

A glomeruloszklerózis korai és késői szakaszának vizsgálata rágcsálókban

Doktori értekezés

Dr. Bukosza Éva Nóra

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők:

Dr. Hamar Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Szénási Gábor, C.Sc., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Haris Ágnes Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Pap Domonkos Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Losonczy György, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Rempert Ádám, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Micsik Tamás Ph.D., klinikai szakorvos

Budapest
2020

Bevezetés

A krónikus vesebetegség (CKD) a világ népességének 10%-át érintő súlyos egészségügyi és gazdasági probléma. A humán klinikai gyakorlatban a CKD jelentős hányadát a magasvérnyomással és a cukorbetegséggel összefüggő, másodlagos glomerulopátiák adják, valamint az elsődleges glomerulonefritiszek, ezek közt is a leggyakoribb és világszerte növekvő előfordulású fokális szegmentális glomeruloszklerózis (vagy FSGS). Ritkábban a CKD lehet késői következménye főleg a tubulointersticiális szöveteket érintő akut iszkémiás károsodásnak, vagy a teljes szervezetet érintő sepszisnek, illetve állhat háttérben az autoszomális domináns policisztás vesebetegség, a vese egyéb részeit érintő gyulladás vagy bizonyos kóros vizeletelvezető-rendszeri elváltozások. A kóreredettől függetlenül a CKD végső progresszióját meghatározó közös út a *vesefibrózis*, amelynek patomechanizmusáról máig nem rendelkezünk elegendő információval, így hatásos terápia sem létezik a lassítására vagy visszafordítására. Ez motiválja a kísérletes nefrológiai kutatásainkat.

Glomerulopátiákban a kezdeti károsító hatástól függetlenül a vesefibrózis vagyis glomeruloszklerózis kialakulását és progresszióját a glomerulust alkotó sejtek (podociták, parietális epitél-, mezangiális- és endotélsejtek) és kötőszöveti struktúrák (alpmembrán (GBM), mezangiális mátrix, Bowman-tok) a fiziológiástól eltérő működése határozza meg a patológiás állapotokban. Az elmúlt években az egyre szélesebb körben elérhetővé vált multiplex vizsgáló módszerek (RNS-szekvenálás, tömegspektrometria) alkalmazása ugrásszerűen növelte ismerteinket a veseglomerulusban kifejeződő génekről és fehérjékről.

Az elmúlt évtizedben intenzíven vizsgált glomeruláris extracelluláris mátrix (ECM) összetételével kapcsolatban lassan körvonalazódik, hogy az alpmembrán mechanikai stabilitását biztosító kötőszöveti struktúr

fehérjéken kívül más fontos, a sejt-sejt és a sejt-mátrix kommunikációban résztvevő jelátviteli molekulákat is tartalmaz, illetve az ECM a szöveti sérülésre adott válaszában aktiválódó változatos, bonyolult folyamatok színtere. Napjainkban e tényezők közti összefüggések hálózat- és rendszerszintű vizsgálatát tartjuk korszerűnek. A glomeruláris ECM alkotói elemei, ezáltal a glomerulopátiákban kulcsszerephez jutó folyamatok alaposabb megismerésével, és ezáltal a jövőben célzott terápiás megközelítéssel az FSGS kezelésében nagyságrendi előrelépést remélhetünk. A közeljövőben érdemes nyomonkövetni a ECM struktúrfehérjék megújulásáért felelős enzimrendszerek (mátrix metalloproteinázok, gátló fehérjék (TIMP-ek), és a szabályozásukért felelős szerin proteáz inhibitorok (SERPINek), a hegesedési folyamat régóta ismert építőeleme, a fibrin háló biztosításán túl számos más szereppel bíró fibrinogén útvonal, valamint az erőteljes akut fázis válasz részeként a komplement rendszer és a véralvadási kaszkád szerepéről szerzett új ismereteket az FSGS vonatkozásában.

Célkitűzés

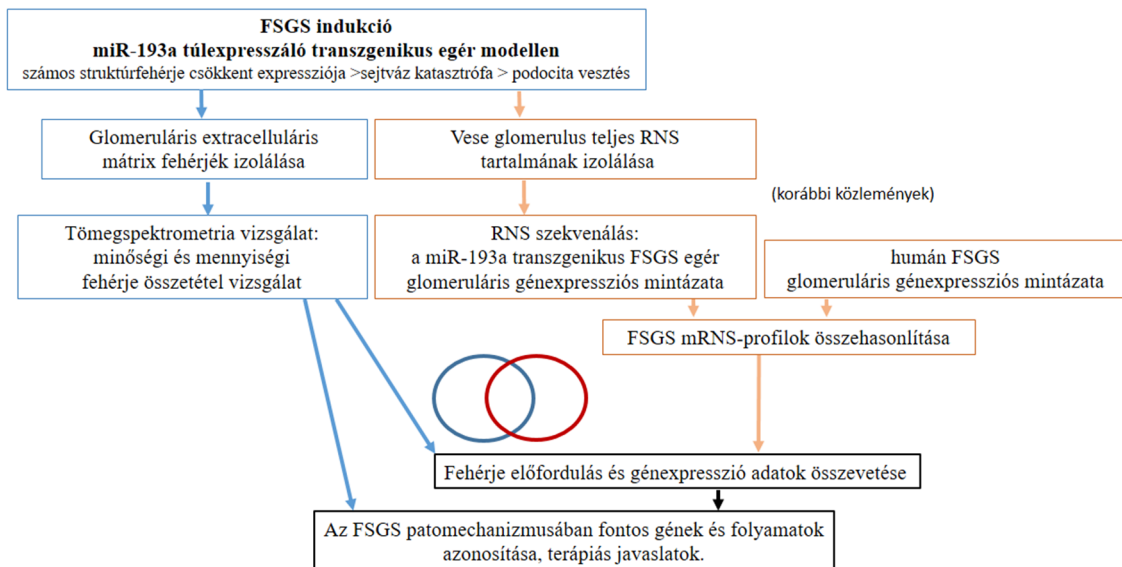
A disszertáció célja a glomerulopátiák patomechanizmusának tanulmányozása volt két különböző etiológiájú, egy kezdeti és egy előrehaladott stádiumú állatkísérletes megközelítésben. Ehhez a következő részcélokat tűztük ki:

A zsíretetéssel létrehozott elhízással és kezdődő glükóz anyagcserezavarral jellemezhető Long-Evans patkányban:

1. jellemezni az elhízás és prediabétesz okozta vesekárosodást, illetve megfigyeléseink alapján következtetni kialakulásának legkoraibb eseményeire;
2. feltárni a vese érintettség és más szervi elváltozások közti feltételezett összefüggéseket.

A miR-193a túlexpresszióval indukált FSGS modell egéren (**1. ábra**):

3. Előrehaladott FSGS-ben potenciálisan fontos extracelluláris mátrix (ECM) géneket azonosítani a glomeruláris fehérje tartalom minőségi és mennyiségi elemzésével;
4. Eredményeinket megerősíteni és kiegészíteni egér-ember glomeruláris génexpresszió mintázatok összehasonlításával, valamint a génexpresszió és a fehérje előfordulási adatok összevetésével.
5. Rámutatni olyan kulcs génekre és kórélettani folyamatokra, amelyek terápiás megközelítésétől a jövőben az FSGS hatékonyabb kezelése remélhető.



1. ábra. Célkitűzések és munka-terv: miR-193a-indukált FSGS vizsgálat.

Az elhízott, prediabéteszes Long Evans patkányok vese és zsírszöveti vizsgálata, amelyet a Semmelweis Egyetemen a Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet, Kardiovaszkuláris és Metabolikus Kutatócsoportjával közösen végeztünk, egy önálló cikk témáját képezte (továbbá: *elhízott, prediabéteszes Long Evans vizsgálat*).

Az előrehaladott FSGS-ben potenciálisan fontos extracelluláris mátrix gének azonosítása a Bécsi Orvosi Egyetemen, a Klinikai Patológia Intézettel és a Bécsi Állatorvosi Egyetem, Tömegspektrometria (VetCore) kutatócsoportjával együttműködésben történt, és egy másik tudományos cikkben került bemutatásra (továbbá: *miR-193a-indukált FSGS vizsgálat*).

Módszerek

Az obez, prediabéteszes Long Evans patkány modell

Az elhízás és kezdődő szénhidrátanyagcsere zavar modellezéséhez, hím Long Evans patkányokat 20 héten át 40% sertészsírral kiegészített diétán tartottunk és a 4. héten, kis dózisban (20mg/ttkg) pankreász β -sejt toxikus anyag (streptozotocin; STZ) egyszeri injekciójával kezeltünk, miközben a kontroll csoportnak normál tápot és csak vivőanyag injekciót adtunk. Az etetési időszak alatt testsúly és vércukorszint monitorozást folytattunk. A kísérlet végén pentobarbitál altatásban az egyik alcsoporton részletes szív funkcionális vizsgálatokat végeztünk (Izd. Koncsos és mtsai., 2016). A másik alcsoportban vizelet és EDTA-al alvadásgátolt teljes vérmintákat gyűjtöttünk. Hűtött, fiziológiás sóoldattal végzett direkt veseperfúzió utáni feldolgozás során a szervsúlyokat megmértük, illetve szöveti (szív, máj, vese, zsírszövetek) mintákat gyűjtöttünk rutin (formalinban fixált, paraffinba ágyazott), és fagyasztva metszett szövettani, valamint génexpressziós vizsgálatokra. A szem makroszkópos kontrollja mellett steril sebészi szikével a vesekérget és vesevelőt szétválasztva, illetve máj és zsírszövet darabokat folyékony nitrogénben gyorsfagyasztva, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -n tároltuk a feldolgozásig.

