

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2723.**

**DR. NÉMETH ÁGNES**

**A folyadék- és elektrolitháztartás szabályozásának élet- és kórélettana-  
Keringés és vérnyomás szabályozás című program**

Programvezető: Dr. Zsembery Ákos, egyetemi docens

Témavezető: Dr. Kökény Gábor, egyetemi docens

# **A TIMP-1 expresszió szabályozása progresszív vesefibrózisban**

Doktori értekezés

**Dr. Németh Ágnes**

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kökény Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Fekete Andrea, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Laczy Boglárka, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Reusz György, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lengyel Zoltán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Tislér András, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2022

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke .....	6
1 Bevezetés.....	8
1.1 A krónikus veseelégtelenség .....	8
1.1.1 Epidemiológia.....	8
1.1.2 Etiológia .....	8
1.1.3 A CKD definíciója .....	9
1.1.4 Szövődmények .....	9
1.2 A vesefibrózis .....	11
1.2.1 Kórélettan.....	11
1.2.2 Miofibroblasztok, a fibrózis fő effektorsejtjei.....	12
1.2.3 Az epiteliális-mesenchymalis tranzíció .....	14
1.2.4 A fibrózis molekuláris mechanizmusa.....	18
1.2.4.1 A transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- $\beta$ ).....	18
1.2.4.2 A TGF- $\beta$ receptorok és a TGF- $\beta$ 1 aktivációja .....	19
1.2.4.3 A TGF- $\beta$ 1 jelátvitel gátlása.....	23
1.2.4.4 A kötőszöveti növekedési faktor (CTGF).....	24
1.2.5 A mátrix metalloproteinázok szerkezete és típusai .....	25
1.2.6 A mátrix metalloproteinázok szöveti inhibitorai (TIMP-ek), a multifunkcionális fehérjék.....	27
1.3 Transzkripciós faktorok szerepe a vesefibrózisban .....	28
1.3.1 Az aktivátor protein komplex-1 (AP-1 komplex).....	28
1.3.2 A JNK útvonal (c-Jun amino terminális kináz).....	29
1.3.3 A Janus kináz (JAK) és szignál transzducer transzkripció aktivátor (STAT) jelátvitel szerepe vesefibrózisban .....	30
1.3.4 Az EGR transzkripciós faktor család.....	31
1.3.5 A Runx transzkripciós faktorok (Runt-related transcription factors).....	33

1.3.6	A PPAR- $\gamma$ (peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor- $\gamma$ ) lehetséges szerepe a fibrózisban.....	34
1.4	A CKD kezelése .....	36
1.5	A genetikai különbségek hatása .....	37
2	Célkitűzések .....	38
3	Módszerek .....	39
3.1	Felhasznált egérmodellek.....	39
3.1.1	A TGF- $\beta$ transzgenikus modell .....	39
3.1.1.1	A TGF- $\beta$ 1 transzgén visszakeresztezése B6 genetikai háttére (kongenikus B6-TGF $\beta$ egerek), valamint hibrid CBAxB6-TGF $\beta$ (F1) transzgenikus egerek létrehozása.....	40
3.1.2	TIMP-1 knockout egérmodell .....	41
3.1.3	Unilateralis ureter obstrukció (UUO) és szubtotális nefrektómia (SNX) modellek.....	41
3.1.4	TIMP-1 neutralizáció, <i>in vivo</i> .....	42
3.1.5	In vitro kísérletek.....	42
3.1.6	Vese biopszia szövetminták .....	43
3.1.7	A renalis transzkriptom elemzése cDNS chip (microarray) segítségével. 43	
3.2	Pioglitazon kezelés TGF- $\beta$ indukált vesefibrózisban .....	43
3.2.1	Kísérleti csoportok.....	43
3.2.2	Genotipizálás .....	44
3.2.3	Vérnyomásmérés .....	44
3.2.4	Plazma TGF- $\beta$ szint meghatározása .....	45
3.2.5	A proteinuria meghatározása.....	45
3.2.6	Génexpressziós vizsgálatok (q-PCR).....	45
3.3	Primér mezangiális sejtek izolálása .....	47
3.4	Immunoblot .....	49

3.5	Szövettan és immunhisztokémia .....	49
3.6	Statisztika .....	50
4	Eredmények.....	51
4.1	A kongenikus B6-TGF- $\beta$ és a CBAxB6-TGF- $\beta$ F1 transzgenikus egerek összehasonlítása .....	51
4.1.1	A kongenikus B6-TGF- $\beta$ transzgenikus egértörzs jellemzése .....	51
4.1.2	A hasonló plazma TGF- $\beta$ szintek ellenére a CBAxB6-TGF- $\beta$ F1 transzgenikus egerekre szignifikáns proteinuria, valamint rövidebb élethossz jellemző .....	53
4.1.3	TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben törzs függő a vesefibrózis kialakulása és progressziója.....	56
4.1.4	Az EGR2 és a TIMP-1 fokozott expressziója megelőzi a manifeszt fibrózist TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben.....	69
4.1.5	A TIMP-1 neutralizáció csökkentette a vesefibrózist CBAxB6-TGF- $\beta$ F1 transzgenikus egerekben .....	72
4.1.6	Az EGR2 és a TIMP-1 korai fokozott expressziója összefüggést mutat az UUO és az SNX utáni vesefibrózis progresszióval .....	74
4.1.7	TIMP-1 knockout SNX egerekben enyhébb a vesefibrózis.....	79
4.1.8	A mezangiális sejtek TGF- $\beta$ , RUNX-1, EGR-1 és EGR2 expressziójának vizsgálata, <i>in vitro</i> .....	82
4.1.9	EGR2 túltermelése HEK293 (Humán Embryonic Kidney Cells, embrionális vese sejt vonal) sejtekben fokozza a TIMP-1 expresszióját, <i>in vitro</i> ...	84
4.1.10	Magasabb EGR2 és TIMP-1 expresszió figyelhető meg humán FSGS vesebiopsziákban .....	86
4.2	A PPAR $\gamma$ agonista pioglitazon kezelés hatása a TGF- $\beta$ -val indukált vesefibrózisra kontroll és TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben.....	86
4.2.1	Plazma TGF- $\beta$ koncentráció, testsúly és vérnyomás.....	86
4.2.2	A pioglitazon csökkenti a TGF- $\beta$ -val indukált proteinuriát és vesefibrózist.....	88

4.2.3	A pioglitazon mérsékli a TGF- $\beta$ -val indukált profibrotikus transzkripciós faktorok túltermelését TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben .....	91
5	Megbeszélés .....	94
6	Következtetések.....	103
7	Összefoglalás .....	105
8	Summary .....	106
9	Irodalomjegyzék .....	107
10	Saját publikációk jegyzéke.....	145
11	Köszönetnyilvánítás .....	148

**Rövidítések jegyzéke**

ACE	angiotenzin konvertáló enzim
AP-1	aktivátor fehérje 1
ARB	angiotenzin receptor blokkolók
BMP-7	csont morfogénikus fehérje-7 (Bone morphogenic protein-7)
CKD	krónikus vesebetegség (chronic kidney disease)
Colla1	I-es típusú kollagén
Col3a1	III-as típusú kollagén
CTGF	kötőszöveti növekedési faktor (connective tissue growth factor)
DM	diabétesz mellitusz
DN	diabéteszes nefropátia
ECM	extracelluláris mátrix
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGFP	fokozott zöld fluoreszcens fehérje (enhanced green fluorescent protein)
EGR-1	korai növekedési válasz fehérje 1 (early growth response protein 1)
EGR2	korai növekedési válasz fehérje 2 (early growth response protein 2)
EndMT	endotélialis mezenchimális tranzíció
EMT	epiteliális mezenchimális tranzíció
ESRD	végstádiumú veseelégtelenség (end stage renal disease)
FGF-23	fibroblaszt növekedési faktor-23
FSGS	fokális szegmentális glomeruloszklerózis
GFR	glomerulus filtrációs ráta
HEK-293	humán embrionális vese sejtvonala (humán embryonic kidney cells)
JAK	Janus kináz
JNK	c-Jun amino terminális kináz (c-Jun N-terminal kinases)
LAP	látens asszociált peptid
LLC	nagy látens komplex (large latent complex)
LTBP	látens TGF- $\beta$ kötő protein (latent transforming growth factor $\beta$ binding proteins)
MAPK	mitogén-aktivált protein kinázok
MMP	mátrix-metalloproteináz
PAI-1	plazminogén aktivátor inhibitor-1

PCR	polimeráz lánreakció (Polimerase Chain Reaction)
PDGF	vérlemezke-eredetű növekedési faktor (platelet derived growth factor)
PPAR $\gamma$	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma
PTH	parathormon
R-Smad	receptor-regulált Smad fehérjék
RUNX	Runt kötött transzkripció faktor (runt-related transcription factor)
SGLT2	nátrium/glükóz kotranszporter 2 (sodium-glucose co-transporter 2)
$\alpha$ SMA	alpha-simaizom aktin (alpha-smooth muscle actin)
SNX	szubtotális nefrektómia (subtotal nephrectomy)
STAT	szignál transzducer és transzkripció aktivátor (signal transducer and activator of transcription)
TGF- $\beta$	transzformáló növekedési faktor- $\beta$ (transforming growth factor beta)
TIF	tubulointersticiális fibrózis
TIMP-1	mátrix metalloproteinázok szöveti inhibitorai (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1)
t-PA	szöveti plazminogén aktivátor (tissue-type plasminogen activator)
T2DM	2-es típusú diabétesz mellitusz (type 2 diabetes mellitus)
UPCR	vizelet fehérje/kreatinin hányados (urine protein to creatinine ratio)
UUO	unilateralis ureter obstrukció
VEGF	vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)



## **1 BEVEZETÉS**

### **1.1 A krónikus veseelégtelenség**

#### **1.1.1 Epidemiológia**

A krónikus vesebetegségben (CKD) szenvedő betegek száma világszerte exponenciálisan növekszik. A CKD a felnőtt populáció 10-14%-át érinti, a vese progresszív strukturális és funkcionális károsodásával jár. A CKD kialakulása hosszú ideig tartó, lassú folyamat, klinikai tüneteket már csak az előrehaladott stádiumokban okoz <sup>1,2</sup>. A CKD incidenciája, prevalenciája és a betegség progressziója eltérést mutat társadalmi-gazdasági szinten. A legalacsonyabb szocio-ökonómiai fejlettségi szinten élőknek 60 %-kal nagyobb a kockázata progrediáló CKD-ra, mint azoknak, akik magasabb fejlettségi szinten élnek. Az Egyesült Államokban a diabéteszes nefropátia (DN) a leggyakoribb vesebetegség, amely vesepótló kezeléshez vezet <sup>3</sup>, ezzel szemben Kínában a primer glomerulonephritis a leggyakoribb oka a végstádiumú vesebetegségnek (ESRD) <sup>4</sup>. A CKD prevalenciája a metaanalízisek szerint a 65 év felettek körében 23,4-35,8%. Magyarországon nincsenek pontos adataink a CKD prevalenciájáról, számítások alapján legalább 700 ezer fő érintett, de feltehetően ennél is több <sup>5</sup>. A dialízisprogramba kerülő új megbetegedések száma 2010-től 2015-ig 10,5%-kal (évente 1,75%-kal) nőtt, a dialízisprogramban kezelt betegek száma hat év alatt 8,4%-kal (évente 1,4%-kal) nőtt <sup>6</sup>.

#### **1.1.2 Etiológia**

A vesét károsító tényezők széles skálája (immunológiai, hipertónia, diabétesz mellitusz (DM), korábbi akut vesekárosodás) okoz gyulladást és fibrózist, majd később ESRD-t <sup>7</sup>. Az akut vesekárosodás általában visszafordítható folyamat, amelynek hátterében különféle okok állhatnak, de leggyakrabban immunológiai, hypoxiás és toxin mediált eseteket figyelhetjük meg. A CKD kialakulásban a genetikai és a környezeti hatások (pl. mezőgazdasági vegyi anyagok, ipari hulladékok, cukros üdítők, sós ételek, stb.) egyaránt szerepet játszhatnak <sup>8, 9</sup>, ugyanakkor a CKD hátterében leggyakrabban a DM és a hipertónia áll. A további okok között szerepel a glomerulonephritis, az intersticiális nephritis, a policisztás vesebetegség, a húgyútak elfolyási zavarai (pl. vesekő, prostata megnagyobbodás, daganatok), visszatérő húgyúti fertőzések, a vesekárosító gyógyszerek

tartós szedése (pl. nem szteroid gyulladáscsökkentők) <sup>10</sup>. A vese felépítése összetett, mely szövettanilag három kompartmentből áll: glomerulusok, tubulointerstícium és a vaszkuláris rendszer <sup>11</sup>. Az egyes kompartmentekben különböző bazális membrán és extracelluláris mátrix (ECM) található, melyeket érinthet a fibrózis folyamata. A CKD legfontosabb szövettani jellemzője a gyulladás és a kiterjedt fibrózis, amely a vesetubulusok fokozatos elvesztésével és a veseparenchyma hegszövetté történő átépülésével jár <sup>12, 13</sup>.

### 1.1.3 A CKD definíciója

A veseműködést a glomerulus filtrációs ráta (GFR) kiszámításával jellemezhetjük, amelynek normál átlagértéke egészséges fiatal felnőttekben 120 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> értéke az életkor előrehaladtával csökken, valószínűleg a nefronsám csökkenése miatt. A CKD diagnózisát akkor lehet kimondani, ha a GFR értéke <60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, vagy normális GFR mellett a vesekárosodás egyéb strukturális és funkcionális jelei mutathatók ki (albuminuria, kóros vizelet üledék elsősorban haematuria, tubuláris vesefunkció károsodása miatt elektrolit és egyéb eltérések, szövettani elváltozások, képalkotó módszerekkel észlelt strukturális károsodások, korábbi vese transzplantáció), és igazolható, hogy a vesebetegség több mint 3 hónapja fennáll <sup>14</sup>. A kezdeti stádiumra jellemző nem specifikus tünetek megnehezítik a CKD felismerését, így gyakran későn, már a betegség súlyosbodásakor kerül diagnosztizálásra. A CKD stádiumbeosztásánál a vesebetegség okát, a GFR-t, valamint a proteinuria/albuminuria mértékét javasolt figyelembe venni <sup>15</sup>.

### 1.1.4 Szövődmények

A hipertónia és a CKD szorosan kapcsolódnak egymáshoz, mivel mindegyik okozója lehet a másiknak. A hipertónia kezelése nagyon fontos pillére a CKD megelőzésének, mivel a vérnyomás normalizálása csökkenti a szív- és érrendszeri betegségek, valamint az ESRD kialakulásának az esélyét <sup>16, 17</sup>.

Az eritropoietint az intersticiális fibroblasztok termelik a peritubuláris kapillárisok és a proximális kanyarulatos csatornák körül. A vesefunkció beszűkülése miatt csökken a vörösvértestképzést serkentő eritropoietin termelése CKD-ben <sup>18</sup>.

A rekombináns eritropoietin készítmény képezi a haemodializált betegek gyógyszeres kiegészítő terápiáját <sup>14</sup>.

A csontképződés - és ásványianyagcsere zavara („renalis osteodystrophia”) gyakori szövődménye a CKD-nek, amely a kalcium, a foszfor, a mellékpajzsmirigy által termelt hormon, a parathormon (PTH) és a D-vitamin metabolizmusának zavara miatt jelentkezik <sup>19</sup>. Az FGF23 (fibroblaszt növekedési faktor-23) a szérumban foszfát és kalcitriol (D-vitamin aktív formája) szintjének legfontosabb szabályozója. Osteociták és oszteoblasztok választják ki, az orális foszfát terhelés vagy a megnövekedett szérumban kalcitriol szintre adott válaszként. Humán vesebetegségekben a vesefunkció beszűkülése emeli a szérumban foszfát szintet, mivel az FGF23 érzékeny biomarkere a plazma foszfát koncentrációjának emelkedésének, ezért az FGF23 szintje is emelkedik. A magas FGF23 növelné a foszfát kiválasztását, így csökkentené a szérumban foszfát szintet egészséges vesefunkció mellett. Az FGF23 csökkenti az  $1\alpha$ -hidroxiláz aktivitását, ezáltal gátolja a kalcitriol szintézisét és közvetve fokozza a PTH termelését <sup>20</sup>. A renalis hyperparathyreoidizmus fokozott kardiovaszkuláris morbiditással és mortalitással jár <sup>21</sup>. CKD-ben a glomerulusok pusztulása, a beszűkült vesefunkció miatt só- és vízretenció következik be. CKD-ben metabolikus acidózis alakulhat ki, mivel csökken a filtrált bikarbonát visszaszívása és a  $H^+$  kiválasztása.

Az urémia a vesefunkció romlásával járó klinikai állapot, folyadékháztartási-, elektrolit egyensúlybeli-, hormonális- és anyagcserezavarok jellemzik <sup>22</sup>. Ebben az állapotban, a vese már nem képes a fehérje bomlástermékeket kiválasztani, urémiás tünetek jelentkeznek (cachexia, viszketés, hányinger, fejfájás, álmatlanság, „nyugtalan láb” szindróma, stb.) <sup>23</sup>. Az urémia leggyakrabban a CKD szövődményeként jelentkezik, de előfordulhat akut vesekárosodás következtében is <sup>22</sup>.

## 1.2 A vesefibrózis

### 1.2.1 Kórélettan

Az utóbbi években a fibrózissal társuló betegségek kiemelt figyelmet kaptak, mivel az epidemiológiai adatok azt mutatták, hogy a fejlett országokban a krónikus fibroproliferatív betegségek a halálesetek 45%-át okozzák<sup>24</sup>. Már korábban ismertté vált a sebgyógyulás, a krónikus fibrózis és a tumorok progressziója közötti kapcsolat<sup>25,26</sup>. A fibrózist egy diszregulált sebgyógyulási folyamatnak tekintjük, amely több hetet vagy hónapot meghaladó krónikus sérülés vagy más krónikus betegség következményeként jelentkezik<sup>27</sup>. A fibrózis tulajdonképpen egy helyreállítási és gyógyulási folyamat, egy kezdődő vesebetegségre adott válasz<sup>13</sup>. Jelen ismereteink szerint a fibrózis egy visszafordíthatatlan folyamat<sup>28</sup>. A vesefibrózis a krónikus vesebetegségek végső közös útja, amely a veseparenchyma folyamatos pusztulása révén ESRD-t eredményez<sup>29</sup>. ESRD-ben a vesefunkció a normál veseműködés 10-15%-a, amely nem elég a szervezet napi szükségleteinek kielégítésére, ezért az ESRD dialízis vagy vese transzplantáció nélkül halálos kimenetelű<sup>12,30</sup>. A CKD során fellépő gyulladáshoz vezető válasz és szöveti átépülés a renin-angiotenzin rendszer legfontosabb peptidjének az angiotenzin II-nek is tulajdonítható, amelynek központi szerepe van az értónus-, a vérnyomás- és az elektrolit homeosztázis szabályozásában is<sup>31</sup>. Az angiotenzin II közvetlenül aktiválja a renalis glomeruláris és tubuláris sejteket, valamint a lokális fibroblasztokat és immunsejteket citokinek (pl. transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), monocita kemoattraktáns protein 1(MCP-1)), illetve gyulladáshoz és fibrotikus faktorok expressziójának fokozására serkenti<sup>32,33</sup>. Az angiotenzin II fokozza a TGF- $\beta$  expressziót a mezangiális sejtekben<sup>34</sup>, a proximális tubuláris epitél sejtekben<sup>35</sup> és a renalis intersticiális fibroblasztokban *in vitro*<sup>36</sup>.

A kiváltó ágenstől függetlenül, a fibrózis folyamata hasonló a különböző etiológiájú CKD-ben, amelyet a gyulladás folyamata jellemez. A gyulladás egy természetes válasz a vesét ért sérülésre, mivel a károsodott vese szövet igyekszik helyreállítani a bekövetkezett változásokat. Általában a sérült glomeruláris vagy tubuláris sejtek „vészjeleket” bocsátanak ki, majd a kemotaktikus ingerek hatására megjelennek a gyulladást közvetítő leukociták<sup>37,38</sup>. A gyulladáshoz vezető sejtek egyik csoportja a csontvelőből származó neutrophil granulocyták, makrofágok, fibrocyták és hízósejtek, a másik csoport pedig lokálisan a

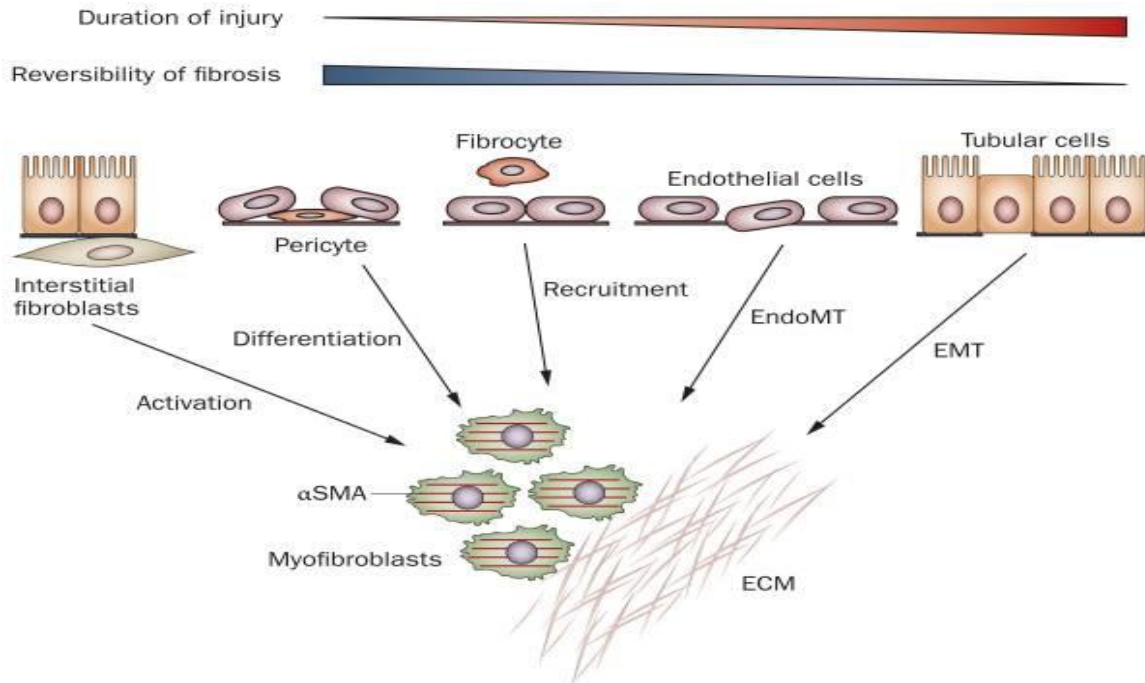
veséből származó sejtek, mint például mezangiális sejtek, podociták, tubuláris hámsejtek, endotél sejtek és fibroblasztok. Ezek az aktivált sejtek profibrotikus citokineket és növekedési faktorokat termelnek, amelyek a miofibroblasztok aktiválódását és felszaporodását okozzák. Az ECM egy dinamikus hálózat, amelyet érint a remodeling folyamata, különösen fibrózis során <sup>11</sup>. Fibrózis során felborul az ECM fehérjék szintézisének és lebontásának egyensúlya, amelyet az ECM bontó enzimek (mátrix-metalloproteinázok, MMP-k) és inhibitoraik (szöveti MMP-inhibitorok, TIMP-ek) szabályoznak. Az MMP-TIMP rendszer egyensúlyának felborulását látjuk arthritisben, atheroszklerózisban, valamint különböző daganatos betegségekben is <sup>39</sup>. A fibrózishoz összetett, többlépcsős folyamatok vezetnek: gyulladásos sejtek infiltrációja a sérült vesébe, a vesesejtek aktiválódása, proliferációja, károsodása (nekrózis, apoptózis, mesangiolysis és podocytopenia révén), az ECM-et termelő miofibroblasztok és fibroblasztok aktivációja és proliferációja, ezáltal az ECM túlszaporulata, amely megváltoztatja az egészséges vesére jellemző szövet felépítését <sup>40</sup>. A renalis ECM kollagének, elasztin, valamint számos glikoprotein és proteoglikán komplex hálózata, amelyek a bazális membránt és az intersticiális teret alkotják. A kollagének az ECM leggyakoribb alkotóelemei, amelyek a test fehérjéinek kb. 30%-át teszik ki <sup>41</sup>. Az I-es és a III-as típusú kollagén fokozott expressziója korán elkezdődik a vesefibrózis során <sup>42</sup>.

### 1.2.2 Miofibroblasztok, a fibrózis fő effektorsejtjei

A miofibroblasztok a fibrózis fő effektorsejtjei, ép vesében nem fordulnak elő, felszaporodásuk a vesefibrózis progressziójának kritikus lépése <sup>43</sup>, nevüket az alpha-simaizom aktin expressziója ( $\alpha$ -SMA, Acta2) és a fibroblasztokhoz való hasonlóságuk miatt kapták <sup>44, 45</sup>. A miofibroblasztok felszaporodása a vesében található intersticiális fibroblasztok, a csontvelőből származó progenitor sejtek, tubuláris epiteliális sejtek és a peritubuláris endoteliális sejtek ECM-et szintetizáló mesenchymalis sejtekké történő átalakulása révén következik be vesefibrózisban <sup>12</sup>. Az  $\alpha$ -SMA pozitív miofibroblasztok nagy számban jelennek meg *de novo* a beteg vese intersticiumban, és az ECM különféle komponenseit (pl. kollagének, fibronectinek, elasztinok, fibrillinek, TGF- $\beta$  kötő fehérjék, tenascinok, proteoglikánok) termelik, ezáltal járulnak hozzá a fibrózishoz és a gyulladás fenntartásához <sup>46-48</sup>. A fibronectin nagy molekulatömegű adhéziós glikoprotein, amely megtalálható a glomeruláris mesangiumban, a Bowman tokban és a

tubulointerstíciumban is, jelentős szereppel bír a sebgyógyulás folyamatában, és az ECM kialakulásában<sup>49, 50</sup>. Vesefibrózisban az I-es típusú kollagén akkumulációja a leggyakoribb, de más kollagének is felhalmozódhatnak (pl.: III., V., VI., VII., XV-ös típusú kollagén)<sup>51</sup>. Általánosan elfogadott elmélet, hogy a vesében található fibroblasztok TGF- $\beta$ 1 hatására differenciálódhatnak miofibroblasztokká<sup>52,53</sup>. A TGF- $\beta$  a vesefibrózis kialakulásában és fenntartásában kulcsszerepet játszik<sup>54</sup>. Egyre több bizonyíték van arra nézve, hogy a fibrociták nagy mennyiségű kollagént képesek termelni közvetlenül a TGF- $\beta$ 1 stimulusra adott válaszként<sup>55,56</sup>.

A miofibroblasztok eredetével kapcsolatban számos teória létezik (1. ábra). A vesében található fibroblasztokból, a vesébe áramló vérképző sejtekből, a pericytákból, valamint epithel vagy endotél sejtekből is származhatnak<sup>47, 57-59</sup>. Egyes feltételezések szerint az intersticiális miofibroblasztok fő forrása a pericyták a fibrózis során<sup>58, 59</sup>. A pericyták fontos szerepet játszanak az angiogenezisben, valamint a vese véráramlásának a szabályozásában a vesekéregben és a vesevelőben. A pericyták különböző jelátviteli útvonalakon keresztül képesek kapcsolatba lépni az endotél sejtekkel. Májfibrózisban is a pericytákat tartják a miofibroblasztok fő forrásának<sup>60</sup>. A krónikus mikrovaskuláris sérülés a pericyták miofibroblasztokká történő differenciálódását eredményezi diffúz cután szisztémás szklerózisban<sup>61</sup>. A pericyták aktiválódása, valamint a kapillárisokról történő leválásuk akut vagy krónikus vesekárosodás során jelentős szereppel bírhat a CKD progressziójában<sup>62</sup>. LeBleu és mtsai. arról számoltak be, hogy a miofibroblasztok 50%-a a vesében található intersticiális fibroblasztok proliferációja révén jön létre és a további 50% pedig a csontvelői sejtek differenciációjából (35%), az EMT-ből (5%) és az endotélialis-mesenchymalis tranzícióból (EndMT, 10%) származik<sup>63</sup>.



**1. ábra A miofibroblasztok lehetséges eredete vesefibrózisban.** A miofibroblasztok legalább öt különböző forrásból származhatnak különféle mechanizmusok révén: intersticiális fibroblasztokból, a vascularis pericyták differenciációjából, az endotéliális-mesenchymalis átalakulásból és a tubuláris epiteliális-mesenchymalis tranzícióból. A miofibroblasztok eredete nem kellően ismert és ellentmondásos vesefibrózisban. A rezidens fibroblasztok aktivációja lehet a miofibroblasztok kialakulásának elsődleges forrása a sérült vesében, döntően a fibrózis korai szakaszában. Ezzel szemben az EMT késői esemény lehet, és hozzájárulhat a fibrózis irreverzibilis progressziójához.  $\alpha$ SMA (alpha-smooth muscle actin), EndoMT (endothelial to mesenchymal transition), EMT (epithelial to mesenchymal transition), ECM (extracellular matrix) (Kép forrása: Liu, Y., *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. Nat Rev Nephrol, 2011. 7(12): p. 684-96.*)

### 1.2.3 Az epiteliális-mesenchymalis tranzíció

A tubulointerstitialis fibrózis (TIF) kialakulásáért az epiteliális-mesenchymalis tranzíciót (EMT) is felelőssé teszik, amelynek során az epiteliális sejtek ECM-et szintetizáló mesenchymalis sejtekké alakulnak. A TGF- $\beta$  az EMT egyik legfontosabb induktora <sup>64</sup>. Az EMT elősegíti a fibrózis progresszióját, mivel a miofibroblasztok számának nagymértékű növekedésével párhuzamosan csökken az epiteliális sejtek száma, amely a

vese szerkezetének károsodásához vezet <sup>27</sup>. Az EMT a tubuláris epiteliális sejtek proliferációs képességét károsítja, ezáltal hozzájárul a vese parenchyma csökkent működéséhez <sup>12</sup>. Az EMT dinamikusan zajlik, az epiteliális sejtek elveszítik polaritásukat, sejt-sejt kapcsolataikat (például az E-kadherint és a zonula occludens fehérje 1-t), képessé válnak a migrációra, osztódásra, differenciálódásra, fibroblaszt specifikus és mesenchymalis eredetű fehérjéket (például fibroblaszt specifikus fehérje-1-t és plazminogén aktivátor inhibitor-1-t), valamint ECM-t kezdenek termelni. A folyamat végén  $\alpha$ -SMA pozitív miofibroblasztokká differenciálódnak <sup>27</sup>. Felszínükön mesenchymalis eredetű sejtmarkerek jelennek meg, köztük az N-kadherin, a fibronectin és a vimentin.

Az EMT-t három csoportra oszthatjuk fel:

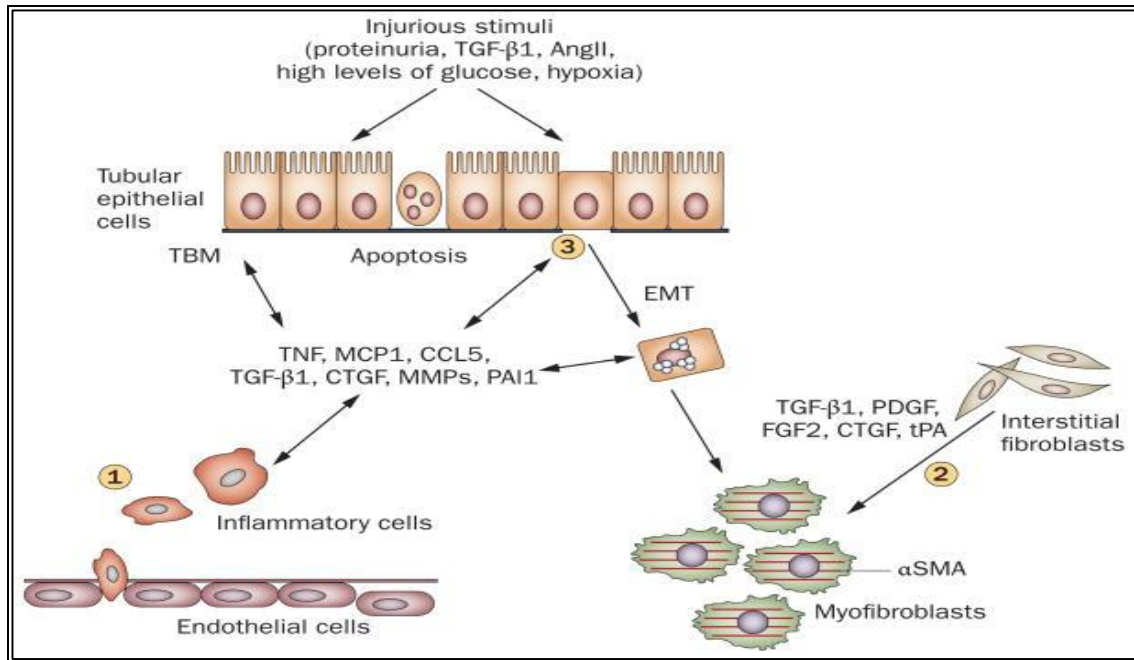
- 1. típusú EMT következik be az embrióképződés és az organogenezis során <sup>65-67</sup>.
- 2. típusú EMT megy végbe a sebgyógyulás, a szöveti regeneráció és a különböző szervek fibrózisa (vese, máj, tüdő, béltraktus, pajzsmirigy, szemlencse, valamint reumás betegségek) során <sup>68-74</sup>.
- A 3. típusú EMT a tumor progresszióban és a metasztázis képzésben játszik szerepet <sup>65, 75, 76</sup>.

Az epiteliális sejtek a gyulladásra adott válaszként különböző sejteket (makrofágok, lymphociták, dendritikus sejtek, hízósejtek) „toboroznak” az interstíciumba, amelyek EMT-t váltanak ki azáltal, hogy enzimeket, mátrixfehérjéket, különböző növekedési faktorokat szabadítanak fel, mint például a TGF- $\beta$ , vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF), epidermális növekedési faktor (EGF) és a fibroblaszt növekedési faktor-2 (FGF-2), amelyek elősegítik és fenntartják a fibrózis folyamatát (2. ábra) <sup>12, 65, 77</sup>. Ezenkívül különböző profibrotikus és gyulladást segítő citokin is felszabadul, mint például a tumor nekrozis faktor-1alfa (TNF-1 $\alpha$ ) és az interleukin-6 (IL-6) <sup>78</sup>. A felsorolt faktorok aktiválják a fibroblasztokat és a tubuláris epiteliális sejteket (2. ábra). A makrofág infiltráció, mely a vesét ért károsodásra következik be, a veleszületett immunválasz egyik kulcsfontosságú lépése, az NF- $\kappa$ B útvonal aktivációjával jár <sup>79</sup>. A makrofágok által kiválasztott TGF- $\beta$  feltehetően szerepet játszik a profibrotikus hatás közvetítésében <sup>80</sup>. Ugyanakkor egy 2013-ban készült tanulmány ezt az eredményt cáfolja, mivel a TGF- $\beta$



deléciója makrofágokban nem befolyásolta a vesefibrózis súlyosságát sem az ischaemia-reperfüziós károsodás, sem az UUO (unilateralis ureter obstrukció) egérmódeljeiben <sup>81</sup>. A makrofágok és az aktivált fibroblasztok a fent felsorolt faktorokon kívül kemokineket és MMP-eket, MMP-2-t, MMP-3-t és MMP-9-t is felszabadítanak. Az epiteliális sejtek, amelyek ezeknek a „jeladó” molekuláknak a hatása alatt állnak, a gyulladásos sejtekkel együttműködve okozzák a bazális membrán károsodását, valamint a laminin és a IV-es típusú kollagén fokális degradációját <sup>82</sup>. A delaminált epiteliális sejtek ezután a növekedési faktorok és más kemokinek hatására az intersticiális térbe vándorolnak <sup>82</sup>. Mivel a szöveti plazminogén aktivátor (t-PA) indukálja az MMP-9 gén expresszióját, így a t-PA degradációjával az MMP-9 gén expresszióját gátolhatjuk, ezáltal az epiteliális sejtek átalakulását akadályozhatjuk meg *in vivo* <sup>83</sup>. A TGF- $\beta$  Smad2/3- és MAPK (mitogén-aktivált protein kinázok) függő útvonalakon idézheti elő az EMT-t. A csont morfogénikus fehérje-7 (BMP-7) a TGF- $\beta$  endogén inhibitora, így a TGF- $\beta$  hatásának gátlásával védőszerepet játszik a vesefibrózisban, mivel gyulladásellenes-, antioxidáns- és antifibrotikus hatást fejt ki <sup>84</sup>. A TGF- $\beta$  indukálta EMT jelentőségét a fibrózis progressziójában a BMP-7 hatása igazolta, mivel gátolta az EMT-t a vese, máj, epeutak, tüdő és a bélrendszer betegségeinek egérmódeljeiben <sup>84, 85</sup>, és javította a tubuláris-epiteliális sejtek javító mechanizmusát és visszafordította a krónikus vesekárosodást <sup>86</sup>.

A parciális EMT során a renális tubuláris epiteliális sejtek nem transzdifferentiálódnak intersticiális fibroblasztokká, hanem a tubulusokban maradnak és szignalizációjuk segíti az egyéb forrásból származó miofibroblasztok létrejöttét. A parciális EMT az egyik legfontosabb folyamat a vesefibrózis progressziójában <sup>12</sup>.



**2. ábra A renalis intersticiális fibrózis főbb eseményei** 1., A fibrózis korai eseménye a gyulladásoos sejtek, elsősorban a T-sejtek és a makrofágok peritubuláris infiltrációja; 2., A miofibroblasztok aktivációja és expanziója különböző forrásokból. A mátrix termelő miofibroblasztok nagy része valószínűleg az intersticiális fibroblasztok lokális aktivációjából származik; 3., A tubuláris sejtek apoptózisa, valamint az EMT, ami tubuláris atrophijához vezet. Ang II (Angiotensin II), TBM (tubular basement membrane), TNF (tumour necrosis factor), MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), CCL5 (C-C Motife Chemokine Ligand 5), TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1), CTGF (connective tissue growth factor), MMPs (matrix metalloproteinases), PAI1 (plasminogen activator inhibitor 1), EMT (epithelial to mesenchymal transition), PDGF (platelet-derived growth factor), FGF2 (fibroblast growth factor 2), tPA (tissue plasminogen activator),  $\alpha$ SMA (alpha-smooth muscle actin) *Kép forrása: Youhua Liu. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. Nat Rev Nephrol, 2011. 7(12): p. 684-96.*

## 1.2.4 A fibrózis molekuláris mechanizmusa

### 1.2.4.1 A transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- $\beta$ )

A fibrózis folyamatában számos jelátviteli útvonal játszik szerepet (pl.: TGF- $\beta$ /Smad, Wnt/  $\beta$ -catenin, Jagged/Notch, EGF-R, JAK/STAT). A TGF- $\beta$  egy több mint 40 citokimból álló szupercsalád tagja <sup>87</sup>. A TGF- $\beta$  szupercsalád tagjai a következők: aktivin, inhibin, BMP-k, növekedési differenciálódási faktorok (growth differentiation factor, GDF) és a glia sejtvonal eredetű növekedési faktor (glial derived neurotrophic factors, GDNF). Ezek a pleiotrop molekulák a vesebetegségekben, a fibrózisban, a sejt apoptózisban és a proliferációban meghatározó szerepet töltenek be <sup>88</sup>. Az emlősökben három TGF- $\beta$  izoformát azonosítottak TGF- $\beta$  1, 2 és 3 elnevezéssel, ezek közül a TGF- $\beta$ 1 a legelterjedtebb, amelyet a vesében lévő összes sejt képes előállítani <sup>88</sup>. Mindhárom TGF- $\beta$  izoforma fokozza a vesefibrózist <sup>89</sup>. A TGF- $\beta$ 1 multifunkcionális citokin, számos biológiai hatással rendelkezik. A TGF- $\beta$ 1 az EMT stimulálásán és a fibroblasztok osztódásának serkentésén keresztül a fibrózis fő szabályozója, valamint fokozza az ECM-szintézist (I-es, III-as, V-ös típusú kollagének, proteoglikánok, lamininek és a fibronectin), továbbá egyidejűleg gátolja a kollagenázok és a ECM-et lebontó MMP-k szintézisét <sup>90</sup>, amellyel szintén hozzájárul az ECM akkumulációhoz. Továbbá, a TGF- $\beta$ 1 serkenti a sejtproliferációt, a sejt differenciálódást, az apoptózist, az autofágiát stb. <sup>91</sup>. A TGF- $\beta$ 1-t a makrofágok, mononukleáris sejtek és a fibroblasztok is képesek szintetizálni <sup>92</sup>. A TGF- $\beta$ 1 mRNS és fehérje fokozott expresszióját látjuk fibrózissal járó vesebetegségekben, mint például az IgA nefropátia, a fokális szegmentális glomerulonephritis, a lupus nephritis, valamint a DN és a humán immundeficiencia vírus asszociált nefropátia <sup>93</sup>.

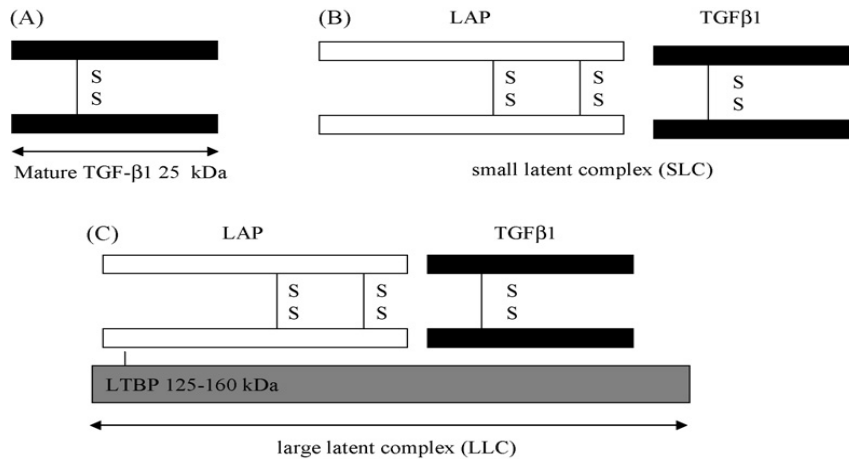
Exogén TGF- $\beta$ 1 növeli a vese ECM fehérjék termelését, transzfekciója után glomeruloszklerózis és tubulointersticiális fibrózis szövettani képe alakul ki *in vivo* kísérleti körülmények között <sup>94-96</sup>. Az ECM expanziójával járó vesebetegségek (DN, lupus nephritis, fokális és szegmentális glomerulonephritis, IgA nefropátia) a TGF- $\beta$ 1 fokozott expressziójával társulnak, azonban azokban a vesebetegségekben, amelyekben nincs jelen az ECM felhalmozódása („minimal change” betegség - vékony bazálmembrán betegség) nem detektálható fokozott TGF- $\beta$ 1 expresszió <sup>94</sup>. A fokozott TGF- $\beta$ 1

expresszió és a keringő aktív TGF- $\beta$ 1 emelkedett szintje a vesebetegség progressziójához is hozzájárul. A TGF- $\beta$ 1 növeli a IV-es típusú kollagén, a laminin és a biglycan termelését glomeruláris epiteliális sejtekben <sup>97</sup>. A TGF- $\beta$ 1 gátolja az ECM lebomlását, mivel az MMP-k szintézisét csökkenti, a TIMP-ek szintézisét fokozza <sup>98,99</sup>. A tubuláris epiteliális sejtekben elősorban az I-es, III-as, V-ös típusú kollagén szintézisét fokozza <sup>100</sup>. A TGF- $\beta$ 1 vizelet kiválasztása emelkedik proteinuriában szenvedő betegeknél a glomeruláris diszfunkció miatt, összehasonlítva az egészséges kontrollokkal, valamint a proteinuria nélküli glomeruláris betegségben szenvedő betegekkkel. Továbbá, a proteinuria immunszuppresszív kezeléssel történő remisszióját követi a vizelet csökkent TGF- $\beta$  ürítése <sup>101, 102</sup>. A TGF- $\beta$  fokozhatja a korai növekedési válasz fehérje 1 (EGR-1) és az aktivátor fehérje 1 (AP-1) transzkripcióját is, így fokozódik az ECM termelése is <sup>103, 104</sup>. Az AP-1 komplex (c-Jun, c-Fos) az ECM akkumulációját a TIMP-1 expressziójának fokozódásával is előidézheti <sup>105</sup>. Ezenkívül a TGF- $\beta$ 1 az egészséges fibroblasztok stimulálásával növeli a c-Jun és a c-Fos expresszióját mRNS és fehérje szinten, így fokozódik az AP-1 aktivitás <sup>104</sup>. Ezek a megfigyelések összhangban vannak azokkal a korábbi megállapításokkal, mely szerint az AP-1 komponensek a TGF- $\beta$  jelátvitel célpontjai <sup>106-109</sup>.

#### 1.2.4.2 A TGF- $\beta$ receptorok és a TGF- $\beta$ 1 aktivációja

A TGF- $\beta$  jelátvitel kanonikus (Smad alapú) és nem kanonikus (nem Smad alapú) útvonalakon keresztül történhet. A Smad fehérjecsaládot három csoportba oszthatjuk: R-Smad (receptor regulated Smad proteins, receptor aktivált Smadok, Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 és Smad8), az R-Smadokkal kapcsolódó co-Smad (közös Smad mediátor, Smad4), I-Smad (gátló Smadok, Smad6, Smad7) <sup>110</sup>. A TGF- $\beta$ 1 a Smad2-t és a Smad3-t aktiválja, a BMP pedig a Smad1-et, a Smad5-t és a Smad8-at. Az R-Smad fehérjék (Smad1, Smad2, Smad3 és a Smad5), egy közös Smad4-el (Co-Smad) lépnek kapcsolatba, majd a sejtmagban az R-Smad/Co-Smad komplex transzkripció faktorokhoz kötődik, majd megváltoztatják a célgének transzkripcióját <sup>111</sup>. A progresszív vesefibrózis mechanizmusa még nem teljesen ismert, de a kutatások kimutatták, hogy a TGF- $\beta$ 1 a Smad jelátvitel útján a vesefibrózis kialakulását segíti elő. A szintézis után a TGF- $\beta$ 1 rejtett formája szabadul fel látens asszociált peptidként (LAP),

amely a látens TGF- $\beta$  kötő proteinhez (LTBP) kötődik és egy nagy látens komplex (LLC) jön létre, mely az ECM-ben raktározódik (3. ábra)<sup>88, 112</sup>.



