

Új perspektívák a proliferatív glomerulonefritisek megközelítésében

Doktori tézisek

Dr. Garam Nóra Éva

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

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

Hivatalos bírálók:

Dr. Dolgos Szilveszter, Ph.D., osztályvezető főorvos

Dr. Tory Kálmán, med. hab., egyetemi docens

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

1. BEVEZETÉS

1.1 A membranoproliferatív glomerulonefritiszek

A membranoproliferatív glomerulonefritisz (MPGN) egy patológiai entitás. A fénymikroszkópos képet a mezangiális hipercellularitás, endokapilláris proliferáció, kapillárisfal megvastagodás jellemzi. Habár történetileg diagnózisként határozták meg, és három csoportra osztották fel a különböző megjelenésű fénymikroszkópos kép alapján, ma már egyértelműen a hisztológiai kép leírásaként használják. Mára ezt a besorolást felváltotta a patogenezis alapú csoportosítás. A komplementrendszer alternatív út szerepének feltérképezése a betegség hátterében elkülönítette az immunkomplex-mediált és a komplement-mediált formákat (C3-glomerulopátia, C3G).

Az immunkomplex-mediált formák hátterében elsősorban valamilyen infekció (HBV, HCV, EBV), szisztémás autoimmun betegség (SLE, reumatoid artritisz) vagy malignus folyamat állhat.

Ezzel szemben a C3G hátterében a komplementrendszer alternatív útjának (AP) sérült működése, szabályozása az elsődleges.

1.2. C3-glomerulopátia

A C3G egy nagyon ritka betegség, incidenciája 1-2/millió fő évente. Leggyakrabban gyerekeket, fiatal felnőtteket érint. Általában tünetmentes mikroszkópos hematuria, proteinuria, magas vérnyomás, veseelégtelenségig terjedő tünetek jellemezhetik. Az idősebb korban jelentkező C3G esetében fontos kizárni, hogy nem áll-e valamilyen szekunder ok a betegség hátterében. Progressziója során az esetek 50 %-ában végstádiumú vesebetegségbe (end-stage renal disease; ESRD) torkollik. Gyakran alakul ki különféle trigger esemény, például felső légúti infekciót követően. A komplement paraméterek közül 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 a betegekben. A diagnózis felállítása a vesebiopszia alapján történik. A fénymikroszkópos képet általánosságban a membranoproliferatív elváltozások jellemzik. Az immunfluoreszcens mikroszkópiás képen az immunkomplex-mediált MPGN-nel

ellentétben a C3 jelölődés minimum két nagyságrenddel nagyobb, mint bármelyik egyéb immunreaktáns (IgG, IgM, IgA, C1q).

Az altípusok további elkülönítése miatt elengedhetetlen az elektronmikroszkópia elvégzése. A C3 glomerulonefritist (C3GN) kevesebb mezangiális, szubendoteliális, szubepiteliális depozitum jellemzi, míg a denz depozit betegség (DDD) esetében elektrondenz ozmofil depozitum található a glomeruláris bazális membránban, illetve a mezangiumban, Bowman-tokban és a tubuláris bazális membrán mentén.

Ezenkívül egy ritka genetikai forma is elkülöníthető, mely a *CFHR5* gén internális duplikációja eredményeként létrejövő CFHR5-nefropátia.

1.2.1. Patogenezis

A betegség patogenezisének hátterében az AP sérült regulációja áll, mely elsősorban a folyadék-fázisban zajlik.

A sérült szabályozást okozhatják egyrészt különböző szerzett, komplementkomponensek elleni autoantitestek, másrészt a faktorokat érintő genetikai abnormalitások.

Az alternatív út sérült szabályozását eredményező különböző autoantitestek lehetnek a H-faktor, a C3, illetve a B-faktor elleni autoantitestek, illetve különböző nefritikus faktorok, mint a C3-nefritikus faktor (C3NeF), C4-nefritikus faktor (C4NeF) és a C5-nefritikus faktor. Ezen antitestek nagyjából az esetek 40-80%-ában detektálhatók.

