

Lipotoxicitás ellen védő hatóanyagok vizsgálata inzulinóma sejteken

Doktori tézisek

Simon-Szabó Laura

Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok
Doktori Iskola



Témavezetők: prof. Kéri György, DSc., kutatóprofesszor
Dr. Csala Miklós, DSc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Töröcsik Beáta, Ph.D., adjunktus
Dr. Venekei István, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:
prof. Török Tamás, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Klebovich Imre, DSc., egyetemi tanár
Dr. Bajtay Zsuzsa, DSc., egyetemi docens

**Budapest
2016**

Bevezetés

A 2-es típusú diabétesz világszerte nagy számban előforduló betegség, mely főként a jóléti társadalmakra jellemző. A túlzott táplálékbevitel és a fizikai aktivitás hiánya, valamint a gyakran ezek következtében fellépő elhízás a betegség kialakulásának legfőbb okai. Az elhízás napjainkban már gyermekkorban is egyre elterjedtebb. A 2-es típusú diabétesz komplex metabolikus betegség, melynek egyik kísérőjelensége a tartósan emelkedett vércukorszint (hiperglikémia). A normál glükóz koncentráció értéke 3,5 és 5,5 mM között van a vérben, melynek szinten tartása esszenciális a szervezet normális működése szempontjából. Az ettől bármely irányban való eltérés kóros állapotokat idéz elő. A vércukorszint szabályozásában alapvetően két hormon játszik döntő szerepet, az inzulin és a glukagon. Mindkettőt a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek sejtjei termelik; a glukagont az α -sejtek, az inzulint pedig a β -sejtek. Glukagon hatására emelkedik a vércukorszint, míg inzulin hatására csökken. Az izom-zsír tömegarány csökkenése gyengült inzulinválaszt eredményez, melyet inzulinrezisztenciának nevezünk. Az inzulinrezisztencia korai stádiumában túlzott inzulintermelés figyelhető meg a hasnyálmirigy β -sejtjeiben. Amikor a β -sejtek már nem tudnak elegendő inzulint termelni az inzulinrezisztencia

néven SAPK (stressz aktivált protein kináz) említik. A JNK tehát stresszkináz, amely az UPR egyik jelátviteli útvonalán, az IRE-1 (inositol-requiring enzyme 1) stressz receptoron keresztül is aktiválódik. A foszforilált, aktív JNK az IRS-1-et (inzulin receptor szubsztrát 1) szerin oldalláncon foszforilálja, ami gátolja e jelátviteli fehérje inzulín-receptor általi tirozín foszforilációját. Ily módon sérül az inzulínjelpálya, és az inzulín bekötődése nem tud kellő mértékű glükózfelvétel-fokozódást, illetve glükóztermelés-gátlást kiváltani.

Több gyógyszer is forgalomban van, melyek az inzulínrezisztencia megjelenésekor, a további romlást és a 2-es típusú diabétesz kialakulását megelőzendően adható. Az egyik ilyen gyógyszer a metformin. Ez a biguanidok csoportjába tartozó hatóanyag csökkenti a máj glükóztermelését, serkenti az izom glükózfelvételét, így megelőzi a hiperglikémia kialakulását. Csökkenti az éhséget, és segíti a súlycsökkenést. Gátolja a glükoneogenezist és a mitokondriális sejthalált. Egyik lehetséges targetje a mitokondrium légzési láncának első komplexe. Emellett azonban új hatóanyagok keresése is fontos inzulínrezisztencia esetében, melyek lehetőleg kevésbé okoznak gyomorpanaszokat, és a vese-, tüdő- és szívbetegek is szedhetik, ugyanis az ő esetükben a metformin egyik mellékhatásaként felléphet a tejsavas acidózis. Tejsavas acidózis során megemelkedik a vérben a tejsav

koncentrációja, ami a fiziológiás pH-t savas irányba tolja el. Ez adott esetben súlyos, akár életveszélyes állapotot is előidézhethet.

Egyre nagyobb teret kezd nyerni a célzott jeltherápia, mely során a stressz hatására aktiválódott pályák egyikének szelektív gátlása történik. Ilyen például az IRS-1 szerin foszforilációjának gátlása közvetlenül, vagy közvetetten a JNK gátlásán keresztül.