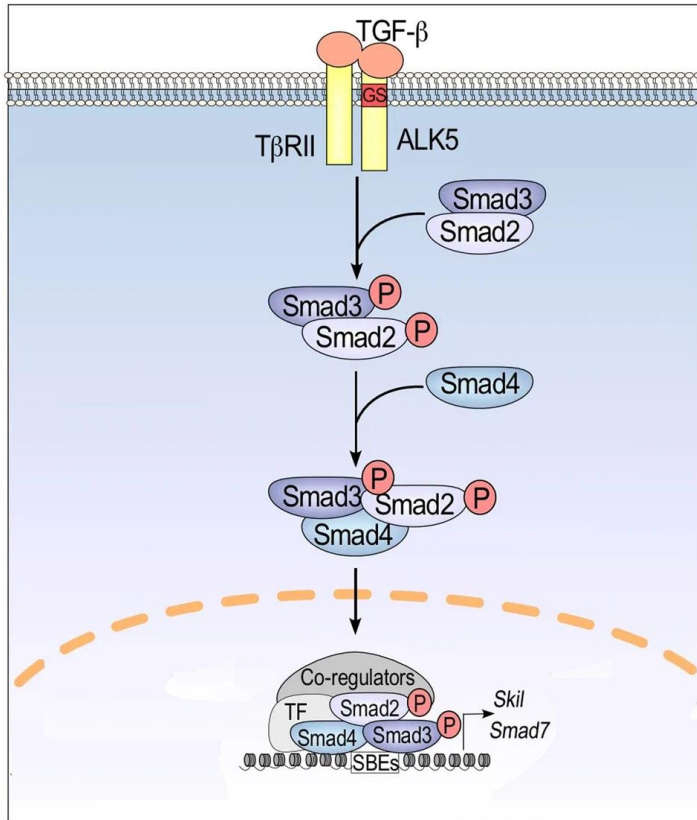
**3. ábra A TGF- $\beta$  fehérje szerkezete.** A TGF- $\beta$  25 egy kDa tömegű fehérje (A); A TGF- $\beta$ -nak két látens formája van: az egyik a LAP-TGF- $\beta$ 1, amely a kis látens komplex (SLC) (B); a másik a LAP-TGF- $\beta$ 1-LTBP, amely a nagy látens komplex (LLC) (C). A szintézis után a TGF- $\beta$ 1 látens asszociált peptidként (LAP) felszabadul, amely az LTBP-hez (látens TGF- $\beta$  kötő protein) kötődik, és egy nagy látens komplex (LLC) jön létre, amely az ECM-ben raktározódik. *Kép forrása: Qi, W., et al., Transforming growth factor-beta/connective tissue growth factor axis in the kidney. Int J Biochem Cell Biol, 2008. 40(1): p. 9-13.*

A Smad3-mediált TGF- $\beta$ 1 stimuláció fokozott kollagén termelést és az ECM lebomlásának gátlását eredményezi<sup>12</sup>. A TGF- $\beta$ 1 termelését számos faktor serkenti, köztük az angiotenzin II, endotélin-1, iszkémia, glükóz, inzulin, inzulinszerű növekedési faktor-1 (insulin-like growth factor 1 - IGF-1), pitvari natriuretikus peptid (ANP), vérlemezke-aktiváló faktor (platelet activating factor - PAF), tromboxán<sup>32</sup>. Különböző stimulusok hatására (reaktív oxigén származékok, integrinek, proteázok, MMP-2, MMP-9, plazmin, acidózis<sup>91, 113-116</sup> a TGF- $\beta$ 1 felszabadul a LAP-ból és az LTBP-ből, majd aktívvá válik *in vitro*. Az aktív TGF- $\beta$ 1 ezután kötődik a T $\beta$ 1RII-höz (II. típusú TGF- $\beta$  receptor), amely egy állandóan aktív szerin/treonin kináz típusú receptor, autofoszforylálódik és felveszi a T $\beta$ R1-t (I. típusú TGF- $\beta$  receptor), majd ezután foszforylálja a receptorral társított Smad 2/3 komplexet<sup>117</sup>. A TGF- $\beta$ 1 e két mediátoron (Smad2/3) keresztül fejti ki biológiai hatását, mint például az ECM termelés serkentését

<sup>118</sup>. Ezután a foszforilált Smad2/3 oligomer komplexet képez a Smad4-el, a sejtmagba transzlokálódnak és megváltoztatják a célgének transzkripcióját ( $\alpha$ -SMA, kollagének, Smad7) (4. ábra) <sup>119, 120</sup>. Fontos megemlíteni, hogy a Smad2-nek anti-fibrotikus a Smad3-nak pedig profibrotikus szerepe van vesefibrózisban, így a Smad2/3/4 komplexen keresztül lehetővé válhat a TGF- $\beta$ 1/Smad jelátvitel megváltoztatása <sup>88</sup>.

A Smad7 egy Smad3 függő mechanizmuson keresztül aktiválódhat, így gátolja a TGF- $\beta$ 1 jelátvitelt <sup>121-124</sup>. A TGF- $\beta$ 1 hatására a Smad7 szintje szignifikánsan csökken CKD-ben. A Smad7 hiánya továbbá a szív és a vese működési zavarához, immunszuppresszióhoz, növekedési retardációhoz vezetett egerekben, amely során a fokozott TGF- $\beta$ 1 jelátvitelt emelkedett foszfo-Smad2/3 szintek jelezték <sup>125</sup>. A Smad7 fokozott expressziója gátolta a TGF- $\beta$ 1 indukált vesefibrózist UUO vagy STZ-indukált DM-ban, amiből az következik, hogy a Smad7 hiánya a vesefibrózis progresszióját eredményezi <sup>118, 126</sup>.

A Smad7 és a TGF- $\beta$  közötti jelátvitel molekuláris mechanizmusai csak részben ismertek. A Smad6/7 gátolja a Smad2/3 foszforilációját, ezáltal a TGF- $\beta$  jelátvitelt is. Ebisawa és mtsai. által közölt tanulmány szerint a Smad7 a Smurf1 (SMAD specifikus E3 ubikvitin fehérje ligáz 1) által csökkenti a TGF- $\beta$  jelátvitelt, amely proteosomális és lizosomális úton bontja le az I-es típusú TGF- $\beta$  receptort <sup>124</sup>. Lin és mtsai. beszámolója szerint a Smurf2 kapcsolatba lép a Smad2-vel, valamint más R-Smad-okkal is, és a Smad2 proteoszóma függő degradációját okozza, ezáltal gátolja a TGF- $\beta$  jelátvitelt <sup>127</sup>. Továbbá, Kavsaket és mtsai. kutatása alapján a Smurf2 a Smad7-en keresztül kötődik a TGF- $\beta$  receptor komplexhez, ezáltal a receptorok és a Smad7 degradációját okozza <sup>123</sup>. A Smad3 és a Smad7 között fennálló egyensúlyhiány a fibrózis létrejöttének egyik fő mechanizmusa, ezért a Smad3 gátlása és a Smad7 aktiválása a vesefibrózis hatékony kezelése lehet <sup>88</sup>. Li és mtsai. arról számoltak be, hogy az EndMT tranzíció gátlása Smad3 inhibitorral védi az endotéliumot és csökkenti a vesefibrózist DN-ban <sup>128</sup>. A Smad7 deléciója felgyorsítja a fibrózist obstruktív nefropátiában, DN-ban, valamint hipertenzív nefropátiában is <sup>118, 126, 129</sup>, ezért a Smad7 használata a CKD kezelésének terápiás eszköze lehet <sup>118, 130-133</sup>.



**4. ábra A TGF-β1 jelátvitel szabályozása (módosított ábra).** Az aktív TGF-β1 kötődik a TβRII-höz, autofoszforilálódik, felveszi a TβR1-t (ALK5), foszforilálja a Smad2/3-t, amely komplexet képez a Smad4-el, a sejtmagba transzlokálódnak, és megváltoztatják a célgének transzkripcióját. *Kép forrása: Tecalco-Cruz, A.C., et al., Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF-beta/Smad signaling pathway in health and disease. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2018. 3: p. 15*

A TGF-β1 Smad független útvonalon keresztül is ki tudja fejteni a hatását, ideértve a tumor nekrosis faktor (TNF) receptor asszociált faktor 4 és 6 (TRAF4, TRAF6), TGF-β aktivált kináz 1 (TAK1), p38, ERK (extracelluláris szignál-regulált kinázok, extracellular signal-regulated kinase), MAPK (mitogén-aktivált protein kinázok), Rho-GTP-ázok, Rac, Cdc42, ILK (integrin-kapcsolt kináz), c-jun N-terminális kináz (JNK), nukleáris faktor kappa B (NF-κB) jelátviteli útvonalakat<sup>134-139</sup>. Bár a Smad független útvonalak is közvetítik a TGF-β által mediált fibrózist,<sup>140</sup> a TGF-β többnyire Smad függő jelátvitelen keresztül fejt ki fibrotikus hatását<sup>141</sup>.

### 1.2.4.3 A TGF- $\beta$ 1 jelátvitel gátlása

A TGF- $\beta$  pleiotrop hatásai miatt a TGF- $\beta$ -nak, a receptorainak vagy főbb jelátviteli molekuláinak farmakológiai gátlása nehézséget okoz. A vesefibrózis enyhítésére számos próbálkozás történt a TGF- $\beta$  jelátvitel gátlásán keresztül: (1) a TGF- $\beta$  közvetlen gátlása antiszensz oligonukleotiddal <sup>142</sup>, (2) a TGF- $\beta$  gátlása neutralizáló antitesttel <sup>143</sup>, vagy a TGF- $\beta$  természetes inhibitorával a decorinnal <sup>144, 145</sup> (3), szolubilis kiméra TGF- $\beta$  receptorral <sup>146</sup>, amely kompetitív módon gátolja a TGF- $\beta$  kötődését a receptorhoz. Az anti-TGF- $\beta$ 1 antiszérum csökkenti az ECM produkciót a TGF- $\beta$  fokozott termelésével járó akut mezangiális proliferatív glomerulonephritis állatmodelljében, továbbá drámai módon mérsékelte a betegség szövettani jellemzőit <sup>143, 144</sup>. A TGF- $\beta$ RII ellenes antitesttel végzett kezelés is csökkentette a mezangiális mátrix expanszióját, a proteinuriát, összehasonlítva a mezangiális proliferációs glomerulonephritis kontroll patkánymodelljeivel <sup>147</sup>. A pirfenidon egy szájon át adható kis molekula, amely gátolja a TGF- $\beta$ 1 gén és fehérje expresszióját. A pirfenidon hatékonyságának és biztonságosságának megítélésére klinikai vizsgálatokat végeztek különböző fibrotikus betegségekben, beleértve a tüdőfibrózist is <sup>148</sup>. A pirfenidon idiopathiás tüdőfibrózisban szenvedő betegekben csökkentette a betegség progresszióját a placeboval kezelt betegekhez képest. A gyomor-bélrendszer-, valamint a bőrt érintő nemkívánatos mellékhatások gyakoribbak voltak a pirfenidon csoportban, mint a placebo csoportban, de a mellékhatások többnyire „tolerálhatóak” voltak <sup>148</sup>. Nyílt (open-label) klinikai vizsgálatot végeztek fokális szegmentális glomeruloszklerózisban (FSGS) szenvedő betegeknél is. A pirfenidon kezeléshez köthető mellékhatások a következők voltak: dyspepsia, hasi diszkomfort, szedáció, fáradtság. A pirfenidon-nak a vérnyomásra és a proteinuriára nem volt hatása. Randomizált, kettős-vak, placebo-kontrollos vizsgálat során felmérték a pirfenidon hatását DN-ban szenvedő betegekben, akiknél csökkent GFR és fokozott albuminuria állt fenn <sup>149</sup>. A pirfenidon-nak nem volt hatása a proteinuriára és a vérnyomásra, de a tubulointersitiumban csökkentette a fibrózis mértékét, anélkül hogy javítaná a glomeruláris sérülést, bár ennek a mechanizmusa nem volt egyértelmű.

DN-ban szenvedő páciensek kezelésére használt TGF- $\beta$  ellenes humán monoklonális neutralizáló antitest (LY2382770) nem befolyásolta a szérum kreatinint, az eGFR-t és a



proteinuriát<sup>150</sup>. Továbbá, a TGF- $\beta$  mindhárom izoformáját gátló humán monoklonális antitest, a Fresolimumab, nem csökkentette a proteinuriát FSGS-ben szenvedő betegekben<sup>151, 152</sup>, ami azt bizonyítja, hogy a TGF- $\beta$  közvetlen gátlása nem alkalmas a CKD kezelésére. Elképzelhető, hogy a TGF- $\beta$  általános hatásának a gátlása (beleértve a TGF- $\beta$  látens formáját is) lehet az oka a klinikai vizsgálatok sikertelenségének. A látens TGF- $\beta$ -t fokozott mértékben expresszáló transzgenikus egerek ellenállóbbak a gyulladással és a fibrózissal szemben, UUO nefropátia és a glomeruláris bazális membrán ellenes glomerulonephritis állatmodelljében<sup>153, 154</sup>. Mivel a keringő TGF- $\beta$  többnyire látens formában van jelen, ezért a TGF- $\beta$  ellenes antitestek használata nagymértékben blokkolhatja a látens TGF- $\beta$  protektív hatását<sup>13</sup>. Összegezve a fentieket, a CKD-ben szenvedő betegek antifibrotikus kezelésére inkább a TGF- $\beta$  jelátviteli útvonal molekuláit kell megcélolni, szemben a TGF- $\beta$  általános hatásának blokkolásával.

#### 1.2.4.4 A kötőszöveti növekedési faktor (CTGF)

A CTGF a TGF- $\beta$  profibrotikus hatásainak downstream közvetítője. A CTGF a CCN fehérje család tagja (CCN fehérjék az ECM-hoz társított fehérjék, amelyek részt vesznek az intercelluláris jelátvitelben), amely négy domént tartalmaz, amelyek más-más növekedési faktorokat szabályoznak, és elősegítik a fibrózist. A CTGF expressziója normál körülmények között alacsony, vesefibrózisban megemelkedik<sup>155</sup>. A CTGF mRNS a krónikus tubulointersticiális károsodás helyén expresszálódik és szintje arányos a károsodás mértékével<sup>155</sup>. A CTGF különféle gyulladáshoz köthető mediátor (citokinek, kemokinek) expresszióját szabályozza különböző jelátviteli útvonalon keresztül. A CTGF gátlás hatékonyságát korábban különféle állatmodelleken figyelték meg, jelenleg klinikai vizsgálatok folynak ebben az irányban. A CTGF serkenti a fibroblaszt proliferációt, az ECM szintézisét és az integrin expresszióját<sup>32</sup>, valamint szerepe van a sejtek túlélésének, proliferációjának szabályozásában, az adhézióban és a migrációban<sup>156</sup>. Igarashi és mtsai. eredményei alapján a CTGF-et a TGF- $\beta$  aktiválja a sebgyógyulás során, valamint a bőrt érintő szklerózis és a dermális fibroblasztok CTGF expressziója között szoros a kapcsolat szisztémás szklerózisban szenvedő betegekben<sup>157, 158</sup>. A TGF- $\beta$  különféle sejtekben képes CTGF expressziót indukálni<sup>159-162</sup> (mivel a CTGF egy TGF- $\beta$  válasz elemet tartalmaz a promóteren), de legfőképpen a fibrózissal összefüggő folyamatokban. A CTGF négy doménnel rendelkezik, amelyek növekedési faktorokkal,

ECM fehérjékkel, az LDL-receptorhoz kapcsolt fehérjékkel és az integrinokkal lépnek kölcsönhatásba<sup>156, 163, 164</sup>. A CTGF von Willebrand-típusú C doménje lehet a közvetítője a TGF- $\beta$  szupercsaláddal (BMP, TGF- $\beta$ ) kialakult interakciónak. Így a CTGF a BMP és a TGF- $\beta$  ligandokhoz kötődik, ami a BMP jelátvitel gátlásához, és a TGF- $\beta$  jelátvitel fokozódásához vezet<sup>165</sup>. A CTGF hiánya csontváz disz-morfológiához vezet, amely porcfejlődési rendellenességet és szájpadhasadékot okoz egerekben<sup>166</sup>.

### 1.2.5 A mátrix metalloproteinázok szerkezete és típusai

Számos progresszív humán vesebetegségben<sup>167, 168</sup>, valamint ezek kísérleti modelljében<sup>169-171</sup> figyelhető meg emelkedett TIMP-1 expresszió. TGF- $\beta$ 1 hatására fokozódik az ECM alkotóelemeinek szintézise<sup>95, 172, 173</sup>, valamint csökken a mátrix lebontása (fokozott TIMP-1, csökkent MMP expresszió)<sup>174</sup>. Ugyanakkor máig sem teljesen ismert a TGF- $\beta$  indukálta TIMP-1 expresszió mechanizmusa. A mátrix metalloproteinázok csoportjába a cink függő endopeptidázok tartoznak, amelyek az ECM lebontásában játszanak fontos szerepet<sup>175</sup>. Az MMP-k vagy szolubilis fehérjékként szabadulnak fel, vagy a sejtfelszínen expresszálódnak, így szabályozzák a sejtek és az ECM közötti kapcsolatot<sup>176</sup>. Az MMP-k kulcsszabályozói az ECM átépülésének normális és patológias állapotokban egyaránt. A fejlődés, szöveti mátrix átépülés, sejtnövekedés, tumorsejt invázió és a metastasis képződés szakaszaiban vesznek részt, de szerepet játszanak proinflammatorikus és profibrotikus folyamatokban is<sup>177, 178</sup>. Profibrotikus hatásuk az EMT-t indukáló képességükön alapszik. Az MMP-k a vesefibrózis minden szakaszában szerepet játszanak (mononukleáris sejtek infiltrációja, sejtproliferáció, hegesedés)<sup>179</sup>. Az összes MMP inaktív proenzim formájában szintetizálódik. A propeptid doménjük egyik cisztein oldallánca kötődik az aktív centrumban lévő katalitikus cink-kötő doménhez, így az enzim inaktív marad. Az MMP-k aktivációja során a cink atom disszociál a fehérjéről, a cisztein-Zn kölcsönhatás megszűnik, a propeptid domén autoproteolízissel lehasad, az enzim konformációs változáson megy keresztül, így aktívvá válik<sup>180, 181</sup>.

CKD-ben szenvedő betegek plazma- és vizeletmintáiban magasabb az MMP-2 és az MMP-7 szintje, így ennek mérése fontos adat lehet vesebetegekben<sup>182</sup>. A proteinázokat hat csoportba soroljuk, aszerint hogy az ECM-nek melyik részét bontják: kollagenázok (MMP-1, MMP-8 és az MMP-13), zselatinázok (MMP-2 és MMP-9) (1. táblázat), amelyek denaturált kollagéneket, IV-es típusú kollagéneket a bazális membránban és

néhány kemokint hasítanak, stromelizinek (MMP-3, MMP-10, MMP-11 és az MMP-19), amelyek számos ECM elemet képesek bontani, mint például a fibronektint és a laminint, de natív kollagént nem képesek bontani, mátrilizinek (MMP-7 és MMP-26), amelyek a laminint és az entactint bontják, a sejtmembrán külső oldalán elhelyezkedő membrán típusú MMP-k (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 és az MMP-25), továbbá egyéb sejt- vagy szövetspecifikus MMP-k<sup>183-185</sup>. Henger és munkatársai megfigyelték, hogy több MMP gén (MMP-3, MMP-13, MMP-14) expressziója emelkedett a fibrózis különböző szakaszaiban<sup>186</sup>. A gyulladás folyamata során a különböző MMP-k eltérően, gyakran egymással ellentétesen működnek. Az MMP-7 és az MMP-9 a gyulladás progressziójában játszik szerepet<sup>187, 188</sup>. MMP-7 knockout egerekben csökkent a vesefibrózis mértéke UUO modellben<sup>189</sup>. Ezzel szemben a feltételezések szerint az MMP-13 és az MMP-17 gyulladásgátló mediátorként működik<sup>190</sup>. Az MMP-3 elősegítheti az EMT-t, az epiteliális szövet átalakulását olyan szöveté, amelyben a fibroblasztok jelennek meg, ezáltal felgyorsíthatja a fibrózist<sup>191</sup>. Az MMP-k aktivitását szöveti inhibitoraik, a TIMP-ek szabályozzák. Aktiválják vagy gátolják az MMP-k működését, mivel több olyan kötőhellyel rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik kapcsolódásukat az MMP-khez<sup>192</sup>. Az MMP-k és a TIMP-ek közötti dinamikus egyensúly hiánya az ECM elemek megváltozott felhalmozódásában és lebontásában észlelhető, amit patkány és humán modellekben is leírtak<sup>193-195</sup>. Az MMP-1 csökkent expressziója, a TIMP-1, az MMP-2, az MMP-7 és az MMP-9 fokozott expressziója profibrotikus, valamint a vese parenchymára destruktív hatással bír<sup>194, 195</sup>. A zselatinázokat, az MMP-2-t és az MMP-9-t a glomeruláris és a tubuláris sejtek is expresszálják<sup>196, 197</sup>. Az MMP-2 és az MMP-9 fokozott aktivitása a tubuláris bazális membrán szerkezeti változását okozhatja, amely az EMT-n keresztül tubuláris atrophiat és fibrózist eredményez<sup>198, 199</sup>. Ezenkívül a látens TGF- $\beta$  komplex proteolitikus degradációján keresztül tudják aktiválni a TGF- $\beta$ -t<sup>200</sup>.

**1. táblázat** A mátrix-metalloproteinázok (MMP-k) bizonyos típusai (Táblázat forrása: Ahmed, A.K.H., *Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Kidney Scarring: Culprits or Innocents. Journal of Health Science, 2009. 55(4): p. 473–483.*)

<b>Zselatináz típusú mátrix metalloproteinázok</b>		
<b>MMP típusa</b>	<b>szubsztrát</b>	<b>termelő sejtek a vesében</b>
MMP-2 (zselatináz A)	kollagén-3, -4, -5, -7, -10, zselatin, fibronektin, laminin, elasztin, proteoglikán	mezangiális-, epiteliális-, endotél- és tubulus sejtek, fibroblasztok, makrofágok
MMP-9 (zselatináz B)	kollagén-3, -4, -5, zselatin, proteoglikán, elasztin	u.a., mint az MMP-2

### **1.2.6 A mátrix metalloproteinázok szöveti inhibitorai (TIMP-ek), a multifunkcionális fehérjék**

A TIMP-ek csoportjában eddig négy fehérjét azonosítottak, amelyeket TIMP-1-el, TIMP-2-vel, TIMP-3-al és TIMP-4-el jelölnek. A négy fehérje közül a TIMP-1, a TIMP-2 és a TIMP-3 expresszálódik a vesében<sup>185, 201</sup>. A fehérjék N- és C-terminális doménnel rendelkeznek, amelyek képesek egymástól függetlenül működni. Az N-terminális domén az MMP-eket gátolja, a C-terminális domén a proenzimekkel (proMMP-k) képez komplexet<sup>202</sup>. A TIMP-eket számos sejt képes termelni (fibroblasztok, makrofágok, tubuláris epiteliális sejtek) és a legtöbb humán szövetben és testfolyadékban megtalálhatók<sup>32, 200</sup>. A TIMP-1 az összes ismert MMP-t képes gátolni és kulcsszerepet játszik az ECM lerakódása és lebontása közötti egyensúly fenntartásában különböző élettani folyamatokban<sup>203</sup>. A TIMP-ek az MMP-k aktív centrumával lépnek kölcsönhatásba nem kovalens kötéssel, 1:1 sztöchiometrikus arányban és reverzibilisen gátolják az MMP-k proteolitikus aktivitását<sup>204, 205</sup>. A TIMP-1 a proMMP9-re hat, míg a TIMP-2-nek a proMMP-2-höz nagy az affinitása<sup>200</sup>. A TIMP-2 számos sejt növekedését segíti elő, köztük a erythroid progenitor sejteket<sup>206</sup> és a metanephricus mesenchymalis sejteket is a nefron morfogenezise során<sup>207</sup>.

A TIMP-1 MMP gátló hatását az 1970-es évek elején fedezték fel kollagenáz inhibitor formájában humán bőr fibroblasztok<sup>208</sup>, humán szérum<sup>209</sup>, valamint szarvasmarha porc és aorta izolátumokban<sup>210</sup>. A csökkent MMP expresszió és/vagy az emelkedett TIMP-1 expresszió az ECM lebontásának gátlását, így az ECM felhalmozódását okozza<sup>171</sup>. A TIMP-1 expressziója alacsony egészséges vesében, viszont a legtöbb vesebetegség kísérleti modelljeiben (az előregedett vesékben is) szignifikánsan emelkedik, és a növekedés mértéke összefügg a fibrózis súlyosságával<sup>211-214</sup>.

A TIMP-1 mRNS fibrózissal összefüggő fokozott expresszióját eddig vesében, tüdőben<sup>215</sup> és májban<sup>216</sup> figyelték meg. A TIMP-eknek az MMP-ktől független biológiai aktivitása is van. Serkentik a sejtnövekedést, sejt differenciálódást és a sejt migrációt, gátolják az angiogenezist, és az apoptózist<sup>217</sup>. A TIMP-1 serkenti a sejtnövekedést keratinocytákban<sup>218</sup>, fibroblasztokban<sup>219</sup>, chondrocytákban, epiteliális sejtekben, valamint különféle leukaemiás sejtvonalakban is<sup>220</sup>. A TIMP-1-et a TGF- $\beta$ -n kívül aktiválhatják más növekedési faktorok, köztük az epidermális növekedési faktor (EGF), PDGF, TNF- $\alpha$ , citokinek (IL-1, -6, -10), oncostatin M, endotoxin és a thrombin<sup>32</sup>. A TIMP-1 pleiotrop hatásai a CKD progressziójában is szerepet játszanak, mivel szabályozza a krónikus gyulladást, a megváltozott immunválaszt, a fokozott apoptózist és a kardiovaszkuláris komorbiditást<sup>221</sup>. A TIMP-1 expressziója emelkedett különböző daganatos megbetegedésekben, szívelégtelenség progressziójában pedig biomarker szerepét töltheti be<sup>222, 223</sup>. Máig vitatott, hogy vesefibrózisban a TIMP-1 által közvetített ECM lebontás korlátozása az MMP gátlása révén, vagy az MMP-től független módon történik-e.

### **1.3 Transzkripciós faktorok szerepe a vesefibrózisban**

A transzkripciós faktorok olyan fehérjék, amelyek specifikus DNS szekvenciákhoz képesek kötődni és így szabályozzák a gének DNS-ről RNS-re történő átírását<sup>224</sup>.

#### **1.3.1 Az aktivátor protein komplex-1 (AP-1 komplex)**

A heterodimer AP-1 transzkripciós faktor felépítésében a Jun-, Fos-, ATF (activating transcription factor, aktiváló transzkripciós faktor) - és Maf fehérje családok különböző tagjai vesznek részt, aktivitását ezek expressziója, valamint az AP-1 DNS kötő oldala

határozza meg. Az AP-1 aktivitását különböző stimulusok széles skálája szabályozza, ideértve a növekedési faktorokat, a bakteriális és vírusfertőzéseket, a citokineket, az UV sugárzást <sup>225-227</sup>. Az AP-1 számos biológiai folyamat közvetítésében vesz részt, mint például a sejtproliferáció, a sejt differenciálódás, a sejtek túlélése és a sejthalál <sup>228, 229</sup>. A különböző AP-1 dimerek aktivitása a sejtípustól és a sejt differenciálódási állapotától is függ. Különböző külső stimulusok (pl.: növekedési faktorok, gyulladáscsökkentő citokinek) hatására a MAPK (mitogén-aktivált protein kináz, mitogen-activated protein kinase) növeli és szabályozza az AP-1 dimerek mennyiségét és aktivitását <sup>230</sup>. Munkacsoportunk vizsgálati eredményei alapján a hyperosmolaritás növeli az AP-1 expressziót patkány vese velőállományának sejtjeiben <sup>231</sup>. A Jun család tagjaival (c-Jun, Jun-B, Jun-D) ellentétben, a Fos család tagjainak (c-Fos, Fra-1, Fra-2 és Fos-B) heterodimerizálniuk kell a Jun család tagjaival a transzkripcionálisan aktív komplex létrejöttéhez. A dimerizálódás után az AP-1 komplexek a DNS megfelelő helyeihez kötődnek, ideértve a 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) válasz elemet (TREs) és a cAMP válasz elemet a célgének promóter és enhancer régióiban <sup>232, 233</sup>. A TIMP-1 transzkripciót részben az AP-1 komplex szabályozza. A c-Fos, a JunD és a c-Jun elengedhetetlenek a TGF- $\beta$  indukált TIMP-1 expresszióhoz <sup>234</sup>. A proinflammatorikus és a genotoxikus stressz leginkább a JNK és a p38MAPK útvonalon keresztül okozza az AP-1 komplex aktiválódását <sup>235</sup>.

### **1.3.2 A JNK útvonal (c-Jun amino terminális kináz)**

A JNK szignalizáció, amely egyike a három mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalnak, kulcsfontosságú tényező a tubulointersticiális sérülés és fibrózis kialakulásában humán és a kísérleti vesebetegségekben. A tubulointersticiális sejtekben történő JNK aktiváció során romlik a vesefunkció, infiltrálódnak a makrofágok, a tubulusok károsodását és az intersticiális fibrózis képét látjuk <sup>236, 237</sup>. A JNK útvonal aktiválódása során foszforilálódnak többek között a c-Jun, a JunD, az ATF <sup>228</sup>. A JNK útvonal proinflammatorikus és profibrotikus válaszok aktiválódását eredményezi, továbbá olyan fehérjék foszforilációját idézi elő, amelyek apoptózist, sejtproliferációt vagy transzformációt indukálnak a sejtek típusától és a stimulustól függően <sup>7, 238</sup>. A JNK útvonal aktiválódása a TGF- $\beta$  látens formáját aktiváló enzimek expresszióját idézi elő, közvetlenül foszforilálja a Smad3-at, így fokozza a profibrotikus molekulák

transzkripcióját <sup>7</sup>. Emellett a JNK aktivációt a glomeruláris betegségek különböző állatmodelljeiben is megfigyelték, köztük félhold képződéssel járó glomerulonephritisben, DN-ban, minimális elváltozással járó (minimal change) glomerulonephritisben, Alport szindrómában és „sóérzékeny” hypertoniában <sup>239-243</sup>. JNK aktiváció az öregedő vesékben is kimutatható <sup>244</sup>. A JNK-gátlók hatásosak akut vesekárosodásban, továbbá mérséklék a glomeruloszklerózis és a tubulointersticiális fibrózis kialakulását <sup>7</sup>.

### **1.3.3 A Janus kináz (JAK) és szignál transzducer transzkripció aktivátor (STAT) jelátvitel szerepe vesefibrózisban**

A JAK/STAT útvonalat számos növekedési faktor és citokin aktiválhatja. Ennek az útvonalnak az aktivációja fontos szerepet játszik a vesebetegségek patofiziológiájában, az ECM akkumulációjában, a tubulointersticiális fibrózis kialakulásában <sup>245</sup>.

A STAT-ok az EGF (Epidermal growth factor, epidermális növekedési faktor), PDGF, ERK (extracelluláris szignál-regulált kinázok, extracellular signal-regulated kinase), protein kináz C és a MAPK-ok által is képesek aktiválódni, amelyek JAK-tól független útvonalak <sup>246</sup>. A JAK család tirozin kináz típusú fehérjékből áll, emlősökben négyféle JAK (JAK1, JAK2, JAK3 és a TYK2) ismert <sup>247</sup>. A STAT fehérjék hét tagból állnak (STAT1-STAT4, STAT5A, STAT5B és a STAT6) <sup>245</sup>. Lu és mtsai. streptozotocinnal indukált DM-ban vizsgálták a STAT3 szerepét. Azokban az egerekben, amelyekben 25%-os volt a STAT3 aktivitás szignifikánsan kisebb mértékű proteinuriát, mezangiális expanziót, glomeruláris sejtproliferációt és makrofág infiltrációt láttak, mint azokban az egerekben, amelyekben 75%-os volt a STAT3 aktivitás <sup>248</sup>. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a STAT3 fontos szerepet játszik az intersticiális fibrózis gyulladós sejteinek infiltrációjában és az ECM akkumulációjában a DN korai szakaszában <sup>245</sup>. A JAK/STAT aktiváció szerepét a vesebetegségekben elsősorban UUO és DN modellekben vizsgálták <sup>249</sup>. Pang és mtsai. kimutatták, hogy a STAT3 inhibitor gátolta az  $\alpha$ -SMA és a fibronectin expresszióját intersticiális fibrolaszt sejtenyészetben, és csökkentette az ECM akkumulációt, valamint az intersticiális fibroblasztok szaporodását UUO modellben, egerekben <sup>250</sup>. A vesebetegségek közül a DN minden bizonnyal a JAK/STAT aktiváció legjobb példája. DN-ban a JAK/STAT útvonal angiotenzin II által közvetített aktivációja a glomeruláris mezangiális sejtekben fokozza a TGF- $\beta$ , a IV-es típusú

kollagén és a fibronectin termelését <sup>251</sup>, amelyek fokozzák az ECM akkumulációját és hozzájárulnak a glomeruloszklerózis kialakulásához DN-ban. Kuratsune és mtsai. az aktivált STAT3 (Tyr705-foszforilált STAT3; pSTAT3) szignifikáns emelkedését figyelték meg patkány renalis tubuláris intersticiális sejtekben és miofibroblasztokban UÚO során, ami arra utal, hogy a STAT3 hozzájárulhat az intersticiális fibrózis progressiójához <sup>252</sup>. A kísérleti eredmények arra világítanak rá, hogy a JAK/STAT jelátviteli út, különösen a JAK2 és a STAT3 gátlása csökkentheti a vesefibrózis mértékét és javíthatja a vesefunkciót, ugyanakkor további vizsgálatok szükségesek a fibrózissal járó vesebetegségekben szerepet játszó specifikus JAK/STAT tagok jelátvitelének megismeréséhez <sup>245</sup>.

### 1.3.4 Az EGR transzkripciós faktor család

Az EGR-1 (NGFI-A, Krox24), EGR2 (Krox20), EGR-3 (PILOT) és az EGR-4 (AT133) cink-ujj transzkripciós faktorok, amelyek számos, a sejt differenciálódásban, a növekedésben és az extracelluláris szignálra adott válaszban érintett gén expresszióját szabályozzák <sup>253-256</sup>. Az EGR család tagjainak expresszióját (mely alacsony vagy kimutathatatlan nyugvó sejtekben) számtalan extracelluláris szignál aktiválhatja, köztük citokinek, növekedési faktorok, T sejt receptor aktiváció és toxikus anyagok <sup>257-261</sup>.

Az EGR-1 (korai növekedési válasz fehérje 1, early growth response protein 1) egy korai transzkripciós faktor, amelynek a gyulladásban és fibrózisban betöltött szerepe már ismert, de a veseelégtelenségben betöltött szerepe még nem teljesen egyértelmű. A biológiai folyamatok közül részt vesz a sejtnövekedésben, a proliferációban, differenciálódásban és a mátrix átépülésben <sup>262</sup>. Az EGR-1 fokozott expresszióját látjuk minden olyan folyamatban, amely a szövetek sérüléséhez kapcsolódik. A vaszkuláris sérülésre adott válaszként az EGR-1 aktiválhatja a profibrotikus és a mátrix átépülésben résztvevő géneket, például a TGF- $\beta$ -t és a PDGF-t <sup>263</sup>. Az EGR-1 expressziót a TGF- $\beta$  aktiválja normál fibroblasztokban <sup>264</sup>. EGR-1 KO egerek embrionális fibroblasztjaiban a TGF- $\beta$  nem képes stimulálni a kollagén szintézist, ami arra utal, hogy az EGR-1 nélkülözhetetlen a TGF- $\beta$  indukált kollagén szintézishez <sup>265</sup>. Az EGR-1 közvetlenül fokozza a tumor nekrozis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , TIMP-1, MMP-2, I-es, III-as, IV-es típusú kollagén expresszióját, így a mátrix akkumulációjának, valamint a miofibroblasztok differenciációjának fokozásával is hozzájárul a vesefibrózishoz <sup>103, 266-</sup>



<sup>270</sup>. Az EGR-1 kulcsfontosságú szerepet játszik a szövetek akut sérülésre adott PDGF, a CTGF, a VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor - vascular endothelial growth factor), a PAI-1 (plazminogén aktivátor inhibitor-1) és a TGF- $\beta$  expressziós válaszában <sup>264</sup>. Az EGR-1 továbbá elősegíti a gyulladás kialakulását kolesztatikus májkárosodás <sup>271</sup>, ischemia-reperfúziós tüdőkárosodás <sup>263</sup> és az atherogenezis állatmodelljeiben <sup>272</sup>. A vesében, az ischemia-reperfúziós károsodás során az EGR-1 fehérje expressziója gyorsan megnövekszik és akkumulálódik a vese vastag felszálló szárának és gyűjtőcsatornájának sejteiben <sup>273</sup>. Ezenkívül TGF- $\beta$  vagy más fibrogén stimulusra bekövetkező EGR-1 expressziót tapasztaltak scleroderma, tüdőfibrózis és colitisz állatmodelljeiben <sup>274-276</sup>. A fibrózisban betöltött szerepét az is igazolja, hogy EGR-1 hiányában enyhébb lefolyású a bleomycinnal kiváltott bőr- és tüdőfibrózis egerekben <sup>277</sup>. Emellett az aktiválódott EGR-1 az intersticiális fibroblasztok és a tubuláris epiteliális sejtek stimulálásával súlyosítja a vesefibrózist <sup>278, 279</sup>. Az EGR-1 profibrotikus szerepét bizonyítja, hogy a fokozott EGR-1 termelés elősegíti a tubuláris sejtek proinflammatorikus citokin és kemokin szekrécióját, így tovább súlyosítja a veseelégtelenséget. EGR-1 knock out (KO) egerekben ugyanakkor enyhébb vesefibrózis és csökkent gyulladásos válasz alakult ki, továbbá az EGR-1 hiánya enyhítette a TGF- $\beta$  és TNF- $\alpha$  indukálta gyulladást és profibrotikus válaszreakciót humán proximális tubuláris epiteliális sejtekben <sup>280</sup>. Munkacsoportunk bizonyította, hogy az ozmotikus stressz hatására is fokozódik az EGR-1 termelése patkány vesében <sup>231</sup>. Az EGR2 fontos szerepet játszik az immunregulációban, mivel gátolja a T-sejt aktivációt, valamint kritikus fontosságú szerepe van az immuntolerancia fenntartásában <sup>259</sup>. Elengedhetetlen továbbá az agy fejlődéséhez, valamint a perifériás idegek myelinizációjához is. Az EGR2 KO egerek vizsgálata arra a felfedezésre vezetett, hogy az EGR2 a Schwann sejt myelinizációjának elsődleges szabályozója. Bár a legtöbb EGR2 KO egér születése után elpusztul, néhány EGR2 KO egér legfeljebb 2 hétig marad életben, és idegeik hypomyelinizáltak. <sup>259, 281, 282</sup>. Az EGR2 a kollagén gén intracelluláris stimuláló mediátoraként is működik, valamint részt vesz a TGF- $\beta$  által indukált fibrotikus folyamatokban <sup>283</sup>. EGR2 közvetlenül előidézi számtalan profibrotikus gén expresszióját fibroblasztokban, így részt vesz az ECM átépülésének szabályozásában és a fibrogenézisben <sup>284</sup>.

### 1.3.5 A Runx transzkripciós faktorok (Runt-related transcription factors)

A Runt domén transzkripciós faktorok (RUNX1, RUNX2, RUNX3) szerves részei mind a TGF- $\beta$ , mind a BMP indukált jelátvitelnek számos fontos biológiai folyamatban. Az R-Smad fehérjék és a Runx transzkripciós faktorok közvetlen kapcsolatban állnak egymással<sup>285</sup>. A BMP RUNX2 expressziót okoz a mesenchymalis progenitor sejtekben Smad-függő módon. A RUNX2 a Smad1-el és a Smad5-el lép kölcsönhatásba és az oszteoblaszt differenciálódásban részt vevő célgénnek expresszióját szabályozza<sup>285, 286</sup>. A RUNX2 nélkülözhetetlen az oszteoblasztokéréséhez és az oszteogenezishez<sup>287</sup>.

A RUNX3 fehérje a gasztrointesztinális traktus epiteliális sejtjeiben termelődik. RUNX3 hiányában csökken az epiteliális sejtek érzékenysége a TGF- $\beta$  apoptózist indukáló és növekedésgátló hatásával szemben, így a RUNX3 tumorszuppresszor szerepet tölt be minden olyan malignus folyamatban, ahol a TGF- $\beta$  jelátviteli útvonal aktiválódik<sup>288</sup>. A RUNX1 transzkripciós faktornak kiemelkedő szerepe van az endotéliális-hematopoetikus tranzícióban (EHT), amely elméletben hasonlít az EMT-hez, ám az EMT-ben és a vesefibrózisban betöltött szerepe még nem egyértelmű. A RUNX1 nélkülözhetetlen a végleges haemopoézishez, így ha funkciója elveszik, nem alakulnak ki a haemopoetikus őssejtek<sup>289</sup>. Az akut leukémiák 30%-ában megtalálható a RUNX1 gén valamilyen pontmutációja, valamint számos kromoszóma transzlokáció is gyakran érinti a Runx1-et kódoló régiót<sup>290</sup>. A RUNX1 szükséges a myeloid prekursor sejtek differenciálódásához, így a RUNX1 funkciókiesése éretlen proliferáló sejteket eredményez. Ebben a kontextusban a RUNX1 tumorszuppresszor szerepet tölt be<sup>291</sup>. Zhou és mtsai. arra a megállapításra jutottak, hogy a RUNX1 elősegíti a renális tubuláris EMT-t és a vesefibrózist. Eredményeik szerint a TGF- $\beta$  indukált RUNX1 expresszió Smad3 függő, ami azt jelezheti, hogy a Smad3 részben elősegítheti az EMT-t a RUNX1-en keresztül, illetve a RUNX1 delécióna szignifikánsan csökkenti a vesefibrózist renális tubuláris epiteliális sejtekben<sup>292</sup>. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a RUNX2 közvetíti a PTH anti-apoptotikus hatását a proximális tubuláris vesesejtekben<sup>293</sup>, a RUNX3 részt vesz az angiotenzin-II 1-es típusú (AT1) receptorral asszociált fehérjék expressziójának szabályozásában a vese disztális kanyarulatos csatornájának sejtjeiben<sup>294</sup>. Bertrand és mtsai. a RUNX1 és RUNX2 transzkripciós faktorok TIMP-1 expresszióra gyakorolt hatását vizsgálták májsejtekben, és megállapították, hogy ezek a fehérjék képesek

aktiválni a TIMP-1 gén promóterét, így fokozzák expresszióját <sup>295</sup>. Vesében még nem írtak le hasonló összefüggést.

### **1.3.6 A PPAR- $\gamma$ (peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor- $\gamma$ ) lehetséges szerepe a fibrózisban**

A PPAR-ok ligand aktivált transzkripciós faktorok, amelyek a nukleáris receptor szupercsaládhoz tartoznak. A PPAR-t 1990-ben fedezték fel peroxiszóma proliferátorokra adott válasz közvetítőjeként rágcásalókban. A PPAR-ok számos élettani folyamatban vesznek részt, például a lipid anyagcsere szabályozásában, gyulladásoos válaszban, a glükóz homeosztázisban és a sejtek differenciálódásában. A mai napig három PPAR izotípust jellemeztek: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  és a PPAR- $\gamma$  <sup>296, 297</sup>. A PPAR- $\gamma$  egy a sejt-magban található anti-fibrotikus és vasoprotektív hatással rendelkező nukleáris hormon receptor és transzkripciós faktor <sup>298</sup>.

A PPAR- $\gamma$  expresszió számos szövetben és sejtben megfigyelhető (zsírszövet, izomszövet, pancreas szigetsejtjei, endotélsejtek, makrofágok) <sup>299, 300</sup>. A PPAR- $\gamma$  a vesében főleg a velőállomány gyűjtőcsatornáiban <sup>301</sup> található meg, emellett a nefron többi szegmensében is expresszálódik, mint például a podocitákban <sup>302</sup>, a mezangiális sejtekben <sup>303</sup>, és a proximális epiteliális sejtekben <sup>302, 304</sup>. Mindez felveti, hogy a PPAR- $\gamma$  agonisták közvetlenül is befolyásolhatják a vese működését. A thiazolidindionoknak (TZD-k; troglitazon, pioglitazon, rosiglitazon), amelyek a PPAR- $\gamma$  agonisták eddig klinikai használatba került csoportja, az inzulin érzékenység javításában és az adipogenezis fokozásában van központi szerepük. A TZD-k csökkentik a triglicerid szintet harántcsíkolt- és szívizomsejtekben, valamint a pancreas-szigetsejtekben, a HDL-koleszterin szintet pedig növelik <sup>305-309</sup>. A TZD-k közül a troglitazon és a rosiglitazon már nincs klinikai forgalomban. A troglitazon a potenciálisan súlyos hepatikus szövődmények (májelégtelenség, transzplantáció szükségessége, halállal végződő esetek) miatt <sup>310, 311</sup>, a rosiglitazon a cardiovascularis mellékhatások miatt került kivezetésre <sup>312</sup>. A PPAR- $\gamma$  agonisták bizonyítottan csökkentik a vesekárosodás mértékét ischaemia-reperfúziós károsodás, autoszomális domináns policisztás vesebetegség (APKD), illetve nem DM okozta CKD-ben <sup>313</sup>. A PPAR- $\gamma$  agonisták terápiás hatását eddig főleg T2DM-ban (2-es típusú diabétes mellitus, type 2 diabetes mellitus) szenvedő betegekben vizsgálták, mivel növelik az inzulinérzékenységet, csökkentik a máj glükóz termelését, HbA<sub>1c</sub>

szintjét, valamint megakadályozzák a pancreas  $\beta$ -sejtjeinek apoptózist<sup>298, 310</sup>. Mivel a PPAR- $\gamma$  receptor nagy mennyiségben expresszálódik az erek simaizomsejtjein, valamint az endotélsejteken is, így a TZD-k az endotélvédő tulajdonságuk miatt csökkentik a DM okozta vaszkuláris szövődmények kialakulását is<sup>300</sup>. A PPAR- $\gamma$  agonisták ezenkívül anti-fibrotikus hatással is rendelkeznek, csökkentik a IV-es típusú kollagén és a fibronectin termelést, valamint a TIMP-1 és a TIMP-2 aktivitását<sup>302</sup>, továbbá glomerulusokban mérséklék a DM indukálta TGF- $\beta$  expressziót is<sup>314</sup>.

