

AZ IL-20 CITOKIN ALCSALÁD SZEREPE A VESEFIBRÓZIS PATOMECHANIZMUSÁBAN

Doktori értekezés

Pap Domonkos

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Vannay Ádám, PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Komlósi Zsolt, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Gál Krisztina, Ph.D., osztályos orvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szalai Csaba, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Szijártó Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Szántai-Kis Csaba, Ph.D., vezető kutató

Budapest

2017

1. TARTALOMJEGYZÉK

1.	TARTALOMJEGYZÉK	2
2.	RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	5
3.	BEVEZETÉS.....	7
3.1	A krónikus vesebetegség és patomechanizmusa	7
3.1.1	Kongenitális obstruktív nefropátia és modellezése	8
3.1.2	A miofibroblasztok eredete	11
3.1.3	Aktin izoformák.....	13
3.1.4	Primer tervezés	14
3.1.5	TGF- β szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában.....	15
3.1.6	PDGF-B szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában	16
3.1.7	Az oxidatív stressz szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában	16
3.1.8	IL-20 citokin alcsalád és receptorai.....	17
3.1.9	Mátrix metalloproteinázok	20
4.	CÉLKITŰZÉSEK.....	23
5.	MÓDSZEREK.....	24
5.1	Unilaterális uréter obstrukció	24
5.2	A vese hisztológiai analízise.....	25
5.2.1	Perjódsav-Schiff (PAS) festés	25
5.2.2	Masson-féle Trichrome festés	26
5.2.3	Szöveti kollagén tartalom kimutatása Sirius-Red festéssel	26
5.2.4	Immunhisztokémiai festés	27
5.3	KON funkcionális genomikai elemzése	27
5.3.1	Microarray vizsgálat	27
5.3.2	Microarray adatok statisztikai kiértékelése	28

5.3.3	Génontológiai analízis	29
5.3.4	Hálózat elemzés	29
5.4	In vivo valamint in vitro molekuláris biológiai vizsgálatok	30
5.4.1	Áramlási citometriás mérés	30
5.4.2	Sejtkultúra és kezelések	31
5.4.3	RNS-izolálás, cDNS szintézis, RT-PCR reakció	31
5.4.4	Western-blot	34
5.5	α -SMA és β -aktin specifikus primerek tervezése	35
5.5.1	Mesterséges DNS templát használata	36
5.6	Statisztika	36
6.	EREDMÉNYEK	37
6.1	Kongenitális obstruktív nefropátia vizsgálata microarray technológia segítségével	37
6.1.1	UUO indukált patológiai változások a vesében	37
6.1.2	Microarray analízis	38
6.1.3	Génontológiai elemzés eredménye	41
6.1.4	Hálózat elemzés	43
6.1.5	A microarray vizsgálat mRNS szinten történő validálása	46
6.1.6	A microarray vizsgálat fehérje szinten történő validálása	48
6.1.7	Az MMP-12 és az IL-24 vesén belüli lokalizációja	49
6.1.8	A TGF- β , PDGF-B és H ₂ O ₂ hatása a HEK-293 sejtek MMP-12 és IL-24 mRNS expressziójára	50
6.1.9	A TGF- β , PDGF-B és H ₂ O ₂ hatása a HK-2 sejtek MMP-12 és IL-24 mRNS expressziójára	51
6.1.10	Az IL-20R β kimutatása HEK-293 és HK-2 sejteken	52
6.1.11	Az IL-24 hatása a HEK-293 sejtek IL-6, valamint MMP-3 és -7 expressziójára	52

6.1.12 AZ IL-24 hatása a HK-2 sejtek IL-6, valamint MMP-3 és -7 expressziójára.	53
6.2 Az IL-24 szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában.....	54
6.2.1 Az IL-19,-20,-24 valamint IL-20R β expressziója UUO indukálta vesefibrózisban	54
6.2.2 Szöveti kollagén lerakódás kimutatása Sirius-red festéssel	55
6.2.3 Szöveti kollagén lerakódás kimutatása Masson festéssel.....	56
6.2.4 A miofibroblasztok mennyiségének meghatározása	58
6.2.5 Az IL-24 hatása a HK-2 sejtek TGF- β és PDGF-B expressziójára.....	59
6.2.6 Az IL-24 hatása a HK-2 sejtek TGF- β és PDGF-B fehérje termelésére	59
6.3 Az α -SMA valamint β -aktin specifikus detekciója fibrózis modellben	61
6.3.1 Specifikus egér α -SMA és β -aktin primerek tervezése	61
6.3.2 A saját tervezésű egér α -SMA és β -aktin primerek tesztelése	61
6.3.3 Korábban az irodalomban használt egér α -SMA és β -aktin primerek specifitásának vizsgálata.....	63
7. MEGBESZÉLÉS	67
7.1 Kongenitális obstruktív nefropátia patomechanizmusának rendszerbiológiai szintű elemzése.....	67
7.2 Az IL-24 szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában.....	71
7.3 Az α -SMA specifikus detektálása fibrózis modellben	74
8. KÖVETKEZTETÉSEK	77
9. ÖSSZEFOGLALÁS	78
10. SUMMARY	79
11. IRODALOMJEGYZÉK	80
12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	92
13. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	94

2. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AKT	Jelátviteli útvonal (Serine/threonine kinase)
CCl ₄	Szén-tetraklorid
DAB	Diamino-benzidin
DAVID	Ontológiai adatbázis
DMEM	Dulbecco's módosított sejtmédium
ECM	Extracelluláris mátrix
EGF	Endotéliális növekedési faktor
EMT	Epitéliális mezenchimális tranzíció
endoMT	Endotéliális mezenchimális tranzíció
ERK	Jelátviteli útvonal (Extracellular signal-regulated kinase)
FACS	Áramlási citofluoriméter
FBS	Fötális borjú szérum
FDR	Téves felfedezési ráta
FSP-1	Fibroblaszt specifikus protein 1
GAPDH	Glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GO	Génontológia
H ₂ O ₂	Hidrogén peroxid
HEK-293	Humán embrionális vese epitél sejt
HK-2	Humán vese epitél sejt
IL-20R α/β	Interleukin 20 receptor α/β
IL-6,-19,-20,-22,-24	Interleukin -6,-19,-20,-22,-24

JAK-STAT	Jelátviteli útvonal (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription)
JNK	Jelátviteli útvonal (c-Jun N-terminal kinases)
KGF	Keratinocita növekedési faktor
KO	Gén kiütött
KON	Kongenitális obstruktív nefropátia
KVB	Krónikus vesebetegség
MAPK	Jelátviteli útvonal (Mitogen-activated protein kinase)
MMP-3,-7,-12	Mátrix metalloproteináz -3,-7,-12
OD	Optikai denzitás
PAS	Perjódsav–Schiff festés
PDGF-B	Vérlemezke eredetű növekedési faktor B
PI3K	Jelátviteli útvonal (Phosphoinositide 3-kinase)
RT-PCR	Reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SMAD	Jelátviteli útvonal (Sma and Mad Related Family)
T7,-14	Uréter obstrukciót követően eltelt napok száma
TGF- β	Transzformációs növekedési faktor β
TNF- α	Tumor nekrozis faktor alfa
T β R	TGF- β receptor
UUO	Unilaterális ureter obstrukció
VEGF	Vaszkuláris endotéliális növekedési faktor
WT	Vad típusú
α -SMA	Alfa simaizom aktin

3. BEVEZETÉS

3.1 A krónikus vesebetegség és patomechanizmusa

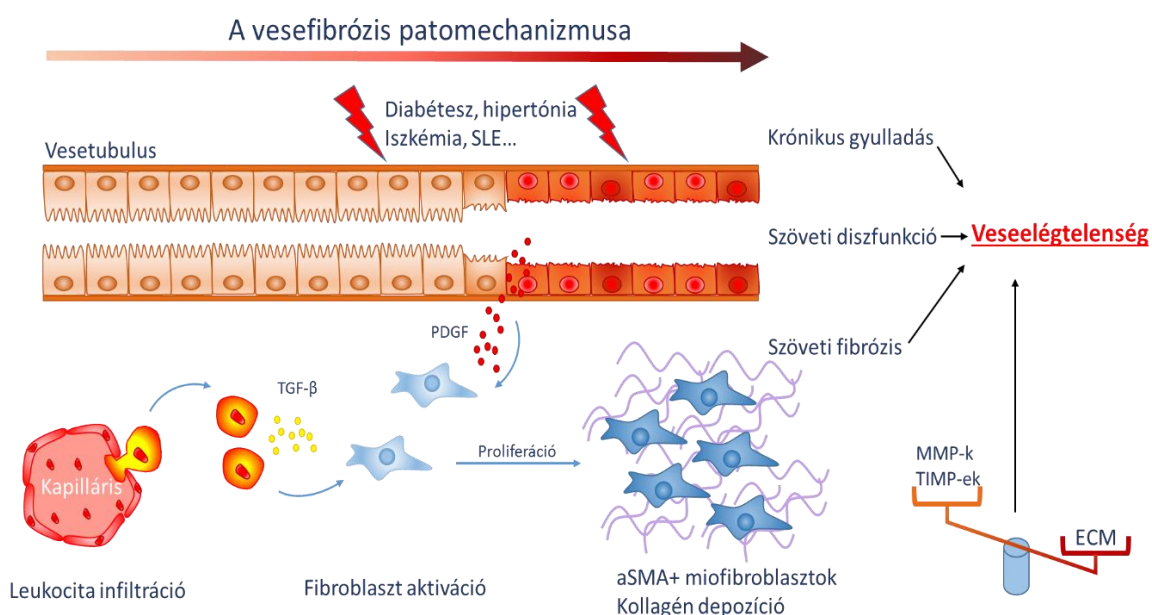
A krónikus vesebetegség (KVB) prevalenciáját világszinten 8-16%-ra becsülik [1], és az epidemiológiai tanulmányok szerint az érintettek száma a jövőben várhatóan még tovább növekszik [2, 3]. A KVB utolsó stádiuma a végállapotú vesebetegség, melynek kezelésére jelenleg egyedül a különböző vesepótló kezelések, (hemodialízis, peritoneális dialízis) állnak rendelkezésünkre. A gyermekkori KVB egyik leggyakoribb oka a kongenitális obstruktív nefropátia, a felnőtt korban kialakuló KVB hátterében pedig leggyakrabban a diabétesz mellitusz, illetve a magas vérnyomás betegség áll [4]. Ezeknek, de más kiváltó okoknak (gyógyszer intoxikáció, irradáció, öregedés stb.) is mindig szerves részét képezik a gyulladással, immunológiailag mediált folyamatok, melyek szoros korrelációt mutatnak a vesében kialakuló fibrózis mértékével.

A fibrótikus szövet alapvetően a sérülést követő természetes sebgyógyulási mechanizmusok túlzott mértékűvé válása következtében alakul ki. A folyamat során a glomeruláris és tubuláris sejtek károsító hatásra adott válaszként olyan kemoatraktáns citokinek szabadulnak fel, melyek fehérvérsejtek lokális felhalmozódásához vezetnek [5]. A sérülés helyére érkező monociták, makrofágok, granulociták valamint limfociták [6, 7] reaktív oxigén gyökök, pro-inflammatorikus citokineket, növekedési faktorokat, kemokineket, sejtadhéziós molekulákat termelnek, melyek emelkedett mennyisége lokális gyulladáshoz és további fehérvérsejtek felhalmozódásához vezet.

Kiemelendő a számos profibrotikus faktor közül a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) valamint a vérlemezke eredetű növekedési faktor B (PDGF-B) szerepe a folyamatban. Az ezen faktorok által kialakuló gyulladással közeg vezet a fibrózis fő effektor sejtjeiként ismert miofibroblaszt sejtek aktivációjához, proliferációjához [8]. A miofibroblasztok által nagy mennyiségben termelt extracelluláris mátrix (ECM) komponensek (kollagének, proteoglikánok, laminin) kóros mértékben felhalmozódnak a veseparenchimában. A folyamatot erősíti, hogy megbomlik az ECM komponensek degradációjáért felelős mátrix metalloproteinázok (MMP-k), valamint azok szöveti inhibitorai közötti egyensúly. A fibrózis előrehaladtával az egészséges vesére jellemző szöveti struktúra átalakul, a vesefunkció fokozatosan beszűkül, majd

megszűnik, szükségessé téve a veseptlő kezelések megindítását [9, 10].

A nyilvánvaló, terápiás igény ellenére sincs olyan általánosan elfogadott kezelés, mely egyértelműen képes lenne csökkenteni a végállapotú veseelégtelenséghez vezető szöveti fibrózis progresszióját. Fontos tehát, hogy feltárjuk a fibrózis patomechanizmusa mögött álló molekuláris mechanizmusokat, és azonosítsuk azokat a molekulákat melyek befolyásolják a szöveti hegesedés progresszióját és a későbbiekben terápiás kezelési célpontként szolgálhatnak.



1. ábra. A vese fibrózis patomechanizmusa. Sematikus folyamatábra mely a fibrózis során lezajló folyamatokat szemlélteti, kezdve a fibrózis folyamatát elindító sérüléstől, majd immunsejt infiltrációtól, és gyulladás kialakulásától a fokozott növekedési faktor (TGF-β, PDGF-B) termelésen át a miofibroblasztok akkumulációjáig és túlzott mértékű ECM termeléséig, ezáltal a végállapotú veseelégtelenség kialakulásáig.

3.1.1 Kongenitális obstruktív nefropátia és modellezése

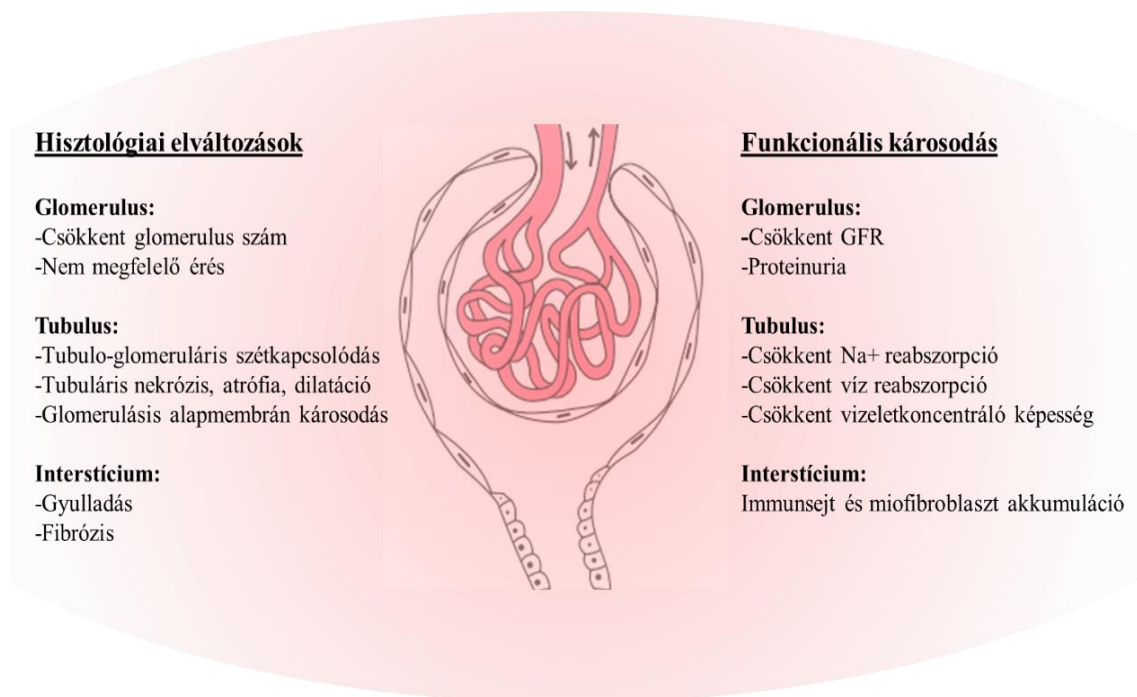
A kongenitális obstruktív nefropátia (KON) az egyik leggyakoribb oka a gyermekkori végállapotú veseelégtelenségnek [11]. Gyakorisága alapján körülbelül 10%-át teszi ki a veleszületett rendellenességeknek [12]. A hatékony vizelet transzporthoz elengedhetetlen a vese és az uréter közötti megfelelő anatómiai kapcsolat. Az uréter falát alkotó és a vizelet húgyhólyag irányába történő perisztaltikus szállításáért felelős simaizom sejtek

rendellenes fejlődése tehető sok esetben felelőssé az anatómiai kapcsolat beszűküléséért, az uréter elzáródásáért. Az obstrukció következtében kialakuló hidronefrózis a vesék üregrendszeri tágulata, amelyet az elzáródás következtében kialakuló nyomásfokozódás vált ki. A vizelet a veséből normálisan nagyon alacsony nyomáson folyik ki, azonban, ha útja elzáródott, a vizelet visszaáramlik a vese gyűjtőcsatornáiban. Ennek következtében a vese kitágul, ciszták alakulhatnak ki, és a veseparenchimára nehezedő nyomás idővel gyulladást indukál, károsítja a vese fejlődését, struktúráját valamint funkcióit ezáltal kialakítva a krónikus, majd végállapotú veseelégtelenséget. Bár az uréter fizikális elzáródásának megszüntetésére hatékony műtéti eljárások állnak rendelkezésre, mérsékelve ezzel a rövidtávon jelentkező akut vesekárosodást, a humán és állatokkal kapcsolatos vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy az obstrukció hosszútávon is megmaradó krónikus változásokat indukál a vesében [13].

Több különböző állatmodell is a kutatók rendelkezésére áll a kongenitális obstruktív nefropátia tanulmányozásához. Ismert olyan specifikus egér modell, mely genetikailag hajlamos, hogy spontán kialakuljon benne az uréter obstrukciója, azonban a csökkent reprodukciós képessége, miatt csak korlátozottan alkalmas a KON patomechanizmusának hatékony tanulmányozására [14]. A KON vizsgálatához leggyakrabban alkalmazott eljárás az újszülött rágcsálók unilaterális uréter obstrukciója (UUO) által kiváltott hidronefrózis, amely jelentős irodalmi beágyazottsággal bír, mivel az ivarérett állatokon alkalmazott UUO a vesefibrózis legtöbbször alkalmazott vizsgálati modellje is [15]. A módszert elsőként nyulakon és kutyákon vizsgálták, mára azonban gyakorlati megfontolások miatt (gyors reprodukciós képesség, alacsony fenntartási költségek) a legtöbb ilyen vizsgálatot különböző egér- és patkánytörzseken végzik. Elterjedtségét jelzi, hogy az utóbbi ötven évben ezernél is több publikációban szerepel az UUO, mint a KON valamint a vesefibrózis tanulmányozására szolgáló alapmethodika. Az obstruktív nefropátiát az állatok egyik uréterének lekötésével imitálják. Az obstrukció következtében kialakuló egyre nagyobb nyomású pangó vizelet a humán folyamathoz hasonlóan hidronefrózist eredményez. Az obstrukció következményeként kimutatható az intersticiális fibroblasztok nagymértékű aktiválódása, proliferációja, miofibroblaszttá differenciálódása. A miofibroblasztok fokozott ECM termelése pedig szöveti fibrózishoz vezet. A modell egyik legnagyobb előnye, hogy a fibrózis mértéke jól befolyásolható az obstrukció időtartamának változtatásával. Mivel a beavatkozás hatására már néhány nap

alatt kollagén lerakódás alakul ki a vesében, így a folyamat dinamikája jól vizsgálható. Az okozott sérülés következtében a kialakuló tubuláris nekrozis, glomerulus károsodás, kollagén lerakódás nem teljesen visszafordítható, a behatás megszüntetésével a regeneráció molekuláris mechanizmusa, valamint a folyamatban szerepet játszó molekulák szintén jól vizsgálhatóak. Az uréter obstrukciós metodika egyik hátránya, hogy a vesevezeték teljes elkötésével a vizelet nem tud eltávozni a veséből, így az állatok különböző vizeletparaméterei, melyekkel a vesefunkciók romlását lehetne vizsgálni a kísérlet során nem mérhetőek. Ez az akadály megszüntethető az uréter részleges elkötésével, ahol a fő vesekárosodást kiváltó hatás szintén a vizelet felgyülemzése által okozott nyomásnövekedés, de a szűrlet egy része mégis távozik az obstruált veséből. Az eljárás bonyolultságából eredően kevésbé standardizálható, reprodukálható, ezért a szakirodalomban csak sporadikusan fordul elő. Az uréter részleges elkötése esetén a fibrózis kialakulásához szükséges idő nehezen meghatározható, ellentétben a teljes elzárással, ahol egy héten belül már szövettanilag jól detektálható elváltozások jönnek létre [16].

A felnőtt állatokon végzett uréter obstrukció nem megfelelően demonstrálja, hogy milyen hatása van az uréter elzáródásának a fejlődésben lévő vesére. A kifejlett vesében kialakuló obstrukcióra adott válaszreakció egyértelműen elkülöníthető a pre- és posztnatális korban bekövetkező obstrukciós folyamatoktól [17] mivel obstrukció negatívan befolyásolja a vese morfogenezisét, növekedését, valamint érését [18]. Patkányokban és egerekben születésükig a nefrogenezisnek csupán a 10 százaléka zajlik le, és további 10 napnak el kell telni ahhoz, hogy a nefrogenezis lezáruljon, ezért az ezen állatokon neonatális korban végzett UUO hasonló hatást gyakorol a vese fejlődésére és funkcióira mintha a humán vese fejlődését a középső trimeszterben érné obstrukciós inzultus. Az újszülött patkányokon és egereken végrehajtott módszer ezért alkalmas arra, hogy megvizsgáljuk milyen molekuláris biológiai változások történnek KON hatására az állatok veséiben, és így előzetes következtetéseket vonjunk le humán vonatkozásban is [19, 20].

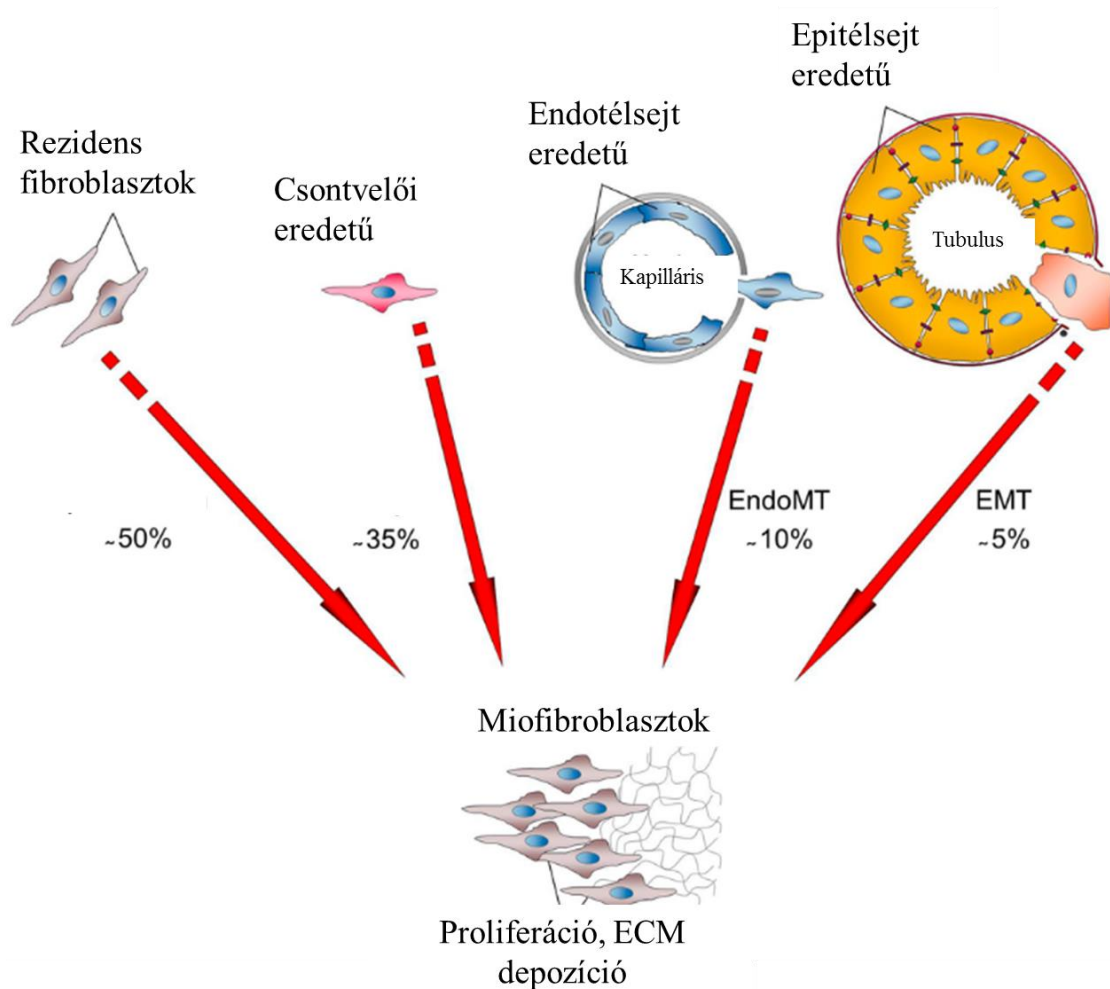


2. ábra. A kongenitális obstruktív nefropátia során kialakuló hisztológiai és funkcionális elváltozások a vesében.

3.1.2 A miofibroblasztok eredete

A miofibroblasztok olyan, jellemzően patológiás körülmények között előforduló differenciálódott sejtek, melyek a fibrózis során felelőssé tehetőek a kollagén-1, -3 valamint fibronektinben gazdag extracelluláris mátrix képződéséért. Elsőként hegyszövetben azonosították a sejtípust [21]. Jellemzőjük, hogy számos morfológiai és struktúrális hasonlóságot mutatnak a simaizom sejtekkel [22]. Jelenlétük szoros összefüggést mutat a szöveti fibrózis és a tubuláris atrófia mértékével ezért azonosításuk prognosztikai jelentőséggel bír. A felsorolt tulajdonságaik miatt került a detekciójuk a szöveti heggedéssel kapcsolatos kutatások fókuszába. A miofibroblasztok szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok fenntartásában, továbbá ismert, hogy ellenállnak az apoptózisnak, számos növekedési faktort, citokint termelnek, valamint fokozott a migrációs kapacitásuk [23, 24]. Eredetükkel kapcsolatban több elmélet is található az irodalomban, melyek szerint a vesében folyamatosan megtalálható kisszámú fibroblaszt aktivációjával [25], a csontvelői eredetű őssejtek sérülés helyére vándorlásával [26],

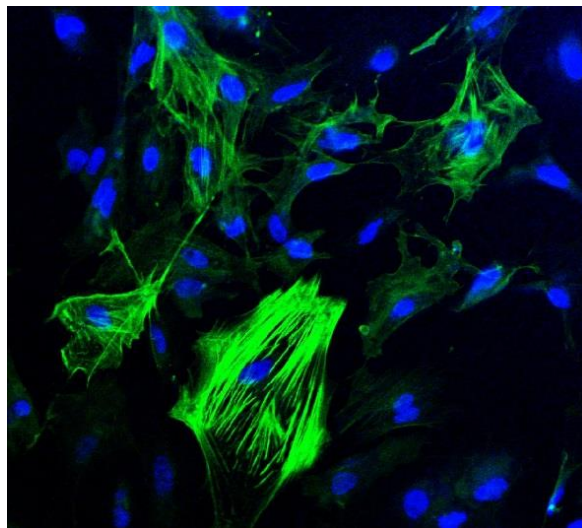
epiteliális mezenchimális tranzícióval (EMT) [27], valamint endoteliális mezenchimális tranzícióval (endoMT) [28, 29] keletkezhetnek.



3. ábra. A miofibroblasztok feltételezett eredete. A miofibroblasztok rezidens fibroblasztokból, csontvelői eredetű őssejtekből továbbá epitél és endotél sejtekből egyaránt differenciálódhatnak. A miofibroblasztá alakult sejtek fokozott mértékben osztódnak, és nagy mennyiségű ECM komponenst termelnek.

A miofibroblasztok differenciációjában, proliferációjában számos növekedés faktor játszik szerepet, melyek közül legszélesebb körben a transzformáló növekedési faktor β (TGF- β), és a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF-B) hatásait vizsgálták [30, 31]. Az extracelluláris mátrix elemeinek lerakódása a szövetben glomeruláris elmeszesedéshez, tubulo-intersticiális fibrózishoz vezet. A miofibroblasztok

detektálásához több specifikus molekulát is azonosítottak (fibroblaszt specifikus fehérje 1, vimentin) [32, 33] de a fibrózis detekciója során leggyakrabban használt specifikus biomarker, az alfa simaizom aktin (α -SMA) molekula, mely az aktin izoformák családjába tartozik [34, 35].

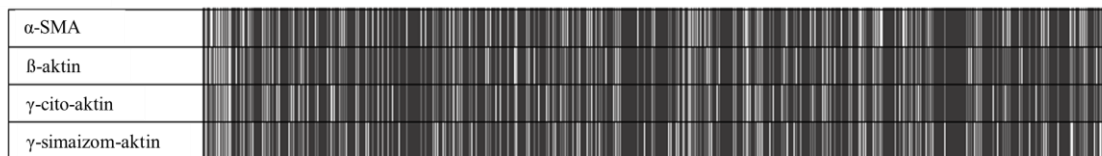


4. ábra. Reprezentatív kép α -SMA specifikus antitesttel jelölt miofibroblaszt sejtekről. Kék festődést mutatnak a sejtmagok, az α -SMA át pedig zöld festődés jelöli. 400x-os nagyítás.

3.1.3 Aktin izoformák

A különböző aktin típusok a sejtműködést alapvetően befolyásoló funkcionális szerkezeti egységei az eukarióta sejteknek. Alapvető feladatuk van a sejtben belüli transzportfolyamatokban, a sejtmozgásban, a sejtmozgás szabályozásában, az endo- és exocitózis folyamatában, a fagocitózisban és a citokin termelésben egyaránt [36]. A mikrofilamentális hálózat alapját képező aktin hálózat a mikrotubulusokkal és intermedier filamentumokkal közösen alkotják a citoskeletális rendszer komplex egységét. Az aktinnak ugyan több mint 100 egyedi szekvenciájú formája létezik, azonban a térszerkezeti, illetve funkcionális izoformák kiemelkedő homológiája mellett a különböző élőlényekben előforduló azonos izoformák erős szekvenciális konzervativizmusa figyelemre méltó. Az emlősökben előforduló aktin 3 izoformája gélelektroforézises elválasztás alapján 4 csoportba sorolhatóak, úgy mint α -aktin, β -aktin,

γ -cito aktin és γ -simaizom aktin. Bár az egyes aktin izoformákat különböző gének kódolják, köztük a hasonlóság ennek ellenére rendkívül nagyfokú.



Az adott pozícióban, hány aktin izoforma tartalmazza ugyan azt a nukleotidot:



5. ábra. Az aktin izoformák nukleotid szekvencia hasonlóságát leíró térkép. Az egyes színek a nukleotidok előfordulási gyakoriságát jelölik az aktin izoformák között. A különböző aktin izoformákat kódoló nukleotid szekvenciák hasonlósága meghaladja a 90%-ot. Ezt az ábrán a sötétebb színek dominanciája reprezentálja melyekkel az adott pozícióban kódolt, megegyező nukleotidokat jelöltük.

