

# **Az iszkémia/reperfúzió okozta akut veseelégtelenség proteomikai analízise: új terápiás célpontok azonosítása**

**Balicza-Himer Leonóra**

**MTA Támogatott Kutatócsoportok Irodája**

**Gyermekgyógyászati és Nephrológiai Kutatócsoport**

**OTKA PD105361 záró beszámoló**

2012.09.01 – 2017.03.31

## Rövid összefoglaló

Az egészségügyi ellátás fejlődése ellenére az akut veseelégtelenség (ARF) gyógyítása mind a mai napig komoly nehézséget okoz. A humán gyógyászatban az ARF egyik leggyakoribb oka a vese iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása, ezért ennek a folyamatnak a komplex proteomikai vizsgálatát, új biomarkerek és terápiás célpontok keresését tűztük ki kutatásunk céljául.

Hím ivarérett Wistar patkányokon létrehoztuk a vese I/R károsodásának állatmodelljét, és elvégeztük a veseminták összehasonlító proteomikai analízisét kétdimenziós elektroforézis és folyadékkromatográfia-tömegspektrometria segítségével. 108 szignifikáns változást mutató fehérjét azonosítottunk, melyeket adatbázisok segítségével funkcionális, illetve génontológiai csoportokba rendeztünk, a közöttük lévő kapcsolatrendszerrel feltártuk. Elemzésünkkel az I/R indukálta károsodás folyamatában központi szerepet betöltő molekulaként azonosítottuk a Parkinson's disease 7-et (PARK7). Igazoltuk a PARK7 protektív hatását az oxidatív stressz okozta károsodással szemben. Vizsgálatainkat az ARF mellett más oxidatív stresszel járó kórképekre, így a gyulladásos bélbetegségekre, illetve cöliákiára is kiterjesztettük.

Az OTKA támogatásával számos jelentős lépést sikerült tennünk az ARF kiváltó okaként ismert I/R vesekárosodás molekuláris mechanizmusának megértéséhez. Az általunk azonosított, I/R patomechanizmusában szerepet játszó fehérjék - különös hangsúlyt fektetve a PARK7-re-, a későbbiekben az ARF terápiás célpontjai lehetnek.

## **Short summary**

Despite development in the intensive health care, treatment of acute renal failure means a serious problem. The leading cause of acute renal failure (ARF) is ischemia/reperfusion (I/R) induced injury, thus our aim was to better understand its complex pathomechanism and to find new biomarkers and therapeutic targets.

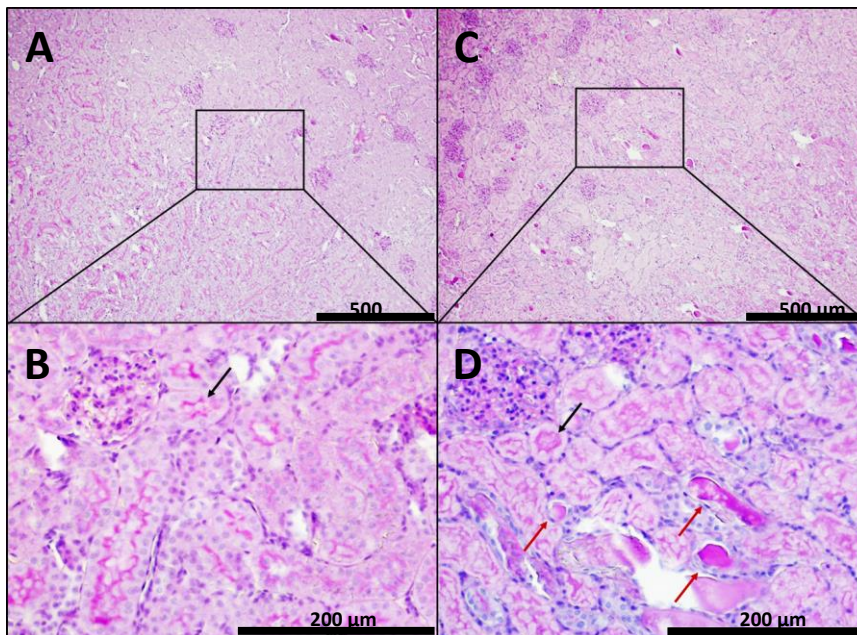
Using the rat model of I/R induced ARF, comparative proteomic analysis of kidney samples using two-dimensional gel electrophoresis followed by mass spectrometry was performed. Our analysis revealed 108 significantly altered proteins in the kidney after I/R induced injury. According to databases, these proteins were sorted into functional and gene ontological groups, and possible connections were explored between them. Based on our analyses, we identified the central role of Parkinson's disease 7 (PARK7) in the pathomechanism of I/R induced kidney damage. Moreover we demonstrated its protective role against cell damage caused by oxidative stress. Besides ARF, our experiments were also extended to other oxidative stress related diseases, such as inflammatory bowel diseases and coeliac disease.

Summarizing the results of the present proposal supported by OTKA, substantial steps were made to explore molecular events of I/R induced ARF. We identified numerous proteins playing roles in the pathomechanism of I/R, of which PARK7 may serve as therapeutic target in the treatment of ARF in the future.

## Főbb eredményeink:

### *A vese iszkémia/reperfúziós (I/R) sérülésének hisztológiai analízise*

Létrehoztuk a vese I/R károsodásának patkánymodelljét. A kísérlethez ivarérett hím Wistar patkányok bal vese artériáját és vénáját 45 percre leszorítottuk, majd 24 órás reperfúziót követően az állatok veséjét eltávolítottuk. Kontrollként álműtött patkányokat alkalmaztunk. Az I/R károsodást követően eltávolított vesékből készült szövettani metszetek PAS festése jelentős patológiai elváltozásokat mutatott. A veseparenchyma struktúrája károsodott, tubuláris atrófia, valamint hialin lerakódások jellemezték a vese interstíciumot (1. ábra/C, D). A kontroll (áloperált) állatok veséiben ezzel szemben a vese struktúrája intakt maradt, patológiai elváltozásnak nem volt nyoma (1. ábra/A, B).

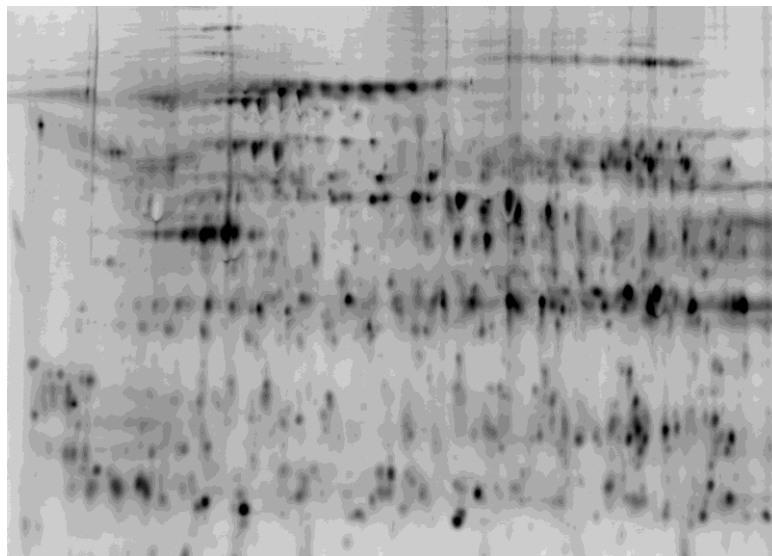


**1. Ábra. Reprezentatív PAS festett képek kontroll (A, B) és I/R sérülésen átesett állatok (C, D) veséiről készültek. A piros nyilak az I/R károsodás következtében kialakult hialin lerakódásokat jelzik: 100x nagyítás (A, C), valamint 400x nagyítás (B, D).**

### *Az I/R sérülés indukálta akut vesekárosodás patomechanizmusában szerepet játszó fehérjék azonosítása*

Az ARF állatmodelljének beállítását követően megkezdjük a kontroll, valamint I/R csoportok összehasonlító proteomikai elemzését. Ennek során a homogenizált vesemintákat

fluoreszcens festékkel jelöltük, majd izoelektromos fókuszálást követően SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Az elemzés során több mint 300 fehérje spot-ot (pöttyöt) sikerült azonosítani DeCyder software (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) segítségével (2. Ábra). Ezek közül az I/R károsodás hatására 153-nak változott az intenzitása, ezeket a spot-okat választottunk ki további elemzésre, fehérje összetételüket folyadékkromatográfiához csatolt tömegspektrometria (LC-MS) segítségével azonosítottuk. A vese I/R sérülése kapcsán 108 fehérje mennyisége változott meg szignifikánsan a kontrollokhöz viszonyítva  $p \leq 0,05$  (1. Táblázat).



