

Μοριακές μεταβολές σε πειραματικά μοντέλα και σε νεφροπαθείς: εμπλοκή και πρωτεϊνών και μη κωδικοποιών RNA

20^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νεφρολογίας

3 Μαΐου 2018

Μέγαρο Διεθνές Συνεδριακό Κέντρο Αθηνών

Άρης Χαρώνης

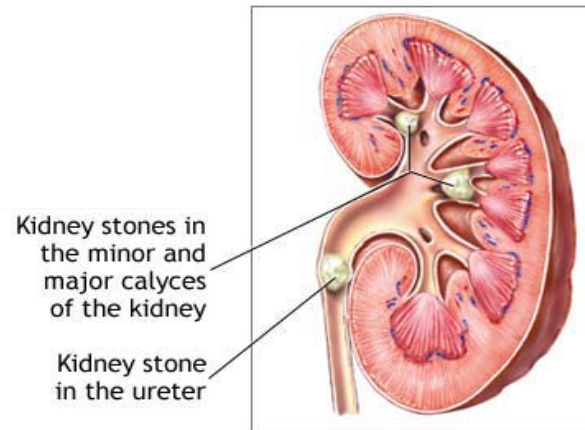
Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών

της Ακαδημίας Αθηνών

Οι προσεγγίσεις μας

- Χρησιμοποιούμε πειραματικά μοντέλα νεφροπαθειών, με κύριο το της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης
- Μελετάμε τους ιστούς με τεχνικές συστημικής βιολογίας, –omics (πρωτεομική και μεταγραφομική) και αναλύουμε τα αποτελέσματα με τη βοήθεια της βιοπληροφορικής
- Επιλέγουμε μακρομόρια και μονοπάτια
- Επαληθεύουμε τα ευρήματα σε άλλα πειραματικά μοντέλα
- Επαληθεύουμε τα ευρήματα σε βιοψικό υλικό (συνεργασίες με Νεφρολόγους και Παθολογοανατόμους)
- Αναζητάμε δείκτες παθολογικών διεργασιών στο νεφρικό παρέγχυμα και σε δείγματα ούρων

Το ζωϊκό μοντέλο της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης



- Πρόκειται για ένα μοντέλο που μιμείται πολλές παραμέτρους νεφρικών νοσημάτων που οδηγούν σε νεφρική ίνωση
- Εξελίσσεται σε μικρό χρονικό διάστημα . Σε 8-10 ημέρες έχουμε εκτεταμένη ίνωση με σωληναριακές αλλαγές ατροφικού τύπου.
- Μελετάμε το νεφρικό παρέγχυμα για διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την απολίνωση (2, 8 και 17 ημέρες)

Ευρήματα από την πρωτεομική

- Τρανσγκελίνη (transgelin)
- CLIC4 (Chloride Intracellular Channel 4)
- Καλρετικουλίνη (calreticulin)
- 14-3-3σ (στρατιφίνη) (stratifin)

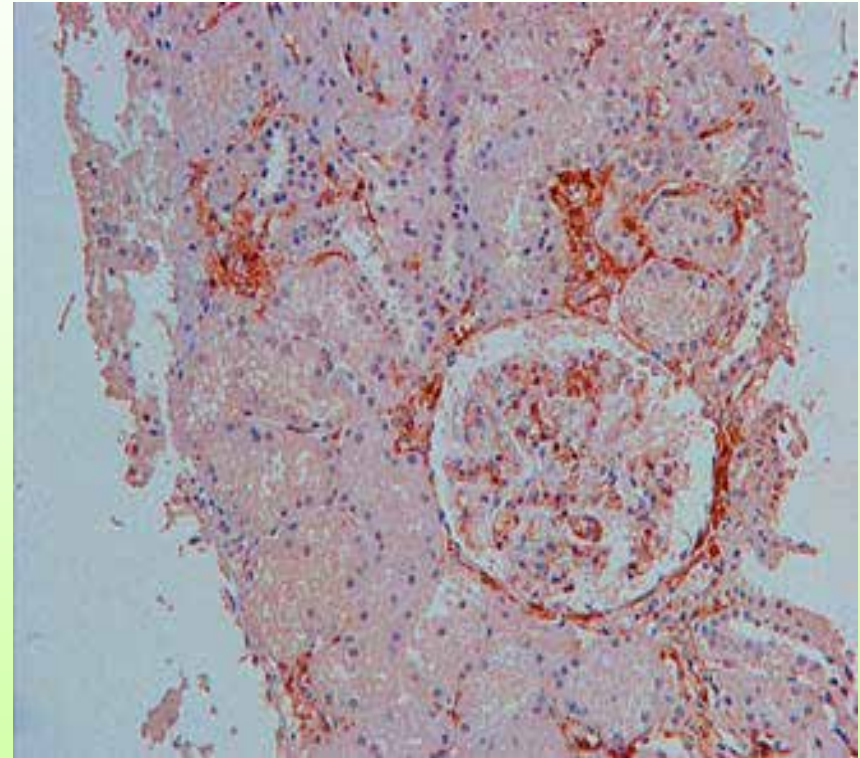
Transgelin

Η τρανσγκελίνη (γνωστή και σαν SM22) είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την ακτίνη

Βρίσκεται σε φυσιολογικές συνθήκες στις λείες μυϊκές ίνες, κυρίως στα αγγεία.

Σε παθολογικές καταστάσεις στο νεφρικό παρέγχυμα ανιχνεύεται και ενδοσπειραματικά αλλά και σε επιμήκη κύτταρα που περιβάλλουν σπειράματα και σωληνάρια

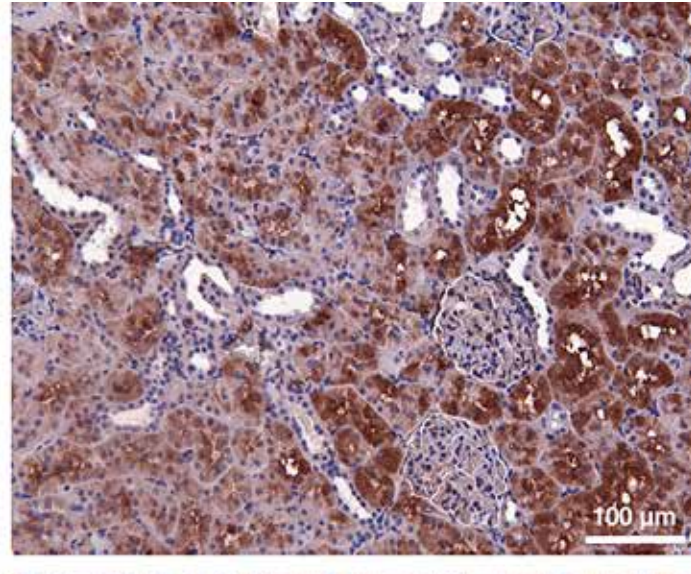
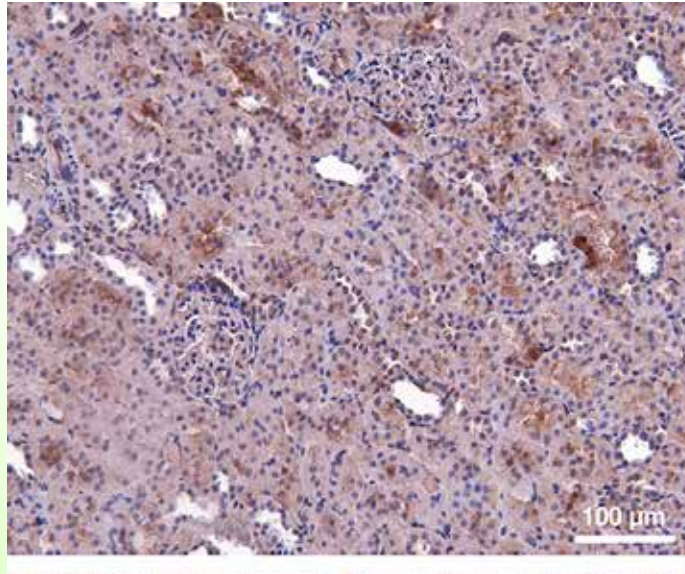
Επίσης, σε παθολογικές καταστάσεις ανιχνεύεται και ενδοπυρηνικά