3.1.4 Primer tervezés

A különböző aktin izoformákat kódoló nukleotid szekvenciák hasonlósága meghaladja a 90%-ot, ezáltal igazi kihívást jelent az egyes izoformák valóban specifikus detektálása [37]. Sajnos a nyilvánvaló kódoló szekvenciát érintő hasonlóság ellenére a legtöbb tanulmány nem fordít kellő figyelmet arra, hogy az egyes aktin izoformákra valóban specifikus primereket tervezzen a polimeráz lánc reakciós (PCR) méréseik során. Nehéz megbecsülni annak mértékét, hogy a nem megfelelő aktin izoforma specifikus primerek milyen mértékben torzítják a szakirodalomban publikált tudományos közlemények eredményeit, de a probléma súlyát jól jelzi, hogy a különböző aktin izoformák mRNS szinten történő detekciója több ezer tudományos publikációban megtalálható, mivel például a β -aktin molekulát széles körben használják a molekuláris biológiai mérések normalizálásához, mint háztartási gént, az alfa simaizom aktin (α -SMA) pedig a miofibroblaszt detekció fő markere [38].

A primerek tervezésénél elméleti cél mindig az, hogy a célszekvenciához 100%-ban illeszkedő primereket hozzunk létre, amelyek a reakcióelegyben található többi génhez ne kapcsolódjanak, és mindemellett a célszekvenciánkat nagy hatékonysággal

felismerjék, hozzákapcsolódjanak és a PCR reakció során azt felsokszorozzák. A primereket körültekintő megtervezése elengedhetetlen ahhoz, hogy reakciónk működőképes, valamint az általunk felsokszorosítani kívánt mRNS szekvenciára specifikus legyen. A primerek ideális hossza 20 nukleotid körül van (18–25), ennél rövidebb vagy hosszabb primerek aspecifikus kötődést eredményezhetnek. A tervezés során az egyik a fontosabb szempont, hogy a két primer olvadási hőmérséklete (melting temperature, T_m) hasonló legyen. Ha megoldható, igyekeznünk kell olyan primereket tervezni, amelyek változatos nukleotid szekvenciájúak, a guaninok (G) és citozinek (C) mennyisége hasonló a timinek (T) és az adeninek (A) mennyiségéhez (GC arány ~40–60%), komplementer szekvenciák hiánya miatt sem magukkal (hairpin képződés), sem a másik primerrel (primer dimer képződés) nem képesek összekapcsolódni. Továbbá szintén ajánlatos a repetitív szekvenciák kerülése. A primerek exonhatárokra való tervezésével elkerülhetővé válik, hogy a genomiális DNS-t is felsokszorozzuk a PCR reakciónk során. Tervezéskor törekednünk kell arra, hogy a primerek 3' végén C vagy G legyen, de érdemes kerülni a CG vagy GC végeket [39].

3.1.5 TGF- β szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában

A TGF- β növekedési faktor egy 25 kDa méretű, két 12,5 kDa nagyságú alegységből álló fehérje. Az elsőként humán vérlemezkéből izolálták a citokint [40]. Szignalizációs útvonalának aktiválódása számos folyamatban bizonyított, befolyásolja a sejtek migrációját, proliferációját, differenciációját [41]. A szöveti homeosztázis fenntartásában betöltött szerepe miatt egészséges vesében is kimutatható. Sérülés hatására a vesében rezidens sejtek, valamint az infiltrálódó immunsejtek is nagy mennyiségben expresszálják [42, 43]. A TGF- β központi szerepe a fibrózisban vitathatatlan. Multifunkcionális citokinként fokozza az ECM molekulák expresszióját, valamint egyes proteáz inhibitorok szekrécióját, melyek gátolják a kötőszöveti fehérjék enzimátikus lebontását [44].

A TGF- β homodimer propeptinoként szintetizálódik, érett formája limitált proteolízist követően képződik a golgi rendszerben. Az így keletkezett aktív ligand, a TGF- β -receptor (T β R) I és T β R II alegységekből álló heterotetramer szerin-treonin kináz aktivitással rendelkező receptoron fejti ki hatását [45]. Az érett dimer ligand a T β R II extracelluláris doménjéhez kötődik, aminek hatására a receptor intracelluláris része autofoszforilálódik, majd ez foszforilálja a T β R I alegységet. Az aktiválódott I alegység

foszforilálja az intracelluláris SMAD2/3 komplexet, mely a SMAD4 molekula segítségével a sejtmagba transzlokálódik, ahol transzkripciósfaktorként megváltoztatják a géneexpressziót. A T β R II a másik alegység foszforilálásával egy időben más szignáltranszdukciós útvonalakat, többek között az ERK, p38, MAPK, JNK jelátviteli rendszereket is aktiválja. Ezen folyamatok eredményeként megváltozik a sejtek géneexpressziós profilja, sejtciklusbeli állapota, fokozódik az ECM fehérjék deposíciója [46].

3.1.6 PDGF-B szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában

A PDGF fehérjét az első növekedési faktorok egyikeként 1971-ben azonosították [47]. A PDGF családnak 4 izoformája ismert (A, B, C, D), melyek disszulfid híddal homodimereket alkotnak, valamint az A és B izoforma heterodimerré kapcsolódhat. Receptorának α és β típusait különböztetjük meg, melyek szintén homo- és heterodimereket képezhetnek. A ligandumok az extracelluláris Ig-like doménjéhez kötődve aktiválják a receptort, mely során a receptor alegységek dimerizálódnak, megváltozik a konformációjuk, valamint intracelluláris, kinázaktivitással bíró doménjük több helyen autofoszforilálódik. Az így keletkezett kötődési felszínen számos szignalizációs útvonal, többek közt a MAPK, PI3K, JAK-STAT kaszkád iniciációs molekulája foszforilálódik és indítja el jelátviteli kaszkádját [48]. A PDGF mitogén hatással bír a mesenchimális eredetű fibroblaszt, simaizom és gliasejtekre, ezáltal szerepe van az embrionális fejlődésben, angiogenezisben, sebgyógyulásban, fibrotikus, és fertőzőes folyamatok patomechanizmusában [49].

A PDGF vesefibrózisban betöltött hatása régóta ismert. A PDGF izoformáinak, valamint receptorainak fokozott expresszióját detektálták több, különböző eredetű vesekárosodást követően, humán betegségek és állatmodellek kapcsán egyaránt [50]. A mezangiális sejtek proliferációjában, ezáltal a tubulointersticiális hiperpláziában és fibrózisban a PDGF-BB izoforma kiemelkedő szerepet játszik [51].

3.1.7 Az oxidatív stressz szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában

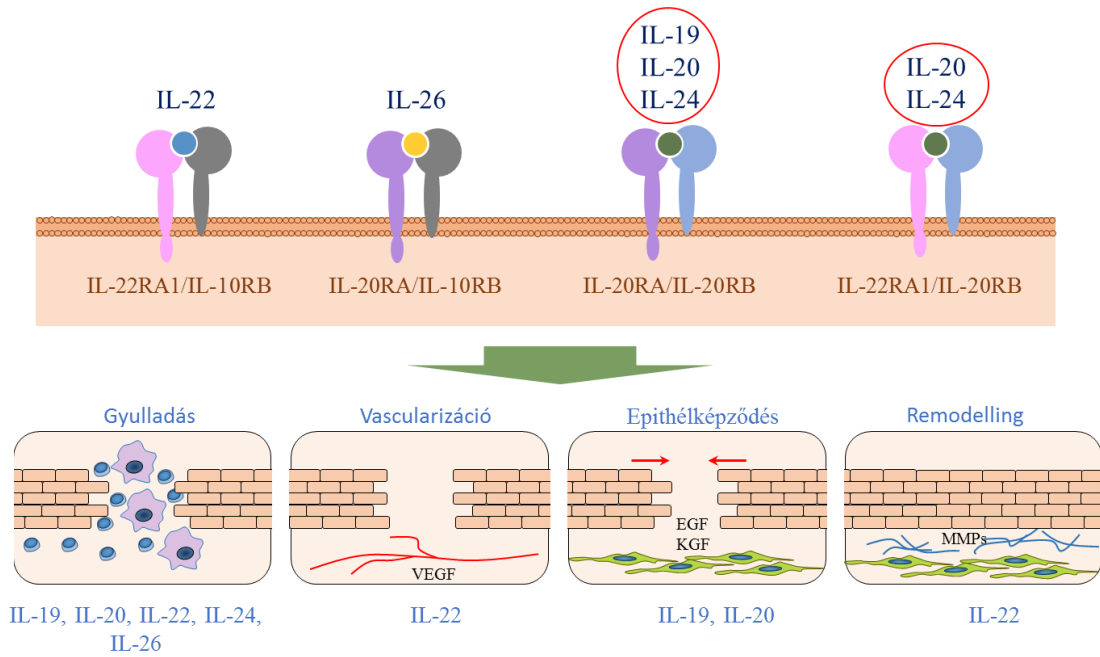
A oxigén szabadgyökök nagy reaktivitású, párosítatlan elektronnal rendelkező molekulák, melyek hatékonyan képesek reakcióba lépni más, szabad elektronnal

rendelkező molekulával. Az oxigén szabadgyökök lipid peroxidáció, DNS károsítás és fehérje modifikációkon keresztül károsítják a biológiai rendszereket, szöveteket. Jól ismert reaktív oxigén gyök a szuperoxid ion ($O_2^{\bullet-}$), a hidrogén peroxid (H_2O_2). Az élő szervezetekben a reaktív oxigén gyökök jellemzően a mitokondriális elektron transzportlánc rendszerében képződnek [52, 53]. A fiziológiás körülmények között kialakuló szabadgyököket inaktíválják az intracelluláris antioxidáns mechanizmusok. Számos vesét is érintő szisztémás betegség, úgymint magas vérnyomás, diabétesz mellitusz, különböző fertőzések indukálnak gyulladásos folyamatokat, ezáltal szabadgyök képződést a vesében [54]. A különböző hormonok, növekedési faktorok, valamint gyulladásos folyamatok eredményeképpen létrejövő reaktív oxigén gyökök és az általuk kiváltott oxidatív stressz kritikus szerepet töltek be a vesefibrózis kezdeti iniciációjában, valamint progressziójában. Leírták pozitív reguláló szerepüket a fibrózis fő effektor sejtjeinek számító miofibroblasztok akkumulációjában és proliferációjában, továbbá a képződő reaktív oxigén gyökök direkt módon is károsítják a szöveteket, és a képződő fehérjéket, ezáltal hozzájárulva a vesekárosodás fokozódásához [55]. Az oxidatív stressz *in vitro* modellezésére gyakran használnak H_2O_2 -ot.

3.1.8 IL-20 citokin alcsalád és receptorai

Az utóbbi évtized tudományos eredményei rávilágítottak, hogy az IL-20 citokin alcsalád tagjai egyfajta hidat képeznek az immunrendszer és az epitel sejtek közötti kommunikációban, ezáltal téve hatékonyabbá a természetes immunválaszt [56]. Ennek a figyelemreméltó biológiai kapcsolatnak a létrejötte azon alapszik, hogy az epitel sejtek nagy mennyiségben expresszálják az IL-20 citokincsalád tagjainak receptorait, az immunsejtek pedig a fő forrásai az IL-20 citokin alcsalád tagjainak. Az IL-20 citokin alcsalád az IL-10 citokincsalád tagja, melynek jelentős szerepe van a természetes immunválasz szabályozásában, az epitel sejtek integritásának fenntartásában, valamint a szöveti hegesedés szabályozásában [57]. Az IL-20 alcsaládba az átfedő célsejt specificitás és biológiai funkció, valamint közös receptor szignalizáció alapján az IL-19, IL-20, IL-22, IL24 és az IL-26 tartozik [56]. Az IL-19 receptora az IL-20 α /IL-20 β heterodimer, míg az IL-20 és IL-24 kötődhet az IL-20 α /IL-20 β valamint IL-22 α 1/IL-20 β heterodimer receptor pároshoz. Az IL-22 receptora IL-22 α 1/IL-10 β az IL-26 pedig IL-20 α /IL-10 β receptorkomplexen keresztül hat.

A citokin alcsalád tagjai elsősorban a JAK/STAT szignalizációs útvonal aktiválásával fejtik ki a hatásukat [58]. Az IL-20R α és β alegységek citoplazmatikus régióhoz a JAK (Janus kinase) jelátviteli család tagjai asszociáltak, melyek ligandkötés esetén aktiválódnak és foszforilálják azokat a kötőhelyeket a receptoron, melyekhez a további jelátvitelt elindító STAT (signal transducers and activators of transcription) molekulák kapcsolódnak. Ezek a STAT molekulák foszforilációjuk és dimerizációjukat követően transzlokálódnak a sejtmagba és ott direkt módon szabályozzák génexpressziót [59]. Az IL-20R α és IL-20R β jellemzően a bőr, tüdő, vese, és placenta epitél sejtjeiben expresszálódik. Az IL-22R α 1 receptor alegység jelenlétét pedig vesében, bélben, májban és hasnyálmirigyben írták le [60]. Az IL-20 alcsaládba tartozó citokinek fő forrásai a mieloid és limfoid eredetű immunsejtek [61]. Leírták a citokincsalád szerepét, pikkelysömörben [62, 63], rheumatoid arthritisben [64], valamint gyulladásos bélbetegségekben [65] ezzel is alátámasztva, szerepüket a gyulladásos betegségek kialakulásában. Végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő felnőtt betegekben emelkedett IL-19 citokin szintet mutattak ki a vizeletben, valamint iszkémia reperfüzió indukált vesekárosodás rágszáló modelljében szintén emelkedett IL-19 expressziót detektáltak a vesében. Kimutatták, hogy az IL-19 apoptózist indukál a vese tubuláris epitél sejtjein, valamint *in vitro* fokozza ezen sejtek TGF- β expresszióját, mely az IL-19 anti-inflammatorikus és profibrotikus szerepére utal. Az IL-20 citokin szérumszintje szintén emelkedett végstádiumú vesebetegekben, és kísérletes körülmények között apoptózist indukál a vese epitél sejtjeiben. [66, 67]. Az IL-24 szerepéről a vesében irodalmi adatok nem állnak rendelkezésünkre, azonban ismert, hogy megemelkedik expressziója bőrben sebgyógyulás során [68] valamint adenovirális overexpresszálása hatékonyan csökkenti a humán keloidszövetből izolált fibroblasztok proliferációját [69]. Ezen vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy az IL-24 részt vesz a sebgyógyulás során végbemenő szöveti átrendeződésben. Továbbá Andoh et al. eredményei szerint az IL-24 hatására fokozódik a vastagbél epitél sejtjeinek mucin-1,-3 és 4 termelése mely az IL-24 mukózális gyulladást csökkentő hatására utal gyulladásos bélbetegségekben. Továbbá, az az IL-24-ről ismert, hogy adenovirális overexpresszója számos tumoros sejtvonalon apoptózist indukál [70, 71].



6. ábra. Az IL-20 citokin alcsalád és receptorai. A citokincsalád aktivitásához szükséges különböző heterodimer receptorkomplexek, valamint az általuk regulált folyamatok a fibrózis során.

Az IL-26 citokin szerepét szöveti fibrózissal járó betegségekben még nem vizsgálták. Jellemzően az immunválaszt szabályzó, antivirális és antimikrobiális szerepe feltárt [72]. A következő táblázatban szervekre bontva összefoglaltuk az egyes IL-20 citokin alcsalád tagjaihoz tartozó, fibrózisban betöltött szerephez kapcsolódó vizsgálati eredményeket szervekre bontva.

IL-20 alcsalád	Vese	Bél	Máj
IL-19	-KVB (humán): vizelet IL-19↑ [66] -Nefrotoxikus (epitél sejteken): IL-19↑	-Gyulladásos bélbetegség (humán): szérum IL-19↓[74] -IL-19 KO (egér): fibrózis↑[75]	-

	-Vese tubulus epitél sejt+IL-19: apoptózis↑[73]		
IL-20	-KVB (humán): vizelet IL-20↑ -Nefrotoxikus (epitél sejteken): IL-20↑ -Vese tubulus epitél sejt+IL-20: apoptózis↑[67]	-Aktív gyulladásos bélbetegség (humán): szérum, mukóza IL-20↑[76]	-Májfibrózis (humán): IL-20↑ -CCl ₄ -indukált májfibrózis (egér): IL-20↑ -CCl ₄ -indukált májfibrózis +IL-20 neutralizáló antitest/IL-20 KO: fibrózis↓[77]
IL-24	-	-Aktív gyulladásos bélbetegség (humán): szérum IL-24↑ [78] -Vastagbél epitél sejt+IL-24: mucin-1, -3 és -4↑[65]	-

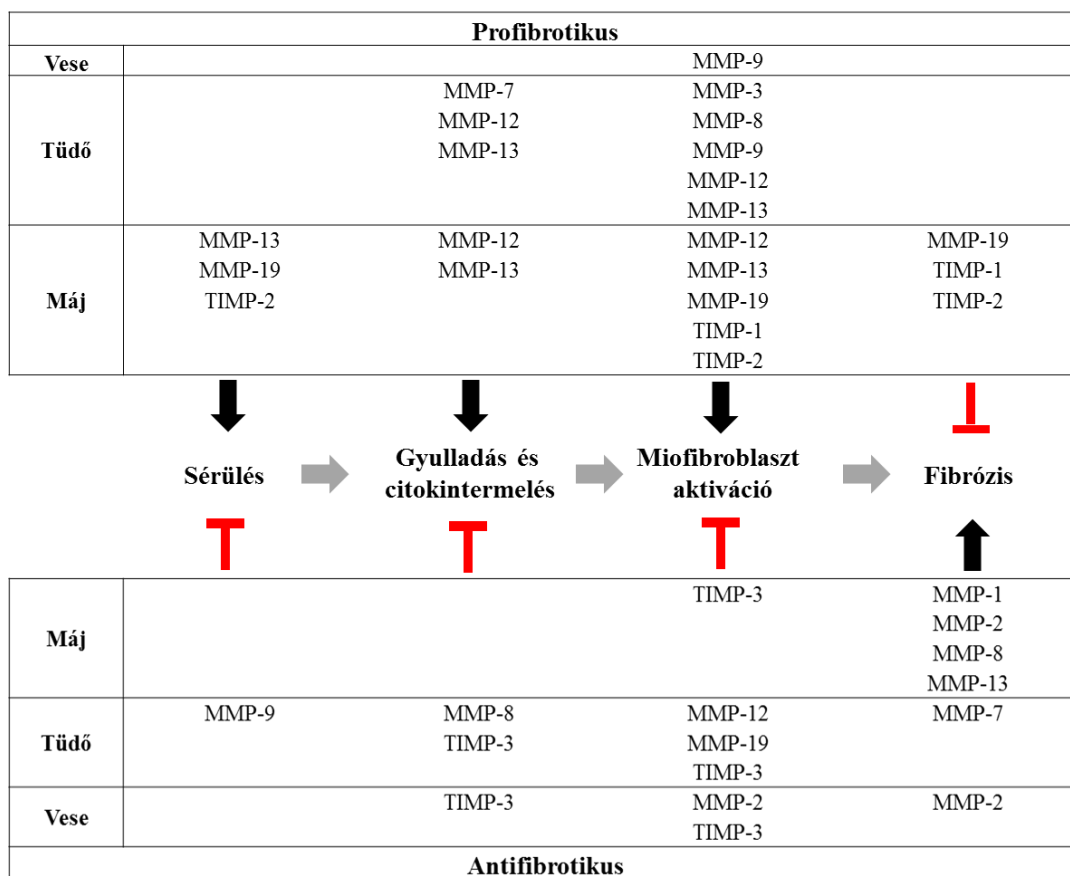
1. táblázat. Az IL-20 citokin alcsalád szerepe a fibrózisban.

3.1.9 Mátrix metalloproteinázok

A mátrix metalloproteinázok (MMP) családjába cink-függő endopeptidázok tartoznak. Eddigi ismereteink alapján 25 különböző MMP mutatható ki emlősökben, melyekhez jól elkülöníthető valamint részben átfedő funkciók tartoznak. Az MMP-k régóta ismert funkciója, hogy szinte valamennyi extracelluláris mátrix komponens bontására képesek, beleértve a kollagéneket (kollagenázok), denaturált vagy részlegesen degradált kollagéneket (zselatinázok), laminineket. A legújabb kutatási eredmények szerint szerepük van az immunválaszban szabályozásában, sejtmigrációban, leukocita aktivációban, antimikrobiális válaszban, továbbá az angiogenezisben is [8, 79, 80].

Szerepük egy kétélű kardhoz hasonlítható az ECM homeosztázisának fenntartásában, ugyanis míg egyes MMP-k profibrotikusan hatnak a szöveti hegesezés egyes szakaszai során, addig mások antifibrotikus szerepet töltenek be, és ezen funkcióik nem kizárólag a kollagének és más ECM komponensek proteolízisén keresztül valósul meg, hanem a fentebb említett immunmediált szabályozó lépéseken keresztül. Az egyes MMP-khez több szubsztrát is tartozhat, melyek jelenléte különbözőképpen hathat az enzimaktivitásukra [81]. Az MMP-k aktivitását olyan endogén proteáz inhibitorok szabályozzák mint pl. a TIMP-ek (MMP-k szöveti inhibitorai) [82]. A TIMP molekulák több olyan fehérje interakciós kötőhellyel rendelkeznek, melyek hatékonyan kapcsolódnak az egyes MMP-khez, ezáltal inaktíválva őket [83].

Több vizsgálat igazolta, hogy egyes MMP-k képesek a fibrózis progresszióját fokozni [84, 85]. Jelen vannak és mediátor funkciót töltenek be a sérülés kialakulásánál, majd az ezt követő immunsejt infiltrációnál és gyulladásos citokin termelődésnél, tovább fibrózis fő effektor sejtjeinek számító miofibroblaszt aktivációnál és végül a kialakult fibrotikus szövetben is. Az MMP-2,-3,-7, és 9 szerepét már vizsgálták az UUO indukált vesekárosodás patomechanizmusában de az MMP-12 szerepe a KVB-ben még nem teljesen tisztázott, a KON-ban pedig egyáltalán nem ismert. [84, 86-88]. Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az MMP-12 központi szerepet játszik a cigaretta füst indukálta tüdőátgúlatban, valamint kötőszöveti lebomlásban [89], továbbá az elasztin lebontásában a máj fibrotikus elváltozásai során [90].



7. ábra. A különböző MMP-k és TIMP-ek eddig feltárt szerepe a szöveti fibrózisban. Az ábrán a fibrózis folyamatának 4 kulcs szakasza látható, valamint az egyes MMP-k és TIMP-ek ezekre a szakaszokra kifejtett aktiváló (fekete nyíl) illetve gátló (piros T alakzat) hatása.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célkitűzésünk a kongenitális obstruktív nefropátia, valamint a krónikus vesebetegségek patomechanizmusában szerepet játszó olyan új molekulák és molekuláris útvonalak azonosítása volt, melyek befolyásolják a szöveti hegesedés progresszióját és a későbbiekben diagnosztikai, vagy terápiás kezelési célpontként szolgálhatnak. A következő kérdésekre kerestük a választ:

Kongenitális obstruktív nefropátia:

- Milyen génexpressziós változásokat indukál a kongenitális obstruktív nefropátia a fejlődésben lévő vesékben?
- A megváltozott expressziójú gének milyen funkcionális génontológiai csoportokba sorolhatóak be, valamint milyen interakciós hálózatokban vesznek részt?
- Az elemzés során feltárt megváltozott expressziójú molekulák hol lokalizálódnak a vesében, expressziójukra hogyan hatnak a profibrotikus citokinek, valamint milyen szerepük lehet a fibrózis patomechanizmusában?

Az IL-20 citokin alcsalád szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában:

- Hogyan változik az IL-20 citokin alcsalád expressziója az uréter obstrukció indukálta fibrózis során?
- IL-20R β hiánya hogyan befolyásolja a fibrózis során lerakódó extracelluláris mátrix mennyiségét?
- Milyen hatással van az IL-24 molekula a vese epitél sejtek profibrotikus molekula expressziójára?

Az α -SMA valamint β -aktin specifikus detekciója fibrózis modellben:

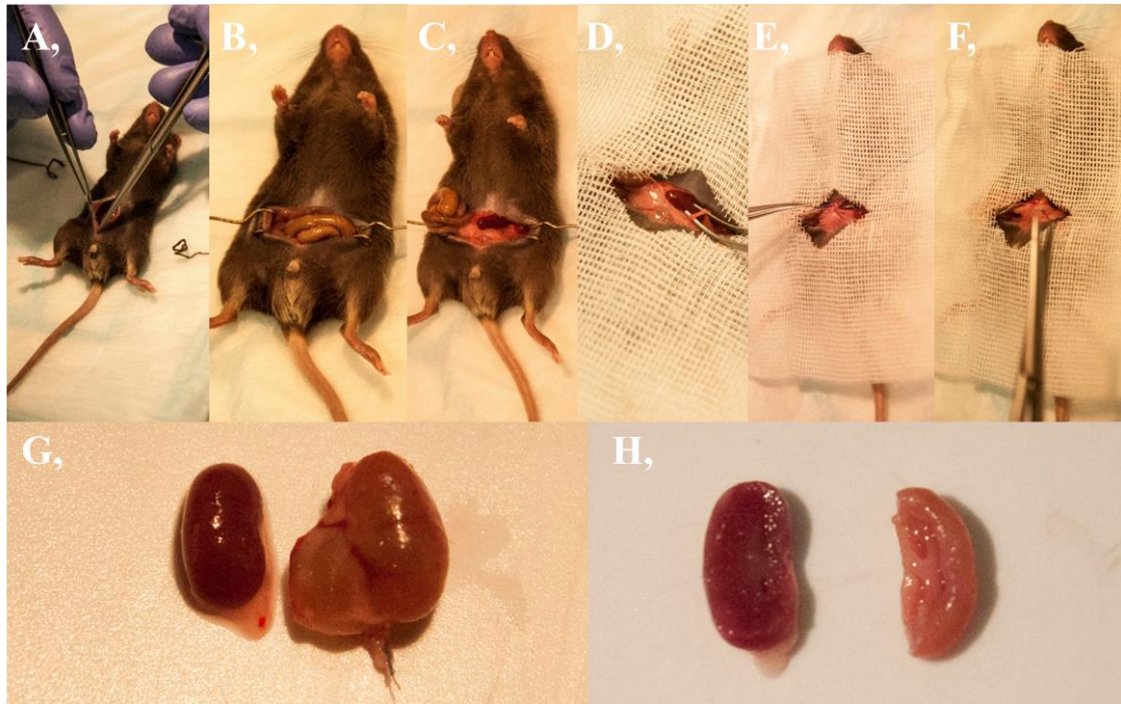
- Specifikus α -SMA és β -aktin primerek tervezése, ezek specificitásának ellenőrzése.
- Az irodalomban használt α -SMA és β -aktin primerek specificitásának ellenőrzése.

5. MÓDSZEREK

5.1 Unilaterális uréter obstrukció

A kísérletekben használt patkányokat (Wistar) és egereket standard körülmények között tartottuk, kontrollált hőmérsékletű ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) szobákban, 12 óránként váltakozó világos és sötét periódusok mellett. Az állatoknak állandóan elérhető standard rágcslótápot és vizet biztosítottunk. Minden állatkísérletre vonatkozó protokollt a Semmelweis Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága engedélyezett (22.1/3491/003/2008).

A neonatális uréter obstrukció okozta vesekárosodás modellezéséhez újszülött Wistar patkányokat használtunk (Charles River Laboratories, distr.: Innovo Kft.). A felnőtt kori vesefibrózis modellezéséhez 7 hetes C57Bl/6 egereket (Charles River Laboratories, distr.: Innovo Kft.) valamint C57Bl/6 genetikai háttérrel rendelkező IL-20R β KO egereket (University Medical Center, Ulm, Németország) használtunk. A vizsgálatokhoz mind az újszülött patkányok, mind pedig a vad típusú és IL-20R β KO egerek esetében két csoportot alakítottunk ki, csoportonként 6-6 állattal: áloperált kontroll, valamint uréter obstruált csoport. A neonatális uréter obstrukció okozta vesekárosodás modellezésénél hím és nőstény állatok vegyesen szerepeltek, a felnőtt kori vesefibrózis modellezésénél használt állatok hímek voltak (a hormonális ciklus hatásának kiküszöbölése miatt). A műtéti előkészítés során az újszülött patkányok, valamint 7 hetes egerek altatását és általános érzéstelenítését dietil-éterrel végeztük. A műtét során az állatok hasszűrjét leborotváltuk, majd hasi középvonalán 1 cm-es bemetszést ejtettünk, a hasizmokat oldalirányba széthúztuk, így könnyen hozzáférhetővé váltak a vesék. A bal vesét és urétert izoláltuk a környező zsír- és kötőszövetektől. Az uréter obstrukcióját 0,8-as, nem felszívódó fonállal, az uréter eredésétől ~5 mm-re, kettős csomó kötésével kivitelezte. Ezek után a hasi középvonalon ejtett bemetszés helyét nem felszívódó fonállal varrtuk össze. A patkányok veséit a műtét utáni 10. napon, az egerek esetében pedig a műtét utáni 7. és 14. napon távolítottuk el. Az eltávolítás során dietil-éterrel történő altatást követően átvágtuk az állatok aorta abdominalisát, és eltávolítottuk az obstruált veséjüket. A veseburok lefejtése után levágtuk a vesecsúcsokat, és a fennmaradó részt vertikális vágásokkal 4 egyforma méretű szeletre osztottuk. Három részt -80°C -os, egyet pedig 4%-os formalin oldatban 4°C -os hűtőbe helyeztünk a további vizsgálatok elvégzéséig.



8. ábra. Az uréter obstrukció egyes lépései felnőtt egereken demonstrálva. Hasi középvonal bemetszése (A), hasizmok oldalirányú széthúzása (B), az uréterhez történő könnyebb hozzáférhetőség érdekében a belek óvatos oldalra helyezése (C), a vese és az uréter izolálása a környező zsír és kötőszövetektől (D), az uréter ligálása (E, F), valamint az obstrukciót követő 7. napon eltávolított szűrlettől duzzadt, hidronefrózisos vesék az ellenoldali kontroll vesék mellett (G, H).

5.2 A vese hisztológiai analízise

5.2.1 Perjódsav-Schiff (PAS) festés

Az UUO indukált vesekárosodás hisztológiai vizsgálatához a vesék egy részét 4%-os formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk. A szövettani blokkokból 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, és deparaffinálást követően perjódsav-Schiff festést alkalmaztunk haematoxylin-eosin festés mellett a tubuláris károsodás kimutatásához. A mintákon fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk a vesekárosodás mértékét jelző hisztológiai elváltozásokat.

5.2.2 Masson-féle Trichrome festés

A 4%-os formalin oldatban tárolt mintákból paraffinba ágyazást követően 5 µm vastag metszeteket készítettünk. A kollagénben dús kötőszöveti lerakódást Masson-féle Trichrome eljárással festettük meg, ami a sejtmagokat feketére, a sejtplazmát és a vörösvértesteket vörösre, míg a kollagént kékre festi. Veséknél átlagosan 12 képet értékelünk ki, mind a kéregből, mind a velőállományból, elkerülve a glomerulusokat és nagyobb ereket, 20X-os nagyítású képeken. A mintákat kódoltuk majd azonos megvilágítási és polarizációs beállítások mellett fénymikroszkóppal fotózott képeken vizsgáltuk a tubulointersticiális fibrózis mértékét, melyre a kék színben megjelenő kollagén mennyiségéből következtettünk. Az Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated San Jose, CA, USA) program segítségével kijelöltük a kékekkel ábrázolódó fibrotikus szövetet, majd ugyanezen program használatával a kijelölt területet feketére, a fennmaradó részeket fehérre alakítottuk át. Az így kapott fekete-fehér képeken Scion image (Scion Corporation, <http://scion-image.software.informer.com/>) szoftver segítségével elemeztük a fekete területek arányát a fehér területhez viszonyítva [91]. A kontroll csoport eredményét 1-re normalizáltuk, a többi eredményt pedig arányosan viszonyítottuk hozzá [92].

