



**Πανεπιστήμιο  
Κύπρου**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΣΥΝΔΡΟΜΟ ALPORT ΚΑΙ**

**ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ:**

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΥΟ ΝΕΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ**

**ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΚΥΠΡΙΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΣΑΒΕΛΛΑ ΣΑΒΒΑ**

**2020**



**Πανεπιστήμιο  
Κύπρου**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΣΥΝΔΡΟΜΟ ALPORT ΚΑΙ**

**ΝΕΦΡΟΠΑΘΕΙΑ ΤΗΣ ΛΕΠΤΗΣ ΒΑΣΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ:**

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΥΟ ΝΕΩΝ ΖΩΙΚΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ**

**ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΚΥΠΡΙΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ**

**ΙΣΑΒΕΛΛΑ ΣΑΒΒΑ**

**Διατριβή η οποία υποβλήθηκε προς απόκτηση διδακτορικού  
τίτλου σπουδών στο Πανεπιστήμιο Κύπρου**

**Δεκέμβριος 2020**

ΙΣΑΒΕΛΛΑ ΣΑΒΒΑ

## ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΥΡΟΤΗΤΑΣ

**Υποψήφια Διδάκτορας: Ισαβέλλα Σάββα**

**Τίτλος Διατριβής: Σύνδρομο Alport και Νεφροπάθεια της Λεπτής Βασικής Μembrάνης: Χαρακτηρισμός δύο νέων ζωικών μοντέλων και μελέτες σε Κύπριους ασθενείς**

*Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για απόκτηση Διδακτορικού Διπλώματος στο **Τμήμα Βιολογικών Επιστημών** και εγκρίθηκε στις 3 Δεκεμβρίου 2020 από τα μέλη της **Εξεταστικής Επιτροπής**.*

**Εξεταστική Επιτροπή:**

**Ερευνητικός Σύμβουλος:** Κωνσταντίνος Δέλτας

Καθηγητής

**Μέλος Επιτροπής:** Παντελής Γεωργιάδης

Αναπληρωτής Καθηγητής

**Μέλος Επιτροπής:** Κυπρούλα Χριστοδούλου

Καθηγήτρια

**Μέλος Επιτροπής:** Σταύρος Μαλάς

Καθηγητής

**Μέλος Επιτροπής:** Ιωάννης Μπολέτης

Καθηγητής

## ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ

Η παρούσα διατριβή υποβάλλεται προς συμπλήρωση των απαιτήσεων για απονομή Διδακτορικού Τίτλου του Πανεπιστημίου Κύπρου. Είναι προϊόν πρωτότυπης εργασίας αποκλειστικά δικής μου, εκτός των περιπτώσεων που ρητώς αναφέρονται μέσω βιβλιογραφικών αναφορών, σημειώσεων ή και άλλων δηλώσεων.

.....

.....

ΙΣΑΒΕΛΛΑ ΣΑΒΒΑ

## Περίληψη

Το σύνδρομο Alport (ΣΑ) είναι είδος κληρονομικής νεφροπάθειας που οδηγεί αναπόφευκτα σε τελικό στάδιο χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (ΤΣΧΝΑ) και μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία για αυτό. Οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια *COL4A3*, *COL4A4* και *COL4A5* τα οποία κωδικοποιούν για τις α3, α4 και α5 αλυσίδες αντίστοιχα του κολλαγόνου τύπου IV, το οποίο αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ). Το 85% των περιπτώσεων παρουσιάζουν φυλοσύνδετη κληρονόμηση, ενώ το 15% κληρονομείται κατά τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα. Οι ετερόζυγοι φορείς του αυτοσωματικού υπολειπόμενου Alport πάσχουν από τη Νεφροπάθεια της Λεπτής Βασικής Μεμβράνης (ΝΛΒΜ). Τα νοσήματα αυτά χαρακτηρίζονται από σημαντική γενετική και φαινοτυπική ετερογένεια.

Παρά το γεγονός ότι οι πλείστες μεταλλάξεις που ευθύνονται για το σύνδρομο Alport αφορούν στην αντικατάσταση ενός μονήρους αμινοξέος, εντούτοις απουσιάζει μέχρι στιγμής από τη βιβλιογραφία η λεπτομερής περιγραφή ενός knockin μοντέλου ποντικού για το ΣΑ. Στη μελέτη αυτή έγινε πλήρης φαινοτυπική ανάλυση δύο μοντέλων ποντικού για το ΣΑ. Πρόκειται για ένα knockin μοντέλο το οποίο φέρει την παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη *Col4a3-p.G1332E* και ένα σύνθετο ετερόζυγο μοντέλο το οποίο φέρει την *Col4a3-p.G1332E* και ένα *Col4a3* knocked out αλληλόμορφο. Η μετάλλαξη αυτή είναι η ομόλογη της *COL4A3-p.G1334E* στον άνθρωπο και συναντάται ιδιαίτερα συχνά ανάμεσα στους Κύπριους ετεροζυγώτες φορείς μεταλλάξεων στα *COL4A* γονίδια, ως αποτέλεσμα του φαινομένου του ιδρυτή. Παράλληλα, πολλοί ασθενείς με ΣΑ είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες φορείς μεταλλάξεων στα *COL4A3*, *COL4A4* και *COL4A5* γονίδια.

Τα ευρήματα από τη μελέτη των δύο ζωικών μοντέλων είναι συμβατά με τα χαρακτηριστικά του ΣΑ (μειωμένη επιβίωση, διαταραχή των βιοχημικών δεικτών στο αίμα και τα ούρα ενδεικτική νεφρικής νόσου, ιστολογικά ευρήματα αυξημένης ίνωσης στα σπειράματα και στο διαμεσοσωληναριακό ιστό και χαρακτηριστικές παθολογικές για το ΣΑ ανωμαλίες της ΣΒΜ κατά τη μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα από τα πειράματα ανοσοφθορισμού σε κρυοτομές νεφρικού ιστού και από τις μελέτες ανοσοαποτύπωσης, τα οποία δεικνύουν ότι τα ποδοκύτταρα εκκρίνουν το μεταλλαγμένο α3α4α5 τριμερές στη ΣΒΜ αλλά αυτό πιθανότατα στη συνέχεια διασπάται. Η αποτελεσματική έκκριση των μεταλλαγμένων τριμερών μορίων κολλαγόνου IV στη ΣΒΜ πιθανώς να σχετίζεται με τον ηπιότερο φαινότυπο που παρουσιάζουν τα δύο αυτά μοντέλα ποντικού σε σχέση με τον *Col4a3*

knockout ποντικό που περιγράφηκε στο παρελθόν. Φαίνεται ότι η παρουσία του ελαττωματικού α3α4α5 τριμερούς “σώζει” εν μέρει το φαινότυπο σε σχέση με την πλήρη απουσία του από τη ΣΒΜ.

Επιπρόσθετα, έγινε στρατολόγηση Κύπριων ασθενών με ετερόζυγες μεταλλάξεις στα *COL4A3/COL4A4* γονίδια και ΝΛΒΜ και πλήρης κλινικο-εργαστηριακός χαρακτηρισμός τους, σε δύο χρονικά σημεία με διαφορά 2,5 ετών μεταξύ τους. Έγινε ταξινόμηση των ασθενών ανάλογα με το στάδιο σοβαρότητας της νόσου τους, με βάση την παρουσία επηρεασμένης νεφρικής λειτουργίας ή/και κλινικά σημαντικής πρωτεϊνουρίας. Επιβεβαιώθηκε για άλλη μια φορά ότι στον κυπριακό πληθυσμό η ΝΛΒΜ δεν αποτελεί μία καλοήγη νόσο και ότι η νεφρική αυτή οντότητα χαρακτηρίζεται από αργή εξέλιξη, παρέχοντας το περιθώριο για θεραπευτική παρέμβαση.

Παράλληλα, από τους εν λόγω ασθενείς έγινε συλλογή αίματος προς απομόνωση DNA, ορού και πλάσματος και συλλογή ούρων. Το βιολογικό υλικό φυλάχθηκε στη Βιοτράπεζα του Πανεπιστημίου Κύπρου και σε συνδυασμό με τον άρτιο φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των ασθενών, αναδεικνύεται πολύτιμο για μελλοντική ανεύρεση τροποποιητικών γονιδίων και διαγνωστικών/προγνωστικών βιοδεικτών.

## Abstract

Alport syndrome (AS) is a hereditary nephritis leading inevitably to end stage renal disease. Until today there is no effective treatment for it. It is attributed to mutations in the *COL4A3*, *COL4A4* and *COL4A5* genes, coding for  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  and  $\alpha 5$  chains of collagen type IV respectively. Collagen type IV is one of the main components of the glomerular basement membrane (GBM). 85% of AS cases show an X-linked type of inheritance and 15% an autosomal recessive one. Heterozygous carriers of the autosomal recessive AS have Thin Basement Membrane Nephropathy (TBMN). Collagen IV diseases are characterized by significant genetic and phenotypic heterogeneity.

Despite the fact that most of the mutations causing AS are missense mutations, a detailed phenotypic analysis of a knockin mouse model for AS is absent from the literature. In this study we present a thorough analysis of two AS mouse models. The first one is a knockin model carrying the *Col4a3-p.G1332E* missense mutation and the second one is a compound heterozygous model carrying the *Col4a3-p.G1332E* and a *Col4a3* knocked out allele. This mutation is the homologous of the *COL4A3-p.G1334E* in humans, which is very frequent among the Cypriot heterozygous carriers of *COL4A* mutations, as a result of a founder effect. Furthermore, many AS patients are compound heterozygotes for mutations in the *COL4A3*, *COL4A4* and *COL4A5* genes.

The findings from the two mouse models are compatible with AS kidney characteristics (reduced survival, impaired biochemical markers in blood and urine indicative of kidney disease, histological findings of increased fibrosis of the glomeruli and tubulointerstitial tissue and the pathognomonic ultrastructural findings of the GBM). Of special interest are the findings from the immunofluorescence studies on kidney sections and western blot results, where it is shown that the podocytes effectively secrete the mutant  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  protomer to the GBM, which is then probably cleaved. The effective secretion of the mutant type IV collagen molecules to the GBM is probably associated with the milder phenotype exhibited by the two mouse models compared to the *Col4a3* knockout model described in the past. It seems that the presence of the defective  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  partly “rescues” the phenotype compared to the total absence of it from the GBM.

Additionally, recruitment of Cypriot patients with heterozygous *COL4A3/COL4A4* mutations and TBMN was performed. These patients were fully characterized based on clinical and laboratory findings at two time points, 2,5 years apart. Furthermore, a classification of their kidney disease severity was done based on the presence of impaired



kidney function and/or clinically significant proteinuria. Once more it was confirmed that TBMN in Cypriots is not a benign condition and its' progression is slow, giving the chance for therapeutic interventions.

In parallel, blood for DNA, serum and plasma isolation was collected as well as urine samples. The biological material was stored at the Biobank of the University of Cyprus. Combined with the meticulous phenotypic analysis of the TBMN patients, this material proves to be valuable for future use in finding modifier genes and diagnostic/prognostic biomarkers.

ΚΑΒΕΝΝΑΣΑΒΒΑ

## Ευχαριστίες

Ο δρόμος ήτανε μακρύς και η διαδικασία επίπονη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου όλους όσους στάθηκαν πλάι μου, με όποιο τρόπο κι αν το έκανε ο καθένας.

Το πρώτο και μεγαλύτερο ευχαριστώ απευθύνεται στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, Κωνσταντίνο Δέλτα. Η υποστήριξή του ήταν έμπρακτη και αδιάλειπτη και η ενθάρρυνσή του συνεχής. Ευχαριστώ που πιστέψατε σε εμένα. Αποτελείτε παράδειγμα προς μίμηση για κάθε νέο επιστήμονα.

Ευχαριστώ επίσης τους συνεργάτες μας στην Ελλάδα και στο εξωτερικό: Δρ Κώστα Στυλιανού, Dr Dorin-Bogdan Borza, Dr Danica Galesic Ljubanovic, Dr Oliver Gross. Η συμβολή τους για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής ήταν ουσιαστική.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Δρ Μυρτάνη Πιερή, Δρ Κωνσταντίνο Βοσκαρίδη, Δρ Γρηγόρη Παραγρηγορίου και Δρ Χάρη Στεφάνου. Η συνεχής σας καθοδήγηση και η πολύπλευρη υποστήριξη που έλαβα από εσάς είναι ανεκτίμητη. Να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στους Δρ Χριστόφορο Οδιάτη και Παύλο Ιωάννου, χωρίς τους οποίους όλα θα ήταν πολύ πιο δύσκολα. Ευχαριστώ επίσης τον Χρήστο Καραϊσκό για την υποστήριξη του στις εγκαταστάσεις των ποντικών, αλλά και τους Δρ Νεοκλή Μακρίδη και Δρ Απόστολο Μαλατρά για όλη τη βοήθεια. Ευχαριστώ όλα τα λοιπά μέλη του εργαστηρίου, αποτελέσατε για εμένα μία νέα οικογένεια.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στο νεφρολόγο Δρ Κυριάκο Ιωάννου, τον πρώτο ίσως συνεργάτη που με παρακίνησε να ασχοληθώ με τον τομέα της έρευνας. Η αφοσίωσή του στον πάσχοντα, η ανάγκη για συνεχή επιμόρφωση και η ακούραστη μεταλαμπάδευση της γνώσης αποτέλεσε για εμένα καθημερινό παράδειγμα προς μίμηση.

Τέλος, ένα ακόμη μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, παρόντες και απόντες, για όλη την αγάπη και τη συμπαράσταση που απλόχερα μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια.

*Αφιερώνω τη διδακτορική μου διατριβή στα δύο μου παιδιά, Ελένη και Γεωργία.*

*Στα μάτια τους βλέπω την ελπίδα για ένα καλύτερο αύριο*

ΙΣΑΒΕΛΛΑ ΣΤΑΥΡΩΒΑ

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	iii
Abstract .....	v
Ευχαριστίες .....	vii
Περιεχόμενα .....	ix
Λίστα με εικόνες .....	xii
Λίστα με πίνακες .....	xiv
Συντομογραφίες .....	xv
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή .....	1
1.1 Δομή και λειτουργία του νεφρού .....	1
1.2 Γενικά για το Σύνδρομο Alport .....	2
1.3 Δομή Κολλαγόνου .....	4
1.4 Γενετική του Συνδρόμου Alport .....	6
1.5 Διάγνωση – Ιστοπαθολογικά ευρήματα .....	8
1.6 Διάγνωση στην εποχή της μοριακής γενετικής – Συσχέτιση με ΕΤΣΣ .....	10
1.7 Φαινοτυπική ετερογένεια – Δράση τροποποιητικών γονιδίων .....	11
1.8 Ζωικά μοντέλα ποντικού .....	13
1.9 Καινοτόμοι τρόποι αντιμετώπισης του ΣΑ και αναστολείς του Άξονα Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης-Αλδοστερόνης (ΑΡΑΑ) .....	19
Κεφάλαιο 2: Επιστημονική Υπόθεση και Ειδικό Στόχο .....	22
Κεφάλαιο 3: Μεθοδολογία για μελέτες σε ποντίκια .....	24
3.1 Μοντέλα Ποντικού .....	24
3.2 Γονοτύπηση ποντικών .....	24
3.3 Αξιολόγηση πρωτεϊνουρίας/αιματοουρίας και βιοχημικών παραμέτρων στον ορό .....	27
3.4 Απομόνωση σπειραμάτων .....	28
3.5 Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεΐνης από σπειράματα και από δείγματα ολικού νεφρού .....	29
3.6 Εξέταση νεφρικού ιστού σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο .....	30
3.7 Απομόνωση νεφρικού ιστού για περαιτέρω ιστολογικές εξετάσεις .....	30
3.8 Έγκλειση νεφρικού ιστού σε παραφίνη .....	31
3.9 Κρυτομές νεφρικού ιστού για πειράματα ανοσοφθορισμού .....	31
3.10 Χρώσεις σε τομές παραφίνης για εξέταση νεφρικού ιστού σε οπτικό μικροσκόπιο .....	32

3.11	Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης.....	32
3.12	Τριχρωμική χρώση Masson's.....	33
3.13	Periodic Acid-Schiff (PAS) χρώση .....	33
3.14	Sirius Red χρώση.....	33
3.15	Ανοσοαποτύπωση (Western Blot).....	33
3.16	Στατιστική ανάλυση .....	35
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα από τις μελέτες στα ποντίκια .....		36
4.1	Αυξημένη αλβουμινουρία στα ομόζυγα knockin ( <i>Col4a3</i> mut/mut) και σύνθετα ετερόζυγα ( <i>Col4a3</i> mut/-) ποντίκια η οποία επιδεινώνεται με την αυξανόμενη ηλικία .....	36
4.2	Υψηλές συγκεντρώσεις κρεατινίνης και ουρίας ορού παρατηρούνται σε ένα υποσύνολο ποντικών με <i>Col4a3</i> μετάλλαξη .....	37
4.3	Πάχυνση και διάσπαση της ΣΒΜ στα <i>Col4a3</i> mut/mut και <i>Col4a3</i> mut/- σε εικόνες στο ΗΜ .....	39
4.4	Ίνωση νεφρικού ιστού στα ποντίκια με <i>Col4a3</i> μετάλλαξη .....	40
4.5	Η διάρκεια ζωής των <i>Col4a3</i> μεταλλαγμένων ποντικών είναι σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με τα wild type ποντίκια .....	42
4.6	Μειωμένη έκφραση των <i>Col4a3</i> , α4, α5 αλυσίδων στα νεφρικά σωληνάρια των <i>Col4a3</i> mut/mut και <i>Col4a3</i> mut/- ποντικών.....	43
4.7	Τα ποδοκύτταρα εκκρίνουν αποτελεσματικά το μεταλλαγμένο κολλαγόνο τύπου IV .....	44
4.8	Μειωμένα επίπεδα α αλυσίδων σε πρωτεΐνη από ολικό νεφρό από μεταλλαγμένα ποντίκια. Στα σπειράματα οι τύπου IV κολλαγονικές αλυσίδες εκφράζονται φυσιολογικά αλλά πιθανώς διασπώνται .....	48
4.9	Πιθανή συσχέτιση της ενεργοποίησης της MMP-9 πρωτεΐνης με τη διάσπαση του μεταλλαγμένου Col4 πρωτομερούς .....	50
Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογία για μελέτες στον άνθρωπο .....		52
5.1	Δειγματοληψία αίματος και ούρων .....	53
5.2	Απομόνωση DNA από ολικό αίμα.....	53
5.3	Απομόνωση πλάσματος από ολικό αίμα.....	54
5.4	Απομόνωση ορού από ολικό αίμα .....	54
5.5	Επεξεργασία δειγμάτων ούρων.....	54
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα από μελέτες στον άνθρωπο .....		56
6.1	Συσχέτιση με τη σοβαρότητα και τον επιπολασμό της νόσου σε άντρες και γυναίκες.....	57
6.2	Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το σωματικό βάρος και το δείκτη μάζας σώματος.....	58

6.3	Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού αρτηριακής υπέρτασης.....	59
6.4	Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το κάπνισμα .....	60
6.5	Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού υπερλιπιδαιμίας και στεφανιαίας νόσου .....	60
	Κεφάλαιο 7: Συζήτηση .....	62
	Συμπέρασμα.....	71
	Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	72
	Παράρτημα .....	80

ΙΣΑΒΕΛΛΑ ΣΑΒΒΑ

## Λίστα με εικόνες

Εικόνα 1: Νεφρός, σπείραμα και φραγμός σπειραματικής διήθησης .....	2
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του ΦΣΔ.....	3
Εικόνα 3: Σχηματισμός τριπλών ελίκων από τις α αλυσίδες του κολλαγόνου τύπου IV .....	4
Εικόνα 4: Δημιουργία του τύπου IV κολλαγονικού δικτύου.....	5
Εικόνα 5: Σχηματική παράσταση της εντόπισης και της οργάνωσης των γονιδίων του κολλαγόνου τύπου IV, των πρωτεϊνικών παραγώγων τους και του σχηματισμού πρωτομερών.....	7
Εικόνα 6: Το πλήρες εύρος του φαινότυπου των ετερόζυγων φορέων αυτοσωματικών υπολειπόμενων μεταλλάξεων στα <i>COL4A3/A4</i> παρουσιάζεται ως πολυπαραγοντική νόσος.....	13
Εικόνα 7: Αλληλούχηση κατά Sanger και επιτυχής χαρακτηρισμός του γονότυπου του <i>Col4a3-G1332E</i> knockin μοντέλου ποντικού.....	26
Εικόνα 8: Γονοτύπηση του <i>Col4a3</i> knockout μοντέλου ποντικού-Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR.....	27
Εικόνα 9: Απομόνωση σπειραμάτων.....	29
Εικόνα 10: Αυξημένη αλβουμινουρία στα σύνθετα ετερόζυγα ( <i>col4a3</i> mut/-) ποντίκια συγκριτικά με τα wild type ποντίκια.....	37
Εικόνα 11: Αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης κρεατινίνης και ουρίας ορού σε ένα υποσύνολο <i>Col4a3</i> mut/mut και <i>Col4a3</i> mut/- ποντικών.....	38
Εικόνα 12: Η εικόνα στο ΗΜ της ΣΒΜ των <i>Col4a3</i> mut/mut και <i>Col4a3</i> mut/- ποντικών συνάδει με την τυπική εικόνα του ΣΑ.....	39
Εικόνα 13Α: Τα <i>Col4a3</i> μεταλλαγμένα ποντίκια παρουσιάζουν μέτρια μέχρι σοβαρή ίνωση σε δείγματα νεφρικού ιστού.....	41
Εικόνα 13 Β, C, D: Western blot ανάλυση των προϊνωτικών δεικτών TGF-β1 και Acta2.....	42
Εικόνα 14: Η διάρκεια ζωής των <i>Col4a3</i> μεταλλαγμένων ποντικών είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα wild type ποντίκια.....	43
Εικόνα 15: Η κατανομή των τύπου IV κολλαγονικών αλυσίδων α3, α4 και α5 εμφανίζεται μειωμένη στα σωληνάρια των <i>Col4a3</i> mut/mut και <i>Col4a3</i> mut/- ποντικών.....	44
Εικόνα 16: Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού δεικνύει τον συνεντοπισμό των πρωτεϊνών <i>Col4a3</i> και laminin στη ΣΒΜ των <i>Col4a3</i> mut/mut και <i>Col4a3</i> mut/- ποντικών.....	46
Εικόνα 17: Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού δεικνύει την απουσία συνεντοπισμού των πρωτεϊνών <i>Col4a3</i> και synaptopodin στα σπειράματα των <i>Col4a3</i> mut/mut και <i>Col4a3</i> mut/- ποντικών.....	47

Εικόνα 18: Μειωμένη έκφραση των α3, α4 και α5 αλυσίδων σε εκχυλίσματα από ολικό νεφρό και εμφάνιση ενός μικρού Col4 πρωτεϊνικού τμήματος σε πειραματικά εκχυλίσματα των <i>Col4a3</i> μεταλλαγμένων ποντικών.....	49
Εικόνα 19: Σχηματικό διάγραμμα το οποίο επισημαίνει τα σημεία αναγνώρισης των δύο anti-Col4a3 αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.....	50
Εικόνα 20: Αξιολόγηση με ανοσοαποτύπωση των επιπέδων του 35 kDa τμήματος της Col4a3 αλυσίδας και των μεταλλοπρωτεϊνών MMP-9 και MMP-3, με την αύξηση της ηλικίας των μεταλλαγμένων ποντικών.....	51
Εικόνα 21: Συσχέτιση με τη σοβαρότητα και τον επιπολασμό της νόσου σε άντρες και γυναίκες.....	59
Εικόνα 22: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το σωματικό βάρος.....	60
Εικόνα 23: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το δείκτη μάζας σώματος.....	60
Εικόνα 24: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού αρτηριακής υπέρτασης.....	61
Εικόνα 25: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το κάπνισμα.....	61
Εικόνα 26: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού υπερλιπιδαιμίας.....	62
Εικόνα 27: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού στεφανιαίας νόσου.....	62



## Λίστα με πίνακες

Πίνακας 1. Λίστα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.....	34
Πίνακας 2. Ασθενείς με ΝΛΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2013. Ταξινόμηση με βάση το φύλο και τη σοβαρότητα της νόσου τους.....	57
Πίνακας 3. Ασθενείς με ΝΛΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2013. Ταξινόμηση με βάση το φύλο, την ηλικία και τη σοβαρότητα της νόσου τους.....	57
Πίνακας 4. Ασθενείς με ΝΛΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2015/16. Ταξινόμηση με βάση το φύλο και τη σοβαρότητα της νόσου τους.....	57
Πίνακας 5. Ασθενείς με ΝΛΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2015/16. Ταξινόμηση με βάση το φύλο, την ηλικία και τη σοβαρότητα της νόσου τους.....	58
Πίνακας 6. Ασθενείς με ΝΛΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2013 και το 2015/16. Ταξινόμηση με βάση το φύλο και τη σοβαρότητα της νόσου τους.....	58
Πίνακας 7. Ασθενείς με ΝΛΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2013 και το 2015/16. Ταξινόμηση με βάση το φύλο, την ηλικία και τη σοβαρότητα της νόσου τους.....	58

## Συντομογραφίες

αΜΕΑ	αναστολείς του Μετατρεπτικού Ενζύμου της Αγγειοτενσίνης
ΑΡΑΑ	Άξονας Ρενίνης Αγγειοτενσίνης Αλδοστερόνης
ΒΜ	Βασική Μembrάνη
ΕΤΣΣ	Εστιακή Τμηματική Σπειραματοσκλήρυνση
ΕΔ	Ενδοπλασματικό Δίκτυο
ΗΜ	Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο
ΝΑΒΜ	Νεφροπάθεια της Λεπτής Βασικής Μembrάνης
ΣΑ	Σύνδρομο Alport
ΣΒΜ	Σπειραματική Βασική Μembrάνη
ΤΣΧΝΑ	Τελικό Στάδιο Χρόνιας Νεφρικής Ανεπάρκειας
ΦΣΔ	Φραγμός Σπειραματικής Διήθησης

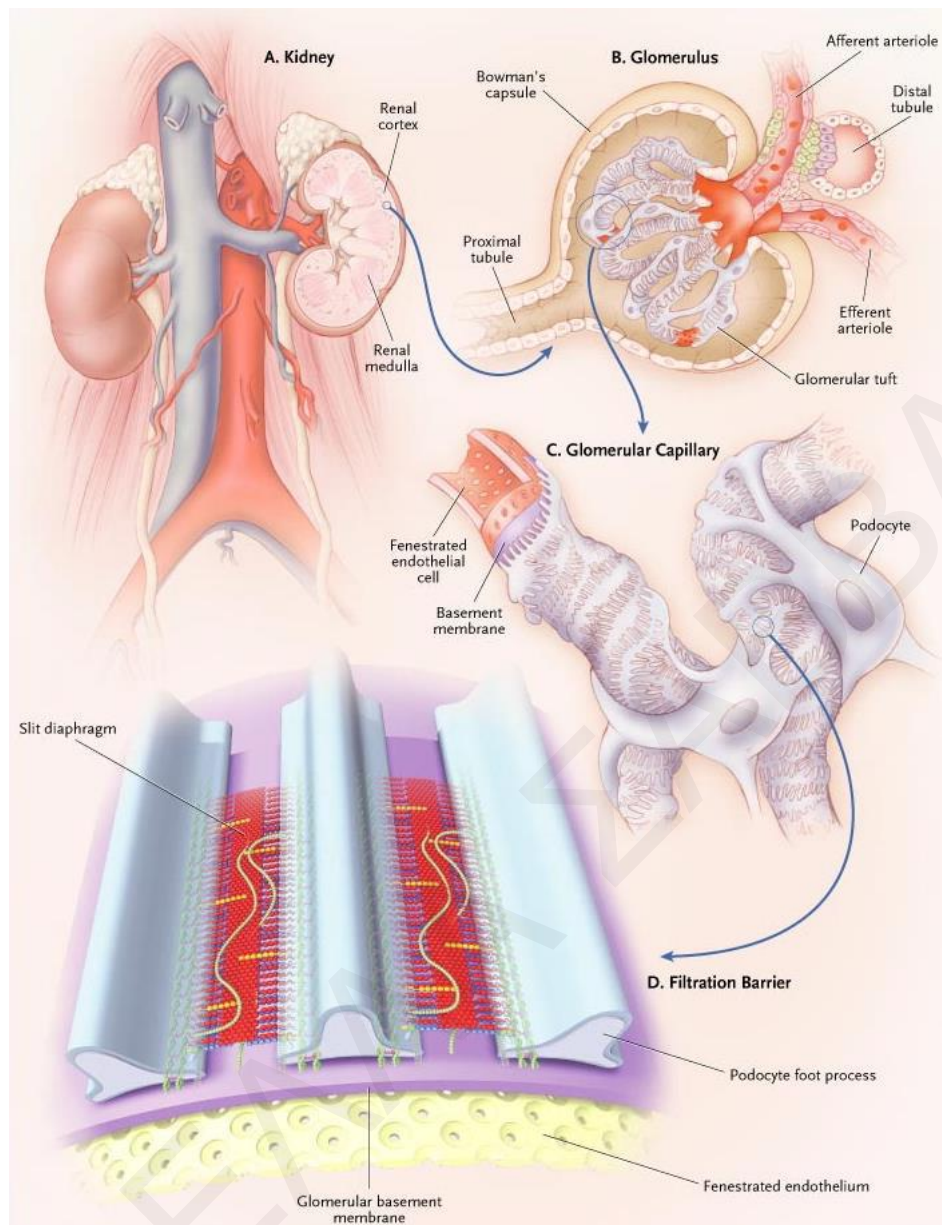
ARAS	Autosomal Recessive Alport Syndrome
AS	Alport syndrome
A-SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
Acta2	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
GBM	Glomerular Basement Membrane
MMP	Metalloproteinase
TBMN	Thin Basement Membrane Nephropathy
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor $\beta$ 1
UPR	Unfolded Protein Response
UACR	Urine Albumin to Creatinine Ratio
XLAS	X-linked Alport Syndrome

# Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

## 1.1 Δομή και λειτουργία του νεφρού

Η λειτουργία των νεφρών αφορά στη διατήρηση της ομοιόστασης του εξωκυττάριου υγρού μέσω εξειδικευμένης κατακράτησης ή απέκκρισης νερού, ηλεκτρολυτών και άλλων μεταβολιτών. Η λειτουργία αυτή επιτελείται μέσω της διήθησης του κυκλοφορούντος αίματος στο σπείραμα, την εκλεκτική επαναρρόφηση νερού και άλλων ουσιών από το σωληναριακό υγρό στο αίμα και την εκλεκτική έκκρισή τους από το αίμα των περισωληναριακών τριχοειδών στο σωληναριακό υγρό. Επιπλέον, οι νεφροί συμβάλλουν στην παραγωγή ή την ενεργοποίηση ορμονών με κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, την ερυθροποίηση και το μεταβολισμό των οστών.

Η δομική και λειτουργική μονάδα των νεφρών είναι ο νεφρώνας και ο κάθε νεφρός αποτελείται από περίπου ένα εκατομμύριο νεφρώνες. Κάθε νεφρώνας αποτελείται από δύο τμήματα: το νεφρικό σωμάτιο όπου γίνεται η διήθηση του πλάσματος και το ουροφόρο σωληνάριο στο οποίο περνάει το διήθημα για να καταλήξει στο αθροιστικό σωληνάριο. Κάθε ουροφόρο σωληνάριο αποτελείται από δομικά και λειτουργικά διακριτά τμήματα: το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Το σπείραμα αποτελείται από ένα θύσανο εξειδικευμένων τριχοειδών αγγείων προσκολλημένων στο μεσάγγειο, τα οποία περικλείονται εντός μίας προέκτασης του σωληναρίου που ονομάζεται κάψα του Bowman. Τα τριχοειδή αγγεία μαζί με το μεσάγγειο καλύπτονται από εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα που ονομάζονται ποδοκύτταρα. Στο ενδιάμεσο των σπειραματικών τριχοειδών και του μεσαγγείου από την μία πλευρά και των ποδοκυττάρων από την άλλη πλευρά, σχηματίζεται η σπειραματική βασική μεμβράνη (ΣΒΜ), (εικόνα 1).



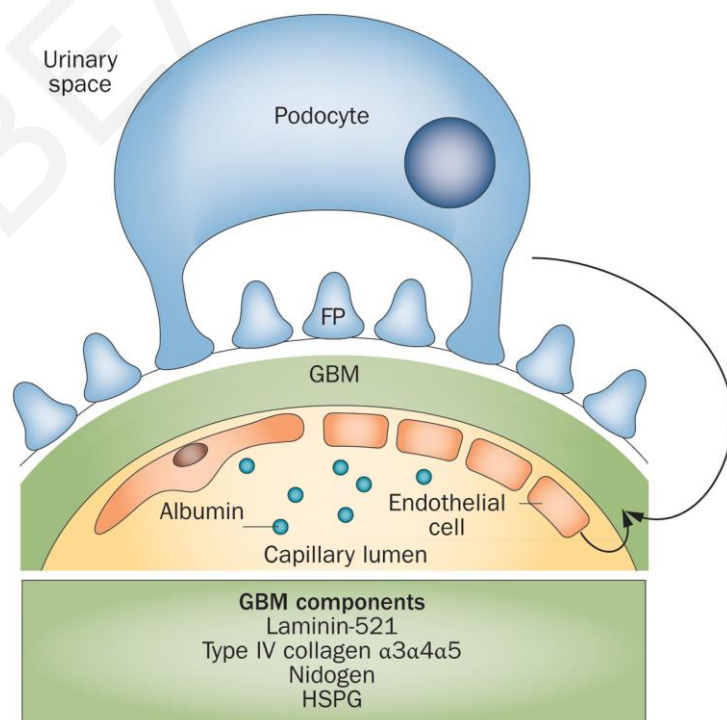
**Εικόνα 1: Νεφρός, σπείραμα και φραγμός σπειραματικής διήθησης.** Τυπικά κάθε ανθρώπινος νεφρός αποτελείται από ένα εκατομμύριο νεφρώνες (Α). Το προσαγωγό αρτηρίδιο εισέρχεται στην κάψα του Bowman και διακλαδίζεται στα τριχοειδή που σχηματίζουν τον αγγειακό θύσανο (Β). Στο φραγμό σπειραματικής διήθησης (ΦΣΔ) πραγματοποιείται η διήθηση του πλάσματος και το παραγόμενο διήθημα οδηγείται προς το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, ενώ το αίμα που δεν έχει διηθηθεί επιστρέφει στην κυκλοφορία μέσω του απαγωγού αρτηριδίου. Ο ΦΣΔ αποτελείται από το θυριδωτό ενδοθήλιο, την ΣΒΜ και τα ποδοκύτταρα με τις ποδοειδείς τους προσεκβολές (Γ). Σχηματική απεικόνιση του ΦΣΔ σε διατομή (Δ). (λήφθηκε από τους Trygvasson et al 2006)

## 1.2 Γενικά για το Σύνδρομο Alport

Ως σύνδρομο Alport ορίζεται ένα κληρονομικό είδος σπειραματονεφρίτιδας, το οποίο συχνά συνοδεύεται από νευροαισθητήρια βαρυκοΐα και οφθαλμικές βλάβες (πρόσθιος φακόκωνος ή/και περιωχρικές κηλίδες). Οι ασθενείς παρουσιάζουν τυπικά μικροσκοπική ή/και μακροσκοπική αιματουρία από την παιδική ηλικία. Με την πάροδο του χρόνου, η εξελισσόμενη νεφρική βλάβη οδηγεί σε πρωτεϊνουρία, επιδείνωση της νεφρικής

λειτουργίας και αναπόφευκτα σε τελικό στάδιο νεφρικής ανεπάρκειας στη 2<sup>η</sup>-4<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής (Kruegel et al., 2013). Για την αντιμετώπιση της νεφρικής νόσου, χρησιμοποιούνται στις μέρες μας συγκεκριμένες φαρμακευτικές ουσίες, όπως οι αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (αΜΕΑ) και οι ανταγωνιστές των υποδοχέων AT<sub>1</sub> της αγγειοτενσίνης II (Gross et al., 2012). Οι ουσίες αυτές παρεμβαίνουν στον άξονα Ρενίνης – Αγγειοτενσίνης – Αλδοστερόνης (ΑΡΑΑ) καθυστερώντας έτσι την εξέλιξη της νεφρικής νόσου, αλλά η αντιμετώπιση αυτή θεωρείται μη ειδική, δεν παρέχει μακράς διάρκειας προστασία και σίγουρα δεν μπορεί να θεωρείται ως “θεραπεία”.

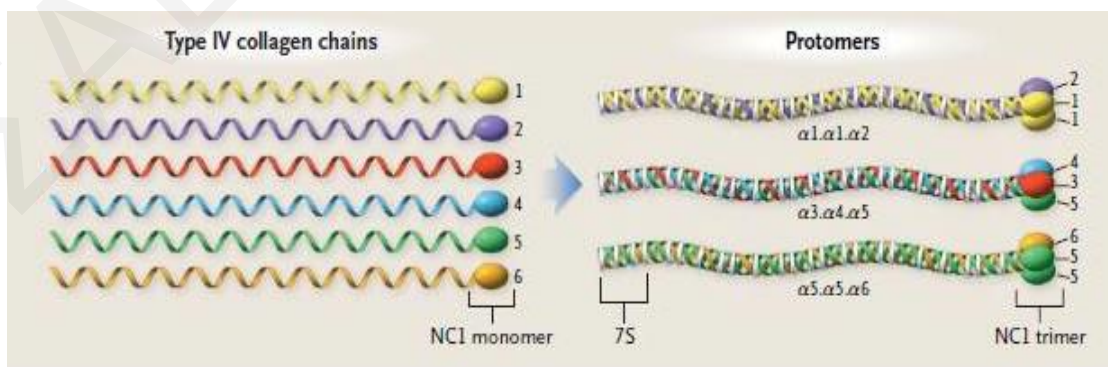
Το σύνδρομο Alport οφείλεται σε μεταλλάξεις στα γονίδια *COL4A3*, *COL4A4* και *COL4A5* τα οποία κωδικοποιούν για τις α3, α4 και α5 αλυσίδες αντίστοιχα του κολλαγόνου τύπου IV. Το κολλαγόνο τύπου IV αποτελεί ένα από τα κύρια δομικά συστατικά της σπειραματικής βασικής μεμβράνης (ΣΒΜ), μαζί με τη λαμινίνη, το νιδογόνο και τις πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης (Miner, 2012). Η ΣΒΜ αποτελεί τη μία από τις τρεις στιβάδες του εκλεκτικά διαπερατού φραγμού σπειραματικής διήθησης (ΦΣΔ), ο οποίος διαχωρίζει τον αγγειακό χώρο των τριχοειδών του σπειράματος από την ουροφόρο κοιλότητα. Οι άλλες δύο στιβάδες του ΦΣΔ αποτελούνται από τα ποδοκύτταρα με το σχισμοειδές διάφραγμα και το θυριδωτό ενδοθήλιο, τα οποία βρίσκονται εκατέρωθεν της ΣΒΜ (εικόνα 2).



**Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του ΦΣΔ**, αποτελούμενου από τα ποδοκύτταρα με το σχισμοειδές διάφραγμα μεταξύ των ποδοειδών προσεκβολών, από τη ΣΒΜ και το θυριδωτό ενδοθήλιο. Το κολλαγόνο τύπου IV αποτελεί ένα από τα κύρια δομικά συστατικά ΣΒΜ. (λήφθηκε από τους Suh, J. H. & Miner, J. H., 2013, *Nat Rev Nephrol*)

### 1.3 Δομή Κολλαγόνου

Η λειτουργική δομή των κολλαγόνων αποτελείται από ελικοειδή μόρια τριών α-αλυσίδων (πρωτομερή). Κάθε α-αλυσίδα αποτελείται σε μεγάλο μέρος της από επαναλαμβανόμενες τριπλέτες αμινοξέων Gly-X-Y. Η γλυκίνη, ως το μικρότερο αμινοξύ, αποτελεί και το μοναδικό το οποίο μπορεί να χωρέσει στο κέντρο της τριπλής έλικας, ενώ στις θέσεις X και Y εντοπίζονται συχνά αμινοξέα όπως η προλίνη και η 4-υδροξυπρολίνη, τα οποία συμβάλλουν στη θερμική σταθερότητα της τριπλής έλικας (Kadler et al., 2007). Η αντικατάσταση της γλυκίνης από άλλο αμινοξύ οδηγεί σε ελαττωματική αναδίπλωση της τριπλής έλικας και αποσταθεροποίησή της. Γύρω στο 51% των ασθενών με ΣΑ κληρονομούν μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος στις αλυσίδες Col4a3, a4 ή a5 και στο 73% των περιπτώσεων αυτών η αντικατάσταση αυτή αφορά στο αμινοξύ γλυκίνη (Heidet et al., 2001), (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>). Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους κολλαγόνου, το κολλαγόνο τύπου IV εντοπίζεται μόνο στις βασικές μεμβράνες (BM) και αποτελείται από έξι διαφορετικές α-πολυπεπτιδικές αλυσίδες, α1 (IV) – α6 (IV). Οι αλυσίδες αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με πολύ ειδικό τρόπο, που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό τριών μόνο βιοχημικά συμβατών ετεροτριμερών (α1α1α2, α3α4α5 και α5α5α6), (εικόνα 3), τα οποία μάλιστα παρουσιάζουν διακριτή κατανομή στους διάφορους ιστούς (Khoshnoodi et al., 2008).

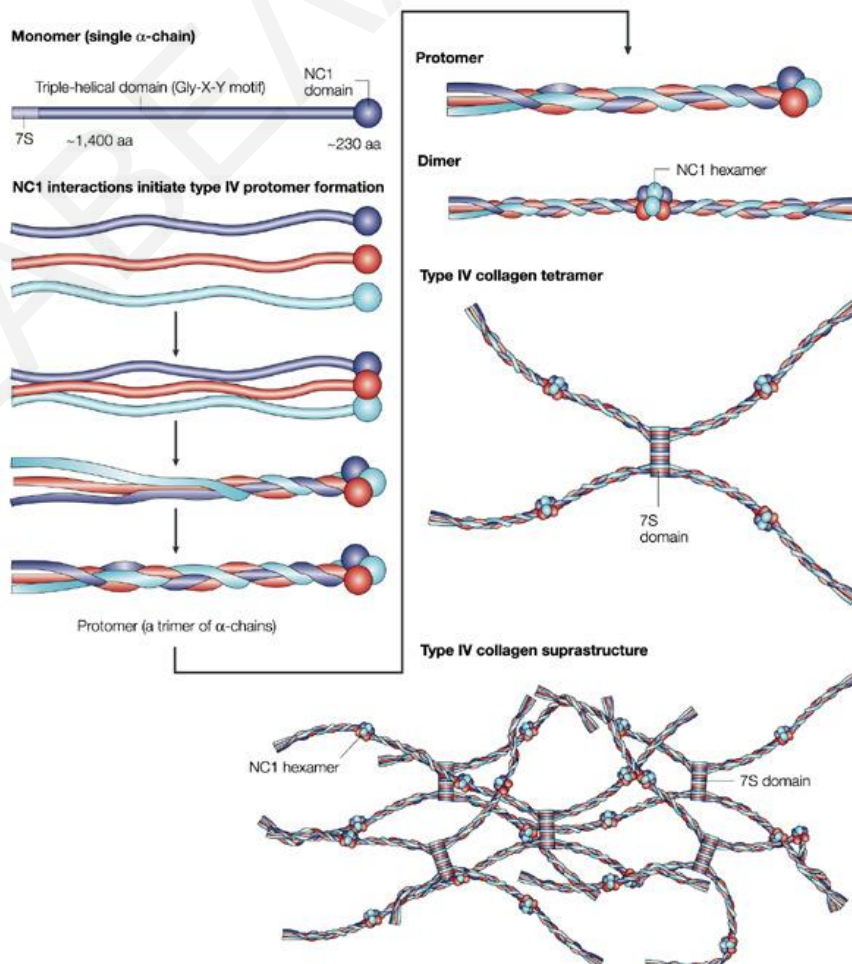


**Εικόνα 3: Σχηματισμός τριπλών ελίκων από τις α αλυσίδες του κολλαγόνου τύπου IV.** Τα έξι διαφορετικά είδη α αλυσίδων σχηματίζουν τριπλές ελικοειδείς δομές που ονομάζονται πρωτομερή και τα οποία διαφέρουν στη σύστασή τους. Κάθε πρωτομερές αποτελείται από ένα 7S τμήμα στο αμινοτελικό άκρο του μορίου, ένα μακρύ κολλαγονικό τμήμα στο μέσο του μορίου και ένα μη κολλαγονικό τμήμα NCI στο καρβοξυτελικό του άκρο. Κατά μήκος του κολλαγονικού τμήματος παρατηρούνται διακοπές στη Gly-X-Y



αλληλουχία των αμινοξέων (λευκοί δακτύλιοι), οι οποίες προσφέρουν στο πρωτομερές την απαραίτητη ελαστικότητα για την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού και των άλλων πρωτομερών για τη δημιουργία δικτύου. Η επιλογή του είδους των α αλυσίδων για το σχηματισμό συγκεκριμένων τριπλών ελίκων ρυθμίζεται από αλληλουχίες μοριακής αναγνώρισης, οι οποίες κωδικοποιούνται από τις υπερμεταβλητές περιοχές των NC1 τμημάτων (λήφθηκε από τους Hudson et al, 2003, *NEJM*)

Κάθε α-αλυσίδα αποτελείται από τρία διαφορετικά τμήματα: Το αμινοτελικό ή 7S άκρο μεγέθους 20 αμινοξέων, το κολλαγονικό τμήμα μεγέθους 1400 περίπου αμινοξέων και το καρβοξυτελικό ή NC1 άκρο με μέγεθος περίπου 230 αμινοξέα. Η βιοσύνθεση των κολλαγόνων αποτελεί μία πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκονται πολλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των α-αλυσίδων, οι οποίες κατά κύριο λόγο λαμβάνουν χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ). Οι τροποποιήσεις αυτές συμπεριλαμβάνουν υδροξυλίωση προλινών και λυσινών, προσθήκη ολιγοσακχαριτών πλούσιων σε μαννόζη καθώς και σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών εντός των αλυσίδων, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών αλυσίδων του ίδιου τριμερούς. Στο ΕΔ γίνεται και ο σχηματισμός της τριπλής έλικας. Μετά την έκκρισή τους από το κύτταρο, τα κολλαγονικά μόρια αλληλεπιδρούν περαιτέρω μεταξύ τους, σχηματίζοντας έτσι ένα τρισδιάστατο πυκνό δίκτυο. Συγκεκριμένα, δύο πρωτομερή, δηλαδή δύο τριπλές έλικες α-αλυσίδων, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω του NC1 καρβοξυτελικού τους άκρου, ενώ τέσσερα πρωτομερή αλληλεπιδρούν μέσω του 7S αμινοτελικού τους άκρου (Khoshnoodi et al., 2008), (εικόνα 4).



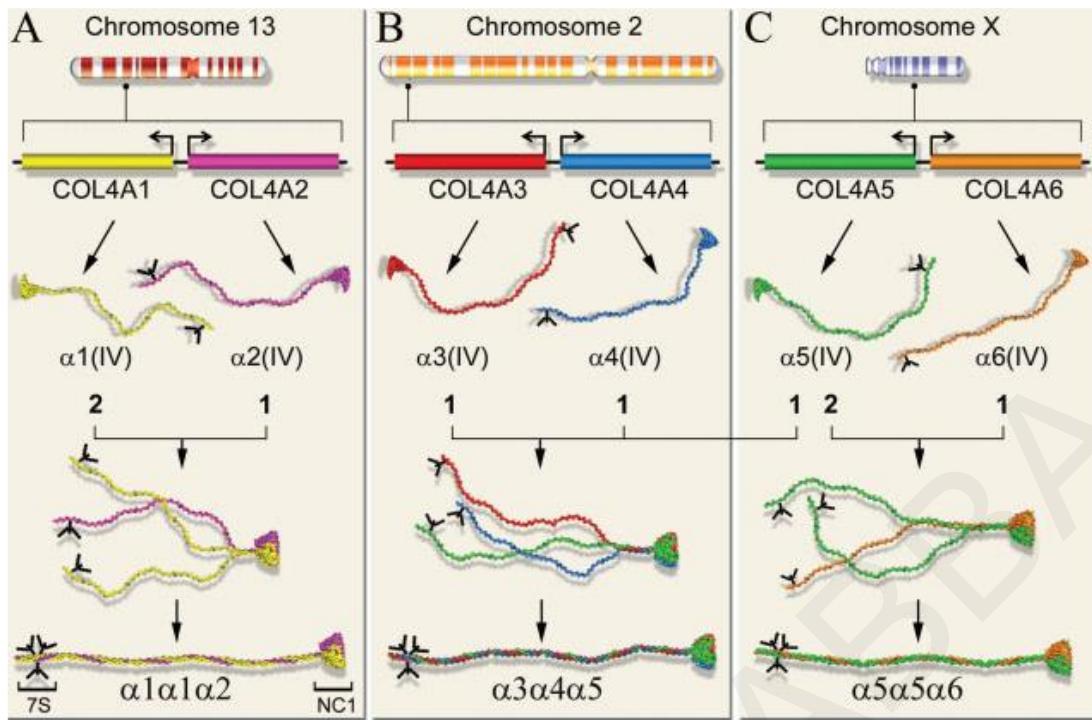
**Εικόνα 4: Δημιουργία του τύπου IV κολλαγονικού δικτύου.** Δύο πρωτομερή συνδέονται μεταξύ τους μέσω των NC1 τριμερών που βρίσκονται στο καρβοξυτελικό άκρο και σχηματίζουν ένα NC1 εξαμερές. Στη συνέχεια, 4 πρωτομερή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στο αμινοτελικό 7S τμήμα τους και σχηματίζουν τετραμερή. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές σχηματίζουν τον πυρήνα ενός κολλαγονικού ικριώματος, το οποίο εξελίσσεται σε ένα πολύπλοκο τρισδιάστατο δίκτυο, μέσω τελικο-τελικών και πλάγιων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τύπου IV κολλαγονικών πρωτομερών (λήφθηκε από τον Kalluri, 2003, *Nat Rev Cancer*)

Στη ΣΒΜ κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης εκφράζεται το τριμερές  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ , ενώ στη συνέχεια παρατηρείται μια σταδιακή μείωση στην έκφραση των αλυσίδων αυτών με παράλληλη έναρξη της έκφρασης των  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  αλυσίδων. Η αλλαγή αυτή στην έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις αλυσίδες του κολλαγόνου τύπου IV, κρίνεται απολύτως απαραίτητη για τη φυσιολογική ωρίμανση της ΣΒΜ. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η τριπλή αλυσίδα  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ , συγκριτικά με την  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ , παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό δισουλφιδικών δεσμών, τόσο ανάμεσα στις τρεις  $\alpha$ -αλυσίδες αλλά και εντός της κάθε αλυσίδας ξεχωριστά, γεγονός που την καθιστά ανθεκτική στην πρωτεολυτική δραστηριότητα και στην αυξημένη ενδοσπειραματική πίεση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το τριμερές  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$  παράγεται και από τους τρεις κυτταρικούς τύπους του σπειράματος, δηλαδή τα ποδοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά και τα μεσαγγειακά κύτταρα, ενώ το τριμερές  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  παράγεται αποκλειστικά από τα ποδοκύτταρα, γεγονός το οποίο αντικατοπτρίζει το σημαντικό ρόλο του ποδοκυττάρου στην παθοφυσιολογία του συνδρόμου Alport (Abrahamson et al., 2009). Απουσία ή διαταραχή του τριμερούς  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  θεωρείται ως η πρωταρχική υποκείμενη ανωμαλία στο ΣΑ.

#### **1.4 Γενετική του Συνδρόμου Alport**

Έξι γονίδια, *COL4A1* - *COL4A6* κωδικοποιούν τις έξι αλυσίδες  $\alpha 1(IV)$  -  $\alpha 6(IV)$ . Τα γονίδια αυτά βρίσκονται σε 3 ζεύγη *COL4A1* - *COL4A2*, *COL4A3* - *COL4A4*, *COL4A5* - *COL4A6*, τα οποία στους ανθρώπους εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 13, 2 και X αντίστοιχα (Kashtan and Michael, 1996). Κάθε ζεύγος γονιδίων έχει φορά “κεφαλή προς κεφαλή” (head to head), με ενδιάμεσο υποκινητή και μεταγραφικές ρυθμιστικές περιοχές (Poschl et al., 1988, Segal et al., 2001), (εικόνα 5).





**Εικόνα 5:** Σχηματική παράσταση της εντόπισης και της οργάνωσης των γονιδίων του κολλαγόνου τύπου IV, των πρωτεϊνικών παραγώγων τους και του σχηματισμού πρωτομερών. Ο σχηματισμός του κάθε ετεροτριμερούς ξεκινά από τα τμήματα των τριών α αλυσίδων και τη δημιουργία του NC1 τριμερούς και ακολουθεί η υπερελίκωση των τριών κολλαγονικών τμημάτων η οποία προχωρά προς τα 7S αμινοτελικά τμήματα. Από τους 56 πιθανούς συνδυασμούς ετεροτριμερών, μόνο τρεις συγκεκριμένοι συνδυασμοί έχουν εντοπιστεί *in vivo*, οι  $\alpha1\alpha1\alpha2$ ,  $\alpha3\alpha4\alpha5$  και  $\alpha5\alpha5\alpha6$  (λήφθηκε από τους Khoshnoodi et al, 2008, *MicroscResTech*)

Από το σύνολο των περιπτώσεων με σύνδρομο Alport, το 85% αφορούν μεταλλάξεις στο *COL4A5* γονίδιο στο Xq26-48 και παρουσιάζουν φυλοσύνδετη κληρονομηση (XLAS) (Martin et al., 1998). Οι άντρες παρουσιάζουν πάντοτε σοβαρή νόσο από νεαρή ηλικία, ενώ οι γυναίκες εμφανίζουν ποικίλη διεισδυτικότητα, ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης και το βαθμό του μωσαϊκισμού που οφείλεται στην τυχαία απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος. Παρά το ότι οι γυναίκες φορείς τείνουν να παρουσιάζουν πιο καλοήγη πορεία, εντούτοις το 12% παρουσιάζουν ΤΣΧΝΑ μέχρι την ηλικία των 40 και ο κίνδυνος για ΤΣΧΝΑ μέχρι την ηλικία των 60 κυμαίνεται μεταξύ 30-40% (Jais et al., 2003)

Το υπόλοιπο 15% των περιπτώσεων αφορούν μεταλλάξεις στο *COL4A3* ή στο *COL4A4* γονίδιο στο χρωμόσωμα 2q35-37 και κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα (ARAS) (Lemmink et al., 1994, Mochizuki et al., 1994). Στην περίπτωση αυτή οι ασθενείς είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες για μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά και δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα όσον αφορά τη σοβαρότητα της νόσου. Ο επιπολασμός της φυλοσύνδετης μορφής του συνδρόμου υπολογίζεται στις 1/10000 πληθυσμού ενώ της αυτοσωματικής υπολειπόμενης μορφής σε 1/50000,

καθιστώντας το σύνδρομο αυτό στην κατηγορία των σπάνιων νοσημάτων (Hertz et al., 2012). Οι ετερόζυγοι φορείς του αυτοσωματικού υπολειπόμενου Alport πάσχουν από τη Νεφροπάθεια της Λεπτής Βασικής Μembrάνης (ΝΛΒΜ) και παρουσιάζουν σημαντική φαινοτυπική ετερογένεια, με κλινική εικόνα που ποικίλει ευρέως από μεμονωμένη μικροσκοπική αιματουρία μέχρι και τελικό στάδιο νεφρικής ανεπάρκειας, σε προχωρημένες όμως ηλικίες, πέραν των 40 ετών (Temme et al., 2012, Voskarides et al., 2007). Ο επιπολασμός της ΝΛΒΜ υπολογίζεται στο 0,3-1% του γενικού πληθυσμού και σε ποσοστό περίπου 40% οφείλεται σε ετερόζυγες μεταλλάξεις στα *COL4A3* και *COL4A4* γονίδια (Savige et al., 2003, Gregory, 2005, Vivante et al., 2011). Ονομάζεται έτσι γιατί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διακρίνεται ομοιογενής λέπτυνση της ΣΒΜ. Ως φυσιολογικό πάχος της ΣΒΜ θεωρούνται κατά προσέγγιση τα  $370 \pm 50\text{nm}$  στους άντρες και τα  $320 \pm 50\text{nm}$  στις γυναίκες (Foster et al., 2005)

Μέχρι σήμερα περισσότερες από 1000 συνολικά μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί και στα τρία γονίδια και περίπου οι μισές αφορούν παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις.

[http://www.arup.utah.edu/database/ALPORT/ALPORT\\_welcome.php](http://www.arup.utah.edu/database/ALPORT/ALPORT_welcome.php),

[https://grenada.lumc.nl/LOVD2/COL4A/home.php?select\\_db=COL4A3](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/COL4A/home.php?select_db=COL4A3),

[https://grenada.lumc.nl/LOVD2/COL4A/home.php?select\\_db=COL4A4](https://grenada.lumc.nl/LOVD2/COL4A/home.php?select_db=COL4A4))

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες συσχέτισης της σοβαρότητας του φαινότυπου με το είδος της υποκείμενης μετάλλαξης (Zhang et al., 2012, Jais et al., 2000, Jais et al., 2003, Gross et al., 2002, Bekheirnia et al., 2010, Tsiakkis et al., 2012). Μεγάλες αναδιατάξεις, μικρές μεταλλάξεις με μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου ή ανερμηνεύσιμες (nonsense) μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με νεαρότερη ηλικία εγκατάστασης νευροαισθητήριας βαρικοΐας και ΤΣΧΝΑ. Αντίθετα, οι μεταλλάξεις σε θέσεις ματίσματος καθώς και οι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις συνδέονται με καθυστερημένη ηλικία εγκατάστασης ΤΣΧΝΑ και λιγότερο συχνές εξωνεφρικές εκδηλώσεις. Εντούτοις, παραμένει άγνωστος σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο ο μηχανισμός που συνδέει την εκάστοτε μετάλλαξη στις κολλαγονικές αλυσίδες με την εγκατάσταση της νεφρικής ανεπάρκειας.

## 1.5 Διάγνωση – Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Ενδείξεις για τη διάγνωση του συνδρόμου Alport αποτελούν η παρουσία οικογενειακού ιστορικού αιματουρίας με ή χωρίς εξέλιξη σε νεφρική ανεπάρκεια, καθώς και η

αμφοτερόπλευρη νευροαισθητήρια έκπτωση της ακοής ή/και η παρουσία των χαρακτηριστικών οφθαλμικών ευρημάτων (πρόσθιος φακόκωνος ή/και περιωχρικές κηλίδες). Ως "gold standard" για τη διάγνωση όμως θεωρούνται τα ιστοπαθολογικά ευρήματα του νεφρικού ιστού που λαμβάνεται μετά από διαδερμική βιοψία του νεφρού (Cosgrove, 2012). Συγκεκριμένα, τα ευρήματα της ΣΒΜ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι παθολογικά του συνδρόμου. Παρατηρείται χαρακτηριστικά διάχυτη πάχυνση και διάσπαση της ΣΒΜ με ανώμαλο εσωτερικό και εξωτερικό περίγραμμα (πολυστρωμάτωση της ΣΒΜ). Συχνότερα όμως και ιδιαίτερα σε νεαρούς ασθενείς ή σε γυναίκες φορείς του φυλοσύνδετου Alport, παρατηρείται εναλλαγή περιοχών πάχυνσης και λέπτυνσης της ΣΒΜ (Heidet and Gubler, 2009). Συνοδό εύρημα αποτελεί η σύντηξη ή κατάργηση των ποδοειδών προσεκβολών των ποδοκυττάρων. Αντίθετα, τα ιστοπαθολογικά ευρήματα μετά από εξέταση στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο είναι μη ειδικά της νόσου.

Στις μέρες μας, με την ολοένα και μεγαλύτερη εφαρμογή της αλληλούχησης του DNA με τεχνολογία Next Generation Sequencing, η ανεύρεση των υποκείμενων μεταλλάξεων με γενετικές μεθόδους θεωρείται ιδιαίτερα ευαίσθητη και αξιόπιστη, οδηγώντας σε ευρήματα που δεν θα μπορούσαν να προβλεφθούν από την ιστοπαθολογική εξέταση και μόνο (Liapis, 2014).

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα μετά από μελέτες ανοσοφθορισμού του νεφρικού ιστού με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τις αλυσίδες  $\alpha 3(IV)$ ,  $\alpha 4(IV)$  και  $\alpha 5(IV)$ . Τυπικά παρατηρείται απουσία από τη ΣΒΜ και των τριών αλυσίδων, παρά το γεγονός ότι η εκάστοτε μετάλλαξη αφορά στη μία μόνο αλυσίδα (Naito et al., 1996, Nakanishi et al., 1994). Σε XLAS έχει δειχθεί ότι ανεξάρτητα από τον τύπο της μετάλλαξης στο *COL4A5*, τόσο το *COL4A3* όσο και το *COL4A4* παρουσιάζουν ενεργό μεταγραφή στα ποδοκύτταρα, γεγονός που δεικνύει ότι η απουσία του  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(IV)$  τριμερούς από τη ΣΒΜ οφείλεται σε ανωμαλίες σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο (Heidet et al., 2000), πιθανόν σε επίπεδο ωρίμανσης του mRNA, πρωτεϊνικής σύνθεσης ή μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Επιπλέον, ενώ φυσιολογικά η εντόπιση των  $\alpha 1(IV)$  και  $\alpha 2(IV)$  αλυσίδων στον ώριμο νεφρώνα περιορίζεται στην υπο-ενδοθηλιακή επιφάνεια της ΣΒΜ, σε ασθενείς με ΣΑ παρατηρείται ισχυρή έκφρασή τους σε ολόκληρο το πάχος της ΣΒΜ (Kashtan and Kim, 1992, Kalluri et al., 1997). Εντούτοις, τα ευρήματα από τις μελέτες ανοσοφθορισμού δεν είναι πάντοτε ξεκάθαρα (Wei et al., 2006, Su et al., 2006), με το 30% των ασθενών με μεταλλάξεις στο *COL4A5* να παρουσιάζουν φυσιολογική κατανομή των  $\alpha(IV)$  αλυσίδων στη ΣΒΜ και να ακολουθούν ηπιότερη πορεία της νόσου. Οι μεταλλάξεις αυτές συνήθως είναι παρερμηνεύσιμες ή αφορούν θέσεις ματίσματος και τα ευρήματα

αυτά δεικνύουν ότι κάποιες μεταλλαγμένες αλυσίδες μπορούν τελικά να ενσωματωθούν στο κολλαγονικό δίκτυο της ΣΒΜ (Kashtan et al., 1996, Naito et al., 1996, Nakanishi et al., 1994, Gubler, 2008, Gubler et al., 1995). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η παρουσία ελαττωματικών δικτύων στη ΣΒΜ σχετίζεται με ηπιότερο φαινότυπο συγκριτικά με την πλήρη απουσία τους.

## 1.6 Διάγνωση στην εποχή της μοριακής γενετικής – Συσχέτιση με ΕΤΣΣ

Και ενώ μέχρι πριν μερικά χρόνια η διάγνωση του ΣΑ, της ΝΑΒΜ και γενικότερα των τύπου IV κολλαγοπαθειών γινόταν με αποκλειστικό γνώμονα το κλινικο-ιστοπαθολογικό υπόβαθρο των ασθενών, η νέα εποχή των μοριακών τεχνικών έφερε την επανάσταση στη διερεύνηση και την αποτελεσματική διάγνωση των παθήσεων αυτών (Savige et al., 2019, Deltas et al., 2013, Deltas et al., 2012).

Ιδιαίτερη μνεία γίνεται στη βιβλιογραφία σχετικά με τη συσχέτιση της Εστιακής Τμηματικής Σπειραματοσκλήρυνσης (ΕΤΣΣ) και της ΝΑΒΜ. Η ΕΤΣΣ αποτελεί ένα ιστολογικό πρότυπο σπειραματικής βλάβης και επακόλουθης ίνωσης, το οποίο μπορεί να οφείλεται σε μία πληθώρα κλινικών οντοτήτων με διαφορετική παθογένεια και κλινική πορεία. Ο όρος “πρωτοπαθής ΕΤΣΣ” αναφέρεται στην κλινική οντότητα που οφείλεται στη επιβλαβή δράση ενός κυκλοφορούντα παράγοντα (permeability factor) επί των ποδοκυττάρων και προκαλεί νεφρωσικού εύρους πρωτεϊνουρία και σχετικά ταχεία επιδείνωση προς ΤΣΧΝΑ. Ο όρος “δευτεροπαθής ΕΤΣΣ” αφορά σε όλες τις άλλες μορφές ΕΤΣΣ που μπορεί να οφείλονται σε κληρονομικές μεταλλάξεις σε γονίδια των ποδοκυττάρων και του σχισμοειδούς διαφράγματος ή σε αιμοδυναμικές συνέπειες σε έδαφος συγγενούς ή επίκτητης απώλειας αριθμού λειτουργικών νεφρώνων (Fogo, 2015).

Στον κυπριακό πληθυσμό συγκεκριμένα, η πρώτη ένδειξη ότι η ΝΑΒΜ δεν αποτελεί καλοήγη νόσο ήρθε το 2007 (Voskarides et al., 2007). Ομάδα του Καθ. Δέλτα και η εμπειριστατωμένη μελέτη του Δρ Βοσκαρίδη σε 82 ασθενείς από 13 οικογένειες με ΝΑΒΜ, έδειξαν ότι οι 31 από αυτούς (37,8%) παρουσίασαν έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και οι 16 (19,5%) κατέληξαν σε ΤΣΧΝΑ. Είκοσι διαθέσιμες βιοψίες νεφρού από τους ασθενείς αυτούς έδειξαν ευρήματα λεπτής ΣΒΜ και ΕΤΣΣ παράλληλα. Οι μεταλλάξεις G1334E και G871C στο *COL4A3* ανιχνεύθηκαν στις 7 και 3 οικογένειες αντίστοιχα. Ακολούθησε επιβεβαίωση και επέκταση των ευρημάτων των Voskarides et al το 2009 (Pierides et al., 2009). Μελετήθηκαν 127 ασθενείς από 11 μεγάλες οικογένειες. Οι

μεταλλάξεις G1334E και G871C ανιχνεύθηκαν στις 6 και 4 οικογένειες αντίστοιχα. 21 βιοψίες νεφρού έδειξαν διάφορα στάδια ΕΤΣΣ και στις 13 από αυτές που έγινε και εξέταση με ΗΜ παρατηρήθηκε λέπτυνση της ΣΒΜ. 57 από τους 127 ασθενείς (44,9%) μετά την ηλικία των 30 ετών παρουσίασαν πρωτεϊνουρία. Έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, επιπρόσθετα της πρωτεϊνουρίας και της αιματουρίας, παρατηρήθηκε στο 8% των ασθενών ηλικίας 31-50 ετών. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε στο 25% στις ηλικίες 51-70 ετών και στο 50% στις ηλικίες άνω των 71. Από αυτούς τους 57 ασθενείς με πρωτεϊνουρία, οι 42 (73,6%) παρουσίασαν στη συνέχεια επηρεασμένη νεφρική λειτουργία και από τους 42 αυτούς ασθενείς, οι 18 (42,9%) κατέληξαν σε ΤΣΧΝΑ σε μέση ηλικία των 60 ετών.

### **1.7 Φαινοτυπική ετερογένεια – Δράση τροποποιητικών γονιδίων**

Διεθνώς αποδεκτή στην επιστημονική κοινότητα είναι πλέον η μεγάλη φαινοτυπική ετερογένεια που χαρακτηρίζει τις τύπου IV κολλαγονοπάθειες και ιδιαίτερα τους ετεροζυγώτες φορείς του αυτοσωματικού υπολειπόμενου ΣΑ. Αποτελεί γενική παραδοχή ότι ο όρος “καλοήθης κληρονομική αιματουρία” είναι πλέον αδόκιμος και επιστημονικά παραπλανητικός για τους ασθενείς με ΝΑΒΜ, αφού ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών θα εμφανίσει μετά την ηλικία των 40 εξελισσόμενη νεφρική βλάβη. Αξιοσημείωτη είναι και η μεγάλη ετερογένεια στον φαινότυπο που παρατηρείται μεταξύ ατόμων με την ίδια μετάλλαξη που προέρχονται μάλιστα από την ίδια οικογένεια.

Έτσι περιγράφεται ένα μεγάλο εύρος στη σοβαρότητα της κλινικής εικόνας στους ασθενείς με ΝΑΒΜ. Αυτό μπορεί να κυμαίνεται στο ένα άκρο από παρουσία μεμονωμένης μικροσκοπικής αιματουρίας εφόρου ζωής μέχρι ΤΣΧΝΑ στο άλλο άκρο με ανάγκη για υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας με κάθαρση ή μεταμόσχευση νεφρού. Στο ενδιάμεσο παρατηρείται εξελισσόμενη νεφρική βλάβη με πρωτεϊνουρία και προοδευτική έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας, με ό,τι αυτό συνεπάγεται σχετικά με την επιβάρυνση των άλλων συστημάτων του οργανισμού (αυξημένη καρδιακή νοσηρότητα και θνησιμότητα για παράδειγμα).

Ξεχωριστή αναφορά για τα άτομα κυπριακής καταγωγής γίνεται στις κατευθυντήριες οδηγίες του British Transplantation Society σχετικά με την αξιολόγηση των πιθανών δωρητών νεφρού με ΝΑΒΜ ([https://bts.org.uk/wp-content/uploads/2018/01/BTS\\_LDKT\\_UK\\_Guidelines\\_2018.pdf](https://bts.org.uk/wp-content/uploads/2018/01/BTS_LDKT_UK_Guidelines_2018.pdf)). Σύμφωνα με τις οδηγίες αυτές, τα άτομα αυτά θα

πρέπει να παραπέμπονται για συμβουλή σε κλινικό γενετιστή, αφού έχει παρατηρηθεί ότι σημαντικό ποσοστό των ασθενών αυτών εμφανίζει εξελισσόμενη νεφρική βλάβη και κάποιοι από αυτούς καταλήγουν σε ΤΣΧΝΑ.

Εύλογα λοιπόν πιθανολογήθηκε η δράση τροποποιητικών γονιδίων για το μεγάλο αυτό εύρος κλινικών εκδηλώσεων που παρατηρείται στους ασθενείς αυτούς και ως εκ τούτου αποτέλεσε αντικείμενο περαιτέρω έρευνας. Τροποποιητικά θεωρούνται τα γονίδια τα οποία, στο υπόβαθρο και μόνο μίας κύριας παθογόνου μετάλλαξης, δρουν επιβαρυντικά ή προστατευτικά στο φαινότυπο.

Αλλαγές σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του σχισμοειδούς διαφράγματος φαίνεται να ασκούν τέτοια τροποποιητική δράση. Για παράδειγμα, η p.Arg229Gln αλλαγή του γονιδίου της ποδοκίνης *NPHS2* είναι γνωστό ότι προκαλεί ανθεκτικό στα στεροειδή νεφρωσικό σύνδρομο μόνο στην περίπτωση που συγκληρονομείται *in trans* με συγκεκριμένες 3' - *NPHS2* μεταλλάξεις στο άλλο αλληλόμορφο, γεγονός που οδηγεί σε ελαττωματικό ετεροδιμερισμό της πρωτεΐνης και λανθασμένο εντοπισμό της στο σχισμοειδές διάφραγμα. Η παρουσία της αλλαγής αυτής σε ετεροζυγία βρέθηκε να προδιαθέτει ασθενείς με ΝΑΒΜ σε σοβαρότερο φαινότυπο (Voskarides et al., 2012, Tonna et al., 2008). Μία δεύτερη αλλαγή στο γονίδιο της ποδοκίνης, η p.Glu237Gln, βρέθηκε επίσης να επηρεάζει αρνητικά την κλινική εξέλιξη ασθενών με ΝΑΒΜ (Stefanou et al., 2015, Savige et al., 2003). Στην τελευταία δημοσίευση, οι Stefanou et al (2015) έδειξαν σε κυτταροκαλλιέργειες ποδοκυττάρων, ότι οι p.Arg229Gln και p.Glu237Gln αλλαγές στο *NPHS2* είχαν ως αποτέλεσμα οι παραγόμενες πρωτεΐνες να παρουσιάζουν επηρεασμένη αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες του σχισμοειδούς διαφράγματος και κυρίως με τη νεφρίνη.

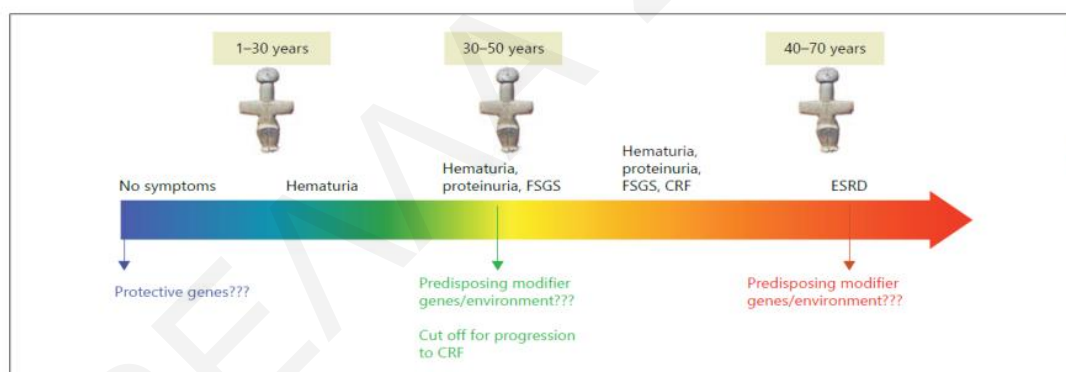
Αλλαγές σε άλλο ένα γονίδιο, το *NEPH3* το οποίο κωδικοποιεί για τη φιλτρίνη, άλλη μια πρωτεΐνη του σχισμοειδούς διαφράγματος, φαίνεται να προδιαθέτει σε αυξημένο κίνδυνο για σοβαρή μορφή νεφρικής νόσου σε ασθενείς με ΝΑΒΜ (Voskarides et al., 2017). Συγκεκριμένα, η p.Val353Met αλλαγή επηρεάζει τον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης και τον ετεροδιμερισμό της με τη νεφρίνη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε επιδημιολογική μελέτη 11258 ατόμων του γενικού πληθυσμού από συμμετέχοντες στις μελέτες Framingham, KORAF4 και SAPHIR ανευρέθηκε σημαντική συσχέτιση στους ομοζυγώτες για την p.Val353Met με την παρουσία μικροαλβουμινουρίας.

Η ιδιαίτερα σοβαρή εικόνα κάποιων ασθενών με ετερόζυγες μεταλλάξεις στα *COL4A3/COL4A4* γονίδια σε συνδυασμό με την παρουσία παθογνωμονικών για το ΣΑ

ιστοπαθολογικών ευρημάτων και εξωνεφρικών εκδηλώσεων σε ένα υποσύνολο ασθενών, οδήγησε ορισμένους συγγραφείς να υποστηρίξουν την ύπαρξη του αυτοσωματικού επικρατητικού ΣΑ (Fallerini et al., 2014, Marcocci et al., 2009, Longo et al., 2002, Pescucci et al., 2004, Kharrat et al., 2006, van der Loop et al., 2000, Temme et al., 2012, Hoefele et al., 2010).

Παράλληλα, η χρήση του Whole Exome Analysis τα τελευταία χρόνια είναι σε θέση να παρέχει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την παρουσία πιθανής διγονιδιακής κληρονόμησης, όπου η συγκληρονόμηση δύο μεταλλάξεων σε δύο διαφορετικά γονίδια είναι απαραίτητη και ικανή προϋπόθεση για την εμφάνιση του παθολογικού φαινότυπου (Deltas, 2018, Mencarelli et al., 2015).

Φαίνεται λοιπόν ότι το εύρος του παθολογικού φαινότυπου των ετερόζυγων φορέων μεταλλάξεων στα *COL4A3/COL4A4* προσομοιάζει με “πολυπαραγοντική νόσο”, στην οποία εμπλέκονται το υποκείμενο γονίδιο, η φύση της υπεύθυνης μετάλλαξης, τροποποιητικά γονίδια και περιβαλλοντικοί παράγοντες (εικόνα 6).



**Εικόνα 6:** Το πλήρες εύρος του φαινότυπου των ετερόζυγων φορέων αυτοσωματικών υπολειπόμενων μεταλλάξεων στα *COL4A3/A4* συμπεριφέρεται ως πολυπαραγοντική νόσος, στην οποία εμπλέκεται η δράση της κυρίαρχης υπεύθυνης μετάλλαξης, τροποποιητικών γονιδίων και περιβαλλοντικών παραγόντων. Η σοβαρότητα του φαινότυπου μπορεί να κυμαίνεται από μεμονωμένη μικροσκοπική αιματουρία μέχρι και ΤΣΧΝΑ, με ενδιάμεσα στάδια αυτά της πρωτεϊνουρίας και της επακόλουθης προοδευτικής έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας (λήφθηκε από τους Deltas et al, 2015, *Nephron*)

## 1.8 Ζωικά μοντέλα ποντικού

Στην προσπάθεια να μελετηθούν οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στο ΣΑ, έχουν κατασκευαστεί κατά καιρούς μοντέλα ποντικών που προσομοιάζουν με το εν λόγω σύνδρομο (Cosgrove et al., 1996, Lu et al., 1999, Rheault et al., 2004, Korstanje et al., 2014, Miner and Sanes, 1996, Hashikami et al., 2019). Αναλόγως, μάλιστα, του γενετικού υποβάθρου του ποντικού παρατηρείται σημαντική διαφορά στο χρόνο



εγκατάστασης ΤΣΧΝΑ. Για παράδειγμα στο 129X1/SvJ υπόβαθρο παρατηρείται σοβαρότερη πορεία της νεφρικής νόσου σε σχέση με το C57BL/6J, γεγονός που αποδίδεται γενικότερα στη δράση τροποποιητικών γονιδίων και εν μέρει στην υποκατάσταση του α3α4α5(IV) τριμερούς στη ΣΒΜ από το α5α5α6(IV), η οποία παρατηρείται στο C57BL/6J υπόβαθρο αλλά όχι στο 129X1/SvJ (Kang et al., 2006, Cosgrove et al., 2007, Andrews et al., 2002).