**2. Ábra. Reprezentatív gélkép az I/R károsodást elszenvedett vesékből készült 2 dimenziós gélelektroforézisről.** A fehérjék elválasztása izoelektromos pont alapján (első dimenzió) és molekula tömeg alapján (második dimenzió) történik.

### ***Az I/R károsodás hatására megváltozott mennyiségű fehérjék cluster analízise***

Az LC-MS analízis során azonosított 108 fehérjét funkciójuk alapján 11 csoportba soroltuk, melyek a következők voltak: citoszkeletonhoz kapcsolt fehérjék, stressz válaszban résztvevő fehérjék, szénhidrát-, lipid-, nukleotid/nukleinsav, aminosav és más metabolizmushoz kapcsolt fehérjék, fehérjebontásban résztvevő fehérjék, DNS/RNS érésehez

(processing) szükséges fehérjék, jelátvitelben résztvevő fehérjék, valamint “vegyes” kategória (1. Táblázat).

<b>Funkcionális csoportok</b>	<b>Tagjai</b>
<b>Citoszkeletonhoz kapcsolt fehérjék</b>	5
<b>Stressz válasz</b>	23
<b>Szénhidrát metabolizmus</b>	17
<b>Lipid metabolizmus</b>	9
<b>Nukleinsav és/vagy nukleotid metabolizmus</b>	9
<b>Aminósav metabolizmus</b>	9
<b>Egyéb metabolizmus</b>	10
<b>Fehérje bontás</b>	10
<b>DNS/RNS érés (processing)</b>	6
<b>Jelátvitel</b>	4
<b>Vegyes</b>	6

**1. Táblázat. A vese I/R sérülése kapcsán 108 fehérje mennyisége változott meg szignifikánsan, melyek funkcióik alapján 11 csoportba sorolhatóak.**

***Az I/R sérülésben szerepet játszó új/ismeretlen fehérjék azonosítása***

A 2 dimenziós elektroforézis segítségével lehetővé válik az egészséges, valamint beteg szövet génexpressziós mintázatainak összehasonlítása, ezáltal új, az adott betegségre jellemző potenciális új target molekulák, és diagnosztikai markerek azonosítása. Az általunk azonosított 108 fehérje közül 59 szerepe korábban egyáltalán nem volt ismert sem a vese, sem egyéb szövet I/R sérülésének patomechanizmusában (2. Táblázat/A). További 21 általunk azonosított fehérje szerepét már leírták a szív, az agy, illetve a béltraktus I/R indukálta szöveti

sérülésében, de vesében még nem volt ismert funkciójuk (2. Táblázat/B). 26 fehérje esetében pedig már korábban igazolták, hogy szerepük van az vesét érő I/R-ós inzultus patomechanizmusában (2. Táblázat/C).

<b>A. Különböző szöveti I/R indukálta sérülésben korábban nem ismert funkciójú fehérjék</b>	<b>B. Vese I/R indukálta sérülésében korábban ismeretlen funkciót betöltő fehérjék</b>	<b>C. Vese I/R indukálta sérülésében ismerten szerepet játszó fehérjék</b>
ABHD14B,;ACAA2;ACMSD; ACOT2; ADSS; AGMAT; AK3L1;AKR1A1;AKR1C12; AKR7A2;AKR7A3, ANXA2; APRT; ARBP; ATP5O; ATP6V1B2; BDH2; CA1; CLIC5; CRYL1; CTSH; DCI; DHDPSL; DHRS4; DLST; DPP7; ERP29; FAH; FAHD1; GALM; GLOD4; GOT1; GRHPR; GSN; GSTP1; HAAO;HNRNPF; HSD17B10; KHK; MPST; MRPL12; NIPSNAP1; OAT; PGAM1; PGLS; PPA1; PRKAR2A; PSMB5; PSMB7; PTER; PYROXD1; QDPR; RANBP1; RUVBL1;STARD10;TAGLN2 ;TALDO1; UAP1L1; VPS4B	ALDOA; ANXA4; BLVRA; CALB1; CAPZ; CTSB; CTSL; ECHS1; ENO1; GDI2; HSPD1; IDH2; IDH3A; NDUFV1; NDUFV2; PARK7; PDHB; PGK1; PZP; SDHB; SELENBP1; SERPINA3N; SORD	ACTB; ACY1; AKR1B1; ALB; ANXA1; APOA1; APOE; ATP5B; CAT; DAO; DDAH2; GATM; GPX3; GSTA3; GSTA4; HP; IDH1; LDHB; MDH1; MSRA; PRDX1; PRDX2 PRDX3; PRDX6; SERPINA1; TAGLN

**2. Táblázat. A vesében I/R sérülés hatására megváltozott expressziójú fehérjék.** A táblázat az általunk azonosított, szöveti I/R indukálta sérülésben korábban ismeretlen funkciójú fehérjéket (A), a vese I/R indukálta sérülésében korábban ismeretlen funkciót betöltő fehérjéket (B), továbbá vese I/R indukálta sérülésében ismerten szerepet játszó fehérjéket összegzi (C).

### ***Korábban ismeretlen fehérje karakterizálása***

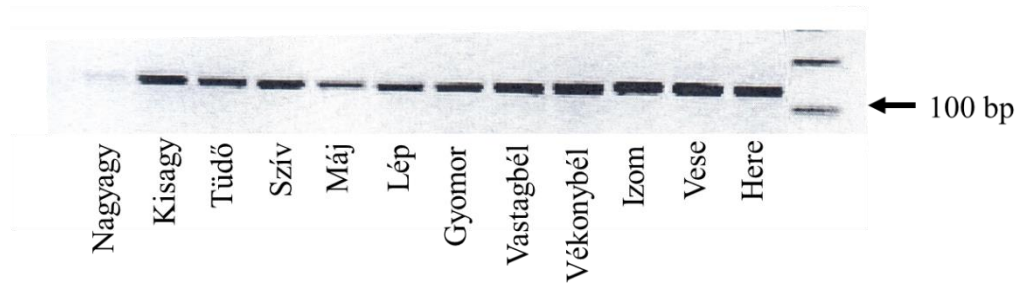
A 2 dimenziós gélelektroforézis vizsgálatunk segítségével azonosítottuk egy korábban nem leírt, ismeretlen fehérje / unknown protein (UP) aminosav szekvenciáját is: *MEAALAVSRLPPHDPRTPALSVVDMHTGGEPLRIVHAGCPEVAGPTLLAKRRYMRQHLDY VRRRLVFEPRGHRDMYGAILVPSELPDAHLGVLFLHNEGYSSMCGHAVLALGRFALDFGL VPAPPEGTREAQVNIHPCGLVTAFFECEGGRSCGPVRFHSPAFVLASDLTVDPGHGK VVVDIAYGGAFYAFVSAEKLGLDVCASAKTRDLVNAASALTGAVKAQFKISHPESEDLGLFY GTILTDGKDVYSEEPTTNICVFADEQVDRSPTGSGVTARIALQYHKGLLQLNQTRAFKSSAT GSVFTGCAVREAKCGDFKAVIVEVAGQAHYTGANLTVEDDDPLRDGFLK*

