

Krónikus vesebetegség kockázatával járó lókuszok funkcionális genomikai vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

Dr. Ledó Nóra

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulensek: Dr. Suszták Katalin, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Tislér András, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Szelestei Tamás, Ph.D., c. egyetemi docens
Dr. Tory Kálmán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga bizottságának elnöke:
Dr. Nyirády Péter, MTA doktora, egyetemi tanár

Komplex vizsga bizottságának tagjai:
Dr. Haris Ágnes, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Wagner László, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2017

Bevezetés

Krónikus vesebetegségnek nevezzük, ha a vesék szerkezete vagy funkciója olyan mértékben károsodik, hogy ez az egészségi állapotra hatással van, és a károsodás legalább három hónapja fennáll. A vesefunkciót leginkább a vesék filtrációs kapacitásával jellemezhetjük (glomeruláris filtrációs ráta – GFR), melyet az endogén kreatinin kiválasztás segítségével határozhatunk meg. Az ún. becsült glomeruláris filtrációs ráta (meghatározott egyenletekkel számolható bGFR) alapján a krónikus vesebetegséget öt stádiumra oszthatjuk: 1. stádium (bGFR > 90 ml/min/1,73m²), 2. stádium (bGFR 60 és 89 ml/min/1,73m² között), 3. stádium (bGFR 30 és 59 ml/min/1,73m² között), 4. stádium (bGFR 15 és 29 ml/min/1,73m² között) és az 5. stádium (bGFR <15 ml/min/1,73m²).

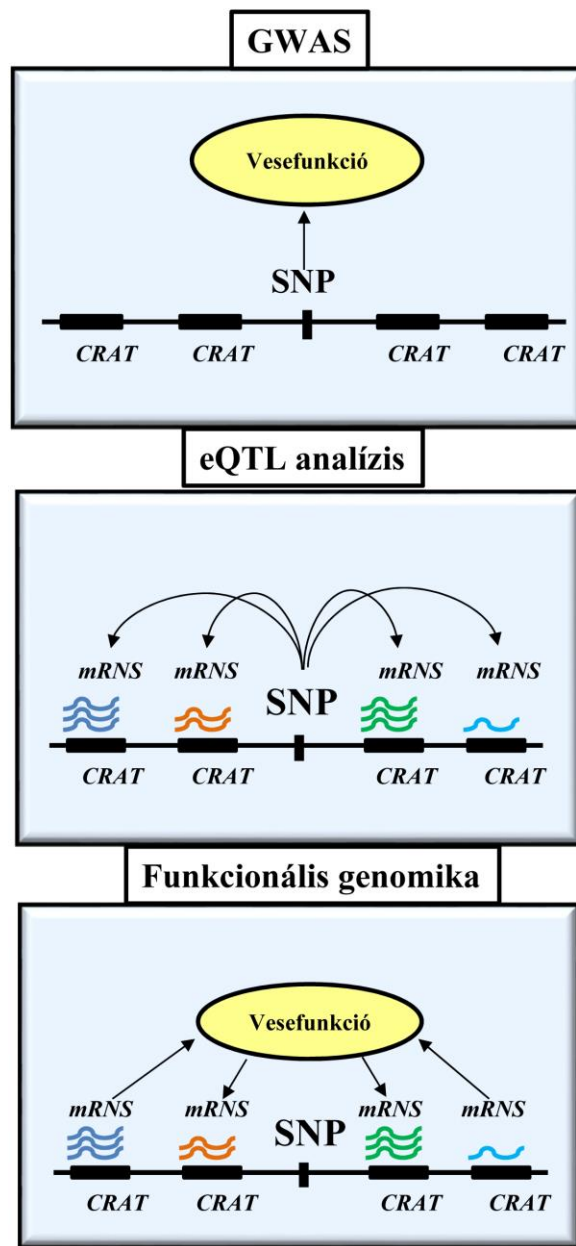
A krónikus vesebetegség előfordulása évről évre növekszik, jelenleg a globális prevalenciája eléri a 13,4%-ot (összes stádium), illetve a 10,6%-ot (3-5. stádiumok). Földrajzi régióként vizsgálva, a krónikus vesebetegség előfordulása Európában a legmagasabb. Ezek az adatok alátámasztják, hogy az utóbbi években a krónikus vesebetegség jelentős globális egészségügyi és gazdasági problémává vált. Így nőtt az igény a krónikus vesebetegség kialakulásának tanulmányozására, mely hosszútávú célja új terápiás utak találása a betegség progressziójának lassítására, vagy akár az idült veseelégtelenség kezelésére.

