

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

Doktori tézisek

**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, az MTA tagja, egyetemi tanár

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

Budapest

2022

## **1. BEVEZETÉS**

A krónikus vesebetegség évek, évtizedek leforgása alatt végstádiumú veseelégtelenséghez (ESRD) vezet, melynek hátterében a progresszív vesefibrózis áll. A vesét károsító tényezők széles skálája (immunológiai, hipertónia, diabétesz mellitusz (DM), korábbi akut vesekárosodás) okoz gyulladást és fibrózist, majd később ESRD-t.

### **1.1 A vesefibrózis kórélettana**

A fibrózist egy diszregulált sebgyógyulási folyamatnak tekintjük, amely több hetet vagy hónapot meghaladó krónikus sérülés vagy más krónikus betegség következményeként jelentkezik. A fibrózis tulajdonképpen egy helyreállítási és gyógyulási folyamat, egy kezdődő vesebetegségre adott válasz. A vesefibrózis jelen ismereteink szerint visszafordíthatatlan folyamat. A vesefibrózis a krónikus vesebetegségek végső közös útja, amely a veseparenchyma folyamatos destrukciója révén ESRD-t eredményez. ESRD-ben a vesefunkció a normál veseműködés 10-15%-a, amely nem elég a szervezet napi szükségleteinek kiegyenlítésére, ezért az ESRD dialízis vagy vese transzplantáció nélkül halálos kimenetelű. A vesefibrózis progressziója egyénileg eltérő emberekben és állatokban egyaránt, ennek oka valószínűleg a különböző genetikai fogékonyság. Ugyanakkor máig nem ismertek azok a molekuláris mechanizmusok, amelyek felelősek lehetnek az eltérő genetikai fogékonyságért, és a különböző mértékű progresszióért.

#### **1.1.2 A fibrózis molekuláris mechanizmusa**

A transzformáló növekedési faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) multifunkcionális citokin, számos biológiai tulajdonsággal rendelkezik. A TGF- $\beta$ 1 serkenti a sejtproliferációt, a sejtdifferenciálódást, az apoptózist, az autofágiát, elsődleges szerepe van a fibrózis, így a vesefibrózis patogenezisében. A TGF- $\beta$  mRNS és fehérje fokozott expresszióját látjuk fibrózissal járó vesebetegségekben, mint például az IgA nephropathia, fokális eszegmentális glomerulonephritis, lupus nephritis, a diabéteszes nefropátia (DN) és a humán immundeficiencia vírus asszociált nefropátia. A fokozott TGF- $\beta$  expresszió és a keringő aktív TGF- $\beta$  emelkedett szintje a vesebetegség progressziójához is hozzájárul.

Fibrózis során felborul az extracelluláris mátrix (ECM) fehérjék szintézisének és degradációjának egyensúlya, melyet az ECM bontó enzimek (mátrix-metalloproteinázok, MMP-k) és inhibitoraik (szöveti MMP-inhibitorok, TIMP-ek) szabályoznak. TGF- $\beta$  hatására fokozódik az ECM alkotóelemeinek szintézise, valamint csökken a mátrix lebontása (fokozott TIMP-1, csökkent MMP expresszió). Ugyanakkor máig nem teljesen ismert a TGF- $\beta$  indukált TIMP-1 expresszió mechanizmusa.

Az MMP-TIMP rendszer egyensúlyának felborulását látjuk arthritisben, atheroszklerózisban, valamint különböző daganatos betegségekben is. A csökkent MMP expresszió és/vagy az emelkedett TIMP-1 expresszió az ECM lebontásának gátlását, így az ECM felhalmozódását okozza. Profibrotikus hatásuk az EMT-t (epithelialis mezenchimális tranzíció) indukáló képességükön alapszik. Az MMP-k a vesefibrózis minden szakaszában szerepet játszanak (mononukleáris sejtek infiltrációja, sejtproliferáció, hegesedés). A TIMP-1 expressziója alacsony egészséges vesében, viszont a legtöbb progresszív humán vesebetegség (az előregedett vesékben is), valamint ezek kísérleti modelljeiben expressziója szignifikánsan emelkedik és a növekedés mértéke összefügg a fibrózis súlyosságával. A TIMP-1 fibrózissal való összefüggését eddig vesében, tüdőben és a májban figyelték meg.

