

# Új perspektívák a komplement-mediált proliferatív glomerulonefritiszek megközelítésében

Doktori értekezés

**Dr. Garam Nóra Éva**

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csuka Dorottya, Ph.D., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Tory Kálmán, med. hab., egyetemi docens  
Dr. Dolgos Szilveszter, Ph.D., osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tulassay Tivadar, DSc.,  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rempert Ádám, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. Ambrus Csaba, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2020.

## TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
2. BEVEZETÉS.....	5
2.1. A komplementrendszer.....	5
2.1.1. Klasszikus út.....	7
2.1.2. Lektin út.....	7
2.1.3. Alternatív út.....	8
2.1.4. Terminális út.....	9
2.2. Komplementrendszert érintő betegségek .....	10
2.2.1. Membranoproliferatív glomerulonefritisz .....	12
2.2.2. C3-glomerulopátia .....	13
2.2.2.1. Klinikai jellemzők .....	13
2.2.2.2. Hisztológia.....	14
2.2.2.3. Patogenezis .....	17
2.2.2.3.1. Autoantitestek.....	17
2.2.2.3.2. Genetikai háttér.....	19
2.2.2.3.3. A H-faktorial rokon fehérje család.....	22
2.2.2.3.4. A H-faktorial rokon 5-ös fehérje .....	24
2.2.2.4. Terápia.....	25
2.3. Új megközelítés a membranoproliferatív glomerulonefritiszek osztályozásában	27
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	29
3.1. H-faktorial rokon 5-ös fehérje szerepének vizsgálata C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban.....	29
3.2. C4 nefritikus faktor vizsgálata a C3G/IC-MPGN-es betegpopulációban .....	30
3.3. A hisztológiai besorolástól független, adat-vezérelt, hipotézismentes klaszteranalízis végzése a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement eredményei alapján.....	31
4. MÓDSZEREK.....	32
4.1. Betegek.....	32
4.2. Kontroll személyek.....	33
4.3. Biopsziák .....	34
4.4. Mintavétel.....	34

4.5. Klinikai adatok .....	34
4.6. Komplement paraméterek meghatározása .....	35
4.6.1. A H-faktorral rokon 5-ös fehérje szérumszintjének meghatározása .....	36
4.6.2. Western blot.....	37
4.6.3. C4 nefritikus faktor meghatározása .....	37
4.7. Genetikai vizsgálatok .....	38
4.8. Statisztikai elemzések.....	40
4.8.1. Leíró statisztika .....	40
4.8.2. Klaszteranalízis.....	40
4.8.4. Vesetúlélés.....	43
5. EREDMÉNYEK.....	44
5.1. Betegek .....	44
5.2. FHR-5 szerepének vizsgálata C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban.....	48
5.2.1. Betegek és egészséges egyének FHR-5 szérumszintjeinek vizsgálata .....	48
5.2.2. Azonosított <i>CFHR5</i> variációk .....	49
5.2.3. Az azonosított <i>CFHR5</i> variációk funkcionális jellemzése .....	55
5.2.4. <i>CFHR5</i> variációt hordozó betegek FHR-5 szérumszintjei .....	56
5.2.6. A <i>CFHR5</i> variációk, az FHR-5 szérumszintek és a betegek vesetúlélése közötti kapcsolat vizsgálata .....	58
5.3. C4 nefritikus faktor vizsgálata a C3G/IC-MPGN-es betegpopulációban .....	62
5.3.1. C4 nefritikus faktor előfordulása C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban .....	62
5.3.2. C4 nefritikus faktor összefüggése a betegek különböző klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement paramétereivel.....	62
5.4. Adat-vezérelt hipotézismentes klaszteranalízis végzése a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement eredményei alapján .....	69
5.4.1. Az olasz és a közép-európai betegcsoport összehasonlítása .....	69
5.4.2. A generált klaszterek jellemzése és összehasonlítása Iatropoulos és mts. munkájával .....	70
5.4.3. A vesetúlélés összefüggése a klaszterekkel.....	76
5.4.4. További komplement paraméterek összefüggése a klaszterekkel .....	77
6. MEGBESZÉLÉS .....	82
6.1. FHR-5 szerepének vizsgálata C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban.....	82
6.2. C4 nefritikus faktor vizsgálata a C3G/IC-MPGN-es betegpopulációban .....	86

6.3. Adat-vezérelt hipotézismentes klaszteranalízis végzése a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement eredményei alapján .....	89
7. KÖVETKEZTETÉSEK.....	98
8. ÖSSZEFOGLALÁS .....	100
9. SUMMARY .....	101
10. IRODALOMJEGYZÉK .....	102
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	120
11.1. Disszertáció alapjául szolgáló publikációk.....	120
11.2. Disszertáció témájához kapcsolódó publikációk .....	120
11.3. Disszertációtól független publikációk .....	120
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	122

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

aHUS	atípusos hemolítikus urémiás szindróma	IC-MPGN	immunkomplex-mediált membranoproliferatív glomerulonefritisz
anti-FB	anti-B faktor	IF	immunfluoreszcens mikroszkópia
anti-FH	anti-H faktor	IgAN	IgA-nefropátia
AP	alternative pathway, alternatív út	LPS	lipopoliszacharid
C1-INH	C1-inhibitor	LPV	likely pathogenic variation
C3G	C3-glomerulopátia	MAC	membrane attack complex
C3GN	C3-glomerulonefritisz	MAF	minor allél frekvencia
C3NeF	C3 nefritikus faktor	MASP	MBL-asszociált szerin proteáz
C4bp	C4-kötő fehérje	MBL	mannóz kötő lektin
C4NeF	C4 nefritikus faktor	MCP, CD46	membrán kofaktor fehérje
C5NeF	C5 nefritikus faktor	MLPA	multiplexligáció-dependens próba amplifikáció
CFB	B-faktor	MPGN	membranoproliferatív glomerulonefritisz
CFH	H-faktor	NHS	normál humán szérum
CFI	I-faktor	OD	optikai denzitás
CH50	klasszikus út összkomplement	PCR	polimeráz lánreakció
CP	classical pathway, klasszikus út	PIGN	posztinfekciós glomerulonefritisz
CR1	komplement receptor-1	PTX-3	pentraxin-3
CRP	C-reaktív fehérje	RCA	regulators of complement activation
DAF	decay accelerating factor	scr	short consensus repeat
DDD	denz depozit betegség	SDS-PAGE	sodium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis
dNTP	dezoxiribóz-nukleotid trifoszfát	SLE	szisztémás lupusz eritematózus
EBV	Epstein-Barr vírus	sMAP	kis MBL/fikolin asszociált fehérje
ECM	extracelluláris mátrix	SPR	Surface plasmon resonance
ELISA	enzyme-linked immunsorbent assay	TCC	terminal complement complex
EM	elektronmikroszkópia	THBD	thrombomodulin
ESRD	end-stage renal disease, végstádiumú vesebetegség	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
FHL-1	H faktor szerű fehérje-1	TX	vesetranszplantáció
FHR-1,2,3,4,5	H-faktorra rokon fehérje 1,2,3,4,5	VBS	veronál puffer
GBM	glomeruláris bazális membrán	VUS	variation of unknown significance
GFR	glomerularis filtrációs ráta		
GVB	zselatin-veronál puffer		
HBV, HCV	hepatitis vírus B, C		
HD	hemodialízis		
het	heterozigóta		
HRP	horseradishperoxidase, tormaperoxidáz		

## 2. BEVEZETÉS

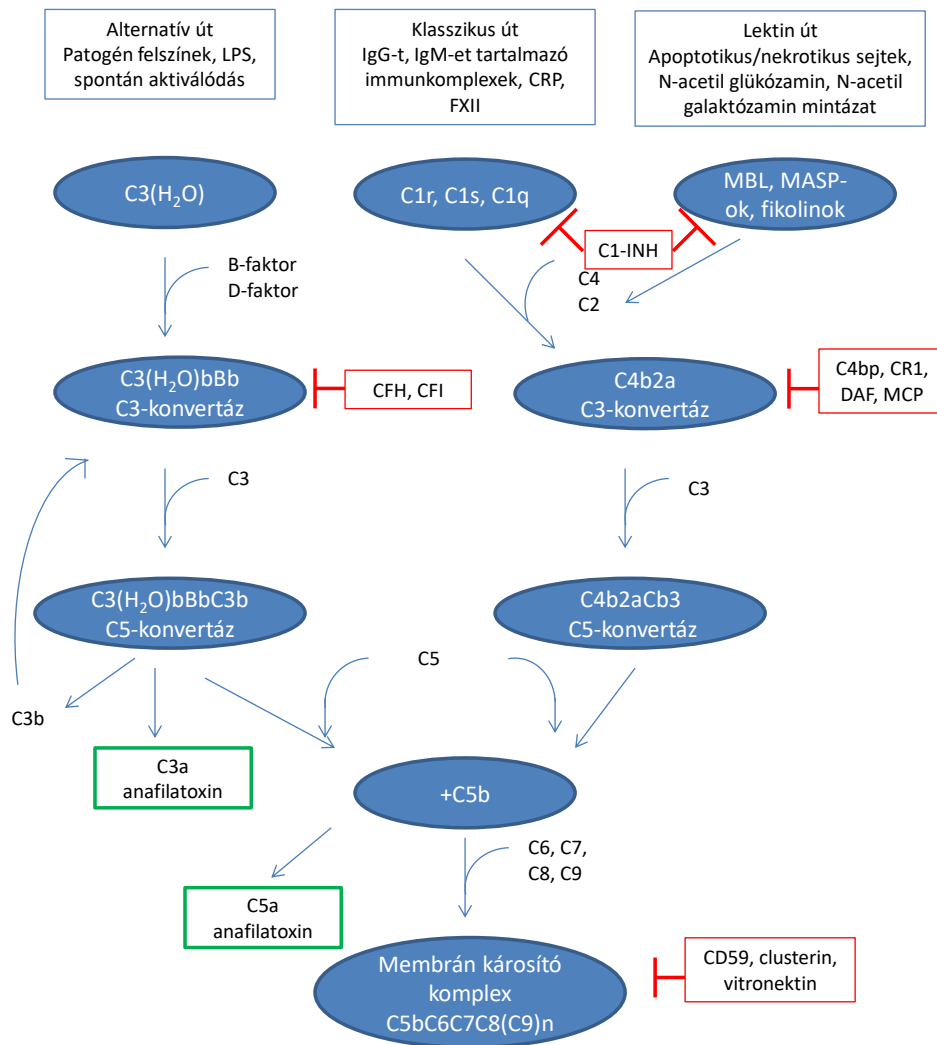
### 2.1. A komplementrendszer

A komplementrendszer szervezetünk természetes immunitásának része. A természetes (veleszületett) immunitás részét képező komplementrendszer leírása Jules Bordet nevéhez kötődik, de már korábban Fodor József felfedezte a vérsavó baktériumölő hatását (1887), míg a komplement (C) elnevezés Paul Ehrlich nevéhez (1899) kapcsolható (1, 2). A komplementrendszer részt vesz a patogének eltávolításában, illetve kapcsolatot teremt a természetes és adaptív immunitás között (3). A komplementrendszert több, mint 40 szolúbilis és membránhoz kötött fehérje alkotja, melyek lehetnek a komplementrendszer komponenseit alkotó fehérjék, receptorok és szabályozó proteinek (4). A komponenseket elsősorban a máj termeli, de lokálisan makrofágokból, monocitákból és epitélisejtekből is felszabadulhatnak. A fehérjék zimogén-formában szekretálódnak, majd kaszkádszerűen aktiválódnak proteolitikus hasítások által (5).

A komplementrendszer három különböző útvonalon keresztül aktiválódhat (1.ábra). Az aktiválódást kiválthatják idegen antigének, illetve károsodott saját struktúrák is. Az aktivátor típusától függően klasszikus (CP), alternatív (AP) és lektin úton indulhat be a folyamat, A rendszer aktiválódási útjait külön részben ismertetem. Mindhárom a C3 molekula proteolízisén át egy közös terminális útba torkollik, melynek végén egy C5-től C9-ig aktiválódott komplementfehérjékből álló membrán-károsító komplex (membrane-attack complex:MAC, vagy más néven terminal complement complex: TCC) jön létre, mely a membrán integritásának megszakításával a célsejtek lízisét eredményezi (6).

Egy további, a kórokozók eliminálását célzó lehetőség, hogy a komplement fehérjék hasítása során létrejövő termékek, elsősorban a C3 hasítása során keletkező C3b segítségével megjelöli az idegen sejteket, és így opszonizációval elősegíti a kórokozók eltávolítását a komplement-receptorral rendelkező effektor-sejtek részvételével. A komplementrendszer ezen túlmenően elősegíti az adaptív immunválasz kialakulását az antigénprezentáció, a B-limfociták antigénreceptorokon keresztül történő kostimulációja és az immunológiai memória kialakulása által (3). Emellett a gyulladáshoz vezető folyamatokban is szerepet játszik elsősorban a komplement fehérjék hasításából származó C3a és C5a anafilatoxinok részvételével, (melyek közül a C5a hatékonyabb anafilatoxin a C3a-nál). Ezek a polipeptidok a környezetbe diffundálva a granulociták, monociták kemotaxisát és degranulációját eredményezik, illetve az erek permeabilitásának növekedését és a

simaizom kontrakcióját okozzák. Aktiválnak és modulálnak különböző sejteket, mint a trombociták, mieloid-sejtek, T-sejtek, illetve a citokinek termelődését is fokozzák. Emellett a szervezet saját, elpusztult sejtjeinek eliminációjában is szerepet játszanak. A komplementrendszer fontos szerepet tölt be az immunkomplexek, apoptotikus sejtek felismerésében és eliminálásában, a szöveti regenerációban, az angiogenezisben, és a hematopoetikus progenitor sejtek mobilizálásában (7, 8).



**1.ábra.** A komplementrendszer (Mella és mts.-i ábrája alapján módosítva)

### 2.1.1. Klasszikus út

A klasszikus úton történő aktiváció elsősorban IgG vagy IgM izotípusú immunkomplexek segítségével jön létre, de a folyamatot különböző bakteriális, virális struktúrák, a XII-es faktor és pentraxinok is beindíthatják.

A C1 molekulakomplex C1q alegysége ismeri fel és köti meg az aktiváló ágenszt, mely  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon kapcsolódik a C1s-C1r-C1r-C1s tetramerhez, mely négy szerinproteázból áll (9). A C1q globuláris feji része megköti az aktiváló struktúrát, mely immunkomplexek esetében annak Fc része, egyéb aktiváló ágensnél annak töltéssel rendelkező vagy hidrofób része. Ez a kötődés a C1r alegység konformáció változását eredményezi, mely autokatalízis révén aktiválódik és hasítja a C1s alegységet (10). Az ilyen módon aktívra váló C1s szubsztrátja a C4 és C2. A C1s először a C4-et hasítja, és a hasítás eredményeként létrejövő C4b kovalensen leköttődik az aktiváló felszínre. A leköttődött C4b megköti a C2-t, amely így proteolitikusan hasíthatóvá válik a C1s számára. Az így létrejövő C2a kötődik a C4b-hez, mely által létrejön a klasszikus út központi C3-konvertáz enzimkomplexe (C4b2a). Ennek katalitikus alegysége a C2, ez képes hasítani a C3-at, melyből a hasított C3b fragmentum hozzákötődik a komplexhez, és létrehozza a C5-konvertázt (C4b2a3b). Ezután a komplement aktiváció a C5 hasítása után egy közös terminális útban folytatódik (11).

A klasszikus út szabályozása több ponton történhet. A C1 enzimkomplex aktiválódását a C1-inhibitor (C1-INH) oly módon gátolja, hogy kovalensen kötődik hozzá, és egy stabil C1rC1sC1-INH-komplex alakul ki, mely ezek után nem képes a további komponensek hasítására (C2, C4) (12). Másik szabályozási pont a C3-konvertáz szintjén van, ahol a C4b további degradálását C4c-re, illetve C4d-re a C4b-kötő fehérje (C4bp) és az I-faktor végzi (13, 14).

### 2.1.2. Lektin út

A lektin utat baktériumok, vírusok és más mikroorganizmusok, illetve elhalt gazdasejtek felszínén található szénhidrát molekulák (mannóz, N-acetil-D-glükózamin, fukóz) képesek aktiválni mannóz-kötő lektinhez (MBL), fikolinokhoz és kollektinekhez való kötődésükön keresztül. Ezek a MBL-asszociált szerin proteázokkal (MASP-ok) alkotott komplexként keringenek. Az aktivált MASP-2 hasítja a C4-et és a C2-t, így létrehozva a



klasszikus úttal közös C3-konvertázt (C4b2a) (11). A MASP-1 egyfelől autoaktivációja útján képes hasítani a MASP-2-t, mely ezáltal aktívvá válik, illetve saját maga is képes lesz C2-t hasítani, így felerősítve a MASP-2 általi aktivációt. A MASP-1 ezen szerepe jelentősen megnöveli a lektin úton keresztüli aktivációt, hiszen a MASP-2 autoaktiválódása egy nagyon lassú folyamat (15-17). A létrejövő C3-konvertáz a klasszikus úton leirtakhoz hasonlóan egy további C3 hasításával és a C3b megkötésével C5-konvertázzá alakul, és a közös terminális úton halad tovább a láncreakció.

A MASP-3-nak valószínűleg a komplementrendszer alternatív útjának aktiválásában lehet szerepe (18).

A lektin út szabályozásában a MBL/fikolin asszociált fehérje-1 (MAP-1), illetve a kis MBL/fikolin asszociált fehérjék (sMAP) vehetnek részt azáltal, hogy a MASP-2-vel versengenek az aktiváló felszínhez való kötődésben. Ezen túlmenően a C1-INH és az alfa-2-makroglobulin is részt vesz a szabályozásban, amelyek a MASP-1 és MASP-2 fehérjékkel komplexeket képezve fejtik ki gátló hatásukat (19-22).

### 2.1.3. Alternatív út

Az alternatív út aktiválódását nukleofil csoportokkal rendelkező, szíálsavban szegény patogén felszínek, lipopoliszacharidok (LPS) indítják el. A szervezet saját sejtjei nagy mennyiségben tartalmaznak szíálsavakat, így ezek fiziológiás körülmények között nem képesek aktiválni az alternatív utat. Az alternatív út a szervezetben viszont alacsony szinten folyamatosan aktivált állapotban van, melyért folyadék-fázisban a C3 fehérjében található tioészter-kötés hidrolízise a felelős (23). A C3 teljes frakciójának körülbelül 1%-a folyamatosan hidrolizált állapotban van (24). Az így keletkező C3(H<sub>2</sub>O) B-faktort tud kötni, melyet a MASP-3 hatására aktiválódó, keringésben proenzimként jelen levő, adipocitákból felszabaduló D-faktor hasít (25). Ennek eredményeként a B-faktor hasításából keletkező Bb hozzákötődik a C3(H<sub>2</sub>O)-hoz (C3(H<sub>2</sub>O)Bb) és egy instabil, folyadék-fázisban működő C3-konvertázt hoz létre. A kötött Bb további C3-at képes hasítani, melyből a C3b Mg<sup>2+</sup> jelenlétében a felszínhez, illetve B-faktorhoz kötődik, melynek D-faktor általi hasítása után létrehozzák az alternatív út C3-konvertázát (C3bBb) (26). A komplex féléletideje nagyon rövid, stabilizálására fiziológiás körülmények között a properdin képes (C3bBbP) (27). A properdin emellett képes direkt aktiválni az alternatív utat az apoptotikus és nekrotikus sejtek megkötésén keresztül (28-30).

A kialakult konvertáz további C3-kat képes kötni, így amplifikálva a reakciót. A keletkező C3b hozzákötődik a komplexhez, létrehozva a C5-konvertázt (C3bBbC3b), mely a C5 hasításán keresztül a közös terminális útban folytatódik (31).

Az alternatív út szabályozásáért a folyadék fázisban elsősorban a H-faktor, illetve a H-faktor-szerű fehérje 1 (FHL-1) tehető felelőssé (5). A H-faktor C-terminális régiója felelős a felszínhez való kötődésért, míg az N-terminális régiója rendelkezik a regulátor funkciókkal (32, 33). Ezzel magyarázható, hogy atípusos hemolitikus urémiás szindrómában (aHUS) elsősorban a H-faktor C-terminális régióját érintő mutációkat írtak le, melyek felszíni diszregulációt eredményeznek, míg C3-glomerulopátiában (C3G) az N-terminális régiót érintő mutációk károsíthatják a folyadék fázisban végbemenő szabályozást. A H-faktor egyrészt gátolja a C3-konvertáz kialakulását, másrészt elősegíti a komplex szétesését, illetve az I-faktor kofaktora a C3b inaktív iC3b-vé, illetve további C3dg-vé, C3d-vé történő hasításakor. Az I-faktor nemcsak a C3b-t, hanem a C4b-t is képes inaktiválni, így a klasszikus út regulátoraként is működik. Felszínhez kötötten elsősorban a membrán kofaktor fehérje (MCP, CD46) és a komplement receptor 1 (CR1) viselkedik az I-faktor kofaktoraként (34). A FHL-1 a C5-fehérjéhez kötődve gátolja a C5-konvertázt. A konvertáz szétesését gyorsíthatja még a decay accelerating factor (DAF) nemcsak az alternatív, hanem a klasszikus úton is (5).

#### **2.1.4. Terminális út**

A C3-konvertáz kialakulása után egy közös útban egyesül a három aktiválódási útvonal. A C5-konvertáz hasítja a C5 fehérjét C5a és C5b fragmensekre. A C5a anafilatoxinként viselkedik, míg a C5b lekötődik a targetfelszínre és maga mellé köti a C6-ot, majd a C7-et. Az így létrejövő hidrofób komplexhez képes lesz a C8 hozzákötődni és a membránba mélyedni, melynek eredményeként kismértékű lízis kezdődik. Végezetül a C8-hoz több C9 molekula kötődik, mely pórusképződést eredményez a célsejt membránjában, annak lízisét okozva (6). A TCC kialakulása szintén több módon szabályozott: gátolhatja a CD59 (protektin) membránfehérje, mely a C5b-8-hoz és a C5b-9-hez kötődik a lipidkettősrétegben (35). A klaszterin a C7-hez kötődik, így az nem lesz képes a membránhoz kapcsolódni (36), míg a vitronektin a TCC membránba való integrálódását akadályozza meg azáltal, hogy kötődik a C5b-7-hez, illetve gátolja a C9 polimerizációját (37).

## 2.2. Komplementrendszer érintő betegségek

A komplementrendszer részvétele a különböző patológiás állapotokban nagyon szerteágazó. A rendszert érintő sérült szabályozás vagy túlzott aktiválódás számos kórképben, elsősorban a vesét érintő megbetegedésekben játszhat szerepet (34).

Kóros folyamatokat okozhat a komplement komponensek öröklött vagy szerzett deficienciája, defektusa: ilyen például a C1-INH hiányában kialakuló örökletes és szerzett angioödéma (38, 39) vagy a regulátorok deficienciáinak eredményeként kialakuló aHUS (40), C3G (34) vagy az időskori makula degeneráció (41).

Másrészről nagyon sok betegségben mutattak ki fokozott komplement aktivációt, konzumpciót: különböző szisztémás autoimmunbetegségekben, antitest-mediált rejekecióban, ischémiás-reperfüziós károsodásban, neurodegeneratív betegségekben, gasztrointesztinális betegségekben, terhességgel asszociált betegségekben, hogy csak néhányat emeljünk ki közülük.

Az aHUS esetében az alternatív út diszreguláció felelős a betegség kialakulásáért. Mind szerzett, mind öröklött faktorok ebben szerepet játszhatnak. Ilyen lehet a H-faktor elleni antitestek jelenléte, illetve különböző mutációk a komplement-asszociált génekben, főleg a *CFH* és *C3* génekben, de ezen kívül érintett lehet a *CFB*, *CFI*, *CD46*, *THBD*, *DGKE*, *CHFR5* gén is (42, 43). A komplement diszreguláció az aHUS esetében a felszínhez kötötten zajlik. Ezzel szemben a C3G esetében, ahol hasonló patogenetikai tényezők azonosíthatóak a betegség hátterében, a sérült szabályozás a folyadék-fázisban jelentkezik (44).

Immunkomplex-mediált membranoproliferatív glomerulonefritiszben (IC-MPGN) az immunkomplex által aktivált klasszikus út játssza a főszerepet. Az utóbbi évek eredményei azonban az alternatív út részvételére is utalnak, mivel vesebiopsziás anyagokban a H-faktorról rokon 5-ös fehérje (FHR-5), a H-faktor és properdin lerakódását is tapasztalták. Szintén kimutatták az alternatív út fehérjéinek csökkent szintjét, illetve C3-nefritikus faktor (C3NeF), illetve egyéb komplement autoantitestek jelenlétét a betegek egy részében. Nemcsak a szerzett faktorok között, de a genetikai eltérések körében is detektáltak alternatív utat érintő variációkat (1).

Az IgA-nefropátia (IgAN) a glomerulonefritisz leggyakoribb formája. A galaktóz-deficiens IgA1 képes aktiválni mind az alternatív, mind a lektin utat. Vesebiopszián a

klasszikus út komponensei hiányoztak a depozitumokból, míg C3, properdin és FHR-5 lerakódások megtalálhatóak voltak. Érdekes megfigyelés, hogy a *CFHR3-1* gén gyakori deléciója protektív hatással bír IgAN-ban (45).

Lupusz nefritisz az SLE-s betegek 50%-ban alakul ki. Elsősorban a klasszikus út részvétele mutatható ki a betegség hátterében a keringő immunkomplexek miatt, de egyre több adat lát napvilágot arra vonatkozóan, hogy a másik két útvonal is érintett lehet. Gyakori az alacsony C3 szint és az alternatív utat érintő genetikai vagy másodlagosan kialakuló elváltozások. A *CFHR3-1* gén deléciója az IgAN-nel ellentétben rizikó tényező lupusz nefritiszben (46).

Pauci-immun glomerulonefritiszben mind immunglobulin, mind komplement depozitumokat kimutattak a glomerulusban. Itt is megtalálhatóak az alternatív út aktiváltságára utaló jelek, mint a csökkent C3 szint emelkedett Bb szinttel.

Primer membranózus glomerulopátiában az IgG4 alosztályba tartozó foszfolipáz A2-receptor elleni antitestek a podocitákon eredményezik a glomeruláris elváltozásokat és a glomeruláris bazális membrán (GBM) károsodását. Az IgG4 nem képes aktiválni a klasszikus utat, viszont a lektin út esszenciális szerepet játszhat a betegség patogenezisében (1).

### 2.2.1. Membranoproliferatív glomerulonefritisz

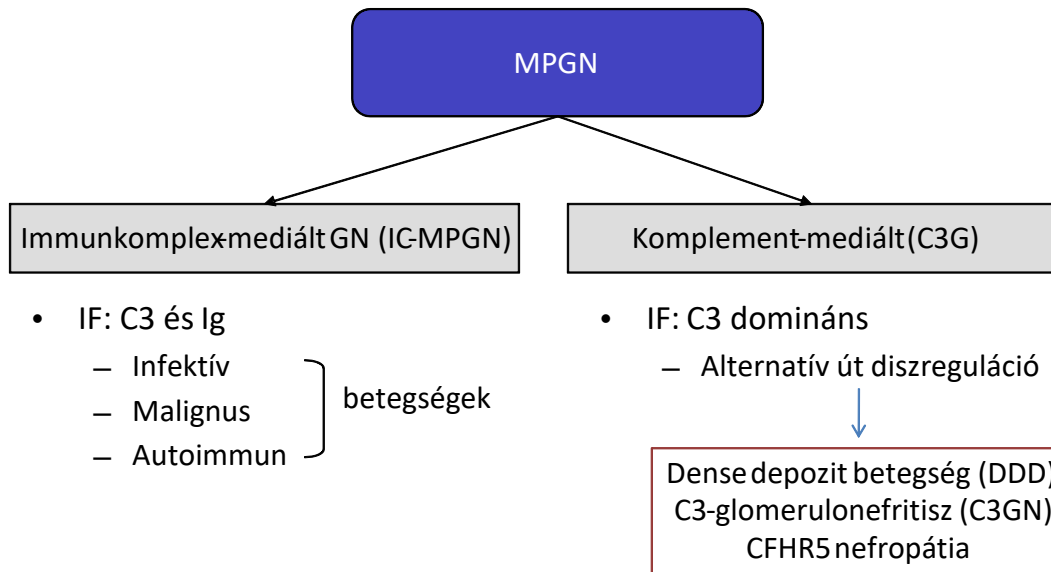
A membranoproliferatív glomerulonefritisz (MPGN) egy patológiai entitás. A fénymikroszkópos képet a mezangiális hipercellularitás, endokapilláris proliferáció, valamint a dupla kontúr képződéssel járó kapillárisfal megvastagodás jellemzi. Habár történetileg diagnózisként határozták meg, és három csoportra osztották, ma már egyértelműen a hisztológiai kép leírásaként használják.

Az MPGN1-re mezangiális proliferáció mellett mezangiális interpozíció, GBM duplikáció, illetve a mezangiális és szubendoteliális depozitumok jelenléte jellemző. MPGN2-re a nagyon elektrondenz intramembránózus depozitumok karakterisztikusak, míg az MPGN3-at általában a membranoproliferatív elváltozásokon kívül membránózus elváltozások is kísérik, mezangiális, szubendoteliális, szubepiteliális és esetenként intramembránózus depozitumokkal. Eredetileg az MPGN1 háttérében elsősorban IC-MPGN, autoimmun betegséghez vagy neoplazmához társuló glomerulonefritisz, illetve C3G állhatott. MPGN2-ként a dense deposit betegséget (DDD) definiálták. MPGN3 esetében két formát különítettek el egyértelműen, a Burkholder-formát, mely MPGN1-hez nagyon hasonló, de szubepiteliális elektrondenz depozitumok is jelen vannak, illetve a Strife/Anders formát. Ez utóbbi formában az intramembránózus depozitumok mellett irregulárisan szubendoteliális és szubepiteliális depozitumok is megfigyelhetők (47). Gyakran a Strife/Anders forma C3-glomerulonefritiszt reprezentál (48).

Az utóbbi években bevezetett újféle klasszifikáció esetében már előtérbe került a patogenezis alapú besorolás, amelyre nem reflektál az MPGN1-3 besorolás. A komplementrendszer alternatív útjának szerepének feltérképezése a betegség háttérében elkülönítette az immunkomplex-mediált és a komplement-mediált formákat (C3-glomerulopátia) (2. ábra).

Az immunkomplex-mediált formák esetében elsődleges a betegség kiváltó okának feltárása: ezek lehetnek infekciók (HBV, HCV, EBV), szisztémás autoimmunbetegségek (SLE, Sjögren-szindróma, reumatoid artritisz), különböző malignus betegségek (hematológiai neoplazmák, plazmasejt betegségek, karcinómák) (34).

Ezzel szemben a primer C3G háttérében az alternatív út sérült működése áll, bár ez is kialakulhat szekunder folyamat eredményeként.



**2. ábra.** A membranoproliferatív glomerulonefritiszek patogenezis szerinti osztályozása

## 2.2.2. C3-glomerulopátia

### 2.2.2.1. Klinikai jellemzők

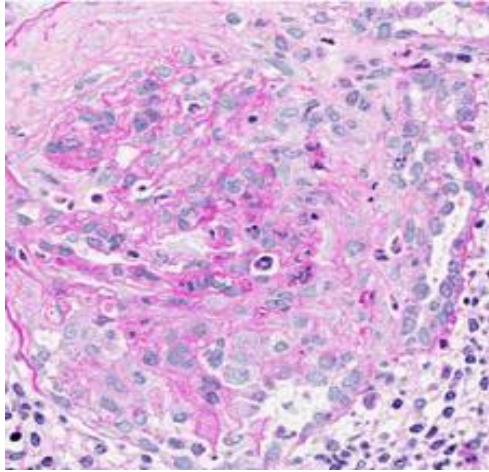
A C3G egy nagyon ritka betegség, incidenciája 1-2/millió fő (34, 49, 50) évente. A C3G két csoportra osztható a hisztológiai kép alapján, a C3-glomerulonefritiszre (C3GN) és dense deposit betegségre (DDD)..

A C3G klinikai képe nagyon sokféle lehet, széles spektrumon mozog, a glomerulonefritisz klasszikus tüneteit mutatja (51). Tünetmentes mikroszkópos hematuria, valamint proteinuriától a nefrózis szindrómáig, veseelégtelenségig terjedő tünetek jellemezhetik. Magasvérnyomás szintén kialakulhat a betegség következtében. Leggyakrabban gyerekeket, fiatal felnőtteket érint. DDD általában fiatalabb korban jelentkezik mint a C3GN (34, 50). Idősebb korban jelentkező C3G esetében fontos kizárni egyéb betegségeket. A betegség progressziója során sok esetben (~50%) végstadiumú vesebetegségbe (end-stage renal disease; ESRD) torkollik. Prognózis tekintetében egyértelmű különbséget nem sikerült azonosítani a különböző csoportok között. (52) Gyakran alakul ki különféle trigger esemény, például felsőlégúti infekció, Streptococcus fertőzés után (53). A laboratóriumi paraméterek közül a vesefunkciót és a vizeletet érintő vizsgálatok mellett elsődleges fontosságúak a komplementrendszer működésére irányuló

tesztek eredményei. Kiemelendő a gyakran tartósan alacsony C3 szint, normális C4 szinttel. A komplement aktivációs markerek szintje (C3a, sC5b-9) sok esetben emelkedett. Ezenkívül különféle patogenetikai tényezők jelenléte is igazolható (anti-H-faktor, nefritikus faktorok), melyeket a későbbiekben fogok részletesen tárgyalni. Fontos kizárni a monoklonális paraprotein jelenlétét a betegben, amely triggerelheti a folyamatot. Differenciáldiagnosztikai szempontból több betegség jár hasonló klinikai képpel, mint az IgAN, lupusz nefritisz, immunkomplex-glomerulonefritiszek. Fő problémát a posztinfekciózus glomerulonefritisztől (PIGN) való elkülönítése jelenti, mely a C3G-vel ellentétben gyakori kórkép. Megjelenésekor hasonló képet mutat a két betegség, ám a PIGN néhány hét alatt regrediál, a prognózisa jó, a C3 szint általában 3 hónapon belül normalizálódik, míg a C3G esetében ez nem történik meg. Ezenkívül a proteinuria tartós fennállása és a folyamatosan romló vesefunkció szintén nem jellemző a PIGN-re, így ezeknél az atípusos lefolyást mutató PIGN eseteknél fel kell vetni a C3G gyanúját, amely vesebiopszia elvégzését indokolja (54). További differenciáldiagnosztikai kihívást primer betegség szekunder formáktól való elkülönítése jelenti. Ezek lehetnek malignus betegséghez, autoimmun folyamatokhoz, paraprotein jelenlétéhez, vírusfertőzésekhez (HVC) társuló formák (34).

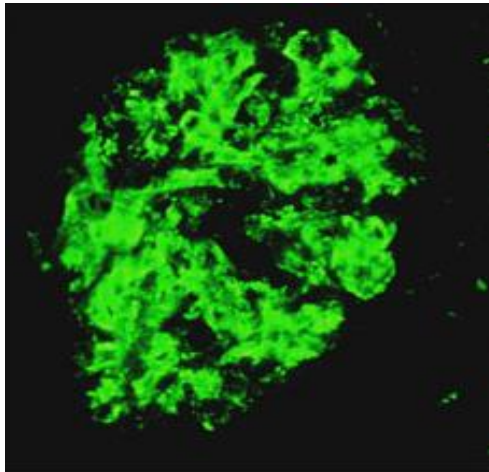
#### **2.2.2.2. Hisztológia**

A diagnózis felállítása a vesebiopszia alapján történik. A fénymikroszkópos képet a membranoproliferatív elváltozások jellemzik (3.ábra), de nem minden esetben. Előfordulhat még mezangiokapilláris és endokapilláris proliferatív formában is, valamint a múltban használt MPGN1-es és MPGN3-as képpel is. Ezen kívül leukocita infiltráció, intersticiális fibrózis, félhold képződés, és a betegség progressziója során glomeruláris szklerózis is gyakran előfordul (48).



**3. ábra.** C3-glomerulopátia fénymikroszkópos képe jellegzetes membranoproliferatív elváltozásokkal (Riedl et al. C3 glomerulopathy (34))

A diagnózis alkotáskor döntő jelentősége az immunfluoreszcens mikroszkópiás (IF) képnek van (4.ábra). Itt az immunkomplex-mediált MPGN-nel ellentétben a C3 jelölődés minimum két nagyságrenddel nagyobb, mint bármelyik egyéb immunreaktáns esetén (IgG, IgM, IgA, C1q). A domináns C3 jelölődés legszembetűnőbb a kapilláris fal mentén és a mezangiumban.



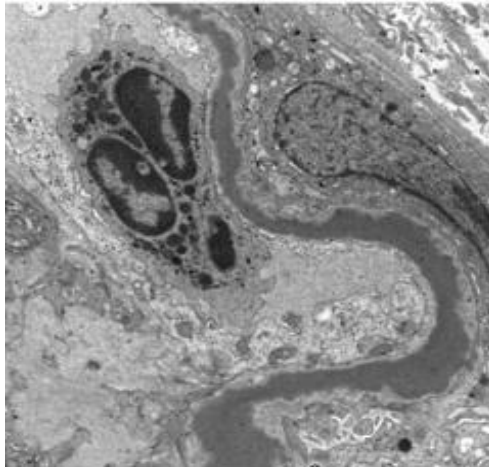
**4. ábra.** Erős C3 jelölődés C3-glomerulopátia immunfluoreszcens mikroszkópiás képén (Riedl et al. C3 glomerulopathy (34))

A C3 jelölődést az immunfluoreszcencia vizsgálat során C3c elleni antitesttel mutatják ki, amely több C3 fragmentumot is felismer, mint a iC3b, C3c, C3dg. Egyes esetekben nem kizárólagos a C3 jelölődés a biopsziás anyagon, kis mennyiségű immunglobulin is



előfordulhat. A DDD-s betegek egyharmadában fordul elő IgG az IF-en. Ez alapján alkották azt a definíciót, hogy C3 és Ig közötti különbségnek minimum két nagyságrendnek kell lennie. Bár még ezzel a meghatározással is vannak olyan DDD-ben szenvedő kivételek, akik rendelkeznek denz ozmofil depozitummal a GBM-ban, de nem teljesítik az IF kritériumait.

