

Micro RNS hálózatok szabályozó szerepének vizsgálata akut veseelégtelenségben. Záró szakmai jelentés

OTKA-azonosító: K -81972 (KISOR)

Vezető kutató: Hamar Péter

Kutatóhely: Kórélettani Intézet (Semmelweis Egyetem)

Kezdet: 2010. 02. 01

Mikro RNS-ek szerepe vese ischemia-reperfúzióban:

A pályázat első évében: 2010-ben két PhD hallgató: Dr Kaucsár Tamás és Révész Csaba megtanulták és beállították a vese ischemia-reperfúziójának egérmodelljét C57Bl6 egereken és a szükséges in-vitro metodikákat. Behatóan tanulmányoztuk a rendelkezésre álló irodalmi adatokat, annak felderítésére, hogy mely miRNS-ek (miR) játszhatnak szerepet a vese ischemia-reperfúziós károsodásában, melyről összefoglaló közleményünk jelent meg az „Advanced Drug Delivery Reviews” c. folyóiratban.

A második évben (2011) a már beállított vese-ischemia reperfúzió modellen és az irodalmi munka során azonosított micro RNS-ek ismeretében a munkatervnek megfelelően először multiplex módszerrel 21 miRNS expresszióját vizsgáltuk vese ischemia-reperfúziót követően luminex platformon. Öt mikro RNS mutatott eltérő expressziót, melyek közül 3-at sikerült real time PCR-al verifikálni. Megvizsgáltuk ezen mikro RNS-ek expresszióját különböző ischemiás és reperfúziós idők függvényében és azt találtuk, hogy a miR-17 és a miR-21 expressziója a reperfúzió során fokozatosan emelkedik. Mivel e 2 miR eddig validált target fehérjei első sorban az apoptózis és sejtregeneráció folyamatainak szabályozói, eredményeink arra utalnak, hogy a két miR-nek fontos szerepe lehet a reperfúziós folyamatok szabályozásában.

2012-ben a korábban multiplex módszerrel azonosított és real time PCR-al verifikált miR-17 és a miR-21 mikro RNS-ek kinetikai vizsgálata során azt találtuk, hogy a két miR expressziója egymással összefüggést mutat, és a reperfúzió során a késői időszakban a reperfúziós károsodás fenntartó fázisában emelkedik. Szöveti mikro-sorozat (Tissue Microarray: TMA) vizsgálatok segítségével a két azonosított miR számos potenciális apoptózist szabályozó fehérje (PTEN, PDCD4) targetjét valamint a vese regenerációját (CyclinD1, Ki-67) szabályozó fehérjék expresszióját vizsgáltuk.

A miR-21 validált targetjei között szerepelnek hősokk fehérjék, melyek közül a HSP70 és HSP90 szerepét vizsgáltuk vese endotoxinnal történő prekondicionálásában. Eredményeinket a Plos One c. Folyóiratban közzétettük.

2013-ban a miR-17 és a miR-21 mikro RNS-ek vese ischemia-reperfúziója során megfigyelt összefüggések további vizsgálataink eredményeit a Nucleic Acid Therapies c. folyóiratban közzétettük, mely közlemény alapját képezi az első szerző Kaucsár Tamás PhD dolgozatának. A két mikro RNS feltételezett egymásra hatását jelenleg sejtkultúrán és a miR-17 és miR-21 funkcióját gátló locked nucleic acid (LNA) in vivo kezeléssel vizsgáljuk. Ezen munkák folytatásához, befejezéséhez kértük egy kutató (Kaucsár Tamás) megbízásával történő alkalmazására átcsoportosítani a személyi kereten keletkezett maradványt. A funkcionális vizsgálatokból jelenleg írjuk a közleményt.

Az NGAL tubulus-károsodás markerként alkalmazása vese ischemia-reperfúziós károsodása során:

2011-ben vizsgáltuk az újonnan leírt tubuláris károsodás marker (NGAL) szerepét, és immunhisztokémiai és qPCR vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az NGAL tubuláris sejtekben megfigyelhető expressziója szorosan koreláll a tubuluskárosodás mértékével.

2012-ben megfigyeltük, hogy az NGAL tubuláris sejtekben történő expressziója szorosan korelállt a tubulus károsodás mértékével a korábbi állatkísérleti minták mellett a szegedi egyetemen gyűjtött 200 vesetranszplantált beteg mintáin is.