## **1.2 Transzkripciós faktorok szerepe a vesefibrózisban**

A TIMP-1 transzkripciója részben az AP-1 komplex által szabályozott. A dimer felépítésű AP-1 transzkripciós faktor aktivitását a Jun-, Fos-, ATF (activating transcription factor) - és Maf fehérje családok különböző expressziója, valamint az AP-1 DNS kötő oldala határozza meg. 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.

Számos sérülésre korai transzkripciós faktor aktivációs válasz alakulhat ki, melyben fontos szerepet játszanak az EGR (korai növekedési válasz fehérje, early growth response protein) család tagjai. Az EGR-1 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. Az EGR2 fontos szerepet játszik az immunregulációban, mivel gátolja a T-sejt aktivációt, valamint kritikus fontosságú

szerepe van az immuntolerancia fenntartásában. Elengedhetetlen továbbá az agy fejlődéséhez, valamint a perifériás idegek myelinizációjához is. Az EGR2 a kollagén gén intracelluláris stimuláló mediátoraként is működik, valamint részt vesz a TGF- $\beta$  által indukált fibrotikus folyamatokban. EGR2 stimulus közvetlenül előidézi számtalan profibrotikus gén expresszióját fibroblasztokban, így hozzájárul az ECM átépülésének szabályozásához és a fibrogenézishez. Az EGR2 a TGF- $\beta$  hatásának kulcsfontosságú közvetítője scleroderma és tüdőfibrózis egérmodelljeiben, valamint humán sclerodermában. Továbbá az EGR2 gén csendesítése csökkentette a májfibrózist egérmodellben.

A JAK (Janus kináz)/STAT (szignál transzducer transzkripció aktivátor) útvonalat számos növekedési faktor és citokin aktiválhatja. Ennek az útvonalnak az aktivációja fontos szerepet játszik a vesebetegségek patofiziológiájában, az ECM felhalmozódásban, a tubulointersticiális fibrózis kialakulásában. STAT3-inhibitor alkalmazása gátolta az  $\alpha$ -SMA (alpha-simaizom aktin) és a fibronektin expresszióját intersticiális fibroblaszt sejtenyészetben és csökkentette az ECM akkumulációt, valamint az intersticiális fibroblasztok szaporodását UUO (unilateralis ureter obstrukció) egerekben. 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.

A Runt domén transzkripció faktorok (RUNX1, RUNX2, RUNX3) szerves részei mind a TGF- $\beta$ , mind a BMP (bone morphogenic protein, csont morfogénikus fehérje) indukált jelátvitelnek számos fontos biológiai folyamatban. RUNX1 hiányában nem alakulnak ki a haemopoetikus őssejtek, az akut leukémiák 30%-át jellemzik a RUNX1 gén valamilyen pontmutációi, valamint számos RUNX1-et is érintő kromoszóma transzlokáció. Szerepet játszik továbbá a vese tubulusok epiteliális-mesenchymalis tranzíciójában (EMT) vesefibrózis során.

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

Vesefibrózisban csökkent PPAR- $\gamma$  aktivitás figyelhető meg. A PPAR- $\gamma$  agonisták bizonyítottan csökkentik a vesekárosodás mértékét ischaemia-reperfúziós károsodás,

autoszomális domináns policisztás vesebetegség, illetve nem DM okozta krónikus vesebetegségben. A PPAR- $\gamma$  agonisták terápiás hatását eddig főleg 2-es diabétesz mellituszban (T2DM) vizsgálták, mivel növelik az inzulinérzékenységet, csökkentik a máj glükóz produkcióját, HbA1C-szintjét, valamint megakadályozzák a pancreas  $\beta$ -sejtjeinek apoptózisát. Ugyanakkor a PPAR $\gamma$  agonisták vesefibrózisra gyakorolt hatása, még nem teljesen ismert.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A genetikai háttér által befolyásolt vesefibrózis progresszió feltárása érdekében célunk volt:

1. Több vesefibrózis modellben is megvizsgálni a genetikai háttér összefüggését a fibrózis 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. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

#### 3.1 Felhasznált egérmodellek

Minden állatkísérletet a PE/EA/948-4/2018 számú etikai engedélynek megfelelően végeztünk. CBA.B6-Alb/TGF- $\beta$  transzgenikus egérmodellre (NIH, USA) jellemző, hogy a sertésből nyert TGF- $\beta$  transzgén teljes cDNS szekvenciája egér albumin promóterhez kapcsolts, így ezen állatok plazma TGF- $\beta$  szintje magasabb. A transzgén szekvenciája két aminosav cserét tartalmaz, így a TGF- $\beta$  aktív formáját kódolja. Mivel a transzgén az Y kromoszómába épült be, ezért ebben a modellben csak a hím egerek transzgenikusak. Az albumin promóter következtében a transzgén csak születés után kezd el expresszálni a májsejtekben. A hím transzgenikus egerekben három-négyszer magasabb a keringő TGF- $\beta$  szint, mint a vad típusú egerekben, ami kettő-négy hetes korban már glomeruloszklerózist, ezt követően pedig intersticiális fibrózist eredményez.

