

Záró kutatói jelentés a "Trombotikus mikroangiopátiák etiopatogenezisének vizsgálata" c. OTKA pályázatról (K100687, 2012-2015), vezető kutató: Prohászka Zoltán

Vizsgálatunk fő célkitűzése a trombotikus mikroangiopátiák etiopatogenezisének tanulmányozása volt, azon belül is az autoimmun folyamatok jellemzőinek és kialakulásuk okainak leírása. Célul tűztük ki továbbá olyan genetikai és molekuláris mechanizmusok feltárását is, amelyek az etiopatogenezis eddig fel nem tárt részleteit világíthatják meg, pl. új genetikai predisponáló tényezők feltárása, funkcionális jellemzése, illetve a patogenezis molekuláris eseményeinek vizsgálata. Kutatásunk humán klinikai, megfigyeléses vizsgálatokat, ex vivo analízist tartalmazott, melyeket érvényes ETT TUKÉB etikai engedély birtokában hajtottunk végre. Vizsgálatainkba 75 aHUS, 70 TTP-s és 430 egészséges kontroll személyt vontunk be. A kísérletek kivitelezése a kutatási tervben és a munkatervben rögzített célok szerint került kivitelezésre, két kivétellel (ADAMTS13 epitópanalízishez használt stratégiát megváltoztattuk, mert a kutatási periódus elején egy japán kutatócsoport az általunk is alkalmazni kívánt stratégiával nyert eredményeket közölt; ill. a megbízható tisztaságú target autoantigének hiánya miatt az új autoimmun mechanizmusok feltárása helyett új biomarkerek és diagnosztikai markerek felismerését tűztük ki), amelyeket a részjelentésekben előzetesen jeleztünk, és ezeket a bírálók nyugtázták is.

A kísérletek kivitelezése alapvetően a pályázatban eredetileg tervezett kutatótársak segítségével történt, TDK hallgatók, PhD hallgatók és posztdoktor munkatársak részvételével. A pályázat kiemelt eredményének tartom, hogy a támogatás révén megvalósított kutatás eredményeire alapozva Szarvas Nóra (korábbi nevén Kiss Nóra) PhD fokozatot szerzett 2016-ban (22), Dr. Mikes Bálint és Sinkovits György lényegében teljesítette a PhD fokozatszerzéshez kitűzött kísérletes/publikációs célokat (fokozatszerzésük 2016-ban és 2017-ben várható), és Trojnár Eszter munkája megalapozza felvételét a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájába. A 4 fiatal munkatárs több hazai és nemzetközi konferencián is bemutatta eredményeit, melyekre szintén az OTKA támogatás adott lehetőséget.

A kutatás megvalósításába a tervezetteknek megfelelően több hazai (Dr. Józsi Mihály Lendület Kutatócsoportja, Dr. Papp Krisztián, ELTE Immunológia Tanszék, Dr. Uray Katalin, ELTE Szerveskémia Tanszék, számos további hazai klinikai partner) és külföldi (Sakari Jokiranta, Helsinki, és Marie-Agnés Dragon-Durey, Párizs, Pilar Nozal Madrid, számos további külföldi klinikai partner) kollaborációs partner került bevonásra.

Részletes eredmények

1. célkitűzés: Az anti-HF autoantitestek keletkezésének és jellemzőinek vizsgálata.

Elsőként az anti-HF autoantitestek előfordulását és epitóp specificitását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy kb. a nemzetközi irodalomban leírt arányban fordul elő anti-HF autoantitest a vizsgálatunkba bevont aHUS betegek körében is (8/75, 11%), míg egészséges kontrollok körében nem észleltünk valós pozitív, magas titerű anti-HF autoantitestet. Ez az adat megfelel az időközben Hofer és munkatársai által közölt Németországi adatoknak is (Hofer J, 2012 Dec, CJASN), a szerzők 118 egészséges vizsgálata során nem találtak anti-HF autoantitesteket. Az anti-HF autoantitestek lineáris B-sejt epitópjait átlapoló szintetikus peptidsorozat segítségével térképeztük, melyről Trojnár Eszter előbb TDK, majd nemzetközi konferencián be is számolt (7, 18). Az anti-HF epitópanalízis eredményeit bemutató első cikk 2015-ben megjelent (15), a megfigyelés lényege az, hogy a HF fő autoantitest epitópja és a CFHR1 fehérje homológ régiója között strukturális különbség van, ami részben magyarázatot adhat a *CFHR1* deléció és az anti-HF antitestek kialakulása közötti szoros kapcsolatra. Az