5.2.3 Szöveti kollagén tartalom kimutatása Sirius-Red festéssel

A 4%-os formalin oldatban tárolt mintákból paraffinba ágyazást követően 5 µm vastag metszeteket készítettünk. A kollagénben dús kötőszöveti lerakódást Sirius Red festéssel jelöltük. 10 perces xilolos deparaffinizálást követően öttagú leszálló koncentrációjú alkoholsorban rehidratáltuk a metszeteket, majd fél órán keresztül telített pikrinsavban oldott Sirius Red (0,1%, DirectRed80, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) festékoldatban inkubáltuk őket. A metszeteket desztillált vízben leöblítettük, majd öttagú felszálló koncentrációjú alkoholsorban dehidratáltuk, xilol segítségével derítettük, végül műgyantával (DPX Mountant for histology, slide mounting medium, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) tartósítottuk és fedőlemezzel lefedtük. A festett metszetek digitalizálása Panoramic 250 Flash 3 (3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) szkennelével történt. A fibrotikus terület kvantifikálása érdekében minden állat veséjéről egyenként 10-20 darab, 20-szoros nagyítású, a teljes cortex régiót lefedő, de egymással át nem fedő területet jelöltünk ki. Az így annotált képeket exportáltuk, majd képelemző

szoftver által feldolgozható formátumúvá alakítottuk. A képek Sirius Red festéssel megjelölt, piros színű területeinek százalékos arányát ImageJ szoftverrel számítottuk ki.

5.2.4 Immunhisztokémiai festés

A 4%-os formalin oldatban tárolt mintákból paraffinba ágyazást követően 5 µm vastag metszeteket készítettünk. A metszeteket deparaffinnizáltuk xylénben majd mostuk desztillált vízzel. Hó indukált epitópfeltárást végeztünk a metszeteken citrát pufferben (HISTOLS® -Citrate Buffer, pH 6.0 cat# 30010; Histopathology, Ltd.) mikrohullámú sütő segítségével (750W) 15 percen keresztül, majd szobahőmérsékletre hűtöttük a metszeteket. A nem specifikus kötőhelyeket gyári kit segítségével blokkoltuk (HISTOLS® Background Blocking Protein Solution, cat#30013, Histopathology, Ltd.) 10 percen keresztül. A következő elsődleges antitesteket használtuk: anti-MMP-12 (rabbit monoclonal IgG, Abcam, Cambridge, UK) 1:100-as hígításban valamint anti-IL-24 (rabbit monoclonal IgG, Abcam, Cambridge, UK) 1:50-es hígításban, 1 órán keresztül jelölve a mintákat. A jelölést követően PBS-el mostuk a metszeteket és másodlagos antitesttel jelöltük a mintákat (HISTOLS® -R anti-rabbit Detection Systems (cat# 30011R, Histopathology, Ltd.) a gyártó utasításai szerint. Mosást követően a metszeteket 3,3'-Diaminobenzidine-el inkubáltuk (HISTOLS® -DAB chromogen/Substrate System, cat#30014.K, Histopathology, Ltd.) majd mostuk és haematoxylinnal háttérrel festettünk. A mintákon fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk a jelölt molekulák festődését.

5.3 KON funkcionális genomikai elemzése

5.3.1 Microarray vizsgálat

Az uréter obstruált és kontroll újszülött patkányok vesemintáiból (n=4/csoport) 1-1 µg RNS-ből kiindulva reverz transzkripciót végeztünk Low-input RNA Linear Amplification Kit segítségével (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Az így kapott RNS mintákat cyanine 3 festékkel jelöltük a gyártó utasításai szerint. A cRNS mennyiségének meghatározása, a jelölés hatékonyságának, valamint a cRNS tisztaságának ellenőrzése Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) spektrofotométerrel történt. A továbbiakban azokkal a mintákkal dolgoztunk melyeknél a festékbeépülés hatékonysága elérte a 9,0 pmol festék / µg RNS értéket. A cyanine 3

jelölt RNS-ekből 825 ng-ot hibridizáltunk 4x44 K Whole Rat Genome Microarray chip-ekre, majd egyéjszakás inkubációt követően a gyártó protokollja szerint mostuk, majd stabilizáló és szárító oldattal kezeltük a chipeket. A hibridizáció során a mintákból származó fluoreszcens jelöléssel rendelkező RNS molekulák versengenek a microarray felületére rögzített, velük komplementer, 60 nukleotid hosszúságú próbákhoz való kötődésért. A hibridizáció során kialakult Cy3 jelintenzitás megmutatja, hogy egy adott molekula cRNS átírata az egyes kezelési csoportok között milyen mértékben változott meg. Ezt követően pedig Agilent microarray szkener segítségével olvastuk le a lemezekon kialakult jelintenzitást (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). A leolvasás által kapott tömörített formátumú képeket a Feature Extraction software version 7.5 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) programmal csomagoltuk ki, majd az így kapott adatokat egyszínű microarray mérésekhez ajánlott beállítások alkalmazásával normalizáltuk.

5.3.2 Microarray adatok statisztikai kiértékelése

A microarray vizsgálat során kapott adatok statisztikai értékelését a GeneSpring 9.02 program (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) segítségével végeztük. A GeneSpring programban az adatok normalizálása és transzformációja a gyártó által egyszínű microarray formátumokra ajánlott beállítások szerint történt. Azokat a géneket melyek expressziója legalább kétszeres eltérést mutatott statisztikai elemzésnek vetettük alá. A kontroll és uréter obstruált csoportok között eltérően expresszálódó gének statisztikai elemzését egyutas ANOVA-val végeztük. A csoportokon belül a kontrollhoz képest változást mutató gének statisztikai elemzéséhez párosítatlan T-próbát használtunk. Ebben az esetben azt vizsgáltuk, hogy a hibridizáció során kialakult Cy3 intenzitás szignifikánsan különbözik-e a nullától. Mivel a microarray adatok kiértékelésénél szükségszerűen nagyszámú gén esetében állítunk fel nullhipotézist a statisztikai próbák során, ezért mindenképpen javasolt korrekciót használni az álpozitív találatok (úgynevezett első fajú hiba) számának a csökkentésére. Ezért az összehasonlítások során a fals pozitív találatok meghatározásához minden esetben a Benjamini-Hochberg többszörös hipotézis korrekciót használtuk. A statisztikai összehasonlítások alkalmával a 0,05 alatti p értéket fogadtuk el szignifikánsnak.

5.3.3 Génontológiai analízis

A génontológia a géntermékek jellemzésének (úgynevezett GO terminusok, osztályok) ellenőrzött rendszere, melyben tájékoztatást kaphatunk a génekről kifejeződő fehérjék molekuláris funkciójáról, valamint a különböző biológiai folyamatokban való részvételéről. Ezen kívül megtudhatjuk azt is, hogy az adott fehérje (ha szerkezeti elemről van szó) milyen celluláris alkotórész kialakításában vesz részt. Olyan génlisták esetén, mint amilyenek a microarray kísérletek eredményei is, általános módszer a felülreprezentált génfunkciók felderítése génontológia segítségével. Microarray vizsgálatunkat során számos olyan gént találtunk, melyek expressziója szignifikánsan megváltozott az UUO-t követően. A megváltozott géneket génontológiai analízisnek vetettük alá, hogy megtaláljuk azokat a fő funkcionális csoportokat, amelyekbe ezek a gének besorolhatóak. Az azonosított *Rattus norvegicus* gének ontológiai analíziséhez a DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery - <https://david.ncifcrf.gov>) adatbázist használtuk. Génkészlet feldúsulási elemzést hipergeometrikus teszt segítségével végeztük. Mivel több génkészlet feldúsulását vizsgáltuk egyszerre, mindenképpen szükséges annak a valószínűségnek a becslése, hogy egy génkészlet mekkora eséllyel álopozítív, tehát csak a véletlen műve, hogy szerepel az eredmények között. Ezért az elemzéseink során a Benjamini-Hochberg többszörös hipotézis korrekciót használtuk minden esetben a fals pozitív ráta meghatározásához. Azokat a génkészleteket fogadtuk el a háttértől szignifikánsan különbözőnek melyeknél 0,05 alatti p értéket kaptunk. Az új információt nem hordozó génontológiai terminusok kizárására a REVIGO webes szervert használtuk mely egy algoritmus segítségével listázza a terminusokat, és a hasonló jelentésűeket eltávolítja. Az eredmények szakszerű vizsgálata után Cytoscape szoftvert (<http://www.cytoscape.org>) használtunk az adatok vizualizálásához.

5.3.4 Hálózat elemzés

A microarray vizsgálat során kapott eredményeink szerint számos gén mRNS mennyisége szignifikánsan megváltozik a KON-t modellező UUO hatására. A megváltozott mRNS-ek transzkripció azonosítójához UniProt protein azonosítót rendeltünk, hogy megkapjuk azoknak a fehérjéknek a potenciális listáját melyek megváltoztak a KON során. Az így kapott fehérjék listáját bevittük a Reactome Pathway Database

(<http://www.reactome.org>) rendszerébe. A Reactome rendszer a fehérje homológia adatokat az Ensembl Compara adatbázisból nyeri ki, mely homológia alapján képes összehasonlítani a humán fehérjét más fajok fehérjéivel. A fehérje-fehérje interakciók elemzését hipergeometrikus teszt segítségével végeztük. Azokat a fehérje-fehérje interakciókat, és a hozzájuk tartozó útvonalakat szűrtük ki, melyek legalább 10 interakcióban vettek részt, valamint a p értékük nagyobb volt mint 0,05. Az interakciókban nem résztvevő kisebb csoportok eltávolítása utána a kapott eredményeket Cytoscape szoftver (<http://www.cytoscape.org>) segítségével vizualizáltuk.

5.4 In vivo valamint in vitro molekuláris biológiai vizsgálatok

5.4.1 Áramlási citometriás mérés

A szöveti áramlási citometriás mérések esetében a vesemintákat kollagenáz II-vel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) emésztettük egysejtes állapotra. A szöveti eredetű sejtek intracelluláris MMP-12 és IL-24, valamint a sejtvonal eredetű sejtek TGF- β és PDGF-B jelölése céljából a sejteket 10 percig szobahőmérsékleten fixáltuk/permeabilizáltuk (FACS Permeabilizing Solution 2, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Ezt követően mintáinkat specifikus elsődleges anti-MMP-12 (rabbit monoclonal IgG, Abcam, Cambridge, UK) valamint anti-IL-24 (rabbit monoclonal IgG, Abcam, Cambridge, UK) antitesttel, továbbá anti-TGF- β és anti-PDGF-B antitesttel (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) inkubáltuk 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten. Az említett elsődleges antitesteket 1:100-as hígításban használtuk. A nem kötődött antitesteket permeabilizáló pufferrel történő mosással távolítottuk el. Mosás után 30 percig szobahőmérsékleten fénytől elzárva inkubáltuk a sejteket az elsődleges antitestre specifikus, fluoreszcens festékkel konjugált másodlagos ellenanyaggal: Alexa 488-konjugált csirke anti-nyúl antitesttel. A negatív kontrollokat csak másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az említett másodlagos antitesteket 1:200-as hígításban használtuk. A nem kötődött antitesteket permeabilizáló pufferrel történő mosással távolítottuk el, majd PBS (foszfáttal pufferált sóoldatban) pufferben vettük fel a sejteket. A mérést BD FACSAriaTM áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük. Az élő sejteket méret (forward scatter) és granuláltság szerinti (side scatter) szórás alapján határoltuk be. Minden

kezelési csoportból 10.000 sejtet számoltunk le. Az eredményeket ezután BD CellQuest™ Pro (BD Biosciences) szoftver segítségével értékeltük ki.

5.4.2 Sejtkultúra és kezelések

A vizsgálatainkhoz humán embrionális vese (HEK-293), valamint humán proximális tubulus epítél (HK-2) sejteket (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) használtunk. A sejteket termosztátban (37°C-on, 5% CO₂) növesztettük DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tápoldatban, melyet kiegészítettünk 10% FBS-el (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) és 1% Penicillin-Streptomycin oldattal (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). A sejtek *in vitro* mérésekhez történő felhasználása a 6. és 10. passzázs között történt 70-80%-os konfluencia mellett. A HEK-293 és HK-2 sejtek a rekombináns citokinnel történő kezelések előtt 24 órával FBS mentes tápoldatot kaptak és kiraktuk őket 6 lyukú sejtenyésző platekre (5x10⁵ sejt/lyuk). A sejteket 1nM TGF-β valamint 0.4nM PDGF-B, 1nM IL-24 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) továbbá 25 μM H₂O₂-val kezeltük 24 órán keresztül. A kontroll csoportba tartozó sejteket csak a rekombináns citokinek oldószerével kezeltük.

5.4.3 RNS-izolálás, cDNS szintézis, RT-PCR reakció

A mérések során felhasznált szövetekből az RNS izolálás RNeasy RNS izoláló kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével történt a gyártó protokolljának megfelelően. A kinyert RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (BCM, Huston, TX, USA) határoztuk meg. Mintánként azonos mennyiségű (1 μg) RNS-ből komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) reagensekkel a gyártó utasításainak megfelelően. A valós idejű RT-PCR méréseket LightCycler 480 SYBR Green I Master enzyme mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) reagenssel, LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) automatán végeztük. A vizsgálni kívánt génekre specifikus primereket az NCBI (National Center for Biotechnology Information) nukleotid adatbázisában található szekvenciákra terveztük, melyeket az Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville,

Iowa, USA) gyártotta le. A különböző célmolekulák mRNS expresszióját a GAPDH háztartási gén hányadosaként határoztuk meg az $x = 2^{-\Delta C_p}$ képlet alapján. A valós idejű RT-PCR reakciók során a következő specifikus primer párokat használtuk fel:

Kongenitális obstruktív nefropátia vizsgálata microarray technológia segítségével című vizsgálatainkhoz használt primerek					
Név	Faj	Primer párok		Termék hossz	Ta
MMP-3	patkány	AS:	5' -CCC TGA GCC TGG CTT TTA TTT GA -3'	185 bp	57°C
		S:	5' -CAG GGA GGC CCA GAG TGT GAA- 3'		
MMP-7	patkány	AS:	5' -GGG AAC AGG CGC AGA ATT ATC TTA -3'	167 bp	57°C
		S:	5' -ACA CCT GGG CTT CTG CAT TAT CTC -3'		
MMP-12	patkány	AS:	5' -ATG AAG CGT GCG GAT GTA GAC T -3'	373 bp	56°C
		S:	5' -GAA ATG TGT TGG GGT GAA GGT ATC -3'		
IL-19	patkány	AS:	5' -AGT TGG CGA TTC TGC TGA TTC TCC -3'	239 bp	57°C
		S:	5' -TTC TGT GGA CAT GCG CCT CCT G -3'		
IL-24	patkány	AS:	5' -AAG TGT CCG GCT GTT GAA -3'	219 bp	52°C
		S:	5' -AGC ATG GCA TTG TCC TTA CT -3'		
IL-1 β	patkány	AS:	5' -GCA CTG CAG GCT TCG AGA TGA -3'	220 bp	60°C
		S:	5' -GGT GGG TGT GCC GTC TTT CA -3'		
Clusterin	patkány	AS:	5' -GAA ATG AAG CTG AAG GCT TTC CCG -3'	535 bp	60°C
		S:	5' -GGA ACT GTA AAG CTG GGC TAT GGA -3'		
Renin	patkány	AS:	5' -TGC CCA CCC TCC CCG ACA TT -3'	167 bp	60°C
		S:	5' -GGC ACC CAG GAC CCA GAC AGG -3'		
GAPDH	patkány	AS:	5' -GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG -3'	159 bp	60°C
		S:	5' -CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC -3'		
MMP-3	humán	AS:	5' -GGC AGT TTT GCT CAG CCT ATC CAT -3'	197 bp	58°C
		S:	5' -TCC CCG TCA CCT CCA ATC CA -3'		
MMP-7	humán	AS:	5' -GTG GGA ACA GGC TCA GGA CTA TC -3'	169 bp	55°C
		S:	5' -ACA TCT GGG CTT CTG CAT TAT TTC -3'		
MMP-12	humán	AS:	5' -CTG GTT CTG AAT TGT CAG GAT -3'	99 bp	60°C
		S:	5' -ACA TTT CGC CTC TCT CTG C -3'		
IL-6	humán	F:	5' -AAAGATGGCTGAAAAAGATGGAT-3'	146 bp	60°C
		R:	5' -CTCTGGCTTGTTCTCACTACTCT-3'		
IL-24	humán	F:	5' -AGG CGG TTT CTG CTA TTC C -3'	55 bp	48°C
		R:	5' -GAG CTG CTT CTA CGT CCA ACT -3'		

GAPDH	humán	F:	5' -AGC AAT GCC TCC TGC ACC ACC AA-3'	159 bp	60°C
		R:	5' -GCG GCC ATC ACG CCA CAG TTT-3'		

2. táblázat. Kongenitális obstruktív nefropátia vizsgálata microarray technológia segítségével című méréseink során felhasznált realtime RT-PCR primerek szekvenciái, valamint a képződő termékek hossza és a primerek anellációs hőmérsékletei.

Az IL-24 indukálta vesefibrózis című vizsgálatainkhoz használt primerek					
Név	Faj	Primer párok		Termék hossz	Ta
mGAPDH	egér	AS:	5'-ATC TGA CGT GCC GCC TGG AGA AAC-3'	164 bp	60 °C
		S:	5'-CCC GGC ATC GAA GGT GGA AGA GT-3'		
IL-19	egér	AS:	5'-CTG GGC ATG ACG TTG ATT CTC T-3'	170 bp	51 °C
		S:	5'-TGA GGC GCA TGT CCA CAG-3'		
IL-20	egér	AS:	5'-GAC CCC TGA CCA CCA TAC CC-3'	178 bp	55 °C
		S:	5'-CAC CGC TGC CTG AAG TTC C-3'		
IL-24	egér	AS:	5'-TGT GGG AGG CCT TCT GGA CTG T-3'	133 bp	57 °C
		S:	5'-AGC AGG CTG TGG GCA AGG TAA C-3'		
IL-20R-β	egér	AS:	5'-GGG CCC CAG TTT GAG TTC CTT GTG-3'	119 bp	59 °C
		S:	5'-GCC CCC GGT TCC ATG GTT TCT A-3'		
TGF-β	humán	AS:	5' -CGA GGC GCC CGG GTT ATG C-3'	159 bp	60°C
		S:	5' -GCGTGC GGCAGCTGTACATTGACT -3'		
GAPDH	humán	AS:	5' -AGC AAT GCC TCC TGC ACC ACC AA-3'	159 bp	60°C
		S:	5' -GCG GCC ATC ACG CCA CAG TTT-3'		

3. táblázat. Az IL-20 citokin alcsalád szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában című vizsgálatokhoz tartozó méréseink során felhasznált realtime RT-PCR primerek szekvenciái, valamint a képződő termékek hossza és a primerek anellációs hőmérsékletei.

Az α-SMA valamint β-aktin specifikus detekciója fibrózis modellben című vizsgálatainkhoz használt primerek					
Név	Faj	Primer párok		Termék hossz	Ta
α-SMA saját	egér	AS:	5'-CCCCTGAAGAGCATCGGACA-3'	105 bp	60 °C
		S:	5'-TGGCGGGGACATTGAAGGT-3'		
β-aktin	egér	AS:	5'-CCCCTGAGGAGCACCGTGTG-3'	106 bp	60 °C
		S:	5'-ATGGCTGGGGTGTGAAGGT-3'		
α-SMA _{L1}	egér	AS:	5'-CACTATTGGCAACGAGCGC-3'	60 bp	48 °C

		S:	5'-CCAATGAAGGAAGGCTGGAA-3'		
α -SMA _{L2}	egér	AS:	5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3'	101 bp	57 °C
		S:	5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3'		
α -SMA _{L3}	egér	AS:	5'-GAGGCACCACTGAACCCCTAA-3'	154 bp	54 °C
		S:	5'-CATCTCCAGAGTCCAGCACA-3'		
β -aktin _{L1}	egér	AS:	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	154 bp	56 °C
		S:	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'		
β -aktin _{L2}	egér	AS:	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	165 bp	55 °C
		S:	5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAAA-3'		
β -aktin _{L3}	egér	AS:	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	228 bp	57 °C
		S:	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTCAA-3'		
RN18S	egér	AS:	5'-AGCGGTCGGCGTCCCCCAACTTCT-3'	107 bp	60 °C
		S:	5'-GCGCGTGCAGCCCCGGACATCTA-3'		

4. táblázat. Az α -SMA valamint β -aktin specifikus detekciója fibrózis modellben című vizsgálatokhoz tartozó méréseink során felhasznált realtime RT-PCR primerek szekvenciái, valamint a képződő termékek hossza és a primerek anellációs hőmérsékletei.

5.4.4 Western-blot

A vizsgált vesemintákat lízis pufferben (10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 1% Triton-X 100, 0,1 M Tris-HCl (pH=8), 1 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 5 mM NaF, 1 mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF), és 10 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)) homogenizáltuk. A felülúszók összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford reagenssel határoztuk meg (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A mintákhoz Leammli-féle treatment puffert (30% glicerol, 20% β -merkaptoetanol, 0,7 M SDS, 0,25 M Tris-HCl pH=6,8) adtunk, majd 5 percig 100°C-on denaturáltuk azokat. Ezt követően 12%-os nátrium-dodecyl-szulfát (SDS)-poliakrilamid gél (Mini-Protean TGX, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) zsebeibe 25 μ g összfehérjének megfelelő mintamennyiségeket, illetve molekulasúly markert (Precision Plus Protein™ Dual Color, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) vittünk fel. Az elektroforézist hűtött rendszerben (PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 200 V feszültség mellett végeztük 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS tartalmú futtató pufferben. Következő lépésként a szeparált fehérjéket az SDS-poliakrilamid gélről 0,2 μ M pórusméretű nitrocellulóz membránra

(Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) blottoltuk (Trans-Blot Turbo Transfer system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A fehérjetranszfer sikerességét 1% Ponceau (Sigma Chemical Co., MO, USA) és 25% ecetsav (Reanal, Budapest, Magyarország) tartalmú festékekkel ellenőriztük. A blotmembránok aspecifikus kötőhelyeinek gátlására a membránokat szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül, óvatos ráztatás mellett blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor, 10% PBS puffer) inkubáltuk. Blokkolást követően a membránokat az elsődleges, specifikus ellenanyagokkal inkubáltuk szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. Ennek során az α -SMA-t kimutató antitestből (anti- α -SMA egér poliklonális antitest, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:1000 hígítást készítettünk mosó oldattal (1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween™ 20 detergens, 10% PBS puffer). A mosási lépéseket követően mosóoldatban 1:2000-re hígított tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesttel (kecske anti-egér HRP-konjugált antitest, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránokat. Belső standarként a GAPDH fehérje szintjét határoztuk meg. Elsődleges antitestként anti-GAPDH nyúl poliklonális ellenanyag (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:500 hígítási arányú oldatát használtuk, másodlagos antitestként pedig tormaperoxidáz-konjugált, kecskében termeltetett anti-nyúl ellenanyag (tormaperoxidáz-konjugált) 1:2000-es hígítását alkalmaztuk. Az immunoreaktív helyek kemilumineszcens szignálját ECL reagens (Amersham ECL™ Prime Western blot detektáló reagens, GE Healthcare) hozzáadásával detektáltuk VersaDoc 5000MP képalkotó rendszer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével. Eredményeinket a Quantity One szoftverrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) denzitometráltuk és értékeltük.

5.5 α -SMA és β -aktin specifikus primerek tervezése

Az egér α -SMA (NM_007392.3), β -aktin (NM_007393.5) γ -cito-aktin (NM_009609.3) és γ -simaizom-aktin (NM_009610.2) szekvencia adataihoz az NCBI Reference Sequence Database segítségével jutottunk hozzá [93]. A saját tervezésű α -SMA (α -SMA_{saját}) és β -aktin (β -aktin_{saját}) specifikus primerek Primer3web szoftver (verzió: 4.0.0) segítségével terveztük meg [94] figyelembe véve a szekvenciák közötti nagyfokú azonosságot. A rangos nemzetközi folyóiratokból vett α -SMA (α -SMA_{L1}, α -SMA_{L2}, α -SMA_{L3}) és β -aktin

(β -aktin_{L1}, β -aktin_{L2}, β -aktin_{L3}) specifikus primerekkel hasonlítottuk össze a saját tervezésű primereinket, melyeket azon ritka régióira terveztük az α -SMA-t és β -aktin-t kódoló nukleotid szekvenciáknak ahol a legtöbb eltérés volt tapasztalható az aktin izoformák között [95-101].

5.5.1 Mesterséges DNS templát használata

A vizsgált primerek specificitásának megfelelő anellációs szakaszt tartalmazó mesterséges DNS templátokat használtunk (Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA)) az α -SMA, β -aktin, γ -cito-aktin valamint γ -simaizom-aktin primerek vizsgálatához. A keletkezett PCR termékeket 2%-os agaróz gélen, elektroforézis segítségével szeparáltuk.

5.6 Statisztika

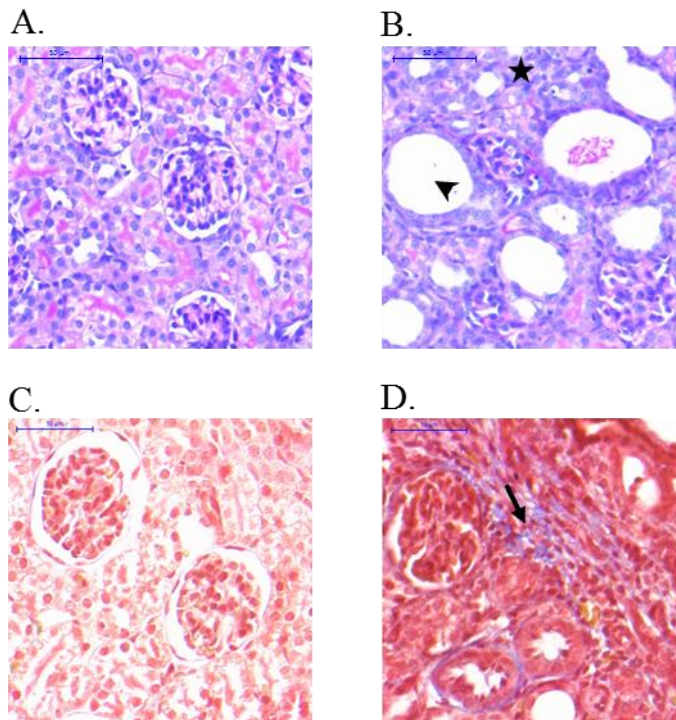
Az adatsorok normál eloszlását Kolmogorow Smirnov, illetve D'Agostino & Pearson omnibus tesztek segítségével határoztuk meg. Amennyiben az adott adathalmaz normál eloszlást mutatott, a csoportok közötti különbséget két csoport esetén 2-mintás t-próbával, kettőnél több csoport esetén egyutas ANOVA teszt segítségével határoztuk meg. Amennyiben a normál eloszlás feltétele nem teljesült, két vizsgált csoport esetén Mann Whitney U-tesztet használtunk. Szignifikáns eltérést a $p < 0,05$ valószínűség esetén jelöltük különböző szimbólumokkal. A szemléltető grafikonokon átlag és szórás (SD) látható.

6. EREDMÉNYEK

6.1 Kongenitális obstruktív nefropátia vizsgálata microarray technológia segítségével

6.1.1 UUO indukált patológiai változások a vesében

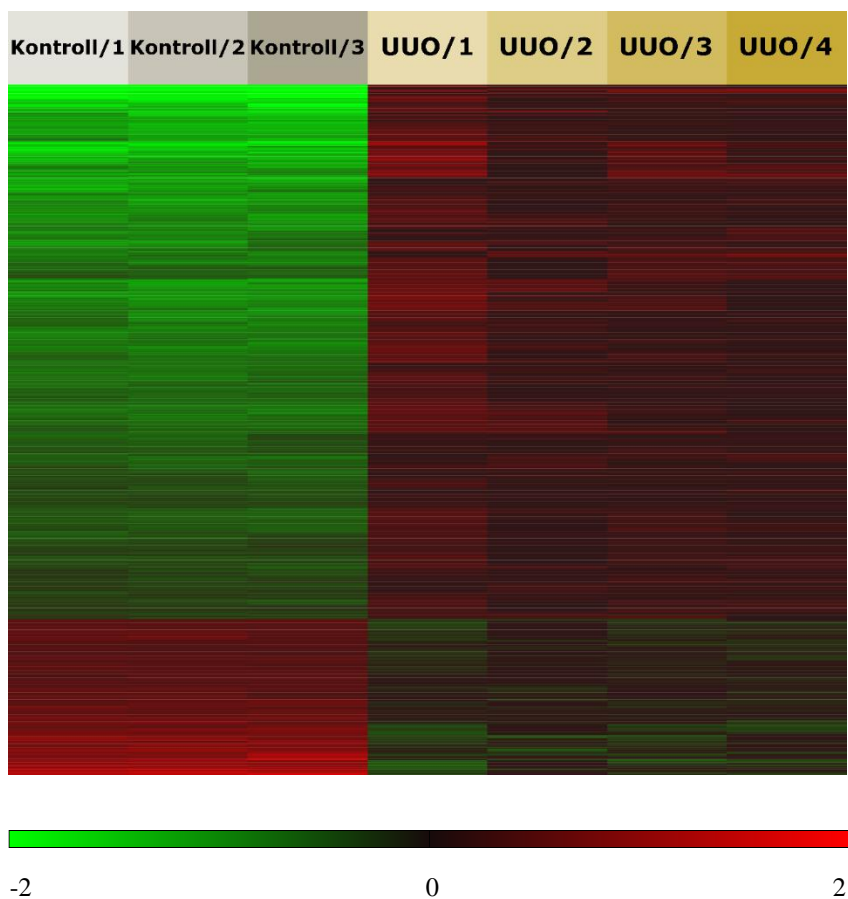
Az UUO-t követően 10. napon az újszülött patkányok veséi jelentősen megteltek tiszta áttetsző sárgás folyadékkal mely egyértelmű jele az obstrukció következtében kialakuló hidronefrózisnak. Az eltávolított vesékből készült szövettani metszetek PAS festése jelentős patológiai elváltozásokat mutatott ki az obstrukciót követően. A veseparenchima struktúrája károsodott, tubuláris atrófia, valamint dilatáció jellemezte az intersticiumot (9. ábra/B). Az kontroll (T0) állatok veséiben ezzel szemben a vese struktúrája intakt maradt, patológiai elváltozásnak nem volt nyoma (9. ábra/A). A fibrotikus folyamatok során lerakódott szöveti kollagén mennyiségét Masson festés segítségével határoztuk meg a kontroll és obstruált vesékben. Eredményeink szerint az UUO-t követő 10. napon jelentősen megemelkedik a lerakódott intersticiális kollagén mennyisége az UUO hatására (9. ábra/C és D).