A CBA.B6-Alb/TGF- $\beta$  transzgenikus egereket munkacsoportunk több, mint 22 generáción át visszakeresztelte B6 genetikai háttérre, az így kapott kongenikus B6-TGF- $\beta$  hímekeket 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.

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. A PCR termékeket 1.5%-os agaróz gélen szeparáltuk, hogy detektáljuk a transzgén 370 bázispár termékét. A kísérletek végén, szemzúgból vett EDTA-s vérmintákból plazmát nyertünk centrifugálással, a felülúszó 10  $\mu$ l-ből meghatároztuk az egerek plazma TGF- $\beta$ 1 szintjét kereskedelmi forgalomban kapható ELISA kit segítségével.

Az UUO kísérleti modellben általában 7 napon belül tubulointersticiális fibrózis alakul ki. Kísérleteinkben korai (1 napos) és késői (7 napos) UUO hatásait egyaránt vizsgáltuk CBA és B6 egerekben.

A szubtotális vese abláció (SNX) a működő nefronszám csökkenése miatt glomerularis hiperfiltrációt okoz a megmaradt glomerulusokban, mely glomeruloszklerózishoz és intersticiális fibrózishoz vezet, ennek következtében súlyos veseelégtelenség alakul ki 15-20 héten belül. Kísérleteinkben emiatt korábbi időpontban, 6 héttel a műtét után hasonlítottuk össze a CBA és B6 egerek veséit.

A TIMP-1 vesefibrózisban betöltött központi szerepének bizonyítására, egyrészt C57Bl6 genetikai háttérű nőstény TIMP-1 hiányos (-/-) egereket CBA hím egerekkel kereszteztük, így hoztunk létre hibrid (fibrózisra érzékeny) genetikai háttérű CBAxB6-Timp1<sup>-/-</sup> F1 törzset (Timp1<sup>-/-</sup>) a vizsgálatainkhoz.

Egy további kísérletben a CBAxB6-Timp<sup>-/-</sup> F1 hím egerek veséjét SNX után hasonlítottuk a kontroll CBAxB6 F1 hím egerek SNX veséjéhez.

A TIMP-1 szerepének további bizonyítására 8 napos CBAxB6-TGF- $\beta$  hím egereket kezeltünk intraperitonealisan TIMP-1 neutralizáló antitesttel (ill IgG-vel) 5 egymást követő napon keresztül, majd 14 napos korban vizsgáltuk a megfelelő paramétereket.

Minden egér kísérlet végén vizsgáltuk a szérum urea, vizelet protein/kreatinin hányados értékeit, a vesék szövettanát, illetve a vesék fehérje- és génexpresszióját.

### **3.2 In vitro kísérletek**

Human embrionalis vese sejteket (HEK293T) 24 lyukú sejtenyészítő lemezekre osztottuk 90 000 sejt/lyuk sűrűséggel, majd OptiMEM médiumban 48 órán át tranzienzen transzfektáltuk 750ng EGR2-t vagy EGFP-t kódoló plazmival, Lipofectamine 3000 felhasználásával, a gyártó protokollja szerint. A sejtekből RNS-t és fehérjét izoláltunk Trizol ill. RIPA puffer segítségével. Az RNS átírást kereskedelmi forgalomban elérhető cDNS átíró kit-tel végeztük (Thermo).

### **3.3 Vese biopszia szövetminták**

Az EGR2 és a TIMP-1 mRNS expressziójának mérésére, valamint az állatkísérletek és az in vitro eredmények alátámasztására fagyasztott humán vesemintákat vizsgáltunk (TUKEB engedély: 228/2014). A vesekéreg minták fokális szegmentális



glomeruloszklerózissal (FSGS) diagnosztizált betegekből, ill. vesesejtes carcinoma miatt nephrectomizált vesék egészséges szövetéből származtak.