Az így ható szerek segítenek a megbomlott egyensúlyi állapotok helyreállításában, ugyanakkor nem változtatnak azon, hogy az elhízás által okozott metabolikus betegségek – köztük a 2-es típusú diabétesz – megelőzése és kezelése elsősorban a helyes életmód kialakításán (megfelelő diéta, testmozgás) alapul.

Célkitűzések

Mivel a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegek száma folyamatosan nő, fontosak azon kutatások, melyek a betegség gyógyszeres kezelésére irányulnak. A célzott jelterápiás eljárások egyre inkább tért hódítanak. Érdeklődésünk középpontjában a β -sejtekben kialakuló lipotoxicitás és lipoapoptózis állt. Ennek vizsgálatára alkalmas sejtes modellrendszerben kívántuk tanulmányozni az ismert antidiabetikum, metformin protektív hatását, illetve ezzel összefüggésben az ER-stressz esetleges gátlását. E kísérleteinkhez RINm5F patkány izulinóma sejteket használtunk, melyekben a lipotoxicitást albuminhoz konjugált palmitát segítségével váltottuk ki.

Kiemelt figyelmet fordítottunk a JNK-aktiváció és a részben ennek következményeként kialakuló IRS-1 Ser307-foszforiláció jelenségére, ami az inzulin-jelátvitel zavarát és a β -sejtek károsodását előidéző egyik legfontosabb tényező. A metformin hatásainak tanulmányozása mellett, a β -sejt-lipotoxicitás modell felhasználásával célzottan e mechanizmus gátlására alkalmas vegyületek kifejlesztését tűztük ki célként. A tesztelni kívánt gyógyszerjelölt kinázgátlók előzetes szelektálásához HEK293

humán vese sejteket használtuk, és ennek során az IRS-1 Ser307-foszforilációt a JNK anisomycin általi aktiválásával provokáltuk.

Munkánk során tehát alábbi specifikus célokat kívántuk elérni:

- Kideríteni, hogy védi-e a metformin a β -sejteket lipotoxicitás és lipoapoptózis ellen.
- Feltárni, hogy befolyásolja-e a metformin a β -sejtekben kifejtett lipotoxicitás során fellépő UPR részjelenségeit.
- Azonosítani olyan gyógyszerjelölt molekulákat, amelyek a lipotoxicitás hatására erősödő IRS-1 Ser307-foszforiláció hatékony gátlása révén antidiabetikus hatóanyagok kifejlesztésének alapjául szolgálhatnak.

Módszerek

RINm5F patkány inzulinóma sejtek életképességét vizsgáltuk tripánké-kizárás segítségével albuminnal-konjugált palmitát kezelést követően. Az élő (tripánkéket kizáró) és halott (tripánkéket felvett) sejtek számlálását automata sejtszámlálóval végeztük.

Vizsgáltuk, hogy miként hat a palmitát az apoptózisra, valamint a nekrozisra inzulinóma sejten Annexin-V-Fluos Staining Kit segítségével, fluoreszcens mikroszkópia alkalmazásával. A foszfatidil-szerint prezentáló, így annexint adszorbeáló apoptotikus sejtek zöld fluoreszcencia, míg a propidium-jodidot felvevő nekrotizáló sejtek piros fluoreszcencia alapján azonosíthatók. A duplán jelölődő (pirosan és zölden egyaránt fluoreszkáló) sejteket nekrotikusnak tekintettük. Kísérletenként legalább 1000 sejtet számoltunk le, majd a kapott eredményekből apoptózis indexet, valamint nekrozis indexet számoltunk (apoptotikus vagy nekrotikus sejtek / összes sejt x 100).

Poliakrilamid Gélelektroforézist (PAGE) követően Western blottal vizsgáltuk az ER stressz hatására aktiválódó UPR részjelenségeit anisomycin valamint palmitát kezelést követően HEK293 illetve RINm5F sejteken. Valamint néztük a metforminnak,

referencia- és újonnan szintetizált kináz inhibitoroknak az ER stresszre, valamint apoptózisra gyakorolt hatását.

