

Az O-GlcNAciláció jelentősége diabéteszes nefropátiában

Doktori tézisek

Dr. Gellai Renáta

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Fekete Andrea, Ph.D

Bíráló bizottság elnöke: Dr. Mandl József, MTA rendes tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Deák György, Ph.D

Dr. Hosszúfalusi Nóra, Ph.D

Bíráló bizottság tagjai: Dr. Wagner Zoltán, Ph.D

Dr. Giricz Zoltán, Ph.D

Budapest

2016

Bevezetés

A cukorbetegség (diabétesz mellitusz, DM) és társuló szövődményei napjaink egyik legjelentősebb népegészségügyi problémája, megelőzésük és kezelésük hatalmas terhet jelent a betegeknek és a társadalomnak egyaránt. A WHO adatai szerint jelenleg 415 millió ember szenved diabéteszben (DM) világszerte, azonban ha az eddigi növekedési tendencia folytatódik, 2040-re minden tizedik felnőtt cukorbeteg lesz.

A DM számos szövődménye közül a diabéteszes nefropátia (DNP) a betegek 30-40%-ában alakul ki, ezzel a felnőttkori végállapotú veseelégtelenség leggyakoribb kóroka. Bár a betegek száma világszerte és hazánkban is folyamatosan nő, a DNP pontos patomechanizmusa nem tisztázott, a progresszió előrehaladtával pedig a rendelkezésre álló terápia ellenére is veseelégtelenségbe torkolhat, és vesepótló kezelést tesz szükségessé. Jelenleg a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) gátlószerei közül az angiotenzin konvertáz gátlók (ACE-gátlók) és angiotenzin receptor blokkolók (ARB) az elsőként választandó szerek a terápiában.

A DNP patomechanizmusában a szisztémás és intraglomeruláris nyomás emelkedése, illetve a RAAS aktiválódása mellett meghatározó tényező a kontrollálatlan vagy tartós hiperglikémia következtében létrejövő direkt glükotoxicitás.

Ismert, hogy glükózterhelés megnövekedése miatt számos alternatív anyagcsereút eltolódása és felerősödése következik be, melyek felelőssé tehetők a glükotoxicitás közvetítette károsodás kialakulásáért. Ezek közül a hexózamin útvonal felerősödése a fehérjék fokozott oxigénhez kapcsolt acetilglükózamin (O-GlcNac) csoporttal történő poszttranszlációs módosulásához vezet.

A 80-as évek elején felfedezett, szinte az összes fehérjén előforduló O-GlcNAcilációs módosulás a foszforilációhoz hasonlóan a fehérjék szerin és treonin hidroxilcsoportjain megy végbe, így azzal kompetícióba léphet. A folyamat a foszforilációhoz hasonlóan dinamikus és reverzibilis, a csoport áthelyeződését az O-GlcNAc transzferáz (OGT), az eltávolítást az O-GlcNAcáz (OGA) katalizálja.

Számos irodalmi adat utal arra, hogy a DM során megnövekedett O-GlcNAciláció meghatározó tényező a DM és a glükotoxicitás indukálta szövődmények kialakításában, azonban DNP-ban szerepe kevésbé ismert.

Hipotézisünk alapján az O-GlcNAciláció az endotheliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) rendszer, a Na-pumpa és a hősokkválaszon keresztül is szerepet játszhat a DNP patomechanizmusában és progressziójában.

DNP-ben az eNOS elégtelenné váló működését eddig elsősorban a vese vaszkuláris endotéliumában tanulmányozták. Az eNOS megtalálható a proximális tubulusokban is, aktivációjához nélkülözhetetlen a szerin1177-en történő foszforilációja, melynek fő katalizátora az ugyancsak foszforilált Akt (pAkt). Előzetes kísérleti eredmények alapján az eNOS foszforilációjának károsodása összefüggésben van a megnövekedett O-GlcNAcilációval, ami az enzim diszfunkciójához vezet.

Vesében a proximális tubulusok különösen érzékenyek a glükotoxicitással szemben, mivel képtelenek kellően csökkenteni a glükóz transzport mértékét, hogy megelőzzék az intracelluláris glükózkoncentráció túlzott növekedését. A vesében a proximális tubulusban a legnagyobb mértékben kifejeződő nátrium/kálium adenozin-trifoszfátáz (NKA) a Na^+ -gradiens fenntartásával biztosítja a glükózfelszívódás energetikai háttérét. Korábbiakban

kimutattuk, hogy streptozotocin (STZ) indukálta DM patkánymodellben megemelkedik a renális NKA expressziója, ugyanakkor az enzim áthelyeződik a bazálmembránból a citoplazma felé, ezáltal funkcióját veszti.