Το 1996, οι Cosgrove et al., περιέγραψαν το *Col4a3* knockout μοντέλο ποντικού για το ΣΑ, το οποίο έμελλε να αποτελέσει τη βάση αναφοράς για τη σύγκριση με μετέπειτα περιγραφόμενα ζωικά μοντέλα αλλά και το βασικό εργαλείο για έρευνα της αποτελεσματικότητας διάφορων φαρμακευτικών σκευασμάτων με σκοπό τη θεραπεία του ΣΑ (Cosgrove et al., 1996). Έγινε εισαγωγή μιας κασέτας έκφρασης γονιδίου για αντοχή στη νεομυκίνη εντός του εξωνίου 5 του *Col4a3* με αντίστροφη διάταξη, με στόχο την πλήρη διάσπαση του NC1 τμήματος. Ο φαινότυπος του εν λόγω μοντέλου είναι ιδιαίτερα σοβαρός, όπως θα αναμενόταν από τη φύση της υπεύθυνης μετάλλαξης και την πλήρη απουσία των αλυσίδων α3(IV), α4(IV) και α5(IV) από τη ΣΒΜ. Ο μέσος όρος ζωής των ποντικών είναι μόλις 14 εβδομάδες (κυμαίνεται μεταξύ 12-15 εβδομάδων), παρουσιάζουν μικροσκοπική αιματοουρία και πρωτεϊνουρία ήδη από την ηλικία των 2 και 5 εβδομάδων αντίστοιχα και η νεφρική λειτουργία επηρεάζεται από την 10<sup>η</sup> εβδομάδα της ζωής με προοδευτική επιδείνωση μέχρι τον θάνατο.

Οι συγγραφείς, με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, ανέδειξαν την παρουσία βλαβών συμβατών με το ΣΑ στη ΣΒΜ των μεταλλαγμένων ζώων, ήδη από τις 4 εβδομάδες ζωής, πριν δηλαδή από την εμφάνιση της πρωτεϊνουρίας και απέδειξαν ότι η απουσία των α3(IV), α4(IV) και α5(IV) αλυσίδων από τη ΣΒΜ οφείλεται σε γεγονότα μετα-μεταγραφικά, αφού τα κωδικοποιούντα mRNA για τις α4(IV) και α5(IV) αλυσίδες ήταν άθικτα. Επιπρόσθετα, σημειώνεται στα μεταλλαγμένα ζώα η εντόπιση των α1(IV) και α2(IV) αλυσίδων σε όλο το πάχος της ΣΒΜ, σε αντίθεση με τα υγιή στα οποία η έκφραση των αλυσίδων αυτών στα σπειράματα περιορίζεται κατά κύριο λόγο στο μεσάγγειο. Ανέδειξαν ακόμη την παθολογική κατανομή στα μεταλλαγμένα ζώα των κύριων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη ΣΒΜ (ινοδονεκτίνη, λαμινίνη, θειϊκή ηπαράνη και εντακτίνη), θέτοντας το ερώτημα αν αυτή μπορεί να θεωρηθεί ως η αιτία της ανώμαλης ΣΒΜ ή απλά αποτελεί συνέπεια της πρωτοπαθούς βλάβης.

Στο ίδιο ζωικό μοντέλο, δύο χρόνια αργότερα, εξετάστηκαν οι βλάβες που παρατηρούνται στον κοιλία από το έσω ους ομόζυγων για τη μετάλλαξη ποντικών (Cosgrove et al., 1998).



Ενώ στο οπτικό μικροσκόπιο δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς βλάβες, ανοσοϊστοχημική ανάλυση ανέδειξε την απουσία των Col4a3, Col4a4 και Col4a5 αλυσίδων από τις BM του λαβυρίνθου, ενώ η έκφραση των Col4a1 και Col4a2 αλυσίδων δεν παρουσίασε αλλαγές. Λέπτυνση και κατά τόπους πάχυνση των BM ήταν το κύριο εύρημα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ενώ η ακουολογική εξέταση των ζώων ανέδειξε ήπιες αλλοιώσεις.

Το 1996 έγινε η περιγραφή ενός ακόμη *Col4a3* knockout μοντέλου ποντικού, το οποίο δημιουργήθηκε με διαγραφή των τριών πρώτων εξωνίων στο καρβοξυτελικό μη κολλαγονικό άκρο (NC1 domain) του *Col4a3* (Miner and Sanes, 1996). Η εν λόγω μετάλλαξη επιλέχθηκε γιατί το NC1 domain θεωρείται απαραίτητο για τη συναρμολόγηση του ColIV δικτύου. Το μοντέλο αυτό παρουσιάζει σοβαρό φαινότυπο ο οποίος προσομοιάζει στο ΣΑ, με αλβουμινουρία από τον δεύτερο μήνα ζωής και ουραιμία η οποία οδηγεί στο θάνατο στον τρίτο μήνα ζωής. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα ομόζυγα για τη μετάλλαξη ποντίκια, δεν παρουσιάζουν αιματουρία ενώ ξεχωριστό εύρημα στο οπτικό μικροσκόπιο αποτελεί η παρουσία μηνοειδών σχηματισμών στα σπειράματα. Οι μηνοειδείς σχηματισμοί περιστασιακά μόνο εντοπίζονται σε ανθρώπινες βιοψίες πασχόντων από ΣΑ.

Οι συγγραφείς επίσης περιέγραψαν, πέραν της απουσίας των αλυσίδων α3, α4 και α5 από τη ΣΒΜ, άλλες έντονες και ταυτόχρονα εκλεκτικές αλλαγές στη μοριακή αρχιτεκτονική των μεταλλαγμένων σπειραμάτων, η παρουσία των οποίων προηγείται της εμφάνισης νεφρικών ιστοπαθολογικών ή παθοφυσιολογικών αλλαγών. Συγκεκριμένα, αναφέρουν στα μεταλλαγμένα ποντίκια μεγάλη αύξηση της έκφρασης στη ΣΒΜ της θειϊκής ηπαράνης, της ινωδονεκτίνης, των α1 και α2 αλυσίδων του ColIV καθώς και του ColVI, ενώ τα επίπεδα της λαμινίνης και της εντακτίνης δεν διαφέρουν ουσιαστικά. Έδειξαν επίσης ότι η σπειραματογένεση δεν επηρεάζεται από τη μετάλλαξη.

Ακόμη πιο σοβαρό φαινότυπο παρουσιάζει το διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού που περιγράφηκε το 1999 (Lu et al., 1999). Στο εν λόγω μοντέλο, διαγράφηκαν τα εξόνια 1 μέχρι 12 του *Col4a4*, τα εξόνια 1 και 2 του *Col4a3* και ο κοινός υποκινητής των δύο γονιδίων με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μεταγραφή τους και οι α3(IV), α4(IV) και α5(IV) αλυσίδες να απουσιάζουν εντελώς από τη ΣΒΜ. Παρατηρείται και εδώ αντισταθμιστική αύξηση της έκφρασης στη ΣΒΜ των α1(IV) και α2(IV) αλυσίδων, ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαπιστώνονται αλλοιώσεις συμβατές με το ΣΑ ήδη από τις 2 εβδομάδες ζωής. Στην ίδια ηλικία τα μεταλλαγμένα ζώα παρουσιάζουν επιπλέον μικροσκοπική αιματουρία και πρωτεϊνουρία, της οποίας ο βαθμός προοδευτικά

επιδεινώνεται. Στις 6 εβδομάδες ζωής διατηρείται φυσιολογική ακόμη η νεφρική λειτουργία, η οποία όμως αργότερα επηρεάζεται και οδηγεί στο θάνατο στις 8-12 εβδομάδες.

Στο μοντέλο αυτό, παρατηρείται και πάλι η παρουσία μηνοειδών σχηματισμών στα σπειράματα, η οποία μάλιστα δεν συνοδεύεται από ανοσοεναποθέσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η επίμονη υπερπλασία των σπειραματικών κυττάρων που παρατηρείται στο ζωϊκό αυτό μοντέλο, γεγονός που οδήγησε τους συγγραφείς να προτείνουν τη σπειραματική υπερπλασία ως ένα πιθανό παράγοντα ο οποίος επηρεάζει την εξέλιξη της νόσου.

Αρκετά αργότερα περιγράφηκε μοντέλο ποντικού με ΕΤΣΣ, πρωτεϊνουρία και αιματοουρία, το οποίο ήταν το αποτέλεσμα της δράσης της μεταλλαξιόγону ουσίας N-αιθυλο-N-νιτροζουρίας (Arnold et al., 2011). Ως υπεύθυνη αναγνωρίστηκε μετάλλαξη στο ιντρόνιο 8 του *Col4a4*, η οποία προκαλεί μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου. Τα ομόζυγα μεταλλαγμένα ποντίκια παρουσίασαν μικρότερη επιβίωση (6-7 μήνες ζωής), ενώ παράλληλα εμφάνισαν και μέτρια νευροαισθητήρια απώλεια ακοής. Οι συγγραφείς στο άρθρο αυτό δεν προχώρησαν σε περαιτέρω ανάλυση του μοντέλου με εξετάσεις ανοσοφθορισμού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, αλλά εστίασαν στον τρόπο ανίχνευσης της παθογόνου μετάλλαξης (αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος σε συνδυασμό με ανάλυση διαχωρισμού μεγέθους (bulk segregation analysis)).

Το πρώτο μοντέλο ποντικού για φυλοσύνδετο ΣΑ περιγράφηκε το 2004 (Rheault et al., 2004). Το μοντέλο αυτό φέρει την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη G5X στο *Col4a5* γονίδιο, βασισμένη σε γνωστή ανθρώπινη μετάλλαξη. Η μετάλλαξη αυτή οδηγεί στη μετατροπή του κωδικονίου 5 σε κωδικόνιο λήξης. Οι συγγραφείς παρουσίασαν το μοντέλο αυτό ως το ιδανικό για περαιτέρω μελέτη της τυχαίας απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X σε θηλυκά ποντίκια φορείς και της μωσαϊκής έκφρασης των κολλαγονικών αλυσίδων στις ΒΜ.

Μελετήθηκαν αρσενικά ημίζυγα και θηλυκά ποντίκια φορείς της μετάλλαξης και διαπιστώθηκε ότι η μέση επιβίωσή τους ήταν 23 και 39 εβδομάδες αντίστοιχα. Τα αρσενικά παρουσίαζαν πρωτεϊνουρία στο 97% των ζώων που μελετήθηκαν (στις 7 εβδομάδες ζωής) και τα θηλυκά στο 78% (στις 9 εβδομάδες). Στα πειράματα ανοσοφθορισμού, τα αρσενικά μεταλλαγμένα ποντίκια παρουσίαζαν απουσία των αλυσίδων α3 και α5 από τη ΒΜ των σπειραμάτων και των σωληναρίων, διατήρηση των αλυσίδων α1 και α2 και απουσία της α6 αλυσίδα από την κάψα του Bowman. Όπως θα

ήταν αναμενόμενο, τα θηλυκά ποντίκια φορείς παρουσίαζαν μωσαϊκή έκφραση των α3 και α5 αλυσίδων. Ιστοπαθολογικές εξετάσεις στο κοινό μικροσκόπιο από νεφρούς αρσενικών ασθενών ποντικών ανέδειξαν επιδεινούμενα με την ηλικία μη ειδικά ευρήματα ίνωσης των σπειραμάτων, ατροφίας των ουροφόρων σωληναρίων και φλεγμονής του διάμεσου ιστού, ενώ στα θηλυκά ποντίκια φορείς τα ευρήματα είχαν εστιακή μονάχα εντόπιση. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, από πολύ μικρή ηλικία (4 εβδομάδων) τα αρσενικά ποντίκια με τη μετάλλαξη εμφάνισαν πολυστρωμάτωση της ΣΒΜ, ενώ σε πιο προχωρημένη ηλικία (17 εβδομάδων) η ΣΒΜ εμφανίζεται διασπασμένη με διάχυτες πλέον ανωμαλίες. Στα θηλυκά ποντίκια φορείς, ενώ στις 17 εβδομάδες οι βλάβες είναι τμηματικές σε κάποια σπειράματα και περισσότερο διάχυτες σε άλλα, στην πιο προχωρημένη ηλικία των 30 εβδομάδων οι βλάβες είναι πλέον σφαιρικές και διάχυτες.

Μία αυτόματη μετάλλαξη στο *Col4a4* αναγνωρίστηκε το 2014, σε ανασυνδυασμένα NONcNZO παχύσαρκα ποντίκια (Korstanje et al., 2014). Το μεταλλαγμένο ποντίκι αναγνωρίστηκε λόγω της ισχύοντος που παρουσίαζε. Πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη που επηρεάζει την πρώτη βάση του εξωνίου 30 και οδηγεί σε απώλεια του εξωνίου, διατηρώντας όμως το πλαίσιο ανάγνωσης του mRNA. Ως αποτέλεσμα, παράγεται μικρότερη πρωτεΐνη, αφού απουσιάζουν 57 αμινοξέα από το κολλαγονικό της τμήμα. Εντούτοις, ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε νεφρικές τομές έδειξαν ότι η παθολογική αυτή πρωτεΐνη καταφέρνει τελικά να αλληλεπιδράσει με την α3 και α5 αλυσίδα και να σχηματιστούν πρωτομερή. Αυτό είναι το πρώτο μοντέλο ποντικού με ΣΑ στο οποίο ανιχνεύεται το τριμερές α3α4α5(IV) στη ΣΒΜ, εύρημα το οποίο άλλωστε περιγράφεται σε ένα υποσύνολο ανθρώπων πασχόντων από ΣΑ.

Οι εικόνες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρουσιάζουν ευρήματα από τη ΣΒΜ συμβατά με το ΣΑ. Ιστολογικές εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο παρουσιάζουν ευρήματα σπειραματοσκλήρυνσης, διαμεσοσωληναριακής νεφρίτιδας και ατροφίας των σωληναρίων, ενώ και πάλι περιγράφονται μνηοειδείς σχηματισμοί όπως και σε προηγούμενες περιγραφές άλλων ζωικών μοντέλων με ΣΑ. Τα μεταλλαγμένα ποντίκια παρουσιάζουν πρωτεϊνουρία και μειωμένη επιβίωση. Οι συγγραφείς μάλιστα έδειξαν ότι τόσο ο βαθμός της αλβουμινουρίας όσο και η μέση επιβίωσή τους επηρεάζονται ιδιαίτερα σημαντικά από το γενετικό υπόβαθρο του μοντέλου (σοβαρότερος φαινότυπος στο DBA/2J και 129S1/SvJmJ γενετικό υπόβαθρο), γεγονός που αντικατοπτρίζει τη σημαντική επίδραση των τροποποιητικών γονιδίων στην τελική κλινικοεργαστηριακή εικόνα. Ιστολογικές εξετάσεις από τους οφθαλμούς και ακουολογική αξιολόγηση των μεταλλαγμένων ποντικών δεν κατάφεραν να αναδείξουν διαφορές με τα υγιή ποντίκια.

Το 2006 χρησιμοποιώντας το *Col4a3* knockout μοντέλο ποντικού το οποίο δημιουργήθηκε από τον Cosgrove, έγινε η περιγραφή του ετερόζυγου knockout μοντέλου για τη ΝΛΒΜ σε SvJ/129 γενετικό υπόβαθρο (Beirowski et al., 2006). Το ποντίκι αυτό παρουσίασε σημαντικά μικρότερη επιβίωση (21.7 μήνες) σε σχέση με το wild type (30.3 μήνες), εμμένουσα μικροσκοπική αιματοουρία από τις 9 εβδομάδες ζωής, πρωτεϊνουρία μετά τους 3 μήνες με προοδευτική επιδείνωση του βαθμού της στους 24 μήνες ζωής και διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας στους 18 μήνες με επακόλουθη σοβαρή επιδείνωση προ θανάτου. Η ΣΒΜ παρουσίασε σημαντική λέπτυνση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ενώ παράλληλα περιγράφηκε συνοδός σπειραματοσκλήρυνση, διαμεσοσωληναριακή ίνωση και αυξημένα επίπεδα TGF-β και CTGF (Connective Tissue Growth Factor). Οι συγγραφείς με τα ευρήματά τους υποδηλώνουν ότι η εξέλιξη της νόσου στο μοντέλο αυτό είναι πολύ πιο αργή από το ΣΑ, έχει όμως το ίδιο ή παρόμοιο παθογενετικό υπόβαθρο. Επισημαίνουν την αδόκιμη χρήση του όρου “καλοήθους οικογενής αιματοουρία” για τους πάσχοντες από ΝΛΒΜ και τον ελλοχεύοντα κίνδυνο για τους πιθανούς δότες νεφρικού μοσχεύματος με ετερόζυγη μετάλλαξη στα γονίδια COL4.

Οι Hashikami et al το 2019 περιέγραψαν άλλο ένα ζωικό μοντέλο με XLAS (Hashikami et al., 2019) με την ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη R471X στο εξόνιο 21 του *Col4a5*, μετάλλαξη η οποία περιγράφεται και σε ανθρώπους με XLAS. Η πρωτεΐνη α5 (IV) δεν εκφράζεται στο εν λόγω μοντέλο, εν τούτοις όμως η εξέλιξη της νεφρικής νόσου είναι αργή. Τα μεταλλαγμένα ποντίκια ζουν κατά μέσο όρο 28 εβδομάδες, παρά το ότι η πρωτεϊνουρία διαπιστώνεται από τις 6 εβδομάδες ζωής. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αιματοουρία δεν ανιχνεύθηκε παρά μόνο μετά τους 22 μήνες. Οι συγγραφείς πιθανολογούν ότι η καθυστερημένη εξέλιξη της νόσου οφείλεται στο C57BL/6 J γενετικό υπόβαθρο και στη θέση της μετάλλαξης 1400bp από το 5' άκρο του γονιδίου. Όπως θα αναμενόταν, οι ανωμαλίες που περιγράφονται στη ΣΒΜ είναι μόνο ήπιες στα αρχικά στάδια της νόσου (εστιακή λέπτυνση στις 6 εβδομάδες ζωής) και εξεσημασμένες με την πάροδο της ηλικίας (πάχυνση, διάσπαση και πολυστρωμάτωση στις 22 εβδομάδες ζωής).

Παρά το γεγονός ότι οι πλείστες μεταλλάξεις που ευθύνονται για το σύνδρομο Alport αφορούν στην αντικατάσταση ενός μονήρους αμινοξέος, εντούτοις μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία δεν καταγράφεται πλήρης φαινοτυπική περιγραφή ενός knockout μοντέλου ποντικού με παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από την περιγραφή ενός knockout μοντέλου ποντικού αναφέρονται σε σχέση με την ενεργοποίηση του “Unfolded Protein Response” (UPR) pathway, σε έδαφος μεταλλάξεων στο *COL4A3* (Pieri et al., 2014). Το εν λόγω μοντέλο φέρει την παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη *Col4a3-*

*G1332E*, η οποία αποτελεί την ομόλογη της *COL4A3-G1334E* μετάλλαξης στον άνθρωπο. Η τελευταία αποτελεί μια ιδιαίτερα συχνή μετάλλαξη ανάμεσα στους Κύπριους ετεροζυγώτες φορείς μεταλλάξεων στο *COL4A3*, λόγω του φαινομένου του ιδρυτή (Voskarides et al., 2007). Στην εν λόγω δημοσίευση, περιγράφονται δεδομένα τα οποία δεικνύουν την ενεργοποίηση του UPR σε καλλιέργειες ανθρώπινων ποδοκυττάρων, στο ζωικό μοντέλο αλλά και σε βιοψικό υλικό από ασθενείς με ΝΑΒΜ που φέρουν την ίδια μετάλλαξη. Η ίδια αυτή μετάλλαξη σε σύνθετη ετεροζυγία με την *COL4A3-G871C* βρέθηκε σε ασθενείς με τυπικό ΣΑ (Voskarides et al., 2007). Σχετικά με την φαινοτυπική ανάλυση του ομόζυγου για την *Col4a3-G1332E* ποντικού, οι συγγραφείς περιορίστηκαν στην περιγραφή της ΣΒΜ στο ΗΜ σε ποντικούς νεαρής ηλικίας, σε μεικτό γενετικό υπόβαθρο. Τα ευρήματα από τη ΣΒΜ ήταν συμβατά με το ΣΑ.

### **1.9 Καινοτόμοι τρόποι αντιμετώπισης του ΣΑ και αναστολείς του Άξονα Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης-Αλδοστερόνης (ΑΡΑΑ)**

Όπως ήδη έχει λεχθεί, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμη θεραπεία που να προσφέρει ίαση για το ΣΑ. Ως εκ τούτου, παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα για ανεύρεση αποτελεσματικής θεραπείας. Πολλές καινοτόμες θεραπευτικές προσεγγίσεις δείχνουν υποσχόμενες σε ζωικά μοντέλα αλλά δεν έχουν εφαρμοστεί ακόμη στον άνθρωπο (Gross and Kashtan, 2009). Για παράδειγμα, αναστολείς του TGF-β1 (Cosgrove et al., 2000), χρήση μεταλλοπρωτεϊνών (Zeisberg et al., 2006), αναστολέων της vasopressinase A (Gross et al., 2005), αναστολέων της HMG-CoA αναγωγάσης (Koepke et al., 2007), χρήση της bone morphogenetic protein-7 (Zeisberg et al., 2003) και αναστολέων του chemokine receptor-1 (Ninichuk et al., 2005) αποτελούν θεραπείες που έχουν δοκιμαστεί σε μοντέλα ποντικού με ΣΑ. Ως νεότερες βιολογικές θεραπείες περιγράφονται η χρήση βλαστοκυττάρων (Prodromidi et al., 2006, Sugimoto et al., 2006, Ninichuk et al., 2006) και η εφαρμογή ακτινοβολίας (Katayama et al., 2008), αν και ο αρχικός ενθουσιασμός για τα είδη αυτά θεραπείας φαίνεται να μην είχε και τα ανάλογα αποτελέσματα στην πορεία, όπως περιγράφεται σε ανασκόπηση όλων των πρόσφατων μελετών με τη χρήση βλαστοκυττάρων για το ΣΑ (Gross et al., 2009). Επιπλέον, η προσπάθεια για γονιδιακή θεραπεία φαίνεται να προκύπτει προβληματική ακόμη και στα ζωικά μοντέλα (Heikkilä et al., 2000). Υπό έρευνα βρίσκονται θεραπείες με τη χρήση βλαστοκυττάρων προερχόμενων από αμνιακό υγρό (Sedrakyan et al., 2012), καθώς και αναστολείς των υποδοχέων του κολλαγόνου τύπου IV (Rubel et al., 2014). Η χρήση συνθετικών chaperones θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση θεραπείας του ΣΑ, τροποποιώντας σε διάφορα επίπεδα την Unfolded Protein Response (UPR) οδό,

βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι το ΣΑ μπορεί να είναι το αποτέλεσμα του συνδυασμού της εξωκυττάριας βλάβης της ΣΒΜ και της ενδοκυττάριας κατάστασης των ποδοκυττάρων (Parazachariou et al., 2014, Pieri et al., 2014). Οι πρωτοπόρες αυτές θεραπευτικές προσπάθειες του ΣΑ περιγράφονται και σε ανασκόπηση του 2014 (Gross et al., 2014).

Περισσότερο υποσχόμενες θεραπευτικές προσεγγίσεις φαίνεται να είναι η χρήση του anti-miRNA-21, της Bardoloxone methyl και της Sparsentan, αφού βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη κλινικές μελέτες με τις ουσίες αυτές (ATHENA trial, clinical trial number: NCT02136862, CARDINAL trial, clinical trial number: NCT03019185, DUET trial (clinical trial number: NCT01613118 αντίστοιχα) (Omachi and Miner, 2019). Το miRNA-21 προάγει την ίνωση πολλαπλών οργάνων όπως και των νεφρών, πιθανώς μέσω παρέμβασης στην κυτταρική παραγωγή ATP, στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και σε φλεγμονώδεις διεργασίες. Σίγαση του miRNA-21 σε μοντέλο ποντικού με ΣΑ βελτίωσε δραστικά την επιβίωση και μείωσε σημαντικά το βαθμό της σπειραματοσκλήρυνσης, της ίνωσης του διάμεσου ιστού, της ατροφίας των ουροφόρων σωληναρίων και της φλεγμονής (Gomez et al., 2015). Η Bardoloxone methyl έχει ήδη δειχθεί να βελτιώνει τη νεφρική λειτουργία σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και χρόνια νεφρική νόσο (Pergola et al., 2011), εντούτοις υπάρχουν ακόμη αμφιβολίες για την ασφάλεια χορήγησής της. Αναστέλλει τον nuclear factor (NF)-κB ο οποίος προάγει τη φλεγμονή και παράλληλα επάγει την παραγωγή αντιοξειδωτικών ουσιών. Η Sparsentan αποτελεί αναστολέα των υποδοχέων AT1 της Αγγειοτενσίνης II άρα παρεμβαίνει στον APAA, αλλά παράλληλα αναστέλλει και τον υποδοχέα τύπου A της Ενδοθηλίνης-1 (ETRA). Η αναστολή του ETRA σε μοντέλο ποντικού με ΣΑ οδήγησε σε καθυστέρηση της εμφάνισης πρωτεϊνουρίας και σημαντική μείωση της βλάβης της ΣΒΜ, ανεξάρτητα από τη μείωση της αρτηριακής πίεσης (Dufek et al., 2016).

Σε λεπτομερή ανασκόπηση της συγγραφέως (Sanna et al., 2016) περιγράφεται η σημαντική δράση των αναστολέων του APAA στην καθυστέρηση της εξέλιξης της νεφρικής νόσου σε ασθενείς με ΣΑ και ΝΛΒΜ. Ουσιαστικά, οι αΜΕΑ πρώτιστα και οι ανταγωνιστές των υποδοχέων AT1 της αγγειοτενσίνης II, μέσω της αντιπρωτεϊνουρικής τους δράσης αλλά και μέσω της δράσης τους ενάντια στη διαδικασία της ίνωσης, θεωρούνται ως ο μοναδικός διαθέσιμος τρόπος αντιμετώπισης του ΣΑ στις μέρες μας. Πρόκειται για παράγοντες οι οποίοι καθυστερούν σημαντικά την εξέλιξη της νεφρικής νόσου, αλλά σε καμία περίπτωση δεν οδηγούν σε ίαση της νόσου. Πολύ πρόσφατα δημοσιεύθηκαν τα εξαιρετικά σημαντικά αποτελέσματα της EARLY PRO-TECT μελέτης (Gross et al., 2020), της πρώτης προοπτικής μελέτης με χορήγηση θεραπείας στο ΣΑ. Από

τη μελέτη αυτή εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι η χορήγηση του αΜΕΑ Ramipril σε παιδιά με πολύ αρχικό στάδιο νόσου (στάδιο αιματουρίας μόνο ή αιματουρίας με συνοδό μικροαλβουμιουρία), είναι ασφαλής σε παιδιά 2 ετών και άνω. Τα αποτελέσματα της μελέτης ήταν ενδεικτικά και υπέρ της αποτελεσματικότητας του Ramipril στην καθυστέρηση της εξέλιξης της νόσου, αν και δεν σημείωσαν στατιστική σημαντικότητα.

ΙΣΑΒΕΛΛΑ ΣΑΒΒΑ

## Κεφάλαιο 2: Επιστημονική Υπόθεση και Ειδικοί Στόχοι

Παρά το ότι πέραν του 50% των περιπτώσεων με ΣΑ οφείλονται σε παρερμηνεύσιμες σημειακές μεταλλάξεις, εντούτοις μέχρι και σήμερα απουσιάζει από τη βιβλιογραφία η ολοκληρωμένη περιγραφή ενός knockin μοντέλου ποντικού. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από το μοντέλο που φέρει τη μετάλλαξη *Col4a3-G1332E* αναφέρονται στη βιβλιογραφία σε σχέση με την ενεργοποίηση του “Unfolded Protein Response” (UPR) pathway (Pieri et al., 2014). Υποθέτουμε ότι το knockin ομόζυγο ζωικό μοντέλο με την εν λόγω μετάλλαξη *Col4a3 mut/mut* και το σύνθετο ετερόζυγο μοντέλο *Col4a3 mut/-* με την εν λόγω μετάλλαξη και ένα knocked out αλληλόμορφο, θα έχουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του ΣΑ, ενώ το ετερόζυγο *Col4a3 mut/+* θα έχει τα χαρακτηριστικά της ΝΛΒΜ.

Οι ειδικοί στόχοι της παρούσας διατριβής ήταν οι εξής:

Πλήρης φαινοτυπική ανάλυση του knockin *Col4a3 mut/mut* και του σύνθετου ετερόζυγου *Col4a3 mut/-* μοντέλου ποντικού σε 129X1/SvJ γενετικό υπόβαθρο. Αυτή θα γίνει ως ακολούθως σε wild type, ετερόζυγα και ομόζυγα ποντίκια, ως ακολούθως:

A) Σε τακτά χρονικά διαστήματα θα γίνεται αξιολόγηση σε ούρα ποντικού παραμέτρων ενδεικτικών νεφρικής νόσου (πρωτεϊνουρία, αιματοουρία), ώστε να εξακριβωθεί η ηλικία εμφάνισής τους και πιθανή προοδευτική επιδείνωση της πρωτεϊνουρίας.

B) Μέτρηση βιοχημικών δεικτών στον ορό των ποντικών προς διαπίστωση επηρεασμένης νεφρικής λειτουργίας (συγκεκριμένα μέτρηση ουρίας και κρεατινίνης ορού).

Γ) Μελέτη νεφρικού ιστού με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (HM) και χαρακτηρισμός των ευρημάτων από τη ΣΒΜ και τα ποδοκύτταρα.

Δ) Αξιολόγηση τομών νεφρικού ιστού με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και κοινώς χρησιμοποιούμενων χρώσεων για την αξιολόγηση κυρίως του βαθμού της ίνωσης των σπειραμάτων και του διαμεσοσωληναριακού ιστού.

Ε) Μελέτη της έκφρασης και της εντόπισης των  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  αλυσίδων του κολλαγόνου τύπου IV με πειράματα ανοσοαποτύπωσης και ανοσοφθορισμού, σε νεφρικά εκχυλίσματα και κρυοτομές νεφρικού ιστού αντίστοιχα.

ΣΤ) Μελέτη της επιβίωσης των μεταλλαγμένων ποντικών

Υποθέτουμε ότι η στρατολόγηση Κύπριων ασθενών με ΝΛΒΜ και ο λεπτομερής κλινικο-εργαστηριακός τους χαρακτηρισμός παράλληλα με τη συλλογή βιολογικού υλικού, θα αποδειχθεί χρήσιμος για τη σκιαγράφηση της φυσικής πορείας της νόσου αλλά και



μελλοντικά για χρήση του βιολογικού υλικού προς ανεύρεση τροποποιητικών γονιδίων ή διαγνωστικών και προγνωστικών βιοδεικτών της νόσου.

Οι ειδικοί στόχοι ήταν οι εξής:

A) Στρατολόγηση Κύπριων ασθενών με ΝΛΒΜ σε 2 χρονικά σημεία με διαφορά τουλάχιστον 2,5 έτη μεταξύ τους.

B) Πλήρης κλινικό-εργαστηριακός χαρακτηρισμός των ασθενών με καταγραφή σωματομετρικών χαρακτηριστικών, συνοδών νοσημάτων, στοιχείων που αφορούν την τρέχουσα φαρμακευτική αγωγή.

Γ) Κατάταξη των ασθενών σε στάδιο σοβαρότητας της νεφρικής τους νόσου, αναλόγως της ηλικίας τους και της παρουσίας κλινικώς σημαντικής πρωτεϊνουρίας και βαθμού έκπτωσης της νεφρικής νόσου. Αξιολόγηση της εξέλιξης της νεφρικής νόσου από το πρώτο χρονικό σημείο μέχρι το δεύτερο.

Δ) Παράλληλη συλλογή βιολογικού υλικού (αίματος προς απομόνωση DNA, ορού, πλάσματος και ούρων) για φύλαξή τους στη Βιοτράπεζα του Πανεπιστημίου Κύπρου και μελλοντική τους χρήση για μελέτες ανίχνευσης διαγνωστικών ή προγνωστικών βιοδεικτών.

## Κεφάλαιο 3: Μεθοδολογία για μελέτες σε ποντίκια

### 3.1 Μοντέλα Ποντικού

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες που αφορούν στη χρήση ζώων διεξήχθησαν σύμφωνα με τον κυπριακό νόμο περί προστασίας των δικαιωμάτων των ζώων και έχουν λάβει έγκριση από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες του Υπουργείου Γεωργίας, Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος (κωδικός έγκρισης CY/EXP/PR.L5). Τα ποντίκια φιλοξενούνται σε ειδικές εγκαταστάσεις στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου, σε περιβάλλον ελεύθερο παθογόνων. Διατηρούνται σε κλουβιά, σε κύκλο 12 ωρών φωτός/12 ωρών σκότους, υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία 21°C και υγρασία 45% και με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή.

Το ομόζυγο knockin (*Col4a3* mut/mut) μοντέλο με τη μετάλλαξη *Col4a3*-Gly1332Glu λήφθηκε από το εργαστήριο του Καθηγητή Κ. Δέλτα (Πανεπιστήμιο Κύπρου). Το εν λόγω μοντέλο φέρει μία σημειακή μετάλλαξη στο εξόνιο 45 του *Col4a3*, η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση της γλυκίνης από γλουταμικό οξύ. Τα ποντίκια διασταυρώθηκαν με wild type ποντίκια στο 129/SvJ γενετικό υπόβαθρο για 5 συνεχόμενες γενιές, ώστε να θεωρούνται ότι έχουν προχωρημένο δείκτη αιμομικτικού γενετικού υποβάθρου (incipient congenic).

Το *Col4a3* knockout μοντέλο λήφθηκε από το εργαστήριο του Καθηγητή Ο. Gross (Πανεπιστήμιο Göttingen, Γερμανία). Προκύπτει από τη διασταύρωση ετερόζυγων knockout (*Col4a3* +/-) ποντικών μεταξύ τους, μια που τα ομόζυγα knockout (*Col4a3* -/-) ποντίκια δεν μπορούν να αναπαραχθούν.

Το σύνθετο ετερόζυγο ποντίκι (*Col4a3* mut/-) φέρει το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο *Col4a3*-Gly1332Glu και το *Col4a3* knockout (-) αλληλόμορφο. Το ποντίκι αυτό προέρχεται από τη διασταύρωση του ετερόζυγου knockout (*Col4a3* +/-) μοντέλου με το ομόζυγο knockin (*Col4a3* mut/mut) μοντέλο.

### 3.2 Γονοτύπηση ποντικών

**Για το knockin (*Col4a3* mut/mut) μοντέλο:**

#### α) Απομόνωση DNA από ουρά ποντικού

Αποκόπτεται τμήμα 5mm από την ουρά ενός ποντικού και τοποθετείται σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf. Προστίθενται 500μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (TNES buffer: 1M Tris, 5M NaCl, 0,5M EDTA, 10% SDS, ddH<sub>2</sub>O) και 20μL Proteinase K (20mg/ml) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 55°C για 18 ώρες. Στη συνέχεια το δείγμα

φυγοκεντρείται για να απομακρυνθούν οι τρίχες και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο φιαλίδιο. Προστίθενται 75μL NaCl 5M και έπειτα 800 μL αιθανόλη 100% παγωμένη στους -20°C και ακολουθεί καλή ανακίνηση. Το DNA κατακρημνίζεται σε μορφή λευκών ινών και μεταφέρεται σε νέο σωλήνα με 800 μL αιθανόλη 70%. Έπειτα το DNA μεταφέρεται και πάλι σε νέο σωλήνα με 800μL αιθανόλη 70%, με σκοπό να απομακρυνθεί εντελώς το NaCl. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε αντλία κενού. Τέλος, επαναδιαλύεται το ίζημα σε 200μL διπλά απιονισμένου νερού και θερμαίνεται στους 60°C για 20 λεπτά με συνοδό συνεχή ανακίνηση, μέχρι να διαλυθεί πλήρως το ίζημα του DNA. Με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE) γίνεται μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA και ακολούθως διάλυσή τους σε συγκέντρωση 50ng/μl.

### **β) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού - PCR**

Γίνεται χρήση 50ng γενωμικού DNA από κάθε δείγμα σε 30μL τελικού όγκου αντίδρασης PCR, σύμφωνα με το ακόλουθο πρόγραμμα: αρχική επώαση στους 96°C για 3min ακολουθούμενη από 30 κύκλους PCR, με 50sec αποδιάταξης στους 94°C, 50sec υβριδισμού των εκκινητών στους 60°C και 50sec επιμήκυνσης στους 72°C. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με ένα κύκλο τελικής επιμήκυνσης στους 72°C για 5min.

Για την ενίσχυση της περιοχής όπου βρίσκεται η μετάλλαξη γίνεται χρήση των ακόλουθων εκκινητών:

mG1332E\_XbaI-F:5'-AAGGGTAACCCTGGATTTCTTGGGCCAATTGGACATCTAG-3'

mG1332E\_XbaI-R: 5'-GGCTTCCCGGAAGAGAGATGACCTTAAGAGTGCCAGGT-3'

### **γ) Αλληλούχηση κατά Sanger**

Χρησιμοποιούνται ιδανικά 20ng προϊόντος PCR τα οποία καθαρίζονται με τη χρήση του ενζύμου ExoSAP. Επιτυγχάνεται έτσι η απομάκρυνση της περίσσειας των εκκινητών και των μονόκλωνων μορίων DNA καθώς και των dNTPs. Ακολουθεί ενίσχυση του DNA σε κυκλική αντίδραση αλληλούχησης, με χρήση του BigDye V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) εφαρμόζοντας τα πρωτόκολλα που παρέχει ο κατασκευαστής. Στη συνέχεια γίνεται κατακρήμνιση του DNA χρησιμοποιώντας 125mM EDTA, 3M οξικό νάτριο και 70% αιθανόλη. Προστίθεται φορμαμίδιο ως αποδιατακτική ουσία, η οποία χρειάζεται για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA στον αυτόματο



Col4a3-mt: 5'-AATCGCCAATGACAATTGAGA-3'

Οι δύο πρώτοι εκκινητές υβριδίζονται στα εξώνια 48 και 49 αντίστοιχα του *Col4a3* γονιδίου, ενώ ο τρίτος εκκινητής υβριδίζεται εντός της κασέτας νεομυκίνης (neomycin cassette). Η τελευταία τοποθετήθηκε εντός του εξωνίου 48 για το σχηματισμό του knockout μοντέλου. Ο συνδυασμός των δύο πρώτων εκκινητών (F και R) αναγνωρίζει το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ενώ ο συνδυασμός του 2<sup>ου</sup> και 3<sup>ου</sup> εκκινητή (R και mt) αναγνωρίζει το knockout αλληλόμορφο. Στη συνέχεια, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε γέλη αгарόζης στα 70V για 45min. Στην εικόνα 8 φαίνεται πώς διακρίνονται τα ποντίκια με βάση το γονότυπό τους.