Az UP-ot kódoló gént *Rattus norvegicus*-ban már leírták korábban (hypothetical protein LOC314214 [*Rattus norvegicus*] (NCBI Reference Sequence: NP\_001101501.1)), és feltételezték, hogy transzlálódik róla fehérje, de semmilyen irodalmi adat nem állt rendelkezésre magáról a fehérjéről. A patkányban kimutatott UP-ot kódoló nukleotid szekvenciát szintén kimutatták már az egér [*Mus musculus*] (NCBI Reference Sequence: NP\_080314.1), valamint a humán [*Homo sapiens*] (NCBI Reference Sequence: NP\_653182.1) genomban is, de pontos funkciójukat nem vizsgálták. Az UP kromoszóma lokalizációja és aminosav szekvenciája alapján feltételeztük, hogy a prokariotákban már leírt prolin racemáz enzimmel lehet homológ, melynek terméke egy izomeráz és fő funkciója az L-prolin D-prolinná történő sztereokémiai inverziójának katalizációja. Kampel és munkatársai kimutatták, hogy az egy hónapon át, naponta 50 mg/ttkg dózisban, ivóvizükben D-prolint kapott Sprague-Dawley patkányok esetében súlyos tubuláris léziók alakulnak ki a vesében, míg az L-prolint kapott patkányok veséjének hisztológiai képe nem tér el a kontrollokétól (Kampel D. Toxicity of D-proline. 1990. Amino acids. pp:1164-1171). Ezek alapján feltételeztük, hogy az ismeretlen fehérje fontos szerepet játszhat az I/R patomechanizmusában.

### ***Az ismeretlen fehérjét kódoló gén expressziója különböző szövetekben***

Az egérben expresszálódó UP mRNA szinten történő detektálásához specifikus primereket terveztünk. Ezen primerek segítségével megvizsgáltuk az UP mRNA expresszióját különböző szövetekben. Eredményeink szerint valamennyi vizsgált szövet típusban (idegszövet, tüdő, szív, máj, lép, gasztrointesztinális rendszer, izom, here, valamint a vese) kifejeződött az UP-t kódoló gén (3. Ábra).

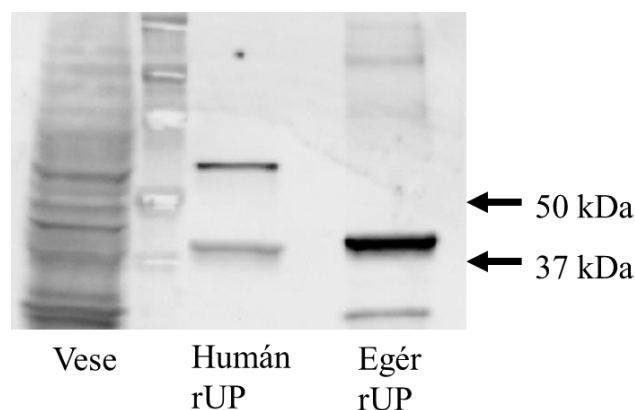




**3. Ábra. Reprezentatív agaróz gélelektroforézis ábra az ismeretlen fehérjét kódoló gén expressziójáról a különböző szövetekben.** Az UP-t kódoló gén kifejeződött az idegszövetben, tüdőben, szívben, májban, lépben, gasztrointesztinális rendszerben, izomban, herékben, valamint a vesében is.

#### *Az ismeretlen fehérje kimutatása vesében*

Az UP funkcionális vizsgálatához, valamint szöveti kimutatásához rekombináns humán és egér fehérjét, valamint specifikus antitestet állítottunk elő Proteogenix (Schiltigheim, Franciaország) biotechnológiai cég közreműködésével. Valós idejű RT-PCR adatainkat alapul véve az UP fehérje mennyiségét Western-blot-tal vizsgáltuk, melyhez kontroll egér vesékből származó szöveti homogenizátumot, valamint rekombináns humán és egér UP-t (rUP) használtunk. Az ismeretlen fehérjét 354 aminosav alkotja, mely alapján a becsült molekulásúlya körülbelül 35-40 kDa. Erőfeszítéseink ellenére Western-blot analízissel nem sikerült a veseszövetben az UP-t kimutatni (4. Ábra).



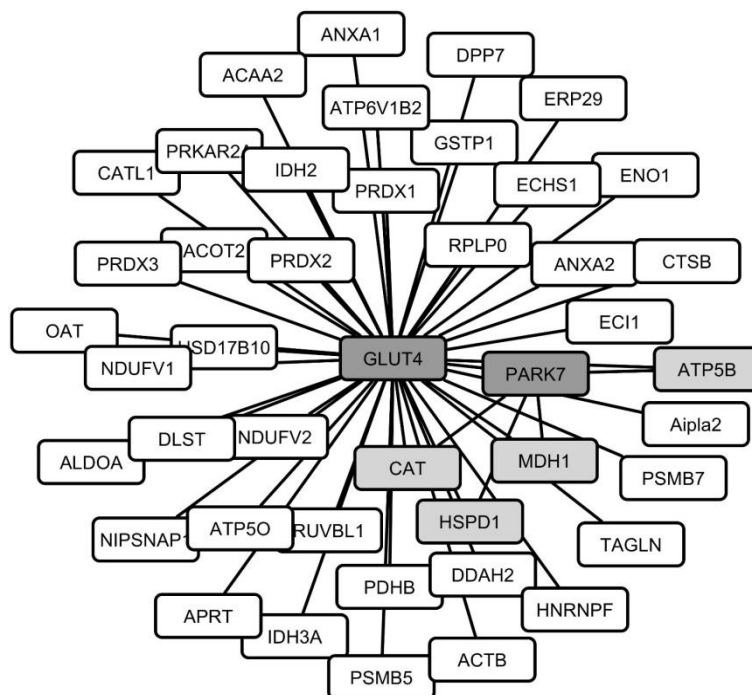
**4. Ábra. Reprezentatív Western-blot az ismeretlen fehérje kimutatására.** Western-blot mérésünk során csupán a pozitív kontrollként alkalmazott egér, valamint humán rekombináns

UP-k (rUP) esetében tudtuk az UP specifikus jelet (35-40 kDa) detektálni. Az egészséges egér veseszövetben nem kaptunk UP specifikus szignált.

Kísérleteinkkel párhuzamosan az ismeretlennek vélt fehérje funkciójáról megjelent egy publikáció [Visser WF et al. Identification of a human trans-3 hydroxy-L-proline dehydratase, the first characterized member of a novel family of proline racemase-like enzymes. Biol. Chem 2012. 287 (26): 21654-62], melyben leírták, hogy valóban egy racemáz szerű fehérjéről van szó, mely a transz-3-hidroxi-L-prolin aminosav tartalmú fehérjéket bontja, köztük a kollagén IV-et is. A publikáció megjelenését követően vizsgálatainkat kiterjesztettük a proteomikai analízisünk által feltárt egyéb fehérjék I/R sérülésben betöltött szerepére.

