UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Disertační práce

Signalizace protein kinázy B a exprese cyklooxygenáz v časných fázích diabetické nefropatie

Mgr. Jana Ždychová

Institut klinické a experimentální medicíny
Vídeňská 1958/9
140 21 Praha 4

Praha, 2008

Autor a adresa pro korespondenci:

Mgr. Jana Ždychová
Centrum diabetologie
Institut klinické a experimentální medicíny
Vídeňská 1958/9
140 21 Praha 4
Telefon: 26136 2124
E-mail: jana.zdychova@post.cz

Školitel:

doc. MUDr. Radko Komers, CSc.
Centrum diabetologie
Institut klinické a experimentální medicíny

Prohlašuji tímto, že jsem disertační práci na téma: ***Signalizace protein kinázy B a exprese cyklooxygenáz v časných fázích diabetické nefropatie*** zpracovala sama pouze s využitím pramenů v práci uvedených.

Jana Ždychová

Mgr. Jana Ždychová

Poděkování :

Tato disertační práce byla vykonávána se souhlasem a podporou Centra diabetologie Institutu klinické a experimentální medicíny a 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze v rámci doktorského studia biomedicíny akreditovaného oboru Biologie a patologie buňky.

Chtěla by jsem touto cestou poděkovat školiteli doc. MUDr. Radko Komersovi, CSc. za odborné vedení v průběhu mého doktorského studia. Dále by jsem ráda poděkovala celému osazenstvu laboratoří za to, že vytvořili příjemné pracovní prostředí. Zejména by jsem chtěla poděkovat RNDr. Monice Cahové, PhD za obětavou a nezištnou pomoc.

Mé díky patří rovněž rodičům Karlovi a Elišce, bratrovi Petrovi a všem přátelům za jejich trpělivost a podporu.

ABSTRAKT

Úvod:
Akt kináza (Akt) je součástí kaskád převádějících signály vasoaktivních a růstových faktorů. Akt-dependentní procesy se podílejí na regulaci mechanismů relevantních pro renální patofyziologii jako jsou syntéza proteinů, viabilita, produkce NO, reabsorbce sodíku atd. Poruchy regulace renálních isoforem cyklooxygenáz produkujících biologicky významné prostanoidy mohou rovněž přispět k známým patofyziologickým mechanismům v rozvoji nefropatie a hypertenze jako důsledek molekulárních abnormalit při diabetu.

Cíl:
Práce je zaměřena na studium aktivity Akt a jejích efektorů, proteinů „mammalian target of rapamycin"(mTOR) a endoteliální NO syntázy (eNOS), spolu s expresí a aktivitou cyklooxygenázy 2 (COX2) v časných fázích diabetu a jejich úlohu v patofyziologii renálních morfologických a hemodynamických změn při diabetu.

Materiál a metody:
Aktivita Akt v renálním kortexu byla měřena pomocí kinázové assay. Exprese proteinů byla kvantifikována immunoblottingem. Studie byly prováděny na modelu DM1, tj. na potkanech u nichž byl diabetes navozen podáním streptozotocinu. Pokusná zvířata byla rozdělena do 3 skupin. První skupina diabetických zvířat byla ponechána bez léčby (STZ0), druhá skupina (STZ4) byla léčena 4 jednotkami insulinu denně a třetí skupina (STZ 12) byla léčena 12 jednotkami insulinu denně. Cílem rozdílného dávkování insulinu bylo navození různého stupně metabolické kontroly a inzulinemie. Potkany kmene Zucker (ZDF) a kontrolní Lean potkany (ZL) ve věku 4 a 12 týdnů jsme použili jako model DM2.

Výsledky:
U STZ potkanů odpovídala aktivita a exprese Akt a mTOR míře metabolické kompenzace s poklesem aktivity u hyperglykemických STZ0 potkanů a obnovou aktivity s ohledem na intenzitu léčby insulinem. ZDF potkani demontrovali nárůst aktivity Akt a mTOR spolu se zvýšenou expresí COX2 v závislosti na rozvoji metabolického syndromu na rozdíl od exprese aktivní eNOS, která byla za těchto podmínek snížená v porovnání s kontrolní skupinou. Akutní podání wortmanninu (100 μg/ kg) redukovalo produkci prostanoidů v moči spolu s renální aktivitou Akt a mTOR u ZDF, ale ne u kontrolní skupiny.

Závěr:
Pozorování u diabetických STZ potkanů ukazuje, že hodnota glykémie je spolu s intenzitou léčby insulinem důležitým modulátorem Akt/mTOR kaskády u DM1. Na rozdíl od alterace signalizace ve vasodilatační Akt/ eNOS kaskádě, nálezy nesvědčí pro přítomnost insulinové rezistence v hypertrofické kaskádě Akt/ mTOR u ZDF. Zvýšená exprese COX2 pak rovněž naznačuje progradující endotheliální dysfunkci u tohoto DM2 modelu. Zmíněné mechanismy tak mohou přispět k objasnění strukturálních a hemodynamických abnormalit asociovaných s časnými fázemi diabetické nefropatie v závislosti na metabolické kontrole a rozvoji metabolického syndromu.

SUMMARY

Introduction: Renal hypertrophy, extracellular matrix accumulation, altered apoptosis as well as changes in regional hemodynamics have been implicated in the pathophysiology of nephropathy in diabetes mellitus (DM). On the molecular level the detailed mechanisms for development of diabetic nephropathy (DN) have been intensively studied. Insulin induces a variety of biological effects in a number of cell types via phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt kinase signaling pathway. Considering multiple function of Akt that include potentially harmful pro-growth effects mediated by mTOR and cyclooxygenas-2 (COX-2), as well as protective effects mediated by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), it is possible that alterations in activities of Akt may play role in the pathophysiology of DN.

Aim: Renal cortical activity and expression of Akt, its down-stream effectors mTOR, eNOS, and COX-2, as well as PTEN, an endogenous Akt inhibitor, were investigated in streptozotocin (STZ)-diabetic rats as a model of Type 1 DM with different levels of glycemic control, and in Zucker diabetic fatty rats, a model of DM2, and in nondiabetic rats as controls.

Methods: Akt activity was measured by kinase assay. Protein expressions were measured by immunoblotting and immunohistochemistry in renal cortex of 4- and 12- week old Zucker rats (ZDF), and lean controls (ZL). STZ rats were treated with various doses of exogenous insulin per day (0U, 4U, 12U of insulin) to obtain different levels of metabolic control (STZ0, STZ4, STZ12). The measurements were made 4 weeks after induction of DM, and results were compared with age matched non-diabetic control rats (K).

Results: Physical and metabolic parameters in all groups of STZ and control rats reflected differences in metabolic control. In accordance with increased plasma insulin concentration, renal Akt activity and expression of active Akt (P-Ser 473-Akt) paralleled the differences in metabolic control and insulin treatment, with a significant reduction in STZ0 rats, partial restoration in moderately hypeglycemic STZ4 rats, and normalization in STZ12 rats, as compared to K. Expression of total Akt protein did not differ between groups. Expression of active mTOR corresponded to Akt activity in STZ0, but not in STZ4 and STZ12 that demonstrated increases in active mTOR as compared to K.

ZDF rats demonstrated age-dependent progressive hyperinsulinemia and other metabolic abnormalities. Renal Akt activity and P-Ser 473 Akt were significantly enhanced in ZDF12 as compared to ZL. PTEN protein expression was similar in ZDF and ZL rats. Corresponding to increases in renal Akt activity, ZDF12 rats demonstrated enhanced phosphorylation of mTOR, increased COX-2 expression and urinary secretion of prostanoids. In contrast to mTOR, eNOS phosphorylation was similar in ZDF and ZL rats, despite higher total eNOS expression. Acute PI3K inhibition with wortmannin (100 μg/kg), used as inhibitor of insulin signaling, attenuated renal Akt and mTOR activities and reduced prostanoid release in ZDF, but not in ZL rats.

Conclusions: Glycemic control and intensity of insulin treatment are important modulators of renal Akt and mTOR activity in experimental Type 1 DM. However, in addition to Akt, other signaling pathways contribute to renal mTOR activity in Type 1 DM. In experimental Type 2 DM, increased renal activity of Akt and mTOR suggests no resistance in insulin pro-growth signaling while vasodilator, and potentially protective Akt/ eNOS pathway is impaired in this condition. In addition, PI3K/ Akt signaling has been linked to increased renal expression and activity in COX-2, a known player in renal pathophysiology. Altogether, these findings support recently emerging evidence about the role of alterations in renal Akt activity in the pathophysiology of nephropathy in DM.

Obsah :

1. Úvod do diabetické nefropatie a Akt signalizace (literární rešerše)

1.1. Diabetes mellitus 1
1.1.1. Diabetes typu I (DM 1) 1
1.1.2. Diabetes typu II (DM 2) 1

1.2. Základní aspekty diabetické nefropatie 2
1.2.1. Definice a epidemiologie....2
1.2.2. Stadia onemocnění a klinický průběh onemocnění....3
1.2.3. Patofyziologie 3
1.2.3.1. Metabolické faktory 3
1.2.3.1.1. Úloha hyperglykémie 3
1.2.3.1.1.1. Tvorba glykosylačních produktů 4
1.2.3.1.1.2. Hexosaminová cesta 4
1.2.3.1.1.3. Polyolová cesta 4
1.2.3.1.1.4. Oxidativní stres 5
1.2.3.2. Hemodynamické faktory 6
1.2.3.3. Cytokiny a růstové faktory 6
1.2.3.4. Úloha zánětu 7
1.2.3.5. Změny signální transdukce v diabetické ledvině 7
1.2.3.6. Úloha změn regulace buněčného růstu 7
1.2.4. Histopatologické změny....8
1.2.4.1. Histologický obraz v diabetické ledvině 8
1.2.4.2. Strukturně-funkční vztahy v diabetické ledvině 9

1.3. Modely zvířat používané pro studium diabetu 10
1.3.1. Hlodavci jako model nefropatie 10
1.3.1.1. STZ potkan - model DM1 10
1.3.1.2. Zuckerův potkan – model DM2 10

1.4. Úvod do biologie Akt kinázy 11
1.4.1. Aktivace Akt kinázy závislá na fosfatidylinositol-3-kináze 13
1.4.2. Aktivace Akt kinázy nezávislá na fosfatidylinositol-3-kináze 14
1.4.3. Regulace aktivity Akt 14
1.4.4. Efektory a fyziologické důsledky aktivace Akt 15
1.4.4.1. Metabolické funkce 15
1.4.4.2. Efekt Akt na syntézu proteinů 16
1.4.4.3. Zapojení Akt v antiapoptotických procesech a procesech buněčného přežívání....16
1.4.4.4. Zapojení Akt do regulace buněčného cyklu 17
1.4.4.5. Role Akt ve vaskulární biologii 17
1.4.4.5.1. Vasodilatace závislá na endotelu 17
1.4.4.5.2. Angiogeneze 17
1.4.5. Patofyziologie Akt kinázy při diabetu 18
1.4.5.1. Patofyziologie Akt při DM2 18
1.4.5.1.1. Úloha Akt při patofyziologii inzulinové rezistence 18
1.4.5.1.2. Akt a vaskulární komplikace při DM2 18

1.4.5.1.3. Akt signalizace v ledvinách při DM2 19
1.4.5.2. Patofyziologie Akt při DM1 19
1.4.5.2.1. Akt a insulitida 19
1.4.5.2.2. Akt a vaskulární komplikace při DM1 19
1.4.5.2.3. Akt signalizace v ledvinách při DM1 19

1.5. Úvod do biologie mTOR 20
1.5.1. Regulátory nadřazené signalizaci mTOR 20
1.5.1.1. Růstové faktory 22
1.5.1.2. Živiny a energie 22
1.5.2. Patofyziologie mTOR při diabetu 22
1.5.3. Patofyziologie mTOR a diabetická nefropatie 23

1.6. Úvod do biologie cyklooxygenáz 23
1.6.1. Exprese a aktivita cyklooxygenázových isoforem 24
1.6.2. Exprese a aktivita cyklooxygenázových isoforem v ledvinách 25

2. Cíle studie 26

3. Metody 27
3.1. Zvířecí modely diabetu použité ve studiích 27
3.1.1. Model DM1 27
3.1.2. Model DM2 27
3.2. Homogenizace tkáně 27
3.3. Akt kinázová assay 28
3.4. Immunoblotting 28
3.5. Immunohistochemie 28
3.6. Analytické metody 29
3.7. Statistická analýza 29

4. Studie I. 30
Renální aktivita Akt kinázy/ protein kinázy B u obézních Zuckerových potkanů
4.1. Úvod 30
4.2. Metody 30
4.2.1. Uspořádání pokusu 30
4.3. Výsledky 30
4.4. Diskuse 39
4.5. Shrnutí 40

5. Studie II. 41
Renální aktivita Akt kinázy/ protein kinázy B u streptozotocinových diabetických potkanů
5.1. Úvod 41
5.2. Metody 41
5.2.1. Uspořádání pokusu 41
5.3. Výsledky 41
5.4. Diskuse 46
5.5. Shrnutí 47

6. **Studie III. 48**
Renální cyklooxygenása 2 u obézního Zuckerova potkana
6.1. Úvod 48
6.2. Metody 48
6.2.1. Uspořádání pokusu 48
6.3. Výsledky 48
6.4. Diskuse 53
6.5. Shrnutí 54

7. **Závěry 55**

8. **Literatura 56**

9. **Přílohy 74**

Ždychová J, Kazdová L, Pelikánová T, Lindsley JN, Anderson S, Komers R. Renal activity of Akt kinase in Obese Zucker Rats. Experimental Biology and Medicine, 2008 (in press)

Ždychová J, Veselá J, Kazdová L, Komers R.Renal activity of Akt kinase in experimental Type 1 diabetes. Physiol Res. 2007 Oct 11. [Epub ahead of print]

Komers R, Ždychová J, Cahová M, Kazdová L, Lindsley JN, Anderson S. Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats. Kidney Int. 2005 Jun;67(6):2151-8.

Úvod do diabetické nefropatie a Akt signalizace (literární rešerše)

1.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je chronické endokrinní onemocnění vznikající jako následek řady faktorů zevních a genetických působících současně. V pravém slova smyslu není diabetes jednou chorobou, ale syndromem, jehož základem je nedostatečné působení insulínu projevující se zvýšením hladiny glukosy v krvi. Onemocnění zároveň postihuje i hospodaření s ostatními živinami a ovlivňuje tak celkovou přeměnu látek v organismu. Nedostatečné působení insulinu může být způsobeno buď jeho absolutním nedostatkem nebo jeho chybnou funkcí při relativním nadbytku insulinu. Díky tomu také rozlišujeme dva základní typy diabetu, které mají podobné manifestační projevy, ale odlišné příčiny vzniku.

1.1.1. Diabetes mellitus 1. typu (DM 1)

Vzniká nejčastěji v dětství nebo v mládí, může však vzniknout kdykoliv během života. Onemocnění se vyznačuje různě rychle probíhajícím zánikem B - buněk pankreatu vedoucím až k absolutnímu nedostatku insulinu. Léčba proto vždy vyžaduje celoživotní dodávání insulinu. Příčinou onemocnění je kombinace genetických vlivů, autoimunitního procesu a spouštěče, kterým může být např. virová infekce.

1.1.2. Diabetes mellitus 2. typu (DM 2)

Je nejběžnějším typem diabetu. K manifestaci onemocnění dochází nejčastěji po 40. roce života. Avšak z důvodů epidemie obezity již nejsou výjimkou ani mladší pacienti. DM2 je multifaktoriální onemocnění rozvíjející se postupně v důsledku insulinové rezistence a poruchy sekrece insulinu. Vznik DM2 je dáván do souvislosti s genetickými vlivy, nezdravou výživou, stresem, nedostatečným pohybem a zejména s nadváhou. Základem léčby onemocnění je dodržování diety. Další léčba spočívající v podávání léků. Pozdější insulinová léčba nastupuje až v případě, je-li předchozí léčba neefektivní. Hlavním předpokladem pro účinnou léčbu je trvalé snížení nadváhy a pravidelný pohybový a dietní režim.

1.2. Základní aspekty diabetické nefropatie

1.2.1. Definice a epidemiologie

Diabetická nefropatie (DN) je chronické progresivně postupující onemocnění vznikající na základě specifických morfologických a funkčních změn ledvin u pacientů s diabetem. Onemocnění je důsledkem spolupůsobení dlouhodobě působící hyperglykémie, dosud nepřesně definované genetické predispozice, hypertenze a řady dalších faktorů. Hlavními klinickými projevy DN jsou perzistující albuminurie (>300mg/ 24 hod), hypertenze a postupný pokles renálních funkcí. DN postihuje přibližně 30% DM1 pacientů. V zemích s dobrou úrovní diabetologické péče se daří v posledních letech podíl těchto pacientů snižovat díky včasnému zahájení nefroprotektivní léčby. Riziko vzniku DN u DM2 osob je obdobné, ale vzhledem k vysoké kardiovaskulární mortalitě údaje o výskytu DN u DM2 kolísají ve větším rozmezí než u DM1. Z důvodu vysokého počtu DM2 pacientů představuje DN u tohoto typu diabetu narůstající medicínský a ekonomický problém. Mimo to celosvětově existují značné rozdíly v incidenci onemocnění v různých etnických skupinách. U Afroameričanů, Asiatů a původních obyvatel Ameriky je riziko rozvoje onemocnění vyšší než u bílé populace (Muneta B a kol. 1993). DN je nejčastější příčinou chronického selhání ledvin v řadě vyspělých zemí (Ritz E 1999). Přibližně jedna třetina DM1 pacientů, u nichž byla diagnostikována manifestni DN dospěje bez terapeutické intervence do stádia selhání ledvin (ESDR). ESDR se rozvíjí u 50% těchto DM1 pacientů v průběhu 10 let a u 75% z nich po uplynutí 20 let. Kumulativní incidence ESDR je u DM2 pacientů nižší. Po 20 letech od objevení manifestní DN dosahuje hodnot kolem 20% (Molitch ME a kol. 2004). Mortalita, vysoké náklady a snížená kvalita života spojená s hemodialýzou motivují výzkum zabývající se příčinami a léčbou, která by buď zcela zabránila nebo alespoň výrazně omezila rozvoj onemocnění až do stádia ESDR. V současné době je léčebný postup zaměřen především na udržování uspokojivé metabolické kompenzace a úrovně sérových lipidů, kontrolu krevního tlaku s častou potřebou kombinační terapie několika různými typy antihypertenziv, dietu spočívající v omezení příjmu solí, tuků a bílkovin ve stravě a zákaz kouření. Ve fázi chronické renální insuficience je dále nutno korigovat případnou těžší acidózu a preventivně působit proti vzniku sekundární anemie a kostní choroby.

1.2.2. Stadia a klinický průběh onemocnění

Vývoj DN lze rozdělit u DM1 do 5 stadií. U DM2 jsou klinická stádia hůře definována, i když průběh onemocnění je obdobný.

Stadium 1. (hyperfiltračně hypertrofické) je charakterizováno zvětšením velikosti ledvin a zvýšením glomerulární filtrace (GFR) o 20-40%. (Mogensen CE a kol. 1983). V průběhu několika let přechází nemocnění do stadia 2 (latentní), kdy je klinicky zcela němé. Prvním klinicky prokazatelným stadiem DN je stadium 3. (incipientní DN), které se vyvíjí cca po 6-15 letech standardní léčby. Albuminurie dosáhne klinických hodnot (30-300 mg/ den). V tomto stadiu dochází rovněž ke vzestupu krevního tlaku, často v rámci normálních hodnot, a dle recentních poznatků lze u některých pacientů zaznamenat počínající pokles GFR. Stadium 4. se vyznačuje makroalbuminurií (>300mg/ 24 hod), což odpovídá proteinurii (>500mg/ 24 hod), hypertenzí a progresivním poklesem GRF. Paralelně výrazně narůstá kardiovaskulární riziko a sklon k anemii ve srovnání s nediabetickými pacinty se srovnatelnou GFR. Terminální stadium 5. se vyznačuje chronickým selháním ledvin vyžadujícím zařazení do programu náhrady funkce ledvin

1.2.3. Patofyziologie

Příčina vzniku DN je spatřována v souhře genetických, metabolických a hemodynamických faktorů. Relevantní faktory tak například zahrnují mechanický stres vzniklý důsledkem pozměněné glomerulární hemodynamiky, mechanismy spojené s působením hyperglykémie a faktorů diabetického milieu, jako například tvorbu pozdních produktů glykosylace (AGE), vystupňování polyolové cesty, zvýšenou tvorba volných radikálů, dále pak aktivaci prozánětlivých působků a růstových faktorů (angiotenzin II, transformující růstový faktor beta, endoteliální růstový faktor, atd.)

1.2.3.1. Metabolické faktory

1.2.3.1.1. Úloha hyperglykémie

Je známo, že u pacientů se špatnou metabolickou kontrolou je průběh DN rychlejší. Na molekulární úrovni je působení hyperglykémie spojováno mimo jiné s vystupňováním polyolové a hexosaminové cesty, tvorbou glykačních produktů , oxidačním stresem a dalšímu mechanismy. Metabolické faktory se rovněž samostatně nebo ve spoluprácí s hemodynamickými faktory podílejí na aktivaci kináz zapojených do přenosu signálu (např. protein kinázy C nebo mitogeny aktivované protein kinázy), nukleárních transkripčních faktorů (např. nukleární faktor kappa B), růstových faktorů a dalších faktorů přispívajících k patogenezi onemocnení (Cooper ME 1998, Wolf G 2004).

1.2.3.1.1.1. Tvorba glykosylačních produktů

Produkty pokročilé glykace (AGE) tvoří heterogenní skupinou látek vzniklých neenzymatickou glykací a vlivem oxidačního a karbonylového stresu. Tvorba AGE je dlouhodobý proces. Alterace tak postihují především proteiny s dlouhým poločasem jakými jsou bazální membrány nebo složky buněčné matrix a cévní komponenty (Heidland A a kol. 2001). AGE mohou přímo poškodit strukturu extracelulární matrix, změnit fyzikální a chemické vlastnosti proteinů, jejich metabolismus a funkce (Singh R a kol. 2001). AGE mohou rovněž působit přes specifické receptory RAGE (receptory pro AGE) náleží do rodiny imunoglobulinových receptorů běžně exprimovaných na površích buněk (Yamamoto Y a kol. 2001). Stimulace těchto receptorů vede k aktivaci kaskád nepříznivě ovlivňujících vitalitu, funkce a trofický stav buněk, neboť přispívá ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů s následnou aktivací nukleárního faktoru kappa B (NF-kappa B) a zvýšené syntéze cytokinů, růstových faktorů a adhezních molekul. Těmito účinky AGE je vysvětlována jejich účast na patogeneze závažných vaskulárních komplikací diabetu včetně nefropatie a renálního selhání (Singh R a kol 2001).

1.2.3.1.1.2. Hexosaminová cesta

Hexosaminová cesta představuje další možný směr metabolismu glukosy. Ta je nejprve zpracována v rámci procesu glykolýzy na fruktoso-6-fosfát a následně enzymem glutamin: fruktose-6-fosfát aminotransferázou konvertována na glukosamin-6-fosfát. Tato látka slouží jako prekursor pro syntézu glykoproteinů, glykolipidů, proteoglykanů a glykosaminoglykanů. Vystupňování hexosaminové cesty v konečném důsledku ovlivňuje buněčný růst, syntézu extracelulární matrix nebo oxidativní stres. Konkrétně v ledvinách je pak hexosaminová dráha zapojena například v transaktivaci genů extracelulární matrix skrze mechanismus zahrnující spolupůsobení transformujícího růstového faktoru beta a regulace aktivity cAMP rozpoznávajícího faktoru, na kterém se podílí protein kinázy A a C (Singh LP a kol. 2001, Singh LP a kol. 2004).

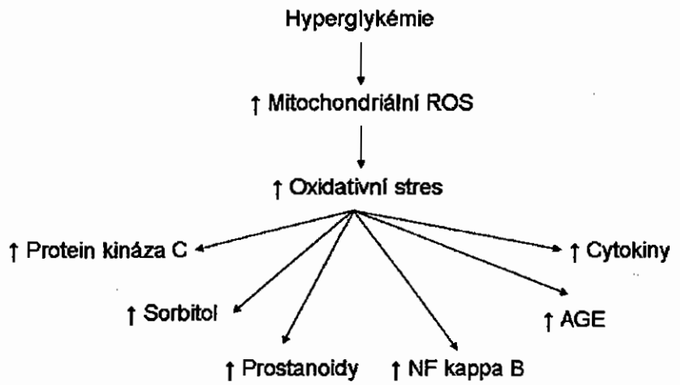
1.2.3.1.1.3. Polyolová cesta

V rámci polyolové cesty metabolismu glukosy je glukosa prostřednictvím aldosové reduktázy za přispění ko-faktoru nicotin amin fosfo dinukleotidu (NADPH) redukována na sorbitol. NADPH je nutný pro udržování hladiny nitrobuněčného glutathionu-důležitého antioxidantu. Spotřebovávání NADPH vystupňováním polyolové cesty tak přispívá k tvorbě ROS. Akumulace sorbitolu, k níž dochází v důsledku nadměrné dostupnosti glukosy při hyperglykemii, má tak mimo jiné za následek poruchu vnitrobuněčné homeostáze vzniklou na podkladě zvýšené osmolarity, imbalance redoxních potenciálů, zvýšené akumulace DAG a aktivace PKC isoforem, což vede k rozvoji četných komplikací diabetu včetně DN (Koya D a kol. 1997, Ii S a kol. 2004, Steffgen J a kol. 2003).

1.2.3.1.1.4. Oxidativní stres

Zvýšený oxidační stres je běžným patologickým faktorem diabetických komplikací. Základem oxidačního stresu je zvýšená tvorba reaktivních forem dusíku, kyslíku a lipoperoxidů, které nestačí zneškodnit antioxidační systém. Za diabetických podmínek byly například zjištěny snížené koncentrace kyseliny askorbové, alfa-tokoferolu spolu se sníženou aktivitou enzymů odstraňujících ROS jakými jsou superoxid dismutásy a glutathion. Reaktivní formy kyslíku (ROS) provádějí přímé oxidace spojené s poškozením struktury a funkce lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Přispívají tak k patogenezi diabetických komplikací (Brownlee M. 2001). Mimo to se ROS rovněž podílí na regulaci mnoha buněčných procesů včetně proliferace, kontroly buněčného cyklu nebo apoptosy a to díky ovlivňování procesu buněčné signalizece na mnoha úrovních (Thannickal VJ a Fanburg BL 2000, Kunsch C a Medford RM.1999).