**Εικόνα 8: Γονοτύπηση του Col4a3 knockout μοντέλου ποντικού-Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR.** Επισημαίνεται πώς διακρίνονται τα ετερόζυγα knockout Col4a3 +/-, τα wild type Col4a3 +/+ και τα ομόζυγα knockout Col4a3 -/- ποντίκια

### **Γονοτύπηση για το σύνθετο ετερόζυγο Col4a3 (mut/-) μοντέλο:**

Ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε πιο πάνω, γίνεται αρχικά εντοπισμός του knockout αλληλομόρφου και ακολουθεί η ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης στο δεύτερο αλληλόμορφο με τη μέθοδο αλληλούχησης κατά Sanger.

### **3.3 Αξιολόγηση πρωτεϊνουρίας/αιματοουρίας και βιοχημικών παραμέτρων στον ορό**

Έγινε συλλογή ούρων 24ώρου από ομόζυγα knockin (*Col4a3* mut/mut), σύνθετα ετερόζυγα (*Col4a3* mut/-) και wild type (WT) ποντίκια από την ηλικία των 3 μηνών, κάθε 4 εβδομάδες, για περίοδο 13 συνολικά μηνών. Για τον σκοπό αυτό τα ποντίκια τοποθετούνταν σε μεταβολικά κλουβιά για 24 ώρες. Τα κλουβιά αυτά είναι ειδικά κατασκευασμένα ώστε να γίνεται αυτόματος διαχωρισμός των ούρων από τα κόπρανα.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση των ούρων για 2 λεπτά στις 4600rpm και 20μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκαν για ημιποσοτική αξιολόγηση της πρωτεϊνουρίας. Αυτή

έγινε με ηλεκτροφόρηση σε 7.5% γέλη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Για το σκοπό αυτό προστέθηκε στο κάθε δείγμα ούρων Laemmli buffer σε αναλογία 1:1. Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεϊνικές ζώνες έγιναν εμφανείς μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue και ακολούθως αποχρωματισμό με διάλυμα Μεθανόλης: Οξικού οξέος: ddH<sub>2</sub>O (30:5:65) σε συνεχή ανακίνηση για 2 ώρες. Ως δείγμα αναφοράς, ηλεκτροφορήθηκε συγκεκριμένος όγκος γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης ορού βοοειδούς (Bovine Serum Albumin-BSA), μοριακού μεγέθους 67kDa. Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε στο ChemiDOC XRS documentation system (Biorad, CA, USA) και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης σε αλβουμίνη των προς εξέταση δειγμάτων με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης (standard curve).

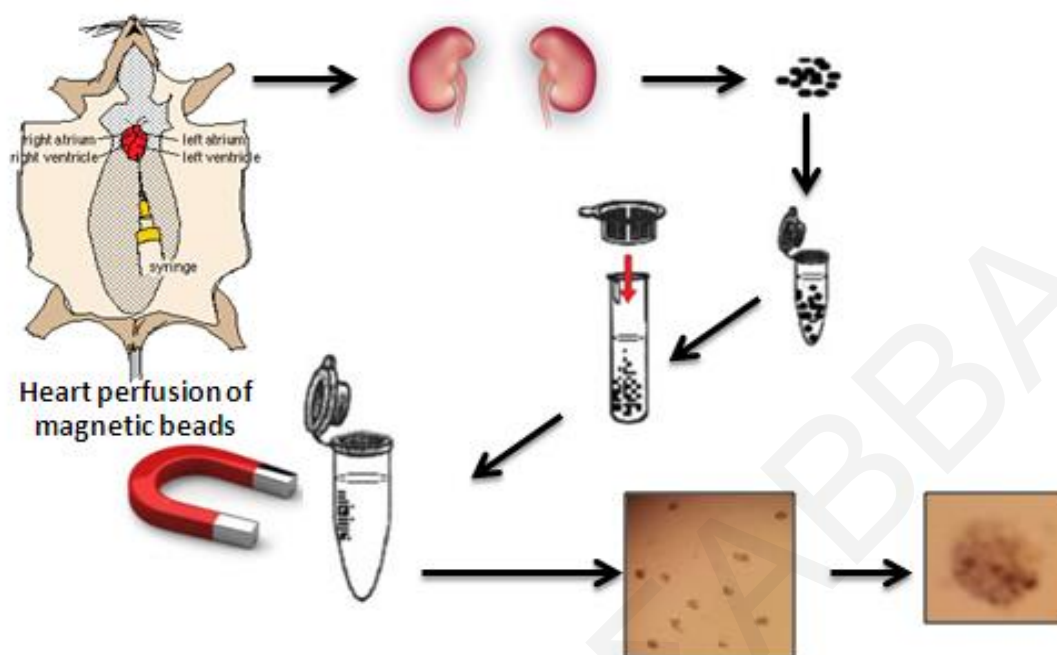
Η αρχική αξιολόγηση της αιματοουρίας έγινε με τη χρήση dipstick test (Combur Test UX, Roche) και ακολούθως με υπολογισμό του αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων/μl ούρων με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κυτταρομετρικές πλάκες τύπου Neubauer και μέτρηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε 10 τουλάχιστον οπτικά πεδία.

Η μέτρηση της ουρίας και της κρεατινίνης στον ορό έγινε με τη χρήση βιοχημικού αναλυτή σε εξωτερικά κλινικά εργαστήρια, από αίμα που συλλέχθηκε από την καρδιά ζώων που θυσιάστηκαν.

### **3.4 Απομόνωση σπειραμάτων**

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Takemoto et al (Takemoto et al., 2002). Εν συντομία, το ποντίκι αναισθητοποιείται μέσω ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης Avertin σε δόση 0,2mL/10gr σωματικού βάρους. Ακολουθεί διάνοιξη του στέρνου, διατομή του δεξιού καρδιακού κόλπου για επίτευξη ανοικτής κυκλοφορίας και χορήγηση δια των αριστερών καρδιακών κοιλοτήτων  $8 \times 10^7$  Dynabeads<sup>®</sup> M-450 Tosylactivated (Invitrogen) διαλυμένων σε 40mL phosphate-buffered saline (PBS). Αφαιρούνται οι νεφροί, τοποθετούνται σε διάλυμα HBSS στους 4°C και ακολούθως τέμνονται σε κομμάτια μεγέθους 1mm<sup>3</sup>. Προστίθεται διάλυμα HBSS με Collagenase (1mg/mL) στους 37°C για 30min, με συνεχή ήπια ανακίνηση. Οι ακόλουθες διαδικασίες πραγματοποιούνται πάνω σε πάγο. Ο ιστός που έχει υποστεί πέψη πιέζεται ελαφρώς διαμέσου ενός κυτταρικού φίλτρου 100μm με τη χρήση του οπίσθιου μέρους ενός εμβόλου σύριγγας 1ml. Γίνεται πλύση του φίλτρου με 5mL HBSS και το εναιώρημα διαπερνά ένα δεύτερο φίλτρο, χωρίς πίεση αυτή τη φορά. Ακολουθεί δεύτερη πλύση με 5mL HBSS και το εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 200g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε

2mL HBSS. Στο τέλος, τα σπειράματα με τα περιέχοντα Dynabeads συγκεντρώνονται με τη βοήθεια μαγνήτη (εικόνα 9).



**Εικόνα 9: Απομόνωση σπειραμάτων** (λήφθηκε από Takemoto et al, 2002, *Am J Pathol*)

Ακολουθούν 3 πλύσεις με 2ml HBSS και έπειτα τα απομονωθέντα σπειράματα με beads τοποθετούνται σε διάλυμα λύσης (με 1% β – μερκαπτοαιθανόλη). Στη συνέχεια διαπερνούν μέσα από βελόνα σύριγγας, με δείκτη 20GX1". Τα δείγματα τοποθετούνται και πάλι στο μαγνήτη προς απομάκρυνση αυτή τη φορά των beads και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέα σωληνάρια, προς απομόνωση σπειραματικής προέλευσης πρωτεΐνης και RNA όπως περιγράφεται πιο κάτω.

### **3.5 Απομόνωση ολικού RNA και πρωτεΐνης από σπειράματα και από δείγματα ολικού νεφρού**

Για τη χρήση δειγμάτων σπειραματικής προέλευσης ακολουθήθηκε η πιο πάνω περιγραφείσα διαδικασία. Για χρήση δειγμάτων ολικού νεφρού, έγινε χορήγηση PBS στα ποντίκια δια των αριστερών καρδιακών κοιλοτήτων και απομόνωση στη συνέχεια των νεφρών. Έγινε διατομή του ιστού σε κομμάτια μεγέθους  $1\text{mm}^3$ , πέψη με Collagenase, πλύσεις με HBSS και τοποθέτηση σε διάλυμα λύσης με 1% β – μερκαπτοαιθανόλη, όπως περιγράφεται πιο πάνω.

Η απομόνωση ολικού RNA και πρωτεΐνης από τα σπειράματα και από δείγματα ολικού νεφρού έγινε με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου NucleoSpin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ακεραιότητα του RNA

αξιολογήθηκε με τη χρήση του Agilent 2100 Bioanalyzer, καθώς και η μέτρηση της συγκέντρωσής του. Η μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης έγινε με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (Qubit R 20 Fluorometer, Invitrogen by Life Technologies).

### **3.6 Εξέταση νεφρικού ιστού σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο**

Έγινε αφαίρεση του νεφρού και μονιμοποίηση φρέσκου ιστού σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης 2,5%, 0,1M κακοδυλικού νατρίου και παραφορμαδεΐδης 4%. Τα δείγματα στάληκαν στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο του Ηρακλείου και συγκεκριμένα στο εργαστήριο του Δρ Στυλιανού, ο οποίος διεκπεραίωσε την περιγραφή των εικόνων στο HM και τις μετρήσεις των ΣΒΜ. Ακολούθησε η λήψη τομών πάχους 50-100nm με τη χρήση υπερμικροτόμου. Χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (JEM2100HR; JEOL, Inc., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με ES500W Erlangshen CCD κάμερα (Gatan GmbH, Munchen, Germany). Η μέτρηση του πάχους της ΣΒΜ έγινε σε ανοιχτές τριχοειδικές αγκύλες με το Digital-Micrograph λογισμικό (Gatan), ενώ οι μετρήσεις αφορούσαν 25-40 σπειράματα από τρία ποντίκια κάθε ομάδας. Ο αριθμός των τριχοειδικών αγκύλων που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε ομάδα ποντικών για τον υπολογισμό του μέσου όρου του πάχους της ΣΒΜ στις περιοχές με λεπτονση ήταν: 44 από τα knockin ομόζυγα *Col4a3* mut/mut, 65 από τα σύνθετα ετερόζυγα *Col4a3* mut/- , 38 από τα knockin ετερόζυγα *Col4a3* mut/+ και 22 από τα wild type *Col4a3* +/+ ποντίκια.

### **3.7 Απομόνωση νεφρικού ιστού για περαιτέρω ιστολογικές εξετάσεις**

Όπως περιγράφηκε πιο πάνω, το ποντίκι αναισθητοποιείται μέσω ενδοπεριτοναϊκής χορήγησης Avertin σε δόση 0,2mL/10gr σωματικού βάρους. Ακολουθεί διάνοιξη του στέρνου, διατομή του δεξιού καρδιακού κόλπου για επίτευξη ανοικτής κυκλοφορίας και χορήγηση δια των αριστερών καρδιακών κοιλοτήτων PBS προς αφαίρεση του αίματος από τα αγγεία των ιστών. Ακολουθεί αφαίρεση των νεφρών και αναλόγως της διαδικασίας που θα ακολουθήσει, γίνεται τοποθέτησή τους στο κατάλληλο διάλυμα.

Συγκεκριμένα, για εξετάσεις ανοσοφθορισμού σε κρυτομές, οι νεφροί τοποθετούνται σε διάλυμα OCT στους -80°C. Για εξετάσεις ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης, οι νεφροί τοποθετούνται σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% στους 4°C, ενώ για επακόλουθη απομόνωση RNA και πρωτεΐνης τοποθετούνται σε διάλυμα HBSS επίσης στους 4°C.



### 3.8 Έγκλειση νεφρικού ιστού σε παραφίνη

Οι νεφροί συλλέγονται σύμφωνα με την πιο πάνω περιγραφείσα διαδικασία και τοποθετούνται σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 4% για 20 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρείται η παραφορμαλδεΐδη, γίνονται 2 πλύσεις με PBS και ακολουθεί τοποθέτηση των νεφρών σε προοδευτικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (50%, 70%, 85%, 90% και 100%) με μία ώρα χρόνο παραμονής σε κάθε διάλυμα. Έπειτα οι νεφροί τοποθετούνται ακόμη 2 φορές σε διάλυμα αιθανόλης 100%, για μία ώρα κάθε φορά. Μετά την αφαίρεση της αιθανόλης, γίνεται τοποθέτηση των νεφρών σε ξυλίνη (3 φορές για 50min κάθε φορά) και ακολούθως σε διάλυμα ξυλίνης : παραφίνης σε αναλογία 1:1 στους 60°C για 15min. Τελικώς, οι νεφροί τοποθετούνται 3 φορές σε υγρή παραφίνη στους 60°C για 60min κάθε φορά, αφαιρούνται από το διάλυμα και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για ένα 24ωρο.

### 3.9 Κρυοτομές νεφρικού ιστού για πειράματα ανοσοφθορισμού

Από τους νεφρούς που τοποθετήθηκαν σε OCT στους -80°C, λαμβάνονται τομές 6μm με τη χρήση κρυοστάτη και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Αφήνονται στους 4°C για 20min. Ακολουθεί μονιμοποίηση με παγωμένη ακετόνη στις πλάκες για 10min στους 4°C και ακολουθούν πολλαπλές πλύσεις διάρκειας 3min με PBS. Για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών προστίθεται 0.2 Triton X για 15min και για την ανάκτηση του επιτόπου (antigen retrieval) γίνεται επώαση με διάλυμα Urea 6M, Glycine-HCl 0.1M pH 3.5 στους 4°C για 30min. Μετά από πλύσεις με PBS ακολουθεί επώαση σε blocking solution (1% BSA, 5% ορού ζώου στο οποίο έχει παραχθεί το δευτερογενές αντίσωμα) για μία ώρα. Αφαιρείται το blocking solution και ακολουθεί επώαση στους 4°C για 16h με το κατάλληλο κάθε φορά πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο στο blocking solution. Στη συνέχεια αφαιρείται το πρωτογενές αντίσωμα, γίνονται πλύσεις με PBS και τοποθετείται 0.2 Triton X για 15min. Γίνονται πάλι πλύσεις με PBS και τοποθετείται το δευτερογενές αντίσωμα (Alexa 488 ή Cy3 conjugated) διαλυμένο σε blocking solution σε αραιώση 1:500 για 60min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 5 πεντάλεπτες πλύσεις με PBS, προσθήκη σταθεροποιητικού υλικού (mounting medium) και τελικά εφαρμογή καλυπτρίδων επί των αντικειμενοφόρων πλακών.

Για τα πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιείται πάλι 0.2 Triton X σε τομές νεφρικού ιστού 6μm. Η ανάκτηση επιτόπου γίνεται με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για 10min σε διάλυμα HCl 3.65g/l και χρήση διαλύματος Urea 6M, Glycine-HCl 0.1M pH 3.5 για 30min στους 4°C.

Χρησιμοποιήθηκε TCSL συνεστιακό (confocal) μικροσκόπιο (Leica, Germany).

### **3.10 Χρώσεις σε τομές παραφίνης για εξέταση νεφρικού ιστού σε οπτικό μικροσκόπιο**

Για την εξέταση του νεφρικού ιστού στο οπτικό μικροσκόπιο και την αξιολόγηση κυρίως του βαθμού και της κατανομής της νεφρικής ίνωσης χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές χρώσεις (Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη, Τριχρωμική Masson's, PAS και χρώση Sirius Red) σε τομές παραφίνης 4μm. Για απομάκρυνση της παραφίνης γίνονται 2 πλύσεις σε ξυλίνη 10min η κάθε μία. Ακολουθεί ενυδάτωση των τομών του νεφρικού ιστού με τοποθέτησή τους σε διαδοχικά μειούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (100%, 70%, 30% και 5%) για 5min σε κάθε διάλυμα. Στη συνέχεια γίνεται πλύση με dH<sub>2</sub>O για 5min και ακολουθεί μία από τις χρώσεις του ιστού, όπως περιγράφεται πιο κάτω.

Η διαδικασία των χρώσεων επαναλήφθηκε σε διαφορετικές τομές (n >3) για το κάθε δείγμα. Για την αξιολόγηση της σωληναριακής βλάβης (η οποία ορίζεται ως η παρουσία ατροφίας και διάτασης των νεφρικών σωληναρίων και πάχυνσης της βασικής τους μεμβράνης) και της διαμεσοσωληναριακής ίνωσης (μπλε χρώμα στην Τριχρωμική χρώση Masson's και κόκκινο χρώμα στη Sirius Red χρώση) εξετάστηκαν: 10 πεδία νεφρικού φλοιού από τον κάθε ποντικό σε μεγέθυνση x 200 και υπολογίστηκε το ποσοστό των σωληναρίων που παρουσίαζαν βλάβη. Για την ποσοτικοποίηση του βαθμού της πειραματικής βλάβης, εξετάστηκαν 100 σπειράματα και ο αριθμός των τμηματικώς ή σφαιρικώς σκληρυμένων σπειραμάτων, εκφράστηκε με τη μορφή ποσοστού. Οι νεφρικές τομές αξιολογήθηκαν από δύο νεφρο-ιστοπαθολόγους με τυφλό τρόπο, στο εργαστήριο της Δρ Danica Galesic Ljubanovic, στο τμήμα Νεφροπαθολογίας και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Πανεπιστημίου του Ζάκρεμπ στην Κροατία.

### **3.11 Χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης**

Η διαδικασία ξεκινά με προσθήκη αιματοξυλίνης για 1min προς χρώση των πυρήνων με μαύρο χρώμα. Οι τομές τοποθετούνται κάτω από νερό βρύσης για 1-2min μέχρι να απομακρυνθεί το έντονο μπλε χρώμα της χρώσης. Ακολουθεί για 4min επώαση σε διάλυμα ηωσίνης 0.5% (αφού έχουν προστεθεί 2 σταγόνες οξικού οξέος και το διάλυμα έχει φιλτραριστεί από χαρτί διήθησης). Η ηωσίνη βάφει το κυτταρόπλασμα και το εξωκυττάριο ιστό με ροζ χρώμα. Γίνονται πλύσεις με dH<sub>2</sub>O και έπειτα ακολουθεί αφυδάτωση των τομών με τοποθέτησή τους σε διαλύματα αιθανόλης προοδευτικά αυξανόμενης συγκέντρωσης (30%, 70% και 100%) για 2min στο κάθε ένα και τελικά σε

ξυλίνη για 10min. Τοποθετείται σταθεροποιητικό υλικό (DPX mounting medium), εφαρμόζονται καλυπτρίδες πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες και αφήνονται σε πλάκα θέρμανσης στους 42°C για 15min.

### **3.12 Τριχρωμική χρώση Masson's**

Για τη χρώση αυτή χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit της Sigma-Aldrich,UK σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η τριχρωμική χρώση χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των κυττάρων από τον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό και θεωρείται ως μία από τις χρησιμότερες χρώσεις για την αξιολόγηση της ίνωσης των σπειραμάτων και του διάμεσου ιστού. Η χρώση βάφει τους πυρήνες με μαύρο χρώμα, το κυτταρόπλασμα και τους μυς με κόκκινο χρώμα και το κολλαγόνο με μπλε χρώμα.

### **3.13 Periodic Acid-Schiff (PAS) χρώση**

Για τη χρώση αυτή χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο Periodic Acid-Schiff Staining kit (Sigma –Aldrich, UK) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Βάφει ως χρώση τους πολυσακχαρίτες και θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική στην ιστοπαθολογική αξιολόγηση του νεφρικού ιστού, αφού αναδεικνύει με σχετική λεπτομέρεια τα κύτταρα του σπειράματος, το μεσαγγειακό ιστό και την πιθανή αύξησή του αλλά και αλλαγές στη ΣΒΜ (πάχυνση, ανωμαλίες, διάσπαση, διπλασιασμός της).

### **3.14 Sirius Red χρώση**

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο kit Sirius Red (Chondrex, USA) και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιώντας τομές 4μm.

Η χρώση αυτή κρίνεται ως πολύ χρήσιμη για την ποσοτικοποίηση του βαθμού της ίνωσης και κατ'επέκταση του ποσοστού της βλάβης του ιστού. Βάφει τις περιοχές της ίνωσης με κόκκινο χρώμα.

### **3.15 Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)**

15μg πρωτεΐνης από δείγματα ολικού νεφρού ή σπειραμάτων ηλεκτροφορούνται σε 10% SDS-PAGE και ακολουθεί μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και blocking. Γίνεται blocking σε 5% γάλα ή σε BSA σε TBST διάλυμα ή ChonBlock (Chondrex, USA) για μία ώρα και ακολουθεί επώαση με τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα

(πίνακας 1). Η επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα γίνεται στους 4°C για 16 ώρες και ακολουθεί την επόμενη μέρα επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα, τα οποία είναι σεσημασμένα με υπεροξειδάση. Όλες οι μεμβράνες επαναχρησιμοποιούνται μετά από stripping με τη χρήση αντισώματος έναντι της  $\beta$ -tubulin (Santa Cruz Biotechnology) σε αραιώση 1:500, για σκοπούς κανονικοποίησης.

Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται με τη χρήση του Enhanced ChemiLuminescence Plus Blotting Detection System (Amersham Biosciences, UK) και οπτικοποιούνται με το ChemiDoc™ XRS+System (BioRad, CA, USA). Η αξιολόγηση της έντασης και της πυκνότητας κάθε μπάντας γίνεται με το ImageJ Software (<http://imagej.nih.gov/ij>).

**Πίνακας 1. Λίστα των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν**

PRIMARY ANTIBODIES		
Antibody	Company / Cat.no	Experiment / Dilution
anti- Acta2	Origene #TA350958	WB 1:1000
anti- $\beta$ -tubulin	Santacruz #sc-55529	WB 1:500
anti- Col4a1	Chondrex #7070	IF-F 1:400
anti- Col4a2	Chondrex #7071	IF-F 1:400
anti- Col4a3	Chondrex #7076	WB 1:700 IF-P 1:50 IF-F 1:400
anti- Col4a3	Origene #TA342815	WB 1:1000
anti- Col4a4	Chondrex #7073	WB 1:700 IF-F 1:400
anti- Col4a5	Chondrex #7078	WB1:700 IF-F 1:400
anti- Col4a5	Chondrex #7079	WB 1:700
anti-laminin	Sigma-Aldrich #L9393	IF-P 1:200
anti-Muc1-CT2	Invitrogen #MA5-11202	WB 1:1000
anti-podocin	Boster # PA1322-1	WB 1:1000
anti-Synaptopodin	Santacruz #sc-21357	WB 1:2000 IF-P 1:50
anti-Tgf $\beta$ 1	Santacruz #sc130348	WB 1:250
SECONDARY ANTIBODIES		
Anti-mouse	Santa Cruz #sc-516102	WB 1:2000
Anti-rabbit	Santa Cruz #sc-2004	WB 1:2000
Anti-rat	Santa Cruz # sc-2006	WB 1:2000
488 anti-Rat	Thermofisher # A21208	IF-F, IF-P 1:500
555 anti-rat	Thermofisher # A21434	IF-F, IF-P 1:500
488 anti-rabbit	Thermofisher # A21206	IF-P 1:500
568 anti-goat	Thermofisher # A11057	IF-P 1:500
<b>WB:</b> Western Blot, <b>IF-F:</b> Immunofluorescence on fresh frozen kidneys, <b>IF-P:</b> Immunofluorescence on paraffin embedded kidneys		

### 3.16 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση του πάχους της ΣΒΜ σε εικόνες από ΗΜ αξιολογήθηκαν οι μετρήσεις από τις διαφορετικές ομάδες των ποντικών, με τη χρήση one-way ANOVA ανάλυσης και TUKEY post-testing.

Η επιβίωση των ποντικών εκτιμήθηκε με τη βοήθεια της standard Kaplan-Meier ανάλυσης σε συνδυασμό με log-rank Mantel-Cox testing.

Για την ανάλυση της αλβουμινουρίας έγινε χρήση της two-way ANOVA σε log<sub>10</sub>- τιμές.

Χρησιμοποιήθηκε το GraphPad Prism-5 λογισμικό (GraphPad, LJ, USA) για την ανάλυση όλων των δεδομένων. Ως στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η τιμή  $p \leq 0.05$ .

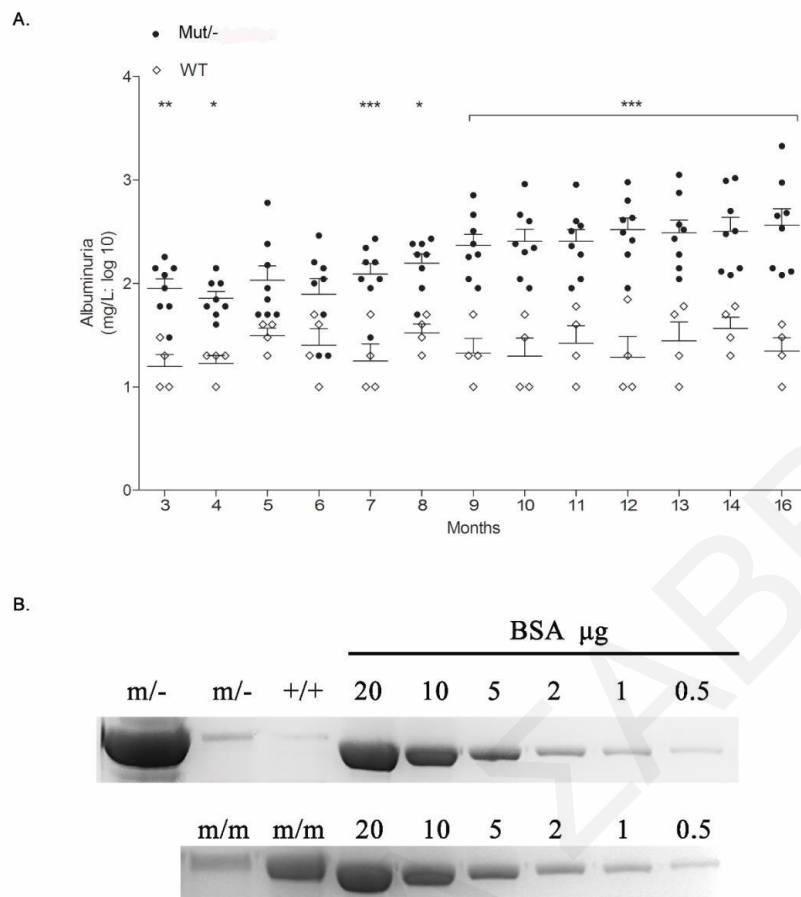
## Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα από τις μελέτες στα ποντίκια

### 4.1 Αυξημένη αλβουμινουρία στα ομόζυγα knockin (*Col4a3* mut/mut) και σύνθετα ετερόζυγα (*Col4a3* mut/-) ποντίκια η οποία επιδεινώνεται με την αυξανόμενη ηλικία

Για περίοδο 13 μηνών έγινε αξιολόγηση της συγκέντρωσης αλβουμίνης στα ούρα ανά μήνα σε *Col4a3* mut/mut (n=8), *Col4a3* mut/- (n=8) και wild type ποντίκια (n=4). Στα σύνθετα ετερόζυγα ποντίκια παρατηρήθηκε αλβουμινουρία > 0.1g/L μετά τους τρεις μήνες ζωής, της οποίας το μέγεθος αυξήθηκε σε > 1g/L μετά τους 12 μήνες ζωής (εικόνα 10). Τα ευρήματα από την αξιολόγηση της αλβουμινουρίας στα *Col4a3* mut/mut ποντίκια δεν ήταν σταθερά, όταν αυτά εξετάστηκαν σε νεαρή ηλικία. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι τα ποντίκια δεν ήταν αποτέλεσμα απόλυτης αιμομιξίας σε κοινό γενετικό υπόβαθρο, οπότε και δικαιολογείται ένας βαθμός φαινοτυπικής ετερογένειας.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν ποντίκια προχωρημένης ηλικίας, άνω των 15 μηνών. Στα *Col4a3* mut/mut (n=32) παρατηρήθηκε αλβουμινουρία σε αυξημένα επίπεδα (>1 g/L) στο 62,5% των ποντικών και στα *Col4a3* mut/- (n=32) στο 65%.

Επιπρόσθετα, η μικροσκοπική ανάλυση των ούρων ανέδειξε διαλείπουσα μικροσκοπική αιματουρία μετά τον τρίτο μήνα ζωής στο 75% των ποντικών με μετάλλαξη. Η παρουσία της σημειακής μετάλλαξης ήταν αρκετή για την διαφυγή ερυθροκυττάρων στα ούρα, με ή χωρίς την επιπρόσθετη πλήρη απώλεια του ενός αλληλομόρφου.



**Εικόνα 10: Αυξημένη αλβουμιουρία στα σύνθετα ετερόζυγα (*col4a3* mut/-) ποντίκια συγκριτικά με τα wild type ποντίκια**

(A) Συγκέντρωση αλβουμίνης ούρων (g/L) σε 8 σύνθετα ετερόζυγα ποντίκια (μαύροι κύκλοι) και 4 wild type ποντίκια (λευκοί ρόμβοι) στην πορεία του χρόνου για 13 μήνες. Επίπεδα αλβουμιουρίας  $>0.1$ g/L παρατηρήθηκαν μετά τους 3 μήνες ζωής και αυξήθηκαν σε  $>1$ g/L μετά τους 12 μήνες στα περισσότερα *Col4a3* mut/- ποντίκια. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με two-way ANOVA on log<sub>10</sub>-transformed values ( $P < 0.001$ ). \* Significant difference of  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

(B) Ηλεκτροφόρηση ούρων σε SDS-PAGE. Ηλεκτροφόρηση 20μl ούρων από δύο σύνθετα ετερόζυγα (mut/-) και ένα wild type ποντίκι παράλληλα με συγκεκριμένες συγκεντρώσεις από Bovine Serum Albumin σε 7,5% SDS-PAGE και ακολούθως χρώση με Coomassie blue. Παρατηρούνται υψηλά επίπεδα αλβουμίνης σε ένα από τα δύο μεταλλαγμένα ποντίκια

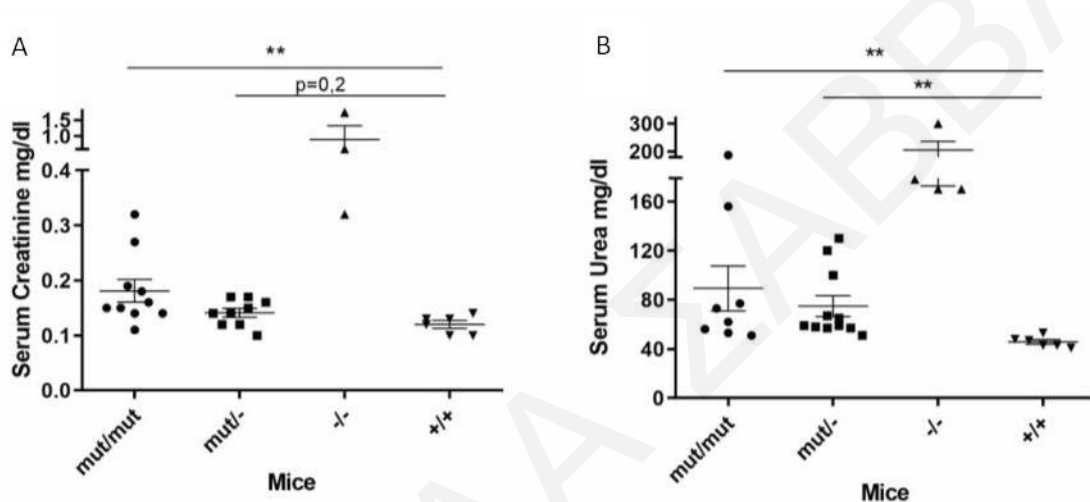
mut/- σύνθετα ετερόζυγα, mut/mut ομόζυγα knockin, +/+ wild type ποντίκια

#### 4.2 Υψηλές συγκεντρώσεις κρεατινίνης και ουρίας ορού παρατηρούνται σε ένα υποσύνολο ποντικών με *Col4a3* μετάλλαξη

Επηρεασμένη νεφρική λειτουργία με υψηλές συγκεντρώσεις κρεατινίνης και ουρίας ορού παρατηρήθηκε στο 62,5% των *Col4a3* mut/mut και στο 63% των *Col4a3* mut/- ποντικών, συγκριτικά πάντα με τα wild type. Μάλιστα στα 2 από τα 10 *Col4a3* mut/mut που εξετάστηκαν, οι τιμές της κρεατινίνης ορού έφτασαν σε υψηλά επίπεδα, παρόμοια με αυτά

των *Col4a3*<sup>-/-</sup> knockout ποντικών, τα οποία πεθαίνουν γύρω στους 3 μήνες ζωής. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα επίπεδα ουρίας ορού σε 5 από τα 19 συνολικά ποντίκια με *Col4a3* μετάλλαξη που μελετήθηκαν (εικόνα 11).

Χρησιμοποιήθηκε ορός από *Col4a3* mut/mut, *Col4a3* mut/- και wild type ποντίκια ηλικίας 15 – 22 μηνών και από knockout *Col4a3*<sup>-/-</sup> ποντίκια ηλικίας 2,5 μηνών.

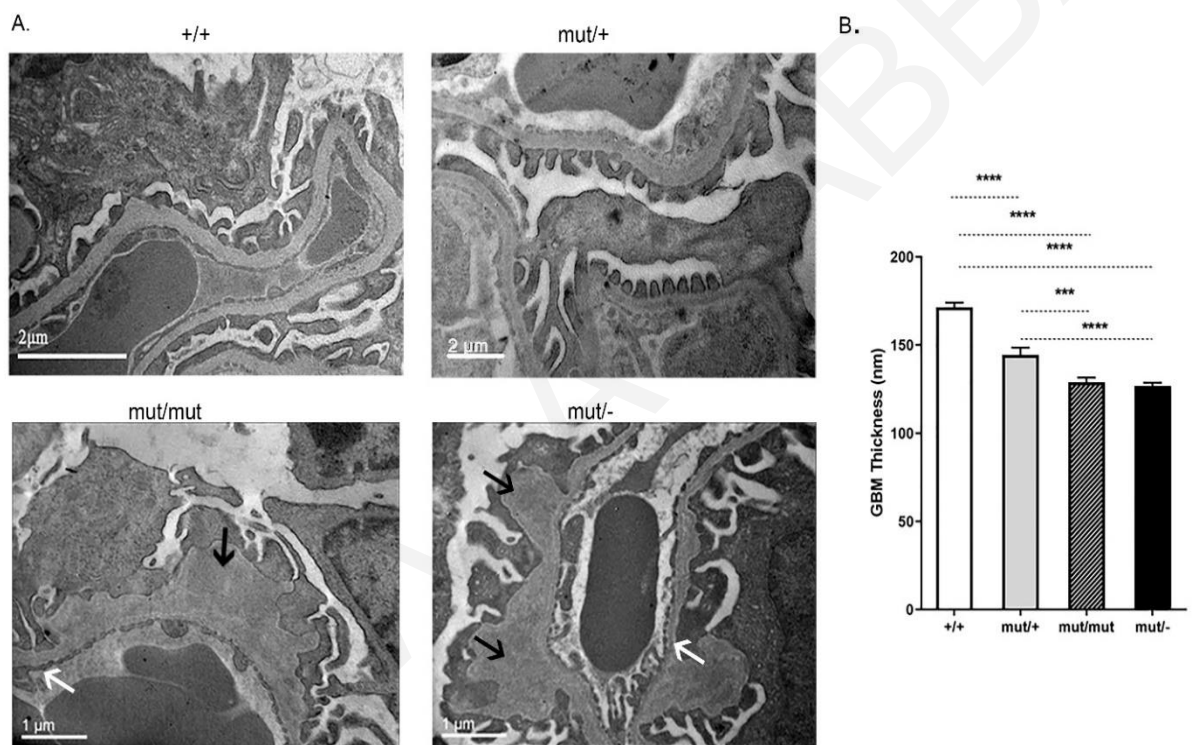


**Εικόνα 11:** Αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης κρεατινίνης και ουρίας ορού σε ένα υποσύνολο *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντικών. Συγκέντρωση κρεατινίνης (A) και ουρίας (B) ορού (mg/dl) από *Col4a3* mut/mut (n=8), *Col4a3* mut/- (n=11), *Col4a3*<sup>-/-</sup> (n=4) και wild type +/+ (n=6) ποντίκια. Τα επίπεδα της ουρίας ορού από 5 *Col4a3*mut/mut και 7 *Col4a3*mut/- ποντίκια ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με τα wild type. Για κάποια από αυτά τα ποντίκια, τα επίπεδα της ουρίας ορού φτάνουν σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα και προσομοιάζουν σε αυτά των *Col4a3*<sup>-/-</sup> knockout ποντικών, τα οποία πεθαίνουν στους 3 περίπου μήνες ζωής. Τα επίπεδα της κρεατινίνης ορού παρουσίασαν γενικότερα μικρή μόνο αύξηση στο σύνολο των ποντικών με μετάλλαξη. Τα *Col4a3* mut/mut τα οποία παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση ουρίας ορού, παρουσίασαν επίσης υψηλά επίπεδα κρεατινίνης ορού, προσομοιάζοντα αυτά των *Col4a3*<sup>-/-</sup> knockout ποντικών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του one way-ANOVA με Tukey multiple comparison adjustment. Οι τιμές p από τη σύγκριση της ουρίας ορού ανάμεσα στις διάφορες ομάδες ήταν οι ακόλουθες: +/+ Vs mut/mut: 0,0054 και +/+ Vs mut/- : 0,0023 ενώ για την κρεατινίνη ορού +/+ Vs mut/mut: 0,0088 και +/+ Vs mut/- : 0,22



### 4.3 Πάχυνση και διάσπαση της ΣΒΜ στα *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- σε εικόνες στο ΗΜ

Μελέτες στο ΗΜ έδειξαν στα *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντίκια τις τυπικές αλλοιώσεις του ΣΑ, με τις εναλλαγές λέπτυνσης και πάχυνσης της ΣΒΜ και τη συνοδό διάσπαση αυτής. Στα ετερόζυγα *Col4a3* mut/+ ποντίκια παρατηρήθηκε ομοιογενής λέπτυνση της ΣΒΜ, συγκριτικά με τη φυσιολογικού πάχους ΣΒΜ των wild type ποντικών και τη φυσιολογική επίσης απεικόνιση των ποδοειδών προσεκβολών των ποδοκυττάρων και του θυριδωτού ενδοθηλίου εκατέρωθεν αυτής (εικόνα 12).