A stressz-válasz egyik fő mediátora, a hősokkfehérje 72 (HSP72) a sejtet ért károsító hatást követően termelődik. DNP-ban, a hiperglikémia és az emelkedett glomeruláris kapilláris nyomás hatására indukálódó HSP72 részt vesz a tubuláris károsodás kivédésében és a veseparenchima regenerációjában, többek között a membránok stabilizálásán és részlegesen károsodott vagy hibás fehérjék helyreállításán keresztül. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a HSP72 stabilizálja a NKA-t fiziológias helyén, valamint részt vesz a károsodott membránfehérje kijavításában. A sejszabályozásban részt vevő O-GlcNAciláció komplex szerepét mutatja, hogy celluláris stressz hatására kiváltott O-GlcNAc módosulás a sejtek ellenálló képességét, így a HSP72 expresszióját is növeli.

PhD-munkám során a diabéteszes szövődmények kialakulásában és progressziójában részt vevő O-GlcNAciláció szerepét vizsgáltuk a DNP patomechanizmusában és terápiájában.

Célkitűzések

Kísérleteink célja az O-GlcNAciláció folyamatának és enzimeinek vizsgálata a DNP patomechanizmusában, különös tekintettel az Akt-eNOS jelátvitelre, a Na-pumpa működésre, a hősokkválaszra és a terápiában elsődlegesen választandó RAAS-gátlók hatására. A következő kérdésekre kerestük a választ.

1. Az O-GlcNAciláció mértéke hogyan változik *in vivo* a DNP experimentális modelljében és *in vitro* proximális tubulussejtenyészetben magas glükóz kezelés után?
2. Miként módosulnak az O-GlcNAcilációt szabályzó OGT és OGA enzimek szintjei a modellekben?
3. Hogyan befolyásolja a hiperglikémia és a magas glükóz kezelés a foszforilált eNOS és Akt mennyiségét experimentális DNP modellben és a proximális tubulussejtekben?
4. Mi a szerepe az O-GlcNAcilációnak a NKA és a HSP72 mennyiségének és működésének változásában *in vivo* DNP-ban és *in vitro* a proximális tubulusokban?
5. A RAAS-gátlók monoterápiában alkalmazva hogyan befolyásolják az O-GlcNAciláció folyamatát és enzimeit DNP-ban?

Módszerek

In vitro modell

In vitro kísérleteinkben immortalizált human kidney-2 (HK2) proximális tubulussejteket normál (5 mM) és magas glükóz (35 mM) tartalmú tápoldatban tenyésztettünk 24 (HG24) és 48 órán keresztül (HG48). A magas glükózon tartott sejteket Enalaprillal (HG+Enalapril; 1 μ M), Lozartánnal (HG+Lozartán; 10 μ M) és Eplerenonnal (HG+Eplerenon; 10 μ M) kezeltük. Ozmotikus kontrollként magas mannóz (5mM glükóz+30mM mannóz) tartalmú tápoldatban tenyésztett sejteket használtunk.

1-es típusú DM (T1DM) patkánymodell és kezelési csoportok

Kísérleteinket 6 hetes, 180-200 gramm súlyú, ivarérett, hím Wistar patkányokon végeztük. A T1DM-et egyszeri, 0,1 M citrát pufferben oldott 65 mg/ttkg intraperitoneális injekcióban adott STZ-vel indukáltuk.

5 héttel a T1DM fennállását követően az állatokat négy csoportba osztottuk (n=8/csoport) és 2 hétig *per os* kezeltük izotóniás sóoldatban oldott:

1. enalaprillal (40mg/ttkg/nap)
2. lozartánnal (20mg/ttkg/nap)
3. szelektív aldoszteron antagonistá eplerenonnal (50mg/ttkg/nap)
4. illetve vehikulumként izotóniás sóoldattal.

Kontrollként kezeletlen, korban és testtömegben illesztett állatok szolgáltak.