Bár a diagnózis általában egyértelmű a fénymikroszkópos és az immunfluoreszcens kép alapján, az altípusok további elkülönítése miatt elengedhetetlen az elektronmikroszkópia elvégzése is. Ez alapján a C3G-nak két formáját különíthetjük el: a C3GN-t kevesebb mezangiális, szubendoteliális, szubepiteliális depozitum jellemzi, míg a DDD esetében nagyon elektronenz ozmofil depozitum található a GBM-ban, illetve a mezangiumban, Bowman-tokban és a tubuláris bazális membrán mentén (47, 48) (5.ábra).



**5. ábra.** Ozmofil denz depozitum elektronmikroszkópos képe a glomeruláris bazális membránban denz depozit betegségben (Riedl et al. C3 glomerulopathy (34))

Ezenkívül egy ritka genetikai forma is elkülöníthető, mely a *CFHR5* gén internális duplikációja eredményeként létrejövő *CFHR5*-nefropátia. Ennek klinikai képe eltérő lehet. Általában torokfájás mellett jelentkező makroszkópos hematuria jellemzi magasvérnyomással és progrediáló veseelégtelenséggel (55).

### **2.2.2.3. Patogenezis**

A betegség patogenezisének háttérében az AP sérült regulációja áll. Ez az aHUS-sal ellentétben folyadék-fázisban zajlik, nem a felszínhez kötötten (5). Az azonosított patogenetikai tényezők közül az egyik csoportba a különböző szerzett, komplement komponensek elleni autoantitestek tartoznak, melyek a komplement komponensek modulálásán át eredményezhetik a diszregulációt. A másik csoportban genetikai abnormalitások állnak, melyek elsősorban a komplement-asszociált géneket érintik, ám ma már egyéb gének is a figyelem középpontjába kerültek. Az e módon károsodott fehérjék mennyiségük vagy funkciójuk megváltozásán keresztül módosíthatják a komplement reguláció folyamatát.

Annak ellenére, hogy számos patogenetikai tényezőt sikerült azonosítani a betegség háttérében, a betegek több, mint 30%-ban nem sikerül a diagnosztikusan elvégzett laboratóriumi és genetikai vizsgálatokkal etiológiai faktort kimutatni. Ezen esetek tisztázására és a patogenezis jobb megértése végett, kulcsfontosságú további faktorok feltárása, melyek magyarázatul szolgálhatnak ezekben a betegekben.

#### **2.2.2.3.1. Autoantitestek**

Az alternatív út sérült szabályozásának háttérében különböző, a komplement fehérjék ellen termelődő autoantitestek állhatnak (56). Ezek lehetnek H-faktor-, C3-, illetve B-faktor elleni autoantitestek, illetve különböző nefritikus faktorok, mint a C3 nefritikus faktor (C3NeF), C4 nefritikus faktor (C4NeF) és a C5 nefritikus faktor (C5NeF) (57-62). Ezeket az autoantitesteket elsősorban komplement-mediált glomerulonefritiszben mutatták ki, de előfordulhatnak IC-MPGN-ben is. Ezen antitestek nagyjából az esetek 40-80%-ban detektálhatók (34, 63, 64).

A nefritikus faktorok közül először a C3NeF-et írták le (65). Ezt az antitestet rutinszerűen mérik a nagyobb komplement laboratóriumokban világszerte. Nemcsak C3G-ben szenvedő betegekben, hanem lupusz nefritiszben, meningococcus meningitiszben és egészséges egyéneknél is kimutatták (66-68). Szintén detektálták öröklött parciális lipodisztrófiában szenvedő betegeknél (69) és okuláris druzen jelenléte (70, 71) esetében, mely lehet a C3G extrarenális manifesztációja is. A C3NeF az alternatív úton létrejövő

C3-konvertáz neoepitópjához kötődve stabilizálja azt (68), akadályozva a H-faktor, CR1, DAF általi inaktiválását, így megnöveli az enzim féléletidejét pár másodpercről akár 4-60 percre (72-76). Ennek eredményeként fokozott komplement aktiváció jön létre. Properdin-dependens és properdin-independens formáját különíthetjük el. Properdin-dependens formája a properdin-independens formával ellentétben nemcsak a C3-konvertáz, hanem a C5-konvertáz stabilizálására is képes (68). Properdin-dependens C3NeF általában C3GN-ben, míg a properdin-independens formája DDD-ben fordul elő gyakrabban (77, 78). A C3NeF körülbelül a DDD-s betegek 80 %-ában, míg a C3GN-ben szenvedő betegekben ennél ritkábban, nagyjából 40%-ban detektálható (56, 63, 79). A C3NeF jelenléte csökkent C3 szintekkel jár C3G-ben szenvedő betegekben (56). A C3NeF szintje fluktuálhat a betegség lefolyása alatt, de eddig nem sikerült egyértelmű összefüggést kimutatni a C3NeF aktivitása és a klinikai kép között. Bizonyos vizsgálatok pozitív összefüggést találtak a C3NeF előfordulása és a betegség progressziója között (80, 81).

A C5 nefritikus faktor (C5NeF) egy, a közelmúltban leírt IgG autoantitest, amely a C5-konvertáz stabilizálásáért felelős. Nemcsak a C3 csökkent szintjével korrelál a jelenléte, hanem a megnövekedett sC5b-9 szintjével is. C5NeF-t leggyakrabban C3GN betegekben azonosították (82).

A C4 nefritikus faktort először 1980-ban írták le (83), a legtöbb kapcsolódó publikáció ezekből az évekből származik. Az autoantitestet C3G-n kívül akut glomerulonefritiszben, lupusz nefritiszben, krónikus glomerulonefritiszben és Neisseria szepszisben mutatták ki (84). A C3NeF-hez hasonló funkciókkal rendelkezik, ám vele ellentétben a klasszikus/lektin úton létrejövő C3-konvertázt (C4b2a) képes stabilizálni dózis-függő módon. A C5-konvertáz stabilizálására is képes 10-szer akkora dózisban, mint a C3-konvertáz stabilizálására (84). A membránhoz kötött C4NeF-ral stabilizált C3-, illetve C5-konvertázokra a DAF általi inaktiválás hatástalan (76). 100 hipokomplementémiás MPGN-nek diagnosztizált beteget vizsgálva kimutatták, hogy jelen lehet C3NeF-ral együtt, illetve önállóan is. Érdekes megfigyelés, hogy dupla pozitív (C3NeF-ra és C4NeF-ra is pozitív) betegekben kifejezett terminális út aktivációt mutattak ki (85). A C4NeF-t nem mérik rutinszerűen a laboratóriumokban.

C3-elleni autoantitestet (anti-C3b) először a 20. század közepén írták le immunconglutinin néven, majd kimutatták, hogy az autoantitest a C3(H<sub>2</sub>O)-C3b-iC3b-

C3c közös epitópját ismeri fel. Infekció után, lupusz nefritiszben mutatták ki, ahol a betegség súlyosságával és alacsony C3 szinttel is korrelált a jelenléte, ezen kívül C3G-ban és IC-MPGN-ben szintén detektálták (86). *In vitro* körülmények között megnövelte az alternatív út C3-konvertázának aktivitását, illetve csökkentette a regulátorok hozzáférését a komplexhez (57). C3G-ben még tisztázatlan, hogy releváns faktor-e a betegség kialakulásában vagy egyszerű epifenomenon.

B-faktor elleni autoantitest jelenlétét szintén igazolták MPGN-nek diagnosztizált betegekben önállóan vagy anti-C3b-vel együtt. Az antitest jelenléte szintén megnövelte a C3-konvertáz aktivitását. A két antitestet az MPGN-es esetek kevesebb mint 10%-ban sikerült izolálni. Az esetek felében infekció szerepelt a kórelőzményben (57).

H-faktor elleni autoantitestet a betegek ~10%-ában lehet kimutatni. A C3G-ben kimutatott antitestek – ellentétben az aHUS-ban detektáltakkal, ahol a H-faktor C-terminális részéhez kötődnek, mely a felszínhez való kötésért felelős – a H-faktor N-terminális régiójához kötődnek (87, 88). Míg aHUS-ban a H-faktor elleni autoantitest jelenléte összefüggést mutat a *CFHR3-1Δ* homozigóta deléciójával, addig ezt az összefüggést nem sikerült kimutatni C3G-ben szenvedő betegekben. A C3G-ben jelenlevő anti-H-faktor antitestek kisebb aviditással kötődnek a H-faktorhoz, mint aHUS-ban kimutatott autoantitestek. Ezek az antitestek gyakran fordultak elő C3NeF-ral együtt gyermekekben, illetve monoklonális gammopátiával felnőttekben (62).

#### **2.2.2.3.2. Genetikai háttér**

A betegség kialakulásában a komplement fehérjéket kódoló géneket - elsősorban az alternatív úthoz tartozó fehérjéket - érintő genetikai eltérések is szerepet játszanak. Ezek lehetnek funkcióvesztéssel járó mutációk, melyek elsősorban a regulátorok csökkent működését eredményezik, illetve funkciónyerő mutációk, melyek az aktivátorok fokozott működésében nyilvánulnak meg. Az így felborult egyensúly az alternatív út túlaktiválódásához vezet, ami a sejtek sérülését eredményezi. A betegek kb. 20-25%-ában mutatható ki az eddig ismert patogenezisben érintett génekből mutáció vagy feltételezhetően patogén variáció, de a genetikai eltérésen kívül más tényező fennállása is szükséges betegség kialakulásához (79, 89-91).

A ritka patogén variációk elsősorban a komplement-asszociált géneket: a H-faktort (*CFH*), I-faktort (*CFI*), C3-at (*C3*), membrán-kofaktor proteint (*CD46*), B-faktort (*CFB*), Thrombomodulint (*THBD*) és a H-faktorról rokon 5-ös fehérjét (*FHR5*) kódoló géneket érintik (79). Fentiekén kívül a genomiális átrendeződés FH-FHR, illetve FHR-FHR hibrid fehérjéket eredményezve, vagy az internális duplikáció a H-faktor-rokon fehérje (*CFHR*) génekben szintén szerepet játszhat a betegség kialakulásában (92-94).

Nemcsak betegség okozó mutációkat, de rizikó haplotípusokat is azonosítottak a *CFH*, *C3*, *CD46* génekben (1. táblázat).

A *CFH* gént érintő mutációk elsősorban a fehérje N-terminális régióját érintik (scr1-4), szemben az aHUS-val, ahol leggyakrabban a C-terminális kódoló szakaszon azonosították. Leírtak heterozigóta, homozigóta és compound heterozigóta mutációkat is (95). Ezek általában csökkent C3b kötődést és kofaktor aktivitást eredményeztek. Bizonyos mutációk megakadályozzák a H-faktor kijutását az endoplazmatikus retikulumból, annak csökkent szintjét okozva (96).

A *CFH* gén Y402H polimorfizmusa a DDD kialakulására hajlamosított, míg a V62I polimorfizmus védő hatású (79).

A *C3* és *CFB* gént érintő mutációk közül elsősorban funkcionyerő mutációk fordulnak elő, melyek előfordulása nagyon ritka, viszont a konvertáz csökkent inaktiválódásával járhatnak. Az MCP, H-faktor és DAF általi inaktivációra rezisztenssé válva a konvertáz fokozott működését eredményezik (97-101).

A *C3* génben található R102G és P314L polimorfizmusok DDD kialakulására hajlamosítanak (90).

A *CD46* génben található mutációk szintén a komplement regulációt károsíthatják, továbbá a *MCP<sub>aagg</sub>* haplotípusa gyakoribb volt C3GN-ben és IC-MPGN-ben (56).

A *CFI* génben szintén előfordulhatnak mutációk (52), melyek a konvertáz inaktiválódását gátolva fenntartják a komplement aktivációt (102-104).

*THBD* gén A473V polimorfizmusa szintén gyakrabban fordult elő C3G-ban szenvedő betegekben (105).

## 1. Táblázat: Rizikó polimorfizmusok és haplotípusok C3G-ben

Gén	Exon/ Intro n	Fehérje	cDNS pozíció	SNP azonosító <sup>1</sup>	Típus	Ritka allél	MAF európai amerikaiakban <sup>2</sup>	MAF afrikai amerikaiakban <sup>2</sup>	MAF az 1000Genomes projektben <sup>3</sup>
<i>CFH</i>	2 (scr1)	p.V62I	c.184G>A	rs800292	Kódoló- misszensz	A	22,2%	70,8%	43,5%
<i>CFH</i>	9 (scr7)	p.Y402H	c.1204C>T	rs1061170	Kódoló- misszensz	C	38,2%	36,3%	27,8%
<i>C3</i>	3	p.R102G	c.304C>G	rs2230199	Kódoló- misszensz	G	20,9%	4,8%	9,8%
<i>C3</i>	9	p.P314L	c.941C>T	rs1047286	Kódoló- misszensz	T	20,5%	4,0%	8,6%
<i>THBD</i>	1	p.A473V	c.1418C>T	rs1042579	Kódoló- misszensz	T	17,9%	5,7%	16,5%
<i>CD46</i> ( <i>MCPaagt</i> rizikó haplotípu s)		-	c.-652G>A	rs2796267	Promóter	G	na	na	38,4%
		-	c.-366G>A	rs2796268	Promóter	G	na	na	36,7%
	9	-	c.989- 78G>A	rs1962149	Nem- kódoló	A	na	na	30,3%
		-	c.1127+638 G>A	rs859705	Nem- kódoló	A	na	na	31,8%
		-	c.*897T>C	rs7144	Nem- kódoló	C	na	na	34,72%

MAF: minor allél frekvencia

1: Az egy bázist érintő polimorfizmus (SNP - single nucleotide polymorphism) referencia száma a dbSNP adatbázis alapján (URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)).

2: A ritkább allél gyakorisága (MAF - minor allele frequency) 4300 európai/2203 afrikai származású amerikai személy adatai alapján az ESP (Exome Sequencing Project URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (02.2014)) szerint.

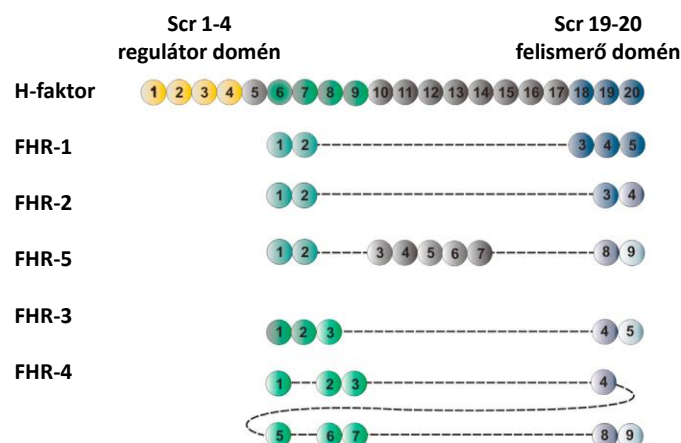
3: A ritkább allél gyakorisága (MAF - minor allele frequency) 1094 különböző eredetű személy adatai alapján az 1000Genomes fázis 1 (May 2011) vizsgálat szerint.

### 2.2.2.3.3. A H-faktorial rokon fehérje család

A H-faktorial rokon fehérje családnak 5 tagja ismert (FHR-1, -2, -3, -4, -5), melyek az 1q32 kromoszómán kódolódnak a komplement aktiválódás szabályozásához kapcsolódó génklaszter (regulators of complement, RCA) részeként. Az FHR-család tagjai short consensus repeat (scr) szekvenciákból épülnek fel, és nagyfokú homológiát mutatnak a H-faktorial, de egyikük sem tartalmazza a H-faktor regulátor doménjét, az scr1-4-et (6. ábra). Az FHR-eket felépítő scr-ek száma 4 és 9 között változhat. Az összes FHR képes kötődni a C3-hoz és aktivációs fragmentjeihez, illetve tartalmazzák a H-faktor C-terminális felszín felismerő doménjét (95). A fent említett homológia miatt feltételezik, hogy az FHR-fehérjék a komplementrendszer alternatív útjának regulációjában vehetnek részt, de az eddigi kutatások eredményei még megerősítésre várnak. A konzervált domének jelenléte alapján az FHR fehérjék két csoportra oszthatók.

Az 1-es csoportba az FHR-1, FHR-2 és FHR-5-ös proteinek tartoznak, melyek homodimerek és heterodimerek képzésére képesek, és konzervált N-terminális doménnel rendelkeznek (106).

A 2-es csoportba a FHR-3 és FHR-4 tartozik, melyekről dimerképző tulajdonságot nem írtak le, mivel hiányzik a N-terminális dimerképző motívuma (106). Nagyfokú homológiát mutatnak a H-faktor scr6-8 doménjeivel, melyek a heparinhoz és a CRP-hez való kötődést mediálják (107).



**6. ábra.** H-faktorial rokon fehérjék felépítése *Skerka et al. Complement factor H related proteins (CFHRs)-módosítva* (106)

A H-faktor és az FHR-fehérjék között tapasztalt magasfokú homológia felveti annak a lehetőségét, hogy ezek a fehérjék képesek kompetícióba lépni a H-faktoral a C3b kötését illetően (108, 109).

Az FHR-1 fehérjének két variánsa ismert, a CFHRA (FHR-1 $\alpha$ ) és CFHRB (FHR-1 $\beta$ ) (110, 111), mindkettő magasfokú homológiát mutat a H-faktor C-terminális szekvenciájával. Az FHR-1 plazmában mért koncentrációja 70-100  $\mu\text{g/mL}$  (112). Az FHR-1 képes kötni a C3-at és a C3b-t, illetve gátolni a C5-konvertázt és következményesen a MAC kialakulását (112), az scr1-2 domének által.

Az FHR-2 fehérje 4 scr alegységből épül fel, és a plazmában homodimereket vagy heterodimereket képez az FHR-1-gyel (113). Az FHR-2 becsült plazmakoncentrációja 1/10-e a H-faktorénak (H-faktor plazmakoncentráció: 250-880 mg/L) (114), és szintén rendelkezik komplement regulátor aktivitással. Képes gátolni a C3-konvertázt, ezzel az amplifikációs kört akadályozni anélkül, hogy C3b-t kötné (106, 115).

Az FHR-5-t részletesen a későbbiekben, külön részben tárgyalom.

Az FHR-3 proteint 5 scr domén alkotja, de nem tartalmaz N-terminális dimerizációs domént (116). A plazmában többféle variánsa jelenik meg, koncentrációja megfelel az FHR-1 koncentrációjának (117).

Az FHR-4-es fehérjét 9 scr alegység építi fel, és az FHR-3-hoz hasonlóan hiányzik a dimerizációs motívuma. A fehérje scr1-4 doménjei nagy mértékben megegyeznek az őket követő scr5-8 alegységekkel (118). A *CFHR4* gén két fehérjét kódol, az FHR-4A-t és az FHR4B-t, melyek közül az FHR-4B egy alternatív splice variánsa az FHR-4-nek (119). Az FHR-4 funkciója nem teljes mértékben tisztázott, ám irodalmi adatok alapján képes kötni a C3b-t, fokozni a H-faktor kofaktor aktivitását, illetve komplement aktiváló hatása is ismert (120). Továbbá az FHR-4A a C-reaktív proteinnel (CRP) kölcsönhatásba lépve a károsodott sejt felszínhez vándorol (107).

A *CFHR*-ek közötti nagyfokú homológia, illetve a közeli elhelyezkedés az 1q32 kromoszómán szintén esélyt ad a genomiális átrendeződésére a *CFHR* génekben, mely hibrid fehérjék képződéséhez vezethet. Ezeket a fehérjéket szintén leírták a betegség hátterében. Az FHR1-FHR5 hibrid protein familiáris C3G-t eredményezett, és kimutatták a hibrid protein versengését a H-faktoral a C3b kötőhelyért (92). Az FHR3-FHR1 hibrid szintén oki tényezőnek tekinthető családi halmozódást mutató C3G-ben (93), míg DDD-ben FHR2-FHR5 hibrid fehérjét azonosítottak (94).



#### 2.2.2.3.4. A H-faktorial rokon 5-ös fehérje

A H-faktorial rokon 5-ös fehérjét (FHR-5) 2001-ben írták le először McRae és munkatársai, komplement depozitumok részeként (121). A fehérje – melynek génje (*CFHR5*) az RCA géncluster 1q32 régiójában található (109) – a májban szintetizálódik, 65 kD molekulásúlyú és 9 scr régió építi fel (55, 109). Az N-terminális 2 scr doménjén keresztül dimereket képes alkotni, amely növeli a ligandkötés affinitását (115). Az FHR fehérjecsalád tagjai közül az FHR-5 mutatja a legnagyobb fokú homológiát a H-faktorial, figyelembe véve a H-faktor scr10-14-es doménjeivel, valamint a H-faktor C-terminális scr19-20-as doménjeivel észlelt nagy mértékű hasonlóságot (122).

Funkcionális *in vitro* vizsgálatokkal igazolták, hogy az FHR-5 fehérje képes kötődni a heparinhoz, CRP-hez, pentraxin-3-hoz (PTX3), illetve az extracellularis mátrix (ECM) bizonyos komponenseihez (109, 123). Kimutatták azt is, hogy képes gátolni folyadék fázisban a C3-konvertázt (109), valamint a PTX3 kötésével képes szabályozni a H-faktorialon keresztüli komplement aktivációt, továbbá ECM-hez kötődvé gátolja a H-faktor felület-asszociált kofaktor aktivitását (123).

Az FHR-5-öt – mint kóroki tényezőt – először Gale és munkatársai írták le 2010-ben a C3G háttérében (124). A *CFHR5*-nefropátia egy autoszómális domináns módon öröklődő, endémiás formája a C3G-nek, melyet ciprusi populációban azonosítottak. A betegség kialakulásáért a *CFHR5* gén 2-es és 3-as exonjának internális duplikációja felelős (ezek az exonok az FHR-5 protein scr1-2-es doménjét kódolják) (124) és *in vitro* vizsgálatok alapján a mutáns FHR-5 fehérje a membrán-kötött C3b-hez gyengébben kötődik, mint a vad típusú fehérje. A *CFHR5*-nefropátia általában mikroszkópos és torokfájással egyidőben jelentkező makroszkópos hematuria epizódjaival jelenik meg, nagyjából a betegek fele progrediál ESRD-be. A C3 szintje nem csökkent a betegekben, mely feltehetően a lokálisan zajló komplement aktivációra utal a GBM-ban. A hisztológiai képet szubendoteliális és mezangiális depozitumok jellemzik (124).

A *CFHR5* genetikai analízise az utóbbi években több betegségben is felvetette esetleges patogenetikai szerepét, úgymint aHUS-ban, IgAN-ban vagy MPGN-ben (125-127).

#### 2.2.2.4. Terápia

Mivel a betegség hátterében nagyon sokféle etiológia lehet, illetve még nem ismerjük az etiológia minden részletét teljes mértékben, így a terápiás megközelítés bonyolult. Mivel nagyon ritka betegségről van szó, a terápiás evidenciák igazolása akadályokba ütközik (48).

Stratégiaként elsősorban a szupportív és az immunszuppresszív terápiák jönnek számításba. Tüneti terápiaként ACE-inhibitor, angiotenzin-receptor-gátló kezelés alkalmazható (34). Immunszuppresszióként egyrészt szteroid jön szóba, amely hosszútávon alkalmazva csökkentette a proteinuriát. A mikofenolát mofetilt önállóan vagy szteroiddal kombinációban alkalmazzák elsősorban idiopátiás MPGN-ben. Szteroiddal együtt alkalmazva a betegek nagyobb része maradt a klinikai remisszió stádiumában az egyéb immunszuppresszív terápiában részesülőkhöz viszonyítva (128). Calcineurin-inhibitorokat, mint a tacrolimust és cyclosporint elsősorban szteroidrezisztens nefrózis szindróma esetén alkalmazzák. Ezen kívül autoantitestek jelenléte esetén ciklofoszfamid, B-sejt gátló terápiaként rituximab jön még számításba. Szintén a kezelések körébe tartoznak a különböző plazmaterápiák, mind a plazmaferézis, mind a plazmapótlás, attól függően, hogy milyen patogenetikai tényezőket lehet azonosítani, bár hatékonyságukra egyértelmű bizonyítékot még nem találtak (48).

2012 óta a terápiás választások nagyban módosultak, mivel a komplement-gátló terápiák megjelenése új távlatokat nyitott a betegség kezelésében. A humán C5-elleni antitestet, az eculizumabot először paroxizmalis nocturnalis hemoglobinuriában használták eredményesen (129, 130). Ezután került törzskönyvezésre aHUS-ban, ahol áttörő eredményeket értek el az alkalmazásával (131). A komplement terminális útjának gátlásával megakadályozza az alternatív út diszreguláció eredményeként létrejövő sejt- és szövetkárosodást. C3G-ben még csak off-label terápiaként használják az eculizumabot. A vele kapcsolatos tapasztalatok még nem szolgálnak egyértelmű bizonyítékként ebben a betegségben való hatásosságáról. Ennek oka lehet egyrészt, hogy a C3G esetében elsősorban a C3-konvertáz szintjén lévő reguláció érintett, míg aHUS esetében a C5-konvertáz szintjén megvalósuló reguláció sérült. Másrészt még a C3G esetében a folyadék-fázisban jelentkezik a komplement diszreguláció, addig aHUS-ban ez a felszínhez kötötten zajlik.

Egyéb új komplement-gátló terápiák is kifejlesztés alatt állnak, az eddigi eredmények reménykeltőek. Fázis II vizsgálatnál tart az avapocan, mely egy C5aR1 inhibitor; ALXN1210, ami egy hosszúhatású anti-C5 humanizált ellenanyag (132); D-faktor elleni inhibitor az ACH0144471; intravénás MASP-2 gátló az OMS721; C3-inhibitor az APL2. Két további szer már a klinikai kipróbálás stádiumánál tart, ezek az AMY101, mely egy szubkután C3-inhibitor, illetve a LPN023, ami egy orálisan szedhető B-faktor inhibitor. Különös jelentőségű a TP10, amely egy C3-konvertáz gátló szolubilis komplement-receptor, így a C3G kezelésében remélhetőleg kulcsfontosságúvá válhat a közeljövőben (132).

Ha a C3G ESRD-be progrediál (átlagosan 10 év alatt) (133), akkor elengedhetetlen a hemodialízis vagy peritoneális dialízis megkezdése, illetve végső soron vesetranszplantáció elvégzése. A betegség rekurrenciája a graftban igen magas (~50%) és általában 2-3 év alatt kialakul (51, 134), ezért nagyon fontos a transzplantáció előtt a pontos kivizsgálás, genetikai háttér feltárása, hogy adekvát kezelés, esetleges eculizumab védelem mellett történjen a transzplantáció.

### 2.3. Új megközelítés a membranoproliferatív glomerulonefritiszek osztályozásában

Habár az ismereteink nagyban bővültek a MPGN-nek patogenezisét illetően, több kérdés is megválaszolatlan maradt. Az elkülönítés az immunkomplex-mediált és a komplement-mediált csoportok között nem minden esetben egyértelmű, mint ahogy ezt a ma létező klasszifikációban meghatározták. Egyrészt nem egyértelmű az elkülönítés sok esetben a C3GN és DDD között, néha még IC-MPGN között sem, illetve az ismételt biopsziák sokszor különböző képet mutatnak (48, 135, 136). Az a tény, hogy az alternatív út diszreguláció a legfontosabb az elkülönítésben a Ig-negatív és Ig-pozitív MPGN között, nem tűnik egyértelműnek, mivel sok esetben IC-MPGN-ben is található AP diszregulációra utaló tényezők, mint C3NeF vagy alacsony C3 szint normális C4 szinttel (56, 79). A karakterisztikusnak mondott immunfluoreszcens C3 jelölődés megállapításához DDD-ben szenvedő betegeket vettek alapul, nem az igazolt AP diszregulációval rendelkezőket (135). A különböző patológiai kép a C3GN és DDD esetében nem utal különböző patogenezisre (89, 137-139).

Ezen kérdések tisztázására Iatropoulos és munkatársai egy új statisztikai megközelítést alkalmaztak. Kizárólag a betegek klinikai, genetikai, hisztológiai és komplement eredményei alapján egy hipotézis-mentes, adatvezérelt hierarchikus klaszter analízist végeztek, mely eredményeként 4 különálló csoportot kaptak. Ezek háttérében különböző patogenezist feltételeztek (140).

Az 1-es klasztert nagy mértékű komplement aktiváció jellemezte alacsony C3 szinttel, a valószínűleg patogén genetikai variációk (likely pathogenic variation; LPV) és C3NeF magas előfordulási gyakoriságával. A betegek diagnóziskori átlagos életkora alacsony volt (15 év). A biopsziás képet kevés félhold képződés jellemezte, mezangiális depozícióval(140).

A 2-es klaszterbe tartozó betegeknél szintén intenzív komplement aktiváció volt látható az AP abnormalitás kialakulásáért felelőssé tehető tényezők magas prevalenciájával (LPV/C3NeF), illetve magasabb Ig jelölődéssel és gyakoribb szubendoteliális depozitumokkal a mikroszkópos képen. A nefrózis szindróma előfordulása magasabb volt (140).

A 3-as klasztert ezzel szemben alacsonyabb sC5b-9 plazma szint jellemezte, alacsony C3 szinttel és LPV/C3NeF magas előfordulási gyakorisággal, illetve az intramembránózus

elektronenz depozitum jelenlétével. A legtöbb DDD-ben szenvedő beteg ebbe a klaszterbe esett (140).

A 4-es klasztert alacsonyabb mértékű komplement aktiváció jellemezte, magasabb C3 szinttel, ritkábban előforduló LPV/C3NeF-ral. Ebbe a klaszterbe idősebb betegek tartoztak és több szklerotikus glomerulus volt látható a biopszián. 4 beteg esetében trombotikus mikroangiopátiát diagnosztizáltak a betegség lefolyása során (140).

Ezek alapján elkülönítették az 1-3-as klasztert, ahol masszív folyadék-fázisú, és a 4-es klasztert, ahol felszínhez kötött komplement aktivációt feltételeztek. Az így elkülönített klaszterek összefüggést mutattak a betegek vesetűlésével, mely a hisztológiai besorolással nem mutatott kapcsolatot. A 4-es klaszterbe tartozó betegeknek, akiknél a szilárd-fázishoz kötött komplement aktivációt hipotetizáltak, rosszabb volt a vesetűlése a többi klaszterhez viszonyítva (140).

Kérdéses, hogy ezek a klinikailag releváns klaszterek felválthatják-e a hisztológiai alapú besorolást. A klaszter alkotás nagyban függ a vizsgált adatoktól, így fontos, hogy független beteganyagon is megismételhetőek-e a közölt megfigyelések (141).

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A membranoproliferatív elváltozások háttérében lezajló patomechanizmus még nem teljes mértékben tisztázott. Sok esetben nem lehet egyértelműen elkülöníteni az immunkomplex- és a komplement-mediált formákat. Habár sok tényezőt azonosítottak a betegség háttérében, mind genetikai, mind szerzett etiológiai faktorokat, melyeknek okozati vagy rizikó szerepe lehet - mint például különböző autoantitestek vagy SNP-k -, még mindig a betegek több mint 30%-ában nem sikerül oki tényezőt találni a napjainkban rutinszerűen végzett diagnosztikus tesztekkel és genetikai analízissel.

Célunk az volt, hogy feltárjuk új, potenciális genetikai, illetve szerzett patogenetikai faktorok szerepét a betegségben, továbbá új megközelítésből vizsgáljuk betegeinket.

#### 3.1. H-faktorral rokon 5-ös fehérje szerepének vizsgálata C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban

Az FHR-5 fehérje nagyfokú szerkezeti homológiát mutat a H-faktorral, így korábbi vizsgálatok alapján felmerült, hogy patogenetikai szerepe lehet a komplement-mediált vesebetegségekben. Ennek tisztázására eddig főleg kisebb esetszámú vizsgálatokat közöltek. Nagyobb esetszámú leíró vizsgálatokat elsősorban IgAN-ban szenvedő betegekről írtak le. Vizsgálatunk az első, melyben nagyszámú C3G/IC-MPGN-ben szenvedő beteg bevonásával vizsgáljuk az FHR-5 szintek és genetikai variációi lehetséges szerepét.

Az FHR-5 szérumszint mérésére házi ELISA módszert állítottunk be, és ezzel párhuzamosan a *CFHR5* gén szekvenálásával meghatároztuk a betegek által hordozott genetikai variációkat.

Vizsgálatunkban a következő kérdésekre kerestünk válaszokat:

1. Van-e különbség a betegek és az egészséges egyének FHR-5 szérumszintjei között?
2. Tapasztalható-e eltérés a *CFHR5* variációt hordozók és nem-hordozók FHR-5 szintjének tekintetében?

3. Megfigyelhető-e összefüggés az FHR-5 szintek és a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement paraméterei között?
4. Van-e összefüggés a *CFHR5* variációk, az FHR-5 szérumszintek és a betegek vesetúlélése között?

### **3.2. C4 nefritikus faktor vizsgálata a C3G/IC-MPGN-es betegpopulációban**

A C4NeF-t rutinszerűen nem mérik a komplementrendszer működésével foglalkozó laboratóriumokban. Az 1980-as években közölt tanulmányok szerint előfordulhat önállóan vagy C3NeF-ral együtt lupusz nefritiszben, membranoproliferatív glomerulonefritiszben, akut glomerulonefritiszben egyaránt. Célunk az volt, hogy az irodalomban először nagyszámú C3G/IC-MPGN-ben szenvedő beteg bevonásával vizsgáljuk a C4NeF előfordulását és kapcsolatát egyidejűleg a betegek klinikai, genetikai és egyéb komplement paramétereivel összefüggésben. Ennek elvégzéséhez beállítottuk a C4NeF aktivitásának hemolítikus módszeren alapuló mérését nagyszámú beteg és egészséges kontroll bevonásával.

A következő aspektusokat vizsgáltuk:

1. Feltárható-e valamilyen összefüggés a C4NeF előfordulása és a hisztológiai csoportok között?
2. Milyen összefüggést mutat a C4NeF előfordulása a betegek különböző klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement paramétereivel?
3. Megfigyelhető-e összefüggés a betegek vesetúlélése és a C4NeF jelenléte között?

### **3.3. A hisztológiai besorolástól független, adat-vezérelt, hipotézismentes klaszteranalízis végzése a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement eredményei alapján**

Iatropoulos és munkatársai négy klasztert azonosítottak kizárólag a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement paramétereire alapján. A így kapott klaszterek összefüggést mutattak az AP diszregulációval, genetikai és szerzett abnormalitásokkal, illetve a betegek vesetűlésével. Kíváncsiak voltunk, hogy egy teljesen független betegcsoporton - mely megfeleltethető az eredeti vizsgálatban közölt betegcsoportnak - megismételve az analízist, validálhatóak-e az ott közölt eredmények:

1. Összevethetőek-e az általunk kapott klaszterek az eredeti vizsgálatban karakterizált klaszterekkel, illetve levonhatóak-e hasonló következtetések belőlük?
2. Mutat-e különbséget a betegek vesetűlése a különböző klaszterek között? A hisztológiai csoportokhoz képest jobban jelzik-e a klaszterek a betegség lefolyását?
3. Feltárhatóak-e további komplement paraméterek, melyekkel összefüggést mutatnak a klaszterek? Van-e eltérés a különböző klaszterekben a C4NeF előfordulását illetően, illetve feltárható-e valamilyen összefüggés a különböző klaszterek és a betegek FHR-5 szintjei, illetve az azonosított variációk között?



## 4. MÓDSZEREK

### 4.1. Betegek

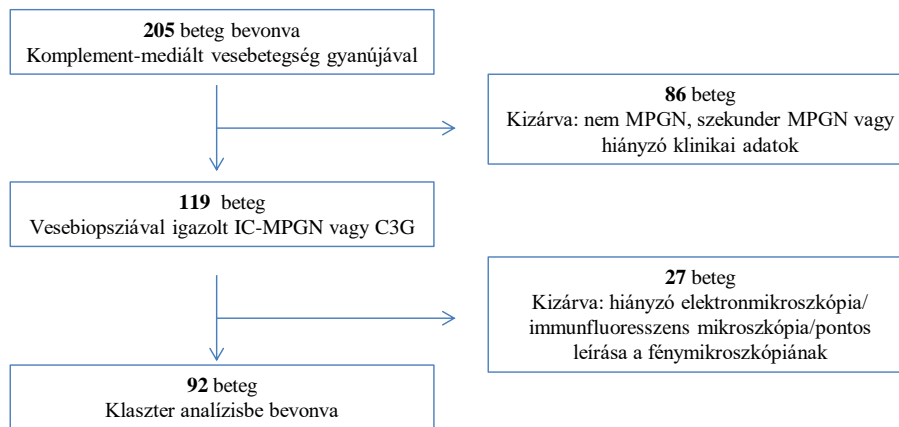
A beválasztásnál célunk hisztológiával igazolt MPGN diagnózissal (immunkomplex-mediált vagy komplement-mediált forma) rendelkező betegek bevonása volt a vizsgálatba.

A betegek gyűjtése 2008. január és 2018. május között történt. 34 közép-európai klinikai központból 206 beteg vérmintája érkezett komplement laboratóriumunkba feltételezett komplement-mediált vesebetegség diagnózissal komplement mérésekre, illetve genetikai analízisre. 86 beteg került kizárára alternatív diagnózis (n=21), szekunder folyamat eredményeként kialakuló MPGN bebizonyosodása (n=2), illetve hiányzó klinikai adatok (n=63) miatt (7. ábra). A fennmaradó 120 beteget szövettannal bizonyított MPGN-nel diagnosztizálták immunkomplex- vagy komplement-mediált formában.

Ezen bevonásra került 120 betegből (7. ábra) 67 (55,8%) beteget diagnosztizáltak IC-MPGN-nel, 12 főt (10%) DDD-vel, míg 41 egyént (34,1%) C3GN-nel. 1 betegnél nem volt lehetőségünk a C4NeF meghatározására, így az erre irányuló vizsgálatokra 119 beteget vontunk be.

