

A szerzett trombotikus trombocitopéniás purpura
patogenezisében szerepet játszó
genetikai és immunológiai tényezők vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Sinkovits György

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Prohászka Zoltán, az MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Kálmánné Dr. Istenes Ildikó, PhD, egyetemi tanársegéd

Dr. Sándor Noémi, PhD, tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Arató András, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kádár János, az orvostudomány kandidátusa, főorvos

Dr. Müller Judit, PhD, egyetemi docens

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----|
| Rövidítések jegyzéke..... | 5 |
| 1. Bevezetés..... | 6 |
| 1.1. A trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) szerzett formájának bemutatása 6 | |
| 1.1.1. Történeti áttekintés – a Moschcowitz-szindrómától az ADAMTS13-deficienciáig | 6 |
| 1.1.2. A TTP etiológiája és formái | 8 |
| 1.1.3. A szerzett TTP előfordulása..... | 8 |
| 1.1.4. A szerzett TTP patogenezise | 8 |
| 1.1.5. A szerzett TTP-s epizód klinikai megjelenése | 9 |
| 1.1.6. A szerzett TTP kórlefolyása..... | 10 |
| 1.1.7. A szerzett TTP diagnózisának felállítása | 10 |
| 1.1.8. A szerzett TTP kezelése | 13 |
| 1.2. Az ADAMTS13-enzim funkciója és a TTP patogenezisében játszott szerepe.... | 15 |
| 1.2.1. Az ADAMTS13 enzim szerkezete és szintézise | 15 |
| 1.2.2. A VWF funkciója, szerkezete és szintézise | 16 |
| 1.2.3. Az ADAMTS13 és a VWF kapcsolódása – a cipzár modell | 18 |
| 1.3. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz szerzett TTP-ben..... | 21 |
| 1.3.1. Az ADAMTS13 elleni autoantitestek jellemzői | 21 |
| 1.3.2. Az egyes IgG alosztályok szerkezeti és funkcionális tulajdonságai, és ennek jelentősége a szerzett TTP patogenezise szempontjából..... | 23 |
| 1.3.3. Genetikai és környezeti tényezők szerepe a toleranciavesztésben és az autoantitestek keletkezésében | 25 |
| 1.3.4. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz kialakulásának lehetséges mechanizmusai..... | 29 |
| 2. Célkitűzések | 34 |

| | |
|---|----|
| 2.1. A szerzett TTP kialakulásának kockázatát befolyásoló genetikai tényezők vizsgálata | 34 |
| 2.2. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz jellemzőinek vizsgálata..... | 35 |
| 3. Módszerek | 36 |
| 3.1. Beteg- és mintabeválasztási kritériumok | 36 |
| 3.1.1. A TTP diagnosztikai kritériumai és a TTP-HUS regiszter | 36 |
| 3.1.2. A HLA-DR-DQ haplotípusok és a PTPN22 c.1858C>T polimorfizmus vizsgálatába bevont betegek és kontrollszemélyek..... | 37 |
| 3.1.3. Az ADAMTS13-ellenes autoantitestek alosztályeloszlásának és gátló hatásának vizsgálatába bevont betegek és minták..... | 38 |
| 3.2. Alkalmazott módszerek | 39 |
| 3.2.1. Az ADAMTS13-enzimaktivitás mérése | 39 |
| 3.2.2. Az ADAMTS13-inhibitorok kimutatása funkcionális vizsgálattal..... | 41 |
| 3.2.3. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek kimutatása ELISA módszerrel... | 41 |
| 3.2.4. DNS-izolálás | 41 |
| 3.2.5. HLA-tipizálás és a HLA-DR-DQ haplotípusok predikciója..... | 41 |
| 3.2.6. A PTPN22 gén c.1858C>T polimorfizmusának vizsgálata | 42 |
| 3.2.7. Az IgG izotípusú ADAMTS13-ellenes autoantitestek alosztályeloszlásának meghatározása | 43 |
| 3.2.8. Az ADAMTS13 elleni autoantitestek fajlagos gátló hatásának meghatározása | 48 |
| 3.3. Statisztikai analízis | 49 |
| 4. Eredmények..... | 50 |
| 4.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok és a PTPN22 c.1858C>T polimorfizmus gyakoriságának, valamint ezek összefüggéseinek vizsgálata szerzett TTP-s betegekben | 50 |
| 4.1.1. A betegcsoport és a kontrollcsoportok leírása..... | 50 |

| | |
|--|----|
| 4.1.2. A DRB1 allélokot és DRB1-DQB1 haplotípusokat hordozók aránya | 51 |
| 4.1.3. A DRB1-DQB1 haplotípusok aránya nőkben és férfiakban | 53 |
| 4.1.4. A PTPN22 c.1858C>T polimorfizmus gyakorisága | 55 |
| 4.1.5. A szerzett TTP-s betegek és egészséges kontrollok aránya a PTPN22 c.1858C>T polimorfizmus és a DRB1-DQB1 haplotípus hordozása alapján képzett csoportokban | 56 |
| 4.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjának, alosztályeloszlásának, gátló hatásának, valamint ezek változásainak és összefüggéseinek vizsgálata | 59 |
| 4.2.1. A betegcsoport leírása | 59 |
| 4.2.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása az összes mintában..... | 59 |
| 4.2.3. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása a TTP különböző stádiumaiban | 60 |
| 4.2.4. Az ADAMTS13-gátlás és összefüggése az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek szintjével és alosztályeloszlásával | 66 |
| 4.2.5. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek fajlagos gátló hatása, és annak összefüggése az alosztályeloszlással és a betegségstádiumokkal | 67 |
| 4.2.6. A rizikófokozó vagy rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusok hordozásának összefüggései az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjával és alosztályeloszlásával..... | 69 |
| 5. Megbeszélés | 73 |
| 5.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok és a <i>PTPN22</i> c.1858C>T polimorfizmus gyakoriságának, valamint ezek összefüggéseinek vizsgálata szerzett TTP-s betegekben | 73 |
| 5.1.1. Az HLA-DR-DQ haplotípusok gyakorisága, feltételezett rizikófokozó és rizikócsökkentő hatása | 73 |
| 5.1.2. A női nem szerepe, a HLA-DR-DQ haplotípusok gyakorisága nőkben és férfiakban | 78 |

| | |
|--|-----|
| 5.1.3. A PTPN22 c.1858C>T polimorfizmus gyakorisága és rizikót befolyásoló hatása..... | 79 |
| 5.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjának, alosztályeloszlásának, gátló hatásának, valamint ezek változásainak és összefüggéseinek vizsgálata | 79 |
| 5.2.1. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása szerzett TTP-ben..... | 79 |
| 5.2.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek alosztályeloszlásának változása a szerzett TTP folyamán | 81 |
| 5.2.3. Az ADAMTS13 elleni IgG4 mennyiségének összefüggése a gátló hatással | 82 |
| 5.2.4. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek alacsonyabb koncentrációja relapszusban | 84 |
| 5.2.5. A HLA-DR-DQ haplotípusok kapcsolata az ADAMTS13 elleni autoantitestek szintjével | 85 |
| 5.3. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz lehetséges modellje..... | 86 |
| 6. Következtetések..... | 89 |
| 6.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok, a PTPN22 c.1858C>T polimorfizmus, valamint ezek összefüggéseinek hatása a szerzett TTP kialakulásának kockázatra | 89 |
| 6.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja, alosztályeloszlása, gátló hatása, valamint ezek változásai és összefüggései szerzett TTP-ben | 89 |
| 7. Összefoglalás..... | 91 |
| 8. Summary..... | 92 |
| 9. Irodalomjegyzék..... | 93 |
| 10. Saját publikációk jegyzéke | 118 |
| 10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk..... | 118 |
| 10.2. A disszertációtól független publikációk | 118 |
| 11. Köszönetnyilvánítás | 121 |

Rövidítések jegyzéke

| | |
|----------|--|
| ADAMTS13 | a <u>d</u> isintegrin and <u>m</u> etalloprotease with <u>t</u> hrombos <u>p</u> ondin type 1 motifs, member <u>13</u> |
| APLS | antifoszfolipid-szindróma |
| CI | konfidenciaintervallum |
| DIC | disszeminált intravaszkuláris koaguláció |
| ELISA | enzim-kapcsolt immunesszé (enzyme-linked immunoassay) |
| ER | endoplazmatikus retikulum |
| FFP | friss fagyasztott plazma |
| FRET | fluoreszcencia-rezonancia-energiatranszfer |
| GP | glikoprotein |
| HLA | humán leukocita-antigén |
| HRP | torma-peroxidáz (horse radish peroxidase) |
| HUS | hemolitikus urémiás szindróma |
| IgG/A/M | immunglobulin G/A/M |
| MAHA | mikroangiopátiás hemolitikus anémia |
| MHC | fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex) |
| OD | optikai denzitás, abszorbancia |
| OR | esélyhányados (odds ratio) |
| PAMP | patogén-asszociált molekuláris mintázat |
| PTPN22 | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 |
| SLE | szisztémás lupus erythematosus |
| TIA | transziens ischaemiás attack (transient ischemic attack) |
| TLR | toll-like receptor |
| TMA | trombotikus mikroangiopátia |
| TMB | tetrametilbenzidin |
| TTP | trombotikus trombocitopéniás purpura |
| ULVWF | ultra-large von Willebrand-faktor |
| VWF | von Willebrand-faktor |

1. BEVEZETÉS

1.1. A trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) szerzett formájának bemutatása

1.1.1. Történeti áttekintés – a Moschcowitz-szindrómától az ADAMTS13-deficienciáig

A ma trombotikus trombocitopéniás purpuraként ismert betegség első leírása Eli Moschcowitz nevéhez fűződik, aki 1924-ben egy 16 éves lány esete kapcsán számolt be az addig ismeretlen kórképről [1]. A fiatal beteg kezdetben sápadtságot és felső végtagi gyengeséget észlelt, majd magas lázzal került kórházba, ahol fizikális vizsgálattal petechiák jelenléte, laboratóriumi vizsgálatokkal pedig emelkedett fehérvérsejtszám, súlyos anémia és hematuria igazolódott, a trombocitaszámot nem vizsgálták. A beteg állapota folyamatosan romlott, hemiparézis, tüdőödéma, majd kóma alakult ki, végül a beteg a tünetek jelentkezésétől számított tizennegyedik napon meghalt. Kórszövettani vizsgálat során testszerte hialintrombusokat találtak a kapillárisokban és terminális arteriolákban. Ez volt az első trombotikus mikroangiopátia patológiai képével járó tünetegyüttes, amelyet kezdetben első leírója után Moschcowitz-szindrómának neveztek, a trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) elnevezést 1947-ben javasolták a tünetegyüttes megjelölésére [2]. Több mint kétszáz TTP-s eset elemzése alapján Amorosi és Ultmann [3] 1966-ban a szindróma öt fő jellemzőjét gyűjtötte össze: (1) intravazális hemolitikus anémia fragmentocitákkal, (2) súlyos trombocitopénia, (3) (többnyire hullámzó) neurológiai tünetek, (4) vesekárosodás, (5) láz. Ez az ún. pentád, amelyet évekig a betegség diagnosztikus kritériumainak tekintettek. A diagnosztika szempontjából fontos tényező a hemolitikus urémiás szindróma (HUS) leírása 1955-ben [4], mivel a két trombotikus mikroangiopátiával járó szindróma klinikai megjelenése esetenként hasonló lehet. Bár a HUS többnyire gyermekeket érint, típusos esetben hasmenést követően jelentkezik és veseelégtelenséggel jár, a TTP pedig gyakrabban érint fiatal felnőtteket és többnyire neurológiai tünetekkel társul, a két kórkép elkülönítése pusztán a klinikai tünetek és a korabeli diagnosztikus módszerek eredményei alapján nem mindig volt lehetséges. Tovább bonyolítja a képet, hogy további, változatos okokra (rosszindulatú daganatok, súlyos fertőzések, transzplantáció, bizonyos gyógyszerek, stb.) visszavezethető trombotikus mikroangiopátiákat is a HUS,

illetve a TTP diagnózisával próbáltak jelölni, nem mindig következetesen [5]. Ez különösen annak fényében okozott gondot, hogy a két kórkép prognózisa eltérő volt: amíg a (típusos) HUS jó prognózisú betegség, amely szupportív terápia mellett többnyire spontán meggyógyul, addig a TTP érdemi kezelés hiányában többnyire halálos kimenetelű volt [3]. Mivel a betegség patogenezise ismeretlen volt, kimenetele pedig súlyos, többféle terápiával próbálkoztak gyógyításában; az esetenként sikerrel alkalmazott empirikus kezelések között szerepelt a splenectomia, glükokortikoidok, illetve trombocita-aggregációt gátló készítmények alkalmazása, valamint teljes vércsere végzése [6]. 1977-ben felismerték [6], hogy a vércsere során a vérben található káros anyag eltávolítása mellett egy hiányzó faktor vérplazmával történő pótlása is szükséges. Egy évvel később Upshaw arra a következtetésre jutott [7], hogy a gyakran visszatérő, de egyszerű plazmainfúzióra gyorsan reagáló trombotikus mikroangiopátiában szenvedő betegből, valamint a Schulman által korábban ismertetett [8] betegből veleszületetten hiányzik egy vérplazmával pótolható faktor, amely meggátolja a hemolízist és trombocitopéniát. A fenti felismeréseket követően a TTP-t friss fagyasztott plazma (FFP) infúziójával vagy FFP szubsztitúciójával végzett plazmaferezissel kezelték, ami a betegség mortalitását jelentősen, a korábbi 90% feletti értékről [3] 20-40% közöttire csökkentette [9]. Egy nagyobb beteganyagon végzett, 1991-ben publikált vizsgálat igazolta az utóbbi kezelés nagyobb hatékonyságát [10]. A hatékony terápia megjelenése a kórkép minél korábbi diagnózisát tette szükségessé, ennek megfelelően alakultak ki a kevésbé szigorú, jelenleg alkalmazott diagnosztikus kritériumok. A TTP korai és hatékony kezelése mellett a korábban jellegzetesnek tartott pentád együttes fennállása többé nem volt jellemző [10]. A betegség patogenezisének megértésében fontos lépés volt Moake felismerése [11], miszerint krónikus relabáló betegek vérében a von Willebrand-faktornak (VWF) egy szokatlanul nagy formája (ultra-large von Willebrand factor, ULVWF) mutatható ki. Eredményéből arra következtetett, hogy az ezen betegek véréből hiányzó ismeretlen tényező egy enzim, amely az ULVWF hasításáért felelős. A VWF-t specifikusan hasítani képes proteázt végül Furlan [12] és Tsai [13] izolálta 1996-ban. 1997-ben Furlan igazolta a proteáz hiányát négy ULVWF-t hordozó betegben [14], 1998-ban pedig mindkét munkacsoport kimutatta a proteáz elleni gátló antitestek jelenlétét egyes szerzett TTP-s betegekben [15, 16]. A VWF-hasító proteáz tisztítása és N-terminális szekvenálása alapján Zheng [17] és Fujikawa [18] 2001-ben azonosította a

fehérjét kódoló *ADAMTS13* gént a 9-es kromoszóma hosszú karján (9q34), ugyanezen évben Levy [19] négy veleszületett TTP-s betegen és családjukon végzett genetikai kapcsoltsági vizsgálat segítségével jutott hasonló eredményre. Ezen eredmények hatására a TTP elnevezés egy változó tünetek által jellemzett klinikai szindróma helyett ma már egy ismert etiológiájú, meghatározott kórképet jelöl, ez utóbbi bemutatása képezi a fejezet témáját.

1.1.2. A TTP etiológiája és formái

A TTP hátterében az ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs, member 13) enzim súlyosan deficiens aktivitása áll [17-19].

Az ADAMTS13-deficiencia kialakulásának mechanizmusa alapján a betegségnek két formáját különítjük el.

1. A TTP **szerezett** formájában a deficienciát az ADAMTS13 enzim ellen termelődő, többnyire gátló hatású autoantitestek [15, 16] okozzák.
2. A TTP **örökletes** formájában (amelyet veleszületett TTP-nek vagy Upshaw-Schulman-szindrómának is neveznek) a deficienciáért az enzimet kódoló *ADAMTS13* gén mindkét allélját érintő mutációk felelősek [19].

1.1.3. A szerzett TTP előfordulása

Bár a szerzett TTP teszi ki a TTP-s esetek 95%-át [20], egy ritka betegségről van szó, incidenciája 3-6 fő/millió lakos évente [21, 22]. Elsősorban felnőtteket érint, a betegek háromnegyede nő [21, 22].

1.1.4. A szerzett TTP patogenezise

Az ADAMTS13 enzim egyetlen ismert funkciója a von Willebrand-faktor (VWF) ultranagy multimer formájának (ULVWF) elhasítása kisebb oligomerekre [12, 13]. ADAMTS13-deficiencia esetén az endotélsejtekből felszabaduló ULVWF hasítása zavart szenved. Ha az ADAMTS13-deficiencia mellett az ULVWF szekréciója fokozódik (többek között fertőzés, terhesség, stb. esetén), nagyobb mennyiségű hasítatlan ULVWF maradhat az endotélsejtek felszínén, illetve a keringésben [11]. Az ULVWF már alacsony nyíróerők mellett is képes a vérlemezkék megkötésére és

aktiválására [23], így e molekulák tartós jelenléte a vérlemezkék kitapadásához és trombocita-trombusok kialakulásához vezethet [24]. A kiserekben (arteriolákban és kapillárisokban) kialakuló trombocita-trombusok a kiserek elzáródását, és így trombotikus mikroangiopátia (TMA) kialakulását okozhatják [24].

A TMA klinikai megnyilvánulásai az alábbiak [25]:

1. a kisértrombózis által érintett szervek ischaemiája és következményes funkciózavara, illetve károsodása,
2. a vérlemezkéknek a trombocita-trombusokban történő szekvesztrációja következtében kialakuló trombocitopénia,
3. a mikroangiopátia által érintett sérült, beszűkült érszakaszokon áthaladó vörösvértestek fizikai károsodása, amely sérült vörösvértestek – ún. fragmentociták – képződéséhez és Coombs-negatív intravazális hemolitikus anémia kialakulásához vezet – ez utóbbit összefoglaló néven mikroangiopátiás hemolitikus anémiának (MAHA) nevezik.

1.1.5. A szerzett TTP-s epizód klinikai megjelenése

A fentieknek megfelelően a TTP klinikailag trombocitopénia és MAHA képében jelentkezik, szervi manifesztációkkal, vagy azok nélkül.

A TTP esetén a TMA bármely szervet érintheti, leggyakrabban az agy, a szív, a vese és a hasnyálmirigy érintett, míg a tüdő és a máj viszonylag ritkán károsodik [26]. Ennek megfelelően:

- Neurológiai tünetek az esetek jelentős részében (akár 80%-ában [27]) felléphetnek. A tünetek súlyossága az egészen enyhétől (zavartság, fejfájás) a rendkívül súlyosig (görcsök, kóma) terjedhet, leggyakoribbak a fokális elváltozásokra (TIA, stroke) utaló tünetek (parézis, afázia, látászavar) [27-33].
- A gasztrointesztinális tünetek (hasi fájdalom, hányinger, hányás, hasmenés) szintén gyakoriak (közel 70% [33]) [27-30]. Az (esetenként véres) hasmenés esetén differenciáldiagnosztikai (típusos HUS-tól való elkülönítés) szempontból különösen fontos a hasmenés és a további tünetek időbeliségének tisztázása.
- Vesekárosodásra utaló tünetek (oliguria, hypertonia), illetve laboratóriumi eltérések (proteinuria, mikrohematuria, emelkedett kreatininszint) gyakoriak

(közel 50% [27]), de általában enyhék, az anuriával járó, vesepótló kezelést igénylő súlyos veseelégtelenség TTP-ben ritkán (5% alatt [27]) fordul elő [27-30, 34].

- Kardiális manifesztációk (angina pectoris, miokardiális infarktus, aritmiák, szívelégtelenség) is előfordulhatnak [35, 36], a szív érintettségének mértéke fontos prognosztikai faktor [28, 37].

A változatos szervi manifesztációk időbeli megjelenése is változékony, a neurológiai tünetek gyakran hullámzóak [27, 30, 38, 39]. A jelenség hátterében az egyes szervek kiseréinek változó mértékű, gyakran ideiglenes elzáródása áll [39].

1.1.6. A szerzett TTP kórlefolyása

A TTP szerzett és veleszületett formája egyaránt epizodikus, shubokban zajló betegség.

A TTP-s epizód kialakulásának az ADAMTS13-deficiencia szükséges, de nem elégséges feltétele. Az epizódok jelentkezéséhez a deficiencián felül általában további kiváltó faktorok (infekció, terhesség, gyógyszeresedés, stb.) szükségesek [40], amelyek feltehetően az endotélsejtek ULVWF-szekréciónak fokozásán keresztül vezetnek a TMA kialakulásához [41].

Az epizód sikeres kezelését követően, a kiváltó faktorok megszűnte után a betegek – akár deficiens ADAMTS13-aktivitás mellett is – tartósan remisszióban maradhatnak [40, 42, 43].

Remisszióról (vagy komplett remisszióról) a plazmaferezis elhagyását követően legalább 30 napig normális trombocitaszám esetén beszélhetünk. A remisszió elérését követően kialakult újabb TTP-s epizódot relapsusznak, a remisszió elérését megelőzően kialakuló újabb trombocitopéniát pedig exacerbációnak nevezzük [43, 44].

1.1.7. A szerzett TTP diagnózisának felállítása

Mivel a TTP klinikai megjelenése változatos és a tünetek egyike sem specifikus a kórképre, ezért a diagnózis felállításához laboratóriumi tesztek elvégzésére van szükség [39].

A szerzett TTP diagnózisának igazolására szolgáló tesztek – mint az ADAMTS13 aktivitás, illetve az ADAMTS13 elleni inhibitorok és antitestek meghatározása – egyelőre csak nagyobb hematológiai centrumokhoz tartozó vagy a TMA-k diagnosztikájára szakosodott laboratóriumokban érhetők el.

Mivel a TTP súlyos, életet veszélyeztető kórkép, amely esetében az időben megkezdett, megfelelő terápia életmentő lehet, így amennyiben a vizsgálati eredmények megérkezése megfelelően rövid időn belül nem várható, a terápiát a diagnózist igazoló eredmények hiányában (de a mintavétel után!), a TTP feltételezett, klinikai diagnózisa alapján meg kell kezdeni [28, 29, 45].

A TTP klinikai diagnózisa a trombocitopénia és MAHA együttes jelentkezése esetén felállítható, amennyiben ezek más, ismert okra nem vezethetők vissza [45, 46].

A TTP-re többnyire súlyos trombocitopénia jellemző, a trombocitaszám átlagosan 10-30 G/L körüli, alacsonyabb, mint más TMA-kban [22, 27, 47].

A MAHA-ra az anémia (alacsony hemoglobinszint és vörösvértestszám) és az intravaszkuláris hemolízis (csökkent haptoglobinszint, emelkedett indirekt bilirubinszint) általános jelein túl gyakran kifejezetten emelkedett LDH-szint jellemző, amely részben a hemolízis, részben az ischaemia miatti szövetkárosodás következménye [48]. A hemolitikus anémia kompenzációja miatt a retikulocitaszám jellemzően emelkedett. A direkt és indirekt Coombs-teszt eredménye negatív, ami segít az immunhemolízisektől való elkülönítésben. A mikroangiopátiás hemolitikus anémiát a hemolitikus anémiák többi formájától leghatározottabban a jellegzetes, gyakran sisak alakú sérült vörösvértestek, a fragmentociták nagy száma különbözteti meg. TTP-ben általában a többi TMA-nál is kifejezettebb fragmentocitózis látható [49, 50].

A klinikai diagnózis felállításához a trombocitopénia és a MAHA igazolásán túl a TMA egyéb okait kell kizárni. A kizárandó kórképek egy része a TTP-hez hasonlóan meghatározott patogenezisű elsődleges TMA-szindróma (Shiga-toxin-mediált (típusos) HUS, komplementmediált (atípusos) HUS, pneumococcus-HUS). A másodlagos TMA-k esetén a TMA kialakulása egyéb alapbetegségre vagy kiváltó okra vezethető vissza (gyógyszerindukált, transzplantáció-asszociált, rosszindulatú daganathoz, szepszishez, HIV-fertőzéshez, szisztémás autoimmun betegségekhez társuló TMA). Egyes további

kórképek, illetve kórállapotok pedig nem tartoznak a TMA-k közé, azonban TMA képét utánozhatják (DIC, Evans-szindróma) [51].

A TTP diagnózisának igazolásához az ADAMTS13 enzim aktivitásának meghatározása szükséges [29].

Az enzimaktivitás meghatározására a jelenlegi laboratóriumi gyakorlatban túlnyomórészt a FRET módszert alkalmazzák [45, 52-54].

Az enzimaktivitást általában több egészséges ember plazmamintájából kevert normál humán minta aktivitásához viszonyítják és százalékban fejezik ki, a normál humán minta ADAMTS13-aktivitását véve 100%-nak. Az ADAMTS13-deficiencia felső határának legtöbb helyen a 10%-os aktivitást tekintik [27, 45, 55, 56].

A TTP klinikai diagnosztikus kritériumainak teljesülése esetén a deficiens ADAMTS13-aktivitás alátámasztja a diagnózist [45, 47, 57-59].

Amennyiben az ADAMTS13-deficiencia igazolható, a TTP szerzett és veleszületett formáinak az elkülönítésére el kell végezni az ADAMTS13 elleni autoantitestek kimutatását. Az antitestek jelenlétének és mennyiségének meghatározása történhet az ADAMTS13 enzim gátlásának vizsgálatán keresztül [15, 16], illetve ELISA-módszerrel [60].

Az ADAMTS13-elleni gátló antitestek (inhibitorok) kimutatására szolgáló funkcionális vizsgálat során a vizsgálandó deficiens mintát ismert aktivitású normál humán mintával kell összekeverni és inkubálni, a kevert mintában mérhető aktivitáscsökkenés utal a betegmintában uralkodó ADAMTS13-gátlás erősségére.

Az ELISA módszer az antigén-antitest-kapcsolódáson alapul, azaz az ADAMTS13 enzim megkötésére képes valamennyi (gátló és nem gátló) antitest kimutatására képes. A kereskedelmi forgalomban kapható kitek az ADAMTS13-elleni antitestek túlnyomó részét kitevő IgG izotípus meghatározására alkalmasak.

Az antitestek jelenlétének igazolása alátámasztja a TTP szerzett formájának a diagnózist [29].

Kis mennyiségű ADAMTS13-antitest nem minden esetben mutatható ki, ebben az esetben a TTP szerzett formája mellett szól az ADAMTS13-aktivitás normalizálódása a remisszió során – hiszen az antitestek eltűnhetnek az alkalmazott terápia hatására [42,

58], de biallélikus *ADAMTS13*-mutációk esetén nem termelődik ép ADAMTS13 enzim, ezért örökletes formában az aktivitás tartósan deficiens marad.

Amennyiben az antitestek jelenlétét sem funkcionális, sem ELISA módszerrel nem sikerül bizonyítani, és az ADAMTS13-aktivitás tartósan deficiens marad, felvetődik a TTP örökletes formájának gyanúja. Ebben az esetben el kell végezni az *ADAMTS13* gén szekvenálását; az eltérő allélokon elhelyezkedő két ADAMTS13 mutáció alátámasztja az örökletes TTP diagnózist [29].

1.1.8. A szerzett TTP kezelése

A TTP kezelését a klinikai diagnózis felállítása után minél hamarabb meg kell kezdeni.

A terápia első és legfontosabb eleme a plazmaferezis végzése FFP (vagy kriofelülúszó) szubsztitúciójával [29, 43, 49] a deficienciát okozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek eltávolítása, valamint a hiányzó ADAMTS13 enzim pótlása céljából. A plazmaferezist naponta, a hematológiai remisszió (vagy terápiás válasz) eléréséig kell folytatni, azaz ameddig a trombocitaszám egymást követő két napon meg nem haladja a 150 G/L-es értéket, vagy amíg egy 150 G/L feletti értéken nem állandósul [29, 43].

A plazmaferezist szerzett TTP-ben az autoantitestek keletkezését gátló immunszuppresszív terápiával kell kiegészíteni.

Az immunszuppresszív terápia alapját glükokortikoidok képezik. A glükokortikoid-terápiát a plazmaferezis felfüggesztését követően is folytatni kell legalább a 20-30%-os ADAMTS13-aktivitás eléréséig, majd 2-3 hét alatti leépítése javasolt [49].

A rituximab egy CD20-ellenes monoklonális ellenanyag, amely hatását a (CD20-pozitív) B-sejtek eliminálásán keresztül fejt ki, az antitestek nagy részét termelő (CD20-negatív) plazmasejtek ellen viszont nem hat, ezért hatása csak lassabban alakul ki. Korábban a rituximabot a kezdeti terápiára nem reagáló TTP-s epizódok, exacerbációk, illetve relapszusok kezelésében, valamint tartósan ADAMTS13-deficiens beteg esetében újabb TTP-s epizód megelőzése céljából alkalmazták [61, 62], de a legújabb ajánlások alapján kontraindikáció hiányában minden TTP-s beteg kezdeti terápiájában alkalmazható [63].

Terápiarefrakter – azaz plazma-, glükokortikoid-, illetve rituximabterápiára nem megfelelően reagáló – esetekben további terápiás beavatkozásokra lehet szükség.

Ezek egy része szintén az autoantitest-termelés gátlását célozza meg. Ezek közül a ciklofoszfamid [64], a bortezomib [65], a mikofenolát-mofetil [66] és a ciklosporin A [67] bizonyult több esetben hatékonyak. A kóros autoantitestek hatásának ellensúlyozására intravénás immunglobulin adásával is értek el jó eredményeket [68, 69].

A caplacizumab a fenti szerekkel szemben a VWF és a vérlemezkék glikoprotein Ib-IX-V receptorkomplexének kapcsolódását gátolja, ezáltal deficiens ADAMTS13-aktivitás mellett is képes megakadályozni az ULVWF-mediált trombocita-trombusok kialakulását TTP-ben [70]. Az antitestek keletkezésére és az ADAMTS13-aktivitásra viszont nincs hatása, ezért csak a korábban ismertetett terápiák kiegészítésére használható [71].

TTP-ben súlyos vérzés hiánya esetén trombocita-transzfúzió adása kontraindikált, mivel elősegítheti a trombocita-trombusok képződését, és ezáltal a trombotikus mikroangiopátia súlyosságát fokozhatja.

A szerzett TTP-s esetek több mint egyharmadában kialakulhat exacerbáció [27], ezért fontos a TTP-s beteg állapotának szoros követése (tünetek megfigyelése és a vérkép kontrollálása) a plazmaferézis felfüggesztését követően is. Exacerbáció esetén a naponkénti plazmaferézist haladéktalanul újra el kell kezdeni, valamint ki kell egészíteni emelt dózisu glükokortikoid-, rituximab- és lehetőség szerint caplacizumab-terápiával.

Relapszusok a szerzett TTP-s betegek egyharmadában alakulhatnak ki, bár a hatékonyabb követés és terápia következtében arányuk csökkenő tendenciát mutat [49, 58, 72]. Az ADAMTS13-aktivitás monitorozása segítséget nyújthat a relapszusrizikó meghatározásában: normál ADAMTS13-aktivitás mellett TTP-s epizód nem alakul ki, míg a deficiens aktivitás fokozott relapszusrizikóval jár [42, 55, 58] és szorosabb követést, illetve preemptív immunszuppresszív terápiát tehet szükségessé. Rituximabra nem reagáló, gyakran relabáló betegek esetében splenectomia elvégzése jön szóba [73, 74].

1.2. Az ADAMTS13-enzim funkciója és a TTP patogenezisében játszott szerepe

1.2.1. Az ADAMTS13 enzim szerkezete és szintézise

A fehérjét kódoló *ADAMTS13* gén a 9-es kromoszóma hosszú karján, a 9q34 pozícióban található, 29 exon alkotja [17, 18]. A génről átíródó fehérjetermék 1427 aminosav hosszúságú, az érett fehérjén túl egy szignálpeptidet és egy propeptidet tartalmaz [17]. Az érett ADAMTS13 enzim a nevének (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs, member 13) megfelelően egy metalloproteáz (M), egy disintegrin-szerű (D) és egy trombospondin (thrombospondin type 1 repeat, T) doménből, valamint az ADAMTS enzimcsalád többi tagjához hasonlóan egy cisztein-gazdag (C) és egy spacer (S) doménből áll, amelyet az ADAMTS13 esetében további 7 trombospondin domén és az enzimcsaládban egyedülálló módon 2 CUB domén követ [17, 18]. **(1. ábra)**



1. Ábra. Az ADAMTS13 enzim doménszerkezete. Met: metalloproteáz, Dys: disintegrin-szerű, TSP: trombospondin, Cys: cisztein-gazdag domén.

A fehérje erősen glikozilált, 10 N-glikozilációs, 6 O-glikozilációs, 8 O-fukozilációs és 3 C-mannozilációs helyet tartalmaz [75], 180-190 kDa-os molekulatömegének 20%-át glikánok teszik ki [17].

Az ADAMTS13 enzim elsősorban a máj csillagsejtjeiben (hepatic stellate cells) [76], az endotélsejtokban [77], valamint megakariocitákban és trombocitákban termelődik [78]. Hogy az egyes sejttípusok pontosan milyen mértékben járulnak hozzá a vérplazma ADAMTS13-tartalmához, egyelőre ismeretlen [79]. Az ADAMTS13 plazmakoncentrációja 1 µg/mL körüli [80, 81], féléletideje a keringésben 2-3 nap [82].

A plazmában található enzim funkcionálisan aktív, aktivitását eddigi ismereteink alapján egyetlen ismert szubsztrátjának, a VWF-multimereknek a szerkezete, illetve konformációváltozása szabályozza [79, 83, 84].

1.2.2. A VWF funkciója, szerkezete és szintézise

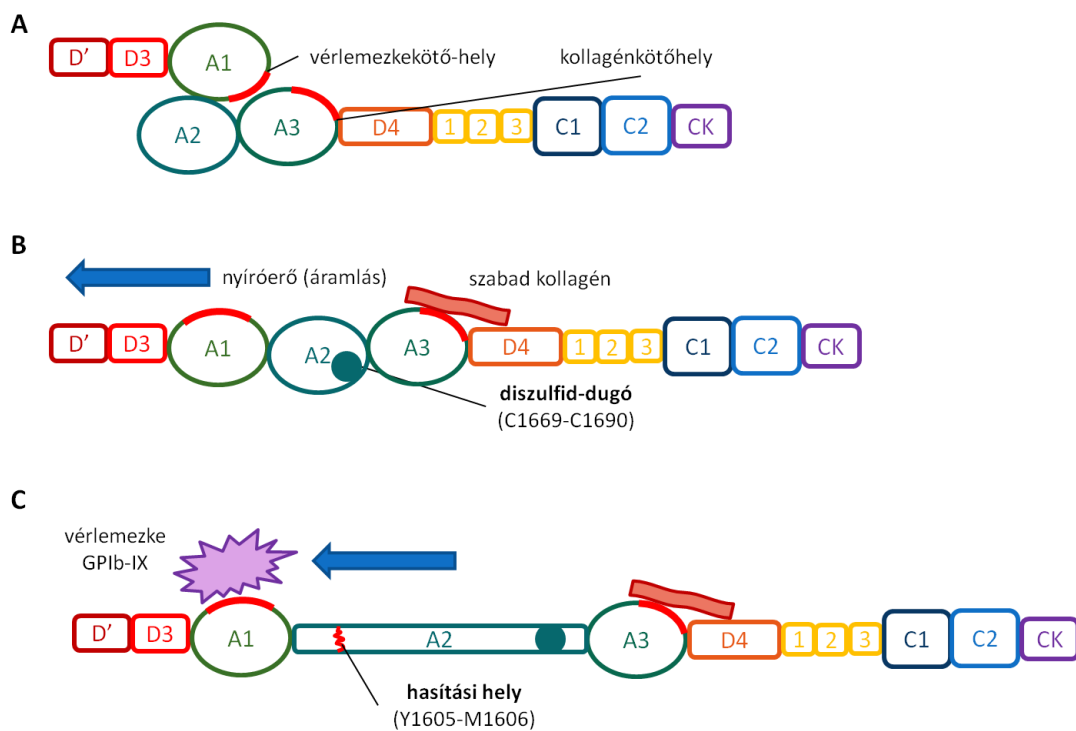
A VWF kettős funkciót tölt be a vérzéscsillapítás folyamatában. Egyrészt a VIII-as véralvadási faktor hordozófehérjeként meghosszabbítja annak féléletidejét a keringésben, másrészt elősegíti a trombociták kitapadását [85]. Ez utóbbi folyamat fiziológiás esetben csak az érsérülés helyén megy végbe, míg a nem megfelelő helyen, túlzott mértékben zajló trombocita-kitapadás és -aggregáció játszik szerepet a TTP kialakulásában. A trombocita-megkötő funkciót a fehérje szerkezete nagymértékben meghatározza, ezért a következőkben a fehérje felépítésének fontosabb részleteit szeretném bemutatni.