A C3NeF az alternatív úton létrejövő C3-konvertázhoz kötődve stabilizálja azt, megnövelve az enzim féléletidejét, melynek eredményeként fokozott komplement aktiváció jön létre.

A C4NeF a C3NeF-hez hasonló funkciókkal rendelkezik, ám vele ellentétben a klasszikus/lektin úton létrejövő C3-konvertázt (C4b2a) képes stabilizálni dózisfüggő módon. MPGN-ben szenvedő betegeket vizsgálva kimutatták, hogy a C4NeF jelen lehet C3NeF-ral együtt, illetve önállóan is.

Ezen kívül nagyjából a betegek 10%-ában lehet kimutatni C3-elleni, B-faktor elleni, illetve H-faktor elleni autoantitestet.

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.

Annak ellenére, hogy számos patogenetikai tényezőt sikerült azonosítani a betegség hátterében, a betegek több mint 30%-ában nem tudunk kimutatni etiológiai faktort a diagnosztikus célból elvégzett laboratóriumi és genetikai vizsgálatokkal. Így ma a kutatások egyre inkább új tényezők felé irányulnak, melyek közül egyik irány a H-faktorral rokon fehérje család, melynek 5 tagja ismert. Nagyfokú homológiát mutatnak a H-faktorral, de egyikük sem tartalmaz a H-faktoréhoz hasonló regulátor domént. Ezek közül a H-faktorral rokon 5-ös fehérjét (FHR-5) – mint kóroki tényezőt – először Gale és munkatársai írták le 2010-ben egy autoszómális domináns módon öröklődő, Cipruson endémiás C3G hátterében. Az FHR-5 fehérje képes kötődni a heparinhoz, CRP-hez, pentraxin-3-hoz, illetve az extracelluláris mátrix bizonyos komponenseihez. Kimutatták azt is, hogy képes gátolni folyadékfázisban a C3-konvertázt, így mai tudásunk szerint deregulátornak tekinthető, bár az irodalmi adatok még nem egységesek ezt illetően.

1.3. Új megközelítés a membranoproliferatív glomerulonefritisek osztályozásában

Habár az ismereteink nagyban bővültek a MPGN-ek patogenezisét illetően, több kérdés is megválaszolatlan maradt. Az elkülönítés az immunkomplex-mediált és a komplement-mediált csoportok között nem minden esetben egyértelmű. Egyrésztől nem egyértelmű az elkülönítés sok esetben a C3GN és a DDD között, néha még az IC-MPGN között sem, illetve ismételt biopszia sokszor különböző képet mutat. Sok esetben találhatóak az alternatív út diszregulációra utaló eltérések IC-MPGN-ben is, mint C3NeF vagy alacsony C3 szint normális C4 szinttel. Ma már egyre jobban elfogadott az a nézet, hogy nem két külön betegségnek, hanem egy spektrum két végpontjának tekinthető a C3G és az IC-MPGN.

Ezen kérdések tisztázására Iatropoulos és munkatársai kizárólag a betegek klinikai, genetikai, hisztológiai és komplement eredményei alapján egy hipotézismentes, adatvezérelt hierarchikus klaszter analízist végeztek, mely eredményeként 4 különálló csoportot kaptak. Az 1-es klasztert fiatal életkor, nagymértékű komplement aktiváció jellemezte alacsony C3 szinttel, a genetikai variációk és C3NeF magas előfordulási gyakoriságával.

A 2-es klaszterbe tartozó betegeknél szintén intenzív komplement aktiváció volt látható magasabb Ig jelölődéssel.

A 3-as klasztert ezzel szemben alacsonyabb sC5b-9 plazma szint jellemezte, alacsony C3 szinttel és ritka variációk valamint C3NeF magas előfordulási

gyakoriságával, illetve az intramembránózus elektrondenz depozitum jelenlétével.