Vesefunkció meghatározás

A centrifugálással nyert plazma és a vizelet minták urea és kreatinin koncentrációját, valamint (később a kreatinin ürítésre normalizált) vizelet fehérje ürítést kolorimetriás, enzimatikus esszékkel határoztuk meg. A vese tubuláris epithelsejt károsodás érzékeny markerét, a neutrofil zselatináz asszociált lipokalin (NGAL) koncentrációját a vizelet mintákban ELISA módszerrel mértük. Az vizelet összfehérje és NGAL koncentrációkat négyparaméteres logisztikus görbeillesztéssel számoltuk ki. (A vesefunkciót

jellemző plazma urea szintet (BUN), plazma karbamidként is szokás tárgyalni, ehhez a plazma urea értéket 0,467-el el kell osztani.)

RNS preparálás

A vesekéreg, -velő és a zsírszöveti mintákból TRI-reagenssel, kloroform-isopropanol módszerrel teljes RNS-t nyertünk ki. Az RNS koncentrációját 260 nm-en, a tisztaságot a 260/280 nm abszorpciós értékek arányával ellenőriztük. Az RNS minták integritását agaróz gélelektroforézissel, a 28S és 18S riboszomális RNS frakciók arányával vizsgáltuk.

Gén- és mikroRNS-expresszió analízis veseszövetből

A gének mRNS szintjét reverz transzkripció lépést közbeiktatva, a dupla szálú DNS (dsDNS)-specifikus festésén (SYBR Green) alapuló qPCR-rel végeztük. A mikroRNS expressziót TaqMan próbákkal és kvantitatív valós idejű PCR-rel (qRT-PCR) mértük. Az összes mintát duplikátumban mértük, és az expressziós értékeket relatív kvantifikációs ($\Delta\Delta C_t$) módszerrel számoltuk ki. A qPCR hatékonyságát standard görbékkel ellenőriztük.

A miR-193a túlexpresszázó, FSGS-indukált transzgenikus egér modell

A tetraciklin-kontrollált transzkripció aktiváció elvét kihasználó genetikailag módosított egérben az ivóvízben adagolt doxiciklin miR-193a túlexpressziót okoz. A doxiciklint tehát egyfajta közvetítőként nem pedig antibiotikus hatása, vagy egyéb farmakológiai tulajdonságai miatt alkalmaztuk. A miR-193a túlexpressziója, az általa szabályozott gének, így többek közt a mester regulátor transzkripció faktor Wilms' tumor fehérje expressziót gátolja, és a következményes podocita sejtvezérlés csökkenés miatt podocita vesztéshez vezetett. Az FSGS kialakulásának jelei elektronmikroszkóppal a 2., fénymikroszkóppal a 4. héttől észlelhetőek. Utóbbi időponttól kezdve klinikailag jelentős mértékű vizelet albuminürítés észlelhető, melyet albumin specifikus enzim-kapcsolt immunoszorbens esszé (ELISA) módszerrel kvantifikáltunk, illetve azonos vizelet mintákon

kolorimetriás plate módszerrel meghatározott kreatinin mennyiség értékekre normalizáltuk. Kísérletünkben a 8 hétig tartó indukcióval jelentős mértékű ECM felhalmozódást, előrehaladott FSGS-t hoztuk létre.

Egér vese glomerulus és ECM izolálás

Az indukciós időszak végén a vese glomerulusokat ketamin-xilazin altatásban, heparin véralvadásgátlás mellett direkt veseperfúzió során mágneses gyöngyök befecskendezésével és az eltávolított vese ezt követő mechanikus és enzimatis kezeléssel izoláltuk. Ezután az alkotóelemeire bontott mintában a szakirodalomból vett, többlépcsős eljárással dúsítottuk fel a glomeruláris ECM fehérje komponenseit. Ehhez proteáz és foszfatáz gátlókat, detergenst, alkilálószeret és Dnáz enzimet tartalmazó pufferoldatok sorozatát használtuk.

Glomeruláris ECM előkészítése tömegspektrometriai analízisre

A glomeruláris ECM mintákat urea pufferben végzett ditiotreitol-redukció, jódacetamid alkiláló lépés, valamint Tripszin/LysC oldatban történő emésztést követően Nano-HPLC/Hybrid Quadrupole–Orbitrap tömegspektrometria módszerrel vizsgáltuk és elemeztük. Az LC-MS adatfeldolgozás során a fehérje azonosítást és kvantifikációt a Proteome Discoverer szoftverrel végeztük, az UniProt adatbázisban a Mus musculus és a cRAP (common Repository of Adventitious Proteins: <ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP/crap.fasta>) ismert fehérjéket véve alapul. A keresés során alkalmazott paramétereket az előkezeléshez (tripszin emésztés, a cisztein diszulfidhidak alkilálása) illesztettük, tehát az azonosításkor figyelembe vettünk olyan dinamikus fehérje módosulásokat, mint a metioninon-történt oxidáció és az N-terminális acetiláció. Egy fehérje azonosításához legalább 2 peptid alkotóelem azonosítása volt a minimum feltétel. A kvantifikációhoz a nyers adatok normalizálása azonos peptid mennyiségre történt. A biológiai minta adott értékét a technikai replikátumok

mért értékeinek mediánja adta. A kísérletterv alapján a statisztikai analízis ú.n. „nem egymásba ágyazott” (non-nested) megközelítésben, a két csoport (kontroll vs. miR193a), négy-négy független biológiai replikátumát figyelembe véve, a normalizált értékek páros összehasonlítását vettük alapul.