Vérnyomás-és pulzusmérés

Az állatok artériás vérnyomását és pulzusát a RAAS gátló kezelés előtt és után a CODA Standard Tail-cuff monitoring rendszerrel végeztük. Az állatokat izoflurán anesztéziában altattuk.

Vesefunkciós és metabolikus paraméterek

Mértük a szérum glükóz, fruktózamin, kreatinin, karbamind, koleszterin, HDL és triglicerid szinteket, gyűjtött vizeletből kreatinin mennyiségi meghatározást végeztük el és megbecsültük a kreatinin clearance értékét.

Hisztológia

A tubulointersticiális fibrózis mértékét Masson trikróm festett vesemetszeteken értékeltük ki. A mezangiális mátrix expansió megítélésére perjódsav-Schiff festést használtunk. A NKA és HSP72 lokalizációját fluoreszcens immunohisztokémia segítségével vizsgáltuk.

Fehérjék mennyiségi meghatározása

Western blot technikával mértük az O-GlcNAc-ilt, OGT, OGA, peNOS, eNOS, pAkt, Akt, NKA és HSP72 fehérjék mennyiségi változását.

Statisztikai analízis

A parametrikus adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. A statisztikai elemzést GraphPad Prism szoftverrel (5.00 verzió) végeztük. A többszörös összehasonlításokra faktoriális variancia analízist végeztünk kiegészítve Bonferroni post-hoc teszttel. A nem-parametrikus adatokra Kruskal-Vallis tesztet használtunk. Statisztikailg szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

Eredmények és következtetések

Hiperglikémia indukált O-GlcNAciláció és izoforma specifikus enzim-termelődés proximális tubulussejtekben

Proximális tubulussejtekben magas glükózon történő 24 és 48 órás kezelés után megnőtt a fehérjék O-GlcNAcilációja, míg mannitol kezelt sejtek nem mutattak hasonló emelkedést.

Elsőként mutattuk ki proximális tubulussejtekben a különböző szubsztrát-specifitással és intracelluláris funkciókkal rendelkező nukleocitoplazmatikus (ncOGT, 110kDa) és mitokondriális (mOGT, 103kDa) OGT illetve a hosszú (OGA-L, 130kDa) és rövid OGA (OGA-S, 75kDa) izoformák időfüggő változásait. A szintézisért felelős ncOGT növekedett a HG24 sejtekben, majd HG48 sejtekben normalizálódott. Az mOGT nem változott a HG24 sejtekben, azonban HG48 sejtekben lecsökkent fehérjemennyiség a kontrollhoz képest.

Az OGA-L a kontroll szintje alá csökkent a HG24 sejtekben, míg megnövekedett a HG48 sejtekben - egy, a megnövekedett O-GlcNAciláció elleni kompenzációs mechanizmust sugallva. Magasabb enzimaktivitásának és citoplazmatikus lokalizációjának köszönhetően ez az izoforma felelős elsősorban az o-glikozil-csoport eltávolításáért. Az OGA-S sokkal kisebb mennyiségben volt jelen a sejtben, és nem mutatott különbséget a csoportok között.

A RAAS-gátlók proximális tubulussejtekben egyedül az OGA-L mennyiségét befolyásolták: a fehérje növekedett 24 órás Enalapril és Lozartán kezelés után.

A peNOS fehérjemennyiség lecsökken magas glükóz hatására proximális tubulussejtekben

Magas glükózon tartott proximális tubulussejtekben változatlan eNOS fehérjemennyiség mellett, a foszforilált eNOS mennyisége lecsökkent, ami azt sugallja, hogy az enzim foszforilálása károsodott hiperglikémiás körülmények között.

Az eNOS Ser(1177)-n történő foszforilációját pAkt katalizálja, mely nélkülözhetetlen az enzim aktivációjához. A pAkt fehérjemennyisége megnőtt HG24 sejtekben változatlan Akt szint mellett. Az ennek ellenére alacsony peNOS szint azonban azt jelzi, hogy a megemelkedett pAkt nem aktív, vagy katalizáló funkcióját nem tudta betölteni. HG48 sejtekben a pAkt mennyisége visszaállt a kontroll szintjére, az Akt pedig megemelkedett.