Vizsgáltuk az XBP-1 mRNS hasítását lipotoxicitás során inzulinóma sejteken. Az RNS-minták reverz transzkripciójával RT-PCR Kit SuperScript III first-strand Synthesis System használatával cDNS-t állítottunk elő. A hasított és hasítatlan XBP-1 szekvenciák (421 és 447 bp) PCR-el lettek felsokszorosítva XBP-1 sense (patkány) és antisense (egér, patkány) primerekkel iProof High-Fidelity DNS Polimeráz Kit segítségével. A PCR-termékeket PEG-precipitációval tisztítottuk, és koncentrációikat Nanodrop 1000 Spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A tisztított PCR-termékeket (200 ng) FastDigest PStI-gyel inkubáltuk, mely a hasítatlan XBP-1 szekvenciákban 2 fragmenst (153 és 294 bp) eredményeznek, míg a hasított változat nem vágódik el. A PCR-termékek azonos mennyiségeit agaróz gélelektroforézissel választottuk el, és a fragmenseket etídium-bromid segítségével tettük láthatóvá.

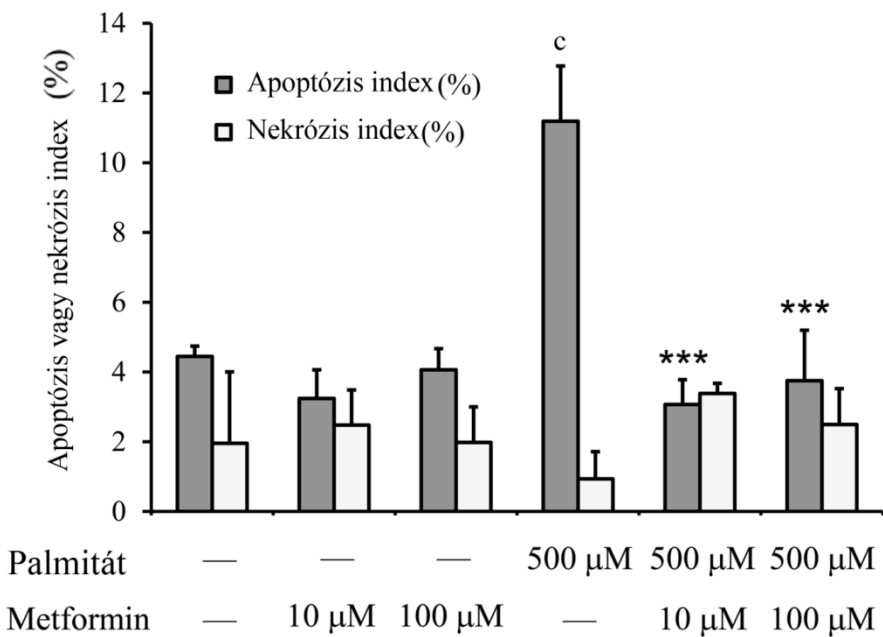
A Western-blotok eredményeit Image Quant 5.2-es program segítségével végzett denzitometrálassal számszerűsítettük. a statisztikai szignifikancia vizsgálatot ANOVA „Tukey’s multiple comparison post hoc test”-el végeztük. A 0,05 alatti P értékeket tekintettük szignifikáns különbségnek.

Eredmények

Palmitát indukált apoptózis RINm5F sejtekben

A metformin lipotoxicitással szembeni védőhatását RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalon kívántuk vizsgálni. Az albuminnal konjugált palmitátot 500 μM -os koncentrációban adtuk a sejtekhez azon tanulmányok alapján, melyek ugyanezt a sejtvonalat használták a lipotoxicitás vizsgálatához.