Aerobní metabolismus obratlovců je závislý na procesech oxidační fosforylace, během kterých je oxidačně-redukční energie elektronového transportu mitochondrií představovaném čtyřmi proteinovými komplexy dýchacího řetězce dávající vznik protonovému gradientu převedena pátým komplexem, ATP syntetázou, na vysokoenergetickou fosfátovou vazbu v molekule ATP. Část energie proteinového gradientu je pak přeměněna, díky činnosti UCP like proteinů, na teplo využívané k udržení tělesné teploty. Hyperglykemie primárně indukuje tvorbu ROS díky zmíněnému elektron transportnímu řetězci mitochondrií. Vystupňování procesů glykolýzy a beta oxidace v diabetických podmínkách vede ke zvýšené tvorbě donorů elektronů (NADH a FADH2), díky čemuž dosáhne elektrochemický napěťový gradient v mitochondrii hraniční hodnoty. To vše pak v konečném důsledku vede ke kolapsu elektron transportního řetězce a tvorbě ROS. Mimo popsané děje však existuje řada dalších mechanismů zvyšující tvorbu ROS v diabetických podmínkách. Vystupňování polyolové cesty snižuje hladinu cytosolického NADPH a glutathionu. Proces tvorby ROS může být stimulován také činností glykosylačních produktů. Rovněž aktivace NADPH oxidazy se zdá být důležitým mechanismem zvyšujícím oxidační stres během diabetu (Li JM a Shah AM. 2003).



Obr 1: Patofyziologické efekty hyperglykémie. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou mediátorem patofyziologického efektu hyperglykémie. Zvýšená tvorba ROS prostřednictvím oxidativního stresu přispívá k patogenezi diabetických komplikací a mimo jiné se podílí na aktivaci protein kinázy C a NF- kappa B; zvýšené produkci produktů pokročilé glykace (AGE), sorbitolu, prostanoidů nebo cytokinů (Wolf G 2004).

1.2.3.2. Hemodynamické faktory

Hemodynamické faktory zapojené v patogenezi DN zahrnují zvýšení systémového a intraglomerulárního tlaku a aktivaci různých hormonálních vasoaktivních drah včetně systému renin-angiotensin (RAS) a endotelinu.

Změny intraglomerulárního tlaku jsou důsledkem hyperglykemií indukované poruchy glomerulární kapilární autoregulace vzniklé vlivem nerovnováhy v aktivitě vasoaktivních faktorů (např. angiotensin II, prostanoidy, NO, endotelin-1 , atd.) ovlivňujících aferentní a eferentní arteriolární tonus (Anderson S a Komers R 2004), což vede ke vzestupu glomerulární filtrace a ke zvýšení renálního plazmatického průtoku. Pokles aferentní rezistence pak rovněž usnadňuje přenos systémových tlaků do glomerulů a je podkladem pro vznik „glomerulární hypertenze". Významným faktorem přispívajícím k rozvoji hyperfiltrace je také glomerulární hypertrofie zvyšující filtrační plochu glomerulů a tím také ultrafiltrační koeficient. Glomerulární hyperfiltrace představuje významnou funkční změnu zapojenou v patogenezi DN. Tento klinicky dobře popsaný fenomén se obvykle sdružuje se vzestupem filtrační frakce. Kromě disbalance aferentního a eferentního arteriálního tonu se na vzniku diabetické hyperfiltrace může podílet i porucha tubuloglomerulární zpětné vazby (Vallon V 2003).

1.2.3.3. Cytokiny a růstové faktory

Na vzniku DN se podílí řada různých růstových faktorů, cytokinů a chemokinů (Flyvbjerg A 2000, Wolf G 2003, Chiarelli F a kol. 2000, Ziyadeh FN 2004, Schrijvers BF a kol. 2004). Je známo, že angiotenzin II (Ang II) a transformující růstový faktor beta (TGF-beta), dva důležité profibrogenně-hypertrofické faktory, jsou úzce spjaté s patogenezí DN (Ziyadeh FN 2004, Wolf G a kol. 1992). Jak Ang II, tak systém TFG beta se významně podílí na indukci diabetické renální hypertrofie a produkci extracelulární matrix (Wolf G a kol. 1992). Výzkum prokázal, že ke stimulaci těchto faktorů dochází mimo jiné účinkem hyperglykemie, glykosylačních produktů nebo ROS (Zhang SL a kol. 2000, Singh R a kol. 2003, Leehey DJ a kol. 2005, Yamagishi S a kol. 2003, Fukami K a kol. 2004). Oba faktory jsou funkčně propojeny. Hovoří se dokonce o významu prosklerotické a profibrotické osy renin - Ang II - TGF beta. Útlum této osy inhibitory RAS podstatně zpomaluje rozvoj glomerulosklerosy a intersticiální fibrosy. Přibývá důkazu i o účasti dalších faktorů jako je destičkový růstový faktor (PDGF), růstový faktor pojivové tkáně (CTGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), insulin-like růstový faktor, epidermální růstový faktor a další. (Flyvbjerg A 2000). Extracelulární matrix (ECM) představuje velmi dynamickou strukturu. Deposita ECM v ledvině jsou závislá na rovnováze syntézy a degradace ECM. Hyperglykémie a účinky TFG beta nejenže zvyšují syntézu ECM v diabetické ledvině, ale zároveň také snižují míru její degradace inhibicí proteolytických systémů plasminu a metalloproteináz (Ha H a Lee HB 2003).

1.2.3.4. Úloha zánětu

Progrese DN je významně ovlivněna přítomností zánětu. Jak v glomerulech, tak v renálních tubulech se nacházejí infiltrované monocyty produkující řadu látek jako jsou ROS, faktory komplementu nebo prozánětliné cytokiny. Profibrogenní cytokiny produkované makrofágy jako například TGF-beta, plasminogen-activující inhibitor nebo inhibitor metalloproteinases se pak podílejí na zvýšené produkci ECM v diabetických ledvinách (Sean Eardley K a Cockwell P. 2005).

1.2.3.5. Změny signální transdukce v diabetické ledvině

V důsledku působení hyperglykémie, akumulace glykosylačních produktů, vystupňování hexosaminové a polyolové cesty nebo působení ROS a řady vasoaktivních a růstových faktorů dochází v ledvinách, ale i dalších orgánech a tkáních postižených diabetem, ke změně signální transdukce projevující se alteracemi v kaskádách proteinových kináz a dalších signálních molekul zajišťujících intercelulární a intracelulární komunikaci.

V souvislosti s rozvojem diabetické nefropatie je dobře známa aktivace protein kinázy C (PKC). Rodina PKC je skupinou příbuzných, ubikviterních, serin-thereoninových kináz. Individuální formy PKC ovlivňují řadu buněčných procesů včetně permeability, kontraktility, proliferace, apoptózy, regulace genové exprese nebo tvorby ECM (Meier M a kol. 2007). V souvislosti s rozvojem DN se uplatňují zejména klasické PKC isoformy, PKC alfa a PKC beta 1. (Meier M a kol. 2007a). PKC se dále podílí i na aktivaci další významné signální kaskády aktivované při DM a specificky v ledvinách, kterou jsou tzv. mitogeny aktivovaná proteinové kinázy (MAPK), zejména pak „extracellular signal-regulated kinase" (ERK) kináza ERK p42/44. V procesu progrese DN se významně uplatňuje i další kináza z rodiny MAPK, kterou je stresem aktivovaná p38 MAP kináza. K aktivaci MAPK může dojít, stejně jako v případě PKC, rovněž synergickým působením hyperglykémie a vasoaktivních, popřípadě růstových faktorů s mnoha důsledky pro funkci a trofický stav buněk.

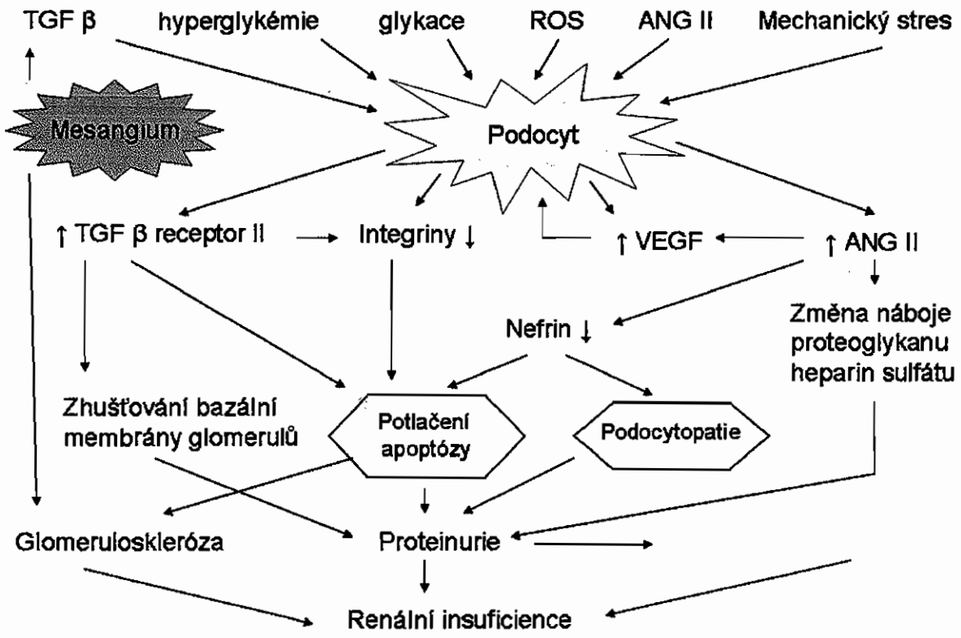
1.2.3.6. Úloha změn regulace buněčného růstu

Buněčný cyklus představuje soubor vysoce organizovaných, vzájemně navazujících dějů zahrnujících expresi genů primární a sekundární odpovědi kodujících proteiny nezbytné pro vlastní realizaci buněčného cyklu. Regulace buněčného cyklu se uskutečňuje na více úrovních a rozhoduje o tom, zda buňka bude fungovat v neproliferačním modu (G0 fáze) nebo v proliferačním modu buněčného cyklu a podstoupí buněčné dělení. Vstoupí-li buňka vlivem stimulačního signálu do buněčného cyklu, potom opakovaně prochází jednotlivými fázemi cyklu (G1-S-G2-M-G1) až do okamžiku, kdy je signálními mechanismy nasměrována ke zpětnému přechodu do klidové G0 fáze. Hlavní úlohu při řízení progrese mají cykliny a cyklin dependentní kinázy (CDK). Zastaví-li buňka svůj průchod buněčným cyklem v určitých bodech cyklu, děje se tak v důsledku nepříznivých okolností. Jeden takový bod je v G1 fázi. G1 blok je typicky pozorován v mesangiálních buněkách diabetických ledvin nebo in vitro u mesangiálních buněk pěstovaných v podmínkách vysoké koncentrace glukosy v mediu a je doprovázen zvýšenou expresí inhibitorů CDK jako např. p21 WAF1 a p27 KIP1, které inaktivují funkční komplex CDK a tím zabrání dokončení G1 fáze cyklu a přechodu do S fáze cyklu. Kromě hyperglykemie se na zvyšené expresi a aktivitě inhibitorů CDK v ledvinách podílejí například TGF-beta a Ang II (Marshall CB a Shankland SJ 2006, Wolf G 2000).

1.2.4.2. Strukturně-funkční vztahy v diabetické ledvině

Zároveň s expanzí mesangia v glomerulech dochází ke kompresi kapilár a poklesu plochy filtrace (Mauer SM et al. 1981, Mauer SM et al. 1984). Jak ukazují morfometrické analýzy, mesangiální frakční objem [Vv (mes/glom)] vyjadřující míru mesangiální expanze přesně koreluje nejen s mírou glomerulární filtrace, ale také s proteinurií a dokonce s hypertenzí (Dalla Vestra et al. 2001).

Strukturně-funkční vztahy u DM2 jsou v porovnání s těmi u DM1 pacientů méně signifikantní v důsledku vysoké heterogenity histologického nálezu (Fioretto P a kol. 1998).



Obr. 2: Mechanismus vedoucí k poškození podocytů a rozvoji proteinurie v průběhu diabetické nefropatie Metabolické faktory diabetického milieu (TGF beta, vysoká hladina glukosy, glykované proteiny, ROS a ANG II) spolu s hemodynamickými faktory (mechanický stres) indukují zvýšenou produkci faktorů VEGF a ANG II . Dalším efektem je pak zvýšení produkce receptoru TGF beta II nebo snížená produkce povrchových integrinů. To vše nakonec vede ke stimulaci produkce kolagenu a alteracím glomerulární membrány zahrnující její zbytnění a alterace filtrační bariéry spolu se stimulací produkce extracelulární matrix, snížením produkce nefrinu, podocytopatií nebo potlačením apoptózy. Účinky TGF beta se projevují rovněž nárůstem produkce extracelulární matrix v mesangiu. Zmíněné alterace vedou ke glomeruosklerose a proteinurii přispívající k rozvoji tubulointestinální fibrosy podílející se na progresi renální insuficience. (Wolf G a kol. 2005).

1.2.4. Histopatologické změny

Patogeneze DN zahrnuje řadu charakteristických strukturálních a funkčních změn jakými jsou glomerulární hypertenze a hyperfiltrace, následovaná mikroalbuminurií, rozvojem hypertenze, manifestní proteinurií a nefrotickým syndromem majícím za následek progresivní pokles glomerulární filtrace v pozdějších fázích DN. Je dobře známo, že jmenované strukturální a funkční změny spolu úzce souvisejí. Porozumění těmto vztahům je základem celkového pochopení vzniku a progrese DN.

1.2.4.1. Histologický obraz v diabetické ledvině

Glomerulopatie, charakterizována zhušťováním basální membrány a zvětšováním objemu mesangia způsobeném zvýšenou tvorbou a ukládáním extracelulární matrix a hypertrofií buněk mesangia , je časnou a nejdůležitější morfologickou změnou u DM1 (Dalla Vestra M a kol 2000, Fioretto P a kol. 1995, Brito PL a kol. 1998). V glomerulech se rovněž nacházejí infiltrované monocyty ovlivňující hypertrofii glomerulů produkcí cytokinů. S pokročilostí onemocnění narůstá mesangiální expanze, která může vytvářet tzv. difuzní diabetickou glomerulosklerózu nebo nodulární diabetickou glomerulosklerózu (Kimmelstiel-Wilsonovy noduly). Nodulární formace jsou pravděpodobně důsledkem postupné progrese difuzních lézí. S rozvojem glomerulopatie korelují alterace filtrační bariery (Wolf G and Ziyadeh FN 2007) bránící pohybu solutů na základě jejich velikosti a náboje. Při stejné velikosti jsou pak filtrovány kationy lépe než aniony. Změny architektury a složení glomerulární membrány při diabetu zahrnují kromě kvantitativních a kvalitativních změn kolagenu IV rovněž změny syntézy fibronektinu a změny náboje proteoglykánu heparin sulfátu, jehož negativní náboj brání filtraci sérového albuminu. Charakteristickou alterací při diabetu je rovněž podocytopatie (Wolf G a kol. 2005) vyznačující se poklesem počtu a density podocytů, glomerulárních viscerálních buněk epitelu, vytvářejících glomerulární membráně póry volně propustné pro vodu a solventy s malou molekulovou hmotností, ale relativně nepropustnou pro plasmatické proteiny (Tryggvason K. 1999, Wartiovaara J a kol. 2004). Současně s rozvojem glomeruloskleózy dochází rovněž ke změnám v tubulointersticiálním kompartmentu. Tyto změny obvykle odráží stupeň cévního poškození a jsou určujícím faktorem rychlosti progrese renální insuficience. Mezi charakteristické změny v tomto kompartmentu pak náleží především intersticiální fibroza, tubulární atrofie a infiltrace mononukleáry (Dalla Vestra M. a kol. 2000, Lane PH a kol. 1993, Harris RD a kol. 1991). Tubulointersticiální hypertrofie se významně podílí na růstu velikosti ledvin.

Podobně jako u DM1 je také u DM2 mesangiální expanze klíčovou strukturální abnormalitou vedoucí k zániku funkce ledvin. Nicméně, na srovnatelné úrovni renální funkce jsou glomerulární změny u DM2 méně pokročilé a řada DM2 pacientů dokonce vykazuje normální glomerulární strukturu navzdory abnormálnímu vylučování albuminu. Další skupina pacientů pak vykazuje atypické změny projevující se relativně mírnými glomerulárními změnami spolu s disproporčně pokročilými tubulointersticiálními a vaskulárními změnami (Fioretto P a kol. 1996, Brocco E a kol. 1997).

1.3. Modely zvířat používané pro studium diabetu

Zvířata jako myši, potkani, prasata, psi nebo kočky se využívají jako modelové organismy při studiu diabetu již po desetiletí. Některé z používaných zvířecích modelů jsou spontánní, jiné vznikají po podání toxických substancí.

1.3.1. Hlodavci jako model nefropatie

V rámci experimentu jsou u laboratorních zvířat studovány patogenetické mechanismy vzniku a progrese poškození ledvin v průběhu diabetu a možnosti jejich prevence a léčby. Experimentální modely hlodavců vykazují řadu strukturálních a funkčních změn pozorovaných rovněž u lidí jako například nárůst glomerulární filtrace, renální hypertrofii, albuminurii nebo glomerulární a tubulointestinální abnormality. Ideální model DN však neexistuje. Mnohé z poznatků o DN byly získány díky experimentálním studiím insulinopenického modelu potkana po aplikaci streptozotocinu představujícím model DM1. Existuje rovněž celá řada hyperinsulinemických DM2 modelů majících genetický základ, které vykazují poškození ledvin a metabolické abnormality v závislosti na na věku, výživě nebo pohlaví pokusných zvířat.

1.3.1.1. STZ potkan - model DM1

Experimentální DM1 model lze indukovat chemickou destrukcí B buněk pankreatu. Za tímto účelem se obvykle využívají vysoké dávky chemických látek streptozotocinu (STZ) a aloxanu. Z důvodu vyšší specifity je preferováno užití STZ (Lown JN a kol. 1979, LeDoux SP a kol. 1986), ačkoli je jeho působení ovlivněno řadou faktorů jako například pohlavím nebo kondicí pokusného zvířete (Okamoto H 1981).

Model STZ potkana je dobře popsán. Je charakterizován nárůstem hladiny glukosy v krvi, ztrátou tělesné hmotnosti a renální hypertrofií (Reckelhoff JF a kol. 1993, Komers R a Cooper ME 1995, Shankland SJ a Scholey JW 1995). Pokusná zvířata rovněž v raných fázích onemocnění vykazují nárůst glomerulární filtrace, variabilní renální plazmatický objem a renální hypertrofii (Allen TJ a kol. 1990). S postupen času pak dochází k nárůstu exkrece albuminu v moči (Cooper ME a kol. 1988). Model vykazuje rovněž četné změny glomerulární ultrastruktury jako expansi mesangia nebo zbytnění basální membrány glomerulu (Cooper a kol. 1988).

1.3.1.2. Zuckerův potkan – model DM2

Zuckerův potkan je charakterizován přítomností recesivní fa mutace v genu kodujícím leptinový receptor. Homozygotní (fa/fa) zvířata vykazují řadu metabolických abnormalit vyskytujících se u DM2 jako hyperlipidemie, obezita, inzulinová rezistence a hyperinzulinemie (Zucker LM 1965, Bray GA 1977, Kasiske BL a kol. 1992 , Bray GA a York DA 1971, 1979, Bray GA a kol. 1989, Ionescu E a kol. 1985, Kava R a kol. 1989, Stern J a kol. 1972; York DA a kol. 1972). Tato zvířata jsou známým a oblíbeným modelem pro studium genetické obezity a a hyperplasticko-hypertrofické obezity (Bray GA a York DA 1971, 1979, Bray GA a kol. 1989). Kontrolní Lean potkani, pak představují další fenotyp geneticky neobezního potkana s absencí jmenovaných abnormalit.

Zuckerův obézní potkan je rovněž atraktivním modelem DM2. Kosterní svalstvo

Zuckerových fa/fa potkanů je charakterizováno projevy insulinové rezistence (Smith OL a Czech MP 1983) a poklesem insulinem stimulovaného transportu glukosy (Sherman WM a kol. 1988). Známky insulinové rezistence se projevují rovněž v játrech nebo periferních tkáních (Terretaz J a kol. 1986a,b). Insulinová rezistence je u modelu asociována s hypertenzí. Přímá měření středního arteriálního tlaku prokázala výskyt zvýšeného krevního tlaku u obézního genotypu. Výše krevního tlaku přitom nebyla ovlivněna hyperfagií nebo vyšší tělesnou hmotností (Kurtz TW a kol. 1989). Snížení kalorického příjmu vedlo u obézních zvířat k částečné korekci hyperinsulinémie (Cleary MP a kol. 1987), neovlivnilo však míru hypertenze mající základ patrně ve zvýšené aktivitě sympatiku (Kurtz TW a kol. 1989, Overton JM a kol. 1997, Kushiro T a kol. 1991). Je známo, že insulin zvyšuje tubulární reasorbci sodíku. Insulinem indukovaná retence sodíku je tak dalším patogenním determinantem hypertenze asociované s obezitou (De Fronzo RA 1981, Brands MW a kol. 1995). Vyšší krevní tlak u obézních potkanů by však mohl být, alespoň z části, důsledkem činnosti RAS (Alonso-Galicia M a kol. 1996), ačkoli je zřejmé, že na vzniku hypertenze se podílí ještě celá řada dalších procesů.

Se vzrůstajícím věkem se u Zuckerových potkanů objevuje porucha podocytů, gradující glomerulosklerosa, tubulointestinální abnormality, insuficience ledvin, albuminurie a další známky rozvíjející se nefropatie (Lavaud S a kol. 1996, Philips A a kol. 1999, Kasiske BL a kol. 1985, Velasquez MT a kol. 1990).

1.4. Úvod do biologie Akt kinázy

Protein kináza B (PKB, známá též jako Akt) (Datta SR a kol. 1999) je serin / thereoninová kináza náležící do rodiny "AGC" proteinových kináz (Pearl LH a Barford D 2002, Parker PJ a Parkinson SJ 2001). Členové rodiny vykazují podobnosti ve struktuře katalytických skupin a mechanismu aktivace.

Akt protein je produktem Akt genu představujícím homolog retrovirálního onkogenu v-Akt (Bellacosa A a kol. 1991). Akt signalizace ovlivňuje řadu buněčných funkcí včetně buněčného růstu, regulace buněčného cyklu, syntézy proteinů, přežití buňky nebo buněčného metabolismu (Brazil DP a Hemmings BA 2001, Scheid MP a Woodgett JR 2001). V současné době jsou známy 3 isoformy Akt proteinu : Akt 1 (PKB alfa), Akt 2 (PKB beta) a Akt 3 (PKB gama). Tkáňová a orgánová exprese jednotlivých isoforem je uvedena v tabulce 1. Tyto isoformy vykazujívíce více než 80% sekvenční homologie (Jones PF a kol.1991). Mezi jednotlivými isoformami Akt existuje funkční překryv, všechny obsahují motiv RXRXXS/T. Všem třem Akt isoformám je rovněž společná přítomnost N terminální plekstrin homologické (PH) domény bohaté na glycin vážící na sebe 3- fosfatidylinositidy, následované kinásovou doménou a C-terminální regulační oblastí vykazující podobnost s podobnou oblastí u proteinkináz A a C (Staal SP 1987, Coffer PJ a Jin J 1998, Marte BM a Downward J. 1997). Katalytická doména Akt kinázy obsahuje první ze dvou klíčových fosforylačních míst, kterým je thereonin 308 (Thr 308). Druhé fosforylační místo , Serin 473 (Ser 473), je lokalizováno v C terminální oblasti (Alessi DR a kol. 1996).

Tabulka 1: Profil exprese Akt isoforem (Ždychová J a Komers R 2005)

Vysoká úroveň exprese		Nízká nebo střední úroveň exprese
Akt 1	mozek, srdce, varlata, thymus	ledviny, játra, slezina
Akt 2	hnědý tuk, cerebrum (Purkinjovy buňky), srdce, kosterní svalstvo	mozek, ledviny, plíce, slezina, varlata
Akt 3	mozek, testes	srdce, ledviny, játra, plíce, kosterní svalstvo, slezina

K aktivaci Akt kinázy dochází prostřednictvím řady růstových stimulů jakými jsou faktory růstu a přežívání buněk, insulin, integriny nebo receptory spřažené s G-proteiny. (tabulka 2). Kaskáda dějů vedoucích k aktivaci Akt kinázy zahrnuje řadu procesů včetně translokace na buněčnou membránu a fosforylaci (Bellacosa A a kol.1998). Typická cesta Akt aktivace je zprostředkována tyrosin kinásovým receptorem jako jsou receptory pro insulin nebo receptory růstových faktorů (obr. 1) a zahrnuje rovněž následné procesy závislé na aktivitě fosfatidylinositol-3-kinasy (PI3 K).