A VWF szintézise az endotélsejtekben és a megakariocitákban történik [86], ahol egy pre-pro-VWF nevű monomer keletkezésével veszi kezdetét [87]. A monomerek több, eltérő funkciójú doménből épülnek fel, amelyek a klasszikus nevezéktan szerint az alábbi sorrendben követik egymást: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-C3-CK [88]. Az endoplazmatikus retikulumban (ER) a monomerek C-terminális (farki) CK doménjeiken keresztül diszulfidhidakkal kapcsolódnak egymáshoz [89]. A dimerek a Golgi-készülékben N-terminális (feji) D3 doménjeik között alakítanak ki diszulfidhidakat, a kapcsolódás eredményeként nagy, akár 60 monomerből álló, helikális tubulusokba rendezett multimerek jönnek létre [85, 89-91].

A VWF-multimerek a vérlemezkék α -granulumaiban [86] és az endotélsejtek Weibel-Palade-testjeiben [90] raktározódnak. Az endotélsejtekben keletkező VWF-molekulák jelentős része konstitutívan szekretálódik a vérbe, illetve a szubendoteliális térbe [87]. A vérbe kerülő VWF-multimerek tubuláris szerkezete a magasabb pH következtében felbomlik, a 0,5-5 μm hosszúságú tubulusok kitekeredése során akár 200 μm hosszúságú fonalszerű struktúrák jönnek létre [90], amelyek azonban a hasításukért felelős ADAMTS13 enzim jóvoltából rövid időn belül elhasadnak, a vérplazmában normál körülmények között megtalálható kisebb VWF-molekulákat (ún. plazma-VWF) eredményezve [92].

Ezek a plazma-VWF-molekulák a keringésben globuláris konformációt vesznek fel [93], amelyben a trombocitakötésben fontos szerepet játszó A1 doménjeik nem hozzáférhetőek; ez hivatott megakadályozni a véráramban velük együtt keringő vérlemezkék megkötését (**2. ábra, A panel**). Érsérülés esetén a plazmában keringő

VWF-molekulák – a szubendoteliális térbe szekretált VWF-molekulákkal együtt – az A3 doménjükön keresztül a szubendoteliális mátrix kollagénmolekuláihoz kötődnek. A kötődést követően a nyíróerők hatására konformációjuk megváltozik, szabaddá téve a vérlemezkék glikoprotein Ib (GPIb) receptorának kötésére képes A1 doméneket [83, 93]. Egy-egy A1-GPIb kölcsönhatás általában rövid ideig tart, azonban a VWF-molekulákkal borított felszínen végiggördülő vérlemezkék az ismételt kölcsönhatások következtében lelassulnak, így lehetővé válik azok kollagénhez történő stabilabb kötődése [94]. **(2. ábra, B panel)**



2. Ábra. A VWF szerkezete. (A) A VWF globuláris konformációjában a kollagénkötőhely hozzáférhető, de a vérlemezkék GPIb receptorának kötőhelye rejtve van. (B) Érsérülés esetén a VWF a szubendoteliális kollagénhez kötődik, és a nyíróerők hatására a vérlemezkékötő-helye szabaddá válik. (C) Nagyobb nyíróerők hatására az A2 domén felnyílik, szabaddá téve az ADAMTS13 enzim hasítóhelyét.

A konstitutív úton nem szekretált Weibel-Palade-testekben található, illetve a vérlemezkék α -granulumaiban tárolt rendkívül nagy VWF-multimerek (ún. unusually large VWF, ULVWF) az endotélsejtek, illetve a trombociták aktivációjakor szabadulnak fel [87].

Amennyiben az ADAMTS13 enzim aktivitása deficiens, a lokálisan nagy mennyiségben felszabaduló multimerek hasítása kihívást jelenthet a plazma ADAMTS13-aktivitása számára, ami az ULVWF tartós jelenlétét eredményezi a keringésben [95].

Az ULVWF-molekulák jelentőségét az adja, hogy nagy méretüknek köszönhetően kisebb nyíróerők hatására is hajlamosak a kitekeredésre, vagyis a globuláris helyett lineáris konformáció felvételére [23]. Ez azt jelenti, hogy az érpályában normális körülmények között uralkodó nyíróerők mellett is számos, a trombociták GPIb receptorainak kötésére alkalmas szabad A1 domént tartalmaznak [23, 96]. A szekréción követően ezek az akár 20 000 kDa méretet meghaladó óriásmolekulák gyakran az endotélsejtek felszínéhez rögzülnek, ahol a vérlemezkék megkötése által trombocita-trombusok kialakulását idézhetik elő [92]. Ráadásul az ULVWF-molekulák kötegekbe rendeződhetnek, amelyek a trombociták tartós megkötésére és aktivációjára is képesek, valamint ellenállóbbak az ADAMTS13 általi hasítással szemben is [97-99].

Az ULVWF-molekulák azonban nagyobb méretüknek köszönhetően – különösképpen akkor, ha az endotélsejtekhez, vagy trombocitákhoz kötődnek – hajlamosabbak a globuláris konformációban rejtett ADAMTS13-hasítóhelyeik felfedezésére is [100] (**2. ábra, C panel**). Normális ADAMTS13-aktivitás mellett ez a sajátosságuk biztosítja a nagy multimerek elhasítását kisebb oligomerekre, amelyek a fiziológias áramlási körülmények között, globuláris konformációjuknak köszönhetően, nem tartalmaznak szabad ADAMTS13-hasítóhelyeket [92, 96, 101].

1.2.3. Az ADAMTS13 és a VWF kapcsolódása – a cipzár modell

Az ADAMTS13 enzim a VWF-molekulákat a Tyr1605-Met1606 helyen képes specifikusan elhasítani [12, 13]. A hasítás létrejöttéhez azonban a szubsztrát konformációváltozására [102] és az enzim és a szubsztrát összetett, több lépcsőben történő kapcsolódására van szükség [83]. (**3. ábra**)

Az ADAMTS13 enzim hasítóhelye a VWF A2 domén belsejében található, és – csakúgy, mint a trombocitakötésért felelős A1 domén – a VWF globuláris konformációja esetén nem hozzáférhető [103].

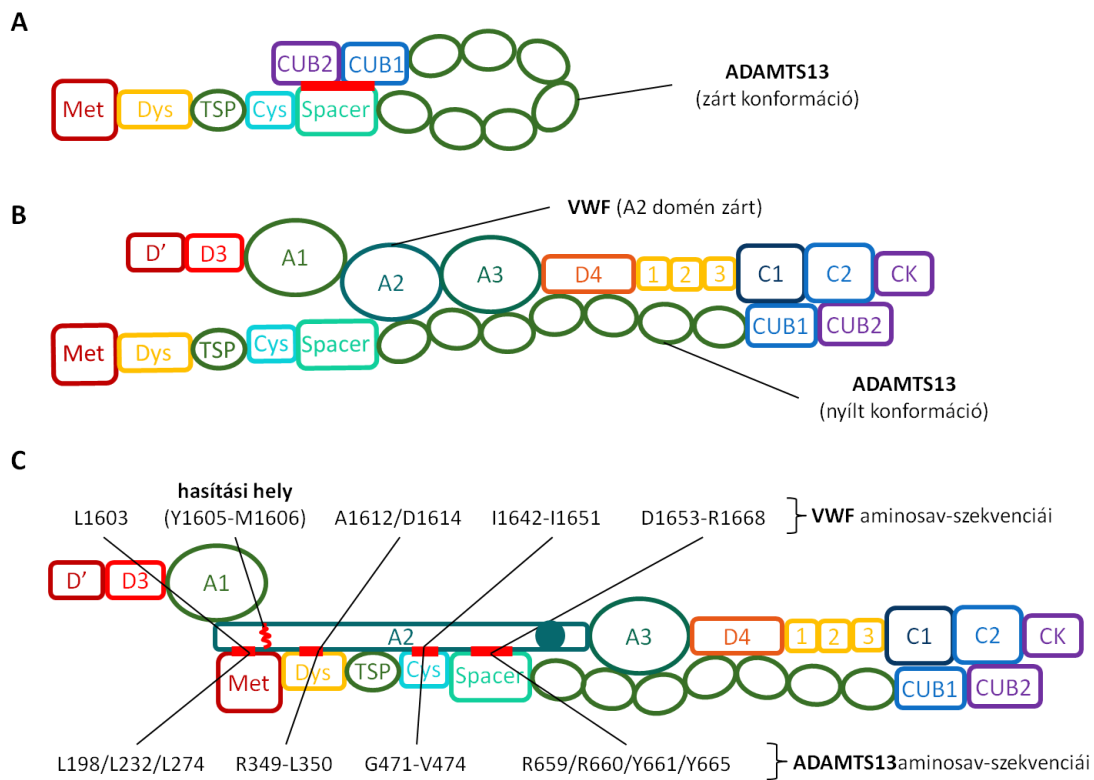
Az enzim C-terminális része (az 5-8. trombospondin domének és a két CUB domén) azonban képes a VWF mindig hozzáférhető C-terminális részéhez (a D4-től a CK doménekig) történő kötődésre [104]. A molekulák C-terminális részeinek kapcsolódása egy olyan optimális helyzetben pozicionálja az enzimet, amely áramlási körülmények között is lehetővé teszi, hogy amint a hasításnak kedvező konformációváltás megtörténik, a további kötődési lépések minél gyorsabban és hatékonyabban végbemenjenek [104]. **(3. ábra, B panel)**

A hasításhoz szükséges konformációváltás a VWF feszülésének következtében megy végbe és az A2 domén szerkezetének részleges felbomlását jelenti [102, 103]. Az A2 domén szerkezete hasonló a VWF másik két A doménjéhez, de számos olyan sajátossággal rendelkezik, amelyek alkalmassá teszi feszülés-érzékelő funkció ellátására [103]. Ezek egyike, hogy az A2 domén esetében az A doménekre jellemző diszulfidhíd két szomszédos cisztein (Cys1669 és Cys1670) között jön létre [103]. Az így kialakuló gyűrűs struktúra, az ún. diszulfid-dugó a domén hidrofób magjába illeszkedik, de húzóerők hatására kimozdulhat onnan, a szerkezet reverzibilis felbomlását és a domén időleges és részleges kitekeredését okozva [103]. **(2. ábra, C panel)**

Az ADAMTS13 enzim (MDTCS domének által alkotott) N-terminális része több, egy vonalban lévő kötőhelyet tartalmaz, amelyek egymás után kapcsolatba lépnek a kitekeredett A2 domén különböző szakaszaival [105]. Ez a cipzárszerű kötődés biztosítja a hasítási hely megfelelő pozicionálását az enzim aktív centruma fölé [83, 105]. Amíg tehát a C-terminális régiók kapcsolódása elősegíti a hatékony kötődést áramlási körülmények között, addig az alábbi kötési lépések nemcsak előnyösek, hanem nélkülözhetetlenek a VWF-nak az ADAMTS13 általi specifikus hasításához. **(3. ábra, C panel)**

A peptidlánc kitekeredése az A2 domén C-terminális végén, a diszulfid-dugó közvetlen szomszédságában kezdődik, ezért először az itt található amfipatikus hélix (α_6 ; Asp1653-Arg1668) kötődik az ADAMTS13 spacer doménjének bázikus aminosavakkal szegélyezett hidrofób felszínéhez (Arg659, Arg660, Tyr661, Tyr665) [102, 106, 107]. A következő fontos lépés a VWF egy hidrofób régiójának (Ile1642, Trp1644, Ile1649, Leu1650, Ile1651) kötődése az ADAMTS13 cisztein-gazdag doménjének hidrofób zsebéhez (Gly471-Val474) [108].

A végső kötődési lépések a hasítási hely pontos pozicionálásában játszanak szerepet. Az ADAMTS13 disintegrin doménjének Arg349 és Leu350 aminosavai a VWF Asp1614 (P9') és Ala1612 (P7') aminosavaival kapcsolódnak [109], a hasítási hely túloldalán pedig a metalloproteáz domén Leu198, Leu232 és Leu274 aminosavai a VWF Leu1603 (P3) aminosavával létesítenek kapcsolatot [110]. Ezáltal a Met1606 (P1') a metalloproteáz domén Asp252-Pro256 aminosavai által kialakított S1' kötőhelyre, a Tyr1605 (P1) pedig annak Val195 és Leu151 aminosavai által kialakított S1 kötőhelyre illeszkedik [110-112], végül a kettő között elhelyezkedő katalitikus hely (His228, His234, His224, Glu225 és egy Zn^{2+} ion) elvégzi a peptidlánc hasítását.



3. Ábra. Az ADAMTS13 enzim és a VWF kapcsolódása. (A) Az ADAMTS13 enzim a keringésben a spacer és CUB doménjei közti kötődés hatására zárt konformációban van. (B) Az ADAMTS13 enzim C-terminális régiói képesek a VWF kötésére az A2 domén zárt konformációja esetén is, ez felnyitja az enzimet, és a további kapcsolódás szempontjából előnyös helyzetbe hozza. (C) Amennyiben magas nyíróerők esetén a VWF A2 doménje felnyílik, az ADAMTS13 enzim spacer, cisztein-gazdag, disintegrin-szerű és metalloproteáz-doménjei sorban kötődnek az A2 domén meghatározott részleteihez (cipzár-modell), biztosítva a hasítóhelynek az enzim aktív centruma fölé történő pozicionálását.

A közelmúltban, doktori munkám kezdete óta derült fény arra, hogy az ADAMTS13 enzim funkciójára nem csak a VWF, hanem maga az ADAMTS13 proteáz konformációja is hatással van.

Felismerték ugyanis, hogy a szabad ADAMTS13 enzim fiziológias körülmények között zárt konformációt vesz fel, amelyben C-terminális CUB doménjei az enzim spacer régiójához kötődnek, és hogy ez a kötődés csökkenti az enzim aktivitását a hasítási helyet tartalmazó mesterséges szubsztrátok iránt (**3. ábra, A panel**) [113, 114]. Amennyiben a CUB domének kötődnek a VWF D4-CK doménjeihez, a spacer domén szabaddá válik és képes lesz az A2 domén felbomlása esetén az $\alpha 6$ hélix kötésére [113, 114].

1.3. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz szerzett TTP-ben

1.3.1. Az ADAMTS13 elleni autoantitestek jellemzői

Szerzett TTP-ben az ADAMTS13 enzim deficienciáját ADAMTS13-ellenes autoantitestek okozzák [15, 16, 60, 115, 116]. Az autoantitestek egy része direkt módon képes blokkolni az ADAMTS13 enzim aktivitását, ezeket gátló autoantitesteknek, vagy inhibitoroknak nevezzük [15, 16, 60, 115, 116]. Ezek mellett azonban ismeretesek olyan, nem gátló autoantitestek is, amelyek az enzim funkciójával – legalábbis *in vitro*, az aktivitásmérésre használatos esszék során – közvetlenül nem interferálnak, hanem egyéb módokon, feltehetően az enzim keringésből történő eltávolításának fokozásával vezethetnek súlyosan csökkent ADAMTS13-aktivitáshoz [60, 117, 118].

Az autoantitestek az ADAMTS13 enzim eltérő régiói ellen irányulhatnak. Csaknem minden szerzett TTP-s betegben jelen vannak spacer-ellenes autoantitestek [119-123], amelyek mind a spacer domén egy meghatározott régióját képesek felismerni [106, 124-126]. A spacer-epitóp közös, központi részét az Arg660, Tyr661, Tyr665, és részben az Arg568, illetve Phe592 aminosavak alkotják [106, 124, 125]. Érdekes módon ugyanez a spacer régió (Arg659, Arg660, Tyr661) játszik kulcsfontosságú szerepet a VWF A2 doménjének felismerésében [106, 107], azaz az autoantitestek kötődése képes megakadályozni a VWF kötését és ezáltal annak elhasítását [106, 125]. Ennek megfelelően főleg ezek a spacer-ellenes autoantitestek felelősek az ADAMTS13-gátló

hatásért [123]. Az enzim N-terminális része (MDTCS) elleni autoantitestek döntően a spacer domén ellen irányulnak [121-123], azonban a szerzett TTP-s betegek többsége hordoz az enzim C-terminális része ellen irányuló autoantitesteket is: a CUB1-2 domének elleni autoantitestek 31-64%-ban, a 2-8. trombospondin domének elleni antitestek 17-37%-ban fordulnak elő [120, 122, 125].

A több epitóp elleni autoantitestválasz arra utal, hogy szerzett TTP-ben az ADAMTS13 elleni immunválasz oligoklonális jellegű, amit az ADAMTS13-specifikus B-sejt-klónokat vizsgáló tanulmányok eredményei is megerősítettek [127-130]. A spacer-ellenes autoantitesteket termelő B-sejt-klónok antitest-repertoárja sok közös vonást mutat: a nehézláncok variábilis részét kódoló régióknak a várhatónál jóval nagyobb aránya VH1-69 eredetű [127-130], egyes eltérő betegekből származó klónok CDR3 régiói nagyfokú hasonlóságot mutatnak [129]. A CDR1 és CDR2 régiókban jelentős szomatikus hipermutáció igazolható, az aminosavcserével járó mutációk magas arányával, ami antigénvezérelt affinitásérési folyamatra utal [127-130].

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek az affinitásérés mellett izotípusváltáson is átesnek: nagy részük IgG izotípusú [15, 16, 60, 116, 125, 131], de a betegek kisebb hányadában (4-11%-ban, illetve 18-25%-ban) előfordulhatnak IgM, illetve IgA izotípusú antitestek is [58, 60, 117, 125, 131, 132]. Az IgG izotípusú ADAMTS13-ellenes antitestek többsége az IgG4 és IgG1 alosztályba tartozik, előbbi a betegek 69-93%-ban, utóbbi 52-76%-ban fordul elő [125, 131, 132]. IgG2 és IgG3 izotípusú antitestek csak a betegek kisebb részében (14-50%, illetve 8-33%), alacsonyabb koncentrációban fordulnak elő [125, 131, 132].

Az antitestek mennyisége, gátló tulajdonsága és azok izotípus-, illetve alosztályeloszlása fontos prognosztikai tényező. Az inhibitorok [47, 133], illetve az IgA, IgG1 és IgG3 antitestek mennyisége [58, 131, 134] korrelál az epizód súlyosságával (alacsony trombocitaszám, több plazmaferezis a remisszió eléréséig, magasabb halálozás). Magas inhibitor szint esetén gyakrabban fordul elő tartós deficiencia remisszióban [58].

Az ADAMTS13-ellenes antitestek ugyanis nemcsak a betegség akut szakában, hanem a betegek egy részében (40-75%) remisszióban is kimutathatóak [116, 132]. A remisszió

során kimutatható gátló antitestek tartós ADAMTS13-deficienciát idézhetnek elő, amely relapszus kialakulására hajlamosít [55, 58, 135].

Az antitestek nemcsak szabad formában, hanem az ADAMTS13-tartalmú keringő immunkomplexek formájában is megtalálhatóak a keringésben [132, 136-139], bár az immunkomplexek előfordulását illetően elég eltérő eredmények születtek (47-97% az akut szak során, 48-93% remisszióban) [132, 138, 139].

Az immunkomplexeket alkotó antitestek alosztályeloszlása korrelál a szabadon keringő alosztályok mennyiségével, bár az IgG4-tartalmú immunkomplexek kissé felülreprezentáltak, ebben szerepet játszhat azok kisebb mérete és csökkent komplementaktiváló-, illetve Fc-receptor-kötő képessége [132].

Az Fc régiójuk különbözőségéből fakadóan ugyanis az egyes IgG alosztályok eltérő funkcionális jellemzőkkel bírnak, ezeket a következőkben ismertetem.

1.3.2. Az egyes IgG alosztályok szerkezeti és funkcionális tulajdonságai, és ennek jelentősége a szerzett TTP patogenezis szempontjából

A fehérjetermészetű antigének elleni immunválasz során elsősorban IgG1 alosztályú antitestek keletkeznek, többnyire más (IgG3 vagy IgG4) alosztályokkal együtt [140]. Ennek megfelelően az IgG1 a leggyakoribb IgG alosztály, az IgG izotípusú immunglobulinok 60-70%-a ebbe az alosztályba tartozik [140, 141]. Az IgG1 hatékonyan képes a C1q kötésére és ezáltal a komplementrendszer klasszikus útjának aktiválására, emellett az Fc-receptorokhoz is hatékonyan kötődik [140, 142-144].

A második leggyakoribb alosztály az IgG2, amely az IgG antitestek 14-32%-át teszi ki [140, 141]. Az IgG2 alosztályú antitestek elsősorban poliszacharid antigének ellen keletkeznek [140, 145], a komplementrendszer klasszikus úton történő aktiválására csak – a poliszacharidokra jellemző – magas antigénsűrűség mellett képesek [144]. Az Fc receptorokhoz igen gyengén kötődnek [140, 142, 143].

Az IgG antitestek 4-8%-a tartozik az IgG3 alosztályba [140, 141]. Az IgG3 antitestek elsősorban fehérjeantigének ellen termelődnek IgG1 antitestekkel együtt, virális fertőzésekben gyakran ez az alosztály jelenik meg elsőként, ennek ellenére IgG3-domináns immunválasz kialakulása nem jellemző [140]. Az IgG3 alosztályú antitestek a leghatékonyabbak az effektor funkciók kiváltásában: nagy affinitással kötik a C1q-t és

az Fc-receptorokat is, ennek megfelelően hatékonyan aktiválják a komplementrendszer és a fehérvérsejteket [140, 142-144]. Az IgG3 molekulák a többi IgG molekulához képest igen hosszú és flexibilis hinge-régióval rendelkeznek, amely a C1q- és Fc γ R-kötő régió jobb hozzáférhetőségén keresztül hozzájárul az IgG3 hatékony, pro-inflammatorikus effektor funkcióinak ellátásához [140]. Az IgG molekulák recirkulációjáért és ezáltal hosszú féléletidejéért felelős FcRn receptorokhoz ezzel szemben gyengén kötődnek, ezért féléletidejük a keringésben – a többi alosztály 21 napos féléletidejével szemben – csupán 7 napos [140, 146].

Az IgG4 az IgG izotípusú antitestek legkisebb hányadát (2-6%) kitevő alosztály [140, 141]. Elsősorban fehérje jellegű antigének (gyakran allergének) ellen termelődik, általában IgG1 (valamint feregfertőzések és allergének esetén IgE) antitestekkel egyetemben [140]. IgG4-domináns immunválasz gyakran hosszas, nem fertőzéshez társuló antigénstimulációt követően alakul ki, például terápiás plazmafehérjék (hemofília kezelése kapcsán VIII-as és IX-es véralvadási faktorok) ellen [140, 147], illetve immunterápia hatására [148]. Immunterápia során az IgG4 antitestek megjelenése általában együtt jár a tünetek lecsengésével, aminek hátterében az IgG4 alosztályba tartozó antitestek rendkívül gyenge komplement- és fehérvérsejt-aktiváló képessége áll [140, 148].

Az IgG4 molekula rendelkezik azzal a sajátos tulajdonsággal, hogy a két nehézláncot összetartó diszulfidhíd egy időre megszűnik, lehetővé téve két eltérő klonalitású, egy-egy nehéz- és könnyűláncból álló félmolekula kapcsolódását [149-151]. Az így létrejött IgG4-molekulák két eltérő antigénfelismerő régiójukkal két különböző antigén megkötésére képesek (bispecifikusak), azonban mindkét antigén ellen csak egy antigénfelismerő régióval rendelkeznek (monovalensek) [149-152]. Az IgG4 molekulák többségének monovalenciája megakadályozza, hogy az általuk felismert antigénnel kapcsolódva nagy immunkomplexeket alkossanak, ami tovább csökkenti komplement- és fehérvérsejt-aktiváló képességüket [150, 152].

Viszonylag inert jellegük ellenére számos autoimmun betegségben igazolták az IgG4-alosztályú antitestek kóros szerepét [153, 154].

Az ADAMTS13 fehérjeantigén, ennek megfelelően, hogy az ellene keletkező autoantitestek jelentős része az IgG1 alosztályba tartozik. Az IgG4 alosztályú autoantitestek magas

arányának háttérében pedig a hosszas, nem fertőzéshez társuló antigénstimuláció állhat, hasonlóan az egyéb plazmafehérjék – pl. a VIII-as és IX-es véralvadási faktor – ellen kialakuló antitestválaszhoz.

Az IgG1 és IgG3 antitestek kifejezettebb, proinflammatorikus effektor funkcióinak szerepe lehet abban, hogy ezen alosztályok szintje korrelál a TTP-s epizódok rosszabb prognózisával.

Az ADAMTS13 elleni antitestek legalább kétféle eltérő mechanizmussal képesek ADAMTS13-deficienciát előidézni: egyrészt az enzim funkciójának közvetlen gátlása által [15, 16, 60, 116], másrészt az enzim keringésből történő eltávolításának fokozásán keresztül [60, 117, 118, 123]. Az antitestek gátló hatása elsősorban az epitópspecifitás függvénye: a gátló antitestek szinte kivétel nélkül a spacer domén meghatározott részlete ellen irányulnak [123]. A keringésből történő eltávolítás hatékonyságát viszont a fent említett eltérő immunológiai tulajdonságaik révén az antitestek alosztálya jelentős mértékben befolyásolhatja. Ennek megfelelően, bár nem két külön antitestpopulációról van szó – ugyanis a gátló antitestek is részt vesznek az enzim eltávolításának fokozásában [123] – elképzelhető, hogy az eltérő alosztályokba tartozó ADAMTS13-ellenes antitestek elsősorban más-más mechanizmussal járulnak hozzá az ADAMTS13-deficiencia kialakulásához: egyesek főleg az enzim eliminációjának hatékonyabb fokozásán keresztül, míg mások a hatékonyabb enzimgátlás útján.

Bár egyre több ismerettel rendelkezünk az ADAMTS13-elleni autoantitesteket illetően, a keletkezésük oka és pontos mechanizmusa egyelőre ismeretlen. A továbbiakban az autoantitestek keletkezésének legfontosabb általános mozzanatait, illetve az ADAMTS13-elleni autoantitestek keletkezésével kapcsolatos jelenlegi ismereteinket szeretném összefoglalni.

1.3.3. Genetikai és környezeti tényezők szerepe a toleranciavesztésben és az autoantitestek keletkezésében

Számos mechanizmus hivatott biztosítani, hogy a saját antigének ellen ne alakuljon ki immunválasz. A centrális tolerancia lényege, hogy a thymusban (T-sejtek esetén), illetve a csontvelőben (B-sejtek esetén) azok az éretlen limfociták, amelyek a saját antigéneket nagy hatékonysággal képesek felismerni, az ún. negatív szelekció során

elpusztulnak. A saját antigéneket gyengén felismerő T- és B-sejtek túlélhetnek, ám ezek a limfociták normális körülmények között, az antigénekkal való sorozatos, kostimulációs szignálok hiányában történő találkozás hatására anerggá válnak vagy elpusztulnak, ezt nevezik perifériás toleranciának. A saját antigéneket felismerő T-sejtek egy része regulátor T-sejteké alakul, amelyek a többi immunsejt szuppressziója révén szintén részt vesznek a perifériás tolerancia kialakításában.

Az autoimmunitás, azaz a saját antigének elleni immunválasz háttérében a toleranciát fenntartó folyamatok összeomlása, az ún. toleranciavesztés áll. Jelenlegi ismereteink alapján a toleranciavesztés genetikailag fogékony egyedekben, környezeti tényezők hatására jön létre.

A genetikai fogékonyság meghatározásában számos gén vesz részt, amelyek közül az MHC-II molekulák szerepe a legismertebb.

Az egyén MHC-II-molekula-készlete meghatározza, hogy az antigénprezentáló sejtek az egyes fehérjeantigének peptidrészleteit (azaz T-sejt-epitópjait) milyen hatékonyan képesek prezentálni a CD4+ helper T-sejtek felé, ami viszont meghatározza az adott fehérjeantigének immunogenitását. Egy saját antigén peptidszakaszainak rossz hatásfokú prezentációja esetén előfordulhat, hogy az antigén T-sejt-epitópjaira specifikus éretlen T-sejtek aktivációja nem lesz elég magas ahhoz, hogy elpusztuljanak, így ezek megmenekülhetnek a – centrális tolerancia kialakulása szempontjából kulcsfontosságú – negatív szelekció elől [155, 156]. A magas hatékonyságú antigénprezentáció ezzel szemben a perifériás tolerancia áttörését, azaz az adott T-sejt-epitóp iránt kisebb affinitást mutató (és ennek következtében túlélő) helper T-sejtek aktivációját segítheti elő [155]. Az autoantigének T-sejt-epitópjait felismerő CD4+ helper T-sejtek aktivációja kulcsfontosságú a fehérjeantigének elleni autoantitestválasz kialakulásában.

Az MHC-II géneknek az autoimmunitás kialakulásában játszott szerepét alátámasztja, hogy a legtöbb autoimmun betegség (SLE [157], 1-es típusú diabetes mellitus [158], rheumatoid arthritis [159], sclerosis multiplex [160], myasthenia gravis [161], coeliakia [162] stb.) esetén találtak összefüggéseket a betegség kialakulásának rizikója és egyes HLA-DRB1, illetve DQB1 allélok hordozása között. Az asszociációs vizsgálatok során elsősorban a legnagyobb variabilitást mutató DRB1 és DQB1 géneket vizsgálták. Ezek

a gének a 6-os kromoszóma rövid karján található MHC-lókuszban helyezkednek el a többi MHC-II és MHC-I molekulát, illetve az antigénprezentációban és az immunrendszer működésében fontos szerepet játszó számos további molekulát kódoló génekkel egyetemben. A gének közelsége miatt az egyes DRB1 és DQB1 allélok egymással és további immungének bizonyos alléljaival kapcsolatban, haplotípusok formájában öröklődnek [163].

Ennek megfelelően egy DRB1, illetve DQB1 allél gyakoriságának egy autoimmun betegség kialakulásának kockázatával való összefüggése nem feltétlenül utal annak oki szerepére, előfordulhat, hogy az allélt hordozó haplotípus rizikófokozó vagy rizikócsökkentő hatásáért az adott haplotípuson elhelyezkedő másik genetikai elem felelős. Ennek megfelelően a DRB1 és DQB1 allélokkal való betegség-asszociációkra vonatkozó eredményeket óvatossággal kell kezelnünk, az asszociációk vizsgálatánál pedig helyesebben járunk el, ha az allélok helyett a haplotípusok gyakoriságának változásáról, és azok rizikófokozó vagy protektív hatásáról beszélünk.

Az MHC-II mellett a saját antigénekkal szembeni toleranciát más gének is befolyásolják, ezek egyike a *PTPN22* (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22). A *PTPN22* gén egy Lyp nevezetű nem receptor típusú tirozin-foszfátáz kódol, amely a T-sejt-receptor jelátvitelének szabályozásában játszik szerepet, ennek megfelelően az MHC-II molekulákkal együtt befolyásolhatja a centrális tolerancia kialakulását [164-166]. A *PTPN22* gén c.1858C>T polimorfizmusa (rs2476601) az R620W aminosavcserén keresztül a Lyp fehérjének az azonos jelátviteli úton szerepet játszó Csk molekulával való interakciójának gátlását eredményezi [167, 168], ami a T-sejt-receptor jelátvitelének fokozott gátlásához vezet [169]. Bár egyelőre nem ismert, hogy a fenti molekuláris változások miként idézik azt elő, de a ritka c.1858T allél több autoimmun betegségben (RA, SLE, 1-es típusú cukorbetegség, myasthenia gravis, Basedow-kór, stb.) játszott rizikófokozó szerepét számos tanulmány eredményei támasztják alá [167, 168, 170-172].

A fenti genetikai tényezőkön túl az autoimmun betegségekre való fogékonyság meghatározásában fontos szerepet játszik a nem. Bár a jelenség háttere – a nemi hormonok, terhesség és mikrokimérizmus, X-kromoszóma, epigenetika, környezeti tényezők esetleges szerepe – nem tisztázott [173], a nem kóroki szerepét alátámasztja,

hogy a férfiak és nők körében az autoimmun betegségek jelentős részének előfordulása eltérő. Az autoimmun betegségek többsége (SLE, Sjögren-szindróma, Graves-kór, Hashimoto-thyreoiditis, primer biliáris cirrhosis, sclerosis multiplex, rheumatoid arthritis, coeliakia) [173, 174] a nők, míg kisebb hányada (Reiter-szindróma, spondilitis ankylopoetica, amiotrophiás lateralsclerosis) [173, 174] a férfiak körében gyakoribb.

Érdekes módon a két nem tagjai között nem csak a betegségre való fogékonyság eltérő bizonyos autoimmun betegségekben, hanem a betegség kialakulásának rizikója és az egyes HLA-allélok hordozása közötti összefüggések erőssége is [173, 175-179].

A fenti örökletes tényezők befolyásolják ugyan az autoimmun betegség iránti fogékonyságot, de a betegség kialakulásában további, környezeti tényezők is szerepet játszanak. A fertőzések többféle módon vezethetnek perifériás toleranciavesztéshez.

A perifériás tolerancia fenntartásában a szöveti dendritikus sejtek fontos szerepet játszanak az által, hogy a saját antigéneket kostimulátor molekulák nélkül mutatják be a helper T-sejteknek, ami ez utóbbiakban anergia kialakulásához és apoptózishoz vezet.

Amennyiben a szöveti dendritikus sejtek egy kórokozó hatására aktiválódnak, az általuk bekebelezett – döntően kórokozó-eredetű, ám részben saját – fehérjékből származó peptideket kostimulátor molekulákkal együtt mutatják be a helper T-sejteknek, ami azok aktivációjához vezet. Ha a dendritikus sejtek az adott saját antigént nagyobb mennyiségben képesek felvenni (pl. az antigénnek a dendritikus sejt receptoraihoz vagy a kórokozóhoz történő nagy affinitású kötődése esetén), illetve ha hatékonyan képesek a saját antigénből származó peptideket prezentálni (pl. adott MCH-II repertoár mellett), akkor a bemutatott saját peptideket felismerő helper T-sejtek aktiválódhatnak. Ezt a folyamatot nevezik bystander-aktivációnak.

A fertőzés következtében történő toleranciavesztés további lehetséges oka a molekuláris mimikri. Ennek lényege, hogy bizonyos kórokozó-eredetű peptidek nagyon hasonlóak lehetnek egy saját fehérje eredetű peptidhez. A fertőzés hatására az aktivált dendritikus sejtek által bemutatott kórokozó-eredetű peptidek így a hasonló saját antigén eredetű peptidet felismerő helper T-sejtek aktivációján keresztül a saját antigén elleni immunválasz alakulhat ki.

1.3.4. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz kialakulásának lehetséges mechanizmusai

Az ADAMTS13 elleni gátló antitestek kialakulásának pontos mechanizmusa egyelőre nem tisztázott. Ennek megfelelően ezen alfejezetben a patomechanizmussal kapcsolatos jelenlegi ismereteinket, lehetséges modelleket és a legfőbb megválaszolendő kérdéseket szeretném összegezni.

Az ADAMTS13 fehérje természetű antigén, ami azt jelenti, hogy a hatékony immunválaszhoz aktivált CD4+ helper T-sejtek közreműködése szükséges. Amint a korábbiakban ismertettük, a TTP-s betegek ADAMTS13-elleni antitestjei izotípusváltáson és affinitáséresen esnek át. Ezek a folyamatok a csíráközpontokban mennek végbe, amelyek kizárólag az antigént (B-sejt-epitópokat) felismerő B-sejtek és az MHC-II molekulákon bemutatott antigén-eredetű peptideket (T-sejt-epitópokat) felismerő aktivált CD4+ helper T-sejtek együttes jelenléte esetén alakulnak ki.

Érdekes módon az egészséges egyének egy része (4-5%) is hordoz ADAMTS13 elleni, vagy legalábbis *in vitro* körülmények között ADAMTS13 enzim kötésére képes antitesteket [60, 116]. Ez az arány egyes autoimmun betegségekben (SLE, APLS) szenvedő betegekben, illetve elhízott egyéneknél is magasabb (13-18%, illetve 20% körüli) [60, 180]. Ezek az antitestek nem képesek az ADAMTS13 funkciójának gátlására és jelenlétük nem jár együtt alacsonyabb ADAMTS13-antigénszinttel [60, 116, 180], de arra utal, hogy a TTP-ben nem szenvedő egyének egy része rendelkezik olyan B-sejtekkel, amelyek képesek lehetnek az ADAMTS13 enzim kötésére, internalizálására, és ennek megfelelően ADAMTS13-eredetű peptidek bemutatására is. Amennyiben ezek a B-sejtek az általuk bemutatott peptideket felismerő aktivált helper T-sejtekkel találkoznak, aktivációjukat követően a csíráközpont-reakció során olyan klónokat hozhatnak létre, amelyek nagyobb affinitású, potenciálisan kóros szerepű ADAMTS13-ellenes antitestek termelésére képesek.

A hivatásos antigénprezentáló sejtek közül nemcsak egyes B-sejtek, hanem a naiv CD4+ helper T-sejtek aktiválásában kulcsfontosságú dendritikus sejtek is képesek az ADAMTS13-enzim megkötésére és felvételére a mannóz-receptoron keresztül [181]. Ezenkívül a makrofágok is képesek az ADAMTS13 endocitózisára a CD163 scavenger-

receptoraikon keresztül, a dendritikus sejteknél jóval nagyobb hatásfokkal, de ennek jelentősége a naív T-sejtek aktiválása szempontjából nem tisztázott [182].