A 120 igazolt MPGN-nel rendelkező betegből 28 beteget zártunk ki a betegek klinikai, hisztológiai, komplement és genetikai eredményein alapuló klaszter analízisből, hiányzó elektronmikroszkópia, immunfluoreszcens mikroszkópia miatt, mivel a klaszter analízishez hiánytalan adathalmaz szükséges (a kizárt betegek hasonlóak voltak a bevont betegekhez a meglévő vizsgált paraméterek tekintetében) (7. ábra).

A bevont 92 beteg közül 11 (12%) betegnél diagnosztizáltak DDD-t, 37 főnél (40,2%) C3GN-et és 44 személynél (47,8%) IC-MPGN-t. Nem volt különbség a betegek neme és kora között a hisztológiai csoportokban.



### 7. ábra. Betegek beválogatása

A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (55381-1/2015/EKU) engedélyezte.

A betegek, illetve gyermekek esetében szüleik felvilágosításuk után írásos beleegyezésüket adták a vizsgálatban való részvételhez, a diagnosztikus tesztek és a genetikai vizsgálatok elvégzéséhez.

### 4.2. Kontroll személyek

85 (67 felnőtt, 18 gyermek) egészséges személyt vontunk be az FHR-5 szerepére irányuló vizsgálatba, illetve 48 egészséges egyént a C4NeF módszer beállításához, illetve a pozitivitás határértékének meghatározásához. A kontroll személyek egészségügyi szűrésen vettek részt. Ezen személyeknek ismert betegségük nem volt a vérvétel időpontjában.

### 4.3. Biopsziák

A vesebiopsziák értékelése a fény-, immunfluoreszcens- és elektronmikroszkópiát elemző kérdőív alapján történt. Ennek kitöltését 69 esetben a patológusok végezték, 50 esetben az eredeti biopsziás lelet alapján mi végeztük. A diagnózis meghatározásánál a biopsziát leletező orvos véleményét vettük alapul. Ha a diagnózis kérdéseket vetett fel, illetve az immunfluoreszcenciás kép nem felelt meg a jelenlegi klasszifikáció alapján a diagnózisnak, abban az esetben a hisztológiai kép alapján felülbíráltuk a patológus véleményét .

### 4.4. Mintavétel

A betegektől, illetve egészséges kontrolloktól a mintavétel (szérum, EDTA-antikoagulált plazma és Na-citrát antikoagulált plazma) könyökvénából, illetve centrális vénás katéteren keresztül történt. A sejteket és a felülúszót a mintavétel utáni centrifugálással választották el és szállították a laboratóriumunkba. A szeparált alikvótokat  $-70\text{ °C}$ -on tároltuk a mérésekig.

### 4.5. Klinikai adatok

A betegek klinikai adatait, illetve laborparamétereit mind a diagnóziskor, mind a követés ideje alatt a klinikusok segítségével gyűjtöttük össze standardizált kérdőív alapján.

A glomeruláris filtrációs ráta (GFR) meghatározása GFR-EPI egyenlet alapján történt felnőttek, illetve „ágy melletti Schwartz” egyenlettel gyermekek esetében. A vesekárosodást  $60\text{ mL/perc}/1,73\text{m}^2$  alatti GFR-ként definiáltunk, míg a veseelégtelenséget  $15\text{ mL/perc}/1,73\text{m}^2$  GFR alatt vagy fennálló vesepótlókezelés (dialízis, vesetranszplantáció) esetében határoztuk meg.

#### 4.6. Komplement paraméterek meghatározása

A szérum C3 és C4 koncentrációjának meghatározása turbidimetriás módszer segítségével történt (*Beckman Coulter, Brea, CA*).

Az alternatív út aktivitásának mérése gyári forgalomban kapható Wieslab AP ELISA kit-tel történt (*EuroDiagnostica, Malmö, Sweden*) a gyártó instrukcióinak megfelelően.

A klasszikus út összkomplement aktivitása hemolítikus titráción alapuló Mayer módszerrel történt (142).

Az I-faktor és a B-faktor antigén koncentráció specifikus antitestet (I-faktor elleni antitest, B-faktor elleni antitest: *Quidel*) használó radiális immundiffúzió segítségével került meghatározásra (143).

A H-faktor, C1q, anti-H-faktor és anti-C1q szinteket házi ELISA módszerekkel határoztuk meg, ehhez az alábbi reagenseket használtuk: anti-H-faktor, *Binding site*; anti-C1q, *Binding site*; H-faktor, *Merck*; C1q, *Quidel*) (143-145).

Az anti-C3 és anti-B-faktor titerek meghatározására házi ELISA módszert alkalmaztunk. Mikrotitráló ELISA lemezt 1 µg/mL PBS-ben oldott kereskedelmi forgalomban kapható C3 fehérjével, illetve B-faktorral (*Quidel*) fedtünk egy éjszakán át. Másnap blokkoltuk a lemezt PBS 0,5% BSA-t tartalmazó oldattal. A betegmintákat PBS 0,05% Tween-t tartalmazó pufferben hígítottuk 1:50-ben, és a lemezhez adtuk, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A kötött antitesteket 1:2500-ban PBS 0,5% BSA 0,05% Tween 20-at tartalmazó oldatban hígított, tormaperoxidázzal jelölt anti-humán-IgG antitestekkel mutattuk ki TMB szubsztrát hozzáadása után. A minták optikai denzitását 450/620 nm-en mértük. A mintákat a normál humán szérum keverék (NHS) különböző hígításaihoz hasonlítottuk és pozitívnak értékeltük, ha az NHS megfelelő hígításának OD értékénél szignifikánsan (>2SD) nagyobb volt.

A C3NeF meghatározása Rother és munkatársai által kidolgozott hemolítikus módszer alapján történt a betegek szérumában (146). Alseverben oldott birka vörösvértesteket veronál puffer (VBS) -EDTA, majd VBS-EGTA pufferben mostunk. Ezután a sejteket tovább oldva VBS-EGTA pufferben, beállítottuk a sejtszámot  $5 \times 10^8$ /ml-re. Az így létrejött sejtek 15 µl-hez 5-5 µl NHS-t, pozitív kontrollt és a betegek szérumait adtuk hozzá. Ezután 10 percig 30°C-on inkubáltuk a sejteket, majd többször mostuk őket VBS-

EDTA oldattal. Ezt követően 25 µl VBS-EDTA-ban 1:1-ben hígított patkányszérumot adtunk hozzá (C5-C9 forrás) és inkubáltuk a sejteket 1 órán át 37 °C-on. Az inkubáció után hideg VBS-EDTA hozzáadásával állítottuk le a reakciót, és a felülúszóban a hemolízist detektáltuk 405 nm-en. A hemolízis mértékét a teljes lízishez viszonyítva adtuk meg. A C3NeF aktivitás pozitivitási küszöbértéke 10% volt.

További komplement komponensek, aktivációs markerek és hasítási termékek (D-faktor, sC5b-9, C3a, Bb, C4d) kereskedelmi forgalomban kapható gyári ELISA kit segítségével kerültek meghatározásra a gyártó útmutatásai alapján (HyCult Complement Factor D, Human, ELISA kit HK343-02; MicroVue C3a-desArgEIA, A032; MicroVue C4d EIA, A008; MicroVue sC5b-9 Plus EIA, A029; MicroVue Bb Plus EIA, A027).

Röviden összefoglalva, a D-faktor szinteket anti-humán D-faktoriall fedett mikrotitráló lemezekon határoztuk meg. A hígított standardokkal és mintákkal 1 órán át szobahőmérsékleten történő inkubáció után a kötött antigéneket biotinnal jelölt antitest majd szterptavidin-preoxidáz konjugátummal mutattuk ki TMB szubsztrát hozzáadása után. A minták optikai denzitás értékeit 450 nm-en spektrofotométer segítségével detektáltuk.

A C3a, Bb, sC5b-9 és C4d szinteket MicroVue Enzyme Immunoassay kitek segítségével határoztuk meg: az egerben termelt, monoklonális anti-humán-C3a, anti-Bb, anti-sC5b-9 és anti-humán-C4d ellenanyagokkal fedett lemezekon inkubáltuk a standardokat, a kontrollokat és a gyártói útmutatásoknak megfelelően hígított EDTA-plazma mintákat 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezt követően C3a-ra, Bb-re, sC5b-9-re, illetve C4d-re specifikus, tormaperoxidázzal jelölt monoklonális ellenanyagokkal inkubáltuk a lemezeket 60 percig szobahőmérsékleten, majd TMB szubsztráttal színreakciót idéztünk elő. A minták optikai denzitását 405 nm-en, illetve 450 nm-en mértük. A minták koncentrációját a különböző kitek standard sorai alapján határoztuk meg.

#### **4.6.1. A H-faktoriall rokon 5-ös fehérje szérumszintjének meghatározása**

Az FHR-5 szérumszintjét házilig beállított ELISA módszerrel határoztuk meg. Mikrotitráló ELISA lemezt 1 µg/mL PBS-ben oldott kereskedelmi forgalomban kapható monoklonális eger anti-humán FHR-5 antitesttel (IgG1, clone #390513, R&D Systems) fedtünk egy éjszakán át 4°C-on. Ezután PBS 2% BSA-t tartalmazó oldat hozzáadásával

blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A mintákat 1:100-ban hígítottuk PBS 1% BSA Tween-20-at tartalmazó oldatban, majd a lemezhez adva 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. Következő lépésben poliklonális kecske anti-humán FHR-5 IgG-t (R&D System) adtunk hozzá és 1 órán keresztül inkubáltuk. A kötött antitesteket 0,1 µg/mL tormaperoxidázzal (HRP) jelölt anti-kecske IgG-vel mutattuk ki TMB szubsztrát hozzáadását követően. A minták optikai denzitását 450/620 nm-en detektáltuk. A minták koncentrációját a rekombináns humán FHR-5 (R&D Systems) felező hígítási sora alapján felállított standard görbe alapján határoztuk meg.

#### 4.6.2. Western blot

A betegek és egészséges kontroll személy szérum mintáját 10%-os SDS-PAGE-n szeparáltuk nem-redukáló körülmények között, majd blottoltuk nitrocellulóz membránra. A blottolás után a membránt blokkoltuk 4% tejport és 1% BSA-t tartalmazó PBS pufferben.

A membránt inkubáltuk poliklonális kecske-, illetve monoklonális anti-FHR-5 antitesttel (R&D) majd HRP-vel konjugált szekunder antitesttel hívtuk elő (nyúl anti-kecske és kecske anti-egér IgG; Southern Biotech, Birmingham, USA). A kötött antitesteket Clarity Western Szubsztráttal (Bio-RAD, California, USA) detektáltuk.

#### 4.6.3. C4 nefritikus faktor meghatározása

A C4 nefritikus faktor (C4NeF) aktivitásának meghatározását Zhang és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján állítottuk be (147).

Alsever oldatban oldott hemolizinnel szenitizált birkavörösvértesteket (EA) használtunk a reakcióhoz. A sejteket  $\text{Ca}^{2+}$ -ot és trietiléntetramin-N,N,N',N'',N''',N''''-hexaacetsav kelátképzőt tartalmazó zselatin-veronál (GVB) pufferben mostuk. Normál humán szérummal inkubáltuk a sejteket 30°C-on 5 percig, mely idő alatt EA+C1+C4 sejteket építettünk fel. Ezután a sejteket  $\text{Ca}^{2+}$ -ot tartalmazó GVB pufferben mostuk és inkubáltuk 30 percig 0°C-on, majd további 30 percig 37°C-on. Ezután  $\text{Ca}^{2+}$ -ot és  $\text{Mg}^{2+}$ -ot tartalmazó GVB pufferrel mostuk a sejteket, mely lehetővé tette a humán C2 fehérje (Calbiochem) kötődését az EA+C1+C4 sejtekhez 30 °C-on 5 perces inkubáció után. Ezután a kialakult EA+C1+C4+C2 sejteket EDTA-GVB pufferben szuszpendáltuk, mely

ennél a pontnál leállította a reakciót. 100 µl sejthez 2,4 ml desztillált víz adását követően 541 nm-en megmértük az oldat optikai denzitását, majd ez alapján EDTA-GVB pufferrel való további hígításával  $5 \times 10^8$ /ml-re állítottuk be a sejtszámot. 15 µl EA+C1+C4+C2 sejthez 5-5 µl betegmintát adtunk, illetve kontrollként NHS-t, illetve egy ismert C4NeF pozitív beteg mintáját. A mintákat így 10 percig 30 °C-on inkubáltuk, majd négyszer mostuk 200 µl EDTA-GVB oldattal. A mosási lépések után 1:2-ben EDTA-GVB-ben hígított patkányszérumot adtunk a sejtekhez, mely a C5-C9 komplement komponenseket tartalmazó forrásként szolgált. 1 órán át tartó 37 °C-on történő inkubálás után 200 µl hideg EDTA-GVB oldat hozzáadásával leállítottuk a reakciót. 5 perc 3000 rpm-en történő centrifugálás után a felülúszó 150 µl-nek meghatároztuk az optikai denzitását 405 nm-en spektrofotométer segítségével. A C4NeF aktivitását, mely arányos a felülúszóban tapasztalható lízis mértékével a teljes lízishez képest %-ban kifejezve adtuk meg. A pozitivitási határérték 48 egészséges kontroll személy C4NeF aktivitásának meghatározásának átlag+2SD értékeként adtuk meg, mely 18%-nak adódott.

#### 4.7. Genetikai vizsgálatok

Ritka variációk, rizikó polimorfizmusok, mutációk feltérképezésére Sanger-szekvenálást végeztünk a komplement fehérjéket kódoló, illetve azokkal kapcsolatban levő génekben, úgymint H-faktor (*CFH*; MIM# 134370), I-faktor (*CFI*; MIM#217030), membrán kofaktor fehérje (*CD46*; MIM#120920), thrombomodulin (*THBD*; MIM#188040), B-faktor (*CFB*, MIM#138470), C3 (*C3*, MIM#120700) és FHR-5 (*CFHR5*; OMIM# 608593).

A DNS izolálást követően PCR amplifikálását végeztünk. A PCR reakcióhoz dNTP-t (deoxiribóz-nukleotid trifoszfát), 5x Promega GoTaq Flexi puffert (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 5 U/µl Promega GoTaq DNS polimerázt (Promega, Madison, Wisconsin, USA), és 10-10µM forward és reverse primert használtunk. A primerszekvenciákat irodalmi adatok alapján és Primer premier program segítségével terveztük. Ezen kívül a reakcióelegy tartalmazott még Q oldatot (Qiagen, Venlo, Hollandia) és MgCl<sub>2</sub>-t különböző arányban. A reakció során a szálak szétválasztása 95°C-on 5 percig tartó inkubáció során zajlott, majd 35 termocikluson át sokszorozódott fel a vizsgálni kívánt DNS szakasz: 15 másodpercig denaturálódott 95°C-on, 10-15

másodpercre tartott az anneláció 59-60 °C-on, majd az extenzió 72 °C-on 60-150 másodpercre. Ezt követően 4°C-ra hűtöttük le a mintákat.

A keletkezett termék mennyiségének meghatározása agaróz-gélelektroforézis segítségével történt. Ezt követően a termék tisztítása után szekvenálási reakciót végeztünk.

A megfelelően hígított termék 1 µl-ét a reakcióelegyhez adtuk, mely 0,5x BigDye reakció premix-et (Life Technologies, Carlsbad, California, USA), 0,5x BigDye szekvenáló puffert (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) és 1mM szekvenáló primert tartalmazott. A reakció során keletkezett terméket Na-acetát-etanolos módszerrel tisztítottuk meg, majd a minták feloldását, denaturálását és a kapilláris elektroforézist a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte. Az így kapott szekvenciákat a CLC DNA Workbench 6 (CLC Bio, Aarhus, Denmark) programmal értékeltük ki.

Új variációk lehetséges funkcionális hatását az alábbi online predikciós programok segítségével határoztuk meg: PolyPhen (version2) (148) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (149) ([http://siftdna.org/www/ExtendedSIFT chr coords submit.html](http://siftdna.org/www/ExtendedSIFT_chr_coords_submit.html)), PROVEAN(150) ([http://provean.jcvi.org/genome submit.php](http://provean.jcvi.org/genome_submit.php)), Human Splicing Finder (version 3.1, <http://www.umd.be/HSF3/>) és Mutation-Taster(151) (<http://mutationtaster.org>). Ezek alapján a variációkat M1-ként (kóroki szerepe van), M2-ként (valószínűleg kóroki szerepe van) és M3-ként (kóroki szerepe bizonytalan) prediktáltuk.

A korábban már betegekben azonosított (és bizonyos esetekben funkcionálisan jellemzett) misszensz variánsokat, illetve nonszensz és splice site mutációkat feltehetően patogén hatásúnak (likely pathogenic variant, LPV) prediktáltuk. Új misszensz variációkat abban az esetben tekintettünk LPV-nek, ha a minor allél frekvenciája <0,1% nemzetközi adatbázisokban (dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp))), Exome Variant Server (NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) and 1000 Genomes Project phase 3 (<http://browser.1000genomes.org/index.html>)), és ha a CADD score-juk  $\geq 10$ .

Kópiaszám variációk (deléciók, duplikációk) meghatározására a *CFHR1*, *CFHR2*, *CFHR3* és *CFHR5* kromoszómális régiókban, multiplexligáció-dependens próba amplifikációt végeztünk (MLPA) SALSA MLPA probemix P236-A3-mal (MRC-Holland, Amsterdam, Hollandia) a gyártó útmutatásait követve.



## 4.8. Statisztikai elemzések

### 4.8.1. Leíró statisztika

A folytonos változókat, mivel eloszlásuk eltért a normál eloszlástól, a medián, illetve 25-75-ös percentilis értékekkel jellemeztük. Kategórikus változók bemutatását darabszámmal, illetve százalékokkal végeztük.

A csoportok összehasonlítását folytonos változóknál két csoport esetében Mann-Whitney U-teszttel, több csoport esetében Kruskal-Wallis teszttel, majd Dunn post-hoc teszttel végeztük. Kategórikus változókat a csoportok között Pearson Khi-négyzet teszt segítségével hasonlítottuk össze.

### 4.8.2. Klaszteranalízis

A klaszteranalízist Iatropoulus és munkatársai munkája nyomán végeztük (140). A következőkben felsorolt adatokat használtuk az elemzéshez: nem, diagnóziskori életkor, hematuria, proteinuria, vesekárosodás, trigger esemény, családi halmozódás, szklerotikus glomerulus, félhold képződés, mezangiális proliferáció, endokapilláris proliferáció, intersticiális gyulladás, intersticiális fibrózis, C3-, IgA-, IgG-, IgM-, C1q jelölődés immunfluoreszcens mikroszkópián, mezangiális-, szubepiteliális-, szubendoteliális-, intramembránózus depozitum elektronmikroszkópián, szérum C3 és C4 szint, plazma sC5b-9 koncentráció, C3NeF, valószínűleg patogén variáció (LPV), gyakori polimorfizmusok (*CFH* V62I és Y402H, *CD46* c.-366A>G, *CFB* R32Q/W, *C3* R102G, *THBD* A473V). A változók és kódolásuk az 2. táblázatban látható. Az eredeti vizsgálathoz képest az immunfluorszcenciás fibrinogén jelölődést kizártuk a jelentős mennyiségű hiányzó adat miatt. Az intramembránózus depozitum esetében a legtöbb

biopsziás lelet nem tett különbséget a granuláris és szalagszerű nagyon elektronenz depozitum között, így ezt mi egy változónak tekintettük. A C3NeF és az LPV jelenlétét külön változóként értékeltük a vizsgálatunkban, mivel az additív hatásuk nem bizonyított. Négyzetes euklideszi távolságok segítségével Ward-módszer szerinti hierarchikus klaszter analízist végeztük a fentiekben felsorolt változók alapján az IBM SPSS 20 program segítségével. A hiányzó értékeket (nem haladta meg a 3%-ot) lineáris interpoláció segítségével pótoltuk. A klaszter analízis validálását random módon kettéosztott adatbázison 100-szor ismételt analízissel végeztük. Az egyes esetek eredményül kapott klaszter számát leellenőriztük az eredetileg kapott klaszter számokkal, melyből Cohen kappa egyezési rátát számoltunk. Ezek átlaga 0,885-nek adódott (az átlag 95%-os CI-a 0,859-0,910), mely majdnem tökéletesen konfirmálja az eredeti és az ismétlések közötti megfigyeléseket.

A zajok kiküszöbölésére a változók főkomponens analízise után is megismételtük a klaszter analízist, mely ugyanazt az eredményt adta 4 beteg kivételével, akik az 1-es klaszterből a 4-es klaszterbe lettek csoportosítva.

A prediktor változókat az eredeti adatok alapján a klaszter számok kategórikus változóként való értelmezése alapján határoztuk meg. A prediktor változókat fontosságuk sorrendjébe állítottuk. Döntési fa segítségével kiválasztottuk azt a minimális változó mennyiséget, amely alapján a betegek besorolhatók a klaszterekbe.

**2. táblázat.** Klaszter analízis során felhasznált változók és kódolásuk

<b>Változó</b>	<b>Kódolás</b>
nem	1:férfi 2:nő
diagnóziskori életkor	év
hematuria	0: nincs 1: mikrohematuria 2: makrohematuria
proteinuria	0: nincs 1: nem-nefrotikus proteinuria 2: nefrózis szindróma
veseelégtelenség	0:nincs 1: vesefunkció csökkenés GFR<60 mL/min/1,73 m <sup>2</sup> 2: veseelégtelenség GFR<15 mL/min/1,73 m <sup>2</sup> /TX/HD
trigger esemény	0:nincs 1:van
családi halmozódás	0:nincs 1:van
szklerotikus glomerulusok %	%
félhold képződés %	%
mezangiális proliferáció fénymikroszkópos képen	0 to 3 + skála
endokapillaris proliferáció fénymikroszkópos képen	0 to 3 + skála
intersticiális proliferáció fénymikroszkópos képen	0 to 3 + skála
intersticiális fibrózis fénymikroszkópos képen	0 to 3 + skála
arteriola szklerózis	0: nincs 1: van
C3 IF-en	0 to 3 + skála
IgA IF-en	0 to 3 + skála
IgG IF-en	0 to 3 + skála
IgM IF-en	0 to 3 + skála
C1q IF-en	0 to 3 + skála
mezangiális depozitum EM-en	0: nincs 1: van
szubepiteliális depozitum EM-en	0: nincs 1: van
szubendoteliális depozitum EM-en	0: nincs 1: van
intramembránózus depozitum EM-en	0: nincs 1: van
szérum C3 szint	0: <0,5 g/L 1: ≥0,5 g/L; <0,9 g/L 2: ≥0,9 g/L
szérum C4 szint	0: <0,1 g/L 1: ≥0,1 g/L; <0,2 g/L 2: ≥0,2 g/L
plazma sC5b-9 szint	0: ≤303 ng/mL 1: ≥303 ng/mL ≤800 ng/mL 2: >800 ng/mL

C3NeF	0: nincs 1: van
LPV	0: nincs 1: van
CFH V62I	I allélek száma
CFH Y402H	H allélek száma
CD46 c.-366A>G	G allélek száma
CFB Q/W32R	R allélek száma
C3 R102G	G allélek száma
THBD A473V	V allélek száma

#### 4.8.4. Vesetúlélés

A vesetúlélés vonatkozásában a csoportok közti különbséget a Kaplan-Meier analízis segítségével elemeztük.

Eseménynek a végstádiumú veseelégtelenséget (end-stage renal disease, ESRD) vettük. Ezt vagy a vesepótló kezelés fennállásával (hemo-/peritoneáldialízis, vesetranszplantáció) vagy 15 mL/perc/1,73m<sup>2</sup> alatti GFR értékkel definiáltuk a követés ideje alatt.

A szignifikancia szintet a kétoldalú p-értékeknél 0,05-nél állapítottuk meg, ha másképp nem említjük.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Betegek

A vizsgálatokba 120 biopsziával igazolt C3G/IC-MPGN diagnózissal rendelkező beteg került bevonásra . 41 beteg C3GN-ben, 12 személy DDD-ben, 67 IC-MPGN-ben szenvedett. A betegek demográfiai, klinikai és komplement eredményeit az 3. táblázat, hisztológiai jellemzőit a 4. táblázat tartalmazza.

A különböző hisztológiai csoportokban nem különböztek a betegek a korukat, nemüket illetően. A betegek átlagéletkora a fiatal felnőttkorra esett. Klinikai paramétereik, mint a hematuria, proteinuria, vesefunkció tekintetében szintén nem találtunk különbséget közöttük. Az IC-MPGN-es betegeket csökkent C4 szint jellemezte erős immunglobulin jelölődéssel az immunfluoreszcens mikroszkópiás képen. Nem volt szignifikáns különbség a csoportok között a C3, C4 szintekben, míg az AP aktivitása a a DDD-vel diagnosztizált betegeknél volt a legalacsonyabb.

Az ismert patogenetikai faktorok tekintetében az irodalmi adatokhoz hasonló prevalenciákat találtunk.

Összesen 23 beteg anamnézisében szerepelt infekció, autoimmunitás, illetve paraprotein jelenléte. A legtöbb, betegséget megelőző infekciót a C3G-s (10/12) csoportban találtuk, míg autoimmun betegség gyakrabban fordult elő IC-MPGN-es betegeknél (6/9). Paraproteint 1 IC-MGN-es és 1 C3G-s betegben tudtunk azonosítani.

A genetikai etiológiai faktorok közül a betegek 20%-ában sikerült feltehetően kóroki variációt azonosítani a komplement-asszociált génekben: 10 mutáció a *CD46*, 5 a *CFH*, 4-4 a *C3* és *CFI*, 3 a *THBD* és 1 a *CFB* gént érintette. 3 betegben FHR hibrid fehérjét detektáltunk, míg 27 betegben azonosítottuk az MLPA eredményei alapján a *CFHR1* és *CFHR3* gének gyakori delécióját.

A betegek 22,5%-ban azonosítottunk C3NeF-et, mely leggyakrabban a DDD-s betegek esetében fordult elő (41,6%). A C3NeF előfordulása alacsonyabbnak adódott a mi kohorszunkban az irodalomban közöltekhez képest, ami valószínűleg az antitest aktivitásának direkt betegszérumból – nem tisztított IgG-ből való mérésének a következménye . Ám a csoportok közötti arányok (C3GN vs DDD 17,5% vs 41,6%) megfelelnek a más munkacsoportok által meghatározottaknak.

Anti-C1q-t az esetek 13,4%-ában, anti-H faktort 5,9%-ában, anti-C3-at 4,3%-ában, anti-B faktort 6%-ában tudtunk kimutatni.

A hisztológiai eredményeket összehasonlítva a csoportok között, számottevő különbségek adódtak az immunfluoreszcens mikroszkópia alapján, mely megfelel a jelenleg használatban levő diagnosztikus kritériumoknak. Intramembránózus elektron denz depozitum a DDD-s betegek 100 százalékában jelen volt, mely a betegség diagnosztizálásának feltétele, ám a másik két betegcsoportban is előfordult.

**3. táblázat.** A betegek demográfiai, klinikai és komplement jellemzői

	<b>C3GN n=41</b>	<b>DDD n=12</b>	<b>IC-MPGN n=67</b>	<b>összes beteg n=120</b>	<b>p*</b>
nem % férfi	22(53,6)	3 (25)	43 (64,2)	68 (56,6)	0,061
diagnóziskori kor, év	22 (15-38)	22 (16-42)	19 (11-41)	22 (13-40)	0,69
mikrohématuria, jelenléte	25 (61)	8 (66,6)	38 (56,7)	71(61,2)	0,77
makrohématuria, jelenléte	9 (22)	2 (16,6)	12 (18)	23 (19,8)	0,85
nefrózis szindróma, jelenléte	19 (46,3)	9 (75)	33 (29,3)	61 (52,1)	0,2
vesekárosodás, jelenléte	14 (34,1)	5 (41,6)	26 (38,8)	45 (38,4)	0,84
veseelégtelenség, jelenléte	5 (12,2)	1 (8,3)	6 (8,9)	12 (10,2)	0,84
trigger, jelenléte	8 (19,5)	3 (25)	10 (15)	21 (17,5)	0,55
családi halmozódás, jelenléte	6 (14,6)	0 (0)	5 (7,5)	11 (9,1)	0,23
szérum C3, g/L	0,68 (0,27-1,06)	0,49 (0,25-0,87)	0,7 (0,48-0,99)	0,69 (0,3-1)	0,61
szérum C4, g/L	0,28 (0,2-0,39) <sup>1</sup>	0,21 (0,16-0,37)	0,21 (0,12-0,25)	0,22 (0,16-0,31)	<b>0,005</b>
sC5b-9, ng/ml	429 (277-809)	453 (248-970)	376 (248-658)	407 (256-719)	0,8
LPV hordozók	7 (17,1)	2 (16,6)	13 (19,4)	22 (19,8)	0,94
C3NeF, jelenléte	7 (17,1)	5 (41,6)	15 (22,4)	27 (22,5)	0,2
C4NeF, jelenléte	7 (17,5)	1 (8,3)	9 (13,4)	17 (14,2)	0,69
Klasszikus út aktivitás, CH50/mL	38 (19-62)	47 (23-57)	46 (30-60)	46 (26-60)	0,79
Alternatív út aktivitás, %	38 (1-78)	4 (0,3-66) <sup>1</sup>	70 (13-95)	58 (1-86)	<b>0,009</b>
C1q, mg/L	108 (90-130)	95 (83-107)	101 (69-123)	104 (83-123,75)	0,19
H-faktor, mg/L	528 (470-697)	715 (589-903)	495 (324-700)	534(381-715)	<b>0,013</b>
I-faktor, %	93 (79-112)	87 (78-98)	90 (74-1110)	91 (78-109)	0,41
B-faktor, %	90 (72-106)	88 (69-124)	82 (62-99)	86 (66-103)	0,3
D-faktor, ug/mL	1,9 (0,7-4,4)	2,8 (0,8-4)	2,4 (0,95-3,6)	2,31 (0,9-3,94)	0,93
C3a, ng/mL	160 (70-259)	221 (59-259)	125 (86-183)	132 (79-208)	0,6
Bb, ug/mL	1,57 (1,12-2,6)	1,7 (0,05-3,7)	1,4 (0,9-2)	1,49 (0,99-2,28)	0,19
C4d, ng/mL	6,2 (2,9-8,8)	6,1 (3,3-9,4)	4,1 (3-8,8)	5,19 (3,1-8,9)	0,5
anti-H faktor, present	4 (10)	0 (0)	3 (4,5)	7 (5,9)	0,33
anti-C1q, jelenléte	5 (12,8)	1 (8,3)	9 (14,3)	15 (13,4)	0,89
anti-C3, jelenléte	2 (5,4)	1 (8,3)	2 (3)	5 (4,3)	0,64
anti-B-faktor , jelenléte	3 (8,1)	2 (16,6)	2 (3)	7 (6)	0,15
Több, mint egy autoantitést, jelenléte <sup>2</sup>	7 (18,9)	1 (10)	8 (12,7)	16 (15,1)	0,63

A változókat a medián értékükkel, az interkvartilis tartománnyal, illetve százaléként adtuk meg. \*P-értéket  $\chi^2$ -teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével határoztuk meg az IC-MPGN, C3GN és DDD-s betegek között. <sup>1</sup> Szignifikánsan különbözik IC-MPGN-es betegektől. <sup>2</sup> C3NeF, C4NeF, anti-H-faktor, anti-C1q, anti-C3, anti-B-faktor Referencia tartomány: C3 0,9-1,8 g/L; C4 0,15-0,55g/L; sC5b-9 110-252 ng/mL; klasszikus út aktivitás 48-103 CH50/ml; alternatív út aktivitás 70-125%; C1q 60-180 mg/L; H-faktor 250-880 mg/l ; I-faktor 70-130%; B-faktor 70-130%; D-faktor 0,51-1,59  $\mu$ g/mL; C3a 70-270 ng/mL; C4d 0,7-6,3  $\mu$ g/mL; Bb 0,49-1,42  $\mu$ g/mL;

A következő változók esetében bizonyos betegek értékei hiányoznak: proteinuria (n=3), vesekárosodás/elégtelenség (n=3), trigger (n=2), családi halmozódás (n=1), sC5b-9 (n=15), LPV (n=9), C1q (n=13), D-faktor (n=23), C3a (n=19), Bb (n=23), C4d (n=23), anti-H-faktor (n=2), anti-C1q (n=8), anti-C3 (n=3), anti-B-faktor (n=3).

## 4. táblázat. A betegek hisztológiai jellemzői

	C3GN n=41	DDD n=12	IC-MPGN n=67	összes beteg n=120	p*
Biopsziáig eltelt idő, hónap	0 (0-2,2)	1 (0-4,5)	0 (0-0,6)	0 (0-0,88)	0,54
<i>Fénymikroszkópia</i>					
szklerotikus glomerulus %	6,7 (0-39)	0 (0-13,5)	4 (0-21,2)	4,6 (0-23)	0,24
félhold képződés %	0 (0-6,3)	0 (0-6,2)	0 (0-6,6)	0 (0-7)	0,81
mezangiális proliferáció foka	0/1/2/3* 7/9/13/11	2/4/5/1	9/19/28/11	18/32/46/22	0,69
endokapilláris proliferáció foka	0/1/2/3* 9/9/14/8	5/4/2/1	35/10/15/7	49/23/31/15	0,07
intersticiális inflammáció foka	0/1/2/3* 16/12/8/4	3/5/4/0	30/27/8/2	49/44/20/5	0,48
intersticiális fibrózis foka	0/1/2/3* 15/12/10/3	3/6/2/1	29/20/17/1	47/37/29/5	0,54
arteriola szklerózis	15 (38,5)	3 (25)	16 (23,8)	34 (28,6)	0,78
<i>Immunofluoreszcens mikroszkópia</i>					
C3	0/1/2/3* 0/0/12/29	0/0/1/10	5/5/29/27 <sup>1,2</sup>	5/5/42/65	0,0051
IgA	0/1/2/3* 36/4/0/0 <sup>3</sup>	7/4/0/0	40/12/4/10	82/20/4/10	<b>0,0027</b>
IgG	0/1/2/3* 30/11/0/0	5/6/0/0	24/14/14/14 <sub>1,2</sub>	59/30/14/14	<b>&lt;0,0001</b>
IgM	0/1/2/3* 26/14/0/0	5/6/0/0	7/20/29/11 <sup>1,2</sup>	37/40/29/11	<b>&lt;0,0001</b>
C1q	0/1/2/3* 28/11/0/0	3/7/0/0 <sup>3</sup>	17/13/17/9 <sup>1,2</sup>	47/31/17/9	<b>&lt;0,0001</b>
<i>Elektronmikroszkópia</i>					
mezangiális depozitum, jelenléte	28 (73,7)	8 (66,6)	26 (56,5)	62 (59)	0,29
szubepiteliális depozitum, jelenléte	14 (36,8)	5 (41,6)	21 (45,6)	40 (33,6)	0,71
szubendoteliális depozitum, jelenléte	22 (57,9)	5 (41,6)	29 (63)	56 (47,1)	0,4
intramembránózus depozitum, jelenléte	14 (36,8)	12 (100) <sup>1,3,4</sup>	20 (43,5)	46 (47,9)	<b>0,0005</b>

A változókat a medián értékükkel, az interkvartilis tartománnyal, illetve százaléként adtuk meg.

\*A p-értéket  $\chi^2$ -teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével határoztuk meg IC-MPGN, C3GN és DDD-ben szemvedő betegek összehasonlításakor. <sup>1</sup> Szignifikánsan különbözik C3GN-től. <sup>2</sup> Szignifikánsan különbözik DDD-től. <sup>3</sup> Szignifikánsan különbözik IC-MPGN-től. \* Fénymikroszkópián és immunfluoreszcens mikroszkópián látott elváltozások fokát 0-tól 3-ig terjedő skálán határoztuk meg.

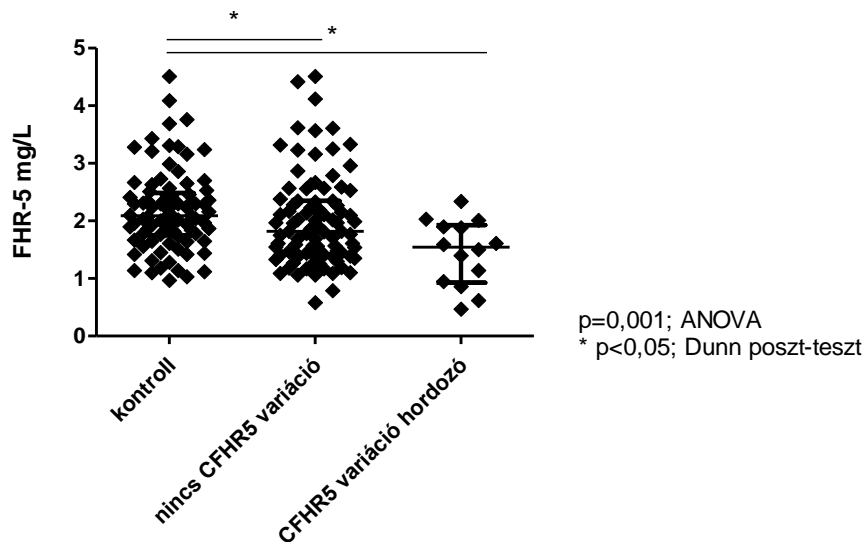
A következő változók esetében bizonyos betegek értékei hiányoznak: proteinuria: C3- (n=2), IgA- (n=3), IgG- (n=2), IgM- (n=2), C1q (n=15) immunfluoreszcens festés és elektronmikroszkópia (n=23).



## 5.2. FHR-5 szerepének vizsgálata C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban

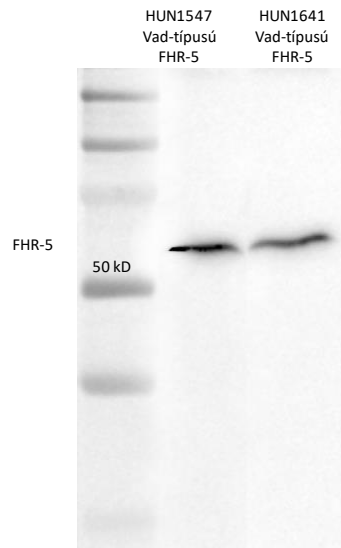
### 5.2.1. Betegek és egészséges egyének FHR-5 szérumszintjeinek vizsgálata

A betegek FHR-5 szérumszintjeinek vizsgálatához ELISA módszert állítottunk be. Így 120 IC-MPGN/C3G-s betegben volt lehetőségünk meghatározni a fehérje szérumszintjét. Az FHR-5 szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben az egészséges kontrollokhoz képest (medián: 2,1 mg/L), függetlenül attól, hogy a betegek hordoztak *CFHR5* variációt (medián: 1,54 mg/L) vagy nem (medián: 1,82 mg/L). (8. ábra). A hisztológiai csoportok között nem találtunk különbséget.