9. ábra: Reprezentatív képek kontroll (A, C) és obstruált (B, D) újszülött patkányok PAS (A, B) valamint Masson festett (C, D) vesemetszeteiről készültek. Tubuláris atrófia (B, fekete csillag) valamint dilatáció (háromszög), kiszélesedett intersticiális tér (B), valamint jelentős kollagén lerakódás (D, fekete nyíl) tapasztalható a vesékben az uréter obstrukció következtében. 200x nagyítás

6.1.2 Microarray analízis

A patkány genomban bekövetkező változások detektálására alkalmas microarray vizsgálatunk szerint a vesékben számos mRNS expressziója szignifikánsan megváltozik 10 nappal az UUO-t követően a kontroll vesékhez képest. Több mint 800 gén expressziója esetében mutattunk ki legalább kétszeres, statisztikailag szignifikáns változást. Az ilyen jelentős mértékű, transzkriptomot érintő változások vizualizálását az úgynevezett génexpressziós hőtérképek segítik (ábra 10). Ezen megváltozott mRNS szintű gének közül 681 expressziója emelkedést, 199 gén pedig csökkenést mutatott az obstrukciót követő vesekárosodás hatására. Az így kapott génlistát ezt követően sorbarendeztük az alapján, hogy mennyire változott meg az adott gén expressziója. A 10 legnagyobb mértékben megváltozott expressziójú gént (mind pozitív, mind negatív irányban) a 5. táblázat tartalmazza.



10. ábra. Hőtérkép azokról a génekről melyek expressziója legalább kétszeres eltérést mutatott az obstruált állatok veséjében a kontroll állatokhoz képest. 681 gén expressziója volt szignifikánsan emelkedett (piros szín), valamint 199 gén expressziója volt szignifikánsan csökkent (zöld szín). $p < 0,05$

Emelkedett expressziójú gének uréter obstrukciót követően (UUO)						
Gén	Elnevezés	Intenzitás átlag		Változás	p érték	FDR
		Kontroll csoport	UUO csoport	(Kontroll vs. UUO)		
Mmp7	matrix metalloproteinase 7	-9,26	0,52	+875,84	0,00045	0,03190
Mmp3	matrix metalloproteinase 3	-6,30	1,64	+244,84	0,00009	0,02080
Trh	thyrotropin releasing hormone	-5,88	0,95	+113,29	0,00063	0,01090
Aoc1	amiloride binding protein 1	-6,32	0,40	+105,23	0,00002	0,01050

Il19	interleukin 19 (predicted)	-5,66	0,97	+98,94	0,00001	0,01670
Mmp12	matrix metallopeptidase 12	-5,13	1,42	+93,90	0,00003	0,03340
Dmbt1	deleted in malignant brain tumors 1	-6,27	0,23	+90,92	0,00053	0,01050
Il24	interleukin 24	-6,04	0,46	+90,13	0,00001	0,01760
Dio3	deiodinase, iodothyronine, type III	-5,91	0,56	+88,73	0,00004	0,02150
C4bpa	complement component 4 binding protein, alpha	-4,62	1,24	+58,18	0,00012	0,02330
Csökkent expressziójú gének uréter obstrukciót követően (UUO)						
Gén	Elnevezés	Intenzitás átlag		Változás	p érték	FDR
		Kontroll csoport	UUO csoport	(Kontroll vs. UUO)		
Pex5l	peroxisomal biogenesis factor 5- like	3,29	-0,58	-14,60	0,00118	0,01670
Fmo3	flavin containing monooxygenase 3	2,96	-0,64	-12,17	0,00037	0,03300
Vwc2	von Willebrand factor C domain containing 2	2,88	-0,63	-11,41	0,00041	0,03060
Spna1	spectrin, alpha, erythrocytic 1	2,98	-0,40	-10,44	0,00003	0,02210
Mlana	melan-A	2,54	-0,81	-10,23	0,00015	0,04430
Gcm1	glial cells missing homolog 1	2,15	-1,08	-9,39	0,00050	0,04720
Myh13	myosin, heavy polypeptide 13	2,42	-0,66	-8,46	0,00139	0,03420
Kcnj10	potassium inwardly- rectifying channel, subfamily J, member 10	2,33	-0,67	-7,98	0,00039	0,03850
Myh7	myosin, heavy polypeptide 7	2,12	-0,79	-7,54	0,00020	0,02950
Lrrc66	leucine rich repeat containing 66	2,04	-0,87	-7,53	0,00014	0,04950

5. táblázat. Microarray vizsgálatunk alapján a legnagyobb mértékben emelkedő valamint csökkenő gének. A táblázat a microarray vizsgálat során kapott fluoreszcencián alapuló génexpressziós értékek átlagát mutatja, továbbá a 10 napos

UUO-n átesett valamint kontroll egerek (n=4/csoport) veséiből származó mérési eredmények alapján kalkulált összesített növekményt és csökkenést. ($p < 0,05$)

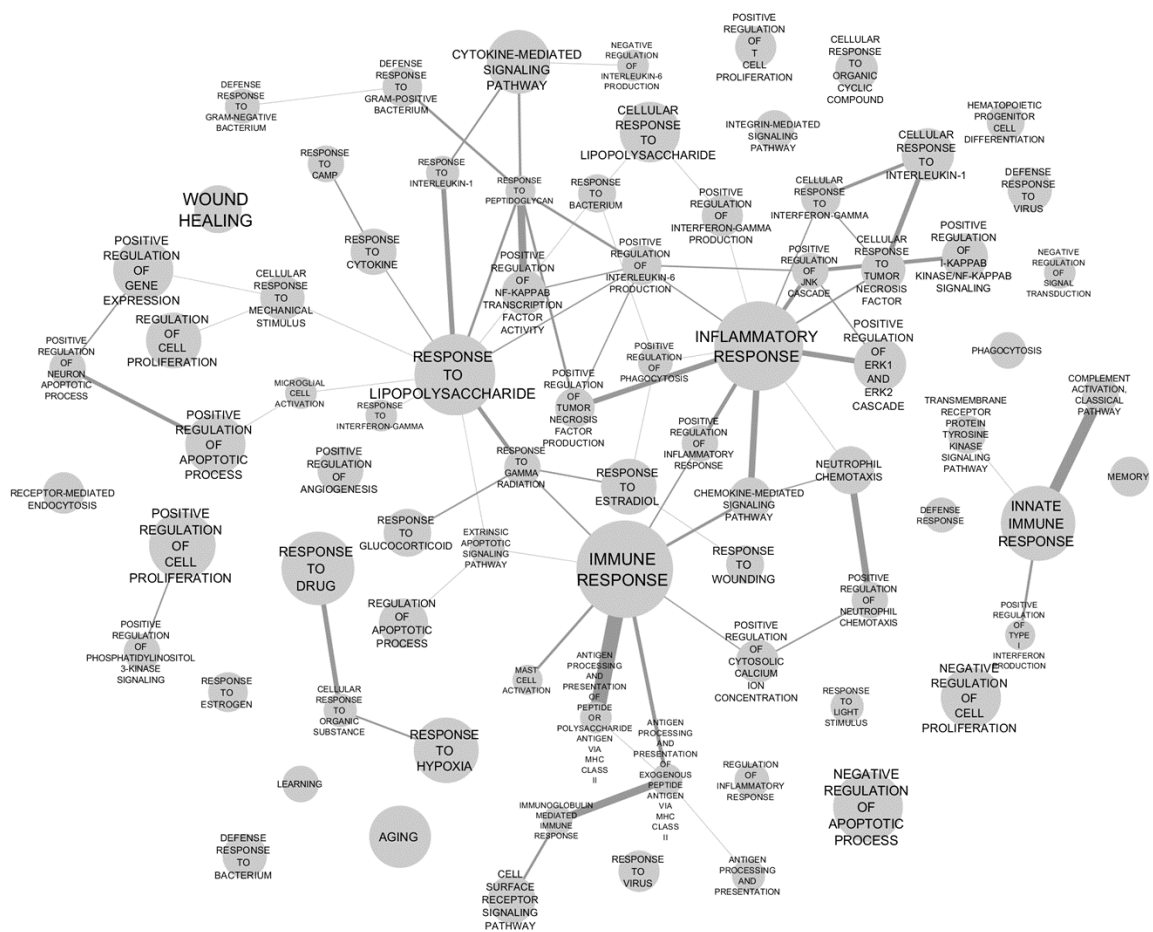
6.1.3 Génontológiai elemzés eredménye

A microarray adatok feldolgozása során kapott eredmények alapján génontológiai elemzést végeztünk. Az elemzés segít, hogy azonosítsuk a géncsaládokat melyek az UUO-t követően szignifikánsan ($p < 0,05$) felülreprezentáltak voltak (6. táblázat). Az azonosított gének ontológiai analíziséhez a DAVID adatbázist használtuk, mely számos jelentősen átfedő génontológiai terminust azonosított. A egyes génontológiai csoportokban legnagyobb mértékben feldúsult géncsaládokról a 11. ábra nyújt tájékoztatást. Az UUO hatására indukálódó gének jellemzően az immunválaszhoz és gyulladáshoz valamint apoptotikus és proliferációs folyamatokhoz kapcsolhatóak.

GO terminusok és elnevezések	Elem szám	p érték	FDR
Biológiai funkciókhoz kapcsolódó GO terminusok			
immune response	47	0.000E+00	0.000E+00
inflammatory response	41	0.000E+00	0.000E+00
response to lipopolisaccharide	34	0.000E+00	0.000E+00
innate immune response	32	0.000E+00	0.000E+00
response to drug	32	0.000E+00	1.100E-03
negative regulation of apoptotic process	30	1.000E-04	5.600E-03
response to hypoxia	27	0.000E+00	0.000E+00
positive regulation of cell proliferation	27	8.000E-04	2.980E-02
aging	25	0.000E+00	2.000E-04
cellular response to lipopolysaccharide	24	0.000E+00	0.000E+00
Molekuláris funkciókhoz kapcsolódó GO terminusok			
protein homodimerization activity	46	3.000E-07	2.000E-04
cytokine activity	18	4.000E-07	1.000E-04
protein binding	69	3.700E-06	8.000E-04
protease binding	13	1.630E-05	2.500E-03
cytokine receptor activity	8	1.710E-05	2.100E-03
chemokine activity	8	3.120E-05	3.200E-03
receptor binding	24	4.430E-05	3.900E-03

protein heterodimerization activity	30	1.649E-04	1.270E-02
tumor necrosis factor receptor binding	7	2.049E-04	1.400E-02
protein complex binding	22	3.829E-04	2.350E-02
Sejten belüli lokációt jelző GO terminusok			
extracellular space	93	0.000E+00	0.000E+00
cell surface	60	0.000E+00	0.000E+00
external side of plasma membrane	33	0.000E+00	0.000E+00
membrane raft	27	0.000E+00	0.000E+00
extracellular region	43	0.000E+00	0.000E+00
MHC class II protein complex	7	0.000E+00	0.000E+00
extracellular matrix	19	0.000E+00	0.000E+00
blood microparticle	14	0.000E+00	6.000E-04
neuronal cell body	31	0.000E+00	1.600E-03
integral component of plasma membrane	40	1.000E-04	3.000E-03

6. táblázat. A 10 legjelentősebb GO terminus mely megváltozott az obstrukció hatására. Biológiai és molekuláris funkció, valamint sejten belüli lokalizáció szerint csoportosítva.



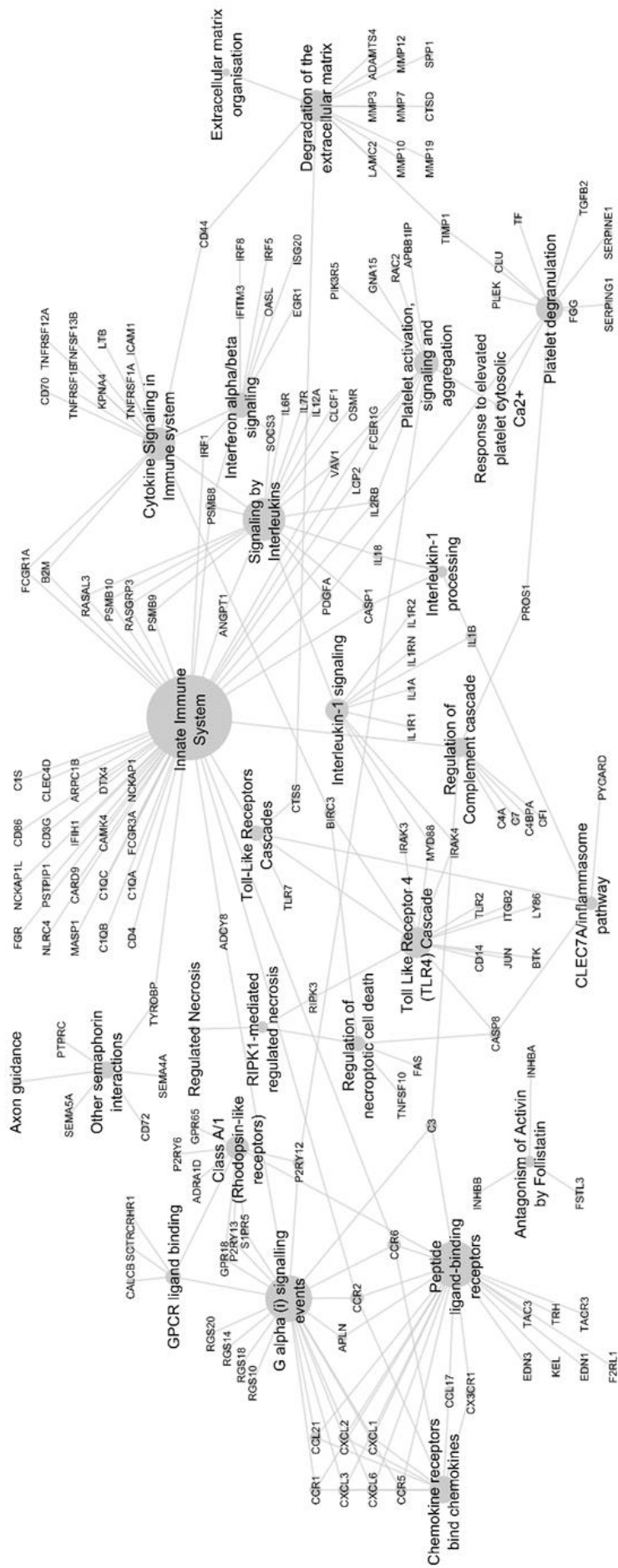
11. ábra. Az UUO-t követő microarray vizsgálat génontológiai elemzésének vizuális ábrázolása. A különböző csoportok a statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) felülreprezentált gén családokat ábrázolják. Az egyes csoportoknál a kör átmérője arányos a csoporthoz tartozó megváltozott gének számával.

6.1.4 Hálózat elemzés

A Reactom Pathway Database segítségével feltártuk azokat a útvonalakat, melyek az UUO hatására aktiválódnak. Az egyes útvonalakat rangsoroltuk a hozzájuk tartozó elemszám alapján (6. táblázat). Ezek az útvonalak jellemzően az adaptív és természetes immunválaszhoz, citokin jelátvitelhez, valamint receptor aktivációs kaszkádhoz tartoznak. A részletes fehérje-fehérje interakciós hálózat, mely tartalmazza a főbb útvonalakat a 12. ábrán látható.

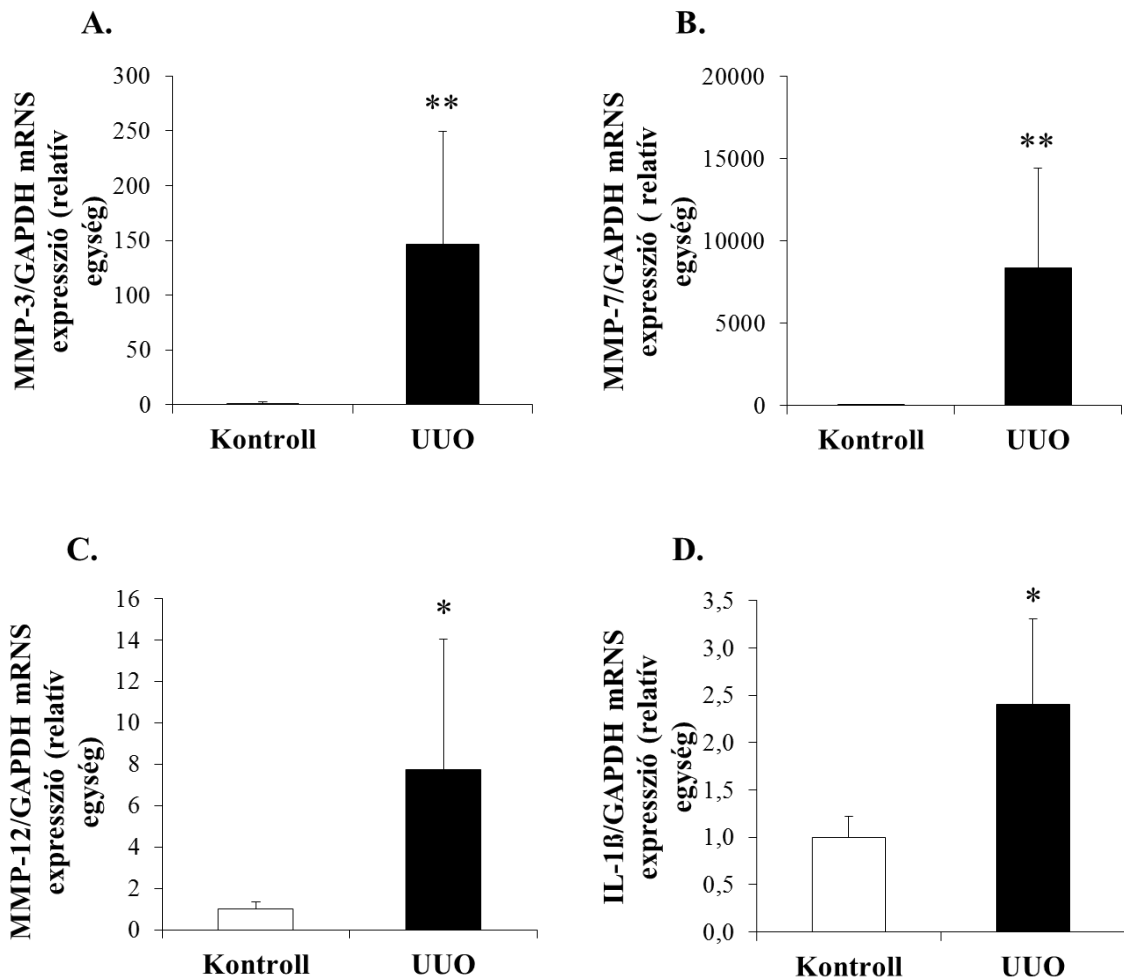
Útvonal elnevezése	Találati arány	Fehérjék száma az útvonalon belül	Megtalált elemek száma	p érték	FDR
Innate Immune System	0.113	806	61	6.460E-08	1.980E-05
Cytokine Signaling in Immune system	0.069	489	44	6.350E-08	1.980E-05
Adaptive Immune System	0.086	609	37	2.450E-03	5.290E-02
GPCR ligand binding	0.055	389	30	1.600E-04	1.170E-02
Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	0.043	304	27	3.510E-05	5.270E-03
Signaling by Interleukins	0.039	280	25	6.360E-05	5.910E-03
Peptide ligand-binding receptors	0.027	191	20	4.280E-05	5.270E-03
G alpha (i) signaling events	0.030	212	20	1.720E-04	1.170E-02
Platelet activation, signaling and aggregation	0.029	203	19	2.750E-04	1.260E-02
Toll-Like Receptors Cascades	0.019	132	14	5.340E-04	2.030E-02

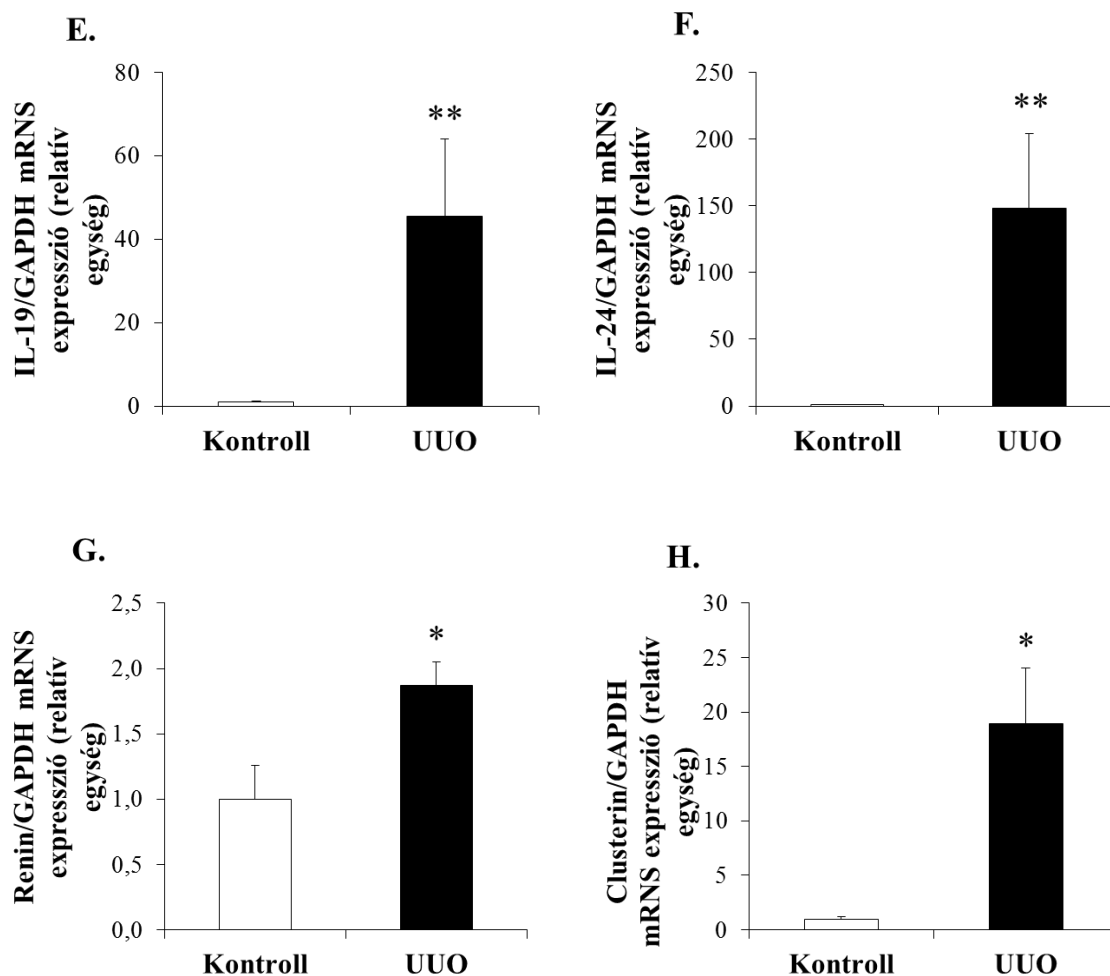
7. táblázat. Az UUO-t követő microarray vizsgálat során kapott eredmények fehérje-fehérje interakciós kapcsolatai alapján azonosított főbb biológiai útvonalak. A 10 különböző útvonal melyek a Reactome Pathway Database alapján felülreprezentáltak voltak az obstruált vesében. ($p < 0,05$)



6.1.5 A microarray vizsgálat mRNS szinten történő validálása

A microarray mérés során kapott eredményeket az adatok statisztikai elemzését követően, nyolc kiválasztott gén expressziójának kontroll és UUO-s mintákból történő valósídejű RT-PCR-el történő meghatározásával validáltuk (13. ábra). A microarray analízisünkkel összhangban, mind a nyolc validálásra kiválasztott molekula (MMP-3-at, 7-et, 12-t, az IL-19-et, 24-et valamint az IL-1 β -t, renint, clusterint) a kontrollokhoz képest szignifikánsan emelkedett expressziót mutatott a vesékben az UUO-t követő 10. napon.

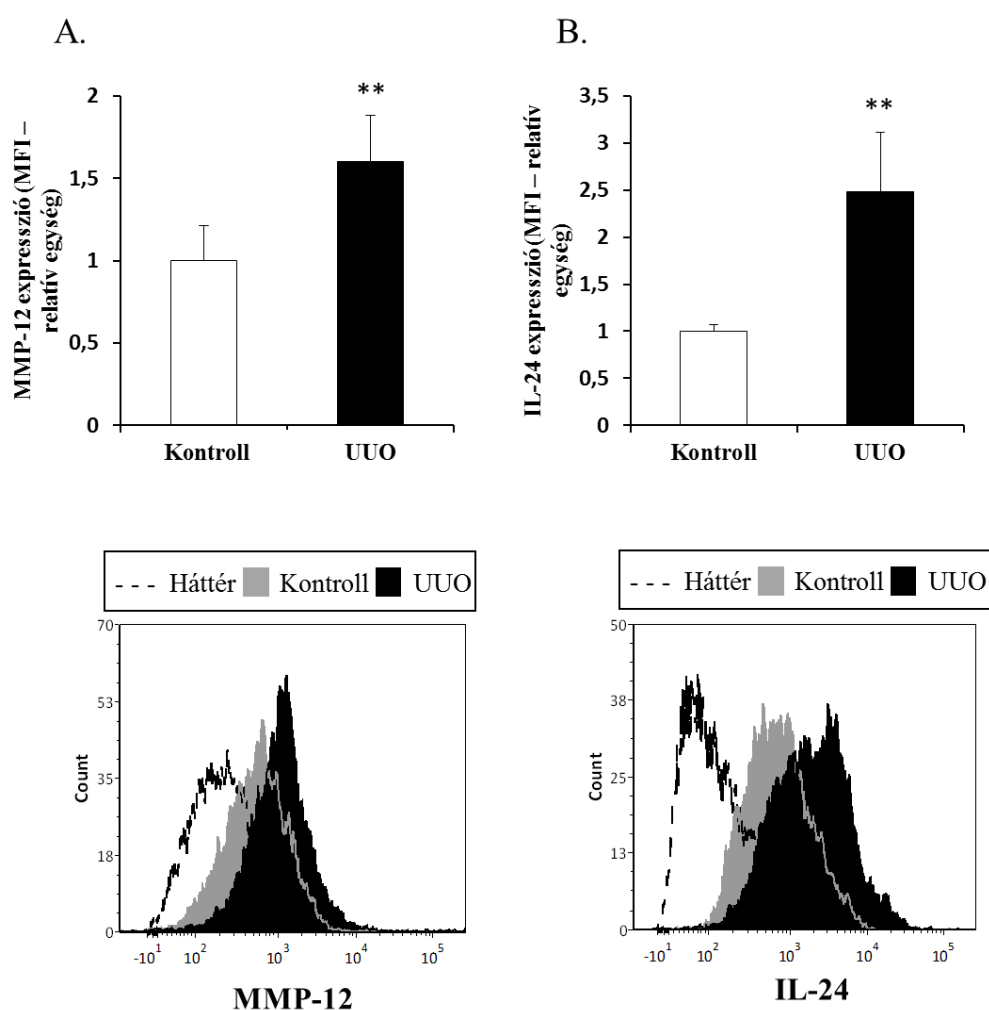




13. ábra. 8 kiválasztott gén expressziójának validálása. A mátrix metalloproteináz (MMP)-3 (A), mátrix metalloproteináz (MMP)-7 (B), mátrix metalloproteináz (MMP)-12 (C), interleukin (IL)-1 β (D), interleukin (IL)-19 (E), interleukin (IL)-24 (F) clusterin (G), renin (H) mRNS szintjének változását a kontroll és uréter obstruált vesékben valós idejű RT-PCR segítségével határoztuk meg. A mérések során kapott mRNS expresszióra vonatkozó értékeket a mintákban található Glicerín – aldehid – 3 – foszfát – dehidrogenázra (GAPDH) normalizáltuk, majd az expressziós változásokat a kontroll mintákban mért expressziós értékek átlagára vonatkoztatva ábrázoltuk. * $p < 0,05$ vs. Kontroll; ** $p < 0,01$ vs. Kontroll

6.1.6 A microarray vizsgálat fehérje szinten történő validálása

A microarray adatok statisztikai elemzése, valamint realtime RT-PCR segítségével történő megerősítése után két, a fibrotikus folyamatokban kevésbé ismert gén expresszióját validáltuk a kontroll és UUO-s mintákból fehérje szinten is áramlási citométer segítségével (14. ábra). A microarray analízisünkkel valamint realtime RT-PCR méréseinkkel összhangban mind az MMP-12, mind pedig az IL-24 a kontroll vesékhez képest szignifikánsan emelkedett expressziót mutatott fehérje szinten az újszülött patkányok veséiben az UUO-t követő 10. napon.

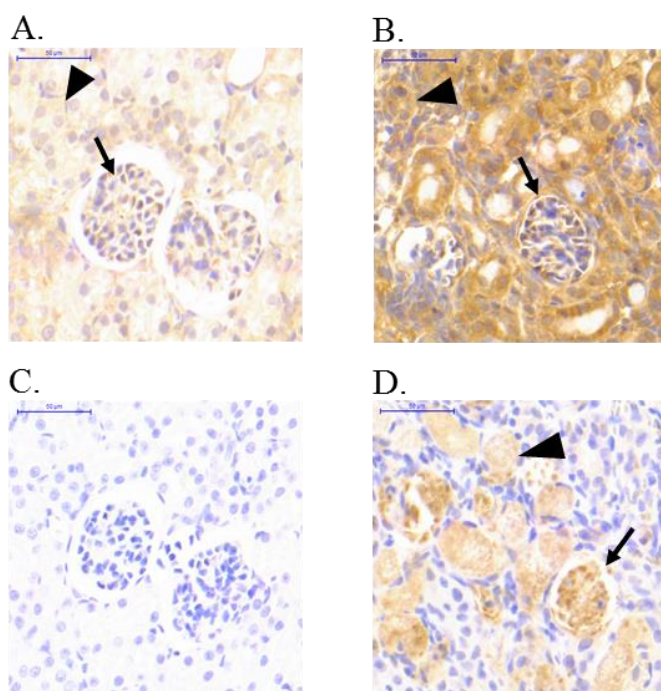


14. ábra. 2 kiválasztott gén expressziójának validálása. A mátrix metalloproteináz (MMP)-12 (A), interleukin (IL)-24 (D), fehérje szintjének változását a kontroll és uréter obstruált újszülött állatok veséiben áramlási citométer segítségével meghatároztuk. A mérések során kapott fehérje expresszióra vonatkozó intenzitás értékeket (kontroll és

obstruált vesékben) az izotípus kontroll ellenanyag által adott intenzitás értékhez (háttér) viszonyítva ábrázoltuk a reprezentatív hisztogramokon. ** $p < 0,01$ vs. Kontroll

6.1.7 Az MMP-12 és az IL-24 vesén belüli lokalizációja

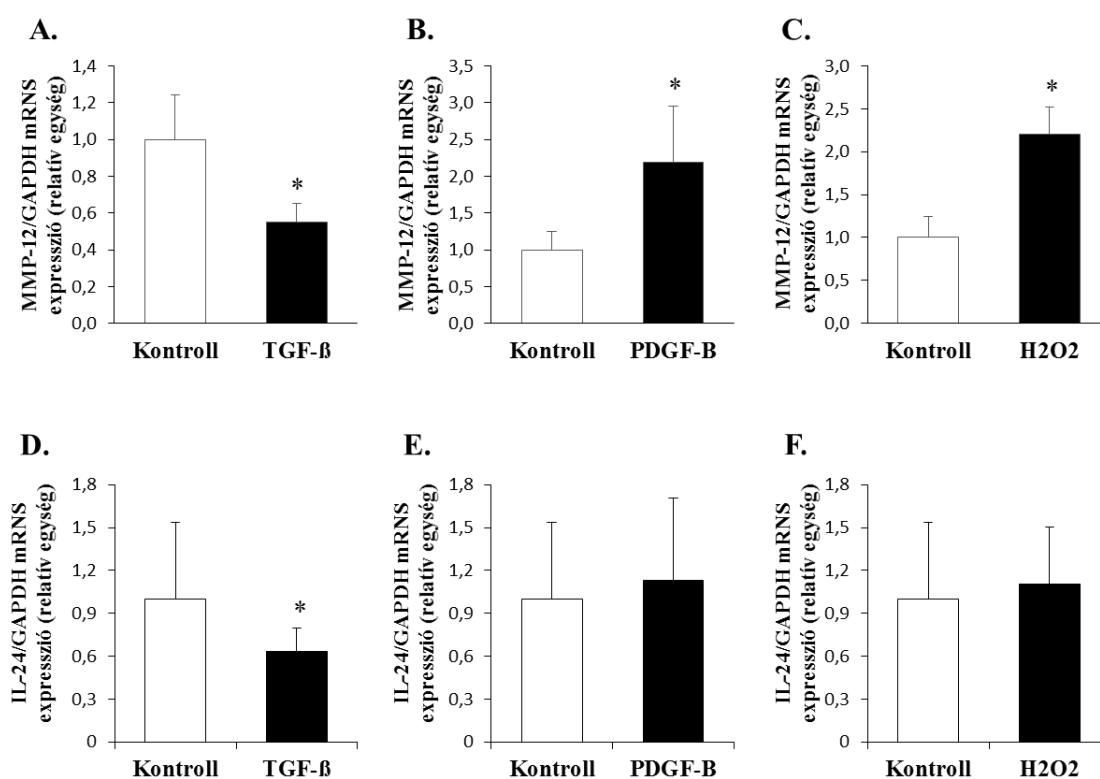
Megvizsgáltuk immunhisztokémiai festés segítségével, hogy hol expresszálódik a vesén belül az MMP-12 és az IL-24. Eredményeink szerint az MMP-12 diffúz módon volt jelen valamennyi vesestruktúrában, valamint fokozottabb expresszió volt tapasztalható az obstruált állatok veséiben a kontroll vesékhez képest (ábra 15. A, B). Szintén emelkedett IL-24 expresszió volt kimutatható az obstrukción átesett állatok vese epitél és glomerulus sejteiben. A kontroll állatok veséiben IL-24 nem volt detektálható (ábra 15. C, D).