Ezenkívül gátolják az AP-1 és az NF- $\kappa$ B által mediált gyulladáshoz vezető választ különböző szövetekben<sup>297</sup>. A PPAR- $\gamma$  agonisták nem csak az endotélsejtek TNF- $\alpha$  által indukált apoptózist gátolják, hanem megakadályozzák az endotélsejtek spontán apoptózist és csökkentik a glomerulus kapillárisok endotéliumának károsodását<sup>315</sup>. A pioglitazon és a troglitazon anti-fibrotikus és renoprotektív hatását a T2DM patkánymodelljében<sup>316</sup> és UUO egérmodellben<sup>317</sup> is megerősítették. A rosiglitazonnal végzett kísérletek igazolták, hogy hatékonyan gátolja a TGF- $\beta$  által kiváltott fibrózist és enyhíti a bleomycin indukált bőr fibrózist *in vivo*<sup>318</sup>. A PPAR- $\gamma$  agonisták ezenkívül gátolják a TGF- $\beta$ /SMAD jelátviteli útvonalat, amellyel mérséklék a vese fibroblaszt aktivációját, csökkentik a CTGF expressziót és az ECM szintézist, így lassul a vesefibrózis progressziója<sup>313</sup>.

A fentiekén túl a PPAR- $\gamma$  agonisták gátolják az NF- $\kappa$ B, a STAT és az AP-1 útvonalakat, csökkentik a gyulladáshoz vezető faktorok expresszióját a monocytákban és a makrofágokban<sup>319</sup>. A T2DM patkánymodelljében a pioglitazon szignifikánsan csökkenti a makrofág infiltrációt a veseszövetben, emellett csökkenti a gyulladáshoz vezető és fibrotikus faktorok (NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , PAI-1, VEGF) szintjét is<sup>316</sup>. A PPAR- $\gamma$  agonistákkal történő kezelés nemcsak a vesefibrózist, hanem a máj- és a szív fibrózist is mérsékelte<sup>320</sup>. Kawai és mtsai. a CKD UUO modelljében vizsgálták a PPAR- $\gamma$  kezelés (troglitazon) vesefibrózisra gyakorolt hatását. A kezelés hatására szignifikánsan csökkent a TGF- $\beta$ -szint, így az intersticiális vesefibrózis és a gyulladás is mérséklődött<sup>317</sup>. Ugyanakkor Zhang és mtsai. eredményei nem támasztották alá a pioglitazon kezelés gyulladáscsökkentő hatását vesefibrózisban, mivel a kezelés nem mérsékelte jelentősen az UUO-indukálta vesefibrózis progresszióját

321.

#### 1.4 A CKD kezelése

A CKD-s betegek jelenlegi kezelése magában foglalhatja a renin gátlását (aliskiren), a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer gátlását, amely az angiotenzin konvertáló enzim gátlókat (ACE-gátlók, ACEi), (kaptopril, enalapril, lizinopril, perindopril stb.), az angiotenzin II receptor blokkolókat (ARB), (losartan, valsartan, telmisartan stb.), valamint az aldoszteron antagonistákat (eplerenon, spironolakton) foglalja magába <sup>322</sup>. Számos klinikai vizsgálat igazolta az ACE-gátlók renoprotektív hatását humán DM-ban <sup>323, 324</sup>, valamint a kísérleti állatmodellekben is <sup>325, 326</sup>. Továbbá a DM kísérleti modelljében a renin-angiotenzin rendszer blokkolása nemcsak a glomeruláris károsodás <sup>327</sup> és az ECM transzkripciójának mérséklését eredményezi a glomerulusban, hanem a TGF- $\beta$  és a kollagén felhalmozódása is csökken a tubulointerstíciumban <sup>328</sup>. Az ACE-gátlók ECM felhalmozódására gyakorolt hasonló hatásáról humán DN-ban is beszámoltak <sup>329</sup>.

Az ACEi/ARB terápia csökkenti a proteinuriát, mérsékli a glomeruláris hiperfiltrációt, így csökkenti a dialízist igénylő diabéteszes betegek számát is <sup>324, 325, 330, 331</sup>. A spironolakton és eplerenon szintén hatékonyan mérséklik a vérnyomást, és az albuminuriát DN-ben, azonban hiperkalémiát okozhatnak <sup>332, 333</sup>. Mindezek ellenére a renin-angiotenzin-aldoszteron blokkád renoprotektív hatása a becslések szerint mindössze 20%-kal csökkenti a CKD progressziójának kockázatát <sup>334</sup>.

A nátrium/glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) gátlását már vizsgálták a T2DM kezelésére, azoknál a betegeknél, akiknél nefropátia is fennáll. Az ACEi/ARB-t kezelt betegeknél alkalmazott SGLT2 gátlás tovább mérsékelt az albuminuriát és lassította a vesefunkció romlást <sup>335, 336</sup>. Mivel az albuminuria csökkenése szorosan összefügg a javuló vesefunkcióval <sup>337</sup>, ezért várható, hogy ez a gyógyszercsoport csökkenti az ESRD kockázatát. Az empagliflozin kezelésről bebizonyosodott, hogy drámai módon csökkenti a szív-és érrendszeri szövődmények előfordulását magas kockázatú DM esetén <sup>338</sup>, valamint ACEi/ARB kezeléssel szemben (az eddig eredmények alapján) az empagliflozin kezelés nem okoz hiperkalémiát <sup>339</sup>. Ugyanakkor az SGLT2 gátlók alkalmazása ellenjavallt alacsony eGFR mellett és súlyos vesekárosodás esetén <sup>340</sup>. A SGLT2 gátlók alkalmazása a fokozott glükozuria miatt kedvező növekedési környezetet biztosíthat a

kommenzális mikroorganizmusok számára és ezáltal növelhetik a vulvovaginitisz és a balanitisz kockázatát <sup>341</sup>.

### 1.5 A genetikai különbségek hatása

A krónikus vesebetegségek azonos etiológia mellett is (pl. DN, hipertenzív nefropátia) eltérő klinikai progressziót mutatnak, ami felveti a genetikai különbségek valószínűségét <sup>342</sup>.

Ugyanakkor máig sem ismertek azok a molekuláris mechanizmusok, amelyek felelősek lehetnek az eltérő genetikai fogékonyságért, valamint a különböző mértékű progresszióért.

Számos tanulmány ismertette már és kiemelte annak fontosságát, hogy az állatkísérletek során a vesebetegségek kialakulása és progressziója törzs függő patkányokban <sup>343-346</sup> és egerekben <sup>346-350</sup>. Ennek háttérében húzódó mechanizmus még nem ismert, de a vizsgálati eredmények alapján a C56B1/6 (B6) törzsek, egyéb egértörzsekhez képest ellenállóbbak a vesefibrózissal szemben, mint a Balb/C, CBA vagy DBA/2 törzsek. Humán betegekben ugyanúgy megfigyelték, hogy a DN-ban vagy a hipertenzív nefropátiában szenvedő betegekben eltérő a vesebetegség progressziója <sup>342, 351</sup>. A progresszió heterogenitása azt sugallja, hogy a genetikai különbségek, mind a humán betegekben, mind az állatmodellekben rendkívül fontosak.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

A genetikai háttér által befolyásolt vesefibrózis progresszió mechanizmusának tisztázása érdekében célunk volt:

1. Több vesefibrózis modellben vizsgálni a genetikai háttér összefüggését a betegség progressziójával és a TIMP-1 expresszióval.
2. A TIMP-1 vesefibrózisban betöltött központi szerepének bizonyítására
  - a) Létrehozni fibrózisra érzékeny (CBAXB6) genetikai háttéren TIMP-1 hiányos egereket, majd vizsgálni a szubtotális nefrektómia (SNX) indukált vesefibrózis lefolyását,
  - b) Gyors progressziót mutató (CBAXB6 háttérű) TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben vizsgálni a TIMP-1 neutralizáció hatását a vesefibrózisra.
3. Tisztázni, hogy a TIMP-1 transzkripciós szabályozásának genetikai különbségei magyarázzák-e a különböző beltenyésztett egértörzsek vesefibrózisának eltérő lefolyását *in vivo* és primer mezangiális sejtekben *in vitro*.
4. Annak tisztázása, hogy PPAR- $\gamma$  agonista kezelés befolyásolja-e a TGF- $\beta$  indukált vesefibrózis lefolyását, valamint a transzkripciós szabályozási útvonalakat.

### 3 MÓDSZEREK

#### 3.1 Felhasznált egérmodellek

A kísérleti állatokat specifikus patogén mentes (SPF) körülmények között tartottuk 10/14 órás fény/sötétség ciklus alatt a Semmelweis Egyetem NET GMO állatházban. Az egerek standard rágcsalótápot és tisztított csapvizet kaptak. Az állatok vérvétele és leölése isoflurane narkózis alatt történt. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság, valamint Pest Megyei Kormányhivatal engedélyezte (engedély szám: PE/EA/948-4/2018).

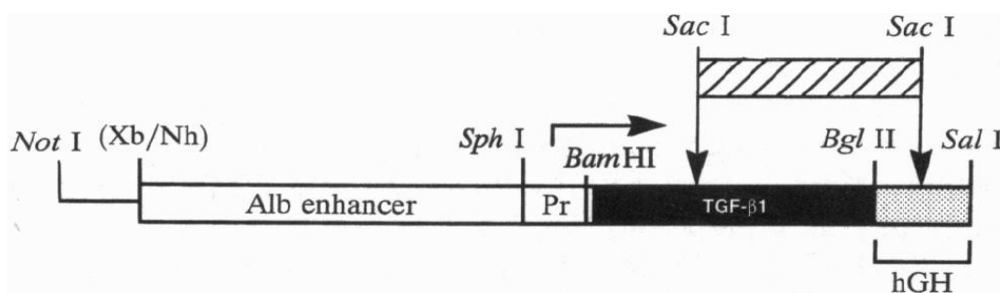
##### 3.1.1 A TGF- $\beta$ transzgenikus modell

Mivel a TGF- $\beta$  elsődleges szerepet játszik a vesefibrózis pathogenezisében, egy magas keringő TGF- $\beta$  szinttel rendelkező állatmodell alkalmas lehet a vesefibrózis modellezésére<sup>137</sup>. A kutatócsoportunk által is használt eredeti transzgenikus egérmodell, a CBA.B6-Alb/TGF- $\beta$  transzgenikus egér<sup>352, 353</sup>, amelyben a sertésből nyert TGF- $\beta$  transzgén teljes cDNS szekvenciája egér albumin promóterhez kapcsolt, így ezen állatok plazma TGF- $\beta$  szintje magasabb<sup>352, 354</sup>.

A transzgén szekvenciája két aminosav cserét (223-as és a 225-ös szerin  $\rightarrow$  cisztein) tartalmaz, így a TGF- $\beta$  aktív formáját kódolja<sup>352</sup>. Mivel a transzgén az Y kromoszómába épült be, ezért csak a hím egerek transzgenikusak. Az albumin promóter segítségével a transzgén expresszióját sikerült a májsejtekre korlátozni, továbbá a promóter biztosítja, hogy csak születés után kezd el expresszálni a TGF- $\beta$  transzgén, így nincs befolyással az intrauterin fejlődésre, viszont születés után folyamatosan a fiziológiás szinteket meghaladó TGF- $\beta$  koncentráció mérhető az egerekben (5. ábra). A transzgenikus törzs létrehozásakor a transzgén konstruktot B6CBA (C57BL6 x CBA F1 egerek) zigótába injektáltuk, és a transzgenikus vonalakat sorozatos visszakeresztezésel tartottuk fenn B6CBA egerekben. A TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben progresszív vesefibrózis és veseelégtelenség alakul ki, amelynek következtében az állatok 25%-a 15 hetes korukra elpusztult<sup>354</sup>. A transzgenikus egerekben 5 hetes korukra két élesen elkülönülő fenotípus alakult ki<sup>353</sup>. A súlyos fenotípusú transzgenikus állatokban gyorsan progrediáló vesefibrózis alakult ki, amit ödéma, szövettanilag súlyos glomeruloszklerózis,



megemelkedett karbamid nitrogén (BUN: blood urea nitrogen), valamint az endogén (renalis) TGF- $\beta$  és a TIMP-1 mRNS expressziójának szignifikáns növekedése kísért. Az állatok másik „enyhe” fenotípusú csoportjában 1-2+ kismértékű glomeruloszklerózis mellett ödéma nem jelentkezett, amit a TGF- $\beta$ , valamint a TIMP-1 mRNS expressziójának csak minimális (nem szignifikáns) emelkedése kísért. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a genetikai háttérnek jelentős szerepe van a TGF- $\beta$  által indukált vesefibrózis progressziójában. A genetikai háttér fibrózist befolyásoló hatását már több egérmodellen bizonyították <sup>348, 355</sup>.



**5. ábra A mikroinjektált TGF- $\beta$  transzgén cDNS szerkezete.** Albumin promóterhez kapcsolt teljes sertés cDNS az Y kromoszómán. A *Not I-Sal I* vektor nélküli DNS-fragmentek sematikus ábrázolása, amelyeket a zigótába injektáltak. C57BL6 x CBA F1 egerek, Alb: albumin, Pr: promóter, hGH: a humán növekedési hormon gén határoló régiója, *Sac I fragment*: sertés TGF- $\beta$ 1 cDNS. (Kép forrása: N Sanderson, V Factor, P Nagy, J Kopp, P Kondaiah, L Wakefield, A B Roberts, M B Sporn, S S Thorgeirsson. *Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. Proc Nat Acad Sci USA 1995. 92(7): p. 2572-2576*)

### 3.1.1.1 A TGF- $\beta$ 1 transzgén visszakeresztezése B6 genetikai háttére (kongenikus B6-TGF $\beta$ egerek), valamint hibrid CBAXB6-TGF $\beta$ (F1) transzgenikus egerek létrehozása

A fentebb ismertetett inhomogén, CBAXB6 hibrid genetikai háttéren fenntartott CBA.B6-Alb/TGF- $\beta$  transzgenikus egereket <sup>352, 353</sup> munkacsoportunk 22 generáción keresztül visszakeresztezte B6 genetikai háttére, az így kapott kongenikus B6-TGF- $\beta$  hímeket használtuk vizsgálatainkhoz. A B6-TGF $\beta$  hím egereket CBA nőstényekkel keresztezve CBAXB6-TGF $\beta$  (F1) transzgenikus egereket hoztunk létre, melyek túlélése 2 hetes

korban csak 50-60%-os volt. Emiatt kísérleteinkben 14 napos transzgenikus egereket vizsgáltunk.

### **3.1.2 TIMP-1 knockout egérmodell**

A C57Bl6/J genetikai háttérű nőstény TIMP-1 KO egereket (*B6.129S4-Timp1<sup>tm1Pds</sup>/J*, Jackson Laboratories, Stock No:006243) CBA hím egerekkel kereszteztük, így jött létre a hibrid genetikai háttérű CBAxB6-TIMP1<sup>-/-</sup> F1 törzs (TIMP1<sup>-/-</sup>), amelyet kísérleteinkben használtunk.

### **3.1.3 Unilateralis ureter obstrukció (UUO) és szubtotális nefrektómia (SNX) modellek**

Izoflurán altatásban 25-30 gramm testtömegű hím B6 és CBA egereken alkalmaztunk UUO-t vagy SNX-et. Az UUO elvégzése során a bal vesét és uretert median laparotomiával értük el, majd a bal uretert a vese alatt kb. 1 cm-re proximalisan és 2 cm-re distalisan lekötöttük, és a ligatúrák között átvágtuk. A műtét után 24 órával éter altatás mellett az egereket szíven keresztül perfundáltuk jégen hűtött fiziológias sóoldattal, majd a lekötött (UUO) és az ellenoldali (kontroll, CTL) veséket eltávolítottuk további vizsgálatok elvégzése céljából. Az alábbi kísérleti csoportokat vizsgáltuk: B6 CTL, B6 UUO, CBA CTL, CBA UUO (n=5/csoport). Az SNX elvégzése során a jobb vese jobb oldali dorsalis lumbotomia elvégzésével került eltávolításra, majd ezután megmértük a tömegét. Egy hét múlva eltávolítottuk az enyhén hipertrofizált bal oldali vese kéregállományának kétharmad részét. A bal oldali vesehilust 20 mm-es DeBaakey bulldoggal rögzítettük. Műtét közben a kivágott veseszövet mennyiségét, a korábban eltávolított ellenoldali vese súlyának 60%-ig távolítottuk el. A vese sebfelszínre Gelaspon csíkokat helyeztünk (Bausch+Lomb, Berlin, Németország), hogy megakadályozzuk a vérzést az artéria felengedése után. A bal oldali eltávolított kéregállomány jobb vese súlyához való viszonyításával határoztuk meg a veseabláció mértékét, ami 60-65% között volt. Az áloperált egerek veséit csak dekapszuláltuk, negatív kontrollként szolgáltak. A műtét után hat héttel vizelet mintákat gyűjtöttünk, a veséket eltávolítottuk szövettani és mRNA expressziós vizsgálatokhoz.

### 3.1.4 TIMP-1 neutralizáció, *in vivo*

8 napos korban CBAxB6-TGF- $\beta$  hím egereket (n=5) kezeltünk intraperitonealisan kecske poliklonális TIMP-1 neutralizáló antitesttel (2  $\mu$ g/nap, #AF980, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) vagy IgG-vel (n=4, 2  $\mu$ g/nap) 5 egymást követő napon keresztül. Két egér elpusztult a neutralizációs kezelés alatt. A kecske IgG-vel kezelt vad típusú (n=5) és a CBAxB6-TGF $\beta$  hím egerek (n=12) negatív és pozitív kontrollként szolgáltak. A kísérleti csoportok az alábbiak voltak: IgG kezelt CBAxB6 F1 (vad típusú, n=5), IgG kezelt CBAxB6-TGF $\beta$  F1 (IgG kezelt TGF- $\beta$  transzgenikus, n=12) és anti-TIMP-1 kezelt CBAxB6-TGF $\beta$  F1 egerek (anti-Timp1 TGF- $\beta$  transzgenikus, n=7). A retenciós paramétereket, a vizelet protein/kreatinin hányadost és a vesék szövettanát 14 napos korban vizsgáltuk.

Egy másik kísérletben az általunk keresztezett (ld. TIMP-1 knockout egérmodell) CBAxB6-Timp<sup>-/-</sup> F1 hím egerek veséjét szubtotális nefrektómia után (SNX) hasonlítottuk a kontroll CBAxB6 F1 hím SNX egerek veséjéhez.

### 3.1.5 *In vitro* kísérletek

10 % FBS-t (fetal bovin serum) és 100 IU/ml penicillint/100  $\mu$ g/ml streptomycint tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) médiumban tenyésztett humán embrionális vese sejteket (HEK293) (ATCC CRL-3216) 24 lyukú sejtenyészítő lemezekre osztottuk 90 000 sejt/lyuk sűrűséggel, majd OptiMEM médiumban (Gibco, Thermo Scientific, USA) 48 órán át tranziensen transzfektáltuk 750 ng EGR2-t vagy EGFP-t (fokozott zöld fluoreszcens fehérje; enhanced green fluorescent protein) kódoló plazmiddal, Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Thermo Scientific, USA) felhasználásával, a gyártó protokollja szerint. A sejtekből RNS-t és fehérjét izoláltunk TriZol (Invitrogen, Thermo, USA), illetve proteáz inhibitor tartalmazó RIPA puffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer: 50mM TRISpH 7-8; 150mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% Na-deoxikolát; 1% NP-40; EDTA-free complete mini proteáz inhibitor, Roche) segítségével. Az RNS átírást, nagy kapacitású cDNS készlettel (Thermo) végeztük a gyártó protokollja szerint (High Capacity cDNA Synthesis Kit, Applied Biosystems).

### 3.1.6 Vese biopszia szövetminták

Az EGR2 és a TIMP-1 mRNS expressziójának mérésére, valamint az állatkísérletek és az *in vitro* eredmények alátámasztására fagyasztott humán vesemintákat elemeztünk. A vese szövetek a Semmelweis Egyetem 2-es számú Patológiai Intézetében diagnosztizált FSGS mintákból származtak a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyása után (TUKEB 228/2014). A vesekéreg minták FSGS-sel diagnosztizált betegekből, ill. vesesejtes carcinoma miatt nephrectomizált vesék egészséges szövetéből származtak, amelyekből RNS izolálást követően génexpresszió vizsgálatot végeztünk qPCR segítségével.

### 3.1.7 A renalis transzkriptom elemzése cDNS chip (microarray) segítségével

Három-három 14 napos B6-TGF $\beta$  és CBAxB6-TGF $\beta$  egér veséiből izoláltunk teljes RNS-t SV Total RNA Kit segítségével (Promega, Madison, WI, USA) a gyártó protokollja szerint, majd az RNS-ek minőségét Agilent Bioanalyzer-en értékeltük (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). A jelöléseket és a chip-re történő hibridizációt az NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) Microarray Core facilitása végezte el Affymetrix Mouse GeneChip 430\_2 segítségével, amely a teljes egér transzkriptomot vizsgálja. A szignifikánsan expresszált gének ANOVA elemzés alapján kerültek kiválasztásra a Partek Genomics Suite szoftver segítségével (Partek, St. Charles, MO, USA) az NIDDK Core Facility munkatársai által.

A gének ontológiai elemzéséhez azon géneket vettük alapul, amelyek  $p < 0,05$  szignifikancia szinten legalább abszolút  $\pm 1,5 \log_2$  expressziós érték változást mutattak, beleértve mind a felfelé, mind a lefelé szabályozott géneket, amelyhez a Thomson Reuters GeneGo szoftverét használtuk. A szabályozási útvonalak elemzését Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood, CA) szoftverrel végeztük.

## 3.2 Pioglitazon kezelés TGF- $\beta$ indukált vesefibrózisban

### 3.2.1 Kísérleti csoportok

Kísérletünkben 10 hetes hím C57BL/6 vad típusú (kontroll, C) és a TGF- $\beta$  transzgenikus egereket (TGFb) két csoportba osztottuk az alábbiak szerint. Az egerek első csoportja

normál tápot kapott (kontroll és TGF- $\beta$ , n=7/csoport). A második csoportot tápba kevert pioglitazonnal kezeltük (20 mg/kg/nap) 5 héten keresztül (kontroll+Pio és TGF- $\beta$ +Pio, n=7/csoport). 15 hetes korban izoflurán (2%) anesztézia alatt steril punkcióval vizelet mintát vettünk, vérnyomást mértünk (lásd: 3.2.3) és narkózisban intrakardiális kanülön keresztül 20 percig 4%-os fiziológiás sóoldattal perfundáltuk az állatokat. A kezelés végén a vesékből szövettani vizsgálatokat végeztünk, valamint meghatároztuk az mRNS expressziókat.

### 3.2.2 Genotipizálás

A TGF- $\beta$  transzgenikus egerek genotipizálásához 1-2 mm-es fark mintákból kivontuk a genomikus DNS-t Tris-NaOH módszer segítségével, majd PCR-t végeztünk specifikus primerek segítségével <sup>352</sup>. A mintákat mikrocentrifugacsőben 200  $\mu$ l 0.1 N NaOH-ban inkubáltuk 10 percen keresztül 96 °C-os termosztátban, ezután vortexeltük és jégen lehűtöttük. A mintákhoz 50  $\mu$ l Tris-t (pH=8) adtunk, vortexeltük és 20000 rpm-en 6 percig 4 °C-on lecentrifugáltuk. Az így nyert felülúszót új csövekbe pipettáztuk és 2.5  $\mu$ l-t használtunk fel az egyes PCR reakciókhoz.

A PCR reakcióhoz a következő Alb/TGF $\beta$  primer szekvenciákat használtuk: szenz: 5'-GGCAAACATACGCAAGGGA-3'; antiszenz: 5'-AGAATCTGGCCGCGAATGG-3'. A PCR reakciók az alábbiak szerint zajlottak: kezdeti denaturálás 95 °C-on 2 percig, majd 35 cikluson keresztül 95 °C-on 50 s-ig, 65 °C-on 50 s-ig és 72 °C-on 75 s-ig. A PCR termékeket ezek után 1.5%-os agaróz gélen szeparáltuk, hogy detektáljuk a transzgén 370 bázispár termékét <sup>354</sup>.

### 3.2.3 Vérnyomásmérés

A szisztémás vérnyomást invazív módon mértük a kísérlet terminálása előtt az izofluránnal altatott egereken. A 1.4F microtip katétert (Millar Instruments, USA) helyeztünk a jobb oldali a. carotisba, és az aortaívig bevezettük. A vérnyomás görbéket PowerLab regisztráló egység és LabChart szoftver segítségével rögzítettük és elemeztük (AD Instruments, Colorado Springs, USA).

### 3.2.4 Plazma TGF- $\beta$ szint meghatározása

A kísérletek végén, a szemzugarból vett EDTA-s vérmintákat (100  $\mu$ l/egér) szilikonizált 1,5 mL-es mikrocentrifuga csövekbe gyűjtöttük, ezután a vérmintákat 1000 g-n centrifugáltuk 20 percig, majd az izolált plazmát egy másik szilikoncsőben 10000 g-n 10 percig újracentrifugáltuk, hogy leüleptsük a trombocitákat. Végül a felülúszó 10  $\mu$ l-ből meghatároztuk az egerek plazma TGF- $\beta$ 1 koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit segítségével (R&D Quantikine TGF- $\beta$  ELISA, Minneapolis, USA).

### 3.2.5 A proteinuria meghatározása

Közvetlenül a szervek kivétele előtt steril hólyagpunkcióval nyert vizeletből határoztuk meg az ürített fehérje (BCA kit, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) és kreatinin koncentrációt (Creatinine Kit, Diagnosticum Zrt). A GFR-re normalizált vizelettel ürített fehérje mennyiségét a vizelet protein/kreatinin hányadosával állapítottuk meg.

### 3.2.6 Génexpressziós vizsgálatok (q-PCR)

20-30 mg teljes vese homogenizátumból izoláltuk az RNS-t, fenol-kloroform extrakció segítségével (Trizol, Thermo Fisher) a gyártó protokollja szerint. Az RNS koncentrációt fotometriásan mértük meg (NanoDrop, Thermo Fisher). Reverz transzkripciót összesen 10  $\mu$ l oldatban 1  $\mu$ g RNS-sel és különböző primerekkel végeztünk az Applied Biosystems High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit felhasználásával (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Mindegyik PCR reakcióhoz a BioRad CFX96 (BioRad, USA) készüléket használtuk Biorline Sensi Fast SYBR Green PCR Master Mix (Biorline, Németország) felhasználásával. A PCR reakciók specificitását és hatékonyságát az olvadási görbék analízise igazolta.

Minden minta mérése duplikátumban történt, és riboszómális 18S RNS expresszióra normalizáltunk, a  $2^{-\Delta C_t}$  képlet segítségével. A primer szekvenciák a 13. táblázatban láthatók.

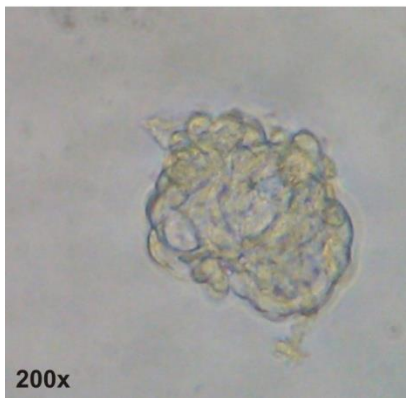
**13. táblázat** A kvantitatív PCR-hez használt primer szekvenciák (5' – 3').

<i>Gének</i>	<i>szensz primer</i>	<i>antiszensz primer</i>
Acta2	ATAACCCTTCAGCGTTCAGC	ACATAGCTGGAGCAGCGTC
Bgn	CGAATCCATGACAACCGTATC	GGTTCAAAGCCACTGTTCTC
Colla1	CATAAAGGGTCATCGTGGCT	TTGAGTCCGTCTTTGCCAG
Col3a1	TGGAAAAGATGGAACAAGTGG	CCAGACTTTTCACCTCCAAC
CTGF	CCCGAGTTACCAATGACAATAC	CTTAGCCCTGTATGTCTTCAC
Dcn	GTTCTGATCTGGGTTTGGAC	CCTCTGGACTGATTTTGCTG
Egr2	AACGGAGTGGCCGGAGAT	ATGGGAGATCCAACGACCTCTT
Fos	TTTCAACGCCGACTACGAGG	GCGCAAAGTCCTGTGTGTT
Jun	GCACATCACCCTACACCGA	GGGAAGCGTGTCTGGCTAT
Lcn2	ACGTCACTTCCATCCTCGTC	CCTGGAGCTTGGAACGAATG
MMP2	GGACAAGAACCAGATCACATAC	CGTCGCTCCATACTTTTAAGG
MMP9	TGGATAAGGAGTTCTCTGGTG	CCACCTTGTTACCTCATTTC
Rn18s	TGGTTGCAAAGCTGAACTTAAAG	AGTCAAATTAAGCCGCAGGC
Smad2	TCACAGACCCATCAAACCTCG	ACTCAGCAAACACTTCCCC
Smad3	GCCTACTGTCCAATGTCAAC	CGAAAATAGCACTGTCCTGAG
Smad4	CATTCCAGCCTCCCATTTC	CCCAAGCAAAGCGATCTC
Smad6	GCAACCCCTACCACTTCAG	GCCTCGGTTTCAGTGTAAGAC
Smad7	TGTGCAAAGTGTTTCAGGTG	CATTGGGTATCTGGAGTAAGG
Tgfb1	CACCATCCATGACATGAACC	TCATGTTGGACAACTGCTCC
TIMP1	CACCAGAGCAGATACCATG	GTGGTCTCGTTGATTTCTGG
TIMP2	CAGGAAAGGCAGAAGGAGATG	GATCATGGGACAGCGAGTG
TIMP3	TGAAGGCAAGATGTACACAGG	GAGGTCACAAAACAAGGCAAG
TGFβ	CACCATCCATGACATGAACC	TCATGTTGGACAACTGCTCC

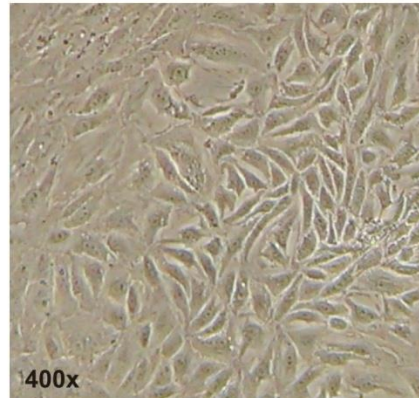
### 3.3 Primér mezangiális sejtek izolálása

Előzetes eredményeink szerint a CBA egértörzs érzékenyebb a vesefibrózisra, ezért 6 hetes CBA hím egerekből primér mezangiális sejteket izoláltunk. Mivel a B6 egértörzs rezisztensnek bizonyult a fibrózis kialakulására, így kontrollként szintén 6 hetes B6 hím egerekből izolált mezangiális sejteket használtunk. A mezangiális sejtek izolálása mágneses mikrogöngy szeparációs módszerrel történt<sup>356</sup>. A glomeruláris sejttenyészetet szelektív médiumban (RPMI 1640 medium, 10% FBS, streptomycin, penicillin) tartottuk fent 21 napig standard körülmények között (37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> tenzió mellett). A szelektív médium hatására elsőként az endotél sejtek, majd a podociták, végül a fibroblasztok pusztultak el, így végül tiszta mezangiális sejttenyészetet kaptunk. A P2 sejteket zselatinnal bevont 8 lyukú kamrákra és 6 lyukú lemezekre osztottuk, ezután 24 órán át növesztettük őket, majd a tenyészet tisztaságát mezangiális markerekkel (E-cadherin, vimentin, fibronectin) ellenőriztük immuncitokémia és immunoblot módszerrel.

**a**



**b**

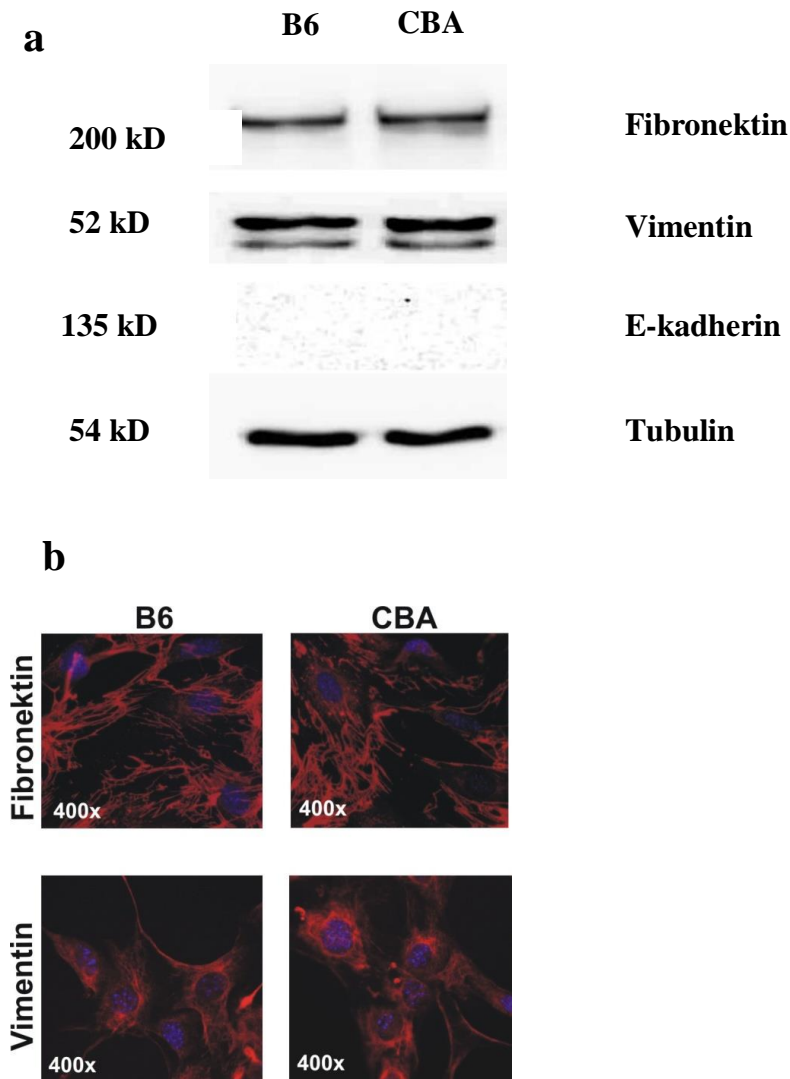


**6. ábra** Izolált glomerulus (a) (200x nagyítás). Az orsószerű sejtek glomeruláris növekedése a 21. napon (b) (400x nagyítás)

Az izolált primér mezangiális sejteket P5 és P8 passzázsok között 24 lyukú sejttenyésztő lemezekre osztottuk le, majd a B6 és a CBA mezangiális sejtek (n=6/csoport) géneexpresszióját 48 órával a PBS (foszfátpufferolt sóoldat) vagy TGF- $\beta$  kezelés (10 ng/ml) után mértük. A mezangiális sejtek vizsgálatához az alábbi antitesteket használtuk fel: nyúl fibronectin (Sigma), nyúl vimentin (CST), nyúl E-cadherin (CST), egér tubulin (Millipore).



Immunoblotlalt a B6 és CBA primér mezangiális sejtek pozitív reakciót mutattak fibronektin és vimentin antitestekkel, illetve negatív reakciót az E-kadherin antitesttel.



**7. ábra Primér mezangiális sejtek vizsgálata.** (a) Mind a B6, mind a CBA primer sejtek immunoblot vizsgálata pozitív reakciót mutatott fibronektin és vimentin antitesttel (mezangiális markerek), illetve negatív reakciót E-kadherin antitesttel (epiteliális marker). (b) Immuncitokémia során az antigéneket specifikus elsődleges antitesttel és Cy-3 (anti-egér IgG antitest) konjugált másodlagos antitesttel (*piros*) festettük meg, a sejtmagokat DAPI-val (univerzális DNS-hez kötődő fluoreszcens festék) jelöltük (*kék*) (400x nagyítás).

### 3.4 Immunoblot

A vesemintákat (20 mg) proteáz inhibitorot tartalmazó RIPA lízis pufferben (Roche, Mannheim, Germany) homogenizáltuk. A fehérje koncentrációt bicinkoniniksavas módszerrel mértük meg (BCA Assay, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Futtatás előtt a mintákhoz Laemmli puffert adtunk, majd 100 °C-on 5 percig forraltuk. A mintákat (40 µg) 12%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid gélen szeparáltuk, majd ezután nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 1 órán keresztül tejport és 0,1% Tween-20-at tartalmazó TBS (trissel puffereelt sóoldat, tris-buffered saline) oldatban blokkoltuk 1 órán keresztül, majd 4°C-on egész éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitestet tartalmazó oldatban. Másnap a membránokat a TTBS-oldattal történő mosás után peroxidáz konjugált másodlagos antitest segítségével hívtuk elő kemilumineszcens detekcióval (ECL kit, Thermo).

### 3.5 Szövettan és immunhisztokémia

A formalinban fixált és paraffinba ágyazott vesemetszeteket Masson trikróm festés után értékeltük. A glomeruloszklerózis és a tubulointersticiális károsodás mértékét szemikvantitatív skála segítségével határoztuk meg <sup>357</sup>. A glomeruloszklerózis indexet (GSI) 0-4 fokozatú pontozási rendszer szerint értékeltük (El Nahas). 0. fokozat: nincs eltérés, egészséges glomerulus; 1. fokozat: a kapillárisok kitapadnak a Bowman-tokhoz; 2. fokozat: a mezangiális mátrix felszaporodása a glomerulusok 25%-ban; 3. fokozat: a mezangiális mátrix felszaporodása a glomerulusok 50%-ban, valamint kapilláris elzáródások; 4. fokozat: a mezangiális mátrix felszaporodása a glomerulusok több mint 75%-ban. Minden állat GSI-jét 400x-os nagyítás mellett határoztuk meg fénymikroszkóp alatt 100 kiértékelt glomerulus pontjainak számtani közepéből. A tubulointersticiális károsodás mértékét 100x nagyítás mellett értékeltük az alábbiak szerint: 0. fokozat: nincs eltérés; 1-5 fokozat aszerint, hogy az alábbiak közül hány eltérés teljesült az adott látótérben: tubulustágulat, tubuláris atrophia, hyalin a tubuluslumenben, a mononukleáris sejtek intersticiális infiltrációja, intersticiális fibrózis.

A paraffinba ágyazott metszetek immunhisztokémiai festését avidin-biotin módszerrel végeztük <sup>357</sup>.

A metszetek rehidrálása az alábbiak szerint történt: 5-5 perces mosás xilollal, majd 100%, 90%, 70%-os etil alkoholba helyezés, végül mosás desztillált vízben. A metszetek rehidrálását követően pH 6,0-os citrát pufferrel 20 perces forralással végeztünk antigén feltárást mikrohullámú sütőben. Fibronektin (1:1000, nyúl poliklonális antitest, anti-fibronektin, Sigma-Aldrich, Budapest) és EGR-1 (1:500, nyúl poliklonális antitest, anti-EGR-1, Cell Signaling, USA) primer antitesteket használtunk egy éjszakán keresztül. Másodlagos antitestként a gyártó előírásának megfelelően Super Sensitive Link-et (BioGenex, San Ramon, CA, USA) használtunk. A metszeteket Vulcan Red szubsztráttal hívtuk elő (Biotium, Németország). Az immunhisztokémiai reaktivitást 400x-os nagyításon fénymikroszkóppal vizsgáltuk szemikvantitatív pontozási módszer segítségével. 0 pont: nincs festődés; 1 pont: gyenge festődés; 2 pont: mérsékelt festődés; 3 pont: erős festődés; 4 pont: nagyon erős festődés. A renalis EGR-1 expresszió kiértékelésekor minden egyes látótérben megszámoltuk a pozitív sejteket 400x-os nagyítás mellett és pozitív sejt/látótér formában értékeltük.

### 3.6 Statisztika

Az adatokat átlag  $\pm$  szórás formájában jelenítettük meg és a statisztikai analízist SPSS 10.0 Windows szoftverrel végeztük (IBM, USA). Az adatokat egyszempontos variancia analízis (ANOVA) és Tukey post-hoc segítségével, illetve Kruskal-Wallis ANOVA-val és többszörös összehasonlító Dunn teszttel elemeztük  $p < 0.05$  szignifikancia szint mellett. A pioglitazon kezelt állatkísérlet adatait kétszempontos ANOVA-val és Sidak-féle poszt hoc teszttel dolgoztuk fel. A túlélési görbe meghatározásához Kaplan-Meier analízist használtunk. Két minta túlélési eloszlásának összehasonlítására log-rank tesztet végeztünk. Az adatok és a statisztikai elemzések megfelelnek a kísérlet tervezésére és elemzésére vonatkozó farmakológiai ajánlásoknak<sup>358</sup>.

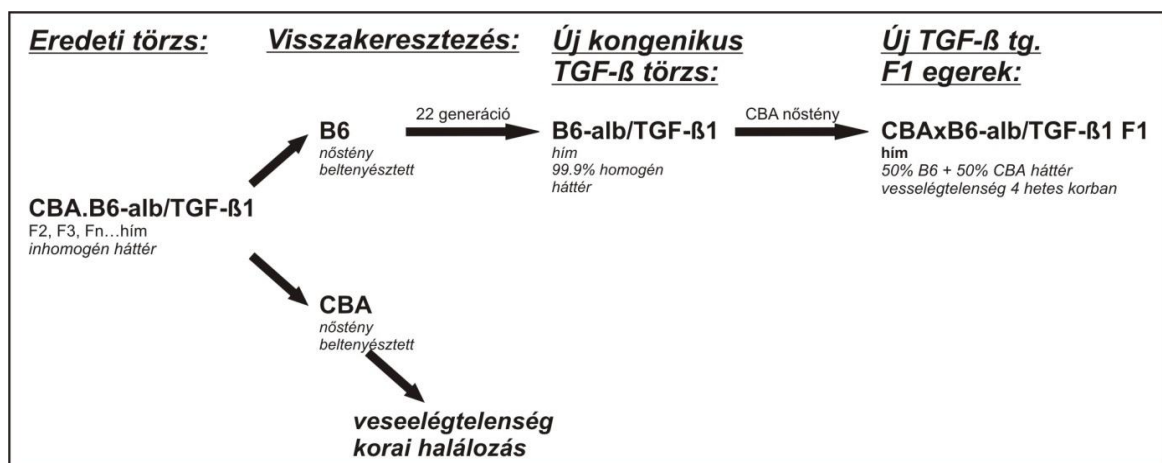
## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 A kongenikus B6-TGF- $\beta$ és a CBAXB6-TGF- $\beta$ F1 transzgenikus egerek összehasonlítása

#### 4.1.1 A kongenikus B6-TGF- $\beta$ transzgenikus egértörzs jellemzése

Annak érdekében, hogy megerősítsük a genetikai háttér szerepét a vesefibrózis progressziójában CBA.B6-Alb/TGF- $\beta_1$  transzgenikus egereket elkezdtek visszakeresztezni a C57Bl6 (B6) és CBA törzsekre, mivel ennek a transzgenikus vonalnak az alapító törzse CBAXB6 F1 hibrid volt.

Az Alb/TGF- $\beta$  transzgén visszakeresztezése CBA egerekre nem sikerült, mivel az összes CBA-TGF $\beta$  F1 egér elpusztult még 6 hetes kor előtt (8. ábra).