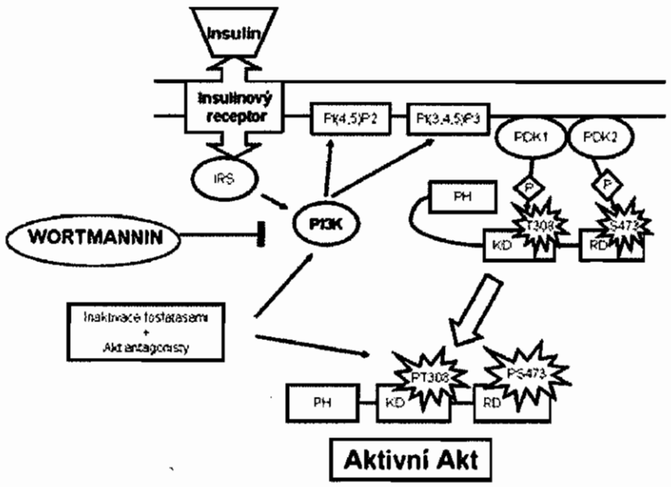
Tabulka 2: Faktory modulující PI3K-Akt signální dráhu (Ždychová J a Komers R 2005)

Factor	Reference
Vaskulární endoteliální růstový faktor *	(Fulton D a kol. 1999)
Angiopoetin-1	(Kim I a kol. 2000)
Insulin-like růstový faktor -I	(Camper-Kirby D a kol. 2001)
Sfingosin-1-fosfát (S1P)	(Marletta MA 2001)
Růstový faktor hepatocytů	(Xiao GH a kol. 2001)
Decorin	(Schonherr E a kol. 2001)
Mechanický stres *	(Dimmeler S a kol. 1998)
Estrogen	(Camper-Kirby D a kol. 2001)
Kyslíkové radikály *	(Thomas SR a kol. 2002)
Kortikosteroidy	(Limbourg FP a kol. 2003)
Angiotensin II	(Gorin Y a kol. 2001)
Leptin	(Vecchione C a kol. 2002)
Transformující růstový faktor beta	(Chen H a kol. 2001a)

* faktory zapojené do vaskulárních komplikací diabetu

1.4.1. Aktivace Akt kinázy závislá na fosfatidylinositol-3-kináze

Heterotetramerický insulinový receptor je tvořen dvěma podjednotkami alfa lokalizovanými na vnější plasmatické membráně spojenými disulfidickými můstky se dvěma transmembránovými beta podjednotkami. Vazba insulinu na alfa podjednotky vyvolá konformační změnu vedoucí k dimerizaci a aktivaci tyrosinkinázové aktivity receptoru autofosforylací receptoru na několika tyrosinových zbytcích, které pak slouží jako připojovací místa pro soubor intracelulárních signálních proteinů vážících se prostřednictvím své SH2 domény (White MF 1998). Příkladem takových substrátů transfosforylovaných v rámci přenosu signálu jsou insulin receptorové substrátové proteiny 1-4 (IRS 1-4), Shc, Gab2 a další proteiny (Sun XJ a kol.1991, Sun XJ a kol.1995). V následném šíření signálu se pak uplatňuje například i aktivita PI3 K (Burgering BM a Coffer JP 1995, Toker A a Cantley LC 1997). Aktivace PI3 K stimuluje lipid kinázovou aktivitu tohoto enzymu. Výsledkem je přidání fosfátové skupiny k inositolovému kruhu a tvorba fosfatidylinositol-3-fosfátu nebo jiných 3-fosforylovaných inositidů (PI3P). PH doména Akt kinázy má afinitu k PI3P, po vazbě PI3P k Akt kináze dochází k transkokaci Akt na plasmatickou membránu (Bellasosa A a kol. 1998, Toker A a Cantley LC 1997, Coffer PJ a kol. 1998, Marte BM a Downward J 1997). Zvýšená hladina PI3P navíc zároveň působí jako vnitrobuněčný druhý posel a podílí se na aktivaci PI-závislých kináz (PDK1 a PDK2). Translokace Akt na membránu je spojena s konformační změnou a fosforylačními procesy prováděnými PDK kinázami (Franke TF a kol. 1995, Toker A a Cantley LC 1997, Franke TF a kol. 1997, Klippel A a kol. 1997, Frech M a kol. 1997). Pro plnou aktivaci Akt kinázy jsou nezbytné fosforylace na pozicích Thr 308 a Ser 473 (Alessi DR et al. 1996). Fosforylaci Thr 308 provádí PDK1, zatímco PDK2 je spojena s fosforylací Ser 473. Fosforylovaná a tedy aktivní forma Akt kinázy disociuje z plasmatické membrány a působí fosforylaci podřazených komponent systému (obr 4.)



Obr 3: Mechanismus Akt aktivace prostřednictvím insulinového receptoru Aktivace Akt kinázy insulinem prostřednictvím insulinového receptoru zahrnuje aktivaci PI3 K a fosforylaci Akt proteinu prostřednictvím PDK kináz. Insulin receptorový substrát (IRS); fosfatidylinositol-3-kináza (PI3 K); 3-fosforylované inositidy (PI(4,5)P2, PI(3,4,5)P3); PI-závislé kinázy (PDK1, PDK2); plestrin homologická doména (PH); kinázová doména (KD) regulační doména (RD); Threonin 308 (T 308); Serin 473 (S 473) (Ždychová J a Komers R 2005).

1.4.2. Aktivace Akt kinázy nezávislá na fosfatidylinositol-3-kináze

Jak uvádějí některé studie, Akt kináza může být za určitých podmínek aktivována rovněž mechanismem nezávislým na aktivitě PI3 K (Moule SK a kol. 1997, Konishi H a kol. 1996, Sable CL a kol. 1997, Yano S a kol. 1998, Filippa N a kol. 1999, Perez-Garcia MJ a kol. 2004). Studie podávají důkaz o zapojení protein kinázy A (PKA) v procesu Akt aktivace, zejména na základě zvýšené hladiny cAMP v důsledku celé řady signálů (Filippa N a kol. 1999). Mechanismus, jakým se PKA podílí na procesu aktivace Akt kinázy není dosud přesně znám. Navíc se zdá, že PKA závislé aktivace nepředstavuje universální mechanismus aktivace Akt kinázy (Shaw M a kol. 1998, Pullen N a kol. 1998). To vše je dosud předmětem dalšího výzkumu. V mechanismu PI 3K nezávislé Akt aktivace se může uplatnit rovněž proces myristoilace, v rámci kterého má přidání myristoilačního signálu na N-terminální oblast Akt za následek konstitutivní translokaci Akt kinázy na membránu vedoucí k trvalé aktivaci Akt kinázy.

1.4.3. Regulace aktivity Akt

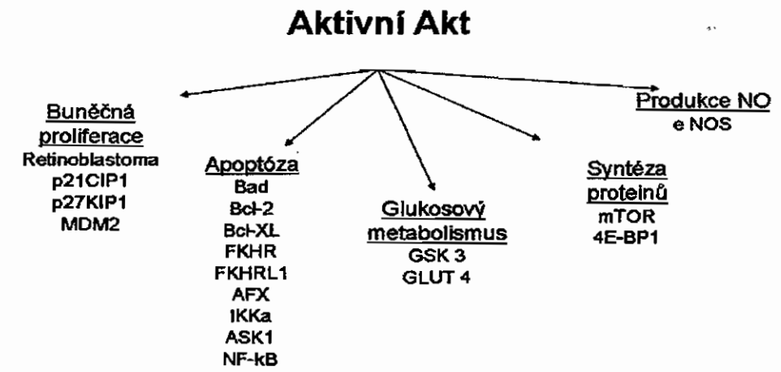
Byla identifikována řada proteinů, jejichž interakce s Akt ovlivňuje aktivitu této kinázy (tabulka 3). Regulační procesy zprostředkované těmito proteiny zahrnují zejména fosforylace Akt, ovlivňují subcelulázní lokalizaci a interakce Akt s nadřazenými kinázami nebo stabilitu Akt kinázy. Kromě zmíněných procesů se na regulaci Akt aktivity podílí rovněž fosfatázy jako fosfatáza 2A nebo Akt antagonisté jako ceramidy nebo PTEN (Ozes ON a kol. 2001, Teruel T a kol. 2001).

Tabulka 3 : Regulační proteiny interagující s Akt

Vazebné proteiny	Biologický význam	Reference
Ft1	Vazba Ft1 podporuje nárůst míry fosforylace Akt mechanismem interakce Akt a PDK1	Remy I a Michnick SW 2004
Actin	Připojení Akt k aktinovému cytoskeletu se projeví zvýšením míry fosforylace Akt. V tomto procesu se rovněž uplatňuje cdc42.	Cenni V a kol. 2003
CTMP	CTMP po vazbě na C terminální doménu Akt blokuje fosforylaci a aktivaci této kinázy.	Maira SM a kol. 2001
Grb 10	Posiluje vazbu Akt na plasmatickou membránu v závislosti na aktivaci tyroxin kinázy c-kit.	Han DC a kol. 2001, Jahn T a kol. 2002
Keratin K10	Inhibuje translokaci Akt z cytosolu na plasmatickou membránu.	Paramio JM a kol. 2001
Trb3	Trb3 po vazbě na kinázovou doménu Akt redukuje míru fostorylace této kinázy.	Du K a kol. 2003
Periplakin	Periplakin se váže na PH doménu Akt kinázy a ovlivňuje tak její lokalizaci v rámci buňky.	van den Heuvel AP a kol. 2002
Hsp 90	Hsp 90 působí spolu s cdc37 jako kinázový chaperon stabilizující Akt	Solit DB a kol. 2003
Hsp 27	Hsp 27 působí jako chaperon vážící se specificky na Akt isoformy během působení stresu.	Konishi H a kol. 1997, Rane MJ a kol. 2003

1.4.4. Efektory a fyziologické důsledky aktivace Akt

Stimulovaná Akt kináza působí na řadu efektorů (obr. 4), které budou blíže diskutovány v následujícím textu.



Obr 4: Efektorové molekuly Akt kinázy (Ždychová J a Komers R 2005)

1.4.4.1. Metabolické funkce

Akt je důležitým mediátorem biologických funkcí insulinu. Velmi důležitým efektem tohoto hormonu je zvýšení transportu glukosy v různých insulin senzitivních tkáních a buňkách kosterního svalstva nebo adipocytů. PI 3K/ Akt signalizace je, alespoň z části, zapojena v procesu insulinem indukované stimulace hlavního glukosového transporteru, ke kterému dochází na základě translokace transporteru z intracelulárních vesikulů na plazmatickou membránu insulin-senzitivních buněk (Frevert EU a kol.1998, Okada T a kol. 1994). Studie prokázaly konkrétní zapojení Akt v procesu insulinem stimulované translokace transporteru GLUT 4 na plazmatickou membránu (Cross DA a kol. 1995, Kohn AD a kol. 1996, Hajduch E a kol. 1998, Calera MR a kol. 1998). Studie Franke TF a kol (1997) využívající inhibici Akt pomocí dominantně negativní mutace pak navíc prokázala zapojení dalších kináz do procesu stimulace transportu glukosy. Dalším mechanismem, kdy se Akt podílí na regulaci metabolických funkcí je proces insulinem indukované syntézy glykogenu zahrnující modifikaci aktivity glykogensyntázy 3 beta (GSK 3 beta) (Cross DA a kol. 1995, Lawrence JC Jr a Roach PJ 1997).

1.4.4.2. Efekt Akt na syntézu proteinů

Vliv Akt na syntézu proteinů je úzce spjat s růstem a mitogenezí a to prostřednictvím známého vlivu PI 3K/ Akt signalizace na regulaci aktivity kinázy mammalian target of rapamycin (mTOR) a jejích efektorů (Scott PH a kol 1998). Ribosomální p70 protein S6 kinasa 1 (S6K1) a iniciační faktor pro vazbu 4E proteinu 1 (4E BP1) jsou mTOR podřazené regulační proteiny známé svým zapojením v procesu kontroly translace (Fingar DC a kol. 2002). Iniciační translační faktor 4F (eIF4F) tvoří spolu s ostatními regulačními faktory aktivní komplex vážící se na strukturu čepičky mRNA. Protein 4E BP1 interaguje v hypofosforylovaném stavu s faktorem eIF4F, čímž negativně reguluje proces iniciace translace. Vlivem aktivity mTOR pak dochází k fosforylaci tohoto inhibičního proteinu mající za následek uvolnění faktoru eIF4F a tvorbu aktivního komplexu a translaci. S6K1 je zapojena do procesu regulace syntézy proteinů prostřednictvím fosforylace 40S ribosomálního proteinu S6 (Pullen N a Thomas G 1997), díky čemuž dojde k nárůstu efektivity translace.

Existují důkazy i o tom, že například již dříve zmiňovaný Akt efektor, GSK 3 beta, zastává rovněž důležitou regulační roli v procesu translace. GSK 3 beta fosforyluje největší z pěti podjednotek faktoru eIF2 podílející se na výměně GDP za GTP (Welsh GI a kol. 1998). Vlivem růstových stimulů tak dochází ke změně aktivity GSK 3 beta, což se projeví poklesem míry fosforylace této podjednotky eIF2Be a iniciací syntézy proteinů (Kimball SR a kol 2002).

1.4.4.3. Zapojení Akt v antiapoptotických procesech a procesech buněčného přežívání

Akt kináza zastává důležitou roli v procesech buněčného přežívání spojených s růstovými faktory a připojením k extracelulární matrix. Zvýšená exprese nebo aktivita Akt kinázy může zachránit buňku před apoptózou vyvolanou vlivem stresových signálů (Kaufmann-Zeh A a kol 1997, Khwaja A a kol. 1997). Akt kináza je zapojena do procesů regulace apoptózy hned na třech úrovních.

První z nich je úroveň regulace transkripce antiapoptotických genů a genů důležitých pro buněčné přežívání. Akt se účastní tohoto procesu přímou fosforylací transkripčních faktorů.

Dalším mechanismem, kterým Akt ovlivňuje přežívání buněk je přímá fosforylace klíčových proteinů proapoptotické kaskády jako jsou protein BAD náležícího do rodiny Bcl-2 proteinů (del Peso L a kol. 1997, Datta SR a kol. 1997) a kaspasa 9 (Cardone MH a kol. 1998).

Akt kináza ovlivňuje proces apoptózy rovněž modulací komplexu GSK 3 beta/ beta katenin. Beta katenin je multifunkční protein mající důležitou úlohu v rámci signální dráhy Wnt/ wingless (Cadigan KM a Nusse R 1997) v rámci které je zapojen v procesu kontroly buněčného cyklu a apoptózy. GSK 3 beta provádí fosforylaci serin/ thereoninových zbytků na N terminálním konci beta kateninu, což představuje klíčový proces vedoucí k ubiquitinaci a následné proteolytické degradaci beta kateninu ubiquitin proteasovým systémem (Amit S a kol. 2002).

1.4.4.4. Zapojení Akt do regulace buněčného cyklu

Proliferace buněk je regulována řetězcem dějů nazývaných buněčný cyklus skládajícího se z G1, S, G2 a M fáze. Přechod mezi fázemi cyklu je regulován pomocí regulačních proteinů buněčného cyklu jakými jsou pozitivně působící cykliny a cyklindependentní kinásy (CDK). Komplexy cyklin/ CDK indukují přechod přes kontrolní restrikční body buněčného cyklu. Skupina CDK inhibičních proteinů vážících se na CDK nebo ke komplexům CDK-cyklin pak způsobuje blok kinázové aktivity těchto proteinů. Inhibitory CDK jako p21 WAF1 a p27 KIP1 způsobují G1 blok. Akt kináza je známým regulátorem buněčného cyklu hned několika pozitivně modulačními mechanismy. Snižuje transkripci inhibičních CDK p21 WAF1 a p27 KIP1 a zároveň tyto proteiny ihibičně fosforyluje (Medema RH a kol. 2000, Shin I a kol. 2002, Zhou BP a kol. 2001). Další mechanismus, jakým PI 3K/ Akt signální dráha pozitivně reguluje buněčnou proliferaci, je závislý na aktivitě GSK 3 beta. GSK 3 beta fosforyluje cyklin D, čímž jej předurčuje pro proteasomovou degradaci (Diehl JA a kol. 1998, Shao J a kol. 2000). Akt inhibuje tyto negativně-modulační funkce buněčného cyklu inhibiční fosforylací GSK 3 beta (Cross DA a kol. 1995 , van Weeren PC a kol. 1998). Mimo uvedené mechanismy ovlivňuje aktivita Akt kinázy také míru fosforylace retinoblastomu (Brennan P a kol. 1997) a moduluje regulační funkce proteinu MDM2. Oba tyto děje mají za následek buněčnou proliferaci. Protein MDM2 neovlivňuje pouze progresi buněčným cyklem, ale je zapojen i v regulaci apoptózy a to v obou případech skrze ovlivňování transkripce a aktivity klíčového regulačního proteinu p53 (Mayo LD a Donner DB 2001).

1.4.4.5. Role Akt ve vaskulární biologii

Signalizace prostřednictvím Akt ovlivňuje ve vaskulatuře v závislosti na typu podnětu stimulu řadu procesů včetně angiogeneze a tvorby oxidu dusnatého (NO).

1.4.4.5.1. Vasodilatace závislá na endotelu

Endoteliální syntáza NO (eNOS) je enzym zapojený v tvorbě NO. NO je mocným vasodilatátorem. Proteinkináza Akt má klíčovou úlohu v dějích souvisejích s tvorbou NO prostřednictvím eNOS. Aktivita eNOS je regulována na úrovni post-translačních modifikací, proteinových interakcí a subcelulární lokalizace. Akt způsobuje v závislosti na přítomnosti Ca^{2+} iontů , ale i Ca^{2+} nezávislým mechanismem, aktivaci eNOS (Dimmeler S a kol. 1999, Fulton D a kol. 1999) spočívající ve fosforylaci eNOS na serinu 1177/1179, mající vliv na redukci inhibiční interakce eNOS s caveolinem-1 a stimulaci vazby eNOS s calmomodulinem. Vazba eNOS na „scaffold" protein caveolin-1 sekvestruje eNOS do caveol, útvarů tvořených plasmatickou membránou, čímž je inhibována funkce eNOS (Frank PG a Woodman 2003). Modulace Akt aktivity tak skrze produkci NO ovlivňuje vaskulární tonus (Luo Z a kol. 2000). Akt může být za fyziologických podmínek aktivována některými růstovými faktory, např. VEGF nebo inzulinem , které představují nejvýznamnější Akt aktivátory tvorby NO (Fulton D et al. 1999, Zeng G a kol. 2000, Zeng G a Quon MJ 1996).

1.4.4.5.2. Angiogeneze

Angiogeneze představuje proces postnatální neovaskularizace zprostředkovaný proliferací, migrací a remodelací plně diferenciovaných buněk endotelu z preexistujících cév (Isner JM a Asahara T 1999). K angiogenetickým procesům dochází jak za normálních, tak za patologických podmínek. Aktivace Akt kinázy reguluje aktivitu řady signálních kaskád potenciálně zapojených v procesu angiogeneze. Akt kináza tak ovlivňuje nejen takové

procesy jakými je inhibice indukce apoptózy, ale interferuje rovněž s řadou biologických funkcí endoteliální vrstvy jako je vaskulární remodelace a integrita cév v procesu angiogeneze. Je známo, že právě apoptóza endoteliálních buněk má klíčovou roli v procesu regulace neovaskularizace. Angiogenní faktory jako VEGF nebo angiopoetin tak nejenže stimulují proliferaci a migraci endoteliálních buněk, ale podílejí se na inhibici apoptózy endoteliálních buněk (Gerber HP a kol. 1998, Gerber HP a kol. 1998a, Fujio Y a Walsh.K 1999, Kim I a kol. 2000) mechanismem zahrnujícím Akt signalizaci (Gerber HP a kol. 1998, Kim I a kol. 2000).

1.4.5. Patofyziologie Akt kinázy při diabetu

Diabetické metabolické milieu vykazuje řadu efektů ovlivňujících buněčnou integritu a funkce vycházející z alterací transdukce signálu. Pokrok v chápání fyziologie a patofyziologie širokého spektra signálních kaskád a jejich vzájemných interakcí otevřel nový prostor pro výzkum. Změny, zahrnující pokles i nárůst aktivity Akt kinázy , byly zaznamenány v rámci experimentálního a klinického kontextu v četných tkáních postižeých diabetem.

1.4.5.1. Patofyziologie Akt při DM2

1.4.5.1.1. Úloha Akt při patofyziologii insulinové rezistence

S ohledem na úlohu, kterou zastává PI 3K/ Akt signální kaskáda v rámci insulinové signalizace, není překvapivé, že se o tomto systému uvažuje jako o možném místě zasaženém insulinovou rezistencí. Řada studií využívající insulin senzitivní buňky a tkáně v rozličných experimentálních uspořádáních, pak potvrdila správnost tohoto předpokladu (Krook A a kol. 1997, Rondinone CM a kol. 1999, Carvalho E a kol. 2000, Song XM a kol. 1999). Na druhé straně však byly, navzdory defektům v transdukci signálu předcházejícím úroveň Akt, zaznamenány příklady normální Akt aktivity (Kim YB a kol. 1999a, Storgaard H a kol. 2001, Nadler ST a kol. 2001). Tyto nálezy svědčí pro to, že na aktivaci Akt kinázy se za těchto diabetických podmínek pravděpodobně podílí celá řada dalších kináz. Je důležité zmínit, že výzkum uvádějící defektní Akt aktivity svědšící pro přítomnost insulinové rezistence byl prováděn za využití suprafyziologických koncentrací inzulinu (Krook A a kol. 1998). Z tohoto důvodu se zdá být důležité srovnání basální úrovně Akt fosforylace a aktivity za fyziologických hladin insulinu.

1.4.5.1.2. Akt a vaskulární komplikace při DM2

Nárůst hladiny cirkulujícího insulinu, vzniklý v důskedku insulinové rezistence, může mít teoreticky vliv na morfologii a funkci řady orgánů. Je zdokumentováno, že funkce endotelu, měřená jako míra insulinem-indukované vasodilatace, je u insulin rezistentních diabetických pacientů redukována (Howard G a kol. 1996). Studie rovněž naznačují možnou disociaci růstových a vasomotorických efektů insulinu ve vaskulatuře za těchto insulin rezistentních podmínek. Zatímco na úrovni signální kaskády PI 3K/ Akt vedoucí k aktivaci eNOS a tvorbě vasodilatačně působícího NO dochází k alteracím, aktivita kaskády zprostředkující transdukci proliferativních a růstových signálů je za těchto podmínek neporušena a k přenosu signálu dochází pravděpodobně prostřednictvím ERK kináz náležejících do rodiny aktivovaných proteinových kináz (MAPK) (Jiang ZY a kol. 1999).

1.4.5.1.3. Akt signalizace v ledvinách při DM2

Ledviny jsou cílovým orgánem mnoha účinků insulinu. Řada in vitro a in vivo studií naznačuje , že účinky insulinu a Akt signalizace ovlivňují v ledvinách syntézu proteinů, viabilitu, stejně jako renální hemodynamiku, tvorbu NO nebo retenci sodíku, tedy mechanismy relevantní pro renální patofyziologii (Feliers D a kol 2001, Bhandari BK a kol. 2001, Senthil D a kol. 2002, Hiromura K a kol. 2002, Bridgewater DJ a kol. 2005, Hayashi K a kol. 1997, Schmetterer L a kol. 1997, Schnyder B a kol. 2002).

1.4.5.2. Patofyziologie Akt při DM1

1.4.5.2.1. Akt a insulitida

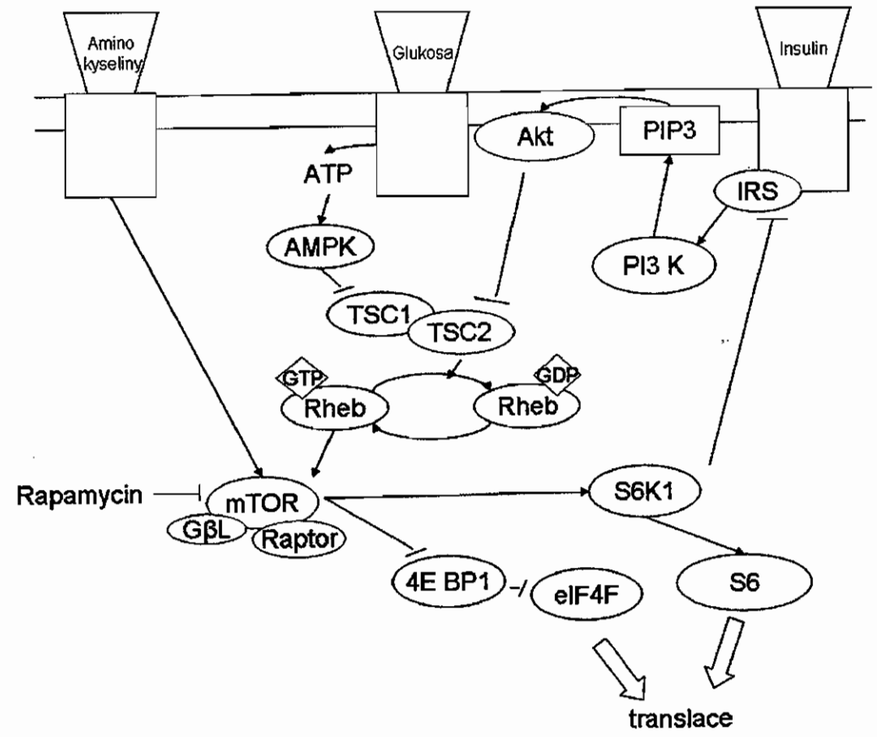
Podkladem pro vznik DM1 je autoimunitní destrukce beta buněk Langerharsových ostrůvků. Jak bylo již dříve uvedeno, Akt kináza se podílí na transdukci většiny signálů pro buněčné přežití. Vsouladu s tím studie prokázaly souvislost mezi zvýšenou expresí Akt kinázy v beta buňkách a zvýšením objemu beta buněk spolu se zvětšením plochy Langerharsových ostrůvků v pankreatu, což bylo provázeno rovněž zlepšením stavu glukosové tolerance u experimentálního modelu diabetu (Bernal-Mizrachi E a kol. 2001, Tuttle RL a kol. 2001). V tomto kontextu je důležité zmínit se rovněž o pozitivním vlivu PTEN, přirozeném antagonisty Akt kinázy (Stiles BL a kol. 2006). Delece PTEN vede ke zvýšení buněčné proliferace a poklesu míry apoptózy a zároveň také k signifikantnímu nárůstu objemu beta buněk bez zjevné alterace jejich diferenciace.

1.4.5.2.2. Akt a vaskulární komplikace při DM1

V průběhu léčby DM1 jsou buňky vystaveny účinkům fluktuujících hladin glukosy v krvi a exogenního inzulinu. Jak bylo již dříve prokázáno, jak glukosa, tak insulin modulují aktivitu Akt kinázy v různých buněčných typech. Z tohoto důvodu je predikce Akt aktivity v případě konkrétních cévních systémů velmi obtížná, zejména je-li aktivita Akt kinázy rovněž tkáňově specifická (Gerhardinger C a kol. 2001, Joussen AM a kol. 2002, Thirone AC a kol. 2002, Laviola L a kol. 2001, Dobrzynski E a kol. 2002).

1.4.5.2.3. Akt signalizace v ledvinách při DM1

Renální hypertrofie, akumulace extracelulární matrix, alterace procesu apoptózy, stejně jako změny renální hemodynamiky, to vše jsou patofyziologické procesy účastnící se vzniku nefropatie během DM1 (Cooper ME 1998). S ohledem na množství funkcí Akt je možné, že nezměněná aktivita této kinázy se rovněž podílí na vzniku DN. Například studie Nagai K a kol (2005) prokázala s využitím experimentálního DM1 modelu vliv signální kaskády Akt/mTOR na mesangiální hypertrofii. Stejná studie se rovněž zabývala vlivem p27, Akt podřazeného inhibitoru cyklin dependentních kináz, na vzniku mesangiální hypertrofie.