15. ábra. Reprezentatív kép az MMP-12 (A, B) valamint IL-24 (C, D) specifikus antitesttel jelölt kontroll (A, C) valamint uréter obstruált vesékből. A kontroll (A) valamint obstruált (B) vesékben a tubulus epitél sejtek (fekete háromszög jelöli) és glomerulus sejtek (fekete nyíl jelöli) jellemzően pozitívak voltak MMP-12-re. Az IL-24 az obstruált vesékben (D) volt detektálható a tubulus epitél sejtekben (fekete háromszög jelöli) és glomerulus sejtekben (fekete nyíl jelöli). Az IL-24 kontroll vesékben nem volt kimutatható (C) 200x-os nagyítás.

6.1.8 A TGF- β , PDGF-B és H₂O₂ hatása a HEK-293 sejtek MMP-12 és IL-24 mRNS expressziójára

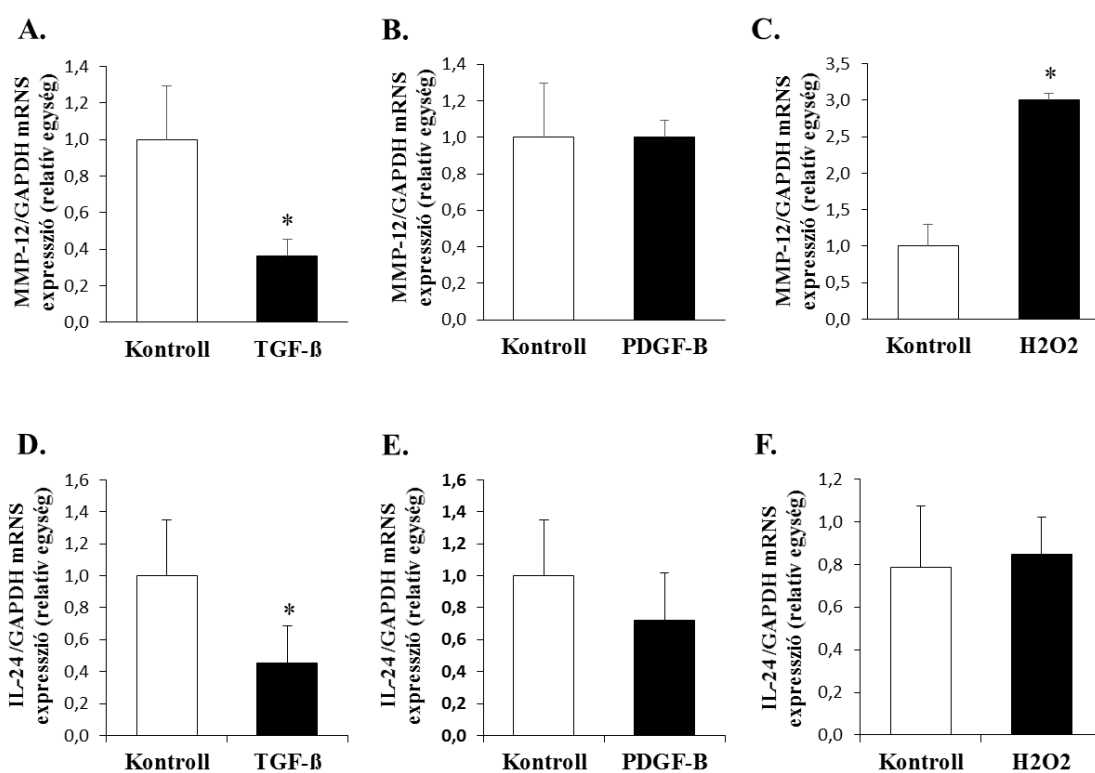
Valósidejű PCR módszer segítségével megvizsgáltuk, hogy a TGF- β , PDGF-B valamint a H₂O₂ kezelés hogyan befolyásolja a HEK-293 embrionális humán vesesejtek MMP-12 valamint IL-24 expresszióját (16. ábra). A TGF- β kezelés csökkentette a HEK-293 sejtek MMP-12 és IL-24 mRNS expresszióját a vehiculummal kezelt kontroll sejtekhez képest (16. ábra/A és D). A sejtek PDGF-B valamint a H₂O₂ kezelése pedig fokozta az MMP-12 mRNS expresszióját a vehiculummal kezelt kontroll sejtekhez képest (16. ábra/B és C).



16. ábra. MMP-12 valamint IL-24 mRNS expresszió meghatározás TGF- β (A,D), PDGF-B (B,E) valamint H₂O₂ (C,F) kezelésekre HEK-293 embrionális vese sejtekben RT-PCR segítségével. A mérések során kapott mRNS expresszióra vonatkozó értékeket a mintákban található Glicerín – aldehyd – 3 – foszfát – dehidrogenázra (GAPDH) normalizáltuk, majd az expressziós változásokat a kontroll mintákban mért expressziós értékek átlagára vonatkoztatva ábrázoltuk. p<0,01 vs. Kontroll

6.1.9 A TGF- β , PDGF-B és H₂O₂ hatása a HK-2 sejtek MMP-12 és IL-24 mRNS expressziójára

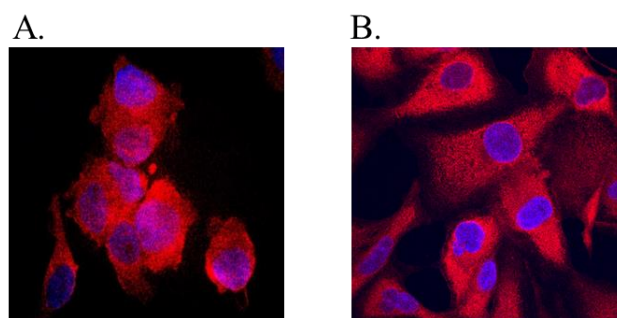
Valósídejű PCR módszer segítségével megvizsgáltuk, hogy a TGF- β , PDGF-B valamint a H₂O₂ hogyan befolyásolja a HK-2 humán proximális tubulus epitél sejtek MMP-12 expresszióját (17. ábra). A TGF- β kezelés csökkentette a HK-2 sejtek MMP-12 és IL-24 mRNS expresszióját a vehiculummal kezelt kontroll sejtekhez képest (17. ábra/A és D). A sejtek PDGF-B kezelésének nem volt hatása az MMP-12 valamint IL-24 mRNS szintjére (17. ábra/B és E). A H₂O₂ pedig fokozta az MMP-12 mRNS expresszióját a vehiculummal kezelt kontroll sejtekhez képest (17. ábra/C).



17. ábra. MMP-12 valamint IL-24 mRNS expresszió meghatározás TGF- β (A,D), PDGF-B (B,E) valamint H₂O₂ (C,F) kezelésekre hatására HK-2 vese proximális tubulus epitél sejtekben RT-PCR segítségével. A mérések során kapott mRNS expresszióra vonatkozó értékeket a mintákban található Glicerín – aldehyd – 3 – foszfát – dehidrogenázra (GAPDH) normalizáltuk, majd az expressziós változásokat a kontroll mintákban mért expressziós értékek átlagára vonatkoztatva ábrázoltuk. p<0,01 vs. Kontroll

6.1.10 Az IL-20R β kimutatása HEK-293 és HK-2 sejteken

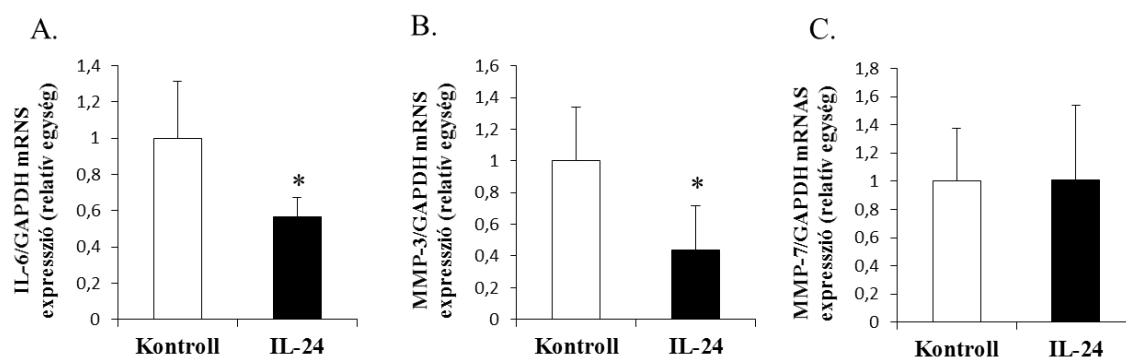
Az IL-24 biológiai aktivitását akkor tudja kifejteni, ha a célsejt expresszálja az IL24 heterodimer receptorainak IL-20R β alegységét. Megvizsgáltuk, hogy a méréseink során használt HEK-293 embrionális humán vesesejtek és HK-2 vese proximális tubulus epitél sejtek sejteken megtalálható-e ez a receptor alegység (18. ábra/A és B). Immunfluorescens jelölést követően azt találtuk, hogy mind a két sejtvonal kifejezi az IL-24 receptorainak közös alegységét az IL-20R β -át.



18. ábra. Reprezentatív kép az IL-20R β specifikus antitesttel jelölt HEK-293 embrionális vese epitél (A) és HK-2 vese proximális tubulus epitél (B) sejtekekről. Kék festődést mutatnak a sejtmagok, az IL-20R β -át pedig piros festődés jelöli. 400x-os nagyítás.

6.1.11 Az IL-24 hatása a HEK-293 sejtek IL-6, valamint MMP-3 és -7 expressziójára.

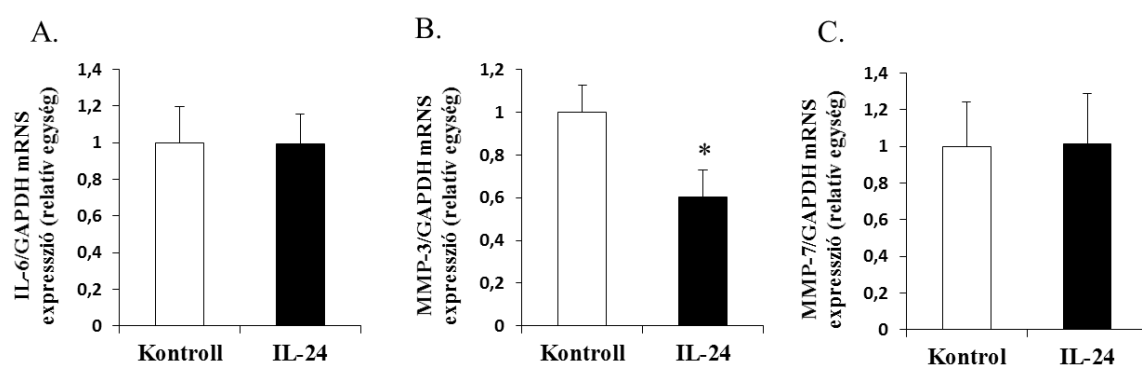
Valósídejű PCR módszer segítségével megvizsgáltuk, hogy az IL-24 hogyan befolyásolja a HEK-293 embrionális vese epitél sejtek IL-6, MMP-3 valamint MMP-7 expresszióját (19. ábra). Az IL-24 kezelés szignifikánsan csökkentette a HEK-293 sejtek IL-6 (19. ábra/A) és MMP-3 (19. ábra/B) mRNS expresszióját a vehiculummal kezelt kontroll sejtekhez képest. A IL-24 kezelésének nem volt hatása az MMP-7 (19. ábra/C) mRNS szintjére.



19. ábra. IL-6, valamint MMP-3 és -7 expresszió meghatározás IL-24 kezelést követően HEK-293 humán embrionális veseepítél sejtekben RT-PCR segítségével. A mérések során kapott mRNA expresszióra vonatkozó értékeket a mintákban található glicerin – aldehyd – 3 – foszfát – dehidrogenázra normalizáltuk az expressziós változásokat. * $p < 0,05$ vs. Kontroll

6.1.12 AZ IL-24 hatása a HK-2 sejtek IL-6, valamint MMP-3 és -7 expressziójára.

Valósídejű RT-PCR módszer segítségével megvizsgáltuk, hogy az IL-24 hogyan befolyásolja a HK-2 proximális tubulus sejtek IL-6, MMP-3 valamint MMP-7 expresszióját (20. ábra). Az IL-24 kezelés szignifikánsan csökkentette a HK-2 sejtek MMP-3 (20. ábra/B) mRNA expresszióját a vehiculummal kezelt kontroll sejtekhez képest. A IL-24 kezelésének nem volt hatása az MMP-7 (20. ábra/C) mRNA szintjére.



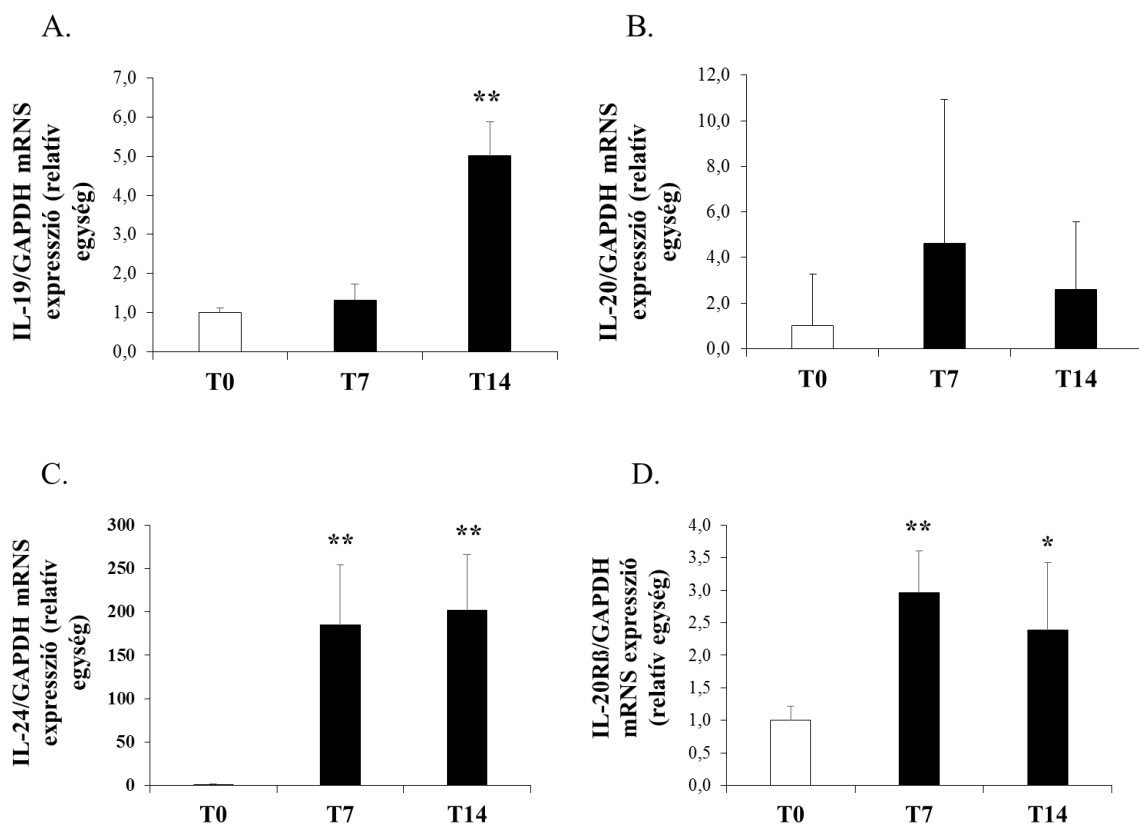
20. ábra. IL-6, valamint MMP-3 és -7 expresszió meghatározás IL-24 kezelést követően HK-2 vese proximális tubulus epítél sejtekben RT-PCR segítségével. A mérések során kapott mRNA expresszióra vonatkozó értékeket a mintákban található

glicerín – aldehid – 3 – foszfát – dehidrogenázra normalizáltuk az expressziós változásokat. * $p < 0,05$ vs. Kontroll

6.2 Az IL-24 szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában

6.2.1 Az IL-19,-20,-24 valamint IL-20R β expressziója UUO indukálta vesefibrózisban

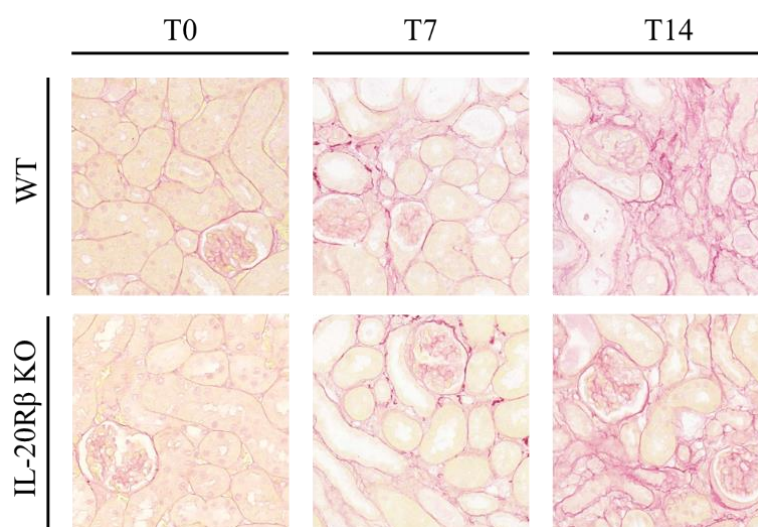
Valós idejű RT-PCR módszer segítségével meghatároztuk az IL-20 citokin alcsaládba tartozó IL-19, IL-20, IL-24 citokinek valamint heterodimer receptoruk közös lánccának, az IL-20R β -nak a mennyiségét az UUO-t követő 7. és 14. napon vad típusú egerek veséiben (21. ábra) a kontroll vesékhez képest. Eredményeink szerint az UUO-t követő 7. és 14. napon is jelentősen megemelkedik az IL-24-nek valamint az IL-20R β -nak az mRNA expressziója (21. ábra/C és D). Az IL-19 expressziója az UUO-t követő 14. napon szignifikánsan emelkedett (21. ábra/A), az IL-20 mennyisége nem változott az uréter obstrukció hatására (21. ábra/B).

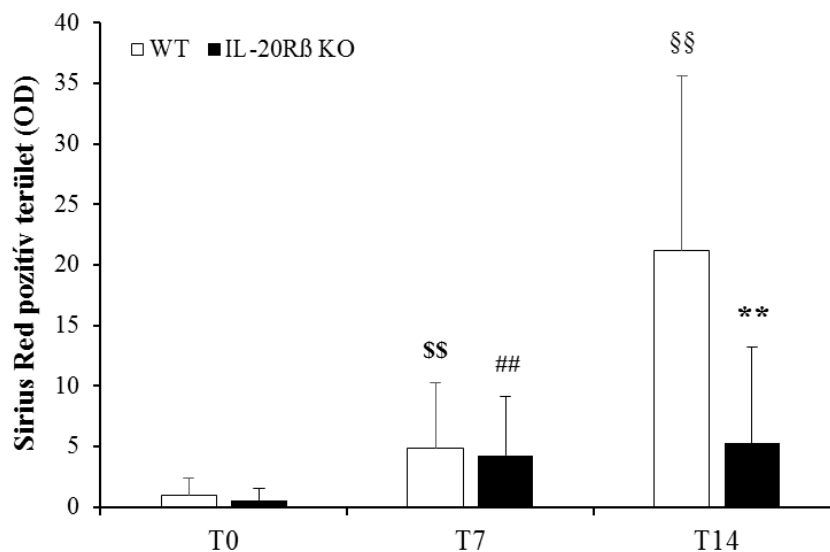


21. ábra. Az IL-20 citokin alcsalád expressziójának meghatározása valós idejű RT-PCR segítségével. Az IL-19 (A), IL-20 (B), IL-24 (C) valamint IL-20R β (D) mRNA szintjét meghatároztuk az egészséges kontroll (T0) valamint az UUO-t követő 7. (T7) és 14. (T14) napon a vett vesemintákban. A mérések során kapott mRNA expresszióra vonatkozó értékeket a mintákban található Glicerín – aldehid – 3 – foszfát – dehidrogenázra (GAPDH) normalizáltuk, majd az expressziós változásokat a kontroll mintákban mért expressziós értékek átlagára vonatkoztatva ábrázoltuk **p<0,01, T7-T14 vs. T0. *p<0,05 T14 vs. T0.

6.2.2 Szöveti kollagén lerakódás kimutatása Sirius-red festéssel

A fibrotikus folyamatok során lerakódott szöveti kollagén mennyiségét Sirius-Red festés segítségével határoztuk meg az UUO-t követő 7. és 14. napon vad típusú (WT) és IL-20R β KO állatok veséiben a kontroll vesék kollagén tartalmához képest (22. ábra). Eredményeink szerint az UUO-t követő 7. és 14. napon is jelentősen megemelkedik a lerakódott intersticiális kollagén mennyisége az UUO hatására. Továbbá az UUO-t követő 14. napon az IL-20R β KO állatok veséiben alacsonyabb a kollagén lerakódás mértéke a vad típusú állatokban mért értékekhez képest. A vad típusú és IL-20R β KO kontroll állatok veséiben valamint az UUO-t követő 7. napon vizsgált vad típusú és IL-20R β KO állatok veséiben a szöveti kollagén mennyiségében nem találtunk különbséget.

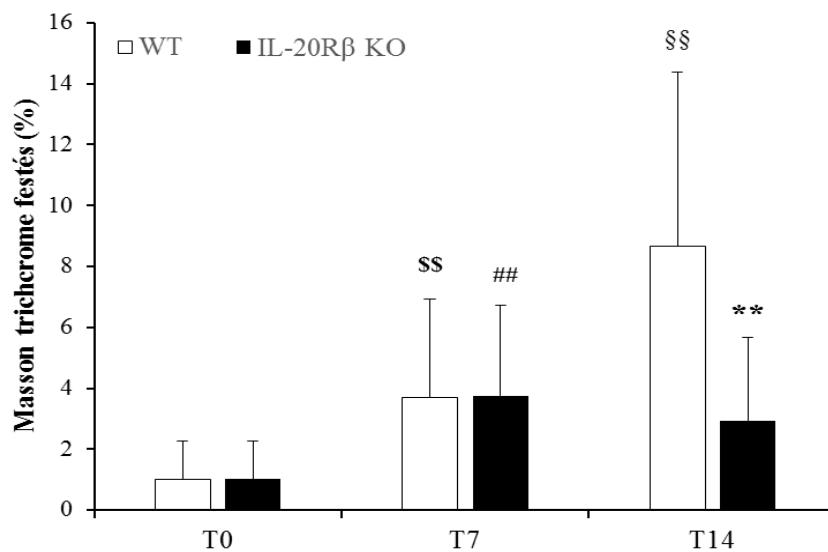
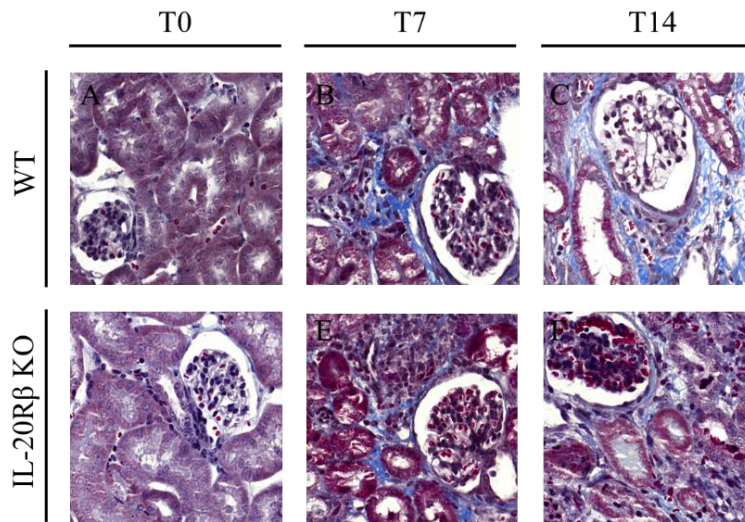




22. ábra. Szöveti kollagén kimutatása Sirius-red festéssel. Az interstíciumban lerakódott kollagének mennyiségét megvizsgáltuk kontroll (T0), valamint UUO-t követő 7. (T7) és 14. (T14) napon vad típusú (WT) és IL-20Rβ KO állatok veseszövetében. A szövettani metszetekből kiválasztott demonstratív képeken piros festődéssel láthatóak a kollagénrostok, a diagramon pedig a fibrózis szemikvantitatív analizisének eredménye látható. §§ $p < 0,01$, WT T0 vs. WT T7; ## $p < 0,01$, IL-20Rβ KO T0 vs. IL-20Rβ KO T7; §§ $p < 0,01$, WT T0 vs. WT T14; ** $p < 0,01$, WT T14 vs. IL-20Rβ KO T14.

6.2.3 Szöveti kollagén lerakódás kimutatása Masson festéssel

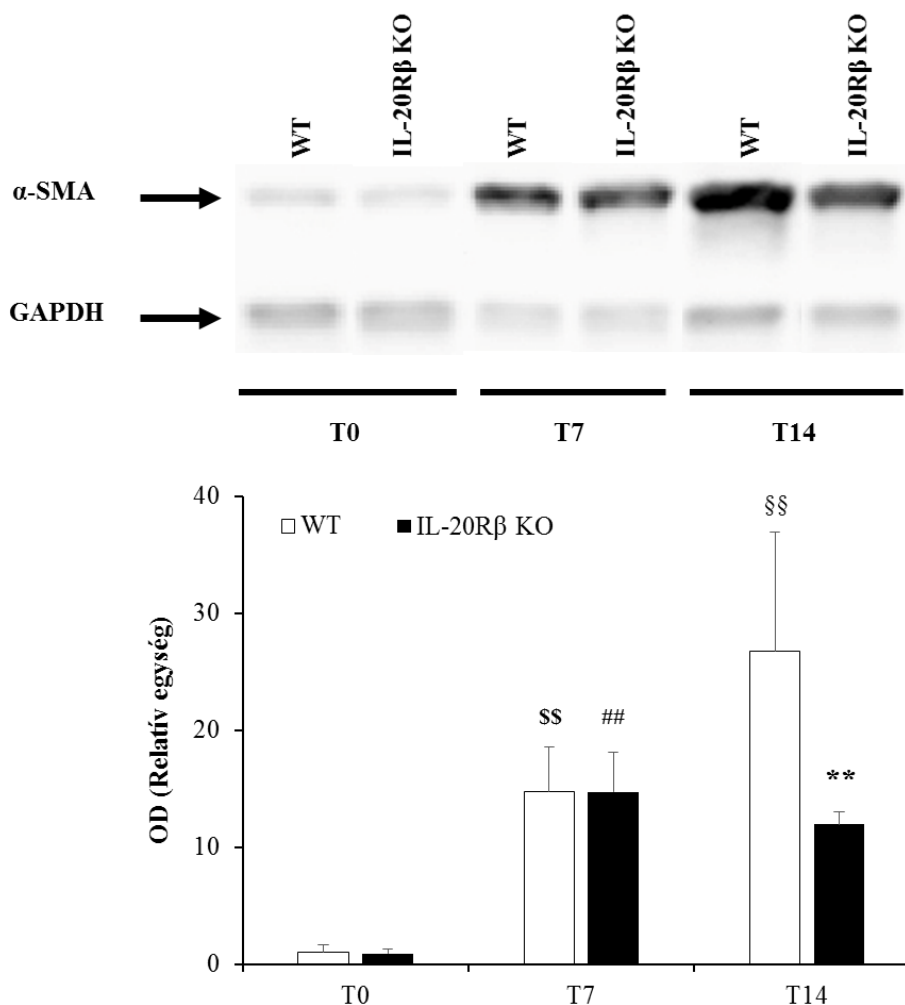
A fibrotikus folyamatok során lerakódott extracelluláris mennyiségét Masson festés segítségével határoztuk meg az UUO-t követő 7. és 14. napon vad típusú (WT) és IL-20Rβ KO állatok veséiben a kontroll vesék kollagén tartalmához képest (23. ábra). Eredményeink szerint az UUO-t követő 7. és 14. napon is jelentősen megemelkedik a lerakódott intersticiális kollagén mennyisége az UUO hatására. Továbbá az UUO-t követő 14. napon az IL-20Rβ KO állatok veséiben alacsonyabb a kollagénlerakódás mértéke a vad típusú állatokban mért értékekhez képest. A vad típusú és IL-20Rβ KO kontroll állatok veséiben valamint az UUO-t követő 7. napon vizsgált vad típusú és IL-20Rβ KO állatok veséiben nem találtunk szignifikánsan eltérő szöveti kollagén mennyiséget.



23. ábra. Az extracelluláris mátrix lerakódás kimutatása Masson festéssel. Az intersticiumban lerakódott kollagének mennyiségét megvizsgáltuk kontroll (T0), valamint UUO-t követő 7. (T7) és 14. (T14) napon vad típusú (WT) és IL-20R β KO állatok veseszövetében. A szövettani metszetekből kiválasztott demonstratív képeken kék festődéssel láthatóak a kollagénrostok, a diagramon pedig a fibrózis szemikvantitatív analízisének eredménye látható. $^{\$}$ p<0,01 WT T0 vs. WT T7; $^{\#}$ p<0,01 IL-20R β KO T0 vs. IL-20R β KO T7; § p<0,01 WT T0 vs. WT T14; ** p<0,01 WT T14 vs. IL-20R β KO T14.