Karagianni et al, PLoS One 8:e66887, 2013

Gerolymos et al, Nephron Clinical Practice 19:74, 2011

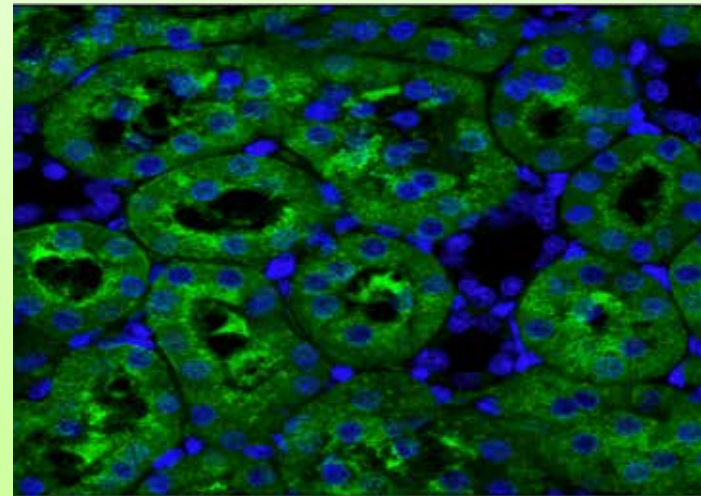
CLIC4 (Chloride Intracellular Channel 4)



Πρόκειται για αντλία χλωρίου που δεν έχει μέχρι τώρα εμπλακεί σε υπερτασική νεφροσκλήρυνση

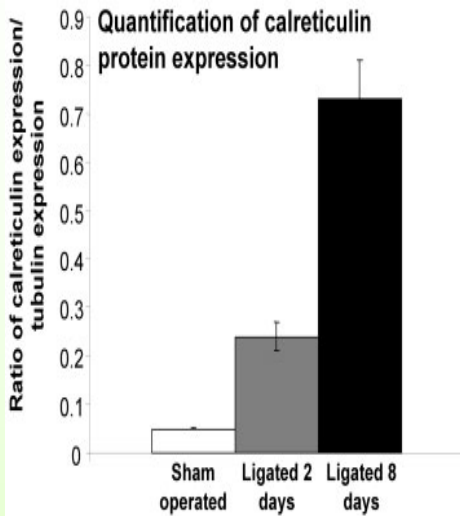
Υπερεκφράζεται από τα πιο αρχικά στάδια (6 εβδομάδες) στα υπερτασικά ζώα

Ένδειξη ότι η υπέρταση προκαλεί αλλαγές από νωρίς και στο σωληναριακό διαμέρισμα του νεφρού

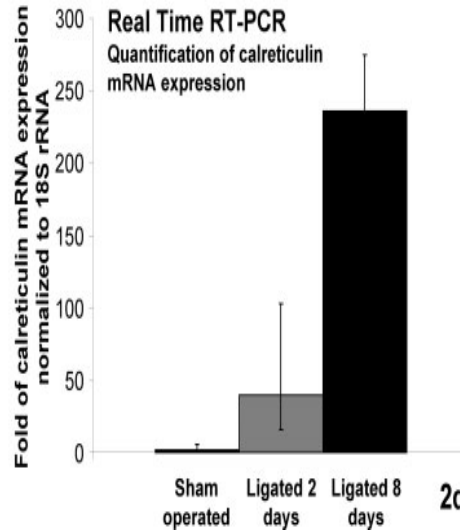


Μπάρκας , Πόστερ Π43, Παρασκευή

Καλρετικουλίνη (calreticulin)



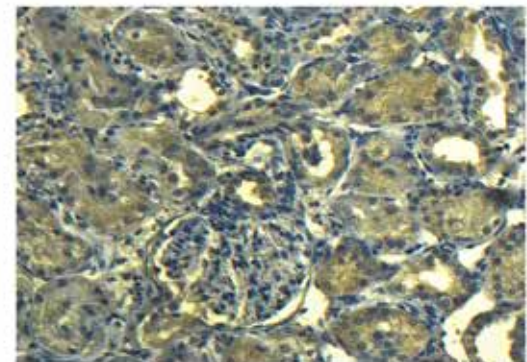
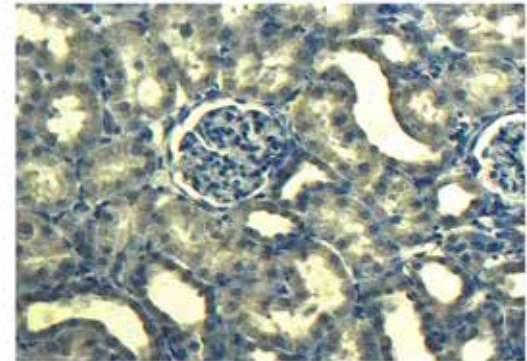
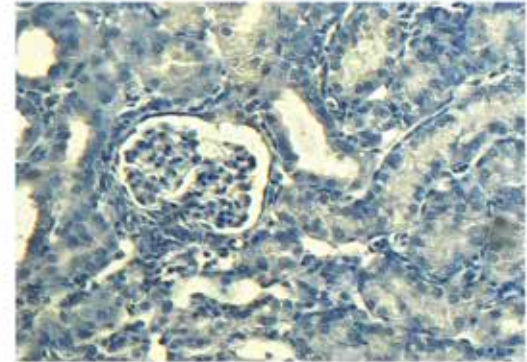
2b



2d

Η καλρετικουλίνη είναι μία πρωτεΐνη του ΕΔ, που εμπλέκεται στην ομοιοστασία ιόντων ασβεστίου

Η υπερέκφρασή της στο πειραματικό μοντέλο ουρητηρικής αποφραξης εντοπίζεται στα επιθηλιακά σωληναριακά κύτταρα



Με ποιο μοριακό μηχανισμό αυξάνεται η έκφραση της καλρετικουλίνης;

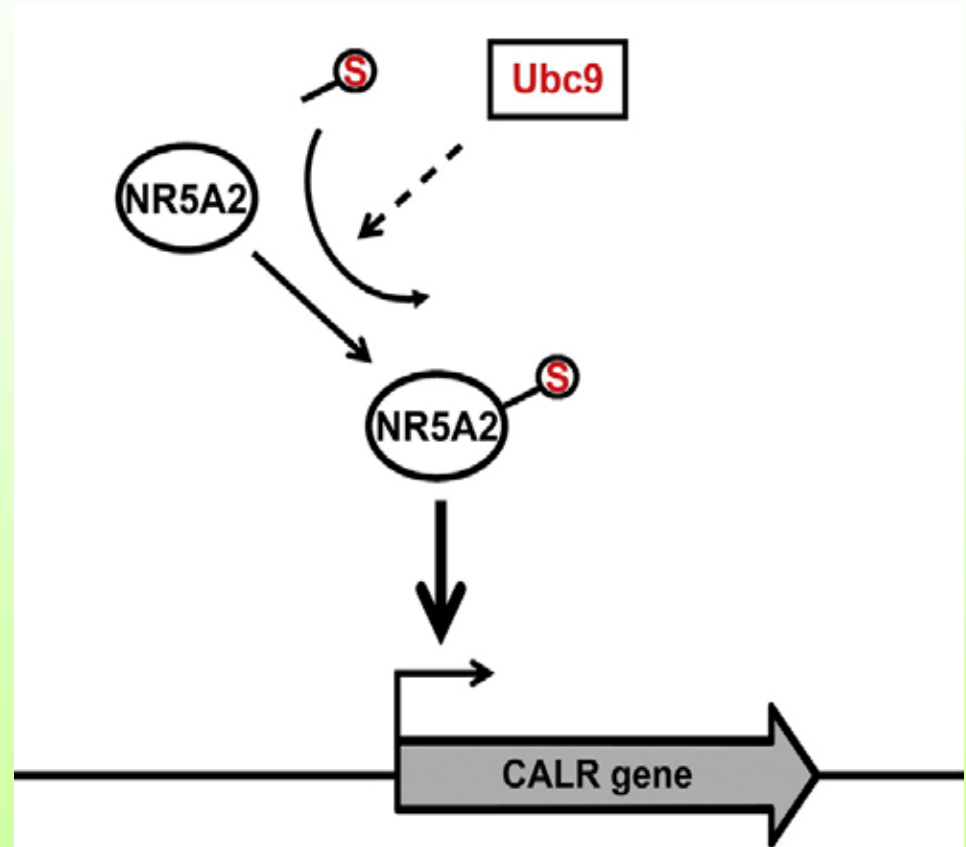
Η μεταγραφική ρύθμιση γίνεται κυρίως στο υποκινητή κάθε γονιδίου