Bár előfordul monogénes betegségek által okozott krónikus vesebetegség is, a krónikus vesebetegség kialakulásában legtöbbször összetett genetikai és környezeti hatások, folyamatok játszanak szerepet. A két leggyakoribb ok, mely a krónikus vesebetegség hátterében állhat, a cukorbetegség és a magas vérnyomás, de a hipertézis és diabéteszes nephropathia hátterében is szerepet játszanak öröklődő tényezők. Az ilyen komplex betegségek –mint a krónikus vesebetegség– genetikai hátterének megismerésére alkalmas vizsgálómódszer a teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálat (genome-wide association study, GWAS). A GWAS vizsgálatok során a humán genomban található genetikai variánsok és az adott fenotípus közötti kapcsolatokat vizsgálják. A vizsgálandó populációt két csoportra osztják: egy bizonyos tulajdonsággal vagy betegséggel rendelkező egyéneket hasonlítanak össze egy kontroll csoporttal, ahol az adott tulajdonság nincs jelen (pl. krónikus vesebeteg populáció vs. nem vesebeteg populáció). Ha egy variáns (single nucleotide polymorphism, [SNP])

előfordulása gyakoribb abban a csoportban, amiben a betegek szerepelnek, azt mondhatjuk, hogy a SNP összefüggésbe hozható a vizsgált betegséggel. A teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatok fontos eszközei a genetikai variánsok és a krónikus vesebetegség közti összefüggések leírására, ugyanakkor további funkcionális vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy feltárjuk a valóban funkcionálisan is fontos polimorfizmusokat.

A legtöbb betegségkockázattal összefüggő SNP a nem-kódoló DNS szakaszban helyezkedik el, ezért a betegségek kialakulásában betöltött szerepükről még keveset tudunk. A betegségekkel összefüggő genetikai variánsok fontos transzkripciós faktorok bekötődését zavarhatják meg, ezáltal befolyásolva a környező gének minőségi vagy mennyiségi expresszióját. Azokat a polimorfizmusokat, melyek befolyásolják a gének expressziójának mértékét, mennyiségi tulajdonságokat meghatározó lókuszoknak, eQTL-nek nevezzük („expression quantitative trait loci”). A genetikai variánsok és a transzkriptom egyidejű analízise olyan SNP-eket tárhat fel, melyek ilyen eQTL lókuszokként viselkednek.

A funkcionális genomika, mint tudomány, a genom dinamikus tulajdonságait, szerepét próbálja megismerni, vizsgálja pl. a transzkripció, transláció, génexpresszió szabályozásának folyamatát és a fehérjék közti kapcsolatokat. A tudományág egyik fontos célja, hogy megismerje a nem-kódoló DNS szakasz funkcióit, ahol a legtöbb betegségkockázattal összefüggő polimorfizmus is megtalálható. A Ph.D. munka célja az volt, hogy rendszerbiológiai módszerek segítségével feltérképezze a krónikus vesebetegség rizikójával összefüggő lókuszok körüli gének expresszióját normál és beteg humán vesemintákban, és ezáltal azonosíthassunk a krónikus vesebetegség kialakulásában potenciálisan szerepet játszó géneket. (1. ábra)



1. ábra: Krónikus vesebetegség vizsgálatának különböző kutatómódszerei

A teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálat (GWAS) a genetikai variánsok (SNP) és a betegség/paraméter közötti kapcsolatot vizsgálja. Az eQTL (expression quantitative trait loci) analízis a genetikai variánsok és transzkriptek mennyisége közötti kapcsolatot vizsgálja. A krónikus vesebetegség kockázatával járó lókuszek körüli transzkript szintek és a vesefunkció kapcsolatát a funkcionális genomika segítségével vizsgálhatjuk. *CRAT: krónikus vesebetegség rizikó-asszociált transzkript (CKD risk associated transcript)*

Célkitűzések

Hipotézisünk szerint a vesebetegség rizikó-asszociált polimorfizmusok befolyásolják a környező gének expresszióját a vesében. A Ph.D. munkában feltérképeztem ezen gének expresszióját normál és beteg humán vesemintákban. Funkcionális genomikai és rendszerbiológiai módszerekkel vizsgáltam ezen transzkriptek szövetspecifikus expresszióját, és azok kapcsolatát a vesefunkcióval.