6.2.4 A miofibroblasztok mennyiségének meghatározása

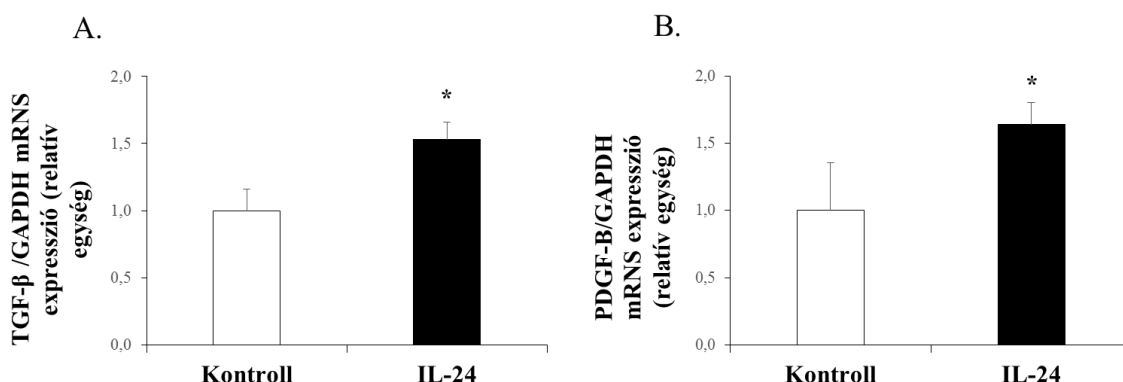
A miofibroblaszt marker α -SMA fehérje mennyiségét Western blot technika segítségével határoztuk meg az UUO-t követő 7. és 14. napon a vad típusú (WT) és IL-20R β KO állatok veséiben a kontroll vesék α -SMA tartalmához képest (24. ábra). Eredményeink szerint az UUO-t követő 7. és 14. napon is jelentősen megemelkedik az α -SMA mennyisége az UUO hatására. Továbbá az UUO-t követő 14. napon az IL-20R β KO állatok veséiben alacsonyabb az α -SMA fehérje mennyisége a vad típusú állatokban mért értékekhez képest. A vad típusú és IL-20R β KO kontroll állatok veséiben valamint az UUO-t követő 7. napon vizsgált vad típusú és IL-20R β KO állatok veséiben nem találtunk szignifikánsan eltérő α -SMA fehérje mennyiséget.



24. ábra. α -SMA fehérje expressziója meghatározása western-blot segítségével. A szöveti α -SMA fehérje mennyiségét megvizsgáltuk kontroll (T0), valamint UUO-t követő 7. (T7) és 14. (T14) napon vad típusú (WT) és IL-20R β KO állatok veseszövetében. A grafikon fölött a western-blot mérés során kapott fehérje csíkokból származó reprezentatív kép látható. $^{§§}p < 0,01$ WT T0 vs. WT T7; $^{###}p < 0,01$ IL-20R β KO T0 vs. IL-20R β KO T7; $^{§§}p < 0,01$ WT T0 vs. WT T14; $^{**}p < 0,01$ WT T14 vs. IL-20R β KO T14.

6.2.5 Az IL-24 hatása a HK-2 sejtek TGF- β és PDGF-B expressziójára

Valós idejű RT-PCR módszer segítségével meghatároztuk az IL-24 kezelés hatását a HK-2 humán proximális tubulus epitél sejt vonal TGF- β és PDGF-B termelésére (25. ábra). Az IL-24 kezelés fokozta a TGF- β , valamint PDGF-B expressziót a HK-2 sejtekben a kontrollként használt vehiculummal kezelt sejtekhez képest (25. ábra/A és B).

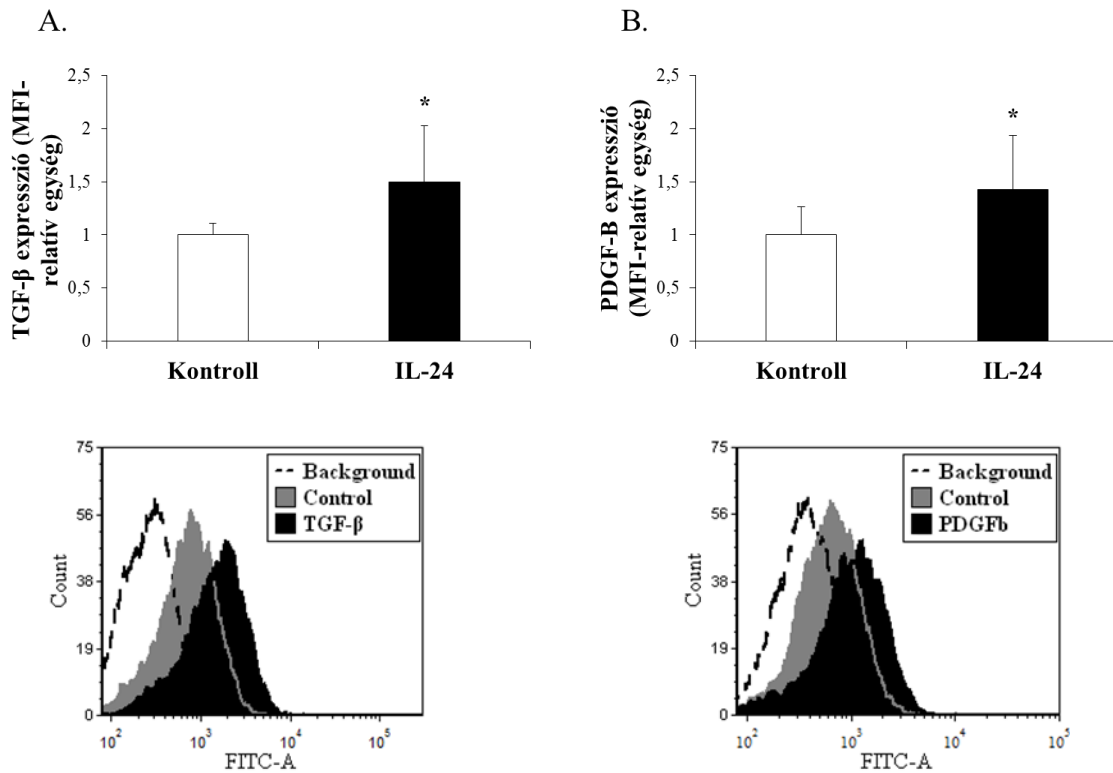


25. ábra. TGF- β (A), PDGF-B (B) mRNS expresszió meghatározás IL-24 kezelés hatására HK-2 vese tubulus epitél sejtekben RT-PCR segítségével. A mérések során kapott mRNS expresszióra vonatkozó értékeket a mintákban található glicerin – aldehid – 3 – foszfát – dehidrogenázra (GAPDH) normalizáltuk, majd az expressziós változásokat a kontroll mintákban mért expressziós értékek átlagára vonatkoztatva ábrázoltuk. $^{*}p < 0,05$ vs. Kontroll

6.2.6 Az IL-24 hatása a HK-2 sejtek TGF- β és PDGF-B fehérje termelésére

Áramlási citofluoriméter segítségével fehérje szinten is meghatároztuk az IL-24 kezelés hatását a HK-2 humán proximális tubulus epitél sejt vonal TGF- β és PDGF-B termelésére.

Az IL-24 kezelés szignifikánsan megemelte a TGF- β valamint a PDGF-B fehérje expressziót HK-2 sejtekben a kontrollként használt vehiculummal kezelt sejtekhez képest.



26. ábra. TGF- β (A), PDGF-B (B) fehérje expressziómeghatározás IL-24 kezelés hatására HK-2 vese tubulus epitél sejtekben RT-PCR segítségével. Az egyes kezelési csoportok (Kontroll, IL-24) mérése során kapott fluoreszcencia intenzitás értékek átlagát a kontroll mintákban mért expressziós értékek átlagára vonatkoztatva ábráztuk. Reprezentatív áramlás-citometriás mérés során kapott hisztogramok láthatóak a grafikonok alatt. * $p < 0,05$ vs. Kontroll

6.3 Az α -SMA valamint β -aktin specifikus detekciója fibrózis modellben

6.3.1 Specifikus egér α -SMA és β -aktin primerek tervezése

Az aktin izofomák nukleotid szekvenciája közötti 90%-os a homológia, miatt az izofomák mRNS szintű detektálása komoly metodikai kihívást jelent. A megfelelő specificitású α -SMA és β -aktin primerek megtervezéséhez meghatároztuk az aktin izofomák mRNS szekvenciájának azon régióit ahol a nukleotid sorrendben az elérhető legtöbb eltérés van majd ezekre a régiókra terveztünk primereket, így elkerülve a primerek aspecifikus keresztreakcióját az egyes izofomák között (27. ábra).

α -SMA	5'-TGTGGCCCTGAGGAGCATTCCGACA CTGCT ... TTGAGACCTTCAATGTCCCAGCCATGTAT-3'
β -aktin	5'-TGTGGCCCTGAGGAGCACCCCTGTCTGCT ... TTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTAC-3'
γ -cito-aktin	5'-TGTGGCTCCTGAGGAGCACCCGGTCTTCT ... TTGAGACCTTCAATACCCCAGCCATGTAC-3'
γ -simaizom-aktin	5'-AGTAGCACCAAGAGAGCACCCCACTGCT ... TCGAAGACCTTCAATGTCCCAGCCATGTAT-3'

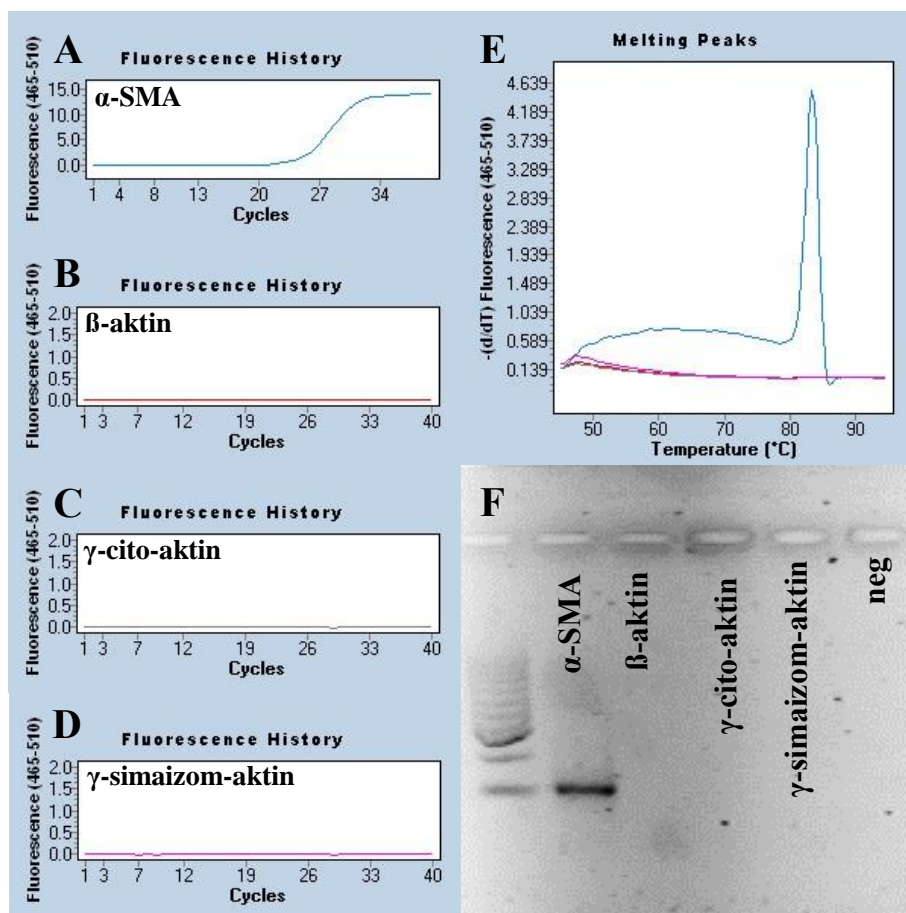
Az adott pozícióban, hány aktin izoforma tartalmazza ugyan azt a nukleotidot:



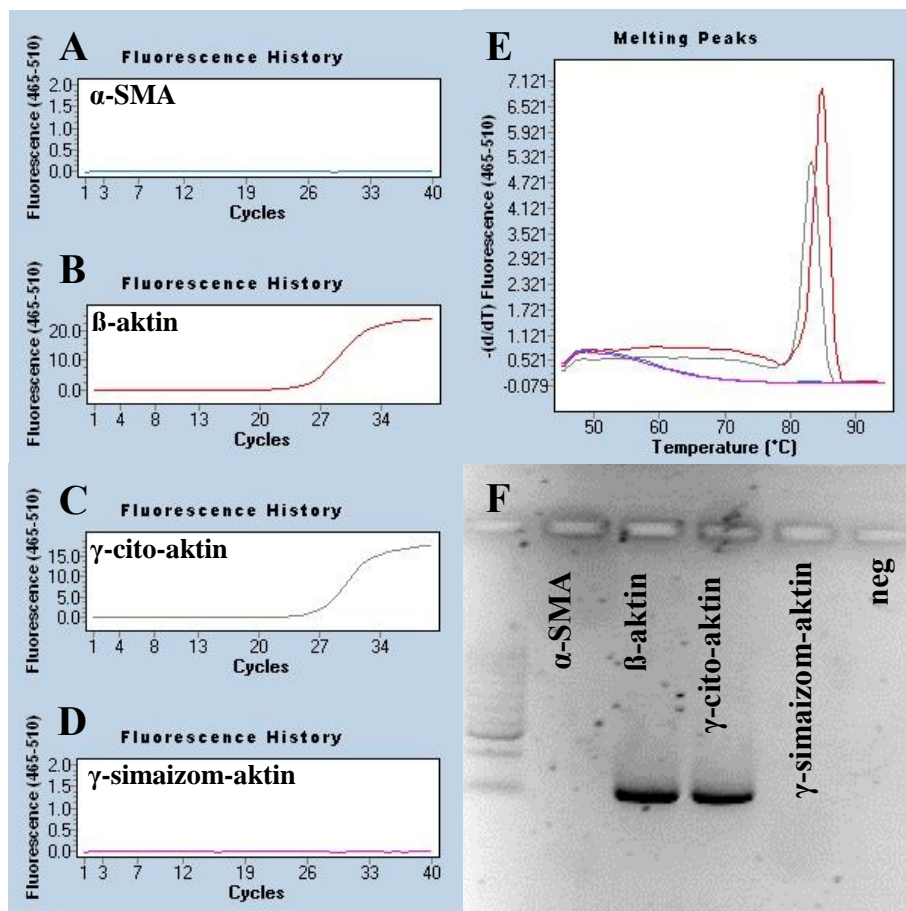
27. ábra. Az aktin izofomák nukleotid szekvencia hasonlóságát leíró hőtérkép. Az egyes színek a nukleotidok előfordulási gyakoriságát jelölik az aktin izofomák között. Azon nukleotidszekvencia szakaszokat melyekre a saját α -SMA és β -aktin primereinket terveztük piros négyzettel emeltük ki.

6.3.2 A saját tervezésű egér α -SMA és β -aktin primerek tesztelése

A saját tervezésű α -SMA és β -aktin primerek specificitásának ellenőrzéséhez mesterséges α -SMA, β -, γ -cito- valamint γ -simaizom-aktin oligonukleotid templátot használtunk (28-29. ábra). Az általunk tervezett α -SMA és β -aktin primerek használata specifikus termék amplifikációt eredményezett (28-29. ábra/A, B, C és D), melyet a képződött termékek melting analízise során kapott csúcs, valamint az agaróz gélen történő megfuttatás során kapott megfelelő bázispár magasságban elhelyezkedő sáv jelöl (28-29. ábra/E és F).



28. ábra. Reprezentatív valós idejű RT-PCR mérési ábra a saját tervezésű α -SMA primer specifikusságáról. A saját tervezésű α -SMA specifikus primer felamplifikálta az α -SMA-t a mesterséges egér α -SMA DNS templátról (A) de nem amplifikált felterméket a mesterséges β -, γ -cito- valamint γ -simaizom-aktin oligonukleotid templátról (B, C, E). A saját tervezésű α -SMA specifikus primer terméke egy diszkrét melting görbe csúcsot (E), valamint egy sávot (F) adott az agaróz gélelektroforézis során.



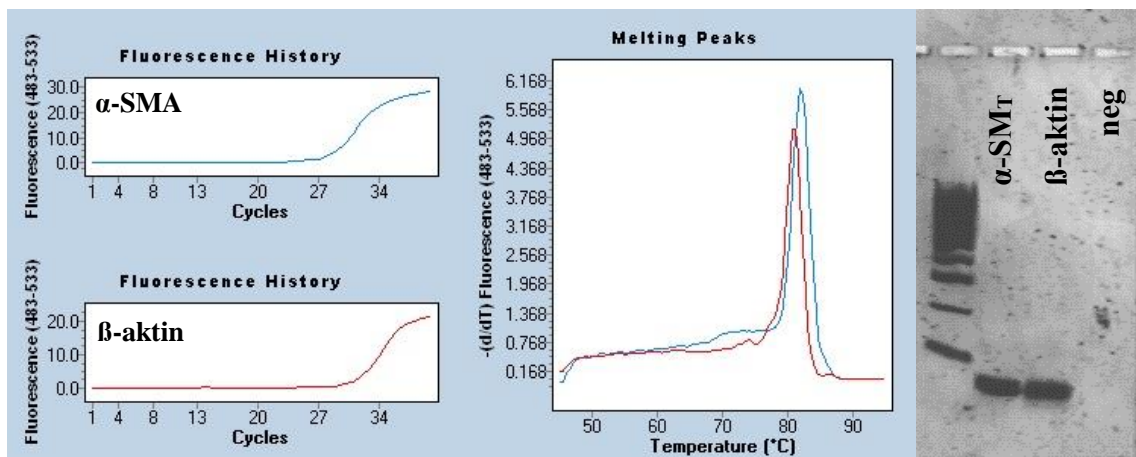
29. ábra. Reprezentatív valós idejű RT-PCR mérési ábra a saját tervezésű β -aktin primer specifikusságáról. A saját tervezésű β -aktin specifikus primer felamplifikálta az β -aktint a mesterséges egér β -aktin DNS templátról (A) de nem amplifikált fel terméket a mesterséges α -SMA valamint γ -simaizom-aktin oligonukleotid templátról (B, C, E). A saját tervezésű β -aktin specifikus primer terméke két melting görbe csúcsot (E), valamint egy-egy sávot (F) adott az agaróz gélelektroforézis során.

6.3.3 Korábban az irodalomban használt egér α -SMA és β -aktin primerek specifitásának vizsgálata

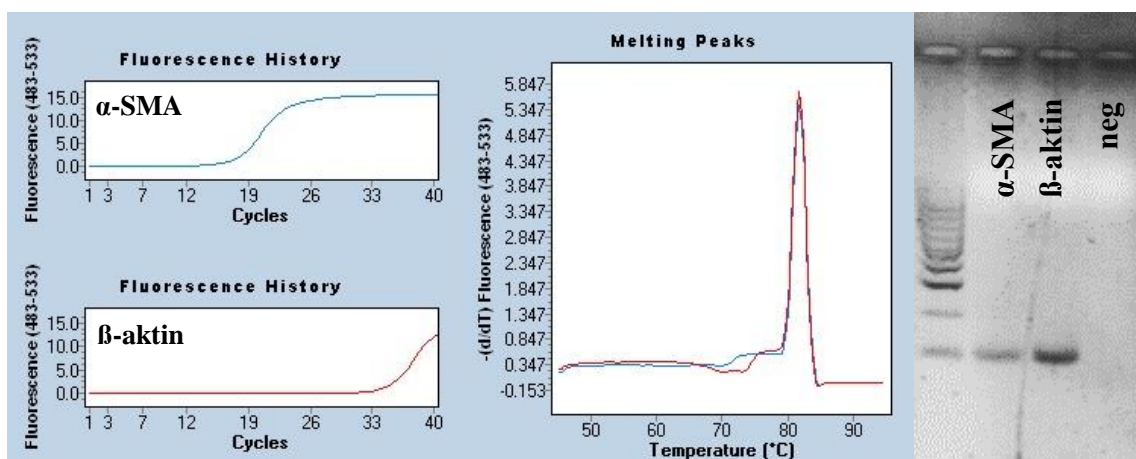
Az irodalomban használt primerek nukleotid szekvenciája jelentős komplementaritást mutat mind az α -SMA, mind a β -aktin kódoló régiójának nukleotid sorrendjével. Primer specifitást vizsgáló valós idejű RT-PCR méréseinkhez rangos nemzetközi folyóiratokból véletlenszerűen választottunk három α -SMA (α -SMA_{L1} α -SMA_{L2} α -SMA_{L3}) valamint három β -aktin (β -aktin_{L1} β -aktin_{L2} β -aktin_{L3}) primert (31-32. ábra).

Mesterséges, α -SMA-nak és β -aktinnak megfelelő DNS templát segítségével megvizsgáltuk az irodalmóból választott α -SMA és β -aktin primerek specifikusságát valós idejű RT-PCR reakciókban. Az irodalomból választott primerek a várakozásainknak megfelelően amplifikáltak a specifitásuknak megfelelő templátról terméküket, de különböző mértékben ugyan a nem specifitásuknak megfelelő templáttal is keresztreakciót mutattak, melyet a képződött termékek melting analízise során kapott csúcsok, valamint az agaróz gélen történő megfuttatás során kapott α -SMA és β -aktinnak megfelelő sávok is igazoltak. (31-32. ábra/A, B és C)

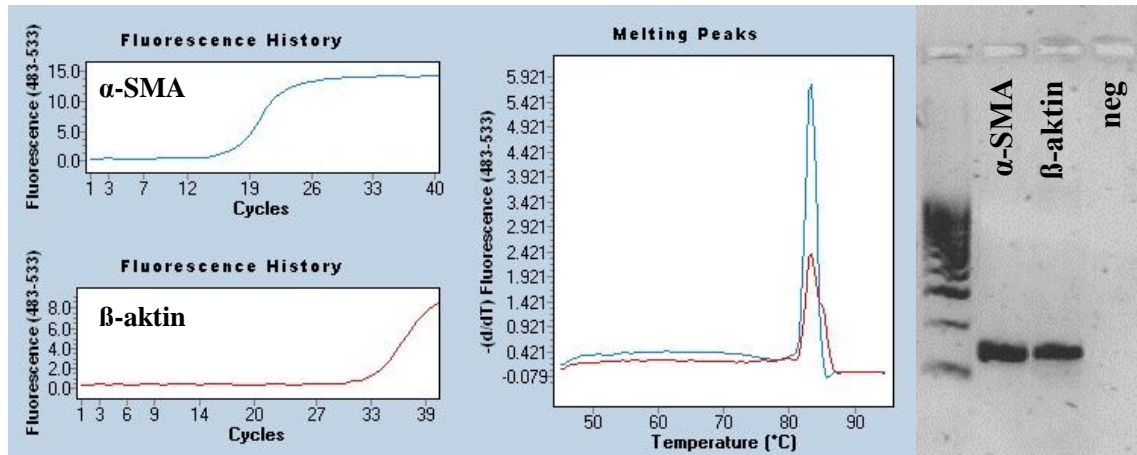
A. α -SMA_{L1}



B. α -SMA_{L2}

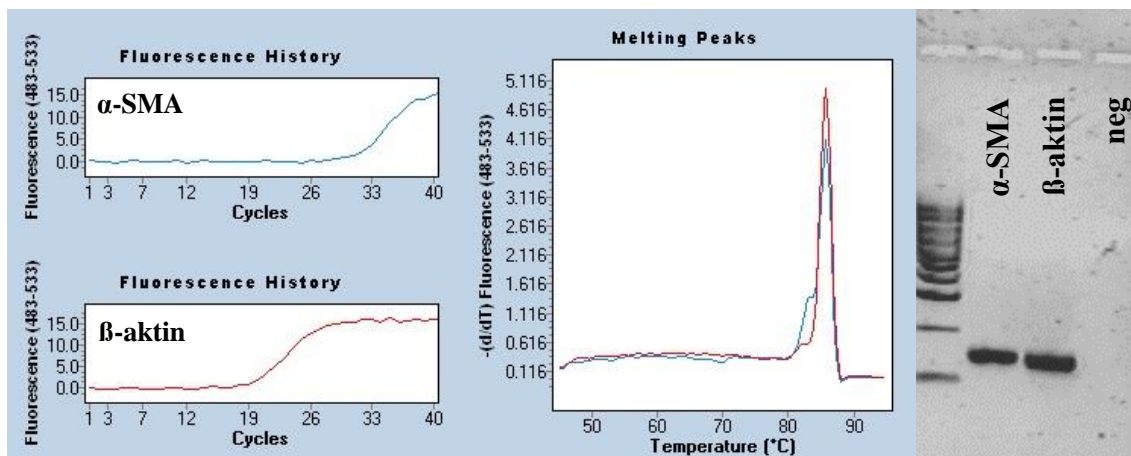


C. α -SMA_{L3}

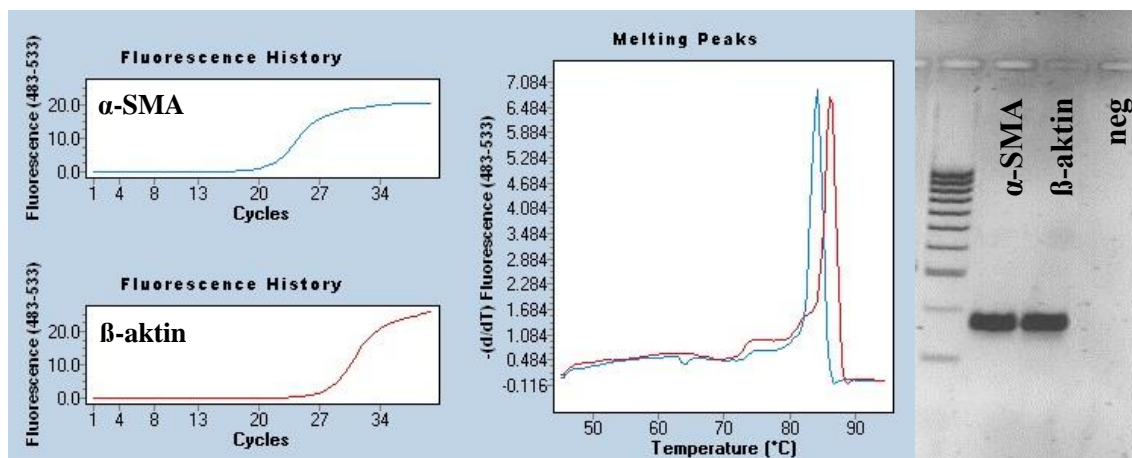


31. ábra. Reprezentatív real-time RT-PCR mérési ábra a szakirodalomban használt három különböző α -SMA primer specifikusságáról. Az irodalomban használt α -SMA_{L1} α -SMA_{L2} α -SMA_{L3} primerek a real-time RT-PCR reakciók során a mesterséges α -SMA DNS templátról minden esetben felamplifikálták a az α -SMA-t. Ezen reakciók egy melting csúcsot, valamint egy diszkrét, α -SMA-nak megfelelő bázispár magasságban elhelyezkedő sávot eredményeztek az agarózgélen (31. ábra/A, B, C). Továbbá az irodalomban használt α -SMA_{L1} α -SMA_{L2} α -SMA_{L3} primerek real-time RT-PCR vizsgálataink során a mesterséges, β -aktin szekvenciát tartalmazó DNS templátról szintén minden esetben felamplifikáltak terméket. Ezen reakciók is egy melting csúcsot, valamint egy diszkrét, α -SMA-nak megfelelő bázispár magasságban elhelyezkedő sávot eredményeztek az agarózgélen (31. ábra/A, B, C)

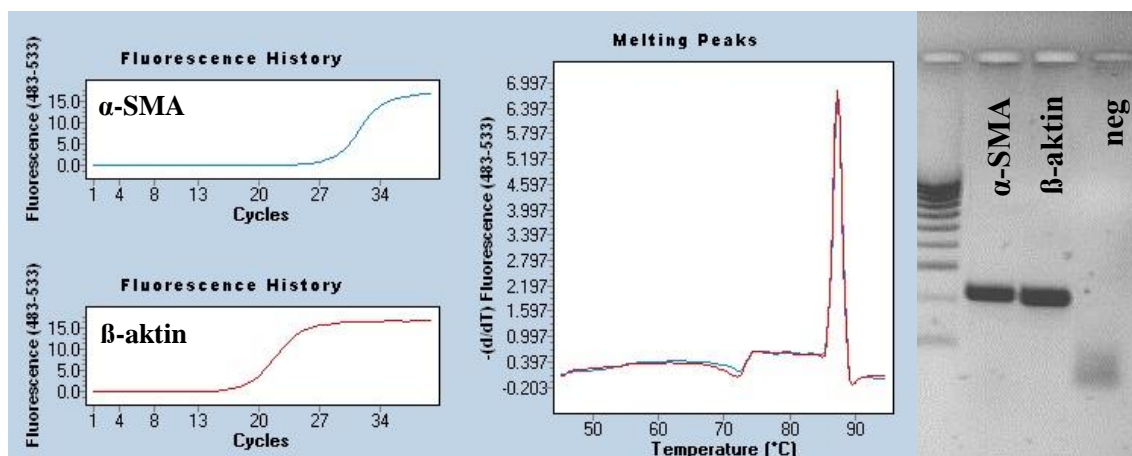
A. β -aktin_{L1}



B. β -aktin_{L2}



C. β -aktin_{L3}



32. ábra. Reprezentatív real-time RT-PCR mérési ábra a szakirodalomban használt három különböző β -aktin primer specifikusságáról. Az irodalomban használt β -aktin_{L1} β -aktin_{L2} β -aktin_{L3} primerek a real-time RT-PCR reakciók során a mesterséges α -SMA DNS templárról minden esetben felamplifikálták az α -SMA-t. Ezen reakciók egy melting csúcsot, valamint egy diszkrét, α -SMA-nak megfelelő bázispár magasságban elhelyezkedő sávot eredményeztek az agaróz gélen (32. ábra/A, B, C). Továbbá az irodalomban használt β -aktin_{L1} β -aktin_{L2} β -aktin_{L3} primerek real-time RT-PCR vizsgálataink során a mesterséges, β -aktin szekvenciát tartalmazó DNS templárról szintén minden esetben felamplifikáltak terméket. Ezen reakciók is egy melting csúcsot, valamint egy diszkrét, α -SMA-nak megfelelő bázispár magasságban elhelyezkedő sávot eredményeztek az agarózgélen(32. ábra/A, B, C)

7. MEGBESZÉLÉS

7.1 Kongenitális obstruktív nefropátia patomechanizmusának rendszerbiológiai szintű elemzése

A KON következtében kialakuló csökkent vesefunkció a gyermekkori krónikus vesebetegségek egyik vezető oka. A KON az egyik leggyakoribb veleszületett rendellenesség, melynek terápiája csak részben tekinthető megoldottnak, ezért fontos, hogy feltárjuk és megértsük azokat a molekuláris biológiai folyamatokat melyek a KON patomechanizmusában szerepet játszanak. Az elmúlt évtizedek egyik jelentős metodikai előrelépése a molekuláris biológiában a funkcionális genomikai elemzéseket lehetővé tevő microarray technika elterjedése volt. A microarray technika segítségével akár több ezer gén expressziójának egy időben történő vizsgálatára is lehetséges. A módszer segítségével lehetővé válik az egészséges, valamint beteg szövet génextpressziós mintázatainak összehasonlítása, ezáltal új, az adott betegségre jellemző potenciális target molekulák, és diagnosztikai markerek azonosítása [102]. Munkánk során microarray vizsgálat segítségével azonosítottuk azokat a géneket és molekuláris útvonalakat melyek szerepet játszanak a KON patomechanizmusában. Ehhez a KON nemzetközileg elfogadott állatmodelljét, uréter obstruált újszülött patkányokat használtunk.