MRNS adatelemzés egér és humán FSGS glomeruláris mintákon

Korábbi közleményekből ismert miR-193a-indukált egér modellünk és humán FSGS glomeruláris génexpressziós mintázatok összehasonlításával további, az FSGS patomechanizmusában potenciálisan fontos legalább háromszoros mértékben megváltozott (csökkent vagy növekedett) kifejeződésű ECM géneket kerestünk.

Szövettan és immunohisztokémia

A vese szövetmintákat pufferolt formaldehiddel fixáltuk, majd dehidrálás után paraffinba ágyasztuk (FFPE) szövettani és immunohisztokémiai feldolgozáshoz. Az *elhízott, prediabéteszes Long Evans vizsgálatban* a glomerulus átmérőt, mátrix fehérje felhalmozódást, proximális tubuláris hámsejtek kefeszegélyét, lipid lerakódás indirekt jelét az inverz vakuoláris festést perjódsav Schiff (PAS) festett metszeteken értékeltük. Az extracelluláris mátrix összetétel vizsgálatára kollagén IV, a mezangiális sejt aktiváció megítélésére α SMA, a podocita stressz észleléséhez dezmin kimutatására alkalmas specifikus immunfestéseket végeztünk. Fagyasztva metszett máj és vese szövetből vett mintákon olajvörös festéssel lipidcseppeket kerestünk. *A miR-193a-indukált FSGS vizsgálatban* elektronmikroszkóppal a podocita álláb leválást és fúziót, a GBM kiszélesedését és más ultrastrukturális eltéréseket, a PAS-festett metszeteken a glomeruláris mátrixban PAS-pozitív anyag felhalmozódását, glomerulomegaliát, savas fukszin narancs-G festéssel intrakapilláris kasztok megjelenését értékeltük fénymikroszkóppal. Specifikus immunfestéssel fibrinogén/fibrin és kollagén 1 felhalmozódását megerősítettük.

Statisztikai analízis

Az eredményeket középérték \pm a standard hiba átlagaként (SEM) adtuk meg. A folytonos változók összehasonlítását kétmintás t-próbával, vagy kétszemponos ismétléses varianciaanalízissel (ANOVA) és Sidak post hoc teszttel kiegészítve végeztük. Ahol a Bartlett-teszt a varianciák inhomogenitását jelezte logaritmikus transzformációt végeztünk. A nullhipotézist akkor vettettük el, ha a kétoldalú p-érték elérte az 5 %-os statisztikai szignifikanciaszintet. Mindkét tanulmányban az adatkezeléshez, a statisztikai elemzéshez és az ábrázoláshoz a GraphPad Prism6 szoftvert (GraphPad Software, La Jolla, Kalifornia, USA) használtuk. Az ábrákon a szignifikáns különbségeket csillagokkal jeleztük (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

Eredmények

Elhízott, prediabéteszes Long Evans patkány vizsgálat

Az elhízott, prediabéteszes Long Evans modell

A 20 hetes zsíros diétával etetett és az egyszeri, kis dózisú STZ-vel kezelt Long Evans patkányokban a testsúly és a zsírszövet relatív mennyisége megnőtt, a zsírszövet eloszlás megváltozott, a plazma leptin koncentráció emelkedett, valamint a tartósan emelkedett a vércukorszint, és enyhe glükóz intolerancia és inzulin rezisztencia alakult ki a kontrollokhöz képest.

Morfológiai, funkcionális és molekuláris szintű szív és máj elváltozások

A modellt biztosító társmunkacsoport *in vivo* és *ex vivo* keringési vizsgálatokkal bal kamrai diasztolés diszfunkciót és hipertrófiát, és szívizomsejtekben intracelluláris lipid felhalmozódást, a subsarcolemmális mitochondriumokban fokozott oxidatív stresszt, mitofágia korai változásait és zsírmáj kialakulását írta le az általunk is vizsgált patkányokban. A májszövetben a jelentős elzsírosodás ellenére a plazma lipidek (koleszterin, LDL-C, HDL-C, TG) és a májenzimek (GOT, GPT) koncentrációja nem változott (Koncsos és mtsai., 2016).