Εφαρμόσαμε την τεχνική ανοσοκαθίζησης χρωματίνης και αναζητήσαμε τους μεταγραφικούς παράγοντες που παίζουν ρυθμιστικό ρόλο

Μεταξύ αυτών (18) βρήκαμε ότι βασικό ρόλο παίζει ο μεταγραφικός παράγοντας NR5A2

Ο ρόλος του ρυθμίζεται από μια μετα-μεταγραφική αλλαγή, του σουμοϋλίωση

Επιβεβαιώσαμε σε πειραματικό μοντέλο την αύξηση της έκφρασης του NR5A2 και του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη σουμοϋλίωση



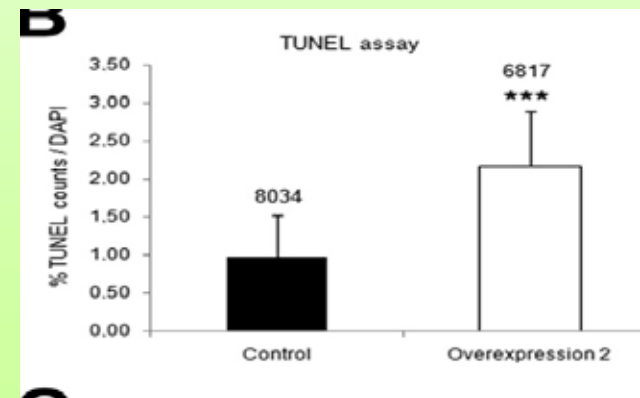
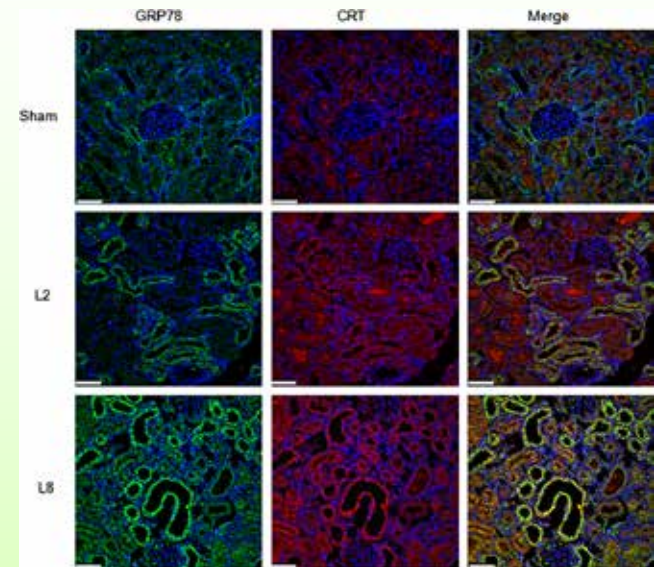
Ποιό είναι το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της καλρετικουλίνης;

Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήσαμε κυτταροκαλλιέργειες με διαμόλυνση με το γονίδιο της καλρετικουλίνης και πειραματόζωα με ουρητηρική απόφραξη

Βρήκαμε σημαντικές φαινοτυπικές αλλαγές:

- μείωση της κυτταρικής συνάφειας,
- αύξηση της παραγωγής ειδικού τύπου εξωκυττάριας ουσίας,
- αύξηση της παραγωγής TGFβ
- αυξημένο κυτταρικό στρες και
- αυξημένη απόπτωση

Κάναμε πρωτεομική ανάλυση των κυττάρων που υπερεκφράζουν καλρετικουλίνη



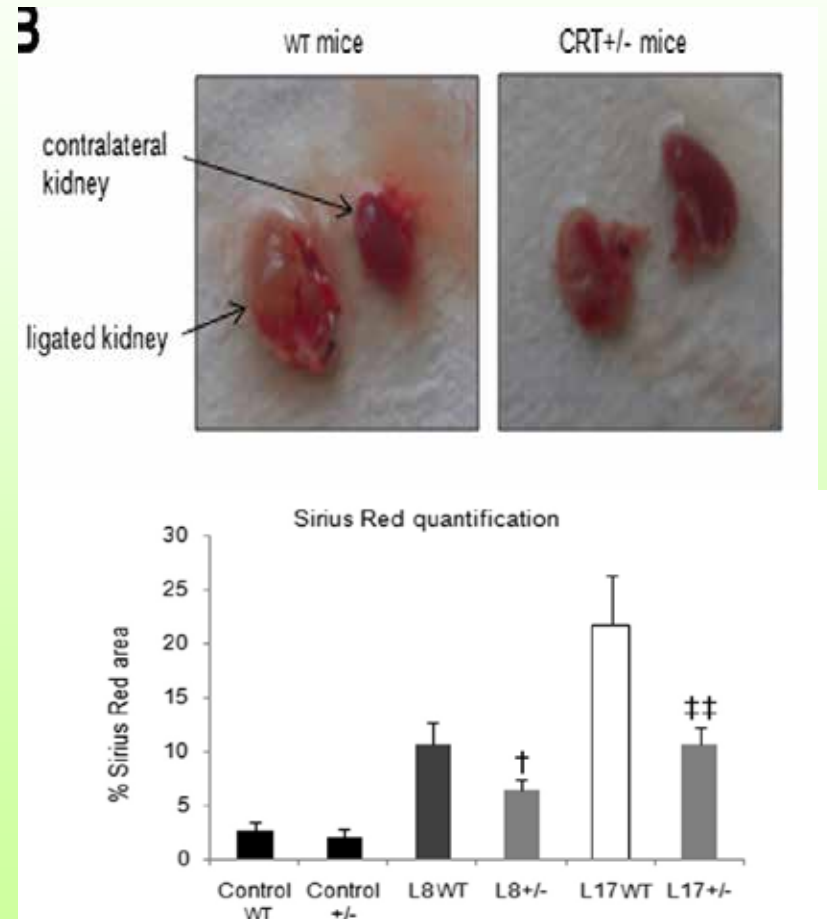
Αν η αυξημένη καλρετικουλίνη συμμετέχει στην ίνωση, μπορούμε να επιβραδύνουμε την ίνωση μειώνοντας την καλρετικουλίνη;

Χρησιμοποιήσαμε πειραματόζωα που είχαν μειωμένη έκφραση καλρετικουλίνης

Μετά από μονόπλευρη ουρητηρική απόφραξη είδαμε μακροσκοπικά βελτίωση της εικόνας του νεφρού

Είδαμε μικροσκοπικά άθροιση πολύ λιγότερης εξωκυττάριας ουσίας

Τι συμβαίνει σε μοριακό επίπεδο;



Τι συμβαίνει σε μοριακό επίπεδο όταν μειώσουμε την έκφραση της καλρετικουλίνης;

Μειωμένη καλρετικουλίνη οδηγεί σε:

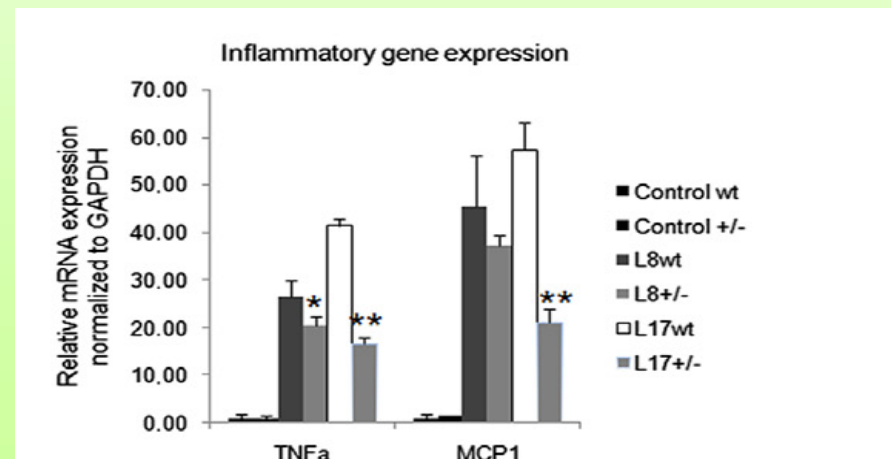
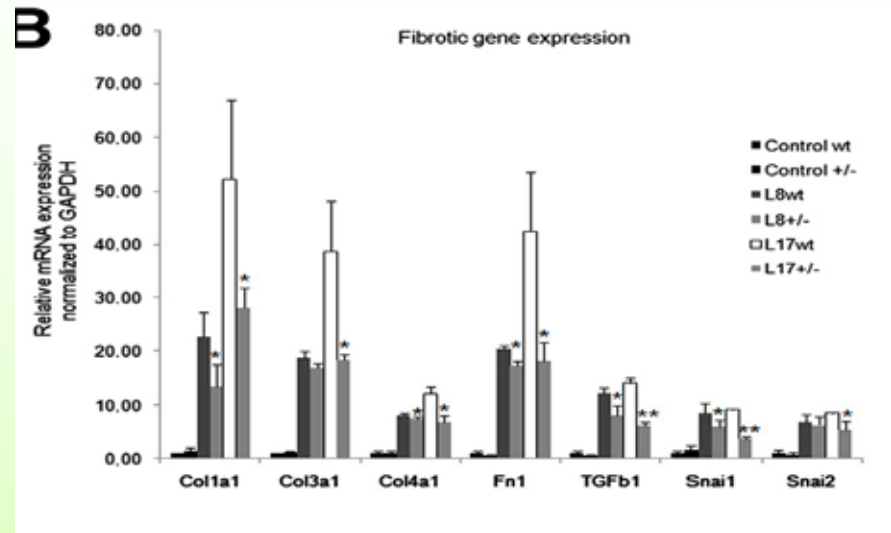
Μείωση της έκφρασης των γονιδίων κολλαγόνου I, II και IV

Μείωση της έκφρασης του γονιδίου της ινονεκτίνης

Μείωση της έκφρασης του γονιδίου του TGFβ

Μείωση της έκφρασης του γονιδίου της θρομβοσπονδίνης, που ενεργοποιεί τον TGFβ

Μείωση της έκφρασης των προ-φλεγμονωδών γονιδίων TNFα και MCP1



Πρωτεομική ανάλυση των κυττάρων που υπερεκφράζουν καλρεκουλίνη

Ανάλυση κυτταρικών σειρών

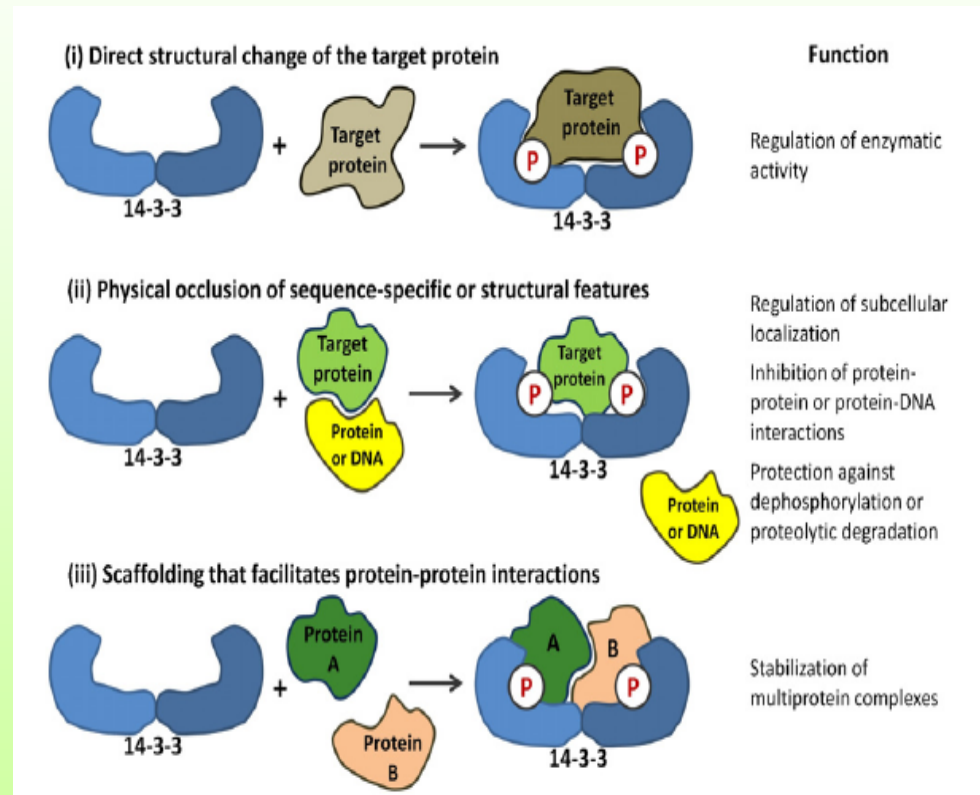
Σχηματισμός πινάκων και ταξινόμηση πρωτεϊνών σε δίκτυα

Η οικογένεια των πρωτεϊνών 14-3-3 (7 μέλη) εμφανιζόταν σε πολλά δίκτυα

Εστιάσαμε τις μελέτες μας σε αυτή την οικογένεια, γιατί παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σημάτων

Επιβεβαιώσαμε την υπερέκφραση μελών της οικογένειας και σε κυτταροκαλλιέργειες και σε πειραματικά μοντέλα

Εστιάσαμε τις μελέτες μας ειδικά στην 14-3-3σ που λέγεται και **στρατιφίνη**



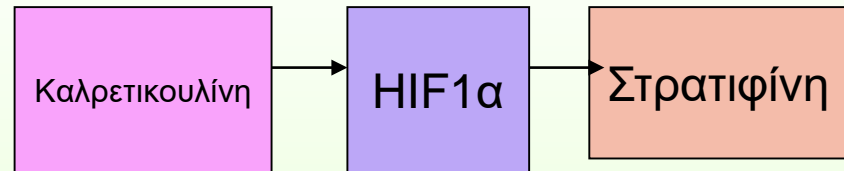
Πώς επάγεται και τι σημασία έχει η στρατιφίνη για τις νεφροπάθειες

Μελέτες και σε κυτταροκαλλιέργειες και σε πειραματικά μοντέλα έδειξαν ότι:

Η υπερέκφαρη της καλρετικουλίνης οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής HIF1α, του κλασσικού μεταγραφικού παράγοντα στην υποξεία

Η αύξηση των επιπέδων του HIF1α οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής του γονίδιου της στρατιφίνης

Ο HIF1α προσδένεται ειδικά σε θέσεις του υποκινητή του γονίδιου της στρατιφίνης



[Keratins are novel markers of renal epithelial cell injury.](#)

Djudjaj S, **Papastiriou M**, Bülow RD, Wagnerova A, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Strnad P, **Goumenos DS**, Floege J, Boor P.

Kidney Int. 2016 Apr;89(4):792-808.

