő, de kis mennyiségben egy szolubilis formája is megtalálható a plazmában, melynek funkciója hasonló. Transzplantáció után elméletileg nem kell számítani újabb epizódra, de ismert olyan eset, ahol három nappal a transzplantáció után mégis rekurrencia alakult ki. Ennek oka feltehetően a szolubilis, mutáns trombomodulin jelenléte volt (125).

### 3. Célkitűzések

Hemolitikus urémiás szindrómával diagnosztizált betegektől 2008 óta érkeztek szérumminták a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumába, ahol számos komplementfehérje, aktivációs termékek és autoantitestek mérése érhető el rutin laboratóriumi vizsgálat keretében. Az egyre elterjedtebb molekuláris genetikai módszerek adta diagnosztikai lehetőségek ellenére a magyarországi hemolitikus urémiás szindrómás betegek nagy részében nem volt ismert a betegséget okozó pontos genetikai háttér. A komplement gének direkt DNS szekvenálása laboratóriumunkban 2010 előtt nem volt beállítva, ennek következtében megválaszolatlanok maradtak a hosszú távú prognózissal valamint a transzplantációs stratégiával kapcsolatos kérdések, és családvizsgálat végzésére sem volt lehetőség a betegség esetleges kialakulásának megítélésére. Eset-sorozat tanulmányunkkal fel kívántuk tárni betegeinkben az aHUS komplex etiológiáját, és a következő konkrét célokat tűztük ki:

- a 2008-2014 között laboratóriumunkban vizsgált aHUS betegek klinikai jellemzőinek és laboratóriumi paramétereinek összegyűjtése és elemzése,
- a *CFH*, *CFI*, *CD46*, *C3*, *CFB* és *THBD* gének teljes kódoló régióját érintő DNS szekvenálási vizsgálmódszer beállítása,
- az atípusos HUS betegek genetikai rizikójának feltárása és a betegség kimenetelének vizsgálata az etiológia, a kezelés és az életkor függvényében.

Az elmúlt években egyre több nemzeti- és nemzetközi összefoglaló tanulmány és adatbázis közli a felderített genetikai eltérések listáját, ám a mutációk pontos funkcionális szerepével kapcsolatban nem minden esetben található információ. Azt feltételeztük, hogy a H-faktor szintjének allélspecifikus mérése és funkciójának tanulmányozása vörösvértest-lízis esszében értékes adatokat szolgáltathat egy adott, új genetikai variáció hatásának megítéléséhez, ezért a következő konkrét kérdés megválaszolását is célul tűztük ki:

- A betegeinkben azonosított H-faktor mutációknak milyen hatása van a fehérje mennyiségére és funkciójára?

Irodalmi adatokból ismert, hogy egy-egy mutáció nem mutat teljes penetranciát, a hordozó személyben a betegség kialakulása számos más tényezőtől is függ. A környezeti tényezőkön túl atípusos HUS-ban egyéb, penetranciát befolyásoló rizikó haplotípusok is ismertek, ilyen pl. a H-faktor H3 haplotípusa, ami a betegpopulációkban magasabb arányban fordul elő, mint a kontrollokban. Az, hogy a H3 haplotípus milyen mechanizmussal járul hozzá a betegség kialakulásához, nem pontosan ismert, így az alábbi kérdésre is kerestük a választ:

- A H3 haplotípus mutat-e összefüggést a szérumban H-faktor koncentrációval?

A pHUS pathomechanizmusában a neuraminidázt termelő *Streptococcus pneumoniae* patogén szerepe jól tanulmányozott. Mivel az invazív pneumococcus betegség az esetek csak kis százalékában progrediál pHUS-sá, feltételezhető, hogy a gazdaszervezet rizikófaktora is hozzájárulnak a betegség kialakulásához, ez azonban kevésbé vizsgált. A pHUS esetében eddig nem történt részletes komplementprofil- és genetikai analízis, ezért a következő kérdésekre kerestük a választ:

- A pHUS betegekben megfigyelhető-e a komplementrendszer diszregulációja?
- A pHUS betegekben előfordulnak-e az aHUS betegekben ismert komplement mutációk, rizikó haplotípusok és kópiaszám-variációk, vagyis igazolható-e az alternatív út diszregulációja háttérben genetikai komponens?

## 4. Módszerek

### 4.1. Vizsgált személyek

Vizsgálatainkat 2008 és 2014 között, HUS gyanú miatt vagy HUS klinikai diagnózissal laboratóriumunkba küldött betegek és családtagjaik mintáival végeztük. A HUS klinikai diagnózisa a következő kritériumok alapján került megállapításra: egy vagy több epizódos mikroangiopátiás hemolitikus anémia, trombocitopénia és akut veseelégtelenség megléte. A betegek mintái diagnosztikai vizsgálat céljából érkeztek Magyarországról és a következő európai országokból: Ausztria, Csehország, Macedónia, Bosznia-Hercegovina, Litvánia, Szerbia, Szlovákia, Szlovénia és Ukrajna. A bemutatott betegek teljes genetikai- és komplement vizsgálata laboratóriumunkban zajlott.

Vizsgálatainkba atípusos HUS és pneumococcus-asszociált HUS betegeket vontunk be, a diarrhea-asszociált formát, így azokat a betegeket, akik a HUS megjelenése előtti napokban véres hasmenéses panaszai voltak, kizártuk. A HUS H-faktor elleni autoantitestekhez köthető formája, valamint a más alapbetegségekhez társuló szekunder formák szintén kizárási kritériumok voltak. Nem mutatom be továbbá azokat a betegeket, akik genetikai vizsgálata csak részben történt laboratóriumunkban. Összesen 29 aHUS beteget vizsgáltunk 27 családból (életkor 0-61 év, 16 nő, 13 férfi), valamint 5 pHUS beteget 5 családból (életkor 11-37 hónap, 5 nő). A betegek, illetve kiskorú beteg esetén a szülők írásbeli beleegyezésüket adták a laboratóriumi vizsgálatok diagnosztikai és kutatási célú elvégzéséhez. A klinikai és laboratóriumi adatok utólagos gyűjtése a kórházi dokumentációból, az Egészségügyi Tudományos Tanács által jóváhagyott protokoll alapján zajlott. A betegeket „HUN” azonosítóval regisztráltuk, a betegadatokat az összesített kiértékelés során anonimizált formában (melynek során a beteg azonosító adatait regisztrációs kódra cseréltük) kezeltük. A dolgozatban említett „akut betegségszakaszból” származó minták a betegség hematológiai aktivitása alatt levett mintákat jelentik, a „remisszós” minták hematológiailag remisszóban lévő betegektől származnak, a vese állapotától függetlenül.

A vizsgálatokban kontrollként használt csoportot összesen 210 (119 nő, 91 férfi, 19-65 év közötti) egészséges, nem rokon, kaukázusi személy alkotta, akik munkaalakalmassági vizsgálat keretében kerültek bevonásra, és írásos beleegyezésüket adták mintáik kutatási céllal történő felhasználására.

#### 4.2. Mintavétel és tárolás

A külföldi betegek szérum- és plazmamintái szárazjégen, míg Magyarországról a frissen levett perifériás vérminták 4°C-on hűtve, hűtőtáskában érkeztek, ezekből laboratóriumunkban történt a szérum és plazma szeparálása, majd aliquotokat készítettünk, amiket -80°C-on tároltunk felhasználásukig. Az EDTA-val (etilén-diamin-tetraecetsav) alvadásgátolt vérmintákat -20°C-on tároltuk a DNS izolálásig.

(A vizsgálatok során használt általános vegyszerek és reagensek gyártója a Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), a későbbiekben ezeknél a termékeknél a gyártót nem nevesítem, más gyártókat a termékek után zárójelben tüntettem fel.)

#### 4.3. DNS izolálás

A genomiális DNS izolálása EDTA-val alvadásgátolt vérből származó mononukleáris sejtekből történt, kisózásos technikával (126). Fél ml plazmamentes alvadásgátolt vérhez 1ml vörösvértest-lízis puffert (1,6M szaharóz, 5 v/v % Triton X-100, 25mM MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O, 60mM Tris-HCl pH 7,5) mértünk, majd fél perc óvatos forgatás után 2 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a fehérvérsejtekből álló csapadékhoz 1ml desztillált vizet mértünk, majd újabb 2 percig 13000rpm-en centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a sejtek feltárására 80µl proteináz-K puffert (0,375M NaCl,0,12M EDTA pH 8,0), 15µl 10 mg/ml-es proteináz-K enzimet, 20µl 20%-os SDS-t és 240µl desztillált vizet mértünk a csapadékra. Az enzimatis emésztés 55°C-os vízfürdőben 30 percig zajlott, majd a mintákat szobahőmérsékletre hűtöttük. A fehérjék kicsapásához a lizátumhoz 250µl telített NaCl oldatot adtunk, majd 15 másodperces erős összerázás után 7 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk. Ezután a felülúszóhoz 0,5ml i-propanolt adtunk a DNS kicsapásához. A mintákat fél percig óvatosan átforgattuk, majd újabb két percig centrifugáltuk. A kicsapott DNS-t 500µl 70%-os etanollal mostuk, majd újból centrifugáltuk. Az etanol eltávolítása után a mintákat vákuumcentrifugában 23°C-on 20 percig szárítottuk, végül 75µl desztillált vízben oldottuk fel, majd egy napig 4°C-on tároltuk.

#### 4.4. A DNS koncentráció meghatározása

A DNS koncentráció meghatározása előtt a mintákat a teljes beoldódás érdekében 37°C-on fél óráig inkubáltuk, ezután a NanoDrop1000 (Thermo Fisher Scientific

Waltham, Massachusetts, USA) spektrofotométer DNS koncentráció mérés panelja alkalmazásával 260 és 280 nm-en mértük az oldat abszorbanciáját. A DNS koncentrációját 260 nm-es hullámhosszon, míg az oldatban lévő fehérje szennyeződést 280 nm-en lehet leolvasni, a mintákat megfelelő tisztaságúnak 1,8 feletti abszorbancia hányados (A260/A280) esetén fogadtuk el. A DNS mintákat koncentrációjuk lemerése után -20°C-on tároltuk felhasználásukig.

## 4.5. Mutációanalízis

### 4.5.1. PCR

A szekvenálás első lépéseként PCR amplifikációt végeztünk. Az alkalmazott primereket irodalmi adatok alapján illetve a Primer Premier program (Premier Biosoft, Paolo Alto, California, USA) segítségével terveztük. A 3. táblázat tartalmazza a primerek szekvenciáját.

### 3. táblázat

*A PCR reakciók során alkalmazott primerek szekvenciája*

| Forward primer |                          |            | Reverse primer |                           |            |
|----------------|--------------------------|------------|----------------|---------------------------|------------|
| Primer név     | szekvencia (5'-3')       | Referencia | Primer név     | szekvencia (5'-3')        | Referencia |
| HFspF2         | CCCCAAATTCATCAAGCACTG    | PP         | HFspR2         | TAGGAAAGCAAACCTCCTCCA     | PP         |
| scr1F3         | TTTAGATAGACCTGTGACTG     | (127)      | scr1R3         | TTTGACTGGCAATAGTGATA      | (127)      |
| scr2AF         | CCCAGCCAATACATCATCAT     | (127)      | scr2AR         | TTTTCCCACTCTCCATAAT       | (127)      |
| scr2BF2        | GACACTCAGAATGGCATCGAG    | (128)      | scr2BR2        | GATCAGGCTGCATTCTTTTGG     | (128)      |
| scr3F          | CCACTCCCATAGAAAAGAATC    | PP         | scr3R          | TAGCTCAATTACAGGCAGATAG    | PP         |
| scr4F2         | CCTGATGGAAACAACATTTCTG   | (128)      | scr4R2         | CATAAATTAGCACTCTACTTTTG   | (128)      |
| scr5F          | GCCATTTTGTATTATGCTAAGG   | (128)      | scr5R          | CTTACTTTGTATATAAATAAGAC   | (128)      |
| scr6F4         | TTAACCAGGGATAGGGTATG     | PP         | scr7R3         | ATACGACTTCATTTAACCAACA    | (95)       |
| scr8F3         | GAGATTTGGAATTGCCAGAAG    | PP         | scr8R3         | GCACTAGGCATCCATATCTTCA    | PP         |
| scr9F          | GCCTGTTTTATTACTAGCATTGTC | PP         | scr9R2         | TGAGGAAGTTGTAACCAACTATAA  | PP         |
| scr10F2        | GTATGACCAATATCAACCTCAC   | PP         | scr10R2        | AACCTAAAGTAGACTAAGACCGACA | PP         |
| scr11F2        | CACCATCTTGATTGTTTAGG     | PP         | scr12R2        | TTGAAGACTGGAAATGTTGAG     | PP         |
| scr13F2        | CTCTAACATTTTCAGCGACAG    | PP         | scr13R2        | TAATAATTCACAGGGCACA       | PP         |
| scr14F2        | TCTATGAGAATACAAGCCAAAAGT | (95)       | scr14R3        | ATATTCTCCACCATATCTATGTTAC | (127)      |
| scr15F2        | CAAATTATACTCACTTTAAATCCG | (128)      | scr15R2        | CCCCTCACTTTGATAACAAGAG    | (128)      |
| HF2881F        | TCTCTGTGATGCATAGTAGCT    | (95)       | HF2881R        | TACCACTTACACTTTGAATGAA    | (95)       |
| scr17F5        | GAGGAGTGAGTGAAGGAGGAA    | PP         | scr17R5        | AAGAAGATGATGATGCTACCG     | PP         |
| scr18F2        | CATTCTTCTCTTTAACTTGG     | PP         | scr18R2        | TTGGTTTCCCTTATTTTCATCTC   | PP         |
| scr19F3        | TCAGGCATCATTTTATTATTTC   | PP         | scr19R2        | GTGAGTATTTGTTACAACAGTG    | PP         |
| scr20F2        | CCTAATTCATACATTAACATCG   | PP         | scr20d2sR      | AGAAATAAAGTCTGAAAATTGCG   | PP         |
| IFe1F          | GGAAACAAGTTCCTATTGGTC    | (35)       | IFe1R          | CTTGTTCAAGTCAATGCCTCT     | (35)       |
| IFe2F          | CTTGAAGCCACCAGACAACA     | (129)      | IFe2R          | GGCAACCCCTGATTTGTTTA      | (129)      |
| IFe3F3         | ATCCTGGCTTCATCACTTGG     | (129)      | IFe3R2         | CAGAATCACTAAAGGATTCATC    | (129)      |
| IFe4F          | CTTGCCCAAGCTGTAACCTCC    | (129)      | IFe4R          | GCAACGAGGCATCAATCAT       | (129)      |
| IFe5F2         | TCCATAAGCCAGGTTTGACC     | (124)      | IFe6R2         | CCATAGTTCTGCAAATGCC       | (124)      |
| IFe7F2         | GAAGGCGTGTGCTGGGATT      | (124)      | IFe7R          | CTAAACTAATGTTCAAGGCTGGG   | (124)      |
| IFe8F2         | CATGCCCTGGGGATTTTGTA     | (129)      | IFe8R2         | TCCAGTTTTAAAGCAATTCTCAA   | (129)      |
| IFe9F2         | CACAGTTTCCATGTTGTTAGT    | (35)       | IFe10R2        | CTATGGGTTTGATCTGCCTTT     | (35)       |



| Forward primer |                             |            | Reverse primer |                          |            |
|----------------|-----------------------------|------------|----------------|--------------------------|------------|
| Primer név     | szekvencia (5'-3')          | Referencia | Primer név     | szekvencia (5'-3')       | Referencia |
| IFe11F3        | AAGCATTACAAAATTCTGGGG       | (124)      | IFe11R3        | GGCTGGATGTTTACTTTTCTGG   | (124)      |
| IFe12F         | CCCTTTCATAATCCCAATGGT       | (129)      | IFe12R         | CTGATGTGGTGGGAGGAGAT     | (129)      |
| IFe13F         | TTGTTAAATGCCATGGAGGAG       | (35)       | IFe13R2        | GACAGGTAATGCCAAACAT      | (35)       |
| MCPprF2        | GCAGAAGCCAAACCTTTGAGA       | PP         | MCPe1R         | CGAAAACACGATTACAGCTTT    | (130)      |
| MCPe2F2        | TTATTCCAAACAAACCAAAAG       | (131)      | MCPe2R2        | CCCCAAATGTATGCAAATCTCT   | (131)      |
| MCPe3F         | ATTCACCCATTCAAAGAG          | (130)      | MCPe3R         | GCCTATCCATAAAACATCC      | (130)      |
| MCPe4F         | TAAGAAACCCCTCAAACACTAC      | (124)      | MCPe4R         | CCGTCTCTTCAAAAATTACAAAA  | (124)      |
| MCPe5F3        | ATTGGGAAAGACAGAAGGAGA       | PP         | MCPe5R2        | TTTACCCTACCATAGCCAGA     | PP         |
| MCPe6F         | CTTGTCTCTGTTACACTGGAAATTA   | (36)       | MCPe7-8R       | ATGGCTATACAAATGTCCTC     | (131)      |
| MCPe9F         | ACACCCATCTCACATTACTTTCA     | (124)      | MCPe9R         | GGCTGTGAGGGGTTAGG        | (124)      |
| MCPe10F        | CCCGGCTAATCCCTCTATCT        | PP         | MCPe10R        | TCCTATGTTGGGCACCTCA      | PP         |
| MCPe11F        | AATTGCGATTCAAGTAGAGATT      | (131)      | MCPe12R        | TGTTTTATGTTGCAGTGATGTTA  | (131)      |
| MCPe13F        | GAACCTAATTCTCAGCTTTC        | (131)      | MCPe13R        | CCTCTTGATATTACTGCC       | (131)      |
| MCPe14F        | CAGTGAGACCAGTTGAACATTTG     | (124)      | MCPe14R        | AAAATACAGCATATCCCTGCTT   | (124)      |
| C3e1F2         | TTTACCACCAAAGTCACTCA        | PP         | C3e1R          | ACTCCAATTCACGATACCTG     | PP         |
| C3e2F2         | AAAGATTGGTACTTCCGGTTCA      | (111)      | C3e2R2         | TCAGTGGGAGGGACTTAGAGGG   | (111)      |
| C3e3F2         | GTTCCCTCACCTGAGTCCCTC       | PP         | C3e4R2         | GGTCATGCACGTTGTGCTGT     | PP         |
| C3e5F2         | CACCTGGTCCCTGTTCTTA         | PP         | C3e7R2         | CCCACATGGTCCACCTCC       | PP         |
| C3e8F2         | GTGGGAGTGGGGCAAGGTG         | PP         | C3e11R2        | TCCGTGTAAGTGAAGGAGCAG    | PP         |
| C3e12F2        | TAAAGGCAGCAGCATAGCATC       | PP         | C3e14R2        | GGAACCCATGTCCAACCTCAT    | PP         |
| C3e15F2        | AAAGGAAGGGCAGAAGCAGGAA      | PP         | C3e17R         | CAGCCCCACCCACAGACA       | (111)      |
| C3e18F3        | CCTGGCTGGAGTGTAGTCTG        | PP         | C3e19R2        | AACATAGGGTTGATTGATTTGG   | PP         |
| C3e20F2        | CCACCATCATCTGTCTATT         | PP         | C3e21R2        | CCAATCTGGCTCTGCTTCT      | PP         |
| C3e22F2        | CCCGCAATGCTAGGGTGAT         | PP         | C3e23R2        | TGAACTAAATGCTATCTGGAGGCT | (124)      |
| C3e24F2        | GAACAGTCTGGAAAGTAACATTAAGCG | (124)      | C3e24R2        | AAATGAGGGGAGTGGCTAGGAG   | (124)      |
| C3e25F2        | TCTGAATCCCTGTCTCTT          | PP         | C3e26R2        | GGAGAATGCAGGTGTTGATG     | PP         |
| C3e27F2        | GACCATGTCCATTTCCCTAC        | PP         | C3e27R2        | AAGGCAGACAGAAAGAATCCC    | PP         |
| C3e28F2        | ACATAATAGATATGCAGCAACAAGG   | PP         | C3e29R2        | GAATGAAACCGTAGCCAGGGA    | PP         |
| C3e30F2        | CTGCATCCTCAGGTCGCT          | (124)      | C3e33R2        | ACTTTGGCAGCCCAAGGCA      | (124)      |
| C3e34F2        | TGAAGCATGGAGGGTCAAATA       | PP         | C3e35R2        | AGGAGGCAAATGGTCAGAAGA    | PP         |
| C3e36F2        | ATAGCAATCTGTTAGCCACC        | PP         | C3e38R2        | CACTACTGCCATACAAACCA     | PP         |
| C3e39F2        | GGTTGTAGATGGCAGTGAGTGT      | PP         | C3e41R2        | CAGGTGAAATGGAGGTGAGGC    | PP         |
| BFe1F          | TCACATGGAATTTCCAGTTATG      | PP         | BFe3R2         | CAGTGGTAGGTGACGCTGTCT    | PP         |
| BFe3F          | TATGGGTTGAGGAGTAGGTAAGATG   | PP         | BFe7R          | CACGGAATCCCTTTGACCAC     | PP         |
| BFe7F          | AGCCCTTGAGCCTTACTGA         | PP         | BFe12R2        | TATCTCAGGTCCCGCTTCTC     | PP         |
| BFe13F2        | GGCAACACCTCCACTTTCT         | PP         | BFe18R2        | CCCAATGCTGGTCTCAGTAAA    | PP         |
| TMs3F          | GAAAGAAAGGAGACCAAGAG        | PP         | THBDs2R        | GGTAGTGAGGACCTGGGACAA    | PP         |

PP= Primer Premier programmal tervezve

A PCR reakciók különböző összetételű, 10 $\mu$ l-es végtérfigatú reakcióelegyekben zajlottak. Mindegyik reakcióelegy tartalmazott 2mM dNTP-t (dezinukleozid-trifoszfát), 5x Promega GoTaq Flexi puffert (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 5U/ $\mu$ l Promega GoTaq DNS polimerázt, valamint 10-10 $\mu$ M forward és reverse primert és 1 $\mu$ l ~50ng/ml koncentrációjú DNS-t. A reakcióelegyek eltérő arányban tartalmaztak MgCl<sub>2</sub>-t illetve ún. Q-oldatot (Qiagen, Venlo, Hollandia). A polimeráz láncreakciókat egy AB GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) PCR készülékben végeztük. A PCR reakciók során a kezdeti denaturáció, amely során szétválnak a genomiális DNS szálai 95°C-on 5 percig tartott. Ezt 35 termociklus követte,

ciklusonként három lépéssel: 15 másodperces denaturálás 95°C-on; 10 másodperces anneálás 59°C-on, majd termékmérettől függően 60-150 másodperces extenzió 72°C-on. Végül a mintákat 4°C-ra hűtöttük le, majd a további vizsgálatokig -20°C-on tároltuk. A PCR-ek során alkalmazott reakcióelegyek (mixek) összetételét, az egyes amplikonoknál alkalmazott extenziós időt és a keletkezett termékek méretét a 4. táblázat foglalja össze.

#### 4. táblázat

*A PCR-ek során alkalmazott reakcióelegyek összetétele, extenziós idők és a keletkezett termékek*

| Gén     | Amplikon neve | Amplifikált exon(ok) | Forward primer | Reverse primer | Mix száma | MgCl <sub>2</sub> végkoncentráció | Q-oldat végkoncentráció | Extenzió ideje | Termék hossza |      |
|---------|---------------|----------------------|----------------|----------------|-----------|-----------------------------------|-------------------------|----------------|---------------|------|
| CFH     | HFsp          | 1                    | HFspF2         | HFspR2         | 4         | 3mM                               | 0                       | 90 sec         | 1362          |      |
|         | HFscr1        | 2                    | scr1F3         | scr1R3         | 2         | 2mM                               | 0                       | 75 sec         | 403           |      |
|         | HFscr2A       | 3                    | scr2AF         | scr2AR         | 4         | 3mM                               | 0                       | 90 sec         | 557           |      |
|         | HFscr2B       | 4                    | scr2BF2        | scr2BR2        | 2         | 2mM                               | 0                       | 75 sec         | 356           |      |
|         | HFscr3        | 5                    | scr3F          | scr3R          | 2         | 2mM                               | 0                       | 75 sec         | 546           |      |
|         | HFscr4        | 6                    | scr4F2         | scr4R2         | 4         | 3mM                               | 0                       | 90 sec         | 375           |      |
|         | HFscr5        | 7                    | scr5F          | scr5R          | 4         | 3mM                               | 0                       | 90 sec         | 406           |      |
|         | HFscr6-7      | 8-9                  | scr6F4         | scr7R3         | 4         | 3mM                               | 0                       | 90 sec         | 1411          |      |
|         | HFscr8        | 11                   | scr8F3         | scr8R3         | 4         | 3mM                               | 0                       | 90 sec         | 952           |      |
|         | HFscr9        | 12                   | scr9F          | scr9R2         | 2         | 2mM                               | 0                       | 75 sec         | 796           |      |
|         | HFscr10       | 13                   | scr10F2        | scr10R2        | 2         | 2mM                               | 0                       | 75 sec         | 532           |      |
|         | HFscr11-12    | 14-15                | scr11F2        | scr12R2        | 4         | 3mM                               | 0                       | 90 sec         | 734           |      |
|         | HFscr13       | 16                   | scr13F2        | scr13R2        | 4         | 3mM                               | 0                       | 90 sec         | 569           |      |
|         | HFscr14       | 17                   | scr14F2        | scr14R3        | 4         | 3mM                               | 0                       | 75 sec         | 739           |      |
|         | HFscr15       | 18                   | scr15F2        | scr15R2        | 4         | 3mM                               | 0                       | 75 sec         | 364           |      |
|         | HFscr16       | 19                   | HF2881F        | HF2881R        | 2         | 2mM                               | 0                       | 75 sec         | 361           |      |
|         | HFscr17       | 20                   | scr17F5        | scr17R5        | 4         | 3mM                               | 0                       | 75 sec         | 1235          |      |
|         | HFscr18       | 21                   | scr18F2        | scr18R2        | 2         | 2mM                               | 0                       | 75 sec         | 1196          |      |
|         | HFscr19       | 22                   | scr19F3        | scr19R2        | 4         | 3mM                               | 0                       | 75 sec         | 853           |      |
|         | HFscr20       | 23                   | scr20F2        | scr20d2sR      | 2         | 2mM                               | 0                       | 75 sec         | 676           |      |
| CFI     | IFe1          | 1                    | IFe1F          | IFe1R          | 2         | 2mM                               | 0                       | 65 sec         | 531           |      |
|         | IFe2          | 2                    | IFe2F          | IFe2R          | 9         | 1mM                               | 1x                      | 65 sec         | 574           |      |
|         | IFe3          | 3                    | IFe3F3         | IFe3R2         | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 709           |      |
|         | IFe4          | 4                    | IFe4F          | IFe4R          | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 398           |      |
|         | IFe5-6        | 5-6                  | IFe5F2         | IFe6R2         | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 699           |      |
|         | IFe7          | 7                    | IFe7F2         | IFe7R          | 2         | 2mM                               | 0                       | 65 sec         | 274           |      |
|         | IFe8          | 8                    | IFe8F2         | IFe8R2         | 2         | 2mM                               | 0                       | 65 sec         | 390           |      |
|         | IFe9-10       | 10-11                | IFe9F2         | IFe10R2        | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 1004          |      |
|         | IFe11         | 11                   | IFe11F3        | IFe11R3        | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 539           |      |
|         | IFe12         | 12                   | IFe12F         | IFe12R         | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 275           |      |
|         | IFe13         | 13                   | IFe13F         | IFe13R2        | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 748           |      |
|         | CD46          | MCPpr+ e1            | 1              | MCPprF2        | MCPe1R    | 1                                 | 1mM                     | 0              | 65 sec        | 1081 |
|         |               | MCPe2                | 2              | MCPe2F2        | MCPe2R2   | 1                                 | 1mM                     | 0              | 65 sec        | 473  |
| MCPe3   |               | 3                    | MCPe3F         | MCPe3R         | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 353           |      |
| MCPe4   |               | 4                    | MCPe4F         | MCPe4R         | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 552           |      |
| MCPe5   |               | 5                    | MCPe5F3        | MCPe5R2        | 2         | 2mM                               | 0                       | 65 sec         | 1055          |      |
| MCPe6-8 |               | 6-8                  | MCPe6F         | MCPe7-8R       | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 1038          |      |
| MCPe9   |               | 9                    | MCPe9F         | MCPe9R         | 9         | 1mM                               | 1x                      | 65 sec         | 519           |      |

| Gén      | Amplikon neve | Amplifikált exon(ok) | Forward primer | Reverse primer | Mix száma | MgCl <sub>2</sub> végkoncentráció | Q-oldat végkoncentráció | Extenzió ideje | Termék hossza |
|----------|---------------|----------------------|----------------|----------------|-----------|-----------------------------------|-------------------------|----------------|---------------|
|          | MCPe10        | 10                   | MCPe10F        | MCPe10R        | 1         | 1mM                               | 0                       | 65 sec         | 473           |
|          | MCPe11-12     | 11-12                | MCPe11F        | MCPe12R        | 4         | 3mM                               | 0                       | 65 sec         | 943           |
|          | MCPe13        | 13                   | MCPe13F        | MCPe13R        | 2         | 2mM                               | 0                       | 65 sec         | 331           |
|          | MCPe14        | 14                   | MCPe14F        | MCPe14R        | 2         | 2mM                               | 0                       | 65 sec         | 522           |
| C3       | C3e1          | 1                    | C3e1F2         | C3e1R          | 1         | 1mM                               | 0                       | 70 sec         | 1157          |
|          | C3e2          | 2                    | C3e2F2         | C3e2R2         | 3         | 1mM                               | 0,5x                    | 120 sec        | 1183          |
|          | C3e3-4        | 3-4                  | C3e3F2         | C3e4R2         | 1         | 1mM                               | 0                       | 70 sec         | 974           |
|          | C3e5-7        | 5-7                  | C3e5F2         | C3e7R2         | 9         | 1mM                               | 1x                      | 60 sec         | 894           |
|          | C3e8-11       | 8-11                 | C3e8F2         | C3e11R2        | 9         | 1mM                               | 1x                      | 120 sec        | 1774          |
|          | C3e12-14      | 12-14                | C3e12F2        | C3e14R2        | 3         | 1mM                               | 0,5x                    | 120 sec        | 1965          |
|          | C3e15-17      | 15-17                | C3e15F2        | C3e17R         | 9         | 1mM                               | 1x                      | 120 sec        | 1099          |
|          | C3e18-19      | 18-19                | C3e18F3        | C3e19R2        | 9         | 1mM                               | 1x                      | 60 sec         | 978           |
|          | C3e20-21      | 20-21                | C3e20F2        | C3e21R2        | 10        | 2mM                               | 1x                      | 70 sec         | 789           |
|          | C3e22-23      | 22-23                | C3e22F2        | C3e23R2        | 1         | 1mM                               | 0                       | 70 sec         | 915           |
|          | C3e24         | 24                   | C3e24F2        | C3e24R2        | 10        | 2mM                               | 1x                      | 70 sec         | 651           |
|          | C3e25-26      | 25-26                | C3e25F2        | C3e26R2        | 10        | 2mM                               | 1x                      | 70 sec         | 1097          |
|          | C3e27         | 27                   | C3e27F2        | C3e27R2        | 1         | 1mM                               | 0                       | 70 sec         | 720           |
|          | C3e28-29      | 28-29                | C3e28F2        | C3e29R2        | 3         | 1mM                               | 0,5x                    | 120 sec        | 1582          |
|          | C3e30-33      | 30-33                | C3e30F2        | C3e33R2        | 9         | 1mM                               | 1x                      | 120 sec        | 1586          |
|          | C3e34-35      | 34-35                | C3e34F2        | C3e35R2        | 1         | 1mM                               | 0                       | 70 sec         | 791           |
| C3e36-38 | 36-38         | C3e36F2              | C3e38R2        | 3              | 1mM       | 0,5x                              | 120 sec                 | 1672           |               |
| C3e39-41 | 39-41         | C3e39F2              | C3e41R2        | 9              | 1mM       | 1x                                | 120 sec                 | 1216           |               |
| CFB      | BFe1-3        | 1-3                  | BFe1F          | BFe3R2         | 2         | 2mM                               | 0                       | 150 sec        | 1814          |
|          | BFe3-7        | 3-7                  | BFe3F          | BFe7R          | 3         | 1mM                               | 0,5x                    | 150 sec        | 1851          |
|          | BFe7-12       | 7-12                 | BFe7F          | BFe12R2        | 8         | 2mM                               | 0,5x                    | 150 sec        | 2382          |
|          | BFe13-18      | 13-18                | BFe13F2        | BFe18R2        | 1         | 1mM                               | 0                       | 150 sec        | 1820          |
| THBD     | THBD          | 1                    | TMs3F          | THBDs2R        | 10        | 2mM                               | 1x                      | 150 sec        | 2499          |

#### 4.5.2. Agaróz gélelektroforézis

A PCR termékek amplifikációját követően a keletkezett termékek mennyiségének meghatározására agaróz gélelektroforézist használtunk: 2%-os agaróz gél készítettük 1x TBE puffer (0,09M Tris, 0,09M bórsav, 0,002M EDTA, pH8.0) felhasználásával, amelyhez 1µg/ml etídium-bromidot adtunk. A termékek 3µl-éhez 2µl loading dye-t (10mM Tris-HCl (pH7.6); 0,03 V/V% brómfenolkék; 0,03 V/V% xilén cianol; 60 V/V% glicerol; 60mM EDTA) kevertünk és 2µl 50 vagy 100 bázispáros létra (Thermo Fisher Scientific) mellett vittük fel a géltre. Az elektroforézis szobahőmérsékleten 6V/cm térerő alkalmazásával, 30 percig zajlott. A DNS-etídiumbromid fragmentumokat UV-fénnyel megvilágítva ( $\lambda_{em}=620$  nm), Syngene Chemigenious2 (Syngene, Cambridge, UK) gëldokumentációs rendszerben detektáltuk, és digitális fényképet készítettünk róluk. Az értékelés során a szekvenálási reakcióhoz szükséges PCR termékek koncentrációját szemikvantitatív módszerrel határoztuk meg, a létra fragmentumok koncentrációjának ismeretében.