2013-ban a különböző modelleken szerzett tapasztalataink alapján kiderült, hogy a vese-károsodásra legspecifikusabb marker a vizeletben és a vérben mért NGAL hányadosa. Eredményeinkből írt publikáció elkészült.

A reperfúziós károsodásban fontos szerepet játszó oxidatív stressz forrásainak vizsgálata:

2011-ben a xantin oxidáz és NADPH-oxidázok közül a vesére jellemző 2. és 4. izotípus (NOX-2,4) expressziója vese ischemia reperfúziót követően nem változott számottevően, és expressziójuk gátlása siRNS-el nem védett a vese károsodásától. Ugyanakkor a xantin oxidáz farmakológiai gátlása hatékony védelmet jelentett. Ezen eredményeinkből készülő publikáció anyagát az RNS-interferencia konferencián mutattuk be Münchenben.

2012-ben a vese-oxidázok szerepét tovább vizsgálva granulocita adhézións molekula depletált (CD-18 KO) és granulocita depletált egerekben sem találtunk jelentős funkcionális javulást vese-ischemiát követően. Csak a xantin oxidáz farmakológiai gátlásával tudtunk védelmet elérni. Jelenleg az oxidatív stressz mérésének módszereit állítjuk be.

2013-ban a NADPH-oxidáz izoformák siRNS-el történő gátlása kutatási témából jelenleg készül a közlemény.

Ischemiás kontraszt nefropátia patomechanizmusának vizsgálata:

A röntgen kontraszt anyag okozta akut vese károsodás (CI-AKI) gyakori klinikai problémává vált az invazív kardiológia térhódítása következtében. Ezért 2012-től a Semmelweis Egyetem Karidológiai Központjának munkatársaival közösen beállítottunk egy egér-modellt az ischemiás vesekárosodás talaján kialakuló kontraszt-nefropátia patomechanizmusának vizsgálatára.

2013-ban végzett kísérleteink több eredménye is alátámasztja, hogy a CI-AKI patomechanizmusában az ozmotikus tubulus károsodás fontos szerepet játszik.

A kis nem-kódoló RNS-ek terápiás alkalmazásának mellékhatás-vizsgálata

2011-ben az RNS interferencia lehetséges off-target, interferon választ indukáló mellékhatásáról kimutattuk, hogy in vivo egér-modellünkben nem jelentkezik. Eredményeinket a Nucleic Acid Therapies c. folyóiratban közzétettük.

A kutatás témájában továbbá 2 összefoglaló közleményünk jelent meg a Gene Therapy Application és az Acta Physiologica Hungarica c. folyóiratokban.

A vese ischemiás károsodásához hasonló patomechanizmusú tubuláris károsodást okozó **toxikus vesekárosodás** modellekben (cisplatin, adriamicin) vizsgáltuk egy korábban azonosított (Kökény, Hamar: Nephrol. Dial Transplant, 2010) rezisztens patkánytörzsben fibrózis asszociálta mikro RNS-ek szerepét és egy antioxidáns kezelés szerepét (Máthé, Szénási, Hamar, Albert: Hum Exp Toxicol, 2013).

2012-2013-ban az adriamicin toxicitás iránti rezisztencia hátterében a podociták jobb antioxidáns választását sikerült több módszerrel igazolni. Eredményeinkből írt közleményt most küldtük be az

American Journal of Pathology-nak, ami az első szerző: Szalay Csaba PhD dolgozatának alapját is képezi.

A kutatás témájában továbbá 1 felkérésre írt összefoglaló közleményünk jelent meg a Nucleic Acid Therpies (IF: 2,797) c. folyóiratban.

PhD képzés:

A beszámolási időszakban a pályázó (Hamar Péter) témavezetésével és az OTKA támogatással folytatott kísérletek alapján 2 PhD hallgató (Buday Anna és Rác Zsuzsanna) szerzett fokozatot és 2 PhD hallgató (Kaucsár Tamás és Szalay Csaba) szerzett abszolutóriumot.