Obr 5: Vliv živin a insulinu na mTOR/ S6K1 signální dráhu mTOR/ S6K1 signální dráha zpracovává za účelem kontroly buněčného růstu signály z růstových faktorů (insulinu) a živin. Aminokyseliny působí aktivaci mTOR skrze modulaci inhibiční funkce TSC komplexu a stimulací proteinu Rheb. Glukosa moduluje aktivitu mTOR prostřednictvím 5´AMP aktivovaná protein kinázy (AMPK), když na základě dostupnosti ATP v buňce přímo fosforyluje TSC2 protein, mechanismem nezávislým na Akt kináze, a reguluje tak aktivitu multiproteinového komplexu, jehož součástí je i mTOR. Insulin prostřednictvím insulinového receptoru aktivuje PI3 K a Akt kinázu. Aktivní Akt fosforyluje a tím inaktivuje TSC2, což má za následek stimulaci funkce Rheb jako pozitivního stimulátoru mTOR aktivity. S6K1 a 4E BP1 jsou mTOR podřazené regulační proteiny známé svým zapojením v procesu kontroly translace. S6K1 se rovněž podílí, prostřednictvím zpětné vazby, na regulaci aktivity IRS. (Um SH a kol. 2006)

1.5.1.1. Růstové faktory

Růstové faktory ovlivňují aktivitu mTOR dráhy skrze aktivitu nadřazené PI 3K/ Akt signální dráhy (Wullschleger S a kol. 2006) v detailech diskutované již v předchozím textu. Recentní studie pak podaly důkaz o úloze proteinů TSC1 a TSC2 v procesu aktivace mTOR. Proteiny TCS jsou produkty genů tuberického skterotizujícího komplexu a uplatňují se jako negativní regulátory mTOR signalizace. Komplex proteinů TSC je přímo podřazen PI 3K/ Akt signalizaci (Manning BD a kol. 2002) a je zapojen v přenosu signálu z růstových faktorů a živin. Podle dnes preferovaného modelu působí Akt fosforylaci TCS2, vlivem čehož je zrušen inhibiční vliv TSC komplexu na mTOR signalizaci. Objev Rheb, proteinu přímo podřazeném TSC komplexu, pak ještě víc rozšířil znalosti o mechanismu aktivace mTOR. Rheb je vysoce konzervovaný malý GTP vazebný protein. TSC2 stimuluje Rheb prováděnou hydrolýzu in vivo a in vitro (Castro AF a kol. 2003, Garami A a kol. 2003, Inoki K a kol. 2003a, Tee AR a kol. 2003, Zhang Y a kol. 2003). Podle zjednodušeného modelu tak hypofosforylovaný komplex TSC proteinů inhibuje mTOR aktivitu díky stimulaci Rheb GTP hydrolýzy zprostředkované TSC2 GAP aktivitou, čímž inhibuje funkce Rheb jako pozitivního stimulátoru mTOR aktivity.

1.5.1.2. Živiny a energie

Dosud není zcela přesně známo, jakým způsobem je protein mTOR zapojen do transmise takovýchto signálů. Ačkoli detaily tohoto procesu nejsou stále detailně prozkoumány, řada studií podala možná vysvětlení. Zdá se, že aktivita mTOR je regulována dostupností živin, zároveň se ovšem mTOR podílí na kontrole exprese genů závislých na příjmu živin a to skrze modulaci subcelulární lokalizace řady transkripčních faktorů (Crespo JL a kol. 2002). V procesu regulace syntézy proteinů se uplatňují jak aminokyseliny, tak glukosa. Aminokyseliny působí aktivaci mTORC1 skrze modulaci inhibiční funkce TSC komplexu a stimulaci Rheb (Wullschleger S a kol. 2006). Studie Denis PB a kol. (2001) pak prezentuje zjištění, že při dostupnosti aminokyselin je množství ATP v buňce dalším důležitým faktorem regulujícím aktivitu mTOR. V tomto procesu je, jak se zdá, zapojena 5´AMP aktivovaná protein kinása (AMPK). K aktivaci AMPK dochází vlivem zvýšení poměru AMP/ATP. AMPK funguje jako citlivý ATP senzor v procesu regulace aktivity mTOR, když na základě deplece hladiny ATP v buňce přímo fosforyluje TSC2, což v konečném důsledku vede ke zvýšení GAP aktivity TSC2 a inhibici mTORC1 signalizace (Inoki K a kol. 2003).

1.5.2. Patofyziologie mTOR během diabetu

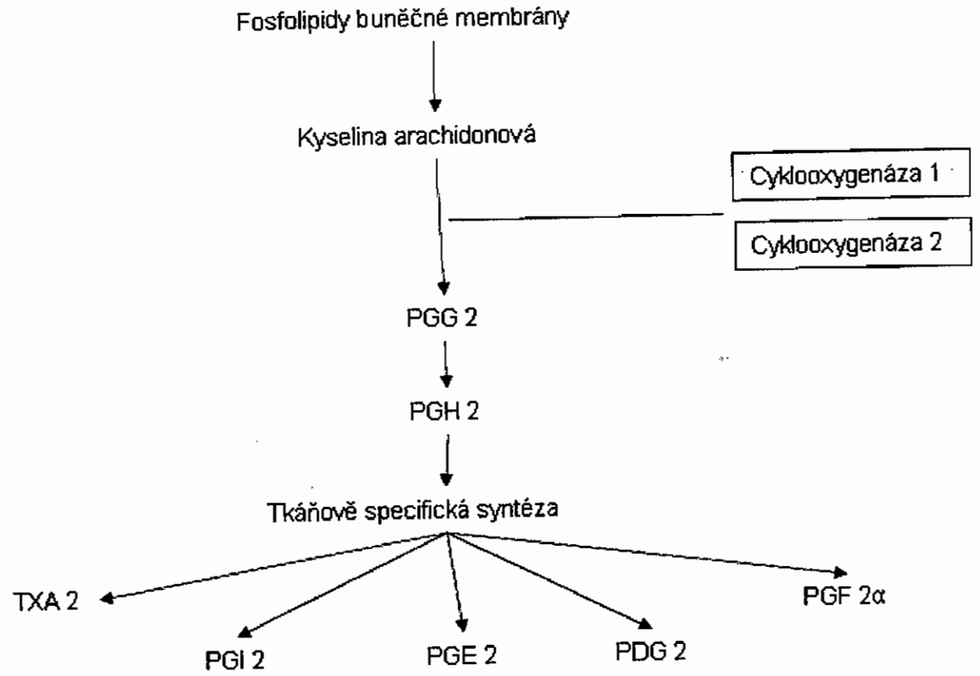
Výzkum týkající se míry aktivity proteinu mTOR ve vztahu k dostupnosti živin naznačuje možnost zapojení tohoto systému v procesech spojených s obezitou a insulinovou rezistencí (Um SH 2006, Patti ME a Kahn BB 2004). Podle nedávných studií by pak mohla být aktivita insulinové signální kaskády modulována mimo jiné rovněž zpětnou vazbou skrze mTOR zprostředkovanou aktivitu S6K1, která snižuje aktivitu Akt kinázy indukovonou insulinem mechanismem zahrnujícím snížení aktivity IRS1 (Um SH a kol. 2006, Harrington LS a kol. 2005). IRS1 signální protein skutečně obsahuje několik míst, kam se váže aktivní S6K1 (Shah OJ a Hunter T 2006). Na základě těchto poznatků byl vytvořen model, podle kterého fosforylace IRS1, k nimž dochází vlivem zvýšené aktivity S6K1, vede k poruše interakce tohoto signálního mediátoru s insulinovým receptorem a k degradaci tohoto proteinu. Mimo to se zdá, že popsaným mechanismem závislým na mTOR/ S6K1 je rovněž ovlivněna aktivita IRS2 (Shah OJ a kol. 2004). V konečném důsledku pak tento mechanismus vede k projevům alterace insulinové signalizace v kaskádě.

1.5.3. Patofyziologie mTOR a diabetická nefropatie

Řada patofyziologických mechanismů zapojených do procesu vzniku DN je ovlivněna aktivitou mTOR. Například studie Nagai K a kol (2005) prokázala vliv signální dráhy PI 3K/ Akt/ mTOR/ p 70 S6 a 4E BP1 a úlohu CDK a jejího inhibitoru p27 KIP v procesu rozvoje glomerulární hypertrofie. Podání rapamycinu in vivo pak mimo jiné brání rozvoji například albuminurie, zbytnění glomerulární membrány nebo poškození glomerulů (Yang Y a kol. 2007). Tyto nálezy tak svědší pro benefiční vliv rapamycinové léčby blohující prohypertrofickou mTOR signalizaci v ledvinách.

1.6. Úvod do biologie cyklooxygenáz

Cyklooxygenázy (COX) jsou enzymy iniciující první krok při syntéze biologicky významných prostanoidů, jakými jsou prostaglandiny (PG) E_2, F_2, G_2, a I_2 a tromboxan A_2 (TxA2). Prostanoidy jsou velmi důležité látky s významnou úlohou v řadě fyziologických a patologických procesů v organismu (Smith WL a Langenbach R. 2001). Mezi tyto procesy patří např. modulace zánětlivého procesu, ochrana gastrointestinálního traktu, hemostáza, angiogeneze nebo renální hemodynamika. Prostaglandiny jako PgI2 a PgE2 způsobují renální vasodilataci a udržují glomerulární filtraci, především za podmínek převahy působení vasokonstriktorů jako je AngII (Jaimes EA a kol. 2005). Dále se tyto působky vyznačují významným natriuretickým a diuretickým působením. Další významný prostanoid, TxA2, naopak způsobuje renální vasokonstrikci a díky schopnosti aktivovat TGF-beta působí preskleroticky (Negrete H a kol. 1995). Do dnešního dne byly v genomu savců identifikovány nejméně dvě isoformy COX proteinů. Cyklooxygenáza 1 (COX-1) a cyklooxygenáza 2 (COX-2) se vykazující cca 60% sekvenční homologii (Xie WL a kol. 1991) a jsou kodovány různými geny lokalizovanými na odlišných chromozomech. V nedávné době byla charakterizována třetí COX isoforma, COX-3, která představuje variantu COX-1 vzniklou odlišným sestřihem (Chandrasekharan NV a kol. 2002). V následujícm textu budou ovšem blíže diskutovány pouze ioformy COX-1 a COX-2. Obě izoformy COX jsou membránově vázané enzymy s podobnou terciální strukturou a vykazují rovněž podobnosti ve struktuře aktivního místa enzymu (Picot D a kol. 1994, Kurumbail RG a kol. 1996).



Obr 6: Schématické znázornění biosyntézy prostanoidů z kyseliny arachidonové (Cronstein BN 2002)

1.6.1. Exprese a aktivita cyklooxygenázových isoforem

Ačkoli se isoformy COX zásadně neliší strukturou ani katalytickou aktivitou, k zásadním odlišnostem dochází na úrovni exprese, funkce a lokalizace v organismu. Zjednodušeně lze říci, že COX-1 představuje konstitutivní isoformu, jejíž exprese je regulována hormonálními signály ovlivňijícími buněčnou homeostázu. COX-1 je zodpovědná za syntézu cytoprotektivních prostaglandinů ve sliznici gastrointestinálního traktu, především v žaludeční sliznici. Hraje rovněž významnou roli v hemodynamické regulaci ledvin a v syntéze tromboxanu A2 v krevních destičkách. Zatímco je COX-1 jako konstitutivní forma enzymu přítomna v mnoha buněčných typech v konstantním množství, aktivita inducibilní COX-2 je za fyziologických podmínek téměř nezjistitelná a její exprese v organismu je je omezena především na místo zánětu. K nárůstu exprese COX-2 tak dochází vlivem řady zánětlivých, mitogenních a fyzikálních stimulů (Tetsuka T a kol. 1996, Fletcher BS a kol. 1992). Promotorová oblast COX-2 genu obsahuje řadu regulačních oblastí jako NF kB, CRE, AP2 nebo SP1 (Fletcher BS a kol 1992, Sirois J a kol. 1993, Inoue K a kol. 1995, Yamamoto K a kol. 1995, Kosaka T a kol. 1994) vážící transkripční faktory jejichž aktivita je ovlivněna mimo jiné rovněž aktivitou MAPK a Akt kinázy.

1.6.2. Exprese a aktivita cyklooxygenázových isoforem v ledvinách

Renoprotektivní účinky vazodilatačních prostaglandinů produkovaných COX-1 isoformou se uplatňují zejména při udržení dostatečného renálního průtoku v případě některých patologických stavů (srdeční selhání, jaterní cirhóza, renální insuficience). Ačkoli je COX-2 považována za inducibilní enzym produkující prostaglandiny zodpovědné za vznik bolesti a zánětu, v ledvinách je tato isoforma exprimována konstitutivně a to v macula densa a v Henleyově kličce (cTALH) u zvířecích modelů jako potkan, myš, králík nebo pes. U člověka pak dochází k expresi COX2 rovněž v podocytech (Câmpean V a kol. 2003, Harris RC a kol. 1994, Kömhoff M a kol. 1997). Exprese COX-2 je u člověka omezena a dochází k ní u pacientů starších 60 let (Harris RC 2006). Macula densa představuje v ledvinách oblast tvořící důležitou součást renin-angiotensinového systému ovlivňující hospodaření se solemi a fluidní objem v ledvinách (Schnermann J a Briggs JP 1999). K nárůstu produkce COX2 v macula densa dochází například vlivem deprivace solí, což ukazuje na význam prostaglandinů produkovaných tímto enzymem pro proces absorbce solí v ledvinách v závislosti na jejich dostupnosti (Nantel F a kol. 1999). U několika modelů progradujících renálních onemocnění, včetně modelů DM1, pak byla rovněž zaznamenána zvýšená exprese COX-2 (Cheng HF a kol. 2002, Komers R a kol. 2001). Dlouhodobé studie prokázaly pozitivní vliv selektivní inhibice COX-2 na rozvoj proteinurie a renálních strukturálních změn (Cheng HF a kol. 2002, Sanchez PL a kol. 1999, Wang JL a kol. 2000).

2. Cíle studie

Práce je zaměřena na studium aktivity Akt a jejích efektorů, proteinů mTOR a eNOS, spolu s expresí a aktivitou cyklooxygenáz v časných fázích diabetu a jejich úlohu v patofyziologii renálních morfologických a hemodynamických změn při diabetu.

Práce shrnuje studie zaměřené na následující dílčí cíle:

1/ Studium ativity Akt kinázy a jejího efektoru, mTOR, v kůře ledvin streptozotocinových diabetických potkanů, modelu DM1, a příslušných kontrol ve vztahu ke stupni metabolické kompenzace.

2/ Studium aktivity Akt kinázy a jejich efektorů, proteinů mTOR a eNOS, v kůře ledvin diabetických obézních potkanů kmene Zucker, modelu DM2, a příslušných kontrol ve vztahu k plazmatickým hladinám insulinu.

3/ Studium vylučování prostanoidů v moči a exprese COX isoforem v kůře ledvin DM2 experimentálního modelu (Zuckerův diabetický obézní potkan) a příslušných kontrol ve vztahu k plazmatickým hladinám insulinu.

3. Metody

3.1. Zvířecí modely diabetu použité ve studiích

3.1.1. Model DM1 :

Diabetes byl u dospělých osmi týdenních samců potkana kmene Wistar (200-300g) vyvolán i.v. aplikací streptozotocinu (STZ, 65 mg/ kg, jako vehikulum byl použit citrátový pufr pH 4,0 v koncentraci 0,1 mmol/ L). Kontrolní skupině zvířat byl podán pouze citrátový pufr. STZ potkani představují dobře popsaný model DM1. STZ ničí beta buňky pankreatu za vzniku insulinopenie. Model vykazuje četné změny glomerulární ultrastruktury a renálních funkcí (Cooper ME a kol. 1988, Allen TJ a kol. 1990). K uvedeným studiím byl použit STZ model s různým stupněm metabolické kompensace. Měření byla prováděna ve 4 týdnu po navození diabetu.

3.1.2. Model DM2 :

Ve studiích byli využiti samci Zuckerova obézního potkana (ZDF) a kontrolní zvířata (ZL) dodaná firmou Charles River, Sulzfeld, Německo. ZDF potkani jsou metabolicky velmi dobře charakterizováni : autosomálně-recesivní mutace fa genu kodujícího leptinový receptor vede k hyperfagii, obezitě a hyperlipidemii (Phillips MS a kol. 1996). Pokusná zvířata vykazují většinu metabolických abnormalit asociovaných s DM2 jako například insulinovou rezistenci, hyperinsulinémie, porucha glukosové tolerance a postupně se zvyšující hladinu cukru v krvi (Ionescu E a kol. 1985). ZDF potkani jsou rovněž hojně využívaným modelem pro studium nefropatie asociované s DM2 (Zucker LM 1965, Kasiske BL a kol. 1992). S narůstajícím věkem se u zvířat spontánně vyvíjejí proteinurie a ohniska segmentální glomerulosklerosy, což pak spolu s rozvojem dalších funkčních a strukturálních abnormalit vede k selhání ledvin (Zucker LM 1965, Kasiske BL a kol. 1985).

Se zvířaty bylo nakládáno dle metodických pokynů zákona na ochranu zvířat proti týrání. Zvířata byla chována ve standardním chovu s volným přístupem k potravě a vodě a střídáním period světla a tmy po 12 hodinách. K usmrcení zvířat dekapitací došlo bez předchozího hladovění. Ihned po usmrcení byla zvířatům odebrána krev a byly zjištěny hodnoty krevního cukru a hladiny insulinu v séru. Zvířatům byly rovněž ihned odebrány ledviny. Dekapsulace ledvin a jejich rozdělení na korovou a dřeňovou část bylo provedeno na ledu. Získané vzorky tkání byly zamraženy v tekutém dusíku a pak dlouhodobě uchovávány při teplotě -80 stupňů až do dalšího zpracování. Polovina pravé ledviny byla prosycena 10% formalínem a později využita k imunohistochemickým analýzám.

3.2. Homogenizace tkáně

Tkáň renálního kortexu byla homogenizována v chlazeném extrakčním pufru elektrickým homogenizátorem a centrifugací (850G po 10 min při 4 °C) zbavena zbytků tkáně a jaderné frakce. Supernatant byl znovu centrifugován (100 000G po 60 min při 4 °C). Tímto způsobem byla získána cytosolická frakce tvořící supernatant a membránová frakce obsažená v usazenině. V následujících studiích byly za účelem analýzy immunoblottingem dále využity cytosolické frakce. Koncentrace proteinů ve vzorcích byla zjištěna pomocí komerčního BCA kitu (Pierce, Rockford, IL, USA) při dodržení postupu doporučeného výrobcem.

3.3. Akt kinázová assay

Míra Akt aktivity byla měřena s využitím komerční kinázové assay (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) při dodržení postupu doporučeného výrobcem spočívajícím v immunoprecipitaci homogenátu renální kortikální frakce s imobilizovanou anti fosfo Ser 473 Akt protilátkou následovanou inkubací immunoprecipitátu se substrátovým GSK3 fuzním proteinem za přítomnosti ATP. Míra fosforylace GSK3 proteinu, vyjadřující míru Akt aktivity, pak byla stanovena s využitím techniky immunoblotingu a anti-fosfo-GSK3 protilátky.

3.4. Immunoblotting

Míra exprese proteinů COX-1, COX-2 , PTEN, Akt a jejich efektorů mTOR a eNOS byla měřena za využití techniky immunoblottingu s využitím primárních protilátek COX-1, COX-2 (1:500; Cayman Cheminal, Ann Arbor, MI, USA) a PTEN, Akt, mTOR a eNOS (1:750; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA). Metoda immunoblotingu je založena na transféru proteinů rozdělených pomocí sodium dodecyl sulfátového polyakrylamidového gelu (SDS-PAGE) na membránu a následné detekcí specifického proteinu pomocí vizualizace vazby antigen-protilátka využívající značenou sekundární protilátku (Kurien BT a Scofield RH. 2006). V tomto případě byly příslušné sekundární protilátky značeny křenovou peroxidázou (Pierce, Rockford, IL, USA) a k vizualizaci produktu na rentgenový film (Kodak, Rochester, NY, USA) došlo pomocí chemiluminiscenčního kitu (Pierce, Rockford, IL, USA) a dodržení pracovního postupu doporučeného výrobcem. Po detekci produktu byly membrány v souladu s postupem navrženým výrobcem inkubovány po 30 min v komerčním reblotovacím roztoku (Chemicon International, Temecula, CA, USA) a následně po 60 min blokovány v roztoku mléka. Specifický produkt byl, stejně jako v předchozím případě detekován chemiluniniscencí. Exprese jednotlivých proteinů byly vztaženy k expresi aktinu (1:2000; Abcam, Cambridge, CA, UK). Získané filmy byly hodnoceny densitometrií s využitím NIH Image gel plotting macro.

3.5. Immunohistochemie

Cílem imunohistochemického stanovení je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, t.j. na principu vazby antigenu a protilátky. Pro standardnost provedení jsou tkáňové řezy nejprve odparafinovány a poté rehydratovány před blokací aktivity endogenní peroxidásy a aplikací primární protilátky. V případě nepřímé imunohistochemické metody je pak aplikována sekundární protilátka konjugovaná s enzymem a specifické barvení je zviditelněno po přidání enzym - specifického substrátu (Ambrosius H a Luppa H 1987).

Této metodiky bylo použito k lokalizaci studovaných proteinů v kůře ledvin. Standardní procedura fixace ledninové tkáně ve formolu a příprava tenkých řezů byla provedena v laboratořích PAP IKEM. Vlastní immunohistochemické stanovení fosfo-Akt-Ser 473 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) nebo COX-2 (Cayman Cheminal, Ann Arbor, MI, USA) bylo provedeno za využití ABC, resp. SABC metody. Princip metody spočívá v označení sekundární protilátky biotinem a jeho následné vazbě se streptavidin-biotinovým komplexem označeným křenovou peroxidázou. Enzymatická aktivitu této peroxidázy po přidání chromogenu indikovala ta místa v preparátu, na nichž došlo k primární specifické reakci.

3.6. Analytické metody

Hladina glukosy v krvi byla stanovena s využitím glukosa-oxidační assay (Pliva-Lachema, ČR). Koncentrace insulinu v séru byly měřeny pomocí RIA kitu (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Hladina sérových triacylglycerolů byla stanovena s využitím standardní enzymatické fotometrické metody (Bio-latest, ČR). Ke stanovení hladiny sérových neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) byl použit komerční kolorimetrický kit využívající oxidace acyl-CoA (Roche Diagnostic, Basel, CH). Koncentrace proteinu v moči byly stanoveny spektrofotometricky po reakci s kyselinou perchlorovou (Pliva-Lachema, ČR). Vylučování prostanoidů v moči bylo stanoveno pomocí immunoassay kitu (Cayman Chemicals, Ann Argor, MI, USA). Při využití komerčních kitů bylo postupováno dle firemních metodických doporučení.

3.7. Statistická analýza

Data jsou vyjádřena jako průměrná hodnota ± SEM. Veškerá statistická vyhodnocení byla provedena s využitím analýzy variance (ANOVA) a následným Scheffé testem. Srovnání různých způsobů léčby u kontrol a diabetických zvířat bylo provedeno s využitím dvoucestné ANOVA s opakováním. Veškerá statistická srovnání byla provedena s využitím softwaru Statview SE a Graphic (BrainPower, Calabasas, CA, USA). Hodnota p nižší než 0,05 byla považována za statisticky významnou.

4. Studie I.

Renální aktivita Akt kinázy/ protein kinázy B u obézních Zuckerových potkanů

4.1. Úvod

Akt kináza je serin/ thereoninová kináza podřazená PI3K (Burgering BM a Coffer PJ 1995) významně se uplatňující v procesu insulinové signalizace. Aktivita Akt kinázy reguluje řadu buněčných funkcí včetně metabolismu glukosy, buněčné viability, syntézy proteinů atd. Porucha insulinové signalizace na úrovni PI3K/ Akt je součástí patofyziologie insulinové rezistence (IR) v kosterním svalstvu, játrech nebo tukové tkáni (Krook A a kol. 1998, Rondinone CM a kol. 1999). Možné alterace Akt signalizace v dalších tkáních, rovněž postižených komplikacemi během diabetu, však nebyly dosud dobře prozkoumány.

Ledviny jsou cílovým orgánem mnoha účinků insulinu. Akt-dependentní procesy se podílejí na regulaci mechanismů relevantních pro renální patofyziologii jako jsou syntéza proteinů, viabilita, produkce NO, reabsorbce sodíku atd. (Bhandari BK a kol. 2001, Senthil D a kol. 2002, Hiromura K a kol. 2002, Bridgewater DJ a kol. 2005, Hayashi K a kol. 1997, Schmetterer L a kol. 1997, Schnyder B a kol. 2002) a mohou tak přispět k morfologickým a funkčním změnám v diabetických ledvinách.

4.2. Metody

Metody využité v této studii jsou detailně popsány v sekci 3.

4.2.1. Uspořádání pokusu

Předkládaná studie se zaměřuje na určení renální kortikální aktivity a exprese Akt kinázy a jejích efektorů, proteinů mTOR a eNOS, spolu s expresí proteinu PTEN u DM2 modelu Zuckerových obézních potkanů (ZDF) a kontrolních zvířat (ZL) ve věku 4 a 12 týdnů. Význam vlivu PI3K/ Akt signalizace byl studován v separátním experimentu, kde byl skupině zvířat ve věku 12 týdnů intraperitoneálně injikován wortmanin v dávce 100 μg/ kg tělesné hmotnosti 90 minut před usmrcením. Jako vehikulum bylo využito 15% DMSO (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO USA) . Získaná data pak byla porovnána s výsledky získanými u zvířat , kterým bylo aplikováno pouze vehikulem.

4.3. Výsledky

Základní metabolické a fyzické parametry pokukusných zvířat jsou shrnuty v tabulce č. 5. Dle předpokladů byla tělesná hmotnost diabetických zvířat signifikantně vyšší v porovnání s kontrolními potkany a to už ve věku 4 týdnů. Ve věku 12 týdnů byl dosažený rozdíl v hmotnosti zvířat ještě výraznější. U obou věkových skupin došlo k nárůstu hmotnosti ledvin. Poměr hmotnosti ledviny ku hmotnosti těla však u 4 týdenních ZDF nevykazoval rozdíl v porovnání se stejně starými kontrolami. U skupiny ZDF potkanů ve věku 12 týdnů tento poměr v porovnání se ZL dokonce klesl. U diabetických zvířat jsme zjistili rovněž významný nárůst koncentrace insulinu v plazmě a hodnot triacylglycerolů a NEMK v séru. Diabetická zvířata obou věkových skupin vykazovala signifikantní nárůst hladiny cukru v krvi v porovnání s kontrolami stejného věku.