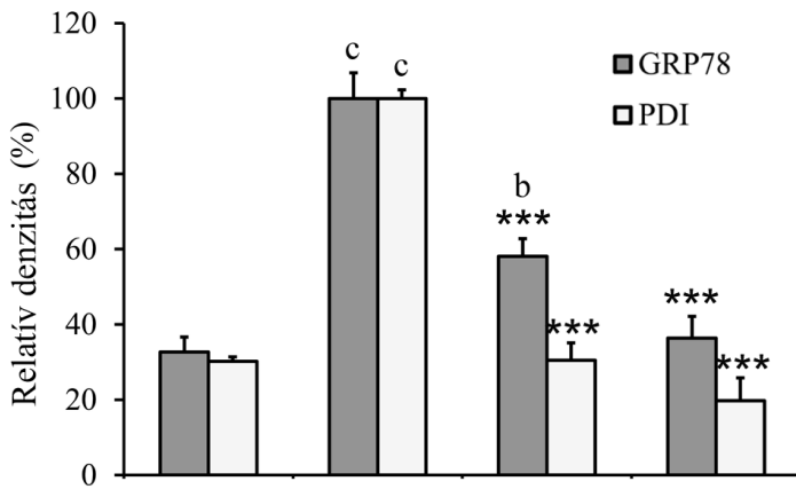
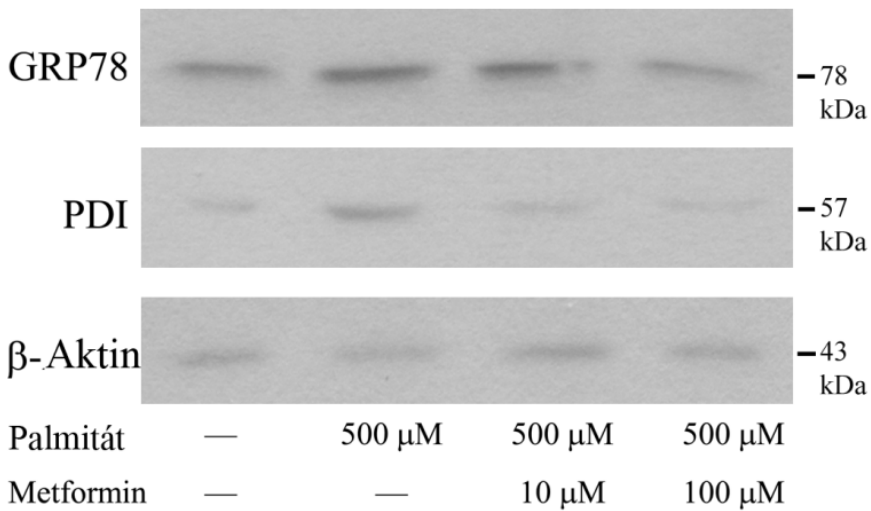
A sejtek pusztulását tanulmányoztuk az apoptózis és a nekrozis megkülönböztetésével, amihez Annexin-V-Fluos Staining Kitet és fluoreszcens mikroszkópiát használtunk (1. ábra). 6 óra elteltével közel megháromszorozódott az apoptózis index. Önmagában adva a metformin nem fejtett ki hatást a sejteken, azonban palmitátkezelt sejteknél mind 10 μM , mind 100 μM -os koncentrációban szignifikánsan csökkentette az apoptózist egészen a kezeletlen kontroll szintjére. Ugyanakkor sem a palmitátnak, sem a metforminnak nem volt hatása a sejtek nekrozisának mértékére (1. ábra).



1. ábra: Apoptózis és nekrózis index RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalon

Metformin hatása a palmitát által indukált ER-stresszre

Az ER-chaperonok indukálása jellemző velejárója az UPR jelenségének, ezért az ER-stressz gyakran alkalmazott markerének tekinthető. Kísérleteinkben két fő ER-chaperont vizsgáltunk lipotoxicitás során Western blot segítségével (2. ábra). Mind a GRP78 vagy másik nevén BiP, mind a PDI mennyisége megnőtt a palmitátkezelt mintákban a kontrollhoz képest, ami azt mutatja, hogy a lipotoxicitás ER-stresszel járt a sejtekben. Metformin egyidejű alkalmazása mindkét chaperon fehérje indukcióját csökkentette, és 100 μ M-os metformin kezelés hatására mindkét chaperon mennyisége a kontroll szintjén maradt (2. ábra).



2. ábra: ER chaperonok, GRP78 és PDI indukciója

JNK-aktiválódás és IRS-1 Ser307-foszforiláció gátlószereinek szelektálása

A Vichem EVL molekulakönyvtárból kiválogatott JNK-gátlók elsődleges szűréséhez a kináz anisomycinnel való – széles körben alkalmazott és jól dokumentált – aktiválásán alapuló modellt alkalmaztunk HEK293 humán vese eredetű fibroblaszt sejteken. A gátlás pozitív kontrolljaként az irodalomból ismert BI-78D3 hatóanyagot választottuk, és mindenek előtt ennek hatékonyságát, illetve koncentrációfüggését teszteltük rendszerünkben.