Közlemények:

A beszámolási időszakban 27 közleményünk jelent meg (IF: 91.56), melyből 11 a pályázat témájában (1-11, IF: 38.914) ebből 3 eredeti közlemény (1-3, IF: 9.128). Továbbá német partnerünkönél (Lorenzen, Thum) végzett kutatás eredményeként Kaucsár Tamás résztvevőnek megjelent további 1 eredeti közleménye jelen pályázat témájában (IF: 9.466). (Lorenzen JM, Kaucsár T: MicroRNA-24 Antagonism Prevents Renal Ischemia Reperfusion Injury., J Am Soc Nephrol, 2014)

- 1) Kaucsár T, Revesz C, Godó M, Krenacs T, Albert M, Szalay C, Rosivall L, Benyo Z, Batkai S, Thum T, Szénási G, Hamar P: Activation of the miR-17 Family and miR-21 During Murine Kidney Ischemia-Reperfusion Injury., NUCLEIC ACID THERAPEUTICS 23:(5) pp. 344-354. (2013), IF: 2.797
- 2) Kaucsár T, Bodor C, Godó M, Szalay C, Révész C, Németh Z, Mózes M, Szénási G, Rosivall L, Solti C, Hamar P.: LPS-induced delayed preconditioning is mediated by Hsp90 and involves the heat shock response in mouse kidney., PLoS One., (2014), IF: 3.534
- 3) Racz Z, Godó M, Revesz C, Hamar P: Immune activation and target organ damage are consequences of hydrodynamic treatment but not delivery of naked siRNAs in mice., NUCL ACID THERAP 21: (3) 215-224, (2011), IF:2.797
- 4) Kaucsár T, Racz Z, Hamar P: Post-transcriptional gene-expression regulation by micro RNA (miRNA) network in renal disease, ADV DRUG DELIVER REV 62: (14) 1390-1401, (2010), IF:13.577
- 5) Hamar P: Role of Regulatory Micro RNAs in Type 2 Diabetes Mellitus-Related Inflammation, NUCL ACID THERAP 22: (5) 289-294, (2012), IF: 1.406
- 6) Révész Cs, Kaucsár T, Rác Zs, Godó M, Hamar P: Silencing oxidases with RNAi does not prevent renal ischemia/reperfusion injury in mice, RNAi & miRNA Europe, (2011), absztrakt
- 7) Kaucsár T, Révész Cs, Godó M, Tarszabó R, Rác Zs, Hamar P: MicroRNA expression pattern in renal ischemia-reperfusion injury, RNAi & miRNA Europe (2011) absztrakt
- 8) Stokman G, Qin Y, Racz Z, Hamar P, Price LS: Application of siRNA in targeting protein expression in kidney disease, ADV DRUG DELIVER REV 62: (14) 1378-1389, (2010), IF:13.577