A Ph.D. munka célja:

1. Olyan gének keresése, melyek szerepet játszhatnak a krónikus vesebetegség kialakulásában
2. A vesefunkció hanyatlásával összefüggő fehérje-hálózatok feltárása, mely további vizsgálatok alapja lehet

Módszerek

Humán veseminták

A humán veseminták sebészi nephrectomia, illetve diagnosztikus vesebiopszia fel nem használt részéből származtak. A vesemintáknak csak a normál (tumormentes) részét használtuk fel a vizsgálatokban. A hozzátartozó klinikai adatokat olyan egyén gyűjtötte, aki a vizsgálatban egyébként nem vett részt. Mikroszkóp segítségével a veseszövetet mikro-disszekciós módszerrel szétválasztottuk glomerulus- és tubulusmintákra. Finom csipeszek segítségével a glomerulusokat eltávolítottuk, és külön dolgoztuk fel. A veseminta visszamaradt részét neveztük „tubulusmintának”. A génexpresszió vizsgálatára 95 tubulus, 51 glomerulusmintából izoláltunk RNS-t (ribonukleinsav), továbbá 41 tubulusmintát validálásra használtunk fel. A veseminták változatos populációból származtak.

Minták feldolgoása és az adatok analízise

A szétválasztott szövetet homogenizáltuk, és az RNS mintákat az RNAeasy izoláló oszlopok segítségével készítettük el, a gyártó utasításai szerint (Qiagen, Valencia, CA, USA). Csak a degradáció jeleit nem mutató RNS mintákat használtuk fel.

A minták génexpressziós profilját az Affymetrix U133A microarray és a GeneSpring GX program segítségével elemeztük (Agilent Technologies). Továbbá QRT-PCR (quantitative real time polymerase chain reaction) vizsgálatot használtunk validálás, valamint az eQTL analízis során. Az eQTL analízishez a minták genotipizálását DNS izolálás után TaqMan próbákkal végeztük. A gének expresszióját RNS-szekvenálás segítségével is vizsgáltuk egészséges vesékből származó biopsziámintákban (n=2). Immunhisztokémiát alkalmaztunk az expressziós változások követésére fehérje szinten.

Bioinformatikai módszerek

Hálózati elemzéseket végeztünk (DAVID Bioinformatics Resources, Ingenuity Network Analysis) és különböző nyilvánosan elérhető adatbázisok adatait is feldolgoztuk, mint a Human Protein Atlas, Illumina Body Map és a National Institute of Health eQTL keresője.

Használt statisztikai módszerek

Statisztikai analíziseink során a demográfiai, klinikai és hisztopatológiai paraméterek (mint a kor, BMI (body mass index), vércukorszint, vérnyomás (szisztolés és diasztolés), szérum kreatinin, szérum karbamid, szérum albumin, glomerulosclerosis és az intersticiális fibrózis aránya) valamint a becsült glomeruláris filtrációs ráta (bGFR) közötti összefüggések leírására Pearson vagy Spearman korrelációs analízist alkalmaztunk a D'Agostino-Pearson normalitás vizsgálat eredményétől függően. A korreláció szignifikancia szintjét kétoldali próbával számítottuk ki ($\alpha=0,05$). A genotipizált minták génexpressziójának összehasonlításához (eQTL-analízis) egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) és Student-féle t-tesztet alkalmaztunk. A statisztikai analíziseket a Prism 6 programmal végeztük (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

A microarray adatok statisztikai feldolgozásához a GeneSpring GX programot használtuk. A génexpresszió és a bGFR közötti összefüggéseket Pearson korrelációs teszttel vizsgáltuk, Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával (p-érték: 0,05).

Eredmények

A krónikus vesebetegség rizikó-asszociált transzkriptek meghatározása

A krónikus vesebetegség rizikó-asszociált transzkriptek meghatározásához áttekintettük az irodalomban addig megjelent teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatokat, melyekben a krónikus vesebetegséggel összefüggő genetikai variánsokat írtak le. Keresésünk eredményeként 10 olyan tanulmányt találtunk, melyben a polimorfizmusok a bGFR-val (szérum kreatinin vagy cisztatin C alapján számítva) vagy a vesebetegség jelenlétével mutatott összefüggést. A kódoló régióban elhelyezkedő vagy a megfelelő szignifikancia szintet el nem érő ($p > 5 \times 10^{-8}$) polimorfizmusokat kizártuk a további vizsgálatból. Végül 44 „jelölő” („tagging”) SNP-t találtunk, melyek megfeleltek a kritériumoknak. A legtöbb publikáció nem tett különbséget a hipertenzív és a diabeteses nephropathia között, ugyanakkor három vizsgált SNP csak a diabeteses nephropathiával mutatott összefüggést, ezért ezeket külön is vizsgáltuk.