A 4-es klasztert alacsonyabb mértékű komplement aktiváció jellemezte, magasabb C3 szinttel, ritkábban előforduló variációkkal és C3NeF-ral. Ebbe a klaszterbe idősebb betegek tartoztak és több szklerotikus glomerulus volt látható a biopszián.

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

A klaszter alkotás nagyban függ a vizsgált adatoktól, így fontos, hogy független beteganyagban is megismételhetőek-e a közölt megfigyelések.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A membranoproliferatív elváltozások hátterében zajló patomechanizmus még nem teljes mértékben tisztázott. Sok esetben nem lehet egyértelműen elkülöníteni az immunkomplex- és a komplement-mediált formákat. Célunk az volt, hogy feltárjuk új, potenciális genetikai, illetve szerzett patogenetikai faktorok szerepét a betegségben, továbbá új megközelítésből vizsgáljuk betegeinket.

2.1. H-faktossal rokon 5-ös fehérje szerepének vizsgálata C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban

Az FHR-5 fehérje nagyfokú szerkezeti homológiát mutat a H-faktossal, így korábbi vizsgálatok alapján felmerült, hogy patogenetikai szerepe lehet a komplement-mediált vesebetegségekben.

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 vesetűlése között?

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

Célunk az volt, hogy az irodalomban először nagyszámú C3G/IC-MPGN-ben szenvedő beteg bevonásával vizsgáljuk a C4NeF előfordulását és kapcsolatát a betegek klinikai, genetikai és egyéb komplement paramétereivel összefüggésben. 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?

2.3. 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 paramétereinek alapján. 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 vesetúlélése 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?

3. MÓDSZEREK

3.1. Betegek és kontrollok

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. A fennmaradó 120 beteg szövettanul bizonyított MPGN diagnózisú volt immunkomplex- vagy komplement-mediált formában.

Ezen 120 betegből 67 (55,8%) betegnél diagnosztizáltak IC-MPGN-t, 12 fő esetében (10%) DDD-t, míg 41 egyénnél (34,1%) C3GN-t. 1 betegnél nem volt lehetőségünk a C4NeF meghatározására, így az erre irányuló vizsgálatokba 119 beteget vontunk be.

A klaszteranalízisbe 92 beteget vontunk be, akik hiánytalan adathalmazzal rendelkeztek ehhez a vizsgálathoz.

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.

3.2. Alkalmazott módszerek

3.2.1 Komplement paraméterek meghatározása

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

Az alternatív út aktivitásának mérése Wieslab AP ELISA kit-tel (*Eurodiagnostica*), a klasszikus út összkomplement aktivitása hemolitikus titráción alapuló Mayer módszerrel történt.

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

A H-faktor, C1q, anti-H-faktor, anti-C1q anti-C3 és anti-B-faktor szinteket házi ELISA módszerekkel határoztuk meg (reagensek: anti-H-faktor, anti-C1q: *Binding Site*; H-faktor, *Merck*; C1q, C3, B faktor: *Quidel*).

A C3NeF meghatározása Rother és munkatársai által kidolgozott hemolítikus módszer alapján történt a betegek szérumában.

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, MicroVue C3a-desArgEIA, MicroVue C4d EIA, MicroVue sC5b-9 Plus EIA, MicroVue Bb Plus EIA).

3.2.2. A H-faktorral rokon 5-ös fehérje szérumszintjének meghatározása

Az FHR-5 szérumszintjét házilag beállított ELISA módszerrel határoztuk meg. Mikrotitráló ELISA lemezt 1µg/mL PBS-ben oldott kereskedelmi forgalomban kapható monoklonális egér anti-humán FHR-5 (R&D System) antitesttel fedtünk majd PBS 2% BSA-t tartalmazó oldat hozzáadásával blokkoltuk. A mintákat PBS 1% BSA Tween-20-at tartalmazó oldatban hígítottuk, majd a lemezhez adva inkubáltuk szobahőmérsékleten. Következő lépésben poliklonális kecske anti-humán FHR-5 IgG-t (R&D System) adtunk hozzá. A kötött antitesteket 0,1 µg/mL tormaperoxidázzal (HRP) jelölt anti-kecske IgG-vel mutattuk ki TMB szubsztrát hozzáadását követően.