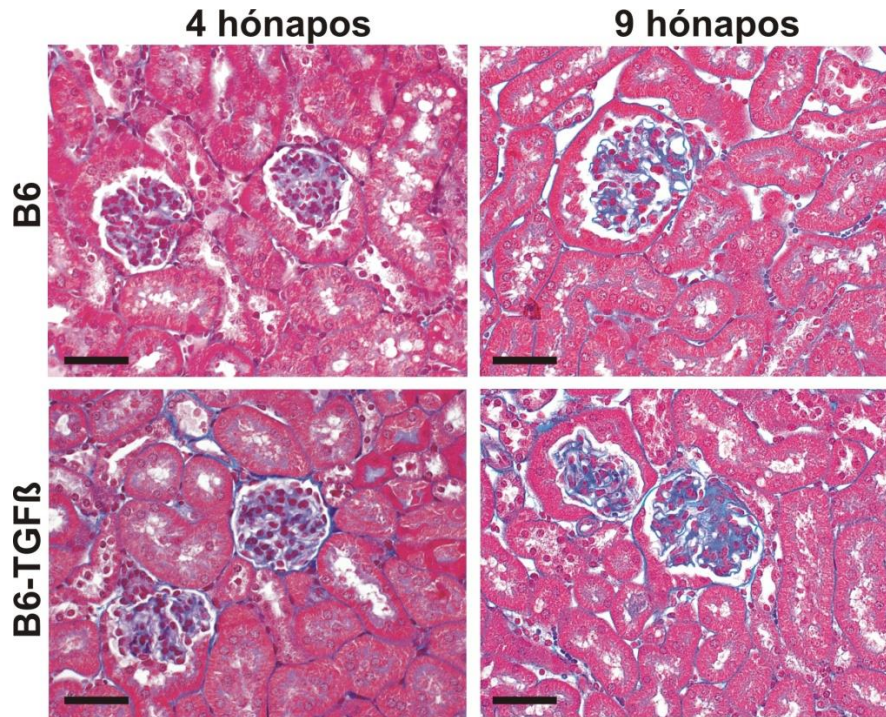
### 8. ábra A genetikai háttér szerepe a vesefibrózis progressziójában

Ezzel szemben az Alb/TGF- $\beta$  transzgén visszakeresztezése a B6 genetikai háttérre 22 nemzedéken keresztül drámai módon megnövelte a túlélést az eredeti transzgenikus törzshez képest, amely 100%-os halálozást mutatott 52 hetes korra. Kísérletünkben a B6-TGF $\beta$  egerek 72%-a élte túl a 15 hetes kort; 39%-a az 52 hetes kort (n=91), szemben a B6 vad típusú kontroll egerek 100%-os túlélésével (n=33, log-rank teszt, p<0,001). Négy és kilenc hónapos korban mértük a plazma TGF- $\beta$  koncentrációt, a test és a szervek tömegét, a fehérjeürítést, továbbá elvégeztük a vesék szövettani elemzését. A plazma TGF- $\beta$  koncentráció kétszer magasabb volt a B6-TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben, összehasonlítva a hasonló korú B6 kontroll egerekkel (3. táblázat).

**3. táblázat.** 4 és 9 hónapos B6-TGF- $\beta$ 1 transzgenikus egerek és a hasonló életkorú B6 kontroll egerek adatainak összehasonlítása (n=8-15/csoport). <sup>a</sup>p<0.05 vs B6 4 hónapos; <sup>b</sup>p<0.05 vs B6 9 hónapos; <sup>c</sup>p<0.05 vs B6-TGF- $\beta$  4 hónapos; <sup>d</sup>p<0.05 vs B6-TGF- $\beta$  9 hónapos. A glomeruloszklerózis indexet (GSI) és a tubulointersticiális károsodás indexet (TDI) Masson trikróm festéssel értékeltük.

	B6		B6-TGF- $\beta$ 1		ANOVA/ Kruskal- Wallis
	4 hónapos	9 hónapos	4 hónapos	9 hónapos	
<b>Testtömeg (g)</b>	28.5±1.7 <sup>bd</sup>	34.6±2.5 <sup>ac</sup>	30.2±2.4 <sup>bd</sup>	35.2±4.7 <sup>ac</sup>	p<0.0005
<b>Vesetömeg/ testtömeg (mg/g)</b>	6.85±1.01	7.30±1.23	7.62±0.88	7.41±1.72	n.s.
<b>Plazma TGF-<math>\beta</math>1 (ng/mL)</b>	1.97±0.62 <sup>c</sup> d	1.79±0.61 <sup>c</sup> d	4.41±1.61 <sup>a</sup> b	4.39±2.23 <sup>a</sup> b	p<0.0005
<b>Proteinuria (fehérje/ kreatinin, g/g)</b>	6.58±2.19	6.83±0.86	6.70±1.52	6.28±2.76	n.s.
<b>GSI (pontszám)</b>	0.12±0.07 <sup>c</sup> d	0.11±0.05 <sup>c</sup> d	1.12±0.65 <sup>a</sup> b	0.77±0.41 <sup>a</sup> b	p<0.0001
<b>TDI (pontszám)</b>	0.23±0.09	0.28±0.18	0.55±0.50	0.44±0.28	n.s.

A B6 és a B6-TGF- $\beta$  egerek testtömege emelkedett az életkorral, ugyanakkor a hasonló korú B6 és B6-TGF- $\beta$  egerek testtömege nem mutatott szignifikáns különbséget (3. táblázat). A normalizált vesesúlyban és a vizelet fehérje/kreatinin hányadosban nem volt különbség az egyes csoportok között. Vese hypertrophiát nem láttunk, azonban enyhe, de szignifikáns glomeruloszklerózist figyeltünk meg a B6-TGF- $\beta$  vesékben 4 és 9 hónapos korban, összehasonlítva a hasonló korú B6 kontrollokkal (3. táblázat, 9. ábra). A B6-TGF- $\beta$  egerekben egyetlen vizsgált életkorban sem figyeltünk meg tubulointersticiális károsodást.



**9. ábra** A B6 és a B6-TGF- $\beta$  egerek veséinek szövettani összehasonlítása 4 és 9 hónapos korban. Vese hypertrophiát nem láttunk, azonban gyenge, de szignifikáns glomeruloszklerózist figyeltünk meg a B6-TGF- $\beta$  vesékben 4 és 9 hónapos korban, összehasonlítva a hasonló korú B6 kontrollokkal. Masson trikróm festés. 400x nagyítás; kalibrációs skála: 50  $\mu$ m.

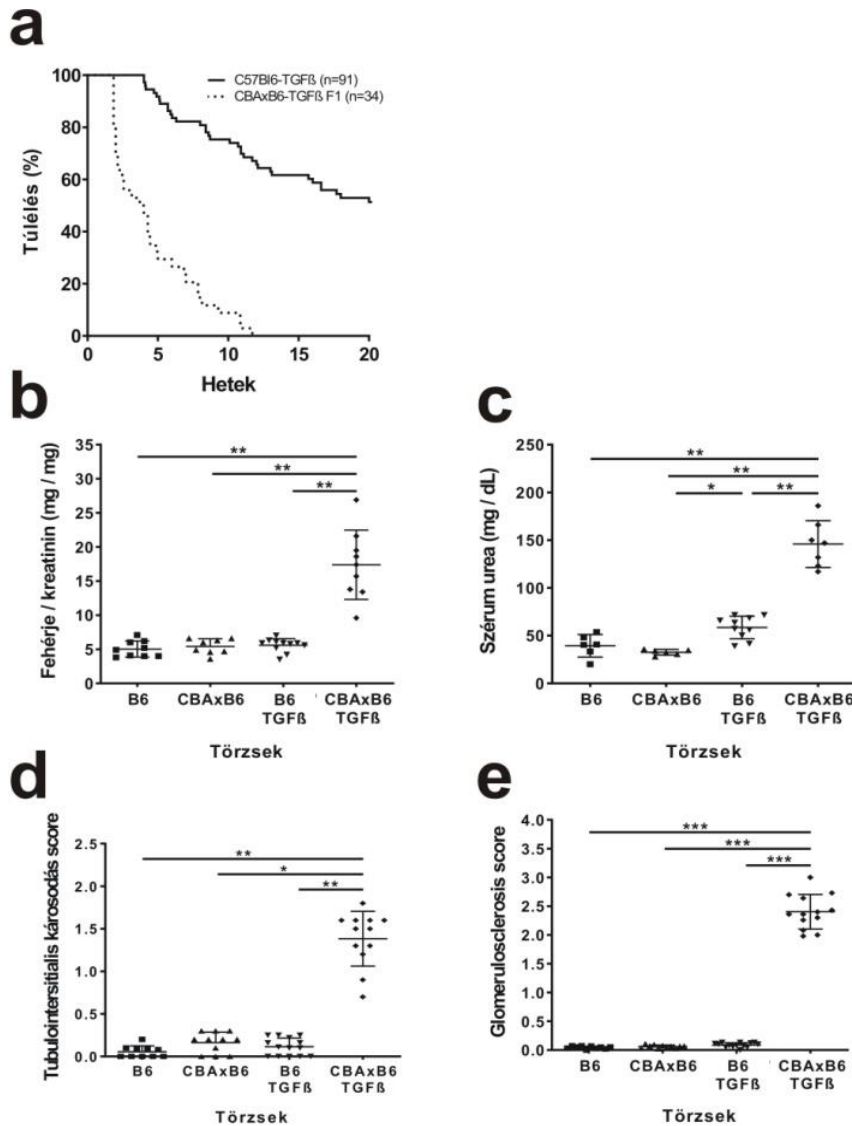
#### **4.1.2 A hasonló plazma TGF- $\beta$ szintek ellenére a CBAXB6-TGF- $\beta$ F1 transzgenikus egerekre szignifikáns proteinuria, valamint rövidebb élethossz jellemző**

A keringő plazma TGF- $\beta$  koncentráció 10-14x magasabb volt a transzgenikus-, mint a vad típusú egerekben (4. táblázat). A transzgenikus egerek és a kontroll egerek testtömege hasonló volt (4. táblázat).

**4. táblázat** A TGF- $\beta$ 1 transzgenikus egerek és a kontroll egerek adatainak összehasonlítása 14 napos korban. <sup>a</sup>p<0.05 vs B6; <sup>b</sup>p<0.05 vs B6-TGF- $\beta$ ; <sup>c</sup>p<0.05 vs CBAxB6 F1; <sup>d</sup>p<0.05 vs CBAxB6-TGF- $\beta$  F1.

	<b>B6 (n=10)</b>	<b>CBAxB6 F1 (n=8)</b>	<b>B6-TGF-<math>\beta</math>1 (n=14)</b>	<b>CBAxB6-TGF-<math>\beta</math>1 F1 (n=15)</b>	ANOVA
<b>Testtömeg (g)</b>	7.25±0.62 <sup>d</sup>	8.45±0.95 <sup>ab</sup>	7.21±0.87 <sup>d</sup>	8.54±1.06 <sup>ab</sup>	p<0.0001
<b>Vesetömeg/ testtömeg (mg/g)</b>	7.60± 1.03 <sup>d</sup>	7.40±0.79 <sup>d</sup>	7.14±0.55 <sup>d</sup>	9.94±1.03 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<b>Plazma TGF-<math>\beta</math>1 (ng/mL)</b>	4.04±2.01 <sup>bd</sup>	3.10±1.76 <sup>bd</sup>	57.61±16.77 <sup>ac</sup>	44.49±19.15 <sup>ac</sup>	p<0.0001

A CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egerek élettartama drámaian lecsökkent, az F1 egerek 60%-a érte el a 2 hetes kort, és az összes egér elpusztult 12 hetes koráig (n=34, p<0.0001, 10. ábra a). Mind a B6-TGF- $\beta$  és a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 törzsekben mért hasonló plazma TGF- $\beta$  szintek ellenére, csak a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egerekben alakult ki szignifikáns proteinuria, amit a magasabb vizelet fehérje/kreatinin arány mutatott (10. ábra b). A vesetömeg és a szérum urea szint is szignifikánsan magasabb volt a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egerekben a B6-TGF- $\beta$  és a kontroll egerekhez képest (4. táblázat, 10. ábra c).

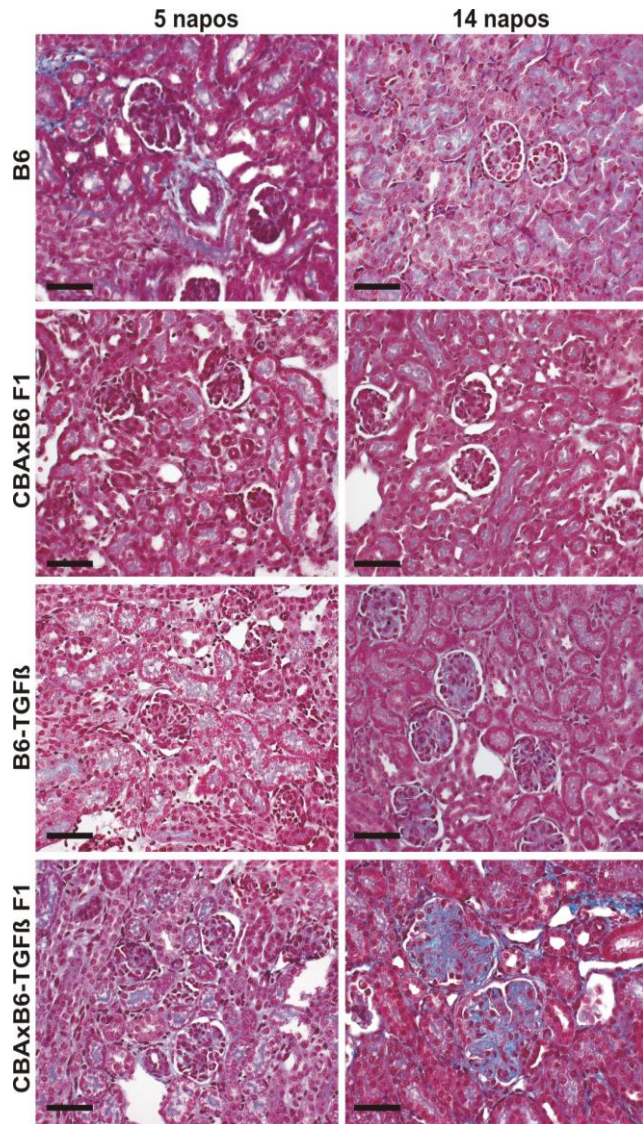


**10. ábra** Túlélés (%), vizelet fehérje/kreatinin arány (mg/mg), szérum urea (mg/dL), tubulointerstitális károsodás- és a glomeruloszklerózis mértéke TGF- $\beta$  transzgenikus- és kontroll egerekben 14 napos korban. A CBAxB6-TGF- $\beta$  egerek élettartama (n=34) (···) drámaian rövidebb volt a B6-TGF- $\beta$  egerekhez képest (n=91) (—) (Kaplan-Meier analízis,  $p < 0.0001$ ) (a). A proteinuria, a szérum urea szint szignifikánsan magasabb volt a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben a B6-TGF- $\beta$  és a kontroll egerekhez képest (b, c). A glomeruloszklerózis (e) és a tubulointerstitális károsodás (d) hisztomorfológiai kiértékelése jelentős vesefibrózist mutatott mezangiális expanszióval a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egerekben, összehasonlítva a B6-TGF- $\beta$  és a kontroll egerekkel. n=7-14/csoport. Kruskal-Wallis teszt, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .



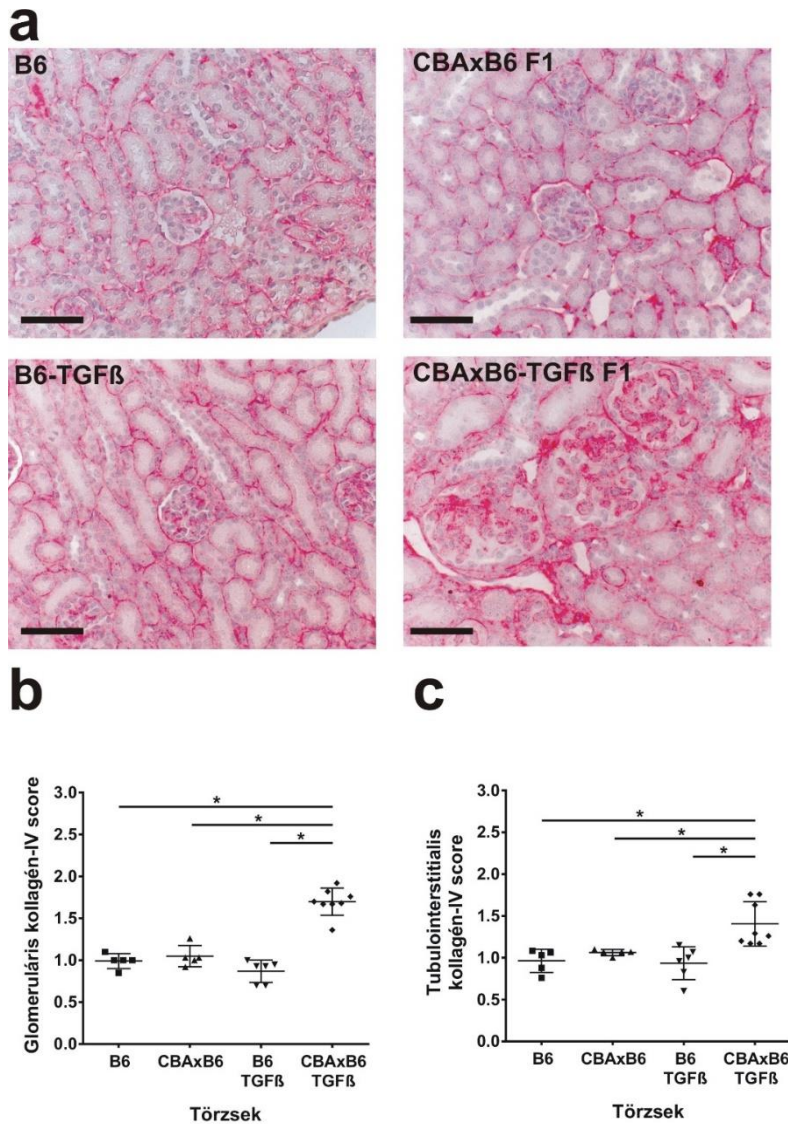
### **4.1.3 TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben törzs függő a vesefibrózis kialakulása és progressziója**

A szövettani vizsgálatokat 5 és 14 napos egerek vese metszetein végeztük. A B6-TGF- $\beta$  egerekben a kontroll egerekhez hasonló normál vese morfológiát láttunk ebben az életkorban. Ezzel szemben nagymértékű glomeruloszklerózis és tubulointersticiális fibrózis alakult ki CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben (11. ábra jobb oldal). A glomerulusok több mint 60%-ban észleltünk glomeruláris hypertrophiát mezangiális expansióval, valamint a kapillárisok pusztulását (11. ábra jobb oldal, 5. táblázat).



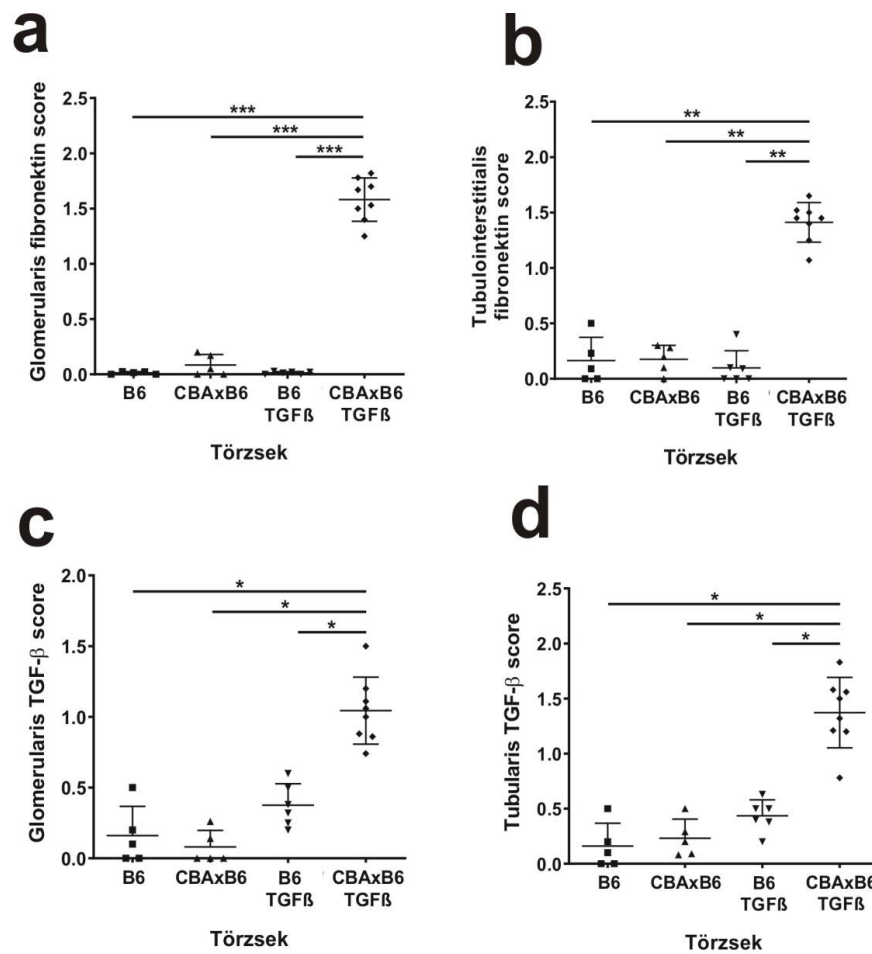
**11. ábra** A vese reprezentatív mikroszkópos képe 5 és 14 napos TGF- $\beta$  transzgenikus és kontroll egerekben. B6-TGF- $\beta$  vesékben nem láttunk szövettani elváltozásokat a kontroll vesékhez képest. A CBAXB6-TGF- $\beta$  F1 vesék néhány glomerulusában enyhe hipertrófiát és szklerózist láttunk 5 napos korban, azonban 14 napos korban súlyos glomeruláris hipertrófiát és szklerózist észleltünk. Masson trikróm festés. 400x nagyítás; skála: 50  $\mu$ m.

A CBAXB6-TGF- $\beta$  egerekben 14 napos életkorban már kialakult enyhe tubulointersticiális fibrózis, valamint proteinuriára utaló tubuláris hyaline is megjelent a metszeteken (11. ábra jobb oldal, 5. táblázat).



**12. ábra A IV-es típusú kollagén immunfestés értékelése 14 napos TGF- $\beta$  transzgenikus és kontroll egerekben.** A IV-es típusú kollagén expresszió mikroszkópos képe fokozott festődést mutatott a CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben, mind a glomerulusban, mind a tubulointerstitiumban (a). (Masson trikróm festés. 400x nagyítás; kalibráció: 50  $\mu$ m.) A IV-es típusú kollagén szignifikánsan magasabb glomeruláris és tubulointerstitiális expresszióját csak a CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben láttuk (b, c). n=7-14/csoport. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05.

A fibronectin (13. ábra a, b), valamint a TGF- $\beta$  fehérje (13. ábra c, d) szignifikánsan emelkedett glomerularis - és tubulointerstitiális expresszióját csak a 14 napos CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben láttuk.



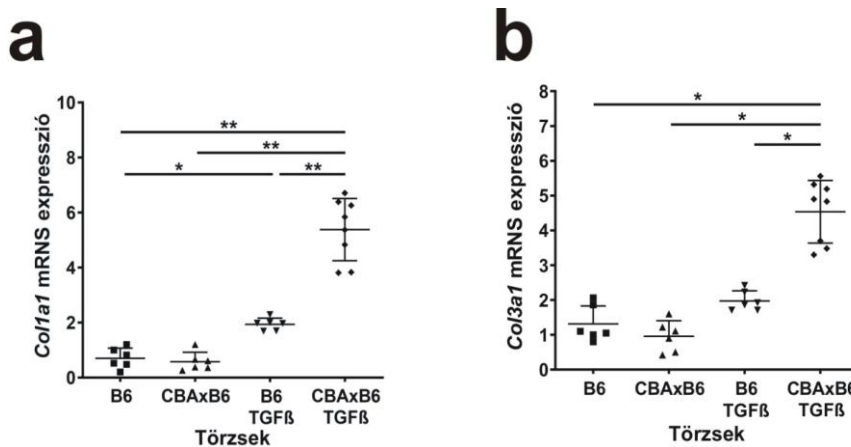
**13. ábra** A fibronektin és a TGF- $\beta$  immunfestés értékelése 14 napos TGF- $\beta$  transzgenikus és kontroll egerekben. A renalis fibronektin (a, b) és TGF- $\beta$  (c, d) immunfestés eredményei is megerősítik a súlyos vesefibrózist CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben.  $n=7-14$ /csoport. Kruskal-Wallis teszt, \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ .

A vesék szövettani értékelését 0 és 5 napos korban is elvégeztük TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben. Újszülött egerekben szövettani elváltozást nem láttunk. Ezzel szemben, a glomerulus mérete és a mezangiális matrix kiterjedése szignifikánsan emelkedett az 5 napos CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben (GSI B6-TGF- $\beta$ :  $0.05\pm 0.01$  vs. CBAxB6-TGF- $\beta$ :  $0.45\pm 0.21$ ,  $p<0.05$ ; 11. ábra, bal oldal).

**5. táblázat. Kontroll és TGF- $\beta$  transzgenikus egerek szövettani értékelése 14 napos korban.** A májfibrózist van Gieson festéssel értékeltük (n=6-10/csoport). A glomeruloszklerózis indexet (GSI) és a tubulointersticiális károsodás indexet (TDI) PAS festéssel értékeltük (n=8-15/csoport). <sup>a</sup>p<0.05 vs B6; <sup>b</sup>p<0.05 vs B6-TGF- $\beta$ ; <sup>c</sup>p<0.05 vs CBAxB6 F1; <sup>d</sup>p<0.05 vs CBAxB6-TGF- $\beta$  F1.

	Máj-fibrózis (%)	Vese szövettan (Trikróm)	
		GSI	TDI
<b>B6</b>	0.04±0.09 <sup>bd</sup>	0.05±0.02 <sup>d</sup>	0.0±0.4 <sup>d</sup>
<b>CBAxB6 F1</b>	0.01±0.02 <sup>bd</sup>	0.06±0.02 <sup>d</sup>	0.1±0.09 <sup>d</sup>
<b>B6-TGF-<math>\beta</math></b>	0.82±0.40 <sup>ac</sup>	0.09±0.04 <sup>d</sup>	0.1±0.10 <sup>d</sup>
<b>CBAxB6-TGF-<math>\beta</math> F1</b>	0.65±0.25 <sup>ac</sup>	2.32 ±0.35 <sup>abc</sup>	1.1±0.55 <sup>abc</sup>

A génexpresszió értékelésekor 14 napos életkorban az I-es típusú kollagén (*Col1a1*) és a III-as típusú kollagén (*Col3a1*) mRNA expressziója enyhén emelkedett a B6-TGF- $\beta$  vesékben a kontroll egerekhez képest, míg a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 hibrid egerekben szignifikáns, négyszeres, ötszörös emelkedést láttunk (14. ábra a, b).



**14. ábra A *Col1a1* (a) és a *Col3a1* (b) renalis mRNA expressziója 14 napos kontroll és TGF- $\beta$  transzgenikus egér törzsekben.** A *Col1a1* és *Col3a1* mRNA expressziója enyhén emelkedett a B6-TGF- $\beta$  vesékben a kontroll egerekhez képest, míg a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 hibrid egerekben szignifikáns emelkedést láttunk. n=7-14/ csoport. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Ezzel párhuzamosan emelkedett a vesék *Tgfb1* és a *Ctgf* mRNS expressziója a CBAXB6-TGF- $\beta$  F1 egerekben (6. táblázat), amelyet a TGF- $\beta$  természetes inhibitorainak, a biglycan és decorin expresszió emelkedése kísért (6. táblázat). Az MMP-2 expressziója hasonló volt mind a vad típusú, mind a transzgenikus vesékben (6. táblázat). A TGF $\beta$ RII, a vizsgált Smad molekulák (Smad2, 3, 4, 6, 7) expressziójában (6. táblázat), illetve a Smad3 foszforilációban (15. ábra) jelentős változás nem történt 14 napos életkorban. Érdekes módon az MMP-9 szintek a B6 és a B6-TGF- $\beta$  vesékben hasonlóak voltak, míg a CBAXB6 és a CBAXB6-TGF- $\beta$  vesékben az MMP-9 három-négyszeres expresszió fokozódását láttuk (6. táblázat).

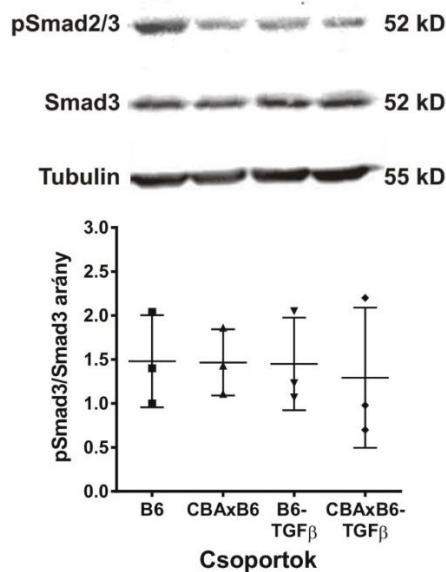
**6. táblázat. A TGF- $\beta$ 1 transzgenikus egerek és a kontroll egerek renalis mRNS expressziójának értékei 14 napos korban.** Az egyes gének expresszióját 18S RNS-re normalizáltuk a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  képlet alkalmazásával. <sup>a</sup>p<0.05 vs B6; <sup>b</sup>p<0.05 vs B6-TGF- $\beta$ ; <sup>c</sup>p<0.05 vs CBAxB6 F1; <sup>d</sup>p<0.05 vs CBAxB6-TGF- $\beta$  F1

Gén jelölése	B6 (n=5)	CBAxB6 F1 (n=5)	B6-TGF- $\beta$ (n=7)	CBAxB6-TGF- $\beta$ F1 (n=7)	Kruskal-Wallis teszt
<i>Tgfb1</i>	1.14 $\pm$ 0.20	1.16 $\pm$ 0.13	0.92 $\pm$ 0.20	1.83 $\pm$ 0.48 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<i>Ctgf</i>	0.68 $\pm$ 0.13	0.52 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.05	1.80 $\pm$ 0.87 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<i>Bgn</i>	0.82 $\pm$ 0.27	0.32 $\pm$ 0.04	0.89 $\pm$ 0.19	1.58 $\pm$ 0.41 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<i>Dcn</i>	0.96 $\pm$ 0.21	0.39 $\pm$ 0.15	1.16 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	1.96 $\pm$ 0.45 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<i>Mmp2</i>	1.17 $\pm$ 0.34	0.52 $\pm$ 0.27	1.05 $\pm$ 0.18	0.99 $\pm$ 0.28	n.s.
<i>Mmp9</i>	1.08 $\pm$ 0.32	3.44 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	0.89 $\pm$ 0.34 <sup>c</sup>	4.03 $\pm$ 1.52 <sup>ab</sup>	p<0.0001
<i>Timp1</i>	0.92 $\pm$ 0.53	0.49 $\pm$ 0.27	1.49 $\pm$ 0.68	101.81 $\pm$ 26.70 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<i>Timp2</i>	0.89 $\pm$ 0.18	0.58 $\pm$ 0.06	0.88 $\pm$ 0.08	1.29 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	p<0.05
<i>Timp3</i>	0.75 $\pm$ 0.16	0.93 $\pm$ 0.11	0.87 $\pm$ 0.05	0.93 $\pm$ 0.21	n.s.
<i>Tgbr2</i>	0.90 $\pm$ 0.12	0.82 $\pm$ 0.14	0.93 $\pm$ 0.31	1.04 $\pm$ 0.15	n.s.
<i>Smad2</i>	0.66 $\pm$ 0.23	0.56 $\pm$ 0.07	0.57 $\pm$ 0.09	0.75 $\pm$ 0.17	n.s.
<i>Smad3</i>	0.94 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.21	0.80 $\pm$ 0.13	0.99 $\pm$ 0.20	n.s.
<i>Smad4</i>	1.42 $\pm$ 0.39	1.20 $\pm$ 0.37	1.37 $\pm$ 0.16	1.29 $\pm$ 0.34	n.s.
<i>Smad6</i>	1.93 $\pm$ 0.90	2.16 $\pm$ 0.36	1.83 $\pm$ 0.74	2.13 $\pm$ 1.15	n.s.
<i>Smad7</i>	1.02 $\pm$ 0.10	0.76 $\pm$ 0.13	0.88 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.15	n.s.

A *Timp2* mRNS expressziója hasonló volt a kontroll és a B6-TGF- $\beta$  vesékben, ugyanakkor a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben emelkedést mutatott (6. táblázat).

A *Timp3* mRNS szintje nem mutatott különbséget az egyes csoportok között (6. táblázat).

A *Timp1* mRNS expressziója százszorososan emelkedett a CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben a B6-TGF- $\beta$  és a kontroll egerekben észlelt expresszióhoz képest (6. táblázat, 16. ábra a).



### 15. ábra Smad3 foszforiláció 14 napos kontroll és TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben.

A Smad3 foszforilációban nem volt különbség az egyes csoportok között.  $n=7-14$ /csoport, Kruskal-Wallis teszt.

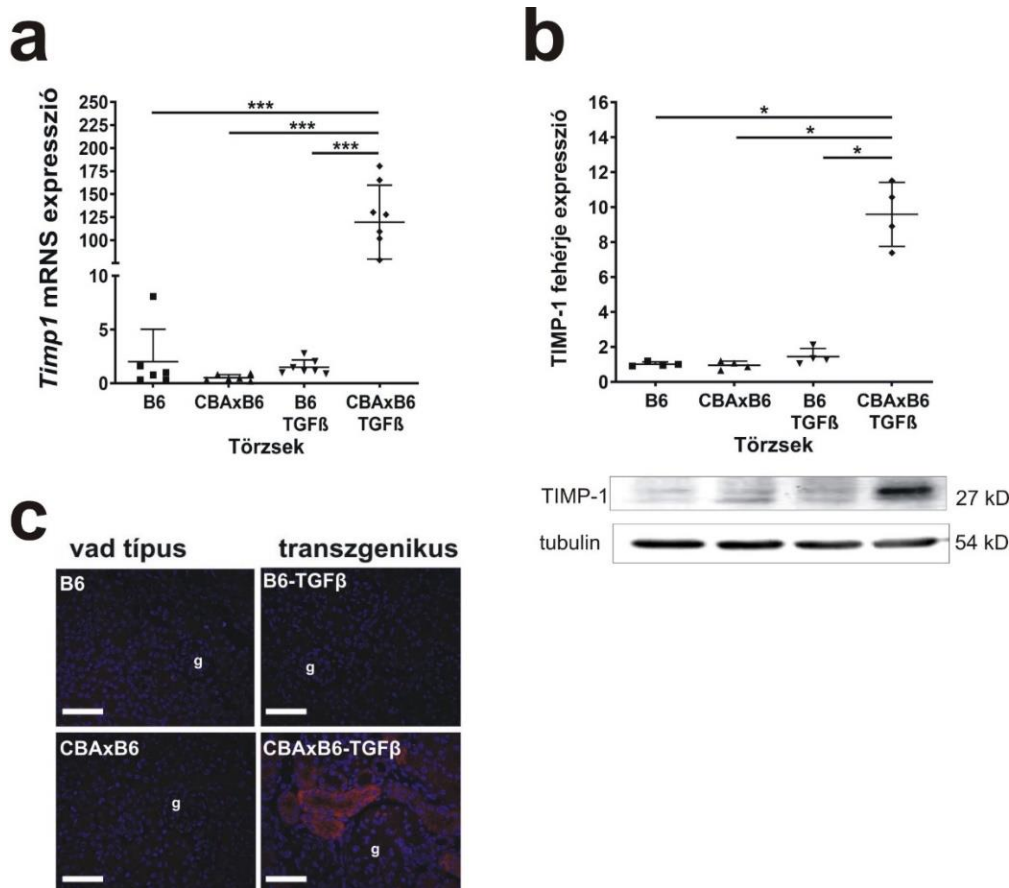
A transzgenikus egerek 5 napos életkorában az *Egr2* és a *Timp1* mRNS expressziója szignifikánsan magasabb volt (a *Timp1* mRNS expressziója 50%-kal) a CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben, mint a B6-TGF- $\beta$  egerekben (7. táblázat). Ugyanakkor a *Tgfb1* mRNS emelkedett renalis expresszióját nem kísérte fokozott kollagén termelődés (7. táblázat). A *Ctgf* mRNS expressziója hasonló volt a kontroll és a B6-TGF- $\beta$  vesékben, a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben enyhe emelkedést mutatott (7. táblázat).



**7. táblázat A TGF- $\beta$ 1 transzgenikus egerek és a kontroll egerek renalis mRNS expressziójának értékei 5 napos korban.** Az egyes gének expresszióját 18S RNS-re normalizáltuk a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  képlet alkalmazásával. <sup>a</sup>p<0.05 vs B6; <sup>b</sup>p<0.05 vs B6-TGF- $\beta$ ; <sup>c</sup>p<0.05 vs CBAxB6 F1; <sup>d</sup>p<0.05 vs CBAxB6-TGF- $\beta$  F1

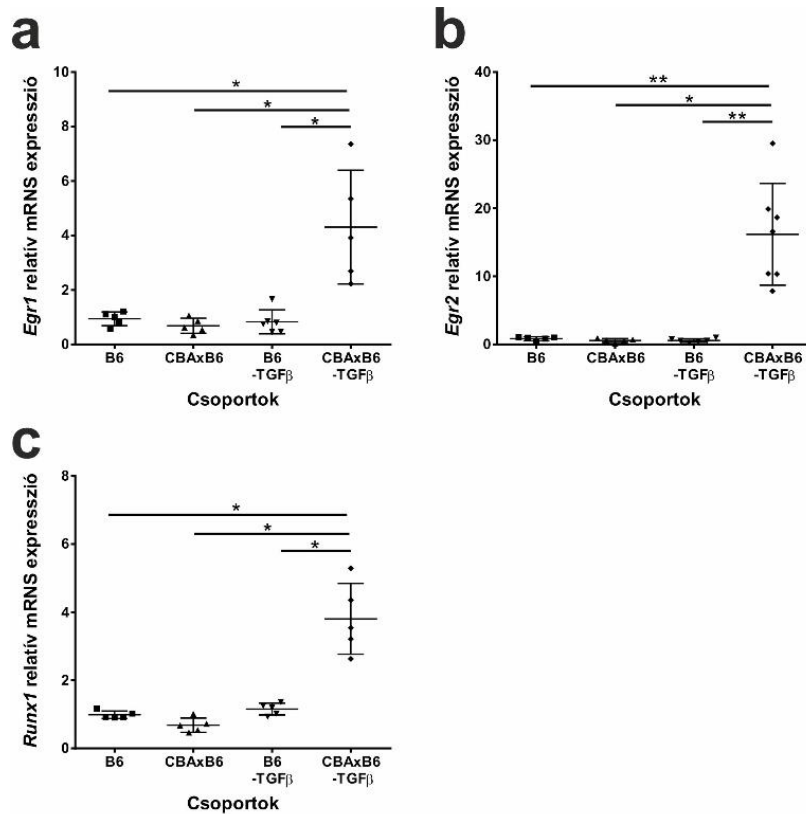
Vizsgált gén	B6 (n=4)	CBAxB6 F1 (n=4)	B6-TGF- $\beta$ 1 (n=6)	CBAxB6-TGF- $\beta$ 1 F1 (n=6)	Kruskal-Wallis teszt
TGF- $\beta$ 1 (1.5x)	0.96 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>	0.91 $\pm$ 0.05 <sup>d</sup>	0.84 $\pm$ 0.15 <sup>d</sup>	1.31 $\pm$ 0.25 <sup>abc</sup>	p<0.01
CTGF	0.21 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.05	0.31 $\pm$ 0.20	n.s.
I-es típusú kollagén	2.02 $\pm$ 0.45	1.68 $\pm$ 0.53	2.90 $\pm$ 0.90	2.86 $\pm$ 0.44	n.s.
III-as típusú kollagén	2.26 $\pm$ 0.60	1.68 $\pm$ 0.21	2.43 $\pm$ 1.14	2.75 $\pm$ 0.52	n.s.
MMP2	1.35 $\pm$ 0.16 <sup>d</sup>	1.18 $\pm$ 0.19 <sup>d</sup>	1.33 $\pm$ 0.27 <sup>d</sup>	1.95 $\pm$ 0.48 <sup>abc</sup>	p<0.001
MMP9	0.97 $\pm$ 0.31	0.92 $\pm$ 0.21	0.79 $\pm$ 0.41	0.92 $\pm$ 0.24	n.s.
TIMP-1 (1.5x)	2.69 $\pm$ 0.70 <sup>d</sup>	2.95 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>	2.73 $\pm$ 0.72 <sup>d</sup>	4.17 $\pm$ 0.79 <sup>abc</sup>	p<0.001

Az immunoblot vizsgálatban tízszer magasabb TIMP-1 fehérje expressziót találtunk (16. ábra b) CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben a B6-TGF- $\beta$  és a kontroll egerekben mért expressziókhöz képest 14 napos korban, ami immunfestéssel főleg a tubulusokra lokalizálódott (16. ábra c).



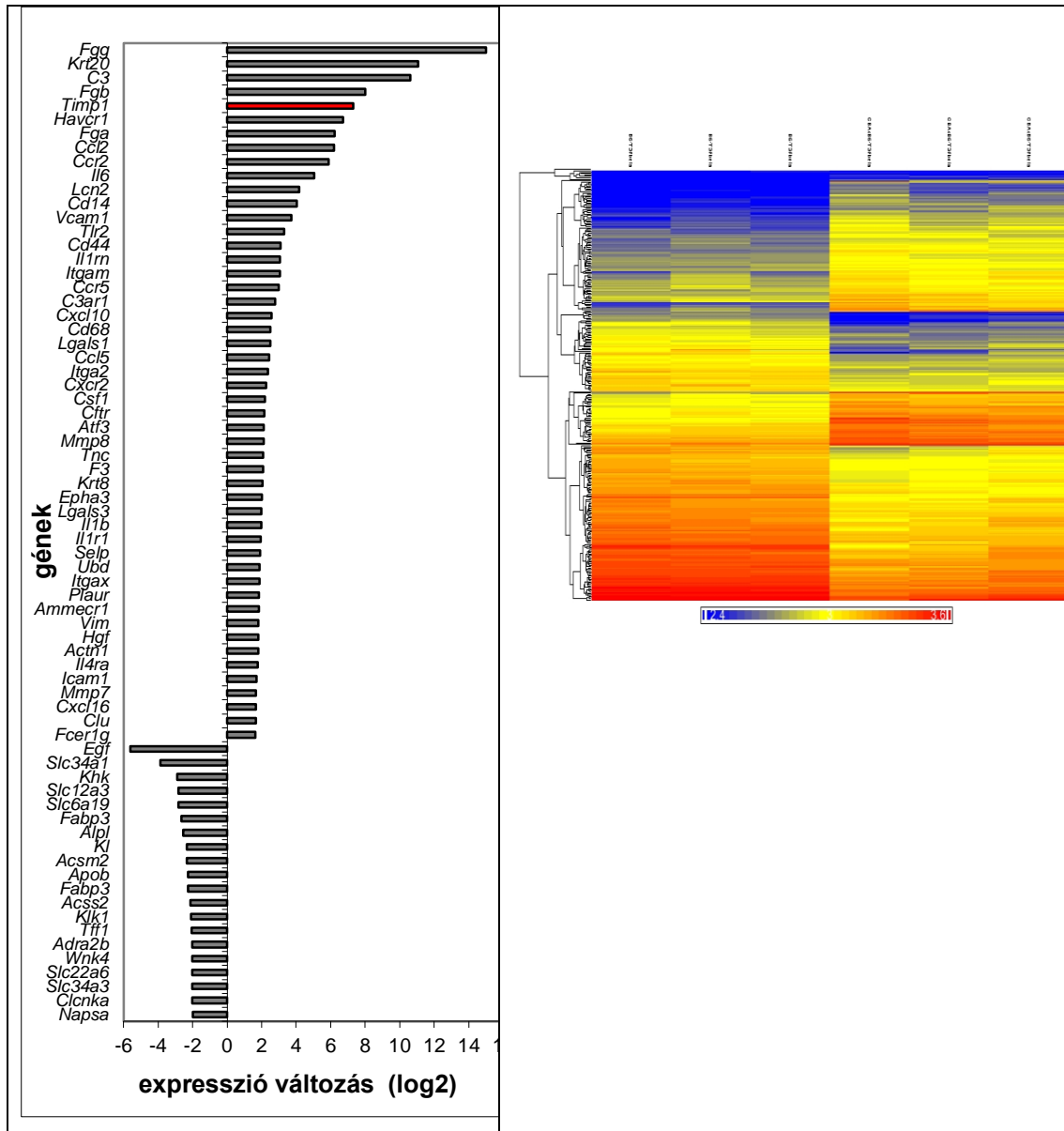
**16. ábra** A *Timp1* mRNS és TIMP-1 fehérje renalis expressziója (a, b), illetve a TIMP-1 immunfluoreszcencia értékelése (c) 14 napos kontroll és TGF- $\beta$  transzgenikus egér törzsekben. A *Timp1* mRNS expressziója százszorososan emelkedett a CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben a B6-TGF- $\beta$  és a kontroll egerekben mért expressziókhöz képest. A TIMP-1 immunoblot vizsgálat (n=5/csoport) tízszeres növekedést mutatott CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben, amely immunfestéssel főként a tubulusokra lokalizálódott (b, c). 400x nagyítás, skála: 50  $\mu$ m, g: glomerulus. n=7-14/ csoport. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

Az *Egr1* mRNS expresszió szignifikánsan emelkedett a 14 napos CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben a kontroll egerekhez képest, azonban a B6-TGF- $\beta$  egerekben expressziója alacsony maradt (17 a ábra). Az *Egr2* mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben, de hasonló volt a B6-TGF- $\beta$  és a kontroll egerekben (17 b ábra). A *Runx1* mRNS expresszió szignifikánsan emelkedett a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben a kontroll egerekhez képest, azonban a B6-TGF- $\beta$  egerekben a kontrollhoz hasonló volt (17 c ábra).



**17. ábra** *Egr1*, *Egr2*, *Runx1* mRNS expresszió 14 napos kontroll és TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben. Az *Egr1* és az *Egr2* mRNS expresszió szignifikánsan emelkedett a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben a kontroll és a B6-TGF- $\beta$  egerekhez képest (a, b, c). n=7-14/ csoport. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05, \*\* p<0.01.

Annak kiderítésére, hogy mely egyéb, vesebetegségekkel kapcsolatos gének változásai lehetnek felelősek a fent említett fenotípusért, cDNS Chip (microarray) vizsgálatokat végeztünk B6-TGF- $\beta$  és CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben. A microarray 311 gén szignifikáns változását jelezte az XX csoportban a YY csoporthoz képest (18. ábra, 8-9. táblázat), és megerősítette, hogy a mátrix átépüléssel kapcsolatos gének közül a TIMP-1 gén túltermelődése bizonyult az egyik legmagasabbnak.