**Εικόνα 12:** Η εικόνα στο ΗΜ της ΣΒΜ των *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντικών συνάδει με την τυπική εικόνα του ΣΑ

(A) Τα wild type *Col4a3* +/+ ποντίκια εμφανίζουν φυσιολογική ΣΒΜ με πάχος 280-300nm. Τα *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντίκια εμφανίζουν λεπτές ΣΒΜ 140-160nm (λευκά βέλη) με εναλλαγή περιοχών με σοβαρή ανώμαλη πάχυνση (μαύρα βέλη), ευρήματα χαρακτηριστικά του ΣΑ. Η ΣΒΜ στα ετερόζυγα *Col4a3* mut/+ ποντίκια εμφανίζεται πιο λεπτή σε σχέση με τα wild type. Εξετάστηκαν ποντίκια ηλικίας 20 εβδομάδων.

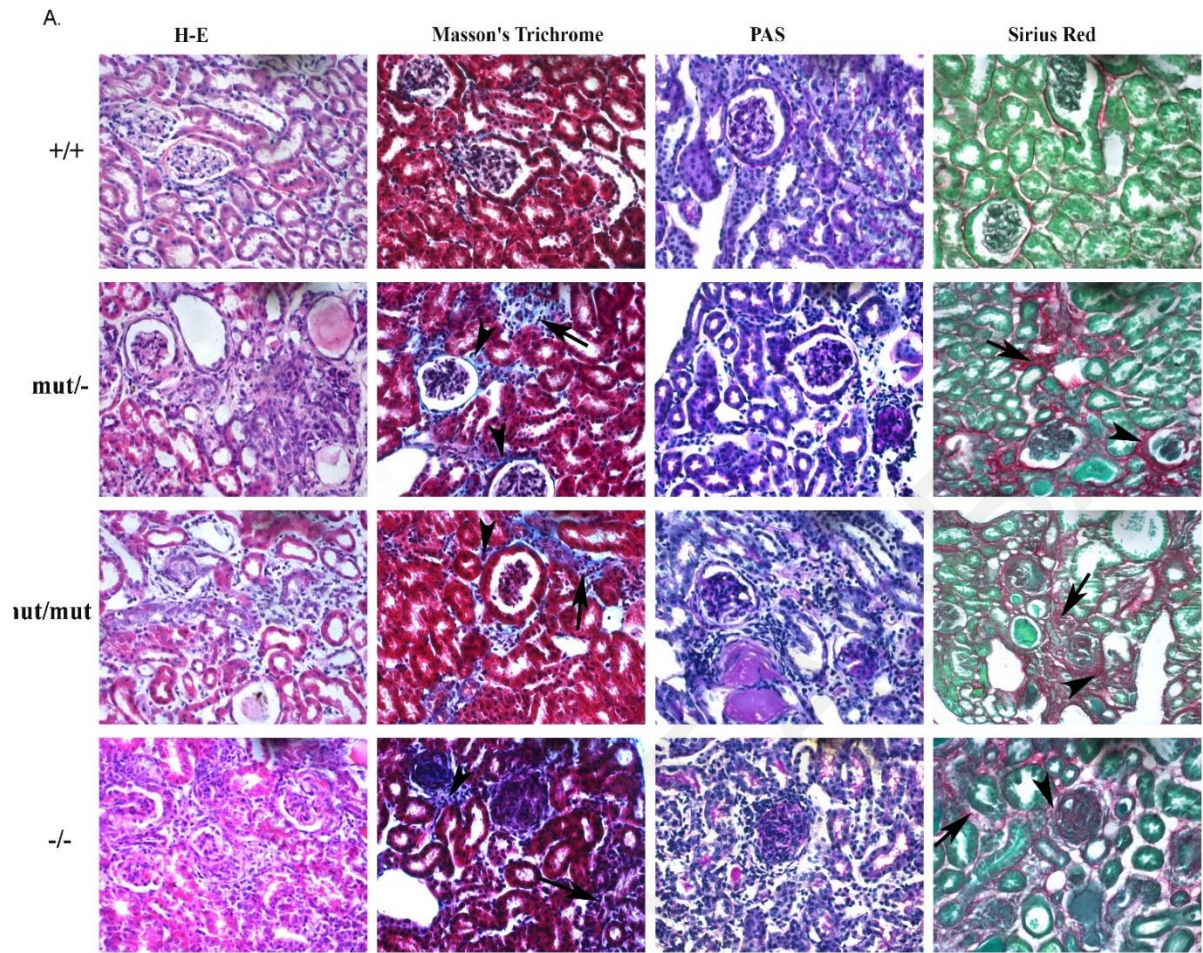
(B) Μέσες τιμές των περιοχών λέπτυνσης της ΣΒΜ σε *Col4a3* mut/mut, *Col4a3* mut/-, *Col4a3* mut/+ και *Col4a3* +/+ ποντίκια. Τα αποτελέσματα από τα ιστογράμματα του πάχους της ΣΒΜ βασίστηκαν σε εξέταση 25-40 σπειραμάτων από τρία ποντίκια της κάθε ομάδας. Ο αριθμός των τριχοειδικών αγκύλων που εξετάστηκαν ήταν 44 για τα *Col4a3* mut/mut, 65 για τα *Col4a3* mut/-, 38 για τα *Col4a3* mut/+ και 22 για τα *Col4a3* +/+ ποντίκια. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση one-way ANOVA με Tukey post testing (\*\* p=0,0009, \*\*\*\* p=0,0001)

#### 4.4 Ίνωση νεφρικού ιστού στα ποντίκια με *Col4a3* μετάλλαξη

Τόσο τα ομόζυγα knockin *Col4a3* mut/mut όσο και τα σύνθετα ετερόζυγα *Col4a3* mut/- ποντίκια παρουσίασαν εκφυλιστικές αλλοιώσεις στο νεφρικό ιστό (εικόνα 13A). Συγκεκριμένα, σε νεφρικές τομές από τα μεταλλαγμένα ποντίκια, παρατηρήθηκε μετρίου με σοβαρού βαθμού διάχυτη περιπειραματική ίνωση και ίνωση του διάμεσου ιστού, σε συνδυασμό με ήπια προς μέτρια λεμφοκυτταρική διήθηση στις πλείστες περιπτώσεις. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκαν περιοχές με τμηματική ή σφαιρική σπειραματοσκλήρυνση.

Αξιολογήθηκαν τομές νεφρικού ιστού από 12 συνολικά μεταλλαγμένα ποντίκια. Παρατηρήθηκε < 25% και 75% βαθμός σωληναριακής βλάβης στο 67% και στο 33% των μεταλλαγμένων ποντικών αντίστοιχα. Ο βαθμός της ίνωσης του διάμεσου ιστού που παρατηρήθηκε ήταν < 25% ή μεταξύ 26-45%. Τα ποντίκια με τον πλέον σοβαρό φαινότυπο είχαν επίσης 20-23% τμηματικά ή σφαιρικά σκληρωμένα σπειράματα. Όπως θα αναμενόταν, τα ποντίκια με τις πιο σοβαρές ιστολογικές βλάβες ήταν τα ίδια με τις πιο σοβαρά διαταραγμένες βιοχημικές παραμέτρους. Τα wild type *Col4a3* +/+ ποντίκια της ίδιας ηλικίας, δεν παρουσίαζαν τις πιο πάνω περιγραφείσες ιστολογικές βλάβες.

Μελετήθηκε επίσης η έκφραση του Transforming Growth Factor beta-1 (TGF-β1) και της α-smooth muscle actin (α-SMA ή Acta2). Η έκφραση και των δύο πρωτεϊνών ήταν αυξημένη στα σπειράματα από τα *Col4a3* mut/mut και τα *Col4a3* mut/- ποντίκια σε σύγκριση με wild type ποντίκια της ίδιας ηλικίας (εικόνα 13 B-D). Αυξημένη έκφραση αυτών των δεικτών ήταν επίσης εμφανής σε πρωτεΐνη από ολικό νεφρό σε μεγάλης ηλικίας μεταλλαγμένα ποντίκια. Ο TGF-β1 προάγει πολλές από τις κύριες οδούς που συμμετέχουν στη διαδικασία της ίνωσης και θεωρείται η κύρια προϊνωτική κυτοκίνη. Στη χρόνια νεφρική νόσο υπερέκφραση του TGF-β1 προάγει την ίνωση του νεφρικού ιστού (Schnaper et al., 2009). Οι μυοϊνοβλάστες, κύτταρα τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της νεφρικής ίνωσης, συχνά αναγνωρίζονται από την έκφραση της Acta2 (Ina et al., 2011, Zhang et al., 1995).



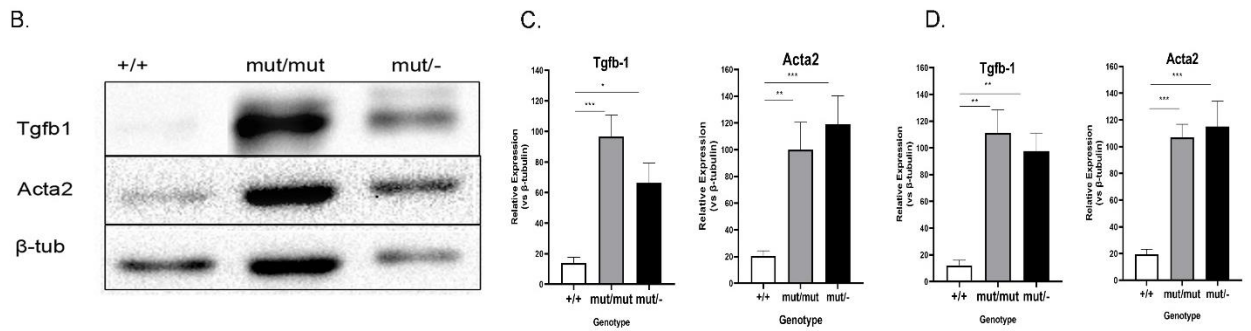
**Εικόνα 13Α: Τα *Col4a3* μεταλλαγμένα ποντίκια παρουσιάζουν μέτρια μέχρι σοβαρή ίνωση σε δείγματα νεφρικού ιστού.** Χρώσεις σε τομές νεφρικού ιστού προς αξιολόγηση της νεφρικής ίνωσης. Κάθε χρώση έλαβε χώρα σε τομές 4mm νεφρικού ιστού σε παραφίνη από τρία ποντίκια κάθε ομάδας. Η εναπόθεση κολλαγόνου περιπειραματικά και στο διάμεσο ιστό επισημαίνεται με τις κεφαλές του βέλους και τα βέλη αντίστοιχα.

***Col4a3* +/+ wild type ποντίκια (ηλικίας 20 μηνών):** H&E x 20 με πολύ ήπιες αλλοιώσεις. Masson's trichrome x 20 αναδεικνύει τις κάψες του Bowman και τα νεφρικά σωληνάκια να επενδύονται από λεπτή ομαλή γραμμική κολλαγόνου. PAS x 20 αναδεικνύει με μωβ χρώμα τη φυσιολογική βασική μεμβράνη στα νεφρικά σπειράματα και τα νεφρικά σωληνάκια. Sirius red x 20 όπου οι ίνες κολλαγόνου παρουσιάζονται σαν λεπτές κόκκινες γραμμές.

***Col4a3* mut/- σύνθετα ετερόζυγα ποντίκια (ηλικίας 20 μηνών):** H&E x 20 με μέτριου βαθμού διάχυτη περιπειραματική ίνωση και ίνωση του διάμεσου ιστού. Masson's trichrome x 20 δεικνύει εναπόθεση κολλαγόνου περιπειραματικά και στο διάμεσο ιστό. PAS x 20 με ήπια εναπόθεση PAS θετικού υλικού. Sirius red x 20 επιβεβαιώνει τα ευρήματα με τη χρήση των H&E και Masson's trichrome χρώσεων.

***Col4a3* mut/mut ομόζυγα knockin ποντίκια (ηλικίας 20 μηνών):** H&E x 20, Masson's trichrome x 20 με μέτρια πολυεστιακή ίνωση του διάμεσου ιστού. PAS x 20 με μέτριου βαθμού διάχυτη εναπόθεση PAS θετικού υλικού στην κάψα του Bowman και στους σπειραματικούς θυσάνους. Sirius red x 20 αναδεικνύει εναπόθεση ινών κολλαγόνου στο διάμεσο ιστό και περιπειραματικά επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα με τη χρήση των H&E και Masson's trichrome χρώσεων.

***Col4a3* -/- knockout ποντίκια (ηλικίας 6 εβδομάδων):** H&E x 20 με ευρήματα σοβαρής σπειραματικής ίνωσης και ίνωσης του διάμεσου ιστού. Masson's trichrome x 20 δεικνύει εναπόθεση κολλαγόνου περιπειραματικά και στο διάμεσο ιστό. PAS x 20 με σοβαρή εναπόθεση PAS θετικού υλικού. Sirius red x 20 δεικνύει ένα πλήρως ουλοποιημένο σπείραμα στο κέντρο του οπτικού πεδίου.

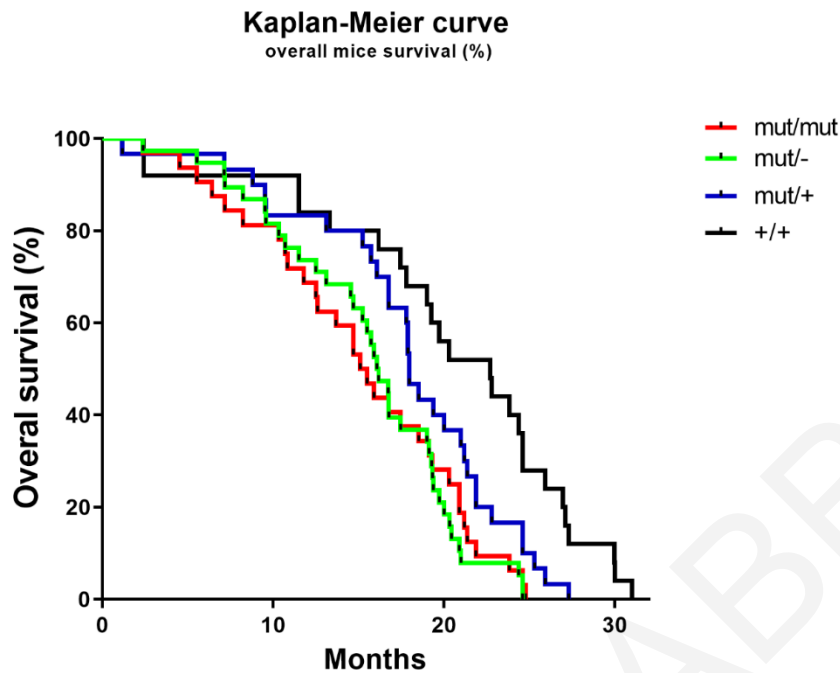


**Εικόνα 13 B,C,D: (B) Western blot ανάλυση των προϊνωτικών δεικτών TGF-β1 και Acta2.** Αναδεικνύονται αυξημένα επίπεδα των TGF-β1 και Acta2 σε πρωτεΐνη που απομονώθηκε από σπειράματα *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντικών ηλικίας 20 μηνών. Η έκφραση της β-Tubulin χρησιμοποιήθηκε για σκοπούς κανονικοποίησης (C-D) Ποσοτικοποίηση αντιπροσωπευτικών blots όπως στο (B) σε μορφή γραφικής παράστασης. Τα επίπεδα έκφρασης των TGF-β1 και Acta2 στα σπειράματα (C) ή σε ολικό νεφρό (D) μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα της β-Tubulin. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση one-way ANOVA με Tukey post testing (\* $p \leq 0,0164$ , \*\*  $p \leq 0,004$ , \*\*\*  $p \leq 0,0009$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). mut/- σύνθετα ετερόζυγα, mut/mut ομόζυγα knockin, +/+ wild type ποντίκια, Acta2 alpha-smooth muscle actin

#### 4.5 Η διάρκεια ζωής των *Col4a3* μεταλλαγμένων ποντικών είναι σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με τα wild type ποντίκια

Τα συμπεράσματα για τη διάρκεια ζωής των ποντικών βασίστηκαν στη μελέτη *Col4a3* mut/mut (n=31), *Col4a3* mut/- (n=33), *Col4a3* mut/+ (n=25) και wild type +/+ (n=23) ποντικών. Τα *Col4a3* mut/mut και τα *Col4a3* mut/- ποντίκια είχαν μέσο όρο ζωής 15,1 και 16,07 μήνες αντίστοιχα, 30-35% μικρότερο δηλαδή από το μέσο όρο των wild type ποντικών που ήταν 22,7 μήνες. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικώς σημαντική ( $p < 0,05$ ) με τη χρήση του log-rank (Mantel-Cox) test. Η μέση επιβίωση των ετερόζυγων knockin ποντικών *Col4a3* mut/+ ήταν επίσης μειωμένη, στους 17,9 μήνες (εικόνα 14).

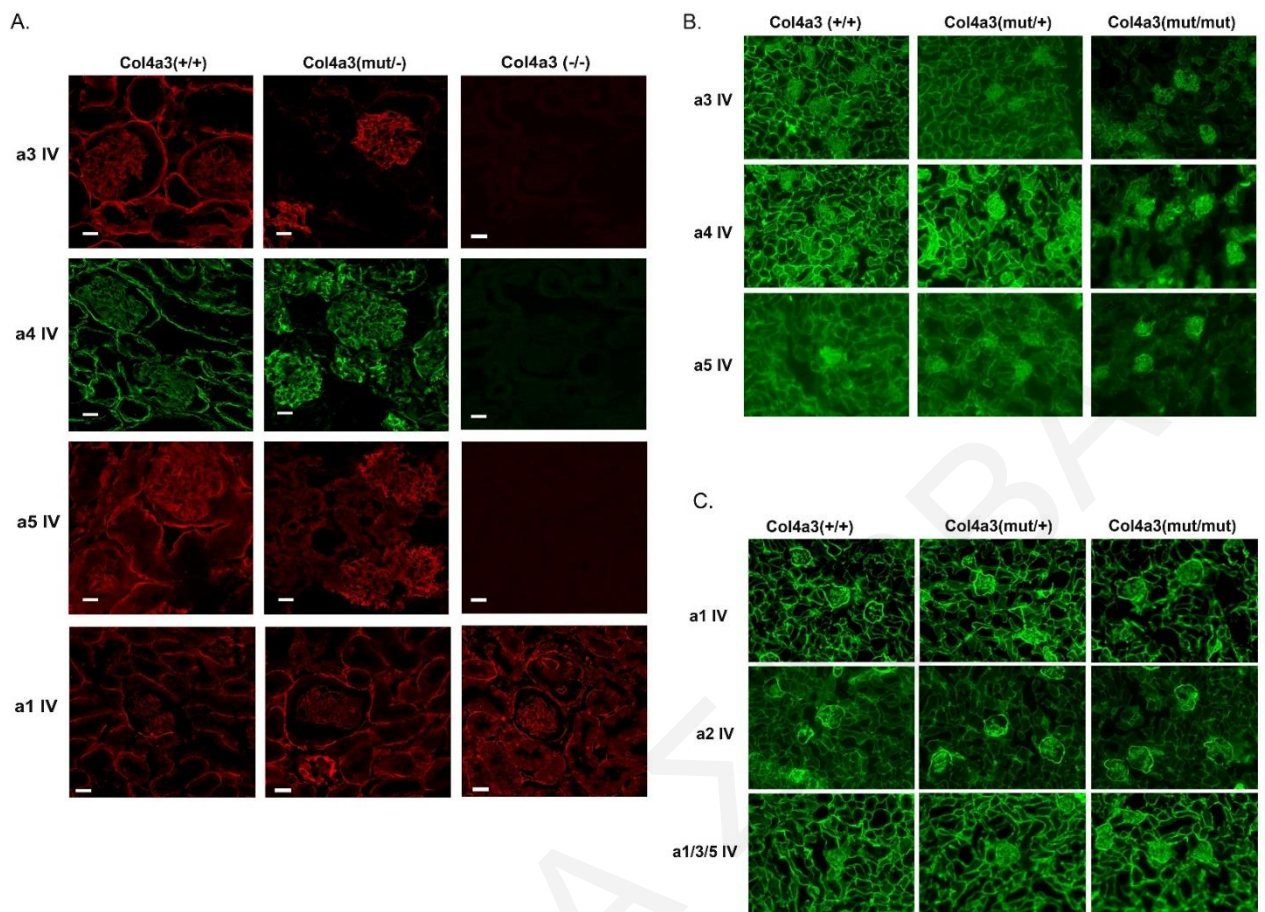




**Εικόνα 14:** Η διάρκεια ζωής των *Col4a3* μεταλλαγμένων ποντικών είναι σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τα wild type ποντίκια. Καμπύλη επιβίωσης που αναδεικνύει τη μειωμένη διάρκεια ζωής των *Col4a3* mut/mut και των *Col4a3* mut/- ποντικών σε σύγκριση με τα knockin ετερόζυγα *Col4a3* mut/+ ποντίκια. Ο μέσος όρος ζωής των *Col4a3* mut/mut ήταν 15,1 μήνες (n=31) και των *Col4a3* mut/- 16,07 μήνες (n=33), σημαντικά μειωμένος σε σχέση με το μέσο όρο ζωής των *Col4a3* mut/+ (n=25) και των wild type +/+ (n=23) που ήταν 17,9 και 22,7 μήνες αντίστοιχα. Έγινε χρήση της Kaplan-Meier ανάλυσης επιβίωσης και του log-rank (Mantel-Cox) test για τη σύγκριση των δεδομένων. Το p value ήταν 0,016, στατιστικώς σημαντικό.

#### 4.6 Μειωμένη έκφραση των *Col4a3*, $\alpha 4$ , $\alpha 5$ αλυσίδων στα νεφρικά σωληνάρια των *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντικών

Η κατανομή των  $\alpha$  αλυσίδων του κολλαγόνου τύπου IV αξιολογήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού σε νεφρικές τομές 6μm, με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το NC1 τμήμα της κάθε κολλαγονικής αλυσίδας. Παρατηρήθηκε ότι στους νεφρούς από wild type +/+ και ετερόζυγα *Col4a3* mut/+ ποντίκια, η χρώση για τις  $\alpha 3/\alpha 4/\alpha 5$  αλυσίδες ήταν φυσιολογική, τόσο στη ΣΒΜ όσο και στη σωληναριακή βασική μεμβράνη. Εντούτοις, σε νεφρούς από *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντίκια, η έκφραση των  $\alpha$  αλυσίδων ήταν μειωμένη στα σωληνάρια αλλά φυσιολογική στα σπειράματα (εικόνα 15 A, B). Σε αντίθεση, η έκφραση των  $\alpha 1$  και  $\alpha 2$  αλυσίδων στα *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντίκια, ήταν φυσιολογική τόσο στη ΣΒΜ όσο και στη σωληναριακή βασική μεμβράνη (εικόνα 15 A, C).

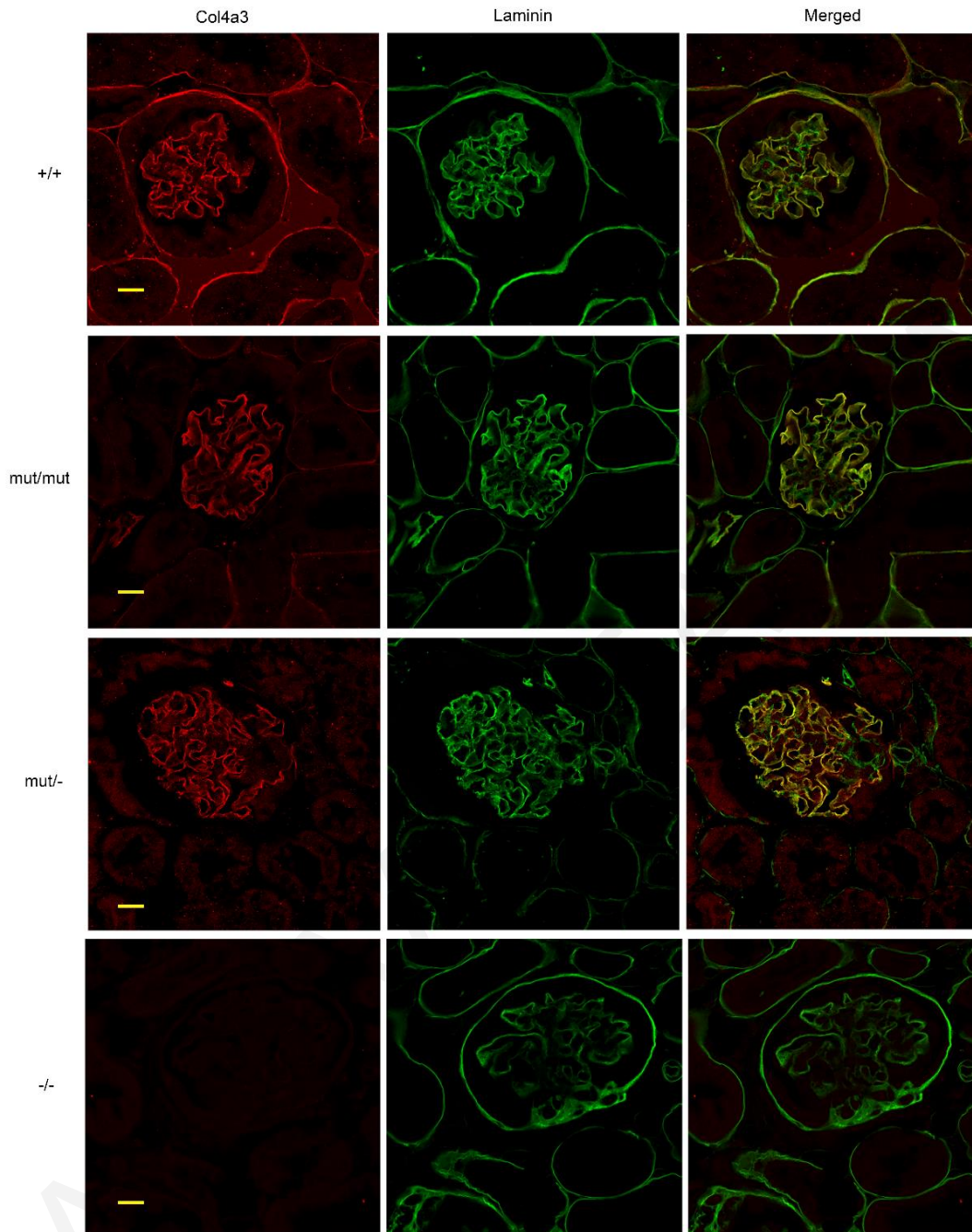


**Εικόνα 15:** Η κατανομή των τύπου IV κολλαγονικών αλυσίδων *a3*, *a4* και *a5* εμφανίζεται μειωμένη στα σωληνάρια των *Col4a3* *mut/mut* και *Col4a3* *mut/-* ποντικών. Εξετάσεις ανοσοφθορισμού σε νεφρικές τομές 6μη σε *Col4a3* *mut/-*, wild type *+/+* ποντίκια ηλικίας 20 εβδομάδων και σε *Col4a3* *-/-* ποντίκια 3μηγών (Α) και σε *Col4a3* *mut/mut*, *Col4a3* *mut/+* και wild type ποντίκια ηλικίας 20 εβδομάδων (Β) για κάθε τύπου IV κολλαγονική αλυσίδα (*a3*, *a4*, *a5*) του *a3a4a5* πρωτομερούς καθώς επίσης και για τις αλυσίδες *a1* και *a2* του *a1a1a2* πρωτομερούς (Γ). Σε νεφρούς από τα μεταλλαγμένα *Col4a3* *mut/mut* και τα *Col4a3* *mut/-*, η έκφραση των *a3*, *a4*, *a5* αλυσίδων είναι μειωμένη στα σωληνάρια ενώ στα σπειράματα εμφανίζεται φυσιολογική. Η ολική έκφραση του τύπου IV κολλαγόνου αξιολογήθηκε με τη χρήση του mAb JK2 το οποίο αναγνωρίζει ένα κοινό επίτοπο στο NC1 τμήμα των *a3*, *a4* και *a5* αλυσίδων του κολλαγόνου τύπου IV (Γ). Στα wild type *+/+* και στα ετερόζυγα knockin *Col4a3* *mut/+* ποντίκια, οι *a3*, *a4* και *a5* αλυσίδες εντοπίζονται στη ΣΒΜ και στη σωληναριακή βασική μεμβράνη. Στα ομόζυγα knockout *Col4a3* *-/-* ποντίκια όπως αναμενόταν δεν παρατηρείται φθορισμός (αρνητικοί μάρτυρες). Η έκφραση των τύπου IV κολλαγονικών αλυσίδων *a1* (Α και Γ) και *a2* (Γ) στα σωληνάρια και τα σπειράματα των *Col4a3* *mut/mut* και των *Col4a3* *mut/-* ποντίκια ήταν φυσιολογική. Φαίνεται λοιπόν ότι η *Col4a3* μετάλλαξη επηρεάζει μόνο την έκφραση της ίδιας της *a3* αλυσίδας και των λοιπών αλυσίδων του *a3a4a5* ετεροτριμερούς. Το scale bar ήταν 50μm για τη χρώση των *a3*, *a4* και *a5* (IV) στο (Α) και 25μm για το *a1* (IV). Στο (Β) η μεγέθυνση ήταν 200 x. *Col4a3* *mut/mut* knockin, *Col4a3* *mut/-* σύνθετα ετερόζυγα, *Col4a3* *mut/+* ετερόζυγα knockin, *Col4a3* wild type *+/+* ποντίκια

#### 4.7 Τα ποδοκύτταρα εκκρίνουν αποτελεσματικά το μεταλλαγμένο κολλαγόνο τύπου IV

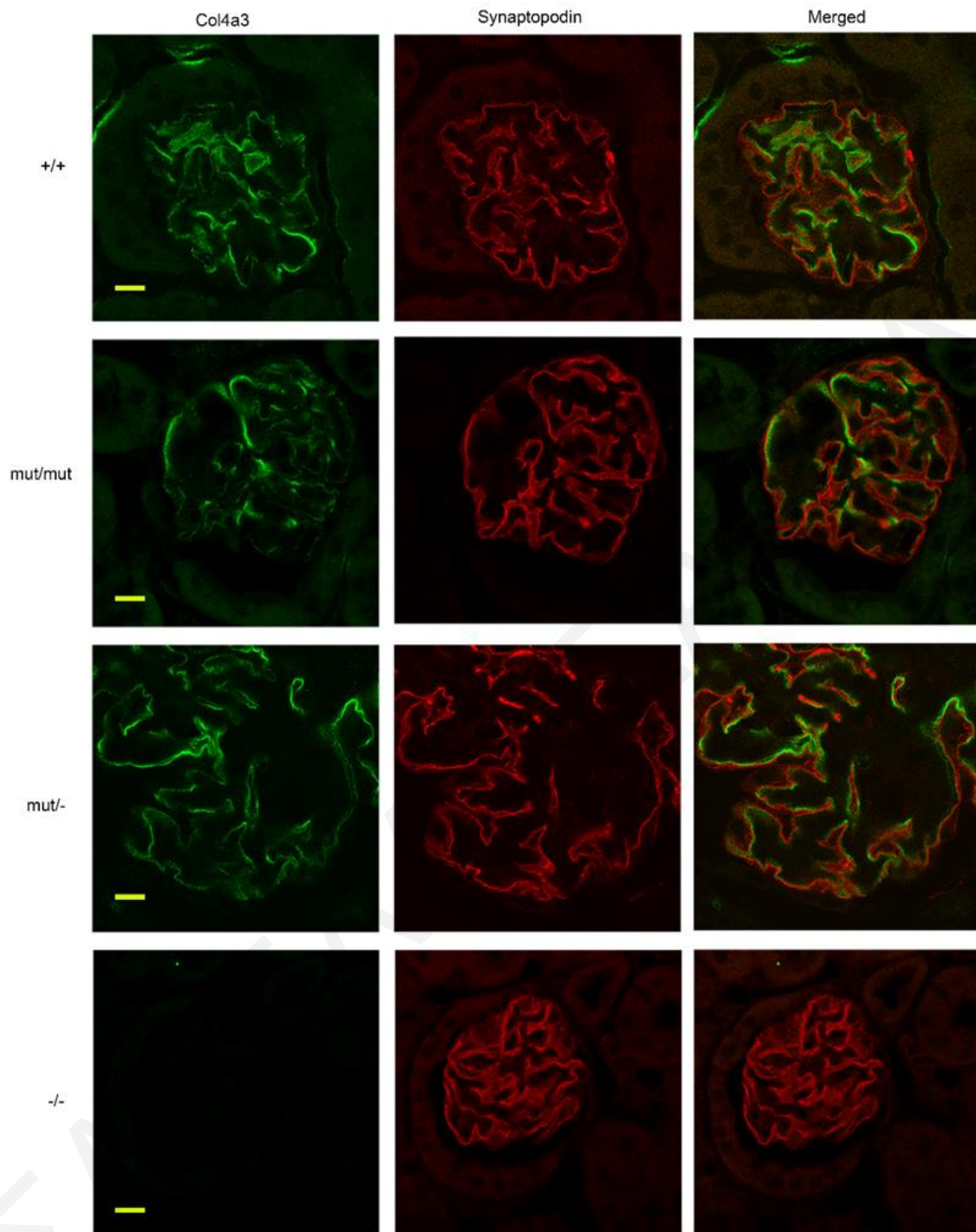
Στην προσπάθεια να εξεταστεί κατά πόσον το μεταλλαγμένο κολλαγόνο εκκρίνεται αποτελεσματικά από τα ποδοκύτταρα στη ΣΒΜ, έγινε σε *Col4a3* *mut/mut* και *Col4a3*

mut/- ποντίκια, διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για το Col4α3 και τη laminin, πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται και οι δύο τόσο στη ΣΒΜ όσο και στη σωληναριακή βασική μεμβράνη. Και οι δύο πρωτεΐνες Col4α3 και laminin φάνηκε να συνεντοπίζονται στη ΣΒΜ και στα δύο μεταλλαγμένα ποντίκια, χωρίς διαφορά σε σύγκριση με τα wild type (εικόνα 16). Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού έγινε επίσης και για τις πρωτεΐνες Col4α3 και synaptopodin. Η τελευταία αποτελεί πρωτεϊνικό δείκτη του κυτταροσκελετού των ποδοκυττάρων. Η μεταλλαγμένη Col4α3 πρωτεΐνη δεν συνεντοπίζεται με τη synaptopodin στο κυτταρόπλασμα των ποδοκυττάρων των νεφρών από τα μεταλλαγμένα ποντίκια, όπως συμβαίνει και στα wild type ποντίκια (εικόνα 17). Τα αποτελέσματα αυτά δεικνύουν ότι η αντικατάσταση της γλυκίνης στη μεταλλαγμένη Col4α3 πρωτεΐνη δεν εμποδίζει την έκκριση από το ποδοκύτταρο στη ΣΒΜ αν όχι ολόκληρου του α3α4α5 τριμερούς, τουλάχιστον ενός τμήματός του.



**Εικόνα 16: Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού δεικνύει τον συνεντοπισμό των πρωτεϊνών Col4a3 και laminin στη ΣΒΜ των *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντικών. Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για το Col4a3 (κόκκινο χρώμα) και για τη laminin-πρωτεϊνικό δείκτη της ΣΒΜ (πράσινο χρώμα), σε νεφρικές τομές σε παραφίνη 6μm από wild type +/+, *Col4a3* mut/mut, *Col4a3* mut/- ποντίκια ηλικίας 20 μηνών και *Col4a3* -/- ποντίκια ηλικίας 2,5 μηνών. Στις συγχωνευμένες εικόνες, ο συνεντοπισμός του Col4a3 και της laminin παρουσιάζεται με κίτρινο χρώμα. Η έκφραση του Col4a3 τόσο στα *Col4a3* mut/mut όσο και στα *Col4a3* mut/- συνεντοπίζεται με την έκφραση της laminin, όπως παρατηρείται και στα wild type +/+ ποντίκια. Το αποτέλεσμα αυτό δεικνύει ότι η Col4a3 πρωτεΐνη εκκρίνεται αποτελεσματικά στη ΣΒΜ (scale bar 50μm).**

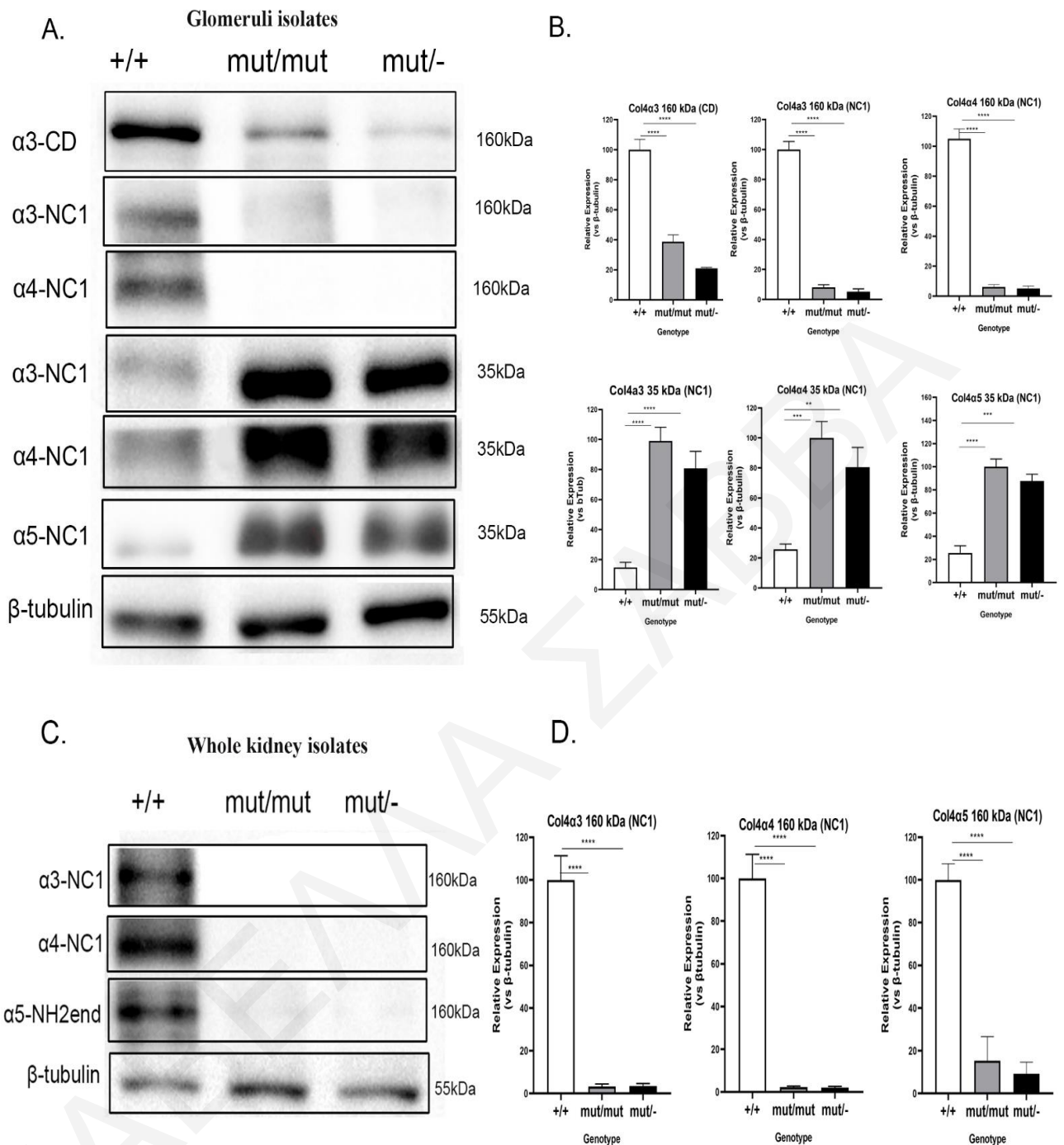




**Εικόνα 17:** Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού δεικνύει την απουσία συνεντοπισμού των πρωτεϊνών *Col4a3* και *synaptopodin* στα σπειράματα των *Col4a3* *mut/mut* και *Col4a3* *mut/-* ποντικών. Διπλή χρώση ανοσοφθορισμού για το *Col4a3* (πράσινο χρώμα) και για τη *synaptopodin*-πρωτεϊνικό δείκτη των ποδοκυττάρων (κόκκινο χρώμα) σε νεφρικές τομές σε παραφίνη 6μm από wild type +/+, *Col4a3* *mut/mut*, *Col4a3* *mut/-* ποντίκια ηλικίας 20 μηνών και *Col4a3* *-/-* ποντίκια ηλικίας 2,5 μηνών. Στη δεξιά στήλη παρουσιάζονται οι συγχωνευμένες εικόνες μετά από χρώση για το *Col4a3* και τη *synaptopodin*. Η έκφραση του *Col4a3* τόσο στα *Col4a3* *mut/mut* όσο και στα *Col4a3* *mut/-* δεν παρουσιάζει συνεντοπισμό με την έκφραση της *synaptopodin*, όπως ακριβώς παρατηρείται και στα wild type +/+ ποντίκια. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ενδεικτικό της αποτελεσματικής έκκρισης τόσο του φυσιολογικού όσο και του μεταλλαγμένου τριμερούς α3α4α5 (scale bar 50μm).