**8.ábra.** Az IC-MPGN/C3G betegek és az egészséges kontroll csoport szérum FHR-5 szintjei.

Az ELISA módszer specificitását western blot módszerrel igazoltuk, ahol monoklonális anti-FHR-5 antitesttel csak az FHR-5-nek megfelelő mérettartományban detektáltunk terméket (9. ábra).



**9. ábra.** A monoklonális anti-FHR-5 specificitásának igazolása western blot-on, két vad-típusú FHR-5 fehérjét hordozó beteg szérummintáját vizsgálva.

### 5.2.2. Azonosított *CFHR5* variációk

A *CFHR5* gén genetikai analízisét 111 betegben végeztük el. Nyolc ritka, heterozigóta variációt azonosítottunk a *CFHR5* gén szekvenálása során 14 betegben. Ezek közül 2 kereteltolódással járó mutációt (c.479\_480insAA; c.479\_480insA), 6 misszensz variációt (P46S, V110A, K144N, C208R, G278S, R356H) azonosítottunk. A *CFHR5* variációt hordozó betegek fontosabb komplement eredményeit, további mutációit és klinikai adatait a 5. táblázat foglalja össze. Az újonnan azonosított ritka variációk lehetséges hatását *in silico* predikciós programok segítségével prediktáltuk (6. táblázat).

MLPA analízissel vizsgáltuk a *CFHR* géneket, mely alapján 3 betegben azonosítottunk *CFHR* génátrendeződést és következményesen létrejövő hibrid fehérjét western blot módszerrel. Mindhárom betegnél magas FHR-5 szinteket mértünk, és a speciális genetikai háttérre tekintettel a további elemzésekből kizártuk őket.

5. táblázat. A *CFHR5* variációt hordozó betegek főbb komplement és klinikai jellemzői

Beteg azonosító	Szövet-tani csoport	<i>CFHR5</i> cDNS pozíció	Aminosav csere <i>FHR-5</i> fehérjében	Interpretáció	rs szám	MAF 1000 Genom és Project alapján	További gének variációi	Rizikó variáció <i>CFH</i> Y402 H	C3 g/l	C4 g/l	CH50 /mL	AP %	HF mg/L	sC5b-9 ng/ml	<i>FHR-5</i> mg/L	Nefrózis szindróma	Vese-károsodás	Auto anti-test
HUN1502	IC-MPGN	c.136C>T	P46S <sup>(152)</sup> (33)(153)	LPV	rs3775 63612	0,9%	<i>CD46</i> T383I <sup>(154-156)</sup>	het.	1,28	0,19	52	65	546	261	1,61	igen	igen	nem
HUN278	DDD	c.329T>C	V110A (157, 158)	VUS	rs1406 91305	0,4%	-	het.	0,87	0,26	46	63	676	383	2,01	igen	igen	C3NeF
HUN523	IC-MPGN						<i>CFI</i> R406 H <sup>(103, 159-161)</sup>	het.	0,93	0,3	38	38	165	534	1,59	nem	nem	nem
HUN746	IC-MPGN						<i>CFI</i> R406 H <sup>(103, 159-161)</sup> <i>C3</i> D277 E	vt	0,91	0,5	69	104	732	-	2,03	igen	nem	nem
HUN1612	IC-MPGN						-	het	0,45	0,1	30	13	413	731	2,34	igen	igen	nem
HUN821	IC-MPGN	c.432A>T	K144N <sup>(125, 126, 158)</sup>	VUS	rs1815 11327	0,1%	<i>C3</i> c.- 2_- insA C	vt	0,19	0	0	0	538	-	1,14	igen	nem	anti-C1q
HUN564	IC-MPGN	c.479_480insAA	p.E163Kfs* 10*	LPV	rs5654 57964	0,0%	<i>CD46</i> A353 V <sup>(155, 162-165)</sup>	vt	1,02	0,3	0	0	217	165	0,95	nem	igen	anti-FH

Beteg azonosító	Szövet-tani csoport	CFHR5 cDNS pozíció	Aminosav csere FHR-5 fehérjében	Interpretáció	rs szám	MAF 1000 Genom és Project alapján	További génekben variáció	Rizikó variáció CFH Y402 H	C3 g/l	C4 g/l	CH50 /mL	AP %	HF mg /L	sC5b -9 ng/ml	FHR -5 mg/L	Nefrózis szindróma	Vese-károsodás	Auto anti-test
HUN593	IC-MPGN	c.479_480insA	p.E163Rfs* <sub>35</sub> <sup>(126, 166)</sup>	LPV	rs565457964	0,1%	-	het	0,41	0,21	35	16	355	368	1,88	nem	nem	anti-FB
		c.622T>C	C208R*	VUS	rs41299613	0,03%												
HUN225	DDD	c.832G>A	G278S <sup>(158, 159, 167, 168)</sup>	LPV	rs139017763	0,4%	-	vt	0,28	0,4	47	7	733	770	0,86	igen	nem	nem
HUN769	IC-MPGN						-	na	0,87	0,36	48	104	583	393	1,9	igen	igen	nem
HUN1190	IC-MPGN						-	het	0,69	0,12	34	39	379	561	0,62	igen	igen	nem
HUN290	IC-MPGN	c.1067G>A	R356H <sup>(126, 169)</sup>	LPV	rs35662416	1%	CD46	vt	0,87	0,26	61	87	341	589	1,4	igen	nem	C3NeF
HUN1325	C3GN						-	vt	1,24	0,28	72	73	438	382	1,5	igen	nem	nem
HUN2446	C3GN	c.136C>T	P46S <sup>(152)</sup> <sub>(33)</sub> <sup>(153)</sup>	LPV	rs377563612	0,9%	-	vt	0,24	0,22	12	1	501	1777	0,47	nem	nem	anti-FH, anti-C1q
		c.479_480insA	p.E163Rfs* <sub>35</sub> <sup>(126, 166)</sup>	LPV	rs565457964	0,1%												
		c.622T>C	C208R*	VUS	rs41299613	0,03%												
Összes, medián (25-75 tartomány)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,87 (0,42 - 0,93)	0,26 (0,2 - 0,3)	42 (31-51)	39 (9-71)	470 (361-574)	464 (379-625)	1,55 (1-1,9)	-	-	-

Azokat a misszensz, illetve nonszensz mutációkat tekintettük valószínűleg patogén genetikai variációknak (LPV), amelyeket korábban már publikáltak és funkcionálisan jellemeztek. A korábban nem közölt ritka variációkat csillaggal jelöltük.

Rövidítések: het: heterozigóta; LPV: likely pathogenic variation, feltételezhetően patogén variáció; na: nincs adat; VUS: ismeretlen funkciójú variáció; vt: vad-típus;

HF: H-faktor

Azonosított <i>CFHR5</i> variáció	MutationTaster	PROVEAN	SIFT	Polyphen-2
<b>P46S</b>	Polimorfizmus (Valószínűség: 0,99)	Semleges (pontszám: -0,49)	Tolerálható (pontszám: 0,37)	Benignus (pontszám: 0,044, szenzitivitás: 0,94; specificitás: 0,3)
<b>V110A</b>	Polimorfizmus (Valószínűség: 0,99)	Káros (pontszám: -3,03)	Tolerálható (pontszám: 0,16)	Feltehetően káros (pontszám: 0,877, szenzitivitás: 0,83; specificitás: 0,94)
<b>K144N</b>	Polimorfizmus (Valószínűség: 0,99)	Semleges (pontszám: -0,36)	Tolerálható (pontszám: 0,17)	Benignus (pontszám: 0,058, szenzitivitás: 0,94; specificitás: 0,84)
<b>E163Kfs*10</b>	Kóroki hatású (Valószínűség: 1,00)	NA	NA	NA
<b>E163Rfs*35</b>	Kóroki hatású (Valószínűség: 1,00)	NA	NA	NA
<b>C208R</b>	Polimorfizmus (Valószínűség: 0,98)	Káros (pontszám: -11,56)	Roncsoló (pontszám: 0,0)	Feltehetően káros (pontszám: 1,00, szenzitivitás: 0,00; specificitás: 1,00)
<b>G278S</b>	Polimorfizmus (Valószínűség: 0,99)	Káros (pontszám: -5,26)	Tolerálható (pontszám: 0,07)	Feltehetően káros (pontszám: 0,99, szenzitivitás: 0,14; specificitás: 0,99)
<b>R356H</b>	Polimorfizmus (Valószínűség: 0,99)	Semleges (pontszám: -0,33)	Tolerálható (pontszám: 0,19)	Feltehetően káros (pontszám: 0,820, szenzitivitás: 0,84; specificitás: 0,93)

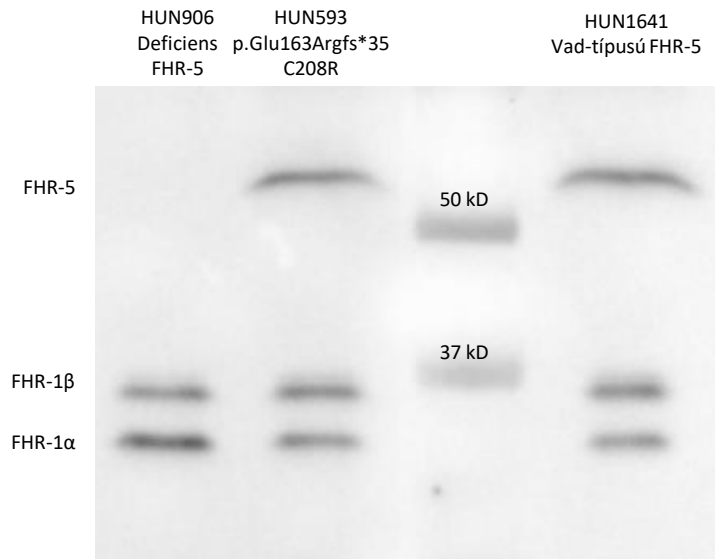
**6. táblázat.** Az azonosított *CFHR5* variációk *in silico* prediktálása során kapott eredmények

7 beteg esetében (HUN225, HUN593, HUN769, HUN1190, HUN1325, HUN1612, HUN2446) nem találtunk olyan további etiológiai tényezőt a rutin diagnosztikus módszerekkel, amely hatással lehet az AP diszregulációra. A *CFHR5* variációt fordozó betegek közül 6 heterozigóta formában hordozta az *CFH* Y402H allélt. (5. táblázat).

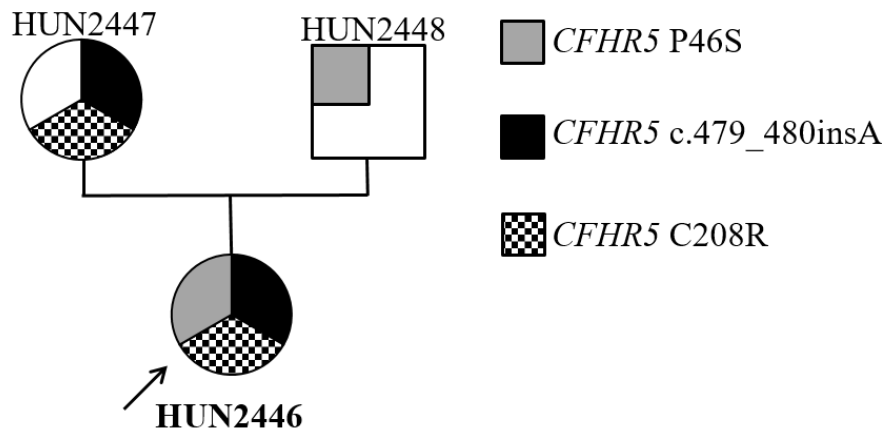
Az azonosított misszensz és kereteltolódással járó variációk az FHR-5 protein 1-6-os short consensus repeat (scr) doménjeire estek. 5 variációt feltehetően károsnak tartunk (LPV) az alapján, hogy 1) már korábban leírták patogén faktorként C3G-ben szenvedő betegekben (p.E163Kfs\*10, p.E163Rfs35), 2) korábbi irodalmi adatok alapján szegregációt mutat a betegséggel (P46S), vagy 3) funkcionális vizsgálatok alapján (G278S, R356H) (6. táblázat) (*kézirat csatolva, közlésre beadva*). Az amerikai populációban a P46S mutációt gyakrabban azonosították az egészséges kontrollokban a betegekhez képest, ám a különbség valószínűleg a két kohorsz közötti etnikai eltéréstől adódik (158).

Egy betegünk (HUN593) két variációt is hordozott a *CFHR5* génben, egy misszensz és egy kereteltolódással járó variációt (C208R, c.479\_480insA), ugyanakkor az FHR-5 szint nem mutatott jelentős csökkenést (1,88 mg/l). Ennek tisztázására western blot analízist végeztünk, az FHR-5 protein a várt magasságban látszódott, összehasonlítható intenzitással a vad-típusú FHR-5 fehérjét hordozó mintához képest, mely alapján a az ELISA mérés során kapott eredményeinket konfirmáltuk (10. ábra). Feltehetően a két különböző *CFHR5* variáció ugyanazon az allélen helyezkedik el, így az egyik allél teljesen intakt, és az erről a szárlól átíródó fehérjét detektáljuk. Sajnos a család többi tagjától nem érkezett minta, hogy ezen hipotézisünket alátámaszthassuk.

A HUN2446-os azonosítószámú betegünkben három különböző *CFHR5* variációt azonosítottunk, mely közül egy kereteltolódással, kettő aminosavcserével jár (c.479\_480insA, P46S, C208R). Ebben az esetben, ahogy várható volt, csökkent FHR-5 szintet detektáltunk (0,47 mg/L). A beteg egészséges édesanyja szintén hordoz két variációt (C208R, c.479\_480insA), míg a szintén egészséges édesapja heterozigóta a P46S variációra. (12. ábra) Érdekes, hogy a beteg édesanyja nem vesebeteg, míg egy IC-MPGN diagnózisú betegünk (HUN593) ugyanazt a két variációt hordozza a *CFHR5* géneben. HUN593 betegünk azonban heterozigóta a gyakori *CFH* Y402H rizikóvariációra, illetve B-faktor elleni antitestet is detektáltunk a szérummintájában (11. ábra).



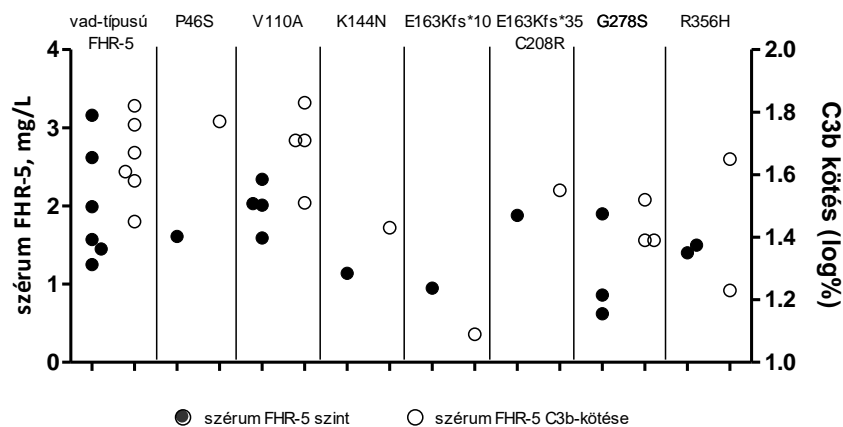
**10. ábra.** A két *CFHR5* mutációt hordozó beteg (HUN593) szérumbintájának vizsgálata western blot-on poliklonális anti-FHR-5 alkalmazásával. A HUN906 számú (teljes FHR-5 deficiens) és a HUN1641 kódú (vad-típusú FHR-5-öt hordozó) betegeket referenciaként tüntettük fel.



**11. ábra.** A három *CFHR5* variációt hordozó HUN2446-os beteg családfája.

### 5.2.3. Az azonosított *CFHR5* variációk funkcionális jellemzése

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk van-e valamilyen hatása az azonosított *CFHR5* variációknak az FHR-5 funkciójára, meghatároztuk, hogy a betegek szérumban található FHR-5 fehérjék milyen mértékben kötődnek az ELISA-lemezen immobilizált C3b-hez. Az FHR-5 C3b-kötő képessége csökkent volt a G278S variációt hordozó betegek szérumban a vad-típusú fehérjét hordozókhoz képest, valamint azokhoz a betegekhez viszonyítva is, akik a dimerizációs scr1-2-es doménben hordoztak valamilyen *CFHR5* variációt (P46S, V110A, K144N), illetve akik a R356H mutációt hordozták az scr6 doménben (12. ábra). Kíváncsiak voltunk, hogy a tapasztalt különbség nem a betegenként eltérő különböző FHR-5 szérumszintekből fakad-e (12. ábra), ezért munkacsoportunk együttműködött az ELTE Immunológiai Tanszékének Komplement kutatócsoportjával. Az együttműködés keretein belül Cserhalmi Marcell és munkatársai rekombináns fehérjéket expresszáltak (G278S, R356H). Az így termelt G278S és R356H fehérjék C3b kötését ELISA, illetve surface plasmon resonance (SPR) módszerekkel megvizsgálva a variációkat hordozó betegek szérumban a korábban mért eredményeinket megerősítették. Tekintettel arra, hogy ezek a kísérletek nem képezték doktori munkám célkitűzéseit, és nem az én munkám alapján készültek, az eredményeket (is) bemutató kéziratot csak tájékoztatásul csatolom a doktori dolgozathoz.

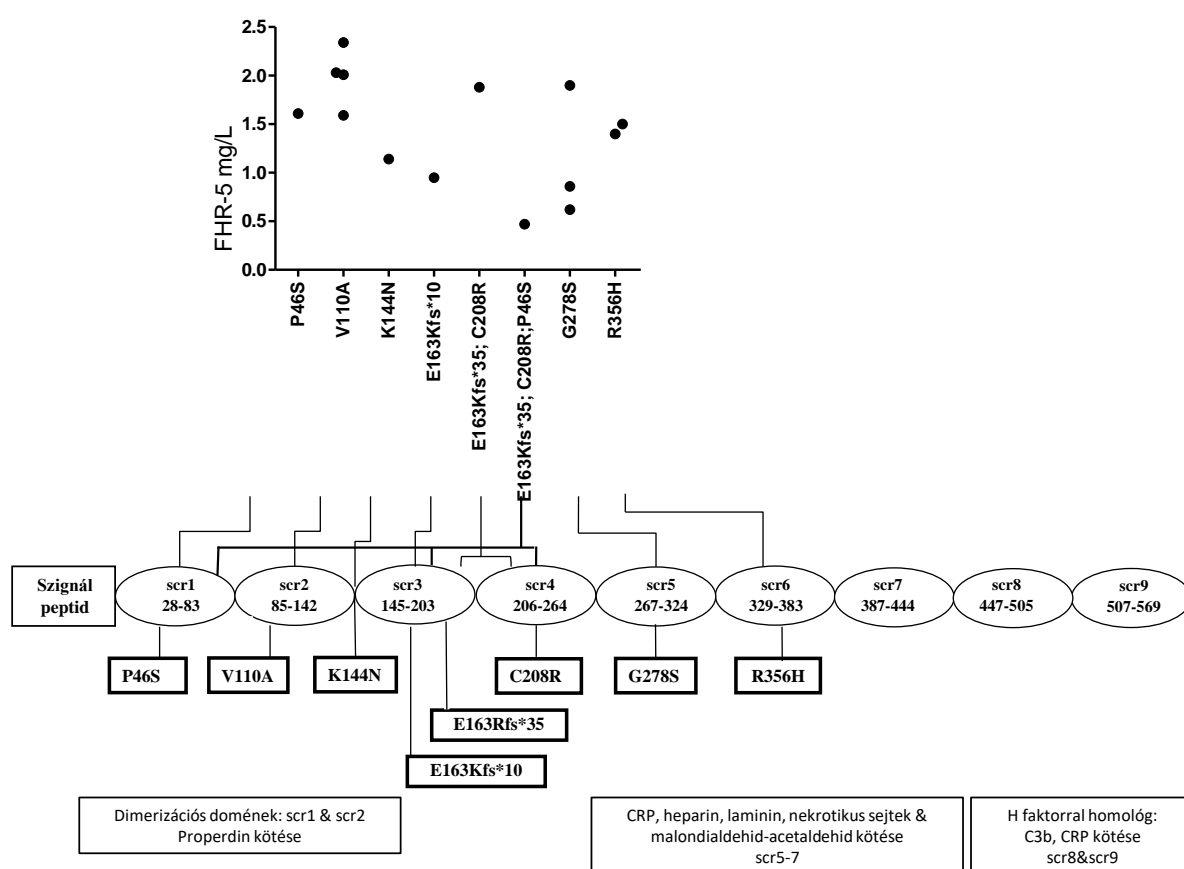


**12. ábra** A vad-típusú és a különböző variánst hordozó egyének szérumban mért szérumban FHR-5 szintek (bal oldali y-tengely), valamint ugyanezen egyének mintáiban mért FHR-5 fehérjék C3b-kötésének mértéke (jobb oldali y-tengely)



### 5.2.4. *CFHR5* variációt hordozó betegek FHR-5 szérumszintjei

Megvizsgáltuk, hogy az azonosított *CFHR5* variációk hordozása és az FHR-5 szérumszintjei között feltárható-e valamilyen kapcsolat. Mivel 1-1 bizonyos *CFHR5* mutációt csak néhány beteg hordozott, az alacsony mintaszám miatt nem volt lehetőségünk statisztikai elemzés elvégzésére. Megfigyeléseink alapján nincs erős összefüggés a *CFHR5* variációk lokalizációja és a detektált FHR-5 szérumszintek között (13. ábra).



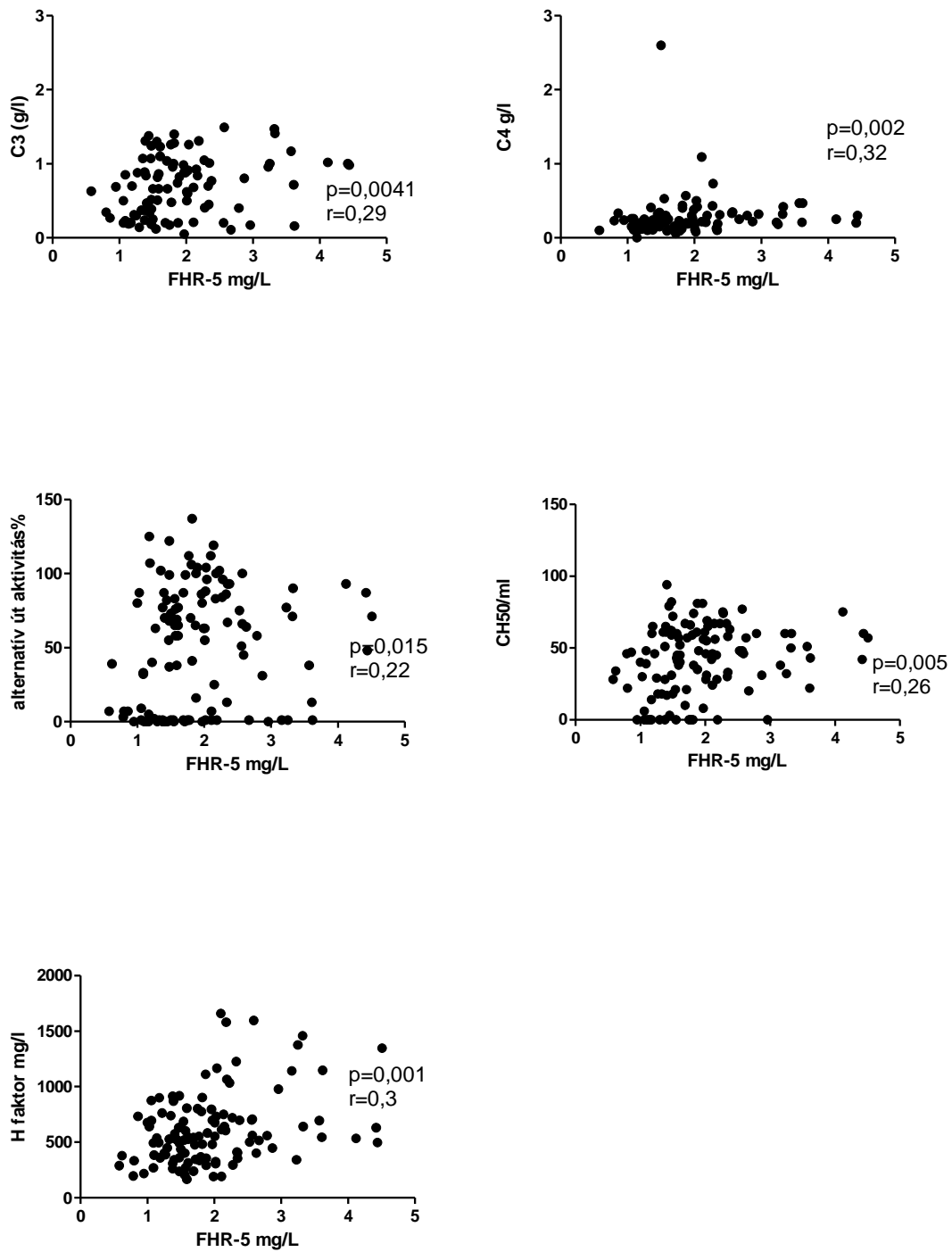
**13. ábra.** Az azonosított *CFHR5* variációt hordozó betegek FHR-5 szintjei és lokalizációjuk a doménszerkezetre vetítve, bemutatva az egyes domének irodalmi adatok alapján ismert funkcióit is.

### **5.2.5. Az FHR-5 szérumszintek összefüggése a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement paramétereivel**

Célunk az volt, hogy homogén betegcsoportban tudjuk vizsgálni a vad-típusú FHR-5 szerepét MPGN-ben, a szérum FHR-5 szint összefüggését a klinikai, patológiai, genetikai és komplement jellemzőkkel. E célból a *CFHR5* variációt hordozó betegeket külön csoportként kezeltük, és kizártuk őket a további analízisekből.

Az FHR-5 szérumszintje pozitív korrelációt mutatott a szklerotikus glomerulus jelenlétével a fénymikroszkópiás képen. Ezzel szemben a betegek klinikai paramétereivel, mint a proteinuria mértéke vagy a vesefunkció változása nem találtunk kapcsolatot.

Megvizsgáltuk, hogy van-e összefüggés - és ha igen, milyen - a betegek komplement paramétere és FHR-5 szintje között. Szignifikáns, pozitív irányú korrelációt találtunk a C3 és C4 szintekkel, az alternatív valamint a klasszikus út aktivitással, és a H-faktor koncentrációval is (14. ábra). Egészséges kontrollokban nem találtunk összefüggést a vizsgált változók között.



**14. ábra.** Az FHR-5 szintek összefüggése különböző komplement paraméterekkel (C3, C4, alternatív út aktivitás, klasszikus út aktivitása, H-faktor).

### 5.2.6. A *CFHR5* variációk, az FHR-5 szérumszintek és a betegek vesetűlése közötti kapcsolat vizsgálata

Kíváncsiak voltunk, hogy a betegség kimenetele mutat-e kapcsolatot a diagnóziskor meghatározott FHR-5 szintekkel. Ennek vizsgálatakor a 101 sikeresen követett beteg közül kizártuk 8 beteget, akik nem rendelkeztek DNS mintával, illetve a *CFHR5* variációt hordozó betegeket (n=13; ebből 1 főnek nem voltak követéses adatai) külön csoportként kezeltük. A maradék 80 beteget ROC-analízis segítségével két csoportra osztottuk, hogy vizsgálni tudjuk az ESRD kialakulása és az FHR-5 szintek közötti lehetséges kapcsolatot. Így kaptunk egy alacsony FHR-5 szinttel rendelkező csoportot (FHR-5 <1,565 mg/L), valamint egy magasabb FHR-5 koncentrációval jellemzett csoportot (FHR-5 >1,565mg/L) (7. táblázat).

**7. táblázat.** *CFHR5* variációt hordozók, illetve nem hordozók klinikai és laboratóriumi adatai az FHR-5 szérumszinjének függvényében.

	<i>CFHR5</i> variációt hordozó betegek* n=13	<i>CFHR5</i> variációt <b>nem hordozó</b> betegek		<b>P</b> érték**
		szérum FHR-5 <1,565 mg/L n=28	szérum FHR-5 >1,565 mg/L n=52	
nem % férfi	7 (53,8)	13 (46,4)	33 (63,4)	0,14
diagnóziskori életkor	17 (8-29)	16 (11-26)	31 (15-47)	<b>0,012</b>
mikrohématuria, jelenléte	7 (53,8)	19 (67,8)	32 (61,5)	0,57
makrohématuria, jelenléte	3 (23)	5 (17,8)	10 (19,6)	0,77
nefrózis szindróma, jelenléte	8 (61,5)	12 (42,8)	28 (54,9)	0,3
vesekárosodás, jelenléte	6 (46,2)	8 (29,6)	23 (45)	<b>0,03</b>
akut veseelégtelenség, jelenléte	0 (0)	2 (7,4)	7 (13,7)	0,48
szklerotikus glomerulus (%)	0 (0-5,2)	6,7 (0-17,8)	14,2 (0-44,4)	0,17
félhold képződés (%)	0 (0-5,8)	0 (0-6)	0 (0-17,6)	0,21
ESRD a követés alatt, jelenléte	0 (0)	2 (7,1)	15 (28,8)	<b>0,02</b>
szérum C3, g/L	0,64 (0,24-0,78)	0,37 (0,21-0,98)	0,8 (0,3-1)	0,21
szérum C4, g/L	0,18 (0,10-0,25)	0,21 (0,13-0,26)	0,24 (0,2-0,35)	<b>0,02</b>
sC5b-9, ng/mL	534 (375-751)	517 (273-1277)	349 (244-574)	<b>0,09</b>
csökkent C3, jelenléte	9 (69,2)	19 (67,8)	25 (48)	<b>0,08</b>
csökkent C3 normális C4 szinttel, jelenléte	4 (30,8)	5 (17,8)	3 (5,7)	0,12
emelkedett C5b-9, jelenléte	11 (84,6)	19 (79,2)	36 (72)	0,58
Klasszikus út aktivitás, CH50/mL	37 (12-49)	35 (3,7-60,7)	45,5 (29-60)	0,17
Alternatív út aktivitás, %	27 (0,75-67)	8 (1-81)	61 (6-88)	0,1
szérum FHR-5, mg/L	1,54 (0,92-1,88)	1,34 (1,12-1,46)	2,16 (1,87-2,85)	<b>&lt;0,0001</b>

\*A *CFHR5* variációt hordozó betegek referenciaként vannak feltüntetve.

\*\*p értéket Mann-Whitney U teszt és  $\chi^2$  teszt segítségével határoztuk meg, összehasonlítva a betegeket, akikben a szérum FHR-5 <1,565 mg/L, illetve akikben szérum FHR-5 >1,565 mg/L.

Az alacsony FHR-5 szinttel rendelkező betegekre jellemző volt a hipokomplementémia, alacsony C3 szintekkel és csökkent alternatív út aktivitással (7. táblázat).

A 80 követett vad-típusú FHR-5-tel rendelkező beteg közül (medián követési idő: 1,53 év; 0,05-6 év) 17 beteg progrediált ESRD-be. Az ESRD-be progrediált betegekben szignifikánsan magasabb volt a szklerotikus glomerulus aránya (8. táblázat).

**8. táblázat.** *CFHR5* variációt nem hordozó betegek klinikai jellemzése a követési idő alatt kialakuló ESRD függvényében

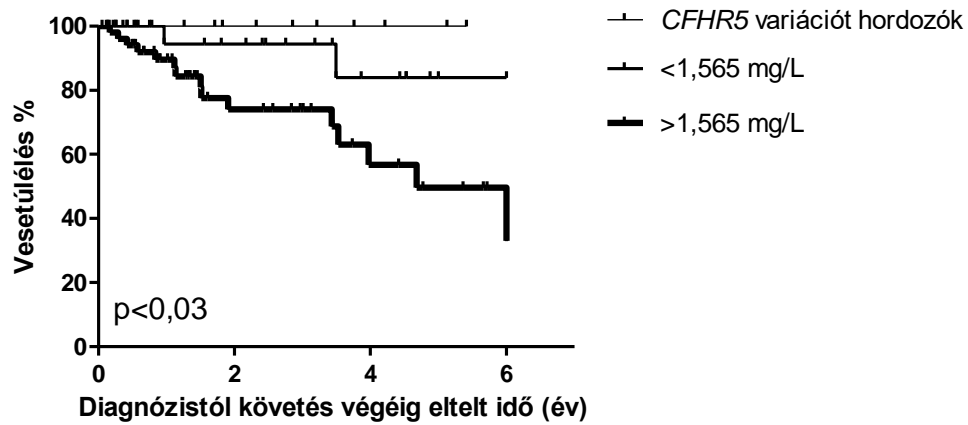
	ESRD-be progrediáló betegek a követés alatt n=17	ESRD-be nem progrediáló betegek a követés alatt n=63	P érték*
nem % férfi	10 (58,8)	36 (57,1)	0,9
diagnóziskori életkor	17,5 (3-40)	19 (12-37)	<b>0,046</b>
mikrohématuria, jelenléte	13 (76,5)	38 (61,3)	0,24
makrohématuria, jelenléte	3 (17,6)	12 (19,3)	1
nefrózis szindróma, jelenléte	12 (70,6)	28 (45,2)	0,09
vesekárosodás, jelenléte	10 (58,8)	4 (6,5)	0,055
veseelégtelenség, jelenléte	5 (29,4)	4 (6,5)	<b>0,02</b>
szklerotikus glomerulus (%)	27 (7,1-53,5)	5,2 (0-20,8)	0,014
félhold képződés (%)	0 (0-17,3)	0 (0-9,1)	0,87
szérum C3, g/L	0,95 (0,36-1,27)	0,61 (0,2-1)	0,07
szérum C4, g/L	0,24 (0,22-0,42)	0,22 (0,16-0,31)	0,16
sC5b-9, ng/mL	350 (234-615)	422 (262-913)	0,27
csökkent C3, jelenléte	10 (58,8)	34 (53,9)	0,08
csökkent C3 normális C4 szinttel, jelenléte	1 (5,8)	7 (11,1)	1
emelkedett sC5b-9, jelenléte	10 (62,5)	45 (77,6)	0,22
Klasszikus út aktivitás, CH50/mL	48 (30,5-66,5)	43 (21-60)	0,22
Alternatív út aktivitás, %	76 (21-91)	37 (1-83)	0,11
szérum FHR-5, mg/L	1,96 (1,69-2,25)	1,75 (1,38-2,56)	0,34

\* Az összehasonlítás Mann-Whitney U teszttel és  $\chi^2$  teszttel történt.

A külön csoportként kezelt *CFHR5* variációt hordozó betegeknél azt mindenképpen kiemelném, hogy közülük egy sem progrediált ESRD-be.

Az ESRD-be progrediált betegek közül 15 tartozott a magas FHR-5 szinttel rendelkező csoportba (ESRD ráta: 0,38/esemény/ember/év, medián követési idő: 1,45 év; 0,05-6 év), míg a maradék 2 fő az alacsony FHR-5 szinttel rendelkező csoport tagja volt (ESRD ráta: 0,04/esemény/ember/év, medián követési idő: 1,98 év; 0,11-6 év). A magasabb FHR-5 szinttel rendelkező betegekre (medián=2,16; 1,87-2,85) rosszabb vesetűlés volt jellemző, azokhoz a betegekhez képest, akikben alacsonyabb volt az FHR-5 koncentráció

(medián=1,34; 1,12-1,46) ( $p=0,034$ ), illetve ha a csoportokat együtt elemeztük ( $p=0,016$ ) (15. ábra).



Rizikóbetegek	0	2	4	6
<i>CFHR5</i> variációt hordozók	13	8	4	1
<1,565 mg/L	28	16	8	2
>1,565 mg/L	52	21	10	3

**15. ábra.** A betegek FHR-5 szintje és a vesetülés közötti kapcsolat

### **5.3. C4 nefritikus faktor vizsgálata a C3G/IC-MPGN-es betegpopulációban**

#### **5.3.1. C4 nefritikus faktor előfordulása C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban**

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a C4NeF előfordulását, 119 hisztológiailag igazolt C3G/IC-MPGN-es beteg szérumában határoztuk meg a C4NeF aktivitását hemolítikus teszt segítségével. 17 betegben azonosítottuk a C4NeF jelenlétét, közülük 7 (17,5%) IC-MPGN-ben, 1 (8,3%) DDD-ben és 9 (16,4%) C3G-ben szenvedett. A C4NeF-ral rendelkező betegek hisztológiai, genetikai és komplement jellemzőit a 9. táblázat tartalmazza.

#### **5.3.2. C4 nefritikus faktor összefüggése a betegek különböző klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement paramétereivel**

A vizsgálatba bevont betegeket két csoportra osztottuk az alapján, hogy jelen van-e a C4NeF autoantitest. A betegek klinikumában nem találtunk különbséget a C4NeF-re pozitív illetve negatív betegek között a hematuria, proteinuria tekintetében. Egyedül a diagnóziskor jelenlevő veseelégtelenség prevalenciája volt alacsonyabb a C4NeF pozitív betegek csoportjában. A betegek komplement paramétereit elemezve nem találtunk különbséget a C3 és C4 fehérjék szérumszintje között. A C4NeF pozitív egyének mintáiban alacsonyabb klasszikus és alternatív út aktivitást mértünk. A C1q szintekben és anti-C1q antitest jelenlétében szintén nem találtunk különbséget a C4NeF pozitív, illetve C4NeF negatív betegek között. A C4 hasításából származó C4d aktivációs termék szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a C4NeF-ral rendelkező betegekben (10. táblázat).