Az ADAMTS13-eredetű peptidek prezentálásának hatékonyságát az endocitózis mellett a peptideknek az egyén MHC-II molekuláihoz történő kötődésének erőssége is befolyásolja. Független munkacsoportok eredményei alapján a DRB1*11 (*1101 és 1104) és az ezzel kapcsolatos öröklődő DQB1*0301 allélok aránya magasabb, a DRB1*04 és az ezzel kapcsolatos DRB4 aránya pedig alacsonyabb az európai szerzett TTP-s betegek körében az egészséges populációhoz viszonyítva [183-186]. Az egyes DR és DQ allélok egymással, illetve az immunrendszer egyéb fehérjéit kódoló génekkel történő kapcsolatos öröklődése megnehezíti a fentiekhez hasonló asszociációs eredmények értelmezését és a HLA-DR-DQ haplotípus rizikófaktor, illetve protektív hatásért felelős fehérje, illetve genetikai elem azonosítását.

Egy, genomszerte számos SNP-re kiterjedő, immunochip-alapú asszociációs vizsgálat eredményei alapján a HLA lókusztban, a DRA és DRB5 között elhelyezkedő rs6903608 SNP korrelált legerősebben a TTP kialakulásával [187]. A vizsgálatban a feltehetően azzal egy haplotípuson elhelyezkedő DRB1*11, DQB1*0301 és DQA1*0505 is pozitívan korrelált a rizikóval, de az rs6903608 SNP hatása ezekétől függetlennek bizonyult [187]. A rizikófaktor tulajdonsága háttérben a fenti SNP-nek más HLA-, illetve T-sejt-receptor-gének expresszióját befolyásoló (eQTL) hatása állhat [187].

Mindazonáltal számos eredmény utal bizonyos MHC-II molekuláknak a TTP patomechanizmusában játszott közvetlen szerepére. Kimutatták, hogy a DRB1*11-pozitív egyének monocitáiból differenciáltatott, ADAMTS13-mal inkubált dendritikus sejtek mind az ADAMTS13 enzim CUB2 doménjének azonos core-szekvenciával (FINVAPHAR) rendelkező peptidjeit prezentálták [188]. A DRB1*03 allélt hordozó dendritikus sejtek elsősorban egy másik, szintén CUB2-eredetű peptidet (ASYILIRD) prezentáltak [188]. A fenti peptidek prezentációjának jelentőségét alátámasztja, hogy egy DRB1*11-hordozó TTP-s betegben a FINVAPHAR peptidre, egy DRB1*03-pozitív betegben pedig az ASYLIRD peptidre aktivációval reagáló CD4+ T-sejtek jelenlétét sikerült igazolni [189]. A szintén CUB2 domén eredetű ADAMTS13¹²³⁹⁻¹²⁵³ peptidet DRB1*01 allélt hordozó dendritikus sejtek képesek bemutatni, a peptidet egy DRB1*01-pozitív TTP-s beteg CD4+ T-sejtei felismerték [190].

Más HLA-DR molekulák is képesek lehetnek ADAMTS13-eredetű peptidek prezentálására, elsősorban magasabb antigénkoncentráció mellett [188, 191]. A DQ molekulák is képesek lehetnek ADAMTS13-eredetű peptidek bemutatására, az általuk prezentált peptidek spektruma részben átfed a DR molekulákon bemutatott peptidekével, de annál szűkebb [191]. Magasabb antigénkoncentrációk esetén is csak a sejtek közel fele prezentált ADAMTS13-eredetű peptideket DQ molekulákon keresztül [191]. A prezentált ADAMTS13-eredetű peptidek alacsony számának háttérében feltehetően az ADAMTS13 nem elég hatékony felvétele áll [191].

A dendritikus sejtek mannóz-receptora az ADAMTS13 glikánjait ismeri fel, így azok módosulásai (deglizoziláció, hiperglizoziláció) befolyásolhatják a dendritikus sejtek általi endocitózis hatékonyságát [181]. A megváltozott glizoziláció a peptidek prezentációját és antigenitását is megváltoztathatja, de a glizozilált peptidek bemutatására vonatkozó ismereteink egyelőre hiányosak [191].

A CD4+ helper T-sejtek aktivációjához az MHC-II molekulákon hatékonyan bemutatott peptidek felismerésén túl az antigénprezentáló sejtek felszínén kifejezett kostimulátor molekulák is szükségesek. A dendritikus sejtek számos patogén-asszociált molekuláris mintázatot felismerő receptorral rendelkeznek (ilyenek a toll-like receptorok (TLR) is), ezek aktiválása fokozza az antigénprezentáció hatékonyságát és a kostimuláció erősségét. Fertőzés esetén az aktivált dendritikus sejtek ennek megfelelően az ADAMTS13-eredetű peptidek hatékonyabb prezentációjára is képessé válhatnak, elősegítve a peptidekre specifikus CD4+ helper T-sejtek bystander-aktivációját. Érdekes módon két TLR9 SNP gyakoribb (elsősorban a DR11-negatív) TTP-s betegek körében, ami fokozhatja a dendritikus sejtek aktivációját bizonyos fertőzések esetén [192].

Az is elképzelhető, hogy egyes fertőzések során olyan, mikrobiális peptidekre specifikus T-sejtek aktiválódnak, amelyek a bemutatott ADAMTS13-peptideket is képesek felismerni, és ez a keresztreakció biztosítja az ADAMTS13 enzimet felismerő B-sejtek aktivációjához szükséges stimulust (molekuláris mimikri) [193]. A TTP-s epizódokat valóban gyakran előzik meg különféle fertőzések [192]. Ezek egyrészt fennálló ADAMTS13 deficiencia mellett az endotélsejtekből történő ULVWF-felszabadulás útján vezethetnek TMA kialakulásához, azonban a fent ismertetett

mechanizmusok révén szerepet játszhatnak az ADAMTS13-deficienciát előidéző antitestválasz kiváltásában is.

Fontos megemlíteni, hogy a szerzett TTP-s betegek túlnyomó többsége (75-80%) nő [22, 72, 194], ami arra utal, hogy a női nem szintén növeli a betegség kialakulásának kockázatát, ám a rizikófaktorok pontos mechanizmusa – és a HLA-DR-DQ haplotípusok jelentősége az egyes nemek esetén – egyelőre nem tisztázott.

A nyugat-európai regiszterek tanúsága szerint a TTP gyakrabban fordul elő feketékben, mint kaukázusiakban [22, 72, 194, 195], amit részben magyarázhat a feltehetően protektív HLA-DRB1*04 allél ritkább előfordulása körükben [195].

Érdemes megemlíteni, hogy a HLA-allélok gyakorisága az európai kaukázusi populáción belül is mutat regionális különbségeket [196-198]. Mivel egy asszociációs vizsgálat elsősorban a populációban gyakoribb allélok vizsgálatára alkalmas, ezért eltérő populációk vizsgálata más-más allélok esetleges rizikófaktor- vagy rizikócsökkentő szerepére deríthet fényt.

Az egyes HLA-allélok mellett a *PTPN22* gén c.1858C>T polimorfizmusának gyakorisága is jellegzetes földrajzi különbségeket mutat [199]. Ennek megfelelően érdemes lehet megvizsgálni a polimorfizmus kapcsolatát a szerzett TTP kialakulásának kockázatával annak ellenére, hogy egy korábbi vizsgálatban nem találtak különbséget a szerzett TTP-s betegek és egészséges egyének csoportjai között a minor allélt hordozók aránya tekintetében [184]. Elképzelhető az is, hogy a polimorfizmus hatását a genetikai háttér – többek között eltérő MHC allélok hordozása – befolyásolhatja. A *PTPN22* polimorfizmus és a HLA-DR és DQ allélok kapcsolatát még nem vizsgálták szerzett TTP-ben.

Az antitestkeletkezés szempontjából fontos távlatokat nyitott az a nemrégiben tett felismerés, hogy az ADAMTS13 működése során konformációváltozást szenved [113, 114], felfedve addig rejtett epitópokat. A TTP akut szakában az ADAMTS13-enzimek döntően nyitott konformációban vannak [200], újabb, még nem publikált eredmények alapján a konformációváltásban egyes ADAMTS13-elleni antitestek is szerepet játszanak. Elképzelhető, hogy ezek az ún. nyitó antitestek fontos szerepet játszanak abban, hogy az ADAMTS13 enzim rejtett doménjei elérhetővé válnak az immunrendszer számára, így lehetővé téve a spacer domén meghatározott epitópja

elleni immunválasz beindulását és ezáltal a TTP-ben kóroki szerepű gátló antitestek keletkezését.

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek keletkezése mellett szintén keveset tudunk az autoantitest-válasz időbeli változásairól. Pedig a relapszusok és azok kezelése során – illetve az antigén tartós jelenléte miatt akár remisszió alatt is – az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz bizonyos változásokon mehet keresztül, amely érintheti az autoantitestek mennyiségét, alosztályeloszlását, affinitását és – ezeken keresztül – gátló hatásuk erősségét is.

A fentiekén túl megválaszolandó kérdés az is, hogy a betegségre hajlamosító genetikai faktorok hordozása az autoantitestek kialakulásának esélyén kívül vajon az autoantitest-válasz bizonyos mennyiségi vagy minőségi jellemzőire is hatással van-e?

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. A szerzett TTP kialakulásának kockázatát befolyásoló genetikai tényezők vizsgálata

Első vizsgálatunkban azt a célt tűztük ki, hogy:

1. Megvizsgáljuk az egyes HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulásának kockázatára gyakorolt hatását a magyar populációban.

Ennek érdekében meghatároztuk és összehasonlítottuk az egyes HLA-DR-DQ haplotípusokat hordozó egyének arányát magyar szerzett TTP-s betegek és egészséges magyar kontrollszemélyek egy-egy csoportjában.

2. Megvizsgáljuk az egyes HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulásának kockázatára gyakorolt hatását külön a nők, illetve a férfiak körében.

E célból az 1. pontban leírt összehasonlításokat nemek szerinti bontásban is elvégeztük.

3. Megvizsgáljuk a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmusnak a szerzett TTP kialakulásának kockázatára gyakorolt hatását a magyar populációban.

Ehhez a – más autoimmun betegségekben rizikófokozó hatásának bizonyult – ritka *PTPN22* c.1858T allélt hordozó szerzett TTP-s betegek és egészséges kontrollszemélyek arányát állapítottuk meg és hasonlítottuk össze.

4. Megvizsgáljuk, hogy hogyan befolyásolja a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus a HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulásának kockázatára kifejtett hatását.

Ennek érdekében összehasonlítottuk a szerzett TTP-s betegek és egészséges kontrollszemélyek arányát a ritka *PTPN22* c.1858T allél, valamint a rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása alapján képzett csoportokban.

2.2. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz jellemzőinek vizsgálata

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek túlnyomó része az IgG osztályba tartozik, IgG izotípusú ADAMTS13-ellenes autoantitestek gyakorlatilag minden TTP-s betegen kimutathatóak a betegség akut szakában, illetve a betegek egy részében remisszióban is.

Ennek megfelelően második vizsgálatunkban azt a célt tűztük ki, hogy:

1. Meghatározzuk és összehasonlítsuk az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációját, alosztályeloszlását és gátló hatását szerzett TTP-s betegek különböző stádiumokban – az első akut epizód során, relapszusban és remisszióban – vett mintáiban.
2. Megvizsgáljuk az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek alosztályeloszlásának szerepét az ADAMTS13-gátló hatás kifejtésében.

Ennek érdekében egyrészt megvizsgáltuk az egyes IgG alosztályokba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek koncentrációjának kapcsolatát az ADAMTS13-gátlás erősségével, másrészt közvetlenül összehasonlítottuk eltérő alosztályeloszlású de azonos ADAMTS13 elleni IgG-koncentrációjú hígított betegminták gátló hatását.

3. Megvizsgáljuk a HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása és az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz jellemzői közötti kapcsolatot.

E célból összevetettük az ADAMTS13 elleni IgG autoantitesteknek a rizikófaktor, illetve rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusokat hordozó, illetve nem hordozó TTP-s betegek csoportjaiban mért koncentrációját és alosztályeloszlását.

3. MÓDSZEREK

3.1. Beteg- és mintabeválasztási kritériumok

3.1.1. A TTP diagnosztikai kritériumai és a TTP-HUS regiszter

Laboratóriumunkban 2007 augusztusa óta zajlik trombotikus mikroangiopátiás betegek differenciáldiagnosztikája. A diagnosztikus mérések elvégzése céljából laboratóriumunkba érkezett mintákat ez idő óta tároljuk, a vizsgált betegek és minták adatait pedig egy regiszterben (TTP-HUS regiszter) rögzítjük. A dolgozat alapját képező kutatásokba a betegeket és mintákat a regiszterben szereplők közül válogattuk be a későbbiekben részletezett kritériumok alapján.

A szerzett TTP diagnózist az alábbi kritériumok alapján állítottuk fel:

- 1) trombocitopénia (150 G/L alatti trombocitaszám)
- 2) mikroangiopátiás hemolitikus anémia (csökkent hemoglobinszint, emelkedett LDH, negatív Coombs-teszt, fragmentociták a perifériás vérkenetben)
- 3) deficiens ADAMTS13-aktivitás (<10% az alább részletezett FRET esszével meghatározva)
- 4) kimutatható ADAMTS13-inhibitorok (funkcionális, keveréses vizsgálattal) vagy ADAMTS13-ellenes IgG autoantitestek (ELISA módszerrel)

Az első két kritérium éppen zajló trombotikus mikroangiopátiára utal, azaz a négy kritérium együttes teljesülése a TTP akut szakára jellemző; a második két kritérium ezzel szemben remisszióban lévő TTP esetén is teljesülhet. Egyes esetekben a korábban lezajlott trombotikus mikroangiopátia (1. és 2. kritérium) miatt kivizsgált beteg diagnózist remisszióban állítottuk fel igazolható ADAMTS13-deficiencia és kimutatható inhibitorok (3. és 4. kritérium) alapján.

A laboratóriumunkba küldött minták között ennek megfelelően voltak akut szakból és remisszióból származó minták is. Az akut szakból származó minták nagyobbik hányada a terápia (plazmaferézis) megkezdése előtt lett levéve, kisebbik hányaduk esetén a mintavétel a zajló kezelés mellett, az aznapi plazmaferézis előtt történt. A komplett remissziót (röviden: remisszió) akkor mondtuk ki, ha a trombocitaszám a kezelés felfüggesztésétől számítva 30 napon keresztül a normáltartományban volt és nem

jelentkeztek új tünetek. A remisszió elérését követő újabb TTP-s akut epizódokat neveztük relapszusnak.

A laboratóriumunkba küldött vérminták perifériás vénából vagy centrális vénás kanülből lettek véve. Rövid szállítási idő esetén a vérmintákat hűtött csomagokban, 4°C-os hőmérsékleten szállították laboratóriumunkba, majd a vérsejteket és a savót vagy plazmát centrifugálással választottuk el. Hosszabb szállítási idő esetén a centrifugálás a mintavételi hely szerinti laboratóriumban történt, a szeparált vérsejteket, savót, illetve plazmát fagyasztva, -20°C-os hőmérsékleten szállították laboratóriumunkba. A szérum-, illetve plazmamintákat alikvotok formájában -70°C-on tároltuk a mérések elvégzéséig.

A vizsgálatokat a Helsinki Nyilatkozatban rögzített elveknek megfelelően végeztük, a minták felhasználása a betegek írásos, tájékozott beleegyezésével történt, a vizsgálatot (*A trombotikus mikroangiopátiák etiopatogenezisének komplex vizsgálata*) az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta.

3.1.2. A HLA-DR-DQ haplotípusok és a PTPN22 c.1858C>T polimorfizmus vizsgálatába bevont betegek és kontrollszemélyek

A HLA-DR-DQ haplotípusok és a PTPN22 gén c.1858C>T polimorfizmusának vizsgálatához a betegbeválogatás 2015 júliusában zárult le, ekkor 84 igazolt szerzett TTP-s beteg szerepelt a regiszterünkben. A fenti betegek közül 76 esetében állt rendelkezésünkre, vagy volt utólag elérhető a DNS-izoláláshoz szükséges EDTÁ-val antikoagulált teljes vérminta. A 76 betegből egy beteget zártunk ki délkelet-ázsiai származása miatt, mivel a HLA-DR-DQ haplotípusok eloszlása eltérő etnikai és földrajzi eredetű populációkban jelentős különbségeket mutat. A vizsgálatba bevont 75 beteg mindegyike Magyarországról (73 fő) vagy környező közép-európai országokból (1 fő Horvátországból, 1 fő Szlovákiából) származott. A HLA-DR-DQ vizsgálatához kontrollként 204 egészséges személy (csontvelőtranszplantáció előtt álló gyermekek szülei (106 fő), illetve családvizsgálatban részt vevő szülők (98 fő)[202]) adatai szolgáltak. A HLA-DR eredmény az összes kontroll (204 fő) esetében elérhető volt, a HLA-DQ eredmény pedig a betegek egy alcsoportjában (162 fő) volt ismert. A

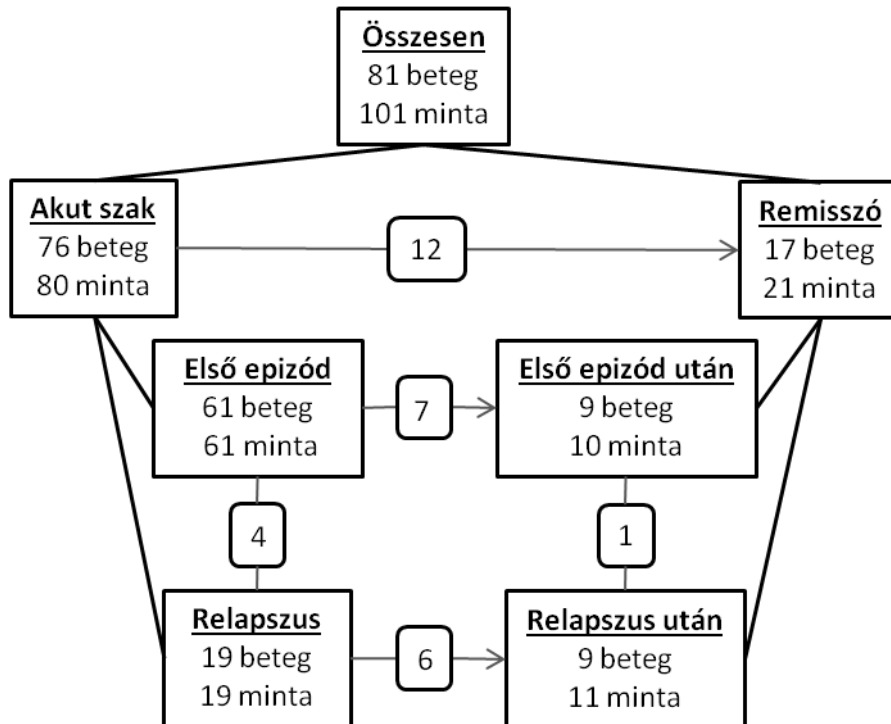
PTPN22-polimorfizmus vizsgálatához 169 kontrollszemély esetén rendelkezünk a szükséges mintával.

3.1.3. Az ADAMTS13-ellenes autoantitestek alosztályeloszlásának és gátló hatásának vizsgálatába bevont betegek és minták

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek alosztályeloszlásának és gátló hatásának vizsgálatát 81 szerzett TTP-s beteg 101 ADAMTS13-ellenes IgG-t tartalmazó mintájában végeztük el. A betegbeválasztás 2017 márciusában zárult, a regiszterünkben ekkor szereplő 113 szerzett TTP-s beteg összes ADAMTS13-deficiens (és néhány nem deficiens) mintájában elvégeztük az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek meghatározását, amely 109 betegminta esetében bizonyult pozitívnak. Ez utóbbi mintákban kíséreltük meg az alosztályeloszlás vizsgálatát, amely 101 minta esetén volt sikeres, 8 mintában túl alacsony volt az autoantitestek koncentrációja az alosztályeloszlás meghatározásához. Az alosztályeloszlás tekintetében vizsgált 101 minta 81 TTP-s beteghez tartozott, a betegek és minták betegségstádiumok szerinti megoszlását a **4. ábra** mutatja.

A 101 minta közül 100 esetében volt deficiens az ADAMTS13-aktivitás, ezek közül 97 elérhető minta esetén keverékes vizsgálatot (lásd a módszerek leírásánál) végeztünk az ADAMTS13-inhibitorok kimutatása céljából. Az autoantitestek fajlagos gátló hatását azokban az akut mintákban vizsgáltuk, amelyekben az IgG4 aránya 70% feletti (19 minta) vagy 30% alatti (16 minta) volt, illetve az összes elérhető remissziós mintában (14 minta, mind IgG4-domináns).

Mintatípusok száma betegségstádium szerint



4. Ábra. Az alosztályeloszlás vizsgálatához beválogatott TTP-s betegek és minták eloszlása betegségstádiumok szerint. Az egyes csoportok közös betegeinek a számát az összekötő vonalakon, szövegdobozokban jelöltem.

3.2. Alkalmazott módszerek

A módszerek ismertetését a szerzett TTP diagnózisának felállításához szükséges tesztek bemutatásával (ADAMTS13-aktivitásmérés, funkcionális ADAMTS13-inhibitor-meghatározás, ADAMTS13-ellenes IgG ELISA) kezdem, majd a többi módszert a vizsgálatok időbeli sorrendjében mutatom be. Az általunk beállított módszerek menetét részletesebben ismertetem, a széles körben ismert és használt módszerek esetén a részletek tekintetében utalok a protokollt leíró publikációkra, gyári kitek esetén a kit leírására.

3.2.1. Az ADAMTS13-enzimaktivitás mérése

Az ADAMTS13-enzimaktivitás meghatározása fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer (FRET) elven történt [52, 203], a FRET-S-VWF73 (Peptides International Inc., Louisville, KY, USA) szubsztrát felhasználásával.

A fenti szubsztrátot az ADAMTS13 enzim specifikusan képes felismerni és hasítani, a hasítási hely két oldalára egy fluoreszcens molekula, illetve egy elnyelő (quencher) molekula van szintetizálva. Ha a szubsztrát hasítatlan formában van jelen, a fluoreszcens molekula gerjesztése esetén nem detektálható kibocsátott sugárzás, mivel azt a közeli quencher molekula elnyeli. A szubsztrát hasítása esetén a két molekula térben távol kerül egymástól, így a fluoreszcens molekula által kibocsátott sugárzás mérhetővé válik. A kinetikus mérés időtartama során az ADAMTS13 enzim egyre több FRET-S-VWF73 szubsztrátot hasít el, így a fluoreszcens molekula gerjesztése esetén annak kibocsátási hullámhosszán egyre erősebb jelintenzitás detektálható. Az intenzitást a mérés kezdete óta eltelt idő függvényében ábrázolva egyeneseket kapunk, amelyek meredekségéből lehet következtetni a mintában mérhető ADAMTS13-aktivitásra.

A mérés során a vizsgálandó kontroll és betegmintákat a reakciópufferben (5 mM Bis-Tris, 25 mM CaCl₂, 0,005% Tween-20, pH 6,0) 1:25 arányban hígítottuk, valamint a 100% névleges ADAMTS13-aktivitású poolozott normál citrátos plazmamintából az 1:25-ös hígítástól (100%) kezdődően 5 lépcsős hígítási sort készítettünk 1:400-as hígításig (6,25%), a hígítási sor 6. eleme a 0%-os névleges aktivitású reakciópuffer volt. Pozitív kontrollként egy egészséges egyén mintáját, negatív kontrollként pedig egy szerzett TTP-s beteg deficiens (0%) aktivitású, magas ADAMTS13 elleni autoantitest-titerű mintáját használtuk. A hígított kalibrátorokból, kontrollokból és betegmintákból 20-20 µL-t egy 384-lyukú fehér mikrolemez megfelelő lyukaiba pipettáztunk, hozzáadtuk a reakciópufferben 1:20 arányban hígított (5 µM végkoncentrációjú) FRET-S-VWF73 szubsztrát 20-20 µL-ét, majd a lemezt a 37°C-ra előmelegített mérőműszerbe (Chameleon microplate reader, Hidex, Turku, Finnország) helyeztük. A kinetikus mérés egy órán keresztül, percenkénti leolvasással zajlott 37°C-on, 340 nm-es gerjesztési és 460 nm-es kibocsátási hullámhosszon. A további kiértékelést a GraphPad Prism 5 (GraphPad Softwares Inc., La Jolla, CA, USA) statisztikai programmal végeztük. A kapott egyenesek meredekségét meghatároztuk, majd a kalibrátorok meredekségi értékeit az ismert ADAMTS13-aktivitásuk függvényében ábrázoltuk, az így előállt kalibrációs görbe alapján határoztuk meg a betegminták meredekségéből azok ADAMTS13-aktivitását.

3.2.2. Az ADAMTS13-inhibitorok kimutatása funkcionális vizsgálattal

Az ADAMTS13 elleni gátló autoantitestek (inhibitorok) kimutatását deficiens ADAMTS13-aktivitás esetén végeztük. A beteg tömény citrátos plazmamintájának 50 µL-ét összekevertük 50 µL poolozott normál citrátos plazmával, majd a kevert minta, a tömény betegminta, illetve a poolozott normál citrátos plazmaminta 100-100 µL-ét 37°C-on 2 órán át rázóasztalon inkubáltuk. Ezt követően az inkubált minták aktivitását a 3.2.1. pontban részletezett módon meghatároztuk, majd egy szorzóval úgy korigáltuk, hogy az inkubált normál citrátos plazmaminta aktivitása 100% legyen. Ebben az esetben az inkubált tömény betegminta aktivitásának deficiensnek, az eredetileg mért aktivitással megegyezőnek kellett lennie, a kevert minta aktivitása pedig a betegmintában lévő szabad inhibitorok jelenlétéről és a gátlás erősségéről tájékoztatott. Az inhibitorok teljes hiánya esetén (pl. mutáció miatt hiányzó enzim veleszületett TTP-ben) a 0%-os betegminta és a 100%-os normál minta 1:1 arányú keverékében 50%-os enzimaktivitás mérhető. A beteg mintájában főlegesen jelen lévő inhibitorok a normál plazmában jelen lévő ADAMTS13 enzimek gátlása által 50% alatti enzimaktivitást eredményeznek. Minél erősebb a gátlás a betegmintában, annál alacsonyabb a kevert minta ADAMTS13-aktivitása. Diagnosztikus vizsgálataink során a kevert minta 40% alatti aktivitása esetén beszéltünk kimutatható szabad ADAMTS13-inhibitorokról.

3.2.3. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek kimutatása ELISA módszerrel

Az IgG osztályú ADAMTS13-ellenes autoantitestek koncentrációját antigénkötésük alapján, ELISA módszerrel határoztuk meg, a gyári Technozym ADAMTS13-Inh® kit (Technoclone GmbH, Bécs, Ausztria) segítségével. A gyártó ajánlása alapján a 15 U/mL feletti antitestkoncentrációkat tekintettük pozitívnak.

3.2.4. DNS-izolálás

A DNS izolálása EDTÁ-val antikoagulált teljes vérből történt kisózással módszerrel, a Miller és mtai által publikált protokoll alapján [204].

3.2.5. HLA-típusozás és a HLA-DR-DQ haplotípusok predikciója

A HLA-DR és HLA-DQ allélok alacsony felbontású meghatározását az Országos Vérellátó Szolgálat Transzplantációs Immunogenetikai Laboratóriumában végezték

szekvensziaspecifikus oligonukleotid- hibridizációs módszerrel (One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

A családvizsgálatban szereplő 98 kontrollszemély esetében a HLA-DR-DQ haplotípusokat a családtagok HLA-DR és HLA-DQ eredményeinek ismeretében a szegregáció alapján határoztuk meg. A további 64 HLA-DR és HLA-DQ eredményekkel egyaránt rendelkező kontrollszemély és a 75 szerzett TTP-s beteg haplotípusait a Phase (v2.1) [205, 206] program segítségével prediktáltuk. A prediktált haplotípusokat 95%-os valószínűség felett fogadtuk el.

3.2.6. A *PTPN22* gén c.1858C>T polimorfizmusának vizsgálata

A *PTPN22* gén c.1858C>T polimorfizmusát az érintett DNS szakasz polimeráz láncreakcióval (PCR) történő megsokszorozását követően RFLP (restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus) módszerrel vizsgáltuk. A PCR-hez az alábbi primerpárt alkalmaztuk: 5'-GCCTCAATGAACTCCTCAA-3' (forward) és 5'-CCTCCTGGGTTTGTACCTTA-3' (reverse) (Laddha és mtsai cikke alapján [207]). A PCR-mix összetétele a következő volt: 0,5 µM mind a reverse, mind a forward primerből, 0,2 mM dNTP, 0,035 U/µL DNS-polimeráz (GoTaq G2 Flexi; Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1 mM MgCl₂, 0,5-szörös töménységű Q-oldat (Qiagen GmbH, Hilden, Németország), 1-szeres töménységű reakciópuffer (Green GoTaq Flexi Buffer; Promega Corporation, Madison, WI, USA), és hozzávetőlegesen 1 ng/µL DNS-minta. A reakcióelegy összterfoga 10 µL volt mintánként. A denaturáció 95°C-on, a kapcsolódás (annealing) 58°C-on, az extenzió pedig 72°C-on zajlott. A kezdeti, 15 perces denaturációs lépést követően 35 ciklus ment végbe, a denaturáció 15 másodpercig, a kapcsolódás és az extenzió pedig 30-30 másodpercig zajlott, a ciklusokat egy 10 perces végső extenziós lépés követte.

Az RFLP során a 400 bázispár méretű PCR-terméket 0,5 U/µL RsaI enzimmel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) egy éjszakán át emésztettük. A PCR-termék 2 kontroll hasítási helyet tartalmazott, így a vad típusú termék összesen 3 helyen hasadva 4 fragmenst eredményezett, melyek hossza 13, 228, 44, illetve 115 bázispár volt. A minor allélt tartalmazó PCR-termék 2 helyen, azaz 3 fragmensre hasadt, amelyek 13, 272 és 115 bázispár hosszúságúak voltak. Az emésztett PCR-terméket az elektroforézis

során 2%-os agarózgélben futtattuk, és a GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) festékekkel tettük láthatóvá.

3.2.7. Az IgG izotípusú ADAMTS13-ellenes autoantitestek alosztályeloszlásának meghatározása

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek alosztályeloszlásának meghatározását ELISA módszerrel végeztük. A betegek mintáit rekombináns ADAMTS13-mal fedett mikrolemezekben inkubáltuk, majd az egyes IgG alosztályokba tartozó autoantitesteket alosztályspecifikus másodlagos antitestek segítségével detektáltuk. Hogy a másodlagos, konjugált antitestek eltérő affinitása és az antitestekhez kapcsolt enzimek eltérő aktivitása ne torzítsa a mérési eredményeinket, az alosztályok nyers abszorbanciaértékeit (optikai denzitás, OD) nem közvetlenül egymáshoz viszonyítottuk, hanem az adott alosztályhoz tartozó kalibrációs görbék alapján határoztuk meg az egyes alosztályokba tartozó lekötődött autoantitestek mennyiségét.

A kalibrációs görbék előállításához kalibrátorlemezeket készítettünk az alábbi módon. Ismert alosztályú humán IgG molekulákból (Abcam Plc, Cambridge, Egyesült Királyság; katalógusszámok: IgG1 - ab90283, IgG2 - ab90284, IgG3 - ab118426, IgG4 - ab90286) 9,8-as pH-jú bikarbonátoldatban felező hígítási sorokat készítettünk 1 µg/mL koncentrációtól 15,6 ng/mL koncentrációig, a hígítási sor utolsó eleme egy bikarbonátoldatot tartalmazó vak volt (0 ng/mL). A hígítási sorokat egy 96-lyukú, lapos aljú polisztirol mikrolemezben (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Ausztria) állítottuk elő 100 µL/lyuk végtérfogatban, alosztályonként két-két párhuzamos hígítási sort készítettünk. A kalibrátorlemezt egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, majd a mérést megelőzően szobahőmérsékletre melegítettük. Ezt követően a lemezeket 200 µL/lyuk térfogatú mosóoldat (a Technozym ADAMTS-13 Inh® kit mosóoldata) hozzáadásával egy alkalommal mostuk, majd 110 µL/lyuk blokkolóoldat (0,5% m/v zselatin – PBS) hozzáadásával 50 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. **(5. ábra, 1-2. panel)**

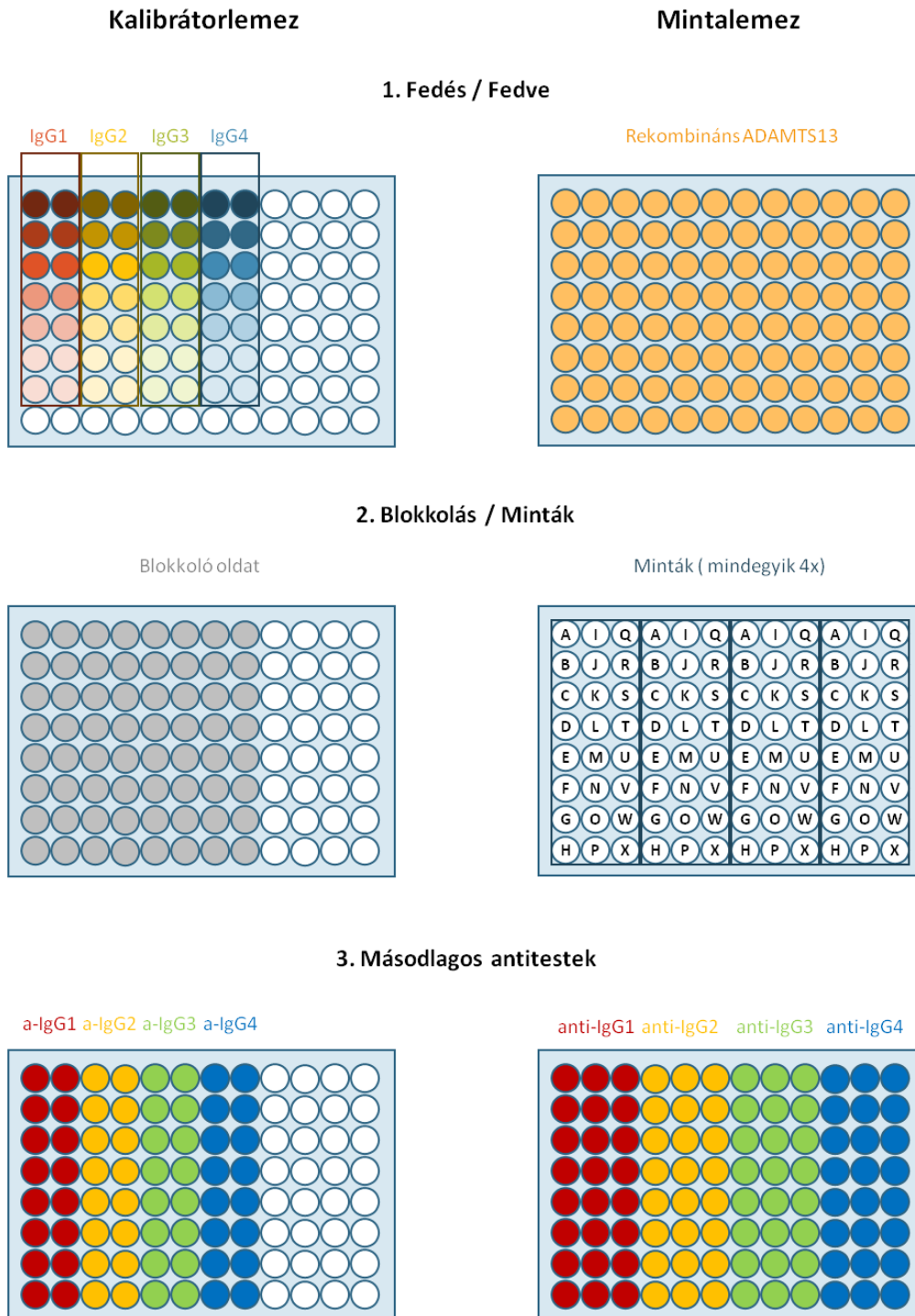
A vizsgálandó betegmintákat a Technozym ADAMTS-13 Inh® kit mintahígító oldatával a kívánt mértékben hígítottuk. A hígítás mértékét az ADAMTS13-ellenes IgG (Technozym ADAMTS-13 Inh® kit segítségével korábban meghatározott) koncentrációja szerint határoztuk meg előkísérletek tapasztalatai alapján: 100 U/mL

alatti antitestkoncentráció esetén 12,5-szeres, 100 és 200 U/mL közötti koncentráció esetén 20-szoros, 200 feletti koncentráció esetén 50-szeres vagy 100-szoros kezdeti hígításokat alkalmaztunk. A hígítás optimális mértéke függött az autoantitestek alosztályeloszlásától is, ezért több esetben a mérést egy másik koncentrációban meg kellett ismételnünk. A hígított mintákban az ADAMTS13-ellenes IgG autoantitestek végkoncentrációja 2 és 10 U/mL közötti tartományban volt. A hígított betegminták 100-100 µL-ét a Technozym ADAMTS-13 Inh® esszé rekombináns ADAMTS13-mal fedett lemezének 4-4 lyukába pipettáztuk – a négy IgG-alosztálynak megfelelően – majd a lemezt egy órán keresztül (a kalibrátorlemez mosásával és blokkolásával egyidejűleg) szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációs idő leteltét követően a kalibrátorlemezt 3 alkalommal, a mintákat tartalmazó mikrolemezt pedig 5 alkalommal mostuk 200 µL/lyuk mosóoldat hozzáadásával. **(5. ábra, 1-2. panel)**

Ezt követően az alosztályspezifikus másodlagos, torna-peroxidázzal (HRP) jelölt egér anti-humán (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA; katalógusszámok: IgG1 - 9054-05, IgG2 - 9060-05, IgG3 - 9210-05, IgG4 - 9200-05) antitesteket adtuk hozzá a kalibrátorlemez és a mintalemez (a négy azonos minta egyikét tartalmazó) megfelelő oszlopaihoz. Az anti-IgG1 és anti-IgG2 antitesteket 1'000-szeres, az anti-IgG3 antitestet 10'000-szeres, az anti-IgG4 antitestet 5'000-szeres hígításban alkalmaztuk. (Előkísérletek tanúsága alapján az alkalmazott koncentrációkban a másodlagos antitestek csak a megfelelő alosztályú antitesteket ismerték fel, keresztreakciót, vagyis a többi alosztályba tartozó antitestekhez történő érdemi kötődést nem tapasztaltunk.) A hígítást a Technozym ADAMTS-13 Inh® kit mintahígító oldatával végeztük, a hígított másodlagos antitestek 100 µL-ét pipettáztuk a megfelelő lyukakba **(5. ábra, 3. panel)**. A lemezeket egy órán keresztül inkubáltuk, majd mindkét lemezt 6 alkalommal mostuk a fent ismertetett módon.