Tabulka 5: základní metabolické a fyzické parametry ZL a ZDF

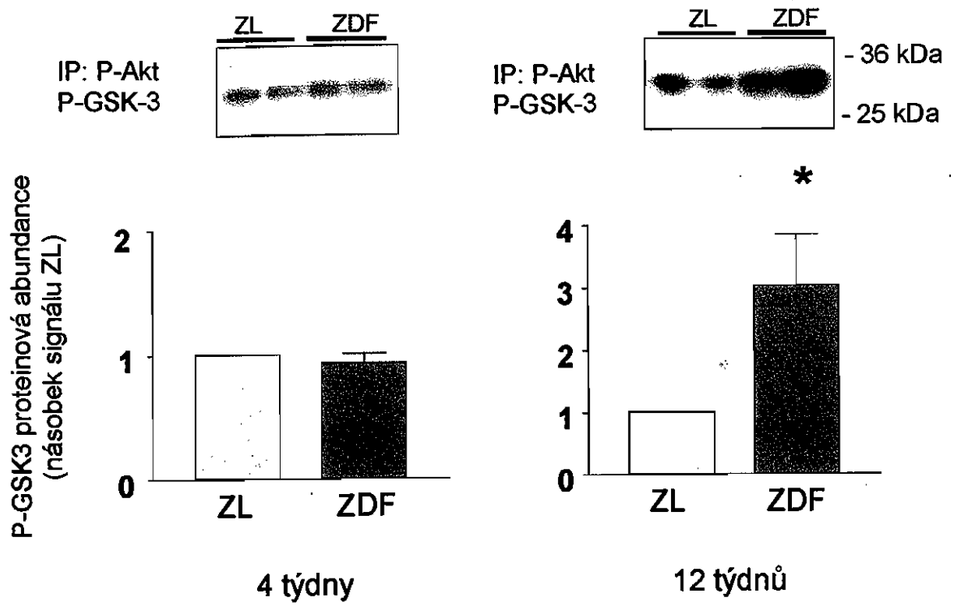
	n	Tělesná hmotnost [g]	Hmotnost pravé ledviny [g]	Hmotnost pravé ledviny / tělesná hmotnost	Plasmatický insulin [nmol/l]	Glukosa v krvi [nmol/l]	Serové triacylglyceroly [nmol/l]	NEMK [nmol/l]
ZL 4	5	103 ±2	0,43±0,01	0,42±0,01	0,40±0.04	4,0±0.1	0,6±0.1	ND
ZDF 4	6	131 ±6^{A}	0,514±0,01^{B}	0,40±0,02	0,74±0.07^{A}	5,5±0.6^{B}	1,4±0.1^{A}	ND
ZL 12	5	358± 9	1,13±0,05	0,31±0.01	0,48±0.09	5,3±0.1	0,9±0.1	0,43±0.02
ZDF 12	6	538±25^{B}	1295±0,04^{B}	0,24±0,01^{B}	1,81±0.19^{C}	6,7±0.3^{C}	4,2±0.4^{C}	0,54±0.02^{C}

NEMK, neesterifikované mastné kyseliny. $^{A}p<0.01$; ^{B} $p<0.05$; ^{C} $p<0.001$ ZDF vs. ZL stejného věku.

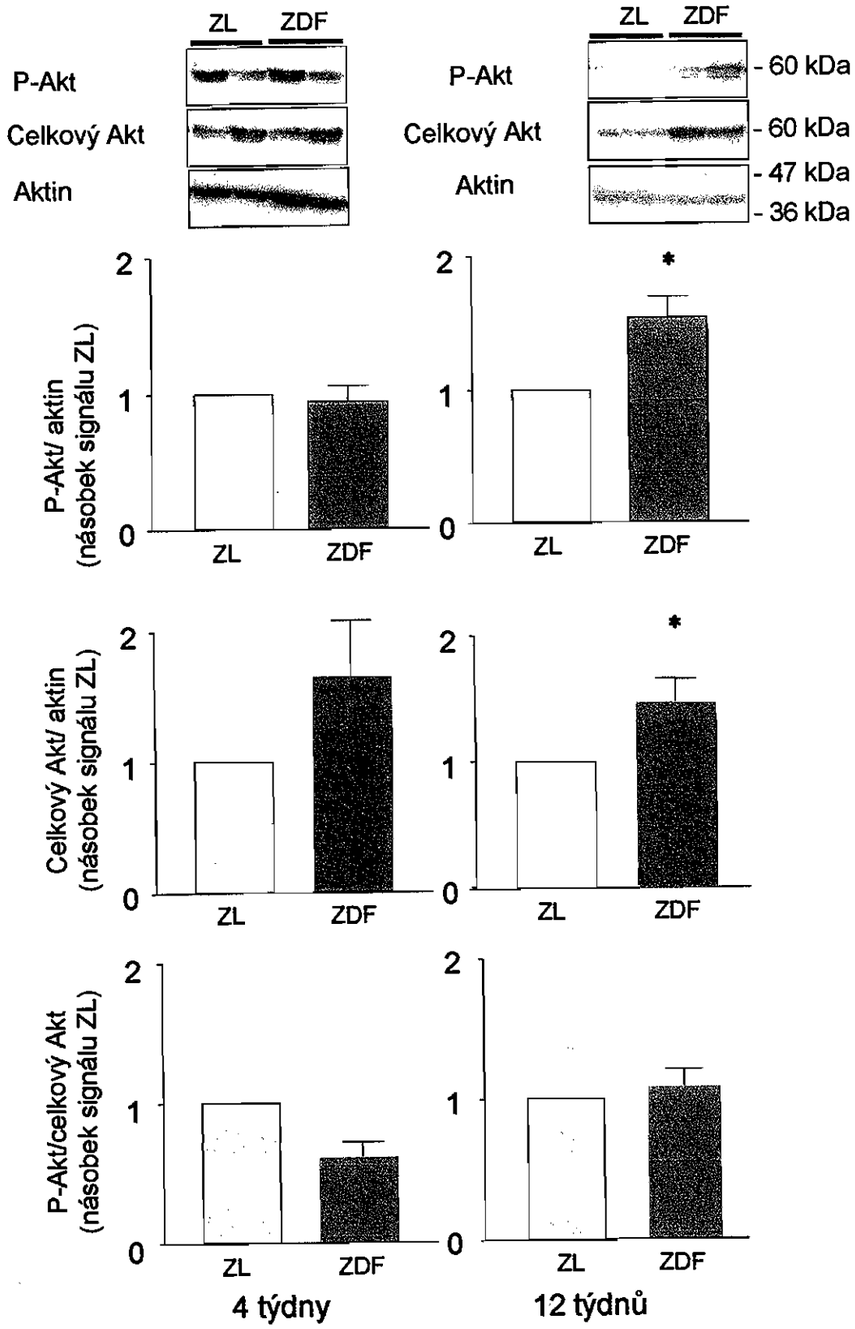
Výsledky stanovení renální kortikální Akt aktivity jsou zobrazeny na obr 7. Ve věku 4 týdnů je Akt aktivita u ZDF a ZL potkanů prakticky shodná. Ve věku 12 týdnů však ZDF potkani vykazují výrazný nárůst Akt aktivity ve srovnání se ZL skupinou. Tento nález koresponduje s nárůstem exprese P-Ser 473 Akt (obr. 8). U 12 týdenních ZDF potkanů rovněž došlo k nárůstu exprese celkové Akt (obr.8). Výsledky analýzy exprese proteinu PTEN, fosfatásy regulující aktivitu Akt kinázy, jsou zobrazeny na obr. 9. Exprese PTEN se mezi věkovými skupinami nelišila a byla srovnatelná u diabetických i kontrolních zvířat. Imunohistochemické studie lokalizovaly expresi P-Ser 473 Akt do glomerulů, podocytů a distálních tubulů. Distribuce exprese P-Akt Ser 473 byla u skupin diabetických a kontrolních zvířat srovnatelná.

V souladu se zvýšenou renální Akt aktivitou vykazovala diabetická zvířata ve věku 12 týdnů rovněž nárůst fosforylace proteinu mTOR. Rozdíl v expresi celkového mTOR mezi skupinami diabetických a kontrolních zvířat nedosáhl statistické významnosti (obr 10). Na rozdíl od aktivity mTOR byla fosforylace proteinu eNOS, a to i navzdory zvýšené expresi celkové eNOS, u 12 týdenních ZDF potkanů v porovnání s kontrolními zvířaty nižší. (obr. 13).

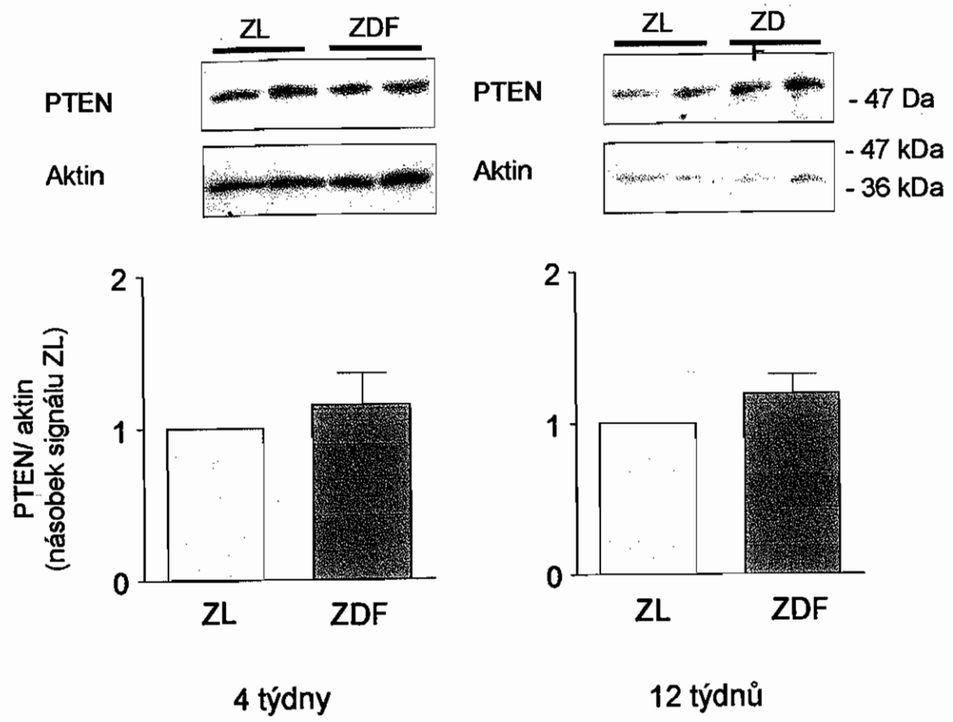
Vliv PI3K/ Akt signalizace byl sledován ve zvláštním experimentu u skupin zvířat ve věku 12 týdnů, kterým byl jednorázově aplikován inhibitor PI-3 kinázy wortmanin. Fyzické a metabolické parametry těchto zvířat byly identické s hodnotami uvedenými v tabulce 5. Z důvodu možného ovlivnění Akt aktivity vehikulem, byla provedena srovnávací měření u skupiny zvířat, kterým bylo podáno jen samotné vehikulum (DMSO). Obr 11, panel A ukazuje, že samotné vehikulum nemá na sledované parametry žádný vliv. Podání wortmaninu vedlo k redukci Akt aktivity u diabetických zvířat, zatímco u kontrol nemělo podání wortmaninu na míru Akt aktivity vliv (obr 11, panel B). Podání wortmaninu ovlivnilo rovněž míry fosforylace mTOR a to, stejně jako v předchozím případě Akt aktivity, pouze u skupiny diabetických zvířat (obr 12).



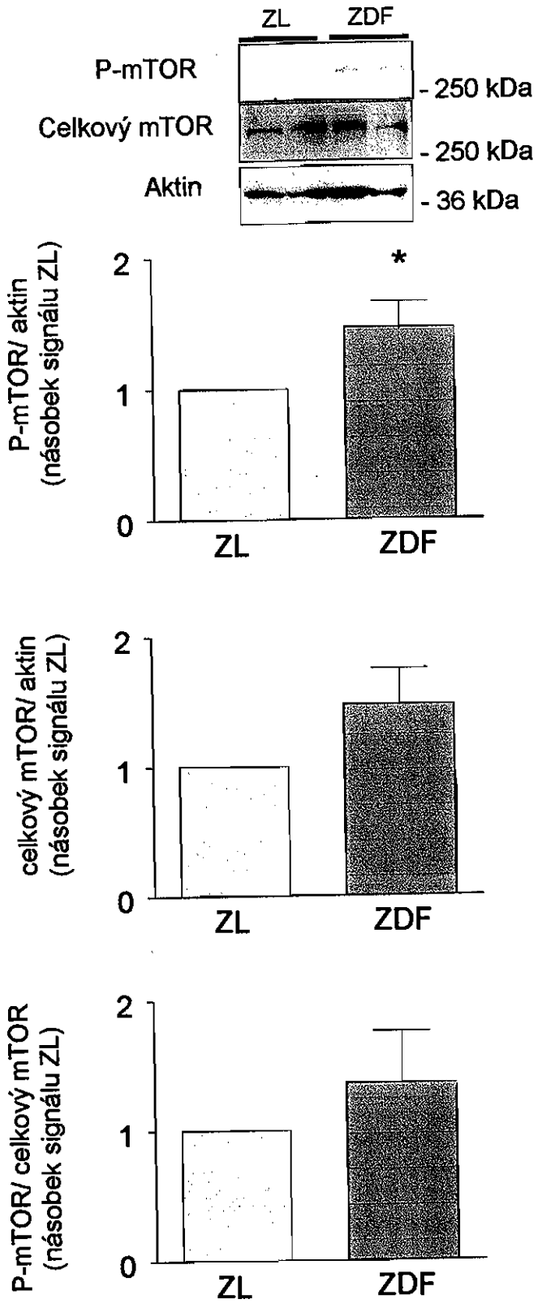
Obr 7: Renální kortikální aktivita Akt kinázy (kinázová assay) u ZL a ZDF ve věku 4 a 12 týdnů.
U 4 týdenních ZDF byla aktivita Akt kinázy srovnatelná se ZL. Zvířata ve věku 12 týdnů mají, na rozdíl od mladých zvířat, aktivitu Akt kinázy v renálním kortexu signifikantně vyšší v porovnání se stejně starými kontrolami *p<0.05 ZDF vs. ZL stejného věku



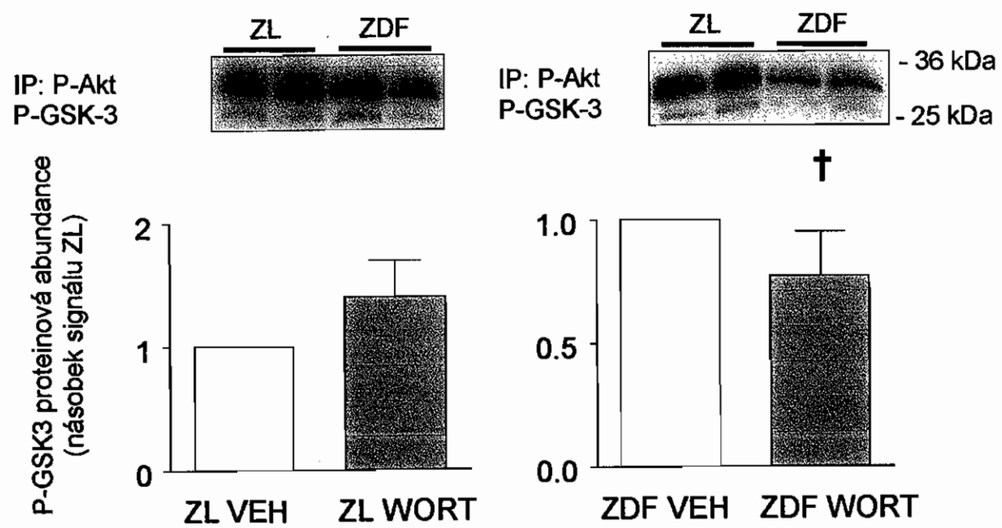
Obr 8 : Exprese P-Ser 473 Akt v renálním kortexu u ZL a ZDF ve věku 4 a 12 týdnů. ZDF potkani ve věku 12 týdnů demonstrují signifikantně vyšší hodnotu exprese P-Ser 473 Akt a celkového Akt v porovnání se stejně starými kontrolami. Hodnota poměru exprese P-Ser 473 ku expresi celkového Akt vyjadřující míru aktivity Akt kinázy se ovšem u diabetických zvířat a kontrol nelišila. *p<0.05 ZDF vs. ZL stejného věku .



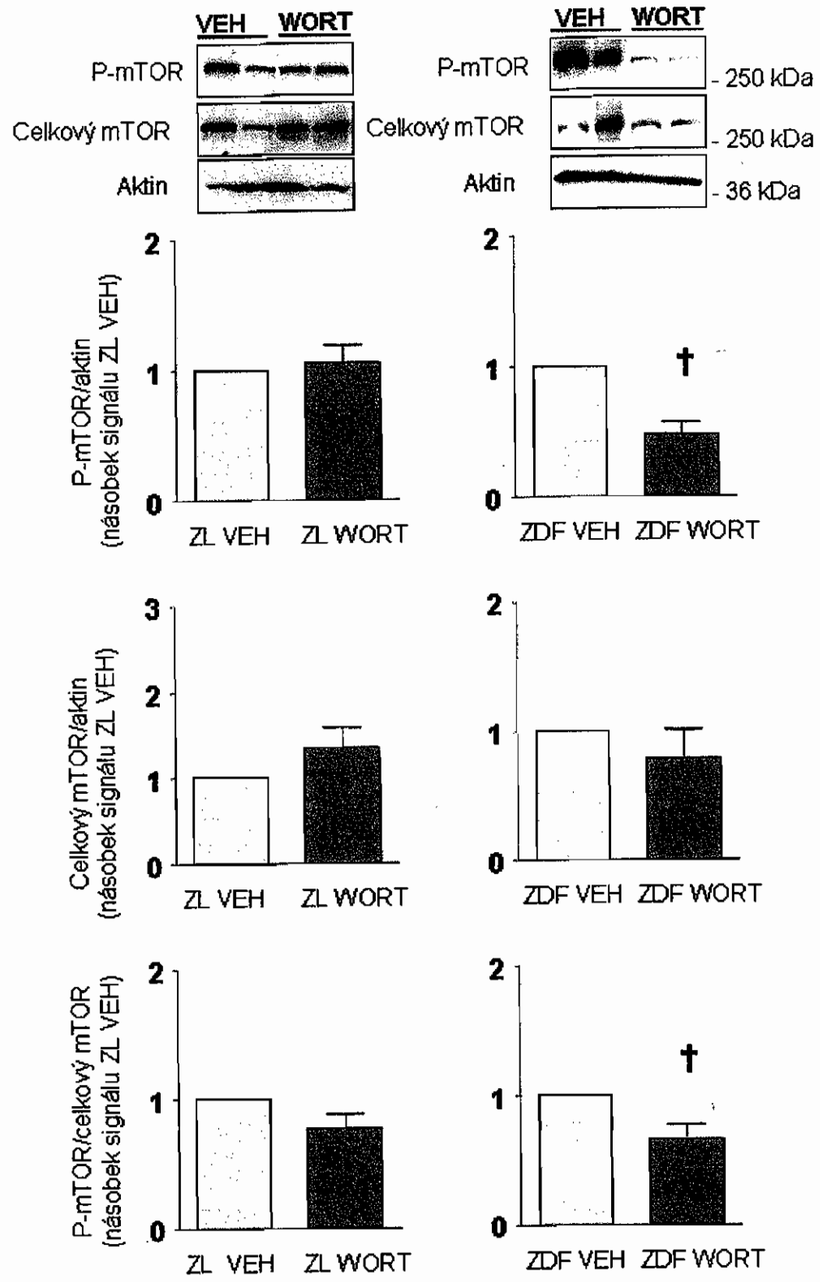
Obr 9 : Exprese PTEN v renálním kortexu u ZL a ZDF ve věku 4 a 12 týdnů.
Nebyly zaznamenány rozdíly v expresi PTEN mezi skupinami pokusnych zvířat



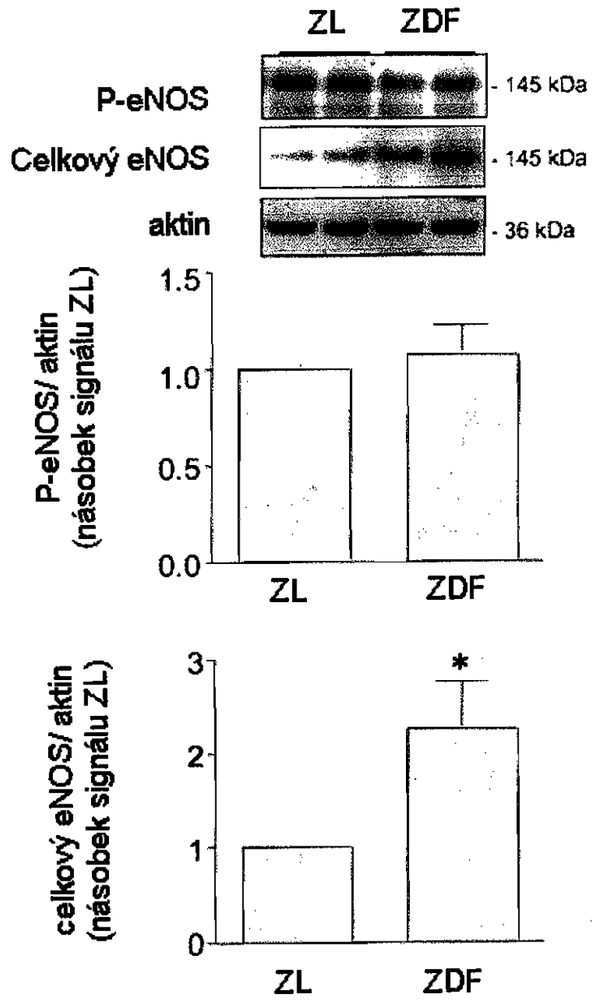
Obr 10: Exprese P-Ser 2448 mTOR a celkového mTOR v renálním kortexu u ZL a ZDF ve věku 12 týdnů.
Exprese P-Ser 2448 mTOR byla u ZDF signifikantně vyšší v porovnání se ZL. Mezi pokusnými skupinami nebyl zaznamenán rozdíl v expresi celkového mTOR ani v poměru P-Ser 2448 mTOR ku celkovému mTOR *$p<0.05$ ZDF vs. ZL.



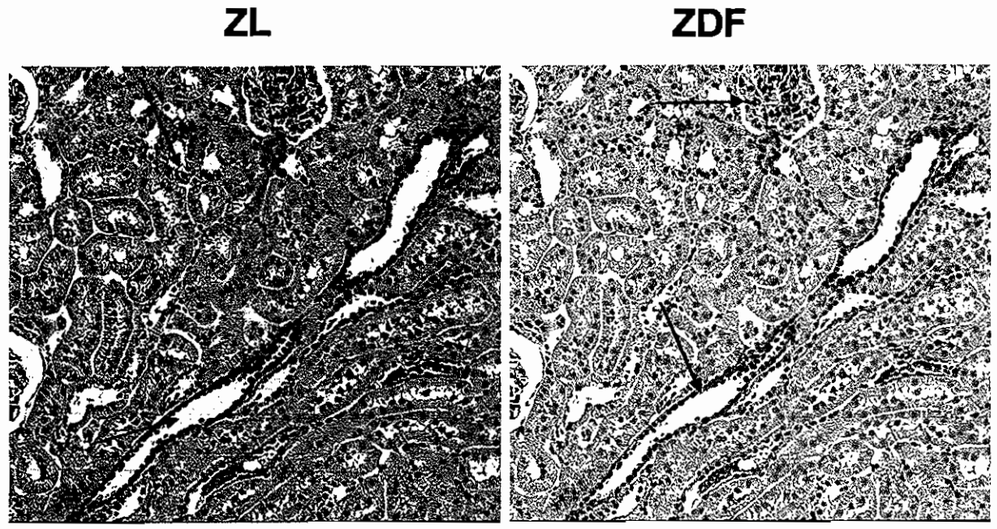
Obr 11 :Efekt wortmaninu na aktivitu Akt kinázy (kinázová assay) v renálním kortexu u ZL a ZDF ve věku 12 týdnů.
Inhibitor PI3K, wortmanin, akutně podaný v dávce 100 μg/ kg tělesné hmotnosti redukoval aktivitu Akt kinázy u ZDF, nikoli však u ZL potkanů **(panel B)**. Z důvodu vyloučení možnosti, že DMSO využívané jako vehikulum při podání wortmaninu ovlivní aktivitu Akt kinázy, byla porovnána aktivita Akt v renálním kortexu ZL a ZDF potkanů, kterým bylo podáno pouze DMSO. Tako zvířata vykazovala stejné rozdíly v aktivitě Akt, jaké byly pozorovány u zvířat bez léčby DMSO **(panel A)**. †$p<0.01$ ZDF s wortmanninem vs. ZDF s vehikulem



Obr. 12: Vliv wortmaninu na expresi mTOR u ZL a ZDF potkanů ve věku 12 týdnů
Exprese mTOR byla měřena metodou immunoblottingu u 12 týdenních ZDF a ZL potkanů, kterým byl akutně podán wortmannin (100 µg/ kg), inhibitorem PI 3K, nebo vehikulem DMSO. Podání wortmaninu mělo za následek redukci fosforylace mTOR u ZDF, nikoli však ZL potkanů. †$p<0.01$ ZDF s wortmanninem vs. ZDF s vehikulem



Obr 13: Exprese P-Ser 1177-eNOS a celkového eNOS v renálním kortexu ZL a ZDF potkanů ve věku 12 týdnů.
Exprese P-Ser 1177-eNOS a celkového eNOS byla měřena technikou western blottingu. Míra fosforylace eNOS byla u ZL a ZDF potkanů srovnatelná, navzdory vyšší proteinové expresi celkové eNOS. *$p<0.05$ ZDF vs. ZL



Obr 14: Immunohistochemická lokalizace P-Ser473-Akt v renálním kortexu
Immunoreaktivita P-Ser473-Akt byla zjištěna v glomerulech a částečně take v podocytech a distálních tubulech-označeno šipkami. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v distribuci P-Ser473-Akt mezi skupinami ZL a ZDF potkanů.

4.4. Diskuse

Změny Akt aktivity a signalizace byly s ohledem na experimentalni a klinický kontext zaznamenány v řadě tkání a buněčných typů. V současné době je již znám význam Akt signalizace pro rozvoj onemocnění ledvin v závislosti na hyperinsulinemii provázející stavy insulinové rezistence. Je rovněž známo, že obézní pacienti a modely obezity jsou náchylné ke vzniku renálních onemocnění. Signální kaskády zapojené do transdukce insulinové signalizace za těchto podmínek však dosud nebyly podrobnější prozkoumány.

Feliers D a kol. (2001) zdokumentoval nárůst Akt aktivity v ledvinách obézních db/ db myší. Předkládaná studie dospěla ke stejným závěrům za využití obézních ZDF potkanů. Použité DM2 modely se ovšem lišily dosaženými hladinami glukosy v krvi. Je známo, že hyperglykemie může nezávisle modifikovat aktivitu Akt kinázy v ledvinných buňkách (Mariappan MM a kol. 2007, Wu D a kol. 2007). V případě modelu ZDF potkana však došlo ke zvýšení Akt aktivity u obézních hyperinzulinemických zvířat nezávisle na účinku hyperglykemie. Navíc, současně se zvýšenou mírou aktivity a exprese P-Ser 473 Akt byla zaznamenána také zvýšená exprese celkové Akt. Tyto výsledky mohou svědčit pro to, že za podmínek chronické hyperinzulinemie dochází u tohoto modelu ke změnám jak na translační tak postranslační úrovni. Zaznamenané rozdíly v aktivitě Akt kinázy u 12 týdenních ZDF potkanů navíc nejsou způsobeny účinky PTEN, který je přirozeným antagonistou Akt kinázy.