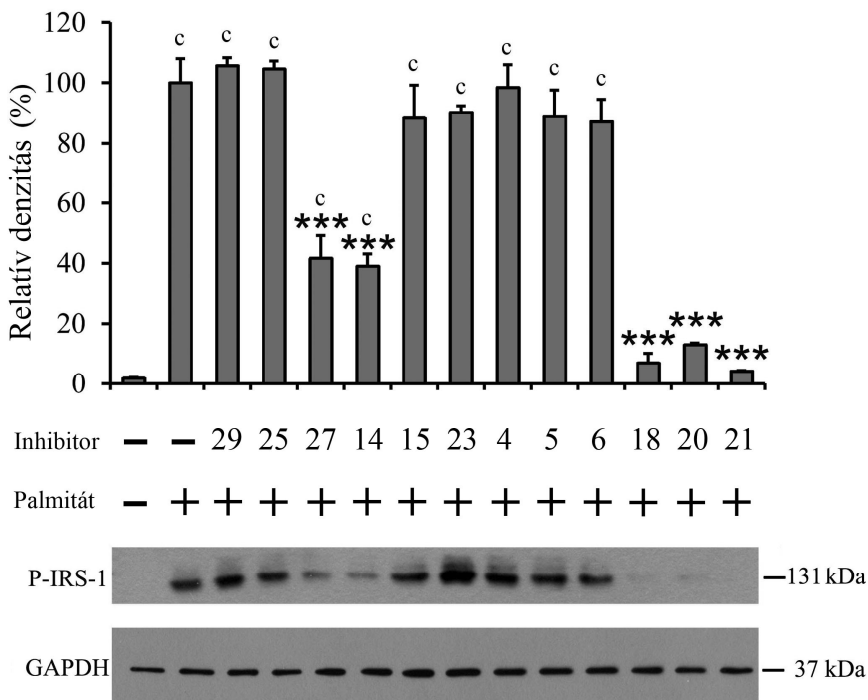
A kiválogatott referenciamolekulák, valamint az újonnan szintetizált származékok JNK-, c-Jun- és IRS-1 Ser307-foszforilációra gyakorolt hatásait elsőként tehát az anisomycin-kezelt HEK293 sejtekben vizsgáltuk egyaránt 10 μ M-os végkoncentrációban. Várakozásunknak megfelelő módon, erős korrelációt figyelhettünk meg a JNK és a c-Jun foszforilációjának gátlása esetében. A JNK és az IRS-1 foszforilációjának mértéke (vagyis a P-JNK és a P-IRS-1 Ser307 denzitása) azonban kevésbé szoros összefüggést mutatott a vizsgált gátlószerek esetében, ami összefügghet azzal, hogy az IRS-1 fehérjét több szerinkináz is foszforilálja.

Az első szűrésben tesztelt, összesen 57 molekulából tizenkettőt választottunk ki további kísérletekhez. A válogatás kritériumaként 65% alatti JNK-foszforilációt, valamint 15% alatti IRS-1 Ser307-foszforilációt jelöltünk meg. Az e feltételeknek megfelelő vegyületek mind 2,6-diszubsztituált 7-oxo-pyrido-[2,3-d]pyrimidin magstruktúrájúak voltak.

Szelektált gátlószeres vizsgálat lipotoxicitás-modellben

Az anisomycinnel kezelt HEK293 sejteken hatékonyan bizonyult gátlószereket a biológiai szempontból relevánsabb lipotoxicitási sejtmodellben is megvizsgáltuk. RINm5F patkány inzulinóma sejtekben – korábban leírt módon – albuminhoz konjugált palmitáttal (500 μM) váltottunk ki stresszt, és a tizenkét féle gátlószer (10 μM) JNK- és IRS-1 Ser307-foszforilációra gyakorolt hatását 8-órás kezelési idő után Western blot analízis segítségével vizsgáltuk (3.ábra). Két vegyület (27 és 18 jelű) hozzáadásakor észleltünk igen erős (54% és 59%-os mértékű) gátlást a JNK-foszforiláció vonatkozásában. Ez a két hatóanyag jelentős – meglehetősen különböző mértékű (58%, illetve 93%-os) – gátlást eredményezett az IRS-1 Ser307-foszforilációban is. Érdekes, hogy

az IRS-1 Ser307-foszforilációt még három további vizsgált vegyület, nevezetesen a 14-es, a 20-as és a 21-es jelű is hatásosan (61%, 87% és 96%-kal) csökkentette, holott ezek a foszforilált JNK szintjére nem hatottak hasonló mértékben (3. ábra).