Ezután 100 µL/lyuk kromogén szubsztátot (Tetramethylbenzidine (TMB), Novex® TMB by Life Technologies, Frederick, MD, USA) adtunk a lemezekhez, majd a megfelelő szín elérése után a reakciót 50 µL/well 4N H₂SO₄ hozzáadásával leállítottuk. Az egyes másodlagos antitestek előhívása során a színreakció kinetikája eltérő volt, ennek megfelelően különböző előhívási időket alkalmaztunk (IgG1 – 8 perc, IgG2 – 5 perc, IgG3 – 1,5 perc, IgG4 – 1,5 perc), de a kalibrátorlemez és a mintákat tartalmazó lemez azonos másodlagos antitestekkel jelölt oszlopaikat szigorúan azonos ideig hívtuk

elő. Az abszorbanciaértékeket 450 nm-es hullámhosszon határoztuk meg 620 nm-es referencia-hullámhossz mellett.



5. Ábra. Az ismert alosztályú antitestek, minták és másodlagos antitestek elhelyezése az ELISA lépései során.

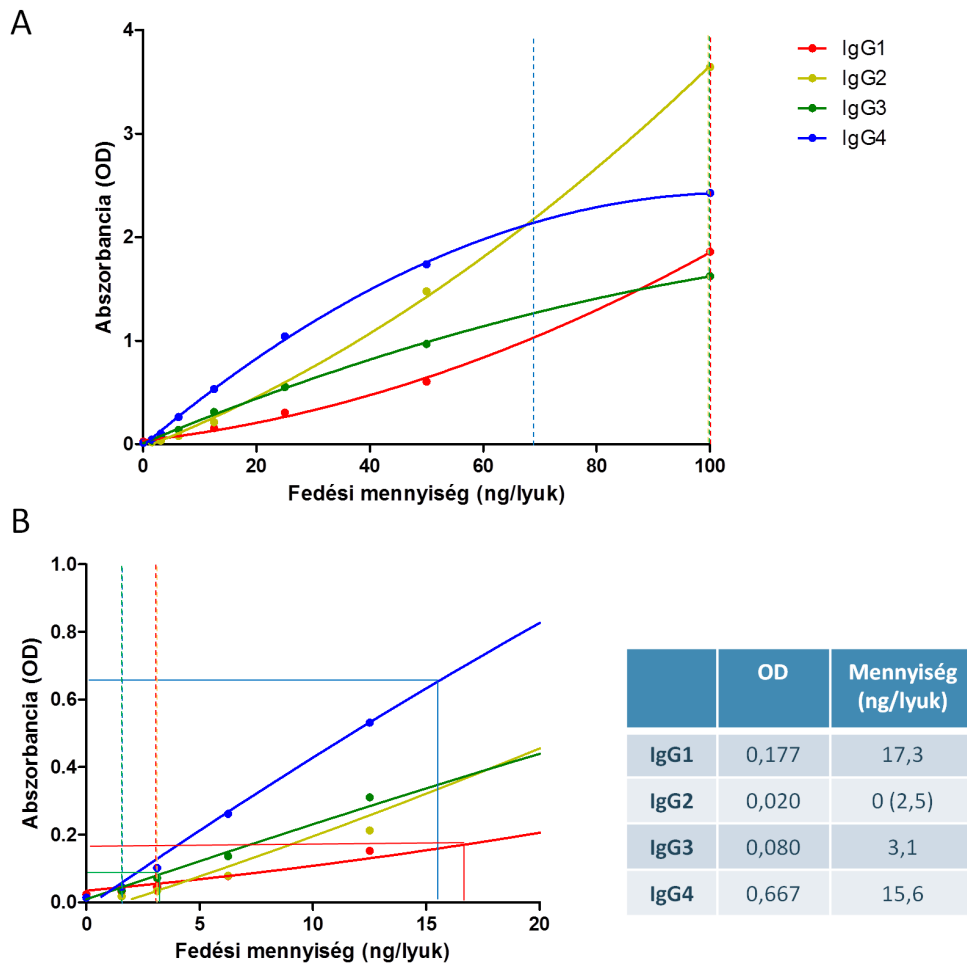
A kalibrátorlemezen található kalibrátorok meghatározott abszorbanciaértékeit a standardok ismert antitest-koncentrációjának függvényében ábrázolva alosztályspecifikus kalibrációs görbéket készítettünk (**6. ábra, A panel**), majd a minták abszorbanciaértékeiből a megfelelő kalibrációs görbe alapján meghatároztuk a vizsgált alosztályba tartozó lekötődött autoantitestek mennyiségét (**6. ábra, B panel**).

A kalibrációs görbék alapján meghatároztuk az egyes alosztályokhoz tartozó alsó és felső értékelhetőségi határokat: előbbit a legalacsonyabb, vaktól eltérő kalibrátor koncentrációjaként definiáltuk, utóbbinak a kalibrátor görbe legalább 0,02 OD/ng meredekségű, közel lineáris szakaszának legmagasabb pontját tekintettük. Az értékelhetőség alsó határa alatti értékeket nullának tekintettük. Amennyiben valamelyik alosztályhoz tartozó érték az értékelhetőség felső határánál magasabb volt, nem tudtunk értéket hozzárendelni, az adott minta esetében a mérést nagyobb hígításban megismételtük (mind a négy alosztályra nézve).

Minden minta esetében összeadtuk az egyes alosztályba tartozó lekötődött autoantitestek mennyiségét, majd az alosztályspecifikus értékeket a lekötődött autoantitestek összmennyiségével osztva határoztuk meg a mintában található ADAMTS13-ellenes IgG autoantitestek százalékos alosztályeloszlását (**7. ábra, A panel**).

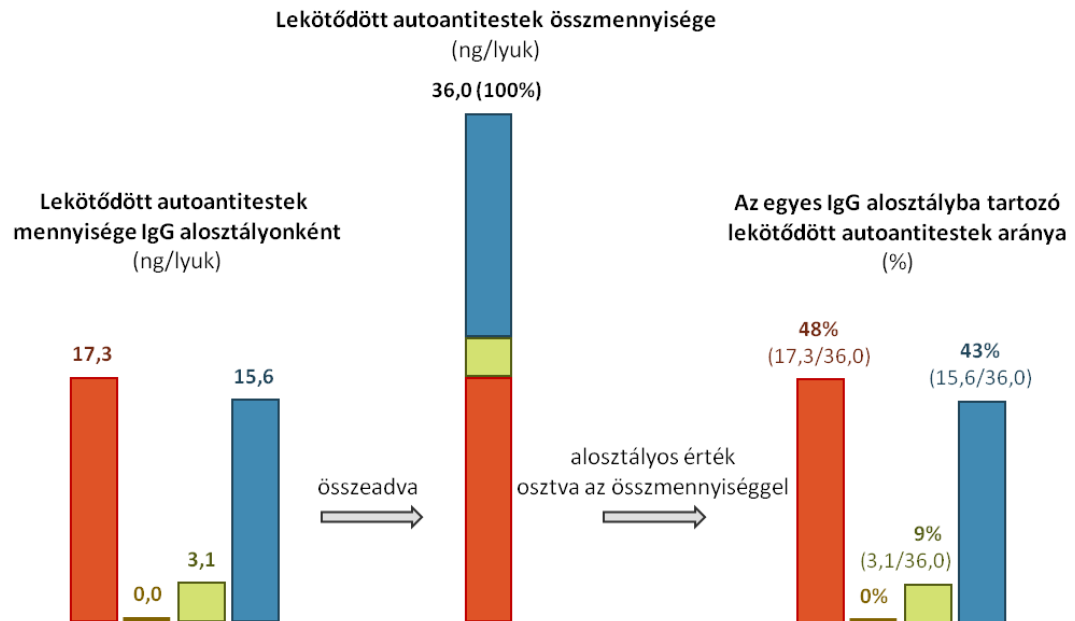
A mintákban az egyes IgG alosztályok koncentrációját úgy számítottuk ki, hogy a fent ismertetett módon meghatározott százalékos értékeket megszoroztuk a minták (Technozym ADAMTS-13 Inh® kit segítségével korábban megmért) ADAMTS13-ellenes IgG-koncentrációjával (**7. ábra, B panel**).

Az egyes mérések összevethetőségének biztosítása céljából minden mérés során egy kontrollminta alosztályeloszlását is meghatároztuk. A kontrollminta, valamint további minták ismételt mérései alapján az intra-assay variációs koefficiens 6,5%-os, az inter-assay variációs koefficiens 13,6%-os volt.

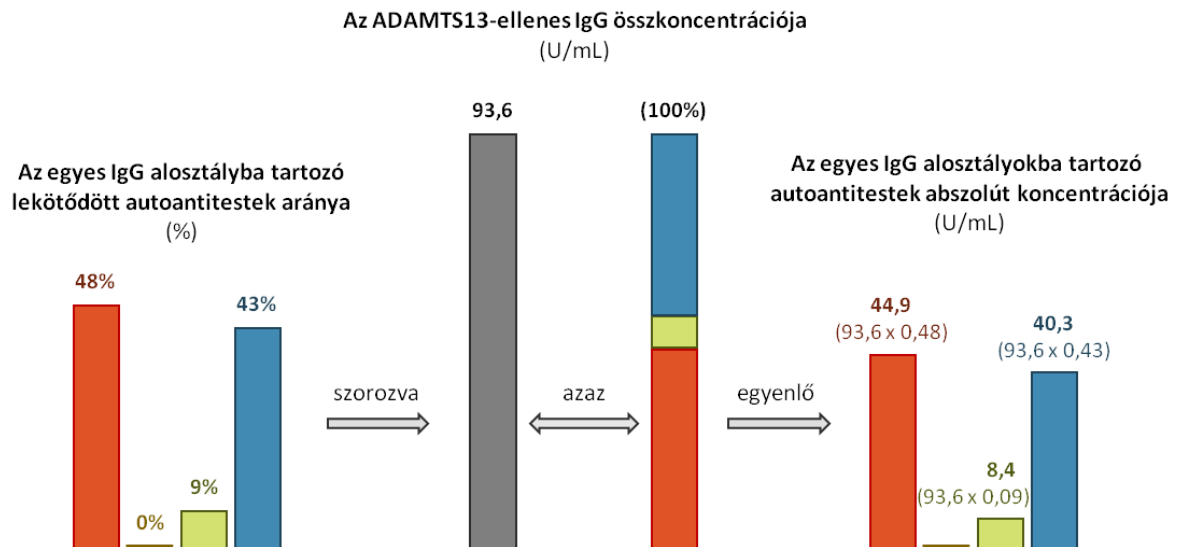


6. ábra. Kalibrátorgörbék, értékelésük és használatuk. (A) A kalibrátorlemez ismert koncentrációjú, ismert alosztályú IgG-vel fedett lyukainak abszorbanciaértékei alapján készített alosztályspezifikus kalibrátorgörbék. A szaggatott vonalak az értékelhetőség felső határát jelölik, alosztályonként. (B) A fenti görbék kinagyított részlete. Az összefüggő vonalak jelölik egy adott minta alosztályspezifikus abszorbanciaértékeit és az ezek alapján meghatározott fedési mennyiségeket. Ez utóbbiakat táblázatos formában is feltüntettük. A lekötődött IgG2 mennyisége (2,5 ng) alacsonyabb, mint az értékelhetőség alsó határa, ezért 0-nak tekintettük. A szaggatott vonalak az értékelhetőség alsó határát jelölik, alosztályonként.

A



B



7. ábra. Az egyes IgG alosztályba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek relatív és abszolút koncentrációinak meghatározása. (A) Az IgG alosztályok relatív koncentrációinak számítása. (B) Az IgG alosztályok abszolút koncentrációinak számítása.

3.2.8. Az ADAMTS13 elleni autoantitestek fajlagos gátló hatásának meghatározása

A vizsgálatra kiválasztott betegmintákat pH 7,4-es kémhatású PBS oldatban hígítottuk olyan módon, hogy a hígított betegminták ADAMTS13-ellenes IgG koncentrációja

azonos, 25 U/mL-es legyen. A hígítás mértékét a minták korábban meghatározott ADAMTS13-ellenes IgG koncentrációi alapján számítottuk ki. A hígított betegmintákat a minta típusának megfelelően normál szérum- vagy citrátos plazmamintával kevertük össze 3:1, 1:1 és 1:2 arányban, 60 µL-es osztófogatban, majd a kevert mintákat 2 órán át 37°C-on inkubáltuk. A kevert minták ADAMTS13-aktivitását a 3.2.1. pontban leírt módon meghatároztuk, és egy szorzóval úgy korrigáltuk, hogy az egyező típusú (szérum vagy plazma) inkubált normál minta aktivitása 100% legyen. A kevert minta aktivitása a mintában található ADAMTS13-ellenes autoantitestek fajlagos gátló hatását jelezte, minél alacsonyabb volt az aktivitás, annál erősebb volt az autoantitestek fajlagos gátló hatása.

3.3. Statisztikai analízis

Statisztikai számításainkat a GraphPad Prism 5 (GraphPad Softwares Inc., La Jolla, CA, USA) szoftver segítségével végeztük el.

Mivel mintáinkban az értékek a legtöbb esetben nem normál eloszlást mutattak, ezért a csoportokat a medián és az interkvartilis tartomány megadásával írtuk le, és nem paraméteres statisztikai próbákat végeztünk. Két független csoport összehasonlítására Mann-Whitney-tesztet, két összetartozó csoport összehasonlítására párosított Wilcoxon-tesztet használtunk. Több független csoportot a Kruskal-Wallis-, több összetartozó csoportot pedig a Friedman-teszttel hasonlítottunk össze, az egyes csoportok közti különbségeket a Dunn-féle post hoc teszttel vizsgáltuk. Két változó közötti összefüggés vizsgálatára a Spearman-próbát alkalmaztuk. A diszkrét változók közötti kapcsolatot a chí-négyzet tesztel, alacsony elemszám (5 alatti várható elemszám bármely csoportban) esetén a Fisher-féle egzakt tesztel vizsgáltuk. A nemek arányának eltérőségét egymintás chí-négyzet próbával vizsgáltuk, a HLA-DR-DQ haplotípusok és a *PTPN22* c.1858 polimorfizmus interakciójának vizsgálatára többváltozós logisztikus regressziós tesztet alkalmaztunk.

Kétoldalú statisztikai próbákat végeztünk, 0,05 alatti p-értékek esetén tekintettük az eredményt statisztikailag szignifikánsnak. Két csoport több szempontból történő összehasonlítása esetén Bonferroni-korrekciónkat alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok és a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus gyakoriságának, valamint ezek összefüggéseinek vizsgálata szerzett TTP-s betegekben

Hogy a HLA-DR-DQ haplotípusoknak és a *PTPN22* gén c.1858C>T polimorfizmusának a szerzett TTP kialakulásában játszott szerepére következtethessünk, meghatároztuk az egyes HLA-DRB1 allélok, a HLA-DRB1-DQB1 haplotípusokat és a *PTPN22* c.1858 genotípusokat hordozók arányát szerzett TTP-s betegek és egészséges kontrollszemélyek csoportjaiban.

4.1.1. A betegcsoport és a kontrollcsoportok leírása

A vizsgálatba összesen 75 szerzett TTP-s beteget vontunk be, esetükben mind a DRB1, a DQB1 és *PTPN22* c.1858 genotípus meghatározásra került. A szerzett TTP-s betegek eredményeit az egészséges kontrollszemélyeknek az adott eredménnyel rendelkező alcsoportjainak eredményeihez viszonyítottuk. A kontrollszemélyek mindegyike (204 fő) esetében volt ismert a DRB1 genotípus, míg a DQB1 genotípus 162 fő esetében, a *PTPN22* c.1858 genotípus 169 fő esetében volt ismert, összesen 132 beteg esetében tudtuk meghatározni a DRB1-DQB1 haplotípust és a *PTPN22* c.1858 genotípust is.

A vizsgálatba bevont szerzett TTP-s betegek és kontrollok adatait az **1. táblázatban** foglaltam össze.

1. Táblázat. A genetikai vizsgálatba bevont betegek és kontrollszemélyek kor és nem szerinti megoszlása.

| | TTP-s betegek | Kontrollszemélyek | | | |
|------------------|---------------|-------------------|------------|------------|--------------------|
| | | Összes / DRB1 | DRB1-DQB1 | PTPN22 | DRB1-DQB1 + PTPN22 |
| Egyének száma | 75 | 204 | 162 | 169 | 132 |
| Életkor (év) | 41 (32-48) | 55 (41-64) | 57 (46-66) | 56 (42-67) | 57 (46-67) |
| Nemek (nő/férfi) | 60/15 | 117/87 | 86/76 | 100/69 | 71/61 |
| Nők aránya (%) | 80,0 | 57,4 | 53,1 | 59,2 | 53,8 |

A kontrollszemélyeknek az elérhető eredmények alapján képzett alcsoportjait is feltüntettem. Az életkort 'medián (interkvartilis tartomány)' formátumban tüntettem fel.

A TTP-s betegek átlagos életkora több mint 10 évvel alacsonyabb volt az egészséges kontrollok bármely alcsoportjához képest. Az egészséges kontrollok alcsoportjaiban a nemek aránya közel azonos volt, kis női túlsúllyal, ezzel szemben a TTP-s betegek csoportjában a nők aránya jóval magasabb volt (80,0% vs. 57,4%, $p < 0,0001$).

4.1.2. A DRB1 allélok és DRB1-DQB1 haplotípusokat hordozók aránya

A korábbi eredményekkel való összevethetőség kedvéért a DRB1 allélok hordozók arányának összehasonlítását is elvégeztük, de a DRB1 és DQB1 allélok kapcsolt öröklődése miatt az eredmények értelmezése szempontjából a DRB1-DQB1 haplotípusok összehasonlítására helyeztük a hangsúlyt.

Az egyes DRB1 allélok, illetve DRB1-DQB1 haplotípusokat hordozó TTP-s betegek, valamint egészséges egyének számát és arányát a **2. és 3. táblázat**okban mutatom be.

2. Táblázat. Az egyes HLA-DRB1 allélok hordozó egyének aránya és száma a TTP-s betegek, illetve az egészséges kontrollszemélyek csoportjában.

| HLA-DR allél | Hordozók aránya és száma | | p-érték | OR (CI) |
|--------------|-------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| | Egészséges kontrollok (N=204) | TTP-s betegek (N=75) | | |
| DRB1 | % (n) | % (n) | | |
| 01 | 18,6 (38) | 10,7 (8) | 0,1121 | |
| 03 | 20,1 (41) | 24,0 (18) | 0,5098 | |
| 04 | 21,1 (43) | 10,7 (8) | 0,0543 | |
| 07 | 27,0 (55) | 10,7 (8) | 0,0035 | 0,32 (0,15-0,72) |
| 08 | 8,8 (18) | 6,7 (5) | 0,6334 | |
| 09 | 2,0 (4) | 0,0 (0) | 0,5768 | |
| 10 | 2,5 (5) | 2,7 (2) | 1,0000 | |
| 11 | 28,9 (59) | 56,0 (42) | <0,0001 | 3,13 (1,81-5,41) |
| 12 | 4,4 (9) | 9,3 (7) | 0,1454 | |
| 13 | 19,1 (39) | 8,0 (6) | 0,0273 | 0,36 (0,15-0,91) |
| 14 | 5,9 (12) | 13,3 (10) | 0,0478 | 2,46 (1,02-5,97) |
| 15 | 14,2 (29) | 28,0 (21) | 0,0129 | 2,35 (1,24-4,45) |
| 16 | 12,7 (26) | 9,3 (7) | 0,5333 | |

Szignifikáns összefüggés esetén az adott allélt félkövér kiemeléssel jelöltem, ehhez a Bonferroni-korrekció nélküli szignifikanciaszintet vettem alapul. A Bonferroni-korrekciót követően a szignifikanciaszint $p = 0,0038$ (0,05/13). N, n: az egyének száma a csoportban, illetve az allélt hordozó egyének száma. OR: esélyhányados (odds ratio), CI: 95%-os konfidenciaintervallum (confidence interval).

3. Táblázat. Az egyes HLA-DRB1-DQB1 haplotípusokat hordozó egyének aránya és száma a TTP-s betegek, illetve az egészséges kontrollszemélyek csoportjában.

| | | Hordozók aránya és száma | | | |
|---------------------------|-----------|-------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| HLA-DR-DQ haplotípus | | Egészséges kontrollok (N=162) | TTP-s betegek (N=75) | | |
| DRB1 | DQB1 | % (n) | % (n) | p-érték | OR (CI) |
| 01 | 05 | 17,9 (29) | 10,7 (8) | 0,1808 | |
| 03 | 02 | 19,8 (32) | 22,7 (17) | 0,6087 | |
| 04 | 03 | 18,5 (30) | 10,7 (8) | 0,1818 | |
| 07 | 02 | 21,6 (35) | 6,7 (5) | 0,0046 | 0,26 (0,10-0,69) |
| 07 | 03 | 3,7 (6) | 4,0 (3) | 1,0000 | |
| 08 | 03 | 1,2 (2) | 0,0 (0) | 1,0000 | |
| 08 | 04 | 6,8 (11) | 6,7 (5) | 1,0000 | |
| 09 | 03 | 2,5 (4) | 0,0 (0) | 0,3106 | |
| 10 | 05 | 3,1 (5) | 2,7 (2) | 1,0000 | |
| 11 | 03 | 27,2 (44) | 56,0 (42) | <0,0001 | 3,41 (1,93-6,05) |
| 12 | 03 | 4,9 (8) | 9,3 (7) | 0,2508 | |
| 13 | 03 | 3,7 (6) | 4,0 (3) | 1,0000 | |
| 13 | 06 | 13,6 (22) | 4,0 (3) | 0,0243 | 0,27 (0,08-0,92) |
| 14 | 05 | 6,2 (10) | 13,3 (10) | 0,0796 | |
| 15 | 06 | 11,7 (19) | 25,3 (19) | 0,0125 | 2,55 (1,26-5,18) |
| 16 | 05 | 11,1 (18) | 9,3 (7) | 0,8214 | |
| Egyéb / nem meghatározott | | 2,8 (9) | 4,0 (3) | | |

Szignifikáns összefüggés esetén az adott allélt félkövér kiemeléssel jelöltem, ehhez a Bonferroni-korrekció nélküli szignifikanciaszintet vettem alapul. A Bonferroni-korrekciót követően a szignifikanciaszint $p=0,0031$ (0,05/16). N, n: az egyének száma a csoportban, illetve az haplotípust hordozó egyének száma. OR: esélyhányados (odds ratio), CI: 95%-os konfidenciaintervallum (confidence interval).

A DRB1*11, *14 és *15 allélokat hordozók aránya kétszer magasabb volt a TTP-s betegek, mint az egészséges kontrollok csoportjában (rendre 56,0% vs. 28,9%, 13,3% vs. 5,9%, illetve 28,0% vs. 14,2%), a DRB1*07 és *13 aránya pedig több mint kétszer alacsonyabb volt (10,7% vs. 27,0%, illetve 8,0% vs. 19,1%). A DRB1*11 és DRB1*07 allélok esetén a különbség a Bonferroni-korrekció után (korrigált $p=0,0038$) is szignifikáns maradt.

A DRB1-eredményeknek megfelelően a DRB1*11-DQB1*03, DRB1*14-DQB1*05, és DRB1*15-DQB1*06 haplotípusokat hordozók aránya is több mint kétszer magasabb volt (rendre 56,0% vs. 27,2%, 13,3% vs. 6,2%, illetve 25,3% vs. 11,7%). A különbség a DRB1*14-DQB1*05 haplotípus esetén nem bizonyult szignifikánsnak, viszont a DRB1*11-DQB1*03 haplotípus esetében Bonferroni-korrekciót követően (korrigált $p=0,0031$) is szignifikáns maradt.

A DRB1*07 és 13 allélokot tartalmazó haplotípusok közül a DRB1*07-DQB1*02 és a DRB1*13-DQB1*06 haplotípusokat hordozók aránya csaknem háromszor alacsonyabb volt a TTP-s betegek csoportjában az egészséges kontrollokéhoz képest (6,7% vs. 21,6%, illetve 4,0% vs. 13,6%), ezzel szemben a DRB1*07-DQB1*03 és DRB1*13-DQB1*03 haplotípusokat hordozók arányában nem volt különbség a csoportok között (4,0% vs. 3,7% mindkét esetben).

A fenti eredmények a DRB1*11-DQB1*03 és DRB1*15-DQB1*06 haplotípusok rizikófokozó és a DRB1*07-DQB1*02 és DRB1*13-DQB1*06 haplotípusok rizikócsökkentő hatására utalnak.

Az esélyhányados (odds ratio; 95%-os konfidencia-intervallummal) a DRB1*11-DQB1*03 haplotípus esetében 3,41 (1,93–6,05), a DRB1*15-DQB1*06 esetében 2,55 (1,26–5,18), a DRB1*07-DQB1*02 esetében 0,26 (0,10–0,69), a DRB1*13-DQB1*06 esetében pedig 0,27 (0,08–0,92) volt.

4.1.3. A DRB1-DQB1 haplotípusok aránya nőkben és férfiakban

Tekintettel arra, hogy a szerzett TTP női dominanciájú megbetegedés, és a beteg- és kontrollcsoportok között lényeges eltérés volt a nemi arányokban, stratifikált analízist is végeztünk. A DRB1-DQB1 haplotípusoknak a beteg- és kontrollcsoportokban tapasztalt arányát a **4. táblázat**ban foglaltam össze nemek szerinti bontásban.

4. Táblázat. Az egyes HLA-DRB1-DQB1 haplotípusokat hordozó egyének aránya és száma a női és férfi TTP-s betegek, illetve az egészséges nők és férfiak csoportjában.

| | | Női hordozók aránya és száma | | | | Férfi hordozók aránya és száma | |
|-----------------------------|-----------|------------------------------------|----------------------------|---------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| HLA- DR-DQ haplotípus | | Egészséges kontrollok (N=86) | TTP-s betegek (N=60) | | | Egészséges kontrollok (N=76) | TTP-s betegek (N=15) |
| DR B1 | DQ B1 | % (n) | % (n) | p-érték | OR (CI) | % (n) | % (n) |
| 01 | 05 | 19,8 (17) | 10,0 (6) | 0,1651 | | 15,8 (12) | 13,3 (2) |
| 03 | 02 | 20,9 (18) | 21,7 (13) | 1,0000 | | 18,4 (14) | 26,7 (4) |
| 04 | 03 | 19,8 (17) | 10,0 (6) | 0,1651 | | 17,1 (13) | 13,3 (2) |
| 07 | 02 | 22,1 (19) | 5,0 (3) | 0,0045 | 0,19 (0,05- 0,66) | 21,1 (16) | 13,3 (2) |
| 07 | 03 | 4,7 (4) | 5,0 (3) | 1,0000 | | 2,6 (2) | 0,0 (0) |
| 08 | 03 | 2,3 (2) | 0,0 (0) | 0,5125 | | 0,0 (0) | 0,0 (0) |
| 08 | 04 | 3,5 (3) | 6,7 (4) | 0,4460 | | 10,5 (8) | 6,7 (1) |
| 09 | 03 | 2,3 (2) | 0,0 (0) | 0,5125 | | 2,6 (2) | 0,0 (0) |
| 10 | 05 | 4,7 (4) | 1,7 (1) | 0,6489 | | 1,3 (1) | 6,7 (1) |
| 11 | 03 | 26,7 (23) | 61,7 (37) | 0,0001 | 4,41 (2,17- 8,93) | 27,6 (21) | 33,3 (5) |
| 12 | 03 | 3,5 (3) | 8,3 (5) | 0,2737 | | 6,6 (5) | 13,3 (2) |
| 13 | 03 | 3,5 (3) | 5,0 (3) | 0,6899 | | 3,9 (3) | 0,0 (0) |
| 13 | 06 | 14,0 (12) | 1,7 (1) | 0,0151 | 0,10 (0,01- 0,83) | 13,2 (10) | 13,3 (2) |
| 14 | 05 | 2,3 (2) | 8,3 (5) | 0,1238 | | 10,5 (8) | 33,3 (5) |
| 15 | 06 | 12,8 (11) | 30,0 (18) | 0,0122 | 2,92 (1,26- 6,77) | 10,5 (8) | 6,7 (1) |
| 16 | 05 | 9,3 (8) | 10,0 (6) | 1,0000 | | 13,2 (10) | 6,7 (1) |

Szignifikáns összefüggés esetén az adott allélt félkövér kiemeléssel jelöltem, ehhez a Bonferroni-korrekció nélküli szignifikanciaszintet vettem alapul. A Bonferroni-korrekciót követően a szignifikanciaszint $p=0,0031$ (0,05/16). N, n: az egyének száma a csoportban, illetve az haplotípust hordozó egyének száma. OR: esélyhányados (odds ratio), CI: 95%-os konfidenciaintervallum (confidence interval).

Az összesített eredményekhez hasonlóan a TTP-s betegek körében a DRB1*11-DQB1*03 és DRB1*15-DQB1*06 haplotípusokat hordozók aránya magasabb (61,7% vs. 26,7%, illetve 30,0% vs. 12,8%), a DRB1*07-DQB1*03 és DRB1*13-DQB1*03 haplotípusokat hordozók aránya pedig alacsonyabb (5,0% vs. 22,1%, illetve 1,7% vs. 14,0%) volt, mint az egészséges nők körében. A DRB1*11-DQB1*03 haplotípust hordozók arányában tapasztalt különbség Bonferroni-korrekciónál is szignifikáns maradt.

A férfi TTP-s betegek csoportjában a DRB1*14-DQB1*05 allél gyakorisága túltúlszámított az egészséges férfiak csoportjához viszonyítva, de a férfi TTP-s betegek száma túl alacsony volt statisztikai vizsgálatok elvégzéséhez, illetve következtetések levonásához.

A női TTP-s betegek körében tehát ugyanazok a haplotípusok bizonyultak rizikófaktorok és rizikócsökkentő hatásúnak, mint a teljes betegcsoportban, ráadásul az összefüggések az alacsonyabb elemszám ellenére még kifejezettebbek voltak. Az esélyhányados a DRB1*11-DQB1*03 haplotípus esetében 4,41-nek (2,17–8,93), a DRB1*15-DQB1*06 esetében 2,92-nek (1,26–6,77), a DRB1*07-DQB1*02 esetében 0,19-nek (0,05–0,66), a DRB1*13-DQB1*06 esetében pedig 0,10-nek (0,01–0,83) adódott.

4.1.4. A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus gyakorisága

Hogy megvizsgáljuk a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmusnak a betegség kialakulására gyakorolt hatását, összehasonlítottuk az egyes genotípusok gyakoriságát a szerzett TTP-s betegek és az egészséges kontrollok egy csoportjában.

A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus ritka (c.1858T), illetve vad (c.1858C) alléljait hordozó egyének aránya és száma a TTP-s betegek, illetve az egészséges kontrollok csoportjában az **5. táblázatban** látható.

5. Táblázat. A *PTPN22* c.1858 genotípusok és allélok aránya a TTP-s betegek, illetve az egészséges kontrollok csoportjában.

| <i>PTPN22</i> c.1858 genotípus | Genotípusok aránya | | Genotípusok aránya nőkben | | Genotípusok aránya férfiakban | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| | Egészséges kontrollok (N=169) | TTP-s betegek (N=75) | Egészséges kontrollok (N=100) | TTP-s betegek (N=60) | Egészséges kontrollok (N=69) | TTP-s betegek (N=15) |
| | % (n) | % (n) | % (n) | % (n) | % (n) | % (n) |
| c.1858 TT | 0,6 (1) | 0,0 (0) | 0,0 (0) | 0,0 (0) | 1,4 (1) | 0,0 (0) |
| c.1858 CT | 19,5 (33) | 21,3 (16) | 23,0 (23) | 23,3 (14) | 14,5 (10) | 13,0 (2) |
| c.1858 CC | 79,9 (135) | 78,7 (59) | 77,0 (77) | 76,7 (46) | 84,1 (58) | 86,7 (13) |
| | Allélgyakoriság | | Allélgyakoriság nőkben | | Allélgyakoriság férfiakban | |
| | Egészséges kontrollok (N=169) | TTP-s betegek (N=75) | Egészséges kontrollok (N=100) | TTP-s betegek (N=60) | Egészséges kontrollok (N=69) | TTP-s betegek (N=15) |
| | % (n) | % (n) | % (n) | % (n) | % (n) | % (n) |
| c.1858 T | 10,4 (35) | 10,7 (16) | 11,5 (23) | 11,7 (14) | 8,7 (12) | 6,7 (2) |
| c.1858 C | 89,6 (303) | 89,3 (134) | 88,5 (177) | 88,3 (106) | 91,3 (126) | 93,3 (28) |

N, n: az egyének száma a csoportban, illetve az adott genotípusú egyének száma.

A *PTPN22* c.1858T allélt heterozigóta, illetve homozigóta formában hordozók aránya, valamint a c.1858T allél gyakorisága is azonos volt a TTP-s betegek és az egészséges kontrollok körében. A fenti megállapítások egyaránt igazak a nemek szerint kettébontott csoportokra is.

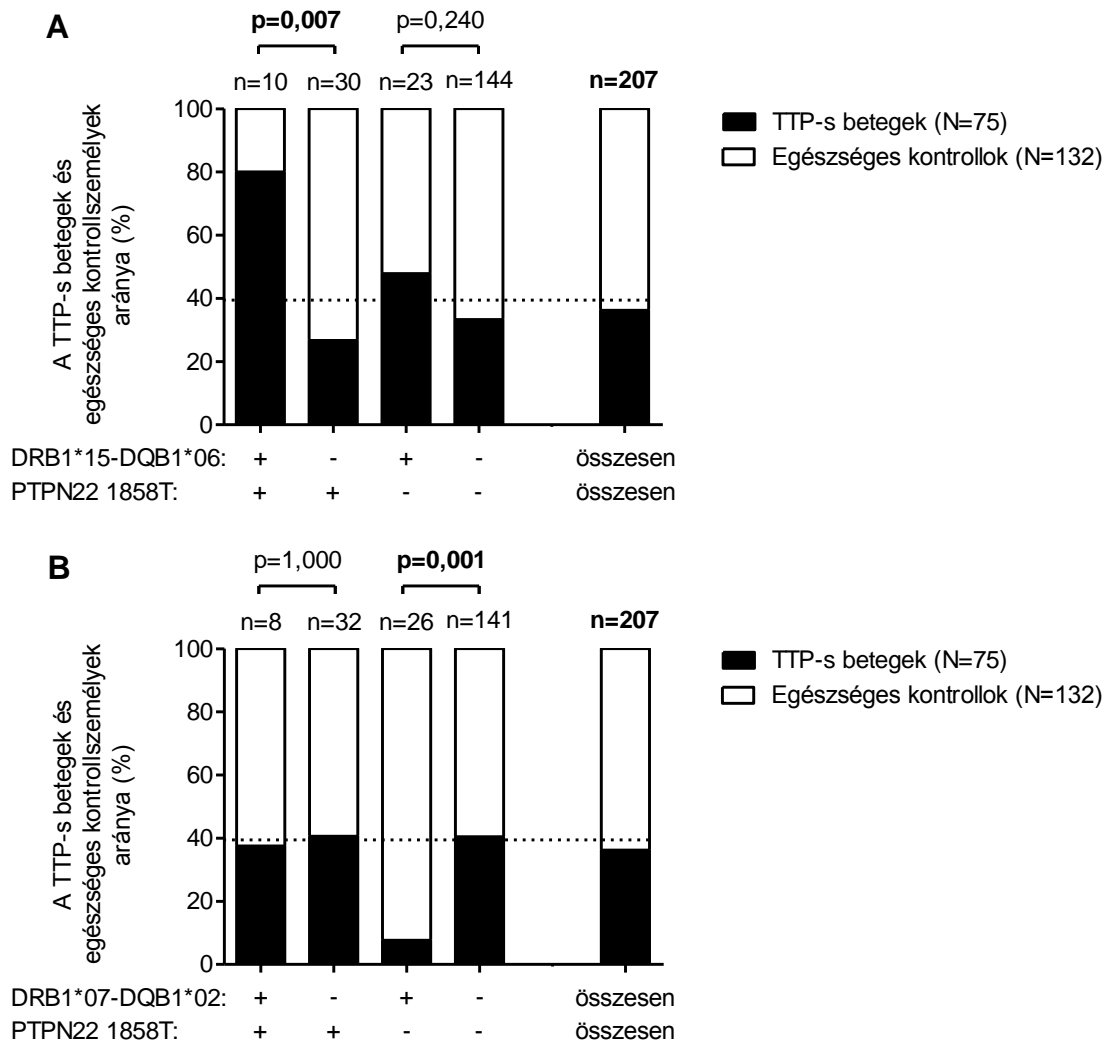
Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus összességében nem függ össze a szerzett TTP kialakulásának kockázatával.

