

A komplement alternatív út regulációjának szerepe hemolitikus urémiás szindrómában

Doktori tézisek

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

1. Bevezetés

A gyermekkorban kialakuló akut veseelégtelenség leggyakoribb oka a hemolitikus urémiás szindróma (HUS), mely során az endotél sejtréteg károsodásának következtében a vese kapillárisaiban és kisereiben mikrotrombusok keletkeznek, ami intravaszkuláris hemolízishez vezet. Ennek megfelelően a betegség fő tünetei a hemolitikus anémia, a súlyos trombocitopénia és az akut veseelégtelenség.

A típusos, vagy diarrhea-asszociált HUS a betegség klasszikus, relatíve jó prognózisú formája, mely Shiga-like toxint termelő baktériummal való fertőzés következtében alakul ki. A pneumococcus asszociált HUS (pHUS) forma invazív pneumococcus fertőzéseknek (IPD) ritka szövődmény. Patogenezisének hátterében a kórokozó neuraminidáz termelése áll, amely az IPD betegek kb. 50%-ánál jelen lehet, de csak kis részükben, 0,4–0,6%-ban progrediál a betegség HUS-sá. A HUS atípusos formája (aHUS) az esetek kb. 10%-ában fordul elő, kimenetele súlyos, gyakoriak a relapszusok, a végállapotú veseelégtelenség kialakulásának kockázata magas. Patogenezisének hátterében a komplementrendszer alternatív útjának diszregulációja áll. A szabályozási zavar okai lehet a komplement H-faktor ellen képződő autoantitestek, valamint genetikai eltérések, melyek a komplementrendszer alternatív útjának különböző fehérjéit kódoló génekben azonosíthatók. A betegséggel kapcsolatba hozható mutációk az érintett szabályozó faktorok (H-faktor (*CFH*), membrán

kofaktor protein, MCP (*CD46*), I-faktor (*CFI*), trombomodulin (*THBD*)) funkcióvesztéses vagy az alternatív út C3-konvertáz komponenseinek (C3 (*C3*) és B-faktor (*CFB*),) funkciónyeréses mutációi, melyek egyaránt a komplementrendszer alternatív út szabályozásának sérüléséhez és aHUS kialakulásához vezethetnek. Az eddig közölt tanulmányok a betegek 50-70%-ában találtak eltérést vizsgált génekben, ezek nagy része heterozigóta formában fordul elő és penetranciájuk nem teljes, körülbelül 50%, így tünetmentes hordozók fordulnak elő a betegek családtagjai között. A mutációkon kívül vagy környezeti okok és más genetikai tényezők szerepe is ismert a betegség kialakulásában, ilyen pl. a H-faktor H3 haplotípusa és az membrán kofaktor protein MCP_{GGAAC} haplotípusa, ami a betegpopulációkban magasabb arányban fordul elő, mint egészségesekben.

Az atípusos HUS elsővonalbeli kezelése hagyományosan a plazmaterápia, mely eltávolítja a mutáns fehérjéket és az autoantitesteket, és működőkkel pótolja azokat, azonban nem gátolja a komplementrendszer aktiválódását, így nem előzi meg a szöveti károsodást. Az elmúlt években az eculizumab megjelenésével új lehetőségek nyíltak meg az aHUS kezelésében. Ez a humanizált monoklonális anti C5-antitest megakadályozza a terminális komplement komplex kialakulását, ezáltal hatékonyan gátolja a komplement-mediált patogén mechanizmusokat.

2. Célkitűzések

1) Eset-sorozat tanulmányunkkal fel kívántuk tární a 2008-2014 között laboratóriumunkban vizsgált aHUS betegeinkben a betegség komplex etiológiáját, és a következő célokat tűztük ki: a betegek klinikai jellemzőinek és laboratóriumi paramétereinek elemzése és a betegség kimenetelének vizsgálata az etiológia, a kezelés és az életkor függvényében.

2) 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, így következő célkitűzésünk a *CFH*, *CFI*, *CD46*, *C3*, *CFB* és *THBD* gének teljes kódoló régióját érintő DNS szekvenálási vizsgálómódszer beállítása, és az aHUS betegek genetikai rizikójának feltárása volt.