A NKA és HSP72 fehérjemennyiség megnő magas glükóz hatására proximális tubulussejtekben

A magas glükózon tenyésztett HK2 sejtekben a NKA mennyisége kezdetben nem változott, majd megnőtt HG48 sejtekben a kontrollokhoz képest. A HSP72 mennyiségének ugyancsak a növekedését figyeltük meg HG24 sejtekben, ami azonban 48 órás kezelés után visszaállt a kontroll szintjére. Immunfluoreszcens festett metszeteken a HSP72 a kontroll sejtekben perinukleáris festődést mutatott, magas glükóz kezelés után azonban az egész citoplazmában kimutatható volt.

DNP kialakulása T1DM állatokban

7 héttel az STZ-indukált T1DM kialakulása után a patkányok testsúlya lecsökkent, a szérum kreatinin és karbamid szintek megemelkedtek, a GFR csökkent, a fruktózamin és lipidszintek emelkedtek. Nonpresszor RAAS-gátló dózisok alkalmazásának megfelelően a vérnyomás nem változott egyik csoportban sem. A szövettani vizsgálatok igazolták a diabéteszes állatok veséinek strukturális károsodásait: a Masson-festett metszeteken a vesék kiterjedt tubulointersticiális fibrózist mutattak, míg PAS-festett metszeteken a mezangiális mátrix expansiója ábrázolódott.

A RAAS-gátló kezelések javították a vesefunkciós paramétereket és csökkentették a renális strukturális károsodást a tubulointersticiális fibrózis és a mezangiális mátrix expansió mérséklésén keresztül, a Lozartán pedig csökkentette a szérum koleszterin szintet.

A RAAS-gátlók csökkentik a fehérjék O-GlcNAc-ilációját diabéteszes vesében

T1DM patkányok veséinek megnövekedett fehérje O-GlcNAc-ilációját mutattunk ki a kontrollokhöz képest. Ennek mértékét mindegyik RAAS-gátló kezelés csökkentette.

Diabéteszes vesében kimutattuk az ncOGT és mOGT mennyiségének csökkenését, amit a RAAS-gátlók nem befolyásoltak. Ugyancsak alacsony volt diabéteszes vesében az OGA-L mennyisége, míg a sejtmagban található és lipid-cseppekhez kötött OGA-S mennyisége megnőtt. A RAAS-gátlók közül a Lozartán mérsékelte az OGA-L csökkenését, míg az OGA-S mennyisége valamennyi kezelés esetében csökkent.

RAAS-gátlók mérséklék az eNOS foszforiláció csökkenését diabéteszes vesében

Diabéteszes vesében mind a foszforilált eNOS mennyisége, mind a peNOS/peNOS arány csökkent. A RAAS-gátlók, különös tekintettel a Lozartán és Eplerenon, megnövelték a peNOS mennyiségét, illetve mérsékeltek az emelkedett eNOS szintet. Az Akt mennyisége kis mértékben emelkedett T1DM-ben, azonban sem a pAkt, sem a pAkt/Akt arány nem változott sem a cukorbeteg állatokban, sem a RAAS-kezelés hatására.

HSP72 fehérjemennyiség csökken diabéteszes vesében

A cukorbeteg állatok veséjében a HSP72 fehérje mennyiségének csökkenését figyeltük meg a kontrollokhöz képest, ami a RAAS-gátlókkal történő kezelés után egy mérsékelt növekedő tendenciát mutatott. Immunhisztológiai eljárással kimutattuk, hogy a fehérje a tubulusokba lokalizálódik.

A NKA fehérjemennyiség növekedése és lokalizációjának változása diabéteszes vesében

T1DM-ben a NKA fehérjemennyisége megnövekedett és a bazálmembránról áthelyeződött a citoplazmába, ezáltal funkcióját veszítette. A fehérje mennyisége Enalapril kivételével a Lozartán és Eplerenon kezelésekre hatására csökkentek.