Μπορούμε να παρέμβουμε φαρμακολογικά ;

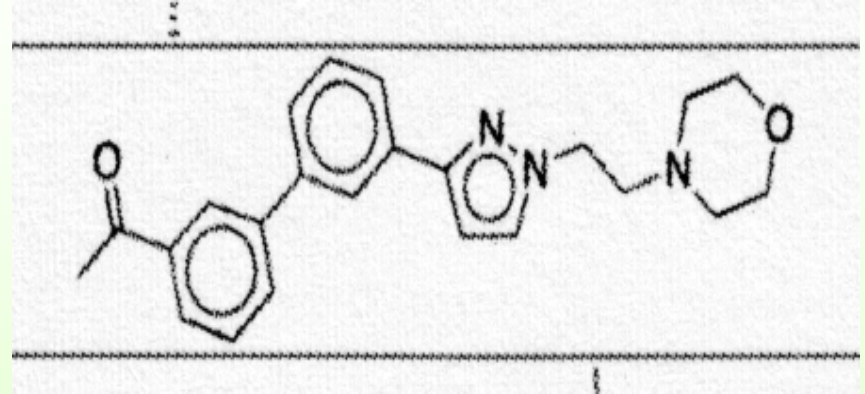
---Σε επίπεδο μεταγραφής

Με μόρια που ανταγωνίζονται τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα NR5A2 στον υποκινητή του γονίδιου της καλρετικουλίνης

---Σε επίπεδο μετάφρασης

Με μόρια που μέσω αναγνώρισης της αλληλουχίας του mRNA της καλρετικουλίνης μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της παραγόμενης πρωτεΐνης

ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ



[Activation of Notch3 in Glomeruli Promotes the Development of Rapidly Progressive Renal Disease.](#) El Machhour F, Keuylian Z, Kavvas P, Dussaule JC, **Chatziantoniou C.** J Am Soc Nephrol. 2015 Jul;26(7):1561-75.

[Targeting connexin 43 protects against the progression of experimental chronic kidney disease in mice.](#) Abed A, Toubas J, Kavvas P, Authier F, Cathelin D, Alfieri C, Boffa JJ, Dussaule JC, **Chatziantoniou C,** Chadjichristos CE. Kidney Int. 2014 Oct;86(4):768-79.

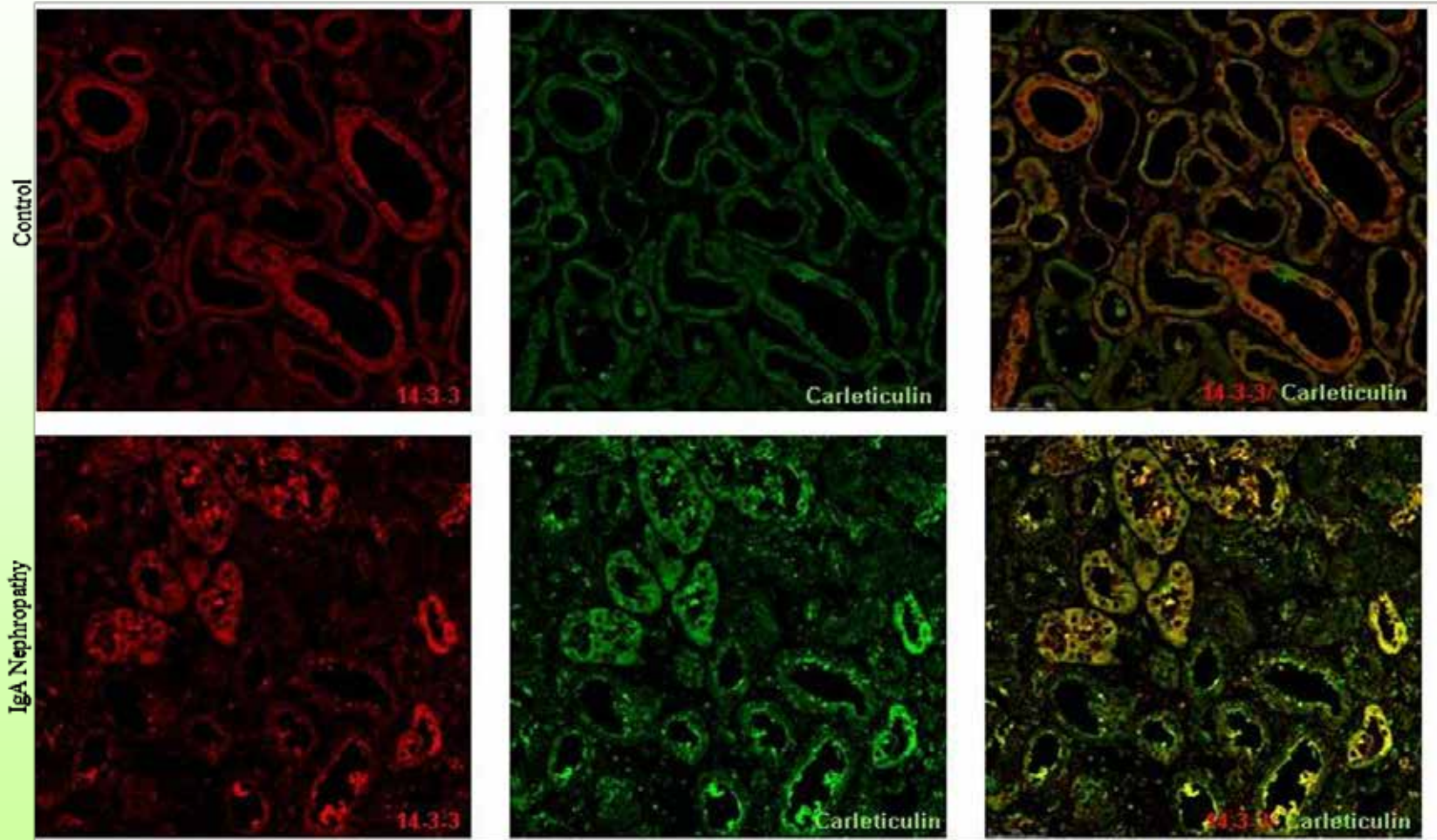
[Inhibition of periostin expression protects against the development of renal inflammation and fibrosis.](#) Mael-Ainin M, Abed A, Conway SJ, Dussaule JC, **Chatziantoniou C.** J Am Soc Nephrol. 2014 Aug;25(8):1724-36.

[Genetic inhibition of discoidin domain receptor 1 protects mice against crescentic glomerulonephritis.](#) Kerroch M, Guerrot D, Vandermeersch S, Placier S, Mesnard L, Jouanneau C, Rondeau E, Ronco P, Boffa JJ, **Chatziantoniou C,** Dussaule JC. FASEB J. 2012 Oct;26(10):4079-91.