**9. táblázat.** C4NeF-ral rendelkező IC-MPGN/C3G betegek hisztológiai, genetikai és komplement jellemzői

Beteg azonosító	LPV	Allél frekvencia 1000 Genomes Project alapján	Funkcionális vizsgálatok	CFH, CFHR1, CFHR2, CFHR3 és CFHR5 kópiaszám	Szöveti csoport	C3NeF, %	C3, g/L	sC5b-9
HUN260	-	-	-	Vad-típus	IC-MPGN	14,3	0,15	1450
HUN477	-	-	-	Vad-típus	IC-MPGN	12,5	1,23	1715
HUN542	-	-	-	CFHR1 és CFHR3 het. deléciója	DDD	2,4	0,51	103
HUN586	-	-	-	CFHR1 és CFHR3 het. deléciója	C3GN	28,2	0,17	2127
HUN588	-	-	-	Vad-típus	C3GN	5	0,17	>800
HUN589	na	na	na	na	C3GN	4,9	0,35	-
HUN625	na	na	na	na	C3GN	1,6	0,25	-
HUN634	CD46 E142Q het.	0,0%	van (170)	CFHR1 és CFHR3 het. deléciója	C3GN	5,3	0,15	2874
HUN1112	na	na	na	na	IC-MPGN	5,8	0,96	459
HUN1181	na	na	na	na	IC-MPGN	4,7	0,96	-
HUN1312	-	-	-	CFHR1 és CFHR3 het. deléciója	C3GN	14,6	1,07	231
HUN1360	-	-	-	Vad-típus	IC-MPGN	18,6	0,2	2117
HUN1447	C3 R315X het.	0.0%	nincs	CFHR1 és CFHR3 het. deléciója	IC-MPGN	20	0,05	2575
HUN1652	-	-	-	Vad-típus	IC-MPGN	62	0,31	1581
HUN1712	CFI A240 G het.	0.0%	van (104)	Vad-típus	IC-MPGN	9,98	1,07	119
HUN1739	CD46 A353 V het.	0.4%	van (162, 164, 165)	CFHR1 és CFHR3 het. deléciója	IC-MPGN	5	0,52	228
HUN1772	-	-	-	Vad-típus	C3GN	8,6	0,93	346

Rövidítések: LPV: likely pathogenic variation, feltételezhetően patogén variáció; het.:heterozigóta, na: nincs adat

normáltartományok: C3NeF<10%; C3: 0,8-1,9 mg/L; sC5b-9: 110-252 ng/mL



**10.táblázat.** C4NeF pozitív, illetve C4NeF negatív IC-MPGN/C3G betegek klinikai és komplement jellemzői

	C4NeF pozitív betegek n=17	C4NeF negatív betegek n=102	p
nem % férfi	9 (53)	58 (57)	0,79
diagnóziskori életkor, év	16 (14-31,5)	24 (12,75-41)	0,24
mikrohématuria, jelenléte	11 (65)	59 (58)	0,79
makrohématuria, jelenléte	2 (12)	21 (21)	0,52
nefrózis szindróma, jelenléte	7 (41)	54 (53)	0,43
vesekárosodás, jelenléte	1 (6)	44 (43)	<b>0,002</b>
veseelégtelenség, jelenléte	1 (6)	11 (11)	1
trigger, jelenléte	2 (12)	19 (19)	0,73
családi halmozódás, jelenléte	1 (6)	9 (9)	1
szérum C4, g/l	0,2 (0,12-0,26)	0,23 (0,17-0,32)	0,232
szérum C3, g/l	0,33 (0,19-0,98)	0,73 (0,39-01)	0,115
Klasszikus út aktivitás, CH50/mL	30 (11-54)	46 (28-61)	0,065
Alternatív út aktivitás, %	40 (0-67)	63 (3-87)	0,055
C3NeF pozitivitás	7(41)	20 (19,6)	0,063
C1q, mg/L	108 (83-138)	102 (83-123)	0,528
anti-C1q, U/mL	4 (23,5)	10 (9,8)	0,117
C4d, ng/mL	3,23 (2,6-5,3)	5,46 (3,15-9,27)	<b>0,038</b>

A változókat a medián értékükkel, az interkvartilis tartomány, illetve százaléként adtuk meg. A p-értéket  $\chi^2$ -teszt és Mann-Whitney teszt segítségével határoztuk meg.

A következő változók esetében bizonyos betegek értékei hiányoznak: vesekárosodás/elégtelenség (n=3), trigger (n=2), családi halmozódás (n=1).

Megfigyeltük, hogy a C3NeF előfordulása magasabb volt azokban a betegekben, ahol C4NeF-et is detektáltunk. Ez alapján kíváncsiak voltunk, hogy a kétféle autoantitest előfordulása és a betegség megjelenése, valamint a laboratóriumi paraméterek között van-e összefüggés. Ennek vizsgálatára négy csoportot hoztunk létre: csak C3NeF-ral rendelkező csoport (n=20), csak C4NeF-ral rendelkező csoport (n=10), mindkét antitestre pozitív csoport (n=7), illetve mindkét antitestre negatív csoport (n=82) (11. táblázat).

A mindkét nefritikus faktoral rendelkező betegek fiatalabbak voltak a többi beteghez viszonyítva. Szintén megfigyeltük, hogy a C4NeF-ral rendelkező betegek esetében – akár önmagában, akár C3NeF-ral együtt – a diagnózis idején veseelégtelenség ritkábban állt fenn (11. táblázat).

A dupla pozitív betegeket alacsonyabb C3 szint jellemezte, de hasonló különbséget nem tapasztaltunk a C4 szintek tekintetében. Ezzel egybehangzóan magasabb sC5b-9 szinteket detektáltunk a dupla pozitív csoportban, míg a csak C4NeF-ra pozitív csoportban mértük

a legalacsonyabb szinteket. Szintém a dupla pozitív csoportban detektáltuk a legalacsonyabb klasszikus és alternatív út aktivitásokat, míg ezek aktivitása az antitest negatív csoportban volt a legmagasabb. Az alternatív út aktivitása szintén csökkent volt a C3NeF pozitív csoportban. A többi vizsgált komplement faktor tekintetében egyedül a C4d szint esetében találtunk különbséget, az antitest negatív csoporthoz képest minden esetben alacsony szinteket mértünk.

A betegek biopsziás leírását vizsgálva egyedül a C1q jelölődése volt hiányos számottevően a C4NeF pozitív csoportban (12. táblázat).

Megvizsgáltuk, hogy van-e bármilyen összefüggés az öröklött faktorok és a C4NeF előfordulása között, de nem találtunk kapcsolatot a különböző génekben azonosított LPV-ekkel.

Mivel azt tapasztaltuk, hogy a C3NeF és C4NeF együtt, illetve külön-külön is előfordulhat, további komplement autoantitesteket is megvizsgáltunk. A dupla pozitív csoportban tapasztaltunk leggyakrabban további autoantitesteket, úgymint az anti-C1q és anti-C3b megjelenését.

**11. táblázat.** A nefritikus faktor státuszuk alapján osztályozott IC-MPGN/C3G betegek klinikai, komplement és genetikai eredményei

	C3NeF pozitív betegek n=20	C4NeF pozitív betegek n=10	Dupla pozitív betegek C3NeF-ra és C4NeF-ra n=7	C3NeF-ra és C4NeF-ra negatív betegek n=82	p
nem % férfi	13 (65)	6 (60)	3 (42,9)	45 (54,9)	0,057
diagnóziskori életkor	15 (9-21) <sup>1</sup>	14 (11-39)	16 (11-17)	28 (13-41)	<b>0,036</b>
mikrohématuria, jelenléte	12 (60)	7 (70)	4 (80)	47 (58,8)	0,735
makrohématuria, jelenléte	6 (30)	2 (20)	0 (0)	15 (18,8)	0,461
nefrózis szindróma, jelenléte	12 (60)	5 (50)	2 (28,6)	42 (53,2)	0,552
vesekárosodás, jelenléte	9 (45)	1 (10)	0 (0)	35 (44,3) <sup>2,3</sup>	<b>0,026</b>
veseelégtelenség, jelenléte	2 (10)	1 (10)	0 (0)	9 (11,4)	0,824
trigger, jelenléte	8 (40)	1 (11,1)	1 (14,3)	11 (13,8)	<b>0,045</b>
családi halmozódás, jelenléte	2 (10)	1 (11,1)	0 (0)	7 (8,6)	0,863
szérum C3, g/l	0,34 (0,2-0,77) <sup>1</sup>	0,52 (0,25-0,96)	0,2 (0,17-1,07)	0,84 (0,48-1,04)	<b>0,01</b>
szérum C4, g/l	0,25 (0,13-0,33)	0,23 (0,19-0,28)	0,15 (0,11-0,26)	0,22 (0,17-0,31)	0,57
sC5b-9, ng/ml	575 (384-1206) <sup>1</sup>	287 (115-1063)	1716 (1450-2127) <sup>1,2</sup>	368 (244-553)	<b>0,000</b> <b>4</b>
LPV hordozó	5 (27,7)	3 (50)	1 (14,3)	13 (16,5)	0,19
Klasszikus út aktivitás, CH50/mL	36 (12,5-59)	39 (18-59)	14 (0-46)	47,5 (31-61)	0,077
Alternatív út aktivitás, %	1,5 (1-89)	57,5 (0,75-68,5)	1 (0-58)	65 (13-86) <sup>3,4</sup>	<b>0,033</b>
C1q, mg/L	108 (93-146)	111 (80,25-145)	104 (73-124,5)	101 (76-121,5)	0,46
H-faktor, mg/L	573,5 (360-697)	546,5 (360-639)	495 (384-763)	538 (370-742)	0,977
I-faktor, %	92,5 (78-103)	82 (67-102,5)	90 (78-107)	92,5 (78-111)	0,598
B-faktor, %	85 (65-98,5)	84 (65-107)	86 (66-107)	86 (65,5-103)	0,971
D-faktor, ug/mL	2,15 (1,06-3,72)	1,83 (0,78-5,28)	0,48 (0,33-2,5)	2,44 (0,98-4,13)	0,16
C3a, ng/mL	113 (77-274)	124 (72-190)	138 (53-188)	137 (91-221)	0,805
Bb, ug/mL	2,24 (1,52-3,4)	0,93 (0,89-2,27)	1,14 (0,71-2,37)	1,45 (1,01-2,08)	0,079
C4d, ng/mL	3,97 (3,25-8,9)	3,23 (2,66-4,41)	3,71 (0,59-6,2)	5,77 (3,04-9,27)	0,21
anti-H faktor, jelenléte	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (7,3)	0,359
anti-C1q, jelenléte	2 (10)	1 (10)	3 (25,2) <sup>2</sup>	8 (9,7)	<b>0,044</b>
anti-C3, jelenléte	1 (5)	0 (0)	2 (28,57) <sup>1</sup>	2 (2,5)	<b>0,011</b>
anti-B-faktor, jelenléte	2 (10)	0 (0)	0 (0)	4 (5)	0,608
További antitestek*, jelenléte	3 (16,6)	1 (11,1)	4 (57,14) <sup>3</sup>	15 (19,73)	0,09

A változókat a medián értékükkel, az interkvartilis tartománnyal, illetve százalékként adtuk meg. A p-értéket  $\chi^2$ -teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével határoztuk meg. <sup>1</sup>Szignifikánsan különbözik nefritikus faktorokra negatív betegektől. <sup>2</sup>Szignifikánsan különbözik C4NeF pozitív betegektől. <sup>3</sup>Szignifikánsan különbözik dupla pozitív betegektől. <sup>4</sup>Szignifikánsan különbözik C3NeF pozitív betegektől. Referencia tartomány: C3 0,9-1,8 g/L; C4 0,15-0,55g/L; sC5b-9 110-252 ng/mL; klasszikus út aktivitás 48-103 CH50/ml; alternatív út aktivitás 70-125%; C1q 60-180 mg/L; H-faktor 250-880 mg/l; I-faktor 70-130%; B-faktor 70-130%; D-faktor 0,51-1,59  $\mu$ g/mL; C3a 70-270 ng/mL; C4d 0,7-6,3  $\mu$ g/mL; Bb 0,49-1,42  $\mu$ g/mL;

A következő változók esetében bizonyos betegek értékei hiányoznak: proteinuria (n=3), vesekárosodás/elégtelenség (n=3), trigger (n=2), családi halmozódás (n=1), sC5b-9 (n=15), LPV (n=9), C1q (n=13), D-faktor (n=23), C3a (n=19), Bb (n=23), C4d (n=23), anti-H-faktor (n=2), anti-C1q (n=8), anti-C3 (n=3), anti-B-faktor (n=3). \* anti-H-faktor, anti-C1q, anti-C3, anti-B-faktor.

**12. táblázat.** A nefritikus faktor státuszuk alapján osztályozott IC-MPGN/C3G betegek hisztológiai eredményei

	C3NeF pozitív betegek n=20	C4NeF pozitív betegek n=10	Dupla pozitív betegek C3NeF-ra és C4NeF-ra n=7	C3NeF-ra és C4NeF-ra negatív betegek=82	p	
Biopsziáig eltelt idő, hónap	0,01 (0-0,72)	0 (0-12)	0 (0-0,23)	0 (0-0,91)	0,67	
<i>Fénymikroszkópia</i>						
szklerotikus glomerulus %	5 (0-21,2)	7,5 (0-17)	0 (0-0)	5,6 (0-34)	0,22	
félhold képződés %	0 (0-0)	0 (0-8,5)	0 (0-0)	0 (0-8,6)	0,45	
mezangiális proliferáció foka	0/1/2/3*	4/4/8/3	1/2/3/4	0/2/2/3	13/24/33/12	0,51
endokapilláris proliferáció foka	0/1/2/3*	8/2/8/1	4/2/0/4	1/3/2/1	36/16/21/9	0,08
intersticiális inflammáció foka	0/1/2/3*	6/8/4/1	8/1/1/0	4/3/0/0	31/32/15/4	0,39
intersticiális fibrózis foka	0/1/2/3*	6/8/4/1	4/4/2/0	5/2/0/0	32/23/23/4	0,69
arteriola szklerózis	16 (80)	8 (80)	6 (85,7)	54 (65,)	0,28	
<i>Immunfluoreszcens mikroszkópia</i>						
C3	0/1/2/3*	0/0/6/14	0/0/2/7	0/0/4/3	5/5/30/41	0,52
IgA	0/1/2/3*	14/3/1/2	7/1/0/0	5/1/1/0	56/15/2/8	0,82
IgG	0/1/2/3*	8/7/2/3	7/1/0/1	5/1/1/0	39/21/11/10	0,68
IgM	0/1/2/3*	6/9/4/1	3/2/1/2	1/2/4/0	27/27/20/8	0,48
C1q	0/1/2/3*	8/7/2/1	6/1/0/0 <sup>1,2,3</sup>	1/1/5/0	32/22/10/8	<b>0,008</b>
<i>Elektronmikroszkópia</i>						
mezangiális depozitum, jelenléte	10 (50)	4 (40)	5 (71,4)	43 (52,4)	0,313	
szubepiteliális depozitum, jelenléte	9 (45)	2 (20)	2 (28,6)	27 (32,9)	0,794	
szubendoteliális depozitum, jelenléte	9 (45)	3 (30)	5 (71,4)	39 (47,6)	0,188	
intramembránózus depozitum, jelenléte	12 (60)	4 (40)	1 (14,3)	29 (43,9)	0,164	

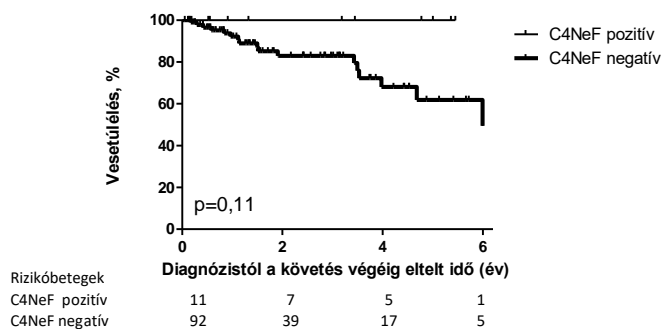
A változókat a medián értékükkel, az interkvartilis tartománnyal, illetve százaléként adtuk meg. A p-értéket  $\chi^2$ -teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével határoztuk meg. <sup>1</sup> Szignifikánsan különbözik C3NeF pozitív betegektől. <sup>2</sup> Szignifikánsan különbözik dupla pozitív betegektől. <sup>3</sup> Szignifikánsan különbözik a nefritikus faktorokra negatív betegektől.\* Fénymikroszkópián és immunfluoreszcens mikroszkópián látott elváltozások fokát 0-tól 3-ig terjedő skálán határoztuk meg.

A következő változók esetében bizonyos betegek értékei hiányoznak: proteinuria: C3- (n=2), IgA- (n=3), IgG- (n=2), IgM- (n=2), C1q (n=15) immunfluoreszcens festés és elektronmikroszkópia (n=23).

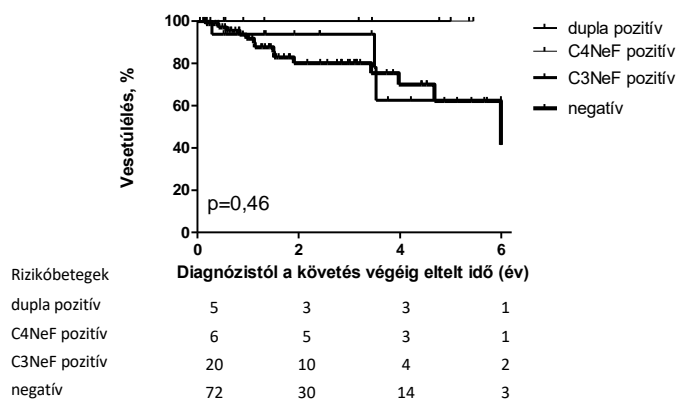
### 5.3.3. Vesetülélés összefüggése a C4NeF jelenlétével

A 119 betegből 103 beteget tudtunk nyomonkövetni (medián:1,52 év; 0,05-6 év). A diagnózis idején 12 betegnek volt veseelégtelensége, akik közül egy beteg volt pozitív a C4NeF-ra. A követési idő alatt 17 beteg progrediált ESRD-be: ezen betegek közül 14-ben nem mutattunk ki sem C3NeF-t, sem C4NeF-t, a további 3 beteg C3NeF-ra pozitívnak bizonyult. A C4NeF pozitív és negatív betegek túlélését tekintve nem találtunk közöttük szignifikáns különbséget (16/A ábra). Szintén nem mutattunk ki különbséget a C3NeF pozitív, C4NeF pozitív, dupla pozitív és negatív csoportok között (16/B ábra).

**A**



**B**



**16. ábra.** A betegek vesetülélése a (A) C4NeF pozitív és negatív, illetve a (B) C3NeF pozitív, C4NeF pozitív, dupla pozitív és negatív betegcsoportokban.

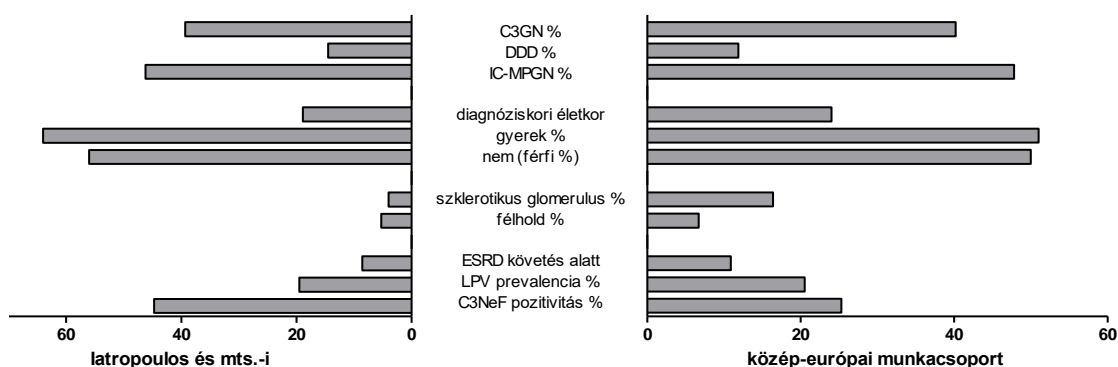
## **5.4. Adat-vezérelt hipotézismentes klaszteranalízis végzése a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement eredményei alapján**

### **5.4.1. Az olasz és a közép-európai betegcsoport összehasonlítása**

Megvizsgáltuk, hogy az általunk bevont betegek alkalmasak-e arra, hogy az így létrejött betegcsoporton megismételjük, és esetlegesen validáljuk az olasz munkacsoport eredményeit. Ehhez első lépésként összehasonlítottuk a két független betegcsoportot ismert paramétereik tekintetében.

A mi kohorszunkban a betegek 40,2%-a szenvedett C3GN-ben, 12%-a DDD-ben és 47,8%-a IC-MPGN-ben, míg az olasz kohorszban 39,3%, 14,5% és 46,2% volt a diagnózisok megoszlása. Az általunk vizsgált betegcsoportban az átlagéletkor 24 év volt, az olasz kohorszban 18,9 év, továbbá a mi gyűjtésünkben 51%-ban fordultak elő gyerekek szemben a 64%-kal. Vizsgálatunkban a C3GN-es betegek átlagéletkora 28 év volt, míg az olasz vizsgálatban 18,2 év. A nemek megoszlása hasonló volt a két csoportban (férfiak: 0,5 vs. 0,56). Az olasz vizsgálatban a biopsziáig eltelt idő kevesebb, mint egy év volt a C3GN-ben és IC-MPGN-ben szenvedő betegeknél, a DDD-ben szenvedő betegeknél 1,1 év volt, ami hosszabb volt, mint a mi vizsgálatunkban, ahol az esetek nagy részében a diagnózissal egy időben történt a mintavétel. A betegség súlyosságát jellemző szklerotikus glomerulus jelenléte magasabb volt a mi betegcsoportunkban (16,4% vs. 4%), míg a félhold képződés mértéke nem mutatott különbséget (6,7% vs. 5,3%). A diagnóziskor fennálló veseelégtelenség 12% volt a közép-európai, míg 1,2 % volt az olasz kohorszban. A követési idő a betegek 50%-nál 5 (0,05-10,32 év) illetve 2 év (~0,1-10 év) volt. A követés alatt ESRD-be progrediáló betegek előfordulása 10 % és 8,6% volt a két betegcsoportban. Az LPV-k (20,5% vs. 19,5%) és a C3NeF (25,3% vs. 44,7%) előfordulása között kis különbséget tapasztaltunk a két csoport között (17. ábra).

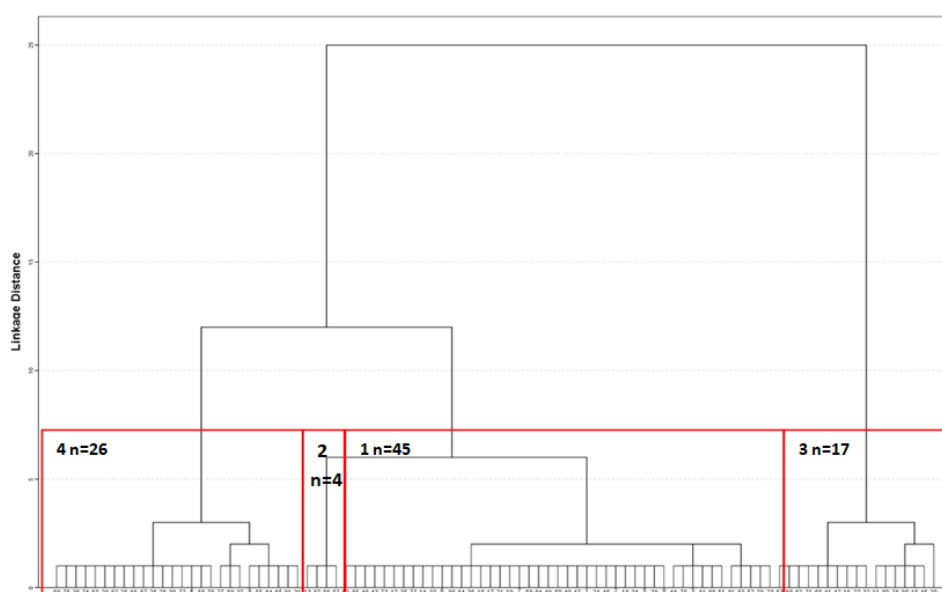
Fentiek alapján a legfontosabb klinikai, genetikai és biokémiai adatok segítségével a két kohorsz egymással összehasonlítható, és az általunk gyűjtött betegcsoport alkalmas arra, hogy megismételjük rajta a korábban közölt analíziseket (17. ábra).



**17. ábra.** Az olasz és a közép-európai munkacsoport kohorszainak grafikus összehasonlítása

#### 5.4.2. A generált klaszterek jellemzése és összehasonlítása Iatropoulos és mts. munkájával

Hierarchikus klaszter analízissel 4 klasztert generáltunk. 45 beteg került az 1-es, 4 beteg a 2-es, 17 beteg a 3-as és 26 beteg a 4-es klaszterbe. Az analízis során először a 3-as klaszter határolódott el, melyet főleg fiatal betegek alkottak alacsony sC5b-9 szinttel és szklerotikus glomerulusok gyakori jelenlétével. Következő lépésben a 4-es klaszter vált külön, melybe idősebb betegek tartoztak jellemzően magasabb C3 szintekkel (18. ábra).



**18. ábra.** Hierarchikus klaszter analízis ágrajza

Az 1-es klasztert alacsony C3 szint jellemezte (medián: 0,5 g/L), jelentősen emelkedett sC5b-9 aktivációs marker szinttel (medián: 540 ng/mL) és a genetikai faktorok, valamint a C3NeF magas előfordulási gyakoriságával. Főleg fiatal betegek kerültek ebbe a csoportba (medián életkor: 13 év). A diagnózis idején a betegeket alacsony kreatinin szint és jó vesefunkció jellemezte. A biopsziás képen hiányoztak a szklerotikus glomerulusok és a félholdképződés. Az immunfluoreszcenciás képen a C3 jelölődésen túl immunglobulin jelölődés is detektálható volt, mely megegyezett az olasz 1-es klaszterben megállapítottakkal.

A 2-es klaszterben tapasztaltuk a legerősebb festődést IgA-ra, IgG-re és C1q-ra lényeges félholdképződéssel. A 4-ből 3 betegnél jelentkezett nefrózis szindróma. Ebbe a klaszterbe kevés beteg került, és mivel így nem adtak volna releváns információt, őket a további analízisekből kizártuk.

A 3-as klaszterben tapasztaltuk a legalacsonyabb sC5b-9 (medián: 250 ng/mL) szinteket, mely együtt járt az enyhén csökkent C3 szintekkel (medián: 0,77 ng/mL), és az LPV-k magas előfordulási gyakoriságával. A fénymikroszkópos képet intersticiális fibrózis és inflammáció jellemezte sok szklerotikus glomerulus jelenlétével és kevés félholdképződéssel a többi klaszterhez viszonyítva.

A 4-es klaszterbe idősebb betegek kerültek (medián: 39,5 év) normális C3 szintekkel. Ezt a klasztert az elektronmikroszkópiás képen kevesebb intramembránózus depozitum jellemezte. Az olasz munkacsoport vizsgálatában ebben a klaszterben több esetben is jelentkezett trombotikus mikroangiopátia. Mi ezt nem tudtuk vizsgálni, mivel a mi anyagunkban csak két esetben jelentkezett trombotikus mikroangiopátia és ezeket a betegeket hiányzó paraméterek miatt nem tudtuk bevonni a klaszteranalízisbe.

A különböző klaszterekbe tartozó betegek klinikai, genetikai és komplement jellemzőit a 13. táblázat, a hisztológiai adatait a 14. táblázat tartalmazza.



**13. táblázat.** A betegek klinikai, genetikai és komplement jellemzői a különböző klaszterekben

	<b>Klaszter 1 n=45</b>	<b>Klaszter 2 n=4</b>	<b>Klaszter 3 n=17</b>	<b>Klaszter 4 n=26</b>	<b>P</b>
N	45	4	17	26	
nem % férfi	20 (44,4)	3 (75)	12 (70,6)	11 (42,3)	0,16
diagnóziskori életkor, év	13 (7-16)	9,5 (8-20)	25 (10-33)	39,5 (33-50) <sup>1,2</sup>	<b>&lt;0,0001</b>
mikrohématuria, jelenléte	27 (60)	2 (50)	11 (64,7)	16 (61,5)	0,94
makrohématuria, jelenléte	9 (20)	2 (50)	4 (23,5)	5 (19,2)	0,93
nem-nefrotikus proteinuria, jelenléte	24 (53,3)	1 (25)	7 (41,2)	12 (48)	0,68
nefrózis szindróma, jelenléte	17 (37,7)	3 (75)	10 (58,8)	13 (52)	0,25
vesekárosodás, jelenléte	9 (20) <sup>2</sup>	2 (50)	11 (64,7)	10 (40)	<b>0,003</b>
veseelégtelenség, jelenléte	4 (8,9)	1 (25)	1 (5,9)	5 (20)	0,27
kreatinin µmol/L	61 (49-79) <sup>2</sup>	215 (50-569)	170 (63-229)	166 (92-285)	<b>0,005</b>
trigger, jelenléte	12 (26,7) <sup>3</sup>	1 (25)	1 (5,9)	1 (4)	<b>0,02</b>
családi halmozódásjelenléte (%)	4 (8,9)	0 (0)	4 (23,5)	2 (7,7)	0,21
szérum C3 g/l	0,5 (0,23-0,84) <sup>3</sup>	0,64 (0,29-0,93)	0,77 (0,4-0,92)	0,93 (0,66-1,17)	<b>0,02</b>
szérum C4 g/l	0,19 (0,12-0,3) <sup>2</sup>	0,35 (0,18-0,6)	0,25 (0,21-0,4)	0,24 (0,2-0,3)	<b>0,01</b>
alacsony szérum C3 normális szérum C4-gyel, jelenléte	20 (44,4)	3 (75)	11 (64,7)	10 (38,5)	0,22
sC5b-9 ng/mL	540 (332-1136) <sup>2</sup>	438 (275-724)	250 (189-404)	407 (261-500)	<b>0,003</b>
LPV hordozó	10 (23,2)	0 (0)	3 (17,6)	5 (20,8)	0,89
C3NeF pozitívitas, jelenléte	17 (38,6) <sup>3</sup>	1 (25)	2 (11,8)	3 (11,5)	<b>0,02</b>
LPV hordozó és/vagy C3NeF pozitív, jelenléte	21 (46,7)	1 (25)	4 (23,5)	7 (26,9)	0,21

A változókat a medián értékükkel, az interkvartilis tartomány, illetve százaléként adtuk meg. A p-értéket  $\chi^2$ -teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével kaptuk meg az 1-es,3-as és 4-es klaszterek összehasonlításának eredményeként.

<sup>1</sup> Szignifikánsan különbözik klaszter 1-től. <sup>2</sup> Szignifikánsan különbözik klaszter 3-tól. <sup>3</sup> Szignifikánsan különbözik klaszter 4-től.

Referencia tartományok: C3: 0,9-1,8 g/L; C4: 0,15-0,55g/L; sC5b-9: 110-252 ng/mL

A következő változók esetében hiányzó értékek vannak: proteinuria, vesekárosodás/elégtelenség, sC5b-9, LPV, C3NeF

**14. táblázat.** A betegek hisztológia jellemzői a különböző klaszterekben

	<b>Klaszter 1</b> <b>n=45</b>	<b>Klaszter 2</b> <b>n=4</b>	<b>Klaszter 3</b> <b>n=17</b>	<b>Klaszter 4</b> <b>n=26</b>	<b>p<sup>#</sup></b>
Biopsziáig eltelt idő, (hónap)	0 (0-0,69)	1,85 (0,15- 4,91)	0 (0-0,6)	0 (0,46- 2,1)	0,22
<b>Fénymikroszkópia</b>					
szklerotikus glomerulus %	0 (0-5)	0 (0-0)	60 (47- 70) <sup>1,3</sup>	6 (0-19)	<b>&lt;0,00 01</b>
félhold képződés % mezangiális	0 (0-4)	55 (46-62) <sup>1,2,3</sup>	0 (0-6)	0 (0-9)	0,06
proliferáció foka endokapilláris	0/1/2/3* 5/11/18/11	1/1/2/0	2/3/6/4	4/11/9/2	0,34
proliferáció foka intersticiális	átlag±SD 1,78 (0,95)	1,25 (0,95)	1,59 (1,12)	1,35 (0,84)	0,48
inflammáció foka	0/1/2/3* 13/8/18/6	2/0/1/0	7/4/3/3	11/7/5/3	0,001
intersticiális inflammáció foka	átlag±SD 0,53 (0,625) <sup>2,3</sup>	0,75 (0,957)	1,59 (0,939) <sup>3</sup>	0,96 (0,916)	<b>&lt;0,00 01</b>
intersticiális fibrózis foka	0/1/2/3* 27/15/3/0	2/1/1/0	1/3/10/3	9/8/8/1	<b>&lt;0,00 01</b>
arteriola szklerózis, jelenléte	átlag±SD 0,47 (0,625) <sup>2,3</sup>	0,75 (0,957)	1,88 (0,78) <sup>3</sup>	1,04 (0,916)	<b>&lt;0,00 01</b>
<b>Immunfluoreszcens mikroszkópia</b>					
C3	0/1/2/3* 1/1/12/31	0/1/0/3	0/1/4/12	1/0/10/15	0,72
IgA	átlag±SD 2,62 (0,64)	2,5 (1)	2,64 (0,6)	2,5 (0,77)	0,89
IgG	0/1/2/3* 28/9/3/5	2/1/0/1	12/3/0/1	19/4/1/2	0,13
IgM	átlag±SD 0,67 (1,02)	1 (1,41)	0,37 (0,80)	0,46 (0,9)	0,5
C1q	0/1/2/3* 22/8/7/8	0/2/0/2	9/7/0/1	16/7/2/1	0,16
	átlag±SD 1,02 (1,17)	2 (1,15)	0,58 (0,79)	0,41 (0,65)	
<b>Elektronmikroszkópia</b>					
mezangiális depozitum, jelenléte	0/1/2/3* 14/16/10/5	1/3/0/0	7/5/2/2	12/8/6/0	0,93
szubepiteliális depozitum, jelenléte	átlag±SD 1,13 (0,99)	0,75 (0,5)	0,93 (1,06)	0,77 (0,81)	0,09
szubendoteliális depozitum, jelenléte	0/1/2/3* 18/11/9/7	1/1/1/1	10/5/0/1	12/7/3/0	0,28
intramembránózus depozitum, jelenléte	átlag±SD 1,11 (1,11)	1,5 (1,29)	0,5 (0,81)	0,59 (0,73)	0,07

A változókat a medián értékükkel, az interkvartilis tartomány, illetve százaléként adtuk meg. A <sup>#</sup>P - értéket  $\chi^2$ -teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével kaptuk meg az 1-es,3-as és 4-es klaszterek összehasonlításának eredményeként.

\* A fénymikroszkópián és elektronmikroszkópián látott elváltozásokat 0-tól 3-ig terjedő skálán értékeltük.

<sup>1</sup> Szignifikánsan különbözik 1-es klasztertől. <sup>2</sup> Szignifikánsan különbözik 3-as klasztertől. <sup>3</sup> Szignifikánsan különbözik 4-es klaszteről.

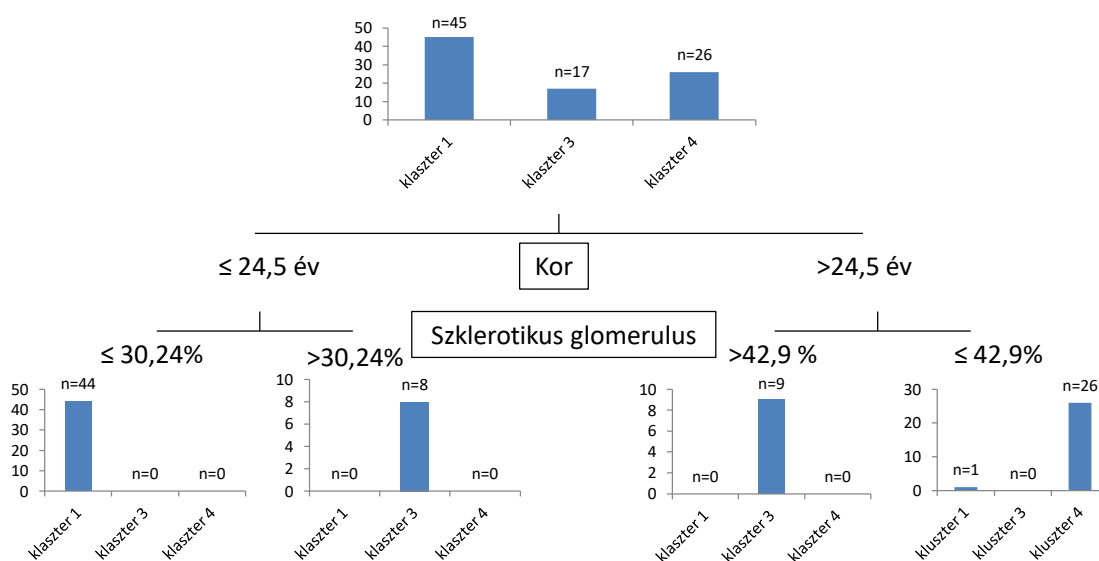
A következő változók esetében hiányzó értékek vannak: IgA-, IgM-, C1q immunfluoreszcens festődés.

Az olasz munkacsoport vizsgálatában a DDD-s betegek a 3-as klaszterbe estek. Mi nem találtunk kapcsolatot a generált klaszterek és az eredeti hisztológiai alapú diagnózis között (15. táblázat).

**15. táblázat.** A hisztológia-alapú diagnózis megoszlása a különböző klaszterekben

	Klaszter 1	Klaszter 2	Klaszter 3	Klaszter 4	p
C3GN	16	0	9	12	0,186
DDD	5	2	1	3	
IC-MPGN	24	2	7	11	

Azért, hogy megkeressük a legkevesebb változót, amellyel klasztereinket jellemezhetjük, egy döntési faanalízist használtunk. A prediktor változókat fontossági sorrendbe állítottuk. Ez alapján a két legmeghatározóbb változó a szklerotikus glomerulusok százalékos jelenléte, illetve a betegek diagnóziskori életkora volt. 3 vágópontot használva sikerült besorolni betegeinket a klaszterekbe (19. ábra).