#### 4.5.3. A PCR termékek tisztítása

A keletkezett PCR termékeket a feleslegben maradt dNTP-től és a primerektől alkalikus foszfatáz (Thermo Fisher Scientific) (a DNS 5' végén található foszfátok defoszforilációjátkatalizálja) és ExonucleaseI (Thermo Fisher Scientific) (degradálja az egyszálú oligonukleotid szakaszokat) enzimek felhasználásával tisztítottuk meg a szekvenálási reakció előtt. A reakció során 10µl térfogatú PCR termékhez 0,05µl 1U/ul koncentrációjú ExonucleaseI enzimet és 0,25µl 20U/µl koncentrációjú alkalikus foszfatázt adtunk. A mintákat 37°C-on 60 percen át inkubáltuk, majd 85°C-on 15 perc alatt inaktiváltuk az enzimeket.

#### 4.5.4. Szekvenálási reakció

A szekvenálási reakciók 10µl végtérfogatú reakcióelegyben zajlottak. A tisztított PCR termékeket az agaróz gélelektroforézissel meghatározott mennyiség alapján a termék hosszának megfelelőkoncentrációra (~100bp-onként 1ng/µl) hígítottuk. A reakcióelegy a következőket tartalmazta: BigDye reakció premix és BigDye szekvenáló puffer (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) 0,5x koncentrációban, 0,5µl 1mM szekvenáló primer, 1µl tisztított PCR termék. A szekvenálási reakcióhoz használt primereket az 5. és a 6. táblázatában tüntettem fel. A *CFH*, *CFI*, *CD46* és *C3* gének primerei az 5. táblázatban szerepelnek. Ezen gének esetén az előzőekben bemutatott amplikonokat egy-egy forward és reverse primerrel (a hosszabb termékeket 2-2 forward és reverse primerrel) szekvenáltuk, a kapott szekvenciák a kódoló szakaszokat kétszer lefedik.

### 5. táblázat

A *CFH*, *CFI*, *MCP (CD46)* és a *C3* szekvenáló primereinek szekvenciája

| Forward primer |                           |            | Reverse primer |                                |            |
|----------------|---------------------------|------------|----------------|--------------------------------|------------|
| Név            | szekvencia (5'-3')        | Referencia | Név            | szekvencia (5'-3')             | Referencia |
| HFspF          | ACAATAGACCCGAATAGAGTT     | PP         | HFspR          | CAATGTCAAAAGCCACTCA            | PP         |
| scr1F3         | TTTAGATAGACCTGTGACTG      | (127)      | scr1R3         | TTTGACTGGCAATAGTGATA           | (127)      |
| scr2AR3*       | ATTTCCATCATAGTTAACTTTCAGG | (124)      | scr2AR         | TTTTCCCACTCTCCATAAT            | (127)      |
| scr2BF2        | GCACTCAGAATGGCATCGAG      | (128)      | scr2BR         | GAGACTTAAAGATATTTAATGTAAG      | (36)       |
| scr3F          | CCACTCCATAGAAAAGAATC      | PP         | scr3R          | TAGCTCAATTACAGGCAGATAG         | PP         |
| scr4F2         | CCTGATGGAAACAACATTTCTG    | (128)      | scr4R2         | CATAAATTAGCACTCTACTTTTG        | (128)      |
| scr5F          | GCCATTTTGTATTATGCTAAGG    | (128)      | scr5R          | CTTACTTTGTATATAACAATAAGAC      | (128)      |
| scr6F          | CCTAGAAACCTAATGGAATGTG    | (124)      | scr6R2         | TTTGGTCACTTTGCTTGAACA          | (124)      |
| scr7F2         | AGAAAAGAGTTGTTCAAGCAAAG   | PP         | scr7R2         | TTGCCACAATTAATATAGATGAGTCTTAGA | (95)       |
| scr8F2         | GGCAACTCTGAGCTTATT        | PP         | scr8R          | ACTTTTGTGTATCATCTGGATAATC      | (36)       |

| Forward primer |                           |            | Reverse primer |                             |            |
|----------------|---------------------------|------------|----------------|-----------------------------|------------|
| Név            | szekvencia (5'-3')        | Referencia | Név            | szekvencia (5'-3')          | Referencia |
| scr9F2         | ACTTTTGACAACACTATTTTACGAC | PP         | scr9R          | CCCTTCTTTTCCCAGTTTATGT      | PP         |
| scr10F         | CAACCTCACTTTATTGTGGCATATG | (36)       | scr10R2        | AACCTAAAGTAGACTAAGACCGACA   | PP         |
| scr11F2        | CACCATTCTTGATTGTTTAGG     | (36)       | scr12R         | GTTGTTACAATAAAAATATTAACCTTG | (36)       |
| scr13F2        | CTCTAACATTTTCAGCGACAG     | PP         | scr13R2        | TAACATAATTCACAGGGCACA       | PP         |
| scr14F         | GTGATAATTTATGAAACAGTTATTG | (36)       | scr14R2        | CTCTCTGTTTACACGAAGCAC       | (127)      |
| scr15F2        | CAAATTATACTCACTTTAAAATCCG | (128)      | scr15R2        | CCCCTCACTTTGATAACAAGAG      | (128)      |
| HFscr16R*      | TGGTACCACCTTACACTTTGAATG  | (36)       | HF2881R        | TACCACTTACACTTTGAATGAA      | (95)       |
| scr17F2        | AATTGCTACGGCTACCAATAT     | PP         | scr17R2        | GTCTCGAACTCCTGACCTCAA       | PP         |
| scr18lgF       | TTTAAAACATCAACGCTTGACCTT  | PP         | scr18lgR       | TCAATTTGGTCGAATCTTTCTGG     | PP         |
| scr19F2        | ATATACAGTGTGTGTTTGCG      | PP         | scr19R         | GTGAAATATCAGACTCATCACAGA    | (36)       |
| scr20usF       | TGTTTCTACATAGTTGGTTTGAT   | PP         | scr20d1sR      | CATTTTATGAACTGGACACAACC     | PP         |
| IFe1F          | GGAAACAAGTTCCTATTGGTC     | (35)       | IFe1R          | CTTGTTCAAGTCAATGCCTCT       | (35)       |
| IFe2F          | CTTGAAGCCACCAGACAACA      | (129)      | IFe2R          | GGCAACCCTGATTGTGTTA         | (129)      |
| IFe3F          | TCGTCATGATGTTCAAAGCTC     | (129)      | IFe3R          | TGATGCACATAGTTAATTTCTTAG    | (129)      |
| IFe4F          | CTTGCCCAAGCTGTAACCTC      | (129)      | IFe4R          | GCAACGAGGCATCAATCAT         | (129)      |
| IFe5F2         | TCCATAAGCCAGGTTTGACC      | (124)      | IFe5-6R        | CCATCTATGTTCCCTTAAGAT       | (35)       |
| IFe7F          | AAAACAGAAATAAGGTGCAATGG   | (124)      | IFe7R2         | CATGCTCCATTAACAGTTACAT      | (124)      |
| IFe8F2         | CATGCCTTGGGGATTTTGTA      | (129)      | IFe8R2         | TCCAGTTTTAAAAGCAATCTCAA     | (129)      |
| IFe9-10F       | TACTAATGATTCCAGCCTGTC     | (35)       | IFe9-10R       | GCTTTATCATCTGCCACAATC       | (35)       |
| IFe11F2        | TTCTGGGGAAATGAAAAGG       | (129)      | IFe11R         | TTATGCTTCTCTGAGTGTCT        | (35)       |
| IFe12F         | CCCTTTCATAATCCAATGGT      | (129)      | IFe12R         | CTGATGTGGTGGGAGGAGAT        | (129)      |
| IFe13F         | TTGTTAAATGCCATGGAGGAG     | (35)       | IFe13R2        | GACAGGTAATGCCAAAACAT        | (35)       |
| MCPprF         | ATTTCTACCCATCCGAATCCTT    | PP         | MCPprR         | AATCCCCAACTCACAAGCA         | PP         |
| MCPe1F         | AGGGCTTAGCAAGAAAAAGG      | (130)      | MCPe1R         | CGAAAACACGATTCACGCTTT       | (130)      |
| MCPe2F2        | TTATTTCCAAACAACCAAAAG     | (131)      | MCPe2F**       | AGGGCTTTCTGTTTTTTCTG        | (130)      |
| MCPe3F         | ATTCCCACCCATTCAAAGAG      | (130)      | MCPe3R         | GCCTATCTCCATAAAAACATCC      | (130)      |
| MCPe4F         | TAAGAAACACCCCTCAAACACTAC  | (124)      | MCPe4R3        | TGTAAGGGGTGTAAGGAGGC        | PP         |
| MCPe5F2        | TGGACTACAATTTGACATGCGATT  | PP         | MCPe5R         | CACATACACCTGCTTTGTTTACTGT   | (36)       |
| MCPe6F         | CTGTCTCTGTTCCACTGGAAATTA  | (36)       | MCPe6R         | CAGCAACAACAATAACAACCAAGA    | (36)       |
| MCPe7-8F       | GTTCTTAGCACGTTATGTAC      | (131)      | MCPe7-8R       | ATGGCTATACAATGTCTCT         | (131)      |
| MCPe9F         | ACACCCATCTCACATTACTTTCA   | (124)      | MCPe9R2        | CTGGGGGAGGGATAGCATTAG       | (131)      |
| MCPe10F        | CCCGGCTAATCCCTCTATCT      | PP         | MCPe10R2       | CCTATGTTTGGGCACCTCATAA      | (36)       |
| MCPe11F3       | ACAGCCAAACCATATCAAGTGT    | (130)      | MCPe12R2       | GAAGCTGCACAAAAGCATGTT       | (130)      |
| MCPe13F        | GAACCTAATTCTCAGCTTTC      | (131)      | MCPe13R        | CCTCTTTGATATTTACTGCC        | (131)      |
| MCPe14F        | CAGTGAGACCAGTTGAACATTTG   | (124)      | MCPe14R        | AAAATACAGCATATCCCTGCTT      | (124)      |
| C3e1F          | ACTACAAAGTGGGTCCAACAGA    | PP         | C3e1R2         | ATCCACAAACACCCAAATGC        | (124)      |
| C3e2F          | AGAGAAGATAATGGCATTGGC     | (111)      | C3e2R          | TAGAAAGGGGAGAAGCAGAAG       | (111)      |
| C3e3-4F        | GACCAAGAATAATGGGCAGG      | (124)      | C3e3-4R        | CCCTCCGGTGTGTCTTTC          | (124)      |
| C3e5-7F        | AGACACAGGTCCGGGAGAG       | (124)      | C3e5-7R        | CCCACCTGGTCTTCACTG          | (124)      |
| C3e8-9F        | GGCTCCAGTCTTACGACA        | (124)      | C3e8-9R        | CAGGCTGGAATCCATCTTCA        | (124)      |
| C3e10-11F      | GCACAGGCCAGATGAAAG        | (124)      | C3e10-11R      | TGCGCAGGAGAGAACCTC          | (124)      |
| C3e12-13F      | CTTAATCCCATCTGCAAAGC      | PP         | C3e13R3        | GAGAGAGAGGAGTAGGGAGAGG      | PP         |
| C3e14F         | AACCTTTCTGTCTTCCACTC      | (111)      | C3e14R         | CATTCCCATCTTCACTTCAA        | (111)      |
| C3e15-16F      | AGGGCAGAAGCAGGAATGG       | PP         | C3e15-16R      | CGGACCCAGGGAGGACTT          | PP         |
| C3e17F2        | GAAGTCTTCCCTGGGGTC        | (124)      | C3e17R2        | TCCCTCCTCAGACAGGATC         | (124)      |
| C3e18-19F      | TTTACCATGTTAGCTAGGCT      | (111)      | C3e18-19R      | AATGAGATGACACTCAGACAC       | (111)      |
| C3e20F         | TTTAGTTCACAGGCTTACGCA     | (111)      | C3e20-21R      | CCTAAGCTGGACACTATGATT       | (111)      |
| C3e22-23F      | AGTGCCTGTCTGACCATC        | PP         | C3e22-23R      | GAAGGGGAAGAGAAAGGTGC        | (124)      |
| C3e24F         | CTCGCTGTCCCTAACCC         | (124)      | C3e24R         | GGAGGGCGTGGTCTTGAG          | (124)      |
| C3e25F         | TCCTCCAGAACCCTCCG         | PP         | C3e26R3        | TGGGCAGTGGGCACATGGAGG       | PP         |
| C3e27F         | TAACACCTAGAAGAGACTCAG     | (111)      | C3e27R         | ATGACTGCAGTGTGTCTGTT        | (111)      |
| C3e28F         | CAAGGACAGAAATCCCTGATG     | PP         | C3e28R         | TGGCTCCTGCCTTACCTC          | PP         |
| C3e29F         | GCAGGTCTCATTGTAACCA       | PP         | C3e29R         | GGCTCGTGGGAATGAAGAA         | PP         |
| C3e30-31F      | GATGTCCAGCTCTGATTTG       | (124)      | C3e31R2        | GAGGAGATGGTCCCTCTGG         | PP         |
| C3e32-33F      | GACCATCTCCTTGTCCCC        | (124)      | C3e32-33R      | ACTTGGAAAGTACTGAATATCATGG   | (124)      |
| C3e34-35F      | TGCTGCTATGTGGGAATCAG      | (124)      | C3e34-35R      | CCTACAACCTCAGCAGCACA        | (124)      |

| Forward primer |                       |            | Reverse primer |                       |            |
|----------------|-----------------------|------------|----------------|-----------------------|------------|
| Név            | szekvencia (5'-3')    | Referencia | Név            | szekvencia (5'-3')    | Referencia |
| C3e36F         | TTGATCCTTCAGTTTCTCCAC | (111)      | C3e36R         | TTCTCAGATCCCCACAATTCA | (111)      |
| C3e37-38F      | GGGGTTGAAGACCTAGCATC  | (124)      | C3e37-38R      | CCACACCCACAGCCTGAA    | (124)      |
| C3e39-41F      | GTGACTGGCTGTGATTCTGC  | PP         | C3e39-41R      | GGTGGGAACAGGTGAGGTT   | PP         |

\*A *CFH* *scr2* és *scr16* doméneket kódoló exonok forward irányból nem szekvenálhatók szépen egy hosszú homopolimer régió miatt, így két reverse primerrel szekvenáltuk őket.

\*\*Az *MCPe2* exon reverse irányból nem szekvenálható szépen egy hosszú homopolimer régió miatt, így két forward primerrel szekvenáltuk.

A *CFB* gén esetén az exonok közelebb helyezkednek el egymáshoz, így az amplifikált szakaszokon több primert használtunk, egymással átfedő szekvenciákat eredményezve. A kapott szekvenciák minimum kétszer lefedik a kódoló régió minden szakaszát. A thrombomodulin génje, a *THBD* egyetlen exont tartalmaz, ezt egy amplikonnal fedtük le, és 4 primerpárral szekvenáltuk. A kapott szekvenciák ebben az esetben is minimum kétszer lefedik a kódoló régió minden szakaszát. A *CFB* és a *THBD* szekvenáló primereit a 6. táblázat foglalja össze.

## 6. táblázat

A *CFB* és *THBD* szekvenáló primereinek szekvenciája

| Amplikon neve | Szekvenált exonok* | Primer név | Szekvencia (5'-3')        | Referencia |
|---------------|--------------------|------------|---------------------------|------------|
| BFe1-3        | 1-2                | BFe32F     | GGGAAAGTGTGTGGGTAGGAC     | PP         |
| BFe1-3        | 1-2                | BFe2R      | TGTCACCTGCCTAGTCTCATC     | PP         |
| BFe1-3        | 3 (2)              | BFe3R      | ACATCGAGGTAAGCACTGAAGC    | PP         |
| BFe3-7        | 3-4 (5)            | BFlg1F     | CCGAGACCAGGAGGGATACAC     | PP         |
| BFe3-7        | 4-5 (3)            | BFe4-5R    | CTTCTCCATTTTCCCCCAGT      | PP         |
| BFe3-7        | 5-6 (7)            | BFe5F      | CCTGCTCTTTCCTCACTTTGT     | PP         |
| BFe3-7        | 6-7 (5)            | BFs1R      | CCCTCCACCCTGAACCTCCTGAC   | PP         |
| BFe7-12       | 7-8                | BFe7F2     | CTCCCTGTCCAGCAAAGTC       | PP         |
| BFe7-12       | 7-8                | BFlg1R     | GAGCAAGTTGAGGAAGGGTTAGAG  | PP         |
| BFe7-12       | 9-10               | BFe9F      | GACTCATAGCTGGCTGTTTCATC   | PP         |
| BFe7-12       | 9-10 (8)           | BFe8-10R   | TGCCAGGAAACAAGAATAGTG     | PP         |
| BFe7-12       | 11-12              | BFe11-12F  | GACTCCTACCCAAAAGGCTG      | (124)      |
| BFe7-12       | 11-12              | BFe11-12R  | AGAAAGTGGGAGGTGTTGCC      | (124)      |
| BFe13-18      | 13-14 (15)         | BFe13F     | ACACTCCACCCTCCTCAAT       | PP         |
| BFe13-18      | 13-14              | BFe14R     | GCTCCCACCACTGTCATCTC      | PP         |
| BFe13-18      | 15-17 (18)         | BFe15F     | AAGGCAATGGGGAGATGAC       | (124)      |
| BFe13-18      | 15-16 (14)         | BFe17R     | ACATGCATTGAGCTTTCCTG      | (124)      |
| BFe13-18      | 17-18              | BFe17F     | ATGCTCTTTGGTTGTGCTACA     | PP         |
| BFe13-18      | 17-18 (16)         | BFe18R     | CACATCTCCCTCAGCCTCTG      | PP         |
| THBD          | (1)                | THBDs1F    | TACGGGAGACAACAACCA        | (124)      |
| THBD          | (1)                | THBDs1R    | TATGCAGTCATCCAGTCTCT      | (124)      |
| THBD          | (1)                | THBDstrF   | CATCCTGGACGACGGTTTCATCTGC | PP         |
| THBD          | (1)                | THBDstrR   | GCGCCACCACAGGCACAGG       | PP         |
| THBD          | (1)                | THBDs2F    | GACCTCTGCGAGCACTTCTG      | PP         |
| THBD          | (1)                | TMsdR      | GGCTCATTCTCCTCCTCTAA      | PP         |

| Amplikon neve | Szekvenált exonok* | Primer név | Szekvencia (5'-3')     | Referencia |
|---------------|--------------------|------------|------------------------|------------|
| THBDII        | (1)                | THBDIIF    | CTGGGCTGGGACGGACAGGAGA | PP         |
| THBDII        | (1)                | THBDIIR2   | CGGAGACAGCGACGACAACG   | PP         |

\*A zárójelben lévő exont az adott szekvenáló primer használatával kapott szekvencia részben lefedti.

A szekvenálási reakciók során a kezdeti denaturáció 95°C-on 1 percig tartott. Ezt 25 termociklus követte, ciklusonként három lépéssel: 10 másodperces denaturálás 96°C-on; 10 másodperces anneálás 56°C-on, majd 4 perces extenzió 60°C-on. Végül a mintákat 4°C-ra hűtöttük le, majd a további vizsgálatokig -20°C-on tároltuk.

#### 4.5.5. Na-acetát-etanolos tisztítás

A szekvenálási reakciót követően a keletkezett termékeket a reakcióban jelenlévő puffer, MgCl<sub>2</sub>, Taq polimeráz enzim és be nem épült dNTP és ddNTP maradványoktól Na-acetát-etanolos módszerrel tisztítottuk meg. A 10µl térfogatú termékhez 4,5µl 3M-os nátrium acetátot és 30µl -20°C-os 100%-os etanolt adtunk, majd szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk. Ezután 45 percig 3500rpm-en centrifugáltuk, majd a csapadékot 170µl 70%-os etanollal mostuk, 25 percig 3500rpm-en centrifugáltuk és újra leöntöttük a felülúszót. A tisztított minták beszárításához a csöveket lefelé fordítva 1 percig 1250 rpm-en centrifugáltuk.

#### 4.5.6. A minták feloldása, denaturálás, kapilláris elektroforézis

A szekvenálási reakciót követően a minták feloldását, a denaturálást és a kapilláris elektroforézist a Biomi Kft (Gödöllő) végezte. A beszárított mintákat 11µl deionizált formamidban szuszpendálták fel, majd centrifugálás után 96°C-on 3 percig denaturálták. A kapilláris elektroforézis Applied Biosystems 3130xl típusú genetikai analizátorban zajlott.

#### 4.5.7. A szekvenciák értékelése

A szekvenciák kiértékelését a CLC DNA Workbench 6 (CLC Bio, Aarhus, Dánia) programmal végeztük. A kromatogrammon a legnagyobb csúcsoktól eltérő másodlagos csúcsok felismerésének limitje 40% volt.

#### 4.6. A H-faktor polimorfizmusok genotipizálása PCR-RFLP-vel

A H-faktor polimorfizmusok (HF-331, Y402H, E936D) genotipizálására polimeráz láncreakciót követő restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) technikát alkalmaztunk. A módszer első lépéseként a vizsgálni kívánt DNS szakaszt polimeráz láncreakcióval felsokszoroztuk, majd a keletkezett terméket restrikciós endonukleázzal emésztettük. Az amplifikált DNS szakaszt úgy választottuk ki, hogy kontroll hasítási helyet is tartalmazzon, ezzel megelőzhető a restrikciós endonukleáz nem megfelelő működéséből származó hibalehetőség.

##### 4.6.1. PCR amplifikáció

A PCR amplifikáció 10µl-es végtérfogatban történt. A reakcióelegyek összetételét a 7. táblázat, az alkalmazott primerek szekvenciáit a 8. táblázat tartalmazza.

#### 7. táblázat

*A polimorfizmusok genotipizálása során használt reakcióelegyek összetétele*

| Polimorfizmus                                   | CFH c.-331 | CFH p.Y402H | CFH p.E936D |
|---|------------|-------------|-------------|
| DNS templát                                     | 10-20ng    | 10-20ng     | 10-20ng     |
| dNTP  | 200µM      | 200µM       | 200µM       |
| forward primer                                  | 1µM        | 0,5µM       | 0,7µM       |
| reverse primer                                  | 1µM        | 0,5µM       | 0,7µM       |
| GoTaq DNS polimeráz (Promega)                   | 0,025U/µl  | -           | -           |
| TrueStart Taq DNS polimeráz (Thermo Scientific) | -          | 0,04U/µl    | 0,04U/µl    |
| GoTaq Flexi puffer (Promega)                    | 1x         | -           | -           |
| TrueStart puffer                                | -          | 1x          | 1x          |
| MgCl <sub>2</sub>                               | 100µM      | 250µM       | 200µM       |

#### 8. táblázat

*A polimorfizmusok genotipizálása során használt PCR primerek*

| Polimorfizmus | Forward primer (5'→3')  | Reverse primer (5'→3') |
|---------------|-------------------------|------------------------|
| CFH c.-331    | AGCAGCACTATTTCATACCAGC  | ACAACGTCCAGTTCTCCTCTT  |
| CFH p.Y402H   | ATCACAGGAGAAATAAATATAGG | ATGTAAGTGTGGTCTGCGCTT  |
| CFH p.E936D   | TCTCTGTGATGTCATAGTAGCT  | TACCACTTACACTTTGAATGAA |

A PCR reakciók során az alábbi termociklust használtuk: a kezdeti denaturáció, amely során a genomiális DNS szálai szétválnak, 95°C-on 15 percig tartott. Ezt 35 termociklus követte, ciklusonként három lépéssel: 20 másodperces denaturálás 94°C-on; 20 másodperces anneálás 58°C-on, majd 30 másodperces (p.Y402H, p.E936D) vagy 70



másodperces (c.-331) extenzió 72°C-on. Végül 72°C-on történő 10 perces végső extenzió után a mintákat 4°C-ra hűtöttük le, majd a további vizsgálatokig -20°C-on tároltuk.

#### 4.6.2. A PCR termékek restriktív emésztése

Az amplifikációt követő restriktív emésztést az adott polimorfizmusra specifikus restriktív enzimmel végeztük, ismert genotípusú kontrollok használata mellett. Az emésztési reakció minden esetben a gyártó által ajánlott standard körülmények között zajlott. A reakcióelegyek összetételeit a 9. táblázat tartalmazza. (A feltüntetett enzimek és a pufferek gyártója a Thermo Fisher Scientific).

### 9. táblázat

*A restriktív emésztéshez használt reakcióelegyek összetétele*

| Polimorfizmus | Restriktív endonukleáz |              | Puffer       |              | Végtérfogat |
|---------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
|               | név                    | koncentráció | név          | koncentráció |             |
| CFH c.-331    | HphI                   | 1,6U/μl      | Buffer B     | 3x           | 5 μl        |
| CFH p.Y402H   | TasI                   | 1,2U/μl      | Buffer B     | 3x           | 5 μl        |
| CFH p.E936D   | DdeI                   | 1,2U/μl      | Buffer Tango | 3x           | 5 μl        |

Az enzimikus emésztés során a restriktív elegyet 1:2 arányban adtuk a PCR termékekhez (5μl restriktív reakcióelegy 10μl PCR termékhez). Az emésztés 37°C-on zajlott egész éjszakán át. A restriktív emésztést követően a keletkező fragmentumok elválasztására 3%-os (c.-331 esetében 2%-os) agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk, a már korábban leírt módszer szerint (4.5.2. fejezet). Az egyes személyek genotípusát a restriktív emésztés után keletkezett fragmentumok alapján határoztuk meg a 10. táblázat szerint.

### 10. táblázat

*Az egyes polimorfizmusok genotípusai a restriktív emésztések után keletkezett hasítási termékek alapján*

| Restriktív endonukleáz | Poli-morfizmus | Hasítási termékek        |                        |                              | Kontroll hasítási termékek |
|------------------------|----------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|----------------------------|
|                        |                | Homozigóta vad genotípus | Heterozigóta genotípus | Homozigóta variáns genotípus |                            |
| HphI                   | HF-331         | 607, 296 bp              | 903, 607, 296 bp       | 903 bp                       | 185 bp                     |
| TasI                   | Y402H          | 92,89 bp                 | 182,92,89 bp           | 182 bp                       | 63, 16, 138, 24 bp         |
| DdeI                   | E936D          | 146,115 bp               | 261, 146, 115 bp       | 261 bp                       | 100 bp                     |

#### 4.7. Valós idejű PCR (Real Time PCR)

A *CFH* gén p.V62I polimorfizmusának real-time PCR-rel történő genotipizálása 10 µl végtérfogatú reakcióelegyben zajlott. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 8-10ng genomiális DNS; 1x Maxima Probe qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), mely tartalmazza a dNTP-t, Maxima HotStart Taq DNS polimeráz enzimet, a működéséhez szükséges puffert és a ROX festéket; 1x Life Technologies C\_2530382\_10 kit, mely tartalmazza a genotipizáláshoz szükséges primereket és próbákat. A DNS amplifikáció Qiagen Rotor-Gene Q real-time PCR készülékben zajlott. A PCR reakció során alkalmazott kezdeti denaturáció 95°C-on 15 percig zajlott, majd 40 termociklus követte: 92°C 15 másodpercig és 60°C 1 percig. A detektálás 567 nm excitációs és 591 nm emisszós hullámhosszon történt, minden ciklusban a 60°C-os szakaszok alatt.

#### 4.8. Multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (MLPA)

A kópiaszám-eltérések detektálására multiplex ligáció-függő próba amplifikációt végeztünk. A reakciókhoz az MRC-Holland (Amsterdam, Hollandia) próbamixeit használtuk: a SALSA MLPA P236-A3 próbamix a *CFH* és *CFHR* gének (*CFHR1*, *CFHR2*, *CFHR3*, *CFHR5*) kromoszómális régiójában jelenlévő deléciók és duplikációk detektálására alkalmas, míg a P296-A1 mix a *CFI* és *CD46* gének kódoló régióira specifikus próbákat tartalmaz. A denaturálási, hibridizálási, ligálási és PCR reakciók körülményei megegyeztek a gyártó által előírtakkal. A kapilláris elektroforézis Applied Biosystems 3130xl típusú genetikai analizátorban zajlott. Az adatok kiértékelését a Coffalyser MLPA (MRC-Holland) programmal végeztük, mely során az adott allél kontrollhoz viszonyított relatív kópiaszámát vizsgáltuk.

#### 4.9. Az aktivációs utak és komplementfehérjék mérése

Az aktivációs utak és komplementfehérjék mérése rutin diagnosztikai vizsgálatok keretében történt, melyeket laboratóriumi asszisztens munkatársak végeztek a korábban közölt leírások szerint (132). A klasszikus út összaktivitása hemolitikus módszerrel, az alternatív út összaktivitása a Wieslab Compl AP330 kit-tel (Euro Diagnostica, Malmö, Svédország) lett meghatározva. A H-faktor szint mérése szendvics ELISA módszerrel, a C3 fehérjesszint mérése kereskedelmi forgalomból származó Tina-quant C3c. ver.2 immunturbidimetriás teszttel (Roche Diagnostics, Basel, Svájc), a C4, B-faktor és I-faktor

szintjének meghatározása radiális immundiffúziós módszerrel (133), a H-faktor elleni autantitestek mérése pedig direkt ELISA-val történt. Az ADAMTS13 aktivitás meghatározása FRET-VWF-73 fluoreszcens quenching szubsztrát hasításából eredő fluoreszcencia mérésén alapuló módszerrel történt (134).

#### **4.10. Allélspecifikus H-faktor szint mérése**

A H-faktor p.402Y illetve p.402H alléljaira specifikus ELISA módszer beállításához a korábban leírt (135) metodikát optimalizáltuk. A módszerrel a polimorfizmusra heterozigóta személyekben mértük a p.402-es pozícióban tirozint (Y) és a hisztidint (H) tartalmazó H-faktor (és a CFHL-1) fehérjék szintjét és egymáshoz viszonyított arányát.

Az allélspecifikus ELISA végleges beállítása a következő volt: a Nunc Immuno MaxiSorp ELISA lemezek fedését a mérést megelőző napon végeztük birka anti-humán H-faktor poliklonális ellenanyaggal (Binding Site, Birmingham, UK) 8,6µg/ml koncentrációban, 100µl/well térfogatban, bikarbonát pufferben, majd egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk a lemezeket. Másnap minden inkubálás 1 órán át szobahőmérsékleten zajlott, ennek leteltével a kötetlen részecskéket mosással távolítottuk el a lemezről: egymást követően négyszer 200µl/well mosó pufferrel mostuk a lemezeket, majd 100µl/well blokkoló pufferrel blokkoltunk. A szérummintákat hígító pufferrel 1:2000 arányban hígítottuk, majd a lemezre 100-100µl-t mértünk 2 párhuzamosban. Ezután p.402Y-specifikus (0,1mg/L) vagy p.402H-specifikus (0,25mg/L) monoklonális antitesteket adtunk a lemezekhez. Az antitesteket a módszert kidolgozó Paul Morgan (Cardiff Egyetem, UK) bocsátotta rendelkezésünkre. Inkubálás és újabb mosás után kecske anti-egér IgG-tormaperoxidáz konjugátumot (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) adtunk a mintákhoz, amit 1:12000 arányban hígítottunk. Végül 100-100µl használatra kész TMB (3,3,5,5-tetrametil-benzidin) – peroxidot (TMB Single Solution, Life Technologies) mértünk a lemezekhez, majd az enzimatis reakciót 50µl 4M-os kénsavval állítottuk le. Az optikai denzitást 450nm-en mértük.