4.1.5. A szerzett TTP-s betegek és egészséges kontrollok aránya a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus és a *DRB1-DQB1* haplotípus hordozása alapján képzett csoportokban

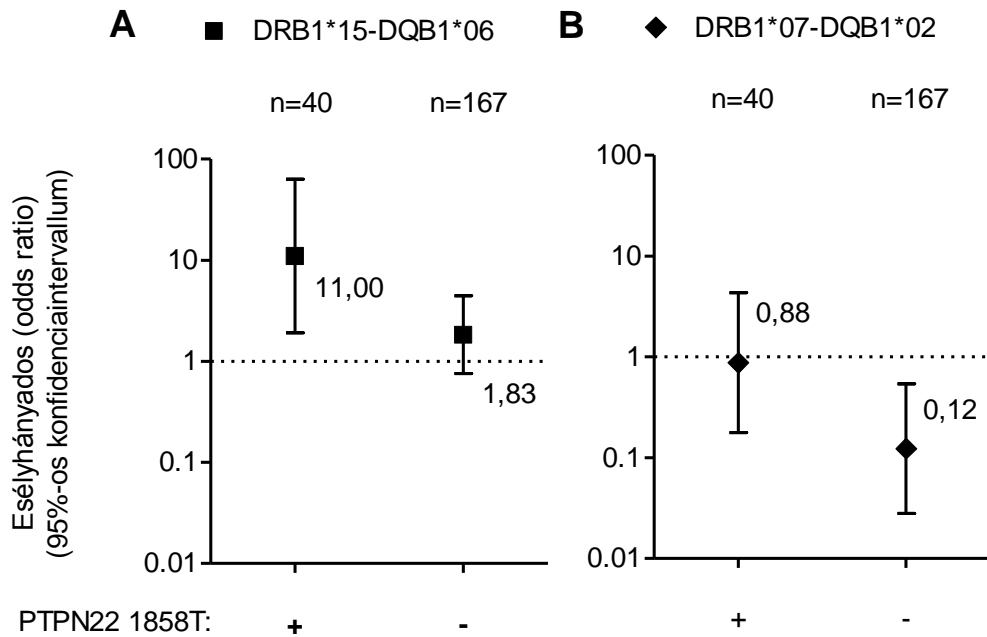
Annak eldöntésére, hogy a genetikai háttér, pontosabban az eredményeink alapján rizikófokozó és rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása befolyásolja-e a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmusnak a TTP kialakulására gyakorolt hatását, megvizsgáltuk a polimorfizmus és a betegségrizikó kapcsolatát a DRB1*11-DQB1*03,

a DRB1*15-DQB1*06, a DRB1*07-DQB1*02, valamint a DRB1*13-DQB1*06 haplotípusok hordozása alapján képzett csoportokban.

A ritka *PTPN22* c.1858T allél hordozása a vizsgált haplotípusok közül a DRB1*15-DQB1*06 és DRB1*07-DQB1*02 hordozása esetén befolyásolta a TTP kialakulásának rizikóját. Az interakciókat a **8. és 9. ábrán** ábrázoltuk.



8. Ábra. A TTP-s betegek és egészséges kontrollszemélyek aránya a DRB1*15-DQB1*06 (A), illetve a DRB1*07-DQB1*02 (B) haplotípusok, valamint a *PTPN22* c.1858T allél hordozása alapján képzett csoportokban. A pontozott vonal a TTP-s betegek összesített arányát mutatja.



9. Ábra. A DRB1*15-DQB1*06 (A) és DRB1*07-DQB1*02 (B) haplotípusok becsült rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő hatása a *PTPN22* c.1858T allél hordozása alapján képzett csoportokban. Az egyes haplotípusoknak a TTP kialakulásának rizikójával való összefüggését a 8. ábrán feltüntetett adatok alapján, Fisher-féle egzakt teszttel vizsgáltuk.

A ritka *PTPN22* c.1858T allél hordozása esetén a DRB1*15-DQB1*06 haplotípus hordozása összefüggött a TTP kialakulásának fokozott rizikójával, az esélyhányados (OR) 11,00-nek (1,91-63,21) adódott. A c.1858T allélt nem hordozó egyéneknél nem volt összefüggés a DRB1*15-DQB1*06 haplotípus hordozása és a TTP kialakulásának rizikója között (OR: 1,83 (0,72-4,46)).

Ennek fordítottjaképpen, a DRB1*07-DQB1*02 haplotípus hordozása csak a *PTPN22* c.1858T allélt nem hordozó egyéneknél függött össze a TTP kialakulásának csökkent rizikójával (OR: 0,12 (0,03-0,54)), míg a c.1858T allélt hordozókban nem volt összefüggés a DRB1*07-DQB1*02 haplotípus hordozása és a TTP kialakulásának rizikója között (OR: 0,88 (0,18-4,3)).

A fenti eredmények ellenére többváltozós logisztikus regressziós modellben a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmusnak a DRB1*15-DQB1*06, illetve a DRB1*07-DQB1*02 haplotípusokkal való interakciója nem bizonyult a TTP kialakulásának statisztikailag szignifikáns rizikófaktorának ($p=0,067$, illetve $p=0,185$), de ezek az interakciós

modellek az egyes alcsoportok alacsony elemszáma miatt csak korlátozottan értékelhetőek.

4.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjának, alosztályeloszlásának, gátló hatásának, valamint ezek változásainak és összefüggéseinek vizsgálata

4.2.1. A betegcsoport leírása

A vizsgálatba bevont 81 beteg medián életkora 38 év (interkvartilis tartomány 29-50 év) volt, 76,5%-uk (62 fő) volt nő, 23,5%-uk (19 fő) pedig férfi.

A medián követési idő 21,9 (0,6-75,7) hónap volt, a követés során 26 betegnek (32,0%) volt legalább egy relapszusa. A vizsgált első akut epizód során 61-ből 9 beteg hunyt el (14,8%), a vizsgált relapszusok során pedig 19 betegből 1 (5,3%).

Az akut minták közül 63 (77,8%) a plazmaferezis-terápia megkezdése előtt lett levéve, 17 (21,0%) az első plazmaferezis után. Három relapszus során és nyolc remisszióban vett minta esetében részesültek a betegek a mintavételt megelőzően rituximabkezelésben (egy, illetve hat esetben egy éven belül), négy további minta vétele pedig egyéb immunosuppresszív szerek (ciklofoszfamid, azathioprin, vincristin) alkalmazását követően történt.

4.2.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása az összes mintában

Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek alosztályeloszlását 101 anti-ADAMTS13-IgG-pozitív (15 U/mL fölötti koncentrációjú) mintában határoztuk meg. A vizsgált mintákban az ADAMTS13-ellenes IgG autoantitestek medián koncentrációja 66,0 U/mL volt (interkvartilis tartomány: 35,6-158,0 U/mL).

Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek elsősorban az IgG4 és IgG1 alosztályba tartoztak. Az IgG4 átlagos (medián) aránya volt a legmagasabb, 66,0% (34,5%-76,0%), ezt az IgG1 követte 32,0%-kal (24,0-51,5%), az IgG3 és IgG2 medián aránya pedig egyaránt 0,0% (0,0-5,5%, illetve 0,0-2,5%) volt. Hetvenegy mintában (70,3%) az IgG4, 28 mintában (27,7%) pedig az IgG1 volt a domináns (legnagyobb arányban jelen lévő)

alosztály. Az IgG3 csupán 2 mintában (2,0%) volt domináns, az IgG2 pedig egyik mintában sem szerepelt domináns alosztályként.

Összesen 97 minta (96,0%) tartalmazott IgG1 alosztályú, 94 (93,1%) pedig IgG4 alosztályú autoantitesteket. IgG3 alosztályú autoantitestek 51 mintában (50,5%), elsősorban IgG1-domináns mintákban fordultak elő: a 28 IgG1-domináns mintából 25 (89,3%) tartalmazott IgG3 alosztályú autoantitesteket. IgG2 alosztályú ADAMTS13-ellenes autoantitestek 41 mintában (40,6%) voltak kimutathatók. Mind a négy alosztály 24 mintában (23,8%) fordult elő együtt, 37 minta (36,6%) tartalmazott három, 36 (35,6%) pedig kettő különböző alosztályt, csupán 4 minta (4,0%) tartalmazott kizárólag egyféle alosztályba tartozó autoantitesteket (2 IgG1-et, 2 IgG4-et).

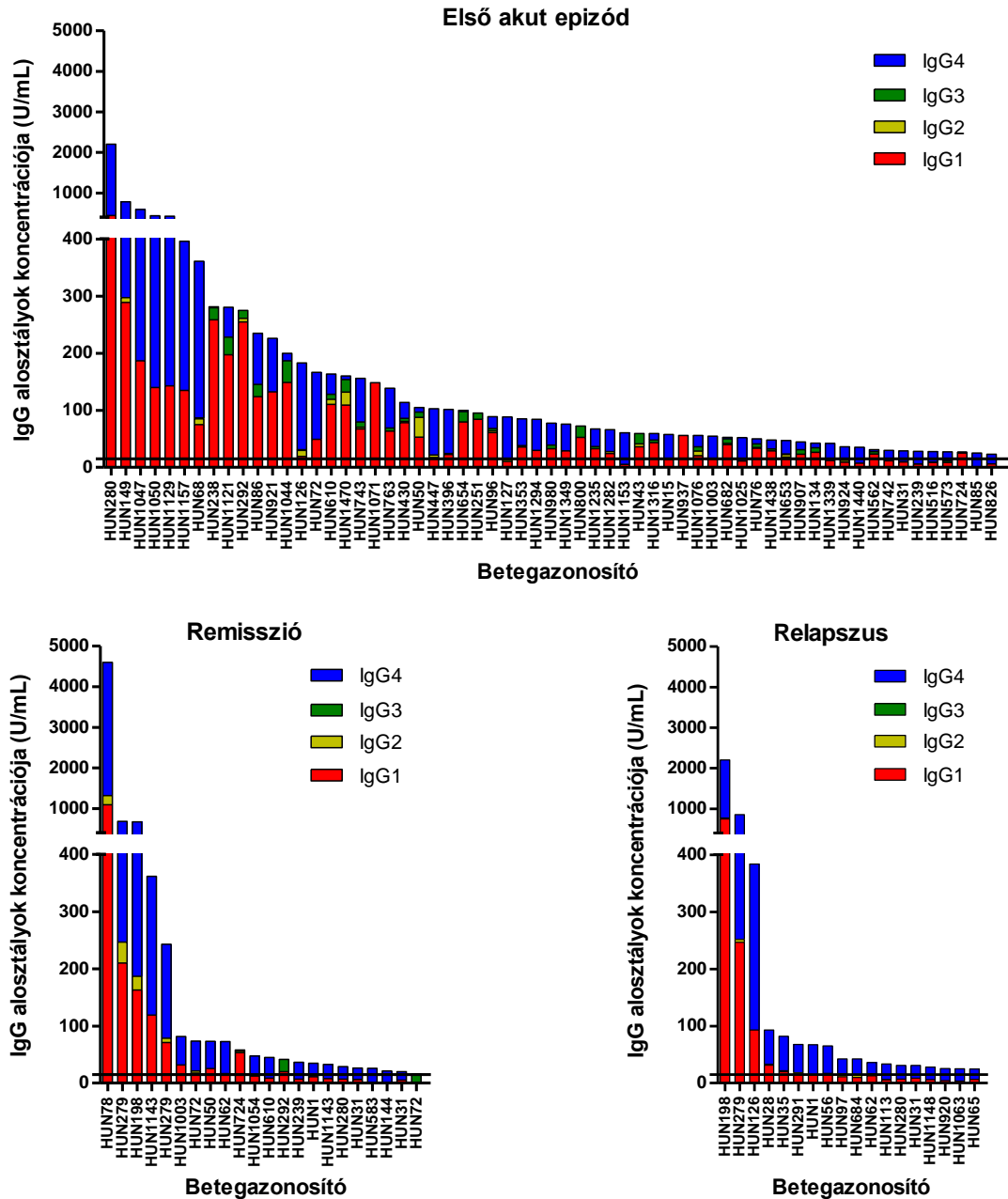
Egyik alosztály aránya sem korrelált az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek összkoncentrációjával. Az egyes alosztályok abszolút koncentrációi többnyire pozitívan korreláltak egymással – IgG1 és IgG2: $r=0,4234$, $p=0,0018$; IgG1 és IgG4: $r=0,2914$, $p=0,03601$; IgG2 és IgG3: $r=0,4497$, $p=0,0008$. Ez alól egy kivétel volt: az IgG3 és IgG4 szintje között negatív korrelációt találtunk ($r= -0,6073$; $p<0,0001$).

A plazmaferezis megkezdése előtt és az első plazmaferezis után vett független minták összehasonlítása során nem találtunk különbséget az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjának és alosztályeloszlásának tekintetében, ami arra utal, hogy az autoantitest-koncentráció egy plazmaferezis által kiváltott csökkenése kisebb volt, mint a különböző betegek mintáiban mért autoantitest-szintek variabilitása. A mintavételt megelőzően rituximab-, illetve egyéb immunszuppresszív kezelésben részesülő egyének száma túl alacsony volt statisztikai tesztek elvégzéséhez, de mintáikban az ADAMTS13-ellenes autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása nem mutatott érdemi különbségeket a többi mintához képest.

4.2.3. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása a TTP különböző stádiumaiban

Hogy megvizsgáljuk az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz változását a betegség lefolyása során, összehasonlítottuk az ADAMTS13 elleni IgG autoantitesteknek az egyes betegségstádiumokból származó mintákban mért koncentrációját és alosztályeloszlását.

A **10. ábra** mutatja az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációját és alosztályeloszlását a szerzett TTP egyes stádiumaiban.



10. Ábra. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása az első akut epizód során, remisszióban, illetve relapszus alatt vett mintákban. A vízszintes vonal a pozitivitás alsó határát (15 U/mL) jelöli.

Az első akut epizód, illetve relapszus alkalmával vett független minták összehasonlítása a **6. táblázatban** látható.

6. Táblázat. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitesteknek az első akut epizód során és relapszus során vett mintákban mért koncentrációjának és alosztályeloszlásának összehasonlítása.

| | Első akut epizód | Relapszus | |
|---|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| <i>Klinikai adatok</i> | | | |
| Egyének száma | 57 | 15 | |
| Kor (év) | 41 (29-54) | 35 (28-44) | |
| Nem (nő, férfi) | 42/15 | 12/3 | |
| Epizód sorszáma | 1 | 3 (2-5) | |
| A TTP diagnózisa óta eltelt idő (hónap) | 0 | 69 (46-230) | |
| <i>ADAMTS13 elleni autoantitestek koncentrációja (U/mL)</i> | | | |
| IgG | 77,5 (47,6-161,8) | 42,3 (28,0-81,9) | p=0,0831 |
| <i>IgG alosztályok aránya (%)</i> | | | |
| IgG1 | 42,0 (30,6-68,8) | 24,3 (21,0-28,8) | p=0,0002 |
| IgG2 | 0,0 (0,0-2,6) | 1,1 (0,0-2,8) | p=0,2230 |
| IgG3 | 2,2 (0,0-9,7) | 0,0 (0,0-0,2) | p=0,0086 |
| IgG4 | 49,7 (14,0-68,3) | 73,6 (65,0-78,4) | p=0,0004 |
| <i>IgG alosztályok koncentrációja (U/mL)</i> | | | |
| IgG1 | 35,7 (17,5-96,6) | 12,8 (6,0-19,9) | p=0,0066 |
| IgG2 | 0,0 (0,0-2,8) | 1,2 (0,0-3,8) | p=0,1826 |
| IgG3 | 1,6 (0,0-8,2) | 0,0 (0,0-0,1) | p=0,0061 |
| IgG4 | 25,2 (8,6-62,6) | 28,5 (21,7-59,7) | p=0,1552 |
| <i>Domináns alosztály (betegek száma, %)</i> | | | |
| IgG1 | 27 (47,4%) | 0 (0%) | p=0,0005 |
| IgG4 | 31 (52,6%) | 15 (100%) | |

A táblázatban csak a független minták eredményei szerepelnek: azok a betegek, akiknek mindkét stádiumból származó mintájuk volt, ki lettek zárva az összehasonlításból. (A kizárást a statisztikai összehasonlíthatóság miatt végeztük. Mindazonáltal a kizárt betegek eredményeit is figyelembe véve hasonló eredményeket kaptunk.) Domináns alosztály alatt a legnagyobb arányú alosztály értendő. Az eredmények mediánját, zárójelben pedig az interkvartilis tartományát tüntettem fel. A szignifikáns különbségeket félkövér kiemeléssel jelöltem.

Az összehasonlításba csak független, eltérő betegektől származó mintákat választottunk be; azon betegek, akiktől mindkét stádiumban vett mintákkal rendelkezünk, ki lettek zárva a vizsgálatból. A két csoport nem- és koreloszlása nem különbözött egymástól. Az ADAMTS13 elleni autoantitestek összkoncentrációja magasabb volt az első akut epizód alatt vett mintákban (77,5 (47,6-161,8) vs. 42,3 (28,0-81,9) U/mL), de a különbség nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. Az IgG1 és IgG3 alosztályba tartozó autoantitestek aránya (42,0% (30,6-68,8%) vs. 24,0% (21,0-29,0%)), illetve 2,0% (0,0-9,7%) vs. 0,0% (0,0-0,0%)) és abszolút koncentrációja (35,7 (17,5-96,6) vs. 12,8 (6,0-19,9), illetve 1,6 (0,0-8,2) vs. 0,0 (0,0-0,1) U/mL) viszont szignifikánsan magasabb volt az első akut epizód során, mint remisszióban. Az IgG4 aránya ennek megfelelően a relapsusból származó mintákban volt magasabb (74,0 (65,0-78,0) vs. 49,7 (14,0-68,3)). Amíg az első akut epizód során a minták 47,4%-ában az IgG1 volt a domináns alosztály, a relapszus alatt vett minták mindegyikében az IgG4 alosztály dominált.

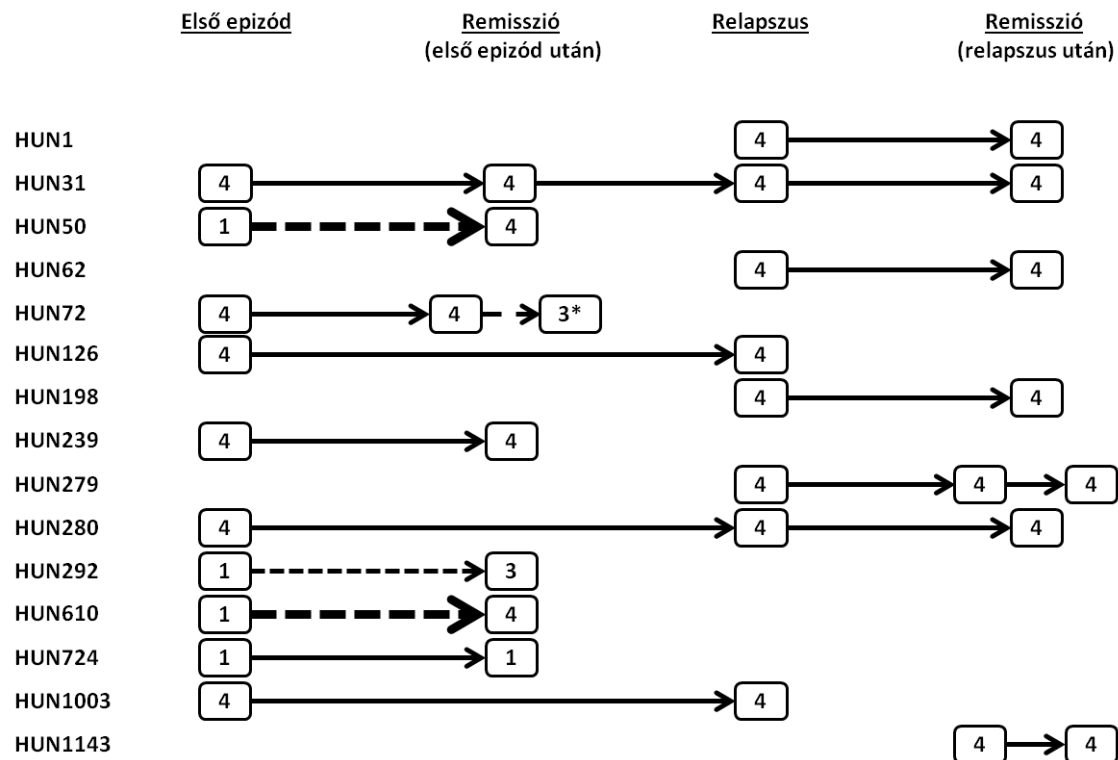
A fentiekhez hasonlóan a relapszust követő remisszióból származó minták mindegyikében IgG4-dominanciát figyeltünk meg, amíg az első epizódot követő remisszióban vett minták között voltak IgG1-domináns (10/1 db) és IgG3-domináns (10/2 db) minták is. Az első akut epizódot, illetve relapszust követő remisszióból származó független minták jellemzőit a **7. táblázatban** foglaltam össze.

7. Táblázat. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása az első akut epizódot, illetve egy relapszust követően vett remissziós mintákban.

| | Első akut epizódot követő remisszió | Relapszust követő remisszió |
|---|-------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Klinikai adatok</i> | | |
| Egyének száma | 9 | 8 |
| Kor (év) | 34 (20-45) | 34 (30-45) |
| Nem (nő, férfi) | 8/1 | 8/0 |
| A megelőző epizód sorszám | 1 | 3 (2-4) |
| A TTP diagnózisa óta eltelt idő (hónap) | 7 (3-35) | 72 (42-143) |
| <i>ADAMTS13 elleni autoantitestek koncentrációja (U/mL)</i> | | |
| IgG | 45,0 (31,5-73,3) | 60,2 (30,6-592,2) |
| <i>IgG alosztályok aránya (%)</i> | | |
| IgG1 | 23,8 (19,2-41,7) | 25,3 (22,1-31,5) |
| IgG2 | 0,0 (0,0-4,9) | 0,0 (0,0-2,9) |
| IgG3 | 0,0 (0,0-2,0) | 0,0 (0,0-0,6) |
| IgG4 | 71,4 (32,6-80,8) | 73,0 (67,2-76,9) |
| <i>IgG alosztályok koncentrációja (U/mL)</i> | | |
| IgG1 | 17,6 (6,7-39,4) | 14,0 (8,1-152,0) |
| IgG2 | 0,0 (0,0-3,3) | 0,0 (0,0-18,3) |
| IgG3 | 0,0 (0,0-1,0) | 0,0 (0,0-0,3) |
| IgG4 | 29,6 (10,0-49,9) | 45,7 (24,2-388,5) |
| <i>Domináns alosztály (betegek száma, %)</i> | | |
| IgG1 vagy IgG3 | 2 (20%) | 0 (0%) |
| IgG4 | 8 (80%) | 8 (100%) |

A táblázatban csak a független minták eredményei szerepelnek: minden beteg első (legkorábbi) remissziós mintáját választottuk be. Az alacsony elemszámokra való tekintettel statisztikai analízist nem végeztünk. Domináns alosztály alatt a legnagyobb arányú alosztály értendő. Az eredmények mediánját, zárójelben pedig az interkvartilis tartományát tüntettem fel.

A független minták összehasonlításán túl megvizsgáltuk a domináns alosztály változását ugyanazon betegek eltérő stádiumból származó mintáiban is. Tizenöt betegről állt rendelkezésünkre több stádiumból származó minta, e minták domináns alosztályait a **11. ábrán** mutatom be.



11. Ábra. Domináns alosztályok a több mintával rendelkező betegek mintáiban. A domináns alosztály megváltozását szaggatott nyíl jelöli, az IgG1-ről IgG4-re történő váltás vastag szaggatott nyíllal van kiemelve. Az egyetlen normál ADAMTS13-aktivitású mintát csillag jelöli.

Az első akut epizód során tízből négy beteg mintája IgG1-domináns volt, hat beteg mintája pedig IgG4-domináns. Az első akut epizódot követő remisszióban a négy, kezdetben IgG1-domináns beteg közül kettőben már IgG4 volt a domináns alosztály, egyben IgG3, egy beteg remissziós mintája továbbra is IgG1-domináns volt. Az első remisszió folyamán az egyik beteg deficiens IgG4-domináns mintáját egy normál aktivitású IgG3-domináns minta követte. Minden relapszusból, vagy relapszust követő remisszióból származó minta IgG4-domináns volt.

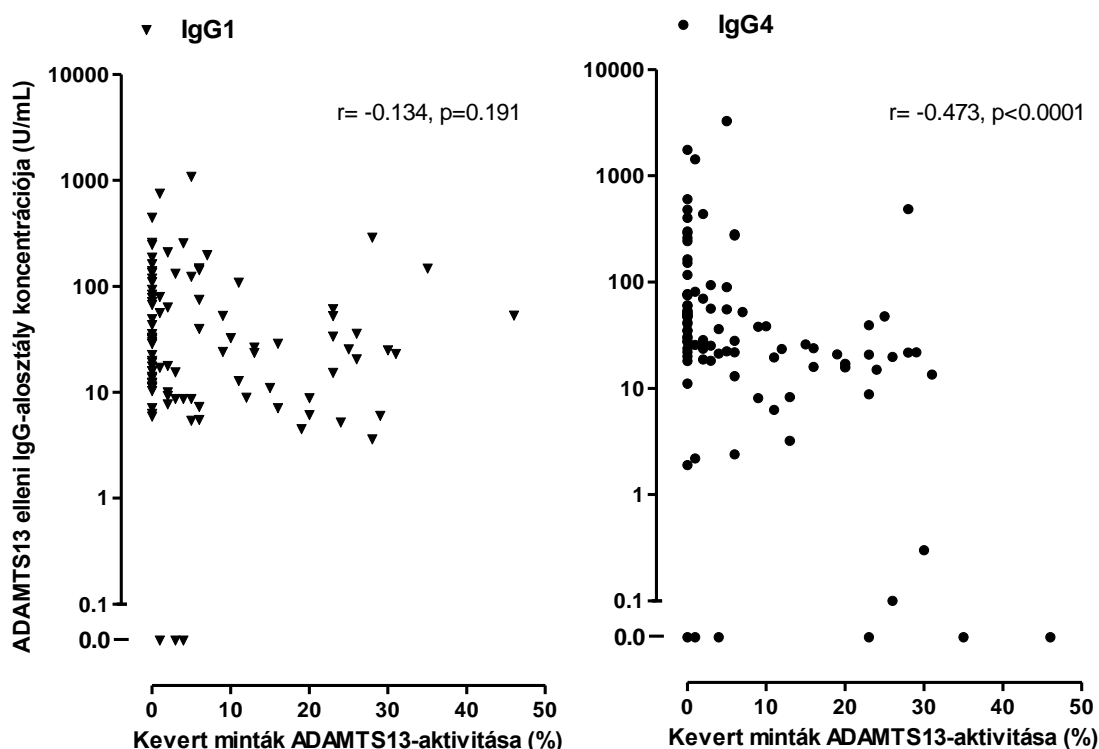
Négy beteg esetén szerepelt az anamnézisben a TTP diagnózisát megelőző ismeretlen eredetű trombocitopénia. Az első diagnosztizált TTP epizód során vett mintában mind a négy beteg autoantitest-profilja IgG4-domináns volt.

A fentieket összegezve megállapíthatjuk, hogy amíg az első epizód során, vagy azt követő remisszióban vett minták egy része IgG1- vagy IgG3-domináns ADAMTS13 elleni antitestprofillal rendelkezett, a relapszus során, vagy azt követő remisszióban vett minden minta IgG4-domináns volt.

4.2.4. Az ADAMTS13-gátlás és összefüggése az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek szintjével és alosztályeloszlásával

Az ADAMTS13-ellenes autoantitestek ADAMTS13-gátló hatásának vizsgálata céljából első lépésként megvizsgáltuk a mintákban mérhető ADAMTS13-gátlás erőssége és az egyes alosztályba tartozó autoantitestek koncentrációja közötti összefüggéseket.

Az alosztályeloszlás szempontjából vizsgált 101 mintából 100-ban volt deficiens az ADAMTS13-aktivitás. (A fennmaradó egy mintában normális (100% feletti) ADAMTS13-aktivitás és alacsony pozitív (15,8 U/mL-es) ADAMTS13-elleni IgG koncentráció volt mérhető.) A 100 deficiens minta közül 97 esetében volt elérhető minta az ADAMTS13-gátló hatás erősségének vizsgálatához. Az ADAMTS13-gátlás erősségét keveréses funkcionális vizsgálat segítségével határoztuk meg. A normál humán mintával 1:1 arányban kevert, majd két órán keresztül 37°C-on inkubált betegminták aktivitása a gátlás erősségének következménye: az 50% körüli aktivitás a gátlás hiányára, az alacsony, 0% körüli aktivitás igen erős gátlásra utal.



12. Ábra. A normál humán mintával 1:1 arányban kevert és két órán át 37°C-on inkubált deficiens betegminták ADAMTS13-aktivitásának összefüggése azok ADAMTS13 elleni IgG1- és IgG4-koncentrációjával.

A kevert, inkubált betegminták aktivitása fordított korrelációt mutatott az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek összmenyiségével ($r = -0,326$; $p = 0,011$), azonban ennél erősebb fordított korrelációt találtunk a kevert minták aktivitása és azok IgG4-koncentrációja között ($r = -0,473$; $p < 0,0001$) (**12. ábra**). A többi alosztály szintje nem korrelált a kevert minták aktivitásával (IgG1: $r = -0,134$, $p = 0,191$; IgG2: $r = -0,0127$, $p = 0,901$; IgG3: $r = 0,169$, $p = 0,098$).

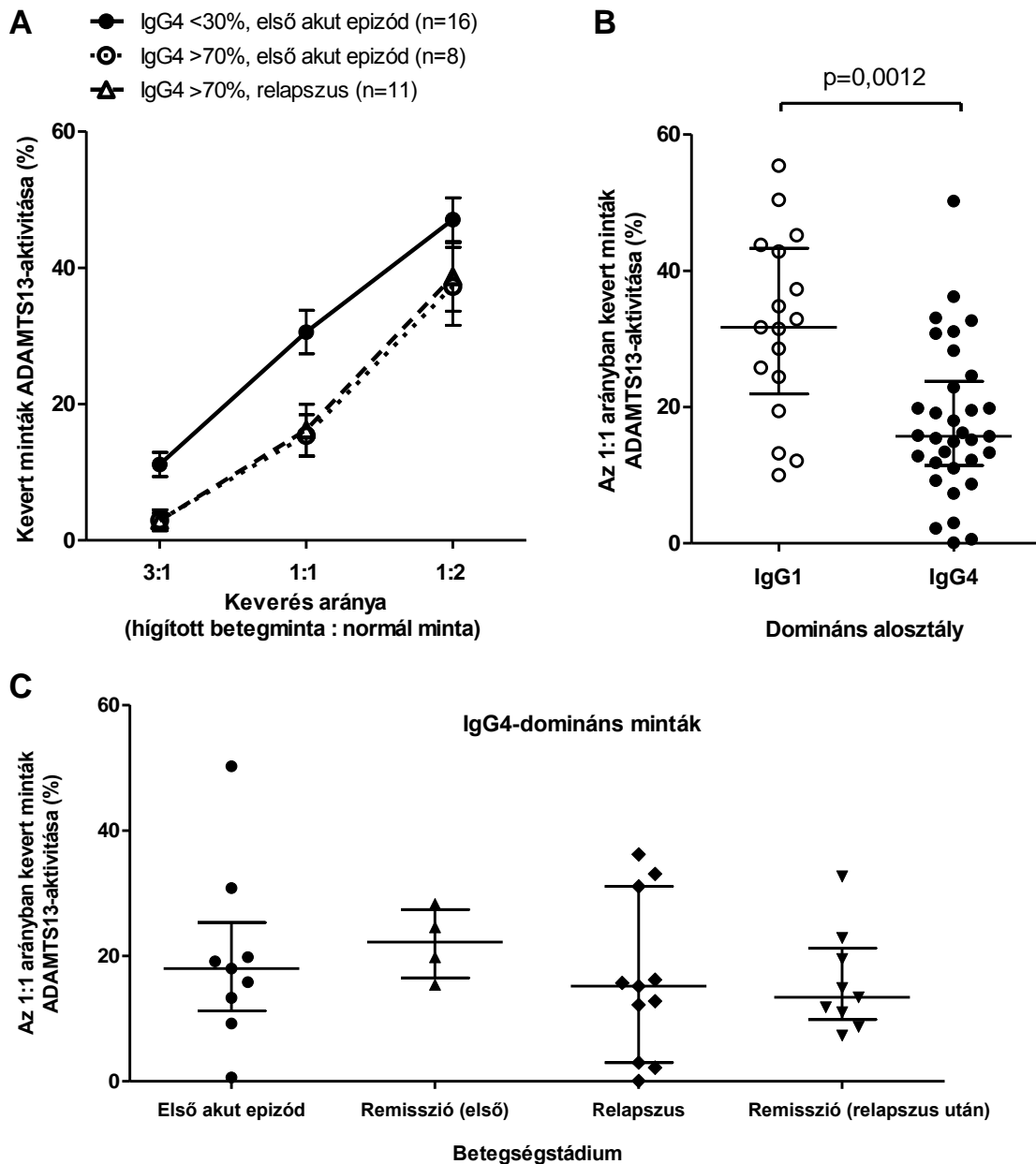
A kevert minták aktivitása és az ADAMTS13 elleni IgG, illetve IgG4 autoantitestek szintje közötti összefüggés szignifikáns maradt akkor is, ha csak az első akut epizódból származó mintákat vizsgáltuk ($r = -0,278$, $p = 0,034$, illetve $r = -0,302$, $p = 0,021$).

A fenti eredmények arra utalnak, hogy az ADAMTS13-gátlás erőssége függ az ADAMTS13 elleni IgG, illetve azon belül az IgG4 alosztályba tartozó autoantitestek mennyiségétől.

4.2.5. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek fajlagos gátló hatása, és annak összefüggése az alosztályeloszlással és a betegségstádiumokkal

Hogy az egyes betegek ADAMTS13 elleni IgG autoantitestjeinek fajlagos – azaz adott autoantitest-koncentrációra vonatkoztatott – gátló hatását meghatározzuk, a választott betegmintákat azonos, 25 U/mL ADAMTS13-ellenes autoantitest-koncentrációjúra hígítottuk. A hígított betegmintákat három különböző arányban (3:1, 1:1, 1:2) inkubáltuk normál humán mintával, majd inkubációt követően meghatároztuk a kevert minták aktivitását. A korábban ismertetteknek megfelelően a kevert minta minél alacsonyabb aktivitása jelezte a gátlás erősségét.

A kevert minták aktivitását a domináns alosztály és a betegségstádium alapján képzett csoportok között hasonlítottuk össze. A fajlagos gátlóhatás vizsgálatát 35 akut és 14 remissziós mintában végeztük el. Az akut minták közül 19-ben (8 első akut, 11 relapszus) 70% felett, 16 (mind első akut) mintában 30% alatt volt az IgG4 alosztály aránya, a 14 remissziós minta mindegyikében az IgG4 volt a domináns alosztály.



13. Ábra. Betegminták fajlagos ADAMTS13-gátló hatása a domináns alosztály és a betegségstádium alapján. A betegmintákat pufferrel azonos, 25 U/mL-es anti-ADAMTS13-IgG-koncentrációjúra hígítottuk, majd eltérő arányban (3:1, 1:1, 1:2) normál humán mintával összekevertük és inkubáltuk. A kevert minták ADAMTS13-aktivitása jelzi a betegminta gátló hatásának erősségét: alacsony aktivitás erős gátló hatásra utal, és viszont. (A) Az akut betegminták fajlagos gátló hatása. A kevert aktivitás átlaga és az átlag standard hibája (SEM) van feltüntetve. (A relapszusból származó minták mindegyike IgG4-domináns volt.) Mivel az 1:1 arányban kevert minták aktivitása volt a legérzékenyebb mutató, ezért a további két ábrán csak ezt tüntettem fel. (B) A minták fajlagos gátló hatása alosztályok szerinti bontásban. (C) Az IgG4-domináns minták fajlagos gátló hatása. (Minden relapszusban, vagy azt követő remisszióban vett minta IgG4-domináns volt.)

Amint a **13. ábrán** látható, a kevert aktivitás alacsonyabb az IgG4-domináns mintákban az IgG1-domináns mintákéhoz képest.