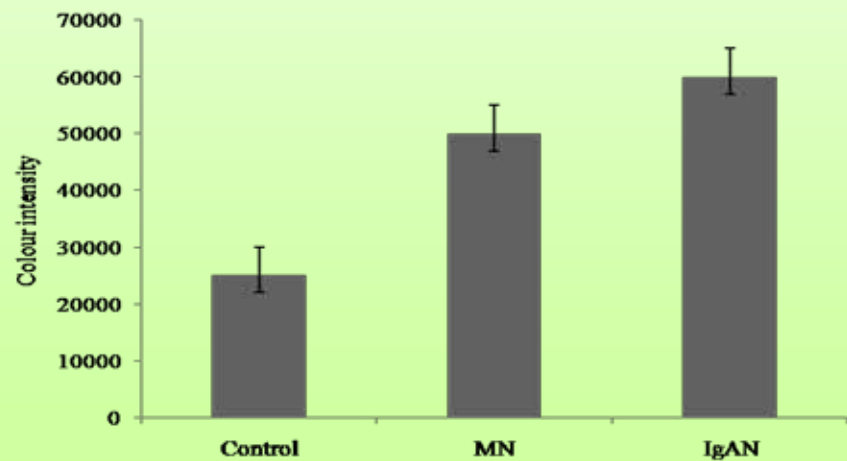
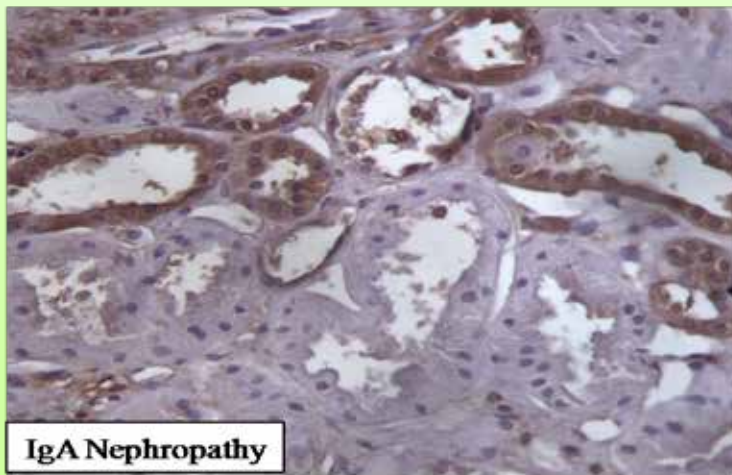
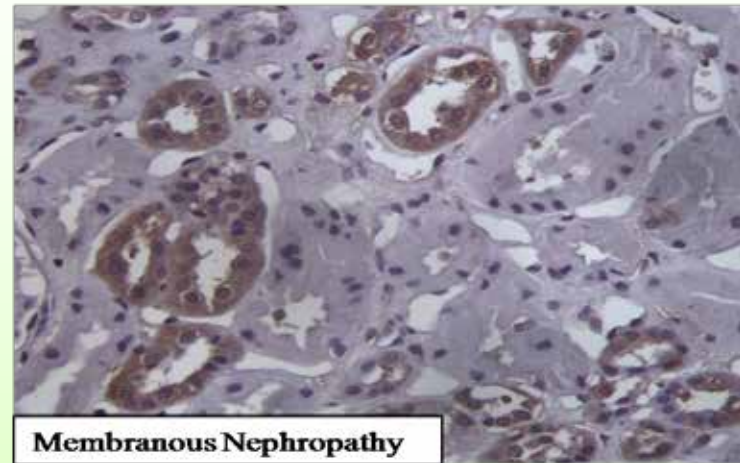
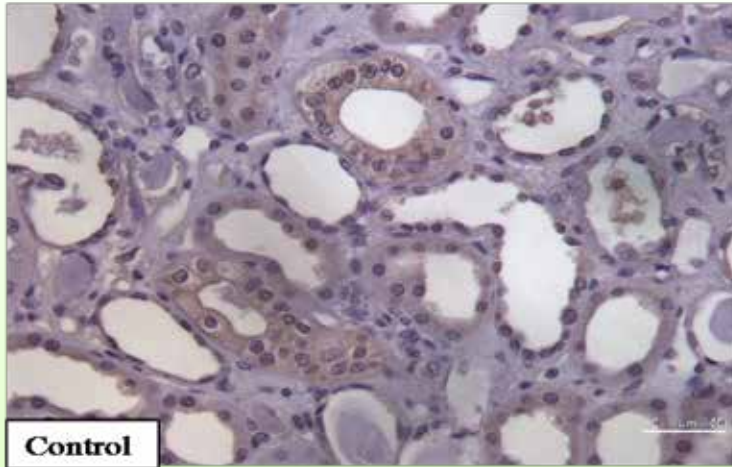
Ευρήματα σε βιοψικό υλικό

- Εξετάσαμε 33 περιπτώσεις IgA νεφροπαθειών με βιοψικό υλικό που κάλυπτε όλα τα είδη αλλοιώσεων και 10 περιπτώσεις μεμβρανώδους νεφροπάθειας
- Στο 100% των περιπτώσεων, σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα ειδικά των άπω εσπειραμένων σωληναρίων εμφάνιζαν έντονη υπερέκφραση καλρετικουλίνης και πρωτεΐνων 14-3-3.

Τυπική περίπτωση βιοψίας ασθενούς με IgA νεφροπάθεια – μελέτη με ανοσοφθορισμό



Τυπική εικόνα βιοψιών ασθενών με IgA και μεμβρανώδη νεφροπάθεια- μελέτη με ανοσοϊστοχημεία



Που εντάσσονται τα ευρήματα

Οι μελέτες μας καθώς και οι μελέτες πολλών άλλων εργαστηρίων στοχεύουν στη **δημιουργία ειδικών αλγορίθμων**

Με τους οποίους

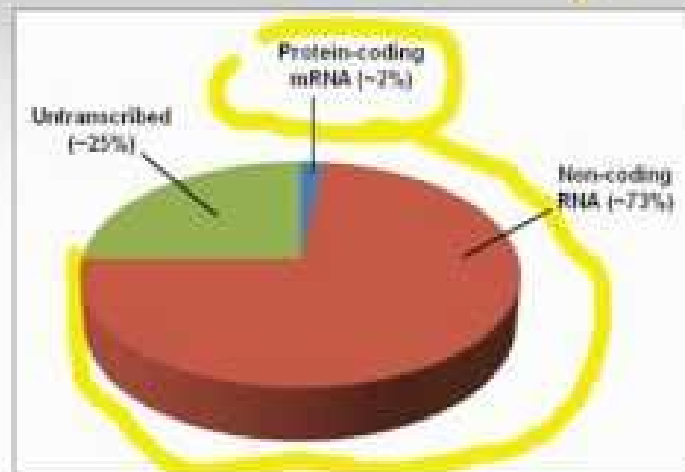
Εντοπισμός μεταβολών στην έκφραση πολλών πρωτεϊνών θα οδηγεί σε **αξιόπιστα προγνωστικά και διαγνωστικά συμπεράσματα**

Κάτι άλλο

- Μέχρι τώρα μιλήσαμε για πρωτεΐνες
- Άς μιλήσουμε για κάποια άλλη κατηγορία μακρομορίων
- RNA

Μεταγραφή του ανθρώπινου γονιδιώματος

Transcription of the Human genome



Adapted from Djebali S, Davis, et al. (2012). Nature 489, 101

RNAseq

Η τεχνική αυτή περιγράφεται και ως
whole transcriptome shotgun sequencing (WTSS)

Χρησιμοποιεί τις δυνατότητες της τεχνικής αλληλούχισης
νέας γενεάς - **Next Generation Sequencing (NGS)**
για να αποκαλύψει τη στιγμιαία αλλά πλήρη εικόνα όλων
των μορίων RNA που βρίσκονται σε κάποιο δείγμα τη
συγκεκριμένη χρονική στιγμή

Προσφέρει
και ποιοτική
και ποσοτικοποιημένη πληροφορία

Στο μεταγράψωμα υπάρχουν πολλά είδη RNA
Εμείς εστιάζομαστε σε μια υποκατηγορία τους, τα

- **Long non-coding RNAs (lncRNAs)**
(Επιμήκη μη κωδικοποιά ριβονουκλεϊνικά οξέα)

Αριθμός βάσεων > 200

Μοιάζουν με τα γονίδια που κωδικοποιούν
πρωτεΐνες

Λειτουργική σημασία και μηχανισμοί δράσης

Γιατί είναι λειτουργικά σημαντικά

Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης πολλών lncRNAs έχουν συνδεθεί με
---αναπτυξιακές διεργασίες και με
---παθολογικές καταστάσεις

Μηχανισμοί δράσης:

Δομικές δράσεις

Ενεργούν σαν καλούπια για σύνδεση και αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών και ριβονουκλεϊνικών οξέων