Již dříve byla zaznamenána korelace mezi zvýšením Akt aktivity a projevy hypertrofie a akumulace extracellulární matrix, což jsou známé strukturální změny provázející diabetickou nefropatii. Protein mTOR, o kterém je známo, že se podílí na kontrole translace, by pak mohl během hyperinsulinemických stavů ovlivňovat zmíněné patofyziologické procesy (Bhandari BK a kol. 2001). Výsledky této studie, podle kterých byla v souladu se zvýšenou

aktivitou Akt kinázy u skupiny diabetických hyperinzulinemických ZDF potkanů ve věku 12 týdnů zvýšena rovněž míra fosforylace proteinu mTOR v porovnání se stejně starými kontrolami, by svědčily o správnosti těchto tvrzení. Následně provedená analýza využívající inhibici PI3 K wortmaninem podaném skupině 12 týdenních diabetických a kontrolních zvířat pak měla ozřejmit, zda u tohoto experimentálního DM2 modelu existuje vztah mezi aktivitou proteinů Akt a mTOR a jakou měrou je tato závislost ovlivněna insulinovou signalizací. Podání wortmaninu způsobilo pokles aktivity u obou proteinů, avšak pouze u skupin diabetických zvířat. Výsledky analýz tak svědčí pro to, že aktivita Akt kinázy je u tohoto obézního DM2 modelu, alespoň z části, závislá na inzulinu. Míra aktivity Akt kinázy pak ovlivňuje i stupeň fosforylace mTOR.

Kromě zmíněných potencionálně patofyziologických aktivit se Akt kináza ovšem rovněž podílí na přenosu protektivních signálů, konkrétně na procesu fosforylace endoteliální NO syntásy (eNOS) vlivem různých fyziologických stimulů. Tato posttranslační modifikace je klíčová pro tvorbu oxidu dusnatého (NO) zprostředkovanou tímto enzymem. NO hraje důležitou vasoprotektivní roli v kontrole systémové a intrarenální hemodynamiky (Kone BC. 2004). Na rozdíl od mTOR však byla míra fosforylace eNOS srovnatelná u skupin diabetických a kontrolních zvířat, a to i navzdory zvýšené expresi celkové eNOS. Obdobná pozorování, tj. defektní insulinem-indukovanou renální aktivitu eNOS u modelu obézního ZDF potkana, přinesla i studie Li Z a kol. (2005).

4.5. Shrnutí

Paralelně s narůstajícím věkem a rozvojem metabolického syndromu dochází u ZDF zvířat k nárůstu aktivity Akt a mTOR. Inhibice PI3K/ Akt signalizace akutním podáním wortmanninu prokázala, že nárůst aktivity zmíněných proteinů je, alespoň z části, závislý na insulinu. Nálezy nesvědčily o přítomnosti insulinové rezistence v této insulinem stimulované kaskádě na rozdíl od defektů v insulinem indukované protektivní Akt/ eNOS signalizaci. Tato kombinace odpovědi na působení hyperinsulinemie, kdy dochází ke stimulaci hypertrofické Akt/ mTOR a oslabení vasoprotektivní Akt/ eNOS signalizace v kůře ledvin obézního ZDF potkana, tak patrně přispívá k pozdějšímu vzniku a rozvoji diabetické nefropatie.

5. Studie II.

Renální aktivita Akt kinázy/ protein kinázy B u streptozotocinových diabetických potkanů

5.1. Úvod

Během léčby DM1 jsou buňky vystaveny účinkům kolísajících hladin glykemie a insulinemie. Je zdokumentováno, že jak glukosa, tak insulin modulují aktivitu Akt kinázy. Z tohoto důvodu je predikce aktivity Akt kinázy a její vliv na lokální morfologii, faktory a funkce v jednotlivých případech obtížná, zvláště je-li Akt aktivita zároveň orgánově specifická (Gerhardinger C a kol. 2001, Joussen AM a kol. 2002, Thirone AC a kol. 2002, Laviola L a kol. 2001, Dobrzynski E a kol. 2002).

Ledviny jsou cílovým orgánem mnoha účinků insulinu. Renální hypertrofie, akumulace extracelulární matrix, změny v apoptotické odpovědi stejně jako změny regionální hemodynamiky, to vše jsou procesy zapojené v patofyziologickém procesu vzniku diabetické nefropatie během DM1 (Cooper ME. 1998). S ohledem na mnohočetné funkce Akt kinázy a mTOR, je možné, že změny v aktivitách těchto kináz jsou zapojeny v procesu vzniku DN.

5.2. Metody

Detailní popis použitých metod je uveden v sekci 3.

5.2.1. Uspořádání pokusu

Diabetes byl navozen i.v. injekcí streptozotocinu. Po indukci diabetu byla pokusná zvířata rozdělena do 3 skupin. Jedna skupina byla ponechána bez léčby (STZ0), druhá skupina (STZ4) byla léčena 4 jednotkami insulinu denně a třetí skupina (STZ 12) byla léčena 12 jednotkami insulinu denně. Cílem rozdílného dávkování insulinu bylo navození různého stupně metabolické kontroly a insulinemie. Měření byla u diabetických zvířat prováděna 4 týdny po indukci diabetu a srovnána s výsledky měření u skupiny zdravých kontrol (K). Další skupině kontrolních zvířat (K4) byly aplikovány 4 jednotky insulinu denně. V rámci experimentu byla zjišťována aktivita a exprese Akt a mTOR v renálním kortexu pokusných zvířat.

5.3. Výsledky

Základní metabolické a fyziologické parametry pokusných zvířat jsou uvedeny v tabulce 6. U STZ0 byl zaznamenán pokles tělesné hmotnosti ve srovnání s kontrolami nebo diabetickými zvířaty léčenými insulinem. U všech skupin diabetických zvířat se zvýšila hmotnost ledvin. Renální hypertrofie byla nejvýraznější u skupiny STZ0, která vykazovala nejvyšší hodnotu poměru hmotnosti ledvin k celkové hmotnosti těla zvířat. Hladina plasmatického insulinu a glukosy v krvi byla u většiny diabetických zvířat vyšší než u kontrol. Diabetická zvířata léčená inzulinem se vzájemně lišila v hodnotách glykemie, míra insulinemie odpovídala léčbě

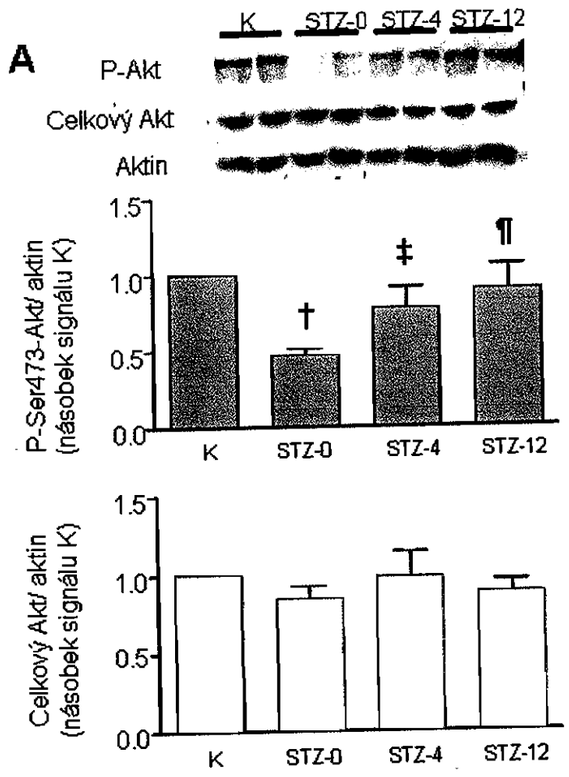
insulinem. U skupiny STZ4 byla míra insulinemie srovnatelná s kontrolami, skupina STZ 12 vykazovala zřetelnou hyperinsulinemii. Skupina kontrolních zvířat léčených insulinem se hodnotami základních metabolických a fyziologických parametrů nelišila od kontrolní skupiny.

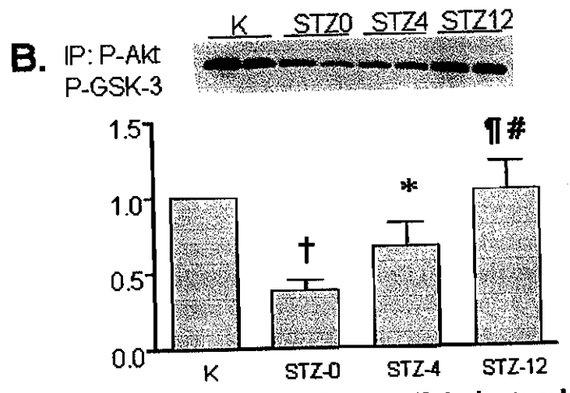
Tabulka 6 : Základní metabolické a fyziologické parametry pokusných zvířat

	n	tělesná hmotnost [g]	Hmotnost pravé ledviny [g]	Hmotnost pravé ledviny / 100g tělesné hmotnosti	Plasmatický insulin [nmol/l]	Glukosa v krvi [nmol/l]
K	6	335±10	1,082±22	0,33±0,01	1,03±0.14	5,4±0.1
STZ 0	6	$270±11^{B}$	$1,338±50^{B}$	$0,5±0,01^{B}$	$0,15±0.03^{B}$	$22,0±1.0^{B}$
STZ 4	6	$309±6^{AD}$	$1,158±20^{C}$	$0,38±0,01^{BD}$	$1,42±0.12^{D}$	$13,4±1,5^{BD}$
STZ 12	6	$343±5^{DE}$	$1,268±36^{BE}$	$0,37±0,01^{BD}$	$1,82±0.21^{AD}$	$8,1±0.4^{BDE}$
K 4	5	345±3	1,056±32	0,33±0,01	1,41±0.14	5,0±0.8

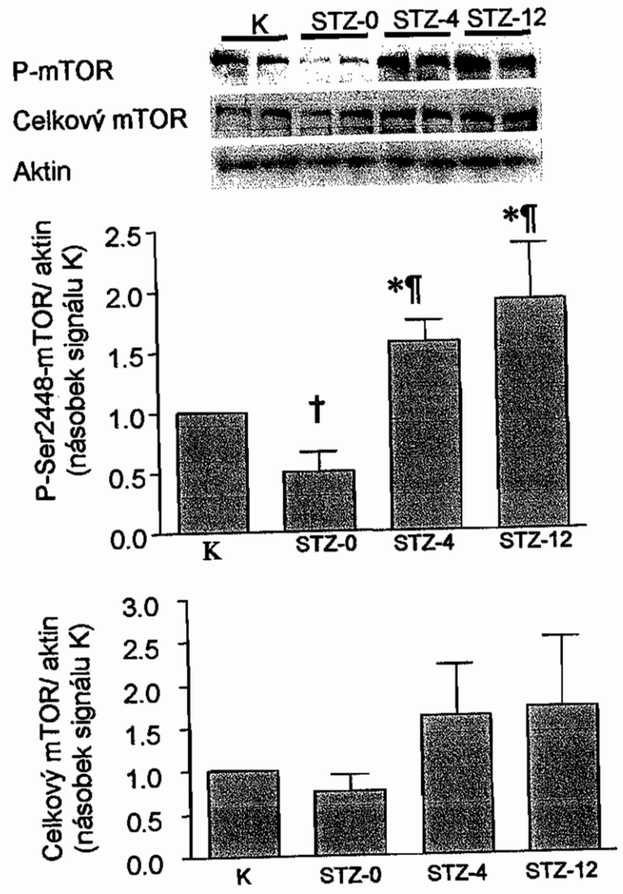
^{A} p<0.05; ^{B}p<0.001 STZ0, 4, 12 vs. K ; ^{C} p<0.05; ^{D} p<0.01 STZ 4, 12 vs.STZ0 ; ^{E} p<0.05 STZ12 vs.STZ 4

Aktivita Akt kinázy v renálním kortexu, vyjádřená mírou fosforylace GSK3 proteinu, je zobrazena na obr 15, panel B. Akt aktivita byla u skupiny hyperglykemických STZ0 redukována, částečně obnovena u skupiny středně glykemických STZ4 potkanů a u skupiny STZ12 s intenzivní inzulinovou léčbou normalizována na úroveň Akt aktivity u kontrolních zvířat. Podobně jako v případě Akt aktivity, rovněž míra exprese P-Ser 473 Akt byla signifikantně nižší u skupiny STZ0 a vlivem léčby insulinem došlo k její obnově až na úroveň kontrol (obr 15, panel A). U skupin STZ4 a STZ12 nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v expresi P-Ser 473 Akt , přestože se tyto dvě skupiny významně lišily úrovní insulinové léčby (obr 15, panel A). Vlivem léčby insulinem došlo u kontrolních zvířat k nárůstu exprese P-Ser473-Akt v renálním kortexu (obr 17). Exprese celkové formy Akt se mezi skupinami nelišila. Exprese aktivní formy mTOR v zásadě kopírovala míru aktivity Akt kinázy. V porovnání s kontrolami však byla míra exprese P-Ser 2448 mTOR u skupin STZ4 a STZ12 vyšší (obr 16). Rozdíl v expresi celkové mTOR nebyl mezi skupinami kontrolních a diabetických zvířat statisticky významný. Podávání insulinu nemělo u kontrolních zvířat vliv na expresi P-Ser 2448 mTOR a celkovou mTOR.

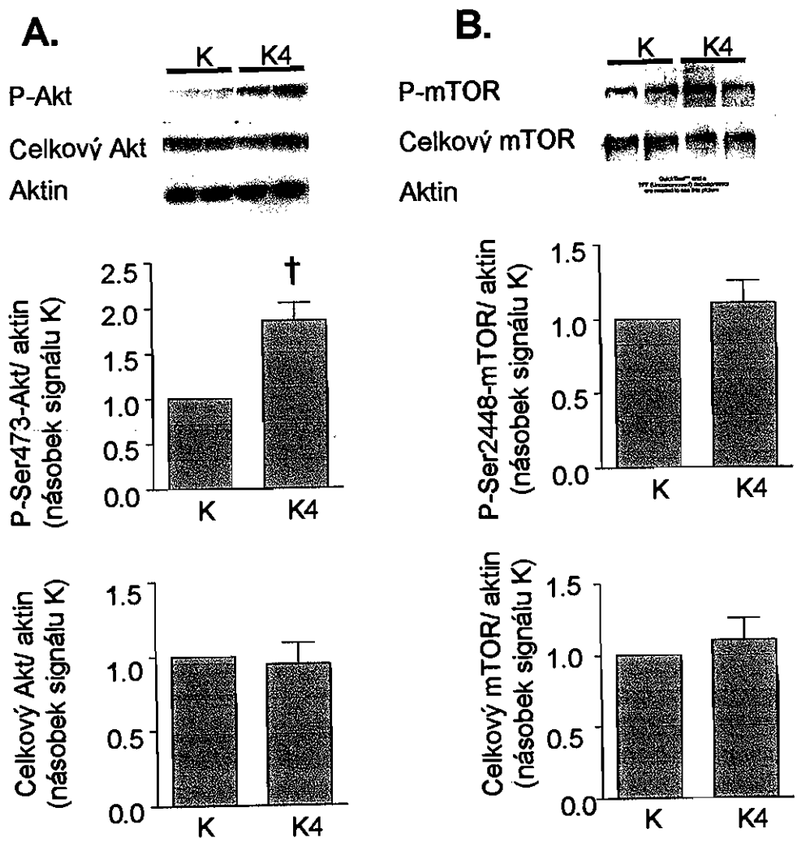




Obr 15: Exprese a aktivita Akt kinázy v renálním kortexu kontrolních a diabetických zvířat
Panel A: Míra exprese P-Ser473-Akt (aktivní) a celkové Akt v renálním kortexu byla u diabetických zvířat bez léčby insulinem (SZT-0) a zvířat léčených 4 jednotkami insulinu denně (STZ4) nebo 12 jednotkami insulinu denně (STZ12) zjišťována metodou immunoblottingu. Exprese P-Ser473-Akt byla u skupiny STZ0 redukována, vlivem léčby inzulinem byla exprese P-Ser 473 Akt obnovena až na úroveň kontrol. **Panel B**: Míra aktivity Akt kinázy v renálním kortexu byla měřena technikou Akt kinázové assay. U skupiny STZ0 byla aktivita Akt redukována, vlivem léčby insulinem došlo došlo k její obnově až na úroveň kontrol *p<0.05 STZ 4 vs. kontrola; †p<0.01 STZ 0 vs. kontrola; ‡p<0.05 STZ 4 vs. STZ 0; ¶ p<0.01 STZ 12 vs. STZ 0 ;# p<0.05 STZ 12 vs. STZ 4



Obr 16: Exprese mTOR v renálním kortexu kontrolních a diabetických zvířat
Míra exprese P-Ser2448-mTOR (aktivní) a celkové mTOR v renálním kortexu byla u diabetických zvířat bez léčby insulinem (SZT-0) a zvířat léčených 4 jednotkami insulinu denně (STZ4) nebo 12 jednotkami insulinu denně (STZ12) zjišťována metodou immunoblottingu. U skupiny STZ0 byla exprese P-Ser2448 mTOR redukována, vlivem léčby insulinem došlo ke stimulaci exprese P-Ser2448. *p<0.05 STZ 4, STZ 12 vs. kontrola; †p<0.01 STZ 0 vs. kontrola; ¶<0.01 STZ 4, STZ 12 vs. STZ-0;



Obr 17: Efekt insulinu na aktivitu Akt a mTOR u kontrolních zvířat
Panel A: Míra exprese P-Ser473-Akt (aktivní) a celkové Akt (panel A) spolu s mírou exprese P-Ser2448-mTOR (aktivní) a celkové mTOR (panel B) v renálním kortexu byla u kontrolních zvířat bez léčby insulinem (K) a kontrolních zvířat, kterým byly podávány 4 jednotky insulinu denně (K4) zjišťována metodou immunoblottingu. Vlivem podávání insulinu došlo v renálním kortexu u kontrolních zvířat k nárůsti exprese P-Ser473-Akt. Insulin neměl vliv na aktivitu mTOR †$p<0.001$ K4 vs. kontrola

5.4. Diskuse

Je známo, že jak glukosa, tak insulin, dva hlavní komponenty diabetického metabolického milieu, modulují aktivitu Akt kinásy v řadě buněčných typů a tkání (Gerhardinger C a kol. 2001, Joussen AM a kol. 2002, Thirone AC a kol. 2002, Laviola L a kol. 2001, Dobrzynski E a kol. 2002, Wu D a kol. 2007, Mariappan MM a kol. 2007). Předkládaná studie testovala hypotézu, že metabolická kompenzace diabetu představuje určující faktor exprese a aktivity proteinů Akt a mTOR zapojených v procesech ranného renálního hypertrofického růstu.

U diabetických STZ potkanů stupeň aktivity Akt kinásy a exprese P-Ser-473 Akt v zásadě odpovídaly hladinám glukosy v krvi a intensitě léčby insulinem. U skupiny STZ0 byla exprese a aktivita Akt redukována, vlivem léčby insulinem došlo k obnově až na úroveň kontrol. Z těchto výsledků vyplývá, že úroveň metabolické kontroly je důležitým faktorem ovlivňujícím aktivitu Akt kinázy v renálním kortexu během diabetu. S ohledem na způsob aktivace Akt kinázy by mohl být možným vysvětlením redukce cytosolické Akt aktivity u skupiny hyperglykemických STZ0 potkanů absolutní nedostatek insulinu. Hladina glukosy v krvi je dalším faktorem modulujícím výrazně aktivitu Akt kinázy. Výzkumy zaměřené na studium Akt signalizace v ledvinách za těchto podmínek přinesly řadu protichůdných závěrů. In vitro studie prokázaly, že vlivem hyperglykémie dochází jak k inhibici (Lin CL a kol. 2006), tak ke stimulaci (Wu D a kol. 2007, Mariappan MM a kol. 2007) Akt aktivity v ledvinách a to s největší pravděpodobností v závislosti na takových faktorech jakými jsou doba trvání hyperglykemických podmínek a buněčný typ, přestože o existenci těchto závislostí lze spekulovat. V buňkách proximálních tubulů například vysoká hladina glukosy indukuje zvýšenou Akt fosforylaci in vitro 15 min po stimulaci glukosou s návratem k bazálním hodnotám po uplynutí 30 min od začátku stimulace (Mariappan MM a kol. 2007), kdežto v případě mesangiálních buněk lze glukosou-indukovanou fosforylaci Akt detekovat 20 minut od počátku indukce glukosou a účinek této stimulace přetrvává ještě 72 hod po začátku in vitro experimentu (Wu D a kol 2007). In vivo byla prokázána zvýšená míra fosforylace Akt kinázy v glomerulech diabetických zvířat bez insulinové léčby 2, 4, a 12 týdnů po indukci diabetu (Nagai K a kol. 2005, Wu D a kol 2007). V renálním kortexu byla u skupiny diabetických zvířat bez léčby insulinem detekována zvýšená aktivita Akt kinázy po uplynutí 4 dnů od indukce diabetu streptozotocinem (Lee MJ a kol. 2007). Již 2 týdny po indukci diabetu však Wu D a kol. (2007) u téže skupiny zvířat uvádí pouze mírně zvýšenou expresi P-Ser-473 Akt v renálním kortexu v porovnání s mírou exprese tohoto proteinu v glomerulech. Předkládaná studie analyzuje ledvinový kortex diabetických zvířat v pozdější fázi - 4 týdny po indukci DM. Naše pozorování, kdy u hyperglykemické skupiny STZ 0 došlo k redukci Akt aktivity v renálním kortexu je důsledkem odlišného uspořádání pokusu a nemusí být v rozporu s výsledky uvedených studií. Je možné, že tento fenomén je jen důsledkem kombinace spolupůsobení akutní fáze hyperglykemie a buněčného typu. Mohou to být právě hypertrofické buňky proximálních tubulů převažující v renálním kortexu diabetem postižených zvířat, které se podílejí na defektní aktivitě Akt kinásy v renálním kortexu za hyperglykemických podminek tím, že maskují zvýšenou aktivitu Akt kinázy v glomerulech. Závislost aktivity Akt kinásy u skupiny STZ 0 na čase byla již prokázána v retině (Li YJ a kol. 2007), další tkání jejíž mikrovaskulatura je postižena účinky hyperglykémie. Naše navazující pozorování, kdy vlivem léčby insulinem došlo pouze k částečnému obnovení aktivity Akt v renálním kortexu u skupiny STZ4 diabetických zvířat, zatímco stejná dávka insulinu vedla u kontrolních zvířat k signifikantnímu nárůstu Akt aktivity a intenzivní léčba insulinem se u skupiny STZ12 se projevila normalizací aktivity Akt na úroveň kontrol pak svědčí pro přítomnost určitého stupně snížené citlivosti Akt kinázy k účinkům insulinu u skupiny diabetických zvířat. Skupina kontrolních zvířat léčených

insulinem přitom vykazovala podobné hladiny insulinu v krvi jako skupina diabetických zvířat STZ4. Uvedené skupiny zvířat se ovšem výrazně lišily hladinami glukosy v krvi.

Renální hypertrofie vyjádřená nárůstem poměru hmotnosti ledviny k celkové hmotnosti těla byla přítomna u všech skupin diabetických zvířat. Míra hypertrofického růstu se však lišila v závislosti na intenzitě insulinové léčby. Protein mTOR se v ledvinách podílí na zvýšené syntéze proteinů extracelulární matrix (Senthil D a kol. 2003) a z dlouhodobého hlediska na rozvoji glomerulosklerosy (Lloberas N a kol. 2006). Význam signální kaskády Akt/ mTOR pro rozvoj DN byl prokázán dlouhodobým podáváním inhibitoru mTOR rapamycinu, který má nefroprotektivní účinky (Yang Y a kol. 2007, Lloberas N a kol. 2006). Dle našich pozorování kopírovala aktivita mTOR zhruba aktivitu Akt kinázy. U skupiny STZ 0 došlo k poklesu aktivity mTOR. Léčba insulinem pak vedla k signifikantnímu nárůstu aktivity mTOR, avšak na rozdíl od aktivity Akt byla aktivita mTOR u diabetických zvířat léčených insulinem vyšší v porovnání s kontrolami a byla přímo úměrná použité dávce inzulínu. U skupiny kontrolních zvířat nemělo podávání insulinu vliv na aktivitu mTOR, na rozdíl od aktivity Akt kinázy. Tato pozorování by svědčila pro to, že míra metabolické kompenzace je důležitým modulátorem aktivity proteinu mTOR v ledvinách v podmínkách DM1 a že kromě Akt kinázy je aktivita mTOR za těchto podmínek pravděpodobně regulována i dalšími signálními molekulami. Hyperglykemické podmínky například modulují aktivitu AMP-aktivované protein kinásy (AMPK), přirozeného inhibitoru aktivity mTOR, uplatňující se v procesu regulujíce renální hypertrofie stimulací aktivity mTOR (Lee MJ a kol 2007). Signální kaskáda S6K1 aktivující mTOR prostřednictvím protein kinásy C (Holz MK a Blenis J. 2005) by pak mohla být dalším mechanismem potencionálně zapojeným do procesu Akt nezávislé aktivace mTOR.

5.5. Shrnutí

Řada patofyziologických mechanismů zapojených do procesu vzniku DN je ovlivněna aktivitou Akt, která je ovšem zapojena rovněž v procesech nefroprotektivní signalizace, a prohypertrofickou aktivitou mTOR. Naše pozorování , kdy u diabetických STZ potkanů aktivita a exprese Akt a mTOR zhruba reflektovala míru metabolické kompenzace, ukazuje, že hodnota glykémie je spolu s intenzitou léčby insulinem důležitým modulátorem signální kaskády Akt/mTOR při DM1. Fakt, že na rozdíl od aktivity Akt byla aktivita mTOR u diabetických zvířat léčených insulinem vyšší v porovnání s kontrolami a byla přímo úměrná použité dávce inzulínu nabízí hypotézu, že za podmínek DM1 je aktivita mTOR, ve vztahu ke stupni metabolické kompenzace, regulována i dalšími mechanismy.