### **3.4 Pioglitazon kezelés TGF- $\beta$ indukált vesefibrózisban**

#### **3.4.1 Állatmodell**

Kísérletünkben 10 hetes hím C57BL/6 vad típusú (kontroll, C) és a TGF- $\beta$  transzgenikus egereket (TGF $\beta$ ) 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, narkózisban vérnyomást mértünk (lásd 3.4.1), majd intrakardiális kanülön keresztül 20 percig 4%-os fizioológias sóoldattal perfundáltuk az állatokat. A kezelés végén a vesékből szövettani vizsgálatokat végeztünk, valamint meghatároztuk az mRNS expressziókat.

#### **3.4.1 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.

#### **3.4.2 A proteinuria meghatározása**

A vizelet mintákból meghatároztuk a kiválasztott fehérje és kreatinin koncentrációt. A GFR-re normalizált vizelettel ürített fehérje mennyiségét a vizelet protein/kreatinin hányadosával állapítottuk meg.

#### **3.4.3 Génexpressziós vizsgálatok**

A génexpressziós mérésekhez kvantitatív RT-PCR méréseket végeztünk SYBR Green segítségével. 20-30 mg teljes vese homogenizátumból izoláltuk az RNS-t, fenol-kloroform extrakció segítségével a gyártó protokollja szerint. Az RNS koncentrációt fotometriásan mértük meg. A PCR reakciók specificitását és hatékonyságát az olvadási görbék analízise igazolta. Minden minta mérése duplikátumban történt, és riboszómális 18S RNS expresszióra normalizáltunk, a  $2^{-\Delta Ct}$  képlet segítségével.

### **3.5 Primér mezangiális sejtek izolálása**

Előzetes eredményeink szerint a CBA egértörzs érzékenyebb a vesefibrózisra, ezért 6 hetes CBA hím egerekből primér mezangiális sejteket izoláltunk. A glomeruláris sejttenyészetet szelektív médiumban tartottuk fent 21 napig standard körülmények között. A szelektív médium hatására elsőként az endothel sejtek, majd a podociták, végül a fibroblasztok pusztultak el, így végül tiszta mezangiális sejttenyészetet kaptunk, melyet specifikus markerekre vizsgáltunk (E-cadherin negatív, vimentin és fibronectin pozitív). Az izolált primér mezangiális sejteket P5 és P8 passzázsok között 24 lyukú sejttenyésztő lemezekre osztottuk le, majd megmértük a B6 és a CBA mezangiális sejtek génexpresszióját 48 órával a PBS (foszfátpufferolt sóoldat) vagy TGF- $\beta$  kezelés után.

### **3.6 Immunoblot (Western-blot)**

A vesemintákat (20 mg) proteáz inhibitor tartalmazó RIPA lízis pufferben homogenizáltuk, majd meghatároztuk a fehérje koncentrációt. A Laemmli pufferrel kevert mintákat nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid gélen szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránok tejporos blokkolása után 4°C-on egész éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitesttel, majd peroxidáz konjugált másodlagos antitest segítségével hívtuk elő kemilumineszcens detekcióval.

### **3.7 Szövettan, immunhisztokémia**

A formalinban fixált és paraffinba ágyazott vesemetszeteket Masson-féle trikróm festés után értékeltük. A glomeruloszklerózis és a tubulointersticiális károsodás mértékét szemikvantitatív skála segítségével határoztuk meg. A glomeruloszklerózis indexet (GSI) 0-4 fokozatú pontozási rendszer szerint értékeltük (El Nahas). A tubulointersticiális károsodás mértékét 100x nagyítás mellett értékeltük. A paraffinba ágyazott metszetek immunhisztokémiai festését avidin-biotin módszer segítségével végeztük.