Kalibrációs standardok készítéséhez olyan p.402H és p.402Y homozigóta genotípusú egyedek szérummintáját kevertük össze 1:1 arányban, akikben előzőleg a H-faktor szintet megmértük, és genotípusukat PCR-RFLP-vel megállapítottuk. Hígító pufferben felező hígítással 15,62 mg/ml-2000 mg/ml nominális koncentrációjú standard mintákat készítettünk, ezeket aliquotokra osztottuk, -80°C-on tároltuk, és minden lemezhez 1-1

aliquotot felolvasztottunk. Kontrollként négy beteg szérummintáját használtuk, amiket előzetesen a kereskedelmi forgalomban kapható HK353 ELISA kit (Hycult Biotech, Uden, Hollandia) felhasználásával lemértünk, betartva a gyártó előírásait. A kontroll mintákat a kalibrációs standardokhoz hasonlóan aliquotokra osztottuk,  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, és minden lemezhez 1-1 aliquotot felolvasztottunk és lemértünk. A kalibrációs standardokat két párhuzamosban használtuk minden ELISA lemezen, ezekből átlag abszorbancia értékeket számoltunk. A standard görbét nonlineáris regressziós modellel illesztettük a kalibrációs pontokhoz. A lemezeket akkor értékeltük ki, ha minden kalibrációs pont és a kontroll minták is teljesítették az elfogadási kritériumokat: a kalibrációs görbéből visszaszámolt koncentráció értéke a nominális koncentrációérték  $\pm 20\%$ -os tartományában volt, és a két párhuzamos mérés variációs koefficiense  $\pm 20\%$ -on belül volt.

#### **4.11. H-faktor hemolitikus teszt**

A H-faktor hemolitikus tesztet Sanchez- Corral és munkatársai által leírt módszer szerint végeztük (136). A mérés során  $100\mu\text{l}$  AP-CFTD (5mM nátrium-barbitál pH 7,4, 150mM NaCl, 7mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM EGTA) pufferben hígított szérumot  $100\mu\text{l}$  birka vörösvértesthez mértünk ( $1 \times 10^8$  sejt/ml) és 30 percig,  $37^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltuk. A reakció leállításához az elegyhez  $150\mu\text{l}$  hideg VBS-EDTA (2,5mM barbitál, 1,5mM Na-barbitál, 144mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7,2–7,4) puffert adtunk, majd a mintákat 2000 rpm-en, 10 percig centrifugáltuk. A vörösvértestekből történő hemoglobin felszabadulás méréséhez 414 nm-es hullámhosszon olvastuk le az abszorbanciát. A lízis mértékét úgy számítottuk ki, hogy az abszorbancia értékből kivontuk a blank értékét, és elosztottuk a pozitív kontrollal (a vörösvértestekhez desztillált vizet adtunk), ami a 100%-os lízisnek felel meg.

#### **4.12. Statisztikai módszerek**

A statisztikai analíziseket a Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) statisztikai szoftverrel végeztük. A hemolitikus tesztben mért eredmények kontroll mintához hasonlítását Dunnet-féle post hoc teszttel kiegészített egyszempontos, paraméteres ANOVA-val végeztük. A H3 és nem H3 hordozó személyek

ELISA eredményeinek összehasonlításához Mann-Whitney U-tesztet használtunk. A próbák eredményét  $p < 0,05$  értékek esetén tekintettük szignifikánsnak.

A *CD46* gén polimorfizmusai közötti kapcsoltsági egyensúlytalanságot (LD) a Haploview 4.2 szoftvert használva (137) számoltuk ki, az International HapMap Project ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) észak- és nyugat-európai kaukázusi populációjának genotípus adatai alapján.

#### **4.13. In silico predikciók**

Az újonnan azonosított mutációk lehetséges funkcionális hatásának *in silico* predikcióját a PolyPhen (version2) (138) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), a SIFT (139) (<http://sift.jcvi.org/>), a PROVEAN (140) ([http://provean.jcvi.org/genome\\_submit\\_2.php](http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php)) és a MutationTaster (141) (<http://mutationtaster.org>) online predikciós szoftverekkel végeztük.

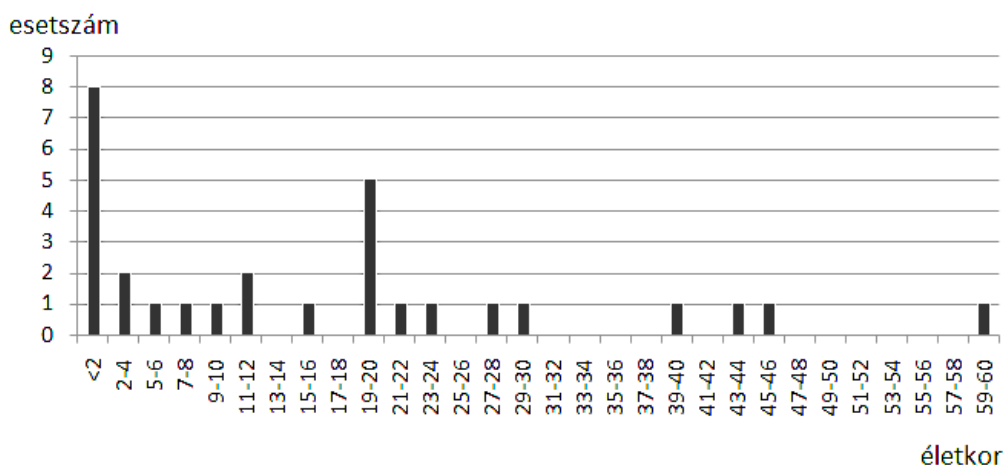
## 5. Eredmények

A bemutatott eredmények a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában folyó komplement-diagnosztikai vizsgálatoknak és a 2008-ban indult genetikai módszerbeállításoknak köszönhetőek, ebbe a munkába 2011 őszén kapcsolódtam be. A legtöbb bemutatott beteg kezelését, adataik gyűjtését és feldolgozását a Semmelweis Egyetem I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika, a Transzplantációs és Sebészeti Klinika, a Fővárosi Szent István és Szent László Kórház Hematológiai (Csontvelőtranszplantációs és Aferezis) osztály munkatársai valamint a bécsi Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde és a Skopjei University Children's Hospital munkatársai végezték. A doktori értekezés alapjául szolgáló egyik közlemény eredményei Anna Blom munkacsoportjával (Medical Protein Chemistry Research Group, Lund University, Malmö, Svédország) együttműködésben jöttek létre.

### 5.1. Az aHUS betegek klinikai jellemzői és laboratóriumi paraméterei

#### 5.1.1. A betegség lefolyásának vizsgálata

A betegség lefolyását 29 aHUS betegben vizsgáltuk, kórházi dokumentációkból gyűjtött adatok alapján. A betegség megjelenésére, kezelésére és kimenetelére vonatkozó részletes adatok a 11. táblázatban láthatók. Az aHUS első megjelenése 1 napos kortól 60 éves korig terjedt (medián 13,5) (11. ábra), jellemzően gyermekkorban (<18 év, 53,3%) jelentkezett, a legtöbb betegnél már 2 éves kor előtt (30%).



11. ábra

*Az vizsgált betegek életkora az aHUS első megjelenésekor*

A másik jellemző életkor a fiatal felnőttkor volt, a betegek 36,7%-ának 19-30 év közötti életkorban volt az első epizódja, nők esetében ez gyakran az első terhességet vagy szülést jelentette.

A betegség elsődleges kezelése minden esetben plazmaterápia volt, 19 beteg szorult dialízisre (65,5%). Az első epizód során három, 2 év alatti beteg hunyt el (10,34%). Tizenhárom betegben (44,83%) már az első epizód során végállapotú veseelégtelenség alakult ki (ESRD), azóta közülük egy elhunyt, a többi beteg dialízis kezelésre szorult. Az első epizód során 4 betegnél (13,79%) alakult ki krónikus veseelégtelenség, itt vesepótló kezelésre nem volt szükség, jelenleg remisszióban vannak. Összesen 9 beteg (31,03%) az első epizód után vesekárosodás nélkül került teljes remisszióba.

A követés ideje alatt további 3 beteg exitált, így összesen 6 beteg hunyt el (20,69%). 13 betegnek (44,82%) volt egy vagy több relapszusa, 5 (17,2%) betegnek volt legalább egy transzplantációja, egyikük elhunyt, a többi beteg transzplantáció után is dialízisre szorult a graft nem megfelelő működése miatt. Jelenleg összesen 12 beteg (41,38%) végállapotú veseelégtelenség miatt tartós dialízisre szorult, 11 beteg (37,93%) pedig veseelégtelenség nélkülteljes remisszióban van, közülük öten ecilizumab kezelés mellett.

### 11. táblázat

#### Az aHUS betegek klinikai jellemzői

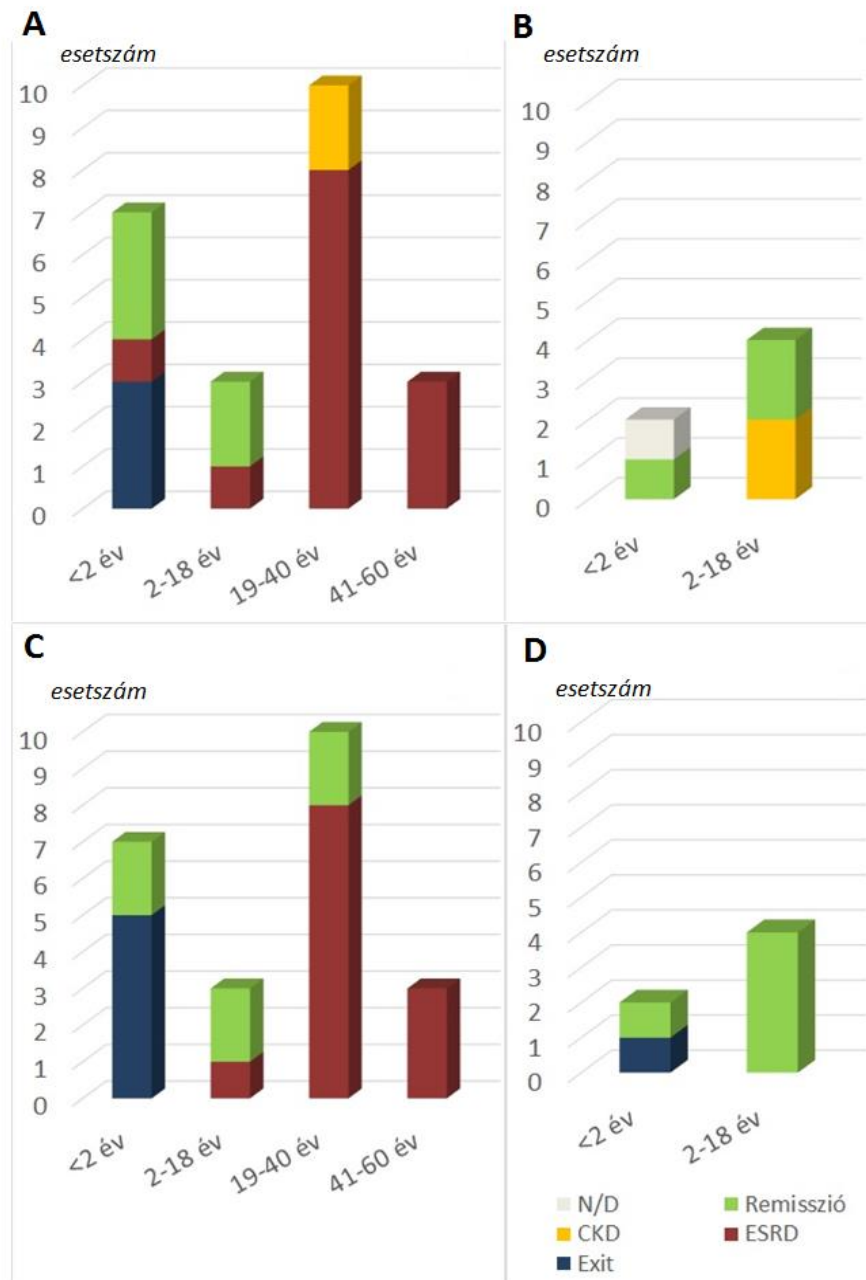
| Regisztrációs kód | Nem (F/N) | Életkor az 1. epizódkor | Epizódok száma | Dialízis | Transzplantációk száma | Ecilizumab | Kimenetel az első epizód után | Jelenlegi státusz            | Követés (év) |
|-------------------|-----------|-------------------------|----------------|----------|------------------------|------------|-------------------------------|------------------------------|--------------|
| HUN12             | N         | 0,5                     | 5              | +        | -                      | -          | teljes remisszió              | exit                         | 2            |
| HUN40             | N         | 23                      | 1              | +        | -                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorult           | 7            |
| HUN44             | N         | 30                      | 2              | +        | 1                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorult           | 15           |
| HUN60             | N         | 20                      | 2              | +        | 2                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorult           | 16           |
| HUN71             | F         | 1                       | 5              | -        | -                      | -          | teljes remisszió              | remisszió                    | 13           |
| HUN92             | N         | 22                      | 3              | +        | 3                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorult           | 18           |
| HUN93             | N         | 15                      | 3              | +        | 2                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorult           | 28           |
| HUN161            | N         | 19                      | 4              | -        | -                      | -          | CKD                           | remisszió                    | 14           |
| HUN165            | F         | 60                      | 1              | +        | -                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorult           | 5            |
| HUN167            | F         | 40                      | 1              | +        | -                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorult           | 5            |
| HUN193            | F         | 1                       | 1              | +        | -                      | -          | MODS,exit                     | exit                         | 0            |
| HUN216            | F         | 43                      | 1              | +        | -                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorult           | 3            |
| HUN229            | F         | 0                       | 1              | +        | -                      | -          | MODS,exit                     | exit                         | 0            |
| HUN246            | N         | 20                      | 1              | -        | -                      | -          | CKD                           | remisszió                    | 3            |
| HUN304            | N         | 0                       | 1              | +        | -                      | -          | MODS,exit                     | exit                         | 0            |
| HUN335            | F         | 12                      | 2              | -        | -                      | -          | teljes remisszió              | remisszió                    | 4            |
| HUN362            | F         | 2                       | 4              | +        | 4                      | -          | ESRD                          | exit                         | 20           |
| HUN371            | N         | 1                       | 1              | -        | -                      | -          | teljes remisszió              | remisszió                    | 2            |
| HUN420            | F         | 7                       | 2              | +        | -                      | +          | teljes remisszió              | remisszió ecilizumab mellett | 11           |

| Regiszer kód | Nem (F/N) | Életkor az 1. epizódkor | Epizódok száma | Dialízis | Transzplantációk száma | Eculizumab | Kimenetel az első epizód után | Jelenlegi státusz                           | Követés (év) |
|--------------|-----------|-------------------------|----------------|----------|------------------------|------------|-------------------------------|---|--------------|
| HUN421       | N         | 2,5                     | 5              | +        | -                      | +          | teljes remisszió              | remisszió eculizumab mellett                | 19           |
| HUN499       | F         | 0                       | 1              | -        | -                      | +          | remisszió eculizumab          | exit más okból                              | 0,5          |
| HUN528       | F         | 20                      | 2              | +        | -                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorul                           | 9            |
| HUN555       | N         | 46                      | 1              | +        | -                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorul                           | 1            |
| HUN579       | F         | 6                       | 1              | -        | -                      | -          | teljes remisszió              | remisszió                                   | 1            |
| HUN599       | N         | 19                      | 1              | +        | -                      | -          | ESRD                          | dialízisre szorul                           | 1            |
| HUN620       | N         | 9                       | 1              | -        | -                      | +          | CKD                           | eculizumab kezelés alatt                    | 1            |
| HUN649       | N         | 27                      | 4              | +        | 3                      | -          | ESRD                          | remisszó (krónikus allograft nefropátiával) | 15           |
| HUN680       | F         | 0                       | 4              | N/D      | -                      | +          | N/D                           | eculizumab kezelés alatt                    | 11           |
| HUN737       | N         | 12                      | 1              | -        | -                      | +          | CKD                           | remisszió eculizumab mellett                | 0,5          |

Rövidítések: ESRD: végállapotú veseelégtelenség (end-stage renal disease), CKD: krónikus veseelégtelenség (chronic kidney disease), MODS: többszervi elégtelenség (multiple organ dysfunction syndrome)

A betegség kimenetelét az első epizód után, valamint a jelenlegi státuszban értékeltük (12. ábra). Külön értékeltük az eculizumab kezelésben nem részesült (12. ábra, A, C) és az eculizumab kezelésben részesült betegek adatait (12. ábra, B,D). Az értékeléshez 4 korcsoportot határoztunk meg: 2 év alatti csecsemők, gyermekek 2-18 év között, fiatal felnőttek 19-40 év között és 40 év feletiek. A 2 éves kor alatti korosztályban volta legsúlyosabb a betegség kimenetele, mind a 6 elhunyt csecsemő volt, és csak 3 beteg élt túl. A mortalitási ráta 66,67% ebben a korosztályban, az összes betegre vonatkoztatva pedig 20,69%. Az eculizumab kezelésben részesült betegek prognózisa jobb, mint a kezelésben nem részesült betegeké. Bár egyelőre kevés beteg kaphatott célzott komplement-terápiát, és a kezelések minden esetben jelenleg is tartanak, az eddigi eredmények alapján hatékonyak bizonyult (HUN499 egyéb ok miatt hunyt el, a többi beteg remisszióban van).





12. ábra

*A betegség kimenetele az első epizód után és a jelenlegi státuszban (követés) két éves kor alatti, a 2-18 év közötti, a 19-40 év közötti, és a 41-60 év közötti betegekben.*

*A korosztályok a betegség első megjelenését jelölik. A: A betegség kimenetele 23 ecilizumab kezelésben nem részesült betegben, az első epizód után; B: A betegség kimenetele 6 ecilizumab kezelésben részesült betegben, az első epizód után; C: A 23 ecilizumab kezelésben nem részesült beteg jelenlegi státusza; D: A 6 ecilizumab kezelésben részesült beteg jelenlegi státusza. Kék: elhunyt, Piros: végállapotú veseelégtelenség (ESRD), Sárga: krónikus veseelégtelenség (CKD), Zöld: remisszió, Fehér (N/D): nincs adat*

### 5.1.2. A betegek komplementprofiljának vizsgálata

A 12. táblázatban foglaltam össze a betegekben mért komplementprofilokat akut betegsége szakaszából és/vagy remissziós mintából mérve.

#### 12. táblázat

*Az aHUS betegek komplementprofilja akut fázisban és remisszióban*

| Beteg azonosító | Komplementprofil akut fázisban |                  |              |                   |              | Komplementprofil remisszióban |                  |              |                   |              |
|-----------------|--------------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
|                 | AP % (70-105)                  | C3 g/L (0,9-1,8) | IF% (70-130) | HF mg/L (250-880) | BF% (70-130) | AP % (70-105)                 | C3 g/L (0,9-1,8) | IF% (70-130) | HF mg/L (250-880) | BF% (70-130) |
| HUN12           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 0                             | 0,36             | 74           | 258               | 93           |
| HUN40           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 52                            | 0,69             | 81           | 342               | 81           |
| HUN44           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 0                             | 0,75             | 51           | 717               | 17           |
| HUN60           | 1                              | 0,4              | 65           | 124               | 51           | 46                            | 0,58             | 92           | 98                | 74           |
| HUN71           | 44                             | 0,67             | 57           | 171               | 65           | 77                            | 1,42             | 72           | 311               | 127          |
| HUN92           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 85                            | 1,1              | 82           | 242               | 109          |
| HUN93           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 86                            | 1,43             | 122          | 552               | 95           |
| HUN161          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 4                             | 0,16             | 77           | 469               | 64           |
| HUN165          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 130                           | 0,93             | 102          | 545               | 125          |
| HUN167          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 74                            | 0,57             | 70           | 151               | 77           |
| HUN193          | 5                              | 0,36             | 42           | 95                | 65           | -                             | -                | -            | -                 | -            |
| HUN216          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 64                            | 0,74             | 98           | 308               | 99           |
| HUN229          | 0                              | 0,26             | 47           | 123               | 50           | -                             | -                | -            | -                 | -            |
| HUN246          | 21*                            | 0,58*            | 56*          | 363*              | 66*          | 110                           | 1,22             | 131          | 847               | 103          |
| HUN304          | 0                              | 0,41             | 26           | 80                | 19           | -                             | -                | -            | -                 | -            |
| HUN335          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 96                            | 1,42             | 115          | 454               | 96           |
| HUN362          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 86                            | 0,83             | 97           | 281               | 96           |
| HUN371          | 100                            | 0,79             | 111          | 181               | 148          | -                             | -                | -            | -                 | -            |
| HUN420          | 114                            | 0,9              | 104          | 496               | 88           | 98                            | 1,05             | 97           | 297               | 69           |
| HUN421          | 1#                             | 0,97#            | 97#          | 302#              | 61#          | 44                            | 0,77             | 67           | 333               | 63           |
| HUN499          | 0                              | 0,62             | 35           | 147               | 54           | 14                            | 0,59             | 67           | 386               | 100          |
| HUN528          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 64                            | 0,8              | 114          | 400               | 63           |
| HUN555          | -                              | -                | -            | -                 | -            | -                             | -                | -            | -                 | -            |
| HUN579          | 36                             | 0,68             | 108          | 365               | 136          | -                             | -                | -            | -                 | -            |
| HUN599          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 104                           | 0,81             | 94           | 412               | 89           |
| HUN620          | 109                            | 1,51             | 107          | 996               | 160          | -                             | -                | -            | -                 | -            |
| HUN649          | 90                             | 0,49             | 126          | 191               | 62           | -                             | -                | -            | -                 | -            |
| HUN680          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 0#                            | 0,21#            | 99#          | 941#              | 91#          |
| HUN737          | 22                             | 0,55             | 84           | 200               | 65           | 1#                            | 1,04#            | 167#         | 349#              | 118#         |

\*: szubakut minta: plazmaferezis befejezése után, hematológiailag remisszióban

# :Eculizumab kezelés alatti minta. Kiemelt értékek: normál tartomány alatt.

Rövidítések: AP: alternatív út aktivitás, IF: I-faktor fehérjeszint, BF: B-faktor fehérjeszint

Az aHUS betegek komplementprofiljában akut fázisban a legtöbb esetben fokozott komplement-aktiváció és konzumpció figyelhető meg: alacsony alternatív út aktivitás a rendelkezésre álló minták 69,23%-ában, alacsony C3 szint 84,62%-ban, alacsony I-faktor

szint 53,85%-ban, alacsony H-faktor szint 69,23%-ban, alacsony B-faktor szint 69,23%-ban volt jellemző (13 mintában, a komplementgátló terápia alatti mintákat kizárva). Remisszióban több eltérés helyreállt, azonban sok esetben megfigyelhető egyes komponenseknek tartósan alacsony szintje, ami mutáció(k) hatására utal az alternatív út komponenseiben: alacsony alternatív út aktivitás a rendelkezésre álló minták 47,37%-ában, alacsony C3 szint 63,16%-ban, alacsony I-faktor szint 21,05%-ban, alacsony H-faktor szint 15,79%-ban, alacsony B-faktor szint 26,32%-ban volt jellemző (19 mintában, a komplementgátló terápia alatti mintákat kizárva).

## **5.2. Az aHUS betegek genetikai vizsgálata**

### **5.2.1. A szekvenálási reakciók beállítása**

#### **5.2.1.1. PCR primerek tervezése**

A hat vizsgált gén (*CFH*, *CFI*, *CD46*, *C3*, *CFB*, *THBD*) összesen 109 exont tartalmaz. Az amplifikáláshoz a legtöbb esetben egy exonra egy primerpárt terveztünk, ám ha két vagy több egymás melletti exon mérete és távolsága lehetővé tette, úgy egy közös terméket amplifikáltunk azokról, így összesen 66 amplikont kaptunk. A primerek egy részét irodalmi adatok alapján rendeltük meg, illetve a Primer Premier program segítségével terveztük meg.

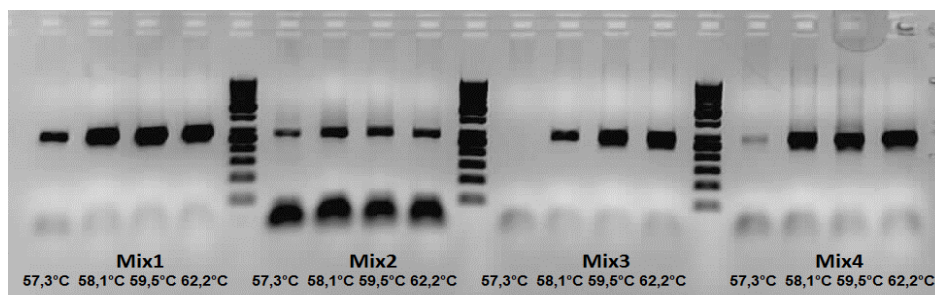
#### **5.2.1.2. A PCR reakciók optimalizálása**

A 10 $\mu$ l végtérfogatú PCR reakcióelegy összetétele minden reakció esetében 2mM dNTP, 5x Promega GoTaq Flexi puffer, 5 U/ $\mu$ l Promega GoTaq, 10-10 $\mu$ M forward és reverse primer volt, ehhez különböző mennyiségű Q-oldatot és MgCl<sub>2</sub> oldatot adtunk. A Q-oldat egy glicerint tartalmazó oldat, amely a DNS olvadáspontjának csökkentésével elősegíti a GC-gazdag régiók amplifikálását, véd a másodlagos struktúrák kialakulása ellen és növeli az enzim stabilitását. A MgCl<sub>2</sub> a DNS polimeráz kofaktora, ami növeli az amplifikáció hatékonyságát. Összesen 12 féle reakcióelegyet próbáltunk ki, ezek összetétele a 13. táblázatban látható (mix1-12), az optimalizálás után összesen 8 féle reakcióelegyet használtunk (4. táblázat).

**13. táblázat***PCR reakcióelegyek (mixek) Q-oldat és MgCl<sub>2</sub> végkoncentrációja (hozzáadott mennyiség)*

| Mix száma | Q-oldat    | MgCl <sub>2</sub> |
|-----------|------------|-------------------|
| 1         | -          | 1mM (0,5μl)       |
| 2         | -          | 2mM (1μl)         |
| 3         | 0,5x (1μl) | 1mM (0,5μl)       |
| 4         | -          | 3mM (1,5μl)       |
| 5         | 1,5x (3μl) | 1mM (0,5μl)       |
| 6         | 2x (4μl)   | 1mM (0,5μl)       |
| 7         | 0,5x (1μl) | 4mM (2μl)         |
| 8         | 0,5x (1μl) | 2mM (1μl)         |
| 9         | 1x (2μl)   | 1mM (0,5μl)       |
| 10        | 1x (2μl)   | 2mM (1μl)         |
| 11        | 0,5x (1μl) | 3mM (1,5μl)       |
| 12        | -          | 4mM (2μl)         |

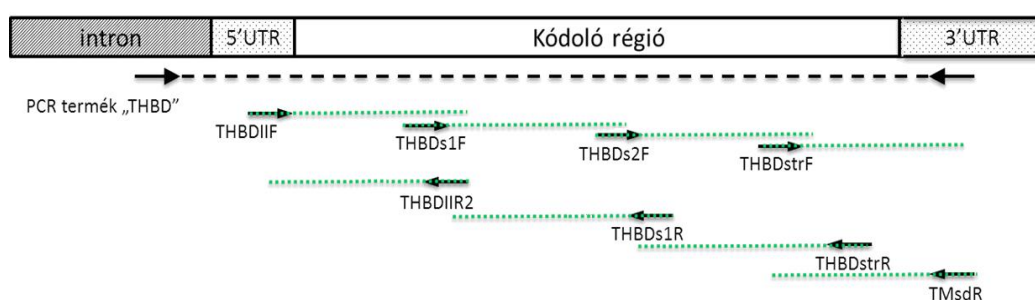
A PCR reakciók optimalizálásához több reakcióelegyet is teszteltünk párhuzamosan, majd agaróz gélelektroforézissel láthatóvá tettük a keletkezett termékeket, és ezek mennyisége alapján állapítottunk meg az optimális összetételt. A beállítás akkor volt sikeres, ha az elektroforetikus kép alapján nagy mennyiségben keletkezett specifikus termék, és nem volt aspecifikus termék. Ha a kapott termékek nem voltak megfelelőek, további reakcióelegyeket is teszteltünk. A reakcióelegy összetételén kívül meghatároztuk az optimális annealing hőmérsékletet, hogy elkerüljük a primerek nem megfelelő kötődését a denaturált egyszálú DNS-hez. Az annealing hőmérséklete kritikus a reakcióban, 50-65°C között változik, ha túl alacsony, aspecifikus kötődések jöhetnek létre, ezáltal aspecifikus termékek képződhetnek; ha túl magas, akkor nem fog megfelelően hibridizálni a primer. Az optimális hőmérséklet általában 3-5°C-kal van a primerek olvadási hőmérséklete alatt. A 13. ábrán a H-faktor scr20 domén PCR reakciójának optimalizálása látható, ahol a mixeket és az annealing hőmérsékleteket kombinálva teszteltük.

**13. ábra**

*PCR termékek négyféle annealing hőmérséklet és négyféle reakcióelegy alkalmazásával*

### 5.2.1.3. Szekvenáló primerek tervezése

A reakció nagyobb specificitása miatt a PCR reakciókat és a szekvenálást a legtöbb esetben két különböző primerpárral végeztük. Bár a leghosszabb amplifikált PCR termék 2499 bp volt, a szekvenálási reakciók kb. 600-800 bp-ig értékelhetők, így a hosszabb termékeken több szekvenáló primert alkalmaztunk, és a szekvenciákat szoftveresen illesztettük össze. A 14. ábrán a *THBD* génről amplifikált PCR termék és az erről 8 különböző szekvenáló primerrel leolvasható régiók elhelyezkedése látható. Az illesztés után a szekvencia a kódoló régió teljes szakaszát legalább kétszeresen lefedi.



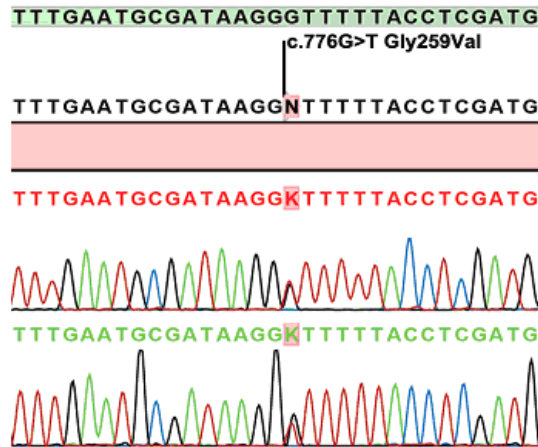
14. ábra

*A THBD génről amplifikált PCR termék és a szekvenáló primerekkel leolvasható régiók elhelyezkedése*

---- PCR termék; .....:szekvenálási termék, →: forward primer, ←: reverse primer

### 5.2.1.4. A kromatogramok feldolgozása

A nyers szekvenciafile-okat CLC DNA Workbench 6 programmal dolgoztuk fel, ami a vizsgált minta bázisrendjét a referencia szekvenciához viszonyítva jeleníti meg. A másodlagos csúcsok kiértékelésére 40%-os küszöbértéket állítottunk be, azaz a fő csúcs 40%-át elérő kisebb csúcsot a program az adott variációra heterozigótának értékeli (15. ábra).



15. ábra

***Egy MCP mutáció (p.G259V) kromatogramja a referencia szekvenciához  
illetve a CLC feldolgozás után.***

*A felső sorban a referencia szekvencia részlete látható, alatta a vizsgált DNS kétirányú szekvenálásából összeillesztett szekvencia részlete, pirossal a reverse, zölddel pedig a forward szekvencia részlete. A heterozigóta mutációt két csúcs (G és T) jelzi.*

### 5.2.2. Az aHUS betegek genetikai vizsgálatainak eredményei

A vizsgált gének teljes kódoló régiójának szekvenálását 29 aHUS betegben végeztük el. Huszonhárom betegben összesen 27, feltételezhetően betegségkókozó variációt találtunk, 6 beteg esetében nem találtunk mutációt. Összesen 15 korábban már leírt és 12 új mutációt találtunk ezekben a betegekben. A mutációk részletes jellemzése a 14. táblázatban látható.