Zsírszöveti átépülés gyulladáshoz jelek nélkül

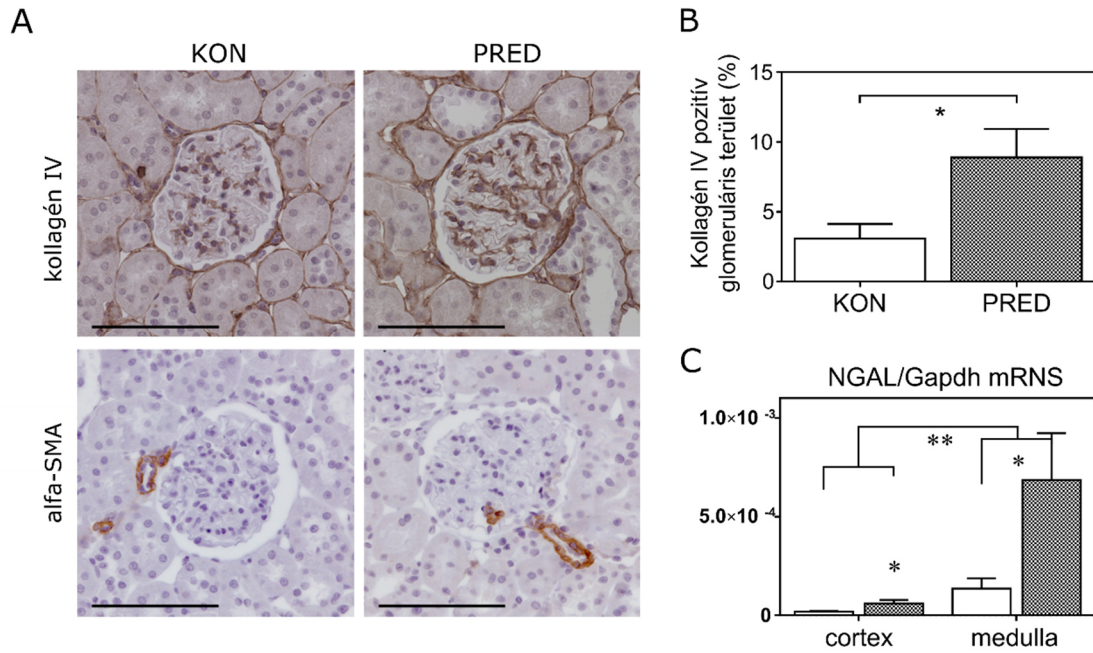
Az elhízás mértékével arányosan, jelentős mértékben és tartósan emelkedett plazma leptin szint ellenére a viscerális zsírszövet működését szabályozó egyes kulcsgének expresszióját szűrőpróba-szerűen ellenőrizve az elhízott, prediabéteszes állatokban csak a TGF- β 1 mRNS expresszió növekedését tudtuk kimutatni. Nem észleltünk a zsírszövet fibrotikus átépülésre, gyulladásra, fokozott oxidatív stressz válaszra és megváltozott metabolikus aktivitásra utaló jelet. Meglepő módon a plazma CRP-szint kismértékben, de szignifikánsan csökkent az elhízott, prediabéteszes állatokban, amit csökkent gyulladáshoz hajlamként értékeltünk.

Nagyrészt megtartott vese morfológia és funkció

Az elhízott, prediabéteszes vesében irodalmi ismereteink szerint az elhízás okozta glomerulopátia jeleit, glomerulomegáliát, mechanikus stressz közvetítésével glomeruláris hiperfiltráció okozta podocita károsodást, illetve a tartós hiperglikémia nyomán a kötőszöveti mátrix felhalmozódását, valamint romló vesefunkciót, fehérjeürítést vártuk. Rutin szövettani metszeteken azonban ilyen eltéréseket nem tudtunk igazolni, és a vesefunkció is megtartott volt. A plazma kreatinin koncentráció hasonló volt a kontroll és prediabéteszes patkányokban, és albuminuriát sem lehetett kimutatni. Az elhízott, prediabéteszes állatokban mért alacsonyabb plazma urea koncentráció a kafetéria diétán élőkben ismerten csökkent urea szintézissel magyarázható.

A legkorábbi vesekárosodás jelek prediabéteszes elhízásban

Vesemintáinkat specifikus immunfestésekkel tovább vizsgálva a kollagén IV magasabb arányát észleltük a glomeruláris ECM-ban, aminek hátterében inkább a csökkent degradáció állhat, mivel a fokozott termelés valószínűtlen volt a mezangiális sejt aktiváció (α SMA festődés) hiányában. Noha a globális vesefunkcióban eltérést nem találtunk, az elhízott, prediabéteszes patkányokban a kontrollokhoz képest egyaránt megnövekedett vesekérgi és medulláris Lcn2 mRNS expresszió a tubuláris működés kismértékű megváltozására utalt, bár a vizelet Lcn2 fehérje ürítés még nem változott. Meg kell azonban jegyezni, hogy a modellünkben kimutatott változások jelentősen elmaradtak a súlyos iszkémiás, toxikus vagy gyulladásszerű károsodások után tapasztaltaktól.



2. ábra A legkorábbi vesekárosodás jelek prediabéteszes elhízásban. (A) Repräsentatív immunhisztokémiai felvételek specifikus kollagén IV (fent) és alfa-SMA (lent); (B) elhízott, prediabéteszes glomerulusban a kollagén IV-el nagyobb mértékben festődött glomeruláris terület a fehérje mehnövekedett arányát mutatja ECM-ban; (C) az NGAL-t kódoló tubuláris károsodás marker gén expressziója elhízott, prediabéteszes fokozott. Adatok: átlag ± SEM, $n \geq 7$ /csoport. kétszemponos ismétléses ANOVA; kétmintás t-próba (B-E); *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

Vesefibrózis és gyulladásos útvonalak modellünkben nem aktiválódtak

A magasabb plazma leptin szint ellenére a vesefibrózist közvetítő TGF- β 1 és rövid leptin-receptor (Ob-Ra) expressziója nem változott. A gyulladást jelző IL-1 β és TNF α citokinek, és az e folyamatok szabályozásában részt vevő mikroRNSEk expressziója nem különbözött a két csoport között. Meglepő, de a fenti zsírszöveti és szisztémás eredményekkel egybecsengő módon az IL-1 β mRNS-expressziója az elhízott prediabéteszes patkányokban alacsonyabb volt mind a vesekéregben, mind a vesevelőben, mint a kontroll állatokban.