A genomszintű analízisünk eredményei szerint UUO hatására az újszülött patkányok veséiben 880 gén expressziója változott meg. A kapott eredményeket további úgynevezett génontológiai analízisnek vetettük alá. A génontológia a géntermékek jellemzésének (úgynevezett GO terminusok, osztályok) ellenőrzött rendszere, melyben tájékoztatást kaphatunk a génekről kifejeződő fehérjék molekuláris funkciójáról, valamint a különböző biológiai folyamatokban való részvételéről. Továbbá megtudhatjuk azt is, hogy az adott fehérje (ha szerkezeti elemről van szó) milyen celluláris alkotórész kialakításában vesz részt. A microarray vizsgálatból származó adataink feldolgozása 114 génontológiai csoportot azonosított, melyből a hasonló jelentéstartalommal bíró csoportokat összevonva 86 reprezentatív terminust kaptunk. A kapott terminusokat osztályoztuk a biológiai funkcióik, molekuláris szerepük, valamint sejten belüli lokalizációjuk alapján. A beazonosított és csoportosított terminusok jellemzően a következő élettani folyamatokhoz tartoztak: immunválasz és kemotaxis, extracelluláris

mátrix reorganizáció és angiogenezis, továbbá sejtadhéziós folyamatok és apoptózis.

A microarray adatok elemzése során módunk van arra is, hogy a megváltozott expressziót mutató mRNS molekulákhoz hozzárendeljük az azokról transzláció során átíródó fehérjéket és elemezzük a fehérje-fehérje interakciós hálózatokat humán proteomikai adatbázisok (pl.: Ensembl Compara) segítségével. Ezzel a módszerrel lehetőségünk nyílt arra, hogy összehasonlítsuk a *Rattus norvegicus*-ban KON során aktiválódó jelátviteli útvonalakat, valamint az interakcióba lépő egyéb fehérjéket azok humán megfelelőivel. Az így kapott humán fehérjelistán úgynevezett hálózat elemzés végeztünk mely rámutatott, hogy az alábbi folyamatok aktiválódnak a KON patomechanizmusa során: természetes immunválasz, immunválaszhoz kötődő citokin jelátvitel, adaptív immunválasz, fehérje-ligandkötő receptorok, vérlemezke degranuláció, továbbá a citokin jelátvitel.

A microarray vizsgálatunk során kapott génexpressziós változások bioinformatikai elemzése tovább erősítette a hipotézist, miszerint a KON egy komplex betegség, mely patomechanizmusában a fejlődési rendellenesség által indukált krónikus gyulladás, lokális immunválasz, valamint tubuláris apoptózis hatására megnő a lerakódott extracelluláris mátrix mennyisége, melynek következtében fibrotikus folyamatok indulnak el a károsodott vesében [103]. A microarray adatok génontológiai, valamint fehérje interakciókat vizsgáló hálózat elemzése a vizsgáló szemléletétől teljesen függetlenül rávilágíthat fontos molekuláris kapcsolatokra, valamint a gráfelméleti és hálózat-topológiai ismeretek segítségével a patomechanizmus szempontjából fontos géneket jelölhet ki.

Eredményeinkkel összhangban, más kutatócsoport is kimutatta az immunfolyamatokhoz kapcsolódó gének fokozott expresszióját az obstrukciós inzultust elszenvedett vesékben. A vizsgálatainkban használt microarray chip (Affymetrix) detekciós spektruma 8 ezer génre terjedt ki szemben az általunk használt microarray chip-el (Agilent) mely a teljes patkány genomot, több mint 44 ezer gént képes egy időben vizsgálni. Vizsgálatainkban 250 gén expresszió változását tárták fel a KON során, de a megváltozott expressziót mutató gének funkcionális aktivitását, patomechanizmusban betöltött szerepét nem vizsgálták [104].

Microarray analízisünk kimutatta, hogy KON patomechanizmusa során a mátrixmetalloproteinázok családjába tartozó MMP-3,-7 és -12 expressziója a 10

legnagyobb mértékben emelkedett expressziójú gén között van. A vizsgálatunk eredményét erősíti, hogy egy másik kutatócsoport is emelkedett MMP-12 expressziót talált felnőtt állatokban az UUO-t követő 7. napon [105, 106]. Eredményeik szerint az UUO-n átesett felnőtt MMP-12 KO állatokban az MMP-12 nem a kollagén lerakódás szabályozásán keresztül vesz részt az obstruktív nefropátia patomechanizmusában. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy TGF- β [107, 108], a PDGF-B [109] valamint az oxidatív stressz [110] a fibrózis során végbemenő szöveti átrendeződés fő effektor és mediátor molekulái, továbbá leírt szerepük az MMP-1,-3 és -9 expressziójának szabályozásában [111-113]. Annak tisztázásához, hogy ezen profibrotikus faktorok (TGF- β , PDGF-B, oxidatív stressz) hogyan szabályozzák az MMP-12 expresszióját, *in vitro* kísérleteket végeztünk HEK-293 embrionális vese epitél sejteken, valamint HK-2 proximális tubulus epitél sejteken. Eredményeink szerint a PDGF-B (a HEK-293 sejtekben), valamint az oxidatív stressz fokozza a veseepitél sejt vonalak MMP-12 szintézisét, míg a TGF- β csökkentette. *In vivo*, valamint *in vitro* eredményeink alapján feltételezhető, hogy az MMP-12 emelkedett expressziójának a KON kialakulásának korai, immunsejtek által mediált, fokozott gyulladással, oxidatív stresszel és PDGF-B expresszióval jellemezhető fázisában lehet fontos szerepe. Amikor viszont az obstrukció indukálta gyulladás, valamint szöveti átépülés krónikussá válik és átvált TGF- β mediálta intenzív szöveti ECM lerakódásba, akkor csökken az MMP-12 expressziója (TGF- β hatására) így hozzájárulva, hogy a fokozott kollagén lerakódás károsítsa a vese normál struktúráját, kialakítva a krónikus vesebetegséget.

A jelentősen megemelkedett MMP-12 mRNS szint mellett az IL-20 citokin alcsoportba tartozó IL-19 és IL-24 expressziója is rendkívül markánsan megnőtt az UUO-t követően újszülött patkányok veséiben. Tudomásunk szerint elsőként írjuk le az irodalomban, hogy az IL-24 szintézise fokozódik a krónikus vesebetegséghez vezető patológiai folyamatok során, valamint szerepet játszhat a fibrótikus szöveti átrendeződésben. Nem található irodalmi adat arról sem, hogy a vesében milyen mechanizmusok szabályozzák az IL-24 citokin expresszióját ezért *in vitro* kísérletekben megvizsgáltuk, hogy a profibrotikus TGF- β , PDGF-B valamint az oxidatív stressz, hogyan befolyásolja a HEK-293, valamint HK-2 vese eredetű epitél sejtek IL-24 termelését. Eredményeink szerint, míg az oxidatív stressznek és a PDGF-B kezelésnek nem volt hatása az IL-24 expresszióra, addig a TGF- β egyfajta negatív regulátorként

(hasonlóan az MMP-12-re gyakorolt hatásához) gátolta az IL-24 expresszióját a vese tubulus epitél sejtekben. Az irodalomban szintén nem találtunk arra vonatkozó adatot, hogy az IL-24 milyen szerepet tölt be a különböző vesét érintő kórképek patomechanizmusában, ellenben ismert, hogy a különböző eredetű epitél sejtek jelentős mértékben expresszálják az IL-24 biológiai aktivitásáért felelős receptorkomplexeket, az IL-20R α /IL-20R β -t, valamint IL-22R α 1/IL-20R β -t [56]. Az IL-24 által kifejtett biológiai hatás a receptorkomplexéhez tartozó IL-20R β alegység expressziójától függ. Vizsgálataink szerint a HEK-293, valamint HK-2 sejtek expresszálják az IL-20R β receptor alegységet, mely alapján feltételezhető, hogy lokálisan a vese epitél sejtek célpontjai az IL-19 és IL-24 citokinnek. Korábban leírták, hogy az IL-24-nek szerepe lehet a természetes immunválasz aktiválódása során kialakuló gyulladás szabályozásában [114]. Megvizsgáltuk az IL-24 hatását olyan ismert, és KON patomechanizmusában szerepet játszó gyulladásos mediátorok szintézisére mint az IL-1 β , IL-6, valamint TNF- α [19]. Eredményeink alapján az IL-24 kezelés szignifikánsan csökkentette az HEK-293 sejtek IL-6 citokin termelését. Az IL-6 citokin az egyik legjelentősebb pro-inflammatorikus hatással bíró immunmoduláns, mely immunsejt differenciációt és akutfázis fehérje termelést kiváltó hatása révén iniciálja a gyulladásos folyamatokat [115]. Az HEK-293 sejtekben IL-24 kezelés következtében kialakult csökkent IL-6 expresszió arra utal, hogy az IL-24 jelenléte anti-inflammatorikus hatású az obstrukciós inzultust elszenvedett fejlődő vesében.

A microarray vizsgálataink alapján az MMP-3 és -7 az ureter obstrukciót követően a legnagyobb mértékben emelkedett expressziót mutató gének közé tartozott. Kevésbé ismertek azonban azok a regulációs mechanizmusok melyek ezen mátrixmetalloproteinázok szintézisét szabályozzák a vesét érintő gyulladásos, és fibrotikus folyamatokban. Mivel microarray analízisünk szerint az IL-24 expressziója nagymértékben megemelkedett az obstrukciót követően ezért megvizsgáltuk hatását az MMP-3, és -7 expressziójára vese epitél sejteken. Eredményeik szerint az IL-24 *in vitro* kezelés csökkentette az extracelluláris mátrix bontásában szerepet játszó [116] MMP-3 termelést mind a két sejtvonal esetében. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy az IL-24-nek szerepe lehet a szöveti átrendeződésben az MMP-3 szintjének regulálása által.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy bioinformatikai analízisünk által átfogóbb képet kaptunk azokról a génekről, valamint molekuláris útvonalakról

melyek szerepet játszhatnak a kongenitális obstruktív nefropátia patomechanizmusában. Az analízisünk által azonosított molekulák, úgy mint az MMP-3, -7,-12, valamint az IL-19 és IL-24 a későbbiekben akár diagnosztikai markerként is szolgálhatnak obstruktív nefropátia esetén. Eredményeink szintén rámutattak az IL-24 potenciális szerepére a KON-t kísérő gyulladáson, valamint szöveti átrendeződéssel járó folyamatokban.

7.2 Az IL-24 szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában

Az újszülött patkányokon végrehajtott, kongenitális obstruktív nefropátia patomechanizmusát tanulmányozó microarray mérésünk bioinformatikai elemzése rámutatott, hogy az UUO-t követően az IL-20 citokin alcsalád tag IL-19 és IL-24 expressziója jelentősen megemelkedik. Eredményeink alapján feltételeztük, hogy az IL-20 citokin alcsaládba tartozó IL-19, valamint IL-24 citokinnek szerepe lehet a különböző etiológiájú (pl. hipertónia, diabétesz mellitusz), jellemzően felnőtt korban kialakuló, KVB-hez vezető kórképek patomechanizmusában is. Az IL-24 akut és krónikus vesebetegségeken betöltött szerepéről nincs irodalmi adat. Ismert azonban, hogy megemelkedik expressziója bőrben sebgyógyulás során [68], valamint adenovirális overexpresszálása hatékonyan csökkenti a humán keloidszövetből izolált fibroblasztok proliferációját. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az IL-24-nek szerepe lehet a fibrótikus folyamatokat kísérő szöveti átrendeződésben[69]. Annak tisztázására, hogy az IL-20 citokin alcsalád tagjainak milyen szerepe van a krónikus vesebetegség patomechanizmusában, megvizsgáltuk az IL-19, -20, -24, valamint receptoruknak az IL-20R β -nak az expresszióját a vesefibrózis, valamint KVB unilaterális uréter obstrukció indukálta állatmodelljében.

Eredményeink szerint az obstrukciót követően jelentősen megemelkedett az IL-19 és IL-24 expressziója. Kiemelendő, hogy az IL-24 citokin mRNS szintje több százszorosára emelkedett a kontroll vesék értékeihez képest UUO-t követően. Eredményeink szerint az IL-20 citokin alcsalád biológiai aktivitásáért felelős receptor (IL-20R β) mennyisége is emelkedett volt az uréter obstrukcióját követően, mely a fokozott IL-19, valamint IL-24 expresszióval együtt arra utal, hogy az ezen citokinek direkt módon szerepet játszanak az a vesefibrózis patomechanizmusában.

A molekuláris biológiában mára bevett gyakorlattá vált az egyes gének, és a róluk

átíródo fehérjék funkciójának vizsgálatához a génkiütött állatok alkalmazása. Kutatócsoportunknak is lehetősége nyílt megvizsgálni, hogy az IL-19, -20 valamint IL-24 hiánya hogyan befolyásolja a vesefibrózis patomechanizmusában kiemelt szereppel bíró miofibroblasztok proliferációját, és extracelluláris mátrix termelését *in vivo*. Ehhez az UO-indukált vesefibrózis állatmodelljét alkalmaztuk IL-20R β KO egereken. Mivel ezekben a KO állatokban az IL-20R β nem expresszálódik, ezért mind az IL-20R α /IL20R β mind az IL-22R α /IL-20R β heterodimer receptor inaktív. A receptorokon keresztül ható IL-19,-20, valamint IL-24 citokin nem képes kifejteni biológiai aktivitását.

Uréter obstruált IL-20R β KO egerek segítségével megvizsgáltuk, hogy az IL-20R β hiánya hogyan befolyásolja a fibrózis során nagy mennyiségben képződő, a vese normál struktúráját, funkcióját irreverzibilis módon károsító extracelluláris mátrix lerakódás mértékét. Vizsgálataink szerint az IL-20R β KO egerekben kisebb mennyiségben volt jelen az UO indukálta kollagén lerakódás az obstrukciót követő 14. napon. Ezen eredményünk arra utal, hogy az IL-20 citokin alsalád tagjai hozzájárulnak a vesefibrózishoz vezető, fokozott mennyiségű kollagén lerakódás kialakulásához, biológiai aktivitásuk hiánya pedig direkt módon képes csökkenteni a kollagén lerakódás mértékét.

A vese tubulusokat alkotó epitél sejtek specifikus receptor expressziójuk miatt az IL-20 citokin alsalád célsejtjei [56], továbbá meghatározó szerepet játszanak a vesefibrózis patomechanizmusának szabályozásában gyulladásoos citokin, valamint kemokin termelésük révén [117]. A vesét érő sérülés hatására (pl.: obstruktív/diabéteszes nefropátia) a tubulus sejtek fokozott mértékben expresszálják a TGF- β , és PDGF-B növekedési faktort [118, 119] mely által hozzájárulnak a vesében fiziológiás körülmények között is megtalálható nyugvó fibroblasztok aktivációjához, α -SMA pozitív miofibroblaszttá történő differenciálódásához, valamint a miofibroblasztok proliferációjához. Az aktiválódott miofibroblasztok fokozott ECM termelése kulcsfontosságú lépés a KVB során kialakuló fibrotikus léziók, valamint kiterjedt kollagén depozitumok létrejöttében [120]. Az IL-24 citokin profibrotikus szerepét vizsgáló méréseink szerint az IL-24 kezelés szignifikánsan megemelte a tubulus epitél sejtek TGF- β valamint PDGF-B termelését. Ezen eredményeink magyarázatot adhatnak az IL-20R β KO állatokban tapasztalt csökkent mértékű fibrózisra. mivel az obstruált IL-20R β KO állatokban az IL-24 nem tudja kifejteni TGF- β és PDGF-B szintézist fokozó

hatását, ezáltal csökken a két molekula expressziója, melynek eredményeként pedig a szöveti kollagén lerakódás mértéke is mérséklődik.

Megvizsgáltuk, hogy az IL-19, -20 valamint IL-24 biológiai aktivitásának hiánya hogyan befolyásolja kollagén termelésért felelős α -SMA pozitív miofibroblasztok mennyiségét uréter obstrukciót követően. Eredményeink szerint az IL-20R β KO egerekben kisebb mennyiségben voltak jelen az α -SMA pozitív miofibroblasztok az obstrukciót követő 14. napon. Ezen eredményünk szintén magyarázatul szolgálhat az IL-20R β KO állatokban tapasztalt csökkent mértékű vesefibrózisra, hiszen ha kevesebb a kollagén termelésért felelős miofibroblasztok mennyisége (feltételezhetően a csökkent TGF- β és PDGF-B expresszió miatt) az eredményezhet alacsonyabb mértékű kollagén lerakódást az obstruált vesékben. Ezen méréseinket csak fehérje szinten végeztük el mivel az α -SMA mRNS szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat más aktin izofomák szekvenciájával. Ez a nagyfokú szekvencia hasonlóság jelentős körültekintést igényel a primer tervezés során, hogy elkerüljük az egyes aktin izofomák közötti detekciós keresztreakciót. (A disszertáció *Megbeszélés* fejezetének következő pontjában összefoglaljuk a metodikai probléma megoldása érdekében végzett vizsgálatainkat.)

Mivel az obstrukciós inzultuson átesett IL-20R β KO állatokban egyszerre érvényesül IL-19,-20, valamint IL-24 citokin biológiai aktivitásának hiánya, ezért további vizsgálatok szükségesek az IL-19, valamint IL-20 citokin szerepének pontos feltárásához, hiszen a citokin alcsalád többi tagja betölthet profibrotikus funkciót.

Vizsgálataink rámutattak, hogy az IL-20 citokin alcsalád fokozottan expresszálódik a fibrotikus folyamatokban, továbbá az alcsalád receptorának hiánya direkt módon befolyásolja a vesében található miofibroblasztok mennyiségét, valamint extracelluláris mátrix termelését *in vivo*, továbbá az IL-24 kezelés *in vitro* fokozza az epitél sejtek profibrotikus citokin termelését. Ereményeinket összefoglalva, kimutattuk (KON patomechanizmusát vizsgáló méréseinkkel összhangban) az IL-20 citokin alcsalád, valamint az IL-24 potenciális szerepét a vesefibrózis patomechanizmusában.

7.3 Az α -SMA specifikus detektálása fibrózis modellben

A különböző fibrotikus betegségek incidenciájának növekedésével párhuzamosan azon publikációk száma is folyamatosan emelkedik melyek a miofibroblasztok azonosítására, mennyiségük meghatározására az α -SMA molekulát használja biomarkerként [121]. A β -aktin molekuláris biológiai jelentősége szintén egyértelmű, hiszen háztartási génként vizsgálatok ezreiben használják a kapott eredmények normalizálásához. Az utóbbi években azonban egyre többször merül fel a gyanú, hogy nem teljesen megfelelő ilyen célra, mert expressziója a kísérlet körülményeitől függően változhat [38]. Ennek a háttérben feltételezésünk szerint az állhat, hogy bár az egyes aktin izoformákat különböző gének kódolják ezek mRNS, valamint aminosav szekvenciájának homológiája 90% fölötti. Ez a nagyfokú hasonlóság igazi metodikai kihívássá teszi az egyes aktin izoformák keresztreakció nélküli, specifikus detekcióját [37]. A kísérleteink α -SMA primer tervezési fázisában mi is szembesültünk ezzel a metodikai nehézséggel, de a vonatkozó szakirodalomban nem találtunk olyan vizsgálatot mely megoldást nyújtott volna a problémára, vagy egyáltalán foglalkozott volna vele. A specifikus PCR primerek tervezése során kritikus pont a primerek 3' végének lokalizációja. A polimeráz enzim, mely az új DNS szál felépítését végzi 5'-3' irányban halad, ezért fontos, hogy elkerüljük a bázis különbségeket a primerek 3' vége és a DNS templát között, mert csak így jöhet létre megfelelő primer anelláció, és specifikus PCR termék [122, 123]. A fentieket figyelembe véve primer tervezésünk során nagy gondot fordítottunk arra, hogy az α -SMA és β -aktin primereink 3' vége olyan szekvencia részhez kapcsolódjon az mRNS molekulákon mely az aktin izoformák között a legtöbb lehetséges szekvencia különbséget tartalmazza.

Első lépésként valós idejű RT-PCR módszer segítségével megvizsgáltuk az általunk tervezett egér α -SMA és β -aktin primerek specificitását *in vitro* körülmények között. Ezen méréseinkhez mesterségesen szintetizált egér α -SMA, β -aktin, γ -cito aktin, valamint γ -simaizom aktin génfragmensek szolgáltak templátként, így lefedve azon géneket, melyek nagyfokú hasonlósága miatt keresztreakció jöhet létre a PCR reakciók során. Az általunk tervezett egér α -SMA primer a hozzá tartozó mesterséges α -SMA templáton az olvadáspont analízis alapján csak egy terméket (olvadáspont csúcsot) amplifikált, valamint a termék gélelektroforézises elválasztása is csak egy, megfelelő hosszúságú terméket mutatott ki. Az egér β -aktin primerünk a mesterséges β -aktin

templát mellett a mesterséges γ -cito aktin templátról is amplifikált terméket. Ennek a keresztreakciónak a biológiai jelentősége csekély, mivel mind a két gént háztartási génként tartják számon.

Annak igazolására, hogy a nem kellő körültekintéssel megtervezett egér α -SMA és β -aktin mRNS-re specifikus primerek mérési pontatlanságot okozhatnak, valamint még a szakterületükön vezető szerepet betöltő tudományos folyóiratok sem fordítanak a problémára kellő figyelmet, véletlenszerűen kiválasztottunk 3 különböző α -SMA és β -aktin primert neves folyóiratok már megjelent közleményeiből. A kiválasztott primereknek megvizsgáltuk a specificitását *in vitro* körülmények között. Mivel a primerek specificitásának egyik fontos tényezője a megfelelően megválasztott anellációs hőmérséklet, ezért az irodalomból választott primerek esetében primertervező szoftver segítségével kiszámoltuk az egyes primerekhez tartozó optimális anellációs hőfokokat. Eredményeink szerint különböző mértékben ugyan, de mind a három neves szakfolyóiratból választott primer képes volt amplifikálni, mind az α -SMA-t, mind pedig a β -aktint, a templátként használt az α -SMA, valamint β -aktin mesterséges oligókról az optimális (valamint az attól eltérő (± 2 °C)) anellációs hőmérsékleteken. Az általunk tervezett α -SMA és β -aktin primerekkel ellentétben az irodalmi α -SMA és β -aktin primerek mind az α -SMA mind a β -aktin mesterséges templátokon az olvadáspont analízis alapján két terméket (olvadáspont csúcsot) amplifikáltak fel, valamint a termékek gélelektroforézises elválasztása két, α -SMA-nak és β -aktinnak megfelelő hosszúságú terméket mutatott ki. Ezen valós idejű RT-PCR méréseink igazolták azon feltételezésünket, hogy a véletlenszerűen kiválasztott irodalmi egér α -SMA primer aspecifikusan bekötődhet, és amplifikálhatja a β -aktinnak megfelelő szekvenciájú mRNS molekulákat. Ezt az aspecifikus keresztreakciót az irodalmi β -aktin primerek esetében is kimutattuk, így kísérletes eredményekkel is igazolni tudtuk, hogy az általunk felvetett metodikai probléma létezik, és még a neves folyóiratok sem fordítanak kellő figyelmet az elkerülésére. Az valós idejű RT-PCR méréseikhez α -SMA, valamint β -aktin primerek használó kutatócsoportok feltételezhetően nincsenek is tisztában a probléma létezésével, ezért jóhiszeműen használják az interneten elérhető primertervező programok (pl.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) által automatikusan tervezett, de éppen ezért nem teljesen specifikus primereket.

A rágcsálókban UUO-val történő vesefibrózis indukció az egyik legtöbbet

vizsgált, legjobban leírt állatmodellje a humán krónikus vesebetegségnek. Számos kísérletben igazolták, hogy az α -SMA molekula mennyisége mind mRNS mind pedig fehérje szinten megemelkedik az állatmodellben obstrukció hatására. A modellben az általunk tervezett primer segítségével valóban specifikus módon lehet vizsgálni az α -SMA molekula expresszióját, ezáltal meghatározva a vesefibrózis effektor sejteinek számító miofibroblasztok mennyiségét.

Munkánk során (figyelembe véve az aktin izoformák közötti jelentős mRNS szekvencia hasonlóságot) egy olyan specifikus, valós idejű polimeráz láncreakció metódust dolgoztunk ki, mely a többi aktin izoformától elkülöníthető módon képes detektálni az egér α -SMA mRNS molekula mennyiségét. Továbbá eredményeink rávilágítanak arra, hogy a nem kellő körültekintéssel megtervezett egér α -SMA, valamint β -aktin primerek mérési pontatlanságot okozhatnak bizonyos kísérleti rendszerekben. Ilyen lehetnek a fibrózis patomechanizmusát vizsgáló állatmodellek, ahol a nem specifikus β -aktin primerek keresztreakciók miatt tévesen kimutathatják a nagy mennyiségben jelenlévő α -SMA mRNS molekulákat is.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

PhD munkám célja a kongenitális obstruktív nefropátia valamint a vesefibrózis patomechanizmusában szerepet játszó molekulárisbiológiai folyamatok jelenlegi ismereteinknél pontosabb feltárása, detektálása volt patkány valamint egér állatmodellek segítségével. Eredményeink alapján elmondható:

- 1, Microarray vizsgálataink eredményeként kimutattuk, hogy 880 gén expressziója változik meg szignifikánsan kongenitális obstruktív nefropátia során.
- 2, Elemzésünk rávilágított, hogy ezen gének jellemzően a szöveti átrendeződés, immunhomeosztázis, valamint a krónikus gyulladás folyamataihoz kapcsolhatóak.
- 3, A mátrix metalloproteinázok közé tartozó MMP-3,-7 és 12, valamint az IL-20 citokin családba sorolható IL-19, és IL-24 renális expressziója uréter obstrukciót követően a legnagyobb mértékben változó molekulák között van.
- 4, Az IL-24-nek szerepe lehet az MMP-3 és IL-6 expressziójának szabályozásában kongenitális obstruktív nefropátiában.
- 5, Microarray adatainkkal összhangban kimutattuk, hogy az IL-20 citokin alcsalád tag IL-19, valamint IL-24, valamint receptoruk mennyisége uréter obstrukciót követően szignifikánsan megemelkedik a fibrotikus vesében.
- 6, A vad típusú állatokban tapasztaltakhoz képest az IL-20R β KO egerekben csökkent mértékű volt a miofibroblasztok mennyisége valamint a szöveti kollagén lerakódás az uréter obstrukciót követően.
- 7, A vese epitél sejtek IL-24 kezelése fokozta azok profibrotikus TGF- β és PDGF-B molekula expresszióját.
- 8, Kifejlesztettünk egy olyan valós idejű RT-PCR módszert mely specifikusan képes detektálni az egér α -SMA mRNS molekulát, továbbá igazoltuk, hogy a nem megfelelően megtervezett β -aktinra specifikus primerek amplifikálhatják az α -SMA mRNS molekulákat is, ezáltal torzíthatják a mérési eredményeket.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A krónikus vesebetegség gyakorisága világszerte 8-16%, mely gyors ütemben növekszik. Az egyértelmű klinikai szükség ellenére sincs olyan elfogadott terápia, ami alkalmas lenne a vesefibrózis kezelésére. PhD munkám célja ezért a KVE-hez vezető kongenitális obstruktív nefropátia valamint a vesefibrózis patomechanizmusában szerepet játszó molekuláris biológiai folyamatok és markerek jelenlegi ismereteinknél pontosabb feltárása, detektálása volt.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy microarray analízisünk által átfogóbb képet kaptunk azokról a génekről, valamint molekuláris útvonalokról melyek szerepet játszhatnak a kongenitális obstruktív nefropátia patomechanizmusában. A microarray elemzésünk által azonosított molekulák, úgy mint az MMP-3, -7, -12, valamint az IL-19 és IL-24. Kimutattuk, hogy az IL-24 szerepet játszhat KON-t következőben kialakuló gyulladásban és szöveti átrendeződésben. A vizsgálataink során azonosított molekulák a későbbiekben akár diagnosztikai markerként, vagy terápiás célpontként is szolgálhatnak.

A vesefibrózis patomechanizmusával kapcsolatos vizsgálataink rámutattak, hogy az IL-20 citokin alcsalád (IL-19,-20,-24) fokozottan expresszálódik a vese fibrotikus folyamataiban valamint, az alcsalád receptorának hiánya direkt módon befolyásolja a miofibroblasztok mennyiségét, valamint extracelluláris mátrix termelését. Ez a hatás eredményeink szerint az IL-24 veseepitel sejteken indukált fokozott TGF- β és PDGF-B citokin termelés által valósul meg. Eredményeink rámutattak, hogy az IL-24-nek szerepe lehet a kongenitális obstruktív nefropátia, valamint a vesefibrózis pathomechanizmusában.

Vizsgálataink felhívták a figyelmet a körültekintő primer tervezés fontosságára az egér α -SMA és β -aktin mRNS szintet vizsgáló PCR reakciók során. Munkánk során valóban specifikus primert alkottunk az α -SMA megfelelő detekciójához. Továbbá igazoltuk, hogy az irodalomban használt, nem megfelelően tervezett egér α -SMA és β -aktin primerek aspecifikus keresztreakcióik által torzíthatják a mérési eredményeket, mely jelenség magyarázatot adhatnak arra, hogy miért változik mRNS szinten a β -aktin mennyisége bizonyos kísérleti rendszerekben.

10. SUMMARY

The prevalence of chronic kidney disease (CKD) is estimated to be 8-16% worldwide, and their number is rapidly increasing. The pathomechanism of CKD is still poorly understood however, irrespectively of their etiology it always have an inflammatory component, which shows strong correlation with the progression of renal fibrosis and the decline of renal function. Despite the obvious medical demand there is neither a generally accepted effective drug to treat or hinder kidney fibrosis. In my PhD thesis I investigated the molecular pathways and mechanisms and markers involved in the patomechanism of congenital obstructive nephropathy and kidney fibrosis.

Our data provide a bioinformatics analysis of differentially expressed genes and molecular pathways potentially involved in the pathophysiology of CON thus contributing to the better understanding of the underlying molecular mechanisms. The differentially expressed genes including MMP-3, -7 and -12 or IL-19 and -24 have the potential to be used as targets for early diagnosis and treatment of CON.

We found elevated level of IL-20 cytokine subfamily (IL-19,-20,-24) members in the fibrotic kidney. Moreover, we demonstrated that lack of the IL-20 subfamily receptor resulted in decreased number of myofibroblast, and directly influence the ECM production in the obstructed kidney. Furthermore, we found that IL-24 increases the TGF- β and PDGF-B production of renal epithelial cells. Our results revealed the potencial role of IL-24 in the patomechanism of congenital obstructive nephropathy and kidney fibrosis.