### ***Fehérje interakciós hálózatok feltérképezése***

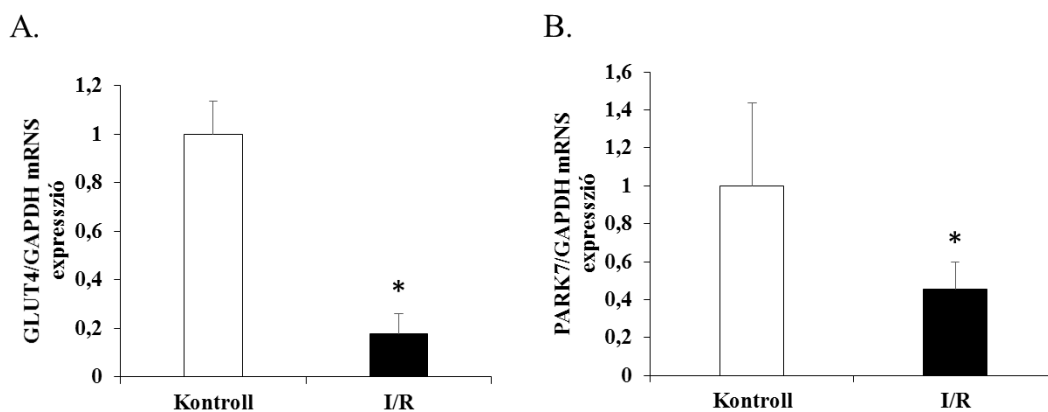
Hálózat elemző szoftverek segítségével feltérképeztük az I/R inzultus hatására megváltozott mennyiséget mutató fehérjék közötti lehetséges kapcsolatokat. A két dimenziós gélelektroforézis segítségével azonosított fehérjék közötti interakciók bioinformatikai elemzése a vizsgáló szemléletétől függetlenül rávilágíthat fontos molekuláris kapcsolatokra, valamint a gráfelméleti és hálózat-topológiai ismeretek segítségével a patomechanizmus szempontjából fontos géneket jelölhet ki. Az interakciós vizsgálat rávilágított a glükóz transzporter 4 (GLUT4 – 43 db kapcsolat) valamint a Parkinson's disease 7 (PARK7 – 4 db kapcsolat) eddig nem ismert szerepére a vese I/R sérülésre adott molekuláris válaszában (5. Ábra). A GLUT4 glükóztranszporter központi szerepe nem meglepő, hiszen az I/R sérülés által kiváltott energia deficittel járó állapot indukálhat változásokat a glükóz homeosztázis fenntartásáért felelős GLUT4 expressziójában. A PARK7 szerepét elsősorban neurodegeneratív betegségek (Parkinson-kór, Alzheimer-kór) kapcsán vizsgálták, ahol leírták citoprotektív (antioxidáns, anti-apoptotikus, valamint molekuláris chaperon) szerepét, vagyis, hogy védelmet nyújt az idegsejtek oxidatív stressz által okozott károsodásával szemben. A legtöbb szervben, illetve szervrendszerben, így a vesében betöltött szerepe azonban teljesen ismeretlen, így kutatócsoportunk elsőként vizsgálta a vese I/R sérülésének patomechanizmusában betöltött funkcióját.



**5. Ábra. Interakciós hálózat a vese I/R sérülését követően szignifikánsan megváltozó fehérjék között.** Az interakciós hálózatot Cytoscape program segítségével vizualizáltuk.

***A GLUT4 és PARK7 mRNS expresszió változása I/R sérülést követően***

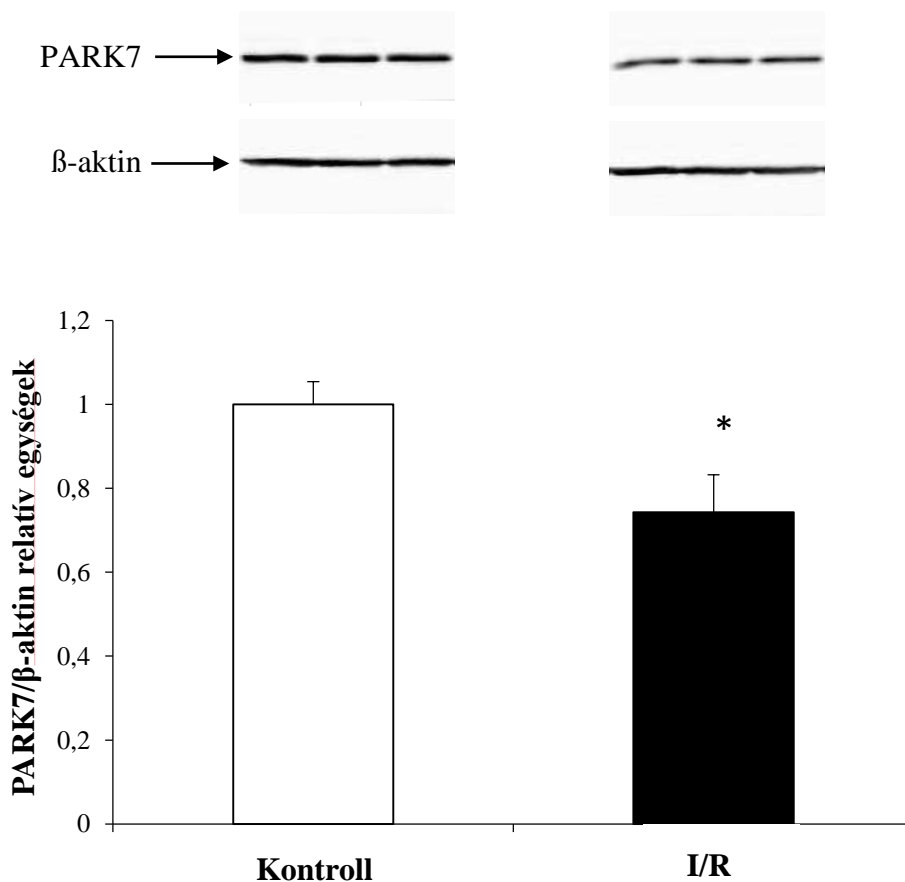
Proteomikai vizsgálataink megerősítésére valós idejű RT-PCR módszer segítségével is meghatároztuk az I/R sérülés indukálta GLUT4, valamint PARK7 mRNS expressziójának változásait a patkány vesékben. Eredményeink szerint mind a GLUT4 (6. Ábra/A.) mind pedig a PARK7 (6. Ábra/B.) mRNS expressziója szignifikánsan csökkent I/R sérülést követően.



**6. Ábra. A glükóz transzporter 4 (GLUT4) (A) valamint a Parkinson disease protein 7 (PARK7) (B) molekula mRNA expressziója kontroll, valamint I/R sérülésen átesett vesékben.** A mérések során kapott mRNA expresszióra vonatkozó értékeket a mintákban található gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz expressziójára normalizáltuk. Az ábrákon a kapott adatok átlag±szórás értékét tüntettük fel. A statisztikai analízis Mann-Whitney U teszt segítségével, a GraphPadPrism szoftver 6.01-es verziójával történt. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll.

***A PARK7 fehérje szint változása I/R sérülést követően***

A PARK7 fehérje mennyiségét Western blot segítségével határoztuk meg az I/R során károsodott, illetve kontroll patkányvesék esetében. A Western blot analízis során 20 kDa-nál detektáltuk a PARK7-hez köthető-, míg 43 kDa-nál a  $\beta$ -aktin-hoz köthető jelet. A PARK7 fehérje szintje szignifikánsan csökkent az I/R sérülést követően a kontrollokhoz viszonyítva ( $p=0.0159$ ) (7. Ábra).