**18. ábra** Génexpresszió mintázat a 14 napos CBAxB6-TGF- $\beta$  és a B6-TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben. Az adatok a cDNS chip eredményeiből származnak az adatok szűrését követően (Thomson Reuters Metacore; *Timp1* pirossal jelölve). A 311 gén szignifikáns expresszió-változásának hőterképe CBAxB6-TGF- $\beta$ , B6-TGF- $\beta$  transzgenikus egerek veséiben (jobb oldalon) ( $> 2x$  ( $\log_2$ ) expresszió változások; kék downreguláció, piros upreguláció).

Csoportonként három állat veséit értékeltük microarray módszerrel. A kiválasztott gének qPCR validálásához csoportonként 8 mintát használtunk. FC: szignifikáns ( $p < 0.05$ ) expresszió változás (lineáris skálán) a CBAxB6-TGF- $\beta$  vs B6-TGF- $\beta$  csoportok között.

**8. táblázat** A microarray adatokból kiválasztott gének qPCR validálása

Gén elnevezése	Gén jelölése	Entrez Gene ID	FC array	p érték array	FC qPCR	p érték qPCR
matrix metalloproteináz szöveti inhibitor 1	<i>Timp1</i>	NM_001044384	159.8	0.0004	92.4	p<0.001
III-as típusú kollagén alpha 1	<i>Col3a1</i>	NM_009930	2.9	0.0055	2.3	p<0.001
I-es típusú kollagén alpha 2	<i>Col1a2</i>	NM_007743	2.7	0.0401	2.8	p<0.001
transzformáló növekedési faktor beta 1	<i>Tgfb1</i>	NM_011577	2.6	0.0152	1.6	p<0.01
Decorin	<i>Dcn</i>	NM_007833	2.3	0.0192	1.7	p<0.01
matrix metalloproteináz 9	<i>Mmp9</i>	NM_013599	2.2	0.0209	3.4	p<0.01

Ezen felül 27 transzkripciós faktor expressziója mutatott szignifikáns változást, amelyek közül 6 faktor legalább 2x-es (log2) eltérést mutatott (9. táblázat). Közülük az EGR2 expressziója 35x emelkedést mutatott a CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben a B6-TGF- $\beta$  egerekhez képest, amelyről korábban már leírták, hogy szerepet játszik bőr- és tüdőfibrózisban<sup>283, 284</sup>.

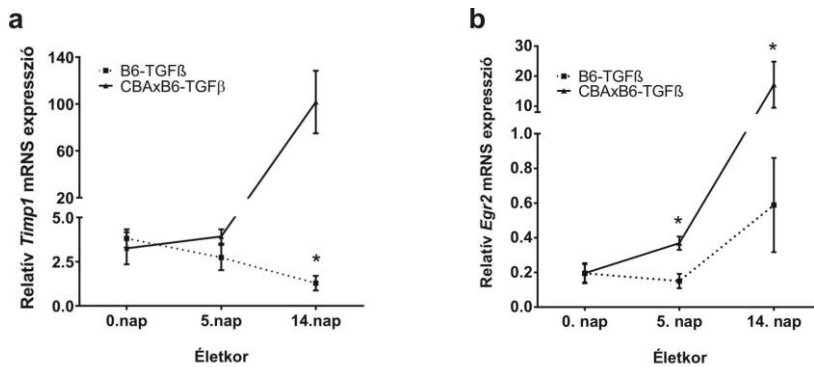
**9. táblázat** A microarray transzkripció faktorok qPCR validálása

Gén neve	Gén jelölése	Entrez ID	FC array	p érték array	FC qPCR	p érték qPCR
early growth response protein 2	<i>Egr2</i>	NM_010118	35.2	0.0041	27.5	p<0.001
runt related transcription factor 1	<i>Runx1</i>	NM_0011111023	6.9	0.0038	4.4	p<0.01
early growth response protein 1	<i>Egr1</i>	NM_007913	2.9 (n.s.)	0.0920	4.5	p<0.01
cAMP response element binding protein 5	<i>Creb5</i>	NM_172728	3.5	0.0060	2.1	p<0.05
signal transducer and activator of transcription 3	<i>Stat3</i>	NM_213659	2.9	0.0243	2.6	p<0.01
AP-1 transcription factor subunit	<i>Fos</i>	NM_010234	2.5 (n.s.)	0.1429	2.7	p<0.05

#### 4.1.4 Az EGR2 és a TIMP-1 fokozott expressziója megelőzi a manifeszt fibrózist TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben

Mivel a szövettani vizsgálat végstádiumú glomeruloszklerózishoz közeli állapotot mutatott a CBAXB6-TGF- $\beta$  (F1) vesékben 14 napos életkorban, az mRNS expresszió szintje inkább a mátrix akkumulációjának terminális állapotát tükrözte, mint a fibrózis elindításában szereplő folyamatot. Ezért az mRNS expressziós szinteket megvizsgáltuk 5 napos életkorban is, amikor a transzgenikus egerek veséiben még nem láttunk jelentős mátrix felhalmozódást (11. ábra bal oldal). A TGF $\beta$  mRNS renalis expressziója szignifikánsan magasabb volt az 5 napos CBAXB6-TGF- $\beta$  egerekben, mint a B6-TGF- $\beta$

vagy a kontroll egerekben (11. táblázat), ugyanakkor ebben az életkorban a *Ctgf*, a *Coll1a1*, *Col3a1* mRNS expressziója hasonló volt minden csoportban (11. táblázat).



**20. ábra** Az *Egr2* és a *Timp1* mRNS expressziójának kinetikája 0 és 14 napos életkor között. A 0 napos B6-TGF- $\beta$  és CBAxB6-TGF- $\beta$  egerek veséiben közel azonos volt a *Timp1*, *Egr2* mRNS expresszió. A B6-TGF- $\beta$  és a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 transzgenikus egerek posztpartum renalis *Timp1*, *Egr2* mRNS expresszió szintjének (a) kinetikája 0 (n=3/csoport), 5 (n=5/csoport) és 14 napos (n=6/csoport) korban csak a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egerekben mutatott korai expresszió fokozódást. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

A *Timp1* mRNS expressziója ebben az életkorban 50%-kal magasabb volt a CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben, mint a B6-TGF- $\beta$  és kontroll vesékben (11. táblázat), és emelkedett az *Egr2* mRNS expresszió is (11. táblázat). Ezzel szemben az újszülött B6-TGF- $\beta$  és a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerek veséiben azonos volt a *Timp1* mRNS (B6-TGF- $\beta$ : 3.82 $\pm$ 0.52 vs. CBAxB6-TGF- $\beta$ : 3.26 $\pm$ 0.91) és az *Egr2* mRNS expressziója (20. ábra).

**11. táblázat** A vesefibrózissal kapcsolatos gének mRNS expressziójának értékei 5 napos TGF- $\beta$  transzgenikus és kontroll egerekben. A *Timp1* és az *Egr2* expressziója már megemelkedett ebben a korai életkorban a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben. <sup>a</sup>p<0.05 vs B6; <sup>b</sup>p<0.05 vs B6-TGF- $\beta$ ; <sup>c</sup>p<0.05 vs CBAxB6 F1.

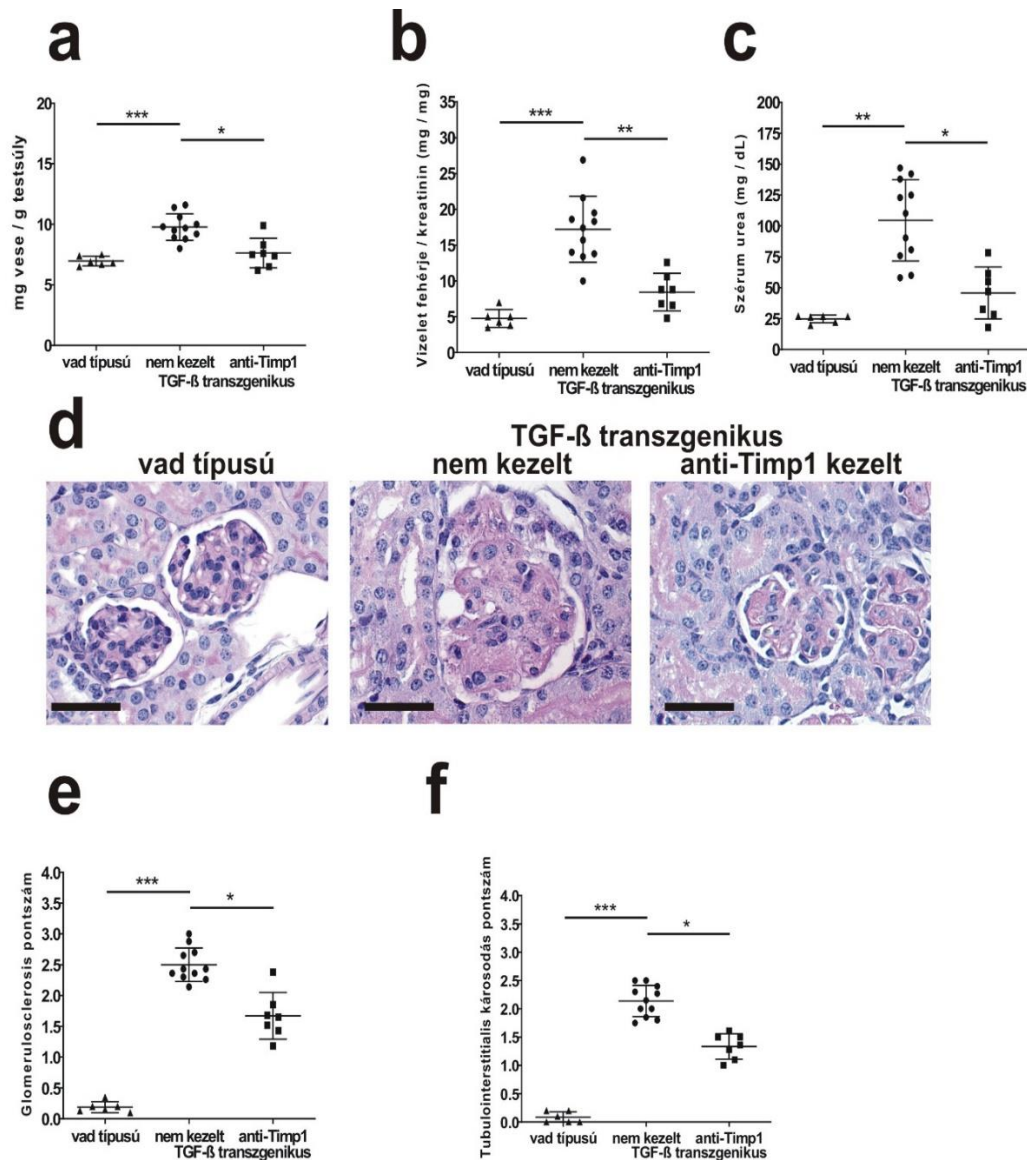
Gén jelölés	B6 (n=4)	CBAxB6 F1 (n=4)	B6-TGF- $\beta$ (n=6)	CBAxB6- TGF- $\beta$ F1 (n=6)	Kruskal- Wallis teszt
<i>Tgfb1</i>	0.96±0.19	0.91±0.05	0.84±0.15	1.31±0.25 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<i>Ctgf</i>	0.22±0.07	0.22±0.05	0.23±0.04	0.32±0.21	n.s.
<i>Colla</i>	2.22±0.59	1.68±.53	2.92±1.02	2.86±0.44	n.s.
<i>Col3a1</i>	2.27±0.61	1.84±0.12	2.43±1.14	2.75±0.53	n.s.
<i>Mmp2</i>	1.35±0.16	1.18±0.19	1.33±0.28	2.06±0.50 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<i>Mmp9</i>	1.11±0.39	0.92±0.21	1.07±0.72	1.23±0.72	n.s.
<i>Timp1</i>	2.69± 0.71	2.95±0.67	2.74±0.72	4.17±0.80 <sup>abc</sup>	p<0.0001
<i>Egr2</i>	0.19± 0.05	0.18±0.06	0.18±0.05	0.42±0.08 <sup>abc</sup>	p<0.001

Az *Egr2* és a *Timp1* mRNS expressziójának kinetikája 0 és 14 napos életkor között felveti az EGR2 és a TIMP-1 központi szerepét a vesefibrózis patofiziológiai folyamataiban, ebben a modellben.



#### **4.1.5 A TIMP-1 neutralizáció csökkentette a vesefibrózist CBAxB6-TGF- $\beta$ F1 transzgenikus egerekben**

Mivel előző eredményeink a TIMP-1 központi szerepére utaltak TGF- $\beta$  indukált vesefibrózisban, ezért 8 napos CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egereket 5 egymást követő napon kezeltünk intraperitonealisan TIMP-1 neutralizáló antitesttel, majd 14 napos életkorban került sor a vesék vizsgálatára. A korai szisztémás TIMP-1 gátlás hatására 20%-kal csökkent a vesék tömege a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 vesékben az IgG-vel kezelt alomtársakhoz képest (21. ábra a). A proteinuria (21. ábra b) és a szérum urea koncentráció (21. ábra c) 50%-kal csökkentek. Az anti-TIMP-1-el kezelt egerekben enyhébb volt a glomeruláris és a tubuláris károsodás, mint az IgG-vel kezelt alomtársakban (21. ábra d), ami alátámasztja a TIMP-1 szignifikáns szerepét ebben a modellben.



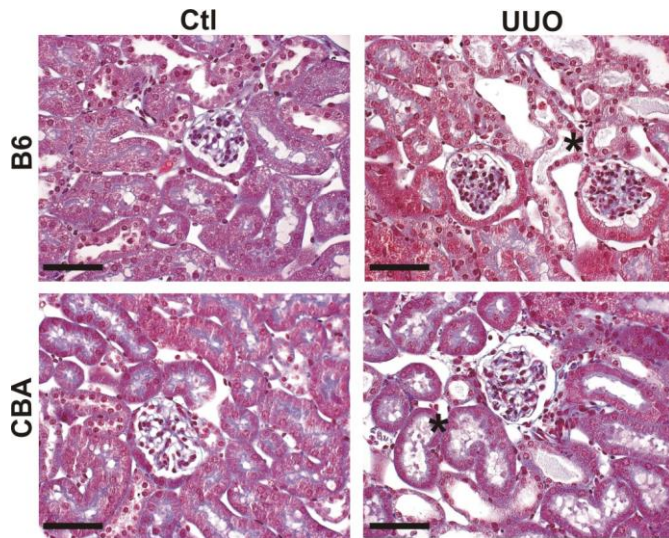
## 21. ábra TIMP-1 neutralizáció hatása CBAXB6-TGF-β F1 transzgenikus egerekben.

A TIMP-1 gátlás hatására 20 %-kal csökkent a vesék tömege a CBAXB6-TGF-β F1 vesékben az IgG-vel kezelt alomtársakhoz képest (a). A proteinuria (b) és a szérum urea koncentráció (c) 50%-kal csökkent. Az anti-TIMP-1-el kezelt egerekben enyhébb volt a glomeruláris és a tubuláris károsodás, mint az IgG-vel kezelt alomtársakban (d, e, f). Kísérleti csoportok: CBAXB6 F1 (vad típusú, n=5), IgG kezelt CBAXB6-TGF-β F1 (nem kezelt TGF-β transzgenikus, n=12) és anti-TIMP-1 kezelt CBAXB6-TGF-β F1 egerek (anti-Timp1 TGF-β transzgenikus, n=7). \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 (Kruskal-Wallis teszt és ANOVA). (Masson trikróm festés, 400x nagyítás; skála: 50 μm.)

A vizelet fehérje/kreatinin hányados jelentősen alacsonyabb volt a TGF- $\beta$  anti-TIMP-1 csoportban a TGF- $\beta$  csoporthoz képest (21. ábra b). A kontroll csoportban minimálisan volt alacsonyabb a hányados a TGF- $\beta$  anti-TIMP-1 csoporthoz képest (21. ábra b). A szérumban urea szint szignifikánsan csökkent a TGF- $\beta$  anti-TIMP-1 csoportban, összehasonlítva a TGF- $\beta$  csoporttal (21. ábra c). TIMP-1 antitest hatására mérséklődött a glomeruloszklerózis (21. ábra d, e) és a tubulointersticiális fibrózis (21. ábra d, f), összehasonlítva az IgG kezelt CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egerekkel. Összegezve eredményeinket a TIMP-1 gátlás a proteinuria, a szérumban kreatinin és urea szint, valamint a glomeruloszklerózis csökkenéséhez vezetett a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben. Előzetes eredményeink azt bizonyítják, hogy a TIMP-1 neutralizációs antitesttel történő gátlása jelentősen enyhítette a TGF- $\beta$ -val indukált vesefibrózist a transzgenikus egérmodellünkben.

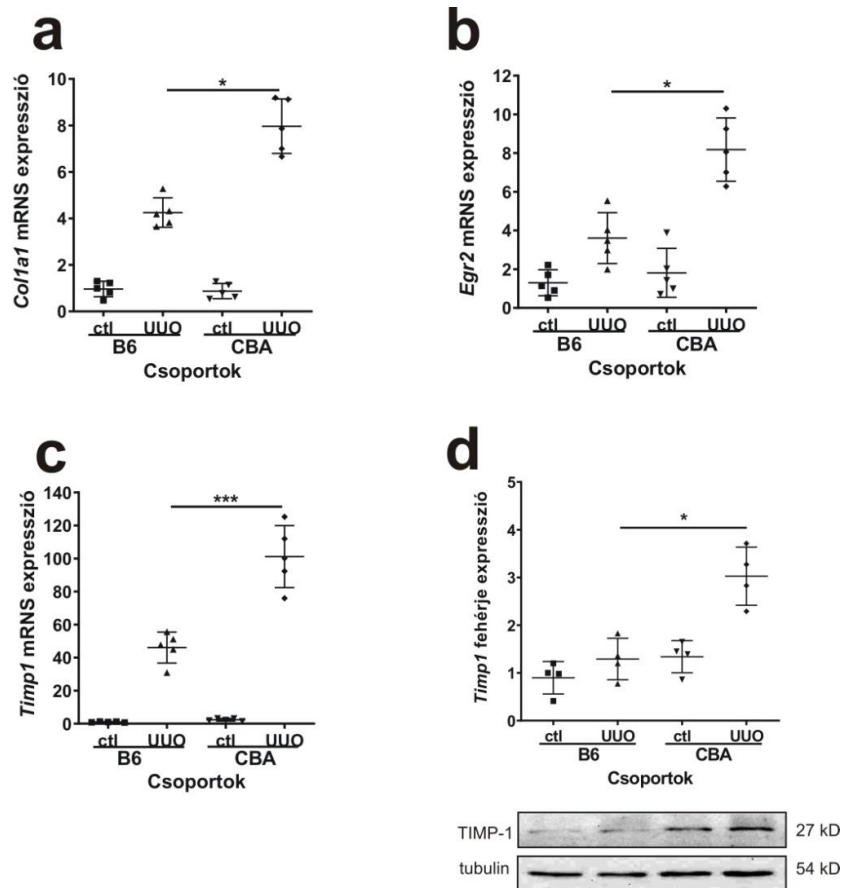
#### **4.1.6 Az EGR2 és a TIMP-1 korai fokozott expressziója összefüggést mutat az UUO és az SNX utáni vesefibrózis progresszióval**

Annak eldöntésére, hogy a vesefibrózis törzsfüggő korai kialakulása összefügg-e az EGR2 és a TIMP-1 fokozott expressziójával más fibrózis modellekben, B6 és CBA egereket vizsgáltunk UUO és SNX után. A szövettanilag igazolható vesefibrózis általában az UUO utáni 3-5. napon alakul ki<sup>359</sup>. Kísérletünkben először fiatal B6 és CBA hím egerek veséit vizsgáltuk 24 órával az UUO után. A lekötetést követően mind a B6, mind a CBA egerekben megemelkedett a vizsgált transzkripciós faktorok mennyisége, azonban a CBA egereknél már a kontroll mintákban is magasabb szinteket láttunk, és a műtét után is jóval nagyobb mértékű mRNS expresszió növekedés következett be. A vesék szövettani vizsgálata során csak néhány dilatált tubulust észleltünk, egyebekben normál vese szerkezetet láttunk és a mátrix akkumulációnak sem láttuk jelét (22. ábra).



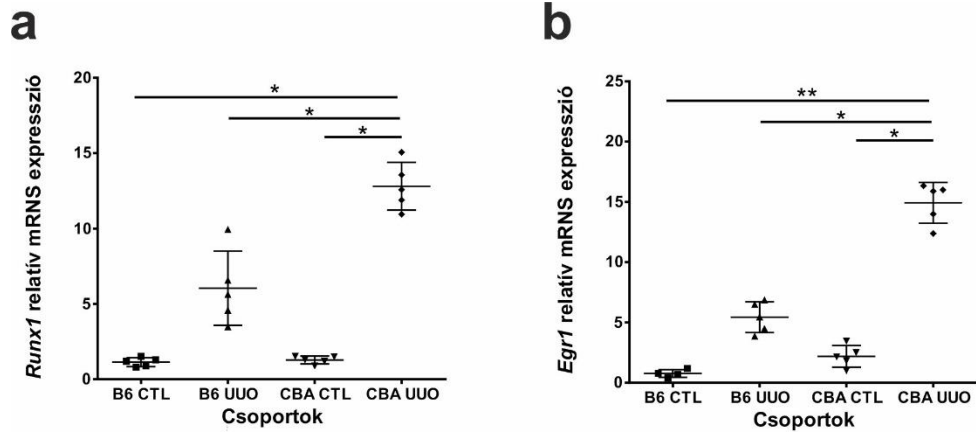
**22. ábra B6 és CBA hím egerek veséinek szövettani képe 24 órával UUO után.** A vesék szövettani vizsgálata során csak néhány dilatált tubulust észleltünk, egyebekben normál vese szerkezetet láttunk és nem láttuk jelét matrix akkumulációnak sem (Masson trikróm festés, 400x nagyítás; kalibráció: 50  $\mu\text{m}$ , \* dilatált tubulus)

A *Colla1* mRNS expressziója kétszer magasabb volt a CBA UUO vesékben, mint a B6 UUO vesékben (23. ábra a). Emellett szignifikáns mértékben fokozódott az *Egr2* és a *Timp1* mRNS expressziója (23. ábra b, c), amit a TIMP-1 fehérje kétszeres expresszió fokozódása kísért a CBA UUO vesékben (23. ábra d). A *Timp1* mRNS expresszió mértéke mind a CBA, mind a B6 törzsben igen alacsony volt, a műtétet követően mindkét egértörzsben emelkedett az expressziója az ellenoldali kontroll vesékhez képest, azonban a CBA egerekben nagyobb mértékben (23. ábra c).



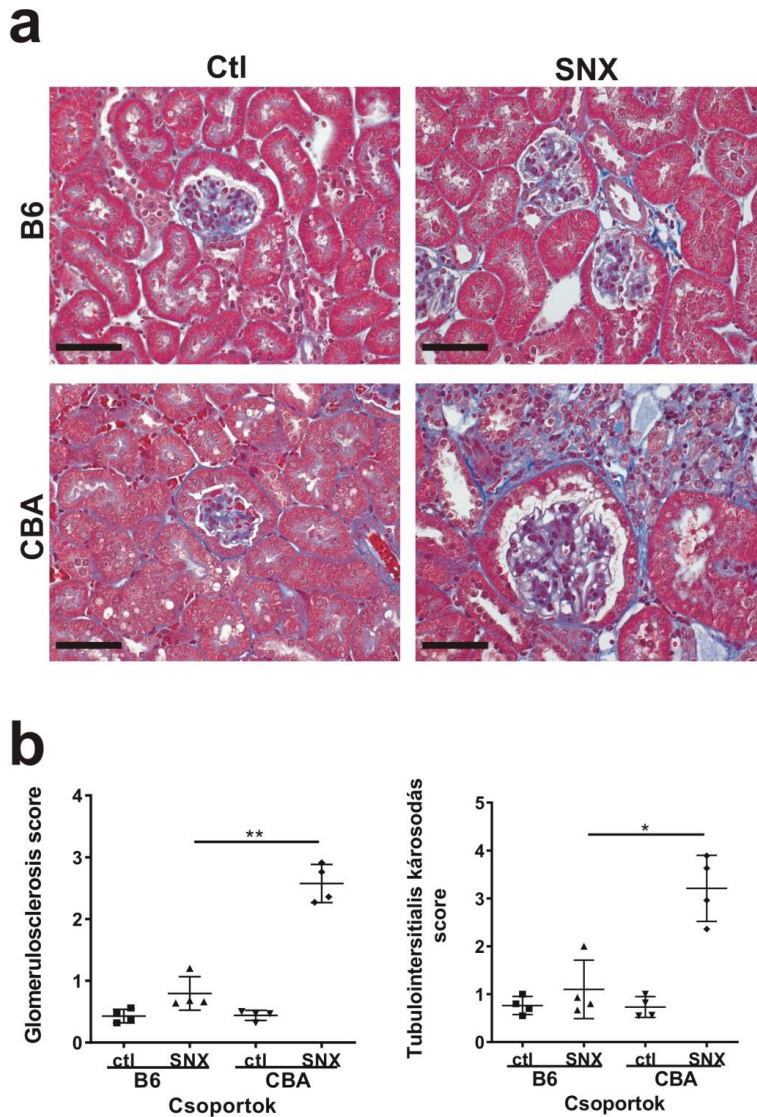
**23. ábra** *Coll1a1*, *Egr2*, *Timp1* mRNA és TIMP-1 fehérje expresszió kontroll és UUO vesékben 24 órával az UUO után. A *Coll1a1* mRNA expressziója kétszer magasabb volt a CBA UUO vesékben, mint a B6 UUO vesékben (a). Szignifikáns mértékben fokozódott az *Egr2* és a *Timp1* mRNA expressziója (b, c), amit a TIMP-1 fehérje kétszer nagyobb expresszió fokozódása kísért a CBA UUO vesékben (d). n=5. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05; \*\* p<0.001.

A *Runx1* mRNA szintjének minimális emelkedését láttuk a B6 egerekben az UUO műtétet követően, azonban a CBA-UUO vesékben szignifikáns expresszió fokozódást tapasztaltunk a kontroll vesékhez képest (24. ábra a).



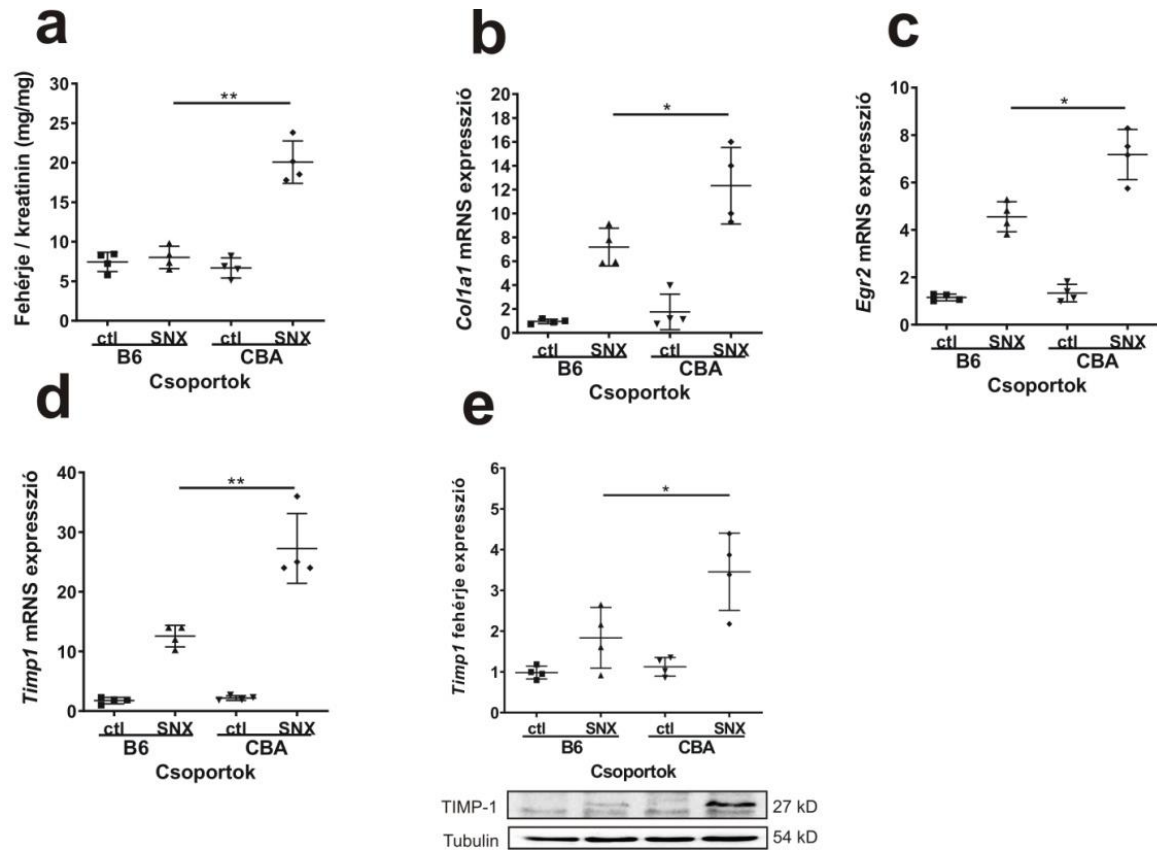
**24. ábra** *Runx1* és *Egr1* relatív mRNS expresszió kontroll és UUO vesékben 24 órával a műtét után. A CBA-UUO vesékben a *Runx1* és az *Egr1* mRNS expresszió jelentősen emelkedett a B6-UUO vesékhez képest. n=5-7/csoport. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05; \*\* p<0.01;

A másik kísérletben súlyos intersticiális fibrózist és glomeruloszklerózist láttunk a CBA egerek veséiben 6 héttel az SNX után, összehasonlítva a B6 egerekkel (25. ábra a, b).



**25. ábra** Kontroll és SNX vesék szövettani képe hat héttel műtét után. Súlyos glomeruloszklerózist és intersticiális fibrózist láttunk a CBA egerek veséiben hat héttel SNX után, összehasonlítva a B6 egerekkel (a, b).  $n=4$ . Kruskal-Wallis teszt, \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ . Masson trikróm festés, 400x nagyítás; kalibráció: 50  $\mu\text{m}$ .

A CBA SNX egerek szignifikáns vesefibrózisa jelentős vizelet fehérje/kreatinin arány emelkedéssel (26. ábra a), valamint a *Colla1* (26. ábra b), az *Egr2* (26. ábra c) és a *Timp1* mRNS és TIMP-1 fehérje (26. ábra d, e) fokozott expressziójával járt.



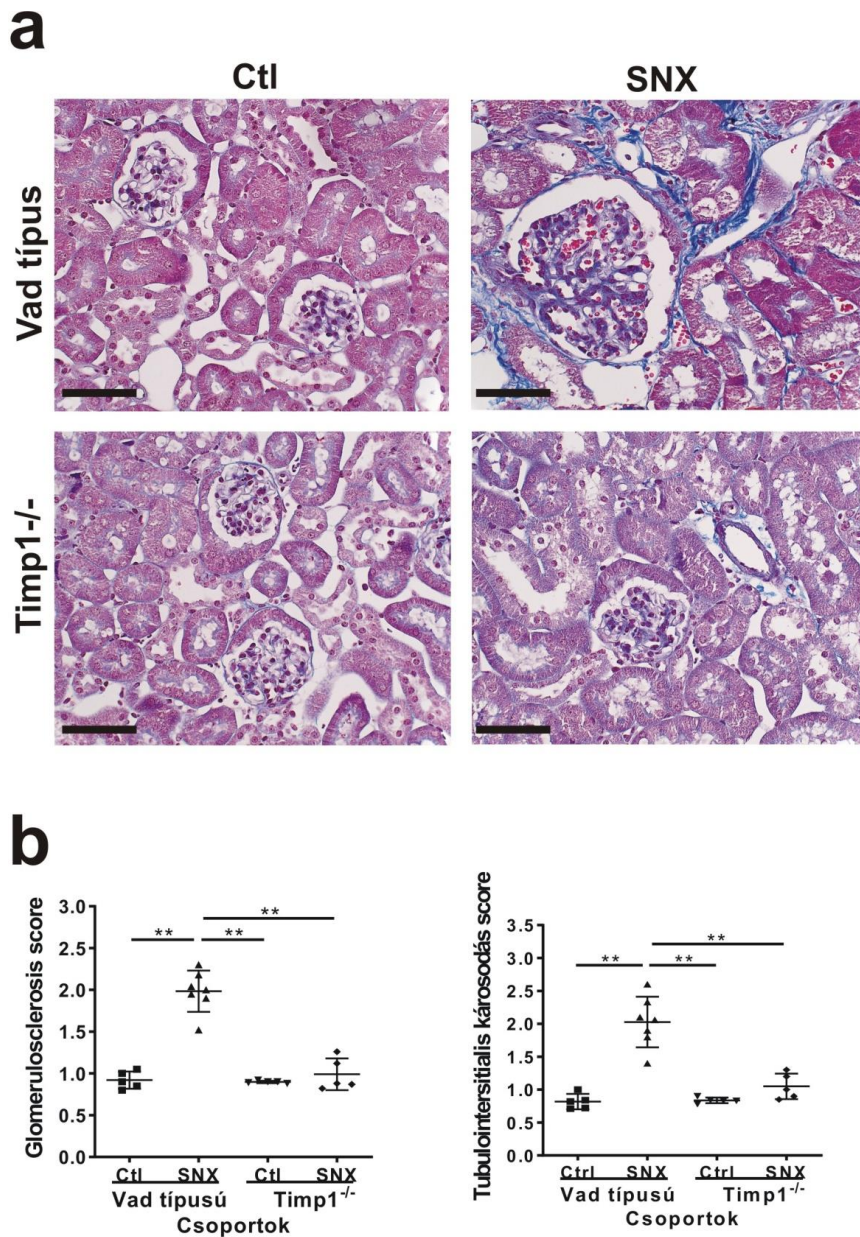
**26. ábra** A vizelet fehérje/kreatinin arány, *Colla1*, *Egr2*, *Timp1* mRNS expresszió és TIMP-1 fehérje expresszió kontroll és SNX egerekben a műtét után hat héttel. A vizelet fehérje/kreatinin arány jelentős emelkedését (a), a *Colla1* (b), az *Egr2* (c ábra) és a *Timp1* mRNS, valamint a TIMP-1 fehérje (d, e) fokozott expresszióját láttuk a CBA SNX egerek veséjében. n=4/csoport. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05; \*\* p<0.01.

#### 4.1.7 TIMP-1 knockout SNX egerekben enyhébb a vesefibrózis

Annak érdekében, hogy megerősítsük a TIMP-1 központi szerepét a vesefibrózis kialakulásában és progressziójában, összehasonlítottuk a TIMP-1 deficiens és a CBAXB6 F1 vad típusú egerek vesefunkcióját SNX után. A vad típusú egerek veséiben a tubuláris atrophia és az intersticiális matrix akkumulációját láttuk 6 héttel az SNX után, ezzel szemben a TIMP-1<sup>-/-</sup> SNX vesékben enyhe, de nem szignifikáns glomeruloszklerózist és intersticiális fibrózist láttunk (27. ábra a, b). A proteinuria mértéke drámaian különbözött az egyes csoportokban, mivel a TIMP-1<sup>-/-</sup> SNX egerekben a fehérje/kreatinin arány enyhe

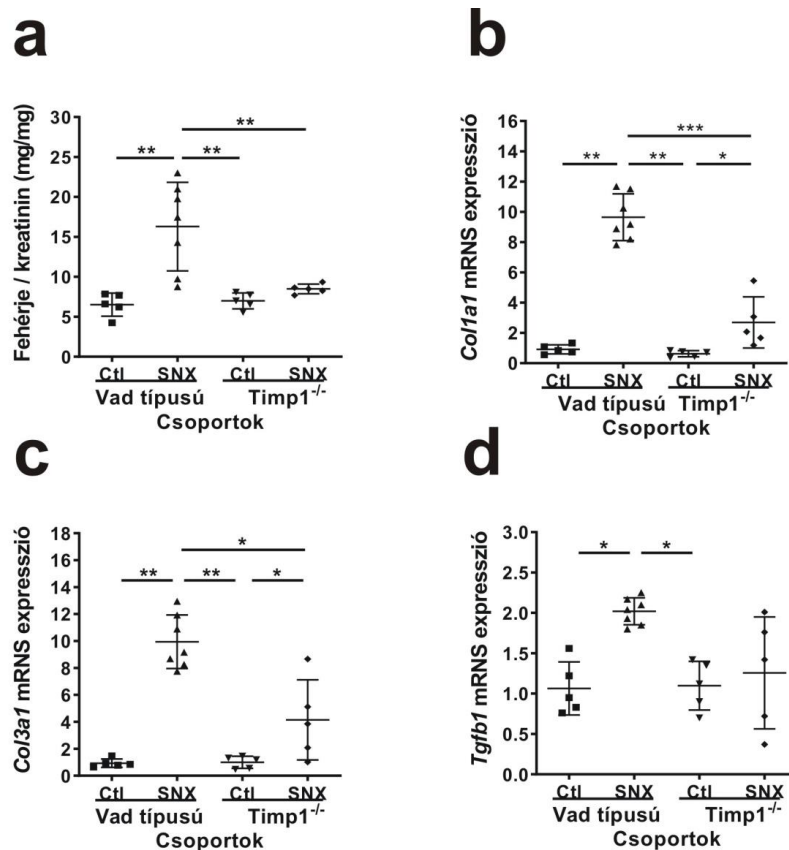


emelkedését láttuk a vad típusú SNX egerekben észlelt nagymértékű emelkedéshez képest (28. ábra a).



**27. ábra Timp1<sup>-/-</sup> deficiens és vad típusú egerek veseszöveti változásainak összehasonlítása SNX után.** Az SNX csak enyhe glomeruláris és tubulointersticiális fibrózist okozott Timp1<sup>-/-</sup> deficiens egerekben (a, b), összehasonlítva a vad típusú egerek szignifikáns glomeruláris hegesedésével és intersticiális fibrózisával (a, b). n=5-7/csoport. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05; \*\* p<0.01. Masson trikróm festés. 400x nagyítás; kalibráció: 50  $\mu$ m.

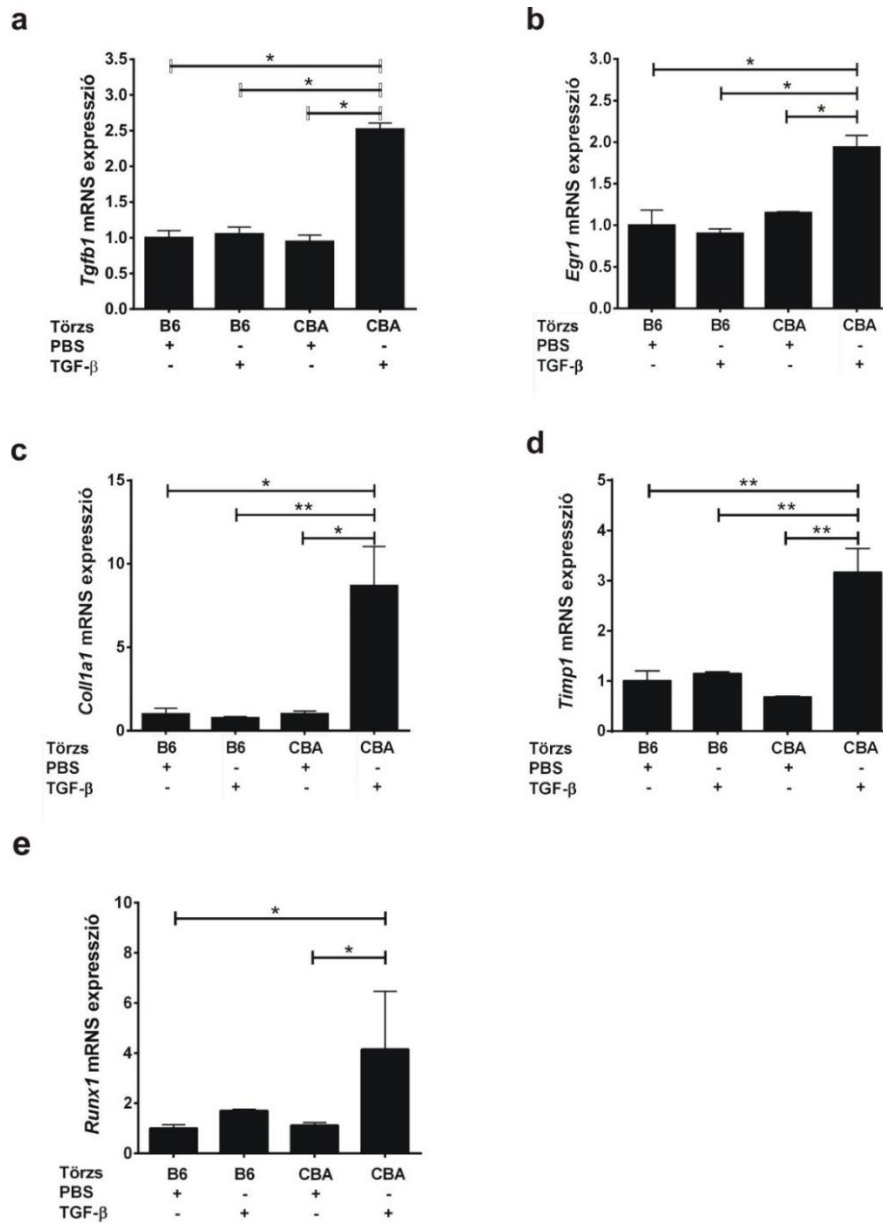
Érdekes módon, bár a *Coll1a1* és a *Col3a1* mRNS expressziója enyhén emelkedett a *Timp1*<sup>-/-</sup> SNX vesékben (28. ábra b, c), a szövettani kép mégis hasonló volt a kontroll vesékhez. Ugyanakkor tízszeres *Coll1a1* és *Col3a1* mRNS expresszió fokozódást láttunk a vad típusú SNX vesékben, amit a *Tgfb1* mRNS expressziójának kétszeres növekedése kísért. Ezzel szemben *Timp1*<sup>-/-</sup> SNX vesékben nem fokozódott a *Tgfb1* mRNS expressziója, a vad típusú vesékhez hasonló expressziót láttunk (28. ábra d).



**28. ábra** A proteinuria mértéke, a *Coll1a1*, a *Col3a1* és a *Tgfb1* mRNS expresszió **TIMP-1<sup>-/-</sup>** deficiens és vad típusú egerekben SNX után. A *Coll1a1* és a *Col3a1* mRNS expressziója enyhén emelkedett a **TIMP-1<sup>-/-</sup>** deficiens SNX vesékben (b, c). A fehérje/kreatinin arány minimálisan emelkedett a **TIMP-1<sup>-/-</sup>** deficiens SNX vesékben (a). Az emelkedett *Coll1a1*, *Col3a1* mRNS expresszió fokozódását a *Tgfb1* mRNS expressziójának növekedése kísérte a vad típusú SNX vesékben. Ezzel szemben *Timp1*<sup>-/-</sup> SNX vesékben nem fokozódott a *Tgfb1* mRNS expressziója (d). n=5-7/csoport. Kruskal-Wallis teszt, \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

#### 4.1.8 A mezangiális sejtek TGF- $\beta$ , RUNX1, EGR-1 és EGR2 expressziójának vizsgálata, *in vitro*

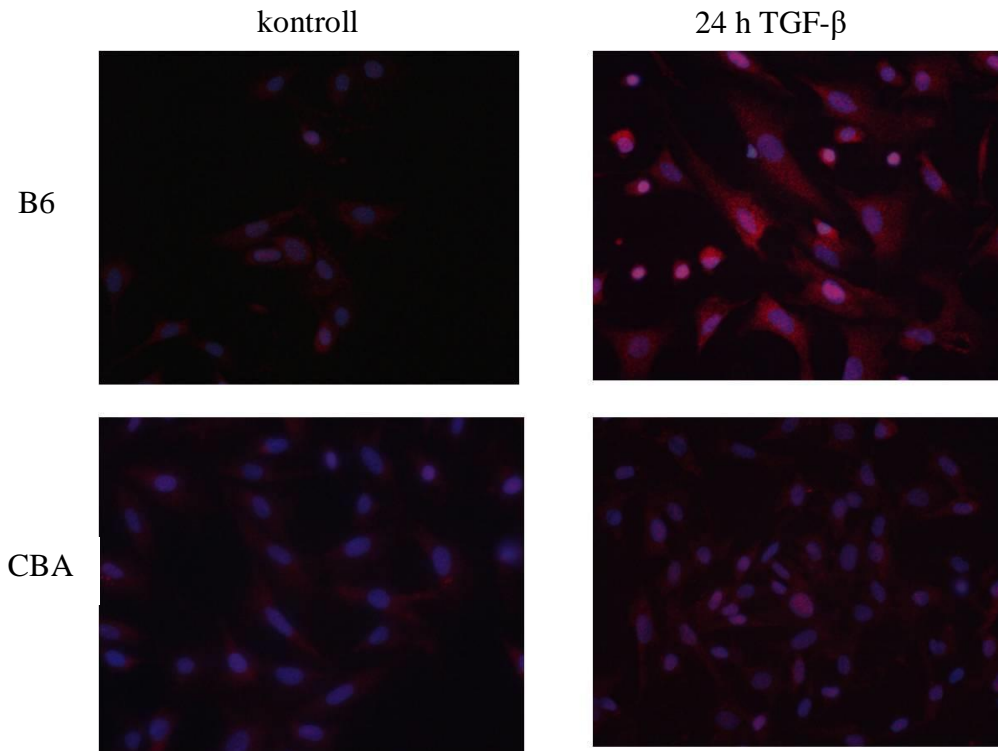
A B6 és CBA egerekből izolált primer mezangiális sejtekben vizsgáltuk a genetikai háttértől függő TIMP-1 expresszió szabályozást, valamint a *Tgfb1*, *Egr1*, *Egr2*, *Colla1*, *Runx1* mRNS expresszióját TGF- $\beta$  adását követően. A CBA mezangiális sejtekben TGF- $\beta$  kezelés hatására megemelkedett mind a *Tgfb1*, *Egr1*, *Colla1*, *Timp1*, *Runx1* mRNS expresszió, míg a kontroll sejtekben, valamint a B6-TGF- $\beta$  mezangiális sejtekben e faktorok szintje alacsony maradt (29. ábra a-d ábra). Az *Egr1* mRNS transzkripciója kétszeresére emelkedett a CBA sejtekben, amit szignifikáns *Colla1* mRNS expresszió növekedés kísért (29. ábra b, c). CBA sejtekben a *Runx1* mRNS expressziója több mint ötszörösére emelkedett TGF- $\beta$  hatására, azonban expressziója a B6 sejtekben TGF- $\beta$  kezelés után is alacsony maradt (29. ábra e).