### **3.8 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 post 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.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1 Állatkísérleti modellek a vesefibrózis és a genetikai faktorok összefüggésének tisztázására

A B6-TGF $\beta$  egerekben a kontroll egerekhez hasonló egészséges vese morfológiát láttunk 14 napos életkorban. Ezzel szemben nagymértékű glomeruloszklerózis és tubulointersticiális fibrózis alakult ki 14 napos CBAxB6-TGF $\beta$  egerekben. A glomerulusok több mint 60%-ban észleltünk glomeruláris hipertrófiát mezangiális expanzióval, valamint a kapillárisok pusztulását. A szövettani eredmények alapján a fibrózissal kapcsolatos molekulák (TGF- $\beta$ , kollagének) mRNS expressziója CBAxB6-TGF $\beta$  egerek veséiben többszörös növekedést mutatott, összehasonlítva a B6-TGF $\beta$  vesékkal. A CBAxB6-TGF- $\beta$  egerekben már kialakult enyhe tubulointersticiális fibrózis, valamint proteinuriára utaló tubuláris hyalin is megjelent a metszeteken. Immunblot vizsgálat során a *Timp1* mRNS százszoros, a TIMP-1 fehérje tízszeres expresszió fokozódást mutatott CBAxB6-TGF $\beta$  vesékben, összehasonlítva a B6-TGF $\beta$  vesékkal, amely immunfestéssel főleg a tubulusokra lokalizálódott.

További vizsgálataink arra keresték a választ, hogy milyen genetikai faktor lehet felelős az eltérő TIMP-1 expresszió szabályozásért. Így figyelmünk olyan transzkripciós faktorokra irányult, melyek bizonyítottan szerepet játszanak fibrotikus betegségekben.

Transzgenikus modellünkben a TIMP-1 mellett legerősebben változó transzkripciós faktornak az EGR2 bizonyult. Az EGR2 expressziója drámai módon emelkedett CBAxB6-TGF $\beta$  vesékben, és jól korrelált a TIMP-1-el. Annak érdekében, hogy tisztázzuk, a megfigyelt EGR2 növekedés 14 napos életkorban egy erősen fibrotikus vesében oki tényező, vagy már egy terminális folyamat következménye, sokkal korábbi életkorban (a transzgenikus egerek 5 napos korában) is vizsgáltuk mind az EGR2, mind a TIMP-1, valamint további fibrózissal asszociált gén expresszióját, amikor még szövettanilag nem látható számottevő vesefibrózis. CBAxB6-TGF $\beta$  egerekben az *Egr2* és a *Timp1* mRNS expressziója szignifikánsan magasabb volt már 5 napos vesékben is (a *Timp1* mRNS expressziója 50%-kal). Mindez arra utal, hogy a korai renális EGR2 és TIMP-1 expresszió CBAxB6-TGF $\beta$  egerekben megelőzi az ECM komponensek fokozott expresszióját, így feltételeztük, hogy oki szereppel rendelkeznek a felgyorsult fibrózis

patogenezisében. Vizsgálatunk megerősítette azt a feltételezést, miszerint a genetikai háttér jelentősen befolyásolja a TGF- $\beta$  profibrotikus hatását ebben a modellben.

Megfigyeléseink alátámasztására két másik széles körben használt vesefibrózis modellben (UUO, SNX) is vizsgáltuk a CBA vs B6 genetikai háttér hatását a vesefibrózis progressziójára.

Hasonlóan a transzgenikus modellben látottakhoz, a kontroll B6 és CBA egerekben UUO és SNX hatására mind az EGR2, mind a TIMP-1 korai renális expresszió fokozódását láttuk a fibrózisra érzékeny CBA egerekben.

A TIMP-1 vesefibrózisban betöltött szerepének további bizonyítására CBAxB6 háttérű TIMP-1 hiányos egerekben SNX hatására kialakuló vesefibrózis mértékét hasonlítottuk vad típusú egerekéhez. Az SNX műtetet követően a CBAxB6 vad típusú egerekben szignifikánsan emelkedett a vese kollagén és *Tgfb1* mRNS expressziója, jelentős proteinuria mellett.

Ezzel szemben sem szignifikáns vesehegesedést, sem proteinuriát nem láttunk a TIMP-1 knockout SNX egerekben.

Mindezek mellett TIMP-1 neutralizáló antitesttel enyhíteni tudtuk a TGF- $\beta$  erős profibrotikus hatását CBAxB6-TGF $\beta$  egerekben is, amit a mérséklődött vesefibrózis, proteinuria és alacsonyabb szérum urea szint jelzett. Ezzel bizonyítást nyert, hogy a vesefibrózisra való genetikai fogékonyság erősen összefügg az EGR2 és a TIMP-1 expresszióval, nemcsak a TGF- $\beta$  transzgenikus modellben, hanem UUO vagy SNX modellben is, továbbá ez a két in vivo kísérlet is bizonyítja, hogy a TIMP-1 a vesefibrózis egyik fő mozgatórugója (1. ábra).