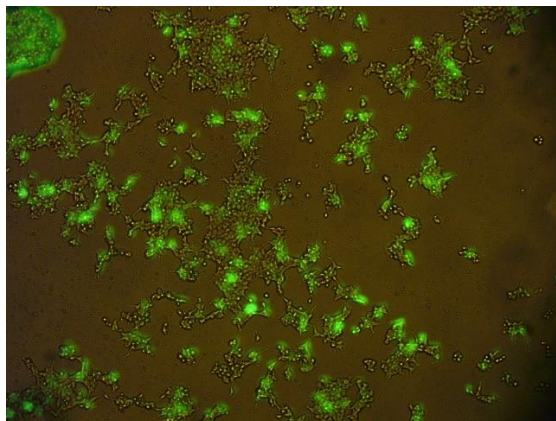


### **7. Ábra. PARK7 fehérje szint az I/R sérülésen átesett, valamint kontroll vesékben.**

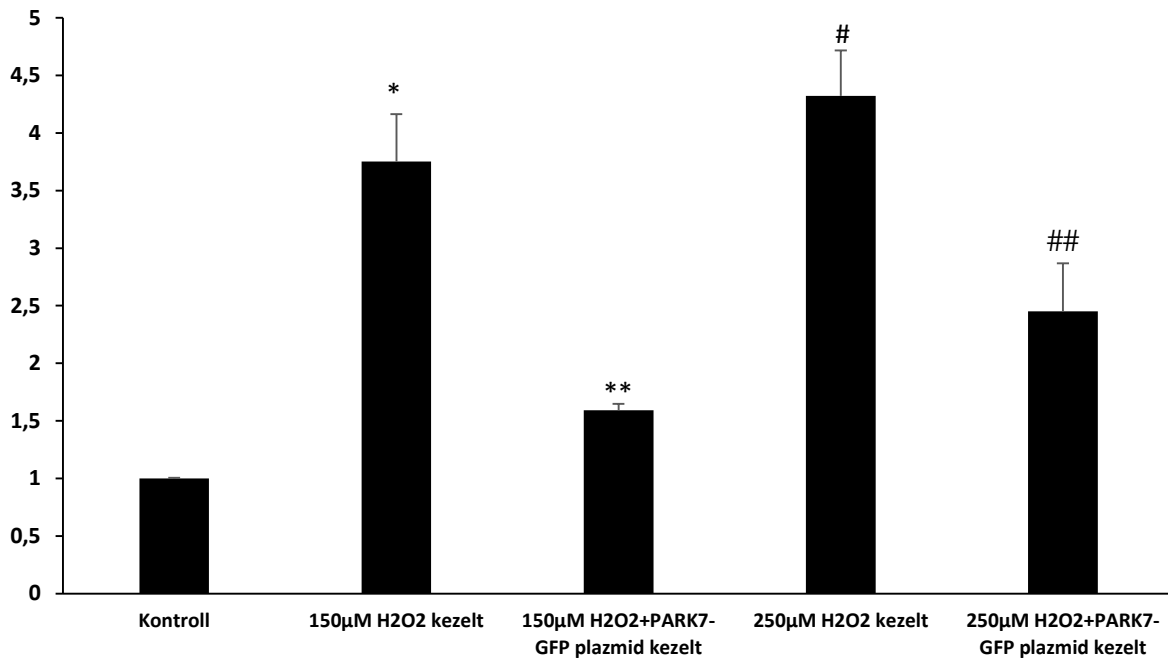
A PARK7-hez köthető jelet 20 kDa-nál detektáltuk, belső kontrollként a  $\beta$ -aktint alkalmaztuk (43 kDa). Az ábrákon a kapott adatok átlag $\pm$ szórás értékét tüntettük fel. A statisztikai analízis Mann-Whitney U teszt segítségével, a GraphPadPrism szoftver 6.01-es verziójával történt.. \*p=0.0159 vs. Kontroll.

### ***A PARK7 overexpresszió hatásának vizsgálata in vitro humán vese epítél (HK2), valamint embrionális veseszövet (HEK-293) eredetű sejtvonalakon***

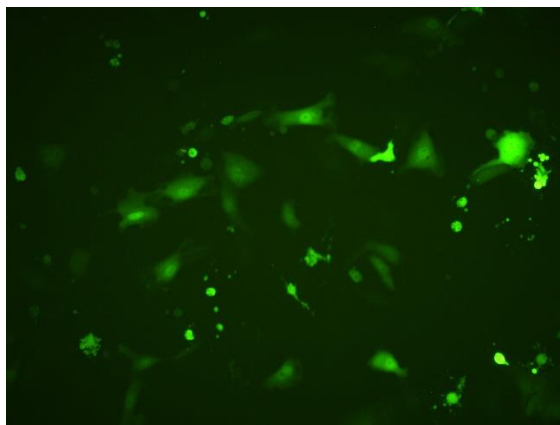
PARK7 overexpressziót követően vizsgáltuk a HK2 és HEK-293 sejtek oxidatív stresszel szembeni érzékenységét. A HK2, illetve a HEK-293 sejtekben PARK7-GFP plazmid segítségével overexpresszáltattuk a PARK7-et (8. Ábra és 10. Ábra). A sejteket 80%-os konfluencia mellett, FBS mentes DEMEM tápoldatban lipofectamin 2000 (ThermoFisher scientific, Hamburg, Németország) transzfekciós ágens segítségével transzfektáltuk, majd 24h elteltével a transzfekció eredményességét Olympus IX-81-es (Olympus Europa Holding Gmb, Hamburg, Németország) inverz immunfluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A PARK7-GFP plazmiddal transzfektált HK2 és HEK-293 sejteket 150  $\mu$ M, valamint 250  $\mu$ M dózisú hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) kezelést alkalmaztunk. A PARK7-et overexpresszáló HK2 és HEK-293 sejtek védettnek bizonyultak a 150  $\mu$ M valamint 250  $\mu$ M dózisú  $H_2O_2$  kezelés sejtkárosító hatásával szemben is (9. Ábra és 11. Ábra: \*\*p<0,05 vs. 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  kezelt, ## p<0,05 vs. 250  $\mu$ M  $H_2O_2$  kezelt, ¥ p<0,01 vs. 150  $\mu$ M  $H_2O_2$  kezelt, € p<0,05 vs. 250  $\mu$ M  $H_2O_2$  kezelt).



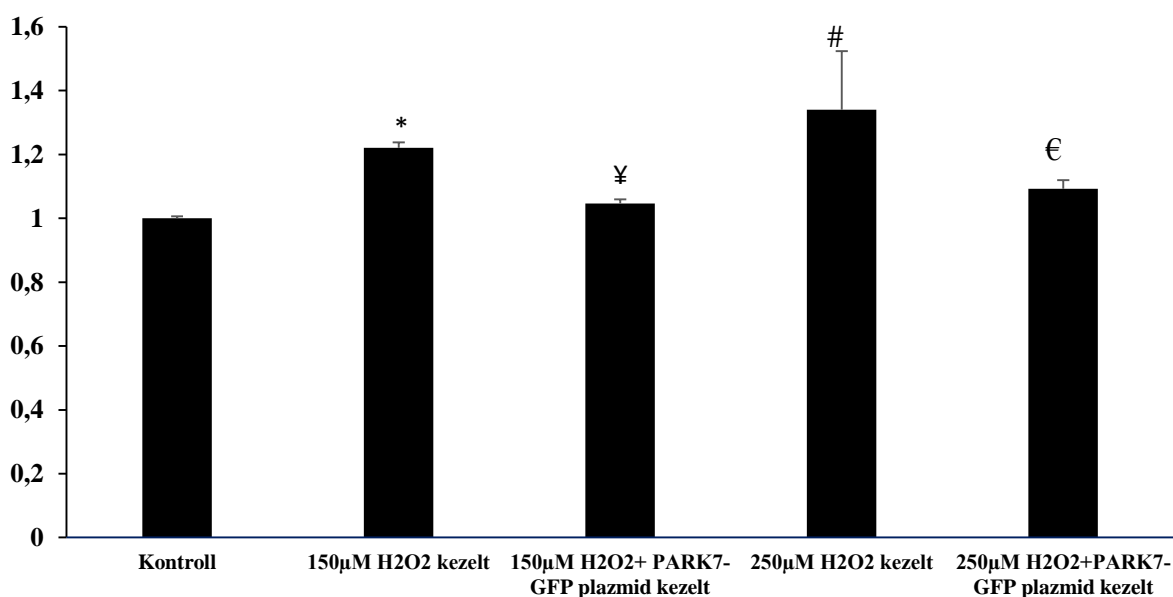
**8. Ábra. A HEK293 sejtek transzfekciója PARK7-GFP plazmid segítségével, 24h elteltével. A PARK7-et overexpresszáló sejtek zölden világítanak az Olympus IX-81-es inverz fluoreszcens mikroszkóp (100x nagyítás) alatt.**