**29. ábra** TGF- $\beta$  kezelés hatása a *Tgfb1*, *Egr1*, *Colla1*, *Timp1* és *Runx1* mRNS expresszióra CBA és B6 egerekből izolált mezangiális sejtekben. A CBA mezangiális sejtekben TGF- $\beta$  kezelés hatására megemelkedett mind a *Tgfb1*, *Egr1*, *Colla1*, *Timp1*, és *Runx1* mRNS expresszió, míg a kontroll sejtekben, valamint a B6-TGF- $\beta$  mezangiális sejtekben e faktorok szintje alacsony maradt (29. ábra a-d). Kruskal-Wallis teszt, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . (PBS: foszfátpufferolt sóoldat)

A kontroll B6 és a CBA egerek veséiben az EGR2 immunpozitív sejtek száma alacsony volt. A kezelés hatására az EGR2 transzlokálódott és nagy mennyiségben volt jelen a

CBA sejtek magjában, ezzel ellentétben B6 sejtekben csak a citoplazmában észleltünk EGR2 festődést (30. ábra).

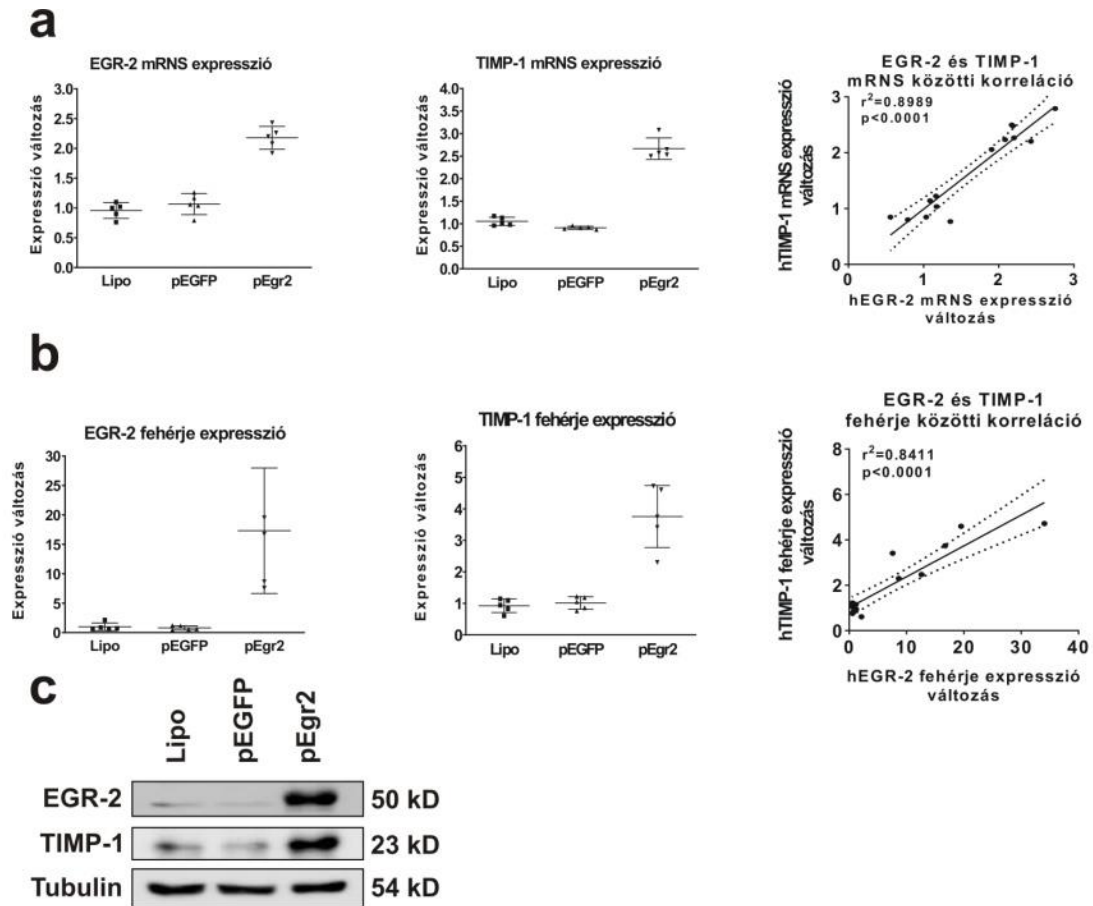


**30. ábra EGR2 fehérje festődése kontroll primér mezangiális sejtekben, valamint 24 órával TGF- $\beta$  kezelés után.** Az EGR2 pozitív sejtek száma alacsony volt a kontroll B6 és CBA egerek veséiben. TGF- $\beta$  kezelés hatására az EGR2 nagy mennyiségben volt jelen a CBA sejtek magjában, ezzel szemben a B6 sejtekben döntően a citoplazmában észleltük az EGR2 festődést. Kék: sejtmag (DAPI) Piros: EGR2. 630x nagyítás.

#### **4.1.9 EGR2 túltermelése HEK293 (Humán Embryonic Kidney Cells, embrionális vese sejtvonal) sejtekben fokozza a TIMP-1 expresszióját, *in vitro***

Egy lehetséges EGR2-TIMP-1 szabályozási tengely *in vitro* bizonyításához a HEK293 sejteket teljes hosszúságú *EGR2* gént (*pEgr2*, n=5) vagy *EGFP*-t (*pEGFP*, n=5) tartalmazó citomegalovírus plazmiddal (pCMV) transzfektáltuk, a nem transzfektált negatív kontrollokat Lipofectaminnal (Lipo, n=5) kezeltük. (pEGR2, IDT DNA, USA). A kontroll sejteket *EGFP* fluoreszcens fehérjét kódoló cDNS-t tartalmazó plazmiddal (*pEGFP*) transzfektáltuk. A *pEgr2* transzfekció (24h) az EGR2 fehérje expressziójának szignifikáns emelkedését eredményezte (31. ábra b, c), ami 2,5-szeres *Timpl* mRNS (31.

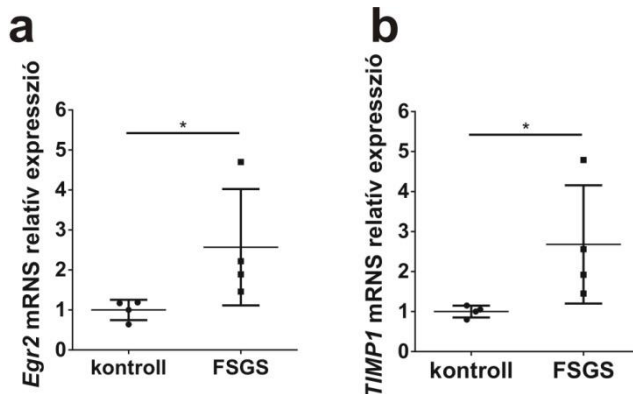
ábra a) és 4-szeres TIMP-1 fehérje (31. ábra b) expresszió fokozódást okozott. Továbbá az EGR2 és a TIMP-1 expresszió szorosan korrelált mind mRNS, mind fehérje szinten (31. ábra a, b).



**31. ábra EGR2- és TIMP-1 mRNS és fehérje expresszió EGR2 gén transzfekció (pEgr2) után.** A HEK293 sejteket teljes hosszúságú *EGR2* gént (*pEgr2*, n=5) vagy *EGFP*-t (*pEGFP*, n=5) tartalmazó citomegalovírus plazmiddal (pCMV) transzfektáltuk, a nem transzfektált negatív kontrollokat Lipofectaminnal (Lipo, n=5) kezeltük. A pEgr2 transzfekció az EGR2 fehérje expressziójának szignifikáns emelkedését eredményezte, ami a TIMP-1 mRNS és fehérje expresszió fokozódását okozta (a, b). Az EGR2 és a TIMP-1 expresszió szorosan korrelált mRNS és fehérje szinten is (a, b). Az EGR2 és a TIMP-1 immunoblotjai (c). Az EGR2 gén transzfekció az EGR2 fehérje expressziójának szignifikáns emelkedését eredményezte, ami a TIMP-1 fehérje expresszió fokozódását okozta. (n=5/csoport)

#### 4.1.10 Magasabb EGR2 és TIMP-1 expresszió figyelhető meg humán FSGS vesebiopsziákban

Annak eldöntésére, hogy van-e humán klinikai jelentősége az egerekben és a HEK293 sejtekben megfigyelt EGR2-TIMP-1 kapcsolatnak, FSGS betegek és kontrollok (nem FSGS-ek) vesebiopsziáiban vizsgáltuk az mRNA expressziókat. A kontroll minták daganat miatt eltávolított vesék egészséges kéregállományából származtak.



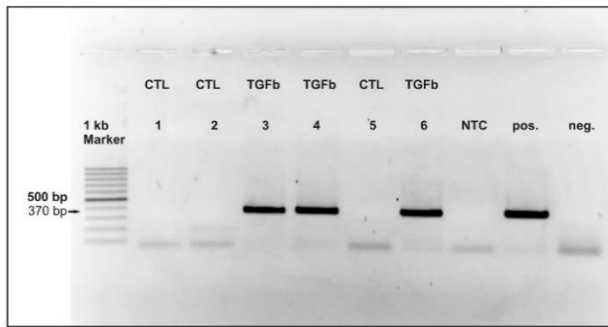
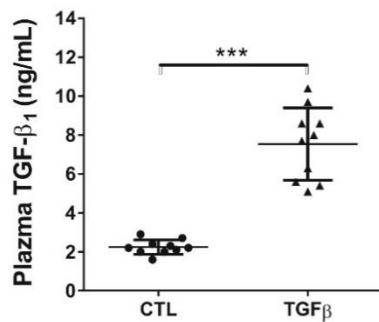
**32. ábra** *Egr2* és *Timp1* mRNA expresszió humán kontroll (n=4) és FSGS mintákban (n=4). Humán FSGS vesebiopsziákban az *Egr2* és a *Timp1* mRNA fokozott expresszióját láttuk. n=4/csoport. Mann-Whitney teszt, \* p<0.05.

Az *Egr2* és a *Timp1* mRNA több mint kétszeres expresszió fokozódását figyeltük meg a humán FSGS mintákban a kontrollokhöz képest (32. ábra).

## 4.2 A PPAR $\gamma$ agonista pioglitazon kezelés hatása a TGF- $\beta$ -val indukált vesefibrózisra kontroll és TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben

### 4.2.1 Plazma TGF- $\beta$ koncentráció, testsúly és vérnyomás

A kontroll egerekben csak az endogén TGF- $\beta$  szekvencia, míg a transzgenikus egerekben az endogén mellett a disznó TGF- $\beta$  cDNS szekvencia amplifikációját is láttuk genotipizálás során (33. ábra). A plazma TGF- $\beta$ -szintje szignifikánsan magasabb volt TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben, mint a kontroll egerekben.

**a****b**

**33. ábra** A TGF- $\beta$  transzgenikus egerek genotipizálásának reprezentatív képe (a 3, 4 és 6-os minták transzgenikusak, a transzgén 370 bp-s PCR termékét mutatják; az 1, 2 és 5-ös minták vad típusú kontrollok) (a). A keringő TGF- $\beta$ 1 koncentráció B6 kontroll egerekben (CTL) és transzgenikus egerekben (TGF- $\beta$ ) a vizsgálat elején egyértelműen azt mutatja, hogy a plazma TGF- $\beta$ 1 szint háromszorosára emelkedett a transzgenikus egerekben. ( $n = 14$ /csoport,  $p < 0.001$ , Mann-Whitney teszt) (b)

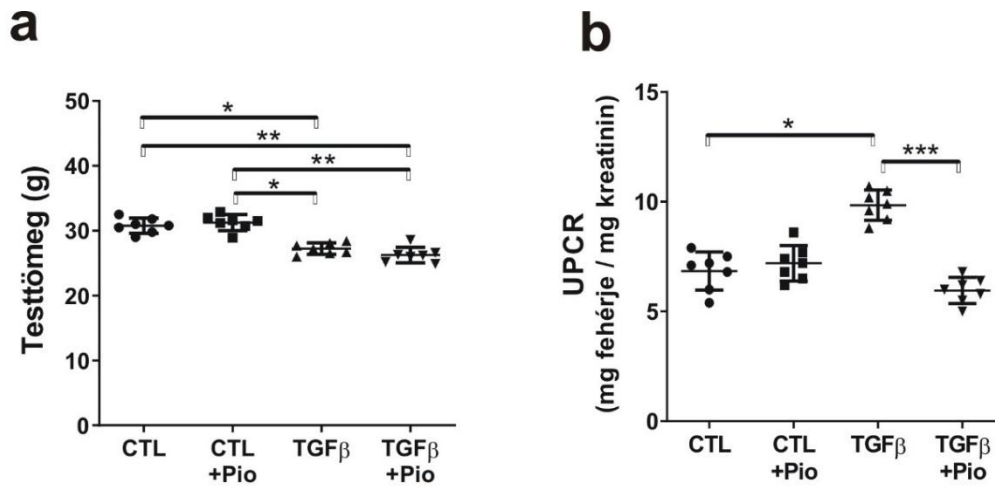
A pioglitazon kezelés nem befolyásolta sem a kontroll sem a TGF- $\beta$  transzgenikus egerek testtömegét (34. ábra a), valamint artériás középnyomását (14. táblázat)

**14. táblázat.** Artériás középnyomás pioglitazonnal kezelt és kezeletlen egerekben (Hgmm, átlag $\pm$ -szórás). Az emelkedett TGF- $\beta$  plazma szintnek, valamint a pioglitazon kezelésnek sem volt hatása az egerek artériás középnyomására

	CTL	CTL+Pio	TGF $\beta$	TGF $\beta$ +Pio
Átlag $\pm$ -szórás	80.00 $\pm$ 4.509	82.00 $\pm$ 3.958	78.00 $\pm$ 4.504	79.14 $\pm$ 7.010
ANOVA	ns	ns	ns	ns



A vizelet fehérje/kreatinin hányados (34. ábra b) emelkedett a kezeletlen TGF- $\beta_1$  transzgenikus egerekben, és a pioglitazon kezelés hatására szignifikánsan csökkent.



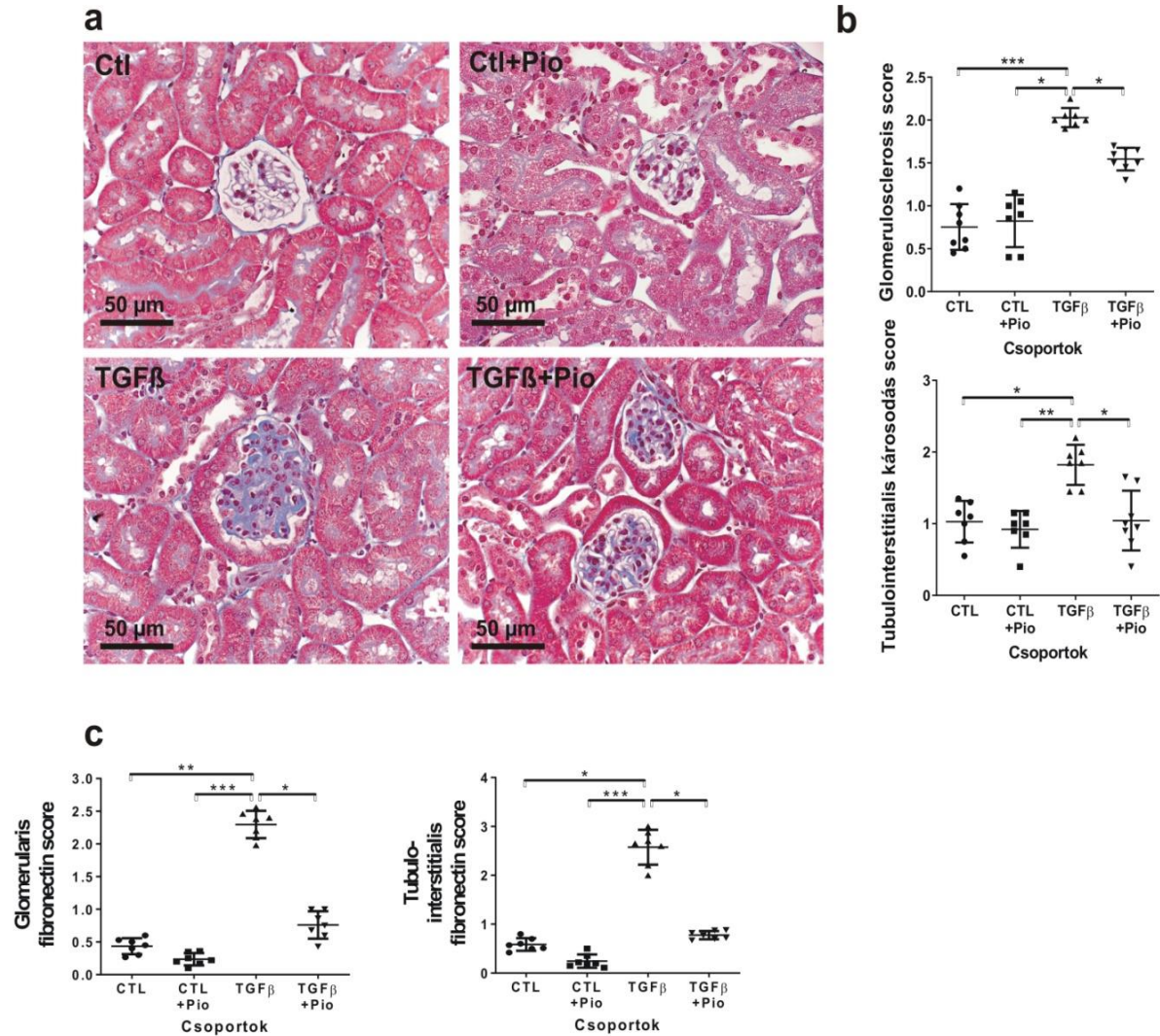
**34. ábra A testtömeg és a vizelet fehérje/kreatinin hányados értékei pioglitazonnal kezelt és kontroll egerekben.** A pioglitazon kezelés nem befolyásolta sem a kontroll, sem a TGF- $\beta$  transzgenikus egerek testtömegét, de a TGF- $\beta$  transzgenikus egerek testtömege kisebb volt, mint a kontrolloké. A TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben észlelt emelkedett vizelet fehérje/kreatinin hányados a pioglitazon kezelés hatására szignifikánsan csökkent. UPCR: vizelet fehérje/kreatinin hányados (urine protein to creatinine ratio). ( $n = 7$ /csoport, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis teszt)

#### 4.2.2 A pioglitazon csökkenti a TGF- $\beta$ -val indukált proteinuriát és vesefibrózist

Az UPCR hasonló volt, mind a pioglitazonnal kezelt kontroll, mind a kezeletlen kontroll egerekben. Ezzel szemben a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben a fehérjeürítés 40%-kal volt magasabb a kontroll egerekhez képest, ugyanakkor a pioglitazonnal kezelt transzgenikus egerekben kontroll szintre csökkent (34. ábra b).

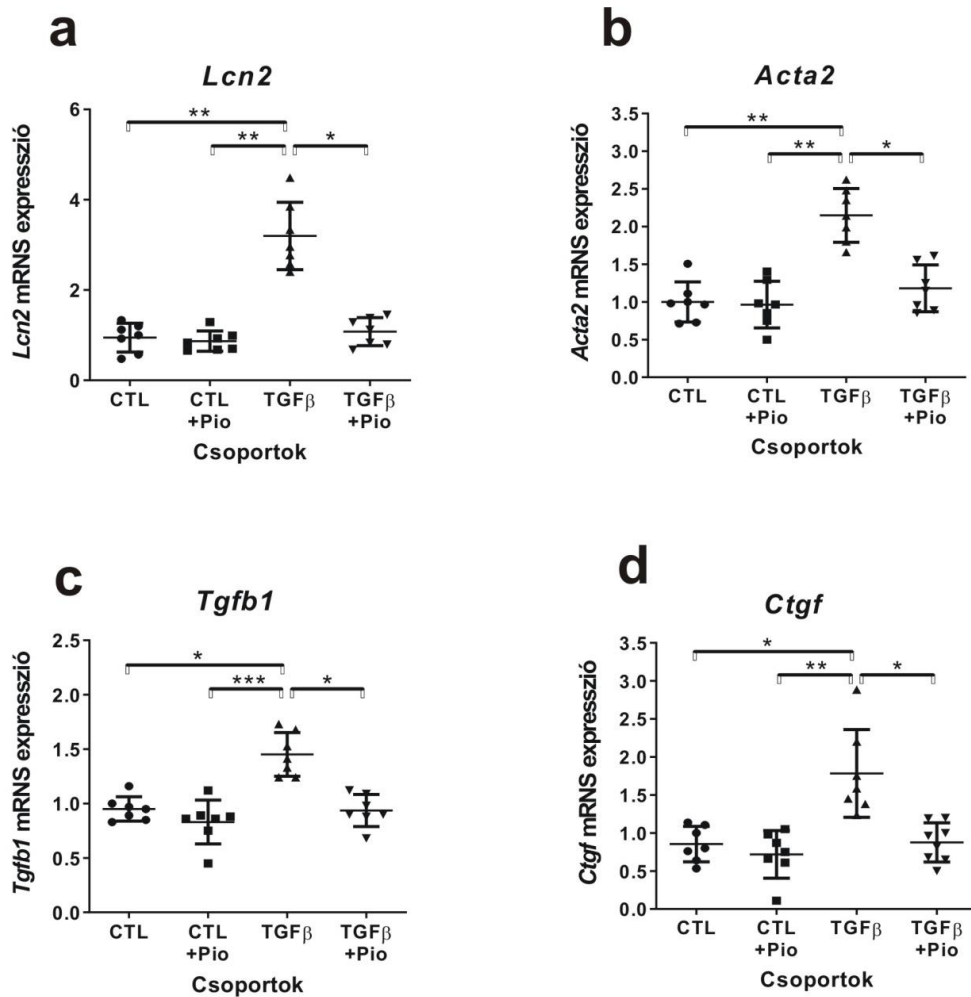
A kontroll állatok veséje mind a kezeletlen, mind a kezelt csoportban egészséges szövettani képet mutatott, nem láttuk sem a glomeruláris, sem a tubuláris károsodás jeleit (38. ábra a, b). Ezzel szemben, összhangban az UPCR eredményekkel, a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerek veséi extenzív glomeruloszklerózis és jelentős tubulointersticiális károsodás képét mutatták (38. ábra a), amelyet a szövettani metszeten erős fibronectin immunoreaktivitás kísért. Ezzel szemben, a pioglitazon kezelés

szignifikánsan csökkentette a TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben észlelt glomeruloszklerózist és tubulointersticiális károsodást (35. ábra b), valamint normál értékre csökkentette a fibronectin expressziót (35. ábra c).



**35. ábra** Kezelt és kezeletlen egerek veséjének szövettani megjelenése, fibronectin expressziója. Szignifikáns glomeruloszklerózist és tubulointersticiális károsodást láttunk a kezeletlen TGF- $\beta_1$  egerekben (a, b), ami a pioglitazon kezelés hatására csökkent. A pioglitazon kezelés normál szintre csökkentette a fibronectin expressziót. (Masson trikróm festés, 400x nagyítás, kalibráció: 50  $\mu$ m). Kruskal-Wallis teszt (n = 7/csoport), \* p < 0.05; \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, Kruskal-Wallis teszt.

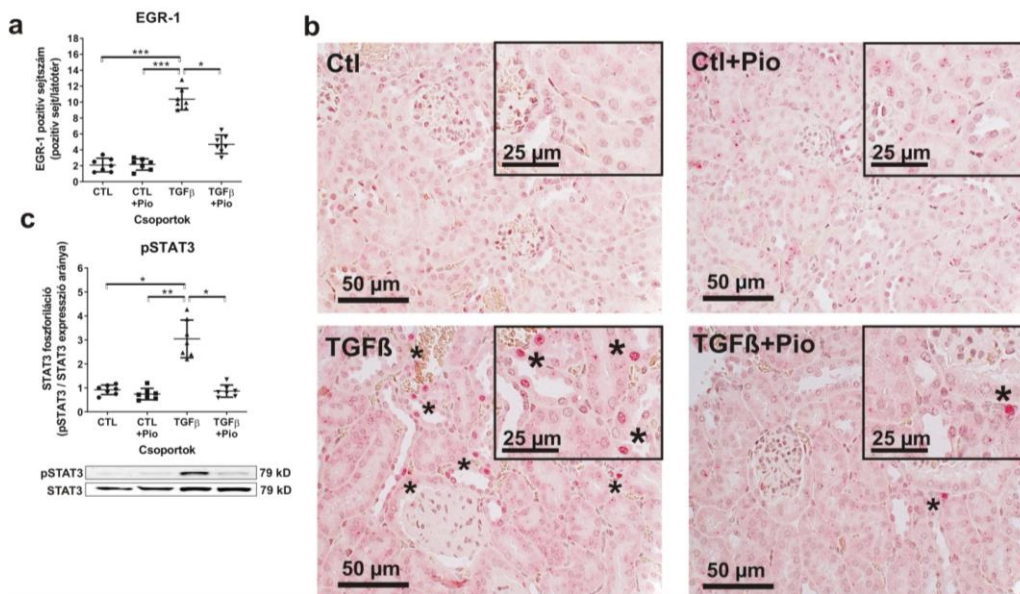
Szövetteni eredményeinkkel összhangban a Lipocalin-2 mRNA expresszió (*Lcn2*, a tubuláris károsodás érzékeny biomarkere <sup>360</sup>) hasonló volt a kezelt és a nem kezelt kontroll egerekben. Ugyanakkor az *Lcn2* mRNA expresszió szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben, de közel normál szintre csökkent a pioglitazonnal kezelt transzgenikus egerekben (36. ábra a).



**36. ábra Fibrózissal kapcsolatos molekulák génexpressziója.** Összehasonlítva a kontroll egerekkel, *Lcn2* (a), *Acta2* (b), *Tgfb1* (c) és a *Ctgf* (d) renalis mRNA expressziója emelkedett a kezeletlen TGF- $\beta_1$  transzgenikus egerekben, de pioglitazon kezelés hatására kontroll szintre csökkent. Kruskal-Wallis teszt ( $n = 7$ /csoport), \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

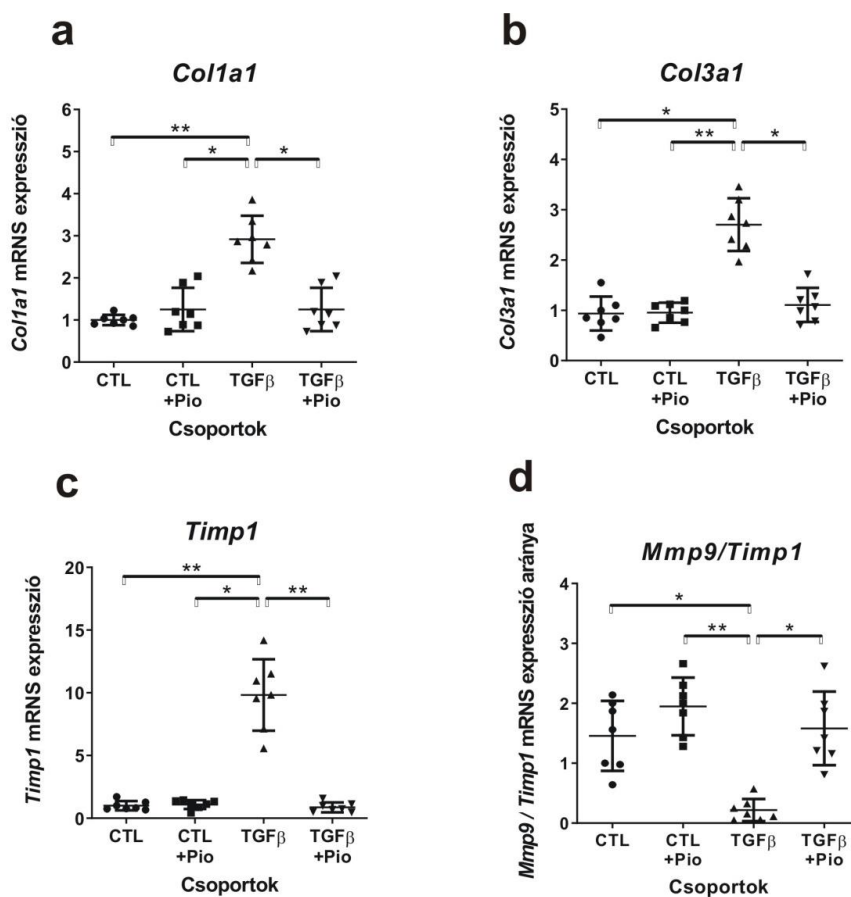
#### 4.2.3 A pioglitazon mérsékli a TGF- $\beta$ -val indukált profibrotikus transzkripciós faktorok túlermelését TGF- $\beta$ transzgenikus egerekben

A TGF- $\beta_1$  transzgenikus egerekben az *Acta2* mRNS expressziója kétszerese volt a kontroll vesékben mérhető értéknek, de pioglitazon kezelés hatására az *Acta2* expressziója közel kontroll szintre csökkent (36. ábra b). A profibrotikus faktorok közül, mind a *Tgfb1*, mind a *Ctgf* mRNS expressziója szignifikánsan csökkent pioglitazon hatására (36. ábra c, d). Az EGR-1 transzkripciós faktor erős immunreaktivitást mutatott kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben, amely a pioglitazon kezelés hatására mérséklődött (37. ábra a, b). Fokozott STAT3 foszforilációt láttunk a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerek veséiben, összehasonlítva a kontroll csoportokkal, melyet visszاسzorított a krónikus pioglitazon kezelés (37. ábra c).



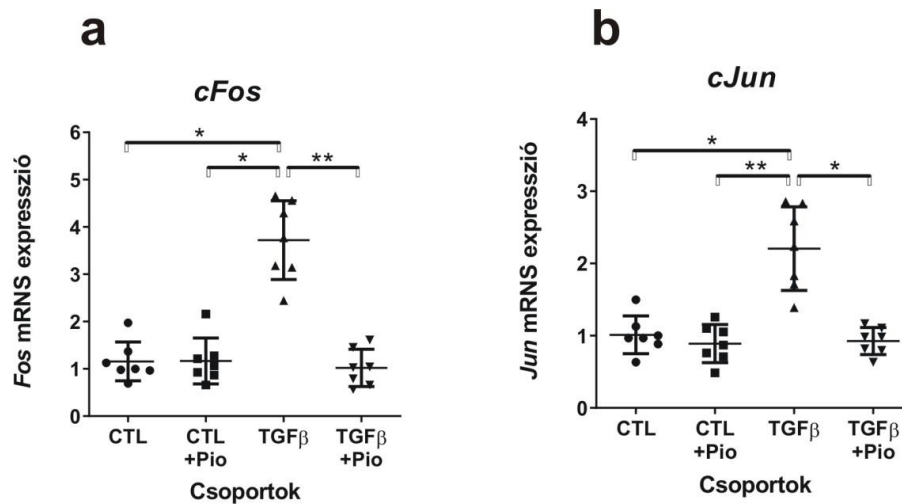
**37. ábra EGR-1 immunreaktivitás, STAT-3 foszforiláció kezelt és kezeletlen egerek veséiben.** A kezeletlen TGF- $\beta_1$  egerek veséiben szignifikánsan több volt az EGR-1 pozitív sejt a kontrollokhoz vagy a pioglitazonnal kezelt TGF- $\beta_1$  egerekhez képest (a, b) (400x nagyítás, kalibráció 50  $\mu$ m; 630x nagyítás, kalibráció 25  $\mu$ m, \* erős EGR-1 immunreakciót adó tubulus sejtek, Masson trikróm festés) Az erős fibrotikus választ jelentős STAT3 foszforiláció kísérte a TGF- $\beta_1$  vesékben, mely a krónikus pioglitazon kezelés hatására jelentősen mérséklődött (c). Kruskal-Wallis teszt ( $n=7$ /csoport), \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Összhangban a keringő TGF- $\beta$  profibrotikus hatásával, kezeletlen transzgenikus egerekben a *Col1a1* és a *Col3a1* renalis expressziója háromszor magasabb volt, mint a kontroll csoportokban, azonban ezek szignifikánsan csökkentek a pioglitazonnal kezelt állatokban (38. ábra a, b). Az ECM alkotóelemek fokozott termelését tízszeres *Timp1* mRNA expresszió növekedés kísérte kezeletlen transzgenikus egerekben (38. ábra c). Emellett jelentősen csökkent a renalis MMP-9/TIMP-1 hányados kezeletlen transzgenikus egerekben (38. ábra d). A transzgenikus egerek pioglitazon kezelése csökkentette a *Timp1* mRNA expresszióját és normalizálta az MMP-9/TIMP-1 hányadost (38. ábra d). A kezelés nem befolyásolta a kontroll csoportok *Timp1* mRNA expresszióját (38. ábra c).



**38. ábra** Az extracelluláris mátrix komponensek génexpressziója. Az ECM komponensek fokozott termelését tízszeres *Timp1* mRNA expresszió növekedés kísérte kezeletlen transzgenikus egerekben. A transzgenikus egerek pioglitazon kezelése csökkentette a *Timp1* mRNA expresszióját és normalizálta az MMP-9/TIMP-1 hányadost. Kruskal-Wallis teszt ( $n = 7$ /csoport), \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

A magasabb TIMP-1 expresszióval párhuzamosan a TGF- $\beta$  transzgenikus egerek veséiben megfigyeltük az AP-1 komponensek (cFos és cJun) fokozott mRNS expresszióját (39. ábra a, b), ami a pioglitazon kezelés hatására a kontroll csoportokban mért szintre csökkent (39. ábra a, b).



**39. ábra** Az aktivátor-protein 1 (AP-1) komponensek expressziója. A kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben megfigyelt fokozott *cFos* és *cJun* mRNS expressziót a pioglitazon kezelés a kontroll csoportokban észlelt szintre csökkentette. Kruskal-Wallis teszt ( $n = 7$ /csoport), \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

## 5 MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt évtizedekben a humán- és állatkísérletek a TGF- $\beta$  központi szerepét igazolták a vesefibrózis kialakulásában és progressziójában. Az azonos etiológiájú krónikus vesebetegségek (pl. DN, hipertenzív nefropátia) progressziója eltérő, ez valószínűleg az eltérő genetikai háttér miatt lehetséges. A TGF- $\beta$  transzgenikus egér a magas keringő TGF- $\beta$  koncentráció miatt alkalmas a vesefibrózis modellezésére. A genetikai háttér vesefibrózisban betöltött szerepének vizsgálatához a TGF- $\beta$  transzgén C57BL/6 egerekre visszakereszteltük, és így kongenikus B6-TGF- $\beta$  egereket hoztunk létre. Bár a TGF- $\beta$  transzgén visszakeresztése a beltenyésztett B6 törzssel (kongenikus B6-TGF- $\beta$  egerek) nem változtatta meg a plazma TGF- $\beta$  koncentrációt, ennek ellenére a B6-TGF- $\beta$  egerekben csak enyhe glomeruloszklerózis alakult ki tubulointersticiális károsodás nélkül, proteinuria sem jelentkezett, és az egerek túlélése is jelentősen hosszabbodott az eredeti, vegyes genetikai hátterű CBA.B6-Alb/TGF- $\beta_1$  egerekhez képest. Vizsgálatunk alátámasztja azt a korábbi eredményt, mely szerint ezek a B6 egerek rezisztensek vesefibrózisra <sup>348, 350, 361</sup>.

Feltételezve, hogy a CBA háttér okozhat rövidebb túlélést, vizsgáltuk a CBA genetikai háttérnek a vesefibrózis progressziójára gyakorolt hatását. A C57BL/6 (B6) hátterű TGF- $\beta$  transzgenikus egereket (B6-TGF- $\beta$ ) CBA egerekkel kereszteltük, így CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egerek születtek. A CBA háttérre történő további visszakeresztés megghiúsult, mivel a vesebetegség progressziója jelentősen felgyorsult, és a túlélés drámai módon lerövidült annak ellenére, hogy a CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 transzgenikus (hibrid) egerek plazma TGF- $\beta$  koncentrációja hasonlóan magas volt, mint a B6-TGF- $\beta$  egerekben mért érték. A CBAxB6-TGF- $\beta$  F1 egerek veséjében már 5 napos korban glomeruláris mátrixfelhalmozódást lehetett megfigyelni, és uraemia miatt legkésőbb 21 napos korukban elpusztultak. Az ivarérettség elérése előtti nagyszámú elhullás miatt megghiúsult a homogén CBA háttérre történő visszakeresztés. Ezért a súlyosabb progresszió vizsgálatára CBAxB6 hibrid hátterű transzgenikus egereket használtunk, biztosítva, hogy ezen egerek mindegyike azonos arányban tartalmaz CBA és B6 géneket.

A szövettani eredmények alapján a fibrózissal kapcsolatos molekulák (TGF- $\beta$ , kollagének) mRNS expressziója CBAxB6-TGF- $\beta$  egerek veséiben többszörös növekedést mutatott már 14 napos korban, összehasonlítva a B6-TGF- $\beta$  vesékkal. A

törzsek között megfigyelt különbségek nem hozhatók összefüggésbe a TGF- $\beta$  természetes inhibitorainak<sup>144, 362</sup>, vagy a TGF- $\beta$  jelátvitelben szerepet játszó Smad molekulák megváltozott expressziójával<sup>363</sup>. A TGF- $\beta$  befolyásolja az ECM átépülését, mivel csökkenti az MMP-k és indukálja a TIMP-ek működését<sup>364</sup>. Az MMP-2 a fibronektint, az I-es és a III-as típusú kollagént<sup>365</sup> hasítja, míg az MMP-9-nek a IV-es típusú kollagénnel nagyobb az affinitása<sup>366</sup>. Az MMP-k inhibitorai közül a TIMP-1, TIMP-2 és TIMP-3 expresszálódik a vesében<sup>366</sup>. A TIMP-1 mRNS százszoros, a TIMP-1 fehérje tízszeres expresszió fokozódást mutatott CBAXB6-TGF- $\beta$  vesékben, összehasonlítva a B6-TGF- $\beta$  vesékkal. A TIMP-1 szintje megemelkedik progresszív humán vesebetegségeknél (DN<sup>167</sup> vagy glomerulonephritis<sup>168</sup>), valamint a lupus glomerulonephritis kísérleti modelljében<sup>169</sup>, fehérje terheléses proteinuriában<sup>170</sup>, továbbá obstruktív uropathiában<sup>171</sup>. Ez felveti azt a kérdést, hogy a magas TIMP-1 expresszió CBAXB6-TGF- $\beta$  egerekben következménye-e vagy része-e a kiterjedt vesehegesedésnek, illetve a jelentősen emelkedett TIMP-1 expresszió ok-okozati szerepe van-e a vese fibrózis kialakulásában a TGF- $\beta$  transzgenikus modellben. Ezért a renalis génexpressziót 5 napos korban is elemeztük, és enyhe glomeruláris hypertrophiát és a glomerulusok kb. 30%-ban észleltünk mezangiális expansziót a CBAXB6-TGF- $\beta$  vesékben. Felmerült a kérdés, hogy milyen genetikai faktor lehet felelős az eltérő TIMP-1 expresszió szabályozásáért. Így további vizsgálatunk olyan transzkripciós faktorokra irányult, amelyek fibrotikus betegségeknél bizonyítottan szerepet játszanak.

Transzgenikus modellünkben a TIMP-1 mellett legerősebben változó transzkripciós faktornak az EGR2 bizonyult. Az EGR2 expressziója drámai módon 35-szörösére nőtt CBAXB6-TGF- $\beta$  vesékben, és jól korrelált a TIMP-1 expresszióval. Sclerodermában szenvedő betegek bőr- és tüdőbiopsziáiban, valamint scleroderma egérmodelljeiben emelkedett EGR2 expresszió észlelhető, amely megerősíti az EGR2 szerepét a TGF- $\beta$  hatásának közvetítésében<sup>283</sup>. Fontos szerepét bizonyítja, hogy Vollmann és mtsai. vizsgálatában az EGR2 géncsendesítés csökkentette a májfibrózist egerekben *in vivo*<sup>367</sup>. Annak érdekében, hogy tisztázzuk oki tényező-e a megfigyelt EGR2 növekedés a 14 napos életkorra erősen fibrotikussá váló vesékben, vagy már egy terminális állapot következménye, sokkal korábbi életkorban is vizsgáltuk mind az EGR2, mind a TIMP-1, valamint további fibrózissal asszociált gének expresszióját, a transzgenikus egerek 5 napos életkorában, amikor még szövettanilag nem látható



számottevő vesefibrózis. A vizsgált gének közül CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben az *Egr2* és a *Timp1* mRNS expressziója szignifikánsan magasabb volt már ebben a korai életkorban (a *Timp1* mRNS expressziója 50%-kal), mint a B6-TGF- $\beta$  egerekben. Ugyanakkor a *Tgfb1* mRNS fokozott renalis expresszióját nem kísérte fokozott kollagén termelődés. Kizártuk annak lehetőségét, hogy a vesefibrózis progressziójában észlelt különbségnek már egy újszülöttkori EGR2 és/vagy TIMP-1 expressziófokozódás következménye lenne, mivel hasonló *Egr2* és *Timp1* mRNS expressziós szinteket találtunk a CBAxB6-TGF- $\beta$  és a B6-TGF- $\beta$  újszülött egerek veséiben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a korai renalis EGR2 és TIMP-1 expresszió CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben megelőzi az ECM komponensek fokozott expresszióját, így feltehetőleg oki szereppel bírnak a felgyorsult fibrózis patogenezisében. Vizsgálatunk megerősítette azt a feltételezést, miszerint a genetikai háttér jelentősen befolyásolja a TGF- $\beta$  profibrotikus hatását ebben a modellben.

Annak kizárására, hogy ez a megfigyelés csak a transzgenikus egerekre jellemző-e, két másik széles körben használt vesefibrózis modellben (UUO, SNX) is vizsgáltuk a CBA vs B6 genetikai háttér hatását a vesefibrózis progressziójára. A genetikai különbségek jelentőségét ebben a két klasszikus vesefibrózis modellben is megfigyeltük.

Az UUO kísérleti modellt alkalmazzák a leggyakrabban a fibrózis vizsgálatára, hiszen általában 7 napon belül tubulointersticiális fibrózis alakul ki ebben a modellben <sup>359</sup>. Kísérleteinkben ezért korai (1 napos) és késői (7 napos) UUO hatásait egyaránt vizsgáltuk CBA és B6 egerekben. Az SNX a működő nefronszám csökkenése miatt glomerularis hiperfiltrációt okoz a megmaradt glomerulusokban, mely glomeruloszklerózishoz és intersticiális fibrózishoz vezet, ennek következtében súlyos veseelégtelenség alakul ki a masszív fibrózis miatt 15-20 héten belül <sup>368</sup>. Kísérleteinkben emiatt korábbi időpontban, 6 héttel a műtét után hasonlítottuk össze a CBA és B6 egerek veséit.

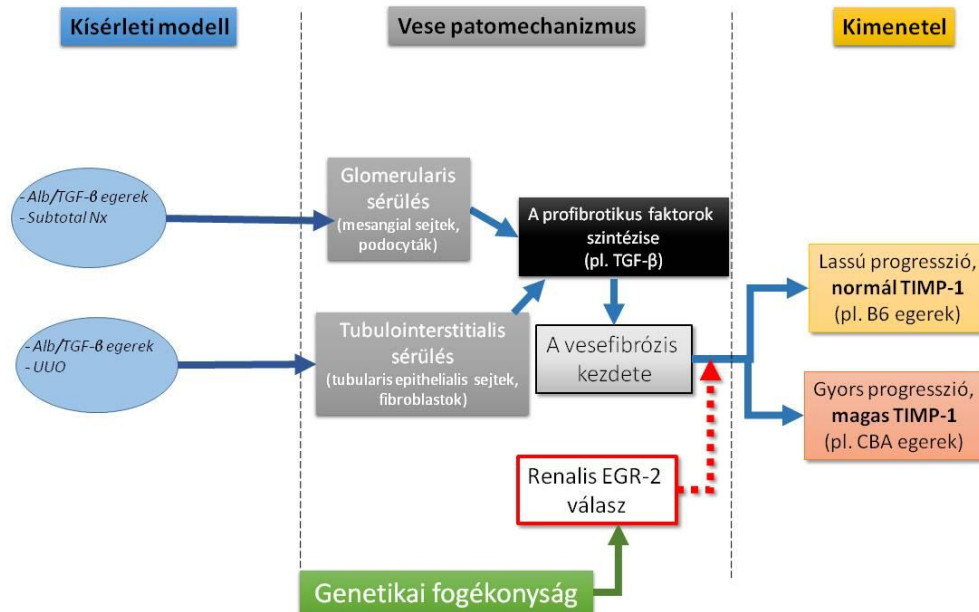
Hasonlóan a transzgenikus egerekben látottakhoz, a vad típusú B6 és CBA egerekben az UUO és SNX hatására mind az EGR2, mind a TIMP-1 renalis expresszió korai fokozódását láttuk a fibrózissra érzékeny CBA egerekben. Tanulmányunk az első olyan vizsgálat, amellyel bizonyítást nyert, hogy a vesefibrózissra való genetikai fogékonyság összefügg(het) az EGR2 és a TIMP-1 expresszióval, nemcsak a TGF- $\beta$  transzgenikus modellben, hanem UUO vagy SNX modellben is.