Mindezek alapján a meglepően enyhének észlelt veseérintettség háttérében a szakirodalomban egyedülálló módon dokumentált diszlipidémia, valamint a szisztémás és lokális gyulladás hiányát feltételezzük a modellünkben.

miR-193a-indukált FSGS vizsgálat

A 8 hetes miR-193a-túlexpresszióval indukált előrehaladott egér FSGS

A miR-193a-túlexpresszázó egerekben elektron mikroszkóppal FSGS-re jellemző ultrastrukturális eltéréseket, podocita álláb vesztést, fúziót és leválást, fénymikroszkóppal glomerulomegaliát, extracelluláris fehérje lerakódást, intrakapilláris kaszt képződést, valamint súlyos albuminuriát mutattunk ki a vad típusú kontrollhoz képest.

A glomeruláris extracelluláris mátrix fehérje összetétel egér FSGS-ben

Tömegspektrometriai elemzésünkkel több, mint 1500 különböző fehérjét azonosítottunk a glomerulusban (ECM), amelyek közt 111 ECM-hez kapcsolódó fehérjét észleltünk, ami egy korábbi, egészséges egerek mintáit elemző közlemény eredményének nagyságrendileg megfelel. Az erősen szignifikáns mennyiségi változásokat tekintve az FSGS egerek glomeruláris ECM fehérje preparátumában 18 fehérje mennyisége megnövekedett, 2 fehérje előfordulása csökkent, valamint négy olyan fehérjét (CFP, ITIH1, PIGR, PSTD) írtunk le, amelyet kizárólag FSGS-ben szenvedő állatok glomeruláris ECM-ban lehetett megtalálni az egészséges kontrollal szemben.

Az FSGS-ben észlelhető patofiziológiás változások

Kézi feldolgozás (Matrisome adatbázis és Pubmed keresés) és Ingenuity Útvonal Analízis alapján a miR-193a-túlexpresszázó FSGS glomeruláris ECM-ban legkifejezettebb jelenség az akut fázis válasz erős aktivációja volt, ideértve a komplement komponensek, fibrinogén útvonal és véralvadási kaszkád elemeinek fokozott jelenlétét. Ugyanakkor néhány, az ECM

turnoverét potenciálisan szabályozó proteáz gátló fokozott előfordulását is kimutattuk.

1. táblázat. Szignifikánsan megváltozott előfordulású fehérjék miR-193a-túlexpresszázó glomerulusban.

ID	Rövidítés	Gén név	FC
P11680	CFP	Properdin	*
F8WJ05	ITIH1	Inter-alpha-tripszin inhibitor 1	*
O70570	PIGR	Polimer Immunglobulin Receptor	*
P50404	SFTPD	Pulmonáris surfactan-asszociált protein D	*
Q566I6	C1R	Komplement C1r	27,8
A8DUV3	HBA1	Hemoglobin alfa1 alegység	18,9
Q3UER8	FGG	Fibrinogén gamma lánc	15,4
Q3TGR2	FGB	Fibrinogén béta lánc	10,0
Q91X17	UMOD	Uromodulin	8,8
Q54AH9	HBB-B2	Hemoglobin béta-2 alegység	8,7
Q542I3	CRP	C-reaktív protein	7,6
A8DUK0	HBB-B1	Hemoglobin béta-1 alegység	7,4
P01029	C4B	Komplement C4-B	6,2
P07759	SERPINA3	Szerin proteináz inhibitor A3K	6,1
A0A2P9DU N6	SERPINA1	Alpha-1-antitripszin 1	5,6
Q00623	APOA1	Apolipoprotein A-I	5,3
P11087	COL1A1	Kollagén I alfa-1 lánc	4,9

Q8VBX5	PPT1	Palmitoil-fehérje tioészteráz 1	4,8
Q9JMG7-2	HDGFL3	Hepatoma-eredetű növekedési faktorhoz kapcsolt fehérje 3	-5,2
O55186	CD59A	CD59A glikoprotein	-5,7

A génexpresszió változásokat a miR-193a-túlexpresszázó FSGS-ben szenvedő és a vad típusú (kontroll) egér glomerulusok közötti arány elemzésével vizsgáltuk; * kontroll mintákban nem azonosítható; ID, nemzetközi fehérje azonosítási szám; FC (fold change) értsd. hányszoros változás miR-193a versus vad típus (kontroll) (pozitív=emelkedett, negatív=csökkent a kontrollhoz képest).