Továbbá azonosítottunk egy ritka C3 variációt (p.D1457H), ami a dbSNP adatbázis (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/ ) rs113742728 azonosítójú polimorfizmusának felel meg. Ezt a ritka variációt eddig nem írták le aHUS betegekben, és az ESP (NHLBI Exome Sequencing Project) adatbázisa (EVS, Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) szerint nem ismert európai-amerikai populációban sem, viszont megtalálták afrikai-amerikaiakban 0,34%-os frekvenciával. Mivel az általunk vizsgált beteg is afrikai származású, ezt a variációt polimorfizmusnak tekintettük, és a mutációs listából kizártuk. Egy további C3 variációt találtunk az 5'-UTR régióban (c.-44C>T), ami nem található meg az EVS és a HGMD (Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>) adatbázisokban. Ez a variáció nem okoz

aminosavcserét, és nem áll rendelkezésünkre adat a fehérjére gyakorolt hatásáról, így szintén kizártuk a mutációs listából.

### 14. táblázat

#### Az aHUS betegekben azonosított mutációk

| Változás a fehérjében | Változás a c.DNS-ben | Exon    | Hivatkozás     | Beteg azonosító |
|-----------------------|----------------------|---------|----------------|-----------------|
| <b>CFH</b>            |                      |         |                |                 |
| p.R53C                | c.157C>T             | 2       | (104, 142-145) | HUN680          |
| p.W198R               | c.592T>C             | 5       | új mutáció     | HUN528          |
| p.C448Y               | c.1343G>A            | 11      | új mutáció     | HUN649          |
| p.V609D               | c.1826T>A            | 13      | új mutáció     | HUN60           |
| p.S722X               | c.2165C>A            | 15      | új mutáció     | HUN193          |
| p.Q950H               | c.2850G>T            | 19      | (95)           | HUN335, HUN579  |
| p.T956M               | c.2867C>T            | 19      | (146)          | HUN40           |
| p.P1161T              | c.3481C>A            | 22      | új mutáció     | HUN216          |
| p.S1191L              | c.3572C>T            | 23      | (147)          | HUN362          |
| p.V1197A              | c.3590T>C            | 23      | (147)          | HUN362          |
| p.R1203W              | c.3607C>T            | 23      | (148)          | HUN167          |
| p.R1210C              | c.3628C>T            | 23      | (149-152)      | HUN12           |
| p.R1215Q              | c.3644G>A            | 23      | (34, 151, 153) | HUN92, HUN93    |
| p.T1216del            | c.3646_3648delACA    | 23      | (154)          | HUN12           |
| <b>CFI</b>            |                      |         |                |                 |
| p.P83Q                | c.248C>A             | 2       | új mutáció     | HUN499          |
| (p.A258T)             | c.772G>A             | 5       | (155, 156)     | HUN44           |
| p.R339L               | c.1016G>T            | 9       | új mutáció     | HUN737          |
| p.R474Q               | c.1421G>A            | 11      | új mutáció     | HUN44           |
| <b>CD46</b>           |                      |         |                |                 |
| -                     | c.286+2T>G *         | intron2 | (130)          | HUN71           |
| p.E142Q               | c.424G>C             | 4       | új mutáció     | HUN362          |
| p.P165S               | c.598C>T             | 5       | (42)           | HUN40           |
| p.G259V               | c.776G>T             | 6       | új mutáció     | HUN335          |
| <b>CFB</b>            |                      |         |                |                 |
| p.I242L               | c.724A>C             | 5       | (124, 144)     | HUN93           |
| p.K323E               | c.967A>G             | 7       | (118)          | HUN161          |
| p.E566A               | c.1697A>C            | 13      | (157, 158)     | HUN620          |
| <b>C3</b>             |                      |         |                |                 |
| p.K104E               | c.310A>G             | 3       | új mutáció     | HUN246          |
| p.R951H               | c.2852G>A            | 22      | új mutáció     | HUN680          |
| p.I1157T              | c.3470T>C            | 27      | (124, 159)     | HUN420, HUN421  |

\*Homozigóta mutáció

A legtöbb mutációt a *CFH* génben találtuk: 13 mutációt (48,1%) 14 betegben; 4-4 mutációt (14,8-14,8%) találtunk a *CD46* génben 4 betegben és a *CFI* génben 3 betegben, 3-3 mutációt (11,1-11,1%) találtunk a *CFB* génben 3 betegben és a *C3* génben 4 betegben. Tizenkét olyan új mutációt azonosítottunk a vizsgált komplement génekben, amiket korábban nem írtak le aHUS betegekben, és egészséges személyekben sem ismert az EVS

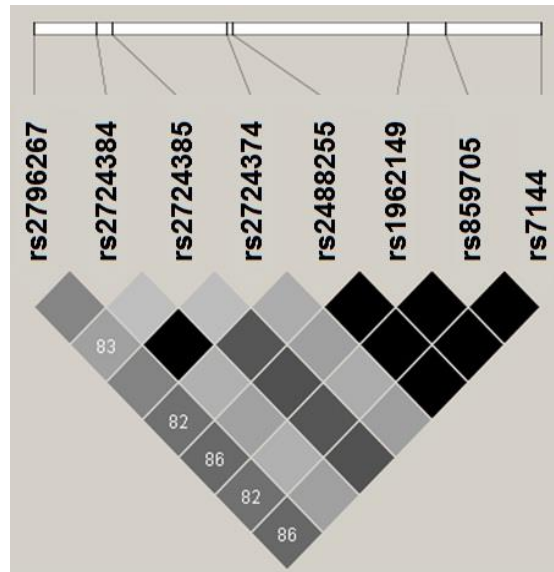
(Exome Sequencing Project, ESP) adatbázisa, a HGMD adatbázisa valamint az 1000Genom Projekt adatbázisa (<http://www.1000genomes.org/>) alapján.

Egy beteg (HUN12) a genetikai vizsgálatok kezdetén már elhunyt, és nem állt rendelkezésünkre EDTA-val alvadásgátolt vérmintája. Bár kis mennyiségű DNS-t izolálni tudtunk a korábban fagyasztott szérummintájából, ez csak egy, a H-faktor scr20-as doménjét kódoló 23-as exon szekvenálására volt elegendő (a szülők szekvenálása alapján ebben az exonban volt várható mutáció). A többi feltüntetett genetikai adatot a családtagok szekvenálásából következtettük ki.

A szekvenálási reakciók során kapott kromatogramokon számos polimorfizmus látható, így aminosavcsere okozó SNP-k és olyan polimorfizmusok is, amik aHUS rizikóként ismert haplotípusok részét képezik. Az rs3753394 (-331C/T), rs800292 (V62I), rs1061170 (Y402H), rs3753396 (Q672Q) és rs1065489 (E936D) polimorfizmusok genotípusából valószínűsíthető (5. ábra) a H-faktor haplotípusa. Összesen 13 beteg (44,8%) hordozza a H-faktor H3 aHUS rizikó haplotípusát, 11 beteg heterozigóta formában, 2 beteg homozigóta formában. A H3 rizikó haplotípus frekvenciája a betegpopulációban 0,259 volt.

Az MCP<sub>GGAAC</sub> aHUS rizikó haplotípus az rs2796267, rs2796268, rs1962149, rs859705 és rs7144 polimorfizmusok ritka alléljeit tartalmazza. Mivel az rs859705 és az rs7144 genotípusaira a szekvenálásból nem kaptunk adatokat, az International HapMap Project (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatait felhasználva kapcsoltsági analízist végeztünk, hogy meghatározzuk a kapcsoltsági egyensúlytalanságot (linkage disequilibrium, LD) az általunk szekvenálással meghatározott polimorfizmusok és további, IPD vagy aHUS rizikóként ismert *CD46* variációk között (16. ábra). Az elemzés alapján az rs859705 és az rs7144 polimorfizmusok szorosan kapcsolatosak az rs1962149 polimorfizmushoz ( $r^2=1$ ,  $D'=1$ ), így nagy biztonsággal kimondható a MCP rizikó haplotípus hordozása a három, kódoló régióra eső, szekvenálással megállapított polimorfizmus alapján (rs2796267, rs2796268, rs1962149). A három polimorfizmus genotípusaiból kikövetkeztethető (2. táblázat), hogy összesen 26 beteg (89,6%) hordozza az MCP<sub>GGAAC</sub> rizikó haplotípust, 17 beteg heterozigóta, 8 beteg homozigóta formában, egy beteg hetero vagy homozigóta formában (HUN12, nem szekvenálható). Az MCP<sub>GGAAC</sub> aHUS rizikó haplotípus frekvenciája (HUN12-t kizárva) 0,589 volt, míg a gyakori MCP<sub>AAGGT</sub> haplotípus 0,321 frekvenciával fordult elő.



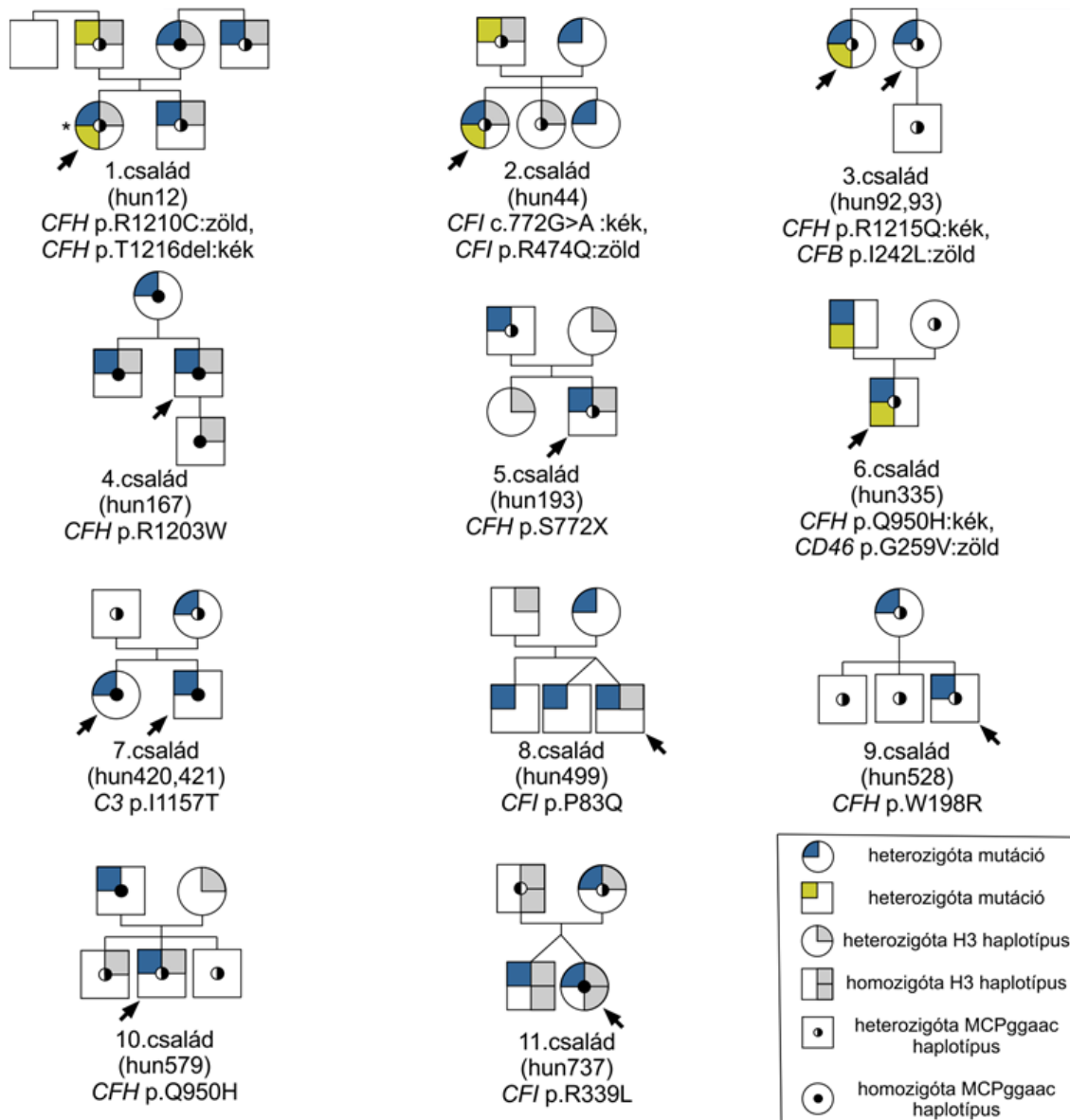


16. ábra

*A vizsgált MCP polimorfizmusok közötti páronkénti kapcsoltság, a Hapmap CEU populáció adatait használva.*

*A négyzetek színe a négyzet két felső oldala irányában lévő két SNP közötti kapcsoltságot jellemző  $r^2$  értéket jelöli szürkeskálán, ahol a fehér szín az  $r^2=0$ , a szürke az  $0 < r^2 < 1$  és a fekete az  $r^2 = 1$ . A négyzetekben lévő számok a  $D'$  értéket jelölik %-ban kifejezve, míg a szám nélküli négyzetek  $D'$  értéke 1,0.*

Továbbá két minor haplotípust is megtaláltuk betegeinkben, az  $MCP_{AGAAC}$  0,036 frekvenciával, míg az  $MCP_{GAGGT}$  0,054 frekvenciával fordult elő. A betegek gyakran egy mutáción kívül egy vagy több rizikó haplotípust is hordoznak, a családtagok genetikai elemzése rámutatott, hogy sok esetben a többszörös rizikót hordozó személyben alakul ki a betegség, ami magyarázat lehet a mutációk viszonylag alacsony penetranciájára (17. ábra).



17. ábra

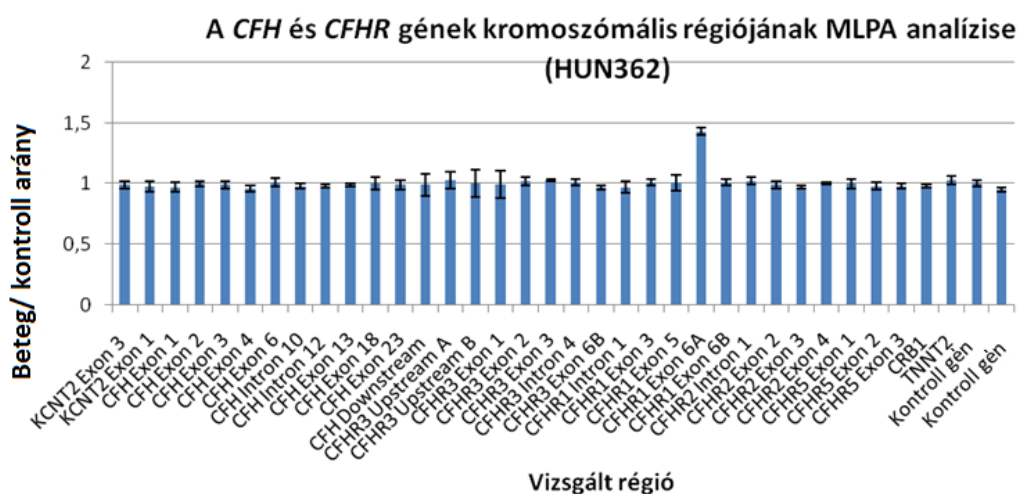
**Tizenhárom aHUS beteg családfája (11 család)**

*A mutációk késsel és zölddel vannak jelölve, a H3 haplotípus szürkével, az MCPggaac haplotípus kis körrel. \* Megjegyzés: a beteg az MCPggaac haplotípust heterozigóta vagy homozigóta formában hordozza (nem szekvenáltuk)*

A haplotípusokat alkotó polimorfizmusokon kívül még 7 olyan polimorfizmust találtunk a vizsgált betegcsoportban, ami aminosavcserét okoz az adott fehérjében. A C3 rs2230199 (p.R102G) G allélja 36%-os frekvenciával, az rs1047286 (p.P314L) T allélja

29%-os frekvenciával fordult elő. A *CFB* rs4151667 (p.L9H) A allélja 3%-os frekvenciával, az rs12614 (p.R32W) T allélja 14%-os frekvenciával, az rs641153 (p.R32Q) A allélja 10%-os frekvenciával és az rs4151651 (p.G252S) A allélja 2%-os frekvenciával fordult elő. A *THBD* rs1042579 (p.A473V) T alléljának frekvenciája 24% volt.

Kópiaszám-variációk és *CFH-CFHR* hibrid gének detektálására multiplex ligáció-függő próba amplifikációt végeztünk, a *CFH*, *CFHR1*, *CFHR2*, *CFHR3*, *CFHR5*, *CFI* és *MCP* gének kromoszómális régiójában jelenlévő deléciókat, duplikációkat és esetleges génátrendeződéseket vizsgáltunk. Összesen kilenc beteg hordozta a *CFHR1-3* gének gyakori delécióját, nyolcan heterozigóta formában, egy beteg pedig homozigóta formában. A *CFH* p.S1191L és p.V1197A mutációkat hordozó beteg mintájában a *CFHR1* specifikus aminosavat felismerő próbánál másfélszeres jelnövekedés volt megfigyelhető (18. ábra), ami arra utal, hogy ez a régió három kópiában van jelen a betegben, két kópia a *CFHR1* génből, és egy kópia a mutáns *CFH* génből. Más kópiaszám-variációt vagy hibrid gént nem találtunk a vizsgált betegekben.



**18. ábra**

MLPA analízis részlete (*CFH* és *CFHR1-5* gének kromoszómális régiója, HUN362)

### 5.2.3. Az újonnan azonosított mutációk várható hatásának *in silico* prediktálása

Az újonnan azonosított mutációk fehérjeszerkezetre és funkcióra gyakorolt várható hatását négy online predikciós program segítségével próbáltuk felbecsülni. Ezek eredményei csak egy becslést adnak a mutáció hatásáról, és különös körültekintéssel kell

kezelni a potenciálisan funkcionyeréses mutációk esetében kapott eredményeket (160), ilyenek vizsgálataink során a C3 és B-faktor mutációk voltak. A PolyPhen pontszám annak a valószínűségét jelzi, hogy egy aminosav-szubsztitúció káros hatású. Minél közelebb van a prediktált érték az 1-hez annál nagyobb valószínűséggel káros hatású a fehérjeszerkezetre az adott variáció. A SIFT pontszám 0-tól 1-ig terjed, az aminosav cserét káros hatásúnak prediktálja, ha a pontszám  $\leq 0,05$ , és tolerálhatónak, ha a pontszám  $> 0,05$ . Ha a PROVEAN pontszám egyenlő vagy kisebb, mint az előre meghatározott küszöbérték (a küszöbérték alapbeállítása: -2,5), akkor a variáció a predikció alapján káros hatású. A MutationTaster valószínűségi értéke a predikció biztonságosságát jelzi, tehát az 1-hez közeli érték “nagy biztonsággal” kalkulált predikciót jelent. A predikciók eredményei a 15. táblázatban láthatók.

### 15. táblázat

#### *Újronnan azonosított misszensz mutációk predikciója*

| Mutáció      | Polyphen-2<br>(Pontszám; szenzitivitás,<br>specifititás) | SIFT<br>(Pontszám)       | PROVEAN<br>(Pontszám)              | MutationTaster<br>(Valószínűség)  |
|--------------|--|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| CFH p.W198R  | Káros hatású<br>(1,000; 0,0; 1,0)                        | Káros hatású<br>(0,00)   | Káros hatású<br>(-8,124 / -10,88)* | Káros hatású<br>(0,912 / 0,994)*  |
| CFH p.C448Y  | Káros hatású<br>(0,711;0,86; 0,92)                       | Káros hatású<br>(0,01)   | Káros hatású<br>(-6,96)            | Káros hatású<br>(-0,989)          |
| CFH p.V609D  | Káros hatású<br>(0,994; 0,69; 0,97)                      | Káros hatású<br>(0,2)    | Káros hatású<br>(-4,87)            | Káros hatású<br>(-0,64)           |
| CFH p.P1161T | Káros hatású<br>(1,000; 0,0; 1,0)                        | Káros hatású<br>(0,02)   | Káros hatású<br>(-6,98)            | Káros hatású<br>(-0,85)           |
| CFI p.P83Q   | Tolerálható<br>(0,172; 0,92; 0,87)                       | Tolerálható<br>(0,39)    | Tolerálható<br>(-0,77)             | Tolerálható<br>(-0,99)            |
| CFI p.R339L  | Káros hatású<br>(1,00; 0,00; 1,00)                       | Káros hatású<br>(0,00)   | Káros hatású<br>(-5,91)            | Káros hatású<br>(-0,99)           |
| CFI p.R474Q  | Káros hatású<br>(0,768; 0,85; 0,92)                      | Tolerálható<br>(0,31)    | Tolerálható<br>(-2,35)             | Káros hatású<br>(-0,972)          |
| CD46 p.E142Q | Káros hatású<br>(0,997; 0,41; 0,98)                      | Tolerálható<br>(-0,24)   | Tolerálható<br>(-0,86)             | Tolerálható<br>(-0,99)**          |
| CD46 p.G259V | Káros hatású (1,000; 0,00; 1,00)                         | Káros hatású<br>(-0,001) | Káros hatású<br>(-8,16)            | Tolerálható<br>(-0,976- -0,902)** |
| C3 p.K104E   | Tolerálható<br>(0,128; 0,93; 0,86)                       | Tolerálható<br>(0,73)    | Tolerálható<br>(-0,76)             | Tolerálható<br>(-0,98)            |
| C3 p.R951H   | Tolerálható<br>(0,000; 1,00; 0,00)                       | Tolerálható<br>(0,16)    | Tolerálható<br>(-0,42)             | Tolerálható<br>(-0,99)            |

*\*H-faktorra prediktálva/ CFHL-1-re prediktálva*

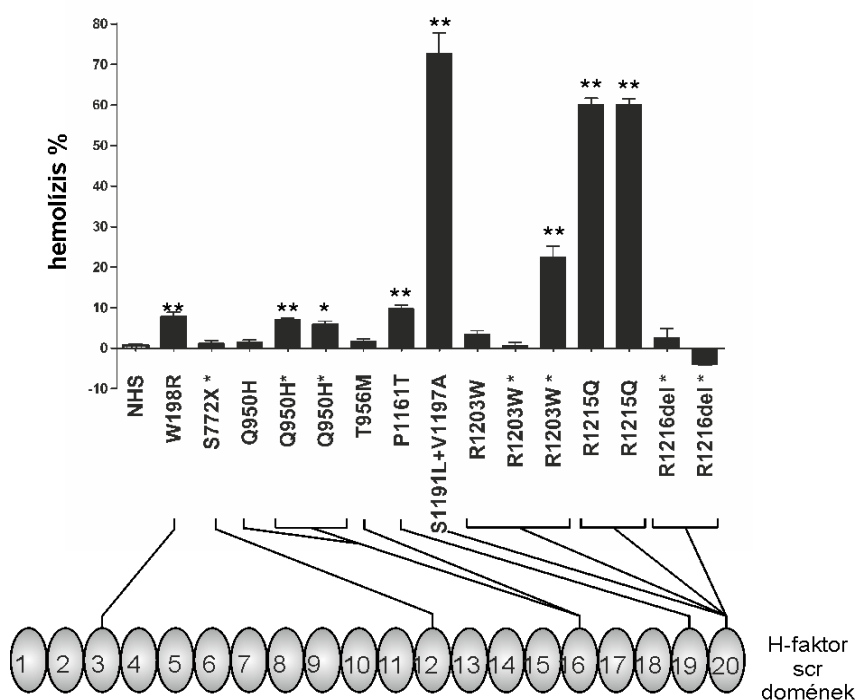
*\*\*minden transzkriptre prediktálva*

A H-faktor mutációkat minden program káros hatásának prediktálja, míg az I-faktor mutációk közül egy káros, egy tolerálható, egy esetben pedig nem egybehangzó a négy predikció eredménye, a CD46 variációt pedig a négy programból három kórosnak prediktálta. Ahogy az irodalmi adatok alapján is várható volt, a feltehetően funkciónyeréses C3 mutációkat a mi predikciós analízisünk sem mutatta betegség okozónak, azonban az ilyen eredmények fokozott körültekintéssel kezelendők. A nemzetközi ajánlásokkal összhangban kiemelten fontos minden egyes új, korábban le nem írt és funkcionálisan nem jellemzett mutáció esetén megvizsgálni, hogy a HUS pathogenezisében szerepet játszhat-e. Doktori munkám lényeges részét képezte ezért az új H-faktor mutációk fehérje-expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatára alkalmas módszerek fejlesztése, beállítása és alkalmazása.

### **5.3. A H-faktor mutációk funkcionális hatásának vizsgálata**

#### **5.3.1. A H-faktor hemolitikus teszt eredményei**

A H-faktor mutációk hatását első lépésben a Sanchez-Corral és munkatársai által leírt hemolitikus teszttel vizsgáltuk (161). A módszer lényege, hogy hígított szérummintákat birka vörösvértestekhez adva a mintában lévő H-faktor az I-faktor kofaktoraként gátolja a komplementrendszer alternatív útjának aktiválását. Ha azonban egy mutáció hatására kofaktor funkció sérül, úgy dóziszfüggő, fokozott lízis figyelhető meg a rendszerben. Inkubálás, majd a reakció leállítása után a hemoglobin-felszabadulás mértékét direkt abszorbanciával 414 nm-en mértük. A lízis mértékét úgy számoltuk ki, hogy az oldat abszorbanciájából kivontuk a megfelelő vak abszorbanciaértékét, majd elosztottuk a teljes lízist jelentő pozitív kontroll abszorbanciájával. A teszt eredményeit a negatív kontrollként használt normál humán szérumhoz hasonlítottuk Dunnet-féle post hoc teszttel kiegészített egyszempontos variancia-analízissel. A lízist pozitívnak értékeltük ha  $p < 0,05$  és erősen pozitívnak ha  $p < 0,01$  volt (19. ábra).



### 19. ábra

A H-faktor hemolitikus teszt eredményei mutációhordozó betegekből és/vagy egészséges családtagjaikból, és a mutációk elhelyezkedése a H-faktor doménszerkezetében. A családtagok összekapcsolva vannak jelölve. A mutációk melletti \* a családtagok mintájában mért értéket jelöli

Ha rendelkezésünkre állt szérumminta mutáció-hordozó családtagoktól, náluk is elvégeztük a hemolitikus tesztet. Mivel a p.R1210C mutációt hordozó betegben két *CFH* mutáció is található, az egyiket (p.T1216del) az anyai mintájával vizsgáltuk, az apától örökölt p.R1210C mutáció vizsgálatához azonban nem volt elérhető szérumminta, így ez a mutáció nem szerepelt a mérésekben. A p.R53C mutáció vizsgálatára sem volt alkalmas szérummintánk, mivel a beteg eculizumab kezelés alatt áll, ami gátolja a komplement-aktiválódást. A p.C448Y, p.V609D, p.S722X, p.Q950H mutációt hordozó betegek mintái akut betegségekből származtak, jelentős komplement C3 és H-faktor konzumpcióval, egy esetben (p.Q950H, HUN579) erősen hemolizált volt a szérum, így ezek a minták nem voltak vizsgálhatók a rendszerünkben. A p.Q950H és a p.S722X mutációt hordozó betegek (HUN579, HUN193) mintái helyett ezért egy mutációhordozó

egészséges családtag mintáját vizsgáltuk, a p.C448Y, és p.V609D mutációt hordozó betegeknek azonban nem voltak elérhető családtagjaik a vizsgálathoz.

A p.W198R, p.Q950H, p.S1191L+V1197A, p.P1161T és p.R1215Q mutáns H-faktort tartalmazó szérumminták a vörösvértestek erős lízisét eredményezték. A p.Q950H mutáns H-faktort tartalmazó egyik szérumminta mérsékeltebb, de szignifikáns lízist eredményezett, a harmadik minta nem okozott szignifikáns növekedést a hemolízisben. A p.S772X, p.T956M, és p.T1216del mutáns H-faktort tartalmazó szérumminták nem okoztak fokozott lízist. A p.R1203W mutáció esetén a beteg és mutáció-hordozó egészséges testvére mintájában nem figyeltünk meg lízist, viszont a szintén mutáció-hordozó édesanyja mintája erős lízist okozott.

A bemutatott mutációk közül a p.Q950H funkcionális hatását Anna Blom munkacsoportjával (Lund University, Malmö, Svédország) együttműködésben vizsgáltuk részletesebben, a további funkcionális tesztek Svédországban végezték el (162).

### **5.3.2. Allél-specifikus H-faktor fehérjeszint mérése**

#### **5.3.2.1. Az allélspecifikus H-faktor ELISA optimalizálása**

A H-faktor mutációk fehérjeszintre gyakorolt hatását egy korábban leírt módszer (135) optimalizálásával szerettük volna vizsgálni. Az allél-specifikus ELISA lényege, hogy a vizsgálati mintákban található H-faktort két külön reakcióban, a p.402-es pozícióban található SNP (Y402H) alléljaira (azaz a tirozinra (Y) illetve hisztidinre (H)) specifikus monoklonális antitestekkel vizsgáljuk. Így elkülönítve vizsgálható a két különböző allérről termelődő H-faktor mennyisége, és heterozigóta személyek esetén azok szintje összehasonlítható egymással. Ha egy H-faktor mutációt hordozó beteg vagy családtagja heterozigóta erre a polimorfizmusra, akkor az allél-specifikus H-faktor szintek összehasonlításával következtethetünk a mutáció hatására a fehérje-expresszióra. Ezzel a módszerrel az újonnan talált és a korábban leírt H-faktor mutációk hatását is vizsgáltuk, amennyiben megfelelő családtag széruma elérhető volt.

A módszer optimalizálásának első lépése a megfelelő kalibrációs standard készítése volt. Kalibrációs standardként gyakran használt az ún. NHS, azaz normál humán szérum, ami egészséges személyek kevert széruma. Ebben a keverékben azonban a p.402-es pozícióban tirozint és hisztidint tartalmazó H-faktor fehérjék ismeretlen arányban vannak jelen, azonban a mi módszerünkhöz olyan kevert kontroll készítése volt szükséges, ahol

ez az arány igazoltan 1:1. Ennek beállításához a laboratóriumunkban rutin mérési módszerként használt össz-H-faktor ELISA-val megmértük az H-faktor koncentrációját olyan egészséges személyekben, akikben a p.Y402H polimorfizmus genotípusát előzőleg PCR-RFLP technikával meghatároztuk. Három homozigóta vad és 3 homozigóta variáns személyt választottunk ki úgy, hogy a két csoport H-faktor koncentrációjának összege megegyezzen, majd a későbbiekben ezeket a szérumokat kevertük össze egyforma arányban. A mérést még kétszer megismételtük különböző mérési napokon (16. táblázat). A kiválasztott minták mért koncentrációja a mérések között 0,6-22,6%-os eltérést mutatott (minták szórása/minták átlaga \*100), a minták keverésével azonban ez a kis eltérés is kiküszöbölhető volt, a p.402Y/ p.402H arány a különböző mérésekben állandó maradt (511,9/533=0,96; 506,5/532,5=0,95; 473,8/504,4=0,94).

### 16. táblázat

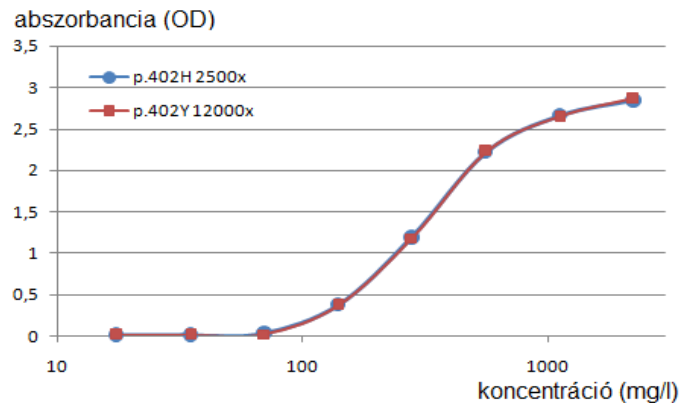
*A kalibrációs standard készítéséhez használt szérumminták mért koncentrációi*

| minta azonosító | p.Y402H genotípus | koncentráció (mg/L) |          |          | % eltérés      |                  |                   | átlag koncentráció (mg/L) |          |          |
|-----------------|-------------------|---------------------|----------|----------|----------------|------------------|-------------------|---------------------------|----------|----------|
|                 |                   | rutin mérés         | 2. mérés | 3. mérés | 2. és 3. mérés | rutin és 2.mérés | rutin és 3. mérés | rutin mérés               | 2. mérés | 3. mérés |
| MK2/78          | Hom.              | 478,5               | 496,5    | 430,3    | 10,1           | 2,6              | 7,5               | 511,9                     | 506,5    | 473,8    |
| MK2/82          | p.402             | 605,9               | 542,6    | 538,0    | 0,6            | 7,8              | 8,4               |                           |          |          |
| MK2/139         | H                 | 451,5               | 480,3    | 453,0    | 4,1            | 4,4              | 0,2               |                           |          |          |
| MK2/159         | Hom.              | 369,7               | 450,7    | 433,6    | 2,7            | 14,0             | 11,2              | 533,0                     | 532,5    | 504,4    |
| MK2/178         | p.402             | 420,9               | 537,6    | 493,6    | 6,0            | 17,2             | 11,2              |                           |          |          |
| MK2/69          | Y                 | 808,4               | 609,3    | 585,9    | 2,8            | 19,9             | 22,6              |                           |          |          |

A továbbiakban ezt a kevert kontrollt használtuk a kalibrációs sorozat elkészítéséhez, minden mérési napon frissen készítettük el a 8 kalibrációs mintát, hígító pufferben 2000 mg/l nominális koncentrációtól 15,5mg/l-ig, felező hígítással. A következő lépés az allélspecifikus antitestek, a HRP-konjugált antitest és a szérumminták hígításának optimalizálása volt. Ehhez különböző koncentrációjú hígításokat készítettünk, és ezeket egymással kombinálva próbáltuk ki. Az anti-p.402H allélspecifikus antitestet 1/1000-1/5000 hígításban, az anti-p.402Y allélspecifikus antitestet 1/4000-1/30000 hígításban, a HRP-konjugált antitestet 1/8000-1/16000 hígításban vizsgáltuk, a szérumminták 1/1000



és 1/2000 hígítása mellett (20.ábra). A végső kiválasztott beállítások a következők voltak: a p.402Y-specifikus antitestet 0,1mg/L koncentrációban (12000x hígítás), a p.402H-specifikus antitestet 0,25mg/L koncentrációban (2500x hígítás), a kecske anti-egér IgG-tormaperoxidázt 1:12000 hígításban alkalmaztuk, 1:2000 arányú szérumhígítás mellett. A reakcióban kromogén szubsztrátként a karcinogén OPD (o-phenylenediamin) helyett TMB-t (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) használtunk.