3) Az elmúlt években egyre több összefoglaló tanulmány és adatbázis közli a felderített genetikai eltérések listáját, ám a mutációk pontos funkcionális szerepével kapcsolatban nem minden esetben található információ. Ezért a következő célkitűzésünk a betegeinkben azonosított H-faktor mutációknak a fehérje mennyiségére és funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata volt.

4) Ismert, hogy a H-faktor H3 haplotípusa aHUS betegekben nagyobb gyakorisággal fordul elő, mint egészséges kontroll populációkban. Az azonban, hogy milyen mechanizmussal járul hozzá a betegség kialakulásához, nem pontosan ismert, így arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a H3 haplotípus mutat-e összefüggést a szérum H-faktor koncentrációjával.

5) 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 rizikófaktorai is hozzájárulnak a betegség kialakulásához, ez azonban kevésbé vizsgált. Célul tűztük ki pHUS betegek részletes komplementprofil- és genetikai analízisét.

3. Módszerek

Vizsgálatainkat 2008 és 2014 között HUS klinikai diagnózissal laboratóriumunkba küldött betegek és családtagjaik mintáival végeztük. Vizsgálatainkba atípusos HUS és pneumococcus-asszociált HUS betegeket vontunk be, összesen 29 aHUS beteget vizsgáltunk 27 családból, és 5 pHUS beteget 5 családból. A kontrollként használt csoportot 210 egészséges, nem rokon, kaukázusi személy alkotta.

A genomiális DNS izolálása EDTA-val alvadásgátolt vérből származó mononukleáris sejtekből történt, kisózásos technikával, a DNS koncentrációt spektrofotométerrel határoztuk meg. A PCR amplifikációhoz alkalmazott primereket irodalmi adatok alapján és a Primer Premier program segítségével terveztük, a keletkezett PCR termékek mennyiségének meghatározására agaróz gélelektroforézist használtunk. A termékeket a feleslegben maradt dNTP-től és a primerektől alkalikus foszfatáz és ExonucleaseI enzimek felhasználásával tisztítottuk meg, majd a termék hosszának megfelelő koncentrációra hígítottuk, és szekvenáló reagenseket adtuk hozzá. A szekvenálási reakciót követően a keletkezett termékeket Na-acetát-etanolos módszerrel tisztítottuk meg, majd a minták feloldását és denaturálását követően kapilláris elektroforézist végeztünk. A H-faktor polimorfizmusok genotipizálására PCR-RFLP technikát és real-time PCR-t alkalmaztunk. A kópiaszám-eltérések detektálására multiplex ligáció-függő próba amplifikációt végeztünk a *CFH*,

CFHR1, *CFHR2*, *CFHR3*, *CFHR5*, *CFI* és *CD46* gének kromoszómális régiójában.

A C4, B-faktor és I-faktor szintjének meghatározása radiális immundiffúziós módszerrel, a C3 fehérjeszint mérése immunturbidimetriás teszttel történt, a klasszikus út összaktivitását hemolitikus módszerrel, az alternatív út összaktivitást kereskedelmi ELISA kit-tel határoztuk meg. A H-faktor szint mérése és a H-faktor elleni autanitestek mérése házi ELISA-val történt. Az ADAMTS13 aktivitás meghatározása FRET-VWF-73 fluoreszcens quenching szubsztrát hasításából eredő fluoreszcencia mérésén alapuló módszerrel történt. A H-faktor mutációk fehérjeszintre gyakorolt hatásának vizsgálatához a p.Y402H polimorfizmusának alléljaira specifikus antitestek segítségével a polimorfizmusra heterozigóta személyekben allélspecifikus H-faktor fehérjeszinteket és ezek egymáshoz viszonyított arányát mértük. A H-faktor mutációk regulátor funkcióra gyakorolt hatásának vizsgálatához H-faktor hemolitikus tesztet alkalmaztunk.

A statisztikai analíziseket a Prism 6 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 számoltuk ki, az International HapMap Project (www.hapmap.org) észak- és nyugat-európai kaukázusi populációjának genotípus adatai alapján. Az újonnan azonosított mutációk lehetséges funkcionális hatásának *in silico* predikcióját a PolyPhen, a SIFT, a PROVEAN, és a MutationTaster online szoftverekkel végeztük.