Hipotézisünk szerint a vesebetegség rizikó-asszociált polimorfizmusok hatással lehetnek egyes transzkripció faktorok kötődésére, és ezzel befolyásolhatják a környező gének expresszióját a vesében. Korábbi adatok szerint a géneket szabályozó régiók (promoterek, génerősítő, illetve -csendesítő régiók) nagy része (70-80%) a génekhez közel, 250 kilobázispáron belüli DNS szakaszon helyezkednek el. A polimorfizmusok körül egy 500 kilobázis pár hosszú ablakot használva összesen 306 gént találtunk a 44 krónikus vesebetegség rizikó-asszociált SNP-k körül. Egy polimorfizmus körül (rs12437854) nem volt gén ebben a távolságban, így a továbbiakban 43 lókuszt vizsgáltunk. Ezt a 306 gént „krónikus vesebetegség rizikó-asszociált transzkripteknek” („*CKD risk-associated transcripts*” – CRAT) neveztük el.

CRAT gének vesespecifikus expressziójának vizsgálata

Először azt vizsgáltuk, hogy ezek a transzkriptek expresszálódnak-e a vesében. Feltételeztük, hogy ha ezek az ún. CRAT transzkriptek szerepet játszanak a vesék működésében, akkor expresszálódnaniuk kell a vesében. RNS szekvenálás segítségével meghatároztuk ezeknek a géneknek az expresszióját normál, egészséges tubulusmintákban (n=2). A vizsgált gének 41%-a erős, 32%-a közepes, 21%-a alacsony kifejeződést mutatott, míg csak 6%-uk nem expresszálódott normál tubulusmintákban.

Összegezve, a krónikus vesebetegség rizikó-asszociált polimorfizmusok környezetében található gének nagy része (94%; 287 a 306-ból) expresszáldott a vesében. Eredményeink megerősítésére nyilvánosan elérhető adatbázisokat használtunk, hogy megvizsgáljuk a CRAT transzkriptek vesespecifikus kifejeződését. Úgynevezett gén ontológiai analízist végeztünk (david.abcc.ncifcrf.gov), mely a CRAT gének specifikus és szignifikáns jelenlétét igazolta a vesében ($p=0,0082$) és a fehérvérsejtekben ($p=0,0014$). Továbbá összehasonlítottuk a CRAT gének expresszióját 16 különböző szövet RNS szekvenálás eredményei alapján (Illumina Body Map, www.ebi.ac.uk). Az adatbázis megerősítette a CRAT gének vesespecifikus expresszióját. Összefoglalva, a CRAT gének erős expressziót mutattak a vesében és a fehérvérsejtekben, mely jelezheti ezeknek a sejteknek a szerepét akár a vesebetegség kialakulásában is.

CRAT gének expressziójának feltérképezése humán vesemintákban

Hipotézisünk szerint a funkcionálisan fontos CRAT gének nemcsak kifejeződnek a vesében vagy a fehérvérsejtekben, de kifejeződésük változik is a vesebetegség megjelenésével. Ennek vizsgálatára megvizsgáltuk ezen gének expresszióját mikro-disszekcióval szétválasztott glomerulus- (n=51) és tubulusmintákban (n=95). A transzkriptek analíziséhez Affymetrix U133v2 microarray chipet használtunk, melyen a vizsgálandó gének közül 226 „prób a”-jelölés szerepelt, így az eredeti 306 génből 226-ot tudtunk vizsgálni ezekben a mintákban.

Korreláció analízis (Pearson) során glomerulusokban 34 CRAT gén expressziója mutatott szignifikáns összefüggést a bGFR-val, mint folyamatos változóval ($p<0,05$). Benjamini-Hochberg korrekciót követően hét transzkript esetében maradt szignifikáns ez az összefüggés. Több, a GWAS vizsgálatok során nem említett, új gén expressziója is szignifikáns összefüggést mutatott a vesefunkcióval. Például a *FAM47E* (Family with sequence similarity 47, member E), *PLXDC1* (Plexin domain-containing 1), *VEGFA* (Vascular endothelial growth factor A) és *MAGI2* (Membrane-associated guanylate kinase 2) expressziója is korrelált a vesefunkcióval. Érdekes módon, a *FAM47E*, *PLXDC1* és *MAGI2* géneket korábban nem jelölték a GWAS vizsgálatok során, mint lehetséges polimorfizmus körüli „cél-géneket”. Összefoglalva, az analízis megmutatta, hogy számos CRAT expressziója korrelál a vesefunkcióval glomerulusmintákban.