**19. ábra.** A betegek besorolása a különböző klaszterekbe döntési fa analízis segítségével meghatározott vágópontok által.

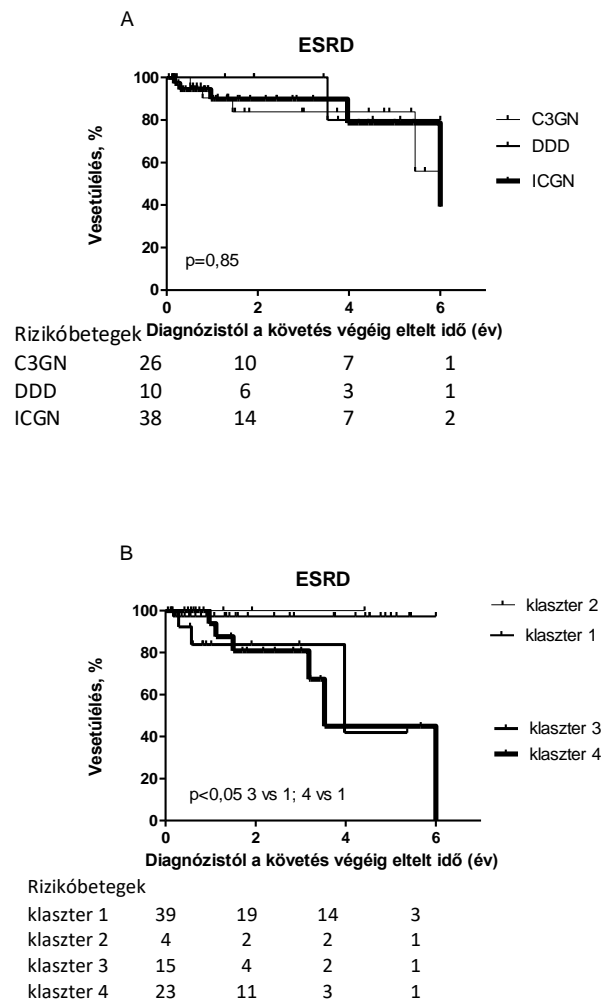
A prediktor változók fontossági sorrendjét a 16. táblázat tartalmazza. A két legfontosabb változón túlmenően további kiemelten fontos prediktor változó volt az intersticiális fibrózis, intersticiális inflammáció, arteriola szklerózis jelenléte, valamint az sC5b-9 szintje.

**16. táblázat.** A prediktor változók fontossági sorrendje döntési fa analízis segítségével meghatározva

	Változó	Prediktor fontosság	
		Változó rang	Fontosság
1	szklerotikus glomerulus	100	1,00
2	diagnóziskori életkor	46	0,45
3	intersticiális fibrózis foka	33	0,32
4	intersticiális inflammáció foka	20	0,20
5	sC5b-9 szint	20	0,20
6	arteriola szklerózis	19	0,18
7	veseelégtelenség jelenléte	12	0,11
8	CFH Y402H	11	0,11
9	szérum C4 szint	11	0,11
10	C1q jelölődés immunfluoreszcens mikroszkópián	11	0,10
11	IgM jelölődés immunfluoreszcens mikroszkópián	10	0,10
12	CD46 c.-366A>G	10	0,09
13	intramembránózus depozitum elektronmikroszkópián	9	0,09
14	félhold %	8	0,08
15	szubepiteliális depozitum elektronmikroszkópián	7	0,07
16	LPV	7	0,07
17	IgG jelölődés immunfluoreszcens mikroszkópián	7	0,06
18	trigger esemény	7	0,06
19	C3NeF pozitivitás	6	0,06
20	szubendoteliális depozitum elektronmikroszkópián	6	0,05
21	szérum C3 szint	6	0,05
22	családi halmozódás	5	0,05
23	nem	5	0,05
24	C3 R102G	5	0,04
25	endokapilláris proliferáció foka	5	0,04
26	CFH V62I	4	0,04
27	mezangiális proliferáció foka	4	0,04
28	proteinuria	3	0,03
29	mezangiális depozitumok elektronmikroszkópián	3	0,02
30	IgA jelölődés immunfluoreszcens mikroszkópián	3	0,02
31	C3 jelölődés immunfluoreszcens mikroszkópián	2	0,02
32	THBD A473V	2	0,02
33	hematuria	2	0,02
34	CFB Q/W 32R	1	0,01

### 5.4.3. A vesetúlélés összefüggése a klaszterekkel

Annak céljából, hogy megvizsgáljuk, van-e klinikai relevanciája az általunk azonosított klasztereknek, megnéztük van-e különbség a csoportok között a betegek vesetúlélésének tekintetében. 79 beteget követtünk, akik közül 10 beteg progrediált ESRD-be. 5 beteg esetében jelentkezett akut veseelégtelenség a diagnózis idején, mely később időlegesen regrediált. A 3-as és 4-es klaszterben rosszabb volt a betegek vesetúlélése Kaplan-Meier analízis eredményei alapján ( $p < 0,05$  1-es klaszter vs. 3-as klaszter; 1-es klaszter vs. 4-as klaszter) (20/A ábra). Ez alapján az idősebb betegek, magasabb szklerotikus glomerulus előfordulással, genetikai és szerzett (LPV, C3NeF) tényezők ritkább előfordulásával rosszabb prognózist mutattak. A hisztológiai csoportok között ezzel szemben nem figyeltünk meg különbséget (20/B ábra).



**20. ábra.** A betegek vesetúlélésének kapcsolata a hisztológiai-besorolással (A), illetve a klaszterekkel (B)

Látva a különbséget a klaszterek között a vesetúlélésben, kíváncsiak voltunk, hogy mennyire különböznek az alkalmazott terápiás eljárások a klaszterek között. A diagnóziskori adatokat analizálva nem találtunk jelentős eltérést a gyógyszeres kezelés tekintetében (17. táblázat).

**17. táblázat.** Az alkalmazott kezelések megoszlása a különböző klaszterekben

	<b>Klaszter 1</b> <b>n=45</b>	<b>Klaszter 2</b> <b>n=2</b>	<b>Klaszter 3</b> <b>n=17</b>	<b>Klaszter 4</b> <b>n=26</b>
ACE-I/ARB	28 (62,2)	1 (25)	10 (58,8)	12 (46,5)
szteroid	22 (48,8)	3 (75)	11 (64,7)	13 (50)
ciklofoszfamid	7 (15,5)	2 (50)	3 (17,6)	5 (19,2)
mikofenolát mofetil	8 (17,7)	0 (0)	3 (17,6)	2 (7,7)
ciklosporin	1 (2,2)	0 (0)	1 (5,8)	2 (7,7)
plazmaterápia	2 (4,4)	1 (25)	3 (17,6)	1 (3,8)
rituximab	2 (4,4)	1 (25)	2 (11,7)	0 (0)
eculizumab	1 (2,2)	1 (25)	1 (5,8)	0 (0)
vesepótló kezelés	1 (2,2)	1 (25)	3 (17,6)	2 (7,7)
takrolimus/azathioprin	1 (2,2)	0 (0)	0 (0)	2 (7,7)
kombinált terápia	22 (48,8)	2 (50)	8 (47)	10 (38,5)

#### 5.4.4. További komplement paraméterek összefüggése a klaszterekkel

Mivel összefüggést láttunk különböző komplement paraméterek, mint az sC5b-9 és a C3 szint, illetve a klaszterek között, ezért további komplement paramétereket is meghatároztunk, úgymint egyéb komplement fehérjéket, aktivációs termékeket (18. táblázat). A komplement aktivációs termék koncentrációk alacsonyak voltak és nem mutattak különbséget a klaszterek között.

Az 1-es klaszterben szignifikánsan alacsonyabb alternatív és klasszikus út aktivációt mértünk, csökkent D-faktor és C1q szintekkel. Ezek az eredmények a szintén csökkent C3 szintekkel alátámasztják a komplement aktiváció és konzumpció jelenlétét ebben a klaszterben.

A C3NeF előfordulása is magasabb volt az 1-es klaszterben, mely arra sarkallt bennünket, hogy további komplement autoantitesteket határozzunk meg, mint az anti-C1q, anti-H-faktor, anti-B-faktor és anti-C3b. A 13 anti-C1q pozitív beteg közül 11 esett az 1-es klaszterbe ( $p=0,018$ ), míg a többi antitest előfordulásában nem találtunk

különbséget. Az antitestek többszörös előfordulása szintén gyakrabban fordult elő az 1-es klaszterben.

Ugyanezen vizsgált faktorok és a hisztológiai csoportok között nem sikerült összefüggést megfigyelni.

### 18. táblázat. A betegek komplement profilja a különböző klaszterekben

	Klaszter 1	Klaszter 2	Klaszter 3	Klaszter 4	p
Klasszikus út aktivitás, CH50/mL	30,5 (6,5-47) <sup>2</sup>	50 (10,75-69,75)	60 (32,5-62)	54 (36,5-54)	<b>0,001</b>
Alternatív út aktivitás, %	7 (1-63) <sup>2</sup>	82,5 (18-103,5)	65 (16,5-84,5)	75 (19-97)	<b>0,02</b>
C1q antigén mg/L	95 (73-123)	94 (75,75-131,8)	112,5 (96,75-136)	105 (79-117)	0,09
anti-C1q pozitívitas, jelenléte	11 (24,4) <sup>2</sup>	0 (0)	1 (5,9)	1 (3,8)	<b>0,018</b>
anti-H-faktor pozitívitas, jelenléte	3 (7,1)	0 (0)	2 (11,8)	0 (0)	0,24
anti-C3 pozitívitas, jelenléte	4 (9,3)	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0,14
anti-B-faktorpozitívitas, jelenléte	2 (4,7)	1 (25)	2 (12,5)	1 (4,2)	0,47
Pozitívitas 1-nél több komplement autoantitestre <sup>3</sup>	5 (11,1) <sup>2</sup>	1 (25)	1 (5,8)	0 (0)	<b>0,04</b>
D-faktor, µg/mL	1,4 (0,65-2,49) <sup>1,2</sup>	2,65 (0,76-5,19)	3,16 (2,37-4,4)	2,48 (1,28-4,66)	<b>0,006</b>
C4d, µg/mL	4,18 (3,05-7,51)	9,37 (7,32-10,83)	3,42 (2,73-9,04)	5,76 (3,31-10,06)	0,32
Bb, µg/mL	1,34 (0,85-2,09)	1,34 (0,69-3,58)	1,6 (1,19-2,08)	1,49 (1,03-2,84)	0,38
C3a, ng/mL	176 (98,5-229,1)	102 (77,46-223)	123 (68-174,7)	172 (105,5-244,5)	0,2

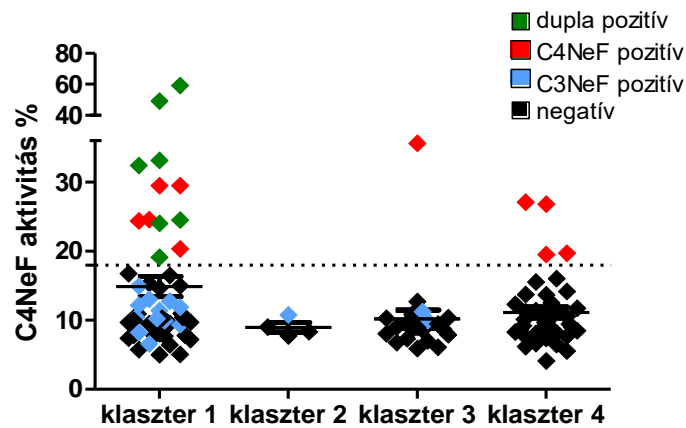
A változókat a medián értékükkel, az interkvartilis tartomány, illetve százaléként adtuk meg. A P - értéket  $\chi^2$ -teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével kaptuk meg az 1-es,3-as és 4-es klaszterek összehasonlításának eredményeként.

<sup>1</sup> Szignifikánsan különbözik a 3-as klasztertől.<sup>2</sup> Szignifikánsan különbözik 4-es klasztertől. <sup>3</sup> C3NeF, anti-C1q, anti-HF, anti-C3 és anti-BF közül.

Referencia tartományok: sC5b-9: 110-252 ng/mL; C3a: 70-270 ng/mL; C4d: 0,7-6,3 µg/mL; Bb: 0,49-1,42 µg/mL; D-faktor: 0,51-1,59 µg/mL

A következő változók esetében hiányzó értékek vannak: C1q antigén, anti-C1q, anti-HF, anti-C3 and anti-BF, D-faktor, C4d, Bb, C3

Megvizsgáltuk, hogy a C4NeF előfordulása mutat-e kapcsolatot a különböző klaszterekkel. Döntési fa analízis alapján azoknál a betegeknél, akik hiányzó adatok miatt nem vettek részt a klaszter alkotásban prediktáltuk, hogy melyik klaszterbe esnének, majd megnéztük, hogy a 17 C4NeF pozitív beteg hogyan oszlik meg a klaszterek között. 12 beteg esett az 1-es, 1 fő a 3-as és 4 beteg a 4-es klaszterbe. A C4NeF prevalenciája szignifikánsan magasabb volt az 1-es klaszterben ( $p=0,028$  1 vs. 3,4 klaszter) (18. ábra). A nefritikus faktorok előfordulását együtt értékelve szintén gyakrabban fordultak elő az 1-es klaszterben (21. ábra). A többi komplement autoantitestet is együttevén az antitestek többszörös előfordulásának aránya szintén magasabb volt ebben a klaszterben (19. táblázat).



	n=53	n=4	n=21	n=40	összes
dupla pozitív	7 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7
C4NeF pozitív	5 (50)	0 (0)	1 (10)	4 (40)	10
C3NeF pozitív	13 (68)	1 (5)	2 (11)	3 (16)	19
negatív	28 (34)	3 (4)	18 (22)	33 (40)	82

$p=0,008$

**21. ábra.** Nefritikus faktorok megoszlása a különböző klaszterekben



**19. táblázat.** Komplement autoantitestek előfordulása a klaszterekben

Autoantitest, pozitívítás/beteg	Autoantitest pozitívítás mintázat (érintett betegek száma)	klaszter 1 (n=46)	klaszter 2 (n=4)	klaszter 3 (n=20)	klaszter 4 (n=36)	Sor összesen
0	-	17 (28%)	3 (5%)	13 (21%)	28 (46%)	61 (100%)
1	C3NeF (14)	19 (57%)	0 (0%)	6 (19%)	8 (25%)	33 (100%)
	C4NeF (8)					
	anti-FH (5)					
	anti-C1q (5)					
	anti-FB (3)					
2	anti-C1q+anti-FH (2)	7 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
	anti-C1q+anti-C3 (1)					
	anti-C1q+C4NeF (1)					
	C3NeF + C4NeF (3)					
>2	anti-C1q+anti-FH+anti-FB (1)	5 (72%)	1 (14%)	1 (14%)	0 (0%)	7 (100%)
	anti-C1q + anti-FH+ anti-C3 (1)					
	C3NeF+anti-FB+anti- C1q (1)					
	C3NeF+C4NEF+anti-Cq (2)					
	C3NeF+C4NeF+anti-C3+anti-C1q (1)					
	C3NeF+C4NeF+anti-C3-anti-FB (1)					

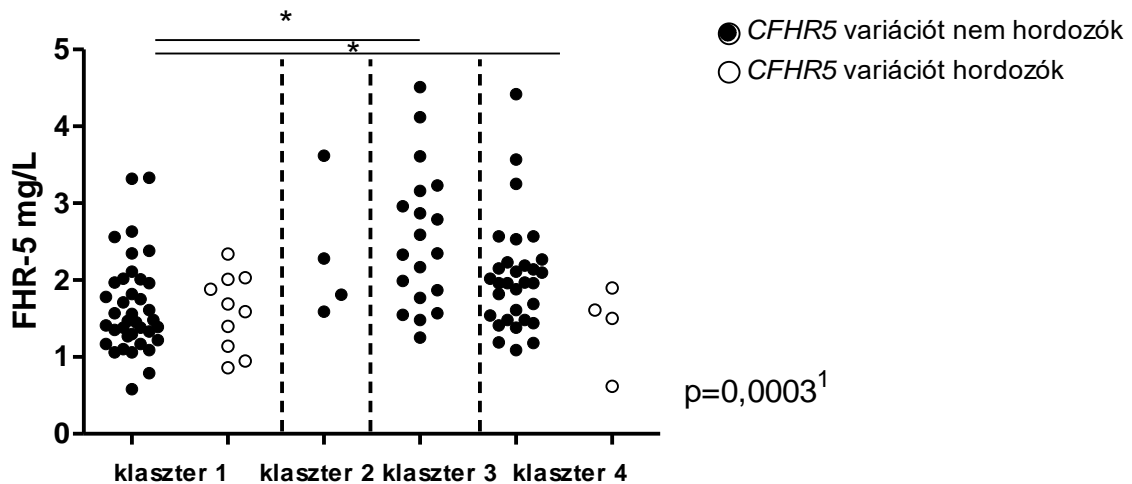
Kíváncsiak voltunk, hogy az FHR-5 szérumszintek, illetve a *CFHR5* variációk jelenléte mutat-e valamilyen kapcsolatot a karakterizált klaszterekkel. Ennek tisztázására a C4NeF vizsgálatához hasonlóan a betegek döntési fa alapján prediktált klasztereit használtuk, azoknál a betegeknél, akik a klaszteranalízisbe hiányzó adatok miatt nem kerültek be.

Az FHR-5 szérumszintek vizsgálatához a vad-típusú fehérjével rendelkező betegeket vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy az FHR-5 szintje nem-random eloszlást mutat a

különböző klaszterek között ( $p=0,0003$ ). A 3-as klaszterbe (medián 2,35 mg/L, 1,77-3,16) és a 4-es klaszterbe (medián 1,96 mg/L, 1,48-2,23) eső betegeknek magasabb FHR-5 szintjük volt az 1-es klaszterhez viszonyítva (1,47 mg/L, 1,25-1,98,  $p<0,05$ , Dunn's post test) (21. ábra).

Szintén megvizsgáltuk, hogy az azonosított *CFHR5* variációk hogyan oszlanak meg a klaszterek között. A *CFHR5* variációt hordozó betegek nagyobb arányban estek az 1-es klaszterbe (10/49, 20,4%) a többi klaszterhez képest (4/58, 6,9%) ( $p=0,047$ ,  $\chi^2$ -teszt) (22. ábra).

Az ESRD jelenléte ezzel szemben ritkábban fordult elő az 1-es klaszterben (2/43; 4,8%) a 3-as (5/17; 29,4%;  $p=0,016$ ), illetve a 4-es klaszterhez (9/33; 27,3%;  $p=0,007$ ) viszonyítva.



\* *CFHR5* variációt hordozók között szignifikáns különbség; Dunn-post hoc teszt  $p<0,05$

<sup>1</sup> ANOVA;  $p<0,05$

**22. ábra.** A betegek FHR-5 szérumszintjei a klaszterekben

## 6. MEGBESZÉLÉS

Munkám célja a membranoproliferatív glomerulonefritisek, elsősorban a komplement-mediált formák hátterének, jellemzőinek, pathogenetikai tényezőinek megismerése, pontosabb feltárása volt. A napjainkban elfogadott osztályozás szerint az MPGN a háttérben azonosítható folyamatok alapján felosztható immunkomplex-mediált és komplement-mediált formákra. Ennek alapja annak feltárása volt, hogy a komplement-mediált csoportban elsődlegesen a komplementrendszer alternatív útjának diszregulációja áll. Napjainkig a betegség hátterében mind szerzett, mind öröklött tényezőket azonosítottak, úgymint különböző genetikai elváltozásokat a komplement-asszociált génekben, valamint autoantitesteket a különböző komplement komponensek ellen, ám az esetek több mint 30%-ában nem sikerül detektálni az eddig ismert kóroki faktorokat. Ezen túlmenően a betegek egy része nem feleltethető meg egyértelműen a jelenleg használatban levő klasszifikációnak. Sok esetben nem különíthetőek el az immunkomplex- és komplement-mediált formák sem a hisztológiai kép, sem a detektált patogenetikai tényezők, illetve a komplement eltérések alapján.

Ennek tisztázására új, feltehetően a patogenezisben résztvevő faktorokat elemeztünk, illetve új megközelítésből vizsgáltuk meg a problémát. A vizsgálat során nem a hagyományos hisztológiai alapú besorolásból indultunk ki, hanem a betegek különböző klinikai, komplement, hisztológiai és genetikai eredményeit vettük alapul.

Eredményeinket a célkitűzéseinkben meghatározott pontoknak megfelelően tárgyalom.

### 6.1. FHR-5 szerepének vizsgálata C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban

Vizsgálatunkban az FHR-5 szérumszintjét és a *CFHR5* variációit vizsgáltuk IC-MPGN/C3G-s betegcsoportunkban és egészséges egyénekben. Ez az első megfigyeléses vizsgálat, mely ilyen nagy esetszámú IC-MPGN/C3G-s betegcsoportban vizsgálja az FHR-5 szerepét a klinikai és laboratóriumi adatokkal együtt. Eddig főleg kisebb esetszámú vizsgálatokat közöltek, ahol a *CFHR5* bizonyos variációi kapcsolatot mutattak a DDD-vel (166). Egy nagy amerikai kohorszon (n=104) végzett megfigyelés központjában a *CFHR5* variációi álltak, ám anélkül, hogy a szérumszintekkel vagy a klinikummal összehasonlították volna őket (158).

A mi vizsgálatunkban a betegek 11,7%-ában azonosítottunk 8 különböző misszensz vagy kereteltolódással járó *CFHR5* ritka variációt. Ezek közül 5 variáció valószínűleg patogén hatással bír, mivel vagy funkcionális vizsgálatok bizonyították (G278S, R356H) vagy már az irodalomban leközölték C3G-s betegekben, mint patogén faktort.

(p.E163Kfs\*10, p.E163Rfs\*35) vagy mert szegregációt mutatott a betegséggel (P46S). Alacsonyabb FHR-5 szérumszinteket mértünk a betegekben az egészséges egyénekhez képest a C3, C4, klasszikus és alternatív út aktivitások hasonló irányú változásával együtt. Az alacsonyabb FHR-5 szinttel rendelkező betegeket jobb vesetűlés jellemezte a magasabb FHR-5 szinttel rendelkezőkhöz képest a követési idő alatt, mely független volt a *CFHR5* variáció hordozásától.

Az FHR-5 egyértelmű patogenetikai szerepét a betegségben elsőként Gale és munkatársai írták le (124) egy familiális C3G háttérben ciprusi populációban, melyet *CFHR5*-nefropátiának neveztek el. A betegség háttérben a *CFHR5* 2-es, 3-as exonjának internális duplikációja állt. Az FHR-5 fehérjét egyéb immundepozitumokkal kolokalizálva, a veseszövetben lerakódva mutatták ki (109, 122). A fehérje fiziológiás, illetve patológiás szerepe még nem teljes mértékben tisztázott, és egyelőre csak feltételezések vannak azzal kapcsolatban, hogy patogenetikai szereppel bírhat-e a vesében bekövetkező komplement aktiválódásában.

A *CFHR* gének átrendeződése eredményeként létrejövő hibrid fehérjéket szintén leírták a betegség háttérben (92-94). A mi betegeink között 3 egyénben mutattuk ki MLPA, illetve western blot vizsgálattal különböző hibrid fehérjék jelenlétét, bennük rendre emelkedett FHR-5 szérumszinteket mértünk. Ezen betegeket a speciális genetikai háttérük miatt a további analízisekből kizártuk, és a hibrid fehérjék pontos karakterizálása még folyamatban van.

Az FHR-5 fehérje magas fokú homológiát mutat a H-faktorial. A korábban közölt irodalmi adatok alapján (115, 123) az FHR-5 enyhe regulátor aktivitással rendelkezhet, feltételezések szerint versenghet a H-faktorial a C3b kötéséért, ám pontos patogenetikai szerepéről még nem született egyértelmű közlés. A H-faktorial ellentétben nemcsak a C3b-t, de a C3 további hasítási termékeit az iC3b-t és a C3dg-t is tudja kötni (115).

Az általunk azonosított variációk az FHR-5-ös fehérje scr1-6-os doménjeit érintették. Az FHR-5 az FHR-1 és FHR-2-vel ellentétben csupán homodimerek képzésére képes (171), melyet az scr1-2-es doménjén keresztül valósít meg (115). Az azonosított variációk közül

3 érintette ezt a régiót (P46S, K144N, V110A). Habár ezek a variációk nem eredményezték az FHR-5 csökkent szintjét, befolyással lehetnek a ligand-kötő (172) és a dimerizációs képességére, melynek alátámasztása funkcionális vizsgálatokat igényel. A két kereteltolódással járó mutáció (E163Rfs\*10, E163Rfs\*35) az scr3-as domént érintette, melynek funkciója tisztázatlan. A csökkent FHR-5 szintet szintén megfigyelték egy E163Rfs\*35 mutációt hordozó betegnél *Streptococcus* infekciót követően (166). A mi betegeink esetében nem detektáltunk csökkent FHR-5 szinteket. A további három misszensz variáció (G278S, R356H, C208R) az scr4-6-os domént érintette, mely a CRP (109), heparin (scr5-7 domének), (109, 173), laminin és a nekrotikus humán endoteliális sejtek (scr5-7 domének) (173) kötéséért felelős. A PTX-3 kötődése az scr6 doménhez szintén felvetődött Csincsi és munkatársai vizsgálata alapján (123), melyben a C208R variáció együtt fordult elő egy betegben az E163Kfs\*35-es mutációval (ez regiszterünkben egy aHUS betegben szintén megtalálható, nem közölt eredmény). A három G278S variációt hordozó beteg közül kettőben alacsonyabb, míg a harmadikban magasabb FHR-5 szérumszintet mértünk. Az R356H variációt hordozó 2 beteg a kontrollok medián FHR-5 szintjéhez képest alacsonyabb FHR-5 szinttel rendelkezett. Kiemelném, hogy 7 betegünk esetében egyedül a *CFHR5* variációt (P46S, E163Rfs\*35, C208R, G278S, R356H) sikerült azonosítanunk lehetséges etiológiai faktorként., Ez erősíti azon hipotézisünket, mely szerint az FHR-5 szerepet játszhat a betegség patomechanizmusában. A funkciójának tisztázása azonban további *in vitro* kísérleteket igényel. A betegeinkben azonosított mutációk nem érintették az scr7-9-es doméneket, melyek közül az scr 8-9-es domén elsősorban a C3b-t köti, míg PTX-3-at nem (123, 173). Ezen eredményeink alapján a ritka *CFHR5* variációk szerepet játszhatnak a C3G kialakulásában, azonban tekintettel a poligénes és multifaktoriális kóreredetre, nem valószínű, hogy a *CFHR5* variációk az egyetlen, vagy legfontosabb patogenetikai faktort jelentik, a *CFHR5*-nefropátia kivételével. A közelmúltban két vizsgálatot közöltek, melyekben aHUS betegekben (n=54, n=65) szekvenálták a *CFHR5* gént, és új variációkat is közöltek, köztük két olyat (K144N, R356H), melyet mi is detektáltunk a betegeinkben (125, 126). 500 IgAN-ban szenvedő betegben is vizsgálták a *CFHR5* gént (127), és szintén több *CFHR5* variációt írtak le. Bár ezek sok esetben közel helyezkedtek el a mi általunk leírt variációkhoz, de nem egyeztek meg velük (c.822A>T vs. c.832 G>A; c.332 A>C vs. c.329T>C).

A *CFHR5* genetikai analízisén túl munkánk során először vizsgáltuk az FHR-5 szérumszinteket nagyszámú IC-MPGN/C3G-ben szenvedő beteg bevonásával, melyhez hasonló vizsgálatot eddig csak IgAN-ben közöltek (174). Betegeinkben az FHR-5 szintje alacsonyabb volt mind a *CFHR5* variációt hordozókban, mind a nem-hordozókban az egészséges kontrollokhhoz képest. Ez a megfigyelés megfelel Vernon és munkatársai által közölteknek, melyben csökkent FHR-5 szinteket mértek 23 C3GN-nel diagnosztizált betegben az egészséges kontrollokhhoz képest a *CFHR5* variáció hordozásától függetlenül (166). Ezzel szemben IgAN-ben szenvedő betegekben magasabb FHR-5 szinteket mértek az egészségesekhez viszonyítva több vizsgálatban is (175, 176) és a magasabb FHR-5 szint rosszabb prognózissal társult (176). Nemcsak az FHR-5, hanem a többi komplement paraméter is alacsonyabb szinteket mutatott az általunk vizsgált betegekben, mely alapján feltehető, hogy a konzumpció eredményezi ezt az eltérést. Infekciót, mint triggeret, amely részt vesz a betegség kialakításában, többször leírtak az irodalomban (54, 166). Feltételezésünk szerint fertőzések következményeként alakulhat ki a komplement diszreguláció, majd ezt követően a komplement regulátorok és deregulátorok génjeiben hordozott (gyakori) variációk, polimorfizmusok hozzájárulhatnak az autoimmunitás kiváltásához, illetve fenntartásához. Az továbbra is megválaszolatlan, hogy a C3G-t triggellik-e a fertőzések, vagy már egy meglévő elváltozás hatása ekkor válik nyilvánvalóvá.

A betegek vesetűlését vizsgálva a prognózis tekintetében az IgAN-kohorszhoz hasonló összefüggést találtunk (176) a mi betegeink esetében is, ugyanis az alacsony FHR-5 szinttel rendelkező betegeknek jobb volt a vesetűlésük a magasabb FHR-5 szinttel rendelkező betegekhez képest a követési idő alatt. Kiemelném, hogy a *CFHR5* variációt hordozó betegek közül senki nem progrediált ESRD-be a vizsgált időszakban, bár egyértelműen ezt az összefüggést még nem tudjuk megmagyarázni. Hipotézisünk szerint az alacsony FHR-5 szint vagy funkció teret ad a H-faktornak, hogy erőteljesebben szabályozza le a komplement aktiválódást. Ha az FHR-5 és a H-faktor közötti fiziológias egyensúly sérül, például egy *CFHR5* mutáció eredményeként, akkor a különböző patogének, melyek kölcsönhatásba tudnak lépni a H-faktoral, feltételezésünk szerint képesek lesznek elkerülni a komplement általi ölü mechanizmusokat, így triggerelve a betegséget. A betegség lefolyása során azonban a deregulátor FHR-5 csökkent aktivitása jobban érvényre juttathatja a H-faktor általi regulálást, így a betegség lefolyása

kedvezőbb lesz. Ráadásul a diagnóziskor alacsonyabb eGFR-rel rendelkező betegekre magasabb kiindulási FHR-5 szint jellemző, mely szintén alátámasztja ezt a gondolatot. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a *CFHR5* variáció hordozása és az FHR-5 szintek szerepet játszhatnak a komplement-mediált vesebetegségek patogenezisében, úgymint az IC-MPGN, C3G, ám ennek pontos mechanizmusa még tisztázatlan. A funkció *in vitro* karakterizálására a *CFHR5* variációk esetében további vizsgálatok szükségesek, hogy jobban megértsük az FHR-5 szerepét a komplement-mediált vesebetegségek hátterében.

## 6.2. C4 nefritikus faktor vizsgálata a C3G/IC-MPGN-es betegpopulációban

Munkánk során először vizsgáltuk a C4NeF jelenlétét párhuzamosan a betegek különböző klinikai, patológia és egyéb etiológiai tényezőinek jelenlétével. Hemolítikus tesztet állítottunk be a C4NeF aktivitásának meghatározására, mely által lehetőségünk nyílt nagyszámú betegben vizsgálni a C4NeF előfordulását (147).

C4NeF pozitivitást a betegeink 14,3%-ában detektáltunk. A C4NeF előfordulása nem különbözött a hisztológiai besoroláson alapuló csoportok között. A C4NeF pozitív betegeket alacsonyabb C4d szint, a diagnóziskor jobb vesefunkció és gyakoribb C3NeF előfordulás jellemezte. A követés ideje alatt ezen betegek közül egy sem progrediált ESRD-be, míg azon betegek közül, akik nem rendelkeztek C4NeF-ral, 17 betegben alakult ki ESRD a követési idő alatt (18,5%).

Azokban az esetekben, ahol a C4NeF C3NeF-ral együtt fordult elő, mértük a legalacsonyabb C3 szinteket és a legmagasabb terminális út aktivációs markerszinteket. Ezen eredményünk összhangban van Ohi és Yasugi munkájával (85), melyben szintén hipokomplementémiát és emelkedett terminális út aktivációt detektáltak a mindkét nefritikus faktorra pozitív betegeken.

A csak C4NeF-ral rendelkező betegeinkben detektáltuk a legalacsonyabb terminális út aktivációs marker szinteket, míg a legmagasabb szinteket a dupla nefritikus faktor pozitív csoportjában mértük. Ezzel egybehangzóan a C3 szintje a legalacsonyabb a dupla pozitívoknál volt, melynél magasabb volt a C3NeF pozitívok, illetve a C4NeF pozitívok esetében. A legmagasabb C3 szinteket a nefritikus faktor negatív csoportban mértük.

Irodalmi adatok alapján a C4NeF képes stabilizálni mind a klasszikus, mind a lektin úton létrejövő C3- és C5-konvertázt, bár a C5-konvertáz stabilizálásához 10-szer annyi antitest szükséges, mint a C3-konvertáz stabilizálásához (76, 84, 85). Egy másik vizsgálatban azt figyelték meg, hogy a C4NeF-ral stabilizált membrán-kötött C3- illetve C5-konvertáz rezisztens a DAF-mediált inaktivációra (76). Eredményeink alapján, mely szerint a C4NeF-ral rendelkező betegek esetében alacsonyabb sC5b-9 szinteket mértünk, a C3-konvertáz stabilizáló kapacitása a C4NeF-nak önmagában nem képes egyidejűleg a C5-konvertáz stabilizálására is. Másrészt viszont azokban a betegekben, akikben mindkét nefritikus faktor jelen volt, detektáltuk a legmagasabb terminális út aktivációs marker szinteket, mely alapján felmerül, hogy a C5-konvertáz stabilizáló funkcióért elsősorban a C3NeF lehet a felelős. Ezek alapján a C4NeF elsősorban a C3-konvertáz stabilizálásán keresztül vezethet a homeosztázis felborulásához, anélkül, hogy a terminális út fokozott aktivációját eredményezné a C5-konvertáz stabilizálásával.

Mivel gyakori volt a két nefritikus faktor együttes előfordulása, így további komplement autoantitesteket is vizsgáltunk. Az anti-C1q és anti-C3b jelenléte szintén emelkedett volt a mindkét nefritikus faktorra pozitívak között. Ezen eredményünk, mely alapján az autoantitestek együttes előfordulása gyakori, megfelel az irodalomban közölt adatoknak (177). Ez a jelenség a háttérben megbúvó poliklonális humorális immunválaszra világíthat rá. Mivel a C3G háttérben leírták a komplementrendszer folyamatosan aktivált állapotát (178-180), így ezen antitestek reflektálhatnak a fennálló „epitóp spreading”-re, melyet a komplementtel fedett partikulumok folyamatos képződése eredményezhet. Megfigyeléseink szerint a komplement autoantitestek előfordulása nem mutatott kapcsolatot különféle genetikai variációk jelenlétével. Eredményeink alapján nem tudjuk megválaszolni azt a kérdést, hogy a detektált autoantitestek patogenetikai faktorként részt vesznek-e a betegség kialakulásában, vagy csupán epifenomként jelentkeznek a betegség előrehaladtával. Fontos megjegyezni, hogy a potenciális triggerként felmerülő különböző fertőzésekhez, autoimmun betegségekhez, keringő paraproteinekhez társuló krónikus antigenémia azonos arányban fordult elő az immunkomplex- és a komplement-mediált csoportban.

A betegek vesetűlését vizsgálva nem találtunk szignifikáns különbséget a C4NeF pozitív/negatív, illetve a C3NeF pozitív, C4NeF pozitív, dupla pozitív, illetve nefritikus faktorokra negatív csoportok között az 5,4 év hosszú követési idő alatt. Ennek ellenére



kiemelném, hogy a C4NeF pozitív betegek közül egy sem progrediált végstádiumú vesebetegségbe, míg a mindkét nefritikus faktorra pozitív betegek 20%-a a második évre ESRD stádiumába került. Annak oka, hogy a különbséget a csoportok között statisztikai módszerekkel nem sikerült egyértelműen igazolni, lehet egyrésről a relatíve rövid követési idő és az alacsony eseményszám a csoportokban. Ám egy ilyen ritka betegség esetében, ahol nem a betegek sokaságából vételezünk mintát, hanem több centrum bevonásával az egész elérhető betegpopulációt célozzuk meg, így ily módon több beteg bevonása nem eszközölhető, de statisztikai ajánlások alapján (link:<https://www.iqwig.de/en/press/press-releases/rare-diseases-no-reason-for-lower-demands-for-studies.6343.html>) a borderline p-értékek esetében megemelhető a szignifikancia határértéke. Ily módon nem veszítünk el biológiailag releváns információkat.

Vizsgálataink alapján a C4NeF az IC-MPGN/C3G-vel diagnosztizált betegek kis százalékában fordul elő egyéb komplement autoantitestekkel, leginkább C3NeF-ral együtt. A C4NeF-ral rendelkező betegeket általában fiatalabb életkor jellemzi jó vesefunkcióval és lassan progrediáló vesebetegséggel. A C4NeF jelenléte nem mutatott kapcsolatot a mutációk jelenlétével a betegség-asszociált génekben, de egyértelműen összefüggést láttunk a komplementrendszer aktivációja és a kialakuló konzumpció között, főleg azokban az esetekben, ahol a két nefritikus faktor együtt fordult elő. (147) Összefoglalva elmondható, hogy a C4NeF az IC-MPGN/C3G esetek 10-15%-ában lehet a komplement diszreguláció oka, de az oki szerepe a betegség patogenezisében nem egyértelmű. Ennek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

### **6.3. Adat-vezérelt hipotézismentes klaszteranalízis végzése a betegek klinikai, laboratóriumi, genetikai és komplement eredményei alapján**

Az MPGN jelenlegi klasszifikációja a vesebiopsziás minták immunfluoreszcenciás képén alapul, mely elkülöníti a komplement-mediált és immunkomplex-mediált formákat. Ám sok esetben az elkülönítés nem egyértelmű, problémákat vet fel. A közelmúltban egy kizárólag adatvezérelt, hipotézismentes statisztikai módszer segítségével Iatropoulos és munkatársai MPGN-es betegeket vizsgáltak, és klinikailag releváns csoportokat (klasztereket) alkottak a betegek klinikai, hisztológiai, biokémiai és genetikai paramétereit alapján (140). Ez a módszer a csoportokon belül kis különbségeket, míg a csoportok között nagyobb variációkat eredményezett. A klaszterek egyértelmű összefüggést mutattak az AP abnormalitásokkal, patogenetikai faktorokkal, illetve a vesetúléléssel. Ám mivel ezen eredmények nagymértékben függenek mind a betegpopulációtól, mind a változóktól, így ennek megisméltése és megerősítése elsődleges fontosságú. Ezen tényre egy szerkesztői levél szintén rámutatott (141), hiszen csak akkor vonhatunk le messzemenő következtetéseket ebből az új megközelítésből, ha ez egy független betegcsoporton is megerősítést nyer.