3.2.3. C4 nefritikus faktor meghatározása

A C4NeF aktivitását hemolítikus teszt segítségével határoztuk meg Zhang és munkatársai által kidolgozott protokoll alapján. Az Alsever-oldatban oldott hemolizinnel szenzitizált birkavörösvértesteket (EA) Ca²⁺-ot és trietiléntetramin-N,N,N',N'',N''',N''''-hexaacetsav kelátképzőt tartalmazó zselatin-veronál (GVB) pufferben mostuk. Normál humán szérummal inkubáltuk a sejteket, így EA+C1+C4 sejteket építettünk fel. Ezután a sejteket Ca²⁺-ot tartalmazó GVB pufferben mostuk, majd inkubáltuk. További Ca²⁺-ot és Mg²⁺-ot tartalmazó GVB pufferben történő mosási lépések után, humán C2-t (Calbiochem) adtunk a sejtekhez, mely eredményeként EA+C1+C4+C2 sejtek alakultak ki. Ezt követően a sejtekhez hozzáadtuk a betegek szérumát, majd inkubációs és mosási lépések után C5-C9 komplement komponenseket tartalmazó forrásként patkányszérumot adtunk a sejtekhez. Inkubáció után hideg EDTA-GVB oldat hozzáadásával leállítottuk a reakciót és meghatároztuk a felülúszó optikai denzitását. A C4NeF aktivitása arányos volt a felülúszóban tapasztalható lízis mértékével. A pozitívítási határérték 48 egészséges kontroll személy C4NeF aktivitásának alapul véve 18%-nak adódott.

3.2.4. Genetikai vizsgálatok

Ritka variációk, rizikó polimorfizmusok, mutációk feltérképezésére Sanger-szekvenálást végeztünk a komplement fehérjét kódoló, illetve azokkal kapcsolatban levő génekben, úgymint H-faktor (*CFH*) I-faktor (*CFI*), membrán kofaktor fehérje (*CD46*), thrombomodulin (*THBD*), B-faktor (*CFB*), C3 (*C3*) és FHR-5 (*CFHR5*).

Az azonosított új variációk lehetséges funkcionális hatását az alábbi online predikciós programok segítségével határoztuk meg: PolyPhen (version2), SIFT, PROVEAN, Human Splicing Finder és Mutation-Taster.

A korábban már betegekben azonosított (és bizonyos esetekben funkcionálisan jellemzett) misszensz variánsokat, illetve nonszensz és splice site mutációkat feltehetően kóroki hatásúnak (likely pathogenic variant, LPV) prediktáltuk. Új misszensz variációkat abban az esetben tekintettünk feltehetően kórokinak, ha a minor allél frekvenciája $<0,1\%$ nemzetközi adatbázisokban (dbSNP, Exome Variant Server, 1000 Genomes Project) és ha a CADD score-juk ≥ 10 .

Kópiaszám variációk (deléciók, duplikációk) meghatározására a *CFHR1*, *CFHR2*, *CFHR3* és *CFHR5* kromoszómális régiókban, multiplex ligáció-dependens próba amplifikációt végeztünk.

3.2.5. Statisztikai elemzések

A folytonos változókat, mivel eloszlásuk eltért a normál eloszlástól, a medián, illetve 25-75-ös percentilis értékekkel jellemeztük. Kategorikus 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. A kategorikus változókat a csoportok között Pearson Khi-négyzet teszt segítségével hasonlítottuk össze.