Hasonlóan, tubulusmintákban is vizsgáltuk a gének expressziója és a bGFR közötti összefüggést. Pearson-féle korrelációs teszt 92 transzkript esetében mutatott szignifikáns összefüggést a vesefunkcióval ($p < 0,05$). Benjamini-Hochberg-féle korrekció után 70 gén esetében maradt szignifikáns ez az összefüggés. A tubulusok funkciójában fontos csatornákat kódoló gének expressziója erős korrelációt mutatott a vesefunkcióval. Például a *SLC34A1* (Solute carrier family 34, member 1) expressziója, ami a kettes típusú nátrium/foszfát transzportert kódolja, valamint a *SLC7A9* (Solute Carrier Family 7 Member 9) expressziója, ami egy aminosav transzporter könnyű láncát kódolja, erősen korrelált a vesefunkció váltoásaival ($R=0,61$ és $R=0,59$). A transzporterekén túl más gének expressziója is erősen korrelált a vesefunkcióval tubulusmintákban, mint például az *ACSM5* (Acyl-CoA synthetase medium chain family member 5), ami egy metabolizmusban szerepet játszó enzimet kódol. Az *ACSM5* fehérje szinten is erős kifejeződést mutatott a vesetubulusokban.

Külső validálásként egy 41 tubulusmintából származó transzkript-profil adatbázist használtunk. Ez a 41 tubulusminta nem egyezett meg az eredeti 95 tubulusmintával. Bár ez az adatbázis kevesebb mintából készült és szűkebb bGFR tartomány tartozott hozzá, 51 CRAT esetében ebben az adatbázisban is szignifikáns korrelációt találtunk a vesefunkcióval, kiemelve ezen gének fontosságát.

Összefoglalva, a génexpresszió és a vesefunkció kapcsolatának vizsgálata számos CRAT génre hívta fel a figyelmet, mely további vizsgálatok alapja lehet.

A „UMOD-lókuszt” és más krónikus vesebetegség rizikó-asszociált lókusztok körüli gének expressziója

Az irodalomban a vesebetegségek vizsgálatában kiemelkedő szerepet kapó gén az uromodulin (*UMOD*), ezért az egyik leginkább vizsgált lókuszt a 16. kromoszómán elhelyezkedő ún. „*UMOD*-lókuszt” (rs12917707, rs4293393 és rs11864909). Az uromodulin expressziós változásait ezért mi is külön vizsgáltuk. Az *UMOD* gén a humán vizeletben egyik leggyakoribb fehérjét, az uromodulint, vagy más néven Tamm-Horsfall fehérjét kódolja. Azt találtuk, hogy tubulusmintákban az *UMOD* erősen korrelált a vesefunkcióval (korrigált $p=6,09 \times 10^{-6}$). Immunhisztokémiai vizsgálatot

végeztünk a gyenge és az erős *UMOD* transzkript expressziót mutató mintákon, ami megerősítette, hogy a transzkript szintek változásai fehérje szinten is észlelhetők.

Az *UMOD* gén fontossága a krónikus vesebetegség kialakulásában már korábban is felmerült, ugyanakkor meglepő módon nemcsak az *UMOD*, hanem más környező gének is erősen expresszálódtak a vesetubulusokban, és expressziójuk korrelált a vesefunkcióval. Az *ACSM5* és *ACSM2A/B* is erősen kifejeződnek a vesetubulusokban. Az Illumina Body Map RNS-szekvenáláson alapuló adata is megerősítette ezen transzkriptek erős kifejeződését a vesében. Korrelációs analízis során az *UMOD*, *ACSM5* és *ACSM2A/2B* expressziója erős összefüggést mutatott a vesefunkció változásaival. Ezen gének microarray chip segítségével mért expressziós változásait QRT-PCR segítségével is validáltuk. Immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk a gyenge és az erős *ACSM2A/2B* transzkript expressziót mutató mintákon, és az expressziós változásokat fehérje szinten is kimutattuk. Az *ACSM5* és *ACSM2A/2B* gének három enzimet kódolnak, melyek a zsírsav-oxidációban vesznek részt. Annak ellenére, hogy ezek a gének erősen kifejeződnek a vesében és expressziójuk a vesefunkcióval is összefüggést mutat, mégsem említették őket a GWAS vizsgálatok során, mint lehetséges „cél-gének”. Eredményeink arra utalnak, hogy ezeknek a géneknek is fontos funkciójuk lehet a vesében.