4. Eredmények

4.1. Az aHUS betegek klinikai jellemzői és laboratóriumi paramétere

Az aHUS első megjelenése 1 napos kortól 60 éves korig terjedt (medián 13,5), jellemzően gyermekkorban jelentkezett (53,3%), a legtöbb betegnél már 2 éves kor előtt (30%). A másik jellemző életkor a fiatal felnőttkor volt, a betegek 36,7%-ának 19-30 év közötti életkorban volt az első epizódja. A betegség kimenetele az irodalmi adatokból ismert betegcsoportokhoz hasonlóan igen rossz, jelenleg csak a betegek 37,93%-a van teljes remisszióban veseelégtelenség 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. A mortalitási ráta a két éves kor alatti gyermekekben volt a legmagasabb (66,67%), ez megfelel a korábbi esetsorozatokban közölt adatoknak. Megfigyeléseink alapján ezek a betegek az aHUS betegek egy speciális csoportját alkotják, akikben a betegség gyorsan progrediál, kezelésük plazmaferezissel nagyon nehezen oldható meg, és magas a mortalitás.

Az aHUS betegek komplementprofiljában akut fázisban a legtöbb esetben fokozott komplement-aktiváció és konzumpció volt megfigyelhető: 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. Remisszióban több eltérés helyreállt, azonban sok esetben megfigyelhető egyes komponensnek tartósan alacsony szintje, (alacsony alternatív út aktivitás 47,37%-ban, 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) ami mutáció(k) hatására utal az alternatív út komponenseiben.

4.2. Az aHUS betegek genetikai vizsgálata

A hat vizsgált gén (*CFH*, *CFI*, *CD46*, *C3*, *CFB*, *THBD*) teljes kódoló régiójának szekvenálásához összesen 66 PCR termék amplifikálását optimalizáltuk, majd 158 szekvenálási termékből kapott adatokat illesztettük össze. 23 betegen összesen 27, feltételezhetően betegségkötő variációt találtunk, 6 beteg esetében nem találtunk mutációt. Összesen 15 korábban már leírt és 12 új mutációt találtunk ezekben a betegekben. A *CFH* génben 13 mutációt azonosítottunk 14 betegen; 4-4 mutációt találtunk a *CD46* génben 4 betegen és a *CFI* génben 3 betegen, 3-3 mutációt találtunk a *CFB* génben 3 betegen és a *C3* génben 4 betegen. Összesen 13 beteg (44,8%) hordozta a H-faktor H3 aHUS rizikó haplotípusát, frekvenciája a betegpopulációban 0,259 volt, és 26 beteg (89,6%) hordozta az MCP_{GGAAC} rizikó haplotípust, frekvenciája 0,589 volt. 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.

4.3. A H-faktor mutációk funkcionális hatásának vizsgálata

Összesen 9 mutáció vizsgálatára volt alkalmas szérummintánk a hemolitikus teszt elvégzéséhez. A p.W198R, p.Q950H, p.S1191L+V1197A, p.P1161T és p.R1215Q mutáns H-faktort tartalmazó szérumminták a vörösvértestek lízisét eredményezték. 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 mutáció-hordozó édesanyja mintája erős lízist okozott.

A H-faktor mutációk fehérjeszintre gyakorolt hatásának vizsgálatához egy korábban leírt allélspecifikus ELISA módszert optimalizáltunk, majd ezzel a módszerrel összesen 7 mutációt tudtunk vizsgálni. A két kromoszómáról közel egyenlő mértékű volt a mért fehérjeszint a p.T956M, a p.S1191L+p.V1197A, és a p.R1215Q mutációkat tartalmazó H-faktor variánsok esetében. A p.V609D, p.S722X, p.T1216del, p.C448Y mutációkat tartalmazó mintákban az egyik kromoszómáról nem volt detektálható H-faktor.

4.4. 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 módszert alkalmaztuk. Összesen 19 H3 haplotípust hordozó és 61 nem H3 haplotípust hordozó mintát hasonlítottunk össze. A két csoport között szignifikáns eltérést találtunk ($p=0,0252$), azaz a H3 hordozó kromoszómákról kevesebb fehérje volt mérhető, mint a többi kromoszómáról.