A klaszteranalízist Iatropoulos és munkatársai munkája nyomán végeztük. Négyzetes euklideszi távolságok segítségével Ward-módszer szerinti hierarchikus klaszter analízist hajtottunk végre az IBM SPSS 20 program segítségével.

Kaplan-Meier analízis segítségével elemeztük a különbséget a csoportok között a vesetúlélést illetően.

4. EREDMÉNYEK

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

4.1.1. Betegek és egészséges egyének FHR-5 szérumszintjeinek vizsgálata

Az FHR-5 szérumszintje szignifikánsan alacsonyabb volt a betegekben az egészséges kontrollokhöz (medián: 2,1 mg/L) képest, függetlenül attól, hogy a betegek hordoztak-e *CFHR5* variációt (medián: 1,54 mg/L) vagy nem (medián: 1,82 mg/L).

4.1.2. 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, melyek az scr1-6-os domént érintették.

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

7 beteg esetében nem találtunk olyan további etiológiai tényezőt a rutin diagnosztikus módszerekkel, amely hatással lehet az AP diszregulációra.

5 variációt LPV-nek tartunk az alapján, hogy 1) már korábban leírták patogén faktorként C3G-ben szenvedő betegekben (p.E163Kfs*10, p.E163Rfs35), 2) korábbi irodalmi adatok alapján szegregációt mutatott a betegséggel (P46S), vagy 3) funkcionális vizsgálatok alapján (G278S, R356H). Megfigyeléseink alapján nincs erős összefüggés a *CFHR5* variációk lokalizációja és a detektált FHR-5 szérumszintek között.

4.1.3. 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 szérumában 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 szérumában a vad-típusú fehérjét hordozókhöz képest, valamint azokhoz a betegekhez viszonyítva is, akik a dimerizációs scr1-2-es doménben hordoztak valamilyen *CFHR5* variációt, illetve akik az R356H mutációt hordozták az scr6 doménben.

4.1.4. 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, ezért 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.

Szignifikáns, pozitív irányú korrelációt találtunk a C3 és C4 szintekkel, az alternatív valamint a klasszikus út aktivitással és a H-faktor koncentrációval is.

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

101 követett beteg közül 8 beteget kizártunk, akik nem rendelkeztek DNS mintával, illetve a *CFHR5* variációt hordozó betegeket (n=13; 1 főnek nem voltak követéses adatai) külön csoportként kezeltük. A maradék 80 beteget ROC-analízis segítségével két csoportra osztottuk, 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).

Kiemelném, hogy a *CFHR5* variációt hordozó betegek közül egy sem progrediált ESRD-be.

A magasabb FHR-5 szinttel rendelkező betegekre (medián: 2,16 mg/L; 1,87-2,85) rosszabb vesetűlés volt jellemző, azokhoz a betegekhez képest, akikben alacsonyabb volt az FHR-5 koncentráció (medián: 1,34 mg/L; 1,12-1,46) (p=0,034).

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

4.2.1. C4 nefritikus faktor előfordulása C3G/IC-MPGN-es betegcsoportban

119 hisztológiailag igazolt C3G/IC-MPGN-es beteg szérumában határoztuk meg a C4NeF aktivitását hemolitikus 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.

4.2.2. 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 C4NeF-re negatív betegek között. Egyedül a diagnóziskor jelenlevő veseelégtelenség prevalenciája volt alacsonyabb a C4NeF pozitív betegek csoportjában. A betegek komplement paramétereit elemezve a C4NeF pozitív egyének mintáiban alacsonyabb klasszikus és alternatív út aktivitást mértünk.

Megfigyeltük, hogy a C3NeF előfordulása magasabb volt azokban a betegekben, akikben 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).

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. A dupla pozitív betegeket alacsonyabb C3 szint jellemezte. A legmagasabb sC5b-9 szinteket a dupla pozitív csoportban detektáltuk, míg a csak C4NeF-ra pozitív csoportban mértük a legalacsonyabb szinteket.