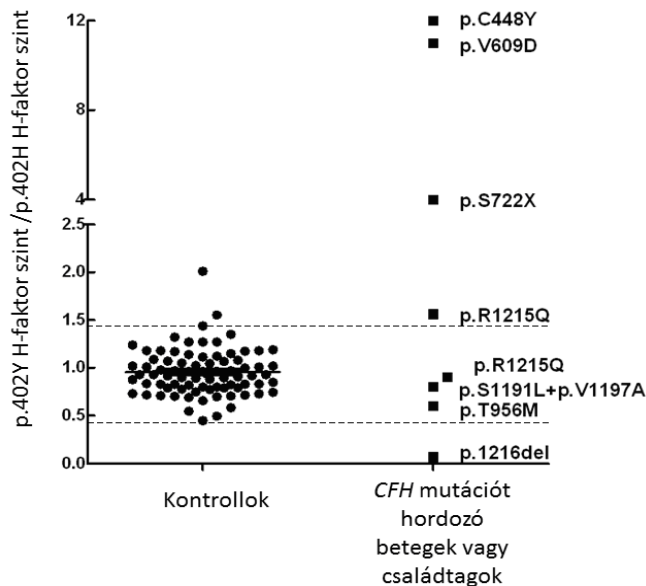
**20. ábra**

*Az allélspecifikus antitestek hígításával kapott kalibrációs görbék, 2000 x-es szérumhígítás mellett ( p.402Y-specifikus antitest 12000x hígítással, p.402H-specifikus antitest 2500x hígítással)*

A kalibrációs pontokra 4 vagy 5 paraméteres nonlineáris regressziós modellel görbét illesztettünk (a jobban illeszkedő görbét használtuk), majd ez alapján kiszámoltuk az allél-specifikus H-faktor szinteket. A kalibrációs pontok és a kontrollok minden kiértékelt lemezen teljesítették az elfogadási kritériumokat (4.10 fejezet). A p.402Y/ p.402H arány normál tartományának meghatározásához azokban az egészséges, munkaalkalmassági vizsgálat során bevont személyek mintájában határoztuk meg az allél-specifikus H-faktor szinteket, akik a p.Y402H polimorfizmusra heterozigóták voltak aPCR-RFLP-vel történt genotipizálás alapján (210 személyből 80 volt heterozigóta). A kontroll mérések eredményei 0,45 és 2,0 között voltak, az átlag 0,95 volt (21. ábra). Normál tartományként az átlag-2szórás és az átlag+2szórás közötti tartományt határoztuk meg, ez 0,46-1,44 volt.

### 5.3.2.2. Az allél-specifikus H-faktor fehérjeszint mérés eredményei

A p.402Y/ p.402H arány a normál tartományban volt, azaz a két kromoszómáról nagyjából egyenlő mértékű volt a mért fehérjeszint a p.T956M és a p.S1191L+p.V1197A mutációt tartalmazó H-faktor variánsok esetében (21. ábra). A p.V609D, p.S722X, p.T1216del, p.C448Y mutációkat tartalmazó mintákban az egyik kromoszómáról nem keletkezett detektálható H-faktor, azaz a p.402Y/ p.402H távol esett a normál tartománytól (21. ábra). Az érintett családok genetikai adataiból kikövetkeztethető, hogy ezek a kromoszómák a mutációt hordozó kromoszómák, azaz ennek a következménye, hogy nem mérhető termelődő fehérje a p.S722X és a p.T1216del mutációk esetében, míg a p.V609D és a p.C448Y mutációknál ez csak feltételezhető, mivel nem volt elegendő családtag a pontos öröklődés megállapításához.



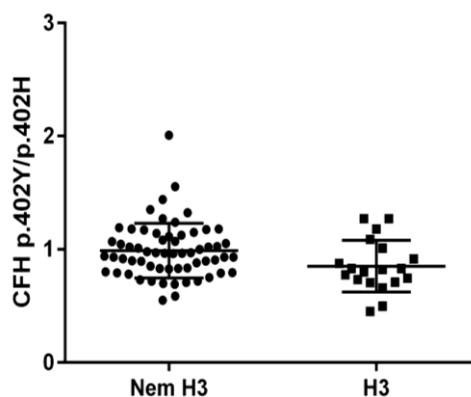
**21. ábra**

*A p.402Y H-faktor szint és p.402H H-faktor szint aránya egészséges kontrollokban és CFH mutációt hordozó betegekben vagy családtagjaikban (---: normál tartomány)*

A p.R1215Q mutáció esetében az egyik testvérben normál Y/H arányt láttunk, míg a másik testvérben ez enyhén a normál tartományon kívül esik, eltolódott. A p.Q950H, p.R53C, p.W198R, p.R1210C, p.P1161T, p.R1203W mutációk esetében a beteg és az elérhető családtagok közül senki nem volt Y402H heterozigóta, így itt nem tudtuk alkalmazni ezt a módszert.

#### 5.4. A H3 haplotípus kapcsolata a H-faktor fehérjeszinttel

Annak vizsgálatára, hogy a H3 haplotípus önmagában, mutáció egyidejű jelenléte nélkül is mutat-e kapcsolatot a H-faktor fehérjeszinttel, szintén az allél-specifikus H-faktor ELISA mérést alkalmaztuk. Az 5.3. fejezetben bemutatott egészséges személyek H-faktor polimorfizmusainak (HF-331, Y402H, E936D és V62I) genotipizálására PCR-RFLP és valós idejű PCR technikákat alkalmaztunk. Ezen polimorfizmusok alapján következtettünk, hogy a személy hordozza-e a H3 haplotípust (5. ábra). A H3 haplotípust hordozó p.Y402H heterozigóta egészségesekben a H3 haplotípust tartalmazó kromoszómáról p.402Y fehérje termelődik, míg a nem H3 haplotípust tartalmazó kromoszómáról képződő H-faktor p.402H. A két kromoszómáról termelődő fehérjék aránya mérési módszerünkkel megállapítható. Referenciacsoportként azokat a p.Y402H heterozigóta mintákat használtuk, amelyek a p.402Y variációt nem a H3 haplotípus részeként hordozták (61 minta, 22. ábra bal oszlop), és 19 olyan mintánk volt, amely H3 haplotípus részeként hordozta a p.402Y variációt (22. ábra, jobb oszlop). Mann-Whitney tesztet alkalmazva a két csoport között szignifikáns eltérést találtunk ( $p=0,0252$ ), azaz a H3 hordozó kontrollokban alacsonyabb a p.402Y/p.402H arány, mint azokban, akik nem hordozzák a H3 haplotípust. Tehát ha a H-faktor génje a H3 haplotípusra jellemző variációkat tartalmazza, az adott kromoszómáról kevesebb termelődő fehérje mérhető egészségesek szérumában, mint a nem H3 haplotípust hordozó kromoszómáról. A 61 nem H3-hordozó minta p.402Y/p.402H arány átlaga 0,9867, ami azt jelenti, hogy a tirozint (Y) tartalmazó fehérje szintje a hisztidint (H) tartalmazó fehérje szintjének átlagosan 98,67% -a. A 19 H3 haplotípust tartalmazó mintában ez az arány átlagosan 0,8511, tehát a tirozint (Y) tartalmazó, H3 haplotípusú kromoszómáról képződő fehérje szintje a hisztidint (H) tartalmazó fehérje szintjének átlagosan 85,11% -a. Ez átlagosan 13,56% különbséget



**22. ábra**

*A p.402Y H-faktor szint és p.402H H-faktor szint aránya nem H3- és H3 haplotípust hordozó egészségesekben*

jelent, ami az általunk használt normál tartományban (250-880 mg/L) 33,8-119,3 mg/L-nek felel meg, azaz ennyivel alacsonyabb fehérje-expresszió mérhető a H3 kromoszómáról, mint a nem H3 kromoszómákról.

### 5.5. Komplement- és genetikai analízis pHUS betegekben

Az előzőekben ismertetett komplementfehérje- és genetikai vizsgálatokat öt *Streptococcus pneumoniae* okozta HUS-ban szenvedő betegben is elvégeztük. Mind az öt beteg teljesítette a definitív pHUS diagnosztikai kritériumait: igazolt HUS, igazolt invazív *Streptococcus pneumoniae* fertőzés és a DIC diagnózisa kizárható volt. A felvételtkor laboratóriumi eredmények és a betegség lefolyása a 17. táblázatban láthatók.

#### 17. táblázat

##### *A pHUS betegek felvételtkor laboratóriumi eredményei és a betegség lefolyása*

| Regisztrációs kód                          | HUN49  | HUN67                                 | HUN129                     | HUN156                     | HUN274                           |
|--|--|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Életkor (hónap)                            | 12   | 11                                    | 37                         | 18                         | 29                               |
| Nem  | Nő   | Nő                                    | Nő                         | Nő                         | Nő                               |
| Vakcináció                                 | Prevenar   | Pneumovax                             | Prevenar                   | Pneumovax                  | Prevenar                         |
| Pneumococcus fertőzéshez kapcsolódó tünet  | Tüdőgyulladás, gennygyülem                       | Tüdőgyulladás, gennygyülem            | Tüdőgyulladás, gennygyülem | Tüdőgyulladás, gennygyülem | Tüdőgyulladás, pulmonáris tályog |
| A <i>Streptococcus</i> fertőzés igazolása* | tenyésztés                                       | tenyésztés                            | Antigénteszt               | antigénteszt               | antigénteszt                     |
| Hemoglobin (g/L)                           | 67(110-140)                                      | 83(108-128)                           | 96(100-600)                | 41(100-600)                | 39(108-156)                      |
| Trombocitaszám (G/L)                       | 65(169-358)                                      | 73(120-350)                           | 33(130-450)                | 33(130-450)                | 25(286-509)                      |
| Fragmentociták                             | Pozitív  | Pozitív                               | Pozitív                    | Pozitív                    | Pozitív                          |
| Direkt Coombs teszt                        | Pozitív  | Pozitív                               | Pozitív                    | Pozitív                    | Pozitív                          |
| LDH (U/L)                                  | 4313(<850)                                       | 1729(150-850)                         | 7610(200-600)              | 8004(200-600)              | 6843(310-790)                    |
| Kreatinin (umol/L)                         | 84   | 47                                    | 207                        | 273                        | 301                              |
| Fibrinogén (g/L)                           | 5,0  | 1,9                                   | 6,2                        | 2,6                        | 3,5                              |
| D-dimer (ug/mL)                            | >4   | ND                                    | >20                        | ND                         | ND                               |
| VVT transzfúzió (egység)                   | 22   | 4                                     | 6                          | 4                          | 2                                |
| Trombocita-transzfúzió (egység)            | -  | 2                                     | -                          | 8                          | -                                |
| Plazmakezelés (kezelések száma)            | Plazmacsere (6)                                  | FFP infúzió (3)                       | Plazmacsere (4)            | -                          | -                                |
| Dialízis (napok)                           | 23   | Hemofiltráció (3), Hemodialízis (2)   | Peritoneális dialízis (2)  | -                          | Peritoneális dialízis (4)        |
| Kórházban töltött napok                    | 101  | 11                                    | 25                         | 15                         | 30                               |
| A betegség kimenetele                      | koponyaúri vérzés a 30. napon, exit a 101. napon | koponyaúri vérzés és exit a 11. napon | Szövődmény nélkül gyógyult | Szövődmény nélkül gyógyult | Szövődmény nélkül gyógyult       |
| Követés (hónap)                            | -  | -                                     | 24                         | 18                         | 8                                |

\*pleurális folyadékgyülemről

Megjegyzés: A hemoglobin és LDH értékek mellett zárójelben a normál tartományok vannak feltüntetve

Mindegyikükben kialakult tüdőgyulladás és mellkasi folyadékgyülem, gennygyülem vagy pulmonáris tályog. Egyikük esetében sem volt igazolható agyhártyagyulladás, és

más kísérőbetegség sem állt fenn. A szérum neuraminidáz aktivitás és a direkt Coombs teszt minden esetben pozitív volt. Két beteg a kórházi kezelés során koponyaúri vérzés következtében elhunyt, a másik három beteg szövődmények nélkül gyógyult, és a követés alatt nem volt újabb relapszusuk.

### 5.5.1. A pHUS betegek komplementprofilja

Az akut betegsége szakasz alatt és a remissziós időszakban mért komplement eredményeket a 18. táblázat mutatja. A remissziós minták gyűjtése a kórház elhagyását követően minimum 2 hónap elteltével történt.

Az akut mintákban a C3 és C4 komplementkomponensek konzumpciója, csökkent klasszikus összkomplement (kivéve az 1. beteg) és csökkent alternatív út aktivitás figyelhető meg. A 3. betegnek erősen csökkent, deficiens volt az alternatív út aktivitása. A B-faktor és a H-faktor fehérjék szintje a referenciatartományon belül voltak az akut mintákban, míg a 2. és 4. beteg esetében az I-faktor szintje kissé csökkent. A remissziós mintákban ezek az eltérések nagyrészt helyreálltak, kivéve a kissé csökkent C3 és H-faktor szintet, valamint az alternatív út aktivitást a 3. betegnél és a csökkent I-faktor szintet a 4. betegnél. Anti-H-faktor elleni autoantitest egyik betegben sem volt jelen, és az ADAMTS13 aktivitás minden esetben kissé csökkent volt az akut fázisban (19–44%) ami később a remisszióban helyreállt.

## 18. táblázat

*pHUS betegek komplement és ADAMTS13 eredményei*

| Regiszter kód                                | HUN49          | HUN67          | HUN129              | HUN156              | HUN274              |
|--|----------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Klasszikus út összaktivitás (48-103 CH50/mL) | 61/ NA         | 27/ NA         | 40/ 55              | 19/ 67              | 29/ 50              |
| Alternatív út aktivitás (70-105%)            | 46/ NA         | 34/ NA         | 1/ 60               | 61/ 80              | 37/ 69              |
| C3 szint (0.9-1.8 g/L)                       | 0,54/ NA       | 0,33/ NA       | 0,45/ 0,78          | 0,54/ 1,34          | 0,66/ 1,04          |
| C4 szint (0.15-0.55 g/L)                     | 0,14/ NA       | 0,05/ NA       | 0,06/ 0,37          | 0,05/ 0,34          | 0,08/ 0,19          |
| B-faktor szint (70-130%)                     | 99/ NA         | 97/ NA         | 89/ 87              | 76/ 125             | 87/ 90              |
| I-faktor szint (70-130%)                     | 87/ NA         | 62/ NA         | 88/ 103             | 63/ 59              | 96/ 83              |
| H-faktor szint (250-880 mg/L)                | 340/ NA        | 131/ NA        | 139/ 106            | 315/ 303            | 372/ 245            |
| Anti-H-faktor IgG autoantitest               | Negatív/<br>NA | Negatív/<br>NA | Negatív/<br>Negatív | Negatív/<br>Negatív | Negatív/<br>Negatív |
| ADAMTS13 aktivitás (67-151%)                 | 44/ NA         | 24/ NA         | 19/ 81              | 19/111              | 32/ 86              |

*Megjegyzés: az első szám a felvételtkor mért, a második a remissziós mintából mért értéket jelöli;*

*NA: nincs adat*

### 5.5.2. A pHUS betegek genetikai vizsgálata

A vizsgált komplementregulátorokban (*CFH*, *CFI*, *CD46*, *THBD*) és komplementfehérjékben (*C3*, *CFB*) három beteg esetén találtunk mutációt (19. táblázat).

#### 19. táblázat

##### *A pHUS betegek genetikai vizsgálatainak eredményei*

| Regisztrer kód                  | HUN49 | HUN67            | HUN129           | HUN156           | HUN274 |
|---------------------------------|-------|------------------|------------------|------------------|--------|
| Mutációk*                       |       |                  |                  |                  |        |
| Érintett gén                    | -     | -                | CFH              | CFI              | THBD   |
| Érintett aminosav               | -     | -                | p.R1149X         | p.P50A           | p.T44I |
| Referencia                      | -     | -                | Új               | (163)            | Új     |
| Polimorfizmusok genotípusa**    |       |                  |                  |                  |        |
| CFB G252S (rs4151651)           | GG    | GG               | GG               | GA               | GG     |
| CFH -331C/T (rs3753394)         | CT    | CT               | CT               | CC               | CC     |
| CFH c.184G/A V62I (rs800292)    | GG    | GG               | GG               | GG               | GG     |
| CFH c.1204T/C Y402H (rs1061170) | TC    | TT               | TT               | TT               | TC     |
| CFH c.2016A/G Q672Q (rs3753396) | AA    | AA               | AG               | AA               | AA     |
| CFH c.2808G/T E936D (rs1065489) | GG    | GG               | GT               | GG               | GG     |
| CD46 c.-547A/G (rs2796267)      | AA    | AA               | AG               | AG               | AG     |
| CD46 c.-261A/G (rs2796268)      | AA    | AA               | AG               | AG               | AG     |
| CD46 IVS1-156A/G (rs2724384)    | AA    | AA               | AG               | AG               | AG     |
| CD46 IVS4+249delA (rs34743953)  | AA    | AA               | Adel             | Adel             | Adel   |
| CD46 IVS8+23T/G (rs2724374)     | TT    | TT               | TG               | TG               | TG     |
| CD46 IVS9-78G/A (rs1962149)     | GG    | GG               | GA               | GA               | GA     |
| CD46 IVS12+43T/C                | TT    | TT               | TC               | TC               | TC     |
| aHUS rizikó haplotípus          |       |                  |                  |                  |        |
| CFH H3                          | -     | -                | Het.             | -                | -      |
| MCPggaac                        | -     | -                | Het.             | Het.             | Het.   |
| Kópiaszám-variációk             | -     | CFHR1-3 deléció* | CFHR1-3 deléció* | CFHR1-3 deléció* | -      |

\* mindegyik variáció heterozigóta formában fordult elő

\*\* A szekvenálás során kimutatott aminosavcsereét okozó polimorfizmusok és aHUS-sal

összefüggésbe hozott polimorfizmusok

Het.: heterozigóta

A 3. betegnél egy heterozigóta H-faktor mutációt találtunk (c.3445C>T), ami a scr19-ben egy stop kodon létrejöttét eredményezi (p.R1149X), ami feltehetően a H-faktor transzlációjakor korai láncterminációt okoz. Ezzel összhangban van, hogy a beteg H-faktor szintje remisszióban is az alsó mérés határ alatt volt. A korábban ismertetett allélspecifikus H-faktor szint mérését a beteg mutációhordozó családtagjában is elvégeztünk, a mutációt hordozó kromoszómáról nem volt mérhető H-faktor (p.402Y/p.402H fehérjeszint aránya 19,7).

A 4. betegben egy heterozigóta I-faktor mutációt találtunk (c.148C>G), ami egy prolin-alanin cserét okoz (p.P50A). Ezt a mutációt korábban két aHUS betegben is leírták, valamint *in vitro* kimutatták azt is, hogy a mutáció alacsony intracelluláris és alacsony szekretált I-faktor szintet eredményez (163). Ezzel összhangban a betegben alacsony I-faktor szintet mértünk akut fázisban és remisszióban is.

Az 5. betegben egy heterozigóta thrombomodulin mutációt találtunk (c.131C>T), ami egy treonin-izoleucin cserét eredményez (p.T44I). Ezt a variációt korábban nem találták meg aHUS betegekben és egészségesekben sem a dbSNP és az Exome Variant Server adatbázisok alapján. Elvégeztük a mutáció hatásának *in silico* predikcióját is, eltérő eredményeket kapunk: a PolyPhen (pontszám 0,524), a PROVEAN (pontszám -4,070) és a SIFT (pontszám 0,02) káros hatásúnak, míg a MutationTaster (valószínűség 0,999) polimorfizmusnak prediktálja.

A komplement gének szekvenálásával számos aminosavcserét okozó polimorfizmusról kaptunk adatokat, ezek alapján egy beteg hordozza a *CFH* H3 rizikó haplotípust, valamint három beteg hordozza az MCP<sub>GGAAC</sub> haplotípust (19. táblázat). Egyik betegben sem azonosítottunk a betegséghez köthető kópiaszámvariációkat a vizsgált génekben.

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Az aHUS betegek klinikai jellemzőinek és laboratóriumi paramétereinek vizsgálata

Összesen 29, laboratóriumunkban 2008-2014 között vizsgált aHUS beteg klinikai jellemzőit gyűjtöttük össze és elemeztük: a betegség megjelenését és a betegség kimenetelét a kezelés és életkor függvényében, valamint a betegek komplementprofilját és etiológiai tényezőit akut fázisban és/vagy remisszóban. Az aHUS első megjelenése gyakoribb volt gyermekkorban (53,3%), az első epizód a betegek 30%-ánál már 2 éves kor előtt jelentkezett, ami megfelel a korábbi megfigyeléseknek (48, 164, 165). A másik jellemző életkor a vizsgált betegek körében a fiatal felnőttkor volt (több esetben terhességhez vagy szüléshez köthető a megjelenés), ami szintén ismert korábbi irodalmi adatokból (30, 166). A betegség kimenetele az irodalmi adatokból ismert betegcsoportokhoz hasonlóan igen rossz, jelenleg csak a betegek 37,93%-a van teljes remisszióbanveseelégtelenség nélkül, 41,38% végállapotú veseelégtelenség miatt jelenleg is tartós dialízisre szorul, 20,69% pedig elhunyt. Az eculizumab kezelésben részesült betegeink prognózisa jobb volt, mint a kezelésben nem részesült betegeké, bár a vizsgált betegek közül egyelőre kevesen kaphattak célzott komplement-terápiát, és a követési idő is lényegesen rövidebb, mint a korábban vizsgált betegek esetén. A mortalitási ráta saját betegeink vizsgálata alapján a két éves kor alatti gyermekekben a legmagasabb (66,67%), ez megfelel a korábbi esetsorozatokban közölt adatoknak. Egy francia esetsorozatban (144) összesen 9 beteg hunyt el, közülük hatan két év alattiak. A dán esetsorozatban (167) csak egy beteg, a legfiatalabb, egy hónapos csecsemő hunyt el. Az általunk vizsgált betegek közül összesen hatan hunytak el, az első epizód mindegyikükben két éves kor előtt jelentkezett, és hármukban már az első epizód halálos kimenetelű volt. Ez a három beteg a plazmaferezisre nem reagált jól, a plazmacsere nem volt kivitelezhető, az eculizumab pedig nem volt elérhető (168). Egy további betegnél eculizumab mellett remisszió volt elérhető (HUN499), de később más ok miatt elhunyt, míg a HUN12 beteg transzplantációs beavatkozás során exitált. Megfigyeléseink alapján tehát a két év alatti csecsemők az aHUS betegek egy speciális csoportját alkotják, akikben a betegség gyorsan progrediál, kezelésük plazmaferezissel nagyon nehezen oldható meg, és magas a mortalitás.



Az elmúlt években az eculizumab hatékonyságának klinikai igazolásával jelentős előrelépés történt az aHUS terápiájában (52), azonban számos kérdés még nyitott az első vonalbeli kezeléssel kapcsolatban (169). A kezelőorvosok az aHUS kezelésének kezdetekor elvben a plazmakezelés és az eculizumab közt választhatnak, bár az eculizumab alkalmazási előírata plazma-rezisztens vagy plazma-dependens aHUS betegek esetére korlátozza a kezelést. A csecsemőkben az alacsony vértérfogat és az erek nehéz kanülálhatósága miatt a plazmaferezis technikailag nagy kihívást jelent, így ezt csak ritkán használják (170, 171). Helyette a friss fagyasztott plazma infúziók adása jellemző, de erre a betegek gyakran nem reagálnak. Az eculizumab hatékony terápia lehet csecsemőknél is, ha a plazmaferezis nem kivitelezhető (172-175). A legújabb gyakorlat (elsősorban Franciaországban és Németországban) az eculizumabot mint elsővonalbeli terápiát ajánlja csecsemőknél, tekintettel a plazmakezelés fokozott rizikójára. Egy nemrégiben megjelent tanulmány a betegek kezelésére egy fokozatos megközelítést ajánl (176). A szerzők (összhangban az alkalmazási előirattal) csak azokban az esetekben tartják indokoltnak az eculizumab adását, ahol igazolható a komplement-mediált mechanizmus, illetve ahol a beteg nem reagál a plazmakezelésre 3-5 napon belül. Bár ez a megközelítés a legtöbb beteg esetében alkalmazható, azonban a csecsemőknél a korábbi megfontolásokat figyelembe véve (169, 174, 175) a hazai gyakorlatban is az eculizumab első vonalbeli adását ajánlanánk a plazmaterápia helyett. Ugyanakkor hangsúlyos szempont a részletes etiológiai kivizsgálás korai megindítása, hogy már az első napok döntéseit is diagnosztikai tesztek eredményeire lehessen alapozni.

Az aHUS diagnosztizálása klinikai jelek és általánosan elérhető laboratóriumi tesztek eredménye alapján történik, azonban felismerését sokszor késlelteti a szepszis vagy DIC egyidejű jelenléte. A plazmakezelés elfedheti az atípusos HUS-ra jellemző laboratóriumi jeleket (komplement diszreguláció), így ha a kezelés előtt nem történik mintavétel, szintén késhet a pontos diagnózis felállítása. A komplement diszreguláció igazolása 1-2 napon belül elérhető és segíthet a pontos etiológia tisztázásában és a korai terápiás döntésekben. A 2009-es és a 2015-ös guideline-ok alapján (50, 177) minden esetben az epizód megjelenésekor, még a plazmakezelés előtt ajánlott a részletes komplementvizsgálat. A differenciáldiagnózishoz szérumban C3 és C4 szint mérése mindenképp szükséges, valamint ajánlott az I-faktor, H-faktor szint mérése és a H-faktor elleni autoantitestek valamint a sejtfelszíni MCP expresszió vizsgálata is.

Laboratóriumunkban két további tesztet adtunk hozzá ezekhez a diagnosztikai tesztekhez, az alternatív út összaktivitás és a B-faktor szint mérését. Korábbi eredményeink alapján (178) ezekkel a tesztekkel együtt növelni lehet a komplementvizsgálatok specificitását a mikroangiopátiák elkülönítő diagnosztikájában.

A vizsgált aHUS betegek komplementprofiljában akut fázisban a legtöbb esetben fokozott komplement-aktiváció és -konzumpció figyelhető meg. Remisszióban több eltérés rendeződik, azonban sok esetben egy-egy komponensnek tartósan alacsony marad a szintje. A későbbiekben azonosított mutációkat a komplementprofillal együtt vizsgálva (20. táblázat) megfigyelhető, hogy a H-faktort érintő mutációknál akut fázisban minden esetben alacsony a C3 szint, és ez remisszióban is jellemzően így marad. Az I-faktor és B-faktor szintek akut szakaszban többnyire alacsonyak, ezek az eltérések jellemzően normalizálódnak remisszióban (pl. *CFH* V609D mutációt hordozó beteg (HUN60) esetében), az alternatív út aktivitás és H-faktor szint pedig vegyes képet mutat. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy egyes *CFH* mutációkra csökkent H-faktor szint jellemző, míg a 22-es és 23 exonban (scr19 és 20) található mutációknál a H-faktor fehérje szint jellemzően nem csökkent. A homozigóta H-faktor mutációkra nagyon alacsony, gyakran nem detektálható C3 szint és H-faktor szint jellemző (30). Egy 2010-ben közölt olasz esetsorozatban az alacsony C3 szint leggyakrabban a *CFH* és *C3* génekben mutációt hordozó betegekben volt jellemző (48). Az olasz munkacsoport által közölt korábbi tanulmányban kimutatták, hogy a *CFH* mutációt hordozó betegekben szignifikánsan nagyobb arányban fordul elő a C3 szint csökkenése és a H-faktor szint csökkenése, mint más mutációt hordozó betegekben (36). Egy francia esetsorozatban is megfigyelték, hogy a C3 szint a *CFH* mutációt hordozókban alacsonyabb más mutációkat hordozó betegekhez képest (179) valamint, hogy a H-faktor szint nagyon alacsony a homozigóta, és mérsékelten csökkent heterozigóta *CFH* mutációt hordozókban (179).

Az I-faktort érintő mutációknál szinte minden komponens alacsony remisszióban is, kivéve az eculizumab kezelés alatt álló betegben (HUN737). A *CD46*, *C3*, *CFB* mutációt hordozó betegek kis száma miatt nem lehet általános következtetéseket levonni az ezen a géneket érintő mutációk esetében. Az általunk vizsgált három, csak C3 mutációt hordozó betegben a C3 szint vegyes képet mutat, hasonlóan az olasz betegcsoportéhoz (48), ahol nem minden C3 mutáció esetében találtak alacsony C3 szintet, valamint egy dán

esetsorozathoz (167), ahol szintén megfigyelték, hogy a normál C3 szint nem zárja ki a C3 génben lévő mutációkat.