Azt is vizsgáltuk, hogy más lókuszok körül is hasonlóan több gén expressziója változik a vesefunkcióval, vagy csak egy gén esetében látjuk az összefüggést. Azt találtuk, hogy 23 SNP esetében (a vizsgált 43 lókusz közül) több környező gén expressziója is összefüggött a vesefunkcióval, ami azt is jelentheti, hogy ezen gének szabályozása egymással összefügg.

eQTL-analízis

A vesefunkcióval összefüggésbe hozható polimorfizmusok befolyásolhatják a környező gének expresszióját. Különböző szövetekben végzett eQTL-vizsgálatok eredményei gyakran mutatnak átfedést, ezért megvizsgáltuk, hogy a krónikus vesebetegség rizikó-asszociált SNP-k befolyásolják-e a környező gének expresszióját (cis-eQTL analízis, 1 Megabázispár távolságban) különböző adatbázisokban, ahol a genotípusok és a génexpressziós adatok elérhetőek. 4 SNP a korábban meghatározott 44 „jelölő” SNP közül, illetve 16 SNP a kapcsolt régióból (linkage disequilibrium: $r^2 \geq 0,8$)

mennyiségi tulajdonságot meghatározó lókuszként viselkedett 11 transzkript esetében ($p < 0,05$). Ezek közül az egyik transzkript, a *CLTB* (Clathrin, light chain B) szignifikáns korrelációt mutatott a bGFR-val glomerulusokban ($p = 0,016$). Egy másik transzkript, a *CERS2* (ceramide synthase 2) expressziója is erősen korrelált a vesefunkcióval tubulusmintákban ($p = 1,2 \times 10^{-4}$) kiemelve a gén lehetséges szerepét a krónikus vesebetegség kialakulásában.

Bár a Ph.D. munka fő része a betegség-progresszió és a génexpresszió összefüggéseire koncentrált, a veseminták genotípusát is meghatároztuk az rs881858 és rs6420094 lókuszkra nézve, hogy megvizsgáljuk ezen lókuszek hatásait a környező gének expressziójára.

Tubulusmintákban a *VEGFA* transzkript szintje alacsonyabb volt azokban a mintákban, amelyek homozigóták voltak a „major” (gyakoribb) allélra nézve az rs881858 lókuszon, összehasonlítva azokkal a mintákkal, ahol a „minor” (ritkábban előforduló) allél volt jelen heterozigóta vagy homozigóta formában ($p = 0,025$). Ez az összefüggés csak egészséges vesemintákban volt igaz ($n = 21$, bGFR > 85 ml/min/1,73m²). A *VEGFA* transzkript- és fehérjeszint erős korrelációt mutat a vesefunkcióval, glomerulus- és tubulusmintákban is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az rs881858 polimorfizmus valószínűleg befolyásolja a *VEGFA* gén expresszióját, azonban ez az összefüggés vesebetegekből származó mintákban már nem figyelhető meg a vesefunkció és a *VEGFA* expresszió erős kapcsolata miatt. Az eredmények alapján a *VEGFA* transzkript fontos szerepet játszhat a krónikus vesebetegség pathomechanizmusában.

Továbbá vizsgáltuk az 5. kromoszómán elhelyezkedő rs6420094 polimorfizmus hatását a *SLC34A1* gén expressziójára. Tubulusmintákban az *SLC34A1* expressziója magasabb volt azokban a mintákban, melyek homozigóták voltak a „major” (gyakoribb) allélra nézve az rs6720094 lókuszon, összehasonlítva azokkal a mintákkal, ahol a „minor” (ritkábban előforduló) allél volt jelen heterozigóta vagy homozigóta formában ($n = 18$, bGFR > 85 ml/min/1,73m², $p = 0,0305$).

***CRAT* gének hálózati elemzése**

Összefoglalva, a 226 CRAT gén közül összesen 104 gén expressziója mutatott szignifikáns összefüggést a bGFR-val 39 lókuszt körül –az eredeti 44 lókuszból.

Megvizsgáltuk, hogy a vesefunkcióval (glomerulus- és/vagy tubulusmintákban) összefüggést mutató 104 CRAT gén kapcsolatban állhat-e egymással és elhelyezhetőek-e egy hálózatban. Hálózati elemzést végeztünk külön azokon a géneken, melyek pozitív, illetve azokon, melyek negatív korrelációt mutattak a vesefunkcióval.