**9. Ábra. PARK7 overexpresszáló, illetve kontroll (PARK7-et nem expresszáló GFP plazmiddal transzfektált) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt HEK-293 sejtek LDH mérése. A PARK7-GFP plazmiddal transzfektált HEK-293 sejtek védettnek bizonyultak a 150 µM valamint 250 µM dózisú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés sejtkárosító hatásával szemben. \*p<0,05 vs. Kontroll, \*\*p<0,05 vs. 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt, #p<0,05 vs. Kontroll, ## p<0,05 vs. 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt. A statisztikai analízis Mann-Whitney U teszt segítségével, a GraphPadPrism szoftver 6.01-es verziójával történt.**



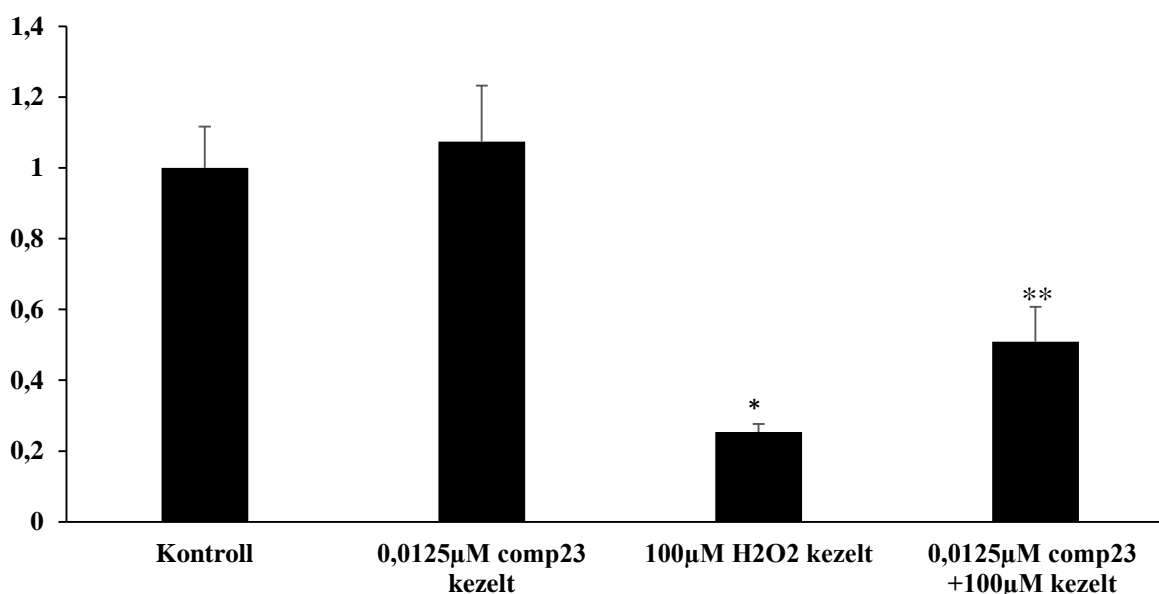
**10. Ábra.** A HK2 sejtek transzfekciója PARK7-GFP plazmid segítségével, 24h elteltével. A PARK7-et overexpresszáló sejtek zölden világítanak az Olympus IX-81-es inverz fluoreszcens mikroszkóp (200x nagyítás) alatt.



**11. Ábra.** PARK7 overexpresszáló, illetve kontroll (PARK7-et nem expresszáló GFP plazmiddal transzfektált) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt HK2 sejtek LDH mérése. A PARK7-GFP plazmiddal transzfektált HK2 sejtek védettnek bizonyultak a 150 µM valamint 250 µM dózisú H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés sejtkárosító hatásával szemben. \*p<0,05 vs. Kontroll, ¥ p<0,01 vs. 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt, #p<0,05 vs. Kontroll, € p<0,05 vs. 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt. A statisztikai analízis Mann-Whitney U teszt segítségével, a GraphPadPrism szoftver 6.01-es verziójával történt.

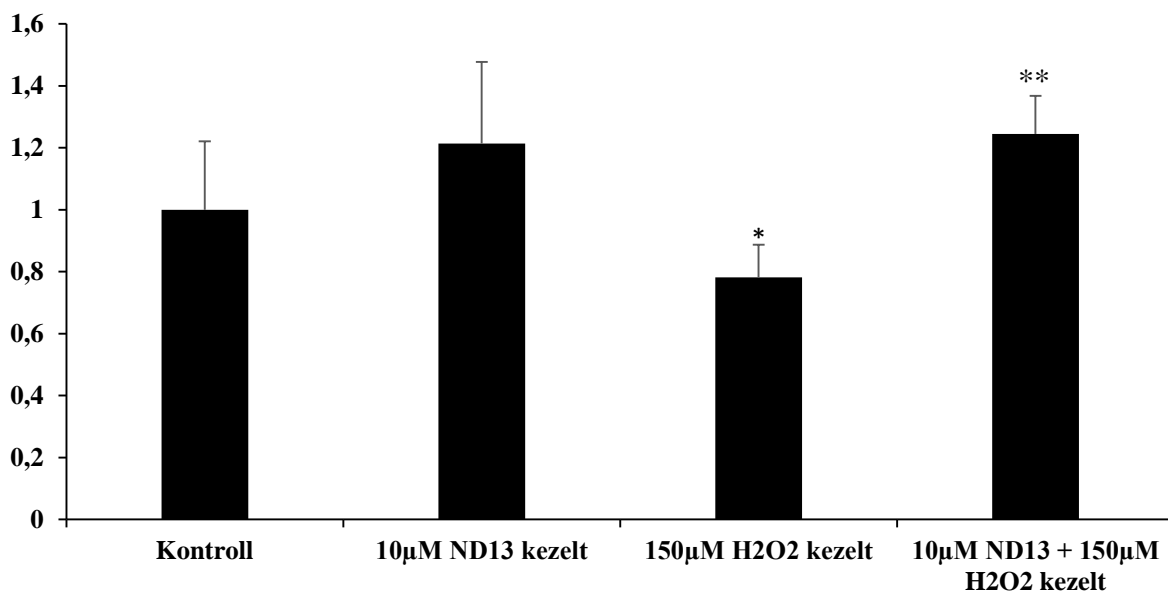
### ***A PARK7 agonista compound 23, illetve ND13 peptid hatásának vizsgálata in vitro humán vese epitél (HK2) sejteken***

A 96-well plate-n 80%-ban konfluens HK2 sejteket, FBS mentes DEMEM tápoldatban előkezeltük a PARK7 agonista comp23-al (dózisfüggés beállítását követően 0,0125  $\mu\text{M}$  dózisban), illetve ND13 peptiddel (dózisfüggés beállítását követően 10  $\mu\text{M}$  dózisban). Huszonnégy órás inkubációt követően 100  $\mu\text{M}$ , illetve 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -al kezeltük a sejteket, majd újabb 24h elteltével MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5- difenil-tetrazolium bromid] tesztet végeztünk. A comp23 és ND13 peptid előkezelés önmagában nem volt hatással a HK2 sejtek életképességére (p=ns, Kontroll vs. 0,0125  $\mu\text{M}$  comp23 kezelt, p=ns Kontroll vs. 10  $\mu\text{M}$  ND13 kezelt), azonban fokozta a sejtek viabilitását a  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezeléssel szemben (12. és 13. Ábra: \*\* p<0,05 vs. 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelt, \*\* p<0,05 vs. 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelt) .