6. Studie III.

Renální cyklooxygenása 2 u obézního Zuckerova potkana

6.1. Úvod

Cyklooxygenázy (COX) katalyzují biosyntézu biologicky významných prostanoidů konverzí kyseliny arachidonové na PGH2. Dosud byly u savců identifikovány tři isoformy COX proteinů. Isoformy COX-1 a COX-2 jsou kodované odlišnými geny (Xie WL a kol. 1991). Jmenované isoformy se neliší strukturou ani katalytickou aktivitou, k zásadním odlišnostem dochází na úrovni exprese, funkce a lokalizace v organismu. Zjednodušeně lze říci, že COX-1 isoforma je konstitutivně exprimována na základě hormonálních signálů uplatňujících se v homeostatických procesech. Naproti tomu inducibilní COX-2 isoforma má nízkou bazální hladinu tkáňové exprese. Ke zvýšení exprese COX-2 dochází působením mitogenních nebo zánětlivých signálů nebo vlivem fyzikálních stimulů (Tetsuka T a kol. 1996, Fletcher BS a kol. 1992). Nárůst exprese a aktivity COX-2 byl zaznamenán u několika modelů progresivních renálních onemocnění, včetně DM1 (Cheng HF a kol. 2002, Komers R a kol. 2001). S ohledem na význam COX metabolitů pro renální funkce je možné, že hyperinzulinemické podmínky během DM2 ovlivňují expresi obou isoforem COX enzymů a produkované metabolity přispějí k rozvoji abnormalit spojených s DN.

6.2. Metody

Detailní popis použitých metod je uveden v sekci 3.

6.2.1. Uspořádání pokusu

Exprese COX-1 a COX-2 v renálním kortexu 4 a 12 týdenních Zuckerových potkanů (ZDF 4, ZDF 12) a věkově odpovídajících kontrolních zvířat (ZL 4, ZL12) byla zjišťována za pomoci metod immunoblottingu a immunohistochemie. Vliv hyperinsulinemie na renální aktivitu COX-2 byl sledován v separátním pokusu, kde byl 12 týdenním ZDF a ZL potkanům intraperitoneálně aplykován wortmannin (v dávce 100 μg/ kg tělesné hmotnosti v 15% DMSO) nebo samotné vehikulum (15% DMSO). Okamžitě po podání uvedených látek byla pokusná zvířata umístněna do metabolických klecí s volným přístupem k vodě a potravě, kde probíhal sběr moči. Až do dalšího zpracování byla moč skladována při -80 °C. Pomocí komerčního immunoassay kitu (EIA) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) a za za využití firemních metodických postupů byly v moči následně stanoveny koncentrace TxA2 spolu s koncentracemi PGE2 a jejich metabolity.

6.3. Výsledky

Základní metabolické a fyziologické parametry pokusných zvířat jsou uvedeny v tabulce 7. V tabulce 8. jsou pak uvedeny metabolické a fyziologické parametry zvířat, kterým bylo aplikováno vehikulum nebo wortmannin. Dle předpokladu byla tělesná hmotnost ZDF potkanů signifikantně vyšší v porovnání se ZL a to již u zvířat ve věku 4 týdnů. Ve věku 12 týdnů byl rozdíl v hmotnosti pokusných zvířat ještě významnější. Ačkoli se poměr hmotnosti ledviny ku hmotnosti těla u 4 týdenních ZDF nelišil v porovnání s kontrolami, ve věku 12 týdnů došlo u ZDF

k poklesu hodnoty tohoto poměru ve srovnání se ZL stejného věku. ZDF zvířata vykazovala rovněž vyšší hodnoty koncentrace inzulinu v plazmě spolu se zvýšenými hladinami triacylglycerolů a NEMK v séru. Podání wortmanninu vedlo k nárůstu hodnot triacylglycerolů a poklesu hladiny NEMK v seru 12 týdenních ZDF.

Tabulka 7: Základní metabolické a fyziologické parametry pokusných zvířat

	n	TH [g]	HPL [g]	HPL / 100g TH	Plasmatický insulin [nmol/l]	Glukosa v krvi [nmol/l]	TG [mmol/l]	NEMK [nmol/l]	Kreatinová clearence [mL/min]	Urinární exkrece proteinů [µg/min]
ZL 4	5	103 ±2	0,43±0,01	0,42±0,01	0,40±0.04	4,0±0.1	0,6±0.1	ND	ND	ND
ZDF 4	6	131 ±6^{A}	0,514±0,01^{B}	0,40±0,02	0,74±0.07^{A}	5,5±0.6^{B}	1,4±0.1^{A}	ND	ND	ND
ZL 12	5	358± 9	1,13±0,05	0,31±0.01	0,48±0.09	5,3±0.1	0,9±0.1	0,43±0.02	0,93±0,13	5,6±0,
ZDF 12	6	538±25^{B}	1,295±0,04^{B}	0,24±0,01^{B}	1,81±0.19^{C}	6,7±0.3^{C}	4,2±0.4^{C}	0,54±0.02^{C}	0.43±0.02	13,6±3,0^{C}

TH, tělesná hmotnost; HPL, hmotnost pravé ledviny; TG, sérové triacylglyceroly; NEMK, neesterifikované mastné kyseliny v séru. ^{A}p<0.01; ^{B} p<0.05; ^{C} p<0.001 ZDF vs. ZL stejného věku.

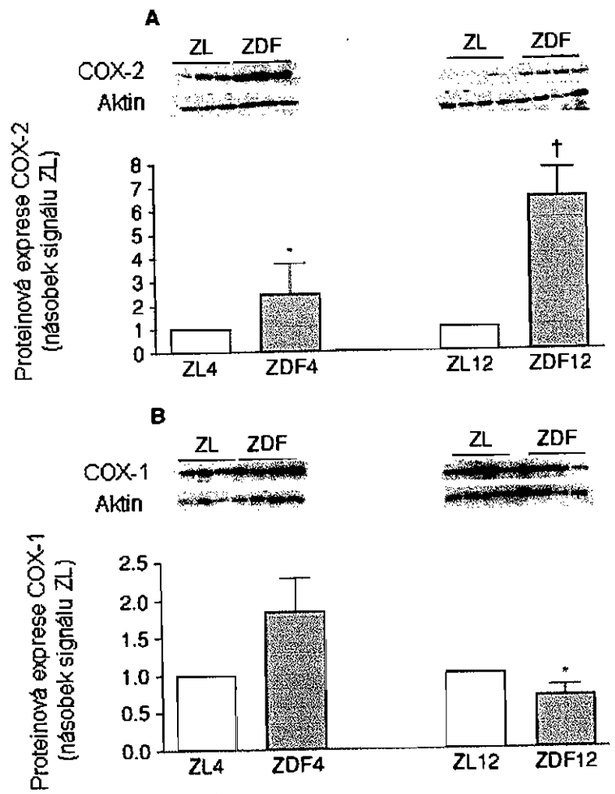
Tabulka 8 : Základní metabolické a fyziologické parametry pokusných zvířat po aplikaci wortmanninu nebo vehikula

	n	TH [g]	HPL [g]	HPL / 100g TH	Glukosa v krvi [nmol/l]	TG [mmol/l]	NEMK [nmol/l]
ZL vehikulum	5	345 ±11	1.06 ±0.06	0.31 ±0.01	4.4 ±0.1	0.67 ±0.10	0.30 ±0.04
ZDF vehikulum	5	508 ±22^{a}	1.23 ±0.04^{b}	0.24 ±0.01^{a}	5.8 ±0.2^{a}	2.82 ±0.12^{c}	0.50 ±0.04^{c}
ZL wortmannin	5	355 ±10	1.05 ±0.03	0.30 ±0.01	4.6 ±0.1	0.59 ±0.07	0.24 ±0.04
ZDF wortmannin	5	516 ±17^{a}	1.17 ±0.05^{b}	0.23 ±0.01^{a}	6.1 ±0.2^{a}	4.52 ±0.47^{c}	0.29 ±0.03^{d}

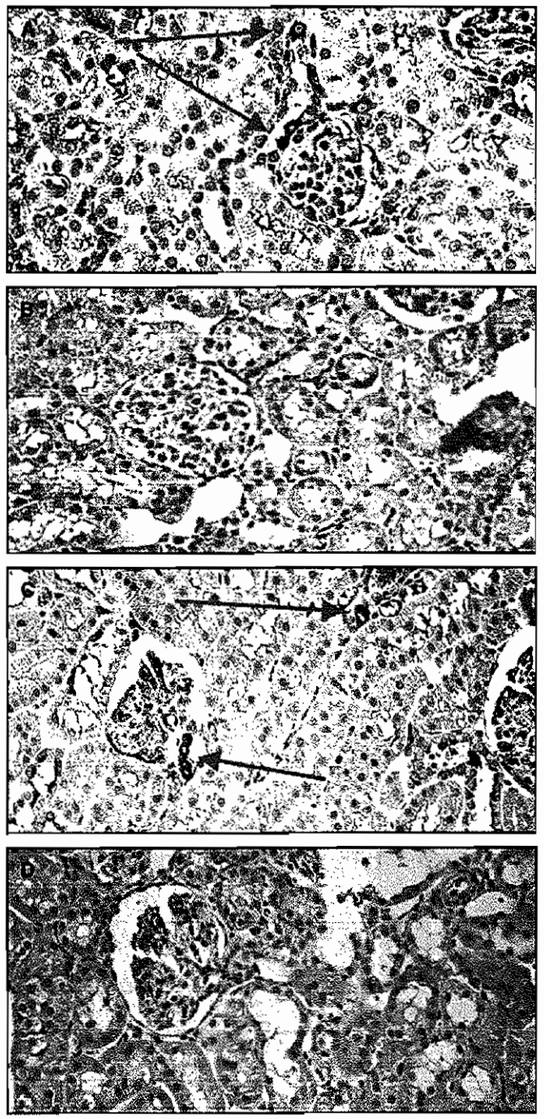
TH, tělesná hmotnost; HPL, hmotnost pravé ledviny; TG, sérové triacylglyceroly; NEMK, neesterifikované mastné kyseliny v séru. ^{A}p<0.001 ZDF s vehikulem vs ZL s vehikulem ; ^{B} p<0.05; ^{C} p<0.01 ZDF s wortmanninem vs ZL s vehikulem; ^{D} p<0.01 ZDF s wortmanninem vs. ZDF s vehikulem

Již u 4 týdenních ZDF jsme prokázali progresivní nárůst exprese COX-2 v renálním kortexu v porovnání se ZL stejného věku (obr 18, panel A). Tento nárůst v expresi COX-2 byl ještě výraznější u skupiny ZDF ve věku 12 týdnů. Zvýšená exprese COX-2 u 12 týdenních ZDF byla asociována se zvýšeným vylučováním metabolitů PGE2 a TxB2 v moči těchto zvířat (obr. 20). Aplikace vehikula vylučování metabolitů neovlivnila (obr 21). Podání wortmaninu skupině ZDF zvířat vedlo k signifikantnímu poklesu produkce TxB2 v moči v porovnání se zvířaty, kterým bylo aplikováno pouze vehikulum. Na rozdíl od skupiny ZDF nemělo podání wortmaninu vliv na produkci metabolitů v moči zvířat ze skupiny ZL (obr 21).

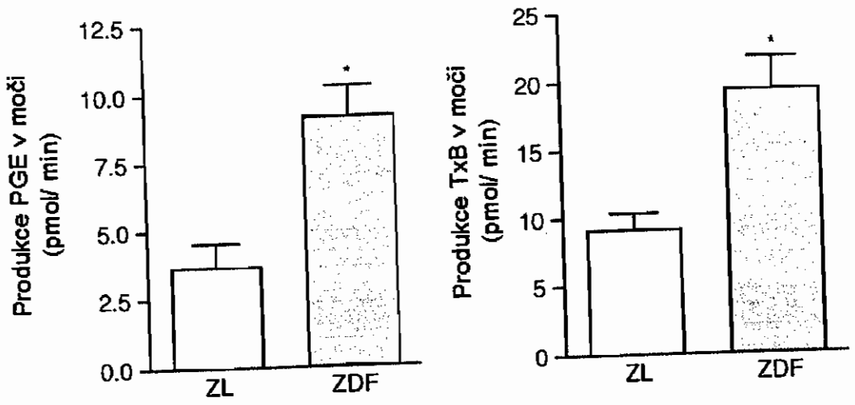
Jak u ZDF, tak u ZL byla exprese COX-2 immunohistochemicky lokalizována do lokalit renálního kortexu typických pro potkana - macula densa a Henleyova klička (TAHL) (obr 19). Na rozdíl od COX-2 byla exprese COX-1 isoformy u ZDF ve věku 12 týdnů nižší v porovnání s kontrolní skupinou (obr18, panel B).



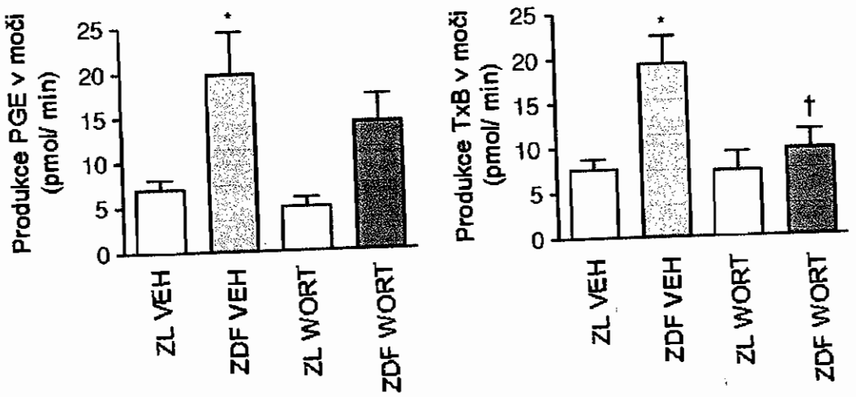
Obr 18: Renální kortikální exprese cyklooxygenázy 2 (COX)-2 (A) a COX-1 (B) u kontrolních Zucker lean (ZL) a obézních diabetických Zuckerových potkanů (ZDF).
(panel A) K signifikantnímu nárůstu exprese COX-2 došlo již u 4 týdenních ZDF. U 12 týdenních ZDF byl tento nárůst exprese ještě více signifikantní v porovnání se ZL stejného věku (panel B) Exprese COX-1 se mezi skupinami 4 týdenních ZDF a ZL nelišila. U 12 týdenních ZDF došlo k signifikantnímu poklesu exprese COX-1 v porovnání se ZL stejného věku.
*P < 0.05 ZDF vs. ZL stejného věku ; †P < 0.01 ZDF vs. ZL stejného věku



Obr 19: Immunohistochemická lokalizace exprese COX-2 v renálním kortexu ZL (A) a ZDF (C) potkanů. Immunohistochemické studie byly prováděny na ledvinách 12 týdenních zvířat. U obou skupin pokusných zvířat byla exprese COX-2 lokalizivána do buněk macula densa a Henleyovy kličky. Na panelech B a D je zobrazena kontrolní tkáň inkubována s neimunními IgG



Obr 20: Produkce stabilních metabolitů prostaglandinu E (PGE) a thromboxanu A2 (TxA2) v moči ZDF a kontrolních ZL potkanů ve věku 12 týdnů V moči ZDF potkanů byla zaznamenána zvýšená produkce obou COX metabolitu *P < 0.05 ZDF vs. ZL



Obr 21: Produkce stabilních metabolitů prostaglandinu E (PGE) a thromboxanu A_2 (TxA_2) v moči 12ti týdenních ZDF a kontrolních ZL zvířat po aplikaci wortmanninu nebo vehikula . Ve srovnáví s kontrolními zvířaty po aplikaci vehikula (ZL-veh), vykazovali ZDF potkani po podání vehikula (ZDF-veh) signifikantní nárůst produkce COX metabolitů v moči. Aplikace wortmanninu měla u skupiny ZDF potkanů (ZDF-Wort) za následedek signifikantní pokles exkrece TxB_2 v moči zvířat ve srovnání se ZDF-veh. Na rozdíl od ZDF, neměla léčba wortmanninem vliv na výskyt TxB_2 v moči kontrolní skupiny ZL (ZL-WORT). *P < 0.05 ZDF-veh vs. ZL-veh ; †P < 0.05 ZDF-WORT vs. ZDF-veh

6.4. Diskuse

Předkládaná studie demonstruje model renálního onemocnění associovaného se zvýšenou expresí a aktivitou COX-2 v kůře ledvin. Tyto nálezy jsou v souladu s již dříve publikovanými studiemi výzkumu exprese a aktivity COX-2 s využitím takových modelů progresivní glomerulosklerosy jakými jsou potkani s částečnou nefrektomií (Wang JL a kol. 1998) nebo streptozotocinový model diabetické nefropatie (Cheng HF a kol. 2002, Komers R a kol. 2001)

Hyperglykémie představuje důležitý faktor ovlivňující expresi COX-2 v ledvinách (Cheng HF a kol. 2002, Komers R a kol. 2001). Na rozdíl od zmíněného DM1 modelu, v případě ZDF modelu nedošlo k nárůstu exprese COX-2 vlivem hyperglykémie, protože 12 týdenní zvířata vykazují pouze středně zvýšenou míru glykémie a 4 týdenní zvířata, která rovněž vykazují signifikantní nárůst exprese COX-2, jsou stále prakticky normoglykemická. Tato pozorování by svědčila pro to, že kromě hyperglykémie se na regulaci exprese COX-2 podílí i další faktory. Je známo, že v hyperglykemickém prostředí je exprese COX-2 modulována mimo jiné signalizací ROS a PI3K/ Akt signální kaskádou podílející se na regulaci aktivity transkripčního faktoru NF kappa B (Kiritoshi S a kol. 2003, Sheu ML a kol. 2004). NF kappa B je známým modulátorem transkripce COX-2 (Lim JW a kol. 2001). Jak prokázaly naše předchozí studie, paralelně s narůstajícím věkem a rozvojem metabolického syndromu vykazuje ZDF model nárůst aktivity a exprese Akt v kůře ledvin. Tento nárůst je, alespoň z části, závislý na insulinu a je nezávislý na účinku hyperglykemie. Zaznamenaná korelace mezi progresivním nárůstem exprese COX-2 proteinu a aktivitou Akt kinázy by pak naznačovala možnou závislost exprese COX-2 na insulinové signalizaci a rozvoji metabolického syndromu. Za účelem posouzení vlivu inzulinové signalizace na aktivitu COX-2 byl skupině 12 týdenních ZDF potkanů podán inhibitor PI 3K, wortmannin. Tato intervence měla za následek pokles exkrece TxB2 a PGE2 metabolitů v moči zvířat, ačkoli na rozdíl od TxB2 nebyl pokles exkrece PGE2 statisticky významný. Toto zjištění, spolu s faktem, že aplikace wortmaninu neměla vliv na vylučování prostanoidů v moči u kontrolní skupiny ZL, vede k závěru, že aktivita COX-2 je u ZDF potkanů, alespoň z části, závislá na inzulinu. Wortmanninem indukovaná snížená produkce prostaglandinů v moči ZDF potkanů by však mohla mít i jiné vysvětlení. Důvodem snížené produkce prostanoidů v moči by mohla být snížená hladina NEMK pozorovaná v séru 12 ti týdenních ZDF korelující se sníženým výskytem prostanoidů v moči ZDF, kterým byl aplikován wortmannin. NEMK slouží jako prekursory syntézy kyseliny arachidonové (Needleman P a kol. 1986). Kyselina achachidonová je COX enzymy nejprve oxidována a posléze redukována za vzniku PGH_2-meziproduktu syntézy prostaglandinů a thromboxynů.

Exprese COX-2 lokalizovaná v oblasti macula densa/ TAHL významně ovlivňuje renální hemodynamiku a funkce modulací systému renin-angiotensin (Cheng HF a Harris RC 2004). Prostanoidy produkované COX-2 v konečném důsledku přispívají k patogenezi DN presklerotickými a hemodynamickými.

Studium exprese COX-1 nebylo původně cílem této studie. Avšak snížená exprese COX-1 u 12 týdenních ZDF spolu se známou lokalizací této izoformy ve sběrných kanálcích (Câmpean V a kol. 2003) mohou mít patofyziologický význam vzhledem k tomu, že enzymem produkované protaglandiny pravděpodobně ovlivňují natriurézu a diurézu (Breyer MD a Breyer RM 2001). Redukce exprese COX-1 by tak u obézních ZDF potkanů mohla přispět k pozdějšímu rozvoji hypertenze snížením natriuretické odpovědi.

6.5. Shrnutí

ZDF potkani demonstrovali, v závislosti na rozvoji metabolického syndromu, pokles exprese COX-1 a nárůst exprese COX2 proteinu spolu se zvýšenou produkcí prostanoidů v moči. Podání inhibitoru insulinové signalizace, wortmanninu, prokázalo souvislost mezi hormonálními a metabolickými charakteristikami (hyperinsulinemií a zvýšenou koncentrací NEFA v plasmě) a produkcí prostanoidů v moči u ZDF modelu. Vzhledem k významu isoforem cyklooxygenáz pro renální funkce a patofyziologii mohou alterace exprese a aktivity těchto enzymů přispět k pozdějšímu rozvoji abnormalit spojených s DN, jakými jsou změny renální hemodynamiky a rozvoj hypertenze.

7. Závěry

U diabetických STZ potkanů korespondovala míra aktivity Akt a exprese P-Ser-473 Akt s míru metabolické kompenzace. Aktivita mTOR pak zhruba kopírovala aktivitu Akt kinázy. Na rozdíl od Akt kinázy, jejíž aktivita odpovídala insulinemii, byla aktivita mTOR modulována kombinací hyperglykémie a spolu s intenzitou léčby insulinem. Tato pozorování by svědčila pro to, že v podmínkách DM1 je míra metabolické kompenzace důležitým modulátorem aktivit proteinů Akt a mTOR a že kromě Akt kinásy je aktivita mTOR za těchto podmínek s velkou pravděpodobností regulována i dalšími signálními molekulami.

V případě modelu DM2 svědčí nárůst aktivity jak Akt, tak mTOR v závislosti na rozvoji metabolického syndromu o normální insulinové signalizaci v hypertrofické Akt/mTOR kaskádě. Aktivita vasoprotektivní Akt/ eNOS signalizace naproti tomu vykazovala známky oslabení a spolu s nárůstem aktivity COX-2 a zvýšenou produkcí prostanoidů tak přispěla ke změnám renálního vaskulárního tonu a modulacím hemodynamiky v renálním kortexu při DM2

S ohledem na mnohočetné funkce a význam Akt a COX signalizace pro renální patofyziologii mohou zmíněné nálezy přispět k pochopení strukturálních a hemodynamických abnormalit asociovaných s rannými stadii diabetické nefropatie.

8. Literatura :

Abraham RT, Wiederrecht GJ.Immunopharmacology of rapamycin. Annu Rev Immunol. 1996;14:483-510.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J. 1996 Dec 2;15(23):6541-51.

Allen TJ, Cooper ME, O'Brien RC, Bach LA, Jackson B, Jerums G. Glomerular filtration rate in streptozocin-induced diabetic rats. Role of exchangeable sodium, vasoactive hormones, and insulin therapy.Diabetes. 1990 Oct;39(10):1182-90.

Alonso-Galicia M, Brands MW, Zappe DH, Hall JE. Hypertension in obese Zucker rats. Role of angiotensin II and adrenergic activity. Hypertension. 1996 Dec;28(6):1047-54.

Ambrosius H., Luppa H. (1987): Immunhistochemie. Springer Verlag, Berlin. ISBN 3-05-500316-0

Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I.Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. Genes Dev. 2002 May 1;16(9):1066-76.

Anderson S, Komers R: Renal hemodynamics in experimental diabetes mellitus. In The Kidney and Hypertension in Diabetes Mellitus, 6 ed. Mogensen CE, Ed. Norwell, Massachusetts, USA, Kluwer Academic Publishers, 2004

Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. Science. 1991 Oct 11;254(5029):274-7.

Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. Oncogene. 1998 Jul 23;17(3):313-25.

Bernal-Mizrachi E, Wen W, Stahlhut S, Welling CM, Permutt MA.Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. J Clin Invest. 2001 Dec;108(11):1631-8.

Bhandari BK, Feliers D, Duraisamy S, Stewart JL, Gingras AC, Abboud HE, Choudhury GG, Sonenberg N, Kasinath BS.Insulin regulation of protein translation repressor 4E-BP1, an eIF4E-binding protein, in renal epithelial cells. Kidney Int. 2001 Mar;59(3):866-75.

Brands MW, Hall JE, Van Vliet BN, Alonso-Galicia M, Herrera GA, Zappe D.Obesity and hypertension: roles of hyperinsulinemia, sympathetic nervous system and intrarenal mechanisms. J Nutr. 1995 Jun;125(6 Suppl):1725S-1731S.

Bray GA, York DA. Genetically transmitted obesity in rodents. Physiol Rev. 1971 Jul;51(3):598-646

Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. Fed Proc. 1977 Feb;36(2):148-53.

Bray GA, York DA Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. Physiol Rev. 1979 Jul;59(3):719-809.

Bray GA, York DA, Fisler JS. Experimental obesity: a homeostatic failure due to defective nutrient stimulation of the sympathetic nervous system. Vitam Horm. 1989;45:1-125.

Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. Trends Biochem Sci. 2001 Nov;26(11):657-64.

Brennan P, Babbage JW, Burgering BM, Groner B, Reif K, Cantrell DA Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. Immunity. 1997 Nov;7(5):679-89.

Breyer MD, Breyer RM.G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. Annu Rev Physiol. 2001;63:579-605.

Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG.Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. Kidney Int. 2005 Apr;67(4):1308-14.

Brito PL, Fioretto P, Drummond K, Kim Y, Steffes MW, Basgen JM, Sisson-Ross S, Mauer M.Proximal tubular basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. Kidney Int. 1998 Mar;53(3):754-61.

Brocco E, Fioretto P, Mauer M, Saller A, Carraro A, Frigato F, Chiesura-Corona M, Bianchi L, Baggio B, Maioli M, Abaterusso C, Velussi M, Sambataro M, Virgili F, Ossi E, Nosadini R.Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. Kidney Int Suppl. 1997 Dec;63:S40-4.

Brownlee M.Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

Burgering BM, Coffer PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. Nature. 1995 Aug 17;376(6541):599-602.

Cadigan KM, Nusse R.Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes Dev. 1997 Dec 15;11(24):3286-305.

Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. J Biol Chem. 1998 Mar 27;273(13):7201-4.

Câmpean V, Theilig F, Paliege A, Breyer M, Bachmann S.Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). Am J Physiol Renal Physiol. 2003 Jul;285(1):F19-32.

Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males.Circ Res. 2001 May 25;88(10):1020-7.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC.Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science. 1998 Nov 13;282(5392):1318-21.

Carvalho E, Rondinone C, Smith U.Insulin resistance in fat cells from obese Zucker rats--evidence for an impaired activation and translocation of protein kinase B and glucose transporter 4.Mol Cell Biochem. 2000 Mar;206(1-2):7-16.

Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA. Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. J Biol Chem. 2003 Aug 29;278(35):32493-6.

Cenni V, Sirri A, Riccio M, Lattanzi G, Santi S, de Pol A, Maraldi NM, Marmiroli S. Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. Cell Mol Life Sci. 2003 Dec;60(12):2710-20.

Cleary MP, Muller S, Lanza-Jacoby S Effects of long-term moderate food restriction on growth, serum factors, lipogenic enzymes and adipocyte glucose metabolism in lean and obese Zucker rats. J Nutr. 1987 Feb;117(2):355-60.