A TIMP-1 vesefibrózisban betöltött központi szerepének további bizonyítására CBAxB6 háttérű TIMP-1 hiányos egerekben SNX hatására kialakuló vesefibrózis mértékét hasonlítottuk vad típusú egerekéhez. Az SNX műtétet követően a CBAxB6 vad típusú egerekben szignifikánsan emelkedett a vese kollagén és *Tgfb1* mRNS expressziója, jelentős proteinuria mellett, ami megfelel az irodalomból is ismert hatásainak<sup>369, 370</sup>. Ugyanakkor nem alakult ki sem szignifikáns vesehegesezés, sem proteinuria a TIMP-1 knockout SNX egerek veséiben. Egy további kísérlet során CBAxB6-TGF- $\beta$  transzgenikus egereket kezeltünk TIMP-1 neutralizációs antitesttel. A TIMP-1 neutralizáló antitesttel enyhíteni tudtuk a TGF- $\beta$  erős profibrotikus hatását CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben, amit a kisebb mértékű vesefibrózis, proteinuria és alacsonyabb szérum urea szint is jelzett. Ezekkel a kísérletekkel is megerősítettük, hogy a TIMP-1 a vesefibrózis egyik fő mozgatórugója.

Ezen kívül *in vitro* kísérletben bizonyítottuk, hogy EGR2-t kódoló plazmáddal történt transzfekció hatására jelentősen megnövekedett intracelluláris EGR2 expresszió HEK293 sejtekben a TIMP-1 fehérje koncentráció jelentős emelkedését eredményezte. Az EGR2 és a TIMP-1 szorosan korrelált mind mRNS, mind fehérje szinten ezekben az *in vitro* kísérletekben is. További vizsgálatunkban humán FSGS vesebiopsziákban is fokozott EGR2 és TIMP-1 expressziót találtunk, ami felveti az EGR2 és TIMP-1 klinikai jelentőségét vesefibrózisban, valamint rámutat arra, hogy az EGR2 új célpontként szolgálhat a fibrózis jövőbeni kezelésében.

Vizsgáltuk továbbá a TGF- $\beta$ -nak a B6 és CBA egerekből izolált primér mezangiális sejtekre gyakorolt hatását is. A B6 és CBA egerekből izolált primér mezangiális sejtekben figyeltük meg a genetikai háttértől függő TIMP-1 szabályozást, valamint a *Tgfb1*, *Egr1*, *Egr2*, *Colla1*, *Runx1* mRNS expresszióját TGF- $\beta$  adását követően. Eredményeink megerősítették a már korábban leírt megfigyeléseket, miszerint TGF- $\beta$  hatására megnövekszik az *Egr1* és *Egr2* mRNS expressziója<sup>270, 283</sup>, és ezzel egy időben a *Timpl*, *Colla1*, *Runx1* mRNS expressziója is emelkedik, ami hozzájárul a fibrózis kialakulásához<sup>265</sup>. Vizsgálatainkban az újdonság az, hogy ez a hatás csak a fibrózisra érzékeny CBA egértörzsekben figyelhető meg, mivel a B6 egerek, illetve a B6 egerek veséiből izolált mezangiális sejtek nem így reagáltak *in vitro* kísérleteink során. A nem kezelt sejtekben, valamint a TGF- $\beta$  kezelt B6 mezangiális sejtekben a fenti faktorok szintje alacsony maradt. Immuncitokémiai vizsgálatunk eredménye alapján a nem kezelt

B6 és a CBA sejtekben alacsony volt az EGR2 expresszió. TGF- $\beta$  kezelés hatására az EGR2 transzlokálódott és nagy mennyiségben volt jelen a CBA sejtek magjában, ezzel ellentétben B6 sejtekben csak a citoplazmában észleltünk EGR2 festődést a kezelés hatására.



**40. ábra A genetikailag meghatározott vesefibrózis progressziójának feltételezett mechanizmusa.** Az Alb/TGF- $\beta_1$  transzgenikus egerek emelkedett keringő TGF- $\beta_1$  szintje glomeruloszklerózis és tubulointersticiális fibrózis kialakulását eredményezi. A glomeruláris vagy a tubulointersticiális károsodástól függetlenül a profibrotikus TGF- $\beta$  és más profibrotikus faktorok egymást követő szintézise indítja el a fibrózis folyamatát. Az eredmény vagy a normális TIMP-1 szint miatti lassú progresszió (pl.: fibrózis rezisztens B6 egerek) vagy a vesefibrózis gyors progressziója a magas TIMP-1 expresszió miatt (pl.: fibrózisra hajlamos CBA egerek).

Összefoglalva, vizsgálati eredményeink alapján a genetikai háttér jelentősen befolyásolja a profibrotikus TGF- $\beta$  hatását. A genetikai háttér meghatározza a korai renalis EGR2 és TIMP-1 expressziót, amely az általunk vizsgált egér törzsekben rezisztenciát (B6) vagy érzékenységet (CBA) jelent a vesefibrózis progressziójával szemben (40. ábra). Kísérleteink továbbá az EGR2 és TIMP-1 tengely által indukált új

szabályozási utat is felvetnek. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a vesefibrózis elleni rezisztencia vagy érzékenység összefüggésben lehet az EGR2 és a TIMP-1 profibrotikus gének törzsfüggő expressziójával.

A magas TIMP-1 expresszió mellett csökkent PPAR $\gamma$  aktivitás észlelhető vesefibrózisban. A PPAR- $\gamma$  a sejtmagban található vasoprotektív és anti-fibrotikus hatással rendelkező nukleáris hormon receptor és transzkripciós faktor, amelyet elsőként a sejtek lipid- és glukóz metabolizmusát befolyásoló faktorként azonosítottak. A leggyakrabban használt PPAR $\gamma$  agonisták, a tiazolidindionok (TZD-k, troglitazon, pioglitazon, rosiglitazon) intracelluláris metabolikus útvonalakon keresztül fokozzák az inzulin hatását, valamint növelik az inzulin érzékenységet a szövetekben<sup>371</sup>. Ezentúl a TZD-k, amelyeket „glitazonoknak” is neveznek, emelik az adiponektin szintet, csökkentik a máj glükoneogenezisét, növelik az inzulin-dependens glükózfelvételt az izomban és a zsírszövetben<sup>372,373</sup>. A TZD-k csökkentik a triglicerid szintet harántcsíkolt- és szívizomsejtekben, valamint a pancreas-szigetsejtekben, a HDL-koleszterin szintet pedig növelik<sup>305-309</sup>. A PPAR $\gamma$  agonistákat (pl.: pioglitazon) széles körben használják a DM előtti állapot és a DM kezelésére<sup>300,374</sup>. A metabolikus hatásokon túl a glitazonok képesek közvetlenül gátolni a TGF- $\beta$  expresszióját, valamint csökkenthetik az intersticiális miofibroblasztok felhalmozódását<sup>317</sup>. A TZD-k közül a troglitazon és a rosiglitazon már nincs forgalomban. A PPAR $\gamma$  agonisták közül a pioglitazon anti-fibrotikus és antiproliferatív hatását korábbi eredmények is alátámasztják. Pozitív hatását igazolták 5/6 nephrectomia<sup>375</sup>, passzív Heymann nephritis<sup>376</sup>, akut mezangiális proliferatív glomerulonephritis, UUO<sup>317</sup> és az iszkémia-reperfúziós károsodás állatmodelljeiben<sup>313,377</sup>. Ugyanakkor még nem teljesen ismert, hogy a PPAR $\gamma$  agonisták vesefibrózisra gyakorolt kedvező hatása milyen transzkripciós szintű változásoknak köszönhető. Ezirányú kísérletünkben azt feltételeztük, hogy a pioglitazon kezelés gátolja a TGF- $\beta$ -val indukált vesefibrózist és annak progresszióját a profibrotikus transzkripciós faktorok expressziójának megváltoztatásával TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben. Vizsgálatunkban sem az emelkedett TGF- $\beta$  plazma szintnek, sem a pioglitazon kezelésnek nem volt hatása az egerek artériás középnyomására. Ez ellentmond azon eredményeknek, amelyek szerint a PPAR $\gamma$  agonisták csökkentik a vérnyomást az endotélialis NO szint emelésével és az ANGII gátlásával<sup>378</sup>. Mindemellett számos további vizsgálat szerint a PPAR $\gamma$  agonista rosiglitazon kezelés nem befolyásolja a

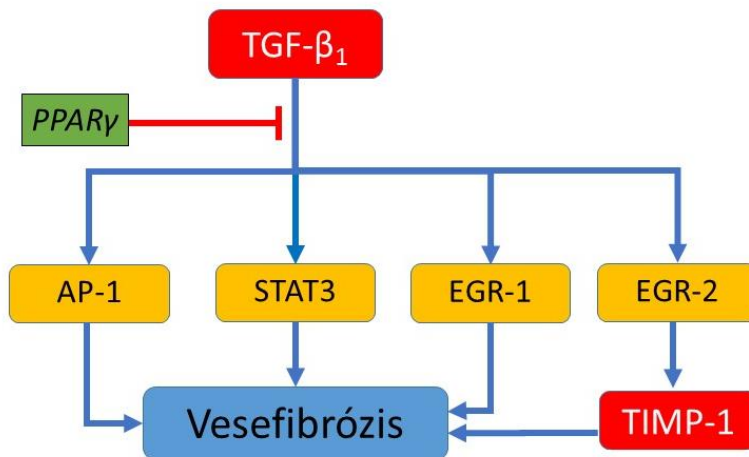
szisztémás vérnyomást C57Bl6/J egerekben<sup>379</sup>. Eredményeink ugyanakkor alátámasztják a PPAR $\gamma$  agonisták jótékony hatását a proteinuria csökkentésére. Proteinuriát csökkentő hatását már korábban bebizonyították a hipertónia és a DM állatmodelljeiben<sup>317</sup>, valamint T2DM-es betegekben<sup>378</sup>. A pioglitazon szignifikánsan mérsékelte mind a glomeruláris, mind a tubulointersticiális fibrotikus változásokat TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben. A tubuláris károsodás érzékeny biomarkere a lipocalin-2 csökkent expressziója is igazolja, amit Viau és mtsai. is leírtak, miszerint a lipocalin-2 gén inaktiválása (Lcn2<sup>-/-</sup>) véd a glomeruloszklerózis és az intersticiális fibrózis ellen a nefronszám 75%-os csökkentése után egerekben<sup>360</sup>. A fibronektin, a *Coll1a1*, a *Col3a1*, a *Tgfb1* mRNS expressziója is csökkent a kezelés hatására. A CTGF, mely a TGF- $\beta$  mediátora, a fibroblaszt proliferációban és az ECM termelésében vesz részt<sup>313</sup>. Kísérletünkben a szájon át adott pioglitazon gátolta a TGF- $\beta$  által aktivált *Ctgf* mRNS expressziót. Munkacsoportunk korábban már leírta, hogy a pioglitazon mérsékli a TGF- $\beta$ -val indukált pulmonalis artériás hipertóniát és a mátrix átépülést, mivel csökkenti a *Tgfb1*, *Ctgf*, *Acta2* mRNS expresszióját a pulmonalis artéria simaizomsejtjeiben<sup>380</sup>. Jelen kísérletünkben a csökkent *Acta2* és renalis *Tgfb1* mRNS expresszió alátámasztja a PPAR $\gamma$  agonisták korábban leírt gátló hatását a miofibroblaszt aktivációra és az ECM termelésre fibrotikus vesékben<sup>381</sup>.

Vesefibrózisban a TGF- $\beta$  nem csak az ECM szintézisét fokozza, hanem a TIMP-ek expressziójának fokozásával a degradációját is csökkenti<sup>382</sup>. Kísérletünkben a PPAR $\gamma$  agonista pioglitazon kezelés csökkentette a TIMP-1 expresszióját, normalizálta az MMP/TIMP egyensúlyt, ezáltal is mérsékelve a vesefibrózist. Másrészt a pioglitazon indirekt módon, transzkripcionálisan is befolyásolhatja az MMP/TIMP egyensúlyt. Mivel a TIMP-1 transzkripciót részben az AP-1 komplex szabályozza, vizsgáltuk az AP-1 komponensek közül a cFos és cJun expresszióját<sup>234</sup>. Mind a *cJun*-, mind a *cFos* mRNS expressziója szignifikánsan magasabb volt a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben, és normalizálódott pioglitazon kezelés hatására. Eredményeink nem csak az AP-1 transzkripció komplex jelentőségét támasztják alá a vesefibrózisban, hanem azt is, hogy a PPAR $\gamma$  megakadályozza az AP-1 aktivációt.

Más, TGF- $\beta$  által is indukált korai transzkripció faktorok, mint például az EGR-1 (melyet számos fibrotikus stimulus aktiválhat), közvetlenül serkenti a kollagén termelést, a mátrix akkumulációt és a miofibroblasztok differenciációját<sup>231, 270</sup>. Az *Egr1* mRNS

expressziója is emelkedett a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus vesékben, amit a pioglitazon kezelés mérsékel. Korábban az EGR-1 és a PPAR $\gamma$  közötti kapcsolatot nem vizsgálták vesékben, egyedül a PPAR $\gamma$  agonista rosiglitazon bőrfibrózist, és az EGR-1 expressziót csökkentő hatását ismertük a scleroderma egérmódeljében<sup>318</sup>. Ez alátámasztja a vesében tapasztalt eredményeinket, valamint felveti, hogy a PPAR $\gamma$  agonisták anti-fibrotikus hatásának egy új feltételezhető célpontja az EGR-1.

A fokozott TIMP-1 és a korai EGR-1 válasz mellett a JAK/STAT útvonal aktivációja is okozhat fokozott miofibroblaszt transzdifferentiációt a sérült vesében<sup>383</sup>. A STAT3 maga is kiválthatja a TGF- $\beta$  expresszió fokozódását<sup>252</sup>, továbbá a STAT3 gátlása mérsékli a tubulointersticiális fibrózist UUO modellben<sup>250</sup>. A fentebb leírtak mellett a TGF- $\beta$  indukálja a STAT3 foszforilációt, amit a pioglitazon képes gátolni<sup>380</sup>. Jelen kísérletünk a STAT3 és a PPAR $\gamma$  között további lehetséges kapcsolatra mutat rá vesefibrózisban, mivel a pioglitazon kezelés gátolta a STAT3 aktivációt TGF- $\beta$  transzgenikus egerek veséjében. Tanulmányunk alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PPAR $\gamma$  agonista pioglitazon anti-fibrotikus hatásában fontos szerepet játszik, hogy gátolja a STAT3 aktivációt, illetve csökkenti az *Egr1* és az AP-1 komponensek (*cFos*, *cJun*) mRNS expresszióját (41. ábra). Eredményeink megerősítik azon korábbi vizsgálati eredményeket, amelyek együttesen felvetik a PPAR $\gamma$  agonisták használatát krónikus vesebetegek jövőbeni kezelésében.



**41. ábra** A PPAR $\gamma$  agonista pioglitazonnak a TGF- $\beta_1$ -val indukált vesefibrózist csökkentő hatásának feltételezett mechanizmusa. Eredményeink alapján a PPAR $\gamma$  agonista pioglitazon csökkenti az EGR-1, EGR2, STAT3 és AP-1 transzkripciós faktorok expresszióját, melyek a TGF- $\beta_1$  indukált vesefibrózis fontos jelátviteli mediátorai. A korai renális EGR2-TIMP-1 expresszió fokozódás feltehetően itt is oki szerepet játszik a vesefibrózis patogenezisében.

## 6 KÖVETKEZTETÉSEK

Több vesefibrózis modellben (UUO, SNX, TGF $\beta$  transzgenikus egerek) is igazoltuk, hogy az egerek genetikai háttere (B6 vagy CBA) szorosan összefügg a drámai módon megváltozott korai EGR2, és az ebből következő TIMP-1 expresszióval, amely meghatározza a fibrózis progresszióját.

Transzgenikus modellünkben a TIMP-1 mellett legerősebben változó transzkripciós faktornak az EGR2 bizonyult. A transzgenikus egerek veséiben 5 napos korban a TIMP-1 mRNS expressziója 50%-kal volt magasabb a CBAxB6-TGF- $\beta$  vesékben, mint a B6-TGF- $\beta$  vesékben, valamint a kontroll egerekben észlelt TIMP-1 mRNS expresszió, amelyet fokozott EGR2 mRNS expresszió kísért, és ami jól korrelált a TIMP-1 expresszióval. Ezzel szemben az újszülött B6-TGF- $\beta$  és a CBAxB6-TGF- $\beta$  egerek veséiben azonos volt a TIMP-1 mRNS és az EGR2 mRNS expressziója.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a korai renalis EGR2 és TIMP-1 expresszió CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben megelőzi az ECM komponensek fokozott expresszióját, így feltehetőleg oki szereppel bírnak a felgyorsult fibrózis patogenezisében.

Hasonló törzsfüggő korai EGR2 és TIMP-1 expresszió változásokat figyeltünk meg UUO vagy SNX után. UUO-t követően mind a B6, mind a CBA egerekben megemelkedett a vizsgált transzkripciós faktorok (Col1a1, EGR-1, EGR2, TIMP-1, RUNX1) mennyisége, azonban a CBA egereknél már a kontroll mintákban is magasabb szinteket láttunk, és a műtét után is jóval nagyobb mértékű volt az mRNS expresszió növekedés. A TIMP-1 mRNS expresszió alacsony volt mind a CBA, mind a B6 törzsből, és az UUO műtétet követően mindkét egértörzsből megemelkedett a szintje az ellenoldali kontroll vesékhez képest, de a CBA egerekben nagyobb mértékű emelkedést láttunk.

A TIMP-1 vesefibrózisban betöltött központi szerepének további bizonyítására vizsgáltuk TIMP-1 hiányos CBAxB6 egerekben SNX hatására kialakuló vesefibrózist, valamint a TIMP-1 neutralizáció hatását gyors progressziót mutató TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben. TIMP-1<sup>-/-</sup> SNX vesékben enyhe, de nem szignifikáns glomeruloszklerózist, intersticiális fibrózist láttunk. A TIMP-1 neutralizáló antitesttel enyhíteni tudtuk a TGF- $\beta$  erős profibrotikus hatását CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben, amit a mérsékeltebb vesefibrózis, proteinuria és alacsonyabb szérum urea szint is igazolt. Ezzel bizonyítást nyert, hogy a vesefibrózisra való genetikai fogékonyság erősen összefügg az EGR2 és a



TIMP-1 expressziójával, nemcsak a TGF- $\beta$  transzgenikus modellben, hanem UUO vagy SNX modellben is.

B6 és CBA egerekből izolált primér mezangiális sejtekben is vizsgáltuk a genetikai háttértől függő TIMP-1 szabályozást. A CBA mezangiális sejtekben TGF- $\beta$  kezelés hatására megemelkedett mind a *Tgfb1*, *Egr1*, *Colla1*, *Timpl*, *Runx1* mRNS szintje, míg a kontroll sejtekben, valamint a B6-TGF- $\beta$  mezangiális sejtekben e faktorok szintje alacsony maradt. Továbbá az EGR2 túltermelése HEK293 sejtekben fokozta a TIMP-1 expresszióját *in vitro*. A pEGR2 transzfekció az EGR2 fehérje expressziójának szignifikáns emelkedését eredményezte, amely a TIMP-1 mRNS és fehérje expresszió fokozódását okozta. Így alátámasztottuk, hogy primér egér mezangiális sejtekben a TGF- $\beta$  indukált TIMP-1 termelése is a genetikailag meghatározott EGR-1 és EGR2 transzkripciós faktorok szabályozásától függ B6 és CBA törzsekben, valamint az EGR2 túltermelése *in vitro* önmagában képes TIMP-1 választ indukálni.

Ezentúl vesefibrózisban csökkent PPAR- $\gamma$  aktivitás figyelhető meg. Célunk volt annak vizsgálata, hogy a PPAR- $\gamma$  agonista pioglitazon kezelés hogyan befolyásolja a TGF- $\beta$  indukált vesefibrózist, valamint a transzkripciós szintű szabályozási útvonalakat transzgenikus egerekben. A krónikus pioglitazon kezelés jelentősen csökkentette a TGF- $\beta$  profibrotikus hatását a vese interstitiumában, gátolta az EGR-1, STAT3 és az AP-1 transzkripciós faktorokat. Eredményeink segíthetnek tisztázni a PPAR $\gamma$  és a tubulointersticiális fibrózis kapcsolatát, valamint arra utalnak, hogy a PPAR $\gamma$  agonisták hatékonyak lehetnek a CKD kezelésében.

## 7 ÖSSZEFOGLALÁS

A krónikus vesebetegség évek, évtizedek alatt végstádiumú veseelégtelenséghez vezet, amelynek háttérében a progresszív vesefibrózis áll. A betegség progressziója egyéni eltérést mutat emberekben és állatokban egyaránt, ennek valószínű oka a különböző genetikai háttér. Máig sem ismertek azok a molekuláris mechanizmusok, amelyek felelősek az eltérő genetikai fogékonyságért. Megvizsgáltuk a genetikai háttér, valamint az UUO (unilaterális uréter obstrukció) és a SNX (szubtotális veseabláció) vesefibrózisra gyakorolt hatását TGF- $\beta$ 1 transzgenikus egerekben, ill. fibrózisra fogékony és arra rezisztens egértörzsekben. A B6-TGF- $\beta$  egerek enyhe vesekárosodásával és hosszabb túlélésével szemben a CBAxB6xTGF- $\beta$  egerek túlélése rövid volt és bennük súlyos vesefibrózis alakult ki, aminek a háttérében fokozott EGR2 és TIMP-1 expressziót találtunk. Korai EGR2 és TIMP-1 expresszió változásokat figyeltünk meg UUO és SNX után is. A TIMP-1 neutralizációja ill. hiánya szignifikánsan enyhítette a vesefibrózist, mind a transzgenikus egerekben, mind SNX modellben *in vivo*. Az EGR2 szerepét mutatja, hogy *in vitro* az EGR2 túltermelése aktiválta a TIMP-1 expresszióját HEK293 sejtekben. Megfigyeléseink a genetikai háttér és vesefibrózis progressziója közötti szoros kapcsolatot támasztják alá, melyben fontos szerepet játszik a korai fokozott EGR2 és a TIMP-1 expresszió. Az eredmények transzlációs jelentőségét mutatja, hogy humán FSGS vesebiopsziákban szintén fokozott EGR2 és TIMP-1 expressziót mutattunk ki.

Vesefibrózisban csökkent PPAR- $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) aktivitás figyelhető meg. A PPAR- $\gamma$  anti-fibrotikus hatással rendelkező ligand aktivált transzkripciós faktor és nukleáris hormon receptor. A PPAR- $\gamma$  agonista kezelés (pioglitazon) növeli az inzulin érzékenységet, csökkenti a glukoneogenezist, és a vércukorszintet 2-es típusú DM-ban, továbbá mérsékli a vesefibrózist a DN és az ischaemia/reperfúziós károsodás állatmodelljében. A TGF- $\beta$ , a PPAR- $\gamma$  és egyéb transzkripciós faktorok közötti kapcsolat még nem ismert vesefibrózisban. Célunk volt annak vizsgálata, hogy a PPAR- $\gamma$  agonista pioglitazon kezelés hogyan befolyásolja a TGF- $\beta$ -val indukált vesefibrózist, valamint a transzkripciós szintű szabályozási útvonalakat transzgenikus egerekben. A krónikus pioglitazon kezelés jelentősen lassította a TGF- $\beta$ 1-val indukált vesefibrózist az EGR-1, a STAT3 és az AP-1 transzkripciós faktorok gátlásán keresztül. Eredményünk arra utal, hogy a PPAR $\gamma$  agonisták hatékonyak lehetnek a CKD kezelésében.

## 8 SUMMARY

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by progressive renal fibrosis and leads to end-stage renal disease over the years. The progression shows variability in both humans and animals, probably due to differences in genetic susceptibility. However, the molecular mechanisms responsible for differences in genetic susceptibility and the speed of progression are still unknown. We examined the effect of genetic background on renal fibrosis in TGF- $\beta$ 1 transgenic mice as well as in UUO (unilateral ureter obstruction) and SNX (subtotal renal ablation) models using fibrosis-susceptible and resistant strains. In contrast to the mild renal damage and longer survival in B6-TGF- $\beta$  mice, CBAxB6-TGF- $\beta$  mice had short survival and severe renal fibrosis with increased EGR2 and TIMP-1 expression. Similar strain-dependent changes were observed in early EGR2 and TIMP-1 expression after UUO or SNX. TIMP-1 neutralization and deficiency significantly alleviated renal fibrosis both in transgenic and SNX models, respectively. Furthermore, overexpression of EGR2 resulted in elevated TIMP-1 expression in HEK293 cells.

These results confirmed the strong relationship between genetic background and renal fibrosis progression, in which early interplay of increased EGR2 and TIMP-1 plays an important role. The translational significance of these experimental results is underscored by the increased EGR2 and TIMP-1 expression found in human FSGS renal biopsies.

Furthermore, reduced PPAR- $\gamma$  activity is detected in renal fibrosis. PPAR- $\gamma$  is a transcription factor and nuclear hormone receptor with anti-fibrotic effects, predominantly found in the renal collecting ducts, proximal tubules, podocytes and mesangial cells. PPAR- $\gamma$  agonist treatment (eg. pioglitazone) increase insulin sensitivity, reduce gluconeogenesis and blood glucose levels in T2DM and reduce renal fibrosis in animal models of diabetic nephropathy and ischaemia/reperfusion injury. Still, the relationship between TGF- $\beta$ , PPAR- $\gamma$  and other transcription factors in renal fibrosis were poorly investigated. We aimed to study the effect of PPAR- $\gamma$  agonist pioglitazone treatment on TGF- $\beta$  induced renal fibrosis and transcriptional regulatory pathways in transgenic mice. Chronic pioglitazone administration significantly reduced TGF- $\beta$ 1 induced renal fibrosis via the attenuation of EGR-1, STAT-3 and AP-1 transcription factors in transgenic mice. Thus, our results further suggest that PPAR $\gamma$  agonists might be effective in the future treatment of CKD.

## 9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Levey AS, Coresh J. (2012) Chronic kidney disease. *Lancet*, 379: 165-180.
2. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. (2016) Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11: e0158765.
3. Saran R, Robinson B, Abbott KC, Agodoa LY, Albertus P, Ayanian J, Balkrishnan R, Bragg-Gresham J, Cao J, Chen JL, Cope E, Dharmarajan S, Dietrich X, Eckard A, Eggers PW, Gaber C, Gillen D, Gipson D, Gu H, Hailpern SM, Hall YN, Han Y, He K, Hebert H, Helmuth M, Herman W, Heung M, Hutton D, Jacobsen SJ, Ji N, Jin Y, Kalantar-Zadeh K, Kapke A, Katz R, Kovesdy CP, Kurtz V, Lavalee D, Li Y, Lu Y, McCullough K, Molnar MZ, Montez-Rath M, Morgenstern H, Mu Q, Mukhopadhyay P, Nallamothu B, Nguyen DV, Norris KC, O'Hare AM, Obi Y, Pearson J, Pisoni R, Plattner B, Port FK, Potukuchi P, Rao P, Ratkowiak K, Ravel V, Ray D, Rhee CM, Schaubel DE, Selewski DT, Shaw S, Shi J, Shieu M, Sim JJ, Song P, Soohoo M, Steffick D, Streja E, Tamura MK, Tentori F, Tilea A, Tong L, Turf M, Wang D, Wang M, Woodside K, Wyncott A, Xin X, Zang W, Zepel L, Zhang S, Zho H, Hirth RA, Shahinian V. (2017) US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*, 69: A7-A8.
4. Liu ZH. (2013) Nephrology in china. *Nat Rev Nephrol*, 9: 523-528.
5. Imre DK. (2015) A krónikus vesebetegek és a dializált betegek epidemiológiája. *Hypertonia és Nephrologia*, 19: S1-S80.
6. Kulcsár I IM, Kovács L. (2016) Dialíziskezelés Magyarországon: 2010-2015. *Hypertonia és Nephrologia* 20: 208-212.
7. Grynberg K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ. (2017) The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis. *Front Physiol*, 8: 829.
8. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. (2013) Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*, 382: 260-272.
9. Obrador GT, Schultheiss UT, Kretzler M, Langham RG, Nangaku M, Pecoits-Filho R, Pollock C, Rossert J, Correa-Rotter R, Stenvinkel P, Walker R, Yang

- CW, Fox CS, Kottgen A. (2017) Genetic and environmental risk factors for chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* (2011), 7: 88-106.
10. Vaidya SR, Aeddula NR. Chronic Renal Failure. StatPearls. Treasure Island (FL), 2019.
  11. Bulow RD, Boor P. (2019) Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem*, 67: 643-661.
  12. Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. (2016) Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab*, 27: 681-695.
  13. Gu YY, Liu XS, Huang XR, Yu XQ, Lan HY. (2020) Diverse Role of TGF-beta in Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol*, 8: 123.
  14. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. (2017) Chronic Kidney Disease. *Lancet*, 389: 1238-1252.
  15. Lamb EJ, Levey AS, Stevens PE. (2013) The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guideline update for chronic kidney disease: evolution not revolution. *Clin Chem*, 59: 462-465.
  16. Nayak-Rao S, Shenoy MP. (2017) Stroke in Patients with Chronic Kidney Disease...: How do we Approach and Manage it? *Indian J Nephrol*, 27: 167-171.
  17. Subbiah AK, Chhabra YK, Mahajan S. (2016) Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: a neglected subgroup. *Heart Asia*, 8: 56-61.
  18. Zheng DH, Han ZQ, Wang XX, Ma D, Zhang J. (2019) Erythropoietin attenuates high glucose-induced oxidative stress and inhibition of osteogenic differentiation in periodontal ligament stem cell (PDLSCs). *Chem Biol Interact*, 305: 40-47.
  19. Hou YC, Lu CL, Lu KC. (2018) Mineral bone disorders in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*, 23 Suppl 4: 88-94.
  20. Juppner H. (2011) Phosphate and FGF-23. *Kidney Int*, 79: S24-27.
  21. De Boer IH, Gorodetskaya I, Young B, Hsu CY, Chertow GM. (2002) The severity of secondary hyperparathyroidism in chronic renal insufficiency is GFR-dependent, race-dependent, and associated with cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol*, 13: 2762-2769.
  22. Zemaitis MR, Foris LA, Katta S, Bashir K. Uremia. StatPearls. Treasure Island (FL), 2021.

23. Bello AK, Alrukhaimi M, Ashuntantang GE, Basnet S, Rotter RC, Douthat WG, Kazancioglu R, Kottgen A, Nangaku M, Powe NR, White SL, Wheeler DC, Moe O. (2017) Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action. *Kidney Int Suppl* (2011), 7: 122-129.
24. Wynn TA. (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*, 117: 524-529.
25. Cox TR, Erler JT. (2014) Molecular pathways: connecting fibrosis and solid tumor metastasis. *Clin Cancer Res*, 20: 3637-3643.
26. Rybinski B, Franco-Barraza J, Cukierman E. (2014) The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. *Physiol Genomics*, 46: 223-244.
27. Fintha A, Gasparics A, Rosivall L, Sebe A. (2019) Therapeutic Targeting of Fibrotic Epithelial-Mesenchymal Transition-An Outstanding Challenge. *Front Pharmacol*, 10: 388.
28. Herrera J, Henke CA, Bitterman PB. (2018) Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J Clin Invest*, 128: 45-53.
29. Eddy AA, Neilson EG. (2006) Chronic kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol*, 17: 2964-2966.
30. Mutsaers HA, Olinga P. (2016) Editorial: Organ Fibrosis: Triggers, Pathways, and Cellular Plasticity. *Front Med (Lausanne)*, 3: 55.
31. Xu Z, Li W, Han J, Zou C, Huang W, Yu W, Shan X, Lum H, Li X, Liang G. (2017) Angiotensin II induces kidney inflammatory injury and fibrosis through binding to myeloid differentiation protein-2 (MD2). *Sci Rep*, 7: 44911.
32. Eddy AA. (2000) Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*, 15: 290-301.
33. Imig JD, Ryan MJ. (2013) Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol*, 3: 957-976.
34. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. (1994) Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*, 93: 2431-2437.
35. Wolf G, Neilson EG. (1993) Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol*, 3: 1531-1540.

36. Ruiz-Ortega M, Egido J. (1997) Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. *Kidney Int*, 52: 1497-1510.
37. Anders HJ. (2010) Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 21: 1270-1274.
38. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P. (2010) Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 330: 362-366.
39. Visse R, Nagase H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, 92: 827-839.
40. Vaidya SR, Aeddula NR. *Chronic Renal Failure*. StatPearls. Treasure Island (FL), 2020.
41. Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. (2002) Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem*, 277: 4223-4231.
42. Soylemezoglu O, Wild G, Dalley AJ, MacNeil S, Milford-Ward A, Brown CB, el Nahas AM. (1997) Urinary and serum type III collagen: markers of renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*, 12: 1883-1889.
43. Wynn TA, Ramalingam TR. (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*, 18: 1028-1040.
44. Grgic I, Duffield JS, Humphreys BD. (2012) The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 27: 183-193.
45. Eyden B. (2001) The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. *Ultrastruct Pathol*, 25: 39-50.
46. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. (2008) Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*, 19: 2282-2287.
47. Mack M, Yanagita M. (2015) Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int*, 87: 297-307.
48. Meng XM. (2019) Inflammatory Mediators and Renal Fibrosis. *Adv Exp Med Biol*, 1165: 381-406.

49. Lenselink EA. (2015) Role of fibronectin in normal wound healing. *Int Wound J*, 12: 313-316.
50. Assad L, Schwartz MM, Virtanen I, Gould VE. (1993) Immunolocalization of tenascin and cellular fibronectins in diverse glomerulopathies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 63: 307-316.
51. Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P. (2014) The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair*, 7: 4.
52. Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. (2003) TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res*, 282: 90-100.
53. Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, Clayton A, Bowen T, Phillips AO, Steadman R. (2013) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *J Biol Chem*, 288: 14824-14838.
54. August P, Suthanthiran M. (2003) Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney Int Suppl*: S99-104.
55. Hong KM, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. (2007) Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, 282: 22910-22920.
56. Wada T, Sakai N, Matsushima K, Kaneko S. (2007) Fibrocytes: a new insight into kidney fibrosis. *Kidney Int*, 72: 269-273.
57. Leonóra Himmer ES, Tivadas Tulassay and Ádám Vannay. (2012) Immunological and Molecular Mechanisms Leading to Fibrosis: Origin of Renal Myofibroblasts.
58. Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS. (2008) Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol*, 173: 1617-1627.
59. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. (2010) Fate tracing reveals the pericyte



- and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol*, 176: 85-97.
60. Schmitt-Graff A, Kruger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H. (1991) Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol*, 138: 1233-1242.
  61. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, Denton CP, Black CM, Abraham DJ. (2005) Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis. *Arthritis Res Ther*, 7: R1113-1123.
  62. Kramann R, Humphreys BD. (2014) Kidney pericytes: roles in regeneration and fibrosis. *Semin Nephrol*, 34: 374-383.
  63. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R. (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med*, 19: 1047-1053.
  64. Lee EH, Joo CK. (1999) Role of transforming growth factor-beta in transdifferentiation and fibrosis of lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40: 2025-2032.
  65. Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119: 1420-1428.
  66. Zeisberg M, Neilson EG. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119: 1429-1437.
  67. Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. (2011) Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle*, 10: 2865-2873.
  68. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*, 13: 952-961.
  69. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. (2007) Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem*, 282: 23337-23347.

70. Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. (2006) Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 13180-13185.
71. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. (2008) The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer*, 99: 1375-1379.
72. Grande M, Franzen A, Karlsson JO, Ericson LE, Heldin NE, Nilsson M. (2002) Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J Cell Sci*, 115: 4227-4236.
73. Stump RJ, Lovicu FJ, Ang SL, Pandey SK, McAvoy JW. (2006) Lithium stabilizes the polarized lens epithelial phenotype and inhibits proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition. *J Pathol*, 210: 249-257.
74. Zvaifler NJ. (2006) Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*, 8: 210.
75. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. (2004) NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*, 114: 569-581.
76. Yang X, Han M, Han H, Wang B, Li S, Zhang Z, Zhao W. (2017) Silencing Snail suppresses tumor cell proliferation and invasion by reversing epithelial-to-mesenchymal transition and arresting G2/M phase in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*, 50: 1251-1260.
77. Duffield JS. (2010) Macrophages and immunologic inflammation of the kidney. *Semin Nephrol*, 30: 234-254.
78. Liu M, Ning X, Li R, Yang Z, Yang X, Sun S, Qian Q. (2017) Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *J Cell Mol Med*, 21: 1248-1259.
79. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. (2017) NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2.
80. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory

- cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101: 890-898.
81. Huen SC, Moeckel GW, Cantley LG. (2013) Macrophage-specific deletion of transforming growth factor-beta1 does not prevent renal fibrosis after severe ischemia-reperfusion or obstructive injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 305: F477-484.
  82. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA, Neilson EG. (2002) Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int*, 61: 1714-1728.
  83. Yang J, Shultz RW, Mars WM, Wegner RE, Li Y, Dai C, Nejak K, Liu Y. (2002) Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest*, 110: 1525-1538.
  84. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. (2003) BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*, 9: 964-968.
  85. Zeisberg M, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Muller GA, Kalluri R. (2003) Bone morphogenic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285: F1060-1067.
  86. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. (2005) Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem*, 280: 8094-8100.
  87. Mantel PY, Schmidt-Weber CB. (2011) Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance. *Methods Mol Biol*, 677: 303-338.
  88. Meng XM, Tang PM, Li J, Lan HY. (2015) TGF-beta/Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol*, 6: 82.
  89. Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. (2003) TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int*, 64: 844-856.
  90. Bani-Hani AH, Campbell MT, Meldrum DR, Meldrum KK. (2008) Cytokines in epithelial-mesenchymal transition: a new insight into obstructive nephropathy. *J Urol*, 180: 461-468.

91. Meng XM, Chung AC, Lan HY. (2013) Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci (Lond)*, 124: 243-254.
92. Ghosh AK, Quaggin SE, Vaughan DE. (2013) Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238: 461-481.
93. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, 342: 1350-1358.
94. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA. (1996) Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int*, 49: 461-469.
95. Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, Okada M, Hino S, Miyamoto H, Maki S. (1993) Transforming growth factor-beta protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest*, 68: 154-163.
96. Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E. (1993) Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest*, 92: 2597-2601.
97. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. (1992) Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int*, 41: 1213-1221.
98. Sureshbabu A, Muhsin SA, Choi ME. (2016) TGF-beta signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. *Am J Physiol Renal Physiol*, 310: F596-F606.
99. Tomooka S, Border WA, Marshall BC, Noble NA. (1992) Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int*, 42: 1462-1469.
100. Creely JJ, DiMari SJ, Howe AM, Haralson MA. (1992) Effects of transforming growth factor-beta on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. *Am J Pathol*, 140: 45-55.
101. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, Vlachojannis JG. (2002) Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*, 17: 2145-2152.

102. Murakami K, Takemura T, Hino S, Yoshioka K. (1997) Urinary transforming growth factor-beta in patients with glomerular diseases. *Pediatr Nephrol*, 11: 334-336.
103. Guerquin MJ, Charvet B, Nourissat G, Havis E, Ronsin O, Bonnin MA, Ruggiu M, Olivera-Martinez I, Robert N, Lu Y, Kadler KE, Baumberger T, Doursounian L, Berenbaum F, Duprez D. (2013) Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair. *J Clin Invest*, 123: 3564-3576.
104. Avouac J, Palumbo K, Tomcik M, Zerr P, Dees C, Horn A, Maurer B, Akhmetshina A, Beyer C, Sadowski A, Schneider H, Shiozawa S, Distler O, Schett G, Allanore Y, Distler JH. (2012) Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor beta-mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum*, 64: 1642-1652.
105. Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, Clark IM. (2003) The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem*, 278: 10304-10313.
106. Verrecchia F, Tacheau C, Schorpp-Kistner M, Angel P, Mauviel A. (2001) Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. *Oncogene*, 20: 2205-2211.
107. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. (1990) Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol*, 10: 1492-1497.
108. Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C. (1997) Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J Biol Chem*, 272: 1429-1432.
109. McGaha TL, Koder T, Spiera H, Stan AC, Pines M, Bona CA. (2002) Halofuginone inhibition of COL1A2 promoter activity via a c-Jun-dependent mechanism. *Arthritis Rheum*, 46: 2748-2761.
110. Tecalco-Cruz AC, Rios-Lopez DG, Vazquez-Victorio G, Rosales-Alvarez RE, Macias-Silva M. (2018) Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major

- regulators of the TGF-beta/Smad signaling pathway in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*, 3: 15.
111. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H. (2001) Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*, 187: 265-276.
  112. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. (2003) Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*, 116: 217-224.
  113. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. (1990) Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol*, 110: 1361-1367.
  114. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*, 96: 319-328.
  115. Robertson IB, Rifkin DB. (2013) Unchaining the beast; insights from structural and evolutionary studies on TGFbeta secretion, sequestration, and activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 24: 355-372.
  116. Shi M, Zhu J, Wang R, Chen X, Mi L, Walz T, Springer TA. (2011) Latent TGF-beta structure and activation. *Nature*, 474: 343-349.
  117. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370: 341-347.
  118. Chen HY, Huang XR, Wang W, Li JH, Heuchel RL, Chung AC, Lan HY. (2011) The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential. *Diabetes*, 60: 590-601.
  119. Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, 389: 631-635.
  120. Miyazawa K, Miyazono K. (2017) Regulation of TGF-beta Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9.
  121. Afrakhte M, Moren A, Jossan S, Itoh S, Sampath K, Westermarck B, Heldin CH, Heldin NE, ten Dijke P. (1998) Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun*, 249: 505-511.

122. Zhu HJ, Iaria J, Sizeland AM. (1999) Smad7 differentially regulates transforming growth factor beta-mediated signaling pathways. *J Biol Chem*, 274: 32258-32264.
123. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*, 6: 1365-1375.
124. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K. (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem*, 276: 12477-12480.
125. Zhu L, Chen S, Chen Y. (2011) Unraveling the biological functions of Smad7 with mouse models. *Cell Biosci*, 1: 44.
126. Chung AC, Huang XR, Zhou L, Heuchel R, Lai KN, Lan HY. (2009) Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. *Nephrol Dial Transplant*, 24: 1443-1454.
127. Lin X, Liang M, Feng XH. (2000) Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, 275: 36818-36822.
128. Li J, Qu X, Yao J, Caruana G, Ricardo SD, Yamamoto Y, Yamamoto H, Bertram JF. (2010) Blockade of endothelial-mesenchymal transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*, 59: 2612-2624.
129. Liu GX, Li YQ, Huang XR, Wei L, Chen HY, Shi YJ, Heuchel RL, Lan HY. (2013) Disruption of Smad7 promotes ANG II-mediated renal inflammation and fibrosis via Sp1-TGF-beta/Smad3-NF.kappaB-dependent mechanisms in mice. *PLoS One*, 8: e53573.
130. Lan HY, Mu W, Tomita N, Huang XR, Li JH, Zhu HJ, Morishita R, Johnson RJ. (2003) Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model. *J Am Soc Nephrol*, 14: 1535-1548.
131. Hou CC, Wang W, Huang XR, Fu P, Chen TH, Sheikh-Hamad D, Lan HY. (2005) Ultrasound-microbubble-mediated gene transfer of inducible Smad7 blocks

- transforming growth factor-beta signaling and fibrosis in rat remnant kidney. *Am J Pathol*, 166: 761-771.
132. Ka SM, Huang XR, Lan HY, Tsai PY, Yang SM, Shui HA, Chen A. (2007) Smad7 gene therapy ameliorates an autoimmune crescentic glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*, 18: 1777-1788.
  133. Ka SM, Yeh YC, Huang XR, Chao TK, Hung YJ, Yu CP, Lin TJ, Wu CC, Lan HY, Chen A. (2012) Kidney-targeting Smad7 gene transfer inhibits renal TGF-beta/MAD homologue (SMAD) and nuclear factor kappaB (NF-kappaB) signalling pathways, and improves diabetic nephropathy in mice. *Diabetologia*, 55: 509-519.
  134. Attisano L, Wrana JL. (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, 296: 1646-1647.
  135. Derynck R, Zhang YE. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425: 577-584.
  136. Li Y, Tan X, Dai C, Stolz DB, Wang D, Liu Y. (2009) Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 20: 1907-1918.
  137. Loeffler I, Wolf G. (2014) Transforming growth factor-beta and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 29 Suppl 1: i37-i45.
  138. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. (2012) A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*, 44: 469-474.
  139. Isaka Y. (2018) Targeting TGF-beta Signaling in Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci*, 19.
  140. Kim SI, Kwak JH, Zachariah M, He Y, Wang L, Choi ME. (2007) TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292: F1471-1478.
  141. Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. (2003) Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest*, 112: 1486-1494.



142. Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E. (1996) Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*, 50: 148-155.
143. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. (1990) Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature*, 346: 371-374.
144. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. (1992) Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*, 360: 361-364.
145. Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA. (1996) Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med*, 2: 418-423.
146. Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, Tsujie M, Sudo T, Ohno N, Border WA, Noble NA, Kaneda Y, Hori M, Imai E. (1999) Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*, 55: 465-475.
147. Kasuga H, Ito Y, Sakamoto S, Kawachi H, Shimizu F, Yuzawa Y, Matsuo S. (2001) Effects of anti-TGF-beta type II receptor antibody on experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*, 60: 1745-1755.
148. King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, Gorina E, Hopkins PM, Kardatzke D, Lancaster L, Lederer DJ, Nathan SD, Pereira CA, Sahn SA, Sussman R, Swigris JJ, Noble PW, Group AS. (2014) A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 370: 2083-2092.
149. Sharma K, Ix JH, Mathew AV, Cho M, Pflueger A, Dunn SR, Francos B, Sharma S, Falkner B, McGowan TA, Donohue M, Ramachandrarao S, Xu R, Fervenza FC, Kopp JB. (2011) Pirfenidone for diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 22: 1144-1151.
150. Voelker J, Berg PH, Sheetz M, Duffin K, Shen T, Moser B, Greene T, Blumenthal SS, Rychlik I, Yagil Y, Zaoui P, Lewis JB. (2017) Anti-TGF-beta1 Antibody Therapy in Patients with Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 28: 953-962.