A célunk az volt, hogy megisméltjük a Iatropoulos és munkatársai által elvégzett hipotézismentes klaszteranalízist, és ez alapján megvizsgáljuk, hogy validálhatóak-e a klinikailag releváns klaszterek. A megfigyeléses vizsgálatok megerősítése kulcsfontosságú, különös tekintettel arra, hogy ma a tudomány reprodukciós krízistől szenved, aminek legfőbb hajtóereje a fals-pozitív vizsgálatok felülreprezentáltsága a publikált tanulmányok között (181). A publikált, "pozitív", megfigyeléses vizsgálatok eredményeinek megbízhatósága sok esetben kérdéses, hiszen az eredmények torzításoktól szenvedhetnek. Egy megisméltelt vizsgálattal reprodukálva a vizsgálatot az eredetileg közölt eredmények megbízhatósága nagymértékben növekszik.

92 C3G/IC-MPGN-nel diagnosztizált beteget vontunk be a vizsgálatba, akikben az eredeti vizsgálatban leírt metodika alapján meghatároztuk ugyanazokat a klinikai, biokémiai, hisztológiai és genetikai paramétereiket. Összehasonlítva a két kohorsz legfontosabb paramétereit megállapítottuk, hogy az általunk gyűjtött betegek alkalmasak arra, hogy megisméltjük a klaszteranalízist. Szintén 4 klasztert generáltunk, mely alapján az 1-es, 3-as, 4-es klaszterbe a statisztikai elemzésekhez megfelelő számú beteg

került, míg a 2-es klaszterbe csak 4 beteg, így őket a továbbiakban kihagytuk a statisztikai analízisből.

Az 1-es, 3-as, és 4-es klaszterek egyértelmű összefüggést mutattak a klinikai, biokémiai, hisztológiai változókkal, mely nagyon hasonló volt a Iatropoulos és mts.-i által közölt eredményekhez (182). A klaszterek klinikai relevanciáját szintén sikerült megerősíteni, hiszen a 3-as és 4-es klaszterben rosszabb vesetűlést figyeltünk meg a követési idő alatt. Iatropoulos és mts.-i egy három-lépcsős algoritmust alkottak, mely alapján 75%-os valószínűséggel be tudták sorolni a betegeket a különböző klaszterekbe (140). Sajnos mi nem tudtunk különbséget tenni a erősen elektronenz szalagszerű- és granuláris depozitum között a bazális membránban, mely szerepelt az olasz munkacsoport algoritmusában. Ezért egy döntési-fa analízist végeztünk, hogy megtudjuk, melyik az a legkevesebb változó, mely alapján besorolhatóak betegeink a különböző klaszterekbe. Ennek eredménye alapján a szklerotikus glomerulus mennyisége, illetve a betegek diagnóziskori életkora adódott a legfontosabb prediktornak a betegek besorolásánál. Azok a betegek, akik idősebbek voltak, és nagyobb arányban volt szklerotikus glomerulusok kerültek a 3-as, 4-es klaszterbe, mely csoportoknak rosszabb volt a vesetűlése. Ez a tény egybevág azzal a jólismert megfigyeléssel, hogy a vesetűléés és a vesében látható krónikus elváltozások között, úgymint a szklerotikus glomerulusok, egyértelmű kapcsolat van. Ám kulcsfontosságú annak feltárása, hogy milyen patomechanizmus állhat a háttérben, mely a különböző hisztológiai képet eredményezi a vesében. Fontos annak tisztázása is, hogy a különböző klinikai és komplement paraméterek milyen módon állnak kapcsolatban a klaszterekkel, illetve a betegség kimenetelével.

A klinikai és patogenetikai faktorok a különböző klaszterekben hasonló mintázatot mutattak a Iatropoulos vizsgálatában feltártakkal összehasonlítva.

Az 1-es klaszterben levő betegeket fiatalabb életkor jellemezte, nagyon magas sC5b-9 szintekkel és alacsony C3 koncentrációval, az LPV-k és C3NeF magas előfordulási gyakoriságával. A 3-as klasztert szintén fiatal betegek alkották, csökkent C3 szinttel, ám alacsonyabb sC5b-9 szintekkel. A hisztológia súlyosabb képet mutatott több intersticiális inflammáció, fibrózis és szklerotikus glomerulus jelenlétével. Ezen eredmények alapján nem feleltethető meg a mi 3-as klaszterünk az olasz vizsgálatban közölttel. A különbséget szintjén alátámasztja a 3-as klaszterben tapasztalt eltérő vesetűléés. Míg az olasz

vizsgálatban a vesetúlélés tekintetében inkább az 1-es klaszterre hasonlított a 3-as klaszter, addig nálunk a 4-es klaszterrel mutatott hasonlóságot. A 4-es klasztert idősebb betegek alkották normális C3 szintekkel, nem kimutatható komplement aktivációval és rosszabb vesetúléléssel.

A hasonlóságok mellett meg kell említeni a különbségeket is a két vizsgálat eredményei között. A legfontosabb eltérés a hisztológiában látható. Mivel mi több centrumból (n=34) vontuk be betegeinket, annak a lehetősége nem volt adott, hogy egy patológus az összes biopsziát átnézze még egyszer. Azért, hogy ezeket a centrumok között esetlegesen fellépő különbségeket minimalizáljuk, standardizált kérdőíveket használtunk, ám még így is előfordulhatnak kisebb különbségek a biopszia értékelésében. A következő szemmel látható eltérés a betegek életkora a 3-as és 4-es klaszterben, amelyben az átlagéletkor 10 évvel többnek adódott a mi vizsgálatunkban. Ez a különbség magyarázhatja a szklerotikus glomerulus magasabb prevalenciáját a 3-as klaszterben. A 3-as klaszter ezen túl további aspektusokban is különbözik az eredeti vizsgálatban közölttel, úgymint a félhold képződés hiánya és az alacsonyabb C3NeF prevalencia. A C3NeF előfordulásában tapasztalható különbséget eredményezheti a különböző mérési módszer. Míg az olasz munkacsoport tisztított IgG-t használt a C3NeF detektálására, addig mi a betegek szérumából határoztuk meg Rother és mts.-inak protokollja alapján (146). Az idősebb életkor, a több szklerotikus glomerulus, az előrehaladott betegség eredményezheti a rosszabb vesetúlélést a 3-as klaszter betegeinél. Szintén különbség, hogy az LPV előfordulása magasabb a mi betegcsoportunkban az olasz kohorszhoz képest, főleg a *CD46* génben azonosított mutációk tekintetében. A legnagyobb különbség az LPV-k előfordulási gyakoriságában a 4-es klaszterben látható, ahol 4 betegünkben azonosítottunk mutációt a *CD46* és/vagy *THBD* génekben. Ezek alapján felmerül, hogy a felszínen expresszált regulátorok (CR1, ADAMTS19) is szerepet játszhatnak ezekben a betegekben. A 4-es klaszterben nem láthatóak a szisztémás komplement aktiváció és konzumpció jelei, de erős C3 jelölődés detektálható az immunfluoreszcens mikroszkópián és rossz vesetúlélés jellemzi a betegeket. Az a kérdés, hogy a 3-as, 4-es klaszterben tapasztalható rossz vesetúlélés, mely az előrehaladott vesekárosodás következménye, összefüggésbe hozható-e a háttérben zajló molekuláris mechanizmusokkal, ma még megválaszolatlan. Az 1-es klaszterben látható komplement konzumpció és magas terminális út aktivációs marker szint arra sarkallt minket, hogy

egyéb komplement biomarkereket és antitesteket vizsgáljunk meg, mely megmagyarázhatja a háttérben zajló folyamatokat. Ezt vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az anti-C1q gyakrabban fordul elő az 1-es klaszterben, ahol szintén nagyobb arányban fordultak elő a több komplement autoantitestre is pozitív betegek. Ez a megfigyelés, mely szerint az 1-es klaszterben gyakrabban fordulnak elő különböző komplement autoantitestek együttesen ( $p=0,043$ ), felveti egy erős poliklonális válasz, epitóp spreading jelenlétét a komplement fehérjék felé. Nemcsak a jól ismert antitestek, hanem a C4NeF is gyakrabban fordult elő az 1-es klaszterben, gyakran C3NeF-fel együtt. A 17 C4NeF betegből 15 esett ebbe a klaszterbe. Ez egybeesik azzal a megfigyeléssel, hogy C4NeF elsősorban a C3NeF-ral együtt jelentkezik, és alacsony C3 koncentrációt eredményez magas sC5b-9 szinttel (58, 85). Egy nemrégiben megjelent tanulmány további C3NeF-mediált mechanizmusokat feltételez a komplement diszreguláció háttérében IC-MPGN/C3G-ben szenvedő betegeknél, és melyben properdin-dependens C3NeF-t gyakrabban azonosított az 1-es klaszterben (183). Ez az eredmény egybehangzik az emelkedett komplement aktivációval és konzumpcióval ebben a klaszterben (183).

További lehetséges faktorokat keresve, melyek szerepet játszhatnak a betegségben, megvizsgáltuk az FHR-5 fehérjét. A *CFHR5* génben azonosított variációk és FHR-5 szérumszintek szintén kapcsolatot mutattak a klaszterekkel: az FHR-5 szintek alacsonyabbak voltak az 1-es klaszterben, ahol a *CFHR5* variációk magasabb arányban fordultak elő.

Szignifikánsan alacsonyabb D-faktor szinteket mértünk szintén az 1-es klaszterben a többi klaszterhez viszonyítva. A csökkent D-faktor szint a következménye lehet a komplementrendszer túlzott aktivációjának és konzumpciójának ebben a klaszterben. Egybevetve a tapasztaltakat, mint a fennálló komplement aktiváció és konzumpció jeleit, a magasabb LPV és komplement-autoantitest előfordulást az 1-es klaszterben, eredményeink alátámasztják a háttérben zajló komplement-mediált patomechanizmus jelenlétét. Az a kérdés azonban megválaszolatlan, hogy ebben a csoportban, ahol egyértelműen láthatóak a komplement diszreguláció jelei, miért jobb a betegek vesetűlése. Felmerülhetne, hogy az alkalmazott terápiának lehet ilyen hatása a betegek túlélésére, ám ezt vizsgálva nem találtunk számottevő különbséget a klaszterek között.

A vizsgálatunknak azonban vannak limitációi is. A hosszú időintervallum alatt 92 olyan beteget tudtunk bevonni 34 közép-európai centrumból, akiknek az összes szükséges adata

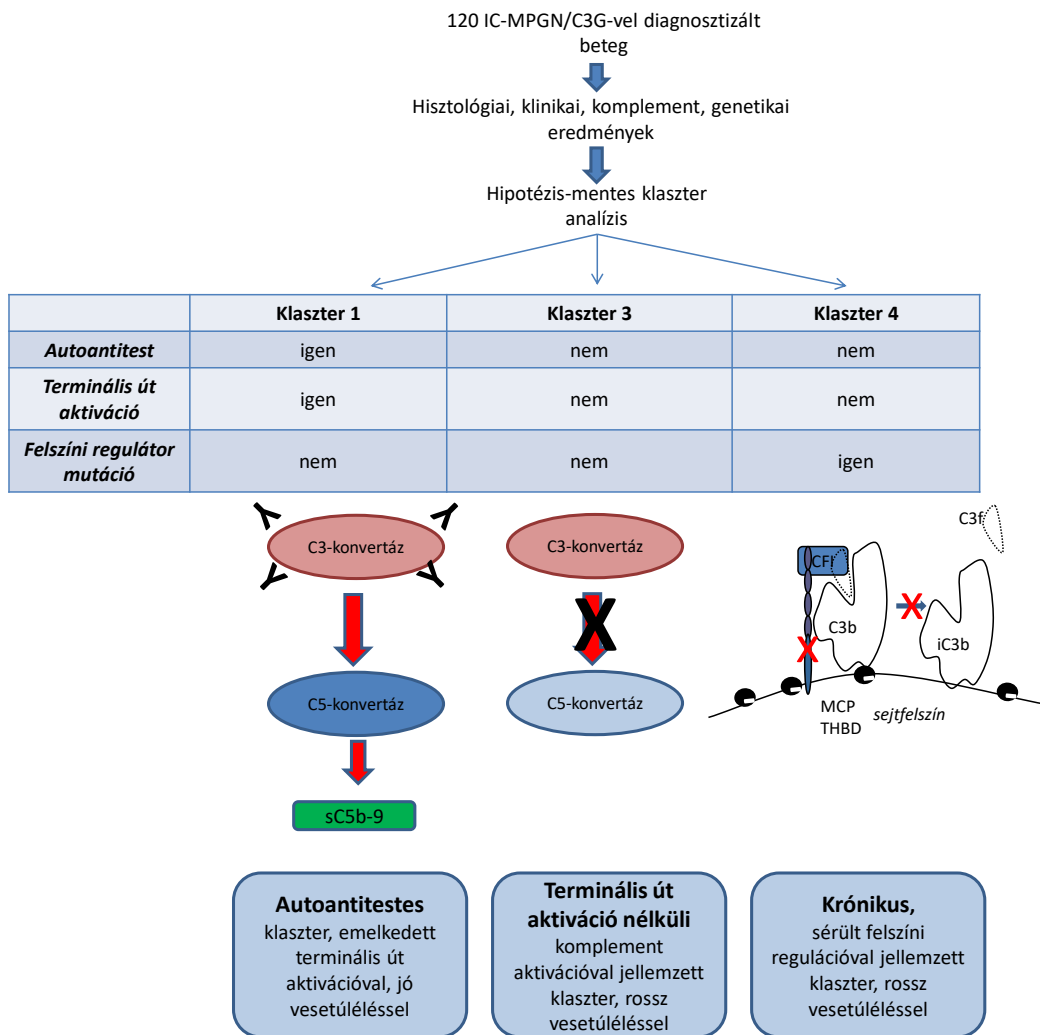
elérhető volt ahhoz, hogy résztvehessen a klaszteranalízisben. Ezért néhány megfigyelésünk és eredményünk eredhet egy nem megfelelő „power”-rel rendelkező vizsgálatból, és I-es típusú hibától szenvedhet. A két vizsgálat főbb megfigyelései azonban nagy hasonlóságot mutatnak, így annak a valószínűsége, hogy kétszer is fals pozitív eredményt kapjunk csekély. Ezen kívül a vizsgálatunkban nem volt lehetőségünk centralizáltan, másodszor is átnézni az összes biopsziát, mely különbségeket eredményezhetett a hisztológián alapuló jellemzők között. Ám a legerősebb klaszterdefiniáló változó a szklerotikus glomerulus százalékos aránya volt, amely a legkevesebb ilyen irányú torzítástól szenvedhetett, a legobjektívabb, számszerűsített adat a biopszián. Nem tudtunk különbséget tenni a nagyon elektron-denz szalag-szerű és granuláris intramembránózus depozitumok között, mivel ezeket a legtöbb biopsziás leírás csak intramembránózus erősen elektron-denz depozitumként említi.

Figyelembe véve, hogy a C3G egy nagyon ritka betegség (2-3/millió fő), így , hogy érdemben tudjuk vizsgálni, nagy, multicentrikus vizsgálatok szükségesek, mint a klaszteranalízis validálásához is. Habár nem tudtunk minden adatot az olasz vizsgálatban közöltekkel teljesen megegyezően összegyűjteni, ez az első vizsgálat, mely arra hivatott, hogy elegendő beteg gyűjtésével – melyre ez a nemzetközi együttműködés lehetőséget teremtett - egy független betegcsoporton megerősítse az olasz munkacsoport eredményeit. Ez a megismételt hipotézis-mentes, adatvezérelt hierarchikus klaszteranalízis lehetőséget nyújt arra, hogy betekintést nyerjünk a betegség hátterében megbújó folyamatokba és a betegség lefolyásába. Azonosítottunk egy **autoantitest pozitivitással jellemezhető** 1-es klasztert, egy **terminális út aktiváció nélküli komplement aktivációval rendelkező** 3-as klasztert és egy **krónikus, sérült felszíni regulációval jellemezhető** 4-es klasztert (182). Eredményeink által formálódott a patogenezisről alkotott kép. A markáns komplementaktivációval, gyakori ismert etiológiai tényezőkkel karakterizált 1-es **autoantitestes** klaszter mutatta a legjobb prognózist, szemben a kevésbé jellemezhető csoportokkal. Ezzel szemben a krónikus veseelváltozásokat, rosszabb prognózist mutató 3-as, 4-es klaszterekben nem tudtunk egyértelmű patogenetikai tényezőket feltárni. Így az továbbra is kérdéses, hogy mi áll a krónikussá váló folyamat hátterében, mely hasonló tünetekkel és szöveti képpel társul (23. ábra). Azzal, hogy igazoltuk az 1-es és 4-es klaszter relevanciáját nagy lépést tettünk meg a terápiás döntéshozatal elősegítésében. Az 1-es klaszter betegeit fiatalabb életkor

jellemezte, hiányzó szklerotikus glomerulusokkal, az LPV-k és C3NeF magas prevalenciájával, a komplement aktiváció és konzumpció egyértelmű jeleivel, így intenzív C5-konvertáz aktivitással. Ezek a jelek a folyadék-fázisú komplement aktiváció irányába mutatnak, így az 1-es klaszterbe eső betegek eredményes kezelést várhatnak a C5-elleni terápiáktól. Ezzel szemben a 4-es klaszterben nem láthatóak a szisztémás komplement aktiváció jelei annak ellenére, hogy a vesében erős C3 festődés látható az immunfluoreszcens mikroszkópián, ez tehát egy felszínhez-asszociált komplement diszregulációt feltételez. Az a tény, hogy az öt LPV-t hordozó beteg közül 4 esetében a felszínen expresszált kofaktorokat (*CD46*, *THBD*) érinti a mutáció, alátámasztja ezt a felvetést. Így Iatropoulos és mts.-i azon javaslatát, hogy ebben a csoportban megfontolandó a C3 aktivációs termékei elleni terápia (pl. TT30 (184)), a mi eredményeink is alátámasztani látszanak.

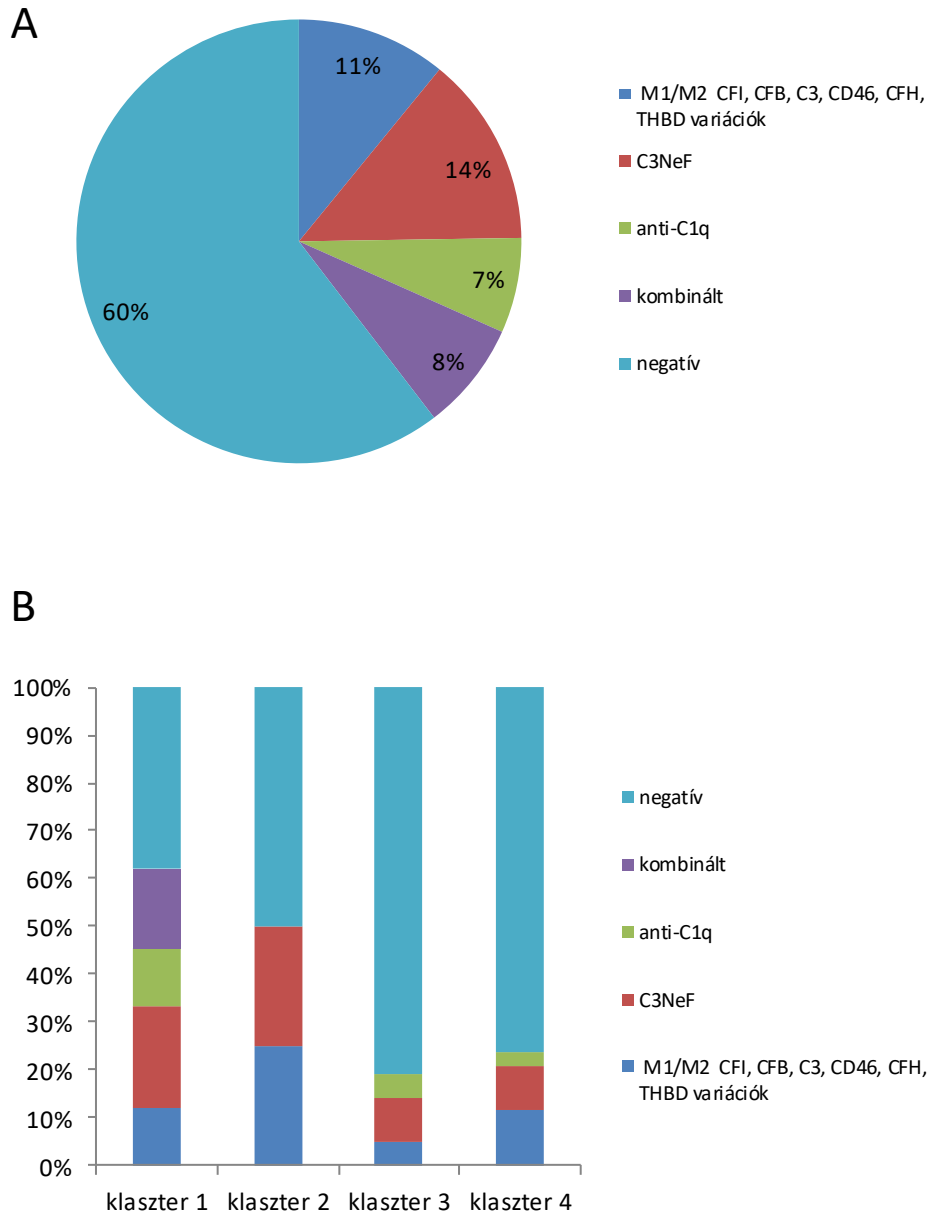
Habár egy független betegcsoporton sikerült igazolnunk a klinikailag releváns klasztereket, az még továbbra is kérdéses, hogy ez az új adatvezérelt, hipotézismentes csoportosítás felválthatja-e a hisztológiai alapú besorolást a jövőben, hogy ezen klasszifikáció megfelelő támogatást nyújtson a terápiás döntéshozatalban.

A hagyományosan etiológiai tényezőként számontartott faktorok segítségével az IC-MPGN/C3G-ben szenvedő betegeink 40%-át sikerült definiálnunk, míg 60%-ban nem tudtunk semmilyen patogenetikai faktort azonosítani (24/A ábra). Ha ezen faktorok körébe bevontuk az általunk vizsgált további tényezőket, mint a különböző autoantitesteket (C4NeF, anti-BF, anti-C3, anti-FH) és a *CFHR5* genetikai variációit is, illetve a lehetséges patogenetika szereppel bíró (M3-as) variációkat, úgy a betegeink 65%-ában sikerült valamilyen feltehetően patogén szereppel bíró faktort azonosítani (24/B. ábra). Ha ugyanezeket az adatokat a klaszterekre vetítjük, akkor azt láthatjuk, hogy mindkét esetben az 1-es klaszterbe eső betegeknek tudjuk a legnagyobb hányadát megmagyarázni valamilyen etiológiai faktor jelenlétével (25/A, 25/B ábra).



23. ábra Feltételezett patogenetikai háttér a különböző azonosított klaszterekben

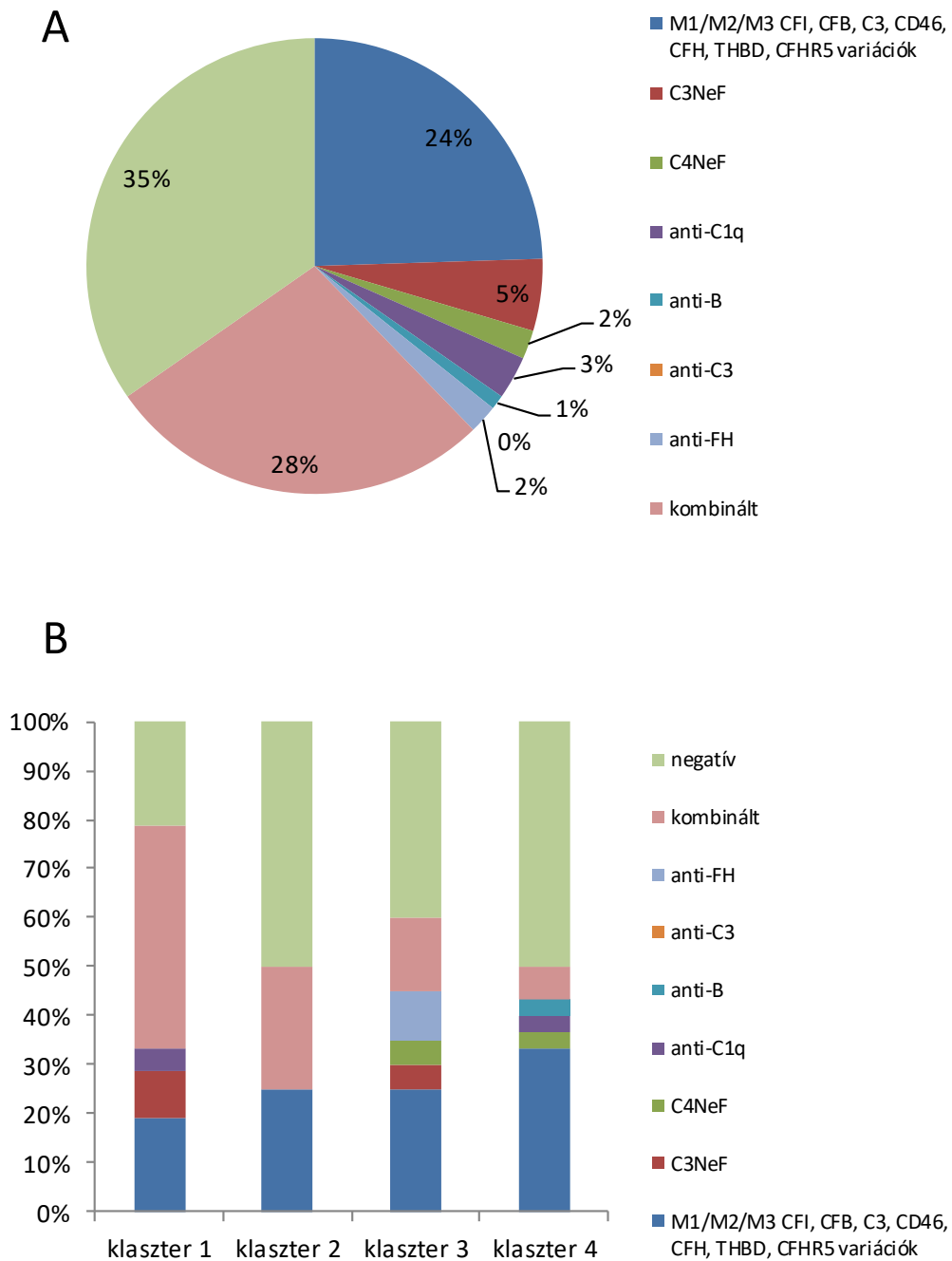




M1: kóroki szerepű variáció

M2: feltételezhetően kóroki szerepű variáció

**24. ábra.** Az ismert etiológiai faktorok előfordulása a betegekben (A) és a klaszterekben (B)



M1: kóroki szerepű variáció

M2: feltételezhetően kóroki szerepű variáció

M3: variáció kóroki szerepű/kóroki szerepe bizonytalan

**25. ábra.** Új, feltételezhető patogenetikai faktorok által kibővített tényezők előfordulása a betegekben (A) és a klaszterekben (B)

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK

### A dolgozat új eredményei, fő megállapításai a következők:

1. Elsőként vizsgáltuk az FHR-5 szérumszintjét és a *CFHR5* gén genetikai variációit nagyszámú IC-MPGN/C3G-ben szenvedő beteg bevonásával. A betegekben szignifikánsan alacsonyabb FHR-5 szinteket mértünk házilag beállított ELISA módszer segítségével az egészséges kontroll csoporthoz képest.
2. A betegek 11,7%-ában azonosítottunk ritka variációt a *CFHR5* génben. A 9 azonosított variáció közül 6 okozott aminosavcserét, míg 2 kereteltolódással járt. Nem mutattunk ki egyértelmű kapcsolatot a *CFHR5* variációk jelenléte és a betegek FHR-5 szérumszintjei között. Az aminosavcserével és/vagy kereteltolódással járó variációk az scr1-6-os doménjét érintették az FHR-5 fehérjének.
3. Az FHR-5 szintek korreláltak a betegek komplement szintjeivel.
4. Megerősítettük IC-MPGN/C3G-s beteginkben azt az IgAN-s betegekben mások által tett megfigyelést, hogy a magasabb FHR-5 szinttel rendelkező csoport vesetűlése szignifikánsan rosszabb az alacsonyabb FHR-5 szinttel rendelkezőkhöz képest a vad-típusú fehérjét hordozó betegekben. A követési idő alatt a *CFHR5* variációval rendelkező betegek közül senki sem progrediált ESRD-be.
5. Nagyszámú IC-MPGN/C3G-ben szenvedő betegben új lehetséges patogenetikai tényező feltárása céljából meghatároztuk a C4NeF aktivitását funkcionális hemolitikus teszt segítségével. A betegek 14,3%-a bizonyult pozitívnak a vizsgált autoantitestre. Az autoantitest gyakorisága nem különbözött a vizsgált betegcsoportok között (IC-MPGN/C3GN/DDD).
6. A C4NeF előfordulása gyakoribb volt a C3NeF-ral rendelkezők körében. A mindkét antitestre pozitív betegeket fokozott komplement aktiváció jellemezte alacsony C3 és jelentősen emelkedett terminális út aktivációs markerszintekkel. A csak C4NeF-ral rendelkező betegeknél a diagnóziskori vesekárosodás alacsonyabb gyakorisággal fordult elő.

7. Nem sikerült egyértelmű kapcsolatot kimutatnunk a betegek vesetúlélése és a nefritikus faktorok jelenléte között. Ugyanakkor a C4NeF pozitív betegek közül egy sem progrediált ESRD-be a jellemzően 3,18 év (medián) hosszú követési idő alatt.

8. Megerősítettük a korábban leírt klinikailag releváns klaszterek létezését IC-MPGN-ben és C3-glomerulopátiában. A betegek klinikai, laboratóriumi, komplement és hisztológiai eredményeit vizsgálva 4 különböző klasztert alkottunk. Az így létrehozott klaszterekben egyértelműen sikerült azonosítanunk a komplementrendszer kóros működését. Az 1-es klasztert alacsony életkor és emelkedett komplement aktiváció jellemezte az alternatív út abnormalitások magasabb prevalenciájával. A 2-es klasztert magas Ig jelölődés jellemezte az immunfluoreszcensziás képen. A 3-as klasztert alacsony C3 szint és alacsonyabb terminális út aktiváció jellemezte az alternatív út abnormalitások gyakori előfordulásával. Ezzel szemben a 4-es klaszterbe idősebb betegek tartoztak, normális C3 szintekkel. Ezek alapján szintén megerősítettük azt a Iatropoulos és mts.-i által felállított hipotézist, mely szerint az 1-3-as klaszter masszív folyadék-fázisú, míg a 4-es klaszter felszínen zajló komplement aktivációval jellemezhető.

9. A klaszterek egyértelmű összefüggést mutattak a betegek vesetúléléésével, míg hasonló összefüggést a hisztológiai csoportokkal nem tudtunk feltárni. A 3-as és 4-es klaszterben rosszabb vesetúléléést mutattunk ki az 1-es, 2-es klaszterhez képest. A különböző vesetúléléés a klaszterekben nem magyarázható a terápiával.

10. Sikeresen tártuk fel további faktorok összefüggését a klinikailag releváns klaszterekkel. A C4NeF jelenléte gyakrabban fordult elő az 1-es klaszterben, melyben a C3NeF magas prevalenciáját azonosítottuk. Ebben a klaszterben nemcsak a C4NeF, hanem az összes komplement autoantitest (anti-C3, anti-B-faktor, anti-H-faktor, anti-C1q) is gyakrabban fordult elő. Eredményeink alapján az érintett betegeknél feltételeztük egy poliklonális, diverzifikálódó, komplement faktorokkal szemben kialakuló humorális immunológiai válasz fennállását.

Szintén az 1-es klaszterben szignifikánsan alacsonyabb FHR-5 szinteket mértünk a 3-as és 4-es klaszterhez képest. Az 1-es klaszterben szintén gyakrabban azonosítottunk *CFHR5* genetikai variációt.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A membranoproliferatív glomerulonefritiszek a patogenezis alapján feloszthatóak immunkomplex-mediált és komplement-mediált formákra. Ám a két csoport elkülönítése sok esetben nem egyértelmű a biopszia alapján, illetve a háttérben zajló biológiai folyamatok között sem vonható éles határ. A betegek jelentős részében (>30%) nem sikerül etiológiai tényezőt azonosítani.

Munkánk során lehetséges új patogenetikai tényezőket kerestünk a betegség háttérében, továbbá új perspektívából közelítettük meg betegeinket. Nem a hisztológiai-alapú besorolást, hanem kizárólag klinikai, laboratóriumi, genetikai, hisztológia adatok alapján statisztikailag alkotott csoportokat vettünk alapul, melyek segítségével betekintést nyerhetünk a betegség patofiziológiájába, lefolyásába.

A 120 biopsziával igazolt IC-MPGN/C3G beteg közül 11,7%-ban azonosítottunk ritka variációt a *CFHR5* génben. A betegekben csökkent FHR-5 szinteket mértünk, az egészségesekhez képest. A magas FHR-5 szinttel rendelkező betegeknek rosszabb volt a vesetűlése. 14 betegben detektáltuk C4NeF-t, mely gyakrabban fordult elő C3NeF-ral, illetve egyéb komplement autotantitestekkel. A mindkét nefritikus faktorral rendelkező betegeknél jelentős komplement aktivációt és konzumpciót tapasztaltunk. Az adatvezérelt klaszteranalízis során sikerült megerősítenünk a komplementrendszer szerepét a betegségben. Azonosítottunk egy jelentős komplement aktivációval jellemezhető csoportot (1-es klaszter), melyet fiatalabb életkor és alternatív út abnormalitás gyakori jelenléte jellemezett. Ezen túlmenően ebben a klaszterben fordultak elő leggyakrabban a komplement autoantitestek és *CFHR5* variációk alacsony FHR-5 szintekkel. A 2-es és 3-as klaszterben szintén jellemzőek voltak a komplement eltérések, míg a 4-es klasztert idősebb életkor és krónikus vese elváltozások jellemezték. Fő megállapításunk az, hogy a klaszterek egyértelműen klinikailag relevánsak, hiszen összefüggést mutattak a betegek vesetűléésével, mely nem mutatható ki a hisztológia-alapú klasszifikációval. Az egyértelmű komplement aktivációval és konzumpcióval, fiatalabb életkorral, markánsabb betegség megjelenéssel jellemezett 1-es klaszter egyértelműen jobb prognózissal társult. Ezen megfigyeléseink nemcsak a betegség jobb megértéséhez járulhatnak hozzá, hanem elősegíthetik a jobb terápiás döntések meghozatalát is.

## 9. SUMMARY

Membranoproliferative glomerulonephritis is divided into immunocomplex-mediated and complement-mediated forms based on the pathogenesis, however the histology-based diagnosis is not always clear. There is no strict border between the biological background of the diseases. We could not identify any etiologic factor in more than 30% of the patients.

In our project we were looking for new, possible pathogenic factors. We tried to examine our patients from a new perspective based on the classification of the patients' clinical, complement, genetic and histological data which led us to get more insights into the disease background and progression.

120 patients with histologically-proven diagnosis of IC-MPGN/C3G were enrolled in the study. We identified rare *CFHR5* variations in 11.7% of our patients. The patients' FHR-5 serum levels were lower compared to healthy controls. We also showed that higher FHR-5 levels in patients were associated with better renal survival. We detected C4NeF in 14 patients, which presented more frequently together with C3NeF and other complement autoantibodies. The patients with double positivity for both nephritic factors are characterized by highly elevated complement activation and consumption. The data-driven hypothesis-free cluster analysis led us to confirm the role of the complement-system in the disease pathogenesis and course. We have identified cluster 1 as a group of patients with high complement activation and consumption with younger age of onset and higher prevalence of complement alternative pathway abnormalities. In addition this cluster was characterized with the highest prevalence of complement autoantibodies, lower FHR-5 levels and more *CFHR5* variants. Complement abnormalities were also detected in clusters 2 and 3, whereas cluster 4 was characterized by older age of onset and chronic changes in the kidney. Our most important finding is that these clusters are clinically relevant because they show clear association with renal survival compared to the histology-based groups. Patients in cluster 1 with clear signs of complement activation and consumption, younger age of onset and severe disease presentation have better renal survival.

Our findings not only help us to better understand the disease, but also they can add useful information in the future to make better therapeutic decisions.