Λειτουργικές δράσεις

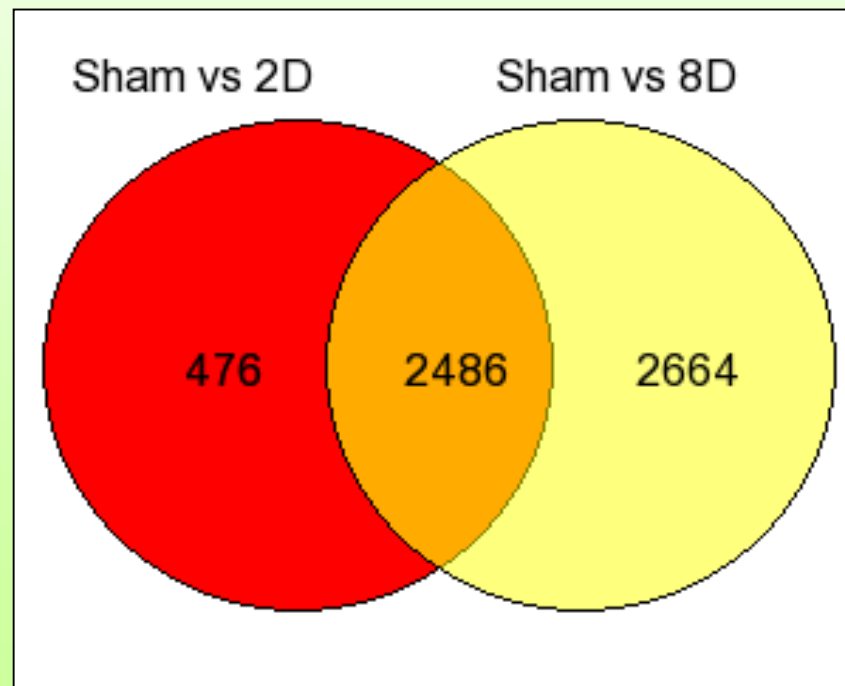
Παρέμβαση και έλεγχος της μεταγραφής

RNAseq στη νεφρική ίνωση στο ποντίκι

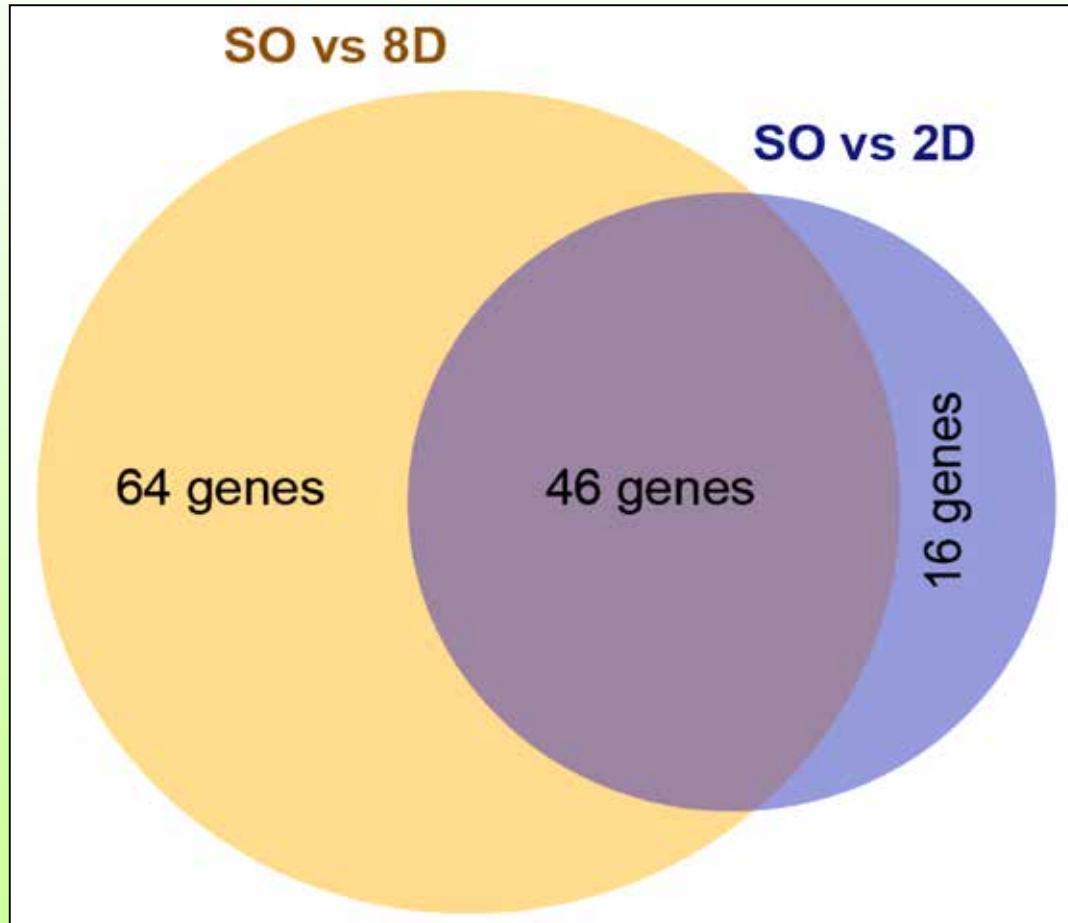
Χρησιμοποιήσαμε την τεχνική στο μοντέλο της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης

Καταγράψαμε χιλιάδες διαφορεικά εκφραζόμενα γονίδια

Για γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, δημιουργήσαμε λίστες με ενδιαφέροντα μέλη, μερικά από τα οποία ενοχοποιούνται για πρώτη φορά στη διαδικασία της ίνωσης



Διαφορικά εκφραζόμενα LncRNAs στο πειραματικό μας μοντέλο



Σύγκριση ποντικού-ανθρώπου σχετικά με τα μακρά μη κωδικοποιά RNA

Για να μεταφερθούμε από το πειραματόζωο στον άνθρωπο, υιοθετήσαμε δύο κριτήρια:

---Ιστοειδικότητα στην έκφραση

---Υψηλή συντήρηση της αλληλουχίας του υποκινητή

Μανωλάκου και συν, Προφορική Παρουσίαση Σάββατο

RP11-373L24.1

Snhg1

Snhg5

Snhg6

Snhg7

LOC102723471

TMEM161B-AS1

LINC00235

Fam120aos

LINC00675

RP11-798M19.6

LINC01187

C11orf96

Mir142 long version (RP5-1171I10.5)