#### **4.8 Μειωμένα επίπεδα α αλυσίδων σε πρωτεΐνη από ολικό νεφρό από μεταλλαγμένα ποντίκια. Στα σπειράματα οι τύπου IV κολλαγονικές αλυσίδες εκφράζονται φυσιολογικά αλλά πιθανώς διασπώνται**

Σε περαιτέρω εργαστηριακή δουλειά και σε συνεργασία με τον μεταδιδακτορικό ερευνητή στο εργαστήριο του Καθ. Δέλτα, Δρ Χριστόφορο Οδιάτη, έγινε αξιολόγηση με Western Blot της έκφρασης του Col4α3 σε εκχυλίσματα από σπειράματα και από ολικό νεφρό. Στα σπειράματα και από τα δύο μεταλλαγμένα ποντίκια, η έκφραση της Col4α3 αλυσίδας στα 160 kDa (μοριακό βάρος των τύπου IV κολλαγονικών αλυσίδων) ήταν μειωμένη. Επιπρόσθετα, με τη χρήση του ίδιου Col4α3 αντισώματος και μόνο στα μεταλλαγμένα ποντίκια, ανιχνεύθηκε ένα de novo πρωτεϊνικό τμήμα 35 kDa, το οποίο αντιπροσωπεύει το καρβοξυτελικό μέρος της αλυσίδας που περιέχει τον επίτοπο στην περιοχή NC1. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τις μη μεταλλαγμένες Col4α4 και Col4α5 αλυσίδες (εικόνα 18 A,B). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μικρό πρωτεϊνικό τμήμα των 35 kDa των τριών α αλυσίδων εντοπίστηκε στα σπειράματα των μεταλλαγμένων ποντικών αλλά όχι στα εκχυλίσματα από ολικό νεφρό. Στα εκχυλίσματα από ολικό νεφρό, όμως, η έκφραση των α3, α4 και α5 αλυσίδων στα 160-200 kDa ήταν επίσης μειωμένη (εικόνα 18 C,D). Επιπλέον, στα σπειράματα των μεταλλαγμένων ποντικών, τα αναμενόμενα διασπώμενα τμήματα του αμινοτελικού άκρου των αλυσίδων του κολλαγόνου IV, τα οποία αποτελούνται από το 7S τμήμα και μέρος του κολλαγονικού τμήματος (CD), δεν ήταν ανιχνεύσιμα με κανένα εκ των δύο αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία αναγνωρίζουν επιτόπους στο αμινοτελικό άκρο ή στο μέσο τμήμα των αλυσίδων (εικόνα 19). Η πλέον πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό είναι ότι τα αμινοτελικά διασπώμενα πρωτεϊνικά τμήματα είναι φυσικοχημικά ασταθή και τυγχάνουν ταχείας εξωκυττάριας αποδόμησης. Προς υποστήριξη της υπόθεσης αυτής, η έκφραση των άθικτων πλήρους μήκους α αλυσίδων ήταν μειωμένη ή μηδαμινή στα 160 kDa στα σπειράματα και στον ολικό νεφρό, σε σύγκριση με τα wild type ποντίκια (εικόνα 18 A-D, εικόνα 1 στο παράρτημα). Προς επιβεβαίωση της σπειραματικής προέλευσης της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για τα πιο πάνω πειράματα, διενεργήθηκαν Western Blots για τις πρωτεΐνες synaptopodin και podocin (ως ποδοκυτταρικοί δείκτες) και για τη MUC1 (ως σωληναριακός δείκτης). Τα αποτελέσματα έδειξαν καθόλου ή αμελητέα έκφραση της MUC1 πρωτεΐνης.

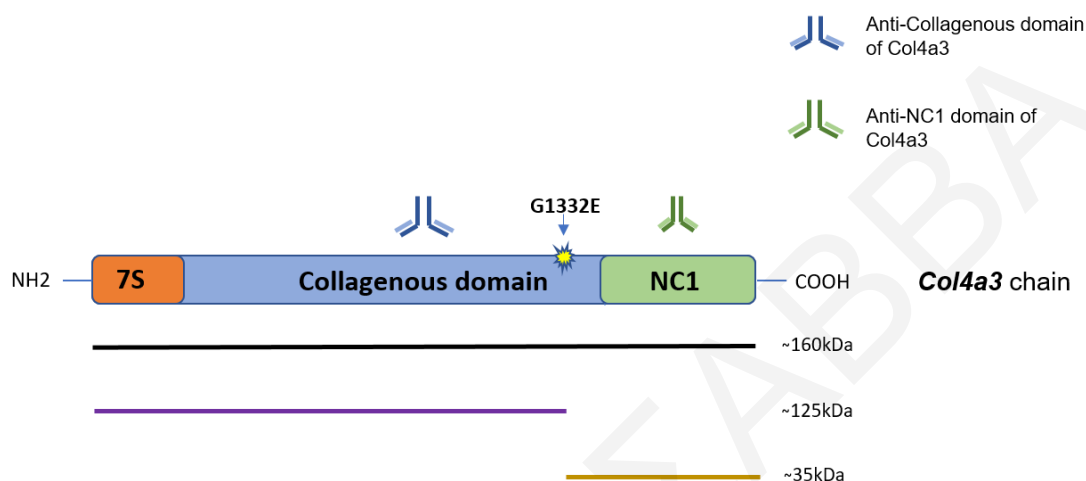


**Εικόνα 18: Μειωμένη έκφραση των  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  αλυσίδων σε εκχύλισμα από ολικό νεφρό και εμφάνιση ενός μικρού Col4 πρωτεϊνικού τμήματος σε σπειραματικά εκχύλισμα των *Col4a3* μεταλλαγμένων ποντικών**

(A) Αντιπροσωπευτικό Western Blot το οποίο δείχνει την αλλαγή στα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης σε εκχύλιμα από **σπειράματα** από wild type +/+, *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντίκια ηλικίας 20 μηνών. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα τα οποία είτε αναγνωρίζουν το κολλαγονικό τμήμα (CD) του Col4 $\alpha 3$  είτε το NC1 τμήμα των  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  αλυσίδων του κολλαγόνου τύπου IV. Παρόλο που η ανίχνευση των  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  αλυσίδων στα 160 kDa είναι σχεδόν μηδαμινή, ένα πρωτεϊνικό τμήμα 35 kDa εντοπίζεται στα μεταλλαγμένα ποντίκια με τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το NC1 τμήμα των Col4 $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  αντίστοιχα. (C) Αντιπροσωπευτικό Western Blot το οποίο δείχνει την αλλαγή στα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης σε εκχύλιμα **ολικού νεφρού** από wild type +/+, *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντίκια ηλικίας 15 μηνών. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα για την εντόπιση των τριών Col4 αλυσίδων ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$ ). Η έκφραση των Col4 $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  και  $\alpha 5$  αλυσίδων εμφανίζεται δραστικά μειωμένη σε δείγματα ολικού νεφρού από *Col4a3* mut/mut και *Col4a3* mut/- ποντίκια. Για την αξιολόγηση της έκφρασης

των α3, α4 και α5 αλυσίδων, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν το αμινοτελικό άκρο (NH2-end) ή το NC1 τμήμα των ColIV αλυσίδων.

**(B, D)** Ποσοτικοποίηση αντιπροσωπευτικών blots (όπως στο A και στο C) σε μορφή γραφικής παράστασης. Έγινε κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των α αλυσίδων σε εκχυλίσματα από σπειράματα (B) ή από ολικό νεφρό (D), με τη χρήση των επιπέδων της β-tubulin. Τα δεδομένα αντιστοιχούν σε μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα (n≥3). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση one-way ANOVA με Tukey post testing (\*\* p≤0,0043, \*\*\* p≤0,0003, \*\*\*\* p≤0,0001)

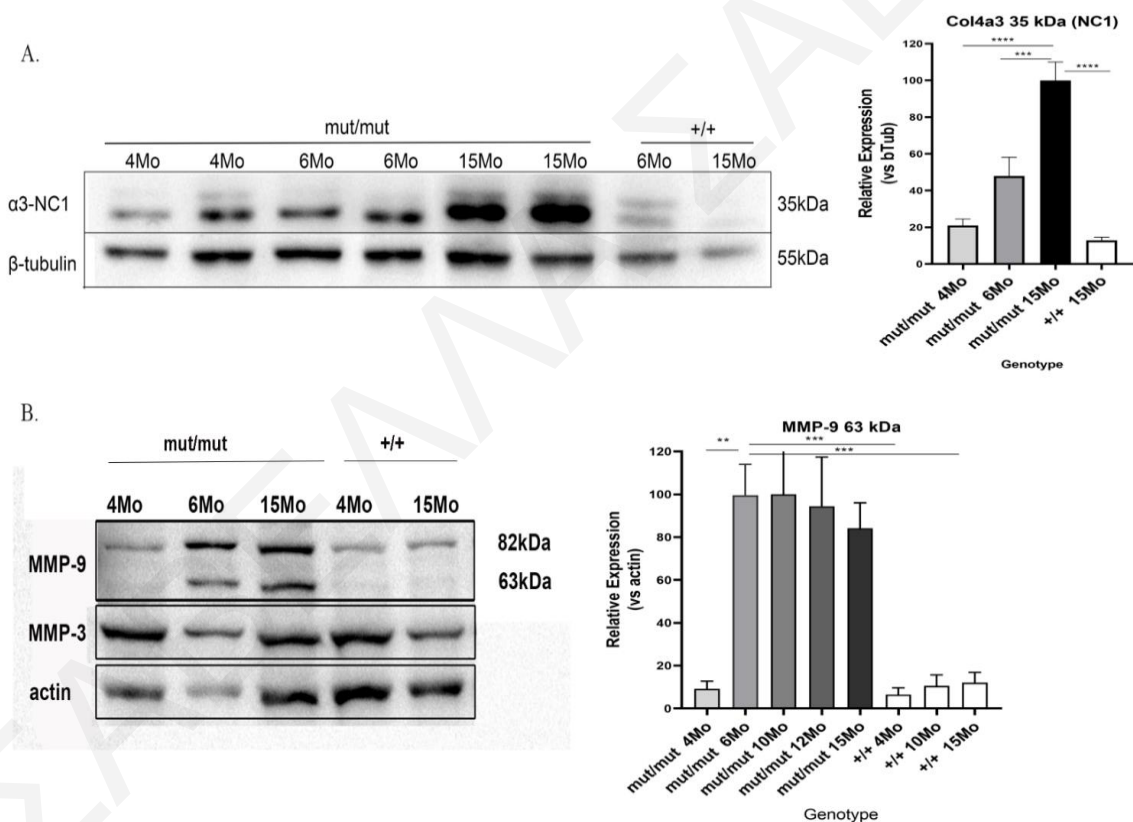


**Εικόνα 19:** Σχηματικό διάγραμμα το οποίο επισημαίνει τα σημεία αναγνώρισης των δύο anti-Col4a3 αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Το πρώτο αντίσωμα (μπλε χρώμα) αναγνωρίζει το μεσαίο κολλαγονικό τμήμα σε σημείο πριν από τη 1332 σημειακή μετάλλαξη, ενώ το δεύτερο αντίσωμα (πράσινο χρώμα) αναγνωρίζει το NC1 τμήμα της α3 αλυσίδας το οποίο εντοπίζεται μετά τη σημειακή μετάλλαξη. Το μοριακό βάρος της α3 αλυσίδας (IV) είναι στα 160kDa. Στην υποθετική περίπτωση που η αλυσίδα διασπάται περίξ του σημείου της μετάλλαξης, τα δύο anti-Col4a3 αντισώματα θα ανέμενε κάποιος να αναγνωρίζουν πρωτεϊνικά τεμάχια 125kDa και 35kDa αντίστοιχα.

#### 4.9 Πιθανή συσχέτιση της ενεργοποίησης της MMP-9 πρωτεΐνης με τη διάσπαση του μεταλλαγμένου Col4 πρωτομερούς

Εξετάστηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο κατά πόσον το Col4a3 τμήμα των 35kDa αποσπάται σε κάποιο συγκεκριμένο σημείο της εξέλιξης της νόσου. Το Col4a3 τμήμα των 35kDa εντοπίζεται ήδη από τη νεαρή ηλικία των ποντικών αλλά σε χαμηλά επίπεδα και φαίνεται ότι σε μετέπειτα στάδιο φτάνει σε υψηλά επίπεδα, γύρω τους 15 μήνες ζωής (εικόνα 20A). Στην προσπάθεια να εξεταστεί κατά πόσον η χρονο-εξαρτώμενη διάσπαση του μεταλλαγμένου πρωτομερούς συσχετίζεται με τη δράση κάποιας μεταλλοπρωτεϊνάσης, αξιολογήθηκε η έκφραση ή η ενεργοποίηση διαφόρων MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-9 και MMP-12) από πρωτεΐνη σπειραματικής προέλευσης, σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία όπως πιο πάνω. Σε αντίθεση με τις MMP-2, MMP-3 και MMP-12 μεταλλοπρωτεϊνάσες (εικόνα 20B), η έκφραση των οποίων δεν φάνηκε να επηρεάζεται, η ενεργοποιημένη μορφή της MMP-9 (63kDa) εντοπίζεται γύρω στον 6<sup>ο</sup> μήνα ζωής των Col4a3 mut/mut knockin ποντικών και η έκφραση αυτής παραμένει σταθερή και σε προχωρημένη ηλικία

(εικόνα 20B). Το γεγονός ότι η ενεργοποιημένη μορφή της MMP-9 ξεκινά να εντοπίζεται τον μήνα ζωής κατά τον οποίο τα επίπεδα του Col4a3 τμήματος (35kDa) αρχίζουν να αυξάνονται, αποτελεί ένδειξη ότι η MMP-9 θα μπορούσε να είναι το ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στη διάσπαση του μεταλλαγμένου Col4a πρωτομερούς. Επιπρόσθετα, η ενεργοποιημένη μορφή της MMP-9 παρουσιάζει αμυδρή εντόπιση σε κάποια wild type +/+ ποντίκια μετά τον 17<sup>ο</sup> μήνα ζωής, πιθανώς λόγω του ρόλου της στην παραγωγή της tumstatin, ενός Col4a3 τμήματος 28kDa, το οποίο παρατηρείται υπό φυσιολογικές συνθήκες.



(A) Τα επίπεδα του 35 kDa τμήματος της Col4a3 αλυσίδας αυξάνουν προοδευτικά με την ηλικία των *Col4a3* μεταλλαγμένων ποντικών. Έγινε χρήση ειδικού αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει το NCI τμήμα της Col4a3 αλυσίδας προς ανίχνευση του 35kDa τμήματος. Έγινε κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της α3 αλυσίδας ως προς τα επίπεδα της β-tubulin

(B) Έγινε χρήση ειδικού αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει τις ενεργοποιημένες μορφές της MMP-9 μεγέθους 82kDa και 63kDa και άλλου που αναγνωρίζει την MMP-3. Η 63kDa ενεργοποιημένη μορφή της MMP-9 ανιχνεύεται στα *Col4a3 mut/mut* ποντίκια από τον 6<sup>ο</sup> μήνα ζωής και διατηρείται μέχρι τον 15<sup>ο</sup> μήνα. Έγινε κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της 63kDa ενεργοποιημένης μορφής της MMP-9 στα σπειράματα *Col4a3 mut/mut* ποντικών 4, 6, 10, 12 και 15 μηνών και στα σπειράματα *Col4a3 wild type +/+* ποντικών 4, 10 και 15 μηνών ως προς τα επίπεδα της actin. Τα δεδομένα αντιστοιχούν σε μέσους όρους ± τυπικό σφάλμα (n≥3). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση one-way ANOVA με Tukey post testing (\*\* p≤0,007, \*\*\* p≤0,0008, \*\*\*\* p≤0,0001).



## Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογία για μελέτες στον άνθρωπο

Στο διάστημα 01-06/2013 έγινε στρατολόγηση και κλινική αξιολόγηση 87 ασθενών με ΝΑΒΜ (63 εκ των οποίων είναι ετερόζυγοι φορείς της *COL4A3 – G1334E*) και στο διάστημα 08/2015-02/2016 έγινε στρατολόγηση 94 ασθενών με ΝΑΒΜ (68 εκ των οποίων είναι ετερόζυγοι φορείς της *COL4A3 – G1334E*). Μετά από τηλεφωνική επικοινωνία με τον κάθε ασθενή διευθετήθηκε προσωπικό ραντεβού. Για τον κάθε ασθενή έγινε καταγραφή των σωματομετρικών χαρακτηριστικών και του ατομικού του ιστορικού, με ιδιαίτερη έμφαση σε στοιχεία που αφορούν στην πιθανή συννοσηρότητα και την τρέχουσα φαρμακευτική αγωγή. Έγινε μέτρηση και καταγραφή της αρτηριακής πίεσης και εργαστηριακή αξιολόγηση της νεφρικής λειτουργίας βάσει βιοχημικών αναλύσεων αίματος και ούρων. Αποκλείστηκαν ασθενείς που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη και ΤΣΧΝΑ. Όλοι οι ασθενείς και οι κηδεμόνες των ατόμων κάτω των 18 ετών υπέγραψαν, για τη συμμετοχή τους στην ερευνητική αυτή εργασία, έντυπο συγκατάθεσης εγκεκριμένο από την Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής Κύπρου.

Αξιολογώντας τις παραμέτρους "ηλικία" και "κλινικώς σημαντική πρωτεϊνουρία με ή χωρίς έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας", οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε *mild*, *severe*, *grey zone* και *unclassified* βάσει της σοβαρότητας της κλινικής τους εικόνας.

Συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση έγινε ως εξής:

- **Mild patients:** ηλικίας  $\geq 50$  έτη, με φυσιολογική νεφρική λειτουργία και νορμοαλβουμινουρία (δηλαδή  $UACR < 30\text{mg/g}$  ή Αλβουμίνη ούρων  $24\text{h} < 30\text{mg}$ )
- **Severe patients:** οποιασδήποτε ηλικίας, με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία και/ή κλινικώς σημαντική πρωτεϊνουρία (δηλαδή  $UACR \geq 300\text{mg/g}$  ή Αλβουμίνη ούρων  $24\text{h} \geq 300\text{mg}$ )
- **Grey zone patients:** οποιασδήποτε ηλικίας, με φυσιολογική νεφρική λειτουργία και μικροαλβουμινουρία (δηλαδή  $UACR 30\text{-}299\text{mg/g}$  ή Αλβουμίνη ούρων  $24\text{h} 30\text{-}299\text{mg}$ )
- **Unclassified patients:** ηλικίας  $< 50$  ετών, με φυσιολογική νεφρική λειτουργία και νορμοαλβουμινουρία (δηλαδή  $UACR < 30\text{mg/g}$  ή Αλβουμίνη ούρων  $24\text{h} < 30\text{mg}$ )

Σχετικά με τους unclassified ασθενείς, αυτοί δεν ταξινομούνται στους mild ασθενείς λόγω του «νεαρού» της ηλικίας τους, παρά το ότι δεν παρουσιάζουν ευρήματα νεφρικής νόσου. Δεν θεωρείται δηλαδή ασφαλές αυτοί οι ασθενείς να ταξινομηθούν ως υγιείς, αφού είναι απρόβλεπτο το πώς θα εξελιχθεί η νόσος τους. Το όριο των 50 ετών έχει τεθεί αυθαίρετα

με βάση προηγούμενες παρατηρήσεις από τη μελέτη Κύπριων ασθενών με ΝΛΒΜ. Σχετικά με τους ασθενείς που ταξινομούνται στη γκρίζα ζώνη, αυτοί παρουσιάζουν ένα πολύ αρχικό στάδιο πρωτεϊνουρίας. Η γκρίζα ζώνη μπορεί να αφορά ένα αρχόμενο στάδιο διαταραχής της λειτουργίας του ΦΣΔ, αλλά είναι ορθότερο αυτό να επιβεβαιωθεί σε μελλοντική αξιολόγηση του ασθενούς, προτού αυτός ταξινομηθεί ως έχοντας σοβαρή νόσο.

Παράλληλα, από τον κάθε ασθενή έγινε λήψη δείγματος αίματος και ακολούθως απομόνωση και φύλαξη DNA, πλάσματος και ορού, όπως επίσης και λήψη και φύλαξη δείγματος ούρων. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν με την προοπτική μελλοντικής αναζήτησης μέσω Whole Exome Sequencing τροποποιητικών γονιδίων που πιθανώς επηρεάζουν την πρόγνωση της νόσου. Επιπλέον, τα δείγματα αυτά είναι διαθέσιμα για πιθανές μελέτες προς ανίχνευση πρώιμων βιοδεικτών εξελισσόμενης νεφρικής βλάβης (proteomics, transcriptomics, metabolomics).

Για 43 από τους ασθενείς που στρατολογήθηκαν (32 φορές της *COL4A3 – G1334E*) έχει γίνει προοπτική κλινικοεργαστηριακή παρακολούθησή τους και παράλληλη συλλογή βιολογικού υλικού, με σκοπό την αξιολόγηση του ρυθμού εξέλιξης της νεφρικής νόσου.

### **5.1 Δειγματοληψία αίματος και ούρων**

Από κάθε ασθενή, μετά από περίοδο νηστείας, λήφθηκαν 2 EDTA σωληνάρια χωρητικότητας 9ml για απομόνωση DNA, 1 Sodium Citrate σωληνάριο χωρητικότητας 6ml για απομόνωση πλάσματος και 1 plain σωληνάριο χωρητικότητας 9ml για απομόνωση ορού. Λήφθηκε επίσης 2<sup>ο</sup> πρωινό δείγμα ούρων από το μέσο της ούρησης, το οποίο συλλέχθηκε σε αποστειρωμένο δοχείο.

### **5.2 Απομόνωση DNA από ολικό αίμα**

Το αίμα μεταφέρεται σε 50ml Falcon σωληνάριο και προστίθεται 0.9% NaCl με τελικό όγκο τα 40ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και προσεκτική απομάκρυνση του υπερκείμενου με τη χρήση αναρροφητήρα. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (0.18M χλωριούχο αμμώνιο, 3mM διττανθρακικό αμμώνιο) με τελικό όγκο τα 45ml και ανακίνηση των σωληναρίων, τα οποία έπειτα αφήνονται σε ηρεμία για 30-40min ώστε να επιτραπεί η αιμόλυση. Ακολούθως γίνεται φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min σε θερμοκρασία δωματίου και αφαιρείται το υπερκείμενο με αναρροφητήρα. Στον πυθμένα του σωληναρίου απομένουν τα λευκά αιμοσφαίρια με τη μορφή λευκωπού ιζήματος. Γίνεται

προσεκτική πλύση του ιζήματος με 0.9% NaCl και έπειτα προσθήκη 4ml διαλύματος λύσης των λευκών αιμοσφαιρίων (100mM χλωριούχο νάτριο, 25mM Dissodium EDTA). Ακολουθεί εντατική ανακίνηση του σωληναρίου και έπειτα προσθήκη 10% SDS και 20μl Proteinase K (20ng/ml). Τα σωληνάρια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 37°C κατά τη διάρκεια της νύκτας. Στη συνέχεια προστίθεται οξικό αμμώνιο 9.5M σε ποσότητα 1.48ml (0.37ml οξικού αμμώνιου για κάθε 1ml διαλύματος λύσης των λευκών αιμοσφαιρίων), ακολουθεί εντατική ανακίνηση μέχρι τη δημιουργία αφρού και έπειτα φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 30min σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη χρήση πιπέτας Pasteur μεταφέρεται το υπερκείμενο σε καινούριο 50ml Falcon σωληνάριο και προστίθεται παγωμένη 96% αιθανόλη με τελικό όγκο τα 30ml. Μετά από 1min γίνεται ανακίνηση και το DNA γίνεται ορατό με τη μορφή λευκών ινιδίων. Το DNA μεταφέρεται προσεκτικά με πιπέτα Pasteur σε 2ml screw cap σωληνάριο, προστίθεται 1ml αιθανόλης 70% και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται η αιθανόλη και προστίθεται 0.5ml TE διαλύματος 10mM (10mM Tris-HCl και 0.1mM EDTA). Τα δείγματα αφήνονται σε rotator κατά τη διάρκεια της νύκτας για πλήρη διαλυτοποίηση. Ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE). Φυλάσσεται DNA σε συγκεντρωμένη μορφή καθώς και αραιώσεις σε 2 aliquots των 200μl (50ng/μl).

### **5.3 Απομόνωση πλάσματος από ολικό αίμα**

Τα Sodium Citrate σωληνάρια φυγοκεντρούνται άμεσα μετά την παραλαβή τους στο εργαστήριο, στα 1500g για 15min στους 4°C. Το υπερκείμενο πλάσμα συλλέγεται και μεταφέρεται σε 2 screw cap σωληνάρια των 2ml, τα οποία περιέχουν 1ml πλάσμα το κάθε ένα. Τα δείγματα πλάσματος φυλάσσονται στους -80°C.

### **5.4 Απομόνωση ορού από ολικό αίμα**

Τα plain σωληνάρια φυγοκεντρούνται άμεσα μετά την παραλαβή τους στο εργαστήριο, στα 1500g για 15min στους 4°C. Ο υπερκείμενος ορός συλλέγεται και μεταφέρεται σε 4 screw cap σωληνάρια των 2ml, τα οποία περιέχουν 1ml ορό το κάθε ένα. Τα δείγματα ορού φυλάσσονται στους -80°C.

### **5.5 Επεξεργασία δειγμάτων ούρων**

Τα δείγματα ούρων πρέπει να τύχουν επεξεργασίας άμεσα μετά την παραλαβή τους στο εργαστήριο. Μεταφέρονται σε 50ml Falcon σωληνάρια και φυγοκεντρούνται στα 1000g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε 10 screw cap



σωληνάρια των 2ml, τα οποία περιέχουν 1.8ml ούρων το κάθε ένα. Τα δείγματα ούρων φυλάσσονται στους -80°C.

ΙΣΑΒΕΛΛΑ ΣΑΒΒΑ

## Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα από μελέτες στον άνθρωπο

Στο διάστημα 01-06/2013 έγινε στρατολόγηση και κλινική αξιολόγηση 87 ασθενών με ΝΑΒΜ. Από αυτούς, οι 63 ασθενείς είναι ετερόζυγοι φορείς της *COL4A3-G1334E* μετάλλαξης (Πίνακες 2, 3).

**Πίνακας 2. Ασθενείς με ΝΑΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2013. Ταξινόμηση με βάση το φύλο και τη σοβαρότητα της νόσου τους**

2013 patients	Male (n=41)	Female (n=46)	All mutations carriers (n=87)	<i>COL4A3-G1334E</i> carriers (n=63)
Severe	19	9	28	21
Mild	1	10	11	6
Grey zone	2	1	3	3
Unclassified	19	26	45	33

**Πίνακας 3. Ασθενείς με ΝΑΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2013. Ταξινόμηση με βάση το φύλο, την ηλικία και τη σοβαρότητα της νόσου τους**

2013 patients	Severe male (n=19)	Severe female (n=9)	Mild male (n=1)	Mild female (n=10)	Unclassified male (n=19)	Unclassified female (n=26)
Age range	39-83	42-83	64	52-77	11-43	4-48
Mean age	57,2	58	64	61,7	27,6	29,6
Median age	57	56	64	58,5	28	32,5

Στο διάστημα 08/2015-02/2016 έγινε στρατολόγηση και κλινική αξιολόγηση 94 ασθενών με ΝΑΒΜ. Από αυτούς, οι 68 ασθενείς είναι ετερόζυγοι φορείς της *COL4A3-G1334E* μετάλλαξης (Πίνακες 4, 5).

**Πίνακας 4. Ασθενείς με ΝΑΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2015/16. Ταξινόμηση με βάση το φύλο και τη σοβαρότητα της νόσου τους**

2015/16 patients	Male (n=46)	Female (n=48)	All mutations carriers (n=94)	<i>COL4A3-G1334E</i> carriers (n=68)
Severe	22	14	36	23
Mild	1	10	11	32
Grey zone	4	3	7	5
Unclassified	19	21	40	8

**Πίνακας 5. Ασθενείς με ΝΑΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2015/16. Ταξινόμηση με βάση το φύλο, την ηλικία και τη σοβαρότητα της νόσου τους**

2015/16 patients	Severe male (n=22)	Severe female (n=14)	Mild male (n=1)	Mild female (n=10)	Unclassified male (n=19)	Unclassified female (n=21)
Age range	33-85	44-85	64	50-85	6-47	11-48
Mean age	56,3	59,9	64	61,6	28,9	32,9
Median age	58	58,5	64	58	30	33

Από τη σύμπτυξη των δύο ομάδων ασθενών προέκυψαν 138 συνολικά ασθενείς. Από τους ασθενείς που είχαν προσέλθει και στα δύο χρονικά σημεία (n=43) χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του πιο πρόσφατου. Από τους 138 ασθενείς, οι 99 ήταν φορείς της *COL4A3-G1334E* μετάλλαξης (Πίνακες 6, 7).

**Πίνακας 6. Ασθενείς με ΝΑΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2013 και το 2015/16. Ταξινόμηση με βάση το φύλο και τη σοβαρότητα της νόσου τους**

2013 and 2015/16 patients	Male (n=64)	Female (n=74)	All mutations carriers (n=138)	<i>COL4A3-G1334E</i> carriers (n=99)
Severe	29	16	45	31
Mild	2	16	18	10
Grey zone	4	3	7	5
Unclassified	29	39	68	53

**Πίνακας 7. Ασθενείς με ΝΑΒΜ που στρατολογήθηκαν το 2013 και το 2015/16 Ταξινόμηση με βάση το φύλο, την ηλικία και τη σοβαρότητα της νόσου τους**

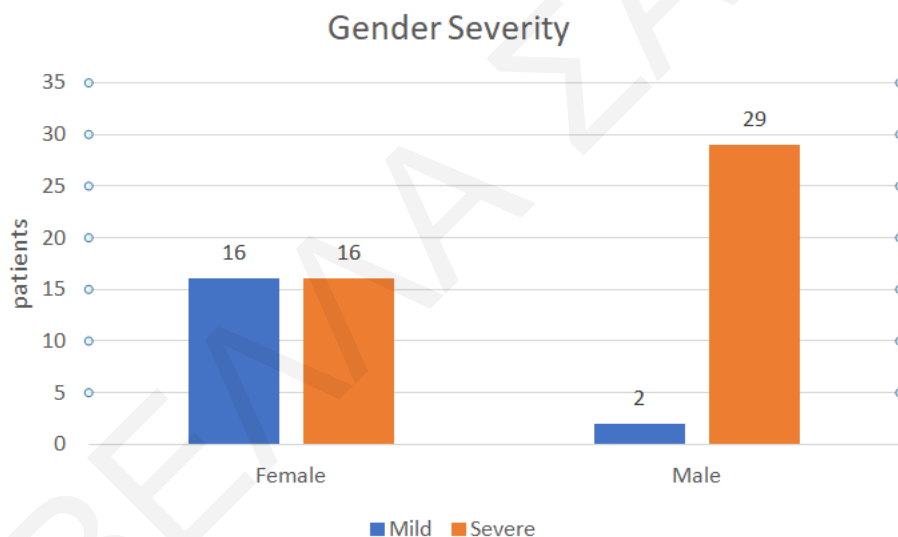
2013 and 2015/16 patients	Severe male (n=29)	Severe female (n=16)	Mild male (n=2)	Mild female (n=16)	Unclassified male (n=29)	Unclassified female (n=39)
Age range	33-85	44-85	64	50-83	6-47	4-48
Mean age	56,8	59,3	64	62,2	28	29,9
Median age	57	58,5	64	58	28	33

Η σύμπτυξη των δύο ομάδων ασθενών έγινε με σκοπό την αύξηση του αριθμού των ασθενών από κάθε ομάδα, για την πιο αξιόπιστη μετέπειτα στατιστική ανάλυσή τους. Από την ανάλυση των δεδομένων προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

### 6.1 Συσχέτιση με τη σοβαρότητα και τον επιπολασμό της νόσου σε άντρες και γυναίκες

Οι γυναίκες είναι πιθανότερο να ανήκουν στην ομάδα με τους mild ασθενείς, σε αντίθεση με τους άντρες που είναι πιο πιθανόν να ανήκουν στους severe (p value=0,0003907, Pearson's Chi-squared test), (εικόνα 21).

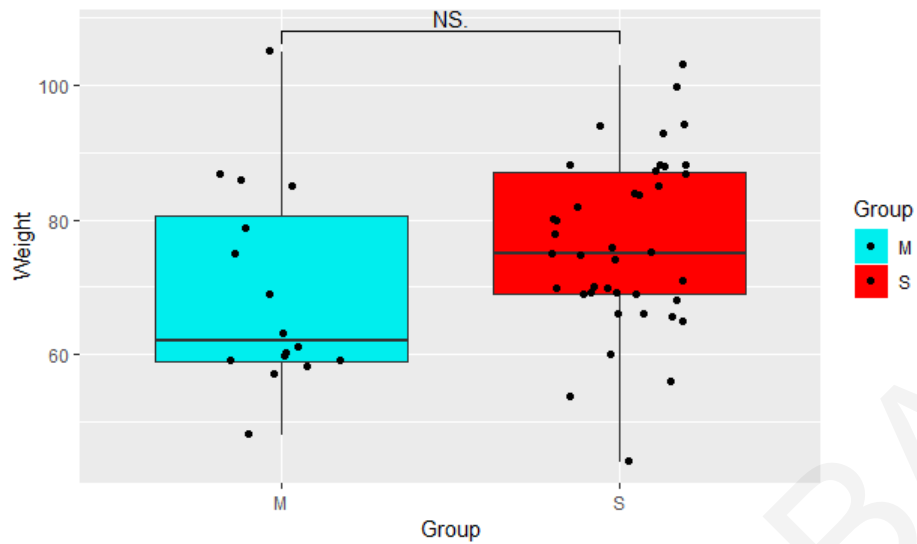
Η συσχέτιση αυτή της σοβαρότητας της νόσου με το άρρεν φύλο αποτελεί καινούριο εύρημα, αφού σε προηγούμενες μελέτες παρατήρησης των ασθενών με NAMB δεν βρέθηκε το φύλο να επιδρά στην εξέλιξη της νεφρικής νόσου (Voskarides et al., 2007, Pierides et al., 2009). Αντίθετα, το άρρεν φύλο φαίνεται να αποτελεί σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα για δυσμενή εξέλιξη της νεφρικής νόσου στη CFHR5 νεφροπάθεια (Athanasίου et al., 2011). Η τελευταία αποτελεί ένα άλλο είδος κληρονομικής νεφροπάθειας, η οποία οφείλεται στο διπλασιασμό των εξωνίων 2 και 3 στο CFHR5 γονίδιο, με αποτέλεσμα τη διαταραχή στη ρύθμιση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Η νόσος αυτή ενδημεί στην Κύπρο και χαρακτηρίζεται από μικροσκοπική αιματοουρία με διαλείποντα επεισόδια μακροσκοπικής αιματοουρίας, μετά συνήθως από λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού. Οι λόγοι που οι άντρες εμφανίζουν πιο σοβαρή πορεία στην εν λόγω νόσο, παραμένουν μέχρι και σήμερα άγνωστοι.



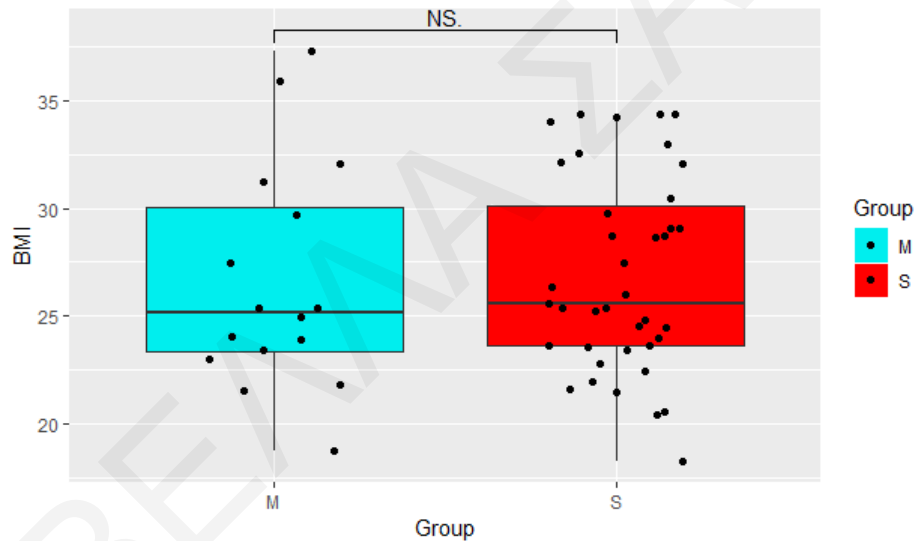
Εικόνα 21: Συσχέτιση με τη σοβαρότητα και τον επιπολασμό της νόσου σε άντρες και γυναίκες

## 6.2 Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το σωματικό βάρος και το δείκτη μάζας σώματος

Δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στους mild και τους severe ασθενείς σε σχέση με τη μέτρηση του σωματικού τους βάρους και τον υπολογισμό του BMI ( $p$  value=0,1143 και 0,8587 αντίστοιχα, Two Sample t-test), (εικόνα 22, 23).