Az FSGS-re jellemző glomeruláris ECM változások

Azonos egér modellen korábban leírt, és egy humán FSGS minták vizsgálatával mások által közölt glomeruláris génexpressziós profilt összehasonlítva, illetve ezeket proteomikai eredményeinkkel együtt értékelve az uromodulin, a SERPINA1, valamint a komplement rendszer központi szerepe feltételezhető FSGS patomechanizmusában. Előbbi a vese gyulladáshoz és immun modulációjában központi jelentőségű, míg a szerin proteáz SERPINA1 az ECM homeosztázisban, véralvadási kaszkádban egyaránt szerepel. A komplement aktiváció felismerése pedig a veleszületett immunitás kóroki szerepére hívja fel a figyelmet a progresszív fibrózis folyamatában.

Következtetések

Két állatkísérletes modell vizsgálata során kapott eredményeink alapján a következő megállapításokat tesszük a glomerulopátia patomechanizmusáról:
A 20 hetes zsírdús diéta és egyszeri, kis dózisú streptozotocin injekció miatt enyhe szénhidrát anyagcserezavarú, elhízott Long Evans patkányban

Az obezitással és prediabétesssel összefüggő szervkárosodás morfológiai és funkcionális jelei korábban jelentkeznek a szívben és a májban, mint a vesében.

A modellünkben az elhízással összefüggő vesekárosodás legkorábbi jeleinek találtuk a glomeruláris extracelluláris mátrix átépülésének részeként a kollagén IV megnövekedett arányát, és a tubuláris érintettséget már a vesefunkció romlást megelőzően jelző Lcn2 (NGAL) mRNS expresszió növekedését.

A krónikusan magas plazma leptin koncentráció önmagában nem okoz obezitással összefüggő glomeruloszklerózist vagy tubulointersticiális fibrózist.

A jelentős elhízás ellenére - a szakirodalomban egyedülállóan tapasztalt - diszlipidémia, zsírszöveti és szisztémás gyulladás hiánya arra utal, hogy az elhízás és prediabétesz hatására kialakuló vesekárosodás a fenti tényezőkkel szoros kóroki összefüggésben áll. A Long Evans patkánytörzs alkalmas lehet a vesekárosodással szembeni rezisztencia mechanizmusának a vizsgálatára.

A miR-193a túlexpresszióval indukált, előrehaladott FSGS egér modellben a glomeruláris extracelluláris fehérjék vizsgálatával
több, mint 60, részben már ismert és számos új, eddigiekben az FSGS-ben nem tárgyalt, megváltozott expressziójú gént mutattunk ki, valamint

kizárólag az FSGS-ben észlelhető fehérjeként a properdint (CFP), inter- α -tripszin inhibitor 1-t (ITIH1), polimer immunglobulin receptort (PIGR) és a tüdő felületaktív anyag-asszociált fehérje D-t (SFTPD) azonosítottuk.

Az FSGS patomechanizmusa szempontjából legjelentősebb változások a komplement rendszert, a fibrinogén útvonalat, a véralvadási kaszkád elemeit, és néhány, az ECM turnoverét potenciálisan szabályozó proteáz gátlót érintik. A felsorolt tényezők fokozott figyelmet érdemelnek egy jövőben kidolgozandó primer FSGS terápia érdekében.

Saját közlemények jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Bukosza EN, Kornauth C, Hummel K, Schachner H, Huttary N, Krieger S, Nöbauer K, Oszwald A, Razzazi Fazeli E, Kratochwill K, Aufricht C, Szénási G, Hamar P, Gebeshuber CA (2020). ECM Characterization Reveals a Massive Activation of Acute Phase Response during FSGS. *Int J Mol Sci.* 21(6). pii: E2095. **IF(2018/19): 4,183**

Bukosza EN, Kaucsár T, Godó M, Lajtár E, Tod P, Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Nguyen MT, Schachner H, Sőti C, Ferdinandy P, Giricz Z, Szénási G, Hamar P. (2019). Glomerular Collagen Deposition and Lipocalin-2 Expression Are Early Signs of Renal Injury in Prediabetic Obese Rats. *Int J Mol Sci.* 20(17). pii: E4266. **IF: 4,183**

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Bukosza EN, Kratochwill K, Kornauth C, Schachner H, Aufricht C, Gebeshuber CA.(2020). Podocyte RNA sequencing reveals Wnt- and ECM-associated genes as central in FSGS. *PLoS One.* 15(4):e0231898. **IF(2018/19): 2,776**

Boehm M, Bukosza EN, Huttary N, Herzog R, Aufricht C, Kratochwill K, Gebeshuber CA. (2019). A systems pharmacology workflow with experimental validation to assess the potential of anakinra for treatment of focal and segmental glomerulosclerosis. *PLoS One.* 14(3):e0214332. **IF(2018/19): 2,776**

Nagy CT, Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Tuza S, Kassai F, Ernyey AJ, Gyertyán I, Király K, Oláh A, Radovits T, Merkely B, Bukosza N, Szénási G, Hamar P, Mathé D, Szigeti K, Pelyhe C, Jelemenský M, Onódi Z, Helyes Z, Schulz R, Giricz Z, Ferdinandy P. (2018). Selegiline reduces adiposity induced by high-fat, high-sucrose diet in male rats. *Br J Pharmacol.* 175(18):3713-3726. **IF: 6,583**