Azok a gének, melyek transzkriptjei negatív összefüggést mutattak a vesefunkcióval (krónikus vesebetegségben emelkedett az expressziójuk), a TNF (tumor necrosis factor), TGF- β 1 (transforming growth factor beta) és a NF- κ B/RELA (nuclear factor kappa B with p65 subunit) szabályozó fehérjék köré csoportosultak. Ennek a hálózatnak a legtöbb eleme immunreakciókban, illetve gyulladásos folyamatok szabályozásában játszik szerepet. A másik hálózat elemei (a vesefunkcióval pozitívan korreláló transzkriptek) a VEGFA és ERBB2 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2) molekulák köré csoportosultak. Ezek a fehérjék epiteliális és endoteliális funkciókban játszanak fontos szerepet. Összefoglalva, hálózati elemzésünk rávilágított arra, hogy ezek a gének szabályozásukban összefügghetnek, illetve az epiteliális folyamatok mellett a gyulladásbiológiai folyamatoknak is nagy szerep juthat a krónikus vesebetegség kialakulásában.

A diabéteszes nephropathiával összefüggő lókuszek körüli gének expressziójának vizsgálata

Külön megvizsgáltuk a diabéteszes nephropathia rizikó-asszociált lókuszek (rs12437854, rs7583877 és rs1617640) körüli gének expresszióját, és azok összefüggéseit a vesefunkcióval olyan glomerulus- és tubulusmintákban, melyek egészséges, illetve diabéteszes vesebetegséggel rendelkező egyénekből származtak. Az analízisből így kizártuk azokat a mintákat, melyeknél hipertenzív vesebetegség volt a vesefunkciócsökkenés oka, és ezzel 42 glomerulus- és 76 tubulusmintában vizsgáltuk a diabéteszes nephropathia rizikó-asszociált SNP-k körüli gének expresszióját. Az eredmények kiemelték, hogy a glomerulusokban a *PCOLCE* (Procollagen C-endopeptidase enhancer), míg tubulusokban a *TRIP6* (Thyroid hormone receptor interactor 6) gén expressziója korrelált a vesefunkcióval.

Emellett vizsgáltuk az rs1326934 lókuszek körüli gének expresszióját. Munkacsoportunk egy többfázisú teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatban összefüggést talált az rs1326934 lókuszek és a diabéteszes nephropathia jelenléte között,

1-es típusú cukorbetegségben (II. publikáció). Ezen GWAS vizsgálat felfedező, első fázisában a vizsgált SNP-k nem érték el a megfelelő szignifikancia szintet, de a második fázis során a vizsgálatban kiemelkedett ez a lókus, mely a *SORBS1* (Sorbin and SH3 Domain Containing 1) gén mellett helyezkedik el.

A *SORBS1* gén expresszióját normál (nem diabéteszes) és diabéteszes vesebeteg mintákban vizsgáltuk (17 glomerulus- és 39 tubulusminta). Először összehasonlítottuk a normál és beteg mintákban a *SORBS1* expresszióját, mely alapján a gén diabéteszes vesebeteg tubulusmintákban erősebb kifejeződést mutatott a kontroll tubulusmintákhoz képest ($p=6 \times 10^{-4}$). Korrelációs analízis során a *SORBS1* expressziója szignifikáns, inverz korrelációt mutatott a bGFR-val tubulusmintákban ($R=-0.493$; $p=1.44 \times 10^{-3}$). Az rs1326934 lókus körülü gének expresszióját vizsgálva pedig megállapítottuk, hogy nemcsak a *SORBS1*, hanem a lókus körülü egyéb gének expressziója is korrelál a vesefunkcióval.

Következtetések

Egy összetett, komplex eredetű betegség kialakulásának megértése, tanulmányozása a tudomány számára nagy kihívás. Ahogy a bevezetésben bemutattam, a krónikus vesebetegség is egy ilyen összetett betegség, számos genetikai és környezeti hatás szerepet játszik a kialakulásában. Az első lépés lehet egy ilyen betegség kialakulásának megértésében, ha feltérképezzük a betegség genetikai hátterét.

A közelmúltban teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálatok feltártak több, krónikus vesebetegség kockázatával járó lókuszt, de ezen SNP-k krónikus vesebetegségek kialakulásában betöltött szerepéről még keveset tudunk.