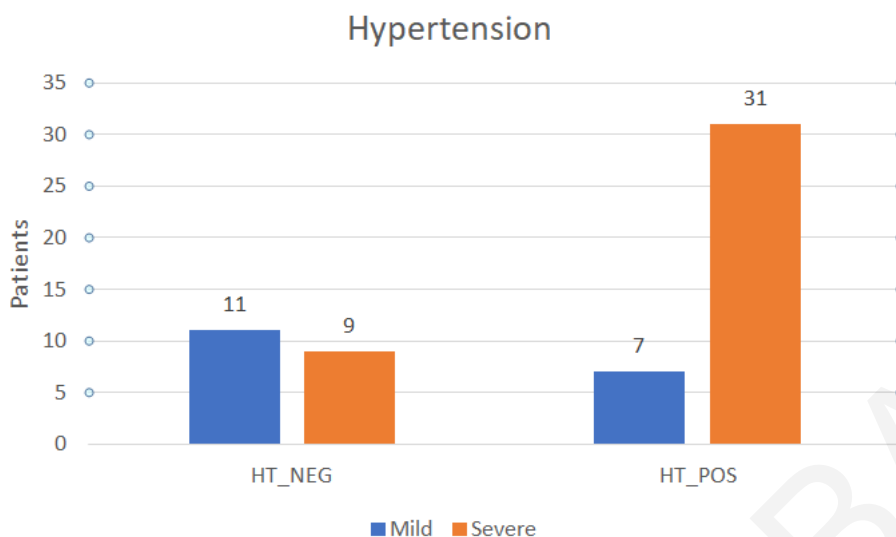
Εικόνα 22: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το σωματικό βάρος



Εικόνα 23: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το δείκτη μάζας σώματος

### 6.3 Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού αρτηριακής υπέρτασης

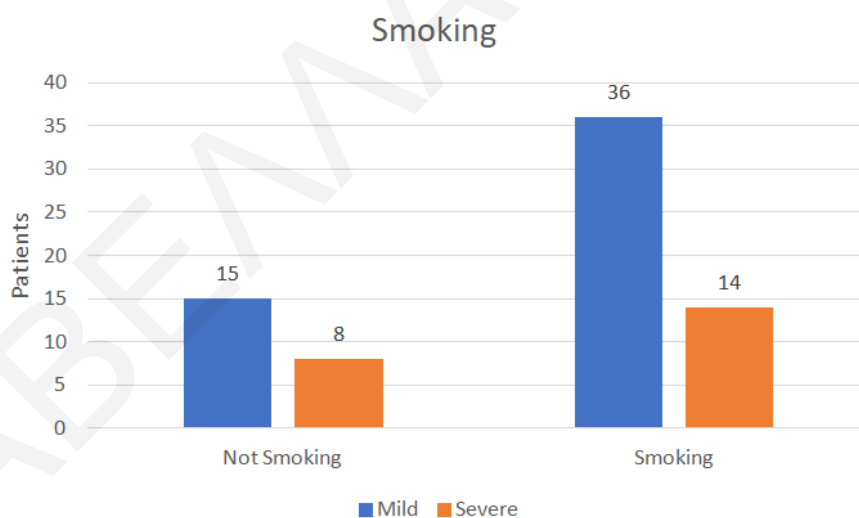
Οι ασθενείς με ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης είναι περισσότερο πιθανόν να ανήκουν στην ομάδα των severe ασθενών ( $p$  value=0,01036, Pearson's Chi-squared test), (εικόνα 24).



**Εικόνα 24:** Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού αρτηριακής υπέρτασης

#### 6.4 Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το κάπνισμα

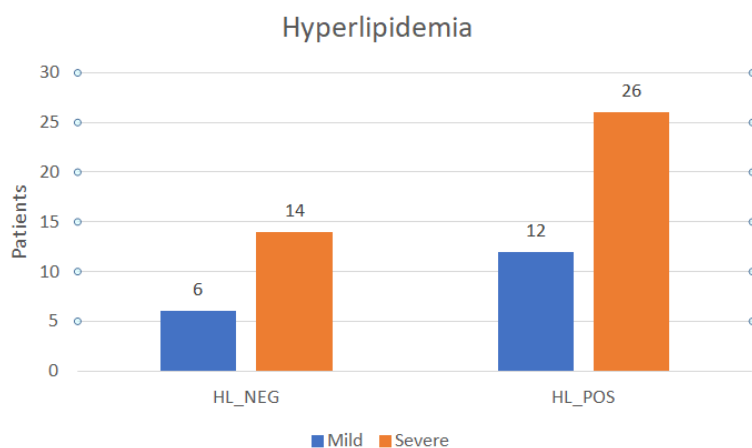
Υπάρχει οριακή στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στους mild και severe ασθενείς ( $p$  value=0,058, Pearson's Chi-squared test), (εικόνα 25).



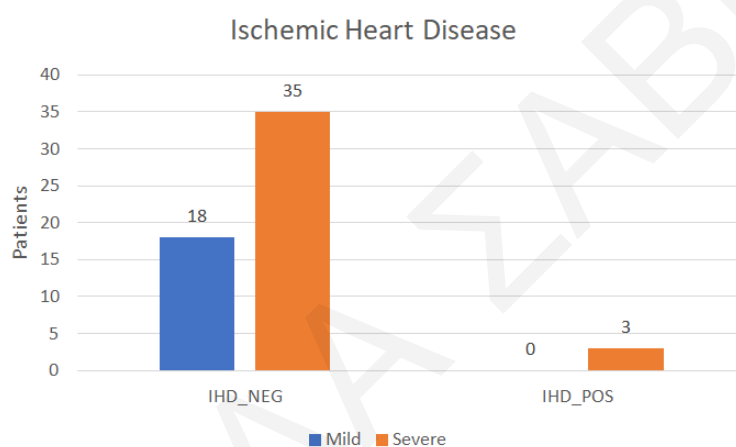
**Εικόνα 25:** Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με το κάπνισμα

#### 6.5 Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού υπερλιπιδαιμίας και στεφανιαίας νόσου

Δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στους mild και τους severe ασθενείς σε σχέση με την παρουσία ιστορικού υπερλιπιδαιμίας ή στεφανιαίας νόσου ( $p$  value=1 και 0,55 αντίστοιχα, Pearson's Chi-squared test), (εικόνα 26,27).



**Εικόνα 26: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού υπερλιπιδαιμίας**



**Εικόνα 27: Συσχέτιση της σοβαρότητας της νόσου με την παρουσία ιστορικού στεφανιαίας νόσου**

Σχετικά με την αξιολόγηση του ρυθμού εξέλιξης της νεφρικής νόσου στους ασθενείς αυτούς, δεν έγινε εφικτό να εξαχθούν αναλυτικά συμπεράσματα λόγω του ότι δεν μπορεί να επιτευχθεί στατιστική ισχύς. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία από δύο μόνο χρονικά σημεία, με σχετικά μικρό χρονικό διάστημα μεταξύ τους και αφορούν μια νόσο η οποία εξελίσσεται αργά. Επιπλέον, ο αριθμός των ασθενών για τους οποίους υπάρχει αξιολόγηση και στα δύο χρονικά σημεία είναι μικρός.

Είναι όμως εμφανές ότι η νόσος δεν έχει ταχεία εξέλιξη αφού η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών δεν άλλαξε κατηγορία σοβαρότητας της νόσου. Μόνο δύο ασθενείς προχώρησαν σε επόμενο στάδιο, συγκεκριμένα δύο άντρες 49 και 33 ετών βρέθηκαν στο δεύτερο χρονικό σημείο να εμφανίζουν κλινικώς σημαντική πρωτεϊνουρία, ενώ στο πρώτο χρονικό σημείο εμφάνιζαν μικροαλβουμιουρία (αλλαγή δηλαδή από grey zone σε severe ομάδα). Άλλοι δύο ασθενείς, μία γυναίκα 63 ετών και ένας άντρας 24 ετών, στο δεύτερο χρονικό σημείο παρουσίασαν μικροαλβουμιουρία ενώ στο πρώτο δεν υπήρχε καμία ένδειξη νεφρικής νόσου από την ανάλυση των ούρων τους.

## Κεφάλαιο 7: Συζήτηση

Το ΣΑ και η ΝΛΒΜ είναι νόσοι οι οποίες οφείλονται σε μεταλλάξεις στα *COL4A3/A4/A5* γονίδια. Οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν ευρεία φαινοτυπική ετερογένεια, ακόμα και μεταξύ ατόμων που φέρουν την ίδια μετάλλαξη και που ανήκουν μάλιστα και στην ίδια οικογένεια. Αρκετές περιπτώσεις φυλοσύνδετου ή αυτοσωματικού υπολειπόμενου ΣΑ καταλήγουν σε ΤΣΧΝΑ σε πιο προχωρημένη ηλικία, π.χ μετά τα 50 έτη, ενώ αντίστροφα παρατηρούνται περιπτώσεις *COL4A3/A4* ετερόζυγων ασθενών με ΝΛΒΜ που παρουσιάζουν πολύ σοβαρή νόσο σε νεότερη ηλικία, π.χ. γύρω στα 40 έτη. Το γεγονός αυτό προκαλεί προβληματισμό στην επιστημονική κοινότητα αλλά και σύγχυση ανάμεσα στους κλινικούς ιατρούς σχετικά με τη φύση της γενετικής καθοδήγησης και την ενημέρωση του εκάστοτε ασθενούς σχετικά με την πρόγνωση του. Ανάμεσα στα μέλη της επιστημονικής κοινότητας μάλιστα επικρατεί διχογνωμία σχετικά με την ονοματολογία των νόσων αυτών. Προτείνεται από πολλούς η κατάργηση των ονομασιών “Σύνδρομο Alport” και “Νεφροπάθεια της Λεπτής Βασικής Μembrάνης”, αφού δυστυχώς η πρώτη τείνει να καταδικάζει τον ασθενή σε ταχεία κατάληξη σε ΤΣΧΝΑ και η δεύτερη να κατηγοριοποιεί αυτόματα τον ασθενή σε μια πιο καλοήγη κατάσταση. Εναλλακτικά προτείνεται ο όρος “Παθήσεις του Κολλαγόνου τύπου IV” ως πιο ευρύς όρος, ο οποίος θα περιλαμβάνει και τους ετερόζυγους φορείς των *COL4A3/A4* μεταλλάξεων. Η εμπειρία και η θεαματική εξέλιξη της γενετικής διερεύνησης των παθήσεων αυτών την τελευταία δεκαετία, μας δείχνουν ότι ο καθορισμός της πρόγνωσης του κάθε ασθενούς θα πρέπει να γίνεται εξατομικευμένα, λαμβάνοντας υπόψη τη φύση της υποκείμενης μετάλλαξης, την πορεία άλλων μελών της οικογένειας στο χρόνο και την εμφάνιση αλβουμινουρίας και αρτηριακής υπέρτασης από πολύ μικρή ηλικία. Ευσεβής στόχος είναι στο μέλλον να μπορούν να αναγνωριστούν οι ασθενείς σε αυξημένο κίνδυνο για σοβαρή νόσο, με την εντόπιση τροποποιητικών γονιδίων ή/και βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά. Σε ένα βήμα παραπέρα, οι βιοδείκτες αυτοί θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης μετά από χορήγηση θεραπευτικών παραγόντων.

Στη σκιαγράφηση του κινδύνου κάθε ασθενή για εμφάνιση σοβαρής νεφρικής νόσου, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη εκτός από τους γενετικούς παράγοντες και η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Τέτοιοι είναι το κάπνισμα, η κατάχρηση αλκοόλ, η υπερβολική κατανάλωση άλατος και πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης και βεβαίως η παχυσαρκία, η μάστιγα των δυτικών κοινωνιών με όλα αυτά τα οποία συνεπάγεται. Η παρουσία συννοσηρότητας με σακχαρώδη διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση (η οποία μπορεί να είναι αιτία αλλά και αποτέλεσμα της νεφρικής βλάβης), υπερλιπιδαιμία, στεφανιαία



νόσο και καρδιακή ανεπάρκεια σίγουρα αυξάνουν τον κίνδυνο εξέλιξης της νεφρικής νόσου οποιασδήποτε αιτιολογίας. Επιπλέον, η αύξηση του μέσου όρου ζωής έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πιθανότητας να καταλήξει σε ΤΣΧΝΑ ένας ασθενής με ΝΑΒΜ και κατά βάση αργή εξέλιξη της νόσου, ενώ στα πιο πάνω έρχεται να προστεθεί και η πολυφαρμακία και η αύξηση της συχνότητας διενέργειας μεγάλων χειρουργικών επεμβάσεων σε άτομα προχωρημένης ηλικίας.

Εφόσον ο ασθενής καταλήξει σε ΤΣΧΝΑ, για να παραμείνει εν ζωή επιβάλλεται η υποκατάσταση της νεφρικής λειτουργίας είτε με μεταμόσχευση νεφρού, η οποία αποτελεί και την καλύτερη επιλογή, είτε με αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση. Η ανάγκη όμως για νεφρικά μοσχεύματα είναι δυσανάλογα μεγάλη σε σχέση με την προσφορά τους. Έτσι, δυστυχώς ο αριθμός των ατόμων με ΤΣΧΝΑ που υποβάλλονται σε κάθαρση αυξάνει χρόνο με το χρόνο, με μεγάλη σωματική και ψυχολογική επιβάρυνση των ασθενών και των οικείων τους αλλά και τεράστια οικονομική επιβάρυνση των επιμέρους συστημάτων υγείας. Η εξελισσόμενη νεφρική βλάβη δεν ελλοχεύει μόνο τον κίνδυνο κατάληξης σε ΤΣΧΝΑ, αλλά επηρεάζει όλα τα συστήματα του οργανισμού και πρωτίτως το καρδιαγγειακό σύστημα, θέτοντας τους ασθενείς σε κίνδυνο οξέος στεφανιαίου επεισοδίου, οξέος εγκεφαλικού επεισοδίου και περιφερικής αγγειοπάθειας, με συνεπακόλουθη αύξηση του βαθμού αναπηρίας, της εξάρτησης από τους οικείους και την περαιτέρω επιβάρυνση των συστημάτων υγείας.

Προκύπτει λοιπόν επιτακτική η ανάγκη για την εν τω βάθει διερεύνηση των γενετικών και κυτταρικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην παθογένεια του ΣΑ, πάντα με απώτερο στόχο την αναγνώριση των ασθενών σε σοβαρότερο κίνδυνο, την εντόπιση πιθανών θεραπευτικών στόχων, την ανακάλυψη καινοτόμων θεραπειών και την παροχή κατά το δυνατόν στοχευόμενης και εξατομικευμένης θεραπείας. Για το σκοπό αυτό κρίνεται απαραίτητη η στενή συνεργασία κλινικών ιατρών, γενετιστών/μοριακών βιολόγων αλλά και των φαρμακευτικών εταιρειών. Απαιτούνται άριστα χαρακτηρισμένες ομάδες ασθενών, με γενετικά στοιχεία σχετικά με τη φύση της υποκείμενης μετάλλαξης και την παρουσία πιθανώς τροποποιητικών γονιδίων, με σωματομετρικά στοιχεία και παράλληλη καταγραφή της συννοσηρότητας και της φαρμακευτικής αγωγής που λαμβάνουν. Η καταγραφή απλών βιοχημικών δεικτών από τον ορό και τα ούρα ασθενών με ΣΑ είναι αναγκαία και ικανή για την κατηγοριοποίηση των ασθενών ως έχοντες ήπια ή πιο σοβαρή νόσο. Εξαιρετικής σημασίας κρίνεται και η συνεργασία με διάφορα κέντρα αναφοράς ασθενών με ΣΑ στο εξωτερικό, με απώτερο στόχο την αύξηση του αριθμού ασθενών προς μελέτη και την ασφαλέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων, ενώ τέτοιου είδους συνεργασίες

θα μπορούσαν μελλοντικά να αποτελέσουν σύνδεσμο για συμμετοχή Κύπριων ασθενών σε κλινικές μελέτες εφαρμογής νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Επιπλέον, από τη χρηματοδότηση προγραμμάτων έρευνας για το ΣΑ θα μπορούσαν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα και για ασθενείς με άλλου είδους νεφροπάθειες, όπως για παράδειγμα έγινε με την EARLY PRO-TECT μελέτη που προαναφέρθηκε, στην οποία διαπιστώθηκε η ασφάλεια στη χρήση του Ramipril σε παιδιά ηλικίας άνω των δύο ετών, μιας ουσίας της οποίας η χορήγηση κρίνεται χρήσιμη στην πλειονότητα των νεφρικών παθήσεων.

Στο πλαίσιο εκπόνησης της διδακτορικής αυτής διατριβής έγινε στρατολόγηση ασθενών με ΝΛΒΜ σε δύο χρονικά σημεία με διαφορά 2,5-3 ετών μεταξύ τους. Επιβεβαιώθηκε για άλλη μια φορά ότι στον κυπριακό τουλάχιστον πληθυσμό η ΝΛΒΜ δεν αποτελεί μία καλοήγη νόσο αφού σημαντικός αριθμός ασθενών παρουσίαζαν πρωτεϊνουρία ή πρωτεϊνουρία με επιπρόσθετο βαθμό έκπτωσης της νεφρικής λειτουργίας. Επιβεβαιώθηκε ακόμη η πιθανολογούμενη αργή εξέλιξη της νεφρικής νόσου στους ασθενείς αυτούς, αφού μικρός μόνο αριθμός ασθενών προχώρησε σε επόμενο στάδιο της νεφρικής νόσου σε διάστημα 2,5-3 ετών. Το γεγονός αυτό στη ΝΛΒΜ δίνει χρόνο για θεραπευτική παρέμβαση και καθυστέρηση της εξέλιξης της νεφρικής βλάβης, αλλά παράλληλα υποδεικνύει ότι ενδεχόμενος σχεδιασμός προοπτικών μελετών προϋποθέτει πολλά έτη παρακολούθησης των ασθενών. Το σύνολο των ασθενών με πρωτεϊνουρία λάμβαναν αγωγή με αναστολέα του ΑΡΑΑ, γεγονός που πιθανότατα προμηνύει ότι τις επόμενες δεκαετίες πολύ μικρότερο ποσοστό ασθενών με ΝΛΒΜ πρόκειται να καταλήξει σε ΤΣΧΝΑ. Ασθενείς με αρτηριακή υπέρταση ήταν πιο πιθανό να ανήκουν στην ομάδα των ασθενών με σοβαρή νόσο, ενώ διαπιστώθηκε ως καινούριο εύρημα ότι οι άντρες πιθανώς να είναι προδιατεθειμένοι σε σοβαρότερη εξέλιξη της νόσου.

Στο σημείο αυτό κρίνεται αναγκαίο να τονιστεί η σημασία της έγκαιρης μοριακής διάγνωσης των ατόμων που προέρχονται από οικογένειες με *COL4A3/A4* κολλαγονοπάθειες, αφού η έγκαιρη παρέμβαση ακόμη και με μη ειδική αγωγή σε αυτές τις αργά εξελισσόμενες νόσους, μπορεί να αποβεί σωτήρια για τους ασθενείς. Με πρωτοβουλία της συγγραφέως, έγινε ακόμη στρατολόγηση 95 ατόμων νεαρής κυρίως ηλικίας προερχόμενων από οικογένειες με γνωστή μετάλλαξη στα *COL4A3/A4*, τα οποία δεν είχαν εξετασθεί στο παρελθόν με γενετικές μεθόδους. Οι 43 από αυτούς αποδείχθηκε να έχουν κληρονομήσει την ανάλογη μετάλλαξη. Υποβλήθηκαν όλοι στη συνέχεια σε εξετάσεις αίματος και ούρων προς καθορισμό του σταδίου της νόσου στο οποίο βρίσκονται και δόθηκε κλινική καθοδήγηση για την περαιτέρω ιατρική παρακολούθησή

τους και αγωγή ή/και τα υγιεινοδιαιτητικά μέτρα ζωής που συνιστάται να ακολουθήσουν. Δόθηκαν επίσης στοιχειώδεις κατευθύνσεις γενετικής συμβουλευτικής.

Πέραν της στρατολόγησης των ασθενών με ΝΛΒΜ, τον λεπτομερή χαρακτηρισμό τους και την παρακολούθηση της πορείας της νόσου τους, έγινε παράλληλα συλλογή από αυτούς βιολογικού υλικού. Συγκεκριμένα, έγινε συλλογή αίματος προς απομόνωση DNA, ορού και πλάσματος και συλλογή δείγματος ούρων. Τα δείγματα αυτά φυλάχθηκαν στη Βιοτράπεζα του Πανεπιστημίου Κύπρου και ήδη αξιοποιούνται από συνεργάτες του Κέντρου Ερευνών Μοριακής Ιατρικής. Για παράδειγμα, αρκετά από τα δείγματα DNA των ασθενών αυτών έχουν τύχει επεξεργασίας με Whole Exome Sequencing στο πλαίσιο άλλου ερευνητικού προγράμματος, στην προσπάθεια εντόπισης τροποποιητικών γονιδίων (αναμένεται δημοσίευση των αποτελεσμάτων). Επιπρόσθετα, τα ούρα των ασθενών αυτών, ως άριστο υλικό για ανεύρεση διαγνωστικών ή προγνωστικών δεικτών, πρόκειται σύντομα να χρησιμοποιηθούν για προτεομική ανάλυση, για ανίχνευση micro-RNAs και για μεταβολομική ανάλυση.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η δουλειά που έχει γίνει με τη στρατολόγηση των ασθενών και με τον άρτιο κλινικο-εργαστηριακό τους χαρακτηρισμό, αποτελεί παράδειγμα για προσέλκυση άλλων κλινικών ιατρών διαφόρων ειδικοτήτων που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στον τομέα της εφαρμοσμένης έρευνας στην Κύπρο. Κάποιος θα μπορούσε να πει ότι δεν είναι μακριά ο καιρός που ο κλινικός ιατρός θα διαθέτει για τον κάθε ασθενή πληθώρα επιπρόσθετων στοιχείων από τέτοιου είδους εξειδικευμένες εξετάσεις και θα μπορεί εξατομικευμένα να σκιαγραφεί τον κίνδυνο που διατρέχει και στοχευόμενα να χορηγεί ανάλογη θεραπεία. Τέτοιου είδους ομάδες ασθενών όπως στην περίπτωση αυτή, είναι ιδανικές για την εντόπιση τροποποιητικών γονιδίων και βιοδεικτών, μια που αποτελούνται από σχετικά ομοιογενές υλικό (οι περισσότεροι ασθενείς είναι φορείς της ίδιας ακριβώς μετάλλαξης και όλοι έχουν το γενετικό υπόβαθρο της γενετικής δεξαμενής των Κυπρίων).

Στην προσπάθεια της επιστημονικής κοινότητας για κατανόηση των μηχανισμών που κρύβονται πίσω από την παθοφυσιολογία του ΣΑ, έχουν κατά καιρούς περιγραφεί διάφορα ζωικά μοντέλα για το ΣΑ. Είναι εμφανές ότι μετά την περιγραφή του πρώτου knockout μοντέλου (Cosgrove et al., 1996), προέκυψε η ανάγκη για δημιουργία και άλλων ζωικών μοντέλων. Και αυτό γιατί η γενετική ετερογένεια που χαρακτηρίζει το σύνδρομο και η συνεπακόλουθη φαινοτυπική ετερογένεια υποδηλώνουν ότι το υπόβαθρο των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών που συνοδεύει την κάθε είδους υποκείμενη μετάλλαξη,

μπορεί να διαφέρει σημαντικά στην κάθε περίπτωση. Παρά το ότι τουλάχιστον οι μισοί ασθενείς με ΣΑ κληρονομούν μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος στις αλυσίδες Col4a3, a4 ή a5 και στο 73% των περιπτώσεων αυτών η αντικατάσταση αυτή αφορά στο αμινοξύ γλυκίνη (Heidet et al., 2001), (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>), εντούτοις μέχρι στιγμής απουσιάζει από την βιβλιογραφία η λεπτομερής περιγραφή ενός knockin μοντέλου ποντικού για το ΣΑ.

Στο πλαίσιο εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έγινε η λεπτομερής φαινοτυπική περιγραφή του πρώτου knockin μοντέλου ποντικού για το ΣΑ, ομόζυγου για τη μετάλλαξη Col4a3-p.Gly1332Glu και ενός σύνθετου ετερόζυγου μοντέλου που φέρει την ίδια μετάλλαξη *in trans* με ένα knocked out αλληλόμορφο. Όπως προαναφέρθηκε, η Col4a3-p.Gly1332Glu αποτελεί ομόλογη μετάλλαξη της COL4A3-G1334E στον άνθρωπο, η οποία αποτελεί μια ιδιαίτερα συχνή μετάλλαξη ανάμεσα στους Κύπριους ετεροζυγώτες φορείς μεταλλάξεων στο COL4A, λόγω του φαινομένου του ιδρυτή (Voskarides et al., 2007, Voskarides et al., 2008). Παράλληλα, πολλοί ασθενείς με ΣΑ είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες φορείς μεταλλάξεων στα COL4A3, COL4A4 και COL4A5 γονίδια.

Και τα δύο ζωικά μοντέλα ανέπτυξαν ΣΑ και ΤΣΧΝΑ, σε προχωρημένη όμως ηλικία συγκριτικά με το ομόζυγο knockout ποντίκι. Ανάλογο φαινόμενο εγκατάστασης ΤΣΧΝΑ σε πιο προχωρημένη ηλικία παρατηρείται και στους ανθρώπους φορείς παρερμηνεύσιμων μεταλλάξεων συγκριτικά με τους φορείς άλλου είδους μεταλλάξεων (Jais et al., 2000, Gross et al., 2002, Storey et al., 2013). Το knockin Col4a3 mut/mut ποντίκι παρέχει τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης του ΣΑ και αποτελεί μοντέλο για ανθρώπους ασθενείς με αυτοσωματικό υπολειπόμενο ή φυλοσύνδετο ΣΑ, που φέρουν ανάλογες παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση γλυκίνης. Ανάλογα, το σύνθετο ετερόζυγο ποντίκι Col4a3 mut/- αποτελεί μοντέλο μελέτης του ΣΑ για ασθενείς με ανάλογες μεταλλάξεις σε σύνθετη ετεροζυγωτία (Voskarides et al., 2007, Savige et al., 2016, Zhang et al., 2019, Zhao et al., 2019). Η COL4A3-G1334E μετάλλαξη διακόπτει τις Gly-X-Y επαναλήψεις στο κολλαγονικό τμήμα του α3α4α5(IV) τριμερούς. Ανάλογες μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί στο COL4A5 (Plant et al., 1999, Weber et al., 2016, Zhang et al., 2018). Υπάρχουν ενδείξεις ότι παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στο COL4A5 που εντοπίζονται κοντά στο καρβοξυτελικό τμήμα του μορίου και αφορούν αντικαταστάσεις γλυκίνης, είναι πιο σοβαρές από αυτές που εντοπίζονται κοντά στο αμινοτελικό τμήμα του (Gross et al., 2002).

Και τα δύο μοντέλα ποντικού που περιγράφουμε παρουσιάζουν μειωμένη διάρκεια ζωής συγκριτικά με τα wild type κατά 30-35%, οφειλόμενη πιθανότατα σε επηρεασμένη νεφρική λειτουργία. Παρόμοια προχωρημένη ηλικία εγκατάστασης ΤΣΧΝΑ έχει περιγραφεί και στο παρελθόν σε ανθρώπους ομοζυγώτες ή σύνθετους ετεροζυγώτες για παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στα *COL4A3/COL4A4* γονίδια (Savigne et al., 2016). Η επηρεασμένη νεφρική λειτουργία οδηγεί σε διαταραχή βιοχημικών παραμέτρων στον ορό των ποντικών και συγκεκριμένα σε αυξημένα επίπεδα ουρίας και κρεατινίνης. Όπως και σε άλλα μοντέλα ποντικού με ΣΑ (Rheault et al., 2004, Falcone et al., 2019, Hashikami et al., 2019) παρατηρείται ευρεία διακύμανση στις τιμές ουρίας και κρεατινίνης ορού ανάμεσα στα μεταλλαγμένα ποντίκια. Είναι σημαντικό να αναφερθεί όμως ότι σε κάποια ποντίκια τα επίπεδα των παραμέτρων αυτών είναι ιδιαίτερα υψηλά, παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στα knockout *Col4a3* *-/-* ποντίκια. Σε αυτά ακριβώς τα ποντίκια μάλιστα παρατηρούνται και οι πλέον σοβαρές ιστολογικές βλάβες.

Τα ευρήματα στα ούρα που συνοδεύουν το ΣΑ είναι η αιματοουρία και η πρωτεϊνουρία. Η μικροσκοπική αιματοουρία στα μεταλλαγμένα ποντίκια είναι διαλείπουσα και δεν αποτελεί ένα από τα πρωταρχικά ευρήματα. Αξίζει να αναφερθεί ότι δεν περιγράφεται αιματοουρία και στο knockout *Col4a3* *-/-* μοντέλο που περιγράφηκε από τον Cosgrove (Cosgrove et al., 1996). Αντίθετα, αλβουμινουρία εντοπίζεται και στα δύο μεταλλαγμένα μοντέλα ποντικού. Αν και παρατηρείται και πάλι διακύμανση στα επίπεδά της, η παρουσία της αλβουμινουρίας αντανακλά στον επηρεασμένο ΦΣΔ και υποδηλώνει ότι η παρουσία της παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης ανεξάρτητα από το αν συνοδεύεται από το knocked out αλληλόμορφο ή όχι, είναι ικανή να επηρεάσει την ομαλή σπειραματική διήθηση. Το γεγονός ότι στα ποντίκια αυτά δεν είχε επιδιωχθεί απόλυτη αιμομιξία στο συγκεκριμένο γενετικό υπόβαθρο (incipient congenic), θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη σχετική διακύμανση που παρατηρείται στη σοβαρότητα των βιοχημικών παραμέτρων και των δεικτών ιστολογικής βλάβης.

Ιστολογικά, σε επίπεδο μελετών με το ΗΜ, η παρουσία των χαρακτηριστικών και παθογνωμονικών ευρημάτων της ΣΒΜ με τη συνοδό σύντηξη των ποδοειδών προσεκβολών, αποτελούν την πλέον αξιόπιστη απόδειξη ότι τόσο το *Col4a3* *mut/mut* μοντέλο όσο και το σύνθετο ετερόζυγο *Col4a3* *mut/-* αποτελούν αντιπροσωπευτικά μοντέλα του ΣΑ. Σε επίπεδο οπτικού μικροσκοπίου, η σπειραματική ίνωση και η ίνωση του διάμεσου ιστού αποτελούν και αυτά ευρήματα πιο προχωρημένης ηλικίας των δύο μοντέλων και αποδίδονται στη χρόνια σπειραματοπάθεια, χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί και η συμβολή της μειωμένης έκφρασης του α3α4α5(IV) στη βασική

μεμβράνη των σωληναρίων στην προαγωγή της διαδικασίας της ίνωσης. Ευρήματα ΕΤΣΣ είναι και αυτά εμφανή. Σε συνοχή με τα πιο πάνω ευρήματα αυξημένης ίνωσης είναι και η αύξηση της έκφρασης των προϊνωτικών παραγόντων TGF- $\beta$ 1 και Acta2.

Κατά την περιγραφή των δύο μοντέλων ποντικού με ΣΑ, ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλούν τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοφθορισμού σε τομές νεφρικού ιστού. Συγκεκριμένα, η έκφραση και των τριών  $\alpha$  αλυσίδων στη ΣΒΜ δεν παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στα μεταλλαγμένα και τα wild type ποντίκια, αλλά αντίθετα στη βασική μεμβράνη των σωληναρίων, η έκφραση και των τριών  $\alpha$  αλυσίδων εμφανίζεται σημαντικά μειωμένη. Η παρουσία της τριμερούς έλικας στη ΣΒΜ έχει περιγραφεί ξανά σε προηγούμενο μοντέλο ποντικού με ΣΑ και σημειακή μετάλλαξη στο *Col4a4* (Korstanje et al., 2014), που οδηγεί σε απώλεια του εξονίου 30 αλλά χωρίς μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης του mRNA. Σημειακές μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικατάσταση γλυκίνης μπορεί να οδηγούν σε επιτυχή έκκριση του μεταλλαγμένου  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(IV)$  πρωτομερούς στη ΣΒΜ (Kashtan et al., 1996, Naito et al., 1996, Nakanishi et al., 1994, Gubler, 2008, Gubler et al., 1995), αν και μερικές φορές συνοδεύονται από ανεπιτυχή έκκρισή του και απουσία του από τη ΣΒΜ (Zhang et al., 2012, Jais et al., 2000, Jais et al., 2003, Gross et al., 2002, Bekheirnia et al., 2010).

Επακόλουθα πειράματα με ανοσοαποτύπωση κατά Western, σε συνεργασία με τον Δρ Οδιάτη, έδειξαν ότι οι  $\alpha$  αλυσίδες του  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(IV)$  πιθανώς υπόκεινται σε ειδική διάσπαση κοντά στην περιοχή της Gly1332Glu αντικατάστασης, απελευθερώνοντας τμήμα μεγέθους 35kDa από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι το 35kDa τμήμα παρατηρείται μόνο σε εκχυλίσματα από σπειράματα μεταλλαγμένων ποντικών και όχι σε εκχυλίσματα από ολικό νεφρό, από τον οποίο η πρωτεΐνη που απομονώνεται είναι κυρίως σωληναριακής προέλευσης. Αυτό υποδεικνύει ότι τα ποδοκύτταρα από το σπείραμα και τα σωληναριακά κύτταρα, ανταποκρίνονται διαφορετικά στην παρουσία της μετάλλαξης, ένα φαινόμενο που αξίζει σίγουρα περαιτέρω διερεύνησης. Η εντόπιση της Col4a3 στη ΣΒΜ στις μελέτες ανοσοφθορισμού πιθανώς να αφορά στην παρουσία στη ΣΒΜ του 35kDa τμήματος, αφού το anti-Col4a3 αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίζει το NC1 τμήμα της  $\alpha 3$  αλυσίδας, το οποίο αποτελεί τμήμα του 35kDa τμήματος και εντοπίζεται λίγο μετά την Gly1332Glu αντικατάσταση (εικόνα 19). Πιθανότατα η ειδική αυτή διάσπαση να εκτελείται μετά τη δημιουργία της τριμερούς έλικας, ίσως λόγω της προκαλούμενης τοπικής ελαττωματικής αναδίπλωσης της πρωτεΐνης. Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι το 35kDa τμήμα εντοπίζεται σε πειραματικά εκχυλίσματα από μεταλλαγμένα ποντίκια, όχι μόνο για τη μεταλλαγμένη  $\alpha 3$

αλυσίδα αλλά και μετά από τη χρήση αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το NC1 τμήμα και των α4 και α5 αλυσίδων. Επιπρόσθετα, με τη χρήση του anti-Col4a3 αντισώματος σε πειραματικά εκχυλίσματα από μεταλλαγμένα ποντίκια, το οποίο αναγνωρίζει το κολλαγονικό τμήμα (CD) του μορίου, δεν αναγνωρίζεται κανένα πρωτεϊνικό τμήμα στα 125kDa (στο μέγεθος δηλαδή που θα ανέμενε κανείς να εντοπίσει το μεγάλο αμινοτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης μετά την ενζυμική διάσπασή της). Αναγνωρίζονται μόνο μειωμένα επίπεδα του πλήρους μήκους της Col4a3 πρωτεΐνης στα 160kDa, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μεγάλο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης που έχει διασπαστεί (μεγέθους 125kDa), αποδομείται γρήγορα στη ΣΒΜ, πιθανώς με τη δράση μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης. Το μεγάλο αμινοτελικό τμήμα είναι λιγότερο ανθεκτικό, είτε λόγω θερμοαστάθειας, είτε λόγω περισσότερων προσβάσιμων σημείων δράσης για τις πρωτεϊνάσες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα της εντόπισης της 63kDa ενεργού μορφής της μεταλλοπρωτεϊνάσης 9 (MMP-9) στα πειράματα των knockin ποντικών κοντά στην ηλικία στην οποία αρχίζει να εντοπίζεται το πρωτεϊνικό τμήμα των 35kDa. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό για το ότι η διάσπαση του κολλαγονικού μορίου μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δράσης της MMP-9. Μία πιθανή εξήγηση για το ότι τα επίπεδα της MMP-9 παραμένουν σταθερά, ενώ τα επίπεδα του 35kDa τμήματος αυξάνουν με την ηλικία των knockin ποντικών, είναι η πιθανή παρατεταμένη συσσώρευση των 35kDa τμημάτων στη ΣΒΜ λόγω της μακράς ημίσειας ζωής του κολλαγόνου τύπου IV, η οποία είναι πέραν των 100 ημερών (Price and Spiro, 1977). Ανάμεσα στην πληθώρα των μεταλλοπρωτεϊναισών που εκφράζονται στο νεφρό, η MMP-9 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγγένεια (affinity) με το Col4a3 και θεωρείται το πιο αποτελεσματικό ένζυμο στην αποκοπή της tumstatin (Hamano et al., 2003). Η tumstatin μεγέθους 28kDa αποτελεί τη βιοενεργό μορφή του NC1 τμήματος του Col4a3 και διασπάται μέσω της δράσης της MMP-9. Δρα αναστέλλοντας την αγγειογένεση ή ως προαποπτωτικός παράγοντας (Hamano et al., 2003, Petitclerc et al., 2000). Η MMP-12, της οποίας η έκφραση βρέθηκε να είναι αυξημένη σε Col4a3 knockout ποντίκια (Rao et al., 2006), δεν βρέθηκε να είναι επηρεασμένη στα knockin ποντίκια, όπως παρόμοια δεν ήταν επηρεασμένη και η έκφραση των MMP-2 και MMP-3.

Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η προχωρημένη ηλικία εμφάνισης κλινικής νόσου στα μεταλλαγμένα ποντίκια συνδέεται σε κάποιο βαθμό με την προοδευτική αύξηση των επιπέδων του 35kDa τμήματος με την αύξηση της ηλικίας. Θα μπορούσε δηλαδή η εμφανιζόμενη βλάβη να μην οφείλεται μόνο στην απουσία του υγιούς κολλαγονικού

δικτύου από τη ΣΒΜ αλλά και στην προοδευτικά αυξανόμενη συγκέντρωση κολλαγονικών πρωτεϊνικών τεμαχίων στη ΣΒΜ που δυνητικά επηρεάζουν την ακεραιότητά της. Από την άλλη, η καλοηθέστερη πορεία που ακολουθούν τα *Col4a3* mut/mut και τα *Col4a3* mut/- ποντίκια συγκριτικά με τα knockout *Col4a3* -/-, πιθανώς να υποδηλώνει ότι η παρουσία ενός ελαττωματικού κολλαγονικού δικτύου στη ΣΒΜ γίνεται καλύτερα ανεκτή από την πλήρη απουσία του και “σώζει” μερικώς τον φαινότυπο. Σε αυτή την υπόθεση βασίζεται η σκέψη για θεραπευτική χορήγηση συνθετικών chaperones (Pieri et al., 2014), με στόχο την πιο αποτελεσματική αναδίπλωση και έκκριση του ελαττωματικού τριμερούς στη ΣΒΜ. Η χρήση των συνθετικών chaperones ως θεραπεία για τα *Col4a3* mut/mut και τα *Col4a3* mut/- ποντίκια βρίσκεται υπό μελέτη στο ΚΕΜΙ και τα αρχικά αποτελέσματα φαίνεται να είναι ενθαρρυντικά.



## Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, το ΣΑ αποτελεί νόσο η οποία επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση αλλά και την ποιότητα ζωής των πασχόντων και η ανάγκη για ανεύρεση θεραπείας προβάλλει επιτακτική. Η αναγνώριση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που πλαισιώνουν το σύνδρομο κρίνεται αναγκαία, ώστε ακολούθως να αναγνωριστούν μοριακοί ή κυτταρικοί θεραπευτικοί στόχοι. Μελέτες στον άνθρωπο μπορούν να οδηγήσουν στην αναγνώριση χρήσιμων διαγνωστικών ή/και προγνωστικών βιοδεικτών, σε επίπεδο τροποποιητικών γονιδίων, microRNAs, πρεοτεομικής και μεταβολομικής. Μελέτες στα ποντίκια επιτρέπουν την εις βάθος μελέτη των μοριακών μηχανισμών που συνοδεύουν το κάθε είδος μετάλλαξης σε αυτή την ευρέως γενετικά ετερογενή νόσο και στη χορήγηση στοχευόμενων θεραπειών. Ο κατά το δυνατόν πληρέστερος χαρακτηρισμός τόσο των ζωικών μοντέλων όσο και των ομάδων ανθρώπων ασθενών κρίνεται απαραίτητος για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων από τις μελέτες αυτές. Στο πλαίσιο εκπόνησης της διατριβής αυτής, έγινε προσπάθεια για αναλυτική περιγραφή δύο ζωικών μοντέλων με ΣΑ που φέρουν τη σημειακή παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη *Col4a3*-Gly1332Glu, το ένα σε ομοζυγία και το άλλο σε σύνθετη ετεροζυγία με το *knocked out* αλληλόμορφο. Η μετάλλαξη αυτή είναι ομόλογη της συχνότερης μετάλλαξης που παρατηρείται ανάμεσα στους Κύπριους ετεροζυγώτες φορείς μεταλλάξεων στα *COL4A3*/*COL4A4*. Αποτελεί την πρώτη λεπτομερή περιγραφή ενός *knockin* μοντέλου ποντικού για το ΣΑ στη βιβλιογραφία. Παράλληλα, έγινε στρατολόγηση ανθρώπων ασθενών με ΝΑΒΜ, λεπτομερής κλινικο-εργαστηριακός χαρακτηρισμός τους και καθορισμός του σταδίου σοβαρότητας της νόσου τους, με συνοδό συλλογή βιολογικού υλικού. Το υλικό αυτό φυλάχθηκε στη Βιοτράπεζα του Πανεπιστημίου Κύπρου και ήδη χρησιμοποιείται σε μελέτες που τρέχουν παράλληλα, στην προσπάθεια για εντόπιση τροποποιητικών γονιδίων και βιοδεικτών για τη νόσο. Η συνεργασία κλινικών ιατρών και εργαστηριακών ερευνητών κρίνεται απαραίτητη για την ευόδωση του κοινού στόχου, που είναι η παροχή στοχευόμενης, ασφαλούς και αποτελεσματικής θεραπείας στον πάσχοντα από παθήσεις του κολλαγόνου τύπου IV.

## Βιβλιογραφικές Αναφορές

- ABRAHAMSON, D. R., HUDSON, B. G., STROGANOVA, L., BORZA, D. B. & ST JOHN, P. L. 2009. Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1471-9.
- ANDREWS, K. L., MUDD, J. L., LI, C. & MINER, J. H. 2002. Quantitative trait loci influence renal disease progression in a mouse model of Alport syndrome. *Am J Pathol*, 160, 721-30.
- ARNOLD, C. N., XIA, Y., LIN, P., ROSS, C., SCHWANDER, M., SMART, N. G., MULLER, U. & BEUTLER, B. 2011. Rapid identification of a disease allele in mouse through whole genome sequencing and bulk segregation analysis. *Genetics*, 187, 633-41.
- ATHANASIOU, Y., VOSKARIDES, K., GALE, D. P., DAMIANOU, L., PATSIAS, C., ZAVROS, M., MAXWELL, P. H., COOK, H. T., DEMOSTHENOUS, P., HADJISAVVAS, A., KYRIACOU, K., ZOUVANI, I., PIERIDES, A. & DELTAS, C. 2011. Familial C3 glomerulopathy associated with CFHR5 mutations: clinical characteristics of 91 patients in 16 pedigrees. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6, 1436-46.
- BEIROWSKI, B., WEBER, M. & GROSS, O. 2006. Chronic renal failure and shortened lifespan in COL4A3<sup>+/-</sup> mice: an animal model for thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1986-94.
- BEKHEIRNIA, M. R., REED, B., GREGORY, M. C., MCFANN, K., SHAMSHIRSAZ, A. A., MASOUMI, A. & SCHRIER, R. W. 2010. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 21, 876-83.
- COSGROVE, D. 2012. Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective. *Pediatr Nephrol*, 27, 885-90.
- COSGROVE, D., KALLURI, R., MINER, J. H., SEGAL, Y. & BORZA, D. B. 2007. Choosing a mouse model to study the molecular pathobiology of Alport glomerulonephritis. *Kidney Int*, 71, 615-8.
- COSGROVE, D., MEEHAN, D. T., GRUNKEMEYER, J. A., KORNAK, J. M., SAYERS, R., HUNTER, W. J. & SAMUELSON, G. C. 1996. Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes Dev*, 10, 2981-92.
- COSGROVE, D., RODGERS, K., MEEHAN, D., MILLER, C., BOVARD, K., GILROY, A., GARDNER, H., KOTELIANSKI, V., GOTWALS, P., AMATUCCI, A. & KALLURI, R. 2000. Integrin alpha1beta1 and transforming growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol*, 157, 1649-59.
- COSGROVE, D., SAMUELSON, G., MEEHAN, D. T., MILLER, C., MCGEE, J., WALSH, E. J. & SIEGEL, M. 1998. Ultrastructural, physiological, and molecular defects in the inner ear of a gene-knockout mouse model for autosomal Alport syndrome. *Hear Res*, 121, 84-98.
- DELTAS, C. 2018. Digenic inheritance and genetic modifiers. *Clin Genet*, 93, 429-438.
- DELTAS, C., PIERIDES, A. & VOSKARIDES, K. 2012. The role of molecular genetics in diagnosing familial hematuria(s). *Pediatr Nephrol*, 27, 1221-31.
- DELTAS, C., PIERIDES, A. & VOSKARIDES, K. 2013. Molecular genetics of familial hematuric diseases. *Nephrol Dial Transplant*, 28, 2946-60.
- DUFEK, B., MEEHAN, D. T., DELIMONT, D., CHEUNG, L., GRATTON, M. A., PHILLIPS, G., SONG, W., LIU, S. & COSGROVE, D. 2016. Endothelin A receptor activation on mesangial cells initiates Alport glomerular disease. *Kidney Int*, 90, 300-310.
- FALCONE, S., WISBY, L., NICOL, T., BLEASE, A., STARBUCK, B., PARKER, A., SANDERSON, J., BROWN, S. D. M., SCUDAMORE, C. L., PUSEY, C. D., TAM, F. W. K. & POTTER, P. K. 2019. Modification of an aggressive model of Alport Syndrome reveals early differences in disease pathogenesis due to genetic background. *Sci Rep*, 9, 20398.
- FALLERINI, C., DOSA, L., TITA, R., DEL PRETE, D., FERIOZZI, S., GAI, G., CLEMENTI, M., LA MANNA, A., MIGLIETTI, N., MANCINI, R., MANDRILE, G., GHIGGERI, G. M., PIAGGIO, G., BRANCATI, F., DIANO, L., FRATE, E., PINCIAROLI, A. R., GIANI, M., CASTORINA, P., BRESIN, E., GIACHINO, D., DE MARCHI, M., MARI, F., BRUTTINI, M., RENIERI, A. & ARIANI, F. 2014. Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases. *Clin Genet*, 86, 252-7.

- FOGO, A. B. 2015. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Rev Nephrol*, 11, 76-87.
- FOSTER, K., MARKOWITZ, G. S. & D'AGATI, V. D. 2005. Pathology of thin basement membrane nephropathy. *Semin Nephrol*, 25, 149-58.
- GOMEZ, I. G., MACKENNA, D. A., JOHNSON, B. G., KAIMAL, V., ROACH, A. M., REN, S., NAKAGAWA, N., XIN, C., NEWITT, R., PANDYA, S., XIA, T. H., LIU, X., BORZA, D. B., GRAFALS, M., SHANKLAND, S. J., HIMMELFARB, J., PORTILLA, D., LIU, S., CHAU, B. N. & DUFFIELD, J. S. 2015. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest*, 125, 141-56.
- GREGORY, M. C. 2005. The clinical features of thin basement membrane nephropathy. *Semin Nephrol*, 25, 140-5.
- GROSS, O., BORZA, D. B., ANDERS, H. J., LICHT, C., WEBER, M., SEGERER, S., TORRA, R., GUBLER, M. C., HEIDET, L., HARVEY, S., COSGROVE, D., LEES, G., KASHTAN, C., GREGORY, M., SAVIGE, J., DING, J., THORNER, P., ABRAHAMSON, D. R., ANTIGNAC, C., TRYGGVASON, K., HUDSON, B. & MINER, J. H. 2009. Stem cell therapy for Alport syndrome: the hope beyond the hype. *Nephrol Dial Transplant*, 24, 731-4.
- GROSS, O., FRIEDE, T., HILGERS, R., GORLITZ, A., GAVENIS, K., AHMED, R. & DURR, U. 2012. Safety and Efficacy of the ACE-Inhibitor Ramipril in Alport Syndrome: The Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III EARLY PRO-TTECT Alport Trial in Pediatric Patients. *ISRN Pediatr*, 2012, 436046.
- GROSS, O. & KASHTAN, C. E. 2009. Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. *Kidney Int*, 76, 599-603.
- GROSS, O., KOEPKE, M. L., BEIROWSKI, B., SCHULZE-LOHOFF, E., SEGERER, S. & WEBER, M. 2005. Nephroprotection by antifibrotic and anti-inflammatory effects of the vasopeptidase inhibitor AVE7688. *Kidney Int*, 68, 456-63.
- GROSS, O., NETZER, K. O., LAMBRECHT, R., SEIBOLD, S. & WEBER, M. 2002. Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant*, 17, 1218-27.
- GROSS, O., PERIN, L. & DELTAS, C. 2014. Alport syndrome from bench to bedside: the potential of current treatment beyond RAAS blockade and the horizon of future therapies. *Nephrol Dial Transplant*, 29 Suppl 4, iv124-30.
- GROSS, O., TONSHOFF, B., WEBER, L. T., PAPE, L., LATTA, K., FEHRENBACH, H., LANGE-SPERANDIO, B., ZAPPEL, H., HOYER, P., STAUDE, H., KONIG, S., JOHN, U., GELLERMANN, J., HOPPE, B., GALIANO, M., HOECKER, B., EHREN, R., LERCH, C., KASHTAN, C. E., HARDEN, M., BOECKHAUS, J., FRIEDE, T., GERMAN PEDIATRIC NEPHROLOGY STUDY, G. & INVESTIGATORS, E. P.-T. A. 2020. A multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind phase 3 trial with open-arm comparison indicates safety and efficacy of nephroprotective therapy with ramipril in children with Alport's syndrome. *Kidney Int*, 97, 1275-1286.
- GUBLER, M. C. 2008. Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol*, 4, 24-37.
- GUBLER, M. C., KNEBELMANN, B., BEZIAU, A., BROYER, M., PIRSON, Y., HADDOUM, F., KLEPPEL, M. M. & ANTIGNAC, C. 1995. Autosomal recessive Alport syndrome: immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. *Kidney Int*, 47, 1142-7.
- HAMANO, Y., ZEISBERG, M., SUGIMOTO, H., LIVELY, J. C., MAESHIMA, Y., YANG, C., HYNES, R. O., WERB, Z., SUDHAKAR, A. & KALLURI, R. 2003. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell*, 3, 589-601.
- HASHIKAMI, K., ASAHINA, M., NOZU, K., IJIMA, K., NAGATA, M. & TAKEYAMA, M. 2019. Establishment of X-linked Alport syndrome model mice with a Col4a5 R471X mutation. *Biochem Biophys Rep*, 17, 81-86.

- HEIDET, L., ARRONDEL, C., FORESTIER, L., COHEN-SOLAL, L., MOLLET, G., GUTIERREZ, B., STAVROU, C., GUBLER, M. C. & ANTIGNAC, C. 2001. Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 12, 97-106.
- HEIDET, L., CAI, Y., GUICHARNAUD, L., ANTIGNAC, C. & GUBLER, M. C. 2000. Glomerular expression of type IV collagen chains in normal and X-linked Alport syndrome kidneys. *Am J Pathol*, 156, 1901-10.
- HEIDET, L. & GUBLER, M. C. 2009. The renal lesions of Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1210-5.
- HEIKKILA, P., TRYGGVASON, K. & THORNER, P. 2000. Animal models of Alport syndrome: advancing the prospects for effective human gene therapy. *Exp Nephrol*, 8, 1-7.
- HERTZ, J. M., THOMASSEN, M., STOREY, H. & FLINTER, F. 2012. Clinical utility gene card for: Alport syndrome. *Eur J Hum Genet*, 20.
- HOEFELE, J., LANGE-SPERANDIO, B., RUESSMANN, D., GLOCKNER-PAGEL, J., ALBERER, M., BENZ, M. R., NAGEL, M. & WEBER, L. T. 2010. Novel heterozygous COL4A3 mutation in a family with late-onset ESRD. *Pediatr Nephrol*, 25, 1539-42.
- INA, K., KITAMURA, H., TATSUKAWA, S. & FUJIKURA, Y. 2011. Significance of alpha-SMA in myofibroblasts emerging in renal tubulointerstitial fibrosis. *Histol Histopathol*, 26, 855-66.
- JAIS, J. P., KNEBELMANN, B., GIATRAS, I., DE MARCHI, M., RIZZONI, G., RENIERI, A., WEBER, M., GROSS, O., NETZER, K. O., FLINTER, F., PIRSON, Y., DAHAN, K., WIESLANDER, J., PERSSON, U., TRYGGVASON, K., MARTIN, P., HERTZ, J. M., SCHRODER, C., SANAK, M., CARVALHO, M. F., SAUS, J., ANTIGNAC, C., SMEETS, H. & GUBLER, M. C. 2003. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol*, 14, 2603-10.
- JAIS, J. P., KNEBELMANN, B., GIATRAS, I., DE MARCHI, M., RIZZONI, G., RENIERI, A., WEBER, M., GROSS, O., NETZER, K. O., FLINTER, F., PIRSON, Y., VERELLEN, C., WIESLANDER, J., PERSSON, U., TRYGGVASON, K., MARTIN, P., HERTZ, J. M., SCHRODER, C., SANAK, M., KREJCOVA, S., CARVALHO, M. F., SAUS, J., ANTIGNAC, C., SMEETS, H. & GUBLER, M. C. 2000. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol*, 11, 649-57.
- KADLER, K. E., BALDOCK, C., BELLA, J. & BOOT-HANDFORD, R. P. 2007. Collagens at a glance. *J Cell Sci*, 120, 1955-8.
- KALLURI, R., SHIELD, C. F., TODD, P., HUDSON, B. G. & NEILSON, E. G. 1997. Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest*, 99, 2470-8.
- KANG, J. S., WANG, X. P., MINER, J. H., MORELLO, R., SADO, Y., ABRAHAMSON, D. R. & BORZA, D. B. 2006. Loss of alpha3/alpha4(IV) collagen from the glomerular basement membrane induces a strain-dependent isoform switch to alpha5alpha6(IV) collagen associated with longer renal survival in Col4a3<sup>-/-</sup> Alport mice. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1962-9.
- KASHTAN, C. E. & KIM, Y. 1992. Distribution of the alpha 1 and alpha 2 chains of collagen IV and of collagens V and VI in Alport syndrome. *Kidney Int*, 42, 115-26.
- KASHTAN, C. E., KLEPPEL, M. M. & GUBLER, M. C. 1996. Immunohistologic findings in Alport syndrome. *Contrib Nephrol*, 117, 142-53.
- KASHTAN, C. E. & MICHAEL, A. F. 1996. Alport syndrome. *Kidney Int*, 50, 1445-63.
- KATAYAMA, K., KAWANO, M., NAITO, I., ISHIKAWA, H., SADO, Y., ASAKAWA, N., MURATA, T., OOSUGI, K., KIYOHARA, M., ISHIKAWA, E., ITO, M. & NOMURA, S. 2008. Irradiation prolongs survival of Alport mice. *J Am Soc Nephrol*, 19, 1692-700.
- KHARRAT, M., MAKNI, S., MAKNI, K., KAMMOUN, K., CHARFEDDINE, K., AZAEIZ, H., JARRAYA, F., BEN HMIDA, M., GUBLER, M. C., AYADI, H. & HACHICHA, J. 2006. Autosomal dominant Alport's syndrome: study of a large Tunisian family. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 17, 320-5.
- KHOSHNOODI, J., PEDCHENKO, V. & HUDSON, B. G. 2008. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech*, 71, 357-70.

- KOEPKE, M. L., WEBER, M., SCHULZE-LOHOFF, E., BEIROWSKI, B., SEGERER, S. & GROSS, O. 2007. Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 22, 1062-9.
- KORSTANJE, R., CAPUTO, C. R., DOTY, R. A., COOK, S. A., BRONSON, R. T., DAVISSON, M. T. & MINER, J. H. 2014. A mouse Col4a4 mutation causing Alport glomerulosclerosis with abnormal collagen alpha3alpha4alpha5(IV) trimers. *Kidney Int*, 85, 1461-8.
- KRUEGEL, J., RUBEL, D. & GROSS, O. 2013. Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nat Rev Nephrol*, 9, 170-8.
- LEMMINK, H. H., MOCHIZUKI, T., VAN DEN HEUVEL, L. P., SCHRODER, C. H., BARRIENTOS, A., MONNENS, L. A., VAN OOST, B. A., BRUNNER, H. G., REEDERS, S. T. & SMEETS, H. J. 1994. Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Hum Mol Genet*, 3, 1269-73.
- LIAPIS, H. 2014. Renal Pathology: SC23-1 ROLE OF NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) IN THE DIAGNOSIS OF HEREDITARY RENAL DISEASE. *Pathology*, 46 Suppl 2, S39-40.
- LONGO, I., PORCEDDA, P., MARI, F., GIACHINO, D., MELONI, I., DEPLANO, C., BRUSCO, A., BOSIO, M., MASSELLA, L., LA VORATTI, G., ROCCATELLO, D., FRASCA, G., MAZZUCCO, G., MUDA, A. O., CONTI, M., FASCIOLO, F., ARRONDEL, C., HEIDET, L., RENIERI, A. & DE MARCHI, M. 2002. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int*, 61, 1947-56.
- LU, W., PHILLIPS, C. L., KILLEN, P. D., HLAING, T., HARRISON, W. R., ELDER, F. F., MINER, J. H., OVERBEEK, P. A. & MEISLER, M. H. 1999. Insertional mutation of the collagen genes Col4a3 and Col4a4 in a mouse model of Alport syndrome. *Genomics*, 61, 113-24.
- MARCOCCI, E., ULIANA, V., BRUTTINI, M., ARTUSO, R., SILENGO, M. C., ZERIAL, M., BERGESIO, F., AMOROSO, A., SAVOLDI, S., PENNESI, M., GIACHINO, D., ROMBOLA, G., FOGAZZI, G. B., ROSATELLI, C., MARTINHAGO, C. D., CARMELLINI, M., MANCINI, R., DI COSTANZO, G., LONGO, I., RENIERI, A. & MARI, F. 2009. Autosomal dominant Alport syndrome: molecular analysis of the COL4A4 gene and clinical outcome. *Nephrol Dial Transplant*, 24, 1464-71.
- MARTIN, P., HEISKARI, N., ZHOU, J., LEINONEN, A., TUMELIUS, T., HERTZ, J. M., BARKER, D., GREGORY, M., ATKIN, C., STYRKARSDOTTIR, U., NEUMANN, H., SPRINGATE, J., SHOWS, T., PETTERSSON, E. & TRYGGVASON, K. 1998. High mutation detection rate in the COL4A5 collagen gene in suspected Alport syndrome using PCR and direct DNA sequencing. *J Am Soc Nephrol*, 9, 2291-301.
- MENCARELLI, M. A., HEIDET, L., STOREY, H., VAN GEEL, M., KNEBELMANN, B., FALLERINI, C., MIGLIETTI, N., ANTONUCCI, M. F., CETTA, F., SAYER, J. A., VAN DEN WIJNGAARD, A., YAU, S., MARI, F., BRUTTINI, M., ARIANI, F., DAHAN, K., SMEETS, B., ANTIGNAC, C., FLINTER, F. & RENIERI, A. 2015. Evidence of digenic inheritance in Alport syndrome. *J Med Genet*, 52, 163-74.
- MINER, J. H. 2012. The glomerular basement membrane. *Exp Cell Res*, 318, 973-8.
- MINER, J. H. & SANES, J. R. 1996. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J Cell Biol*, 135, 1403-13.
- MOCHIZUKI, T., LEMMINK, H. H., MARIYAMA, M., ANTIGNAC, C., GUBLER, M. C., PIRSON, Y., VERELLEN-DUMOULIN, C., CHAN, B., SCHRODER, C. H., SMEETS, H. J. & ET AL. 1994. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet*, 8, 77-81.
- NAITO, I., KAWAI, S., NOMURA, S., SADO, Y. & OSAWA, G. 1996. Relationship between COL4A5 gene mutation and distribution of type IV collagen in male X-linked Alport syndrome. Japanese Alport Network. *Kidney Int*, 50, 304-11.
- NAKANISHI, K., YOSHIKAWA, N., IJIMA, K., KITAGAWA, K., NAKAMURA, H., ITO, H., YOSHIOKA, K., KAGAWA, M. & SADO, Y. 1994. Immunohistochemical study of alpha 1-5 chains of type IV collagen in hereditary nephritis. *Kidney Int*, 46, 1413-21.
- NINICHUK, V., GROSS, O., REICHEL, C., KHANDOGA, A., PAWAR, R. D., CIUBAR, R., SEGERER, S., BELEMEZOVA, E., RADOMSKA, E., LUCKOW, B., PEREZ DE LEMA, G., MURPHY, P. M., GAO,

- J. L., HENGER, A., KRETZLER, M., HORUK, R., WEBER, M., KROMBACH, F., SCHLONDORFF, D. & ANDERS, H. J. 2005. Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease. *J Am Soc Nephrol*, 16, 977-85.
- NINICHUK, V., GROSS, O., SEGERER, S., HOFFMANN, R., RADOMSKA, E., BUCHSTALLER, A., HUSS, R., AKIS, N., SCHLONDORFF, D. & ANDERS, H. J. 2006. Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int*, 70, 121-9.
- OMACHI, K. & MINER, J. H. 2019. Alport Syndrome Therapeutics: Ready for Prime-Time Players. *Trends Pharmacol Sci*, 40, 803-806.
- PAPAZACHARIOU, L., DEMOSTHENOUS, P., PIERI, M., PAPAGREGORIOU, G., SAVVA, I., STAVROU, C., ZAVROS, M., ATHANASIOU, Y., IOANNOU, K., PATSIAS, C., PANAGIDES, A., POTAMITIS, C., DEMETRIOU, K., PRIKIS, M., HADJIGAVRIEL, M., KKOLOU, M., LOUKAIDOU, P., PASTELLI, A., MICHAEL, A., LAZAROU, A., ARSALI, M., DAMIANOU, L., GOUTZIAMANI, I., SOLOUKIDES, A., YIOUKAS, L., ELIA, A., ZOUVANI, I., POLYCARPOU, P., PIERIDES, A., VOSKARIDES, K. & DELTAS, C. 2014. Frequency of COL4A3/COL4A4 mutations amongst families segregating glomerular microscopic hematuria and evidence for activation of the unfolded protein response. Focal and segmental glomerulosclerosis is a frequent development during ageing. *PLoS One*, 9, e115015.
- PERGOLA, P. E., RASKIN, P., TOTO, R. D., MEYER, C. J., HUFF, J. W., GROSSMAN, E. B., KRAUTH, M., RUIZ, S., AUDHYA, P., CHRIST-SCHMIDT, H., WITTES, J., WARNOCK, D. G. & INVESTIGATORS, B. S. 2011. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 365, 327-36.
- PESCUCCI, C., MARI, F., LONGO, I., VOGIATZI, P., CASELLI, R., SCALA, E., ABATERUSSO, C., GUSMANO, R., SERI, M., MIGLIETTI, N., BRESIN, E. & RENIERI, A. 2004. Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene. *Kidney Int*, 65, 1598-603.
- PETITCLERC, E., BOUTAUD, A., PRESTAYKO, A., XU, J., SADO, Y., NINOMIYA, Y., SARRAS, M. P., JR., HUDSON, B. G. & BROOKS, P. C. 2000. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Biol Chem*, 275, 8051-61.
- PIERI, M., STEFANO, C., ZARAVINOS, A., ERGULER, K., STYLIANO, K., LAPATHITIS, G., KARAIKOS, C., SAVVA, I., PARASKEVA, R., DWEEP, H., STICHT, C., ANASTASIADOU, N., ZOUVANI, I., GOUMENOS, D., FELEKKIS, K., SALEEM, M., VOSKARIDES, K., GRETZ, N. & DELTAS, C. 2014. Evidence for activation of the unfolded protein response in collagen IV nephropathies. *J Am Soc Nephrol*, 25, 260-75.
- PIERIDES, A., VOSKARIDES, K., ATHANASIOU, Y., IOANNOU, K., DAMIANOU, L., ARSALI, M., ZAVROS, M., PIERIDES, M., VARGEMEZIS, V., PATSIAS, C., ZOUVANI, I., ELIA, A., KYRIACOU, K. & DELTAS, C. 2009. Clinico-pathological correlations in 127 patients in 11 large pedigrees, segregating one of three heterozygous mutations in the COL4A3/ COL4A4 genes associated with familial haematuria and significant late progression to proteinuria and chronic kidney disease from focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 24, 2721-9.
- PLANT, K. E., GREEN, P. M., VETRIE, D. & FLINTER, F. A. 1999. Detection of mutations in COL4A5 in patients with Alport syndrome. *Hum Mutat*, 13, 124-32.
- POSCHL, E., POLLNER, R. & KUHN, K. 1988. The genes for the alpha 1(IV) and alpha 2(IV) chains of human basement membrane collagen type IV are arranged head-to-head and separated by a bidirectional promoter of unique structure. *EMBO J*, 7, 2687-95.
- PRICE, R. G. & SPIRO, R. G. 1977. Studies on the metabolism of the renal glomerular basement membrane. Turnover measurements in the rat with the use of radiolabeled amino acids. *J Biol Chem*, 252, 8597-602.
- PRODROMIDI, E. I., POULSOM, R., JEFFERY, R., ROUFOSSE, C. A., POLLARD, P. J., PUSEY, C. D. & COOK, H. T. 2006. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and

- amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells*, 24, 2448-55.
- RAO, V. H., MEEHAN, D. T., DELIMONT, D., NAKAJIMA, M., WADA, T., GRATTON, M. A. & COSGROVE, D. 2006. Role for macrophage metalloelastase in glomerular basement membrane damage associated with alport syndrome. *Am J Pathol*, 169, 32-46.
- RHEAULT, M. N., KREN, S. M., THIELEN, B. K., MESA, H. A., CROSSON, J. T., THOMAS, W., SADO, Y., KASHTAN, C. E. & SEGAL, Y. 2004. Mouse model of X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 15, 1466-74.
- RUBEL, D., FRESE, J., MARTIN, M., LEIBNITZ, A., GIRGERT, R., MIOSGE, N., ECKES, B., MULLER, G. A. & GROSS, O. 2014. Collagen receptors integrin alpha2beta1 and discoidin domain receptor 1 regulate maturation of the glomerular basement membrane and loss of integrin alpha2beta1 delays kidney fibrosis in COL4A3 knockout mice. *Matrix Biol*, 34, 13-21.
- SAVIGE, J., ARIANI, F., MARI, F., BRUTTINI, M., RENIERI, A., GROSS, O., DELTAS, C., FLINTER, F., DING, J., GALE, D. P., NAGEL, M., YAU, M., SHAGAM, L., TORRA, R., ARS, E., HOEFELE, J., GAROSI, G. & STOREY, H. 2019. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*, 34, 1175-1189.
- SAVIGE, J., RANA, K., TONNA, S., BUZZA, M., DAGHER, H. & WANG, Y. Y. 2003. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int*, 64, 1169-78.
- SAVIGE, J., STOREY, H., IL CHEONG, H., GYUNG KANG, H., PARK, E., HILBERT, P., PERSIKOV, A., TORRES-FERNANDEZ, C., ARS, E., TORRA, R., HERTZ, J. M., THOMASSEN, M., SHAGAM, L., WANG, D., WANG, Y., FLINTER, F. & NAGEL, M. 2016. X-Linked and Autosomal Recessive Alport Syndrome: Pathogenic Variant Features and Further Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS One*, 11, e0161802.
- SAVVA, I., PIERIDES, A. & DELTAS, C. 2016. RAAS inhibition and the course of Alport syndrome. *Pharmacol Res*, 107, 205-210.
- SCHNAPER, H. W., JANDESKA, S., RUNYAN, C. E., HUBCHAK, S. C., BASU, R. K., CURLEY, J. F., SMITH, R. D. & HAYASHIDA, T. 2009. TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 2448-65.
- SEDRAKYAN, S., DA SACCO, S., MILANESI, A., SHIRI, L., PETROSYAN, A., VARIMEZOVA, R., WARBURTON, D., LEMLEY, K. V., DE FILIPPO, R. E. & PERIN, L. 2012. Injection of amniotic fluid stem cells delays progression of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 23, 661-73.
- SEGAL, Y., ZHUANG, L., RONDEAU, E., SRAER, J. D. & ZHOU, J. 2001. Regulation of the paired type IV collagen genes COL4A5 and COL4A6. Role of the proximal promoter region. *J Biol Chem*, 276, 11791-7.
- STEFANO, C., PIERI, M., SAVVA, I., GEORGIU, G., PIERIDES, A., VOSKARIDES, K. & DELTAS, C. 2015. Co-Inheritance of Functional Podocin Variants with Heterozygous Collagen IV Mutations Predisposes to Renal Failure. *Nephron*, 130, 200-12.
- STOREY, H., SAVIGE, J., SIVAKUMAR, V., ABBS, S. & FLINTER, F. A. 2013. COL4A3/COL4A4 mutations and features in individuals with autosomal recessive Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 24, 1945-54.
- SU, J., LIU, Z. H., ZENG, C. H., WEI, G., CHEN, H. P. & LI, L. S. 2006. Quantitative analysis of type IV collagen subchains in the glomerular basement membrane of patients with Alport syndrome with confocal microscopy. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 1838-47.
- SUGIMOTO, H., MUNDEL, T. M., SUND, M., XIE, L., COSGROVE, D. & KALLURI, R. 2006. Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7321-6.
- TAKEMOTO, M., ASKER, N., GERHARDT, H., LUNDKVIST, A., JOHANSSON, B. R., SAITO, Y. & BETSHOLTZ, C. 2002. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol*, 161, 799-805.
- TEMME, J., PETERS, F., LANGE, K., PIRSON, Y., HEIDET, L., TORRA, R., GRUNFELD, J. P., WEBER, M., LICHT, C., MULLER, G. A. & GROSS, O. 2012. Incidence of renal failure and

- nephroprotection by RAAS inhibition in heterozygous carriers of X-chromosomal and autosomal recessive Alport mutations. *Kidney Int*, 81, 779-83.
- TONNA, S., WANG, Y. Y., WILSON, D., RIGBY, L., TABONE, T., COTTON, R. & SAVIGE, J. 2008. The R229Q mutation in NPHS2 may predispose to proteinuria in thin-basement-membrane nephropathy. *Pediatr Nephrol*, 23, 2201-7.
- TSIAKKIS, D., PIERI, M., KOUPEPIDOU, P., DEMOSTHENOUS, P., PANAYIDOU, K. & DELTAS, C. 2012. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome patients carrying missense mutations in the collagenous domain of COL4A5. *Clin Genet*, 82, 297-9.
- VAN DER LOOP, F. T., HEIDET, L., TIMMER, E. D., VAN DEN BOSCH, B. J., LEINONEN, A., ANTIGNAC, C., JEFFERSON, J. A., MAXWELL, A. P., MONNENS, L. A., SCHRODER, C. H. & SMEETS, H. J. 2000. Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney Int*, 58, 1870-5.
- VIVANTE, A., AFEK, A., FRENKEL-NIR, Y., TZUR, D., FARFEL, A., GOLAN, E., CHAITER, Y., SHOHAT, T., SKORECKI, K. & CALDERON-MARGALIT, R. 2011. Persistent asymptomatic isolated microscopic hematuria in Israeli adolescents and young adults and risk for end-stage renal disease. *JAMA*, 306, 729-36.
- VOSKARIDES, K., ARSALI, M., ATHANASIOU, Y., ELIA, A., PIERIDES, A. & DELTAS, C. 2012. Evidence that NPHS2-R229Q predisposes to proteinuria and renal failure in familial hematuria. *Pediatr Nephrol*, 27, 675-9.
- VOSKARIDES, K., DAMIANOU, L., NEOCLEOUS, V., ZOUVANI, I., CHRISTODOULIDOU, S., HADJICONSTANTINOY, V., IOANNOY, K., ATHANASIOY, Y., PATSIAS, C., ALEXOPOULOS, E., PIERIDES, A., KYRIACOU, K. & DELTAS, C. 2007. COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 18, 3004-16.
- VOSKARIDES, K., PATSIAS, C., PIERIDES, A. & DELTAS, C. 2008. COL4A3 founder mutations in Greek-Cypriot families with thin basement membrane nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis dating from around 18th century. *Genet Test*, 12, 273-8.
- VOSKARIDES, K., STEFANOY, C., PIERI, M., DEMOSTHENOUS, P., FELEKKIS, K., ARSALI, M., ATHANASIOY, Y., XYDAKIS, D., STYLIANOY, K., DAPHNIS, E., GOULIELMOS, G., LOIZOY, P., SAVIGE, J., HOHNE, M., VOLKER, L. A., BENZING, T., MAXWELL, P. H., GALE, D. P., GORSKI, M., BOGER, C., KOLLERITS, B., KRONENBERG, F., PAULWEBER, B., ZAVROS, M., PIERIDES, A. & DELTAS, C. 2017. A functional variant in NEPH3 gene confers high risk of renal failure in primary hematuric glomerulopathies. Evidence for predisposition to microalbuminuria in the general population. *PLoS One*, 12, e0174274.
- WEBER, S., STRASSER, K., RATH, S., KITKE, A., BEICHT, S., ALBERER, M., LANGE-SPERANDIO, B., HOYER, P. F., BENZ, M. R., PONSEL, S., WEBER, L. T., KLEIN, H. G. & HOEFELE, J. 2016. Identification of 47 novel mutations in patients with Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Pediatr Nephrol*, 31, 941-55.
- WEI, G., ZHIHONG, L., HUIPING, C., CAIHONG, Z., ZHAOHONG, C. & LEISHI, L. 2006. Spectrum of clinical features and type IV collagen alpha-chain distribution in Chinese patients with Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 3146-54.
- ZEISBERG, M., HANAI, J., SUGIMOTO, H., MAMMOTO, T., CHARYTAN, D., STRUTZ, F. & KALLURI, R. 2003. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*, 9, 964-8.
- ZEISBERG, M., KHURANA, M., RAO, V. H., COSGROVE, D., ROUGIER, J. P., WERNER, M. C., SHIELD, C. F., 3RD, WERB, Z. & KALLURI, R. 2006. Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease. *PLoS Med*, 3, e100.
- ZHANG, G., MOORHEAD, P. J. & EL NAHAS, A. M. 1995. Myofibroblasts and the progression of experimental glomerulonephritis. *Exp Nephrol*, 3, 308-18.
- ZHANG, X., ZHANG, Y., ZHANG, Y., GU, H., CHEN, Z., REN, L., LU, X., CHEN, L., WANG, F., LIU, Y. & DING, J. 2018. X-linked Alport syndrome: pathogenic variant features and further auditory genotype-phenotype correlations in males. *Orphanet J Rare Dis*, 13, 229.



- ZHANG, Y., DING, J., ZHANG, H., YAO, Y., XIAO, H., WANG, S. & WANG, F. 2019. Effect of heterozygous pathogenic COL4A3 or COL4A4 variants on patients with X-linked Alport syndrome. *Mol Genet Genomic Med*, 7, e647.
- ZHANG, Y., WANG, F., DING, J., ZHANG, H., ZHAO, D., YU, L., XIAO, H., YAO, Y., ZHONG, X. & WANG, S. 2012. Genotype-phenotype correlations in 17 Chinese patients with autosomal recessive Alport syndrome. *Am J Med Genet A*, 158A, 2188-93.
- ZHAO, X., CHEN, C., WEI, Y., ZHAO, G., LIU, L., WANG, C., ZHANG, J. & KONG, X. 2019. Novel mutations of COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Chinese patients with Alport Syndrome using next generation sequence technique. *Mol Genet Genomic Med*, 7, e653.

ΚΑΒΕΝΝΑΣ ΑΣΑΒΒΑ

## Παράρτημα



**Εικόνα 1:** Αντιπροσωπευτικό Western blot στο οποίο αναδεικνύεται η διαφορά στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης από σπειράματα *Col4a3* wild type +/+ και *Col4a3* ομόζυγων knockin mut/mut ποντικών, ηλικίας 6 και 15 μηνών. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το NC1 τμήμα της *Col4a3* πρωτεΐνης. Στα σπειράματα από τα μεταλλαγμένα ποντίκια, η έκφραση της α3 αλυσίδας στα 160kDa είναι μηδαμινή ή μειωμένη, αλλά αναγνωρίζεται ένα νέο πρωτεϊνικό τμήμα στα 35kDa.