A dupla pozitív csoportban tapasztaltunk leggyakrabban további autoantitesteket, úgymint az anti-C1q és anti-C3b megjelenését.

4.2.3. Vesetúlélés összefüggése a C4NeF jelenlétével

A 119 betegből 103 beteget tudtunk nyomon követni (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.

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

4.3.1 A generált klaszterek jellemzése és összehasonlítása Iatropoulos és munkatársai munkájával

Hierarchikus klaszter analízissel 4 klasztert generáltunk.

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 az LPV és 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 klaszterbe összesen 4 beteg került, így őket kizártuk a további analízisekből, mivel nem adtak volna releváns információt.

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

A 4-es klaszterbe idősebb betegek kerültek (medián: 39,5 év) normális C3 szintekkel. Ezt a klasztert az elektronmikroszkópiás képen kevesebb intramembránózus depozitum jellemezte.

4.3.2. A vesetúlélés összefüggése a klaszterekkel

79 beteget követtünk, akik közül 10 beteg progrediált ESRD-be. 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-es klaszter). 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.

4.3.3. További komplement paraméterek összefüggése a klaszterekkel

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.

Megvizsgáltuk, hogy a C4NeF előfordulása mutat-e kapcsolatot a különböző klaszterekkel. A C4NeF prevalenciája szignifikánsan magasabb volt az 1-es klaszterben ($p = 0,028$ 1 vs. 3,4 klaszter). A nefritikus faktorok előfordulását együtt értékelve szintén gyakrabban fordultak elő az 1-es klaszterben. A többi komplement autoantitestet is együttvéve az antitestek többszörös előfordulásának aránya szintén magasabb volt ebben a klaszterben.

Kíváncsiak voltunk, hogy az FHR-5 szérumszintek, illetve a *CFHR5* variációk jelenléte mutat-e valamilyen kapcsolatot a karakterizált klaszterekkel.

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 (medián: 1,47 mg/L, 1,25-1,98, $p < 0,05$, Dunn post-hoc teszt). A *CFHR5* variációt hordozó betegek nagyobb arányban estek az 1-es klaszterbe (10/49, 20,4%) a többi klaszterhez képest (4/58, 6,9%) ($p = 0,047$, χ^2 -teszt).

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat új eredményei, fő megállapításai a következők:

1. 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, melyek az scr 1-6-os doméneket érintették. A 8 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.
3. Az FHR-5 szintek korreláltak a betegek komplement szintjeivel.
4. A magasabb FHR-5 szinttel rendelkező csoport vesetűlése szignifikánsan rosszabbnak bizonyult 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. A betegek 14,3%-a bizonyult pozitívnak a C4NeF 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 beteget 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 vesetűlése és a nefritikus faktorok jelenléte között. Ugyanakkor a C4NeF pozitív betegek közül egy sem progrediált ESRD-be a 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 immunfluoreszcenciás 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.

9. A klaszterek egyértelmű összefüggést mutattak a betegek vesetűléésével, míg hasonló összefüggést a hisztológiai csoportokkal nem tudtunk feltárni. A 3-as és 4-es klaszterben rosszabb vesetűléést mutattunk ki az 1-es, 2-es klaszterhez képest.

10. Sikeresen tártuk fel további faktorok összefüggését a klinikailag releváns klaszterekkel. A C4NeF jelenléte gyakrabban fordult elő az 1-es klaszterben. Ebben a klaszterben nemcsak a C4NeF, hanem az összes komplement autoantitest (C3NeF, anti-C3, anti-B-faktor, anti-H-faktor, anti-C1q) is gyakrabban fordult elő.

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.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó 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)

3) 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)

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített IF: 6,662.

6.2. A disszertációtól független publikációk

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

A disszertációtól független publikációkra vonatkozó összesített IF: 17,219

A megjelölt folyóiratok összesített impakt faktora: 23,881.