A különbség független a betegségstádiumtól, vagyis az első akut epizódból, relapsusból, illetve remisszióból származó IgG4-domináns minták kevert aktivitása között nem volt különbség. (IgG1-domináns minták csak az első akut epizód során, illetve az azt követő remisszió alatt vett minták között voltak, ezért eltérő betegségstádiumból származó IgG1-domináns minták összehasonlítására nem volt lehetőség.)

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az IgG4-domináns minták fajlagos ADAMTS13-gátló hatása erősebb, ami alátámasztja a 4.2.4. pontban tett megállapításainkat.

4.2.6. A rizikófokozó vagy rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusok hordozásának összefüggései az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjával és alosztályeloszlásával

Annak eldöntésére, hogy vajon az egyes rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása a szerzett TTP kialakulására való fogékonyság mellett az antitestválasz egyes jellemzőire is hatással van-e, megvizsgáltuk az ADAMTS13-ellenes IgG autoantitestek koncentrációját és alosztályeloszlását a korábbi vizsgálatunk alapján rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő haplotípusok hordozása alapján képzett csoportokban.

A vizsgálatban szereplő 81 betegből 70 esetében volt ismert a HLA-DR-DQ haplotípus, közülük 47-en (67,1%) hordoztak korábbi vizsgálatunk alapján rizikófokozó (DRB1*11-DQB1*03, DRB1*15-DQB1*06), 9-en (12,9%) pedig rizikócsökkentő (DRB1*07-DQB1*02, DRB1*13-DQB1*06) haplotípusokat, két beteg egy-egy rizikófokozó és rizikócsökkentő haplotípust is hordozott.

Az ADAMTS13 elleni autoantitestek alosztályeloszlása nem különbözött a rizikófokozó vagy rizikócsökkentő haplotípus hordozása alapján képzett csoportokban.

Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek összkoncentrációja azonban magasabbnak bizonyult a rizikócsökkentő haplotípust hordozó betegek csoportjában a rizikócsökkentő haplotípust nem hordozókhoz képest (280,4 (142,8–687,0) vs. 65,7 (42,1–111,4) U/mL, $p = 0,0003$)(**14. ábra**).

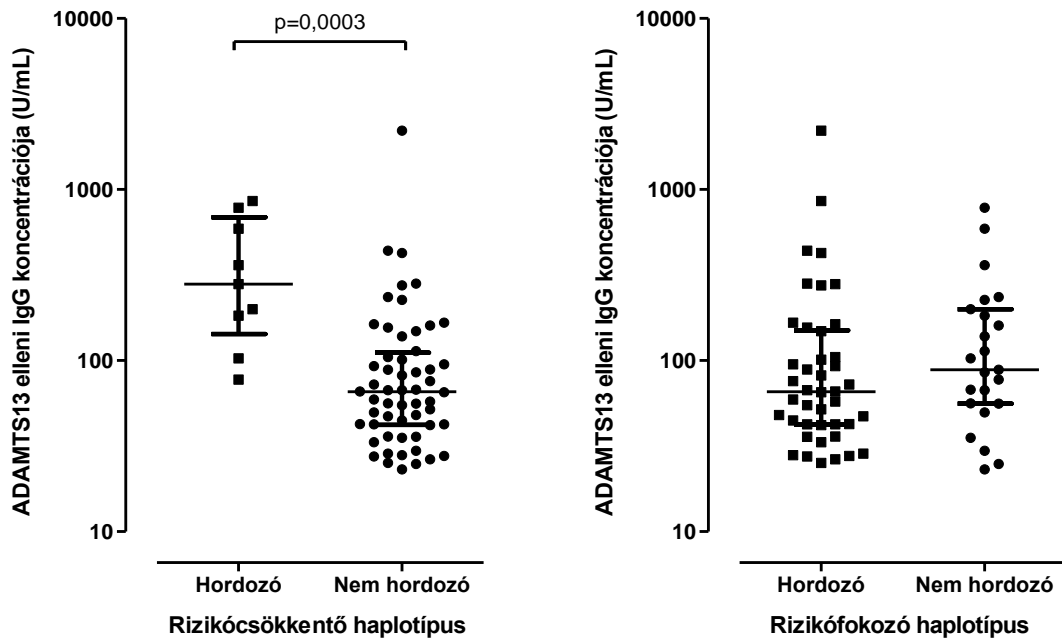
A rizikófokozó haplotípusokat hordozók és nem hordozók között nincs különbség az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek összkoncentrációja tekintetében.

A hordozott rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő haplotípusok száma és az antitestkoncentráció között nem találtunk összefüggést.

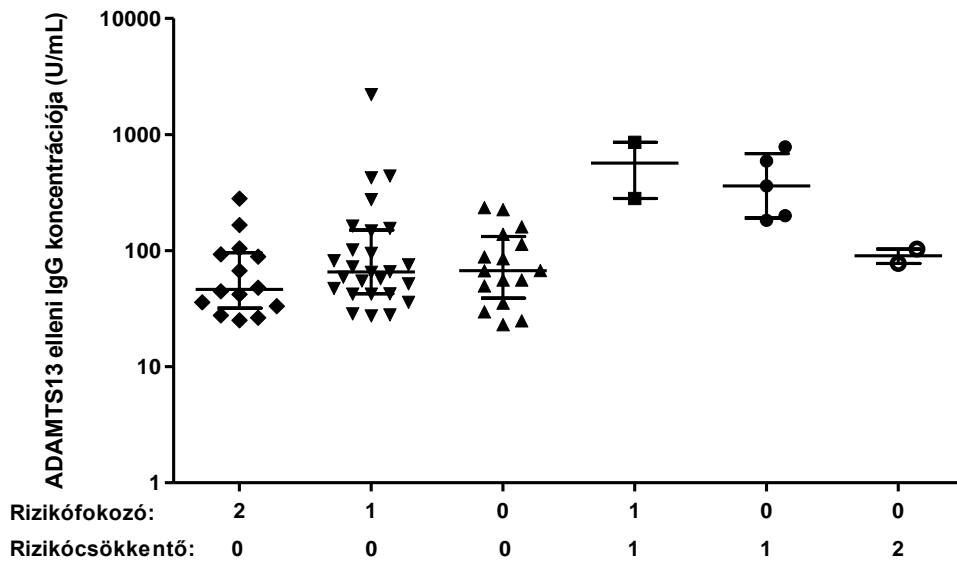
A fenti eredményeknek megfelelően a rizikócsökkentő haplotípust hordozó betegek első akut epizódból származó mintáiban magasabb ADAMTS13-ellenes IgG-szinteket mértünk, mint a rizikócsökkentő haplotípust nem hordozó betegek ugyanezen stádiumból származó mintáiban (240,2 (122,9–533,1) vs. 67,1 (43,6–152,0) U/mL, $p=0,0025$).

Emellett azt tapasztaltuk, hogy érdekes módon a rizikócsökkentő haplotípust nem hordozó betegek relapszusban vett mintáiban alacsonyabb volt az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja az első akut epizódban vett mintáikhoz képest (42,3 (31,0–67,4) vs. 67,1 (43,6–152,0) U/mL, $p = 0,0291$) (**15. ábra**). Hasonló tendencia a rizikócsökkentő haplotípust hordozó betegek esetében nem volt megfigyelhető.

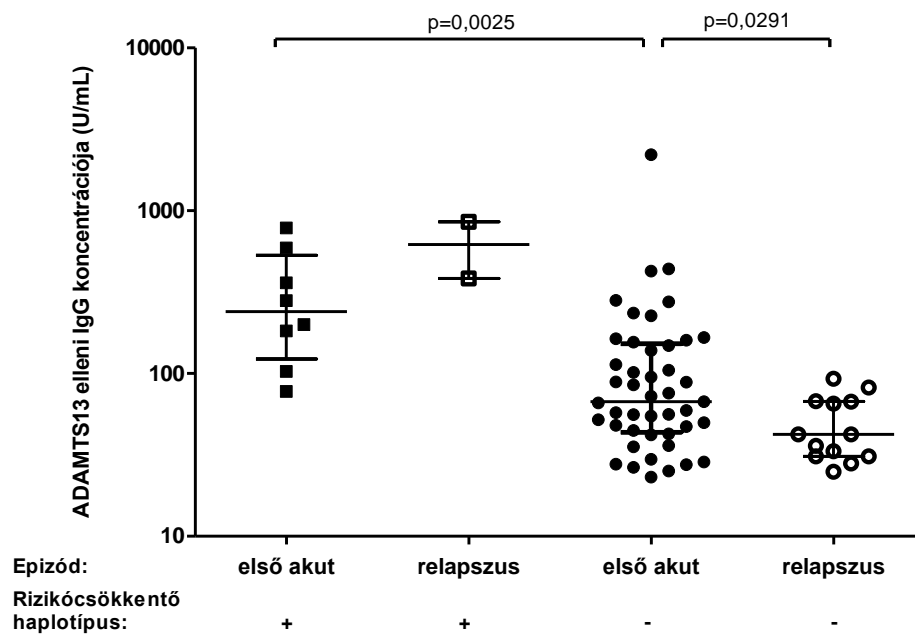
A



B



14. Ábra. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek szintje a rizikófokozó (DRB1*11-DQB1*03, DRB1*15-DQB1*06), illetve rizikócsökkentő (DRB1*07-DQB1*02, DRB1*13-DQB1*06) haplotípusokat hordozó, illetve nem hordozó TTP-s betegekben. A HLA-tipizált betegek első elérhető akut (első akut epizódból vagy relapsusból származó) mintájában mért eredmények vannak feltüntetve. A (B) panelen az x-tengely alatti számok a hordozott rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő haplotípusok számát jelölik.



15. Ábra. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek szintje a rizikócsökkentő (DRB1*07-DQB1*02, DRB1*13-DQB1*06) haplotípusokat hordozó, illetve nem hordozó TTP-s betegek első akut szakból és relapszusból származó mintáiban.
 +: rizikócsökkentő haplotípust hordoz, -: rizikócsökkentő haplotípust nem hordoz.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok és a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus gyakoriságának, valamint ezek összefüggéseinek vizsgálata szerzett TTP-s betegekben

5.1.1. Az *HLA-DR-DQ* haplotípusok gyakorisága, feltételezett rizikófokozó és rizikócsökkentő hatása

Vizsgálatunk eredményei megerősítik a DRB1*11-DQB1*03 haplotípusnak a TTP kialakulásában játszott rizikófokozó szerepét, emellett három további haplotípus esetén találtunk összefüggést a TTP kialakulásának kockázatával. A DRB1*15-DQB1*06 haplotípust hordozók aránya magasabb, a DRB1*07-DRB1*02 és a DRB1*13-DRB1*06 haplotípusokat hordozók aránya pedig alacsonyabb a TTP-s betegek körében, mint az egészséges kontrollszemélyek között, ami az előbbi haplotípus rizikófokozó és az utóbbi két haplotípus rizikócsökkentő szerepére utal.

A DRB1*11-DQB1*03 haplotípuson előforduló DRB1*11 [184-187] és DQB1*03 [184, 185, 187] allélok TTP-s betegekben tapasztalt magasabb előfordulásáról több korábbi tanulmány is beszámolt, azonban a kapcsolt öröklődés miatt ezek az eredmények önmagukban nem támasztják alá ezen allélok rizikófokozó hatását.

Érdemes kiemelni, hogy több vizsgálatban a DRB1*1101 és *1104 allélokat hordozók aránya is magasabbnak adódott a TTP-s betegek körében [184, 186]. Ezek az allélok két hasonló antigenitású, de eltérő fehérjét kódolnak. Mindkét allél megnövekedett gyakorisága arra utal, hogy vagy mindkét allél által kódolt fehérje egyaránt rizikófokozó hatással bír [184], vagy a rizikófokozó hatás egy másik, mindkét alléllal kapcsoltan öröklődő tényezőre vezethető vissza. A DRB1*11 allélok a humán genomban szinte kivétel nélkül a DQA1*0501 és DQB1*0301 allélokkal kapcsoltan fordulnak elő [208]. Érdekes módon a kizárólag ugyanezen DQ allélokhöz kapcsoltan öröklődő DRB1*12 allélok gyakorisága is magasabb a TTP-s betegek csoportjában vizsgálatunk (9,3% vs. 4,4%) és korábbi vizsgálatok (3,2% vs. 1,2% [184], illetve 10,0% vs. 3,0 [185]) eredményei szerint is. Ez arra utal, hogy a DRB1*12-DQB1*03 haplotípus gyakorisága a DRB1*11-DQB1*03 haplotípushoz hasonlóan és azzal azonos mértékben emelkedett

a TTP-s betegek körében, annak ellenére, hogy ez utóbbi allél alacsony gyakorisága miatt a különálló vizsgálatokban a változás mértéke nem érte el a szignifikanciaszintet. A fenti eredmények azt valószínűsítik, hogy a DRB1*11-DQB1*03 és DRB1*12-DQB1*03 haplotípusok azonos mértékű rizikófokozó hatásáért nem az egyes DRB1*11 és DRB1*12 allélok által kódolt különböző fehérjék felelősek, hanem a haplotípusok azonos közös részletén elhelyezkedő genetikai elem.

Ez az elem lehet a haplotípusokra jellemző DQA1*0501 és DQB1*0301 allélok által kódolt DQ molekula [185].

A haplotípusokhoz kapcsolt DRB3 allélok gyakorisága ugyan szintén magasabb TTP-s betegekben, de ezek kóroki szerepe ellen szól, hogy az ezekhez asszociált haplotípusok némelyikének gyakorisága (DRB1*03, 13) nem emelkedett TTP-ben [185].

Az egyes DR és DQ molekulákat kódoló allélok mellett felvetődik a feltehetően a DRB1*11-DQB1*03 haplotípuson elhelyezkedő rs6903608 polimorfizmus kóroki szerepe is [187]. Ez az SNP korábbi vizsgálatok eredményei alapján befolyásolja a HLA-, illetve T-sejt-receptor-gének expresszióját [187, 209-212], ami az antigénprezentáció hatékonyságának módosításán keresztül befolyásolhatja az autoantitestek kialakulásának kockázatát.

Érdekes módon a DRB1*11 allélt hordozók aránya a szerzett TTP mellett egyéb, nem ADAMTS13-ellenes autoantitestek által kiváltott TMA-formákban is magasabbnak bizonyult [213, 214], ami felveti annak lehetőségét, hogy a haplotípuson elhelyezkedő genetikai elemek, vagy az általuk kódolt fehérjék nemcsak az autoantitestek kialakulásában, hanem a TTP patomechanizmusának más lépéseiben is szerepet játszhatnak.

A fentiek alapján meg kell, hogy állapítsuk, hogy bár a DRB1*11-DQB1*03 haplotípusnak a TTP kialakulásában játszott rizikófokozó szerepét számos vizsgálat eredményei támasztják alá, a pontos hatásmechanizmus, illetve az ennek háttérében álló genetikai elem vagy molekula azonosítása az asszociációs vizsgálatokon túl további, funkcionális vizsgálatokat tesz szükségessé.

Függetlenül attól, hogy a DRB1*11 molekulák mennyiben felelősek a megfigyelt rizikófokozó hatásért, az asszociációs vizsgálatok eredményei által inspirált további vizsgálatok feltárták a DR11 molekuláknak az ADAMTS13-eredetű peptidek

prezentálásában [188], valamint a prezentált peptideknek a TTP-s betegek CD4+ T-sejtjeinek aktiválásában játszott szerepét [189]. A fenti vizsgálatok során bizonyítást nyert az is, hogy az ADAMTS13-eredetű peptidek prezentálására más DR, illetve DQ molekulák is képesek [188, 190, 191], illetve hogy az általuk prezentált peptidek is részt vesznek a TTP-s betegek T-sejtjeinek aktiválásában [189, 190]. További DR, illetve DQ molekuláknak a TTP kialakulásában játszott szerepére utalnak vizsgálatunk eredményei is, amelyek szerint a DRB1*11-DQB1*03 haplotípuson kívül további haplotípusok hordozása is befolyásolja a TTP kialakulásának rizikóját.

A DRB1*15-DQB1*06 haplotípust hordozók aránya vizsgálatunkban magasabb volt a TTP-s betegek csoportjában az egészséges kontrollok csoportjához képest (25,3% vs. 11,7%), ami a haplotípus rizikófokozó hatására utal. Mivel a haplotípust alkotó DR és DQ allélok más haplotípusokon gyakorlatilag nem fordulnak elő [208], ezért az asszociáció alapján nem lehet következtetni arra, hogy a hatás hátterében a haplotípus által kódolt DR vagy DQ molekulák állhatnak-e.

A DRB1*07-DQB1*02 haplotípus gyakorisága jóval alacsonyabbnak bizonyult a TTP-s betegek körében az egészséges kontrollokéhoz viszonyítva (6,7% vs. 21,6%), ami arra utal, hogy a haplotípus véd a TTP kialakulásával szemben. Az azonos DR (DRB1*0701) allélt hordozó DRB1*07-DQB1*03 haplotípus gyakorisága nem különbözött a két csoportban, ami arra enged következtetni, hogy a rizikócsökkentő hatás hátterében nem a DRB1*07 allél áll, hanem a DQB1*0202 allél, vagy a haplotípuson elhelyezkedő egyéb elemek.

A DRB1*13-DQB1*06 haplotípust hordozók aránya szintén a TTP-s betegek csoportjában volt alacsonyabb (4,0% vs. 13,6%), ami a haplotípus rizikócsökkentő hatására utal. Bár a DRB1*13-DQB1*03 haplotípust hordozók aránya nem különbözött a két csoportban, de a két haplotípus nemcsak eltérő DQ, hanem eltérő DRB1 allélokat is tartalmaz (DRB1*1301 és 1302, illetve 1303 és 1305), ezért nem lehet következtetéseket levonni a DRB1*13-DQB1*06 haplotípust alkotó DR illetve DQ alléloknak a rizikó csökkentésében játszott szerepét illetően.

Ugyan az utóbbi három asszociációt jellemző p-érték nem érte el a Bonferroni-korrekción utáni szignifikanciaszintet, ez az összehasonlítások számához képest alacsony elemszámnak tudható be, és nem cáfolja eredményeink helyességét. Nem valószínű

ugyanis, hogy az egyes haplotípusokat hordozók arányának több mint kétszeres változásai háttérben a véletlen állna, különösen annak tükrében, hogy a korábbi tanulmányok is az allélgyakoriságoknak az általunk tapasztaltnal azonos irányú és hasonló mértékű különbségeiről számolnak be.

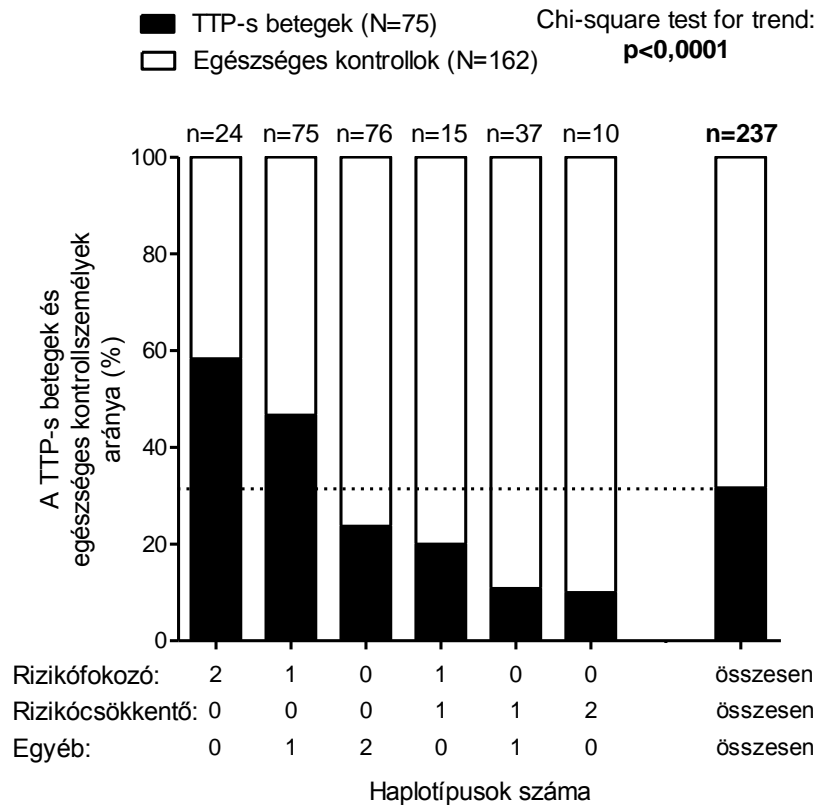
A DRB1*07 allélt hordozók TTP-s betegekben észlelt alacsonyabb arányát (14,0% vs. 29,5%)[185], illetve az allél rizikócsökkentő hatását [187] további vizsgálatok is megerősítik. A DRB1*13 allélt hordozók aránya több vizsgálat eredményei alapján egybehangzóan alacsonyabb volt TTP-s betegek körében a kontrollcsoportokhoz képest (12% vs. 21,5% [185], 15% vs. 32% [184], illetve 13% vs. 24% [186]). A fenti eredmények háttérben feltehetően DRB1*07-DQB1*02 és a DRB1*13-DQB1*06 haplotípusokat hordozó TTP-s betegek alacsonyabb aránya állhat. A DRB1*15 allél hordozása a TTP-s betegek csoportjában más vizsgálatok eredményei alapján is gyakoribb volt (30% vs. 27% [185], 26% vs. 19% [184]), bár az általunk tapasztaltnál kisebb különbséggel. Ezen felül leírták a DRB1*15-DQB1*06 haplotípus előfordulását egy egyéb rizikóhaplotípussal nem rendelkező TTP-s betegben [215].

Vizsgálatunkban a DRB1*04-DQB1*03 haplotípus hordozásának gyakorisága (10,7% vs. 18,5%), és ennek megfelelően a DRB1*04 allélt hordozók aránya (10,7% vs. 21,1%) alacsonyabbnak bizonyult TTP-s betegekben, mint az egészséges kontrollokban. Eredményeink alátámasztják korábbi vizsgálatok eredményeit, amelyekben a DRB1*04 allélt hordozók alacsonyabb arányáról (10,0% vs. 30,0% [185], 9,8% vs. 27,9% [184]) számolnak be. Az összefüggés a mi esetünkben nem érte el a szignifikanciaszintet ($p=0,0543$), amelynek háttérben az állhat, hogy a kelet-európai populációban [197] és így a mi kontrollcsoportunkban is eleve alacsonyabb a DRB1*04 allélt hordozók aránya (21,1% vs. 35% [185] és 27,9% [184]).

A korábbi tanulmányok eredményeivel való fent ismertetett egyezések mellett egy jelentős különbséget is tapasztaltunk. John és mtsai. [186] azt a megállapítást tették, hogy a DQB1*0202 allél fokozza a TTP kialakulásának kockázatát, míg a mi eredményeink az allélt magába foglaló DRB1*07-DQB1*02 haplotípus rizikócsökkentő hatására utalnak. A másik munkacsoport következtetését arra alapozza, hogy TTP-s betegcsoportjukban az említett allélt hordozók gyakorisága (20,0%) jóval magasabb volt, mint az <http://www.allelefrequencies.net> honlap adatbázisából választott 174 fős

német kontrollcsoportban (1,2%). Az allélt hordozóknak a kontrollcsoportban tapasztalt gyakorisága azonban nem felel meg az allél populációs gyakoriságának, ugyanis a nyugat-közép-európai régió 200 főnél nagyobb adatbázisai alapján a hordozók aránya 14% (Hollandia) és 20% (Csehország, Svájc) között mozog, amelytől a betegcsoportjukban észlelt arány nem tér el szignifikánsan. A mi kontrollcsoportunkban a DRB1*07-DQB1*02 haplotípust (és így a DQB1*0202 allélt) hordozók aránya 21,6%, ami megfelel az allél populációs gyakoriságának.

A hordozott rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő haplotípusok száma és a betegség kockázata közötti összefüggést a **16. ábrán** ábrázoljuk.



16. Ábra. A TTP-s betegek és egészséges kontrollszemélyek aránya a hordozott rizikófokozó és rizikócsökkentő haplotípusok száma alapján képzett csoportokban. A vizsgálatunk eredményei alapján a DRB1*11-DQB1*03 és DRB1*15-DQB1*06 haplotípusokat tekintettük rizikófokozó, a DRB1*07-DQB1*02 és DRB1*13-DQB1*06 haplotípusokat pedig rizikócsökkentő haplotípusnak. A pontozott vonal a TTP-s betegek összesített arányát mutatja. N, n: a csoport, illetve alcsoport elemszáma.

A **16. ábrán** láthatjuk, hogy a TTP-s betegek aránya a hordozott rizikófaktorok számának növekedésével és a rizikócsökkentő haplotípusok számának csökkenésével egyre nő, ami arra utal, hogy minél több rizikófaktor (p<0,0001) és minél kevesebb rizikócsökkentő (p=0,0002) haplotípust hordoz valaki, annál nagyobb esélye van a TTP kialakulására.

5.1.2. A női nem szerepe, a HLA-DR-DQ haplotípusok gyakorisága nőkben és férfiakban

A vizsgálatunkban szereplő TTP-s betegcsoportban a betegek átlagos életkora alacsonyabb (41 vs. 55-57 év), a nők aránya pedig jóval magasabb volt (80% vs. 53-59%), az egészséges kontrollok csoportjához képest. A korkülönbség feltehetően nem torzítja az elvégzett összehasonlítások eredményeit. A nők magasabb aránya pedig megegyezik korábbi publikációk eredményeivel, amelyek a nőnemű betegek magasabb arányáról számoltak be bizonyos autoimmun betegségekben [173, 174], többek között szerzett TTP-ben is [22, 72, 194]. A nők TTP-s betegcsoportban tapasztalt magasabb aránya arra utal, hogy a női nem rizikófaktor a TTP kialakulására nézve (OR: 4,00 (2,27-7,04)). Bár a nők egyes autoimmun betegségekre való nagyobb fogékonyságának hátterében álló lehetséges mechanizmusok (nemi hormonok, menstruáció, mikrokimérizmus, stb.) pontos szerepe egyelőre ismeretlen, ezek egy része egy egyedi, csak a nőkre jellemző patomechanizmus létét valószínűsíti. Mindezek alapján érdekesnek tartottuk megvizsgálni, hogy a HLA-DR-DQ haplotípusoknak a TTP kialakulásának rizikójával kapcsolatos összefüggései azonosak-e a nők és a férfiak esetén.

A női betegek és női kontrollok összehasonlítása alapján azt találtuk, hogy ugyanazon haplotípusokat hordozók aránya bizonyult szignifikánsan magasabbnak (DRB1*11-DQB1*03, DRB1*15-DQB1*06), illetve alacsonyabbnak (DRB1*07-DQB1*02, DRB1*13-DQB1*06) a TTP-s betegcsoportban, mint a teljes (férfi és női) TTP-s betegcsoport és kontrollo csoport összehasonlítása során. Ez nem meglepő annak tükrében, hogy a nők alkotják a TTP-s betegcsoport 80%-át.

Az azonban érdekes, hogy az összefüggések a férfiak kizárása esetén az alacsonyabb elemszámok dacára kivétel nélkül erősebbek lettek. Ez azt a látszatot kelti, mintha a fenti összefüggések a női betegekre jellemző összefüggések lennének, amelyet a TTP-s

betegcsoportokban alulreprezentált férfi betegek eredményei nem tudnak elfedni. Sajnos a férfi TTP-s betegek alacsony száma nem tette lehetővé a TTP kialakulásának rizikója és a DR-DQ haplotípusok közti összefüggések vizsgálatát férfi TTP-s betegek és férfi kontrollok összehasonlítása útján.

5.1.3. A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus gyakorisága és rizikót befolyásoló hatása

A számos autoimmun betegségben rizikófokozó hatású ritka *PTPN22* c.1858T allélt hordozók aránya megegyezett a TTP-s betegek és az egészséges kontrollok csoportjában, nemek szerinti bontásban is, ami arra utal, hogy a c.1858T allél hordozása önmagában nem befolyásolja a TTP kialakulásának rizikóját.

Mindazonáltal az eredményeink arra utalnak, hogy a DRB1*15-DQB1*06 haplotípus rizikófokozó hatása csak a *PTPN22* c.1858T allélt hordozókban, a DRB1*07-DQB1*02 haplotípus rizikócsökkentő hatása pedig csak a c.1858T allélt nem hordozókban érvényesül.

A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus és a HLA-DR-DQ haplotípusok közötti kapcsolatból arra következtetünk, hogy a két tényező részben közös mechanizmus útján – feltehetően a T-, illetve B-limfociták aktivációjának befolyásolásán keresztül – fejt ki a szerzett TTP kialakulásának rizikójára gyakorolt hatását.

5.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációjának, alosztályeloszlásának, gátló hatásának, valamint ezek változásainak és összefüggéseinek vizsgálata

5.2.1. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja és alosztályeloszlása szerzett TTP-ben

Eredményeink megerősítik a korábbi vizsgálatok során tett megfigyeléseket [125, 131, 132], miszerint TTP-s betegekben az ADAMTS13 elleni autoantitestek túlnyomó része az IgG4 és IgG1 alosztályokba tartozik, míg az IgG3 és IgG2 alosztályok csak a betegek kisebb hányadában és alacsonyabb koncentrációban fordulnak elő.

Az általunk vizsgált mintákban az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek csaknem kétharmadát IgG4 alosztályú, közel egyharmadát pedig IgG1 alosztályú autoantitestek tették ki, az IgG3 és IgG2 átlagos aránya egyaránt néhány százalék körül mozgott.

Az összes minta 93%-ában mutattunk ki IgG4 alosztályú, 96%-ában pedig IgG1 alosztályú autoantitesteket, ezek az eredmények valamivel magasabbak, mint a korábbi vizsgálatok során megállapított értékek (69-90%, illetve 52-73%) [125, 131, 132], amelynek hátterében az általunk alkalmazott ELISA-módszer nagyobb érzékenysége állhat. Ennek megfelelően a minták 96%-ában legalább kétféle, 60%-ában legalább háromféle, 24%-ában pedig négyféle alosztályba tartozó autoantitestet tudtunk kimutatni. Ez hasonló a Ferrari és munkacsoportja által a TTP első epizódjában megfigyelt értékekhez (88%, 52%, illetve 23%) [131], és arra utal, hogy az ADAMTS13 elleni autoantitest-válaszban a betegek túlnyomó többségében több különböző alosztályba tartozó autoantitestek vesznek részt. Mivel egy adott B-sejt-klón csak egyféle nehézlánccal rendelkező antitesteket képes termelni, eredményeink indirekt módon alátámasztják az ADAMTS13 elleni immunválasz oligoklonális/poliklonális jellegét.

Vizsgálatunkban a különböző alosztályok abszolút koncentrációi – az IgG3 és IgG4 között észlelt negatív korreláció kivételével – pozitívan korreláltak egymással. Ennek hátterében az állhat, hogy az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja tágabb határok között változott az alosztályok egymáshoz viszonyított arányához képest. Ennek megfelelően egy magas IgG-koncentráció esetén mind az IgG1, mind az IgG4 koncentrációja egyaránt viszonylag magas volt, míg egy alacsony IgG-koncentráció esetén mindkét alosztályé viszonylag alacsony, azaz a két alosztály szintjei összességében pozitívan korreláltak.

Az, hogy az IgG3 és IgG4 koncentrációja között a fenti jelenség ellenére is negatív korrelációt figyeltünk meg, különösen érdekes. Az IgG3- és IgG4-szintek közti fordított összefüggés – hasonlóan Ferrari és munkacsoportja által leírt IgG1- és IgG4- szintek közötti negatív korrelációhoz – az immunválasz eltérő polarizáltságát jelezheti. Az IgG3 ugyanis az immunválasz korai szakaszában keletkezik és az IgG alosztályok közül leghatékonyabban képes aktiválni a komplementrendszer, valamint a fehérvérsejteket

[140, 142-144]. Az IgG4 ezzel szemben alig rendelkezik effektor funkciókkal [140, 142-144], és általában tartós antigénstimuláció hatására jön létre [148].

Ez utóbbinak megfelelően TTP-ben is – az antigén (ADAMTS13) tartós jelenléte mellett – a betegség előrehaladtával az IgG4 válik domináns alosztállyá.

5.2.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek alosztályeloszlásának változása a szerzett TTP folyamán

Eredményeink alátámasztják az IgG-alsztályprofil megváltozását a betegség lefolyása során. Azt találtuk, hogy amíg az első akut epizód során a minták közel felében az IgG1 volt a domináns alosztály, addig a relapszus során, vagy egy relapszust követő remisszióban vett minták mindegyikében IgG4-dominancia igazolódott. A fenti eredményeink hasonlóak Ferrari és munkacsoportja [131] megfigyeléseihez, melyek szerint IgG4 alosztályú autoantitestek a korábban relapszuson átesett betegek mindegyikében kimutathatóak voltak, míg IgG1 alosztályú autoantitestek egyikükben sem. A két eredmény – az IgG1 alosztálynak a másik munkacsoport által észlelt teljes hiánya, illetve az általunk tapasztalt alacsonyabb aránya – közötti különbség háttérben feltehetően az általunk alkalmazott ELISA módszer korábban említett, a jelek szerint elsősorban az IgG1 alosztály esetében megnyilvánuló érzékenysége állhat. Az IgG1 alosztályú autoantitestek teljes eltűnése ellen szól, hogy két, több relapszuson átesett szerzett TTP-s beteg lépéből izolált ADAMTS13-specifikus B-sejt klónok 40%-a, illetve 75%-a IgG1 alosztályú autoantitesteket termelt [129].

A TTP diagnózisának felállítását megelőzően ismeretlen eredetű trombocitopéniás epizódon átesett négy beteg mindegyikének az első – klinikailag észlelt – akut epizód során vett mintájában az IgG4 volt a domináns alosztály. A korábbi trombocitopéniás epizódok feltehetően a TTP szubklinikus megnyilvánulásai voltak, esetükben tehát az első diagnosztizált akut epizód immunológiai szempontból egy relapszusnak feleltethető meg. A fenti betegek első mintáiban igazolt IgG4-dominancia tehát tovább erősíti a megfigyelésünket, miszerint a relapszus során vett minták mindegyikében az IgG4 alosztály dominál.

A független minták összehasonlításán túl a több mintával rendelkező betegek eredményei is megerősítik a fenti megfigyelést: a relapszus során, vagy azt követő

remisszióban vett minták esetükben is IgG4-dominánsak voltak. Ezzel összhangban, amíg IgG1-dominanciáról IgG4-dominanciára történő váltást két beteg esetén is megfigyeltünk (már az első remisszió során), addig IgG4-ről IgG1-re történő váltást egy beteg esetében sem észleltünk. Egy esetben figyeltük meg a korábban IgG4-domináns autoantitestválasz megváltozását: az egyik, első remisszió során vett mintában az IgG4 alosztályú autoantitestek eltűnését követően az IgG3 lett a domináns alosztály. Érdekes módon az IgG4 alosztályú autoantitestek eltűnésével párhuzamosan – az alacsony pozitív ADAMTS13-ellenes IgG-szint ellenére – az ADAMTS13-aktivitás teljesen normalizálódott. Ez a megfigyelés felveti az egyes alosztályok eltérő jelentőségét az ADAMTS13-deficiencia kialakulásában.

5.2.3. Az ADAMTS13 elleni IgG4 mennyiségének összefüggése a gátló hatással

Az IgG4 alosztály szerepét az ADAMTS13-gátló hatás kifejtésében további eredményeink is alátámasztották.

Egyrészt – az alosztályok közül egyedüliként – az IgG4 koncentrációja pozitívan korrelált a mintákban mért ADAMTS13-gátlással. Hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy a fenti eredményeinket az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek eltérő összkoncentrációi befolyásolhatták, meghatároztuk a minták fajlagos gátló hatását is, vagyis az azonos ADAMTS13-ellenes IgG-koncentrációjúra hígított minták gátló hatását közvetlenül is összehasonlítottuk. Azt találtuk, hogy IgG4-domináns minták fajlagos gátló hatása erősebb volt az IgG1-domináns mintákénál. Érdekes módon nem találtunk összefüggést az IgG4-domináns minták fajlagos gátló hatása és a betegségstádium között, azaz eredményeink nem utalnak arra, hogy a minták gátlóképessége a betegség előrehaladtával fokozódik.

Elképzelhető, hogy az IgG4 alosztályú autoantitestek hatékonyabb ADAMTS13-gátló hatása hátterében azok magasabb affinitása áll. Az IgG4 alosztályú antitesteknek – a funkcionális monovalenciájuk miatti alacsonyabb aviditásuk ellenére, vagy éppen ezt ellensúlyozandó – általában magas affinitásáról egy, az egyes IgG-alsosztályok szerkezetét és funkcióját összefoglaló review-ban is említést tesznek [140].

IgG4 alosztályú antitestek általában hosszas antigénstimuláció után, az immunválasz késői szakaszában keletkeznek [148]. Mivel az IgG4 alosztályra történő váltás

feltehetően a csíráközpont-reakció során megy végbe, ahol ezzel párhuzamosan affinitásérés is történik, elképzelhető, hogy az IgG4 alosztályú antitestek magasabb affinitása valójában az alosztályváltással párhuzamosan lezajló szomatikus hipermutáció és affinitásérés következménye.