**12. Ábra. A PARK7 agonista compound 23-al előkezelt illetve előkezelést nem kapott (kontroll) HK2 sejtek MTT analízise 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelést követően. A 0,0125  $\mu\text{M}$  comp23-al előkezelt sejtek életképessége szignifikánsan magasabb volt a csak 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelést kapott sejtekhez képest. \*p<0,02 vs. Kontroll, \*\* p<0,05 vs. 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelt. A statisztikai analízis Mann-Whitney U teszt segítségével, a GraphPadPrism szoftver 6.01-es verziójával történt.**





**13. Ábra.** A PARK7 agonista ND13-al előkezelt illetve előkezelésben nem részesült (kontroll) HK2 sejtek MTT analízise 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően. A 10µM ND13-al előkezelt sejtek viabilitása szignifikánsan magasabb volt a csak 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést kapott sejtekhez képest. \*p<0,05 vs. kontroll, \*\* p<0,05 vs. 150µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt. A statisztikai analízis Mann-Whitney U teszt segítségével, a GraphPadPrism szoftver 6.01-es verziójával történt.

Összegezve eredményeink azt mutatják, hogy a PARK7 protektív szerepet játszik a vese I/R károsodásában. Ezt az elképzelésünket támasztják alá megfigyeléseink, miszerint mind a PARK7 tubuláris epitél sejtekben való overexpressziója, mind agonizmusa védi a sejteket az oxidatív károsodással szemben.

## Összefoglalás

Az egészségügyi ellátás fejlődése ellenére az akut veseelégtelenség (ARF) gyógyítása mind a mai napig komoly nehézséget okoz. A jelenleg rendelkezésre álló megelőzési stratégiák és terápiás lehetőségek behatároltak, és közülük egyik sem képes lényegesen megváltoztatni a betegség halálozási arányát. Az ARF egyik leggyakoribb oka az erőteljes oxidatív stresszel járó iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodás, így kutatásunk céljaul az I/R okozta akut vesekárosodás komplex molekuláris patomechanizmusának feltárását, új biomarkerek és terápiás célpontok keresését tűztük ki.

Hím ivarérett Wistar patkányokon létrehoztuk a vese I/R károsodásának állatmodelljét. Ezt követően elvégeztük a kontroll, valamint I/R inzultuson átesett veseminták összehasonlító proteomikai analízisét kétdimenziós elektroforézis és folyadékkromatográfiához csatolt tömegspektrometria segítségével. A 108 szignifikáns változást mutató fehérjét az UniProt, NCBI Pubmed, Ariadne Pathway Studio online adatbázisai, valamint a Cytoscape hálózatépítő program segítségével 11 funkcionális, illetve génontológiai csoportba rendeztük, és a közöttük lévő kapcsolatrendszerrel feltártuk. Ennek során 59 olyan fehérjét azonosítottunk, melyek szerepe korábban egyáltalán nem volt ismert sem a vese, sem egyéb szövet I/R sérülésének patomechanizmusában. Emellett elemzésünk feltárt egy addig ismeretlen fehérjét (UP), melyről szerkezeti homológia alapján feltételeztük, hogy prolin racemáz szerű funkciója révén szerepe lehet az L-prolin D-prolinná történő átalakulásában. A D-prolin felhalmozódása a vesében súlyos tubuláris léziók kialakulásához vezet (Kampel D. Toxicity of D-proline. 1990. Amino acids. pp:1164-1171), így feltételeztük a jelentőségét az I/R indukált károsodásban. Kutatócsoportunkkal párhuzamosan egy másik kutatócsoport (Visser és munkatársai) is vizsgálni kezdte az addig ismeretlen fehérjét, melyről igazolódott, hogy valóban egy prolin racemáz-szerű transz-3-hidroxi-L-prolin dehidratáz. Miután egészséges egér veseszövetben nem tudtuk detektálni az UP-t fehérje szinten, ugyanakkor Visser és munkatársai eredményeiket 2012-ben publikálták, vizsgálatainkat kiterjesztettük a proteomikai analízisünk által feltárt más molekulákra. Elemzésünk az I/R indukálta károsodás folyamatában központi szerepet betöltő molekulaként azonosította a Parkinson's disease 7-et (PARK7). A PARK7 szerepét korábban neurodegeneratív betegségek (Parkinson-kór, Alzheimer-kór) kapcsán vizsgálták, ahol leírták citoprotektív (antioxidáns, anti-apoptotikus, valamint molekuláris chaperon) szerepét, vagyis, hogy védelmet nyújt az idegsejtek oxidatív

stressz által okozott károsodásával szemben. A legtöbb szervben, illetve szervrendszerben, így a vesében betöltött szerepe azonban teljesen ismeretlen volt, így megkezdtük a vese I/R károsodásában betöltött funkciójának pontosabb feltárását. A proteomikai analízisünk eredményeit megerősítve ugyanazon modelltől származó mintákon igazoltuk -valós idejű RT-PCR és Western blot módszerekkel- az I/R károsodás PARK7 expressziót csökkentő hatását. Ezzel párhuzamosan HEK-293 vese epithél és HK-2 proximális tubulus sejtvonalakon overexpresszáltattuk a PARK7-et, illetve PARK7 agonisták (compound-23, ND13) hozzáadásával fokoztuk aktivitását, majd H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléssel oxidatív stresszt indukáltunk. A sejtek állapotát MTT viabilitási-, illetve LDH citotoxicitási assay-el követtük nyomon. Méréseinkkel *in vitro* igazoltuk a PARK7 protektív hatását vesében az oxidatív stresszel szemben.

Munkatervünkben megfogalmazottakkal összhangban a vesében végzett proteomikai elemzésünk alapján fontos patológiai szereppel bíró PARK7 expressziójának, funkciójának vizsgálatát más szervekre, más kórképekre is kiterjesztettük. Igazoltuk a PARK7 mRNS és fehérje emelkedett expresszióját coeliakiás gyermekek duodenum nyálkahártyájában, valamint gyulladós bélbetegségben (IBD) szenvedő gyermekek colon mintáiban és az IBD állatmodelljében egyaránt. A PARK7 IBD-ben betöltött szerepének tisztázására jelenleg funkcionális vizsgálatokat végzünk.