## 20. táblázat

*A vizsgált génekben található mutációk az akut és remissziós komplementprofilal együtt ábrázolva*

| Érintett gén             | Mutáció                        | Beteg azonosító | Komplementprofil akut fázisban |                  |              |                   |              | Komplementprofil remisszióban |                  |              |                   |              |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|-------------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
|                          |                                |                 | AP % (70-105)                  | C3 g/L (0,9-1,8) | IF% (70-130) | HF mg/L (250-880) | BF% (70-130) | AP % (70-105)                 | C3 g/L (0,9-1,8) | IF% (70-130) | HF mg/L (250-880) | BF% (70-130) |
| CFH                      | CFH W198R                      | HUN528          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 64                            | 0,8              | 114          | 400               | 63           |
|                          | CFH C448Y                      | HUN649          | 90                             | 0,49             | 126          | 191               | 62           | -                             | -                | -            | -                 | -            |
|                          | CFH V609D                      | HUN60           | 1                              | 0,4              | 65           | 124               | 51           | 46                            | 0,58             | 92           | 98                | 74           |
|                          | CFH S722X                      | HUN193          | 5                              | 0,36             | 42           | 95                | 65           | -                             | -                | -            | -                 | -            |
|                          | CFH Q950H                      | HUN579          | 36                             | 0,68             | 108          | 365               | 136          | -                             | -                | -            | -                 | -            |
|                          | CFH P1161T                     | HUN216          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 64                            | 0,74             | 98           | 308               | 99           |
|                          | CFH R1203W                     | HUN167          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 74                            | 0,57             | 70           | 151               | 77           |
|                          | CFH R1215Q                     | HUN92           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 85                            | 1,1              | 82           | 242               | 109          |
| CFH R1210C, CFH T1216del | HUN12                          | -               | -                              | -                | -            | -                 | 0            | 0,36                          | 74               | 258          | 93                |              |
| CFI                      | CFI P83Q                       | HUN499          | 0                              | 0,62             | 35           | 147               | 54           | 14                            | 0,59             | 67           | 386               | 100          |
|                          | CFI R339L                      | HUN737          | 22                             | 0,55             | 84           | 200               | 65           | 1#                            | 1,04#            | 167#         | 349#              | 118#         |
|                          | CFI c.772G>A; CFI R474Q        | HUN44           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 0                             | 0,75             | 51           | 717               | 17           |
| CD46                     | MCP c.286+2T>G homo            | HUN71           | 44                             | 0,67             | 57           | 171               | 65           | 77                            | 1,42             | 72           | 311               | 127          |
| C3                       | C3 K104E                       | HUN246          | 21*                            | 0,58*            | 56*          | 363*              | 66*          | 110                           | 1,22             | 131          | 847               | 103          |
|                          | C3 I1157T                      | HUN420          | 114                            | 0,9              | 104          | 496               | 88           | 98                            | 1,05             | 97           | 297               | 69           |
|                          | C3 I1157T                      | HUN421          | 1#                             | 0,97#            | 97#          | 302#              | 61#          | 44                            | 0,77             | 67           | 333               | 63           |
| CFB                      | CFB E566A                      | HUN620          | 109                            | 1,51             | 107          | 996               | 160          | -                             | -                | -            | -                 | -            |
|                          | CFB K323E                      | HUN161          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 4                             | 0,16             | 77           | 469               | 64           |
| kombinált                | CFH T956M; MCP P165S           | HUN40           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 52                            | 0,69             | 81           | 342               | 81           |
|                          | CFH Q950H, MCP G259V           | HUN335          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 96                            | 1,42             | 115          | 454               | 96           |
|                          | CFH S1191L + V1197A, MCP E142Q | HUN362          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 86                            | 0,83             | 97           | 281               | 96           |
|                          | CFH R53C; C3 R951H             | HUN680          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 0#                            | 0,21#            | 99#          | 941#              | 91#          |
|                          | CFH R1215Q; CFB I242L          | HUN93           | -                              | -                | -            | -                 | -            | 86                            | 1,43             | 122          | 552               | 95           |
| nincs mutáció            | -                              | HUN165          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 130                           | 0,93             | 102          | 545               | 125          |
|                          | -                              | HUN229          | 0                              | 0,26             | 47           | 123               | 50           | -                             | -                | -            | -                 | -            |
|                          | -                              | HUN304          | 0                              | 0,41             | 26           | 80                | 19           | -                             | -                | -            | -                 | -            |
|                          | -                              | HUN371          | 100                            | 0,79             | 111          | 181               | 148          | -                             | -                | -            | -                 | -            |
|                          | -                              | HUN555          | -                              | -                | -            | -                 | -            | -                             | -                | -            | -                 | -            |
|                          | -                              | HUN599          | -                              | -                | -            | -                 | -            | 104                           | 0,81             | 94           | 412               | 89           |

\*: szubakut minta: plazmaferezis befejezése után, hematológiailag remisszióban

# :Eculizumab kezelés alatti minta. Kiemelt értékek: normál tartomány alatt.

Rövidítések: AP: alternatív út aktivitás, IF: I-faktor fehérjeszint, BF: B-faktor fehérjeszint

A *CD46* c.286+2T>G homozigóta mutációt hordozó betegnél (HUN71) és a C3 p.K104E mutációt hordozó betegnél (HUN246) minden érték alacsony akut/szubakut betegségi szakban, de helyreáll remisszióban. A több génben mutációt hordozó betegeknek, és ahol nem találtunk mutációt, a komplementprofil vegyes képet mutat.

A komplementprofil vizsgálata az akut betegségi szakban minden esetben igazolta a komplement diszregulációt és konzumpciót, ami segítette a klinikai diagnózis gyors megerősítését és a korai terápiás döntéseket, valamint egyes esetekben a remissziós minta vizsgálata utalt a háttérben jelenlévő genetikai rizikóra és indokolta a részletes további vizsgálatokat.

## 6.2. Az aHUS betegek genetikai vizsgálata

Célul tűztük ki, hogy az aHUS háttérben ismert komplementregulátorok (*CFH*, *CFI*, *CD46*, *THBD*) és komplementfehérjék (*C3*, *CFB*) szekvencia-analízisére alkalmas vizsgálómódszereket állítsunk be, és a vizsgálatra küldött betegek mintáiban azonosítsuk a betegség kialakulásáért felelős mutációkat és a további genetikai rizikótényezőket. A hat vizsgált gén teljes kódoló régióinak szekvenálásához összesen 66 PCR termék amplifikálását optimalizáltuk, majd 158 szekvenálási termékből kapott adatokat illesztettük össze.

Összesen 29 betegben végeztük el az említett gének szekvenálását, és az azonosított variációkat az elérhető családtagokban is direkt DNS szekvenálással vizsgáltuk. 23 betegben (79,3%) találtunk összesen 27 mutációt, az azonos családból származó betegeket kizárva ez az arány 77,7%, ami valamivel magasabb, mint az eddig ismert esetsorozatokban (30, 48). A *CFH* génben 13 mutációt (48,1%) találtunk 14 betegben; ez az arány magasabb, mint a nagyobb európai és amerikai esetsorozatokban (20-30%) (30, 36, 48, 124). A *CD46* génben 4 mutációt (14,8%) találtunk a 4 betegben ez megfelel a korábbi adatoknak (5-15%) (30, 36, 48, 124). A *ACFI* génben 4 mutációt (14,8%) találtunk 3 betegben, ez valamivel magasabb, mint a korábban leírt előfordulás (4-10%) (30, 36, 48, 124). A *C3* és a *CFB* mutációk szintén gyakrabban fordultak elő betegeink körében, mint a korábban közölt tanulmányokban: a *C3* génben három mutációt találtunk (11,1%) ami magasabb, mint korábbi esetsorozatokban (2-10%) (30, 124) és három *CFB* mutációt találtunk (11,1%), ami irodalmi adatok alapján extrém ritka aHUS betegekben (1-4%)

(30, 124). Szintén ritkák aHUS betegek körében a thrombomodulin mutációk (3-5%) (30, 48, 124), ilyet a vizsgált betegek körében nem találtunk.

Kombinált mutációt 8 betegben találtunk (27,6%) ami a korábban ismert előfordulásnál (3-12%) (30, 48) jóval gyakoribb. A viszonylag kis esetszám és a betegek különböző származása miatt ezekből az eltérésekből nem lehet következtetéseket levonni, bár feltételezésünk szerint a mutációk nagyobb arányát az okozhatja, hogy a szomszédos országokból valószínűleg a súlyosabb esetek mintáit küldték laboratóriumunkba genetikai vizsgálatra. Ahogy egyes aHUS betegekben azonosított B-faktor mutációkról kimutatták, hogy nem játszanak szerepet a betegség kialakulásában (119), az általunk azonosított variációkról sem ismert minden esetben, hogy van-e funkcionális relevanciája a betegség pathogenezisében, és ezzel kapcsolatos funkcionális vizsgálatokat eddig nem végeztünk.

A H-faktor irodalmi adatok alapján aHUS kialakulására hajlamosító H3 rizikó haplotípusának frekvenciája 26% volt, ez a gyakoriság megfelel az irodalmi adatoknak (29%) (41). Annak a mechanizmusa, hogy a H3 miként járul hozzá az aHUS patogeneziséhez korábban nem volt ismert. A H3 haplotípus a p.V62I gyakori allélját tartalmazza, ami a kofaktor-aktivitásért felelős régióban található. Funkcionális vizsgálatok kimutatták, hogy a p.62V-t tartalmazó H-faktor kofaktor-aktivitása kissé csökkent a p.62I variánshoz képest, ami a H2 védő haplotípus része (180, 181).

Az MCP<sub>GGAAC</sub> aHUS rizikó haplotípus aránya az általunk vizsgált betegekben 58,6%, ami magasabb, mint az eddig közölt aHUS esetsorozatokban (43-44%) (42, 102), a magas frekvencia azonban megfelel a korábbi megfigyelésnek, hogy a haplotípus előfordulása aHUS betegekben szignifikánsan magasabb, mint egészséges populációban (21-25% kontrollban (42, 102), 43-44% aHUS-ban (102, 104). A promóter régióban található két polimorfizmus (rs2796267, rs2796268) ritka alléljai riporter gén elé klónozva a vad típushoz képest 25%-kal csökkent transzkripciós aktivitást mutattak, ez alapján az MCP<sub>GGAAC</sub> haplotípus feltehetően hatással van a sejt felszíni MCP expresszió szintjére (42).

A tanulmányunkban vizsgált legtöbb beteg a feltehetőleg betegségkötő mutáció(k) mellett hetero- vagy homozigóta formában hordozott egy vagy több rizikó haplotípust is. Ahogy a családtagok genetikai elemzéséből látható, sok esetben a többszörös rizikóval rendelkező személyben alakul ki a betegség (17. ábra, 1., 2., 5., 6., 7., 8., 9., 10. és

11.család). Ez magyarázat lehet arra, hogy a legtöbb ismert mutációnak viszonylag alacsony, 50% körüli a penetranciája (46). Ez a megfigyelés megerősíti a komplex genetikai analízis szükségességét minden aHUS betegben, valamint családtagjaikban is, hogy képet kapjunk arról, hogy egy mutáció önmagában, vagy más faktorokkal együtt mennyiben járul hozzá a betegség kialakulásához az adott betegben.

Bár egyre több aHUS kialakulásával kapcsolatba hozható mutációt közölnek, funkcionális hatásukat ritkábban vizsgálják (119, 150, 152, 182, 183). A betegek komplementprofiljában megfigyelhető eltérések utalhatnak a mutációnak a fehérjeszintjére vagy funkciójára gyakorolt hatására is, további becslést kaphatunk egy mutáció hatásáról a gyorsan elvégezhető predikciókkal. Egy vizsgálat azonban kimutatta, hogy a legjobb predikciós programok hatékonysága is csak 80% körüli, és nem érhető el jobb eredmény több program együttes használatával sem. Mivel az adatbázisokban egyre több ismeretlen hatású variációt találunk, fontos a funkcionális relevanciájukat is elemezni. Ha a patogenitást online predikciós programok alapján, funkcionális vizsgálatok nélkül közelítjük meg, az eredményeket rendkívül óvatosan lehet csak értelmezni (184). Ez különösen a funkcionyeréses mutációk vizsgálatánál fontos, mivel a legtöbb program ezeket nem prediktálja betegségkózosónak (185). Az általunk újonnan azonosított mutációk funkcióját négy online program segítségével prediktáltuk. A H-faktor mutációkat minden program káros hatásúnak prediktálta, ezekkel további funkcionális vizsgálatokat is végeztünk (5.3 és 6.3 fejezet). Az újonnan azonosított I-faktor mutációk közül a p.P83Q mutációt tolerálhatónak prediktáltuk, bár alacsony I-faktor fehérjeszinttel jár együtt a betegnél. A p.R339L mutációt betegségkózosónak prediktáltuk, és patogén szerepére utal, hogy egy korábban leírt mutáció, a p.I340T (11, 167) közelében van, ami szignifikánsan alacsonyabb funkcionális aktivitást mutatott a C4b és C3b inaktiválásában a vad típusához viszonyítva (107, 186). A p.R474Q predikciója nem egyértelmű, és nincs adatunk a funkcionális szerepéről. Bár mutációt hordozó betegben az I-faktor szintje remisszióban is alacsony, ezt nem lehet egyértelműen ennek a variációnak tulajdonítani, mert a beteg egy másik mutációt is hordoz a *CFI* génben (c.772G>A). Az általunk azonosított két *CD46* mutáció predikciója nem egyértelmű. Ezeknek a mutációknak is szeretnénk volna vizsgálni a funkcionális relevanciáját, ezeket a tesztek egy, a laboratóriumunkkal együttműködő kooperációs kutatócsoport végezte, így saját eredményeim közt részletesen nem mutattam be.

Eredményeik alapján a p.G259V mutáció csökkent expressziót és nagymértékben csökkent kofaktor funkciót eredményezett, míg a p.E142Q mutációnak nem volt hatása az expresszióra és a kofaktor funkcióra (162). Ahogy egy korábbi tanulmány alapján is várható volt (160), mi sem prediktáltuk betegségkózzónak a feltehetően funkciónyeréses C3 mutációkat. A C3 p.K104E mutáció közelében van egy jól tanulmányozott variáció, a p.R102G (rs2230199). Ez a variáció egészségesekben is gyakran előfordul (allélfrekvencia európaiakban: 20,94%), az aHUS-ra hajlamosító tényezőként nem írták le, viszont kimutatták, hogy az aminosavcsere befolyásolja a H-faktor általi szabályozás hatékonyságát (187). Hemolízis esszében a variáns fehérje hatékonyabban aktiválta az alternatív utat, és magasabb hemolitikus aktivitással rendelkezett a vad típushoz képest, valamint a ritka allélt hordozókban alacsonyabb alternatív út aktivitás volt kimutatható, mint a homozigóta vad genotípusú egyéneknél (188).

Bár az újonnan azonosított mutációk funkcionális relevanciájának tisztázásához további vizsgálatok szükségesek, a beállított szekvenálási módszereknek köszönhetően a bemutatott betegek csaknem 80%-ában sikerült azonosítani a betegséggel kapcsolatba hozható genetikai variáció(ka)t. A módszerek beállítása óta az elmúlt három évben a fenti gének teljes vagy részleges szekvenálását még további kb. 50 aHUS betegben és családtagjaikban végeztük el, valamint laboratóriumunkhoz érkezett kérés prenatális mutációsűrésre, terápiás tanácsadásra terhességnél és transzplantáció előtt, továbbá több beteg részesülhetett eculizumab kezelésben a komplement- és genetikai vizsgálatok eredményei alapján.

### 6.3. A H-faktor mutációk funkcionális vizsgálata

Az elmúlt években számos mutáció vált ismertté aHUS betegekben, azonban funkcionális hatásuk sok esetben nem ismert. A betegek és családtagjaik komplementprofilja vagy *in silico* predikciók alapján egy mutáció patogenetikai szerepe ugyan sok esetben feltételezhető, de ennek igazolásához és a hatásmechanizmus alaposabb megértéséhez funkcionális tesztekre van szükség. Az aHUS betegek kb. 30%-ában a betegség hátterében H-faktort érintő mutáció áll (94), ezek különböző módon befolyásolhatják a fehérje kvalitatív és kvantitatív tulajdonságait. A legtöbb aHUS-ban ismert H-faktor mutáció a fehérje C-terminális részén, az scr19-20 doméneknél található. A funkcionális vizsgálatok is többnyire ezekre irányulnak, ezek a mutációk jellemzően a

sejtfelszínhez való kötődést csökkentik (46). A molekula közepén lévő mutációk funkciója azonban kevésbé tanulmányozott. Tortajada és munkatársai két korábban aHUS-sal kapcsolatba hozható mutációt vizsgáltak, és eredményeik alapján ezek a variációk egy ősi, ritka haplotípus részei, és nincs relevanciájuk az aHUS patogenezisében (189). Ez a megfigyelés is alátámasztja az újonnan azonosított mutációk funkcionális vizsgálatainak szükségességét.

Azt feltételeztük, hogy a H faktor mennyiségi és minőségi mutatóinak meghatározására alkalmas módszerek segíthetik az új variációk patogenitásának megítélését, ezért célul tűztük ki az általunk azonosított H-faktor mutációk részletes vizsgálatát, hogy megítéljük, az adott mutáció(k)nak milyen hatása van a fehérje termelődésére és funkciójára az adott betegben, ezzel egyaránt értékes eredményt szolgáltatathatunk a betegek ellátásához és az aHUS patogenezisének alaposabb megértéséhez.

A H-faktor hemolitikus teszttel vizsgáltuk, hogy a termelődő mutáns fehérje hatására a komplement regulációjának sérülése és fokozott aktíválódása lízist okoz-e. A birka vörösvértestek normál esetben nem aktiválják a komplement rendszert, mivel a H-faktor a szialsavhoz és a C3b-hez köt a sejt felszínén, így a normál humán szérum a vörösvértesteken nem okoz lízist. Ha azonban egy H-faktor mutáció hatására csökken a kötődés a glükózaminoglikánokhoz vagy a C3b-hez, az a komplement aktiválásához és a vörösvértestek líziséhez vezet. Az allélspecifikus ELISA módszerrel a feltehetőleg mutáció-hordozó kromoszómáról termelődő fehérje mennyiségét hasonlítottuk össze a mutációt nem hordozó kromoszómáról termelődő fehérje mennyiségével, vagyis a mutáció fehérjeszintre gyakorolt hatását vizsgáltuk. A 21. táblázat összefoglalja a funkcionális tesztek eredményeit és azok eredményéből levonható következtetéseket.

A p.W198R, p.S1191L+V1197A és p.R1215Q mutáns H-faktort tartalmazó szérumminták a vörösvértestek erős lízisét eredményezték. A p.P1161T és p.Q950H mutáns H-faktort tartalmazó szérumminták mérsékeltebb, de szignifikáns lízist eredményeztek. A p.S722X, p.T956M és p.T1216del mutáns H-faktort tartalmazó szérumminták nem okoztak lízist.



**21. táblázat**  
*A H-faktor funkcionális tesztek eredményei*

| CFH mutáció           | Allélspecifikus ELISA a beteg vagy családtagjának szérumában                           | Hemoliti-tikus teszt | Ismert funkcionális hatás (irodalmi adatok)   | Mutációs kategória | Vizsgálataink konklúziója         |
|-----------------------|--|----------------------|---|--------------------|-----------------------------------|
| p.R53C                | <i>Nem végezhető</i>   | <i>Nem végezhető</i> | R53H:csökkent kofaktor aktivitás és csökkent 'decay-accelerating' aktivitás(181)  | M1                 | <i>Nem vizsgáltuk</i>             |
| p.W198R               | <i>Nem végezhető</i>   | Erős lízist okoz     | Új mutáció  | M2                 | <b>csökkent regulátor funkció</b> |
| p.C448Y               | Az egyik kromoszómáról képződő H-faktor szintje a mérési tartomány alatt van           | <i>Nem végezhető</i> | Új mutáció, cisztein-hidat érint  | M2                 | <b>nem termelődik</b>             |
| p.V609D               | Az egyik kromoszómáról képződő H-faktor szintje a mérési tartomány alatt van           | <i>Nem végezhető</i> | Új mutáció  | M2                 | <b>nem termelődik</b>             |
| p.S722X               | A mutációt hordozó kromoszómáról képződő H-faktor szintje a mérési tartomány alatt van | Nem okoz lízist      | Új mutáció, Stop kodon  | M2                 | <b>nem termelődik</b>             |
| p.Q950H               | <i>Nem végezhető</i>   | Lízist okoz          | alacsonyabb expresszió a vad típushoz képest (tranzien transzfecció kísérlet) (162)   | M1                 | <b>csökkent regulátor funkció</b> |
| p.T956M               | Hasonló fehérjeszint a két kromoszómáról   | Nem okoz lízist      | Nem végeztek funkcionális tesztet   | M3                 | <i>Nem ismert</i>                 |
| p.P1161T              | <i>Nem végezhető</i>   | Lízist okoz          | Új mutáció  | M2                 | <b>csökkent regulátor funkció</b> |
| p.S1191L+<br>p.V1197A | Hasonló fehérjeszint a két kromoszómáról   | Erős lízist okoz     | Csökkent C3b kötés és defektív komplement-aktiváció gátlás a sejt felszínen (147)   | M1                 | <b>csökkent regulátor funkció</b> |
| p.R1203W              | <i>Nem végezhető</i>   | Nem okoz lízist*     | Nem végeztek funkcionális tesztet   | M1                 | <i>Nem ismert</i>                 |
| p.R1210C              | <i>Nem végezhető</i>   | <i>Nem végezhető</i> | Az új cisztein hatására képződő intermolekuláris diszulfid híd H-faktor dimerek képződését okozza (34). Normál kofaktor aktivitás és defektív kötődés a C3b-hez, heparinhoz, és az endotélsejtekhez(151). | M1                 | <i>Nem vizsgáltuk</i>             |
| p.R1215Q              | Hasonló fehérjeszint a két kromoszómáról   | Erős lízist okoz     | Nem ismert funkcionális hatás (34)  | M1                 | <b>csökkent regulátor funkció</b> |
| p.T1216del            | A mutációt hordozó kromoszómáról képződő H-faktor szintje a mérési tartomány alatt van | Nem okoz lízist      | Nem végeztek funkcionális tesztet   | M1                 | <b>nem termelődik</b>             |

*Nem végezhető: nem volt megfelelő minta a betegtől és/vagy családtagtól. \*Nem okoz lízist két mutációhordozóban, de lízist figyeltünk egy mutációhordozó családtagban, akiben H-faktor szekvenálást nem végeztünk. Mutációs kategória: M1: Szekvenca variáció, amelyet korábban leírtak aHUS-ban szenvedő betegekben, és/vagy kóroki szerepe igazolt a betegség kialakulásában. M2: Korábban nem írták le aHUS-ban szenvedő betegekben, nagy valószínűséggel kóroki szerepe van. M3: Korábban nem írták le aHUS-ban szenvedő betegekben, kóroki szerepe bizonytalan*

A p.R1203W mutáció esetén a beteg és egészséges testvére mintájában nem figyeltünk meg lízist, viszont édesanyja mintája erős lízist okozott. (Az anyában teljes CFH gén

szekvenálást nem végeztünk, egyéb H-faktorban lévő variációkról nincs adatunk). A p.R1210C, p.C448Y, és p.V609D és p.R53C mutációk vizsgálatra nem volt alkalmas szérum mintánk.

A két kromoszómáról mérhető fehérjeszint a p.T956M, p.S1191L+p.1197A, és a p.R1215Q mutációt hordozó H-faktor esetében közel egyenlő mértékű volt, azaz valószínűleg ezeknek a mutációknak a hatása nem az alacsonyabb szintű fehérjeexpresszióban mutatkozik meg. A p.R1215Q mutációt két testvér hordozza, az egyikben normál p.402Y/p.402H arányt látunk, míg a másik testvérben ez kissé a normál tartományon kívül esik. Mivel nem áll rendelkezésünkre elegendő családtag, nem tudjuk megállapítani, hogy a mutáció melyik kromoszómán van. Ez a megfigyelés többször ismételt és megerősített mérés eredménye, így feltételezhető, hogy a betegben lehet még egyéb olyan variáció, ami kismértékben befolyásolja a H-faktor szintet, de ez további vizsgálatokat igényel, illetve szükséges lenne a mérés megismétlése egy újabb mintából is. A két testvér eredménye alapján azonban kimondható, hogy a mutáció a H-faktor szintet jelentősen semmiképp nem befolyásolja.

A p.S1191L+p.1197A és a p.R1215Q mutációk az allélspecifikus ELISA és a hemolitikus teszt eredményei alapján kvantitatív változást nem okoznak, de hordozóikban a komplementaktiválódás alternatív útjának regulációja csökken, ami fokozott hemolízist eredményez. A p.S1191L+p.V1197A mutációkról előzőleg közölt megfigyelések is alátámasztják ezt, a mutáció hatására csökkent C3b kötést és defektív komplement-aktiváció-gátlást írtak le (147). A p.R1215Q mutációról más funkcionális adatot nem találtunk az irodalomban, azonban a p.1215-ös pozícióban előforduló másik mutációról, a p.R1215G-ről kimutatták, hogy a C3b/C3d-hez való kötődésben és a heparin kötésében okoz csökkenést, és alacsonyabb affinitást mutat az endotélsejtek felszínéhez való kötődésben is (151).

A p.T956M mutáció esetében egyik alkalmazott teszttel sem kaptunk olyan eredményt, ami megerősítené a mutáció patogén szerepét, a fehérjére gyakorolt hatásának tisztázása további vizsgálatokat igényel. A mutációt hordozó beteg egy másik mutációt is hordoz (MCP p.P165S), amit korábban egy alacsony sejtfelszíni MCP expressziót mutató aHUS betegben már leírtak (42).

A p.V609D, p.S722X, p.T1216del, p.C448Y mutációkat tartalmazó mintákban az egyik kromoszómáról képződő H-faktor szintje a mérési tartomány alatt volt. Az érintett

családok genetikai adataiból kikövetkeztethető, hogy ezek a kromoszómák a mutációt hordozó kromoszómák a p.S722X és a p.T1216del mutációk esetében (17. ábra, 5. és 1. család). A p.V609D és a p.C448Y mutációknál nem volt elegendő családtag a pontos öröklődés megállapításához, így ezekben az esetekben csak feltételezhető, hogy a nem mérhető, alacsony fehérjeszint a mutáció hatása. Ezzel összhangban van, hogy a p.V609D mutációt hordozó beteg széruma a normál tartománynál alacsonyabb koncentrációban tartalmaz H-faktort (13. táblázat). A vad típusú kromoszómáról termelődő fehérje azonban valószínűleg nem elegendő, mivel a beteg komplementprofilja az alternatív út aktivációjára és konzumpciójára utal remisszióban is. A p.C448Y mutáció egy konzervált cisztein-hidat érint, és az egyik diszulfidkötést teszi tönkre az scr8-ban, ami valószínűleg hatással van a megfelelő protein foldingra, és a molekula elégtelen szekrécióját eredményezi (34, 190), ezzel összhangban nem volt mérhető H-faktor az egyik kromoszómáról. A mutáció patogén szerepét a négy predikció eredménye is megerősíti.

A p.R53C, p.Q950H, p.W198R, p.S1191L+ p.V1197A, p.R1210C, p.P1161T, p.R1203W mutációk esetében a beteg és az elérhető családtagok közül senki nem volt p.Y402H heterozigóta, így nem tudtuk alkalmazni az allélspecifikus ELISA módszert a termelődő fehérje mennyiségének mérésére. A p.W198R, p.S1191L+p.V1197A, p.R1215Q mutációk a hemolitikus teszt alapján csökkentették a komplement-regulátor aktivitást. A p.R1210C mutációt egyik tesztben sem tudtuk vizsgálni, de egy korábbi publikációból ismert, hogy nem okoz csökkent expressziót azonban a Western bloton egy nagy molekulásúlyú anti-H-faktorról reagáló sáv látható, ennek oka lehet, hogy az új cisztein hatására képződő intermolekuláris diszulfid híd H-faktor dimerek képződését okozza(34), és ez egy nem funkcionáló fehérjét eredményez. Az p.R53C mutáció hatását sem tudtuk vizsgálni egyik tesztel sem. A korábban közölt, p.53-as pozícióban lévő másik, p.R53H mutációról kimutatták, hogy csökkent kofaktor aktivitás és csökkent 'decay-accelerating' aktivitás (181). A p.R1203W mutáció esetén a hemolitikus teszt eredménye a három családtagnál nem egyezik, bár korábban erről a mutációról kimutatták, hogy hatására csökkenhet H-faktor C3b-hez való kötődése (148). A p.Q950H és p.P1161T mutációk mérsékelt hemolízist okoznak. Ezeknek a mutációknak a funkcionális elemzése további vizsgálatokat igényel.

A p.Q950H mutáció esetében további tesztek végeztünk kollaborációs partnerünk segítségével (162). Ez a variáció a vörösvérsejtek mérsékelt, de szignifikáns lízisét okozta a hemolitikus tesztben. A H-faktor koncentrációja a rutin diagnosztikai mérés során a mutációt hordozó betegekben a normál tartományban volt. Mivel ez a tartomány igen széles, egy mutáció hatására kialakuló kisebb eltérés nem feltétlenül jelenik meg jelentős csökkenésként az össz-fehérjesszintben. Annak megerősítésére, hogy a megfigyelt hatás valóban a p.Q950H mutációnak köszönhető, egy hasonló hemolitikus tesztet is elvégeztek, ahol H-faktor depletált szérumot használtak, amihez vad típusú és p.Q950H mutáns, rekombináns H-faktort adtak. A H-faktor depletált szérum hozzáadása a vörösvértestekhez lízist okozott, míg ha a reakcióhoz vad típusú H-faktort is adtak, a lízis mértéke dóziszfüggő módon csökkent. A p.Q950H mutáns H-faktor csökkentette ugyan a lízis mértékét, de a vad típusnál szignifikánsan kisebb mértékben. Tranzienst transzfekeciós kísérletekkel is megerősítették, hogy a mutáció funkcionális hatású. A *CFH* c.DNS-ét pcDNA3 vektorba klónozták, majd irányított mutagenézissel bevitték a p.Q950H mutációt, és a konstrukciót humán embrionális vesesejtekbe (HEK 293) transzfekektálták, majd a felülúszóban és a sejtlyázumban mérték a H-faktor koncentrációt. Ebben a kísérletben a mutáns fehérje expressziója valamivel alacsonyabb volt, mint a vad típusé, ami a p.Q950H mutációt hordozó betegek szérumában mért H-faktor szintben a rutin diagnosztikai mérés során nem okozott látható csökkenést (13. táblázat). A rekombináns proteint két további funkcionális esszében tesztelték, a H-faktor komplement-aktiválódást gátló hatását vizsgálták fluid fázisban és a sejt felszínen. A sejt felszíni assay a Jurkat T-sejteken lerakódott MAC mennyiségét határozza meg (C9) normál humán szérum és H-faktor jelenlétében. Ebben a tesztben a p.Q950H hatására lerakódott C9 mennyisége a vad típustól nem tért el, ahogy a fluid fázisban mérhető I-faktor kofaktor aktivitás is a vad típusal megegyező volt. Ennek oka lehet, hogy a hemolitikus teszt sokkal érzékenyebb, mivel a sejt esszében a komplement a sejthez kötött antitesteken keresztül a klasszikus úton is aktiválódhat, míg a hemolitikus teszt eredménye csak az alternatív út aktivációjára utal. Összességében megállapítható, hogy a p.Q950H mutációnak szerepe van a betegség kialakulásában, amit az is megerősít, hogy doktori munkám lezárását követően további egy aHUS betegben is megfigyeltük jelenlétét.

Összesen 13 mutációt azonosítottunk a H-faktor génjében, ebből 11 mutáció vizsgálatára volt alkalmas mintánk egyik vagy mindkét funkcionális teszt elvégzéséhez.

Két mutációról az alkalmazott tesztek alapján nem kaptunk funkcionális adatokat (nem okozott hemolízist, egyelő mértékű fehérjeszint a két kromozómáról). Eredményeink alapján összesen öt mutációról feltételezhető, hogy az alternatív út regulációjának csökkenését okozza, 4 mutációról pedig feltételezhető, hogy hatására nem termelődik, vagy minimális mennyiségű fehérje termelődik a mutációt hordozó kromozómáról (21. táblázat).

A végzett funkcionális vizsgálatok megerősítik annak fontosságát, hogy a betegekben a genetikai adatokat ne csak mutáció szinten értékeljük, hanem a fehérjére és az egész komplementrendszerre gyakorolt hatását vizsgáljuk, melynek segítségével közelebb kerülhetünk annak megismeréséhez, hogy egy variáció milyen módon játszik szerepet az aHUS patogenezisében. A Hakobyan és munkatársai által kifejlesztett allélspecifikus ELISA (135) korlátja, hogy csak az Y402H polimorfizmusra heterozigótákban alkalmazható, így nem tudtunk minden mutációt tesztelni, ehhez további mutációhordozó családtagok bevonása lenne szükséges. A módszert a H-faktor expresszió változások gyors kimutatására fejlesztették ki, a betegek előszűrése már a szekvenálás előtt utalhat egy jelenlévő H-faktor mutációra. A szekvenálással azonosított mutációk funkcionális vizsgálata az allélspecifikus ELISA egy új alkalmazása, mely adaptálásával és házi optimalizálásával lehetővé vált a vizsgált személyek egyes alléljairól szekretálódó fehérjék mennyiségi mérése.

#### **6.4. A H3 haplotípus kapcsolata a H-faktor fehérjeszinttel**

A H-faktorról folytatott kutatások során több olyan polimorfizmust írtak le a fehérje különböző doménjeiben (rs3753394, rs3753396, rs1065489), melyeket összefüggésbe hoztak az aHUS kialakulásával (95, 103). Napjainkban a gyakran csak kis hatású SNP-k funkciójának elemzését egyre inkább felváltja a polimorf lókuszok genetikailag kapcsolt allél-kombinációinak, azaz haplotípusainak vizsgálata (41). A H3 haplotípus hordozása bizonyítottan hajlamosít aHUS kialakulására (95, 96), az azonban, hogy milyen módon járul hozzá az aHUS patogeneziséhez, pontosan nem volt ismert. A kofaktor-aktivitásért felelős régióban található p.V62I polimorfizmus funkcionális vizsgálata során kimutatták, hogy a p.62V-t tartalmazó H-faktor kofaktor funkciója kissé csökkent a p.62I-t tartalmazó H-faktorhoz képest (180, 181). A valint tartalmazó allél többek között a H3

haplotípusnak is része, míg a nagyobb kofaktor aktivitást mutató, izoleucint tartalmazó allél a H2 „védő” haplotípus része.