anti-HF autoantitestek epitópanalízisét bemutató további kézirat 2016-ban szerkesztés alatt áll.

A patogén baktériumtörzsek és az anti-HF autoantitestek keletkezése közötti kapcsolatot két megközelítésben is vizsgáltuk. Trojnár Eszter 2015-ben mutatta be CFH és CFHR baktériumkötődéssel kapcsolatos eredményeit (19), valamint az anti-bakteriális antitestek meghatározása is megtörtént chip-re nyomtatott antigének nagyfelbontású analízisével (kollaboráció Dr. Papp Krisztiánnal). Tekintettel arra, hogy a chip-ekre több tucat kórokozó (és kontroll) antigénjei kerültek felnyomtatásra, és mind IgG és IgM izotípusú antitestek kötődése detektálásra került, az adatok kiértékelése 2016-ban folyamatban van, publikálásuk ezek után várható.

Az anti-HF autoantitestek kifejezetten erős kapcsolódást mutatnak a *CFHR1-3* gének deléciójával, így ezt a kópiaszám variációt is vizsgálat alá vontuk. Nagyszámú kontroll személy CFHR génklaszter kópiaszám analízise és a komplement profil értékelésével megállapítottuk, hogy a H-faktor-szerű fehérjék feltételezett de-regulátor funkciója nem igazolható az alternatív út aktivitás szabályozásának vonatkozásában, a CFHR1 és -R3 fehérjék delécióját hordozó személyek szérummintájában hasonló mértékű a H-faktor mediálta reguláció, mint a vad genotípusú személyek mintájában. Ezeket az eredményeket a Magyar Immunológiai Társaság vándorgyűlésén 2014 őszén bemutattuk (12). Ehhez a célkitűzéshez kapcsolódóan befejeződött a CFHR1-3 géndeléció hordozó egészséges kontrollokban és aHUS betegekben a pontos töréspont meghatározása, az adatok elemzése és publikálásra való előkészítése folyamatban van.

Az anti-HF pozitív aHUS betegek HLA analízise befejeződött, az adatokat átadtuk párizsi kollaborációs partnerünknek, azok értékelése (összegezve nemzetközi adatokkal és illesztett kontroll csoportok adataival) kollaborációs partnerünknel folyamatban van, lezárása és az adatok publikálása 2016-ban várható.

További funkcionális vizsgálatok is történtek (Dr. Józsi Mihály és több külföldi partner kollaborációjában) az anti-HF autoantitestek patológiás szerepének, jellemzőinek megértése céljából. Igazoltuk, hogy a pentraxin 3 molekula és a komplement regulátorok közötti kapcsolatot gátolhatják az anti-HF autoantitestek (2), hozzájárulva ezáltal a kontrollálatlan komplementaktiváció kialakulásához. Az anti-HF autoantitestek epitópspecifitásának, izotípus megoszlásának és aviditásának longitudinális vizsgálatával igazoltuk, hogy az autoantitestek heterogének a betegekben, azonban az adott betegre jellemzőek és időbeli stabilitást mutatnak (21). Az anti-HF autoantitestek molekuláris és klinikai jellegzetességeiről egy összefoglaló közleményben is beszámoltunk (8).

2. célkitűzés: Az anti-ADAMTS13 autoantitestek keletkezésének és jellemzőinek vizsgálata.