3. ábra: Lipotoxicitás által indukált IRS-1 Ser307-foszforiláció gátlása RINm5F sejtekben

Következtetések

Munkánk alapvető célja a lipotoxicitás és lipoapoptózis, illetve az ezekkel szorosan összefüggő, és az inzulinrezisztencia kialakulásában központi szerepet játszó IRS-1-foszforiláció csökkentésére alkalmas hatóanyagok vizsgálata volt.

Az albuminhoz konjugált palmitáttal kezelt RINm5F patkány inzulinóma sejtvonalon egyrészt az ismert antidiabetikum, metformin effektusát teszteltük a sejtek életképessége, az apoptózis mértéke, valamint az ER-stressz erőssége vonatkozásában. Külön figyelmet fordítottunk a központi stresszkináz JNK aktiválódására és az IRS-1 részben ennek tulajdonítható Ser307-foszforilációjára. Megállapítottuk, hogy

- A metformin kivédte a palmitát által indukált apoptózist, amit a kaszpáz-3 aktiválódásának jelentős csökkenése is jelzett, míg a nekrozis mértékére nem volt hatással.
- Metformin alkalmazása jelentősen enyhítette a lipotoxicitás részeként fellépő UPR több részjelenségét, így az eIF2 α PERK működéséhez köthető foszforilációját és az XBP-1 mRNS-ének IRE-1-függő, jellegzetes hasítását, illetve a JNK, az IRS-1 Ser307, valamint a c-Jun IRE-1-en keresztül inicializálódó foszforilációját. Ezekkel összhangban, ugyancsak gátlódott metformin jelenlétében

az ER-chaperon PDI és GRP78 indukciója, és nem utolsó sorban a proapoptotikus CHOP termelődése.

Az albuminhoz konjugált palmitáttal kezelt RINm5F inzulinóma sejtek modellként szolgáltak olyan molekulák teszteléséhez is, amelyek az IRS-1 Ser307 foszforilációja és ezáltal az inzulinrezisztencia, illetve β -sejthalál kivédésében hatékony gyógyszerek kifejlesztéséhez járulhatnak hozzá. A Vichem EVL molekulakönyvtárából referenciamolekulákat, majd a vizsgálatok során ezek újonnan szintetizált módosulatait – összesen 57 potenciális JNK-gátlót – szűrtünk anisomycinnel kezelt HEK293 sejtekben a JNK-aktiválódásra, illetve az IRS-1 Ser307 foszforilációjának mértékére kifejtett effektusuk alapján.

- A tizenkét szelektált molekula közül öt esetében észleltünk számottevő gátlást az IRS-1 Ser307-foszforiláció vonatkozásában, és ezek közül négy jelentősen csökkentette a JNK-foszforiláció mértékét is. Ezek a hatóanyagok antidiabetikus gyógyszerfejlesztés ígéretes kiinduló molekulái lehetnek, ezért indokolt további vizsgálatuk, beleértve in vivo hatásosságuk tanulmányozása is.

Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájához kapcsolódó publikációk jegyzéke:

Simon-Szabo L, Kokas M, Mandl J, Keri G, Csala M. (2014) Metformin attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, serine phosphorylation of IRS-1 and apoptosis in rat insulinoma cells. PLoS One, 9(6):e97868.

IF: 3,234

Simon-Szabo L, Kokas M, Greff Z, Boros S, Banhegyi P, Zsakai L, Szantai-Kis C, Vantus T, Mandl J, Banhegyi G, Valyi-Nagy I, Orfi L, Ullrich A, Csala M, Keri G. (2016) Novel compounds reducing IRS-1 serine phosphorylation for treatment of diabetes. Bioorg Med Chem Lett, 26(2):424-428.

IF: 2,420

Zambo V, **Simon-Szabo L**, Szelenyi P, Kereszturi E, Banhegyi G, Csala M. (2013) Lipotoxicity in the liver. World J Hepatol, 5(10):550-557.

A dolgozat témájához szorosan nem kapcsolódó publikációk jegyzéke:

Varga A, Gyulavari P, Greff Z, Futosi K, Nemeth T, **Simon-Szabo L**, Kerekes K, Szantai-Kis C, Brauswetter D, Kokas M, Borbely G, Erdei A, Mocsai A, Keri G, Vantus T. (2015) Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes in vitro. PLoS One, 10(4):e0124234. IF: 3,234