Wolf D, Bukosza N, Engel D, Poggi M, Jehle F, Anto Michel N, Chen YC, Colberg C, Hoppe N, Dufner B, Boon L, Blankenbach H, Hilgendorf I, von Zur Muhlen C, Reinöhl J, Sommer B, Marchini T, Febbraio MA, Weber C, Bode C, Peter K, Lutgens E, Zirlík A. (2017). Inflammation, but not recruitment, of adipose tissue macrophages requires

signalling through Mac-1 (CD11b/CD18) in diet-induced obesity (DIO). *Thromb Haemost.* 2017 Jan 26;117(2):325-338. **IF: 4,899**

Kölling M, Kaucsar T, Schauerte C, Hübner A, Dettling A, Park JK, Busch M, Wulff X, Meier M, Scherf K, Bukosza N, Szénási G, Godó M, Sharma A, Heuser M, Hamar P, Bang C, Haller H, Thum T, Lorenzen JM. (2017). Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice. *Mol Ther.* 25(1):165-180. **IF: 7,008**

Koncsos G, Varga ZV, Baranyai T, Boengler K, Rohrbach S, Li L, Schlüter KD, Schreckenberger R, Radovits T, Oláh A, Mátyás C, Lux Á, Al-Khrasani M, Komlódi T, Bukosza N, Máthé D, Deres L, Barteková M, Rajtík T, Adameová A, Szigeti K, Hamar P, Helyes Z, Tretter L, Pacher P, Merkely B, Giricz Z, Schulz R, Ferdinandy P. (2016). Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: Role of mitochondrial oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 311(4):H927-H943. **IF: 3,348**

Willecke F, Tiwari S, Rupprecht B, Wolf D, Hergeth S, Hoppe N, Dufner B, Schulte L, Anto Michel N, Bukosza N, Marchini T, Jäckel M, Stachon P, Hilgendorf I, Zeschky K, Schleicher R, Langer HF, von Zur Muhlen C, Bode C, Peter K, Zirlik A. (2014). Interruption of classic CD40L-CD40 signalling but not of the novel CD40L-Mac-1 interaction limits arterial neointima formation in mice. *Thromb Haemost.* 112(2):379-89. **IF: 5,720**

Wolf D, Jehle F, Michel NA, Bukosza EN, Rivera J, Chen YC, Hoppe N, Dufner B, Rodriguez AO, Colberg C, Nieto L, Rupprecht B, Wiedemann A, Schulte L, Peikert A, Bassler N, Lozhkin A, Hergeth SP, Stachon P, Hilgendorf I, Willecke F, von Zur Mühlen C, von Elverfeldt D, Binder CJ, Aichele P, Varo N, Febbraio MA, Libby P, Bode C, Peter K, Zirlik A. (2014). Coinhibitory suppression of T cell activation by CD40 protects against obesity and adipose tissue inflammation in mice. *Circulation.* 129(23):2414-25. **IF: 14,430**

Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőimnek Prof. Dr. Hamar Péternek és Dr. Szénási Gábornak a PhD hallgatói tevékenységem során biztosított anyagi és szellemi erőforrásokért, mely nélkül egyik téma kidolgozása és publikálása sem jöhetett volna létre.

Köszönöm Dr.Christoph Gebeshubernek a bécsi kutatás éveinek közös munkáját, mely nem csak a közleményeink sikeréhez segített hozzá, hanem személyes és szakmai fejlődésemhez is hozzájárult.

Köszönöm Édesanyámnak, Dr. Nieszner Évának, a példamutatását, amely a tudományos munka iránti elkötelezettségem megalapozását jelentette, és mindazt a materiális, mentális és lelki támogatást, amely a fokozatszerzésig tartó hosszú, munkás évek mindenkorai nehézségein átsegített. Hasonlóképpen köszönöm és ajánlom dolgozatomat drága Nagyanyámnak.

Köszönöm Václav Hanusnak végtelen türelmét és szellemi támogatását, valamint a dolgozat szerkesztése során nyújtott felbecsülhetetlen technikai segítséget.

Köszönöm Munkatársaimnak és Barátaimnak, mindenek előtt Kaucsár Tamásnak, André Oszwaldnak, Christoph Kornauthnak, Sigurd Kriegernek a kutatásainkhoz személyes jelenléttel nyújtott segítséget, a sok értékes szakmai diskurzust és mindazt a tudást és tapasztalatot, melyet tankönyvekből megszerezni nem lehet, Ők azonban önzetlenül továbbadtak nekem.

Köszönöm Helga Schachnernek, hogy bevezetett és mindvégig támogatott a szövegtani vizsgálatok világában.

Hálásan köszönöm F.Tóth Krisztina Erasmus-koordinátornak a bécsi kutatásaim befejezéséhez esszenciális mobilitási források biztosításában nyújtott végtelen segítőkészséget és támogatást.

Köszönöm Prof.Dr. Rosivall László és Prof. Dr.Dontscho Kerjaschki Professzor Uraknak, hogy az általuk vezetett nívós intézményeknek munkatársa lehettem.