Befejeződött az ADAMTS13 ellenes gátló antitestek epitóp térképezése (az újra gondolt terveknek megfelelően fág-display technika helyett átfedő szintetikus peptid sorozatok alkalmazásával), valamint az érintett TTP-s betegek HLA analízise. Az eredményeket Dr. Sinkovits György PhD hallgató két konferencián mutatta be (13, 24), 2015 során az adatok összegzése, elemzése és közlésre való előkészítése történt meg. A 15 TTP-s beteg és 10 kontroll vizsgálatával nyert eredményeink szerint az ADAMTS13 fehérje 558Arg-Thr572 és az 1163Gln-Arg1177 szakaszaihoz fokozott mértékben kötődtek a betegek antitestei. Kimutattuk továbbá a teljes kohorsz (70 TTP beteg és 204 egészséges kontroll) vizsgálatával, hogy a HLA DR11 és DR15 allélek hordozása rizikó-, míg a HLA DR4 és DR7 allélek hordozása protektív hatású az ADAMTS13 inhibitor kialakulásának szempontjából. Az EBV fertőzést jelző antitestek (anti-EBNA1, anti-VCA) előfordulásával és mennyiségével kapcsolatos mérések szintén lezárultak, az összegző elemzés és az adatok publikálása (figyelembe véve a genetikai predispozíciót is) 2016-ban folyamatban van.

3. célkitűzés: Új patogenetikai tényezők felismerése TMA-ban

Az új autoimmun mechanizmusok feltárása megkezdődött a thrombomodulin és a CD36 molekulák vizsgálatával, azonban saját és közben ismertté vált külföldi tapasztalatok miatt (lehetetlen volt beszerezni kellő tisztaságú és mennyiségű rekombináns autoantigént, a szennyezett fehérjék erős fals pozitív reakciót adtak) ezt a célkitűzést átgondoltuk, és energiánkat olyan új mechanizmusok, biomarkerek és potenciális diagnosztikai markerek feltárására csoportosítottuk át, amelyek szintén ezt a célkitűzést szolgálva hozzájárulhatnak a TMA-k patogenezisének jobb megértéséhez. Így sikerült igazolnunk, hogy a komplementaktiváció jellemző az ADAMTS13 deficiens TTP-s betegek az akut szakban és remisszióban is (ha tartós az anti-ADAMTS13 inhibitorok jelenléte) (4), a neutrofilek aktiválódását jelző plazma neutrofil-elasztáz-proteináz inhibitor komplex magas szintje jellemzője az akut TTP-nek (9), és hogy a TTP-ben fő patogenetikai szerepet játszó endothelsejtek sérülését a CT-pro-endothelin 1 marker megbízhatóan jelzi (20). A TTP patogenezisében eredményeink szerint lényeges szerepet játszanak a predisponáló ADAMTS13 deficiencia mellett a veleszületett immunitás (komplementrendszer, neutrofilek) és az endothel károsodás elemei, ezeket egy összefoglaló előadásban mutattuk be (5). Számos diagnosztikai markert is leírtunk és bemutattuk hasznosságukat a TMA-k különféle formáiban: igazoltuk, hogy az alternatív út markereinek vizsgálata kifejezetten jó diagnosztikai értékkel bír az aHUS és a TTP elkülönítésében (3), és egy neuraminidáz aktivitás méréshez való fluorogénikus szubsztrát alkalmazásával mérést dolgoztunk ki a pneumococcus-HUS differenciáldiagnózisához (14). A pneumococcus-HUS betegek mintáinak elemzésével azt is igazoltuk, hogy a komplement dysfunctio is lényeges szerepet játszhat betegségük kialakulásában, így diagnosztikai és prognosztikai céllal indokolt részletes komplement vizsgálatokat végezni az érintettekben (6). A jól megválasztott diagnosztikai markerek alkalmazásának fontosságát támasztják alá a különös nehézséget jelentő újszülött- és csecsemőkorú aHUS betegek ellátása során tett megfigyeléseink is (10). Az aHUS diagnosztikájának korszerű módszereiről, melyek kidolgozásához a pályázat nagymértékben járult hozzá, a Magyar Nefrológiai Társaság Nagygyűlésén felkért előadásban számoltunk be (11).