## A közlemények listája:

Sorszám	Közleményjegyzék	Dokumentum típusa	Impakt faktor	NKFI támogatás feltüntetve?
1.	Sziksz E; Himer L; Kékesi AK; Juhász DG; Simor A; Gulyássy P; Darula Zs; Szebeni B; Tulassay T; Vannay Á.: <b>Proteomic analysis of renal ishaemia/reperfusion injury: identification of potential new targets.</b> , <i>Pediatr Nephrol</i> 27:1605-1829. P279, 2012	Konferencia közlemény	-	nem
2.	Sziksz E; Himer L; Kékesi K; Juhász G; Simor A; Gulyássy P; Darula Zs; Ónody A; Pap D; Szebeni B; Tulassay T; Vannay Á.: <b>Új biomarkerek azonosítása proteomikai analízissel az iszkémia-reperfúzió okozta akut vesekárosodás kapcsán</b> , Magyar Nephrologiai Társaság XXIX. Nagygyűlése (Siófok) 2012 Október 4-6.	absztrakt	-	igen
3.	Sziksz E; Himer L; Kékesi K; Juhász G; Simor A; Gulyássy P; Darula Zs; Ónody A; Pap D; Szebeni B; Tulassay T; Vannay Á.: <b>Új biomarkerek azonosítása proteomikai analízissel az iszkémia-reperfúzió okozta akut vesekárosodás kapcsán.</b> , <i>Hypertonia és Nephrologia</i> , 16(suppl.2):S1-S72, 2012	Konferencia közlemény	-	nem
4.	Sziksz E; Himer L; Kékesi KA; Juhász DG; Simor A; Gulyássy P; Darula Zs; Szebeni B; Tulassay T; Vannay Á.: <b>Proteomic analysis of renal ishaemia/reperfusion injury: identification of potential new targets.</b> , European Society for Pediatric Nephrology 45th Annual Scientific Meeting (Krakkó, Lengyelország) 2012. szeptember 6-8.	absztrakt	-	igen
5.	Sziksz E; Himer L; Vannay Á.: <b>Fehérjék relatív mennyiségének meghatározása western blot technikával.</b> , <i>Gyermekgyógyászat</i> . 64(1)9., 2013	folyóiratcikk	-	nem
6.	Vörös P; Sziksz E; Himer L; Ónody A; Pap D; Frivolt K; Szebeni B; Lippai R; Gyórfly H; Fekete A; Brandt F; Molnár K; Veres G; Arató A; Tulassay T; Vannay Á.: <b>Expression of PARK7 is increased in coeliac disease.</b> , <i>Virchows Arch</i> . 2013; 463(3):401-8.	folyóiratcikk	2.560	igen
7.	Béres NJ; Sziksz E; Vannay Á; Szabó D; Pap D; Veres-Székely A; Arató A; Szabó AJ, Veres G.: <b>Role of the microbiome in celiac disease.</b> , <i>International Journal of Celiac Disease</i> , 2014 2 (4), pp 150-153.	folyóiratcikk	-	igen
8.	Fekete A; Vannay Á.: <b>A diabetes nephropathia jelentősége gyermekkorban</b> , <i>Orvosi hetilap</i> , 2014. (155. évf.) 4. sz. 141-150. old., 2014	folyóiratcikk	-	igen
9.	Pap D; Himer L; Sziksz E; Vannay Á.: <b>Transzgénikus állatok az orvosbiológiai kutatásokban.</b> , <i>Gyermekgyógyászat</i> , 2014, 65:(2) pp. 67-68.	folyóiratcikk	-	igen
10.	Rokonay R; Sziksz E; Lippai R; Pap D; Veres-Székely A; Szabó A; Vannay Á.: <b>A vesefibrózisban szerepet játszó szignalizációs útvonalak.</b> , <i>Hypertonia és Nephrologia</i> , 2014; 18(3-4):72-5.	folyóiratcikk	-	igen
11.	Sziksz E; Molnár K; Lippai R; Pap D; Ónody A; Veres-Székely A; Vörös P; Szabó D; Gyórfly H; Veres G; Tulassay T; Vannay Á; Arató A: <b>A PPAR-γ és a TSLP szerepének vizsgálata gyermekkori coeliákiában.</b> , Magyar Gyermekgastroenterológiai Társaság IV. Kongresszusa 2014. Október 2-4.	absztrakt	-	igen
12.	Sziksz E; Molnár K; Lippai R; Pap D; Ónody A; Veres-Székely A; Vörös P; Szabó D; Gyórfly H; Veres G; Tulassay T; Vannay Á; Arató A.: <b>Peroxisome proliferator-activated receptor and thymic stromal lymphopoietin are involved in the pathophysiology of childhood coeliac disease.</b> , <i>Virchows Archiv</i> , 465(4):385-93, 2014	folyóiratcikk	2.651	igen
13.	Sziksz E; Pap D; Fekete A; Veres G; Tulassay T; Vannay Á.: <b>Involvement of heat shock proteins in gluten-sensitive enteropathy.</b> , <i>World Journal of Gastroenterology</i> . 2014; 20(21):6495-6503.	folyóiratcikk	2.369	igen
14.	Lippai R; Sziksz E; Pap D; Rokonay R; Veres-Székely A; Ónody A; Fekete A; Veres G; Arató A; Tulassay T; Szabó AJ; Vannay Á.: <b>Involvement of PARK7 in the pathomechanism of inflammatory bowel diseases.</b> , 24th Meeting of European Society of Paediatric Clinical Research (Budapest) 2015. június 19-20.	absztrakt	-	igen

15.	Lippai R; Sziksz E; Pap D; Rokonay R; Veres-Szekely A; Onody A; Fekete A; Veres G; Arato A; Tulassay T; Szabo AJ; Vannay A.: <b>A PARK7 szerepe gyulladással járó bélbetegségekben</b> , A Magyar Élettani Társaság 79. Vándorgyűlése és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság 2015. évi konferenciája (Szeged). 2015. május 27-30.	absztrakt	-	igen
16.	Pap D; Onody A; Sziksz E; Veres-Szekely A; Himer L; Lippai R; Rokonay R; Fekete A; Veres G; Arato A; Tulassay T; Szabo AJ; Vannay A.: <b>Interleukin-24 is a modulator of tissue remodeling in inflammatory bowel disease.</b> , 24th Meeting of European Society of Paediatric Clinical Research (Budapest) 2015. június 19-20.	absztrakt	-	igen
17.	Réka Rokonay, Erna Sziksz, Domonkos Pap, Apor Veres-Székely, Rita Lippai, Gábor Veres, Ádám Vannay: <b>Involvement of the cytokines of IL-20 subfamily in the pathogenesis of coeliac diseases</b> , The 8th Conference of PhD Students (Marosvásárhely, Románia) – 2015. december 7-11.	absztrakt	-	igen
18.	Rita Lippai, Erna Sziksz, Domonkos Pap, Réka Rokonay, Apor Veres-Székely, Attila J. Szabó, Ádám Vannay: <b>Involvement of PARK7 in the pathomechanism of inflammatory bowel diseases</b> , The 8th Conference of PhD Students (Marosvásárhely, Románia) – 2015. december 7-11.	absztrakt	-	igen
19.	Sziksz E; Pap D; Lippai R; Béres NJ; Fekete A; Szabó AJ, Vannay Á.: <b>Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine family.</b> , Mediators Inflamm. 2015;2015:764641. doi: 10.1155/2015/764641.	folyóiratcikk	3.236	igen
20.	Réka Rokonay, Erna Sziksz, Domonkos Pap, Apor Veres-Székely, Rita Lippai, Attila J. Szabó, Ádám Vannay: <b>Involvement of the cytokines of IL-20 subfamily in the pathogenesis of coeliac diseases</b> , PhD Scientific Meeting 2016 (Budapest, Magyarország) 2016. április 7-8.	absztrakt	-	igen
21.	Rita Lippai, Erna Sziksz, Domonkos Pap, Réka Rokonay, Apor Veres-Székely, Andrea Fekete, Attila J. Szabó, Ádám Vannay: <b>Involvement of PARK7 in the pathomechanism of inflammatory bowel diseases</b> , 202. FALK Symposium (Prága, Csehország) 2016. április 29-30.	absztrakt	-	igen
22.	Rita Lippai, Erna Sziksz, Domonkos Pap, Réka Rokonay, Apor Veres-Székely, Gábor Veres, Tivadar Tulassay, Attila J. Szabó, Ádám Vannay: <b>Involvement of PARK7 in the pathomechanism of inflammatory bowel diseases</b> , PhD Scientific Meeting 2016 (Budapest, Magyarország) 2016. április 7-8.	absztrakt	-	igen