**10. IRODALOMJEGYZÉK**

1. Lukawska E, Polcyn-Adamczak M, Niemir ZI. The role of the alternative pathway of complement activation in glomerular diseases. *Clinical and experimental medicine*. 2018;18(3):297-318.
2. Sim RB, Schwaeble W, Fujita T. Complement research in the 18th-21st centuries: Progress comes with new technology. *Immunobiology*. 2016;221(10):1037-45.
3. Frank MM, Fries LF. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology today*. 1991;12(9):322-6.
4. Mayilyan KR. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein & cell*. 2012;3(7):487-96.
5. Sim RB, Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochemical Society transactions*. 2004;32(Pt 1):21-7.
6. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology*. 2010;11(9):785-97.
7. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV. Complement evasion by human pathogens. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(2):132-42.
8. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part II: Role in Immunity. *Frontiers in immunology*. 2015;6:257.
9. Arlaud GJ, Reboul A, Sim RB, Colomb MG. Interaction of C1-inhibitor with the C1r and C1s subcomponents in human C1. *Biochimica et biophysica acta*. 1979;576(1):151-62.
10. Ziccardi RJ, Cooper NR. Activation of C1r by proteolytic cleavage. *J Immunol*. 1976;116(2):504-9.
11. Reid KB, Porter RR. The proteolytic activation systems of complement. *Annual review of biochemistry*. 1981;50:433-64.
12. Wagenaar-Bos IG, Hack CE. Structure and function of C1-inhibitor. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2006;26(4):615-32.
13. Fujita T, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *The Journal of experimental medicine*. 1978;148(4):1044-51.

14. Davis AE, 3rd, Harrison RA. Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry*. 1982;21(23):5745-9.
15. Moller-Kristensen M, Thiel S, Sjolholm A, Matsushita M, Jensenius JC. Cooperation between MASP-1 and MASP-2 in the generation of C3 convertase through the MBL pathway. *International immunology*. 2007;19(2):141-9.
16. Degn SE, Jensen L, Hansen AG, Duman D, Tekin M, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J Immunol*. 2012;189(8):3957-69.
17. Takahashi M, Iwaki D, Kanno K, Ishida Y, Xiong J, Matsushita M, et al. Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J Immunol*. 2008;180(9):6132-8.
18. Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, et al. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunological reviews*. 2016;274(1):74-97.
19. Parej K, Dobo J, Zavodszky P, Gal P. The control of the complement lectin pathway activation revisited: both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while alpha2-macroglobulin is not. *Molecular immunology*. 2013;54(3-4):415-22.
20. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(10):729-40.
21. Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Lynch NJ, Schwaeble WJ, et al. Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role in the lectin complement pathway. *J Immunol*. 2006;177(12):8626-32.
22. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S. MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol*. 2009;183(11):7371-8.
23. Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. The alternative pathway of complement. *Springer seminars in immunopathology*. 1984;7(2-3):163-92.
24. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*. 2006;176(3):1305-10.



25. Oroszlan G, Kortvely E, Szakacs D, Kocsis A, Dammeier S, Zeck A, et al. MASP-1 and MASP-2 Do Not Activate Pro-Factor D in Resting Human Blood, whereas MASP-3 Is a Potential Activator: Kinetic Analysis Involving Specific MASP-1 and MASP-2 Inhibitors. *J Immunol.* 2016;196(2):857-65.
26. Fearon DT, Austen KF, Ruddy S. Formation of a hemolytically active cellular intermediate by the interaction between properdin factors B and D and the activated third component of complement. *The Journal of experimental medicine.* 1973;138(6):1305-13.
27. Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *The Journal of experimental medicine.* 1975;142(4):856-63.
28. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol.* 2007;179(4):2600-8.
29. Kimura Y, Miwa T, Zhou L, Song WC. Activator-specific requirement of properdin in the initiation and amplification of the alternative pathway complement. *Blood.* 2008;111(2):732-40.
30. Xu W, Berger SP, Trouw LA, de Boer HC, Schlagwein N, Mutsaers C, et al. Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation. *J Immunol.* 2008;180(11):7613-21.
31. Volanakis JE. Participation of C3 and its ligands in complement activation. *Current topics in microbiology and immunology.* 1990;153:1-21.
32. Fearon DT. Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1978;75(4):1971-5.
33. Sharma AK, Pangburn MK. Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996;93(20):10996-1001.
34. Riedl M, Thorner P, Licht C. C3 Glomerulopathy. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(1):43-57.

35. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *The Journal of physiology*. 2002;539(Pt 2):537-45.
36. McDonald JF, Nelsestuen GL. Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: characterization of its impact on C9 polymerization. *Biochemistry*. 1997;36(24):7464-73.
37. Milis L, Morris CA, Sheehan MC, Charlesworth JA, Pussell BA. Vitronectin-mediated inhibition of complement: evidence for different binding sites for C5b-7 and C9. *Clinical and experimental immunology*. 1993;92(1):114-9.
38. Longhurst H, Cicardi M. Hereditary angio-oedema. *Lancet*. 2012;379(9814):474-81.
39. Cicardi M, Zanichelli A. Angioedema due to C1 inhibitor deficiency in 2010. *Internal and emergency medicine*. 2010;5(6):481-6.
40. Noris M, Remuzzi G. Hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(4):1035-50.
41. McHarg S, Clark SJ, Day AJ, Bishop PN. Age-related macular degeneration and the role of the complement system. *Molecular immunology*. 2015;67(1):43-50.
42. Zipfel PF, Skerka C. Complement dysfunction in hemolytic uremic syndrome. *Current opinion in rheumatology*. 2006;18(5):548-55.
43. Fakhouri F, Zuber J, Fremeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 2017;390(10095):681-96.
44. Wong EKS, Kavanagh D. Diseases of complement dysregulation-an overview. *Seminars in immunopathology*. 2018;40(1):49-64.
45. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nature genetics*. 2011;43(4):321-7.
46. Zhao J, Wu H, Khosravi M, Cui H, Qian X, Kelly JA, et al. Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility. *PLoS genetics*. 2011;7(5):e1002079.
47. D'Agati JCMVD. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. 7th ed: Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2014.

48. Pickering MC, D'Agati VD, Nester CM, Smith RJ, Haas M, Appel GB, et al. C3 glomerulopathy: consensus report. *Kidney international*. 2013;84(6):1079-89.
49. Coppo R, Gianoglio B, Porcellini MG, Maringhini S. Frequency of renal diseases and clinical indications for renal biopsy in children (report of the Italian National Registry of Renal Biopsies in Children). Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Pediatric Nephrology and Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Nephrology. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 1998;13(2):293-7.
50. Medjeral-Thomas NR, O'Shaughnessy MM, O'Regan JA, Traynor C, Flanagan M, Wong L, et al. C3 glomerulopathy: clinicopathologic features and predictors of outcome. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2014;9(1):46-53.
51. Smith RJH, Appel GB, Blom AM, Cook HT, D'Agati VD, Fakhouri F, et al. C3 glomerulopathy - understanding a rare complement-driven renal disease. *Nature reviews Nephrology*. 2019;15(3):129-43.
52. Barbour TD, Pickering MC, Terence Cook H. Dense deposit disease and C3 glomerulopathy. *Seminars in nephrology*. 2013;33(6):493-507.
53. Thompson NB, Kelly DM, Warner WC, Jr., Rush JK, Moisan A, Hanna WR, Jr., et al. Intraobserver and interobserver reliability and the role of fracture morphology in classifying femoral shaft fractures in young children. *Journal of pediatric orthopedics*. 2014;34(3):352-8.
54. Al-Ghaithi B, Chanchlani R, Riedl M, Thorner P, Licht C. C3 Glomerulopathy and post-infectious glomerulonephritis define a disease spectrum. *Pediatr Nephrol*. 2016;31(11):2079-86.
55. Gale DP, Maxwell PH. C3 glomerulonephritis and CFHR5 nephropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2013;28(2):282-8.
56. Servais A, Noel LH, Roumenina LT, Le Quintrec M, Ngo S, Dragon-Durey MA, et al. Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney international*. 2012;82(4):454-64.
57. Marinozzi MC, Roumenina LT, Chauvet S, Hertig A, Bertrand D, Olagne J, et al. Anti-Factor B and Anti-C3b Autoantibodies in C3 Glomerulopathy and Ig-Associated

Membranoproliferative GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2017;28(5):1603-13.

58. Zhang Y, Meyer NC, Fervenza FC, Lau W, Keenan A, Cara-Fuentes G, et al. C4 Nephritic Factors in C3 Glomerulopathy: A Case Series. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2017;70(6):834-43.

59. Blom AM, Corvillo F, Magda M, Stasilojc G, Nozal P, Perez-Valdivia MA, et al. Testing the Activity of Complement Convertases in Serum/Plasma for Diagnosis of C4NeF-Mediated C3 Glomerulonephritis. *Journal of clinical immunology*. 2016;36(5):517-27.

60. Sethi S, Fervenza FC, Zhang Y, Zand L, Vrana JA, Nasr SH, et al. C3 glomerulonephritis: clinicopathological findings, complement abnormalities, glomerular proteomic profile, treatment, and follow-up. *Kidney international*. 2012;82(4):465-73.

61. Zhang Y, Meyer NC, Wang K, Nishimura C, Frees K, Jones M, et al. Causes of alternative pathway dysregulation in dense deposit disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2012;7(2):265-74.

62. Blanc C, Togarsimalemath SK, Chauvet S, Le Quintrec M, Moulin B, Buchler M, et al. Anti-factor H autoantibodies in C3 glomerulopathies and in atypical hemolytic uremic syndrome: one target, two diseases. *J Immunol*. 2015;194(11):5129-38.

63. Thomas S, Ranganathan D, Francis L, Madhan K, John GT. Current concepts in C3 glomerulopathy. *Indian journal of nephrology*. 2014;24(6):339-48.

64. Cook HT. C3 glomerulopathy. *F1000Research*. 2017;6:248.

65. Spitzer RE, Vallota EH, Forristal J, Sudora E, Stitzel A, Davis NC, et al. Serum C3 lytic system in patients with glomerulonephritis. *Science*. 1969;164(3878):436-7.

66. Waldo FB, Forristal J, Beischel L, West CD. A circulating inhibitor of fluid-phase amplification. C3 convertase formation in systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*. 1985;75(6):1786-95.

67. Lewis LA, Ram S. Meningococcal disease and the complement system. *Virulence*. 2014;5(1):98-126.

68. Paixao-Cavalcante D, Lopez-Trascasa M, Skattum L, Giclas PC, Goodship TH, de Cordoba SR, et al. Sensitive and specific assays for C3 nephritic factors clarify mechanisms underlying complement dysregulation. *Kidney international*. 2012;82(10):1084-92.

69. Misra A, Peethambaram A, Garg A. Clinical features and metabolic and autoimmune derangements in acquired partial lipodystrophy: report of 35 cases and review of the literature. *Medicine*. 2004;83(1):18-34.
70. Dalvin LA, Fervenza FC, Sethi S, Pulido JS. Shedding Light on Fundus Drusen Associated with Membranoproliferative Glomerulonephritis: Breaking Stereotypes of Types I, II, and III. *Retinal cases & brief reports*. 2016;10(1):72-8.
71. Duvall-Young J, MacDonald MK, McKechnie NM. Fundus changes in (type II) mesangiocapillary glomerulonephritis simulating drusen: a histopathological report. *The British journal of ophthalmology*. 1989;73(4):297-302.
72. Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1976;73(9):3268-72.
73. West CD, Witte DP, McAdams AJ. Composition of nephritic factor-generated glomerular deposits in membranoproliferative glomerulonephritis type 2. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2001;37(6):1120-30.
74. Daha MR, Van Es LA. Stabilization of homologous and heterologous cell-bound amplification convertases, C3bBb, by C3 nephritic factor. *Immunology*. 1981;43(1):33-8.
75. Fischer E, Kazatchkine MD, Mecarelli-Halbwachs L. Protection of the classical and alternative complement pathway C3 convertases, stabilized by nephritic factors, from decay by the human C3b receptor. *European journal of immunology*. 1984;14(12):1111-4.
76. Ito S, Tamura N, Fujita T. Effect of decay-accelerating factor on the assembly of the classical and alternative pathway C3 convertases in the presence of C4 or C3 nephritic factor. *Immunology*. 1989;68(4):449-52.
77. Clardy CW, Forristal J, Strife CF, West CD. A properdin dependent nephritic factor slowly activating C3, C5, and C9 in membranoproliferative glomerulonephritis, types I and III. *Clinical immunology and immunopathology*. 1989;50(3):333-47.
78. Varade WS, Forristal J, West CD. Patterns of complement activation in idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis, types I, II, and III. *American journal of*

kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation. 1990;16(3):196-206.

79. Iatropoulos P, Noris M, Mele C, Piras R, Valoti E, Bresin E, et al. Complement gene variants determine the risk of immunoglobulin-associated MPGN and C3 glomerulopathy and predict long-term renal outcome. *Molecular immunology*. 2016;71:131-42.

80. Schena FP, Pertosa G, Stanziale P, Vox E, Pecoraro C, Andreucci VE. Biological significance of the C3 nephritic factor in membranoproliferative glomerulonephritis. *Clinical nephrology*. 1982;18(5):240-6.

81. Klein M, Poucell S, Arbus GS, McGraw M, Rance CP, Yoon SJ, et al. Characteristics of a benign subtype of dense deposit disease: comparison with the progressive form of this disease. *Clinical nephrology*. 1983;20(4):163-71.

82. Marinozzi MC, Chauvet S, Le Quintrec M, Mignotet M, Petitprez F, Legendre C, et al. C5 nephritic factors drive the biological phenotype of C3 glomerulopathies. *Kidney international*. 2017;92(5):1232-41.

83. Halbwachs L, Leveille M, Lesavre P, Wattel S, Leibowitch J. Nephritic factor of the classical pathway of complement: immunoglobulin G autoantibody directed against the classical pathway C3 convertase enzyme. *The Journal of clinical investigation*. 1980;65(6):1249-56.

84. Miller EC, Chase NM, Densen P, Hintermeyer MK, Casper JT, Atkinson JP. Autoantibody stabilization of the classical pathway C3 convertase leading to C3 deficiency and Neisserial sepsis: C4 nephritic factor revisited. *Clin Immunol*. 2012;145(3):241-50.

85. Ohi H, Yasugi T. Occurrence of C3 nephritic factor and C4 nephritic factor in membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN). *Clinical and experimental immunology*. 1994;95(2):316-21.

86. Vasilev VV, Radanova M, Lazarov VJ, Dragon-Durey MA, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Autoantibodies Against C3b-Functional Consequences and Disease Relevance. *Frontiers in immunology*. 2019;10:64.

87. Goodship TH, Pappworth IY, Toth T, Denton M, Houlberg K, McCormick F, et al. Factor H autoantibodies in membranoproliferative glomerulonephritis. *Molecular immunology*. 2012;52(3-4):200-6.

88. Nozal P, Strobel S, Ibernón M, Lopez D, Sanchez-Corral P, Rodríguez de Córdoba S, et al. Anti-factor H antibody affecting factor H cofactor activity in a patient with dense deposit disease. *Clinical kidney journal*. 2012;5(2):133-6.
89. Licht C, Heinen S, Jozsi M, Loschmann I, Saunders RE, Perkins SJ, et al. Deletion of Lys224 in regulatory domain 4 of Factor H reveals a novel pathomechanism for dense deposit disease (MPGN II). *Kidney international*. 2006;70(1):42-50.
90. Abrera-Abeleda MA, Nishimura C, Frees K, Jones M, Maga T, Katz LM, et al. Allelic variants of complement genes associated with dense deposit disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(8):1551-9.
91. Wong EK, Anderson HE, Herbert AP, Challis RC, Brown P, Reis GS, et al. Characterization of a factor H mutation that perturbs the alternative pathway of complement in a family with membranoproliferative GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25(11):2425-33.
92. Togarsimalemath SK, Sethi SK, Duggal R, Le Quintrec M, Jha P, Daniel R, et al. A novel CFHR1-CFHR5 hybrid leads to a familial dominant C3 glomerulopathy. *Kidney international*. 2017;92(4):876-87.
93. Malik TH, Lavin PJ, Goicoechea de Jorge E, Vernon KA, Rose KL, Patel MP, et al. A hybrid CFHR3-1 gene causes familial C3 glomerulopathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(7):1155-60.
94. Chen Q, Wiesener M, Eberhardt HU, Hartmann A, Uzonyi B, Kirschfink M, et al. Complement factor H-related hybrid protein deregulates complement in dense deposit disease. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(1):145-55.
95. Zipfel PF, Skerka C, Chen Q, Wiech T, Goodship T, Johnson S, et al. The role of complement in C3 glomerulopathy. *Molecular immunology*. 2015;67(1):21-30.
96. Sessions GR, Kant GJ, Koob GF. Locus coeruleus lesions and learning in the rat. *Physiology & behavior*. 1976;17(5):853-9.
97. Imamura H, Konomoto T, Tanaka E, Hisano S, Yoshida Y, Fujimura Y, et al. Familial C3 glomerulonephritis associated with mutations in the gene for complement factor B. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2015;30(5):862-4.
98. Martínez-Barricarte R, Heurich M, Valdes-Canedo F, Vazquez-Martul E, Torreira E, Montes T, et al. Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease

pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(10):3702-12.

99. Fremeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK, Strain L, Blouin J, Brown AL, et al. Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2008;112(13):4948-52.

100. Goicoechea de Jorge E, Harris CL, Esparza-Gordillo J, Carreras L, Arranz EA, Garrido CA, et al. Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(1):240-5.

101. Marinozzi MC, Vergoz L, Rybkine T, Ngo S, Bettoni S, Pashov A, et al. Complement factor B mutations in atypical hemolytic uremic syndrome-disease-relevant or benign? *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25(9):2053-65.

102. Nilsson SC, Karpman D, Vaziri-Sani F, Kristoffersson AC, Salomon R, Provot F, et al. A mutation in factor I that is associated with atypical hemolytic uremic syndrome does not affect the function of factor I in complement regulation. *Molecular immunology*. 2007;44(8):1835-44.

103. Kavanagh D, Richards A, Noris M, Hauhart R, Liszewski MK, Karpman D, et al. Characterization of mutations in complement factor I (CFI) associated with hemolytic uremic syndrome. *Molecular immunology*. 2008;45(1):95-105.

104. Nilsson SC, Kalchishkova N, Trouw LA, Fremeaux-Bacchi V, Villoutreix BO, Blom AM. Mutations in complement factor I as found in atypical hemolytic uremic syndrome lead to either altered secretion or altered function of factor I. *European journal of immunology*. 2010;40(1):172-85.

105. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, Esmon CT, Esmon NL, Ferrell G, et al. Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *The New England journal of medicine*. 2009;361(4):345-57.

106. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Molecular immunology*. 2013;56(3):170-80.

107. Mihlan M, Hebecker M, Dahse HM, Halbich S, Huber-Lang M, Dahse R, et al. Human complement factor H-related protein 4 binds and recruits native pentameric C-reactive protein to necrotic cells. *Molecular immunology*. 2009;46(3):335-44.



108. Sinha S, Morgan-Hughes N, O'Toole L, Hunter S. Minimal access mitral valve repair in a patient with a right pneumonectomy for Scimitar syndrome. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2016;22(6):851-3.
109. McRae JL, Duthy TG, Griggs KM, Ormsby RJ, Cowan PJ, Cromer BA, et al. Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J Immunol*. 2005;174(10):6250-6.
110. Abarrategui-Garrido C, Martinez-Barricarte R, Lopez-Trascasa M, de Cordoba SR, Sanchez-Corral P. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2009;114(19):4261-71.
111. Skerka C, Horstmann RD, Zipfel PF. Molecular cloning of a human serum protein structurally related to complement factor H. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(18):12015-20.
112. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*. 2009;114(12):2439-47.
113. Skerka C, Timmann C, Horstmann RD, Zipfel PF. Two additional human serum proteins structurally related to complement factor H. Evidence for a family of factor H-related genes. *J Immunol*. 1992;148(10):3313-8.
114. Park CT, Wright SD. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30):18054-60.
115. Goicoechea de Jorge E, Caesar JJ, Malik TH, Patel M, Colledge M, Johnson S, et al. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(12):4685-90.
116. Skerka C, Kuhn S, Gunther K, Lingelbach K, Zipfel PF. A novel short consensus repeat-containing molecule is related to human complement factor H. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(4):2904-8.
117. Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, Stippa S, Keilhauer CN, Oppermann M, et al. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H

influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Human molecular genetics*. 2010;19(23):4694-704.

118. Skerka C, Hellwage J, Weber W, Tilkorn A, Buck F, Marti T, et al. The human factor H-related protein 4 (FHR-4). A novel short consensus repeat-containing protein is associated with human triglyceride-rich lipoproteins. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(9):5627-34.

119. Jozsi M, Richter H, Loschmann I, Skerka C, Buck F, Beisiegel U, et al. FHR-4A: a new factor H-related protein is encoded by the human FHR-4 gene. *European journal of human genetics : EJHG*. 2005;13(3):321-9.

120. Hellwage J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS letters*. 1999;462(3):345-52.

121. McRae JL, Cowan PJ, Power DA, Mitchelhill KI, Kemp BE, Morgan BP, et al. Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(9):6747-54.

122. Murphy B, Georgiou T, Machet D, Hill P, McRae J. Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2002;39(1):24-7.

123. Csincsi AI, Kopp A, Zoldi M, Banlaki Z, Uzonyi B, Hebecker M, et al. Factor H-related protein 5 interacts with pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation. *J Immunol*. 2015;194(10):4963-73.

124. Gale DP, de Jorge EG, Cook HT, Martinez-Barricarte R, Hadjisavvas A, McLean AG, et al. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet*. 2010;376(9743):794-801.

125. Westra D, Vernon KA, Volokhina EB, Pickering MC, van de Kar NC, van den Heuvel LP. Atypical hemolytic uremic syndrome and genetic aberrations in the complement factor H-related 5 gene. *Journal of human genetics*. 2012;57(7):459-64.

126. Monteferrante G, Brioschi S, Caprioli J, Pianetti G, Bettinaglio P, Bresin E, et al. Genetic analysis of the complement factor H related 5 gene in haemolytic uraemic syndrome. *Molecular immunology*. 2007;44(7):1704-8.

127. Zhai YL, Meng SJ, Zhu L, Shi SF, Wang SX, Liu LJ, et al. Rare Variants in the Complement Factor H-Related Protein 5 Gene Contribute to Genetic Susceptibility to

IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016;27(9):2894-905.

128. Rabasco C, Cavero T, Roman E, Rojas-Rivera J, Olea T, Espinosa M, et al. Effectiveness of mycophenolate mofetil in C3 glomerulonephritis. *Kidney international*. 2015;88(5):1153-60.

129. Kaplan M. Eculizumab (Alexion). *Curr Opin Investig Drugs*. 2002;3(7):1017-23.

130. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England journal of medicine*. 2004;350(6):552-9.

131. Mache CJ, Acham-Roschitz B, Fremeaux-Bacchi V, Kirschfink M, Zipfel PF, Roedl S, et al. Complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2009;4(8):1312-6.

132. Angeletti A, Reyes-Bahamonde J, Cravedi P, Campbell KN. Complement in Non-Antibody-Mediated Kidney Diseases. *Frontiers in medicine*. 2017;4:99.

133. Smith RJ, Alexander J, Barlow PN, Botto M, Cassavant TL, Cook HT, et al. New approaches to the treatment of dense deposit disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007;18(9):2447-56.

134. Zand L, Lorenz EC, Cosio FG, Fervenza FC, Nasr SH, Gandhi MJ, et al. Clinical findings, pathology, and outcomes of C3GN after kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25(5):1110-7.

135. Hou J, Markowitz GS, Bomback AS, Appel GB, Herlitz LC, Barry Stokes M, et al. Toward a working definition of C3 glomerulopathy by immunofluorescence. *Kidney international*. 2014;85(2):450-6.

136. Figueres ML, Fremeaux-Bacchi V, Rabant M, Galmiche L, Marinozzi MC, Grunfeld JP, et al. Heterogeneous histologic and clinical evolution in 3 cases of dense deposit disease with long-term follow-up. *Human pathology*. 2014;45(11):2326-33.

137. Cook HT, Pickering MC. Histopathology of MPGN and C3 glomerulopathies. *Nature reviews Nephrology*. 2015;11(1):14-22.

138. Habbig S, Mihatsch MJ, Heinen S, Beck B, Emmel M, Skerka C, et al. C3 deposition glomerulopathy due to a functional factor H defect. *Kidney international*. 2009;75(11):1230-4.

139. Bomback AS, Appel GB. Pathogenesis of the C3 glomerulopathies and reclassification of MPGN. *Nature reviews Nephrology*. 2012;8(11):634-42.
140. Iatropoulos P, Daina E, Curreri M, Piras R, Valoti E, Mele C, et al. Cluster Analysis Identifies Distinct Pathogenetic Patterns in C3 Glomerulopathies/Immune Complex-Mediated Membranoproliferative GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2018;29(1):283-94.
141. Cook HT, Pickering MC. Clusters Not Classifications: Making Sense of Complement-Mediated Kidney Injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2018;29(1):9-12.
142. Fetterhoff TJ, McCarthy RC. A micromodification of the CH50 test for the classical pathway of complement. *Journal of clinical & laboratory immunology*. 1984;14(4):205-8.
143. Reti M, Farkas P, Csuka D, Razso K, Schlammadinger A, Udvardy ML, et al. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2012;10(5):791-8.
144. Delamarche C, Berger F, Pouplard A, Emile J. An ELISA technique for the measurement of C1q in cerebrospinal fluid. *Journal of immunological methods*. 1988;114(1-2):101-6.
145. Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, Macher MA, Blouin J, Nivet H, et al. Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(2):555-63.
146. Rother U. A new screening test for C3 nephritis factor based on a stable cell bound convertase on sheep erythrocytes. *Journal of immunological methods*. 1982;51(1):101-7.
147. Garam N, Prohaszka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, et al. C4 nephritic factor in patients with immune-complex-mediated membranoproliferative glomerulonephritis and C3-glomerulopathy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2019;14(247).
148. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*. 2010;7(4):248-9.
149. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome research*. 2001;11(5):863-74.

150. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS one*. 2012;7(10):e46688.
151. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods*. 2010;7(8):575-6.
152. Abreera-Abeleda MA, Nishimura C, Smith JL, Sethi S, McRae JL, Murphy BF, et al. Variations in the complement regulatory genes factor H (CFH) and factor H related 5 (CFHR5) are associated with membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease). *Journal of medical genetics*. 2006;43(7):582-9.
153. Tao J, Lieberman J, Lafayette RA, Kambham N. A rare case of Alport syndrome, atypical hemolytic uremic syndrome and Pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *BMC nephrology*. 2018;19(1):355.
154. Provaznikova D, Rittich S, Malina M, Seeman T, Marinov I, Riedl M, et al. Manifestation of atypical hemolytic uremic syndrome caused by novel mutations in MCP. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(1):73-81.
155. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, Sanchez-Corral P, Fremeaux-Bacchi V, Rodriguez de Cordoba S, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(3):475-86.
156. Mohlin FC, Mercier E, Fremeaux-Bacchi V, Liszewski MK, Atkinson JP, Gris JC, et al. Analysis of genes coding for CD46, CD55, and C4b-binding protein in patients with idiopathic, recurrent, spontaneous pregnancy loss. *European journal of immunology*. 2013;43(6):1617-29.
157. Fidalgo T, Martinho P, Pinto CS, Oliveira AC, Salvado R, Borrás N, et al. Combined study of ADAMTS13 and complement genes in the diagnosis of thrombotic microangiopathies using next-generation sequencing. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*. 2017;1(1):69-80.
158. Osborne AJ, Breno M, Borsa NG, Bu F, Fremeaux-Bacchi V, Gale DP, et al. Statistical Validation of Rare Complement Variants Provides Insights into the Molecular Basis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3 Glomerulopathy. *J Immunol*. 2018;200(7):2464-78.

159. Seddon JM, Yu Y, Miller EC, Reynolds R, Tan PL, Gowrisankar S, et al. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nature genetics*. 2013;45(11):1366-70.
160. Yuasa I, Nakagawa M, Umetsu K, Harihara S, Matsusue A, Nishimukai H, et al. Molecular basis of complement factor I (CFI) polymorphism: one of two polymorphic suballeles responsible for CFI A is Japanese-specific. *Journal of human genetics*. 2008;53(11-12):1016-21.
161. Roversi P, Johnson S, Caesar JJ, McLean F, Leath KJ, Tsiftoglou SA, et al. Structural basis for complement factor I control and its disease-associated sequence polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(31):12839-44.
162. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 2006;108(4):1267-79.
163. Sartz L, Olin AI, Kristoffersson AC, Stahl AL, Johansson ME, Westman K, et al. A novel C3 mutation causing increased formation of the C3 convertase in familial atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol*. 2012;188(4):2030-7.
164. Fang CJ, Fremeaux-Bacchi V, Liszewski MK, Pianetti G, Noris M, Goodship TH, et al. Membrane cofactor protein mutations in atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), fatal Stx-HUS, C3 glomerulonephritis, and the HELLP syndrome. *Blood*. 2008;111(2):624-32.
165. Richards A, Kathryn Liszewski M, Kavanagh D, Fang CJ, Moulton E, Fremeaux-Bacchi V, et al. Implications of the initial mutations in membrane cofactor protein (MCP; CD46) leading to atypical hemolytic uremic syndrome. *Molecular immunology*. 2007;44(1-3):111-22.
166. Vernon KA, Goicoechea de Jorge E, Hall AE, Fremeaux-Bacchi V, Aitman TJ, Cook HT, et al. Acute presentation and persistent glomerulonephritis following streptococcal infection in a patient with heterozygous complement factor H-related protein 5 deficiency. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2012;60(1):121-5.

167. Bu F, Maga T, Meyer NC, Wang K, Thomas CP, Nester CM, et al. Comprehensive genetic analysis of complement and coagulation genes in atypical hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25(1):55-64.
168. Kernan KF, Ghaloul-Gonzalez L, Shakoory B, Kellum JA, Angus DC, Carcillo JA. Adults with septic shock and extreme hyperferritinemia exhibit pathogenic immune variation. *Genes and immunity*. 2019;20(6):520-6.
169. Narendra U, Pauer GJ, Hagstrom SA. Genetic analysis of complement factor H related 5, CFHR5, in patients with age-related macular degeneration. *Molecular vision*. 2009;15:731-6.
170. Mohlin FC, Nilsson SC, Levart TK, Golubovic E, Rusai K, Muller-Sacherer T, et al. Functional characterization of two novel non-synonymous alterations in CD46 and a Q950H change in factor H found in atypical hemolytic uremic syndrome patients. *Molecular immunology*. 2015;65(2):367-76.
171. van Beek AE, Pouw RB, Brouwer MC, van Mierlo G, Geissler J, Ooijevaar-de Heer P, et al. Factor H-Related (FHR)-1 and FHR-2 Form Homo- and Heterodimers, while FHR-5 Circulates Only As Homodimer in Human Plasma. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1328.
172. Chen Q, Manzke M, Hartmann A, Buttner M, Amann K, Pauly D, et al. Complement Factor H-Related 5-Hybrid Proteins Anchor Properdin and Activate Complement at Self-Surfaces. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2016;27(5):1413-25.
173. Rudnick RB, Chen Q, Stea ED, Hartmann A, Papac-Milicevic N, Person F, et al. FHR5 Binds to Laminins, Uses Separate C3b and Surface-Binding Sites, and Activates Complement on Malondialdehyde-Acetaldehyde Surfaces. *J Immunol*. 2018;200(7):2280-90.
174. Medjeral-Thomas NR, Trolborg A, Constantinou N, Lomax-Browne HJ, Hansen AG, Willicombe M, et al. Progressive IgA Nephropathy Is Associated With Low Circulating Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease-3 (MASP-3) and Increased Glomerular Factor H-Related Protein-5 (FHR5) Deposition. *Kidney international reports*. 2018;3(2):426-38.

175. Medjeral-Thomas NR, Lomax-Browne HJ, Beckwith H, Willicombe M, McLean AG, Brookes P, et al. Circulating complement factor H-related proteins 1 and 5 correlate with disease activity in IgA nephropathy. *Kidney international*. 2017;92(4):942-52.
176. Zhu L, Guo WY, Shi SF, Liu LJ, Lv JC, Medjeral-Thomas NR, et al. Circulating complement factor H-related protein 5 levels contribute to development and progression of IgA nephropathy. *Kidney international*. 2018;94(1):150-8.
177. Skattum L, Martensson U, Sjöholm AG. Hypocomplementaemia caused by C3 nephritic factors (C3 NeF): clinical findings and the coincidence of C3 NeF type II with anti-C1q autoantibodies. *Journal of internal medicine*. 1997;242(6):455-64.
178. Noris M, Remuzzi G. Glomerular Diseases Dependent on Complement Activation, Including Atypical Hemolytic Uremic Syndrome, Membranoproliferative Glomerulonephritis, and C3 Glomerulopathy: Core Curriculum 2015. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2015;66(2):359-75.
179. Noris M, Donadelli R, Remuzzi G. Autoimmune abnormalities of the alternative complement pathway in membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy. *Pediatr Nephrol*. 2018.
180. Noris M, Remuzzi G. Overview of complement activation and regulation. *Seminars in nephrology*. 2013;33(6):479-92.
181. Ioannidis JP. Why most published research findings are false. *PLoS medicine*. 2005;2(8):e124.
182. Garam N, Prohaszka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggli M, et al. Validation of distinct pathogenic patterns in a cohort of membranoproliferative glomerulonephritis patients by cluster analysis. *Clinical kidney journal*. 2019:1-10.
183. Donadelli R, Pulieri P, Piras R, Iatropoulos P, Valoti E, Benigni A, et al. Unraveling the Molecular Mechanisms Underlying Complement Dysregulation by Nephritic Factors in C3G and IC-MPGN. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2329.
184. Fridkis-Hareli M, Storek M, Mazsaroff I, Risitano AM, Lundberg AS, Horvath CJ, et al. Design and development of TT30, a novel C3d-targeted C3/C5 convertase inhibitor for treatment of human complement alternative pathway-mediated diseases. *Blood*. 2011;118(17):4705-13.



## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 11.1. Disszertáció alapjául szolgáló publikációk

1) Garam N, Prohaszka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, et al.

**Validation of distinct pathogenic patterns in a cohort of membranoproliferative glomerulonephritis patients by cluster analysis.**

Clinical Kidney Journal. 2019;1-10.

IF: 2,975 (2018)

2) Garam N, Prohaszka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, et al.

**C4 nephritic factor in patients with immune-complex-mediated membranoproliferative glomerulonephritis and C3-glomerulopathy.**

Orphanet Journal of Rare Diseases. 2019;14(247).

IF: 3,687 (2018)

### 11.2. Disszertáció témájához kapcsolódó publikációk

1) Garam N, Prohaszka Z, Szilágyi Á, Aigner C, Schmidt A, Gaggl M, et al.

**CFHR5 genetic variations and serum levels in patients with immune-complex-mediated membranoproliferative glomerulonephritis and C3-glomerulopathy.**

*(közlésre beadva)*

### 11.3. Disszertációtól független publikációk

1) Garam N, Maláti É, Sinkovits G, Gombos T, Szederjesi A, Barabás L, Gráf L, Kocsis J, Prohaszka Z.

**Platelet Count, ADAMTS13 Activity, von Willebrand Factor Level and Survival in Patients with Colorectal Cancer: 5-Year Follow-up Study.**

Thromb Haemost. 2018 Jan;118(1):123-131

IF: 4,662 (2018)

2) Jubran R, Kocsis J, Garam N, Maláti É, Gombos T, Barabás L, Gráf L, Prohaszka Z, Fishelson Z.

**Circulating mitochondrial stress 70 protein/mortalin and cytosolic Hsp70 in blood: Risk indicators in colorectal cancer.**

Int J Cancer. 2017 Dec 1;141(11):2329-2335

IF: 4,982 (2018)

3) Gráf L, Barabás L, Madaras B, Garam N, Maláti É, Horváth L, Prohászka Z, Horváth Z, Kocsis J.

**High serum Hsp70 level predicts poor survival in colorectal cancer: Results obtained in an independent validation cohort.**

Cancer Biomark. 2018;23(4):539-547

IF: 2,859 (2018)

4) Trojnar E, Józsi M, Szabó Z, Réti M, Farkas P, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Garam N, Mikes B, Sinkovits G, Mező B, Csuka D, Prohászka Z

**Elevated Systemic Pentraxin-3 Is Associated With Complement Consumption in the Acute Phase of Thrombotic Microangiopathies.**

Front Immunol. 2019 Feb 25;10:240

IF: 4,716 (2018)

## 12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném kifejezni hálámat és köszönetemet témavezetőmnek Dr. Csuka Dorottyának és a Kutatólaboratórium vezetőjének Prof. Dr. Prohászka Zoltánnak, azért a mérhetetlenül sok segítségért, amit a munkám során végig kaptam tőlük. Bármikor fordulhattam hozzájuk tanácsért, mindig nyitott ajtókkal vártak, minden nehézségen átsegítettek, nemcsak szakmailag, hanem emberileg is mindenben támogattak.

Köszönöm, hogy megismertették velem a kutatói munka szépségeit, biztosították a kutatáshoz szükséges anyagi és szakmai háttérrel és lehetőséget teremtettek arra, hogy részt vehettem hazai és nemzetközi konferenciákon.

Hálával tartozom Karádi István és Masszi Tamás Professzor Uraknak, hogy lehetőséget teremtettek PhD munkám elvégzéséhez a Semmelweis Egyetem III. Számú Belgyógyászati Klinikáján.

Külön köszönettel tartozom laboratóriumi kollégáimnak Dr. Szilágyi Ágnesnek, Mező Blankának, Dr. Veszeli Nórának, Szabó Edinának, Takács Beátának és Dr. Sinkovics Györgynek, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk a kérdéseimmel.

Szeretnék köszönetet mondani a betegeknek a vizsgálatainkban történő részvételükért, valamint a „Kelet-európai C3-glomerulopáthia” munkacsoport összes tagjának, köztük a betegeket kezelő és gondozó valamennyi klinikus és patológus kollégának a betegekre vonatkozó adatok összegyűjtéséért és közléséért.

Köszönöm együttműködésüket kollaborációs partnereinknek, az MTA-ELTE Komplement Munkacsoport munkatársainak, Prof. Dr. Józsi Mihálynak, Dr. Uzonyi Barbarának és Dr. Cserhalmi Marcellnek.

Hálásan köszönöm Dóczy Andrásné, Szendrei Zsuzsanna és Kertész Lászlóné segítségét és iránymutatását a laboratóriumi munka során.

Külön köszönöm Dr. Varga Liliannak dolgozatom házi bírálatát.

Ezen kívül szeretném megköszönni a Kutatólaboratórium összes munkatársának a segítséget, és azt, hogy munkámat ilyen nagyszerű emberek között, jó hangulatban végezhettem.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak türelmüket, kitartó támogatásukat, biztatásukat, mellyel végig segítettek a kutatómunkám során.