A beállított allélspecifikus ELISA módszerrel megvizsgáltuk, hogy a H3 haplotípus jelenléte mutat-e kapcsolatot a kifejeződő és szérumban mérhető H-faktor mennyiségével. A H3 haplotípust hordozó személyek és a nem H3 haplotípus hordozók összehasonlításával a két csoport között szignifikáns eltérést találtunk. Eredményeink alapján a H3 haplotípust hordozó kromoszómáról mérhető H-faktor átlagosan 13,56% -kal, azaz a normál tartományban (250-880 mg/L) 33,8-119,3 mg/L-rel alacsonyabb, mint a nem H3 kromoszómákról mérhető H-faktor fehérjeszint. Feltételezésünk szerint tehát a H3 haplotípus tehát önmagában is befolyásolhatja a H-faktor termelődésének szintjét.

### 6.5. A komplement diszreguláció szerepének vizsgálata pHUS-ban

A pneumococcus epitelsejtekhez való kötődésének fő meghatározója a neuraminidáz (191), melynek termelésére minden *S. pneumoniae* törzs képes (192). A T-antigén egy terminális szialavcsoportok által elfedett diszacharid (193), melyről nemrégiben bizonyították, hogy a *S. pneumoniae* infekcióban a neuraminidáz-aktivitás hatására történik meg expozíciója (194). Azonban *Huang és munkatársai* kimutatták, hogy a T-expozíció *S. pneumoniae* fertőzésben nem specifikus a pHUS-ra (22). Ebben a tanulmányban a T-expozíció a pHUS betegek 100%-ában jelen volt, de jelen volt a pneumococcus fertőzéshez kapcsolódó anémiás betegek 67%-ában, és az IPD betegek 43%-ában is. Mindezek arra utalnak, hogy a neuraminidáz aktivitás szükséges, de nem elégséges a HUS kialakulásához, és egyelőre azonosítatlan tényezők is szerepet játszanak a pHUS patogenezisében. Azt feltételeztük, hogy a komplement diszreguláció hozzájárulhat a pHUS kialakulásához, ezért célunk volt a pHUS betegek részletes komplementprofiljának vizsgálata és genetikai analízise.

A betegek komplementprofiljának vizsgálata azt mutatta, hogy akut fázisban a klasszikus valamint az alternatív út aktivitása is csökkent, ami súlyos komplement-aktivációra és konzumpcióra utal, amit az alacsony CH50, C3, C4 és AP aktivitás jelez. Remisszióban a legtöbb eltérés helyreállt. Betegeinkben az ADAMTS13 aktivitás átmeneti csökkenése volt megfigyelhető, amit a pHUS akut fázisában korábban is leírtak, ez a mikroangiopátiás folyamatokat jelzi (195). A pHUS akut fázisában korábban is megfigyeltek alacsony C3 és C4 szinteket (196). A patológiás komplementprofilhoz a

súlyos IPD fertőzés és következtében kialakuló szeptikémia vagy bakterémia is hozzájárulhatott. Az alternatív út aktivációját és konzumpcióját az akut pneumococcus fertőzés és tüdőgyulladás alatt már korábban is megfigyelték (197, 198), valamint ismert, hogy az alternatív út aktiválódása sokkal meghatározóbb a súlyos betegekben, mint a kevésbé súlyos pneumococcus fertőzöttekben (199).

A *S. pneumoniae* fertőzés következtében kialakuló T-antigén expozíció többféleképpen fokozhatja a komplement-aktivációt és a konzumpciót. Az anti-T IgM antitestek köthetnek a vörösvértestek, epitélsejtek és endotélsejtek T-antigént expresszáló struktúráihoz, ami a klasszikus út aktiválását és konzumpcióját eredményezheti. Továbbá, a neuraminidáz aktivitás következtében a terminális szialsav elvesztése az alternatív út aktiválásához vezethet, mivel az alternatív út fő szolubilis regulátora, a H-faktor a szialsavhoz kötve (200) kofaktorként működik a C3b I-faktor-mediált hasításában. Feltételezésünk szerint tehát, a *S. pneumoniae* fertőzés az elsődleges kiváltó ok, amit később a terminális szialsav elvesztése követ, ami a komplementregulátorok genetikai variációival együtt komplement diszregulációhoz és a pHUS kialakulásához vezethet.

A genetikai vizsgálatok során három mutációt találtunk betegeinkben a vizsgált komplementgénekből. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy a pHUS kialakulását a betegek egy részénél a neuraminidáz aktivitáson túl súlyos komplement diszreguláció és konzumpció kíséri, amelyek genetikai variációk talaján alakulhatnak ki, és a betegség kialakulásához is hozzájárulhatnak. A H-faktorban egy nonszensz variációt azonosítottunk (p.R1149X), ami nagy valószínűséggel trunkált fehérjét eredményez. Az I-faktorban egy misszensz mutációt találtunk (p. P50A), amit korábban azonosítottak aHUS betegekben, de nem találták meg egészségesekben, valamint *in vitro* vizsgálat is kimutatta, hogy a mutáció csökkent I-faktor szintet eredményez (163). A trombomodulinban azonosított variáció (p.T44I) nem található meg adatbázisokban és egészséges személyekben, aHUS betegekben sem ismert, így funkcionális szerepe nem tanulmányozott. A négy online predikciós programból három káros hatásúnak prediktálta. A variáció a lektinszerű doménben helyezkedik el, közelében két aHUS-ban ismert mutáció is van (p.A43T és p.D53G) amelyekről *in vitro* kimutatták, hogy a sejt felszínen az I-faktor C3b inaktiválásában csökkent aktivitást okoznak (123). Feltételezhető, hogy a p.T44I mutáció hatása hasonló lehet, de ennek igazolásához funkcionális vizsgálatok

szükségesek, melyek Marina Noris kutatócsoportjával (Bergamo, Olaszország) kollaborációs munka keretében folyamatban vannak.

Ha a komplement prediszpozíciónak szignifikanciája van a betegség kialakulásában, eredményeink felvetik azt a kérdést, hogy pHUS-ban a komplementmediált atípusos HUS-hoz hasonlóan fennáll-e a veszély a betegség újabb megjelenésére. Az első epizód mortalitása igen magas (10%), CKD és ESRD kialakulása a betegek további 20%-át érinti, azonban az eddig publikált követéses vizsgálatok rekurrenciáról nem számoltak be (20, 201-204). Ahhoz azonban, hogy a rekurrencia veszélyét meg tudjuk becsülni, hosszútávú követéses vizsgálatok és az adatok csoportos elemzése lenne szükséges. (Relapszusban lévő betegeinket 2-4 éve követjük.) Fontos megjegyezni, hogy mindegyik beteg részesült pneumococcus-elleni védőoltásban. A konjugált vakcina bevezetése drámaian csökkentette a vakcinában lévő törzsekhez kapcsolódó IPD előfordulását, de a vakcinával le nem fedett törzsek megjelenésének növekedését is megfigyelték a pHUS betegekben (205). (Az elmúlt években a vakcinát továbbfejlesztették, a korábbi 13 helyett 23 szerotípust tartalmaz.) Arról, hogy a bemutatott öt esetet milyen szerotípusok okozták, nincsenek adataink.

Ismereteink szerint első alkalommal végeztük el a pHUS betegek komplementprofiljának részletes vizsgálatát, valamint komplementregulátorok és komplementfehérjék génjeinek vizsgálatát. Eredményeink arra utalnak, hogy az érintett betegek egy részében hasonló genetikai variációk fordulnak elő, mint aHUS-ban, és ezek hozzájárulnak a pHUS kialakulásához IPD mellett. A C4 szint jellemző csökkenése a pneumococcus fertőzés akut fázisában indikatív lehet a T-expozícióra és az IPD-ből kialakuló HUS-ra. Hogy a megfigyelt komplementeltérések felhasználhatók-e diagnosztikai, prognosztikai vagy terápiás célokra IPD betegekben vagy pHUS-ban, további vizsgálatokat igényel, azonban a komplementprofil gyors vizsgálata mindenképp javasolt az összes TMA formában, beleértve a pHUS-t is (178).



## 7. Következtetések

A dolgozat fő megállapításai a következők:

1. Megfigyeléseink alapján a két év alatti csecsemők az aHUS betegek egy speciális csoportját alkotják, akikben a betegség gyorsan progrediál, kezelésük plazmaferézissel nagyon nehezen oldható meg, és a mortalitási ráta magas. A legújabb gyakorlatot támogatva az eculizumabot első vonalbeli terápiaként tartjuk megfelelő kezelésnek csecsemőknél. Vizsgálataink megerősítik, hogy a részletes komplementvizsgálat már az epizód megjelenésekor segíthet a pontos etiológia tisztázásában és a korai terápiás döntésekben. A remissziós minták komplementvizsgálata utalhat a háttérben jelenlévő genetikai rizikóra.
2. A beállított szekvenálási módszereknek köszönhetően a bemutatott betegek csaknem 80%-ában sikerült azonosítani a betegséggel kapcsolatba hozható genetikai variációkat. A családtagok genetikai elemzése alapján megfigyeltük, hogy sok esetben a mutáció(k) mellett rizikó haplotípus(oka)t is hordozó személyben alakul ki a betegség. Ez a megfigyelés magyarázat lehet a legtöbb ismert mutáció alacsony a penetranciájára, valamint megerősíti a komplex genetikai analízis szükségességét minden aHUS betegben és családtagjaikban, hogy képet kapjunk arról, egy mutáció mennyiben járul hozzá a betegség kialakulásához az adott betegben.
3. Vizsgálataink alapján H-faktor hemolitikus teszt és az allélspecifikus ELISA segíthetik a szekvenálással azonosított új variációk patogénitásának megítélését, a H-faktor mennyiségi és minőségi mutatóinak meghatározását. Az allélspecifikus ELISA-t elsőként alkalmaztuk mutációk funkcionális vizsgálatára, eredményeink alapján a módszer alkalmas a vizsgált személyek egyes alléljairól szekretálódó fehérjék mennyiségi mérésére. Összesen 13 mutációt azonosítottunk a H-faktor génjében, ebből 11 mutáció vizsgálatára volt alkalmas mintánk egyik vagy mindkét funkcionális teszt elvégzéséhez. Két mutációról az alkalmazott tesztek alapján nem kaptunk funkcionális adatokat. Eredményeink alapján összesen öt mutációról feltételezhető, hogy az alternatív út regulációjának csökkenését okozza, 4 mutációról pedig feltételezhető, hogy

hatására nem termelődik, vagy minimális mennyiségű fehérje termelődik a mutációt hordozó kromoszómáról. Eredményeink megerősítik annak fontosságát, hogy a betegekben a genetikai adatokat ne csak mutáció szinten értékeljük, hanem a fehérjére és az egész komplementrendszerre gyakorolt hatását vizsgáljuk.

4. Az allélspecifikus ELISA módszerrel vizsgálva kimutattuk, hogy a H3 haplotípust hordozó kromoszómáról mérhető H-faktor átlagosan 13,56% -kal, azaz a normál tartományban kb. 33,8-119,3 mg/L-rel alacsonyabb, mint a nem H3 kromoszómákról mérhető H-faktor fehérjeszint. Feltételezésünk szerint tehát a H3 haplotípus tehát önmagában is befolyásolhatja a H-faktor termelődésének szintjét.
  
5. Elsőként végeztük el a pHUS betegek komplementprofiljának részletes vizsgálatát, valamint komplementregulátorok és komplementfehérjék génjeinek vizsgálatát. Eredményeink megerősítették azt a feltételezést, hogy a neuraminidáz aktivitáson túl a komplement diszreguláció és konzumpció is hozzájárulhat a pHUS kialakulásához, amelyek genetikai variációk talaján alakulhatnak ki. Feltételezésünk szerint a *S. pneumoniae* fertőzés az elsődleges kiváltó ok, amit később a terminális szialsav elvesztése követ, ami a genetikai variációkkal együtt a komplement diszregulációhoz és a pHUS kialakulásához vezet.

## 8. Összefoglalás

Az atípusos hemolitikus urémiás szindróma egy ritka betegség, melynek hátterében a komplement alternatív útjának diszregulációja, és különböző komplementgéneket érintő mutációk állnak. A magyarországi betegek nagy részében nem ismert a betegséget okozó pontos genetikai háttér. Célul tűztük ki ezen betegek klinikai jellemzőinek és laboratóriumi paramétereinek elemzését és genetikai rizikójuk feltárását. Ehhez DNS szekvenálási módszereket állítottunk be, mellyel vizsgálni tudtuk a *CFH*, *CFI*, *CD46*, *C3*, *CFB* és *THBD* gének teljes kódoló régióját. Ezután vizsgáltuk az azonosított H-faktor mutációknak a fehérje mennyiségére és funkciójára gyakorolt hatását, valamint a H-faktor H3 rizikó haplotípusnak a fehérje mennyiségére gyakorolt hatását. Végül részletes komplementprofil- és genetikai analízist végeztünk pHUS betegeknél.

Megfigyeléseink alapján a két év alatti csecsemők az aHUS betegek egy speciális csoportját alkotják, rossz prognózissal és magas mortalitási rátával. Eredményeink támogatják a legújabb kezelési gyakorlatot, az eculizumab alkalmazását első vonalbeli terápiaként csecsemőknél, és indokolják az azonnali komplementvizsgálatot már az epizód megjelenésekor. A beállított szekvenálási módszereknek köszönhetően összesen 27, a betegséggel kapcsolatba hozható genetikai variációt sikerült azonosítani, ebből 12 variációt elsőként írtunk le. A családtagok genetikai elemzése során megfigyeltük, hogy sok esetben a többszörös genetikai rizikóval rendelkező személyekben alakul ki a betegség, ami magyarázat lehet a mutációk alacsony a penetranciájára.

A H-faktor szintjének allélspecifikus mérésével és vörösvértest-lízis esszével vizsgáltuk a szekvenálással azonosított variációk funkcióját. Eredményeink alapján 5 vizsgált H-faktor mutáció a reguláció csökkenését okozhatja, míg 4 vizsgált mutáció a fehérjeexpresszióban okozhat csökkenést. A H-faktor H3 rizikó haplotípusával végzett vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a haplotípust hordozó kromoszómáról kevesebb H-faktor termelődik, mint a többi haplotípusról, ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a H3 haplotípus önmagában is befolyásolhatja a H-faktor termelődésének szintjét.

A pHUS betegeknél súlyos komplementaktivációt és konzumpciót figyeltünk meg, továbbá három, feltehetően betegség-okozó mutációt találtunk, ami arra utal, hogy egyes betegeknél a neuraminidáz-aktivitáson túl a pHUS patogeneziséhez is hozzájárulhatnak a genetikai variációk talaján kialakuló komplement-eltérések.

## 9. Summary

Atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) is a rare disorder caused by dysregulation of the complement alternative pathway and it is associated with mutations in genes of complement components and regulators. In the majority of Hungarian patients the disease-causing genetic background has not been characterized. We aimed to investigate the clinical features and laboratory parameters of these patients, and to reveal the genetic risk factors. We optimized DNA sequencing methods to screen for mutations in *CFH*, *CFI*, *CD46*, *C3*, *CFB* and *THBD* genes. Then we studied the effect of the identified *CFH* mutations on the protein expression and function, as well as the effect of the *CFH* H3 risk haplotype on protein level. Finally, we carried out detailed complement and genetic analysis of patients with pneumococcus-associated HUS (pHUS).

Based on our observations, we assume that infants under 2 years constitute a specific subgroup of aHUS patients with rapid disease progression and high mortality. Our results support the latest therapeutic management practice, the use of eculizumab as first-line therapy in pediatric cases. Furthermore, we verified the importance of the urgent investigation of the alternative complement pathway at the beginning of the episodes. Due to the optimized sequencing methods, we identified 27 variations associated with the disease of which 12 have been described as novel variations. Based on the genetic analysis of family members, we observed that in many cases the disease develops in individuals with multiple genetic risk factors, which may explain the low penetrance of the mutations.

The functional effect of variations identified by sequencing was investigated by allele-specific measurement of factor H protein level and by red blood cell lysis assay. Based on our results, 5 investigated mutations could cause the decreased regulatory activity of factor H, while 4 mutations could cause decreased protein expression of factor H. Investigation of the *CFH* H3 risk haplotype revealed that lower protein level could be measured from the chromosomes containing the H3 risk haplotype compared to the other *CFH* haplotypes. Based on these results we assume that the H3 haplotype in itself may affect the level of factor H protein production. In patients with pHUS severe complement activation and consumption were observed, furthermore three, presumably disease causing mutations were detected, suggesting that the complement abnormalities and the underlying genetic variations of complement genes may contribute to the development of pHUS in a proportion of the affected patients.

**10. Irodalomjegyzék**

1. Noris M, Remuzzi G. (2005) Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 16:1035-1050.
2. Schieppati A, Henter JI, Daina E, Aperia A. (2008) Why rare diseases are an important medical and social issue. *Lancet*, 371:2039-2041.
3. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006: 291-305.
4. Chiang CK, Inagi R. (2010) Glomerular diseases: genetic causes and future therapeutics. *Nat Rev Nephrol*, 6:539-554.
5. George B, Verma R, Soofi AA, Garg P, Zhang J, Park TJ, Giardino L, Ryzhova L, Johnstone DB, Wong H, Nihalani D, Salant DJ, Hanks SK, Curran T, Rastaldi MP, Holzman LB. (2012) Crk1/2-dependent signaling is necessary for podocyte foot process spreading in mouse models of glomerular disease. *J Clin Invest*, 122:674-692.
6. Ruggenenti P, Noris M, Remuzzi G. (2001) Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int*, 60:831-846.
7. Benz K, Amann K. (2010) Thrombotic microangiopathy: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 19:242-247.
8. Noris M, Remuzzi G. (2009) Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 361:1676-1687.
9. George JN. (2006) Clinical practice. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 354:1927-1935.
10. Besbas N, Karpman D, Landau D, Loirat C, Proesmans W, Remuzzi G, Rizzoni G, Taylor CM, Van De Kar N, Zimmerhackl LB. (2006) A classification of hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura and related disorders. *Kidney Int*, 70:423-431.
11. Le Quintrec M, Lionet A, Kamar N, Karras A, Barbier S, Buchler M, Fakhouri F, Provost F, Fridman WH, Thervet E, Legendre C, Zuber J, Fremeaux-Bacchi V. (2008) Complement mutation-associated de novo thrombotic microangiopathy following kidney transplantation. *Am J Transplant*, 8:1694-1701.

12. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. (1985) The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 151:775-782.
13. Bhimma R, Rollins NC, Coovadia HM, Adhikari M. (1997) Post-dysenteric hemolytic uremic syndrome in children during an epidemic of *Shigella* dysentery in Kwazulu/Natal. *Pediatr Nephrol*, 11:560-564.
14. Butler T, Islam MR, Azad MA, Jones PK. (1987) Risk factors for development of hemolytic uremic syndrome during shigellosis. *J Pediatr*, 110:894-897.
15. Tschape H, Prager R, Streckel W, Fruth A, Tietze E, Bohme G. (1995) Verotoxinogenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: green butter as the infection source. *Epidemiol Infect*, 114:441-450.
16. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 365:1073-1086.
17. Frank C, Werber D, Cramer JP, Askar M, Faber M, An Der Heiden M, Bernard H, Fruth A, Prager R, Spode A, Wadl M, Zoufaly A, Jordan S, Kemper MJ, Follin P, Muller L, King LA, Rosner B, Buchholz U, Stark K, Krause G. (2011) Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*, 365:1771-1780.
18. Donkor ES. (2013) Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol*, 3:7.
19. Brandt J, Wong C, Mihm S, Roberts J, Smith J, Brewer E, Thiagarajan R, Warady B. (2002) Invasive pneumococcal disease and hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics*, 110:371-376.
20. Copelovitch L, Kaplan BS. (2008) *Streptococcus pneumoniae*-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 23:1951-1956.
21. Spinale JM, Ruebner RL, Kaplan BS, Copelovitch L. (2013) Update on *Streptococcus pneumoniae* associated hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Pediatr*, 25:203-208.
22. Huang DT, Chi H, Lee HC, Chiu NC, Huang FY. (2006) T-antigen activation for prediction of pneumococcus-induced hemolytic uremic syndrome and hemolytic anemia. *Pediatr Infect Dis J*, 25:608-610.

23. Klein PJ, Bulla M, Newman RA, Muller P, Uhlenbruck G, Schaefer HE, Kruger G, Fisher R. (1977) Thomsen-Friedenreich antigen in haemolytic-uraemic syndrome. *Lancet*, 2:1024-1025.
24. Allen U, Licht C. (2011) Pandemic H1N1 influenza A infection and (atypical) HUS--more than just another trigger? *Pediatr Nephrol*, 26:3-5.
25. Tobe TJ, Franssen CF, Zijlstra JG, De Jong PE, Stegeman CA. (1999) Hemolytic uremic syndrome due to *Campylobacter jejuni* bacteremia after a dog bite. *Am J Kidney Dis*, 33:e5.
26. Mulder AH, Gerlag PG, Verhoef LH, Van Den Wall Bake AW. (2001) Hemolytic uremic syndrome after *Campylobacter jejuni* (DF-2) septicemia. *Clin Nephrol*, 55:167-170.
27. McGraw ME, Lendon M, Stevens RF, Postlethwaite RJ, Taylor CM. (1989) Haemolytic uraemic syndrome and the Thomsen Friedenreich antigen. *Pediatr Nephrol*, 3:135-139.
28. Pai R, Moore MR, Pilishvili T, Gertz RE, Whitney CG, Beall B, Active Bacterial Core Surveillance T. (2005) Postvaccine genetic structure of *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A from children in the United States. *J Infect Dis*, 192:1988-1995.
29. Caprioli J, Peng L, Remuzzi G. (2005) The hemolytic uremic syndromes. *Curr Opin Crit Care*, 11:487-492.
30. Loirat C, Fremeaux-Bacchi V. (2011) Atypical hemolytic uremic syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 6:60.
31. Zipfel PF, Wolf G, John U, Kentouche K, Skerka C. (2011) Novel developments in thrombotic microangiopathies: is there a common link between hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura? *Pediatr Nephrol*, 26:1947-1956.
32. Thompson RA, Winterborn MH. (1981) Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol*, 46:110-119.
33. Warwicker P, Goodship TH, Donne RL, Pirson Y, Nicholls A, Ward RM, Turnpenny P, Goodship JA. (1998) Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*, 53:836-844.
34. Caprioli J, Bettinaglio P, Zipfel PF, Amadei B, Daina E, Gamba S, Skerka C, Marziliano N, Remuzzi G, Noris M. (2001) The molecular basis of familial

- hemolytic uremic syndrome: mutation analysis of factor H gene reveals a hot spot in short consensus repeat 20. *J Am Soc Nephrol*, 12:297-307.
35. Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Blouin J, Vigneau C, Kuypers D, Boudailliez B, Loirat C, Rondeau E, Fridman WH. (2004) Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet*, 41:e84.
  36. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, Mele C, Bresin E, Cassis L, Gamba S, Porrati F, Bucchioni S, Monteferrante G, Fang CJ, Liszewski MK, Kavanagh D, Atkinson JP, Remuzzi G. (2006) Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*, 108:1267-1279.
  37. Zipfel PF, Skerka C. (2006) Complement dysfunction in hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, 18:548-555.
  38. Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, Macher MA, Blouin J, Nivet H, Weiss L, Fridman WH, Fremeaux-Bacchi V. (2005) Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 16:555-563.
  39. Jozsi M, Strobel S, Dahse HM, Liu WS, Hoyer PF, Oppermann M, Skerka C, Zipfel PF. (2007) Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 110:1516-1518.
  40. Jozsi M, Licht C, Strobel S, Zipfel SL, Richter H, Heinen S, Zipfel PF, Skerka C. (2008) Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood*, 111:1512-1514.
  41. De Cordoba SR, De Jorge EG. (2008) Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol*, 151:1-13.
  42. Esparza-Gordillo J, Goicoechea De Jorge E, Buil A, Carreras Berges L, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P, Rodriguez De Cordoba S. (2005) Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Hum Mol Genet*, 14:703-712.
  43. Venables JP, Strain L, Routledge D, Bourn D, Powell HM, Warwicker P, Diaz-Torres ML, Sampson A, Mead P, Webb M, Pirson Y, Jackson MS, Hughes A, Wood



- KM, Goodship JA, Goodship TH. (2006) Atypical haemolytic uraemic syndrome associated with a hybrid complement gene. *PLoS Med*, 3:e431.
44. Dragon-Durey MA, Blanc C, Marliot F, Loirat C, Blouin J, Sautes-Fridman C, Fridman WH, Fremeaux-Bacchi V. (2009) The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet*, 46:447-450.
  45. Eyster SJ, Meyer NC, Zhang Y, Xiao X, Nester CM, Smith RJ. (2013) A novel hybrid CFHR1/CFH gene causes atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 28:2221-2225.
  46. Kavanagh D, Goodship TH, Richards A. (2013) Atypical hemolytic uremic syndrome. *Semin Nephrol*, 33:508-530.
  47. Kavanagh D, Goodship TH, Richards A. (2006) Atypical haemolytic uraemic syndrome. *Br Med Bull*, 77-78:5-22.
  48. Noris M, Caprioli J, Bresin E, Mossali C, Pianetti G, Gamba S, Daina E, Fenili C, Castelletti F, Sorosina A, Piras R, Donadelli R, Maranta R, Van Der Meer I, Conway EM, Zipfel PF, Goodship TH, Remuzzi G. (2010) Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol*, 5:1844-1859.
  49. Rees L. (2013) Atypical HUS: time to take stock of current guidelines and outcome measures? *Pediatr Nephrol*, 28:675-677.
  50. Ariceta G, Besbas N, Johnson S, Karpman D, Landau D, Licht C, Loirat C, Pecoraro C, Taylor CM, Van De Kar N, Vandewalle J, Zimmerhackl LB, European Paediatric Study Group For HUS. (2009) Guideline for the investigation and initial therapy of diarrhea-negative hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 24:687-696.
  51. Saland JM, Ruggenenti P, Remuzzi G. (2009) Liver-kidney transplantation to cure atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 20:940-949.
  52. Legendre CM, Licht C, Muus P, Greenbaum LA, Babu S, Bedrosian C, Bingham C, Cohen DJ, Delmas Y, Douglas K, Eitner F, Feldkamp T, Fouque D, Furman RR, Gaber O, Herthelius M, Hourmant M, Karpman D, Lebranchu Y, Mariat C, Menne J, Moulin B, Nurnberger J, Ogawa M, Remuzzi G, Richard T, Sberro-Soussan R, Severino B, Sheerin NS, Trivelli A, Zimmerhackl LB, Goodship T, Loirat C. (2013)

Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 368:2169-2181.

53. Zuber J, Le Quintrec M, Krid S, Bertoye C, Gueutin V, Lahoche A, Heyne N, Ardissino G, Chatelet V, Noel LH, Hourmant M, Niaudet P, Fremeaux-Bacchi V, Rondeau E, Legendre C, Loirat C. (2012) Eculizumab for atypical hemolytic uremic syndrome recurrence in renal transplantation. *Am J Transplant*, 12:3337-3354.
54. Fakhouri F, Delmas Y, Provot F, Barbet C, Karras A, Makdassi R, Courivaud C, Rifard K, Servais A, Allard C, Besson V, Cousin M, Chatelet V, Goujon JM, Coindre JP, Laurent G, Loirat C, Fremeaux-Bacchi V. (2014) Insights from the use in clinical practice of eculizumab in adult patients with atypical hemolytic uremic syndrome affecting the native kidneys: an analysis of 19 cases. *Am J Kidney Dis*, 63:40-48.
55. Campistol JM, Arias M, Ariceta G, Blasco M, Espinosa M, Grinyo JM, Praga M, Torra R, Vilalta R, Rodriguez De Cordoba S. (2013) An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: diagnosis and treatment. A consensus document. *Nefrologia*, 33:27-45.
56. Licht C, Greenbaum LA, Muus P, Babu S, Bedrosian CL, Cohen DJ, Delmas Y, Douglas K, Furman RR, Gaber OA, Goodship T, Herthelius M, Hourmant M, Legendre CM, Remuzzi G, Sheerin N, Trivelli A, Loirat C. (2015) Efficacy and safety of eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome from 2-year extensions of phase 2 studies. *Kidney Int*, 87:1061-1073.
57. Kremer Hovinga JA, Lammle B. (2012) Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012:610-616.
58. Geraghty MT, Perlman EJ, Martin LS, Hayflick SJ, Casella JF, Rosenblatt DS, Valle D. (1992) Cobalamin C defect associated with hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr*, 120:934-937.
59. Lemaire M, Fremeaux-Bacchi V, Schaefer F, Choi M, Tang WH, Le Quintrec M, Fakhouri F, Taque S, Nobili F, Martinez F, Ji W, Overton JD, Mane SM, Nurnberg G, Altmuller J, Thiele H, Morin D, Deschenes G, Baudouin V, Llanas B, Collard L, Majid MA, Simkova E, Nurnberg P, Rioux-Leclerc N, Moeckel GW, Gubler MC,

- Hwa J, Loirat C, Lifton RP. (2013) Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nat Genet*, 45:531-536.
60. Bruneau S, Neel M, Roumenina LT, Frimat M, Laurent L, Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F. (2015) Loss of DGKEepsilon induces endothelial cell activation and death independently of complement activation. *Blood*, 125:1038-1046.
  61. Sanchez Chinchilla D, Pinto S, Hoppe B, Adragna M, Lopez L, Justa Roldan ML, Pena A, Lopez Trascasa M, Sanchez-Corral P, Rodriguez De Cordoba S. (2014) Complement mutations in diacylglycerol kinase-epsilon-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9:1611-1619.
  62. Gottschall JL, Elliot W, Lianos E, Mcfarland JG, Wolfmeyer K, Aster RH. (1991) Quinine-induced immune thrombocytopenia associated with hemolytic uremic syndrome: a new clinical entity. *Blood*, 77:306-310.
  63. Knowler MT, Bowton DL, Owen J, Dunagan DP. (2003) Quinine-induced disseminated intravascular coagulation: case report and review of the literature. *Intensive Care Med*, 29:1007-1011.
  64. Badesha PS, Saklayen MG. (1996) Hemolytic uremic syndrome as a presenting form of HIV infection. *Nephron*, 72:472-475.
  65. Lesesne JB, Rothschild N, Erickson B, Korec S, Sisk R, Keller J, Arbus M, Woolley PV, Chiazzese L, Schein PS, Neefe JR. (1989) Cancer-associated hemolytic-uremic syndrome: analysis of 85 cases from a national registry. *J Clin Oncol*, 7:781-789.
  66. Zarifian A, Meleg-Smith S, O'donovan R, Tesi RJ, Batuman V. (1999) Cyclosporine-associated thrombotic microangiopathy in renal allografts. *Kidney Int*, 55:2457-2466.
  67. Lattuada A, Rossi E, Calzarossa C, Candolfi R, Mannucci PM. (2003) Mild to moderate reduction of a von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in pregnant women with HELLP microangiopathic syndrome. *Haematologica*, 88:1029-1034.
  68. Carroll MV, Sim RB. (2011) Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 63:965-975.
  69. Serruto D, Rappuoli R, Scarselli M, Gros P, Van Strijp JA. (2010) Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Nat Rev Microbiol*, 8:393-399.

70. Rus H, Cudrici C, Niculescu F. (2005) The role of the complement system in innate immunity. *Immunol Res*, 33:103-112.
71. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. (1981) Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med*, 154:856-867.
72. Pangburn MK, Morrison DC, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. (1980) Activation of the alternative complement pathway: recognition of surface structures on activators by bound C3b. *J Immunol*, 124:977-982.
73. Sahu A, Kozel TR, Pangburn MK. (1994) Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem J*, 302:429-436.
74. Muller-Eberhard HJ, Gotze O. (1972) C3 proactivator convertase and its mode of action. *J Exp Med*, 135:1003-1008.
75. Fearon DT, Austen KF. (1975) Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med*, 142:856-863.
76. Fearon DT. (1978) Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75:1971-1975.
77. Meri S, Pangburn MK. (1990) Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:3982-3986.
78. Fearon DT, Austen KF. (1977) Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:1683-1687.
79. Pangburn MK. (1989) Analysis of recognition in the alternative pathway of complement. Effect of polysaccharide size. *J Immunol*, 142:2766-2770.
80. Wagenaar-Bos IG, Hack CE. (2006) Structure and function of C1-inhibitor. *Immunol Allergy Clin North Am*, 26:615-632.
81. Cooper NR. (1975) Isolation and analysis of the mechanism of action of an inactivator of C4b in normal human serum. *J Exp Med*, 141:890-903.