Neat1

Mir17hg

Malat1

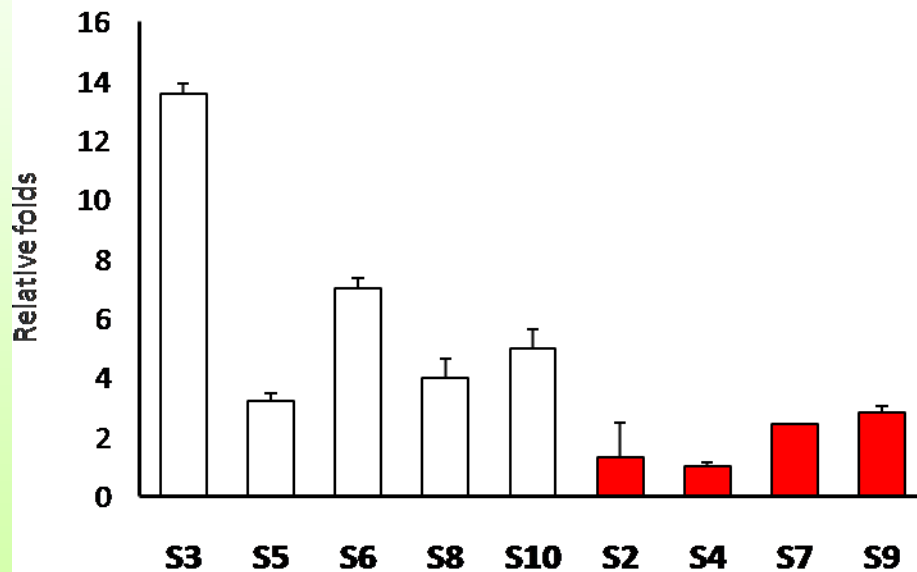
Για το LINC01187

- Δείγματα από Aachen
- Δείγματα από Regensburg
- Αποτελέσματα από Munich Bank

Το LINC01187 μειώνεται δραστικά σε παθολογικές καταστάσεις

Δείγματα από το Aachen

LINC01187 RNA Expression level

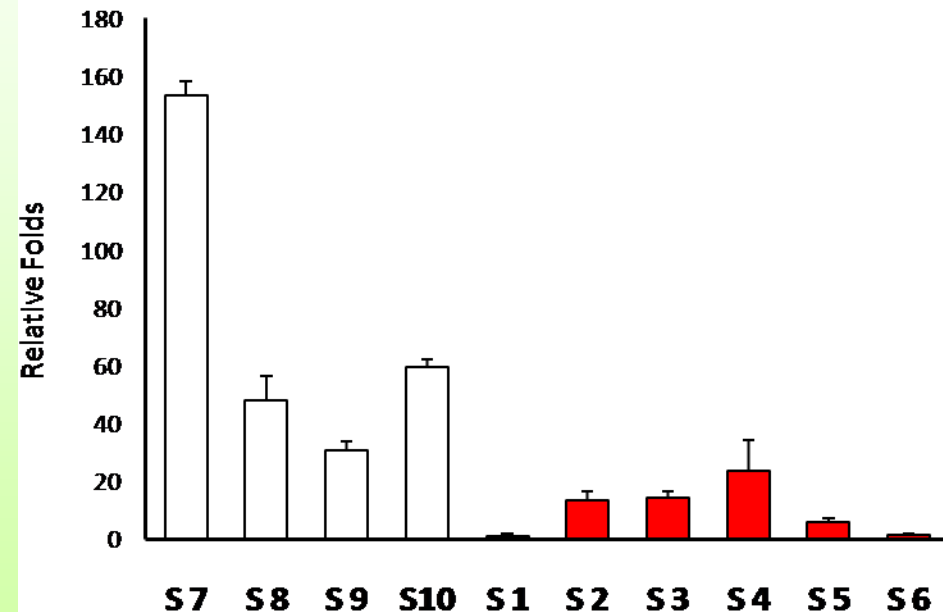


$P < 0.05$

S3-S5-S8-S10: Control samples
S2-S4-S7-S9 : Patient samples-
kidney fibrosis

Δείγματα από το Regensburg

LINC01187 RNA Expression level

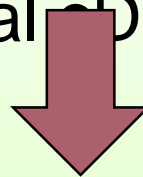


$P < 0.05$

S7-S10 : Control samples
S1-S6: Patient samples

Το LINC01187 μειώνεται δραστικά σε παθολογικές καταστάσεις

Υλικό από βιοψίες όπου έγινε διαχωρισμός
σπειραμάτων και σωληναρίων με μικροτομή
European Renal cDNA Bank (ERCB)

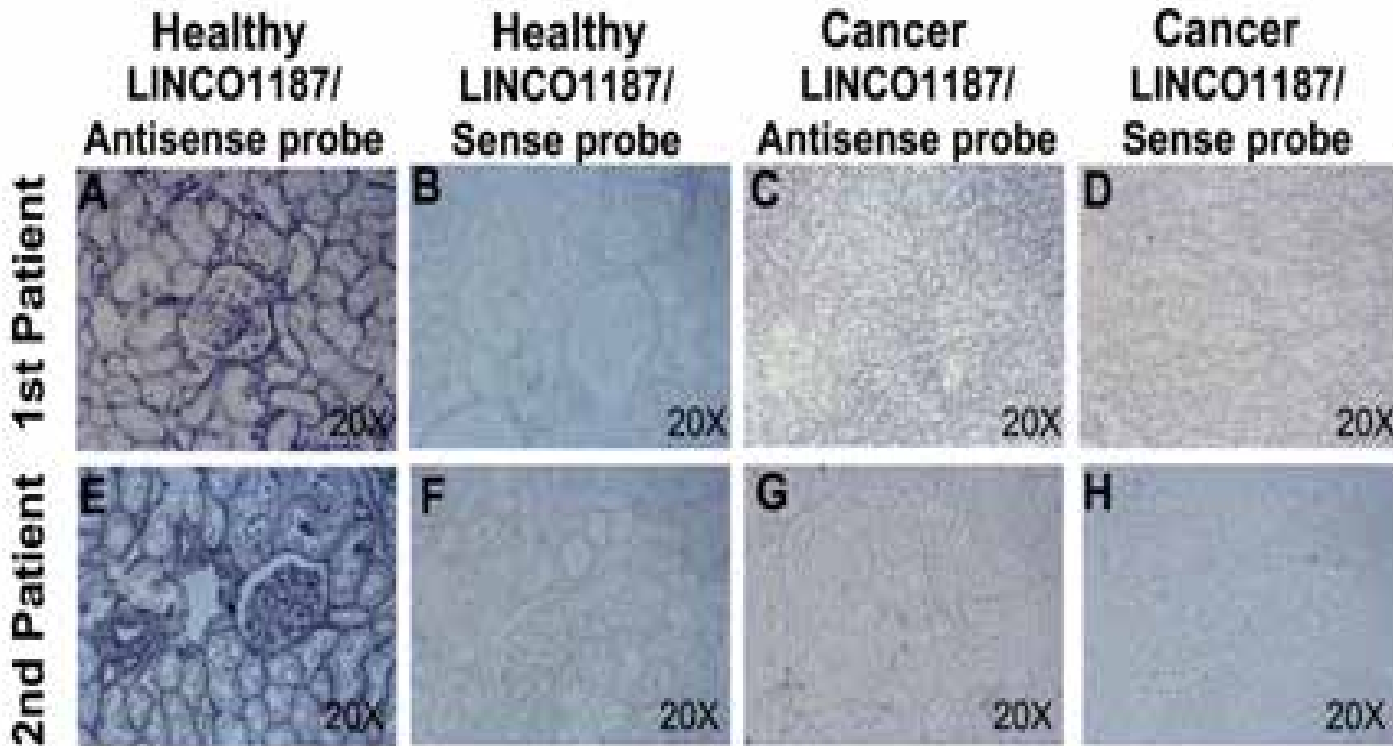


Η έκφραση του LINC01187

ΜΕΙΩΝΕΤΑΙ ΔΡΑΜΑΤΙΚΑ σε

- ο Ταχέως Εξελισσόμενη Σπειραματονεφρίτιδα
 - ο Διαβητική Νεφροπάθεια
- και στα σπειράματα και στα σωληνάκια

Ποια κύτταρα το παράγουν ;



Μανωλάκου και συν, Προφορική παρουσίαση
Σάββατο

**Τα lncRNAs θα
αποτελέσουν στο μέλλον
νέους
φαρμακολογικούς στόχους;**

Ευχαριστίες

Κατερίνα Κυπρέου
Παναγιώτης Καββαδάς
Νίκη Πράκουρα
Έλενα Φράγκου
Έλενα Αρβανίτη
Μυρτώ Ρίζου
Αθηνά Βακράκου
Φιλιώ Μαρινέλη
Μένια Παναγιώτου
Δώρα Μανωλάκου

Βαλέρια Καλτεζιώτη

Παναγιώτης Πολίτης
Τώνια Βλάχου
Μάκης Ζωϊδάκης
Μανούσος Μακριδάκης
Στέλιος Ψαρράς

Νίκος Κωστομητσόπουλος
Μιχάλης Κασιμπουλας
Κώστας Βουγάς

Christos Chatziantoniou
Marek Michalak
Παναγιώτης Μούλος
Yoshito Ihara

Ενίσχυση από
ΓΓΕΤ, ΙΙΒΕΑΑ, FP7

Χαρά Γακιοπούλου
Γιώργος Λιάπης

Νίκος Αφεντάκης
Δημήτρης Βλαχάκος
Δημήτρης Γούμενος
Ευγένιος Δαφνής
Χρήστος Ιατρού
Γιάννης Μπολέτης
Στέλιος Παναγούτσος
Μάκης Πασαδάκης

Σχετικά με τη Βασική Έρευνα στη Νεφρολογία

2009 Οργανώθηκε το 21^ο European Renal Cell Study Group στους Δελφούς

2019 28-31 Μαρτίου, θα γίνει το
31st European Renal Cell Study Group
στο Καλαμάκι Κορινθίας

ΕΙΣΤΕ ΟΛΟΙ ΕΥΠΡΟΣΔΕΚΤΟΙ