4.5. Komplement- és genetikai analízis pHUS betegekben

Akut betegségszakaszban a klasszikus összkomplementet és az alternatív út aktivitás, valamint a C3 és C4 komplement-komponensek szintje jellemzően csökkent volt, ezek az eltérések nagyrészt helyreálltak remisszióban. H-faktor elleni autoantitestet egyik betegben sem volt jelen, és az ADAMTS13 aktivitás minden esetben kissé csökkent volt az akut mintákban, ami később a remisszióban helyreállt.

A vizsgált génekben három beteg esetében találtunk mutációt. Egy betegben egy heterozigóta H-faktor mutációt azonosítottunk (p.R1149X), ami egy stop kodon létrejöttét eredményezi és feltehetően a H-faktor transzlációjakor korai láncterminációt okoz. Ezzel összhangban van, hogy a beteg H-faktor szintje remisszióban is az alsó méréshatár alatt volt. Egy másik betegben egy heterozigóta I-

faktor mutációt találtunk (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. Ezzel összhangban a betegben alacsony I-faktor szintet mértünk akut fázisban és remisszióban is. Egy betegben azonosítottunk egy heterozigóta thrombomodulin mutációt (p.T44I). Ezt a variációt korábban nem találták meg aHUS betegekben és található meg nemzetközi adatbázisok egészséges populációiban sem. A *CFH* H3 rizikó haplotípusát egy betegben azonosítottunk, az *MCP*_{GGAAC} rizikó haplotípust pedig három beteg hordozta.

5. Következtetések

- 1) Megfigyeléseink alapján a két év alatti csecsemők az aHUS betegek egy speciális csoportját alkotják, akikben a betegség gyorsan progrediál, kezelésük plazmaferezissel nem oldható meg, és a mortalitási ráta magas, így a csecsemők esetében első vonalbeli terápiaként az eculizumabot tartjuk megfelelő kezelésnek. Eredményeink megerősítik, hogy a részletes komplementvizsgálat már az epizód megjelenésekor segíthet a pontos etiológia tisztázásában és a korai terápiás döntésekben.
- 2) A beállított szekvenálási módszereknek köszönhetően a bemutatott betegek csaknem 80%-ában sikerült azonosítani a betegséggel kapcsolatba hozható genetikai variációkat. A családtagok genetikai elemzése során megfigyeltük, hogy sok esetben a mutáció(k) mellett rizikó haplotípus(oka)t is hordozószemélyben alakul ki a betegség, ez magyarázat lehet a legtöbb ismert mutáció alacsony penetranciájára.
- 3) Az allélspecifikus ELISA-t elsőként alkalmaztuk mutációk funkcionális vizsgálatára, eredményeink alapján ez a módszer segítheti a szekvenálással azonosított új H-faktor variációk patogenitásának megítélését. A módszert a H-faktor hemolitikus teszttel együtt alkalmaztuk. 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.

- 4) Az allélspecifikus ELISA módszerrel vizsgálva kimutattuk, hogy a H3 haplotípust hordozó kromoszómáról mérhető H-faktor szintje alacsonyabb, mint a nem H3 kromoszómákról mérhető H-faktor fehérjeszint. Feltételezésünk szerint a H3 haplotípus tehát önmagában is befolyásolhatja a H-faktor termelésének szintjét.

- 5) Elsőként végeztük el a pHUS betegek komplementprofiljának és komplement-regulátorok és komplementfehérjék génjeinek vizsgálatát. Eredményeink megerősítették azt a feltételezést, hogy a neuraminidáz aktivitáson túl genetikai variációk talaján kialakuló komplement diszreguláció és konzumpció is hozzájárulhat a pHUS kialakulásához a betegek egy részében.

6. Saját publikációk

6.1. 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:(2) pp. 367-376.

IF:2.973 (2014)*

Szarvas N, Szilágyi 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:(1) Paper 101. 9 p. IF:1.523 (2014)

Szilágyi Á**, Kiss N**, Bereczki Cs, Tálosi Gy, Rác 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:(9) pp. 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 impaktfaktora: 7,984

6.2. 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:(1) pp. 142-145. IF: 3.992 (2013)

Jankovics F, Henn L, BujnaA, 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