Új megállapítások

1. Igazoltuk, hogy az O-GlcNAciláció mértéke megnő magas glükóz kezelés hatására proximális tubulussejtekben illetve DNP-ben.
2. Elsőként mutattuk ki az O-GlcNAciláció enzimeinek különböző izoformáit és azok mennyiségének időfüggő változásait. Glükózterhelés hatására proximális tubulussejtekben az O-GlcNAcilációban szerepet játszó ncOGT, majd kompenzatórikus hatásként az eltávolítást végző OGA-L mennyisége is megnő. Elhúzódó hiperglikémia esetén enzimek szintjei lecsökkennek, ami a felhalmozódott O-GlcNAcilációra adott, részben károsodott válaszreakció lehet.
3. Proximális tubulussejtekben magas glükóz kezelés hatására és diabéteszes vesében a foszforilált eNOS mennyisége lecsökkent, míg az eNOS szint változatlan maradt, ami arra utal, hogy az O-GlcNAciláció megemelkedésének egyik káros következménye az eNOS foszforilációjának gátlása lehet.
4. Magas glükóz kezelés hatására a NKA és a HSP72 fehérjemennyisége megemelkedik és a HSP72 perinukleáris lokalizáció helyett az egész citoplazmában megjelenik. DNP-ben a NKA funkciója károsodik, mert fiziológias helyéről áthelyeződik a citoplazmába, a vele kolokalizáltan elhelyezkedő HSP72 szintje pedig lecsökken, ami a glükotoxicitással szembeni sérülékenységhez vezet.

5. A RAAS-gátlók csökkentik a DNP-ben megnövekedett O-GlcNAcilációt feltételezhetően az OGA-L növelésén keresztül és növelik a peNOS ill. a HSP72 szinteket, ami hozzájárulhat renoprotektív hatásukhoz DNP-ben.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezésben felhasznált közlemények

Gellai R, Hodrea J, Lenart L, Hosszu A, Kőszegi S, Balogh D, Ver A, Banki NF, Fülöp N, Molnar A, Wagner L, Vannay A, Szabo J A, Fekete A: The role of O-linked N-acetylglucosamine modification in diabetic nephropathy. American Journal of Physiology: Renal physiology (2016)

NF Bánki, S Kőszegi, L Wagner, L Lénárt, D Varga, R Gellai, J Hodrea, Á Vér, AJ Szabó, T Tulassay, A Fekete: Új terápiás támpontok a diabéteszes nefropátia kezelésében: a renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer és a Na/K ATPáz szerepe. Gyermekgyógyászat (2013) 64: 70-74 2

NF Banki, A Ver, LJ Wagner, A Vannay, P Degrell, A Prokai, R Gellai, L Lenart, D Nagy Szakal, E Kenesei, K Rosta, G Reusz, AJ Szabo, T Tulassay, C Baylis, A Fekete: Aldosterone Antagonists in Monotherapy are Protective Against Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy in Rats. Plos One (2012) 7:e39938. IF: 3,73

Más témában megjelent közlemények

Hodrea Judit, Lénárt Lilla, Gellai Renáta, Kőszegi Sándor, Wagner László, Bánki N Fanni, Vér Ágota, Vannay Ádám, Tulassay Tivadar, Fekete Andrea: A diabeteshez társuló depresszió patomechanizmusa. Magyar Belorvosi Archivum 66:(4) pp. 198-203. (2013)

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni Szabó Attila és Tulassay Tivadar professzor uraknak, hogy lehetővé tették, hogy a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában végezhettem munkámat.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Fekete Andreának, hogy szakértelmével, következetességével mindvégig támogatta fejlődésemet és szakmai ill. emberi segítségével mindig készen állt a munkám során felmerülő nehézségek megoldására.

Köszönöm Dr. Vér Ágotának, Dr. Hodrea Juditnak, Dr. Wágner Lászlónak és Dr. Vannay Ádámnak, hogy észrevételeikkel, tapasztalataikkal és önzetlen hozzáállásukkal segítettek a munkám során.

Hálával tartozom a Semmelweis Egyetem és Magyar Tudományos Akadémia Kutatólaboratórium valamennyi munkatársainak, hogy barátságos hangulatot és támogató légkört biztosítottak az együtt töltött időszakban. Külön köszönettel tartozom Kőszegi Sándornak, a hisztológiai munkák elkészítéséért, Lénárt Lillának a közleményírás kapcsán felmerülő problémák közös megoldásáért, Bernáth Máriának a sejtenyésztés során nyújtott segítségéért. Köszönöm a Lendület Kutatócsoport minden tagjának: Hosszú Ádámnak, Balogh Dórának, Szkbiszki Edgárnak, Antal Zsuzsának és Bánki Nóra Fanninak, hogy a csapat részese lehettem.

Végül köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy kutatómunkám során háttérrel biztosítottak számomra.