## 4.2 In vitro modellek eredményei

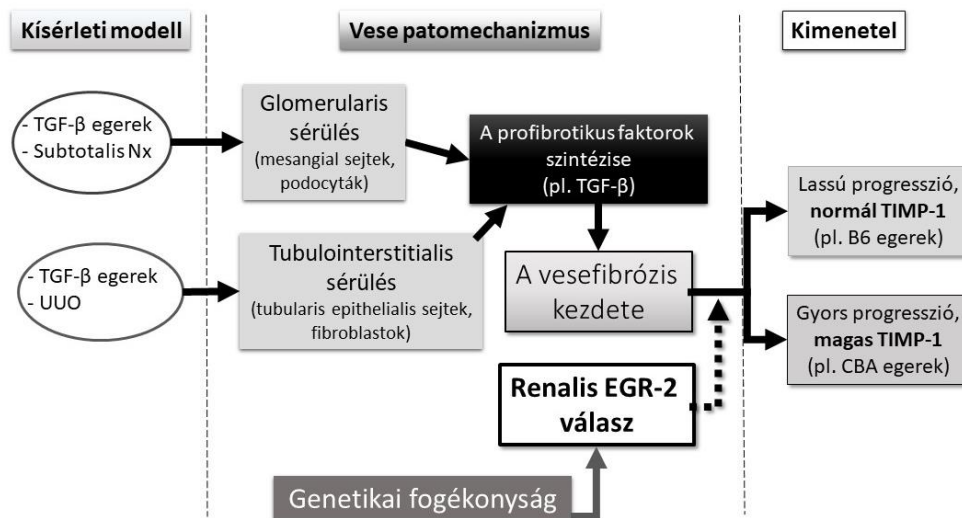
A B6 és CBA egerekből izolált primer mezangiális sejtekben is vizsgáltuk a genetikai háttértől függő TGF- $\beta$  indukált TIMP-1 szabályozást. CBA sejtekben TGF- $\beta$  hatására fokozódott az *Egr1* és *Egr2* mRNS expressziója, ezáltal a *Timp1* mRNS expressziója is, mely hozzájárulhat a fibrózis kialakulásához. Azonban vizsgálatainkban újdonság, hogy ez a hatás csak a fibrózisra érzékeny CBA egerekből származó mesangiális sejtekben

alakult ki, mivel a B6 egerek veséből izolált mezangiális sejtek nem így reagáltak, megerősítve az *in vivo* kísérleteink eredményeit.

További *in vitro* kísérletben bizonyítottuk, hogy EGR2-t kódoló plazmiddal történt transzfecció hatására, a jelentősen megnövekedett intracelluláris EGR2 expresszió HEK293 sejtekben a TIMP-1 fehérje expresszióját is fokozta. Az EGR2 és a TIMP-1 szorosan korrelált mind mRNS, mind fehérje szinten ebben az *in vitro* kísérletben is.

### 4.3 Humán vese biopsziák eredményei

Annak eldöntésére, hogy van-e human klinikai jelentősége az egerekben és a HEK293 sejtekben megfigyelt EGR2-TIMP-1 kapcsolatnak, az FSGS betegek és kontrollok vesebiopsziáiban vizsgáltuk az mRNS expressziókat. Az *Egr2* és a *Timp1* mRNS több mint kétszeres expresszió fokozódását figyeltük meg a humán FSGS mintákban a kontrollokhöz képest, ami felveti az EGR2 és TIMP-1 klinikai jelentőségét vesefibrózisban, valamint rámutat arra, hogy az EGR2 új célpontként szolgálhat a fibrózis jövőbeni kezelésében.



**1. ábra A genetikailag meghatározott vesefibrózis progressziójának feltételezett mechanizmusa.** Feltételezéseink szerint, a genetikailag meghatározott EGR2 válasz befolyásolja a vesefibrózis lefolyását: vagy egy normális TIMP-1 szint melletti lassú progresszió vagy egy fokozott TIMP-1 válasz miatti gyors progresszió alakul ki. A renális EGR2-TIMP-1 tengely a vesefibrózis progresszióját meghatározó új szabályozási mechanizmus lehet.