In summary, our experimental results raise awareness to the importance of proper α -SMA and β -actin primer design RT-PCR reactions. Our results indicate that the use of improperly designed literary primer pairs significantly affect the results of PCRs measuring mRNA expression of α -SMA or β -actin isoforms in fibrotic diseases. We developed a set of carefully designed primer pair to selectively determine the expression of mouse α -SMA isoform. Our data could explain the apparent expressional variability of the housekeeping gene β -actin observed in several experiments.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Jha, V., G. Garcia-Garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, A.Y. Wang, and C.W. Yang, (2013) Chronic kidney disease: global dimension and perspectives, *Lancet*. 382(9888): p. 260-72.
2. Coresh, J., E. Selvin, L.A. Stevens, J. Manzi, J.W. Kusek, P. Eggers, F. Van Lente, and A.S. Levey, (2007) Prevalence of chronic kidney disease in the United States, *JAMA*. 298(17): p. 2038-47.
3. Sharma, S.K., H. Zou, A. Togtokh, B. Ene-Iordache, S. Carminati, A. Remuzzi, N. Wiebe, B. Ayyalasomayajula, N. Perico, G. Remuzzi, and M. Tonelli, (2010) Burden of CKD, proteinuria, and cardiovascular risk among Chinese, Mongolian, and Nepalese participants in the International Society of Nephrology screening programs, *Am J Kidney Dis*. 56(5): p. 915-27.
4. Liu, Y., (2006) Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics, *Kidney Int*. 69(2): p. 213-7.
5. Chung, A.C. and H.Y. Lan, (2011) Chemokines in renal injury, *J Am Soc Nephrol*. 22(5): p. 802-9.
6. Vielhauer, V., O. Kulkarni, C.A. Reichel, and H.J. Anders, (2010) Targeting the recruitment of monocytes and macrophages in renal disease, *Semin Nephrol*. 30(3): p. 318-33.
7. Ricardo, S.D., H. van Goor, and A.A. Eddy, (2008) Macrophage diversity in renal injury and repair, *J Clin Invest*. 118(11): p. 3522-30.
8. Wynn, T.A., (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis, *J Pathol*. 214(2): p. 199-210.
9. Tomasek, J.J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R.A. Brown, (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(5): p. 349-63.
10. Latella, G., J. Di Gregorio, V. Flati, F. Rieder, and I.C. Lawrance, (2015) Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD, *Scand J Gastroenterol*. 50(1): p. 53-65.

11. Benfield, M.R., R.A. McDonald, S. Bartosh, P.L. Ho, and W. Harmon, (2003) Changing trends in pediatric transplantation: 2001 Annual Report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study, *Pediatr Transplant*. 7(4): p. 321-35.
12. Chang, C.P., B.W. McDill, J.R. Neilson, H.E. Joist, J.A. Epstein, G.R. Crabtree, and F. Chen, (2004) Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery, *J Clin Invest*. 113(7): p. 1051-8.
13. Chevalier, R.L., (2015) Congenital urinary tract obstruction: the long view, *Adv Chronic Kidney Dis*. 22(4): p. 312-9.
14. Peters, C.A., (2001) Animal models of fetal renal disease, *Prenat Diagn*. 21(11): p. 917-23.
15. Yang, H.C., Y. Zuo, and A.B. Fogo, (2010) Models of chronic kidney disease, *Drug Discov Today Dis Models*. 7(1-2): p. 13-19.
16. Chevalier, R.L., (2008) Chronic partial ureteral obstruction and the developing kidney, *Pediatr Radiol*. 38(1): p. 11.
17. Chevalier, R.L., M.S. Forbes, and B.A. Thornhill, (2009) Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy, *Kidney Int*. 75(11): p. 1145-52.
18. Peters, C.A., (1997) Obstruction of the fetal urinary tract, *J Am Soc Nephrol*. 8(4): p. 653-63.
19. Simoes e Silva, A.C., F.C. Valerio, M.A. Vasconcelos, D.M. Miranda, and E.A. Oliveira, (2013) Interactions between cytokines, congenital anomalies of kidney and urinary tract and chronic kidney disease, *Clin Dev Immunol*. 597920(10): p. 26.
20. Ingraham, S.E., M. Saha, A.R. Carpenter, M. Robinson, I. Ismail, S. Singh, D. Hains, M.L. Robinson, D.A. Hirselj, S.A. Koff, C.M. Bates, and K.M. McHugh, (2010) Pathogenesis of renal injury in the megabladder mouse: a genetic model of congenital obstructive nephropathy, *Pediatr Res*. 68(6): p. 500-7.
21. Meran, S. and R. Steadman, (2011) Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis, *Int J Exp Pathol*. 92(3): p. 158-67.
22. Vaughan, M.B., E.W. Howard, and J.J. Tomasek, (2000) Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast, *Exp Cell Res*. 257(1): p. 180-9.

23. Eyden, B., (2008) The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine, *J Cell Mol Med.* 12(1): p. 22-37.
24. Bainbridge, P., (2013) Wound healing and the role of fibroblasts, *J Wound Care.* 22(8): p. 407-8.
25. Iwano, M., D. Plieth, T.M. Danoff, C. Xue, H. Okada, and E.G. Neilson, (2002) Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis, *J Clin Invest.* 110(3): p. 341-50.
26. Li, J., J.A. Deane, N.V. Campanale, J.F. Bertram, and S.D. Ricardo, (2007) The contribution of bone marrow-derived cells to the development of renal interstitial fibrosis, *Stem Cells.* 25(3): p. 697-706.
27. Zeisberg, M. and R. Kalluri, (2004) The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis, *J Mol Med.* 82(3): p. 175-81.
28. Broekema, M., M.C. Harmsen, M.J. van Luyn, J.A. Koerts, A.H. Petersen, T.G. van Kooten, H. van Goor, G. Navis, and E.R. Popa, (2007) Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats, *J Am Soc Nephrol.* 18(1): p. 165-75.
29. Li, J., X. Qu, and J.F. Bertram, (2009) Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice, *Am J Pathol.* 175(4): p. 1380-8.
30. Iwabu, A., K. Smith, F.D. Allen, D.A. Lauffenburger, and A. Wells, (2004) Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C delta-dependent pathway, *J Biol Chem.* 279(15): p. 14551-60.
31. Ren, S. and J.S. Duffield, (2013) Pericytes in kidney fibrosis, *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 22(4): p. 471-80.
32. Osterreicher, C.H., M. Penz-Osterreicher, S.I. Grivennikov, M. Guma, E.K. Koltsova, C. Datz, R. Sasik, G. Hardiman, M. Karin, and D.A. Brenner, (2011) Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(1): p. 308-13.
33. Gabbiani, G., (1992) The biology of the myofibroblast, *Kidney Int.* 41(3): p. 530-2.

34. Hinz, B., (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair, *J Invest Dermatol.* 127(3): p. 526-37.
35. Lemoinne, S., A. Cadoret, H. El Mourabit, D. Thabut, and C. Housset, (2013) Origins and functions of liver myofibroblasts, *Biochim Biophys Acta.* 7: p. 948-54.
36. Dominguez, R. and K.C. Holmes, (2011) Actin structure and function, *Annu Rev Biophys.* 40: p. 169-86.
37. Perrin, B.J. and J.M. Ervasti, (2010) The actin gene family: function follows isoform, *Cytoskeleton.* 67(10): p. 630-4.
38. Lin, J. and C. Redies, (2012) Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression, *Dev Genes Evol.* 222(6): p. 369-76.
39. Chuang, L.Y., Y.H. Cheng, and C.H. Yang, (2013) Specific primer design for the polymerase chain reaction, *Biotechnol Lett.* 35(10): p. 1541-9.
40. Assoian, R.K., A. Komoriya, C.A. Meyers, D.M. Miller, and M.B. Sporn, (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization, *J Biol Chem.* 258(11): p. 7155-60.
41. Ikushima, H. and K. Miyazono, (2010) TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression, *Nat Rev Cancer.* 10(6): p. 415-24.
42. Yamamoto, T., T. Nakamura, N.A. Noble, E. Ruoslahti, and W.A. Border, (1993) Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(5): p. 1814-8.
43. Eddy, A.A., (2000) Molecular basis of renal fibrosis, *Pediatr Nephrol.* 15(3-4): p. 290-301.
44. Verrecchia, F. and A. Mauviel, (2007) Transforming growth factor-beta and fibrosis, *World J Gastroenterol.* 13(22): p. 3056-62.
45. Finnsen, K.W., S. McLean, G.M. Di Guglielmo, and A. Philip, Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013 Jun;2(5):195-214.
46. Horbelt, D., A. Denkis, and P. Knaus, (2012) A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters, *Int J Biochem Cell Biol.* 44(3): p. 469-74.

47. Paul, D., A. Lipton, and I. Klinger, (1971) Serum factor requirements of normal and simian virus 40-transformed 3T3 mouse fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(3): p. 645-52.
48. Demoulin, J.B. and A. Essagher, (2014) PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells, *Cytokine Growth Factor Rev.* 25(3): p. 273-83.
49. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz, (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine, *Genes Dev.* 22(10): p. 1276-312.
50. Floege, J., F. Eitner, and C.E. Alpers, (2008) A new look at platelet-derived growth factor in renal disease, *J Am Soc Nephrol.* 19(1): p. 12-23.
51. Tang, W.W., T.R. Ulich, D.L. Lacey, D.C. Hill, M. Qi, S.A. Kaufman, G.Y. Van, J.E. Tarpley, and J.S. Yee, (1996) Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis, *Am J Pathol.* 148(4): p. 1169-80.
52. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, (2005) Mitochondria, oxidants, and aging, *Cell.* 120(4): p. 483-95.
53. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol Rev.* 59(3): p. 527-605.
54. Ozbek, E., (2012) Induction of oxidative stress in kidney, *Int J Nephrol.* 465897(10): p. 17.
55. Nie, J. and F.F. Hou, (2012) Role of reactive oxygen species in the renal fibrosis, *Chin Med J.* 125(14): p. 2598-602.
56. Rutz, S., X. Wang, and W. Ouyang, (2014) The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis, *Nat Rev Immunol.* 14(12): p. 783-95.
57. Sziksz, E., D. Pap, R. Lippai, N.J. Beres, A. Fekete, A.J. Szabo, and A. Vannay, (2015) Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family, *Mediators Inflamm.* 764641(10): p. 24.
58. Wang, M. and P. Liang, (2005) Interleukin-24 and its receptors, *Immunology.* 114(2): p. 166-70.
59. O'Shea, J.J. and P.J. Murray, (2008) Cytokine signaling modules in inflammatory responses, *Immunity.* 28(4): p. 477-87.
60. Parrish-Novak, J., W. Xu, T. Brender, L. Yao, C. Jones, J. West, C. Brandt, L. Jelinek, K. Madden, P.A. McKernan, D.C. Foster, S. Jaspers, and Y.A. Chandrasekher,

- (2002) Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions, *J Biol Chem.* 277(49): p. 47517-23.
61. Wolk, K., S. Kunz, K. Asadullah, and R. Sabat, (2002) Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?, *J Immunol.* 168(11): p. 5397-402.
62. He, M. and P. Liang, (2010) IL-24 transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22, and IL-24 in the epidermis, *J Immunol.* 184(4): p. 1793-8.
63. Wolk, K., H.S. Haugen, W. Xu, E. Witte, K. Waggie, M. Anderson, E. Vom Baur, K. Witte, K. Warszawska, S. Philipp, C. Johnson-Leger, H.D. Volk, W. Sterry, and R. Sabat, (2009) IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not, *J Mol Med.* 87(5): p. 523-36.
64. Kragstrup, T.W., K. Otkjaer, C. Holm, A. Jorgensen, M. Hokland, L. Iversen, and B. Deleuran, (2008) The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis, *Cytokine.* 41(1): p. 16-23.
65. Andoh, A., M. Shioya, A. Nishida, S. Bamba, T. Tsujikawa, S. Kim-Mitsuyama, and Y. Fujiyama, (2009) Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease, *J Immunol.* 183(1): p. 687-95.
66. Jennings, P., D. Crean, L. Aschauer, A. Limonciel, K. Moenks, G. Kern, P. Hewitt, K. Lhotta, A. Lukas, A. Wilmes, and M.O. Leonard, (2015) Interleukin-19 as a translational indicator of renal injury, *Arch Toxicol.* 89(1): p. 101-6.
67. Wei, C.C., H.H. Li, Y.H. Hsu, C.H. Hsing, J.M. Sung, and M.S. Chang, (2008) Interleukin-20 targets renal cells and is associated with chronic kidney disease, *Biochem Biophys Res Commun.* 374(3): p. 448-53.
68. Soo, C., W.W. Shaw, E. Freymiller, M.T. Longaker, C.N. Bertolami, R. Chiu, A. Tieu, and K. Ting, (1999) Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7, *J Cell Biochem.* 74(1): p. 1-10.
69. Liang, J., R.L. Huang, Q. Huang, Z. Peng, P.H. Zhang, and Z.X. Wu, (2011) Adenovirus-mediated human interleukin 24 (MDA-7/IL-24) selectively suppresses proliferation and induces apoptosis in keloid fibroblasts, *Ann Plast Surg.* 66(6): p. 660-6.

70. Kreis, S., D. Philippidou, C. Margue, and I. Behrmann, (2008) IL-24: a classic cytokine and/or a potential cure for cancer?, *J Cell Mol Med.* 12(6A): p. 2505-10.
71. Chada, S., R.B. Sutton, S. Ekmekcioglu, J. Ellerhorst, J.B. Mumm, W.W. Leitner, H.Y. Yang, A.A. Sahin, K.K. Hunt, K.L. Fuson, N. Poindexter, J.A. Roth, R. Ramesh, E.A. Grimm, and A.M. Mhashilkar, (2004) MDA-7/IL-24 is a unique cytokine--tumor suppressor in the IL-10 family, *Int Immunopharmacol.* 4(5): p. 649-67.
72. Stephen-Victor, E., H. Fickenscher, and J. Bayry, (2016) IL-26: An Emerging Proinflammatory Member of the IL-10 Cytokine Family with Multifaceted Actions in Antiviral, Antimicrobial, and Autoimmune Responses, *PLoS Pathog.* 12(6).
73. Hsu, Y.H., H.H. Li, J.M. Sung, W.T. Chen, Y.C. Hou, and M.S. Chang, (2013) Interleukin-19 mediates tissue damage in murine ischemic acute kidney injury, *PLoS One.* 8(2): p. e56028.
74. Yamamoto-Furusho, J.K., E. Alvarez-Leon, J.M. Fragoso, A. Gozalishvilli, M. Vallejo, and G. Vargas-Alarcon, (2011) Protective role of interleukin-19 gene polymorphisms in patients with ulcerative colitis, *Hum Immunol.* 72(11): p. 1029-32.
75. Azuma, Y.T., Y. Matsuo, M. Kuwamura, G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, H. Nakajima, M. Karow, and T. Takeuchi, (2010) Interleukin-19 protects mice from innate-mediated colonic inflammation, *Inflamm Bowel Dis.* 16(6): p. 1017-28.
76. Fonseca-Camarillo, G., J. Furuzawa-Carballeda, L. Llorente, and J.K. Yamamoto-Furusho, (2013) IL-10-- and IL-20--expressing epithelial and inflammatory cells are increased in patients with ulcerative colitis, *J Clin Immunol.* 33(3): p. 640-8.
77. Chiu, Y.S., C.C. Wei, Y.J. Lin, Y.H. Hsu, and M.S. Chang, (2014) IL-20 and IL-20R1 antibodies protect against liver fibrosis, *Hepatology.* 60(3): p. 1003-14.
78. Fonseca-Camarillo, G., J. Furuzawa-Carballeda, J. Granados, and J.K. Yamamoto-Furusho, (2014) Expression of interleukin (IL)-19 and IL-24 in inflammatory bowel disease patients: a cross-sectional study, *Clin Exp Immunol.* 177(1): p. 64-75.
79. Gill, S.E. and W.C. Parks, (2008) Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing, *Int J Biochem Cell Biol.* 40(6-7): p. 1334-47.
80. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease, *Nat Med.* 18(7): p. 1028-40.

81. Hadler-Olsen, E., B. Fadnes, I. Sylte, L. Uhlin-Hansen, and J.O. Winberg, (2011) Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease, *Febs J.* 278(1): p. 28-45.
82. Gill, S.E., S.Y. Kassim, T.P. Birkland, and W.C. Parks, (2010) Mouse models of MMP and TIMP function, *Methods Mol Biol.* 622: p. 31-52.
83. Brew, K. and H. Nagase, (2010) The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity, *Biochim Biophys Acta.* 1: p. 55-71.
84. Tan, T.K., G. Zheng, T.T. Hsu, S.R. Lee, J. Zhang, Y. Zhao, X. Tian, Y. Wang, Y.M. Wang, Q. Cao, V.W. Lee, C. Wang, D. Zheng, S.I. Alexander, E. Thompson, and D.C. Harris, (2013) Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage, *Lab Invest.* 93(4): p. 434-49.
85. Wang, X., Y. Zhou, R. Tan, M. Xiong, W. He, L. Fang, P. Wen, L. Jiang, and J. Yang, (2010) Mice lacking the matrix metalloproteinase-9 gene reduce renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy, *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(5): p. 15.
86. Tveitaras, M.K., T. Skogstrand, S. Leh, F. Helle, B.M. Iversen, C. Chatziantoniou, R.K. Reed, and M. Hultstrom, (2015) Matrix Metalloproteinase-2 Knockout and Heterozygote Mice Are Protected from Hydronephrosis and Kidney Fibrosis after Unilateral Ureteral Obstruction, *PLoS One.* 10(12).
87. Zeisberg, M., M. Khurana, V.H. Rao, D. Cosgrove, J.P. Rougier, M.C. Werner, C.F. Shield, 3rd, Z. Werb, and R. Kalluri, (2006) Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease, *PLoS Med.* 3(4): p. 7.
88. Oelusz, A., L.A. Nichols, E.A. Grunz-Borgmann, G. Chen, A.D. Akintola, J.M. Catania, R.C. Burghardt, J.P. Trzeciakowski, and A.R. Parrish, (2013) Overexpression of MMP-7 Increases Collagen 1A2 in the Aging Kidney, *Physiol Rep.* 1(5).
89. Churg, A., R. Wang, X. Wang, P.O. Onnervik, K. Thim, and J.L. Wright, (2007) Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs, *Thorax.* 62(8): p. 706-13.
90. Pellicoro, A., R.L. Aucott, P. Ramachandran, A.J. Robson, J.A. Fallowfield, V.K. Snowden, S.N. Hartland, M. Vernon, J.S. Duffield, R.C. Benyon, S.J. Forbes, and J.P.

Iredale, (2012) Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis, *Hepatology*. 55(6): p. 1965-75.

91. Degrell, P., J. Cseh, M. Mohás, G.A. Molnár, L. Pajor, J.C. Chatham, N. Fülöp, and I. Wittmann, (2009) Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy, *Life Sci*. 84(13-14): p. 389-93.

92. Banki, N.F., A. Ver, L.J. Wagner, A. Vannay, P. Degrell, A. Prokai, R. Gellai, L. Lenart, D.N. Szakal, E. Kenesei, K. Rosta, G. Reusz, A.J. Szabo, T. Tulassay, C. Baylis, and A. Fekete, (2012) Aldosterone antagonists in monotherapy are protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats, *PLoS One*. 7(6): p. e39938.

93. Strippoli, G.F., S. Di Paolo, R. Cincione, A.M. Di Palma, A. Teutonico, G. Grandaliano, F.P. Schena, and L. Gesualdo, (2003) Clinical and therapeutic aspects of diabetic nephropathy, *J Nephrol*. 16(4): p. 487-99.

94. Ohkubo, Y., H. Kishikawa, E. Araki, T. Miyata, S. Isami, S. Motoyoshi, Y. Kojima, N. Furuyoshi, and M. Shichiri, (1995) Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study, *Diabetes Res Clin Pract*. 28(2): p. 103-17.

95. Bechtel, W., S. McGoohan, E.M. Zeisberg, G.A. Muller, H. Kalbacher, D.J. Salant, C.A. Muller, R. Kalluri, and M. Zeisberg, (2010) Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney, *Nat Med*. 16(5): p. 544-50.

96. Zeisberg, E.M., O. Tarnavski, M. Zeisberg, A.L. Dorfman, J.R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W.T. Pu, A.B. Roberts, E.G. Neilson, M.H. Sayegh, S. Izumo, and R. Kalluri, (2007) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis, *Nat Med*. 13(8): p. 952-61.

97. Henderson, N.C., T.D. Arnold, Y. Katamura, M.M. Giacomini, J.D. Rodriguez, J.H. McCarty, A. Pellicoro, E. Raschperger, C. Betsholtz, P.G. Ruminiski, D.W. Griggs, M.J. Prinsen, J.J. Maher, J.P. Iredale, A. Lacy-Hulbert, R.H. Adams, and D. Sheppard, (2013) Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs, *Nat Med*. 19(12): p. 1617-24.

98. Hecker, L., R. Vittal, T. Jones, R. Jagirdar, T.R. Luckhardt, J.C. Horowitz, S. Pennathur, F.J. Martinez, and V.J. Thannickal, (2009) NADPH oxidase-4 mediates

myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury, *Nat Med.* 15(9): p. 1077-81.

99. Hao, S., W. He, Y. Li, H. Ding, Y. Hou, J. Nie, F.F. Hou, M. Kahn, and Y. Liu, (2011) Targeted inhibition of beta-catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis, *J Am Soc Nephrol.* 22(9): p. 1642-53.

100. LeBleu, V.S., G. Taduri, J. O'Connell, Y. Teng, V.G. Cooke, C. Woda, H. Sugimoto, and R. Kalluri, (2013) Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis, *Nat Med.* 19(8): p. 1047-53.

101. Zeybel, M., T. Hardy, Y.K. Wong, J.C. Mathers, C.R. Fox, A. Gackowska, F. Oakley, A.D. Burt, C.L. Wilson, Q.M. Anstee, M.J. Barter, S. Masson, A.M. Elsharkawy, D.A. Mann, and J. Mann, (2012) Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response, *Nat Med.* 18(9): p. 1369-77.

102. Szabó, P.M., A mellékvesekéreg-daganatok molekuláris patogenezisének vizsgálata- Doktori értekezés, Semmelweis Egyetem.

103. Ingraham, S.E. and K.M. McHugh, (2011) Current perspectives on congenital obstructive nephropathy, *Pediatr Nephrol.* 26(9): p. 1453-61.

104. Silverstein, D.M., B.R. Travis, B.A. Thornhill, J.S. Schurr, J.K. Kolls, J.C. Leung, and R.L. Chevalier, (2003) Altered expression of immune modulator and structural genes in neonatal unilateral ureteral obstruction, *Kidney Int.* 64(1): p. 25-35.

105. Abraham, A.P., F.Y. Ma, W.R. Mulley, E. Ozols, and D.J. Nikolic-Paterson, (2012) Macrophage infiltration and renal damage are independent of matrix metalloproteinase 12 in the obstructed kidney, *Nephrology.* 17(4): p. 322-9.

106. Summers, S.A., P.Y. Gan, L. Dewage, F.T. Ma, J.D. Ooi, K.M. O'Sullivan, D.J. Nikolic-Paterson, A.R. Kitching, and S.R. Holdsworth, (2012) Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction, *Kidney Int.* 82(6): p. 676-85.

107. Pilmore, H.L., Y. Yan, J.M. Eris, A. Hennessy, G.W. McCaughan, and G.A. Bishop, (2002) Time course of upregulation of fibrogenic growth factors and cellular infiltration in a rodent model of chronic renal allograft rejection, *Transpl Immunol.* 10(4): p. 245-54.

108. Bottinger, E.P. and M. Bitzer, (2002) TGF-beta signaling in renal disease, *J Am Soc Nephrol.* 13(10): p. 2600-10.

109. Chen, Y.T., F.C. Chang, C.F. Wu, Y.H. Chou, H.L. Hsu, W.C. Chiang, J. Shen, Y.M. Chen, K.D. Wu, T.J. Tsai, J.S. Duffield, and S.L. Lin, (2011) Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis, *Kidney Int.* 80(11): p. 1170-81.
110. Kim, J., Y.M. Seok, K.J. Jung, and K.M. Park, (2009) Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice, *Am J Physiol Renal Physiol.* 297(2): p. 20.
111. Kim, E.S., Y.W. Sohn, and A. Moon, (2007) TGF-beta-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells, *Cancer Lett.* 252(1): p. 147-56.
112. Behzadian, M.A., X.L. Wang, L.J. Windsor, N. Ghaly, and R.B. Caldwell, (2001) TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(3): p. 853-9.
113. Alge-Priglinger, C.S., T. Kreuzer, K. Obholzer, A. Wolf, M. Mempel, M. Kernt, A. Kampik, and S.G. Priglinger, (2009) Oxidative stress-mediated induction of MMP-1 and MMP-3 in human RPE cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50(11): p. 5495-503.
114. Myles, I.A., N.M. Fontecilla, P.A. Valdez, P.J. Vithayathil, S. Naik, Y. Belkaid, W. Ouyang, and S.K. Datta, (2013) Signaling via the IL-20 receptor inhibits cutaneous production of IL-1beta and IL-17A to promote infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Nat Immunol.* 14(8): p. 804-11.
115. Stenvinkel, P., M. Ketteler, R.J. Johnson, B. Lindholm, R. Pecoits-Filho, M. Riella, O. Heimbürger, T. Cederholm, and M. Girndt, (2005) IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly, *Kidney Int.* 67(4): p. 1216-33.
116. Ye, S., P. Eriksson, A. Hamsten, M. Kurkinen, S.E. Humphries, and A.M. Henney, (1996) Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression, *J Biol Chem.* 271(22): p. 13055-60.
117. de Haij, S., A.M. Woltman, A.C. Bakker, M.R. Daha, and C. van Kooten, (2002) Production of inflammatory mediators by renal epithelial cells is insensitive to glucocorticoids, *Br J Pharmacol.* 137(2): p. 197-204.

118. Fraser, D., N. Brunskill, T. Ito, and A. Phillips, (2003) Long-term exposure of proximal tubular epithelial cells to glucose induces transforming growth factor-beta 1 synthesis via an autocrine PDGF loop, *Am J Pathol.* 163(6): p. 2565-74.
119. Geng, H., R. Lan, P.K. Singha, A. Gilchrist, P.H. Weinreb, S.M. Violette, J.M. Weinberg, P. Saikumar, and M.A. Venkatachalam, (2012) Lysophosphatidic acid increases proximal tubule cell secretion of profibrotic cytokines PDGF-B and CTGF through LPA2- and Galphaq-mediated Rho and alphavbeta6 integrin-dependent activation of TGF-beta, *Am J Pathol.* 181(4): p. 1236-49.
120. Mack, M. and M. Yanagita, (2015) Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis, *Kidney Int.* 87(2): p. 297-307.
121. Hinz, B., (2016) Myofibroblasts, *Exp Eye Res.* 142: p. 56-70.
122. Dieffenbach, C.W., T.M. Lowe, and G.S. Dveksler, (1993) General concepts for PCR primer design, *PCR Methods Appl.* 3(3): p. S30-7.
123. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, *Nat Protoc.* 1(3): p. 1559-82.

12. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Pap D, Sziksz E, Kiss Z, Rokonay R, Veres-Szekely A, Lippai R, Takacs IM, Kis E, Fekete A, Reusz G, (2017) Microarray Analysis Reveals Increased Expression of Matrix Metalloproteases and Cytokines of Interleukin-20 Subfamily in the Kidneys of Neonate Rats Underwent Unilateral Ureteral Obstruction: A Potential Role of IL-24 in the Regulation of Inflammation and Tissue Remodeling *Kidney Blood Press Res.* 42(1): p. 16-32. (IF:2.908)

Veres-Szekely A, Pap D*, Sziksz E, Javorszky E, Rokonay R, Lippai R, Tory K, Fekete A, Tulassay T, Szabo AJ, (2017) Selective measurement of alpha smooth muscle actin: why beta-actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs, *BMC Mol Biol.* 18(1): p. 017-0089. (IF:2.500)

*Megosztott elsőszerző

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények:

Muranyi J, Gyulavari P, Varga A, Bokonyi G, Tanai H, Vantus T, Pap D, Ludanyi K, Mezo G, Keri G, (2016) Synthesis, characterization and systematic comparison of FITC-labelled GnRH-I, -II and -III analogues on various tumour cells, *J Pept Sci.* 22(8): p. 552-60. (IF: 1,951)

Csohany R, Prokai A, Sziksz E, Balicza-Himer L, Pap D, Kosik A, Sugar D, Vannay A, Kis-Petik K, Fekete A, (2016) Sex differences in renin response and changes of capillary diameters after renal ischemia/reperfusion injury, *Pediatr Transplant.* 20(5): p. 619-26. (IF: 1,284)

Prokai A, Csohany R, Sziksz E, Pap D, Balicza-Himer L, Boros S, Magda B, Vannay A, Kis-Petik K, Fekete A, (2016) Calcineurin-inhibition Results in Upregulation of Local Renin and Subsequent Vascular Endothelial Growth Factor Production in Renal Collecting Ducts, *Transplantation.* 100(2): p. 325-333. (IF: 3,690)

Sziksz E, Pap D, Lippai R, Beres NJ, Fekete A, Szabo AJ, Vannay A, (2015) Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family, Mediators Inflamm. 764641(10): p. 24. (IF: 3,283)

Sziksz, E., Molnár, K., Lippai, R., Pap, D., Ónody, A., Veres-Székely, A., ... & Tulassay, T. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease. Virchows Archiv, 465(4), 385-393. (IF: 2,544)

Sziksz E, Molnar K, Lippai R, Pap D, Onody A, Veres-Szekely A, Voros P, Szabo D, Gyorffy H, Veres G (2014) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease, Virchows Arch. 465(4): p. 385-93. (IF: 2,784)

Voros P, Sziksz E, Himer L, Onody A, Pap D, Frivolt K, Szebeni B, Lippai R, Gyorffy H, Fekete A, (2013) Expression of PARK7 is increased in celiac disease, Virchows Arch. 463(3): p. 401-8. (IF: 2,544)

Sandor N, Kristof K, Parej K, Pap D, Erdei A, Bajtay Z, (2013) CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells, Immunobiology. 218(4): p. 652-63. (IF: 2,781)

Sandor N, Pap D, Prechl J, Erdei A, Bajtay Z (2009) A novel, complement-mediated way to enhance the interplay between macrophages, dendritic cells and T lymphocytes Mol Immunol. 47(2-3): p. 438-48. (IF: 3,375)

13. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Vannay Ádámnak a Ph.D. munkám során nyújtott támogató segítségéért, valamint kutatói szemléletformálásomra fordított idejéért.

Köszönettel tartozom Szabó Attila és Tulassay Tivadar professzor uraknak a lehetőségért, hogy Ph.D. munkámhoz kapcsolódó kutatásokat az I.sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriuma által nyújtott keretek között végezhettem.

Köszönettel tartozom továbbá az I.sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumának, valamint az MTA-SE Gyermekgyógyászati és Nefrológiai Kutatólaboratórium valamennyi dolgozójának a segítségéért, kiemelve Dr. Sziksz Erna, Dr. Fekete Andrea, Veres-Székely Apor, Dr. Lippai Rita, Dr. Rokony Réka, Dr. Ónody Anna, Dr. Balicza-Himer Leonóra, Dr. Szebeni Beáta, Kiss Zoltán, Hosszú Ádám, Kőszegi Sándor, valamint Bernáth Mária motiváló hozzáállását, valamint önzetlen támogatását.

Végül, de nem utolsó sorban mérhetetlen hálával tartozom Hegedűs Klárának és családomnak pótolhatatlan segítségükért és véget nem érő biztatásukért.