82. Whaley K, Thompson RA. (1978) Requirements for beta1H globulin and C3b inactivator in the control of the alternative complement pathway in human serum. *Immunology*, 35:1045-1049.
83. Sugita Y, Nakano Y, Tomita M. (1988) Isolation from human erythrocytes of a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. *J Biochem*, 104:633-637.
84. Bhakdi S, Kaflein R, Halstensen TS, Hugo F, Preissner KT, Mollnes TE. (1988) Complement S-protein (vitronectin) is associated with cytolytic membrane-bound C5b-9 complexes. *Clin Exp Immunol*, 74:459-464.
85. Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID, D'apice AJ. (1988) SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *J Clin Invest*, 81:1858-1864.
86. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med*, 146:257-270.
87. Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. (1976) Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73:3268-3272.
88. Whaley K, Ruddy S. (1976) Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med*, 144:1147-1163.
89. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. (2013) Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol*, 56:170-180.
90. Ripoché J, Day AJ, Harris TJ, Sim RB. (1988) The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem J*, 249:593-602.
91. Sharma AK, Pangburn MK. (1996) Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:10996-11001.
92. Meri S, Pangburn MK. (1994) Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site on factor H. *Biochem Biophys Res Commun*, 198:52-59.

93. Perkins SJ, Nan R, Li K, Khan S. Complement Factor H and Its Ligands: A Multidisciplinary Approach to Interactions and Modeling. In: Roberts GCK (szerk.), *Encyclopedia of biophysics*. Springer-Verlag, Berlin, 2013: 328-336.
94. Noris M, Bresin E, Mele C, Remuzzi G. Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Dolan CR, Fong CT, Smith RJH, Stephens K (szerk.) *GeneReviews®* University of Washington, Seattle, 1993: Internet.
95. Caprioli J, Castelletti F, Bucchioni S, Bettinaglio P, Bresin E, Pianetti G, Gamba S, Brioschi S, Daina E, Remuzzi G, Noris M. (2003) Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum Mol Genet*, 12:3385-3395.
96. Pickering MC, De Jorge EG, Martinez-Barricarte R, Recalde S, Garcia-Layana A, Rose KL, Moss J, Walport MJ, Cook HT, De Cordoba SR, Botto M. (2007) Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *J Exp Med*, 204:1249-1256.
97. Seya T, Hirano A, Matsumoto M, Nomura M, Ueda S. (1999) Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions. *Int J Biochem Cell Biol*, 31:1255-1260.
98. Liszewski MK, Atkinson JP. (1996) Membrane cofactor protein (MCP; CD46). Isoforms differ in protection against the classical pathway of complement. *J Immunol*, 156:4415-4421.
99. Hourcade D, Holers VM, Atkinson JP. (1989) The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol*, 45:381-416.
100. Bora NS, Lublin DM, Kumar BV, Hockett RD, Holers VM, Atkinson JP. (1989) Structural gene for human membrane cofactor protein (MCP) of complement maps to within 100 kb of the 3' end of the C3b/C4b receptor gene. *J Exp Med*, 169:597-602.
101. Richards A, Kathryn Liszewski M, Kavanagh D, Fang CJ, Moulton E, Fremeaux-Bacchi V, Remuzzi G, Noris M, Goodship TH, Atkinson JP. (2007) Implications of the initial mutations in membrane cofactor protein (MCP; CD46) leading to atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*, 44:111-122.

102. Ermini L, Goodship TH, Strain L, Weale ME, Sacks SH, Cordell HJ, Fremeaux-Bacchi V, Sheerin NS. (2012) Common genetic variants in complement genes other than CFH, CD46 and the CFHRs are not associated with aHUS. *Mol Immunol*, 49:640-648.
103. Fremeaux-Bacchi V, Kemp EJ, Goodship JA, Dragon-Durey MA, Strain L, Loirat C, Deng HW, Goodship TH. (2005) The development of atypical haemolytic-uraemic syndrome is influenced by susceptibility factors in factor H and membrane cofactor protein: evidence from two independent cohorts. *J Med Genet*, 42:852-856.
104. Servais A, Noel LH, Roumenina LT, Le Quintrec M, Ngo S, Dragon-Durey MA, Macher MA, Zuber J, Karras A, Provot F, Moulin B, Grunfeld JP, Niaudet P, Lesavre P, Fremeaux-Bacchi V. (2012) Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney Int*, 82:454-464.
105. Roversi P, Johnson S, Caesar JJ, Mclean F, Leath KJ, Tsiftoglou SA, Morgan BP, Harris CL, Sim RB, Lea SM. (2011) Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:12839-12844.
106. Nilsson SC, Karpman D, Vaziri-Sani F, Kristoffersson AC, Salomon R, Provot F, Fremeaux-Bacchi V, Trouw LA, Blom AM. (2007) A mutation in factor I that is associated with atypical hemolytic uremic syndrome does not affect the function of factor I in complement regulation. *Mol Immunol*, 44:1835-1844.
107. Kavanagh D, Richards A, Noris M, Hauhart R, Liszewski MK, Karpman D, Goodship JA, Fremeaux-Bacchi V, Remuzzi G, Goodship TH, Atkinson JP. (2008) Characterization of mutations in complement factor I (CFI) associated with hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*, 45:95-105.
108. Nilsson SC, Kalchishkova N, Trouw LA, Fremeaux-Bacchi V, Villoutreix BO, Blom AM. (2010) Mutations in complement factor I as found in atypical hemolytic uremic syndrome lead to either altered secretion or altered function of factor I. *Eur J Immunol*, 40:172-185.
109. Andoh A, Fujiyama Y, Kimura T, Uchihara H, Sakumoto H, Okabe H, Bamba T. (1997) Molecular characterization of complement components (C3, C4, and factor B) in human saliva. *J Clin Immunol*, 17:404-407.

110. Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, Roos A, Daha MR, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson B, Gros P. (2005) Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*, 437:505-511.
111. Fremeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK, Strain L, Blouin J, Brown AL, Moghal N, Kaplan BS, Weiss RA, Lhotta K, Kapur G, Mattoo T, Nivet H, Wong W, Gie S, Hurault De Ligny B, Fischbach M, Gupta R, Hauhart R, Meunier V, Loirat C, Dragon-Durey MA, Fridman WH, Janssen BJ, Goodship TH, Atkinson JP. (2008) Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 112:4948-4952.
112. Sartz L, Olin AI, Kristoffersson AC, Stahl AL, Johansson ME, Westman K, Fremeaux-Bacchi V, Nilsson-Ekdahl K, Karpman D. (2012) A novel C3 mutation causing increased formation of the C3 convertase in familial atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol*, 188:2030-2037.
113. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, Blouin J, Dimitrov JD, Dragon-Durey MA, Cayla M, Fridman WH, Macher MA, Ribes D, Moulouguet L, Rostaing L, Satchell SC, Mathieson PW, Sautes-Fridman C, Loirat C, Regnier CH, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V. (2009) Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 114:2837-2845.
114. Morgan BP, Gasque P. (1997) Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol*, 107:1-7.
115. Morley BJ, Walport M. *The complement factsbook*. Academic Press, San Diego, CA, 2000: 78-82.
116. Ponnuraj K, Xu Y, Macon K, Moore D, Volanakis JE, Narayana SV. (2004) Structural analysis of engineered Bb fragment of complement factor B: insights into the activation mechanism of the alternative pathway C3-convertase. *Mol Cell*, 14:17-28.
117. Milder FJ, Gomes L, Schouten A, Janssen BJ, Huizinga EG, Romijn RA, Hemrika W, Roos A, Daha MR, Gros P. (2007) Factor B structure provides insights into activation of the central protease of the complement system. *Nat Struct Mol Biol*, 14:224-228.



118. Goicoechea De Jorge E, Harris CL, Esparza-Gordillo J, Carreras L, Arranz EA, Garrido CA, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P, Morgan BP, Rodriguez De Cordoba S. (2007) Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:240-245.
119. Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, Ngo S, Bettoni S, Pashov A, Cayla M, Tabarin F, Jablonski M, Hue C, Smith RJ, Noris M, Halbwachs-Mecarelli L, Donadelli R, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. (2014) Complement factor B mutations in atypical hemolytic uremic syndrome-disease-relevant or benign? *J Am Soc Nephrol*, 25:2053-2065.
120. Conway EM. (2012) Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin Immunopathol*, 34:107-125.
121. Tsiang M, Lentz SR, Sadler JE. (1992) Functional domains of membrane-bound human thrombomodulin. EGF-like domains four to six and the serine/threonine-rich domain are required for cofactor activity. *J Biol Chem*, 267:6164-6170.
122. Fuentes-Prior P, Iwanaga Y, Huber R, Pagila R, Rumennik G, Seto M, Morser J, Light DR, Bode W. (2000) Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex. *Nature*, 404:518-525.
123. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, Del-Favero J, Plaisance S, Claes B, Lambrechts D, Zoja C, Remuzzi G, Conway EM. (2009) Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 361:345-357.
124. Maga TK, Nishimura CJ, Weaver AE, Frees KL, Smith RJ. (2010) Mutations in alternative pathway complement proteins in American patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Hum Mutat*, 31:1445-1460.
125. Noris M, Remuzzi G. (2010) Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation. *Am J Transplant*, 10:1517-1523.
126. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16:1215.
127. Schejbel L, Schmidt IM, Kirchhoff M, Andersen CB, Marquart HV, Zipfel P, Garred P. (2011) Complement factor H deficiency and endocapillary

- glomerulonephritis due to paternal isodisomy and a novel factor H mutation. *Genes Immun*, 12:90-99.
128. Richards A, Buddles MR, Donne RL, Kaplan BS, Kirk E, Venning MC, Tielemans CL, Goodship JA, Goodship TH. (2001) Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition. *Am J Hum Genet*, 68:485-490.
  129. Kavanagh D, Kemp EJ, Mayland E, Winney RJ, Duffield JS, Warwick G, Richards A, Ward R, Goodship JA, Goodship TH. (2005) Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 16:2150-2155.
  130. Fremeaux-Bacchi V, Moulton EA, Kavanagh D, Dragon-Durey MA, Blouin J, Caudy A, Arzouk N, Cleper R, Francois M, Guest G, Pourrat J, Seligman R, Fridman WH, Loirat C, Atkinson JP. (2006) Genetic and functional analyses of membrane cofactor protein (CD46) mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 17:2017-2025.
  131. Richards A, Kemp EJ, Liszewski MK, Goodship JA, Lampe AK, Decorte R, Muslumanoğlu MH, Kavukcu S, Filler G, Pirson Y, Wen LS, Atkinson JP, Goodship TH. (2003) Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:12966-12971.
  132. Reti M, Farkas P, Csuka D, Razso K, Schlammadinger A, Udvardy ML, Madach K, Domjan G, Bereczki C, Reusz GS, Szabo AJ, Prohaszka Z. (2012) Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 10:791-798.
  133. Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2:235-254.
  134. Kobayashi T, Wada H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H. (2007) Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res*, 119:447-452.

135. Hakobyan S, Tortajada A, Harris CL, De Cordoba SR, Morgan BP. (2010) Variant-specific quantification of factor H in plasma identifies null alleles associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*, 78:782-788.
136. Sanchez-Corral P, Gonzalez-Rubio C, Rodriguez De Cordoba S, Lopez-Trascasa M. (2004) Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol*, 41:81-84.
137. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21:263-265.
138. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7:248-249.
139. Ng PC, Henikoff S. (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*, 11:863-874.
140. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*, 7:e46688.
141. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*, 7:575-576.
142. Fakhouri F, Roumenina L, Provot F, Sallee M, Caillard S, Couzi L, Essig M, Ribes D, Dragon-Durey MA, Bridoux F, Rondeau E, Fremeaux-Bacchi V. (2010) Pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome revisited in the era of complement gene mutations. *J Am Soc Nephrol*, 21:859-867.
143. Yu Y, Triebwasser MP, Wong EK, Schramm EC, Thomas B, Reynolds R, Mardis ER, Atkinson JP, Daly M, Raychaudhuri S, Kavanagh D, Seddon JM. (2014) Whole-exome sequencing identifies rare, functional CFH variants in families with macular degeneration. *Hum Mol Genet*, 23:5283-5293.
144. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, Bienaime F, Dragon-Durey MA, Ngo S, Moulin B, Servais A, Provot F, Rostaing L, Burtey S, Niaudet P, Deschenes G, Lebranchu Y, Zuber J, Loirat C. (2013) Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol*, 8:554-562.

145. Janssen Van Doorn K, Dirinck E, Verpooten GA, Couttenye MM. (2013) Complement factor H mutation associated with membranoproliferative glomerulonephritis with transformation to atypical haemolytic uraemic syndrome. *Clin Kidney J*, 6:216-219.
146. Perez-Caballero D, Gonzalez-Rubio C, Gallardo ME, Vera M, Lopez-Trascasa M, Rodriguez De Cordoba S, Sanchez-Corral P. (2001) Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet*, 68:478-484.
147. Heinen S, Sanchez-Corral P, Jackson MS, Strain L, Goodship JA, Kemp EJ, Skerka C, Jokiranta TS, Meyers K, Wagner E, Robitaille P, Esparza-Gordillo J, Rodriguez De Cordoba S, Zipfel PF, Goodship TH. (2006) De novo gene conversion in the RCA gene cluster (1q32) causes mutations in complement factor H associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Hum Mutat*, 27:292-293.
148. Westra D, Volokhina E, Van Der Heijden E, Vos A, Huigen M, Jansen J, Van Kaauwen E, Van Der Velden T, Van De Kar N, Van Den Heuvel L. (2010) Genetic disorders in complement (regulating) genes in patients with atypical haemolytic uraemic syndrome (aHUS). *Nephrol Dial Transplant*, 25:2195-2202.
149. Martinez-Barricarte R, Pianetti G, Gautard R, Misselwitz J, Strain L, Fremeaux-Bacchi V, Skerka C, Zipfel PF, Goodship T, Noris M, Remuzzi G, De Cordoba SR. (2008) The complement factor H R1210C mutation is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 19:639-646.
150. Jozsi M, Heinen S, Hartmann A, Ostrowicz CW, Halbich S, Richter H, Kunert A, Licht C, Saunders RE, Perkins SJ, Zipfel PF, Skerka C. (2006) Factor H and atypical hemolytic uremic syndrome: mutations in the C-terminus cause structural changes and defective recognition functions. *J Am Soc Nephrol*, 17:170-177.
151. Manuelian T, Hellwage J, Meri S, Caprioli J, Noris M, Heinen S, Jozsi M, Neumann HP, Remuzzi G, Zipfel PF. (2003) Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest*, 111:1181-1190.
152. Sanchez-Corral P, Perez-Caballero D, Huarte O, Simckes AM, Goicoechea E, Lopez-Trascasa M, De Cordoba SR. (2002) Structural and functional

- characterization of factor H mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet*, 71:1285-1295.
153. Jalanko H, Peltonen S, Koskinen A, Puntila J, Isoniemi H, Holmberg C, Pinomaki A, Armstrong E, Koivusalo A, Tukiainen E, Makisalo H, Saland J, Remuzzi G, De Cordoba S, Lassila R, Meri S, Jokiranta TS. (2008) Successful liver-kidney transplantation in two children with aHUS caused by a mutation in complement factor H. *Am J Transplant*, 8:216-221.
  154. Neumann HP, Salzmann M, Bohnert-Iwan B, Mannuelian T, Skerka C, Lenk D, Bender BU, Cybulla M, Riegler P, Konigsrainer A, Neyer U, Bock A, Widmer U, Male DA, Franke G, Zipfel PF. (2003) Haemolytic uraemic syndrome and mutations of the factor H gene: a registry-based study of German speaking countries. *J Med Genet*, 40:676-681.
  155. Ponce-Castro IM, Gonzalez-Rubio C, Delgado-Cervino EM, Abarategui-Garrido C, Fontan G, Sanchez-Corral P, Lopez-Trascasa M. (2008) Molecular characterization of Complement Factor I deficiency in two Spanish families. *Mol Immunol*, 45:2764-2771.
  156. Vyse TJ, Morley BJ, Bartok I, Theodoridis EL, Davies KA, Webster AD, Walport MJ. (1996) The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency. *J Clin Invest*, 97:925-933.
  157. Montes T, Tortajada A, Morgan BP, Rodriguez De Cordoba S, Harris CL. (2009) Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:4366-4371.
  158. Bekassy ZD, Kristoffersson AC, Cronqvist M, Roumenina LT, Rybkine T, Vergoz L, Hue C, Fremeaux-Bacchi V, Karpman D. (2013) Eculizumab in an anephric patient with atypical haemolytic uraemic syndrome and advanced vascular lesions. *Nephrol Dial Transplant*, 28:2899-2907.
  159. Fan X, Yoshida Y, Honda S, Matsumoto M, Sawada Y, Hattori M, Hisanaga S, Hiwa R, Nakamura F, Tomomori M, Miyagawa S, Fujimaru R, Yamada H, Sawai T, Ikeda Y, Iwata N, Uemura O, Matsukuma E, Aizawa Y, Harada H, Wada H, Ishikawa E, Ashida A, Nangaku M, Miyata T, Fujimura Y. (2013) Analysis of

- genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol*, 54:238-246.
160. Flanagan SE, Patch AM, Ellard S. (2010) Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations. *Genet Test Mol Biomarkers*, 14:533-537.
  161. Sanchez-Corral P, Gonzalez-Rubio C, Rodriguez De Cordoba S, Lopez-Trascasa M. (2004) Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Molecular immunology*, 41:81-84.
  162. Mohlin FC, Nilsson SC, Levart TK, Golubovic E, Rusai K, Muller-Sacherer T, Arbeiter K, Pallinger E, Szarvas N, Csuka D, Szilagyi A, Villoutreix BO, Prohaszka Z, Blom AM. (2015) Functional characterization of two novel non-synonymous alterations in CD46 and a Q950H change in factor H found in atypical hemolytic uremic syndrome patients. *Mol Immunol*, 65:367-376.
  163. Bienaime F, Dragon-Durey MA, Regnier CH, Nilsson SC, Kwan WH, Blouin J, Jablonski M, Renault N, Rameix-Welti MA, Loirat C, Sautes-Fridman C, Villoutreix BO, Blom AM, Fremeaux-Bacchi V. (2010) Mutations in components of complement influence the outcome of Factor I-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*, 77:339-349.
  164. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, Mele C, Bresin E, Cassis L, Gamba S, Porrati F, Bucchioni S, Monteferrante G, Fang CJ, Liszewski MK, Kavanagh D, Atkinson JP, Remuzzi G, International Registry Of R, Familial HT. (2006) Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*, 108:1267-1279.
  165. Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Macher MA, Niaudet P, Guest G, Boudailliez B, Bouissou F, Deschenes G, Gie S, Tsimaratos M, Fischbach M, Morin D, Nivet H, Alberti C, Loirat C, French Society of Pediatric N. (2007) Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 18:2392-2400.
  166. Girardi G, Bulla R, Salmon JE, Tedesco F. (2006) The complement system in the pathophysiology of pregnancy. *Mol Immunol*, 43:68-77.

167. Geerdink LM, Westra D, Van Wijk JA, Dorresteyn EM, Lilien MR, Davin JC, Komhoff M, Van Hoeck K, Van Der Vlugt A, Van Den Heuvel LP, Van De Kar NC. (2012) Atypical hemolytic uremic syndrome in children: complement mutations and clinical characteristics. *Pediatr Nephrol*, 27:1283-1291.
168. Szarvas N, Szilagyi A, Tasic V, Nushi-Stavileci V, Sofijanova A, Gucev Z, Szabo M, Szabo A, Szeifert L, Reusz G, Rusai K, Arbeiter K, Muller T, Prohaszka Z. (2014) First-line therapy in atypical hemolytic uremic syndrome: consideration on infants with a poor prognosis. *Ital J Pediatr*, 40:101.
169. Fakhouri F, Fremeaux-Bacchi V, Loirat C. (2013) Atypical hemolytic uremic syndrome: from the rediscovery of complement to targeted therapy. *Eur J Intern Med*, 24:492-495.
170. Jung S, Kang ES, Ki CS, Kim DW, Paik KH, Chang YS. (2011) Successful therapeutic plasma exchange in a 3.2-kg body weight neonate with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Clin Apher*, 26:162-165.
171. Magen D, Oliven A, Shechter Y, Elhasid R, Bar-Joseph G, Zelikovic I. (2001) Plasmapheresis in a very young infant with atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 16:87-90.
172. Besbas N, Gulhan B, Karpman D, Topaloglu R, Duzova A, Korkmaz E, Ozaltin F. (2013) Neonatal onset atypical hemolytic uremic syndrome successfully treated with eculizumab. *Pediatr Nephrol*, 28:155-158.
173. Gruppo RA, Rother RP. (2009) Eculizumab for congenital atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 360:544-546.
174. Ariceta G, Arrizabalaga B, Aguirre M, Morteruel E, Lopez-Trascasa M. (2012) Eculizumab in the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome in infants. *Am J Kidney Dis*, 59:707-710.
175. Christmann M, Hansen M, Bergmann C, Schwabe D, Brand J, Schneider W. (2014) Eculizumab as first-line therapy for atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics*, 133:e1759-1763.
176. Ruebner RL, Kaplan BS, Copelovitch L. (2012) A time for reappraisal of "atypical" hemolytic uremic syndrome: should all patients be treated the same? *Eur J Pediatr*, 171:1519-1525.

177. Loirat C, Fakhouri F, Ariceta G, Besbas N, Bitzan M, Bjerre A, Coppo R, Emma F, Johnson S, Karpman D, Landau D, Langman CB, Lapeyraque AL, Licht C, Nester C, Pecoraro C, Riedl M, Van De Kar NC, Van De Walle J, Vivarelli M, Fremeaux-Bacchi V, For HUSI. (2015) An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr Nephrol*, 2015 Apr 11. [Epub ahead of print].
178. Prohaszka Z, Varga L, Fust G. (2012) The use of 'real-time' complement analysis to differentiate atypical haemolytic uraemic syndrome from other forms of thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol*, 158:424-425.
179. Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Macher MA, Niaudet P, Guest G, Boudailliez B, Bouissou F, Deschenes G, Gie S, Tsimaratos M, Fischbach M, Morin D, Nivet H, Alberti C, Loirat C. (2007) Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 18:2392-2400.
180. Tortajada A, Montes T, Martinez-Barricarte R, Morgan BP, Harris CL, De Cordoba SR. (2009) The disease-protective complement factor H allotypic variant Ile62 shows increased binding affinity for C3b and enhanced cofactor activity. *Hum Mol Genet*, 18:3452-3461.
181. Pechtl IC, Kavanagh D, Mcintosh N, Harris CL, Barlow PN. (2011) Disease-associated N-terminal complement factor H mutations perturb cofactor and decay-accelerating activities. *J Biol Chem*, 286:11082-11090.
182. Schramm EC, Roumenina LT, Rybkine T, Chauvet S, Vieira-Martins P, Hue C, Maga T, Valoti E, Wilson V, Jokiranta S, Smith RJ, Noris M, Goodship T, Atkinson JP, Fremeaux-Bacchi V. (2015) Mapping interactions between complement C3 and regulators using mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 125:2359-2369.
183. Roumenina LT, Frimat M, Miller EC, Provot F, Dragon-Durey MA, Bordereau P, Bigot S, Hue C, Satchell SC, Mathieson PW, Mousson C, Noel C, Sautes-Fridman C, Halbwachs-Mecarelli L, Atkinson JP, Lionet A, Fremeaux-Bacchi V. (2012) A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain of function. *Blood*, 119:4182-4191.



184. Walters-Sen LC, Hashimoto S, Thrush DL, Reshmi S, Gastier-Foster JM, Astbury C, Pyatt RE. (2015) Variability in pathogenicity prediction programs: impact on clinical diagnostics. *Mol Genet Genomic Med*, 3:99-110.
185. Valdmanis PN, Verlaan DJ, Rouleau GA. (2009) The proportion of mutations predicted to have a deleterious effect differs between gain and loss of function genes in neurodegenerative disease. *Hum Mutat*, 30:E481-489.
186. Geelen J, Van Den Dries K, Roos A, Van De Kar N, De Kat Angelino C, Klasen I, Monnens L, Van Den Heuvel L. (2007) A missense mutation in factor I (IF) predisposes to atypical haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 22:371-375.
187. Heurich M, Martinez-Barricarte R, Francis NJ, Roberts DL, Rodriguez De Cordoba S, Morgan BP, Harris CL. (2011) Common polymorphisms in C3, factor B, and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:8761-8766.
188. Abrera-Abeleda MA, Nishimura C, Frees K, Jones M, Maga T, Katz LM, Zhang Y, Smith RJ. (2011) Allelic variants of complement genes associated with dense deposit disease. *J Am Soc Nephrol*, 22:1551-1559.
189. Tortajada A, Pinto S, Martinez-Ara J, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P, De Cordoba SR. (2012) Complement factor H variants I890 and L1007 while commonly associated with atypical hemolytic uremic syndrome are polymorphisms with no functional significance. *Kidney Int*, 81:56-63.
190. Schmidt BZ, Fowler NL, Hidvegi T, Perlmutter DH, Colten HR. (1999) Disruption of disulfide bonds is responsible for impaired secretion in human complement factor H deficiency. *J Biol Chem*, 274:11782-11788.
191. Brittan JL, Buckeridge TJ, Finn A, Kadioglu A, Jenkinson HF. (2012) Pneumococcal neuraminidase A: an essential upper airway colonization factor for *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Oral Microbiol*, 27:270-283.
192. Pettigrew MM, Fennie KP, York MP, Daniels J, Ghaffar F. (2006) Variation in the presence of neuraminidase genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates with identical sequence types. *Infect Immun*, 74:3360-3365.

193. Hanisch FG, Baldus SE. (1997) The Thomsen-Friedenreich (TF) antigen: a critical review on the structural, biosynthetic and histochemical aspects of a pancarcinoma-associated antigen. *Histol Histopathol*, 12:263-281.
194. Coats MT, Murphy T, Paton JC, Gray B, Briles DE. (2011) Exposure of Thomsen-Friedenreich antigen in *Streptococcus pneumoniae* infection is dependent on pneumococcal neuraminidase A. *Microb Pathog*, 50:343-349.
195. Pelras S, Delmas Y, Lamireau D, Villega F, Nolent P, Ryman A, Llanas B, Brissaud O, Harambat J. (2011) Severe transient ADAMTS13 deficiency in pneumococcal-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 26:631-635.
196. Johnson S, Waters A. (2012) Is complement a culprit in infection-induced forms of haemolytic uraemic syndrome? *Immunobiology*, 217:235-243.
197. Coonrod JD, Rylko-Bauer B. (1977) Complement levels in pneumococcal pneumonia. *Infect Immun*, 18:14-22.
198. Reed WP, Davidson MS, Williams RC, Jr. (1976) Complement system in pneumococcal infections. *Infect Immun*, 13:1120-1125.
199. Rabinovitch RA, Koethe SM, Kalbfleisch JH, Preheim LC, Rytel MW. (1986) Relationships between alternative complement pathway activation, C-reactive protein, and pneumococcal infection. *J Clin Microbiol*, 23:56-61.
200. Ram S, Sharma AK, Simpson SD, Gulati S, Mcquillen DP, Pangburn MK, Rice PA. (1998) A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med*, 187:743-752.
201. Banerjee R, Hersh AL, Newland J, Beekmann SE, Polgreen PM, Bender J, Shaw J, Copelovitch L, Kaplan BS, Shah SS, Emerging Infections Network Hemolytic-Uremic Syndrome Study G. (2011) *Streptococcus pneumoniae*-associated hemolytic uremic syndrome among children in North America. *Pediatr Infect Dis J*, 30:736-739.
202. Huang YH, Lin TY, Wong KS, Huang YC, Chiu CH, Lai SH, Hsia SH. (2006) Hemolytic uremic syndrome associated with pneumococcal pneumonia in Taiwan. *Eur J Pediatr*, 165:332-335.
203. Prestidge C, Wong W. (2009) Ten years of pneumococcal-associated haemolytic uraemic syndrome in New Zealand children. *J Paediatr Child Health*, 45:731-735.

204. Waters AM, Kerecuk L, Luk D, Haq MR, Fitzpatrick MM, Gilbert RD, Inward C, Jones C, Pichon B, Reid C, Slack MP, Van't Hoff W, Dillon MJ, Taylor CM, Tullus K. (2007) Hemolytic uremic syndrome associated with invasive pneumococcal disease: the United kingdom experience. *J Pediatr*, 151:140-144.
205. Copelovitch L, Kaplan BS. (2010) *Streptococcus pneumoniae*--associated hemolytic uremic syndrome: classification and the emergence of serotype 19A. *Pediatrics*, 125:e174-182.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

(A közlemények 2013-ig korábbi nevemen szerepelnek (Kiss Nóra), a 2013 utáni közlemények pedig Szarvas Nóra néven jelentek meg.)

### 11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Mohlin FC, Nilsson SC, Levart TK, Golubovic E, Rusai K, Müller-Sacherer T, Arbeiter K, Pállinger É, Szarvas N, Csuka D, Szilágyi Á, Villoutreix BO, Prohászka Z, Blom AM. (2015) Functional characterization of two novel non-synonymous alterations in CD46 and a Q950H change in factor H found in atypical hemolytic uremic syndrome patients. Mol Immunol, 65: 367-376. IF: 2,973 (2014)\*

Szarvas N, Szilagyi A, Tasic V, Nushi-Stavileci V, Sofijanov A, Gucev Z, Szabo M, Szabo A, Szeifert L, Reusz G, Rusai K, Arbeiter K, Muller T, Prohaszka Z. (2014) First-line therapy in atypical hemolytic uremic syndrome: consideration on infants with a poor prognosis. Ital J Pediatr, 40:101. IF: 1,523 (2014)

Szilágyi Á\*\*, Kiss N\*\*, Bereczki Cs, Tólosi Gy, Rácz K, Túri S, Györke Zs, Simon E, Horváth E, Kelen K, Reusz Gy, Szabó AJ, Tulassay T, Prohászka Z. (2013) The role of complement in Streptococcus pneumoniae-associated haemolytic uraemic syndrome. Nephrol Dial Transplant, 28: 2237-2245. IF: 3,488 (2013)

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

*\*\*megosztott első szerzők*

***A disszertációhoz kapcsolódó közlemények összesített impakt faktora: 7,984***

## **11.2. A disszertációtól független közlemények**

Kiss N, Barabas E, Varnai K, Halasz A, Varga LA, Prohaszka Z, Farkas H, Szilagyi A. (2013) Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. Clin. Immunol, 149: 142-145. IF: 3,992 (2013)

Jankovics F, Henn L, Bujna A, Vilmos P, Kiss N, Erdelyi M. (2011) A Functional Genomic Screen Combined with Time-Lapse Microscopy Uncovers a Novel Set of Genes Involved in Dorsal Closure of Drosophila Embryos. PLOS ONE, 6:(7) IF: 4,092 (2011)

*A disszertációtól független közlemények összesített impakt faktora: 8,084*

*Összesített impakt faktor: 16,068*

## 12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Prof. Dr. Prohászka Zoltánnak, akinek építő ötletei és kritikái segítségével elsajátíthattam a tudományos gondolkodás alapjait. Köszönöm, hogy lehetőségem volt a laboratóriumban dolgozni és részese lehettem a közös munkának.

Köszönet illeti Dr. Szilágyi Ágnes, munkám közvetlen irányítóját, akitől a legtöbbet tanultam az elmúlt években. Köszönök minden szakmai segítséget, tanácsot és emberi támogatást, valamint a példaérekű lelkesedést és kitartást.

A genetikai módszerek beállításában részt vett Takács Beáta és Dr. Csuka Dorottya, akiknek ezúton is szeretném megköszönni a rengeteg segítséget a laborban és azon kívül, a baráti beszélgetéseket, és a sok-sok biztatást.

Hálával gondolok Füst György Professzor Úrra, akinek nyitott, érdeklődő, optimista szellemiségére mindig emlékezni fogok. Hálás vagyok Dr. Cervenak Lászlónak és Prof. Dr. Farkas Henriette-nek, akik sok hasznos ötlettel és tanáccsal láttak el; a komplementdiagnosztikai laboratórium vezetőjének Dr. Varga Liliannak és munkatársainak, Dóczy Andrásné Mártinak, Szendrei Zsuzsannának, Szigeti Antalné Ilikének, Kertész Lászlóné Erának, akik a komplementméréseket végezték, mindig készségesen és türelmesen segítettek munkámban.

Köszönöm a kutatólabor jelenlegi és korábbi munkatársainak, hogy a munka mindig a jó hangulatban telt, és bármikor számíthattam segítségükre.

Köszönöm kollaborációs partnereinknek, a vizsgálatokban résztvevő betegek ellátását és jellemzését végző klinikusoknak, valamint a mutációk funkcionális vizsgálatában részt vevő munkacsoportoknak, hogy lehetőségem nyílt bekapcsolódni munkájukba.

Köszönöm Kovács Zsoltnak a sok bátorítást és támogatást, a mérhetetlen türelmet, és a dolgozat formai megoldásaihoz nyújtott sok-sok segítséget. Hálás vagyok Családomnak pótolhatatlan támogatásukért: Szüleimnek és Nagyszüleimnek, akik töretlenül hittek bennem, valamint testvéreimnek: Katának, Panninak, Petinek, Mikinek és Virágnak a sok biztatásért, ami lelkesített a dolgozat megírásakor.