Az új genetikai variációk felismerése és funkcionális jellemzése aHUS-ban fontos része volt a 3. célkitűzésünknek. Ehhez beszereztünk egy real-time PCR készüléket, sikeresen beállítottuk az olvadáspont analízis módszert ritka variációk szűrésére (H-faktor és XIII-as faktor vonatkozásában), majd alkalmaztuk is a módszert mintegy 75 beteg szűrővizsgálatára. Elsőként ismertük fel, hogy a komplement regulátoros doméneket tartalmazó XIII-as véralvadási faktor B alegységében funkcióvesztő mutáció fordulhat elő aHUS-ban (egy család), ezen a megfigyelésen felbátorodva komplex (XIII-as faktor aktivitás, A2B2 komplex és szabad B alegység antigén mérés) vizsgálatokat kezdtünk a Debreceni Egyetem munkatársaival a kérdés pontos jellemzésére. Kezdeti eredményeinkről Janszky Noémi TDK hallgató számolt be a Semmelweis Egyetem TDK konferencián (17), majd a 2015. évi OTDK-án első díjjal jutalmazták a munkát. A mérések folytatása 2015-ben lezajlott, az újabb eredmények a 2016-os TDK konferencián kerülnek bemutatásra, majd megkezdjük a publikáció összeállítását.

Számos új funkcióvesztéses és funkciónyereses genetikai variációt írtunk le komplement regulátorokban és komponensekben aHUS-ban, ezek összegző leírása, funkcionális jellemzése és értékelése 2014-15 során megtörtént a pályázat támogatásával (1, 16, 23). Beállítottunk és alkalmaztunk egy H-faktor hemolitikus módszert a H-faktor sérült regulátoros funkciójának jellemzésére, valamint egy Y402 és H402 H-faktor allélikus variánsokra specifikus ELISA mérési párt, amivel az egyes kromoszómákról termelődő H-faktor fehérjék mennyisége összehasonlítható módon vizsgálható egy adott betegben. Ezekkel

az eljárásokkal az újonnan felismert H-faktor mutációkat hordozó betegek többségében lehetővé vált a mutációk és a H3 rizikó haplotípus funkcionális hatásának jellemzése. Ezek az ismeretek nagymértékben járulnak hozzá a H-faktor működésének és az aHUS patogenezisének jobb megértéséhez.

Összességében megállapítható, hogy az OTKA támogatásával számos fiatal kolléga képzése és sikeres fokozatszerzése valósult meg, valamint olyan kutatási eredmények születtek, amelyek a trombotikus mikroangiopátiák patogenezisének jobb megértését, az egyes formák diagnosztikáját elősegítő eljárások kifejlesztését, vizsgálatát és elemzését, valamint újabb kérdések megfogalmazását tették lehetővé. Az OTKA támogatását és az anonim bírálók munkáját köszönjük!

A pályázat támogatásával megjelent publikációk:

Sorszám	Közleményjegyzék	Dokumentum típusa	Impakt faktor	NKFI támogatás feltüntetve?	Támogató szervezetek
1.	Kiss Nóra, Szilágyi Ágnes, Varga Lilian, Christina Mitterbauer, Prohászka Zoltán: Funkcionyeréses mutációk vizsgálata atípusos haemolyticus uraemiás szindrómás betegekben , Magyar Nephrológiai Társaság XXIX. Nagygyűlése, Siófok, 2012. október 4-6, 2012	absztrakt	-	igen	
2.	Kopp A, Strobel S, Tortajada A, Rodríguez de Córdoba S, Sánchez-Corral P, Prohászka Z, López-Trascasa M, Józsi M.: Atypical hemolytic uremic syndrome-associated variants and autoantibodies impair binding of factor h and factor h-related protein 1 to pentraxin 3. , J Immunol. 2012 Aug 15;189(4):1858-67. doi: 10.4049/jimmunol.1200357. Epub 2012 Jul 11., 2012	folyóiratcikk	5.520	igen	
3.	Prohászka Z, Varga L, Füst G.: The use of 'real-time' complement analysis to differentiate atypical haemolytic uremic syndrome from other forms of thrombotic microangiopathies. , Br J Haematol. 2012 Aug;158(3):424-5., 2012	folyóiratcikk	4.941	igen	
4.	Réti M, Farkas P, Csuka D, Rázsó K, Schlamadinger Á, Udvardy ML, Madách K, Domján G, Bereczki C, Reusz GS, Szabó AJ, Prohászka Z.: Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. , J Thromb Haemost. 2012 May;10(5):791-8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x., 2012	folyóiratcikk	6.081	igen	
5.	Prohászka Zoltán: The role of innate immune mechanisms in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies , Immunológiai Szemle; V. (3) p11, 2013, 2013	absztrakt	-	igen	
6.	Szilágyi A, Kiss N, Bereczki C, Tólosi G, Rácz K, Túri S, Györke Z, Simon E, Horváth E, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Tulassay T, Prohászka Z.: The role of complement in Streptococcus pneumoniae-associated haemolytic uraemic syndrome. , Nephrol Dial Transplant (2013) 28: 2237–2245, 2013	folyóiratcikk	3.371	igen	
7.	Trojnár Eszter (oh): A komplement H faktor elleni autoantitestek B-sejt epitóp analízise gyermekkori autoimmun hemolitikus urémiás szindrómában , Orvosképzés, 2013; LXXXVIII: (1), p128, 2013	absztrakt	-	igen	
8.	Mihály Józsi a*, Stefanie Reuterb, Pilar Nozalc, Margarita López-Trascasac,d, Pilar Sánchez-Corralde, Zoltán Prohászkae, Barbara Uzonyig: Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome ,	folyóiratcikk	2.367	igen	

	Immunology Letters 160 (2014) 163–171, 2014				
9.	Mikes B1, Sinkovits G1, Farkas P1, Csuka D1, Schlammadinger A2, Rázsó K2, Demeter J3, Domján G3, Réti M4, Prohászka Z5.: Elevated plasma neutrophil elastase concentration is associated with disease activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. , Thromb Res. 2014 Apr;133(4):616-21. doi: 10.1016/j.thromres.2014.01.034. Epub 2014 Feb 1., 2014	folyóiratcikk	2.427	igen	
10.	Nóra Szarvas, Ágnes Szilágyi, Velibor Tasic, Valbona Nushi-Stavileci, Aspazija Sofijanova, Zoran Gucev, Miklós Szabó, Attila Szabó, Lilla Szeifert, György Reusz, Krisztina Rusa, Klaus Arbeiter, Thomas Müllle, Zoltán Prohászka: First-line therapy in atypical hemolytic uremic syndrome: consideration on infants with a poor prognosis , Ital J Pediatr. 2014 Dec 11;40(1):101. [Epub ahead of print], 2014	folyóiratcikk	1.236	igen	
11.	Prohászka Zoltán: A hemolitikus urémiás szindróma klasszifikációja és laboratóriumi diagnosztikája , Magyar Nefrológiai Társaság Nagygyűlése, Eger, 2014	absztrakt	-	igen	
12.	Prohászka Zoltán, Varga Lilian, Szilágyi Ágnes: Complement factor-H-related (CFHR) proteins 1 and 3 and the regulation of the alternative pathway activation , A Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlése, 2014	absztrakt	-	igen	
13.	Sinkovits György, Uray Katalin, Réti Marienn, Tordai Attila, Szilágyi Ágnes, Prohászka Zoltán: Investigation of HLA association and epitope specificity of anti-ADAMTS13 antibodies / Anti-ADAMTS13 antitestek HLA-kapcsoltságának és epitópspecifitásának vizsgálata (, A Magyar Immunológiai Társaság 43. Vándorgyűlése, 2014	absztrakt	-	igen	
14.	Ágnes Szilágyi, Zsuzsa Györke, Csaba Bereczki, Kata Kelen, Péter Tóth-Hejn, Tivadar Tulassay, György S Reusz, Attila J Szabó, Zoltán Prohászka: The use of a rapid fluorogenic neuraminidase assay to differentiate acute Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome (HUS) from other forms of HUS , CLIN CHEM LAB MED 53: (4) e117-e119, 2015	folyóiratcikk	2.707	igen	
15.	Bhattacharjee A, Reuter S, Trojnar E, Kolodziejczyk R, Seeberger H, Hyvarinen S, Uzonyi B, Szilagyí A, Prohaszka Z, Goldman A, Józsi M, Jokiranta TS: The Major Autoantibody Epitope on Factor H in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Is Structurally Different from Its Homologous Site in Factor H-related Protein 1, Supporting a Novel Model for Induction of Autoimmunity in This Disease. , J BIOL CHEM 290: (15) 9500-9510, 2015	folyóiratcikk	4.573	igen	
16.	Frida C Mohlin, Sara C. Nilsson, Tanja Kersnik Levart, Ema Golubovic, Krisztina Rusai, Thomas Müller-Sacherer, Klaus Arbeiter, Éva Pállinger, Nóra Szarvas, Dorottya Csuka, Ágnes Szilágyi, Bruno O. Villoutreix, Zoltán Prohászka, Anna M. Blom: Functional characterization of two novel non-synonymous alterations in CD46 and a Q950H change in factor H found in atypical hemolytic uremic syndrome patients. , MOL IMMUNOL 65: (2) 367-376, 2015	folyóiratcikk	2.973	igen	
17.	Janszky Noémi: A XIII-as faktor szerepének vizsgálata atipusos hemolitikus urémiás szindrómában olvadáspon analízissel, szekvenálással és aktivitás méréssel , Orvosképzés 2015, 1: 145, 2015	absztrakt	-	igen	
18.	Trojnar Eszter: Patogén baktériumtörzsek H faktor és CFHR1 kötésének összehasonlító vizsgálata autoimmun hemolitikus urémiás szindróma tükrében , Korányi Frigyes Tudományos Fórum Absztraktfüzet, 2015	absztrakt	-	nem	