Lehetséges azonban, hogy a magasabb affinitás hátterében az alkalmazott nehézláncok eltérő szerkezete áll. Ez az antitestek működésének klasszikus felfogása alapján – miszerint a variábilis régiók az antigénspecificitásért, a konstans régiók pedig az effektor funkciókért felelősek – a fenti megállapítás meglepően hangzik. Azonban egyes korábbi vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a konstans régiók szerkezete hatással lehet az antitestkötő rész konformációjára; a hatásért az eredmények alapján a variábilis doménekhez legközelebb, az antitestek Fab részén elhelyezkedő CH1 domének variációi felelősek [141, 216-219].

Mivel a különböző nehézláncok eltérő módon befolyásolják az antigénkötőhely szerkezetét, az affinitásérés során egyes, jobb antigénkötő konformációt előidéző nehézláncok előnyt élvezhetnek a többivel szemben. Ez részben megmagyarázhatja, hogy egyes epitópok ellen nagyobb eséllyel keletkeznek egy adott alosztályba tartozó antitestek [220]. Ennek megfelelően az ADAMTS13 enzim egyes epitópjai ellen termelődő autoantitestek is nagyobb eséllyel tartozhatnak valamelyik alosztályhoz. Egy, az ADAMTS13 elleni autoantitestek doménspecificitását vizsgáló tanulmányban [123] arról számoltak be, hogy a relapszus során vett minták túlnyomó részében eltűntek az ADAMTS13-enzim C-terminális régiói ellen irányuló autoantitestek, amelyek az első shub során vett mintában kimutathatóak voltak, az N-terminális rész (spacer domén) elleni, gátló autoantitestek azonban az összes relapszus során vett mintában jelen voltak. Mivel a relapszus során a spacer elleni gátló autoantitestek és az IgG4 alosztályú antitestek aránya is magasabb volt, elképzelhető, hogy a spacer-ellen főleg IgG4 alosztályú autoantitestek termelődnek, míg a C-terminális régiók elleni autoantitestek elsősorban más alosztályokhoz tartoznak. Ez az arányeltolódás szintén magyarázhatja az IgG4 alosztályba tartozó autoantitestek erősebb fajlagos gátló hatását.

A fenti elképzelésnek bizonyos mértékig ellentmond az a megfigyelés, hogy a TTP-s betegek lépéből izolált, az ADAMTS13 spacer doménje ellen irányuló, közös CD3

régióval rendelkező B-sejt-klónok némelyike IgG1, némelyike pedig IgG4 alosztályú antitesteket termel.

Annak megállapítása, hogy a fent ismertetett, vagy egyéb lehetséges mechanizmusok valójában milyen mértékben járulnak hozzá az IgG4 alosztályba tartozó ADAMTS13 elleni autoantitestek erősebb ADAMTS13-gátló hatásához, további vizsgálatokat tesz szükségessé.

5.2.4. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek alacsonyabb koncentrációja relapszusban

Eredményeink arra utalnak, hogy a relapszus során az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek szintje alacsonyabb, mint az első akut epizód idején. A két stádiumból származó minták közti különbség a rizikócsökkentő haplotípust nem hordozók körében statisztikailag is szignifikánsnak bizonyult.

Korábban ismertetett eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a relapszusból származó minták kivétel nélkül IgG4-dominánsak, valamint hogy az IgG4-domináns mintákban erősebb ADAMTS13-gátlás detektálható. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy relapszusban a minták átlagos ADAMTS13-gátló hatása erősebb az első epizódhoz képest. Ennek következtében relapszusban alacsonyabb autoantitest-koncentrációk is elegendőek lehetnek a kritikus mértékű ADAMTS13-gátlás előidézéséhez.

A relapszusban tapasztalt alacsonyabb antitestkoncentrációkat emellett az is magyarázhatja, hogy a korábban TTP-s epizódon átesett betegek és kezelőorvosaik a betegség ismeretében gyorsabban felismerik a kialakuló új epizód jeleit, így diagnózis felállítása és a kezelés megkezdése (valamint a vizsgálatunkban szereplő minták levétele) az epizód korábbi, kevésbé súlyos fázisában történik meg.

A gyorsabb diagnózis és kezelés valószínűleg szerepet játszik a relapszusoknak az első epizódokhoz viszonyítva enyhébb klinikumához (magasabb trombocitaszám, alacsonyabb LDH, kevesebb plazmaferezis remisszióig) [27]. Mindazonáltal elképzelhető, hogy az akut epizódok során a súlyossággal (magasabb mortalitás, több plazmaferezis remisszióig, alacsonyabb trombocitaszám) korreláló IgG1 és IgG3

alosztályok [134] alacsonyabb aránya is közrejátszik a relapszusok enyhébb lefolyásában.

5.2.5. A HLA-DR-DQ haplotípusok kapcsolata az ADAMTS13 elleni autoantitestek szintjével

Vizsgálatunk eredményei alapján a rizikócsökkentő haplotípust (DRB1*07-DQB1*02 vagy DRB1*13-DQB1*06) hordozó betegekben magasabb az ADAMTS13 elleni IgG összkoncentrációja a rizikócsökkentő haplotípust nem hordozó betegekhez képest. Az alosztályok aránya nem különbözött a két csoport között. A rizikóhaplotípust (DRB1*11-DQB1*03, DRB1*15-DQB1*06) hordozó, illetve nem hordozó betegek között nem volt különbség az ADAMTS13 elleni autoantitestek összkoncentrációjában vagy alosztályeloszlásában.

Számos elmélet született az egyes DR és DQ molekulák rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő hatásával kapcsolatban. Ezek egyike szerint elsősorban a DQ molekulák eltérő stabilitása és ennek következtében eltérő expressziója állhat az autoimmunitás hátterében [156]. A modell értelmében azok a DQ molekulák, amelyek csak kis affinitással tudják prezentálni a peptidet, csak kis mértékben aktiválják az adott DQ-peptid komplexet specifikusan felismerő éretlen CD4+ T-sejteket. A kismértékű aktiváció nem elégséges a sejtek önmegsemmisítő programjának beindításához, így ezek a sejtek megmenekülnek a saját antigéneket hatékonyan felismerő T-sejteket célzó negatív szelekció elől. A saját peptid-MHC komplexekre specifikus T-sejtek lehetővé teszik az autoimmun reakció kialakulását.

A fenti elmélet alapján a rizikócsökkentő haplotípusok a fentiek ellentétéként, a saját peptidek hatékony prezentációja útján csökkentik az autoreaktív T-sejtek fennmaradásának az esélyét. Ha viszont valamilyen módon egy ilyen T-sejt-klón mégis fennmarad, és kialakul a fehérje elleni immunválasz, a DQ molekulákon keresztüli hatékony antigénprezentáció erősebb antitestválaszhoz vezethet. Amennyiben a fenti elmélet helytálló, ez a mechanizmus magyarázhatja a magasabb autoantitestszinteket a rizikócsökkentő haplotípusokat hordozó TTP-s betegek csoportjában.

5.3. Az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz lehetséges modellje

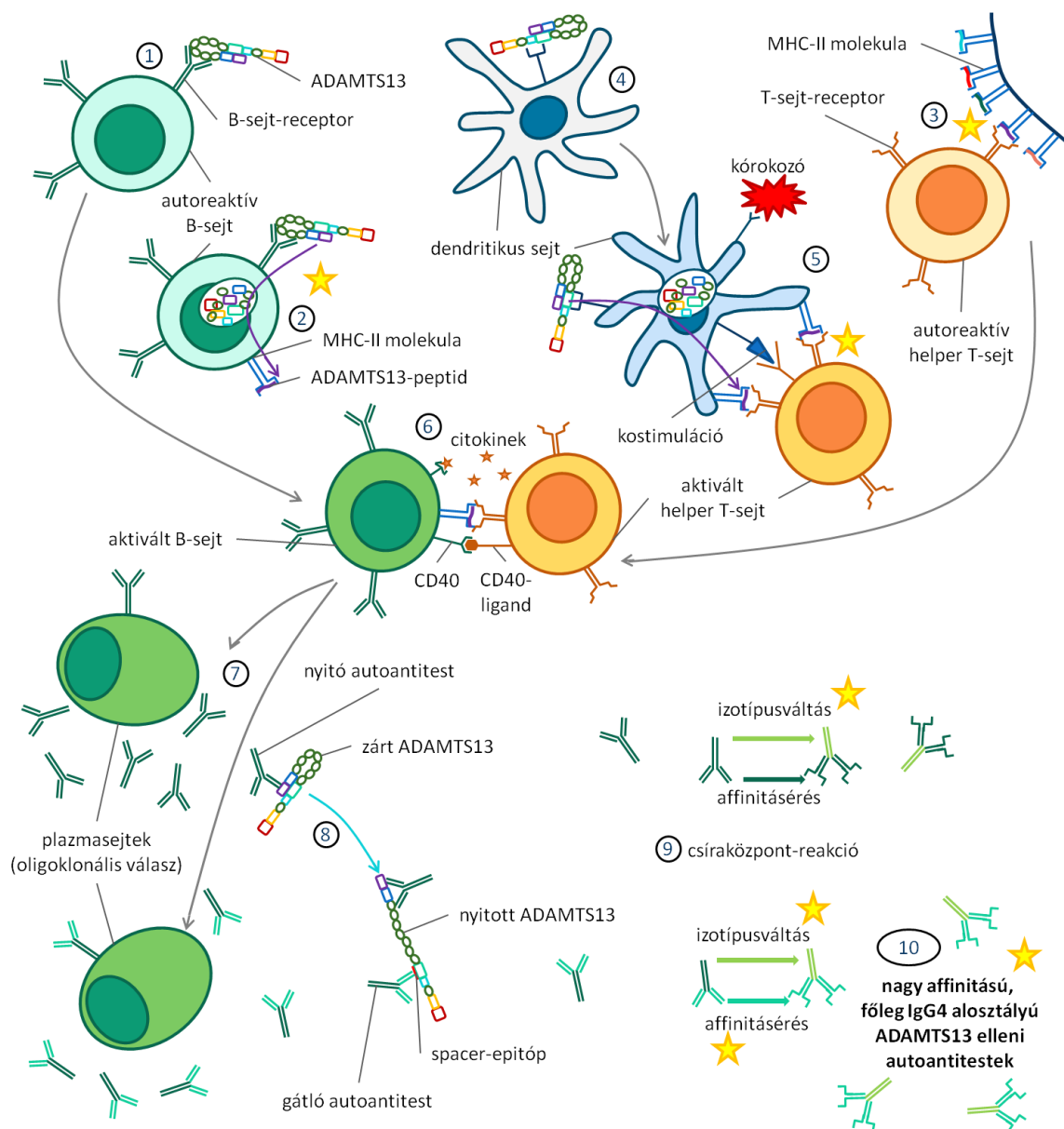
A fentiek összegzésképpen a jelenleg rendelkezésünkre álló ismeretek alapján fel szeretném vázolni a szerzett TTP hátterében álló ADAMTS13-ellenes autoantitestválasz kialakulásának egy lehetséges modelljét, majd kiemelni, hogy a dolgozatomban bemutatott eredmények a modell mely részleteinek pontosabb megértéséhez járultak hozzá. A modell főbb lépései a következők (**17. ábra**):

1. A csontvelőben az ADAMTS13 enzimet felismerő B-sejtek megmenekülhetnek a negatív szelekció elől. Ezt az egészséges egyének jelentős hányadában kimutatható ADAMTS13-ellenes antitestek alátámasztják.
2. Az autoreaktív B-sejtek MHC-II molekulákhoz asszociáltan bemutatják az ADAMTS13-eredetű peptideket a helper T-sejteknek.
3. Egyes, az ADAMTS13 enzim adott peptidjeit felismerő helper T-sejtek megmenekülhetnek a negatív szelekció elől, amennyiben a thymusban bemutatott autoantigénre csak kismértékű aktivációval reagálnak.
4. A dendritikus sejtek a mannóz-receptorukon keresztül képesek az ADAMTS13 enzim megkötésére és felvételére.
5. Amennyiben a dendritikus sejtek fertőzés hatására aktiválódnak, az antigénprezentáció határfoka megnő – különösen abban az esetben, ha a kórokozóhoz történő esetleges kötődése által az ADAMTS13 internalizációja is fokozódik. A dendritikus sejt az ADAMTS13-eredetű peptideket kostimulációs molekulák jelenlétében mutatja be a helper T-sejteknek, aminek következtében az ADAMTS13 T-sejt-epitópjait felismerő T-sejtek aktiválódhatnak.
6. Az aktivált helper T-sejtek felismerik az ADAMTS13-specifikus B-sejtek által bemutatott T-sejt-epitópokat, és citokinek termelésén, illetve CD40-ligand kifejezésén keresztül aktiválják a B-sejteket.
7. Az aktivált B-sejtek ADAMTS13 elleni autoantitesteket termelő plazmasejteké alakulnak át. A folyamatban több B-sejt-klón érintett, amelyek eltérő hatású és patogenitású antitesteket termelnek.

8. Az antitestek egy része képes az ADAMTS13 enzim konformációjának felnyitására (nyitó autoantitestek). A konformációváltozás következtében új, eddig rejtett ADAMTS13-epitópok válnak hozzáférhetővé az immunrendszer számára. A gátló autoantitestek túlnyomó része ehhez a korábban rejtett spacer-régióhoz kötődik.

9. A B-sejt-aktivációt követő csíráközpont- (germinális centrum) reakció során az antitestek affinitásérésen és izotípusváltáson mennek keresztül.

10. A fenti folyamatok végeredményeként nagy affinitású, gátló hatású, megváltozott alosztályeloszlású patogén ADAMTS13-ellenes autoantitestek jönnek létre.



17. Ábra. Az ADAMTS13 elleni immunválasz kialakulásának lehetséges modellje.

A csillagok azokat a lépéseket jelölik, amelyek pontosabb megismeréséhez a dolgozatomban ismertetett eredményeink hozzájárultak. Részletek a szövegben.

A dolgozatomban bemutatott eredmények a fent ismertetett modell több lépésének a pontosabb megértéséhez járulnak hozzá, illetve támasztják alá azokat.

A HLA-DR és HLA-DQ (MHC-II) molekulák az antigénprezentáció hatékonyságán keresztül több ponton is befolyásolják a T-sejtek aktivációjának mértékét, amely szerepet játszhat mind a centrális (3. lépés), mind a perifériás (4. lépés) tolerancia áttörésében. A *PTPN22* gén által kódolt Lyp foszfatáz a limfocita-aktiváció közvetlen módosítása révén ugyanezen lépéseket befolyásolhatja, valamint a B-sejt aktivációval járó lépésekre (2., 6. lépés) is hatással lehet. Eredményeink egyrészt megerősítették a HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulására gyakorolt hatását, másrészt az új, potenciálisan rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő HLA-DR és HLA-DQ molekulák azonosítása alapját képezheti további, az MHC-II molekulák TTP-ben játszott szerepét vizsgáló sejtszintű kísérleteknek. A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus és a HLA-DR-DQ haplotípusok asszociációja arra enged következtetni, hogy a két tényező részben közös úton – a limfociták aktivációjának befolyásolása révén – gyakorol hatást a szerzett TTP kialakulásának rizikójára. Vizsgálataink során ezen felül a HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása és az ADAMTS13 elleni antitestek szintje közötti közvetlen összefüggést is találtunk.

Eredményeink alátámasztják, hogy az izotípusváltás, illetve alosztályváltás a betegség lefolyásának későbbi szakaszában – akár remisszió alatt is – megtörténhet, illetve hogy a folyamat az IgG4 alosztályú antitestek keletkezése irányába mutat. Az IgG4 alosztályba tartozó antitestek magasabb gátlóképessége feltételezésünk szerint részben arra vezethető vissza, hogy az izotípusváltás és az azzal párhuzamosan zajló, a hatékonyabb gátlást lehetővé tevő affinitásérés ugyanazon B-sejt-klónokat érinti.

A dolgozatban ismertetett eredményeinken felül a PhD munkám eredményei, illetve az ADAMTS13 elleni antitestek keletkezésével kapcsolatos ötleteink lehetővé tették, hogy bekerüljünk egy nemzetközi konzorciumba, amely többek között az ADAMTS13 enzim nyitott és zárt konformációjának szerepét vizsgálja az ADAMTS13-ellenes autoantitestek keletkezésének szempontjából.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat főbb megállapításai a következők:

6.1. A HLA-DR-DQ haplotípusok, a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus, valamint ezek összefüggéseinek hatása a szerzett TTP kialakulásának kockázatra

1. Megerősítettük a DRB1*11-DQB1*03 haplotípus rizikófokozó szerepét, továbbá megállapítottuk, hogy ezen felül a DRB1*15-DQB1*06 haplotípus hordozása növeli, a DRB1*07-DQB1*02 és DRB1*13-DQB1*06 haplotípusok hordozása pedig csökkenti a szerzett TTP kialakulásának kockázatát.
2. Megállapítottuk, hogy az 1. pontban ismertetett összefüggések a nők körében különösen erősek, az alacsonyabb elemszám ellenére is.
3. Nagyobb beteganyagon megerősítettük a korábbi megfigyelést, miszerint a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus ritka, illetve vad alléljainak gyakorisága nem tér el a szerzett TTP-s betegek és az egészséges kontrollszemélyek csoportjában.
4. Megállapítottuk, hogy a *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus befolyásolja egyes HLA-DR-DQ haplotípusoknak a szerzett TTP kialakulására gyakorolt rizikófokozó, illetve rizikócsökkentő hatását.

A DRB1*15-DQB1*06 haplotípus rizikófokozó hatása csak a ritka *PTPN22* c.1858T allélt hordozók körében, a DRB1*07-DQB1*02 haplotípus rizikócsökkentő hatása pedig a c.1858T allélt nem hordozók körében bizonyult szignifikánsnak.

6.2. Az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja, alosztályeloszlása, gátló hatása, valamint ezek változásai és összefüggései szerzett TTP-ben

- 1a. Vizsgálatunk eredményei alátámasztják azt a korábbi megfigyelést, hogy szerzett TTP-ben az ADAMTS13 elleni IgG izotípusú autoantitestek elsősorban az IgG4 és IgG1 alosztályokba tartoznak. A minták döntő többségében többféle alosztályba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek egyidejű jelenléte igazolható.
- 1b. Megállapítottuk, hogy az egyes IgG alosztályokba tartozó ADAMTS13-ellenes autoantitestek aránya a betegség lefolyása során jellegzetes változásokat mutat.

Az első akut epizódhoz képest relapszusban az IgG4 alosztályú autoantitestek aránya magasabb, míg az IgG1 és IgG3 alosztályú autoantitestek aránya alacsonyabb.

Ezen felül a független minták összehasonlítása, illetve a több mintával rendelkező betegek eredményei egyaránt arra utalnak, hogy a relapszusban, illetve relapszust követő remisszióban vett minták mindegyikében az IgG4 a domináns alosztály.

2. Megállapítottuk, hogy az IgG4 alosztályú ADAMTS13-ellenes autoantitesteket magasabb arányban tartalmazó minták ADAMTS13-gátló hatása erősebb a többi mintához viszonyítva.

Elsőként vizsgáltuk szisztematikusan, nagyobb esetszámú TTP-s betegcsoportban az ADAMTS13-ellenes IgG autoantitestek alosztályeloszlásának kapcsolatát az ADAMTS13-gátlás erősségével. Megállapításunkat a következő két, egymást alátámasztó eredményünkre alapozzuk. Egyrészt az IgG alosztályok közül egyedül az IgG4 alosztályú autoantitestek koncentrációja korrelált az ADAMTS13-gátlás erősségét jelző mutatóval. Másrészt az IgG4-domináns minták azonos ADAMTS13-ellenes IgG-koncentrációra vonatkoztatott gátlóképesége erősebbnek bizonyult az IgG1-domináns mintákénál.

3. Összefüggést találtunk a HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása, illetve az ADAMTS13 elleni autoantitestválasz egyes jellemzői között.

Elsőként vizsgáltuk meg a HLA-DR-DQ haplotípusok hordozásának és az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz egyes jellemzőinek kapcsolatát.

Eredményeink arra utalnak, hogy az autoantitestek koncentrációja magasabb a rizikócsökkentő haplotípusokat (DRB1*07-DQB1*02 és DRB1*13-DQB1*06) hordozó betegek körében az azokat nem hordozó betegekhez képest.

Emellett azt figyeltük meg, hogy a rizikócsökkentő haplotípust nem hordozó betegek körében az ADAMTS13 elleni IgG autoantitestek koncentrációja a relapszus során vett mintákban alacsonyabb az első akut epizód során vett mintákhoz képest.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A trombotikus trombocitopéniás purpura (TTP) hátterében az ADAMTS13 enzim deficiens aktivitása áll. A TTP szerzett formájában a deficienciát ADAMTS13-ellenes autoantitestek okozzák, ám ezek keletkezésének pontos mechanizmusa egyelőre ismeretlen. Célunk az ADAMTS13 elleni autoantitest-válasz pontosabb megismerése volt. Első vizsgálatunkban egyes genetikai tényezőknek – HLA-DR-DQ haplotípusoknak, illetve a *PTPN22* gén c.1858C>T polimorfizmusának – a szerzett TTP kialakulására hajlamosító szerepét vizsgáltuk 75 szerzett TTP-s beteg és összesen 204 egészséges kontrollszemély genetikai eredményeinek összevetésével. Második vizsgálatunkban az autoantitest-válasz egyes jellemzőit – az ADAMTS13 ellenes IgG autoantitestek koncentrációját, alosztályeloszlását és gátlóképességét – vizsgáltuk a mintavételi stádium, és a genetikai (HLA-DR-DQ) háttér függvényében, 81 szerzett TTP-s beteg 101 mintájának bevonásával. Vizsgálatunkban a DRB1*11-DQB1*03 és DRB1*15-DQB1*06 haplotípusokat hordozók aránya magasabb, a DRB1*07-DQB1*02 és a DRB1*13-DQB1*06 haplotípusokat hordozók aránya pedig alacsonyabb volt a TTP-s betegek csoportjában az egészséges kontrollokéhoz viszonyítva, ami arra utal, hogy az előbbi két haplotípus növeli, az utóbbi két haplotípus pedig csökkenti a szerzett TTP kialakulásának a kockázatát. A nők körében a fenti összefüggések az összesített vizsgálathoz képest erősebbnek bizonyultak, az alacsonyabb elemszám ellenére is. A *PTPN22* c.1858C>T polimorfizmus előfordulása nem különbözött a szerzett TTP-s betegek és egészséges kontrollok között, de eredményeink arra utalnak, hogy a polimorfizmus befolyásolja a DRB1*15-DQB1*06 haplotípus rizikófaktorozó, illetve a DRB1*07-DQB1*02 haplotípus rizikócsökkentő hatását.

Eredményeink megerősítik a korábbi megfigyeléseket, miszerint az ADAMTS13 elleni autoantitestek döntően az IgG1 és IgG4 alosztályokba tartoznak. A betegség előrehaladtával az alosztályeloszlás jellegzetes megváltozását figyeltük meg: relapszusban az IgG4 aránya magasabb, az IgG1 aránya pedig alacsonyabb volt az első akut szakhoz viszonyítva; minden relapszus alatt, vagy relapszust követő remisszióban vett mintában az IgG4 alosztály dominált. Összefüggést találtunk az IgG4 alosztályú autoantitestek mennyisége és az ADAMTS13-gátlás erőssége között. Emellett azt tapasztaltuk, hogy a rizikócsökkentő HLA-DR-DQ haplotípusok hordozása szerzett TTP-s betegekben magasabb ADAMTS13 elleni IgG-szintekkel társul.

8. SUMMARY

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is characterized by the deficiency of the enzyme ADAMTS13. In the acquired form of TTP, the deficiency is caused by anti-ADAMTS13 autoantibodies. The exact mechanism of the development of these autoantibodies is unknown to date. Our aim was to improve our knowledge on the autoantibody-response against ADAMTS13. In our first study, we investigated the role of certain genetic factors – HLA-DR-DQ haplotypes, *PTPN22* c.1858C>T polymorphism – in determining the susceptibility to acquired TTP, by analyzing the genetic data of 75 acquired TTP patients and 204 healthy control subjects. In our second study, we investigated certain characteristics of the autoantibody response – concentration, subclass distribution and inhibitory potential of anti-ADAMTS13 IgG autoantibodies – according to disease stage and genetic (HLA-DR-DQ) background, by analyzing 101 samples of 81 acquired TTP patients. The proportions of individuals carrying the DRB1*11-DQB1*03 and DRB1*15-DQB1*06 haplotypes were higher, whereas the proportions of those carrying the DRB1*07-DQB1*02 and DRB1*13-DQB1*06 haplotypes were lower among acquired TTP patients than among healthy controls, indicating that the first two haplotypes act as risk factors, while the latter two haplotypes act as protective factors for acquired TTP. The above associations were even stronger when investigating women only, despite of the lower number of individuals. The prevalence of the *PTPN22* c. 1858C>T polymorphism in acquired TTP patients did not differ from that in healthy individuals, but our results suggest that the polymorphism influences the predisposing and protective effect of DRB1*15-DQB1*06 and DRB1*07-DQB1*02, respectively. Our results support the previous findings that showed that the anti-ADAMTS13 autoantibodies are primarily of the IgG1 and IgG4 subclasses. We observed a change in subclass distribution during the course of the disease: the proportion of IgG4 was higher and that of IgG1 was lower in relapse compared to the first acute episode; all samples taken during a relapse or in remission following a relapse were IgG4-dominant. We found an association between the amount of IgG4 and the strength of ADAMTS13 inhibition. Furthermore, we discovered that anti-ADAMTS13 IgG levels were higher in patients carrying protective HLA-DR-DQ haplotypes compared to patients who did not carry these haplotypes.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Moschcowitz E. (1924) Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc N Y Pathol Soc*, 24: 21–24.
- [2] Singer K, Bornstein FP, Wile SA. (1947) Thrombotic thrombocytopenic purpura; hemorrhagic diathesis with generalized platelet thromboses. *Blood*, 2: 542-554.
- [3] Amorosi EL, Ultmann JE. (1966) Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of the literature. *Medicine*, 45: 139-159.
- [4] Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. (1955) [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr*, 85: 905-909.
- [5] Lammler B, Kremer Hovinga JA, Alberio L. (2005) Thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 3: 1663-1675.
- [6] Byrnes JJ, Khurana M. (1977) Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma. *N Engl J Med*, 297: 1386-1389.
- [7] Upshaw JD, Jr. (1978) Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 298: 1350-1352.
- [8] Schulman I, Pierce M, Lukens A, Currimbhoy Z. (1960) Studies on thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood*, 16: 943-957.
- [9] Shepard KV, Bukowski RM. (1987) The treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with exchange transfusions, plasma infusions, and plasma exchange. *Semin Hematol*, 24: 178-193.
- [10] Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, Spasoff RA. (1991) Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med*, 325: 393-397.
- [11] Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, Seder RH, Hong SL, Deykin D. (1982) Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 307: 1432-1435.

- [12] Furlan M, Robles R, Lammle B. (1996) Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*, 87: 4223-4234.
- [13] Tsai HM. (1996) Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 87: 4235-4244.
- [14] Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle B. (1997) Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 89: 3097-3103.
- [15] Tsai HM, Lian EC. (1998) Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 339: 1585-1594.
- [16] Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U, Solenthaler M, Lammle B. (1998) von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 339: 1578-1584.
- [17] Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. (2001) Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*, 276: 41059-41063.
- [18] Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. (2001) Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*, 98: 1662-1666.
- [19] Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R, Sarode R, Shurin SB, Chandrasekaran V, Stabler SP, Sabio H, Bouhassira EE, Upshaw JD, Jr., Ginsburg D, Tsai HM. (2001) Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 413: 488-494.
- [20] Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, Murata M, Miyata T. (2011) Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost*, 9 Suppl 1: 283-301.

- [21] Reese JA, Muthurajah DS, Kremer Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, George JN. (2013) Children and adults with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe, acquired ADAMTS13 deficiency: comparison of incidence, demographic and clinical features. *Pediatr Blood Cancer*, 60: 1676-1682.
- [22] Scully M, Yarranton H, Liesner R, Cavenagh J, Hunt B, Benjamin S, Bevan D, Mackie I, Machin S. (2008) Regional UK TTP registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br J Haematol*, 142: 819-826.
- [23] Arya M, Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, Lopez JA. (2002) Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood*, 99: 3971-3977.
- [24] Moake JL. (1995) Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*, 74: 240-245.
- [25] Moake JL. (2002) Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*, 347: 589-600.
- [26] Hosler GA, Cusumano AM, Hutchins GM. (2003) Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities. A review of 56 autopsy cases. *Arch Pathol Lab Med*, 127: 834-839.
- [27] Page EE, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, Vesely SK, George JN. (2017) Thrombotic thrombocytopenic purpura: diagnostic criteria, clinical features, and long-term outcomes from 1995 through 2015. *Blood Adv*, 1: 590-600.
- [28] Mariotte E, Veyradier A. (2015) Thrombotic thrombocytopenic purpura: from diagnosis to therapy. *Curr Opin Crit Care*, 21: 593-601.
- [29] Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, Cheung B, Machin SJ, British Committee for Standards in H. (2012) Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol*, 158: 323-335.
- [30] George JN, Chen Q, Deford CC, Al-Nouri Z. (2012) Ten patient stories illustrating the extraordinarily diverse clinical features of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and severe ADAMTS13 deficiency. *J Clin Apher*, 27: 302-311.

- [31] Burrus TM, Wijdicks EF, Rabinstein AA. (2009) Brain lesions are most often reversible in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Neurology*, 73: 66-70.
- [32] Meloni G, Proia A, Antonini G, De Lena C, Guerrisi V, Capria S, Trisolini SM, Ferrazza G, Sideri G, Mandelli F. (2001) Thrombotic thrombocytopenic purpura: prospective neurologic, neuroimaging and neurophysiologic evaluation. *Haematologica*, 86: 1194-1199.
- [33] van Dorland HA, Mansouri Taleghani M, Sakai K, Friedman KD, George JN, Hrachovinova I, Knobl PN, von Krogh AS, Schneppenheim R, Aebi-Huber I, Butikofer L, Largiader CR, Cermakova Z, Kokame K, Miyata T, Yagi H, Terrell DR, Vesely SK, Matsumoto M, Lammle B, Fujimura Y, Kremer Hovinga JA, Hereditary TTPR. (2019) The International Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Registry: Key findings at enrolment until 2017. *Haematologica*.
- [34] Zafrani L, Mariotte E, Darmon M, Canet E, Merceron S, Boutboul D, Veyradier A, Galicier L, Azoulay E. (2015) Acute renal failure is prevalent in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with low plasma ADAMTS13 activity. *J Thromb Haemost*, 13: 380-389.
- [35] Perez L, Ramappa P, Guzman JA. (2008) Myocardial injury in thrombotic thrombocytopenic purpura: a frequent, perplexing complication. *Int J Cardiol*, 128: 257-260.
- [36] Hawkins BM, Abu-Fadel M, Vesely SK, George JN. (2008) Clinical cardiac involvement in thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Transfusion*, 48: 382-392.
- [37] Scully M, Goodship T. (2014) How I treat thrombotic thrombocytopenic purpura and atypical haemolytic uraemic syndrome. *Br J Haematol*, 164: 759-766.
- [38] Tsai HM, Shulman K. (2003) Rituximab induces remission of cerebral ischemia caused by thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 70: 183-185.
- [39] Sadler JE. (2017) Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 130: 1181-1188.
- [40] Furlan M, Lammle B. (2001) Aetiology and pathogenesis of thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome: the role of von

- Willebrand factor-cleaving protease. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14: 437-454.
- [41] Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. (2004) Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*, 104: 100-106.
- [42] Page EE, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, Vesely SK, George JN. (2016) Clinical importance of ADAMTS13 activity during remission in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 128: 2175-2178.
- [43] Sarode R, Bandarenko N, Brecher ME, Kiss JE, Marques MB, Szczepiorkowski ZM, Winters JL. (2014) Thrombotic thrombocytopenic purpura: 2012 American Society for Apheresis (ASFA) consensus conference on classification, diagnosis, management, and future research. *J Clin Apher*, 29: 148-167.
- [44] Scully M, Cataland S, Coppo P, de la Rubia J, Friedman KD, Kremer Hovinga J, Lammle B, Matsumoto M, Pavenski K, Sadler E, Sarode R, Wu H, International Working Group for Thrombotic Thrombocytopenic P. (2017) Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost*, 15: 312-322.
- [45] Blombery P, Scully M. (2014) Management of thrombotic thrombocytopenic purpura: current perspectives. *J Blood Med*, 5: 15-23.
- [46] Galbusera M, Noris M, Remuzzi G. (2006) Thrombotic thrombocytopenic purpura--then and now. *Semin Thromb Hemost*, 32: 81-89.
- [47] Coppo P, Wolf M, Veyradier A, Bussel A, Malot S, Millot GA, Daubin C, Bordessoule D, Pene F, Mira JP, Heshmati F, Maury E, Guidet B, Boulanger E, Galicier L, Parquet N, Vernant JP, Rondeau E, Azoulay E, Schlemmer B, Réseau d'Etude des Microangiopathies Thrombotiques de IA. (2006) Prognostic value of inhibitory anti-ADAMTS13 antibodies in adult-acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 132: 66-74.
- [48] Cohen JA, Brecher ME, Bandarenko N. (1998) Cellular source of serum lactate dehydrogenase elevation in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Apher*, 13: 16-19.

- [49] George JN. (2010) How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood*, 116: 4060-4069.
- [50] Burns ER, Lou Y, Pathak A. (2004) Morphologic diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 75: 18-21.
- [51] George JN, Nester CM. (2014) Syndromes of thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*, 371: 654-666.
- [52] Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. (2005) FRETTS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol*, 129: 93-100.
- [53] Mancini I, Valsecchi C, Lotta LA, Deforche L, Pontiggia S, Bajetta M, Palla R, Vanhoorelbeke K, Peyvandi F. (2014) FRETTS-VWF73 rather than CBA assay reflects ADAMTS13 proteolytic activity in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura patients. *Thromb Haemost*, 112: 297-303.
- [54] Knobl P. (2014) Inherited and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) in adults. *Semin Thromb Hemost*, 40: 493-502.
- [55] Peyvandi F, Lavoretano S, Palla R, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Battaglioli T, Valsecchi C, Canciani MT, Fabris F, Zver S, Reti M, Mikovic D, Karimi M, Giuffrida G, Laurenti L, Mannucci PM. (2008) ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission. *Haematologica*, 93: 232-239.
- [56] Kremer Hovinga JA, Lammler B. (2012) Role of ADAMTS13 in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012: 610-616.
- [57] Peyvandi F, Ferrari S, Lavoretano S, Canciani MT, Mannucci PM. (2004) von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 127: 433-439.
- [58] Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, Mudde G, Wolf M, Coppo P, Girma JP, Azoulay E, Brun-Buisson C, Fakhouri F, Mira JP, Oksenhendler E, Poullin P, Rondeau E, Schleinitz N, Schlemmer B, Teboul JL, Vanhille P, Vernant JP, Meyer D, Veyradier A, French C, Biological Network on Adult Thrombotic M. (2007) Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first

- episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood*, 109: 2815-2822.
- [59] George JN. (2017) The importance of clinical judgment for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*, 57: 2558-2561.
- [60] Rieger M, Mannucci PM, Kremer Hovinga JA, Herzog A, Gerstenbauer G, Konetschny C, Zimmermann K, Scharrer I, Peyvandi F, Galbusera M, Remuzzi G, Bohm M, Plaimauer B, Lammle B, Scheiflinger F. (2005) ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood*, 106: 1262-1267.
- [61] Scully M, Cohen H, Cavenagh J, Benjamin S, Starke R, Killick S, Mackie I, Machin SJ. (2007) Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br J Haematol*, 136: 451-461.
- [62] Froissart A, Buffet M, Veyradier A, Poullin P, Provot F, Malot S, Schwarzingler M, Galicier L, Vanhille P, Vernant JP, Bordessoule D, Guidet B, Azoulay E, Mariotte E, Rondeau E, Mira JP, Wynckel A, Clabault K, Choukroun G, Presne C, Pourrat J, Hamidou M, Coppo P, French Thrombotic Microangiopathies Reference C. (2012) Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit Care Med*, 40: 104-111.
- [63] Scully M, McDonald V, Cavenagh J, Hunt BJ, Longair I, Cohen H, Machin SJ. (2011) A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 118: 1746-1753.
- [64] Beloncle F, Buffet M, Coindre JP, Munoz-Bongrand N, Malot S, Pene F, Mira JP, Galicier L, Guidet B, Baudel JL, Subra JF, Tanguy-Schmidt A, Pourrat J, Azoulay E, Veyradier A, Coppo P, Thrombotic Microangiopathies Reference C. (2012) Splenectomy and/or cyclophosphamide as salvage therapies in thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience. *Transfusion*, 52: 2436-2444.