151. Trachtman H, Fervenza FC, Gipson DS, Heering P, Jayne DR, Peters H, Rota S, Remuzzi G, Rump LC, Sellin LK, Heaton JP, Streisand JB, Hard ML, Ledbetter SR, Vincenti F. (2011) A phase 1, single-dose study of fresolimumab, an anti-TGF-beta antibody, in treatment-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 79: 1236-1243.
152. Vincenti F, Fervenza FC, Campbell KN, Diaz M, Gesualdo L, Nelson P, Praga M, Radhakrishnan J, Sellin L, Singh A, Thornley-Brown D, Veronese FV, Accomando B, Engstrand S, Ledbetter S, Lin J, Neylan J, Tumlin J, Focal Segmental Glomerulosclerosis Study G. (2017) A Phase 2, Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study of Fresolimumab in Patients With Steroid-Resistant Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Int Rep*, 2: 800-810.
153. Huang XR, Chung AC, Wang XJ, Lai KN, Lan HY. (2008) Mice overexpressing latent TGF-beta1 are protected against renal fibrosis in obstructive kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295: F118-127.
154. Huang XR, Chung AC, Zhou L, Wang XJ, Lan HY. (2008) Latent TGF-beta1 protects against crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 19: 233-242.
155. Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, Goldschmeding R. (1998) Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int*, 53: 853-861.
156. Chen CC, Lau LF. (2009) Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 41: 771-783.
157. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. (1993) Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell*, 4: 637-645.
158. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, Takehara K. (1995) Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*, 105: 280-284.
159. Abraham D. (2008) Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc? *Rheumatology (Oxford)*, 47 Suppl 5: v8-9.

160. Kono M, Nakamura Y, Suda T, Kato M, Kaida Y, Hashimoto D, Inui N, Hamada E, Miyazaki O, Kurashita S, Fukamachi I, Endo K, Ng PS, Takehara K, Nakamura H, Maekawa M, Chida K. (2011) Plasma CCN2 (connective tissue growth factor; CTGF) is a potential biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Clin Chim Acta*, 412: 2211-2215.
161. Morales MG, Cabello-Verrugio C, Santander C, Cabrera D, Goldschmeding R, Brandan E. (2011) CTGF/CCN-2 over-expression can directly induce features of skeletal muscle dystrophy. *J Pathol*, 225: 490-501.
162. Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, Lin A, Yeowell D. (2011) Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 4: 4.
163. Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K, Okada Y. (2002) Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J*, 16: 219-221.
164. Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, Krumlauf R, Smith JC. (2004) Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Development*, 131: 2137-2147.
165. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. (2002) Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol*, 4: 599-604.
166. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. (2003) Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development*, 130: 2779-2791.
167. Suzuki D, Miyazaki M, Jinde K, Koji T, Yagame M, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H. (1997) In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 52: 111-119.

168. Sanders JS, van Goor H, Hanemaaijer R, Kallenberg CG, Stegeman CA. (2004) Renal expression of matrix metalloproteinases in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*, 19: 1412-1419.
169. Nakamura T, Ebihara I, Tomino Y, Koide H. (1995) Effect of a specific endothelin A receptor antagonist on murine lupus nephritis. *Kidney Int*, 47: 481-489.
170. Eddy AA. (1996) Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 7: 2495-2508.
171. Sharma AK, Mauer SM, Kim Y, Michael AF. (1995) Altered expression of matrix metalloproteinase-2, TIMP, and TIMP-2 in obstructive nephropathy. *J Lab Clin Med*, 125: 754-761.
172. Sterzel RB, Luft FC, Gao Y, Schnermann J, Briggs JP, Ganten D, Waldherr R, Schnabel E, Kriz W. (1988) Renal disease and the development of hypertension in salt-sensitive Dahl rats. *Kidney Int*, 33: 1119-1129.
173. Striker GE, He CJ, Liu ZH, Yang DC, Zalups RK, Esposito C, Striker LJ. (1995) Pathogenesis of nonimmune glomerulosclerosis: studies in animals and potential applications to humans. *Lab Invest*, 73: 596-605.
174. Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, Whitham SE, Docherty AJ, Angel P, Heath JK. (1987) Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J*, 6: 1899-1904.
175. Stetler-Stevenson WG. (1996) Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol*, 148: 1345-1350.
176. Murphy G, Nagase H. (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, 29: 290-308.
177. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. (2010) Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141: 52-67.
178. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 221-233.
179. Provenzano M, Andreucci M, Garofalo C, Faga T, Michael A, Ielapi N, Grande R, Sapienza P, Franciscis S, Mastroberto P, Serra R. (2020) The Association of Matrix Metalloproteinases with Chronic Kidney Disease and Peripheral Vascular Disease: A Light at the End of the Tunnel? *Biomolecules*, 10.

180. Tallant C, Marrero A, Gomis-Ruth FX. (2010) Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta*, 1803: 20-28.
181. Overall CM. (2001) Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol Biol*, 151: 79-120.
182. Parrish AR. (2017) Matrix Metalloproteinases in Kidney Disease: Role in Pathogenesis and Potential as a Therapeutic Target. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 148: 31-65.
183. Zakiyanov O, Kalousova M, Zima T, Tesar V. (2019) Matrix Metalloproteinases in Renal Diseases: A Critical Appraisal. *Kidney Blood Press Res*, 44: 298-330.
184. Tan RJ, Liu Y. (2012) Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302: F1351-1361.
185. Catania JM, Chen G, Parrish AR. (2007) Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292: F905-911.
186. Henger A, Kretzler M, Doran P, Bonrouhi M, Schmid H, Kiss E, Cohen CD, Madden S, Porubsky S, Grone EF, Schlondorff D, Nelson PJ, Grone HJ. (2004) Gene expression fingerprints in human tubulointerstitial inflammation and fibrosis as prognostic markers of disease progression. *Kidney Int*, 65: 904-917.
187. Hu Y, Ivashkiv LB. (2006) Costimulation of chemokine receptor signaling by matrix metalloproteinase-9 mediates enhanced migration of IFN- $\alpha$  dendritic cells. *J Immunol*, 176: 6022-6033.
188. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. (2002) Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell*, 111: 635-646.
189. Zhou D, Tian Y, Sun L, Zhou L, Xiao L, Tan RJ, Tian J, Fu H, Hou FF, Liu Y. (2017) Matrix Metalloproteinase-7 Is a Urinary Biomarker and Pathogenic Mediator of Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 28: 598-611.
190. Essick E, Sithu S, Dean W, D'Souza S. (2008) Pervanadate-induced shedding of the intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 ectodomain is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Mol Cell Biochem*, 314: 151-159.

191. Yamashita CM, Dolgonos L, Zemans RL, Young SK, Robertson J, Briones N, Suzuki T, Campbell MN, Gaudie J, Radisky DC, Riches DW, Yu G, Kaminski N, McCulloch CA, Downey GP. (2011) Matrix metalloproteinase 3 is a mediator of pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 179: 1733-1745.
192. Brew K, Nagase H. (2010) The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*, 1803: 55-71.
193. Gagliano N, Arosio B, Santambrogio D, Balestrieri MR, Padoani G, Tagliabue J, Masson S, Vergani C, Annoni G. (2000) Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat kidney cortex. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55: B365-372.
194. Kim H, Oda T, Lopez-Guisa J, Wing D, Edwards DR, Soloway PD, Eddy AA. (2001) TIMP-1 deficiency does not attenuate interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 12: 736-748.
195. Lu Y, Liu S, Zhang S, Cai G, Jiang H, Su H, Li X, Hong Q, Zhang X, Chen X. (2011) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes NIH3T3 fibroblast proliferation by activating p-Akt and cell cycle progression. *Mol Cells*, 31: 225-230.
196. Peiskerova M, Kalousova M, Kratochvilova M, Dusilova-Sulkova S, Uhrova J, Bandur S, Malbohan IM, Zima T, Tesar V. (2009) Fibroblast growth factor 23 and matrix-metalloproteinases in patients with chronic kidney disease: are they associated with cardiovascular disease? *Kidney Blood Press Res*, 32: 276-283.
197. Chung AW, Booth AD, Rose C, Thompson CR, Levin A, van Breemen C. (2008) Increased matrix metalloproteinase 2 activity in the human internal mammary artery is associated with ageing, hypertension, diabetes and kidney dysfunction. *J Vasc Res*, 45: 357-362.
198. Ravarotto V, Simioni F, Pagnin E, Davis PA, Calo LA. (2018) Oxidative stress - chronic kidney disease - cardiovascular disease: A vicious circle. *Life Sci*, 210: 125-131.
199. Cheng S, Pollock AS, Mahimkar R, Olson JL, Lovett DH. (2006) Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J*, 20: 1898-1900.

200. Ries C. (2014) Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci*, 71: 659-672.
201. Kassiri Z, Oudit GY, Kandalam V, Awad A, Wang X, Ziou X, Maeda N, Herzenberg AM, Scholey JW. (2009) Loss of TIMP3 enhances interstitial nephritis and fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 20: 1223-1235.
202. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ. (1991) The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry*, 30: 8097-8102.
203. Zhang X, Chen X, Hong Q, Lin H, Zhu H, Liu Q, Wang J, Xie Y, Shang X, Shi S, Lu Y, Yin Z. (2006) TIMP-1 promotes age-related renal fibrosis through upregulating ICAM-1 in human TIMP-1 transgenic mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61: 1130-1143.
204. Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*, 49: 187-198.
205. Lindsey ML, Yabluchanskiy A, Ma Y. (2015) Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1: Actions beyond Matrix Metalloproteinase Inhibition. *Cardiology*, 132: 147-150.
206. Stetler-Stevenson WG, Bersch N, Golde DW. (1992) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett*, 296: 231-234.
207. Barasch J, Yang J, Qiao J, Tempst P, Erdjument-Bromage H, Leung W, Oliver JA. (1999) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates mesenchymal growth and regulates epithelial branching during morphogenesis of the rat metanephros. *J Clin Invest*, 103: 1299-1307.
208. Bauer EA, Stricklin GP, Jeffrey JJ, Eisen AZ. (1975) Collagenase production by human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 64: 232-240.
209. Woolley DE, Roberts DR, Evanson JM. (1975) Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 66: 747-754.
210. Kuettner KE, Hiti J, Eisenstein R, Harper E. (1976) Collagenase inhibition by cationic proteins derived from cartilage and aorta. *Biochem Biophys Res Commun*, 72: 40-46.

211. Abrass CK, Adcox MJ, Raugi GJ. (1995) Aging-associated changes in renal extracellular matrix. *Am J Pathol*, 146: 742-752.
212. Jones CL, Buch S, Post M, McCulloch L, Liu E, Eddy AA. (1992) Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol*, 141: 1381-1396.
213. Norman JT, Lewis MP. (1996) Matrix metalloproteinases (MMPs) in renal fibrosis. *Kidney Int Suppl*, 54: S61-63.
214. Tang WW, Feng L, Xia Y, Wilson CB. (1994) Extracellular matrix accumulation in immune-mediated tubulointerstitial injury. *Kidney Int*, 45: 1077-1084.
215. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD. (1996) Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 149: 1241-1256.
216. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. (1998) Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*, 102: 538-549.
217. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74: 111-122.
218. Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L. (1991) Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. *J Invest Dermatol*, 97: 679-685.
219. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. (1992) Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett*, 298: 29-32.
220. Saika S, Kawashima Y, Okada Y, Tanaka SI, Yamanaka O, Ohnishi Y, Ooshima A. (1998) Recombinant TIMP-1 and -2 enhance the proliferation of rabbit corneal epithelial cells in vitro and the spreading of rabbit corneal epithelium in situ. *Curr Eye Res*, 17: 47-52.
221. Musial K, Zwolinska D. (2014) Pleiotropic functions of TIMP-1 in patients with chronic kidney disease. *Cell Mol Life Sci*, 71: 1547-1548.



222. Kramer F, Milting H. (2011) Novel biomarkers in human terminal heart failure and under mechanical circulatory support. *Biomarkers*, 16 Suppl 1: S31-41.
223. Lee JH, Choi JW, Kim YS. (2011) Plasma or serum TIMP-1 is a predictor of survival outcomes in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis*, 20: 287-291.
224. Latchman DS. (1997) Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 1305-1312.
225. Eferl R, Wagner EF. (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 3: 859-868.
226. Milde-Langosch K. (2005) The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. *Eur J Cancer*, 41: 2449-2461.
227. Hernandez JM, Floyd DH, Weilbaecher KN, Green PL, Boris-Lawrie K. (2008) Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members. *Oncogene*, 27: 4757-4767.
228. Shaulian E, Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4: E131-136.
229. Hayashi H, Sakai T. (2012) Biological Significance of Local TGF-beta Activation in Liver Diseases. *Front Physiol*, 3: 12.
230. Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese JM, Jr. (2017) Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Front Microbiol*, 8: 2686.
231. Mozes MM, Szoleczky P, Rosivall L, Kokeny G. (2017) Sustained hyperosmolarity increases TGF-ss1 and Egr-1 expression in the rat renal medulla. *BMC Nephrol*, 18: 209.
232. Milde-Langosch K, Roder H, Andritzky B, Aslan B, Hemminger G, Brinkmann A, Bamberger CM, Loning T, Bamberger AM. (2004) The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, 86: 139-152.
233. Bamberger AM, Methner C, Lisboa BW, Stadtler C, Schulte HM, Loning T, Milde-Langosch K. (1999) Expression pattern of the AP-1 family in breast cancer: association of fosB expression with a well-differentiated, receptor-positive tumor phenotype. *Int J Cancer*, 84: 533-538.

234. Karin M, Liu Z, Zandi E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 240-246.
235. Chang L, Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410: 37-40.
236. De Borst MH, Prakash J, Melenhorst WB, van den Heuvel MC, Kok RJ, Navis G, van Goor H. (2007) Glomerular and tubular induction of the transcription factor c-Jun in human renal disease. *J Pathol*, 213: 219-228.
237. de Borst MH, Prakash J, Sandovici M, Klok PA, Hamming I, Kok RJ, Navis G, van Goor H. (2009) c-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulo-interstitial inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 331: 896-905.
238. Weston CR, Davis RJ. (2002) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev*, 12: 14-21.
239. Nishiyama A, Yoshizumi M, Hitomi H, Kagami S, Kondo S, Miyatake A, Fukunaga M, Tamaki T, Kiyomoto H, Kohno M, Shokoji T, Kimura S, Abe Y. (2004) The SOD mimetic tempol ameliorates glomerular injury and reduces mitogen-activated protein kinase activity in Dahl salt-sensitive rats. *J Am Soc Nephrol*, 15: 306-315.
240. Park SJ, Jeong KS. (2004) Cell-type-specific activation of mitogen-activated protein kinases in PAN-induced progressive renal disease in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 323: 1-8.
241. Flanc RS, Ma FY, Tesch GH, Han Y, Atkins RC, Bennett BL, Friedman GC, Fan JH, Nikolic-Paterson DJ. (2007) A pathogenic role for JNK signaling in experimental anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int*, 72: 698-708.
242. Lim AK, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Young MJ, Bennett BL, Friedman GC, Tesch GH. (2011) Evaluation of JNK blockade as an early intervention treatment for type 1 diabetic nephropathy in hypertensive rats. *Am J Nephrol*, 34: 337-346.
243. Nakagawa N, Barron L, Gomez IG, Johnson BG, Roach AM, Kameoka S, Jack RM, Lupher ML, Jr., Gharib SA, Duffield JS. (2016) Pentraxin-2 suppresses c-Jun/AP-1 signaling to inhibit progressive fibrotic disease. *JCI Insight*, 1: e87446.
244. Kim HJ, Jung KJ, Yu BP, Cho CG, Chung HY. (2002) Influence of aging and calorie restriction on MAPKs activity in rat kidney. *Exp Gerontol*, 37: 1041-1053.

245. Matsui F, Meldrum KK. (2012) The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease. *J Surg Res*, 178: 339-345.
246. Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Gupta SR, Tharakan ST, Koca C, Dey S, Sung B. (2009) Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci*, 1171: 59-76.
247. Schindler C, Darnell JE, Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem*, 64: 621-651.
248. Lu TC, Wang ZH, Feng X, Chuang PY, Fang W, Shen Y, Levy DE, Xiong H, Chen N, He JC. (2009) Knockdown of Stat3 activity in vivo prevents diabetic glomerulopathy. *Kidney Int*, 76: 63-71.
249. Chuang PY, He JC. (2010) JAK/STAT signaling in renal diseases. *Kidney Int*, 78: 231-234.
250. Pang M, Ma L, Gong R, Tolbert E, Mao H, Ponnusamy M, Chin YE, Yan H, Dworkin LD, Zhuang S. (2010) A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int*, 78: 257-268.
251. Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC. (2006) Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F762-768.
252. Kuratsune M, Masaki T, Hirai T, Kiribayashi K, Yokoyama Y, Arakawa T, Yorioka N, Kohno N. (2007) Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Nephrology (Carlton)*, 12: 565-571.
253. Carter JH, Lefebvre JM, Wiest DL, Tourtellotte WG. (2007) Redundant role for early growth response transcriptional regulators in thymocyte differentiation and survival. *J Immunol*, 178: 6796-6805.
254. Thiel G, Cibelli G. (2002) Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol*, 193: 287-292.
255. Unoki M, Nakamura Y. (2003) EGR2 induces apoptosis in various cancer cell lines by direct transactivation of BNIP3L and BAK. *Oncogene*, 22: 2172-2185.

256. Kumbrink J, Kirsch KH, Johnson JP. (2010) EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin. *J Cell Biochem*, 111: 207-217.
257. Beckmann AM, Wilce PA. (1997) Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int*, 31: 477-510; discussion 517-476.
258. Collins S, Wolfrain LA, Drake CG, Horton MR, Powell JD. (2006) Cutting Edge: TCR-induced NAB2 enhances T cell function by coactivating IL-2 transcription. *J Immunol*, 177: 8301-8305.
259. Collins S, Lutz MA, Zarek PE, Anders RA, Kersh GJ, Powell JD. (2008) Opposing regulation of T cell function by Egr-1/NAB2 and Egr-2/Egr-3. *Eur J Immunol*, 38: 528-536.
260. Honkaniemi J, Zhang JS, Longo FM, Sharp FR. (2000) Stress induces zinc finger immediate early genes in the rat adrenal gland. *Brain Res*, 877: 203-208.
261. Skerka C, Decker EL, Zipfel PF. (1997) Coordinate expression and distinct DNA-binding characteristics of the four EGR-zinc finger proteins in Jurkat T lymphocytes. *Immunobiology*, 198: 179-191.
262. Silverman ES, Collins T. (1999) Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *Am J Pathol*, 154: 665-670.
263. Yan SF, Fujita T, Lu J, Okada K, Shan Zou Y, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM. (2000) Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat Med*, 6: 1355-1361.
264. de Belle I, Mercola D, Adamson ED. (2000) Method for cloning in vivo targets of the Egr-1 transcription factor. *Biotechniques*, 29: 162-169.
265. Chen SJ, Ning H, Ishida W, Sodin-Semrl S, Takagawa S, Mori Y, Varga J. (2006) The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression. *J Biol Chem*, 281: 21183-21197.
266. Cogswell PC, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. (1997) Involvement of Egr-1/RelA synergy in distinguishing T cell activation from tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B1 transcription. *J Exp Med*, 185: 491-497.

267. Liu C, Adamson E, Mercola D. (1996) Transcription factor EGR-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 11831-11836.
268. Zcharia E, Atzmon R, Nagler A, Shimoni A, Peretz T, Vlodaysky I, Nagler A. (2012) Inhibition of matrix metalloproteinase-2 by halofuginone is mediated by the Egr1 transcription factor. *Anticancer Drugs*, 23: 1022-1031.
269. Wang D, Guan MP, Zheng ZJ, Li WQ, Lyv FP, Pang RY, Xue YM. (2015) Transcription Factor Egr1 is Involved in High Glucose-Induced Proliferation and Fibrosis in Rat Glomerular Mesangial Cells. *Cell Physiol Biochem*, 36: 2093-2107.
270. Bhattacharyya S, Fang F, Tourtellotte W, Varga J. (2013) Egr-1: new conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol*, 229: 286-297.
271. Allen K, Jaeschke H, Copple BL. (2011) Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol*, 178: 175-186.
272. Harja E, Bucciarelli LG, Lu Y, Stern DM, Zou YS, Schmidt AM, Yan SF. (2004) Early growth response-1 promotes atherogenesis: mice deficient in early growth response-1 and apolipoprotein E display decreased atherosclerosis and vascular inflammation. *Circ Res*, 94: 333-339.
273. Bonventre JV, Sukhatme VP, Bamberger M, Ouellette AJ, Brown D. (1991) Localization of the protein product of the immediate early growth response gene, Egr-1, in the kidney after ischemia and reperfusion. *Cell Regul*, 2: 251-260.
274. Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, Chapoval SP, Lee PJ, Noble PW, Yehualaeshet T, Lu B, Flavell RA, Milbrandt J, Homer RJ, Elias JA. (2004) Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med*, 200: 377-389.
275. Bhattacharyya S, Chen SJ, Wu M, Warner-Blankenship M, Ning H, Lakos G, Mori Y, Chang E, Nihijima C, Takehara K, Feghali-Bostwick C, Varga J. (2008) Smad-independent transforming growth factor-beta regulation of early growth response-1 and sustained expression in fibrosis: implications for scleroderma. *Am J Pathol*, 173: 1085-1099.

276. Fichtner-Feigl S, Young CA, Kitani A, Geissler EK, Schlitt HJ, Strober W. (2008) IL-13 signaling via IL-13R alpha2 induces major downstream fibrogenic factors mediating fibrosis in chronic TNBS colitis. *Gastroenterology*, 135: 2003-2013, 2013 e2001-2007.
277. Wu M, Melichian DS, de la Garza M, Gruner K, Bhattacharyya S, Barr L, Nair A, Shahrara S, Sporn PH, Mustoe TA, Tourtellotte WG, Varga J. (2009) Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *Am J Pathol*, 175: 1041-1055.
278. Nakamura H, Isaka Y, Tsujie M, Rupprecht HD, Akagi Y, Ueda N, Imai E, Hori M. (2002) Introduction of DNA enzyme for Egr-1 into tubulointerstitial fibroblasts by electroporation reduced interstitial alpha-smooth muscle actin expression and fibrosis in unilateral ureteral obstruction (UUO) rats. *Gene Ther*, 9: 495-502.
279. Sun S, Ning X, Zhai Y, Du R, Lu Y, He L, Li R, Wu W, Sun W, Wang H. (2014) Egr-1 mediates chronic hypoxia-induced renal interstitial fibrosis via the PKC/ERK pathway. *Am J Nephrol*, 39: 436-448.
280. Ho LC, Sung JM, Shen YT, Jheng HF, Chen SH, Tsai PJ, Tsai YS. (2016) Egr-1 deficiency protects from renal inflammation and fibrosis. *J Mol Med (Berl)*, 94: 933-942.
281. Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J. (2005) Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 2596-2601.
282. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P. (1994) Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature*, 371: 796-799.
283. Fang F, Ooka K, Bhattacharyya S, Wei J, Wu M, Du P, Lin S, Del Galdo F, Feghali-Bostwick CA, Varga J. (2011) The early growth response gene Egr2 (Alias Krox20) is a novel transcriptional target of transforming growth factor-beta that is up-regulated in systemic sclerosis and mediates profibrotic responses. *Am J Pathol*, 178: 2077-2090.

284. Bhattacharyya S, Wu M, Fang F, Tourtellotte W, Feghali-Bostwick C, Varga J. (2011) Early growth response transcription factors: key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biol*, 30: 235-242.
285. Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, Imamura T, Ishidou Y, Fukuchi M, Shi MJ, Stavnezer J, Kawabata M, Miyazono K, Ito Y. (1999) Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J Biol Chem*, 274: 31577-31582.
286. Yoshida Y, Tanaka S, Umemori H, Minowa O, Usui M, Ikematsu N, Hosoda E, Imamura T, Kuno J, Yamashita T, Miyazono K, Noda M, Noda T, Yamamoto T. (2000) Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*, 103: 1085-1097.
287. Alliston T, Choy L, Ducey P, Karsenty G, Derynck R. (2001) TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J*, 20: 2254-2272.
288. Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. (2002) Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*, 109: 113-124.
289. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, 84: 321-330.
290. Look AT. (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, 278: 1059-1064.
291. Ito Y, Miyazono K. (2003) RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 13: 43-47.
292. Zhou T, Luo M, Cai W, Zhou S, Feng D, Xu C, Wang H. (2018) Runt-Related Transcription Factor 1 (RUNX1) Promotes TGF-beta-Induced Renal Tubular Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) and Renal Fibrosis through the PI3K Subunit p110delta. *EBioMedicine*, 31: 217-225.

293. Ardura JA, Sanz AB, Ortiz A, Esbrit P. (2013) Parathyroid hormone-related protein protects renal tubuloepithelial cells from apoptosis by activating transcription factor Runx2. *Kidney Int*, 83: 825-834.
294. Matsuda M, Tamura K, Wakui H, Dejima T, Maeda A, Ohsawa M, Kanaoka T, Haku S, Azushima K, Yamasaki H, Saito D, Hirose T, Maeshima Y, Nagashima Y, Umemura S. (2011) Involvement of Runx3 in the basal transcriptional activation of the mouse angiotensin II type 1 receptor-associated protein gene. *Physiol Genomics*, 43: 884-894.
295. Bertrand-Philippe M, Ruddell RG, Arthur MJ, Thomas J, Mungalsingh N, Mann DA. (2004) Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 gene transcription by RUNX1 and RUNX2. *J Biol Chem*, 279: 24530-24539.
296. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. (2002) Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 717-726.
297. Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85: 267-273.
298. Chiarelli F, Di Marzio D. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vasc Health Risk Manag*, 4: 297-304.
299. Camejo G. (2003) PPAR agonists in the treatment of insulin resistance and associated arterial disease. *Int J Clin Pract Suppl*: 36-44.
300. Kernan WN, Viscoli CM, Furie KL, Young LH, Inzucchi SE, Gorman M, Guarino PD, Lovejoy AM, Peduzzi PN, Conwit R, Brass LM, Schwartz GG, Adams HP, Jr., Berger L, Carolei A, Clark W, Coull B, Ford GA, Kleindorfer D, O'Leary JR, Parsons MW, Ringleb P, Sen S, Spence JD, Tanne D, Wang D, Winder TR, Investigators IT. (2016) Pioglitazone after Ischemic Stroke or Transient Ischemic Attack. *N Engl J Med*, 374: 1321-1331.
301. Guan Y, Zhang Y, Davis L, Breyer MD. (1997) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in urinary tract of rabbits and humans. *Am J Physiol*, 273: F1013-1022.



302. Zafiriou S, Stanners SR, Saad S, Polhill TS, Poronnik P, Pollock CA. (2005) Pioglitazone inhibits cell growth and reduces matrix production in human kidney fibroblasts. *J Am Soc Nephrol*, 16: 638-645.
303. Nicholas SB, Kawano Y, Wakino S, Collins AR, Hsueh WA. (2001) Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells. *Hypertension*, 37: 722-727.
304. Li H, Ruan XZ, Powis SH, Fernando R, Mon WY, Wheeler DC, Moorhead JF, Varghese Z. (2005) EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. *Kidney Int*, 67: 867-874.
305. Madan P. (2005) Effect of thiazolidinediones on lipid profile. *CMAJ*, 173: 344; author reply 344-345.
306. Kuhlmann J, Neumann-Haefelin C, Belz U, Kalisch J, Juretschke HP, Stein M, Kleinschmidt E, Kramer W, Herling AW. (2003) Intramyocellular lipid and insulin resistance: a longitudinal in vivo <sup>1</sup>H-spectroscopic study in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*, 52: 138-144.
307. Debril MB, Renaud JP, Fajas L, Auwerx J. (2001) The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Med (Berl)*, 79: 30-47.
308. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405: 421-424.
309. Saltiel AR, Olefsky JM. (1996) Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes*, 45: 1661-1669.
310. Troglitazone. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD), 2012.
311. Neuschwander-Tetri BA, Isley WL, Oki JC, Ramrakhiani S, Quiason SG, Phillips NJ, Brunt EM. (1998) Troglitazone-induced hepatic failure leading to liver transplantation. A case report. *Ann Intern Med*, 129: 38-41.
312. Graham DJ, Ouellet-Hellstrom R, MaCurdy TE, Ali F, Sholley C, Worrall C, Kelman JA. (2010) Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly Medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. *JAMA*, 304: 411-418.

313. Wang W, Liu F, Chen N. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) agonists attenuate the profibrotic response induced by TGF-beta1 in renal interstitial fibroblasts. *Mediators Inflamm*, 2007: 62641.
314. Weigert C, Brodbeck K, Bierhaus A, Haring HU, Schleicher ED. (2003) c-Fos-driven transcriptional activation of transforming growth factor beta-1: inhibition of high glucose-induced promoter activity by thiazolidinediones. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 301-307.
315. Artwohl M, Holzenbein T, Furnsinn C, Freudenthaler A, Huttary N, Waldhausl WK, Baumgartner-Parzer SM. (2005) Thiazolidinediones inhibit apoptosis and heat shock protein 60 expression in human vascular endothelial cells. *Thromb Haemost*, 93: 810-815.
316. Ko GJ, Kang YS, Han SY, Lee MH, Song HK, Han KH, Kim HK, Han JY, Cha DR. (2008) Pioglitazone attenuates diabetic nephropathy through an anti-inflammatory mechanism in type 2 diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant*, 23: 2750-2760.
317. Kawai T, Masaki T, Doi S, Arakawa T, Yokoyama Y, Doi T, Kohno N, Yorioka N. (2009) PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest*, 89: 47-58.
318. Wu M, Melichian DS, Chang E, Warner-Blankenship M, Ghosh AK, Varga J. (2009) Rosiglitazone abrogates bleomycin-induced scleroderma and blocks profibrotic responses through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Am J Pathol*, 174: 519-533.
319. Ma Y, Shi M, Wang Y, Liu J. (2020) PPARgamma and Its Agonists in Chronic Kidney Disease. *Int J Nephrol*, 2020: 2917474.
320. Yang HC, Deleuze S, Zuo Y, Potthoff SA, Ma LJ, Fogo AB. (2009) The PPARgamma agonist pioglitazone ameliorates aging-related progressive renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 20: 2380-2388.
321. Chen X, Wei SY, Li JS, Zhang QF, Wang YX, Zhao SL, Yu J, Wang C, Qin Y, Wei QJ, Lv GX, Li B. (2016) Overexpression of Heme Oxygenase-1 Prevents Renal Interstitial Inflammation and Fibrosis Induced by Unilateral Ureter Obstruction. *PLoS One*, 11: e0147084.

322. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. (2001) Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*, 38: 635-638.
323. Kasiske BL, Kalil RS, Ma JZ, Liao M, Keane WF. (1993) Effect of antihypertensive therapy on the kidney in patients with diabetes: a meta-regression analysis. *Ann Intern Med*, 118: 129-138.
324. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. (1993) The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med*, 329: 1456-1462.
325. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. (1986) Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest*, 77: 1925-1930.
326. Cooper ME, Allen TJ, Macmillan PA, Clarke BE, Jerums G, Doyle AE. (1989) Enalapril retards glomerular basement membrane thickening and albuminuria in the diabetic rat. *Diabetologia*, 32: 326-328.
327. Allen TJ, Cao Z, Youssef S, Hulthen UL, Cooper ME. (1997) Role of angiotensin II and bradykinin in experimental diabetic nephropathy. Functional and structural studies. *Diabetes*, 46: 1612-1618.
328. Gilbert RE, Cox A, Wu LL, Allen TJ, Hulthen UL, Jerums G, Cooper ME. (1998) Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. *Diabetes*, 47: 414-422.
329. Cordonnier DJ, Pinel N, Barro C, Maynard M, Zaoui P, Halimi S, Hurault de Ligny B, Reznic Y, Simon D, Bilous RW. (1999) Expansion of cortical interstitium is limited by converting enzyme inhibition in type 2 diabetic patients with glomerulosclerosis. The Diabiopsies Group. *J Am Soc Nephrol*, 10: 1253-1263.
330. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S, Investigators RS. (2001) Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*, 345: 861-869.

331. Zatz R, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. (1985) Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 5963-5967.
332. Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR, Boomsma F, Tarnow L, Rossing P, Parving HH. (2006) Beneficial impact of spironolactone on nephrotic range albuminuria in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 70: 536-542.
333. Juurlink DN, Mamdani MM, Lee DS, Kopp A, Austin PC, Laupacis A, Redelmeier DA. (2004) Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study. *N Engl J Med*, 351: 543-551.
334. Drawz PE, Rosenberg ME. (2013) Slowing progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* (2011), 3: 372-376.
335. Barnett AH, Mithal A, Manassie J, Jones R, Rattunde H, Woerle HJ, Broedl UC, investigators E-RRt. (2014) Efficacy and safety of empagliflozin added to existing antidiabetes treatment in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2: 369-384.
336. Yale JF, Bakris G, Cariou B, Nieto J, David-Neto E, Yue D, Wajs E, Figueroa K, Jiang J, Law G, Usiskin K, Meininger G, Group DIAS. (2014) Efficacy and safety of canagliflozin over 52 weeks in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease. *Diabetes Obes Metab*, 16: 1016-1027.
337. Heerspink HJ, Kropelin TF, Hoekman J, de Zeeuw D, Reducing Albuminuria as Surrogate Endpoint C. (2015) Drug-Induced Reduction in Albuminuria Is Associated with Subsequent Renoprotection: A Meta-Analysis. *J Am Soc Nephrol*, 26: 2055-2064.
338. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, Mattheus M, Devins T, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Inzucchi SE, Investigators E-RO. (2015) Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*, 373: 2117-2128.
339. Yavin Y, Mansfield TA, Ptaszynska A, Johnsson K, Parikh S, Johnsson E. (2016) Effect of the SGLT2 Inhibitor Dapagliflozin on Potassium Levels in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Pooled Analysis. *Diabetes Ther*, 7: 125-137.

340. Breyer MD, Susztak K. (2016) Developing Treatments for Chronic Kidney Disease in the 21st Century. *Semin Nephrol*, 36: 436-447.
341. Geerlings S, Fonseca V, Castro-Diaz D, List J, Parikh S. (2014) Genital and urinary tract infections in diabetes: impact of pharmacologically-induced glucosuria. *Diabetes Res Clin Pract*, 103: 373-381.
342. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. (2004) Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med*, 164: 659-663.
343. Kokeny G, Nemeth Z, Godo M, Hamar P. (2010) The Rowett rat strain is resistant to renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*, 25: 1458-1462.
344. Grond J, Beukers JY, Schilthuis MS, Weening JJ, Elema JD. (1986) Analysis of renal structural and functional features in two rat strains with a different susceptibility to glomerular sclerosis. *Lab Invest*, 54: 77-83.
345. Grond J, Muller EW, van Goor H, Weening JJ, Elema JD. (1988) Differences in puromycin aminonucleoside nephrosis in two rat strains. *Kidney Int*, 33: 524-529.
346. Chen JS, Chen A, Chang LC, Chang WS, Lee HS, Lin SH, Lin YF. (2004) Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine serum albumin: antigen dose-response relations and strain differences. *Nephrol Dial Transplant*, 19: 2721-2728.
347. Ishola DA, Jr., van der Giezen DM, Hahnel B, Goldschmeding R, Kriz W, Koomans HA, Joles JA. (2006) In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent. *Nephrol Dial Transplant*, 21: 591-597.
348. Ma LJ, Fogo AB. (2003) Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int*, 64: 350-355.
349. Salzler HR, Griffiths R, Ruiz P, Chi L, Frey C, Marchuk DA, Rockman HA, Le TH. (2007) Hypertension and albuminuria in chronic kidney disease mapped to a mouse chromosome 11 locus. *Kidney Int*, 72: 1226-1232.
350. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. (2006) Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F214-222.

351. Merta M, Reiterova J, Rysava R, Kmentova D, Tesar V. (2003) Genetics of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 18 Suppl 5: v24-25.
352. Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. (1995) Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 2572-2576.
353. Mozes MM, Bottinger EP, Jacot TA, Kopp JB. (1999) Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in TGF-beta transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*, 10: 271-280.
354. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS. (1996) Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest*, 74: 991-1003.
355. Hartner A, Cordasic N, Klanke B, Veelken R, Hilgers KF. (2003) Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol Dial Transplant*, 18: 1999-2004.
356. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, Betsholtz C. (2002) A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol*, 161: 799-805.
357. Czirok S, Fang L, Radovits T, Szabo G, Szenasi G, Rosivall L, Merkely B, Kokeny G. (2017) Cinaciguat ameliorates glomerular damage by reducing ERK1/2 activity and TGF-ss expression in type-1 diabetic rats. *Sci Rep*, 7: 11218.
358. Curtis MJ, Alexander S, Cirino G, Docherty JR, George CH, Giembycz MA, Hoyer D, Insel PA, Izzo AA, Ji Y, MacEwan DJ, Sobey CG, Stanford SC, Teixeira MM, Wonnacott S, Ahluwalia A. (2018) Experimental design and analysis and their reporting II: updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *Br J Pharmacol*, 175: 987-993.
359. Klahr S, Morrissey J. (2002) Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: F861-875.
360. Viau A, El Karoui K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J, Terzi F. (2010) Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest*, 120: 4065-4076.

361. Rumberger B, Vonend O, Kreutz C, Wilpert J, Donauer J, Amann K, Rohrbach R, Timmer J, Walz G, Gerke P. (2007) cDNA microarray analysis of adaptive changes after renal ablation in a sclerosis-resistant mouse strain. *Kidney Blood Press Res*, 30: 377-387.
362. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. (1994) Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*, 302 ( Pt 2): 527-534.
363. Poncelet AC, de Caestecker MP, Schnaper HW. (1999) The transforming growth factor-beta/SMAD signaling pathway is present and functional in human mesangial cells. *Kidney Int*, 56: 1354-1365.
364. Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R, Rosenkranz S, Pfitzner T, Scharffetter-Kochanek K, Bohm M. (2002) Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase. *Eur J Clin Invest*, 32: 295-303.
365. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. (1995) Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*, 309 ( Pt 1): 299-306.
366. Olson MW, Toth M, Gervasi DC, Sado Y, Ninomiya Y, Fridman R. (1998) High affinity binding of latent matrix metalloproteinase-9 to the alpha2(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem*, 273: 10672-10681.
367. Vollmann EH, Cao L, Amatucci A, Reynolds T, Hamann S, Dalkilic-Liddle I, Cameron TO, Hossbach M, Kauffman KJ, Mir FF, Anderson DG, Novobrantseva T, Koteliansky V, Kisseleva T, Brenner D, Duffield J, Burkly LC. (2017) Identification of Novel Fibrosis Modifiers by In Vivo siRNA Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*, 7: 314-323.
368. Shimamura T, Morrison AB. (1975) A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am J Pathol*, 79: 95-106.
369. Waldherr R, Gretz N. (1988) Natural course of the development of histological lesions after 5/6 nephrectomy. *Contrib Nephrol*, 60: 64-72.
370. Brenner BM. (1983) Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease. *Kidney Int*, 23: 647-655.

371. Yamanouchi T. (2010) Concomitant therapy with pioglitazone and insulin for the treatment of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*, 6: 189-197.
372. Yau H, Rivera K, Lomonaco R, Cusi K. (2013) The future of thiazolidinedione therapy in the management of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*, 13: 329-341.
373. Gor D, Gerber BS, Walton SM, Lee TA, Nutescu EA, Touchette DR. (2020) Antidiabetic drug use trends in patients with type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease: A cross-sectional analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey. *J Diabetes*, 12: 385-395.
374. Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. (2014) Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab*, 20: 573-591.
375. Ma LJ, Marcantoni C, Linton MF, Fazio S, Fogo AB. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone protects against nondiabetic glomerulosclerosis in rats. *Kidney Int*, 59: 1899-1910.
376. Benigni A, Zoja C, Tomasoni S, Campana M, Corna D, Zanchi C, Gagliardini E, Garofano E, Rottoli D, Ito T, Remuzzi G. (2006) Transcriptional regulation of nephrin gene by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist: molecular mechanism of the antiproteinuric effect of pioglitazone. *J Am Soc Nephrol*, 17: 1624-1632.
377. Sivarajah A, Chatterjee PK, Patel NS, Todorovic Z, Hattori Y, Brown PA, Stewart KN, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Thiemermann C. (2003) Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma reduce renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Nephrol*, 23: 267-276.
378. Yang J, Zhou Y, Guan Y. (2012) PPARgamma as a therapeutic target in diabetic nephropathy and other renal diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 21: 97-105.
379. Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, Sheikh AY, Suen RS, Stewart DJ, Rabinovitch M. (2007) Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Circulation*, 115: 1275-1284.
380. Calvier L, Chouvarine P, Legchenko E, Hoffmann N, Geldner J, Borchert P, Jonigk D, Mozes MM, Hansmann G. (2017) PPARgamma Links BMP2 and



- TGFbeta1 Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells, Regulating Cell Proliferation and Glucose Metabolism. *Cell Metab*, 25: 1118-1134 e1117.
381. Wynn TA. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 214: 199-210.
382. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. (1992) TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int*, 41: 557-559.
383. Liang Y, Jin Y, Li Y. (2009) Expression of JAKs/STATs pathway molecules in rat model of rapid focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*, 24: 1661-1671.

## 10 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. **Ágnes Németh**, Miklós M. Mózes, Laurent Calvier, Gerog Hansmann, Gábor Kökény. The PPAR $\gamma$  agonist pioglitazone prevents TGF- $\beta$  induced renal fibrosis by repressing EGR-1 and STAT3. BMC Nephrol. 2019 Jul 5;20(1):245.
2. Gábor Kökény, **Ágnes Németh**, Jeffrey B. Kopp, Weiping Chen, Andrew J. Oler, Anna Manzóger, László Rosivall, Miklós M. Mózes. *Susceptibility to kidney fibrosis in mice is associated with early growth response-2 protein and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression*. Kidney Int. 2022 May 2;S0085-2538(22)00348-9. doi: 10.1016/j.kint.2022.03.029 (*in press*)
3. **Németh Á.**, Tasnády K., Mózes M., Rosivall L., Kökény G. TIMP-1 deficiency reduces TGF-beta expression and dampens renal fibrosis after renal ablation. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION 34: Suppl. 1 pp. i160-i160. Paper: FP345, 1 p. (2019).  
56th ERA-EDTA 2019, Budapest.
4. Kökény G., Foss A., **Németh Á.**, Fazekas K., Mózes M. Early renal inflammatory molecule expression differences after unilateral ureter obstruction in mice. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION 33: Suppl 1 pp. i430-i431. Paper: SP257, 2 p. (2018) doi: 10.1093/ndt/gfy104.SP257.  
55th ERA-EDTA Congress, Copenhagen, 2018.05.24. – 2018.05.27.
5. **Németh Á.**, Fazekas K., Mózes M., Kökény G. Gyulladásos markerek törzsfüggő korai expressziója unilaterális ureter obstrukciót követően  
Magyar Nephrológiai Társaság Nagygyűlése, Eger, 2018. október 25-27.
6. **Nemeth Á.**, Kokeny G., Fazekas K., Foss A., Tordai A., Mozes M.

Pioglitazone effectively reduces renal interstitial fibrosis in TGF- $\beta$  transgenic mice.

Magyar Tudós Ifjú Hypertonológusok és Ifjú Nefrológusok Értekezlete (V. Mathiné), Budapest, 2018. április 27.

7. **Németh Á.**, Kökény G., Fazekas K., Foss A., Tordai A., Mózes M.  
Pioglitazone effectively reduces renal interstitial fibrosis in TGF- $\beta$  transgenic mice.  
PhD Tudományos Napok, Semmelweis Egyetem  
Budapest, 2017. április 11-12.
8. **Németh Á.**, Kokeny G., Fazekas K., Foss A., Tordai A., Mozes M.  
Pioglitazone Effectively Reduces Renal Interstitial Fibrosis in TGF-beta transgenic mice. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION 32: (Suppl. 3) pp. 198-198. (2017) doi: 10.1093/ndt/gfx145.SP271.  
54th ERA-EDTA Congress, Madrid, 2017.06.03. – 2017.06.07.
9. Mozes M., **Nemeth Á.**, Szabo L., Fazekas K., Kokeny G.  
Early and sustained RUNX-1 activation after unilateral ureter obstruction in mice: a possible new player in renal fibrosis. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION 31: (Suppl.1.) pp. 1438-1438. (2016) doi: 10.1093/ndt/gfw188.55.  
53rd ERA-EDTA Congress, Vienna, 2016.05.21. – 2016.05.24.
10. Kokeny G., **Nemeth Á.**, Szabo L., Fazekas K., Rosivall L., Mozes M.  
Subtotal renal ablation induces tubulointerstitial EGR2 overexpression in mice. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION 30: (Suppl.3.) Paper: FP307 (2015) doi: 10.1093/ndt/gfv174.42.  
52nd ERA-EDTA Congress, London, 2015.05.28. – 2015. 05.31.

- 11. Németh Á., Kökény G., Fazekas K., Mózes M.**  
Korai EGR-1 expresszió vesefibrózis modellekben  
Magyar Tudós Ifjú Hypertonologusok és Ifjú Nefrológusok Értekezlete (III.  
Mathiné) Budapest, 2016. március 11-12.

## **11 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

A dolgozat elkészítése során számos embertől kaptam segítséget, akik nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre. Szeretném megköszönni dr. Kökény Gábor témavezetőmnek a segítséget, aki tudásával, kitartó munkájával lendítette előre a kutatást. Fazekas Krisztina a labormunka során nyújtott nagyon sok segítséget. Köszönöm a Heim Pál Országos Gyermekgyógyászati Intézetben dolgozó kollégáim türelmét, valamint köszönöm a vezetőségnek, hogy biztosítottak időt a kutatómunka befejezésére.

Ezúton szeretném megköszönni az egész családomnak a töretlen támogatást, amivel munkámat mindvégig segítették.

Végül köszönetet szeretnék mondani férjemnek és kisfiamnak, hogy egész idő alatt tudatták velem, hogy mögöttem állnak és támogatnak céljaim elérésében.