19.	Trojnár Eszter, Uray Katalin, Sakari Jokiranta, Prohászka Zoltán: B cell epitope analysis of factor H autoantibodies in autoimmune haemolytic uremic syndrome , Mol Immunol., 67: (1) 189, 2015, 2015	absztrakt	-	igen	
20.	Mikes B, Sinkovits G, Farkas P, Csuka D, Razso K, Reti M, Radványi G, Demeter J, Prohászka Z: Carboxiterminal pro-endothelin-1 as an endothelial cell biomarker in thrombotic thrombocytopenic purpura. , THROMB HAEMOSTASIS 115: (5), 2016	folyóiratcikk	4.984	igen	
21.	Nozal P, Bernabeu-Herrero ME, Uzonyi B, Szilágyi A, Hyvarinen S, Prohászka Z, Jokiranta TS, Sanchez-Corral P, Lopez-Trascasa M, Jozsi M: Heterogeneity but individual constancy of epitopes, isotypes and avidity of factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome. , MOL IMMUNOL 70: 47-55, 2016	folyóiratcikk	2.973	igen	
22.	Szarvas Nóra: A komplement alternatív út regulációjának szerepe hemolitikus urémiás szindrómában , PhD Doktori értekezés, 2016	disszertáció	-	nem	
23.	Szarvas Nóra, Szilágyi Ágnes, Csuka Dorottya, Takács Beáta, Rusai Krisztina, Müller Thomas, Arbeiter Klaus, Réti Marienn, Haris Ágnes, Wagner László, Török Szilárd, Kelen Kata, Szabó Attila J, Reusz György S, Morgan B Paul, Prohászka Zoltán: Genetic analysis and functional characterization of novel mutations in a series of patients with atypical hemolytic uremic syndrome , MOL IMMUNOL 71: 10-22, 2016	folyóiratcikk	2.973	igen	
24.	Sinkovits György, Uray Katalin, Réti Marienn, Prohászka Zoltán: Antitestek kötődésének vizsgálata az ADAMTS13 enzim lineáris epitópjaihoz TTP-s betegekben. A Magyar Thrombosis és Haemostasis Társaság XII. Kongresszusa, 2014	absztrakt	-	igen	