- [65] Patriquin CJ, Thomas MR, Dutt T, McGuckin S, Blombery PA, Cranfield T, Westwood JP, Scully M. (2016) Bortezomib in the treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 173: 779-785.
- [66] Ahmad HN, Thomas-Dewing RR, Hunt BJ. (2007) Mycophenolate mofetil in a case of relapsed, refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*, 78: 449-452.
- [67] Cataland SR, Jin M, Ferketich AK, Kennedy MS, Kraut EH, George JN, Wu HM. (2007) An evaluation of cyclosporin and corticosteroids individually as adjuncts to plasma exchange in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 136: 146-149.
- [68] Moore JC, Arnold DM, Leber BF, Clare R, Molnar GJ, Kelton JG. (2007) Intravenous immunoglobulin as an adjunct to plasma exchange for the treatment of chronic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang*, 93: 173-175.
- [69] Nakao H, Ishiguro A, Ikoma N, Nishi K, Su C, Nakadate H, Kubota M, Hayakawa M, Matsumoto M. (2017) Acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura successfully treated with intravenous immunoglobulin and glucocorticoid: A case report. *Medicine (Baltimore)*, 96: e6547.
- [70] Callewaert F, Roodt J, Ulrichs H, Stohr T, van Rensburg WJ, Lamprecht S, Rossenu S, Priem S, Willems W, Holz JB. (2012) Evaluation of efficacy and safety of the anti-VWF Nanobody ALX-0681 in a preclinical baboon model of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 120: 3603-3610.
- [71] Coppo P, Cuker A, George JN. (2019) Thrombotic thrombocytopenic purpura: Toward targeted therapy and precision medicine. *Res Pract Thromb Haemost*, 3: 26-37.
- [72] Kremer Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lammle B, George JN. (2010) Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 115: 1500-1511; quiz 1662.
- [73] Kremer Hovinga JA, Studt JD, Demarmels Biasiutti F, Solenthaler M, Alberio L, Zwicky C, Fontana S, Taleghani BM, Tobler A, Lammle B. (2004) Splenectomy in relapsing and plasma-refractory acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 89: 320-324.

- [74] Kappers-Klunne MC, Wijermans P, Fijnheer R, Croockewit AJ, van der Holt B, de Wolf JT, Lowenberg B, Brand A. (2005) Splenectomy for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*, 130: 768-776.
- [75] Verbij FC, Stokhuijzen E, Kaijen PH, van Alphen F, Meijer AB, Voorberg J. (2016) Identification of glycans on plasma-derived ADAMTS13. *Blood*, 128: e51-e58.
- [76] Zhou W, Inada M, Lee TP, Benten D, Lyubsky S, Bouhassira EE, Gupta S, Tsai HM. (2005) ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest*, 85: 780-788.
- [77] Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J. (2006) Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*, 4: 1396-1404.
- [78] Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y. (2004) Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 313: 212-216.
- [79] Zheng XL. (2013) Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease. *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1: 11-23.
- [80] Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. (2001) Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*, 98: 1654-1661.
- [81] Feys HB, Liu F, Dong N, Pareyn I, Vauterin S, Vandeputte N, Noppe W, Ruan C, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. (2006) ADAMTS-13 plasma level determination uncovers antigen absence in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura and ethnic differences. *J Thromb Haemost*, 4: 955-962.
- [82] Furlan M, Robles R, Morselli B, Sandoz P, Lammle B. (1999) Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*, 81: 8-13.
- [83] Crawley JT, de Groot R, Xiang Y, Luken BM, Lane DA. (2011) Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood*, 118: 3212-3221.

- [84] Zander CB, Cao W, Zheng XL. (2015) ADAMTS13 and von Willebrand factor interactions. *Curr Opin Hematol*, 22: 452-459.
- [85] Sadler JE. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*, 67: 395-424.
- [86] McGrath RT, McRae E, Smith OP, O'Donnell JS. (2010) Platelet von Willebrand factor--structure, function and biological importance. *Br J Haematol*, 148: 834-843.
- [87] Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. (2015) von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*, 125: 2019-2028.
- [88] Verweij CL, Diergaarde PJ, Hart M, Pannekoek H. (1986) Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit. *EMBO J*, 5: 1839-1847.
- [89] Wagner DD, Lawrence SO, Ohlsson-Wilhelm BM, Fay PJ, Marder VJ. (1987) Topology and order of formation of interchain disulfide bonds in von Willebrand factor. *Blood*, 69: 27-32.
- [90] Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. (2011) Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*, 117: 5033-5043.
- [91] Huang RH, Wang Y, Roth R, Yu X, Purvis AR, Heuser JE, Egelman EH, Sadler JE. (2008) Assembly of Weibel-Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 482-487.
- [92] Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA. (2002) ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*, 100: 4033-4039.
- [93] Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. (1996) Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*, 88: 2939-2950.
- [94] Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. (1996) Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*, 84: 289-297.

- [95] Turner N, Nolasco L, Moake J. (2012) Generation and breakdown of soluble ultralarge von Willebrand factor multimers. *Semin Thromb Hemost*, 38: 38-46.
- [96] Dong JF. (2005) Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. *J Thromb Haemost*, 3: 1710-1716.
- [97] Kragh T, Napoleone M, Fallah MA, Gritsch H, Schneider MF, Reininger AJ. (2014) High shear dependent von Willebrand factor self-assembly fostered by platelet interaction and controlled by ADAMTS13. *Thromb Res*, 133: 1079-1087.
- [98] Herbig BA, Diamond SL. (2015) Pathological von Willebrand factor fibers resist tissue plasminogen activator and ADAMTS13 while promoting the contact pathway and shear-induced platelet activation. *J Thromb Haemost*, 13: 1699-1708.
- [99] De Ceunynck K, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K. (2013) Unwinding the von Willebrand factor strings puzzle. *Blood*, 121: 270-277.
- [100] Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. (2009) Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*, 324: 1330-1334.
- [101] Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM, Sadler JE. (2009) Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost*, 7: 2088-2095.
- [102] Gao W, Anderson PJ, Majerus EM, Tuley EA, Sadler JE. (2006) Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 19099-19104.
- [103] Zhang Q, Zhou YF, Zhang CZ, Zhang X, Lu C, Springer TA. (2009) Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 9226-9231.
- [104] Zanardelli S, Chion AC, Groot E, Lenting PJ, McKinnon TA, Laffan MA, Tseng M, Lane DA. (2009) A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood*, 114: 2819-2828.
- [105] Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. (2009) Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple

- discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 19274-19279.
- [106] Pos W, Crawley JT, Fijnheer R, Voorberg J, Lane DA, Luken BM. (2010) An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood*, 115: 1640-1649.
- [107] Jin SY, Skipwith CG, Zheng XL. (2010) Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood*, 115: 2300-2310.
- [108] de Groot R, Lane DA, Crawley JT. (2015) The role of the ADAMTS13 cysteine-rich domain in VWF binding and proteolysis. *Blood*, 125: 1968-1975.
- [109] de Groot R, Bardhan A, Ramroop N, Lane DA, Crawley JT. (2009) Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. *Blood*, 113: 5609-5616.
- [110] Xiang Y, de Groot R, Crawley JT, Lane DA. (2011) Mechanism of von Willebrand factor scissile bond cleavage by a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 11602-11607.
- [111] Pruss CM, Notley CR, Hegadorn CA, O'Brien LA, Lillicrap D. (2008) ADAMTS13 cleavage efficiency is altered by mutagenic and, to a lesser extent, polymorphic sequence changes in the A1 and A2 domains of von Willebrand factor. *Br J Haematol*, 143: 552-558.
- [112] de Groot R, Lane DA, Crawley JT. (2010) The ADAMTS13 metalloprotease domain: roles of subsites in enzyme activity and specificity. *Blood*, 116: 3064-3072.
- [113] South K, Luken BM, Crawley JT, Phillips R, Thomas M, Collins RF, Deforche L, Vanhoorelbeke K, Lane DA. (2014) Conformational activation of ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 18578-18583.
- [114] Muia J, Zhu J, Gupta G, Haberichter SL, Friedman KD, Feys HB, Deforche L, Vanhoorelbeke K, Westfield LA, Roth R, Tolia NH, Heuser JE, Sadler JE. (2014) Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 18584-18589.

- [115] Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. (2001) Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood*, 98: 1765-1772.
- [116] Tsai HM, Raoufi M, Zhou W, Guinto E, Grafos N, Ranzurmal S, Greenfield RS, Rand JH. (2006) ADAMTS13-binding IgG are present in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*, 95: 886-892.
- [117] Scheiflinger F, Knobl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M. (2003) Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 102: 3241-3243.
- [118] Shelat SG, Smith P, Ai J, Zheng XL. (2006) Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo. *J Thromb Haemost*, 4: 1707-1717.
- [119] Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, Nozaki C, Miyata T, Fujimura Y, Nakagaki T. (2003) ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*, 102: 3232-3237.
- [120] Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, Dorner F, Lammle B, Mannucci PM, Scheiflinger F. (2004) Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 103: 4514-4519.
- [121] Luken BM, Turenhout EA, Hulstein JJ, Van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J. (2005) The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*, 93: 267-274.
- [122] Zheng XL, Wu HM, Shang D, Falls E, Skipwith CG, Cataland SR, Bennett CL, Kwaan HC. (2010) Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 95: 1555-1562.
- [123] Thomas MR, de Groot R, Scully MA, Crawley JT. (2015) Pathogenicity of Anti-ADAMTS13 Autoantibodies in Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *EBioMedicine*, 2: 942-952.

- [124] Luken BM, Turenhout EA, Kaijen PH, Greuter MJ, Pos W, van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J. (2006) Amino acid regions 572-579 and 657-666 of the spacer domain of ADAMTS13 provide a common antigenic core required for binding of antibodies in patients with acquired TTP. *Thromb Haemost*, 96: 295-301.
- [125] Pos W, Sorvillo N, Fijnheer R, Feys HB, Kaijen PH, Vidarsson G, Voorberg J. (2011) Residues Arg568 and Phe592 contribute to an antigenic surface for anti-ADAMTS13 antibodies in the spacer domain. *Haematologica*, 96: 1670-1677.
- [126] Casina VC, Hu W, Mao JH, Lu RN, Hanby HA, Pickens B, Kan ZY, Lim WK, Mayne L, Ostertag EM, Kacir S, Siegel DL, Englander SW, Zheng XL. (2015) High-resolution epitope mapping by HX MS reveals the pathogenic mechanism and a possible therapy for autoimmune TTP syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 9620-9625.
- [127] Luken BM, Kaijen PH, Turenhout EA, Kremer Hovinga JA, van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J. (2006) Multiple B-cell clones producing antibodies directed to the spacer and disintegrin/thrombospondin type-1 repeat 1 (TSP1) of ADAMTS13 in a patient with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 4: 2355-2364.
- [128] Pos W, Luken BM, Kremer Hovinga JA, Turenhout EA, Scheiflinger F, Dong JF, Fijnheer R, Voorberg J. (2009) VH1-69 germline encoded antibodies directed towards ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 7: 421-428.
- [129] Schaller M, Vogel M, Kentouche K, Lammle B, Kremer Hovinga JA. (2014) The splenic autoimmune response to ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura contains recurrent antigen-binding CDR3 motifs. *Blood*, 124: 3469-3479.
- [130] Ostertag EM, Kacir S, Thiboutot M, Gulendran G, Zheng XL, Cines DB, Siegel DL. (2016) ADAMTS13 autoantibodies cloned from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: 1. Structural and functional characterization in vitro. *Transfusion*, 56: 1763-1774.
- [131] Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA, Scheiflinger F. (2009) IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients

- with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 7: 1703-1710.
- [132] Ferrari S, Palavra K, Gruber B, Kremer Hovinga JA, Knobl P, Caron C, Cromwell C, Aledort L, Plaimauer B, Turecek PL, Rottensteiner H, Scheiflinger F. (2014) Persistence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*, 99: 779-787.
- [133] Isonishi A, Bennett CL, Plaimauer B, Scheiflinger F, Matsumoto M, Fujimura Y. (2015) Poor responder to plasma exchange therapy in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura is associated with ADAMTS13 inhibitor boosting: visualization of an ADAMTS13 inhibitor complex and its proteolytic clearance from plasma. *Transfusion*, 55: 2321-2330.
- [134] Bettoni G, Palla R, Valsecchi C, Consonni D, Lotta LA, Trisolini SM, Mancini I, Musallam KM, Rosendaal FR, Peyvandi F. (2012) ADAMTS-13 activity and autoantibodies classes and subclasses as prognostic predictors in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 10: 1556-1565.
- [135] Jin M, Casper TC, Cataland SR, Kennedy MS, Lin S, Li YJ, Wu HM. (2008) Relationship between ADAMTS13 activity in clinical remission and the risk of TTP relapse. *Br J Haematol*, 141: 651-658.
- [136] Rieger M, Ferrari S, Kremer Hovinga JA, Konetschny C, Herzog A, Koller L, Weber A, Remuzzi G, Dockal M, Plaimauer B, Scheiflinger F. (2006) Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA). *Thromb Haemost*, 95: 212-220.
- [137] Ferrari S, Knobl P, Kolovratova V, Plaimauer B, Turecek PL, Varadi K, Rottensteiner H, Scheiflinger F. (2012) Inverse correlation of free and immune complex-sequestered anti-ADAMTS13 antibodies in a patient with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 10: 156-158.
- [138] Lotta LA, Valsecchi C, Pontiggia S, Mancini I, Cannavo A, Artoni A, Mikovic D, Meloni G, Peyvandi F. (2014) Measurement and prevalence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 12: 329-336.

- [139] Mancini I, Ferrari B, Valsecchi C, Pontiggia S, Fornili M, Biganzoli E, Peyvandi F, Italian Group of TTPI. (2017) ADAMTS13-specific circulating immune complexes as potential predictors of relapse in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Intern Med*, 39: 79-83.
- [140] Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, 5: 520.
- [141] Yang D, Kroe-Barrett R, Singh S, Roberts CJ, Laue TM. (2017) IgG cooperativity - Is there allostery? Implications for antibody functions and therapeutic antibody development. *MAbs*, 9: 1231-1252.
- [142] Bruggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R, Waldmann H, Neuberger MS. (1987) Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med*, 166: 1351-1361.
- [143] Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daeron M. (2009) Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113: 3716-3725.
- [144] Bindon CI, Hale G, Bruggemann M, Waldmann H. (1988) Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med*, 168: 127-142.
- [145] Siber GR, Schur PH, Aisenberg AC, Weitzman SA, Schiffman G. (1980) Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med*, 303: 178-182.
- [146] Kapur R, Einarsdottir HK, Vidarsson G. (2014) IgG-effector functions: "the good, the bad and the ugly". *Immunol Lett*, 160: 139-144.
- [147] van Helden PM, van den Berg HM, Gouw SC, Kaijen PH, Zuurveld MG, Mauser-Bunschoten EP, Aalberse RC, Vidarsson G, Voorberg J. (2008) IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. *Br J Haematol*, 142: 644-652.
- [148] Aalberse RC, van der Gaag R, van Leeuwen J. (1983) Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J Immunol*, 130: 722-726.

- [149] Aalberse RC, Schuurman J. (2002) IgG4 breaking the rules. *Immunology*, 105: 9-19.
- [150] van der Neut Kolfshoten M, Schuurman J, Losen M, Bleeker WK, Martinez-Martinez P, Vermeulen E, den Bleker TH, Wiegman L, Vink T, Aarden LA, De Baets MH, van de Winkel JG, Aalberse RC, Parren PW. (2007) Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*, 317: 1554-1557.
- [151] Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J, Rispens T. (2009) Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*, 39: 469-477.
- [152] van der Zee JS, van Swieten P, Aalberse RC. (1986) Serologic aspects of IgG4 antibodies. II. IgG4 antibodies form small, nonprecipitating immune complexes due to functional monovalency. *J Immunol*, 137: 3566-3571.
- [153] Ludwig RJ, Vanhoorelbeke K, Leyboldt F, Kaya Z, Bieber K, McLachlan SM, Komorowski L, Luo J, Cabral-Marques O, Hammers CM, Lindstrom JM, Lamprecht P, Fischer A, Riemekasten G, Tersteeg C, Sondermann P, Rapoport B, Wandinger KP, Probst C, El Beidaq A, Schmidt E, Verkman A, Manzi RA, Nimmerjahn F. (2017) Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Front Immunol*, 8: 603.
- [154] Koneczny I. (2018) A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol*, 9: 97.
- [155] Wucherpfennig KW, Sethi D. (2011) T cell receptor recognition of self and foreign antigens in the induction of autoimmunity. *Semin Immunol*, 23: 84-91.
- [156] Miyadera H, Ohashi J, Lernmark A, Kitamura T, Tokunaga K. (2015) Cell-surface MHC density profiling reveals instability of autoimmunity-associated HLA. *J Clin Invest*, 125: 275-291.
- [157] Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. (2015) Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 64: 125-136.
- [158] Noble JA, Valdes AM. (2011) Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*, 11: 533-542.
- [159] Weyand CM, Klimiuk PA, Goronzy JJ. (1998) Heterogeneity of rheumatoid arthritis: from phenotypes to genotypes. *Springer Semin Immunopathol*, 20: 5-22.

- [160] Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, Herrera BM, Deluca GC, Orton SM, Dymont DA, Sadovnick AD, Ebers GC. (2009) Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 7542-7547.
- [161] Zhong H, Zhao C, Luo S. (2019) HLA in myasthenia gravis: From superficial correlation to underlying mechanism. *Autoimmun Rev*, 18: 102349.
- [162] Gutierrez-Achury J, Zhernakova A, Pulit SL, Trynka G, Hunt KA, Romanos J, Raychaudhuri S, van Heel DA, Wijmenga C, de Bakker PI. (2015) Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nat Genet*, 47: 577-578.
- [163] Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Vina M, Awdeh ZL, Romero T, Hansen JA, Alper CA. (2003) Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. *Tissue Antigens*, 62: 1-20.
- [164] Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. (1999) Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood*, 93: 2013-2024.
- [165] Mustelin T, Alonso A, Bottini N, Huynh H, Rahmouni S, Nika K, Louis-dit-Sully C, Tautz L, Togo SH, Bruckner S, Mena-Duran AV, al-Khoury AM. (2004) Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Mol Immunol*, 41: 687-700.
- [166] Wu J, Katrekar A, Honigberg LA, Smith AM, Conn MT, Tang J, Jeffery D, Mortara K, Sampang J, Williams SR, Buggy J, Clark JM. (2006) Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. *J Biol Chem*, 281: 11002-11010.
- [167] Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellicchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T. (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*, 36: 337-338.
- [168] Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoecker JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB,

- Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 75: 330-337.
- [169] Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F, Mustelin T, Bottini N. (2005) Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet*, 37: 1317-1319.
- [170] Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, Chang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK, Behrens TW. (2004) Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet*, 75: 504-507.
- [171] Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC, Todd JA. (2004) Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*, 53: 3020-3023.
- [172] Vandiedonck C, Capdevielle C, Giraud M, Krumeich S, Jais JP, Eymard B, Tranchant C, Gajdos P, Garchon HJ. (2006) Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 59: 404-407.
- [173] Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. (2014) Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol*, 35: 347-369.
- [174] Ji J, Sundquist J, Sundquist K. (2016) Gender-specific incidence of autoimmune diseases from national registers. *J Autoimmun*, 69: 102-106.
- [175] Avidan N, Le Panse R, Berrih-Aknin S, Miller A. (2014) Genetic basis of myasthenia gravis - a comprehensive review. *J Autoimmun*, 52: 146-153.

- [176] Czaja AJ, Donaldson PT. (2002) Gender effects and synergisms with histocompatibility leukocyte antigens in type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol*, 97: 2051-2057.
- [177] Celius EG, Harbo HF, Egeland T, Vartdal F, Vandvik B, Spurkiand A. (2000) Sex and age at diagnosis are correlated with the HLA-DR2, DQ6 haplotype in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 178: 132-135.
- [178] Meyer JM, Han J, Singh R, Moxley G. (1996) Sex influences on the penetrance of HLA shared-epitope genotypes for rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 58: 371-383.
- [179] Hughes T, Adler A, Merrill JT, Kelly JA, Kaufman KM, Williams A, Langefeld CD, Gilkeson GS, Sanchez E, Martin J, Boackle SA, Stevens AM, Alarcon GS, Niewold TB, Brown EE, Kimberly RP, Edberg JC, Ramsey-Goldman R, Petri M, Reveille JD, Criswell LA, Vila LM, Jacob CO, Gaffney PM, Moser KL, Vyse TJ, Alarcon-Riquelme ME, Network B, James JA, Tsao BP, Scofield RH, Harley JB, Richardson BC, Sawalha AH. (2012) Analysis of autosomal genes reveals gene-sex interactions and higher total genetic risk in men with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 71: 694-699.
- [180] Lombardi AM, Fabris R, Scarda A, Zanato V, Dal Pra C, Scarparo P, Vettore S, Granzotto M, Berti De Marinis G, Foletto M, Serra R, Sartori MT, Plebani M, Fabris F, Vettor R. (2012) Presence of anti-ADAMTS13 antibodies in obesity. *Eur J Clin Invest*, 42: 1197-1204.
- [181] Sorvillo N, Pos W, van den Berg LM, Fijnheer R, Martinez-Pomares L, Geijtenbeek TB, Herczenik E, Voorberg J. (2012) The macrophage mannose receptor promotes uptake of ADAMTS13 by dendritic cells. *Blood*, 119: 3828-3835.
- [182] Verbij FC, Sorvillo N, Kaijen PHP, Hrdinova J, Peyron I, Fijnheer R, Ten Brinke A, Meijer AB, van Alphen FPJ, van den Berg TK, Graversen JJH, Moestrup SK, Voorberg J. (2017) The class I scavenger receptor CD163 promotes internalization of ADAMTS13 by macrophages. *Blood Adv*, 1: 293-305.

- [183] Joseph G, Smith KJ, Hadley TJ, Djulbegovic B, Troup GM, Oldfather J, Barker RL. (1994) HLA-DR53 protects against thrombotic thrombocytopenic purpura/adult hemolytic uremic syndrome. *Am J Hematol*, 47: 189-193.
- [184] Coppo P, Busson M, Veyradier A, Wynckel A, Poullin P, Azoulay E, Galicier L, Loiseau P, French Reference Centre For Thrombotic M. (2010) HLA-DRB1*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J Thromb Haemost*, 8: 856-859.
- [185] Scully M, Brown J, Patel R, McDonald V, Brown CJ, Machin S. (2010) Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost*, 8: 257-262.
- [186] John ML, Hitzler W, Scharrer I. (2012) The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*, 91: 507-510.
- [187] Mancini I, Ricano-Ponce I, Pappalardo E, Cairo A, Gorski MM, Casoli G, Ferrari B, Alberti M, Mikovic D, Noris M, Wijmenga C, Peyvandi F, Italian Group of TTPI. (2016) Immunochip analysis identifies novel susceptibility loci in the human leukocyte antigen region for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 14: 2356-2367.
- [188] Sorvillo N, van Haren SD, Kaijen PH, ten Brinke A, Fijnheer R, Meijer AB, Voorberg J. (2013) Preferential HLA-DRB1*11-dependent presentation of CUB2-derived peptides by ADAMTS13-pulsed dendritic cells. *Blood*, 121: 3502-3510.
- [189] Verbij FC, Turksma AW, de Heij F, Kaijen P, Lardy N, Fijnheer R, Sorvillo N, ten Brinke A, Voorberg J. (2016) CD4+ T cells from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura recognize CUB2 domain-derived peptides. *Blood*, 127: 1606-1609.
- [190] Gilardin L, Delignat S, Peyron I, Ing M, Lone YC, Gangadharan B, Michard B, Kherabi Y, Sharma M, Pashov A, Latouche JB, Hamieh M, Toutirais O, Loiseau P, Galicier L, Veyradier A, Kaveri S, Maillere B, Coppo P, Lacroix-Desmazes S. (2017) The ADAMTS13(1239-1253) peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4(+) T-cell epitope. *Haematologica*, 102: 1833-1841.

- [191] Hrdinova J, Verbij FC, Kaijen PHP, Hartholt RB, van Alphen F, Lardy N, Ten Brinke A, Vanhoorelbeke K, Hindocha PJ, De Groot AS, Meijer AB, Voorberg J, Peyron I. (2018) Mass spectrometry-assisted identification of ADAMTS13-derived peptides presented on HLA-DR and HLA-DQ. *Haematologica*, 103: 1083-1092.
- [192] Morgand M, Buffet M, Busson M, Loiseau P, Malot S, Amokrane K, Fortier C, London J, Bonmarchand G, Wynckel A, Provot F, Poullin P, Vanhille P, Presne C, Bordessoule D, Girault S, Delmas Y, Hamidou M, Mousson C, Vigneau C, Lautrette A, Pourrat J, Galicier L, Azoulay E, Pene F, Mira JP, Rondeau E, Ojeda-Uribe M, Charron D, Maury E, Guidet B, Veyradier A, Tamouza R, Coppo P, Thrombotic Microangiopathies Reference C. (2014) High prevalence of infectious events in thrombotic thrombocytopenic purpura and genetic relationship with toll-like receptor 9 polymorphisms: experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Transfusion*, 54: 389-397.
- [193] Verbij FC, Fijnheer R, Voorberg J, Sorvillo N. (2014) Acquired TTP: ADAMTS13 meets the immune system. *Blood Rev*, 28: 227-234.
- [194] Terrell DR, Vesely SK, Kremer Hovinga JA, Lammle B, George JN. (2010) Different disparities of gender and race among the thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic-uremic syndromes. *Am J Hematol*, 85: 844-847.
- [195] Martino S, Jamme M, Deligny C, Busson M, Loiseau P, Azoulay E, Galicier L, Pene F, Provot F, Dossier A, Saheb S, Veyradier A, Coppo P, French Reference Center for Thrombotic M. (2016) Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Black People: Impact of Ethnicity on Survival and Genetic Risk Factors. *PLoS One*, 11: e0156679.
- [196] Sanchez-Mazas A, Buhler S, Nunes JM. (2013) A new HLA map of Europe: Regional genetic variation and its implication for peopling history, disease-association studies and tissue transplantation. *Hum Hered*, 76: 162-177.
- [197] Mack SJ, Tu B, Lazaro A, Yang R, Lancaster AK, Cao K, Ng J, Hurley CK. (2009) HLA-A, -B, -C, and -DRB1 allele and haplotype frequencies distinguish Eastern European Americans from the general European American population. *Tissue Antigens*, 73: 17-32.

- [198] Inotai D, Szilvasi A, Benko S, Boros-Major A, Illes Z, Bors A, Kiss KP, Rajczy K, Gelle-Hosso A, Buhler S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Tordai A. (2015) HLA genetic diversity in Hungarians and Hungarian Gypsies: complementary differentiation patterns and demographic signals revealed by HLA-A, -B and -DRB1 in Central Europe. *Tissue Antigens*, 86: 115-121.
- [199] Gregersen PK, Lee HS, Batliwalla F, Begovich AB. (2006) PTPN22: setting thresholds for autoimmunity. *Semin Immunol*, 18: 214-223.
- [200] Roose E, Schelpe AS, Joly BS, Peetermans M, Verhamme P, Voorberg J, Greinacher A, Deckmyn H, De Meyer SF, Coppo P, Veyradier A, Vanhoorelbeke K. (2018) An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 16: 378-388.
- [201] Stanford SM, Bottini N. (2014) PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nat Rev Rheumatol*, 10: 602-611.
- [202] Szilagyi A, Banlaki Z, Pozsonyi E, Yunis EJ, Awdeh ZL, Hosso A, Rajczy K, Larsen CE, Fici DA, Alper CA, Fust G. (2010) Frequent occurrence of conserved extended haplotypes (CEHs) in two Caucasian populations. *Mol Immunol*, 47: 1899-1904.
- [203] Groot E, Hulstein JJ, Rison CN, de Groot PG, Fijnheer R. (2006) FRETTS-VWF73: a rapid and predictive tool for thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 4: 698-699.
- [204] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16: 1215.
- [205] Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, 68: 978-989.
- [206] Stephens M, Scheet P. (2005) Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet*, 76: 449-462.
- [207] Laddha NC, Dwivedi M, Shajil EM, Prajapati H, Marfatia YS, Begum R. (2008) Association of PTPN22 1858C/T polymorphism with vitiligo susceptibility in Gujarat population. *J Dermatol Sci*, 49: 260-262.

- [208] Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, Fernandez-Vina M. (2003) New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens*, 62: 296-307.
- [209] Westra HJ, Peters MJ, Esko T, Yaghootkar H, Schurmann C, Kettunen J, Christiansen MW, Fairfax BP, Schramm K, Powell JE, Zhernakova A, Zhernakova DV, Veldink JH, Van den Berg LH, Karjalainen J, Withoff S, Uitterlinden AG, Hofman A, Rivadeneira F, Hoen PAC, Reinmaa E, Fischer K, Nelis M, Milani L, Melzer D, Ferrucci L, Singleton AB, Hernandez DG, Nalls MA, Homuth G, Nauck M, Radke D, Volker U, Perola M, Salomaa V, Brody J, Suchy-Dacey A, Gharib SA, Enquobahrie DA, Lumley T, Montgomery GW, Makino S, Prokisch H, Herder C, Roden M, Grallert H, Meitinger T, Strauch K, Li Y, Jansen RC, Visscher PM, Knight JC, Psaty BM, Ripatti S, Teumer A, Frayling TM, Metspalu A, van Meurs JBJ, Franke L. (2013) Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. *Nat Genet*, 45: 1238-1243.
- [210] Stranger BE, Nica AC, Forrest MS, Dimas A, Bird CP, Beazley C, Ingle CE, Dunning M, Flicek P, Koller D, Montgomery S, Tavare S, Deloukas P, Dermitzakis ET. (2007) Population genomics of human gene expression. *Nat Genet*, 39: 1217-1224.
- [211] Dixon AL, Liang L, Moffatt MF, Chen W, Heath S, Wong KC, Taylor J, Burnett E, Gut I, Farrall M, Lathrop GM, Abecasis GR, Cookson WO. (2007) A genome-wide association study of global gene expression. *Nat Genet*, 39: 1202-1207.
- [212] Montgomery SB, Sammeth M, Gutierrez-Arcelus M, Lach RP, Ingle C, Nisbett J, Guigo R, Dermitzakis ET. (2010) Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population. *Nature*, 464: 773-777.
- [213] Arons E, Adams S, Venzon DJ, Pastan I, Kreitman RJ. (2014) Class II human leucocyte antigen DRB1*11 in hairy cell leukaemia patients with and without haemolytic uraemic syndrome. *Br J Haematol*, 166: 729-738.
- [214] Balassa K, Andrikovics H, Remenyi P, Batai A, Bors A, Kiss KP, Szilvasi A, Rajczy K, Inotai D, Gopcsa L, Lengyel L, Barta A, Reti M, Tordai A, Masszi T.

- (2015) The potential role of HLA-DRB1*11 in the development and outcome of haematopoietic stem cell transplantation-associated thrombotic microangiopathy. *Bone Marrow Transplant*, 50: 1321-1325.
- [215] Godel P, Fischer J, Scheid C, Gathof BS, Wolf J, Rybniker J. (2017) Familial acquired thrombotic thrombocytopenic purpura in siblings - no immunogenetic link with associated human leucocyte antigens. *Eur J Haematol*, 98: 311-313.
- [216] Pritsch O, Hudry-Clergeon G, Buckle M, Petillot Y, Bouvet JP, Gagnon J, Dighiero G. (1996) Can immunoglobulin C(H)1 constant region domain modulate antigen binding affinity of antibodies? *J Clin Invest*, 98: 2235-2243.
- [217] Pritsch O, Magnac C, Dumas G, Bouvet JP, Alzari P, Dighiero G. (2000) Can isotype switch modulate antigen-binding affinity and influence clonal selection? *Eur J Immunol*, 30: 3387-3395.
- [218] Torres M, May R, Scharff MD, Casadevall A. (2005) Variable-region-identical antibodies differing in isotype demonstrate differences in fine specificity and idiotype. *J Immunol*, 174: 2132-2142.
- [219] Torres M, Fernandez-Fuentes N, Fiser A, Casadevall A. (2007) The immunoglobulin heavy chain constant region affects kinetic and thermodynamic parameters of antibody variable region interactions with antigen. *J Biol Chem*, 282: 13917-13927.
- [220] Casadevall A, Janda A. (2012) Immunoglobulin isotype influences affinity and specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 12272-12273.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Sinkovits G, Szilágyi Á, Farkas P, Inotai D, Szilvási A, Tordai A, Rázsó K, Réti M, Prohászka Z.

The role of human leukocyte antigen DRB1-DQB1 haplotypes in the susceptibility to acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura.

HUMAN IMMUNOLOGY 78:(2) pp. 80-87. (2017)

IF: 1,994

Sinkovits G, Szilágyi Á, Farkas P, Inotai D, Szilvási A, Tordai A, Rázsó K, Réti M, Prohászka Z.

Concentration and subclass distribution of anti-ADAMTS13 IgG autoantibodies in different stages of acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura.

FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 9:1646. (2018)

IF: 4,716

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: 6,71.

10.2. A disszertációtól független publikációk

Sinkovits G, Prohászka Z.

A komplementrendszer szerepe a thromboticus microangiopathiák patogenezisében.

ORVOSKÉPZÉS 88:(2) pp. 331-337. (2013)

IF: -

Mikes B, Sinkovits G, Farkas P, Csuka D, Schlamadinger Á, Rázsó K, Demeter J, Domján G, Réti M, Prohászka Z.

Elevated plasma neutrophil elastase concentration is associated with disease activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura.

THROMBOSIS RESEARCH 133:(4) pp. 616-621. (2014)

IF: 2,447

Mikes B, Sinkovits G, Farkas P, Csuka D, Rázsó K, Réti M, Radványi G, Demeter J, Prohászka Z.

Carboxiterminal pro-endothelin-1 as an endothelial cell biomarker in thrombotic thrombocytopenic purpura.

THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 115:(5) pp. 1034-1043. (2016)

IF: 5,627

Leffler J, Prohaszka Z, Mikes B, Sinkovits G, Ciacma K, Farkas P, Réti M, Kelen K, Reusz GS, Szabó AJ, Martin M, Blom AM.

Decreased neutrophil extracellular trap degradation in Shiga toxin-associated haemolytic uraemic syndrome.

JOURNAL OF INNATE IMMUNITY 9:(1) pp. 12-21. (2017)

IF: 3,837

Farkas P, Csuka D, Mikes B, Sinkovits G, Réti M, Németh E, Rác K, Madách K, Gergely M, Demeter J, Prohászka Z.

Complement activation, inflammation and relative ADAMTS13 deficiency in secondary thrombotic microangiopathies.

IMMUNOBIOLOGY 222:(2) pp. 119-127. (2017)

IF: 2,873

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.

THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS 118:(1) pp. 123-131. (2018)

IF: 4,733

Horváth O, Kállay K, Csuka D, Mező B, Sinkovits G, Kassa C, Stréhn A, Csordás K, Sinkó J, Prohászka Z, Kriván G.

Early increase in complement terminal pathway activation marker sC5b-9 is predictive for the development of thrombotic microangiopathy after stem cell transplantation.

BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION 24(5):989-996. (2018)

IF: 3,599

Trojnár E, Szilágyi Á, Mikes B, Csuka D, Sinkovits G, Prohászka Z.

Role of complement in the pathogenesis of thrombotic microangiopathies.

MAGAZINE OF EUROPEAN MEDICAL ONCOLOGY 11:3 pp. 227-234. (2018)
(összefoglaló cikk)

IF: -

Trojnár 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.

FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 10:240. (2019)

IF: 4,716*

A disszertációtól független publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: 27,832.

A megjelölt folyóiratok összesített impakt faktora: 34,542.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prohászka Zoltán Professzor Úrnak, azért a mérhetetlen szakmai és emberi támogatásért, amelyben a mellette TDK-, majd PhD-hallgatóként eltöltött éveim során részesültem. Köszönöm szépen belém és munkámba vetett bizalmát, és hogy bármikor fordulhattam hozzá: szakértelme és nyugodt derűje segítségével mindig segített felismerni a probléma mögött a megoldás lehetőségét. Továbbá köszönöm Neki, hogy a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumának vezetőjeként egy olyan munkahelyet, közeget, illetve közösséget teremtett és tartott fenn, amelyhez jó tartozni, és amelynek részeként hatékonyan és örömmel tudjuk munkánkat végezni.

Ez utóbbiért köszönettel tartozom a Kutatólaboratórium minden korábbi és jelenlegi munkatársának is, valamint Karádi István és Masszi Tamás Professzor Uraknak, hogy a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinikájának igazgatóiként lehetővé tették és támogatták az intézet Kutatólaboratóriumában végzett munkánkat.

Laboratóriumunk minden munkatársának szeretném megköszönni az évek során nyújtott rengeteg segítséget. Szeretnék külön köszönetet mondani Szigeti Antalné „Ilikének” a laboratóriumi munkába történő bevezetésért, Dr. Szilágyi Ágnesnek, Dr. Csuka Dorottyanak, Takács Beátának és Szabó Edinának pedig a genetikai vizsgálatok megtervezésében, kivitelezésében és értékelésében nyújtott segítségükért.

Hálásan köszönöm az Országos Vérellátó Szolgálat Transzplantációs Immungenetikai Laboratóriuma dolgozóinak, elsősorban Dr. Inotai Dórának és Dr. Szilvási Anikónak a HLA-tipizálásban nyújtott segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani a TTP-s betegeknek a vizsgálatainkban történő részvételükért, valamint a TTP-s betegeket kezelő és gondozó valamennyi klinikus kollégáknak a betegekre vonatkozó adatok összegyűjtéséért és közléséért.

Dr. Réti Mariennek, Dr. Rázsó Katalinnak és Dr. Farkas Péternek ezen felül külön köszönöm, hogy javaslataikkal és meglátásaikkal hozzájárultak a Doktori Értekezésem alapját képező közlemények megszületéséhez, Dr. Horváth Laurának pedig szeretném megköszönni, hogy elvállalta Doktori Értekezésem házi bírálatát.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak az általuk nyújtott rengeteg támogatásért, segítségért, és a szeretetteljes biztos háttérért, amely lehetővé tette, hogy kellő figyelmet és időt tudtam doktori munkámnak szentelni.