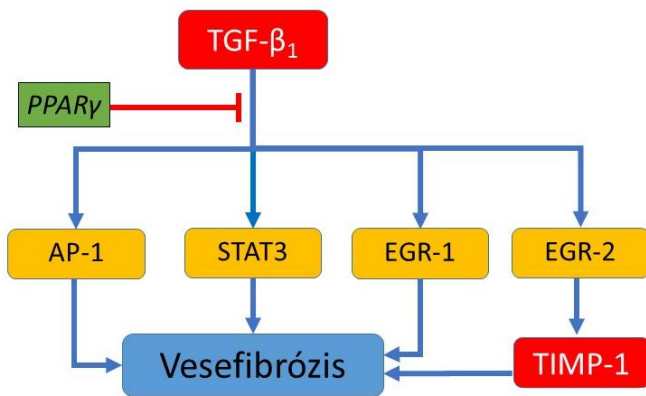
#### 4.4 PPAR $\gamma$ agonista kezelés hatása TGF- $\beta$ indukált vesefibrózisra

Feltételeztük, hogy a pioglitazon kezelés gátolja a TGF- $\beta$  indukált vesefibrózist és annak progresszióját a profibrotikus transzkripciós faktorok expressziójának változtatásával TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben. Vizsgálatunkban a krónikus PPAR $\gamma$  agonista pioglitazon kezelés csökkentette a proteinuria mértékét, glomeruloszklerózis és tubuláris károsodást is. Csökkentette továbbá a *Timp1* mRNS expresszióját, ezáltal mérsékelte a vesefibrózist. Másrészt a pioglitazon indirekt módon, transzkripcionálisan is befolyásolta az MMP/TIMP egyensúlyt.

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

Az *Egr1* mRNS expressziója emelkedett a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus vesékben, melyet mérsékelt a pioglitazon kezelés. Ez az eredmény felveti annak lehetőségét, hogy az EGR-1 a PPAR $\gamma$  agonisták anti-fibrotikus hatásának célpontja lehet. Az EGR-1 fehérje erős immunreaktivitást mutatott kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerekben, amely azonban mérséklődött pioglitazon kezelés hatására. Emellett fokozott STAT3 foszforilációt láttunk a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerek veséiben, összehasonlítva a kontroll csoportokkal. A krónikus pioglitazon kezelés jelentősen mérsékelte a TGF- $\beta$  indukált renális STAT3 aktivációt. Jelen kísérletünk a STAT3 és a PPAR $\gamma$  között további lehetséges kapcsolatra mutat rá vesefibrózisban, mivel a kezeletlen TGF- $\beta$  transzgenikus egerek veséjéhez képest a STAT3 aktiváció szignifikánsan mérséklődött a pioglitazonnal kezelt TGF- $\beta$  transzgenikus egerek veséjében.

Kísérletünk bizonyítja a PPAR $\gamma$  agonisták jótékony hatását vesefibrózisban fontos szerepet játszó több transzkripciós aktivációs útvonal (AP-1, STAT3, EGR1, EGR2) gátlása révén (2. ábra.).



**2. ábra A PPAR $\gamma$  feltételezett hatása TGF- $\beta_1$  indukált vesefibrózisban.** Eredményeink alapján a PPAR $\gamma$  agonista pioglitazon csökkenti az EGR-1, EGR2, STAT3 és AP-1 transzkripció 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.



## 5. KÖVETKEZTETÉS:

1. Több egér vesefibrózis modellben is bizonyítottuk, hogy a genetikai háttér meghatározza a progressziót, mely szorosan összefügg a vese TIMP-1 expressziójával.
2. Állatmodelljeinkben a beltenyésztett egértörzsekben látott törzs-függő vesefibrózis progressziót az EGR2 TIMP-1 szabályozási tengely eltérése okozhatja.
3. Igazoltuk, hogy primer 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.
4. PPAR-gamma agonista pioglitazon kezelés lassítja a TGF- $\beta$ 1 által indukált vesefibrózis progresszióját az EGR-1, a STAT3 és az AP-1 transzkripciós faktorok gátlásán keresztül.

## 6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. **Ágnes Németh**, Miklós M. Mózes, Laurent Calvier, Gerog Hansmann, Gábor Kökény. *The PPARgamma agonist pioglitazon prevents TGF-beta induced renal fibrosis by repressing EGR-1 and STAT3*. BMC Nephrol, 2019. **20**(1): p. 245.
2. Gábor Kökény, **Ágnes Németh**, Jeffrey B. Kopp, Weiping Chen, Andrew J. Oler, Anna Manzéger, 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)