- 9) Revesz Cs, Hamar P: Delivery Methods to Target RNAs in the Kidney., Gene Therapy Applications, InTech, pp. 263-278., (2011) könyvfejezet
- 10) Rácz Zs, Kaucsár T, Hamar P: The huge world of small RNAs: regulating networks of microRNAs, ACTA PHYSIOL HUNG 98: (3) 243-251, (2011), IF: 0.821
- 11) Kaucsár T, Révész Cs, Godó M, Rácz Zs, Tarszabó R Hamar P: A microRNAs-ek szerepe vese ischaemia-reperfúziós károsodásban, Hyperton és Neph 2011;15(suppl 3): s36, (2011), absztrakt
- 12) Buday A, Órsy P, Godó M, Mózes M, Kökény G, Lacza Zs, Koller A, Ungvári Z, Gross ML, Benyó Z, Hamar P: Elevated systemic TGF-beta impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remode, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 299: H386-95., (2010), IF: 3.643
- 13) Rácz Zs, Nagy E, Rosivall L, Szebeni J, Hamar P: Sugar-free, glycine-stabilized intravenous immunoglobulin prevents skin but not renal disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus., Lupus, (2010), IF: 2.244
- 14) Hamar P, Wang M, Godó M, Kökény G, Ouyang N, Heemann U: Lupus nephritis reoccurs following transplantation in the lupus prone mouse., Lupus, 19:175-81, (2010), IF: 2.244
- 15) Kökény G, Németh Z, Godó M, Hamar P: The Rowett rat strain is resistant to renal fibrosis, Nephrol Dial Transpl, 25:1458-62, (2010), IF: 3.568
- 16) Fintha A, Gasparics A, Fang L, Erdei Zs, Hamar P, Mózes M, Kökény G, Rosivall L, Sebe A: Characterization and role of SCAI during renal fibrosis and epithelial-mesenchymal transition, Am J Pathol, (2013), IF:4.890
- 17) Wasik AA, Koskelainen S, Hyvönen ME, Musante L, Lehtonen E, Koskeniemi K, Tienari J, Vaheri A, Kerjaschki D, Szalay C, Révész C, Varmanen P, Nyman TA, Hamar P, Holthöfer H, Lehtonen S.: Ezrin is down-regulated in diabetic kidney glomeruli and regulates actin reorganization and glucose uptake via GLUT1 in cultured podocytes., Am J Pathol., (2014), IF: 4.602
- 18) Fugmann T, Borgia B, Révész C, Godó M, Forsblom C, Hamar P, Holthöfer H, Neri D, Roesli C: Proteomic identification of vanin-1 as a marker of kidney damage in a rat model of type 1 diabetic nephropathy., KIDNEY INT 80: (3) 272-281, (2011), IF: 6.606
- 19) Máthé Cs, Szénási G, Sebestény A, Blázovics A, Szentmihályi K, Hamar P, Albert M: Protective effect of CV247 against cisplatin nephrotoxicity in rats, Hum Exp Toxicol, (2013), IF: 1.772
- 20) Masszi G, Horvath EM, Tarszabo R, Benko R, Novak A, Buday A, Tokes AM, Nadasy GL, Hamar P, Benyó Z, Varbiro S.: Reduced estradiol-induced vasodilation and poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in the aortas of rats with experimental polycystic ovary syndrome (PCOS)., PLoS One, (2013), IF: 3.534
- 21) Masszi G, Buday A, Novak A, Horvath EM, Tarszabo R, Sara L, Revesz C, Benko R, Nadasy GL, Benyó Z, Hamar P, Varbiro S.: Altered insulin-induced relaxation of aortic rings in a dihydrotestosterone-induced rodent model of polycystic ovary syndrome., Fertil Steril, (2013), IF: 4.295
- 22) Masszi G, Benko R, Csibi N, Horvath EM, Tokes AM, Beres NJ, Tarszabo R, Buday A, Repas Cs, Bekesi G, Patocs A, Nadasy GyL, Hamar P, Benyo Z, Varbiro Sz: Endothelial

- relaxation mechanisms and nitrate stress is partly restored by Vitamin D3 therapy in a rat model of polycystic ovary syndrome, *LIFE SCIENCES*, (2013), IF: 2.296
- 23) Masszi G, Novak A, Tarszabo R, Horvath EM, Buday A, Ruisanchez E, Tokes AM, Sara L, Benko R, Nadasy GL, Revesz Cs, Hamar P, Benyó Z, Várbiro Sz: Effects of vitamin D3 derivate calcitriol on pharmacological reactivity of aortic rings in a rodent PCOS model, *Pharmacol Rep*, (2013), IF: 2.445
- 24) Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, Monos E, Nadasy GL, Várbiro S: Arteriolar insulin resistance in a rat model of polycystic ovary syndrome., *FERTILITY AND STERILITY* 97:(2) pp. 462-468., (2012), IF: 3.958
- 25) Saleh HM, Koeleman B, Szénási G, Rosivall L, Hamar P: Association of CTLA-4 Polymorphisms with Type 1 Diabetes in the Egyptian Population, *J Diabetes Metab*, (2013), IF: 3.380
- 26) Tóth A, Kocsis B, Damjanova I, Kristóf K, Jánvári L, Pászti J, Csercsik R, Topf J, Szabó D, Hamar P, Nagy K, Füzi M.: Fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones is diverse across clones of *Klebsiella pneumoniae* and may select for CTX-M-15 type extended-spectrum β -lactamase., *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, (2014), IF: 2.544
- 27) Baintner K, Kocsis B, Kovács K, Péterfi Z, Kökény G, Hamar P: Interaction of concanavalin A with bacterial lipopolysaccharides in agarose gel., *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 58: pp. 201-209., (2011), IF: 0.625