A Ph.D. munkában:

- Meghatároztunk 306 krónikus vesebetegség rizikó-asszociált transzkriptet (CRAT), melyek 44 krónikus vesebetegség rizikó-asszociált lókuszt körül helyezkednek el.
- Feltérképeztük a CRAT gének expresszióját normál és beteg humán vesemintákban, és vizsgáltuk a gének expressziójának összefüggéseit a vesefunkcióval.
- A 44 lókuszból 39 esetben (89%) találtunk géneket, melyek expressziója összefüggött a vesefunkcióval, így további vizsgálatok alapjai lehetnek.
- Példákon keresztül (*UMOD*, *ACSM2A* és *VEGFA*) bemutattuk, hogy ezek az expressziós változások fehérje szinten is jelen vannak.
- Eredményeink azt mutatták, hogy egy lókuszt körül nemcsak a legközelebbi gén expressziója, hanem több környező gén expressziója is korrelálhat a vesefunkcióval, mely a többi gén fontosságára, illetve ezek együttes regulációjára hívja fel a figyelmet.
- Hálózati elemzésünk azt mutatta, hogy a vesefunkcióval korreláló gének kettő, jól körülírható hálózatot alkotnak: egy epiteliális biológiai hálózatot (a vesefunkcióval pozitív korrelációt mutató gének), illetve egy gyulladási biológiai hálózatot (a vesefunkcióval inverzen korreláló gének).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a krónikus vesebetegség kockázatával járó lókusztok funkcionális genomikai vizsgálata számos új, a teljes genomra kiterjedő

asszociációs vizsgálatok során nem említett génre hívta fel a figyelmet. A jövőben molekuláris és sejtbiológiai kísérletek szükségesek, hogy megértsük a krónikus vesebetegség rizikó-asszociált transzkriptek szerepét a krónikus vesebetegség kialakulásában. Eredményeink olyan gének, illetve jelátviteli utak szerepére hívják fel a figyelmet, melyek szerepet játszhatnak a krónikus vesebetegség kialakulásában, vagy a betegség jelzői, biomarkerei lehetnek.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó saját publikációk:

I. **Ledo N**, Ko YA, Park ASD, Kang HM, Han SY, Choi P and Susztak K (2015) Functional genomic annotation of genetic risk loci highlights inflammation and epithelial biology networks in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 26(3):692-714.

II. Germain M, Pezzolesi MG, Sandholm N, McKnight AJ, Susztak K, Lajer M, Forsblom C, Marre M, Parving HH, Rossing P, Toppila I, Skupien J, Roussel R, Ko YA, **Ledo N**, Folkersen L, Civelek M, Maxwell AP, Tregouet DA, Groop PH, Tarnow L and Hadjadj S (2015) SORBS1 gene, a new candidate for diabetic nephropathy: results from a multi-stage genome-wide association study in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 58(3):543-8.

Az értekezés témájához közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk:

1. Ko YA, Yi H, Qiu C, Huang S, Park J, **Ledo N**, Köttgen A, Li H, Rader DJ, Pack MA, Brown CD, Susztak K (2017) Genetic-variation-driven gene-expression changes highlight genes with important functions for kidney disease. *Am J Hum Genet*, 100(6):940-953

2. **Ledó N**, Horváth VJ, Tislér A (2017) A volumenstátusz meghatározásának jelentősége és lehetőségei a szív- és vesebeteg populációban *Hypertonia és Nephrologia*, 21(1)

3. **Ledo N**, Susztak K, Palmer MB (2016) Cell Phenotype Transitions in Renal Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep*, 4:19

4. Murber A, Fancsovits P, **Ledo N**, Szakacs M, Rigo J Jr, Urbancsek J (2011) Impact of highly purified versus recombinant follicle stimulating hormone on oocyte quality

and embryo development in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Acta Biol Hung*, 62(3): 255-64.

5. Pongor E, **Ledó N**, Altdorfer K, Lengyel G, Feher E (2010) Distribution and possible origin of neuropeptide-containing nerve elements in the mammalian liver. *Acta Vet Hung*, 58(2):177-87

6. Murber Á, **Ledó N**, Fancsovits P, Tóthné Gilán Zs, Rigó J jr, Urbancsek J (2010) In vitro fertilizáció (IVF) kezeléseknél alkalmazott stimulációs protokollok hatása a petesejt- és embrióminőségre, valamint a korai embriófejlődésre *Magyar Nőorvosok Lapja*, 73(1):23-29.

7. Murber A, Fancsovits P, **Ledó N**, Gilan ZT, Rigo J Jr, Urbancsek J (2009) Impact of GnRH analogues on oocyte/embryo quality and embryo development in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles: a case control study. *Reprod Biol Endocrinol*, 7:103