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem J. 1998 Oct 1;335 (Pt 1):1-13

Cooper ME, Allen TJ, O'Brien RC, Macmillan PA, Clarke B, Jerums G, Doyle AE. Effects of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat--functional and structural characteristics. J Hypertens. 1988 Dec;6(12):1009-16.

Cooper ME.Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. Lancet. 1998 Jul 18;352(9123):213-9.

Crespo JL, Powers T, Fowler B, Hall MN. The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 May 14;99(10):6784-9.

Cronstein BN.Cyclooxygenase-2-selective inhibitors: translating pharmacology into clinical utility. Cleve Clin J Med. 2002;69 Suppl 1:SI13-9.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.

Dalla Vestra M, Saller A, Bortoloso E, Mauer M, Fioretto P.Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy.Diabetes Metab. 2000 Jul;26 Suppl 4:8-14.

Dalla Vestra M, Saller A, Mauer M, Fioretto P.Role of mesangial expansion in the pathogenesis of diabetic nephropathy. J Nephrol. 2001 Nov-Dec;14 Suppl 4:S51-7.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME.Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell. 1997 Oct 17;91(2):231-41.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev. 1999 Nov 15;13(22):2905-27

DeFronzo RA. The effect of insulin on renal sodium metabolism. A review with clinical implications. Diabetologia. 1981 Sep;21(3):165-71.

del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R, Nuñez G.Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. Science. 1997 Oct 24;278(5338):687-9.

Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor.Science. 2001 Nov 2;294(5544):1102-5.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ.Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes Dev. 1998 Nov 15;12(22):3499-511.

Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. Circ Res. 1998 Aug 10;83(3):334-41.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature. 1999 Jun 10;399(6736):601-5.

Dobrzynski E, Montanari D, Agata J, Zhu J, Chao J, Chao L.Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002 Dec;283(6):E1291-8.

Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. Science. 2003 Jun 6;300(5625):1574-7.

Feliers D, Duraisamy S, Faulkner JL, Duch J, Lee AV, Abboud HE, Choudhury GG, Kasinath BS.Activation of renal signaling pathways in db/db mice with type 2 diabetes. Kidney Int. 2001 Aug;60(2):495-504.

Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B, Van Obberghen E. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. Mol Cell Biol. 1999 Jul;19(7):4989-5000.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J.Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. Genes Dev. 2002 Jun 15;16(12):1472-87.

Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Mauer M.Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. Kidney Int. 1995 Dec;48(6):1929-35.

Fioretto P, Mauer M, Brocco E, Velussi M, Frigato F, Muollo B, Sambataro M, Abaterusso C, Baggio B, Crepaldi G, Nosadini R.Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria. Diabetologia. 1996 Dec;39(12):1569-76.

Fioretto P, Stehouwer CD, Mauer M, Chiesura-Corona M, Brocco E, Carraro A, Bortoloso E, van Hinsbergh VW, Crepaldi G, Nosadini R.Heterogeneous nature of microalbuminuria in NIDDM: studies of endothelial function and renal structure. Diabetologia. 1998 Feb;41(2):233-6.

Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR.Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. J Biol Chem. 1992 Mar 5;267(7):4338-44.

Flyvbjerg A.Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease. Diabetologia. 2000 Oct;43(10):1205-23

Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Jul 1;23(7):1161-8.

Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase.Cell. 1995 Jun 2;81(5):727-36

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. Science. 1997 Jan 31;275(5300):665-8.

Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR, Hemmings BA. High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. J Biol Chem. 1997 Mar 28;272(13):8474-81.

Frevert EU, Bjorbaek C, Venable CL, Keller SR, Kahn BB. Targeting of constitutively active phosphoinositide 3-kinase to GLUT4-containing vesicles in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 1998 Sep 25;273(39):25480-7.

Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. J Biol Chem. 1999 Jun 4;274(23):16349-54.

Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, Takeuchi M, Motomiya Y, Bucala R, Iida S, Tamaki K, Imaizumi T, Cooper ME, Okuda S.AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. Kidney Int. 2004 Dec;66(6):2137-47.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature. 1999 Jun 10;399(6736):597-601

Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2.Mol Cell. 2003 Jun;11(6):1457-66.

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 1998 May 22;273(21):13313-6.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J Biol Chem. 1998a;273:30336–30343

Gerhardinger C, McClure KD, Romeo G, Podestà F, Lorenzi M. IGF-I mRNA and signaling in the diabetic retina. Diabetes. 2001 Jan;50(1):175-83.

Gorin Y, Kim NH, Feliers D, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE. Angiotensin II activates Akt/protein kinase B by an arachidonic acid/redox-dependent pathway and independent of phosphoinositide 3-kinase. FASEB J. 2001 Sep;15(11):1909-20.

Ha H, Lee HB.Reactive oxygen species and matrix remodeling in diabetic kidney. J Am Soc Nephrol. 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S246-9.

Hajduch E, Darakhshan F, Hundal HS. Fructose uptake in rat adipocytes: GLUT5 expression and the effects of streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 1998 Jul;41(7):821-8.

Han DC, Shen TL, Guan JL. The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. Oncogene. 2001 Oct 1;20(44):6315-21

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. Cell. 2002 Jul 26;110(2):177-89.

Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF. Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. Trends Biochem Sci. 2005 Jan;30(1):35-42.

Harris RD, Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DE, Mauer SM.Global glomerular sclerosis and glomerular arteriolar hyalinosis in insulin dependent diabetes. Kidney Int. 1991 Jul;40(1):107-14.

Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD.Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. J Clin Invest. 1994 Dec;94(6):2504-10.

Harris RC. COX-2 and the kidney. J Cardiovasc Pharmacol. 2006;47 Suppl 1:S37-42.

Hayashi K, Fujiwara K, Oka K, Nagahama T, Matsuda H, Saruta T.Effects of insulin on rat renal microvessels: studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. Kidney Int. 1997 May;51(5):1507-13.

Heidland A, Sebekova K, Schinzel R. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. Am J Kidney Dis. 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S100-6.

Hiromura K, Monkawa T, Petermann AT, Durvasula RV, Shankland SJ.Insulin is a potent survival factor in mesangial cells: role of the PI3-kinase/Akt pathway. Kidney Int. 2002 Apr;61(4):1312-21.

Holz MK, Blenis J.Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. J Biol Chem. 2005 Jul 15;280(28):26089-93.

Howard G, O'Leary DH, Zaccaro D, Haffner S, Rewers M, Hamman R, Selby JV, Saad MF, Savage P, Bergman R.Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. Circulation. 1996 May 15;93(10):1809-17.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Oct 15;99(21):13926-31.

Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. TGF-beta(1) modulates NOS expression and phosphorylation of Akt/PKB in rat myocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001a Sep;281(3):H1035-9

Cheng HF, Wang CJ, Moeckel GW, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC.Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension.Kidney Int. 2002 Sep;62(3):929-39.

Cheng HF, Harris RC.Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. Hypertension. 2004 Mar;43(3):525-30. Epub 2004 Jan 19.

Chiarelli F, Santilli F, Mohn A.Role of growth factors in the development of diabetic complications. Horm Res. 2000;53(2):53-67.

Ii S, Ohta M, Kudo E, Yamaoka T, Tachikawa T, Moritani M, Itakura M, Yoshimoto K. Redox state-dependent and sorbitol accumulation-independent diabetic albuminuria in mice with transgene-derived hum v 26;115(5):577-90.an aldose reductase and sorbitol dehydrogenase deficiency. Diabetologia. 2004 Mar;47(3):541-8.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell. 2003 No

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. Genes Dev. 2003a Aug 1;17(15):1829-34.

Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T.Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. J Biol Chem. 1995 Oct 20;270(42):24965-71.

Ionescu E, Sauter JF, Jeanrenaud B. Abnormal oral glucose tolerance in genetically obese (fa/fa) rats. Am J Physiol. 1985 May;248(5 Pt 1):E500-6.

Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. J Clin Invest. 1999 May;103(9):1231-6.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, Hall MN.Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. Nat Cell Biol. 2004 Nov;6(11):1122-8. Epub 2004 Oct 3.

Jahn T, Seipel P, Urschel S, Peschel C, Duyster J. Role for the adaptor protein Grb10 in the activation of Akt. Mol Cell Biol. 2002 Feb;22(4):979-91.

Jaimes EA, Tian RX, Pearse D, Raij L.Up-regulation of glomerular COX-2 by angiotensin II: role of reactive oxygen species. Kidney Int. 2005 Nov;68(5):2143-53.

Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL.Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. J Clin Invest. 1999 Aug;104(4):447-57.

Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA. Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. Cell Regul. 1991 Dec;2(12):1001-9.

Joussen AM, Poulaki V, Tsujikawa A, Qin W, Qaum T, Xu Q, Moromizato Y, Bursell SE, Wiegand SJ, Rudge J, Ioffe E, Yancopoulos GD, Adamis AP. Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. Am J Pathol. 2002 May;160(5):1683-93.

Kasiske BL, Cleary MP, O'Donnell MP, Keane WF. Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat. J Lab Clin Med. 1985 Nov;106(5):598-604.

Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. Hypertension. 1992 Jan;19(1 Suppl):I110-5.

Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffer P, Downward J, Evan G. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. Nature. 1997 Feb 6;385(6616):544-8.

Kava R, Horowitz C, Feldweg A, Turkenkopf I, Johnson P, Greenwood MRC. Short-term Effects of Adrenalectomy and Adiposity, Glycemia and Glucose Tolerance in Obese and Lean Zucker Rats. FASEB J. 1989; 3(3):A356

Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennström S, Warne PH, Downward J.Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. EMBO J. 1997 May 15;16(10):2783-93.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. Cell. 2002 Jul 26;110(2):163-75.

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. Mol Cell. 2003

Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. Circ Res. 2000 Jan 7-21;86(1):24-9.

Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB.Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes.J Clin Invest. 1999a Sep;104(6):733-41.

Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS.Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. J Appl Physiol. 2002 Sep;93(3):1168-80.

Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, Matsumura T, Tokunaga H, Brownlee M, Araki E.Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. Diabetes. 2003 Oct;52(10):2570-7.

Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. Mol Cell Biol. 1997 Jan;17(1):338-44.

Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. J Biol Chem. 1996 Dec 6;271(49):31372-8

Komers R, Cooper ME.Acute renal hemodynamic effects of ACE inhibition in diabetic hyperfiltration: role of kinins. Am J Physiol. 1995 Apr;268(4 Pt 2):F588-94.

Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Schutzer WE, Reed JF, Mader SL, Anderson S.Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. J Clin Invest. 2001 Apr;107(7):889-98.

Kömhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM.Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. Am J Physiol. 1997 Apr;272(4 Pt 2):F460-8.

Kone BC.Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. Semin Nephrol. 2004 Jul;24(4):299-315.

Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Ono Y, Tokunaga C, Kuroda S, Kikkawa U. Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 23;93(15):7639-43.

Konishi H, Matsuzaki H, Tanaka M, Takemura Y, Kuroda S, Ono Y, Kikkawa U.. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. FEBS Lett. 1997 Jun 30;410(2-3):493-8.

Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. Eur J Biochem. 1994 May 1;221(3):889-97.

Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL.Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. J Clin Invest. 1997 Jul 1;100(1):115-26.

Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendić S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR.Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. Diabetes. 1997 Dec;46(12):2110-4.

Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H.Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. Diabetes. 1998 Aug;47(8):1281-6.

Kunsch C, Medford RM.Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. Circ Res. 1999 Oct 15;85(8):753-66.

Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. Methods. 2006 Apr;38(4):283-93.

Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. Hypertension. 1989 Jun;13(6 Pt 2):896-901.

Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC.Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature. 1996 Dec 19-26;384(6610):644-8.

Kushiro T, Kobayashi F, Osada H, Tomiyama H, Satoh K, Otsuka Y, Kurumatani H, Kajiwara N. Role of sympathetic activity in blood pressure reduction with low calorie regimen. Hypertension. 1991 Jun;17(6 Pt 2):965-8.

Lane PH, Steffes MW, Fioretto P, Mauer SM.Renal interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. Kidney Int. 1993 Mar;43(3):661-7.

Lavaud S, Michel O, Sassy-Prigent C, Heudes D, Bazin R, Bariety J, Chevalier J. Early influx of glomerular macrophages precedes glomerulosclerosis in the obese Zucker rat model. J Am Soc Nephrol. 1996 Dec;7(12):2604-15

Laviola L, Belsanti G, Davalli AM, Napoli R, Perrini S, Weir GC, Giorgino R, Giorgino F. Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. Diabetes. 2001 Dec;50(12):2709-20.

Lawrence JC Jr, Roach PJ New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. Diabetes. 1997 Apr;46(4):541-7.

LeDoux SP, Woodley SE, Patton NJ, Wilson GL.Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Alterations in DNA. Diabetes. 1986 Aug;35(8):866-72.

Lee MJ, Feliers D, Mariappan MM, Sataranatarajan K, Mahimainathan L, Musi N, Foretz M, Viollet B, Weinberg JM, Choudhury GG, Kasinath BS.A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. Am J Physiol Renal Physiol. 2007

Leehey DJ, Isreb MA, Marcic S, Singh AK, Singh R.Effect of high glucose on superoxide in human mesangial cells: role of angiotensin II. Nephron Exp Nephrol. 2005;100(1):e46-53.

Li JM, Shah AM.ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S221-6.

Li YJ, Hui YN, Yan F, Du ZJ.Up-regulation of integrin-linked kinase in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2007 Oct;245(10):1523-32.

Li Z, Rodríguez-Iturbe B, Ni Z, Shahkarami A, Sepassi L, Vaziri ND.Effect of hereditary obesity on renal expressions of NO synthase, caveolin-1, AKt, guanylate cyclase, and calmodulin. Kidney Int. 2005 Dec;68(6):2766-72.

Lim JW, Kim H, Kim KH.Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. Lab Invest. 2001 Mar;81(3):349-60.

Limbourg FP, Huang Z, Plumier JC, Simoncini T, Fujioka M, Tuckermann J, Schutz G, Moskowitz MA, Liao JK. Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. J Clin Invest. 2002 Dec;110(11):1729-38. Erratum in: J Clin Invest. 2003 Mar;111(5):759.

Lin CL, Wang JY, Huang YT, Kuo YH, Surendran K, Wang FS.Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells. J Am Soc Nephrol. 2006 Oct;17(10):2812-20.

Lloberas N, Cruzado JM, Franquesa M, Herrero-Fresneda I, Torras J, Alperovich G, Rama I, Vidal A, Grinyó JM. Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. J Am Soc Nephrol. 2006 May;17(5):1395-404.

Lown JN, Mc Laughlin LW, Chang Y. Mechanisms of action of 2-halo ethyl nitrosoureas on DNA and its relations to their anti-leukemic properties. Bioorg Chem 1979;7:97-110.

Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic RD, Daumerie G, Fulton D, Sessa WC, Walsh K. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. J Clin Invest. 2000 Aug;106(4):493-9.

Maira SM, Galetic I, Brazil DP, Kaech S, Ingley E, Thelen M, Hemmings BA. Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. Science. 2001 Oct 12;294(5541):374-80.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. Mol Cell. 2002 Jul;10(1):I51-62

Mariappan MM, Feliers D, Mummidi S, Choudhury GG, Kasinath BS.High glucose, high insulin, and their combination rapidly induce laminin-beta1 synthesis by regulation of mRNA translation in renal epithelial cells. Diabetes. 2007 Feb;56(2):476-85.

Marletta MA. Another activation switch for endothelial nitric oxide synthase: why does it have to be so complicated? Trends Biochem Sci. 2001 Sep;26(9):519-21.

Marshall CB, Shankland SJ.Cell cycle and glomerular disease: a minireview. Nephron Exp Nephrol. 2006;102(2):e39-48.

Marte BM, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. Trends Biochem Sci. 1997 Sep;22(9):355-8

Mauer SM, Steffes MW, Brown DM. The kidney in diabetes. Am J Med. 1981 Mar;70(3):603-12.

Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC.Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. J Clin Invest. 1984 Oct;74(4):1143-55.

Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 25;98(20):11598-603. Epub 2001 Aug 14.

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. Nature. 2000 Apr 13;404(6779):782-7

Meier M, Menne J, Park JK, Haller H.Nailing down PKC isoform specificity in diabetic nephropathy two's company, three's a crowd. Nephrol Dial Transplant. 2007a Sep;22(9):2421-5.

Meier M, Park JK, Overheu D, Kirsch T, Lindschau C, Gueler F, Leitges M, Menne J, Haller H.Deletion of protein kinase C-beta isoform in vivo reduces renal hypertrophy but not albuminuria in the streptozotocin-induced diabetic mouse model. Diabetes. 2007 Feb;56(2):346-54.

Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E: The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. Diabetes 32 (Suppl.2):64-78, 1983

Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, Steffes MW; American Diabetes Association.Nephropathy in diabetes. Diabetes Care. 2004 Jan;27 Suppl 1:S79-83.

Moule SK, Welsh GI, Edgell NJ, Foulstone EJ, Proud CG, Denton RM.Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms. J Biol Chem. 1997 Mar 21;272(12):7713-9.

Muneta B, Newman J, Stevenson J, Eggers P. Diabetic end-stage renal disease among Native Americans. Diabetes Care. 1993 Jan;16(1):346-8.

Nadler ST, Stoehr JP, Rabaglia ME, Schueler KL, Birnbaum MJ, Attie AD.Normal Akt/PKB with reduced PI3K activation in insulin-resistant mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001 Dec;281(6):E1249-54.

Nagai K, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Kanamori H, Iehara N, Fukatsu A, Yanagita M, Nakano T, Ishimoto Y, Kita T, Doi T, Arai H. Gas6 induces Akt/mTOR-mediated mesangial hypertrophy in diabetic nephropathy. Kidney Int. 2005 Aug;68(2):552-61.

Nantel F, Meadows E, Denis D, Connolly B, Metters KM, Giaid A.Immunolocalization of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human elderly. FEBS Lett. 1999 Sep 3;457(3):475-7.

Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowith JB.Arachidonic acid metabolism. Annu Rev Biochem. 1986;55:69-102.

Negrete H, Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR.Role for transforming growth factor beta in thromboxane-induced increases in mesangial cell fibronectin synthesis. Diabetes. 1995 Mar;44(3):335-9.

Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. J Biol Chem. 1994 Feb 4;269(5):3568-73.

Okamato H. Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin dependant diabetes. Mol Cell Biochem 1981;37:43-61.

Overton JM, VanNess JM, Casto RM. Food restriction reduces sympathetic support of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. J Nutr. 1997 Apr;127(4):655-60.

Ozes ON, Akca H, Mayo LD, Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway mediates and PTEN antagonizes tumor necrosis factor inhibition of insulin signaling through insulin receptor substrate-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Apr 10;98(8):4640-5. Epub 2001 Apr 3.

Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. Mol Cell Biol. 2001 Nov;21(21):7449-59.

Parker PJ, Parkinson SJ. AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. Biochem Soc Trans. 2001 Nov;29(Pt 6):860-3.

Patti ME, Kahn BB.Nutrient sensor links obesity with diabetes risk. Nat Med. 2004 Oct;10(10):1049-50.

Pearl LH, Barford D. Regulation of protein kinases in insulin, growth factor and Wnt signalling. Curr Opin Struct Biol. 2002 Dec;12(6):761-7.

Perez-Garcia MJ, Cena V, de Pablo Y, Llovera M, Comella JX, Soler RM. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. J Biol Chem. 2004 Feb 13;279(7):6132-42.

Phillips A, Janssen U, Floege J. Progression of diabetic nephropathy. Insights from cell culture studies and animal models. Kidney Blood Press Res. 1999;22(1-2):81-97.

Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF.Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. Nat Genet. 1996 May;13(1):18-9.

Picot D, Loll PJ, Garavito RM.The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. Nature. 1994 Jan 20;367(6460):243-9.

Pullen N, Thomas G.The modular phosphorylation and activation of p70s6k. FEBS Lett. 1997 Jun 23;410(1):78-82.

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. Science. 1998 Jan 30;279(5351):707-10.

Rane MJ, Pan Y, Singh S, Powell DW, Wu R, Cummins T, Chen Q, McLeish KR, Klein JB. Heat shock protein 27 controls apoptosis by regulating Akt activation. J Biol Chem. 2003 Jul 25;278(30):27828-35.

Reckelhoff JF, Tygart VL, Mitias MM, Walcott JL.STZ-induced diabetes results in decreased activity of glomerular cathepsin and metalloprotease in rats. Diabetes. 1993 Oct;42(10):1425-32.

Remy I, Michnick SW. Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt. Mol Cell Biol. 2004 Feb;24(4):1493-504

Ritz E. Nephropathy in type 2 diabetes. J Intern Med. 1999 Feb;245(2):111-26.

Rondinone CM, Carvalho E, Wesslau C, Smith UP.Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with Type II diabetes mellitus.Diabetologia. 1999 Jul;42(7):819-25.

Sable CL, Filippa N, Hemmings B, Van Obberghen E. cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. FEBS Lett. 1997 Jun 9;409(2):253-7.

Sanchez PL, Salgado LM, Ferreri NR, Escalante B.Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function after renal ablation. Hypertension. 1999 Oct;34(4 Pt 2):848-53.

Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC Jr.Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 23;95(13):7772-7.

Sean Eardley K, Cockwell P.Macrophages and progressive tubulointerstitial disease. Kidney Int. 2005 Aug;68(2):437-55.

Senthil D, Choudhury GG, Abboud HE, Sonenberg N, Kasinath BS.Regulation of protein synthesis by IGF-I in proximal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol. 2002 Dec;283(6):F1226-36. Epub 2002 Aug 13.

Senthil D, Choudhury GG, McLaurin C, Kasinath BS.Vascular endothelial growth factor induces protein synthesis in renal epithelial cells: a potential role in diabetic nephropathy. Kidney Int. 2003 Aug;64(2):468-79.

Shah OJ, Wang Z, Hunter T.Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. Curr Biol. 2004 Sep 21;14(18):1650-6.

Shah OJ, Hunter T.Turnover of the active fraction of IRS1 involves raptor-mTOR- and S6K1-dependent serine phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. Mol Cell Biol. 2006 Sep;26(17):6425-34.

Shankland SJ, Scholey JW.Expression of growth-related protooncogenes during diabetic renal hypertrophy. Kidney Int. 1995 Mar;47(3):782-8.

Shao J, Sheng H, DuBois RN, Beauchamp RD. Oncogenic Ras-mediated cell growth arrest and apoptosis are associated with increased ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation. J Biol Chem. 2000 Jul 28;275(30):22916-24.

Shaw M, Cohen P, Alessi DR. The activation of protein kinase B by H2O2 or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. Biochem J. 1998 Nov 15;336 (Pt 1):241-6.

Sherman WM, Katz AL, Cutler CL, Withers RT, Ivy JL. Glucose transport: locus of muscle insulin resistance in obese Zucker rats. Am J Physiol. 1988 Sep;255(3 Pt 1):E374-82.

Sheu ML, Ho FM, Chao KF, Kuo ML, Liu SH.Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to high glucose leads to regulation of reactive oxygen species-related nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. Mol Pharmacol. 2004 Jul;66(1):187-96.

Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. Nat Med. 2002 Oct;8(10):1145-52. Epub 2002 Sep 16.

Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Oct;2(10):760-8

Schnetterer L, Müller M, Fasching P, Diepolder C, Gallenkamp A, Zanaschka G, Findl O, Strenn K, Mensik C, Tschernko E, Eichler HG, Wolzt M.Renal and ocular hemodynamic effects of insulin. Diabetes. 1997 Nov;46(11):1868-74.

Schnermann J, Briggs JP.The macula densa is worth its salt. J Clin Invest. 1999 Oct;104(8):1007-9.

Schnyder B, Pittet M, Durand J, Schnyder-Candrian S.Rapid effects of glucose on the insulin signaling of endothelial NO generation and epithelial Na transport.Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002 Jan;282(1):E87-94.

Schonherr E, Levkau B, Schaefer L, Kresse H, Walsh K. Decorin-mediated signal transduction in endothelial cells. Involvement of Akt/protein kinase B in up-regulation of p21(WAF1/CIP1) but not p27(KIP1). J Biol Chem. 2001 Nov 2;276(44):40687-92. Epub 2001 Aug 23.

Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. Kidney Int. 2004 Jun;65(6):2003-17.

Singh LP, Andy J, Anyamale V, Greene K, Alexander M, Crook ED.Hexosamine-induced fibronectin protein synthesis in mesangial cells is associated with increases in cAMP responsive element binding (CREB) phosphorylation and nuclear CREB: the involvement of protein kinases A and C.Diabetes. 2001 Oct;50(10):2355-62.

Singh LP, Green K, Alexander M, Bassly S, Crook ED.Hexosamines and TGF-beta1 use similar signaling pathways to mediate matrix protein synthesis in mesangial cells.Am J Physiol Renal Physiol. 2004 Feb;286(2):F409-16

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L.Advanced glycation end-products: a review. Diabetologia. 2001 Feb;44(2):129-46.

Singh R, Singh AK, Alavi N, Leehey DJ.Mechanism of increased angiotensin II levels in glomerular mesangial cells cultured in high glucose. J Am Soc Nephrol. 2003 Apr;14(4):873-80.

Sirois J, Levy LO, Simmons DL, Richards JS. Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Identification of functional and protein-binding regions. J Biol Chem. 1993 Jun 5;268(16):12199-206.

Smith OL, Czech MP. Insulin sensitivity and response in eviscerated obese Zucker rats. Metabolism. 1983 Jun;32(6):597-602

Smith WL, Langenbach R.Why there are two cyclooxygenase isozymes. J Clin Invest. 2001 Jun;107(12):1491-5.

Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. Cancer Res. 2003 May 1;63(9):2139-44.

Song XM, Kawano Y, Krook A, Ryder JW, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR.Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. Diabetes. 1999 Mar;48(3):664-70.

Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jul;84(14):5034-7.

Steffgen J, Kampfer K, Grupp C, Langenberg C, Müller GA, Grunewald RW.Osmoregulation of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in cultivated interstitial cells of rat renal inner medulla. Nephrol Dial Transplant. 2003 Nov;18(11):2255-61.

Stern J, Johnson PR, Greenwood MR, Zucker LM, Hirsch J. Insulin resistance and pancreatic insulin release in the genetically obese Zucker rat. Proc Soc Exp Biol Med. 1972 Jan;139(1):66-9

Stiles BL, Kuralwalla-Martinez C, Guo W, Gregorian C, Wang Y, Tian J, Magnuson MA, Wu H.Selective deletion of Pten in pancreatic beta cells leads to increased islet mass and resistance to STZ-induced diabetes. Mol Cell Biol. 2006 Apr;26(7):2772-81.

Storgaard H, Song XM, Jensen CB, Madsbad S, Björnholm M, Vaag A, Zierath JR.Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant relatives of type 2 diabetic patients [corrected].Diabetes. 2001 Dec;50(12):2770-8.

Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. Nature. 1991 Jul 4;352(6330):73-7.

Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. Nature. 1995 Sep 14;377(6545):173-7.

Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. Curr Biol. 2003 Aug 5;13(15):1259-68

Terrettaz J, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Inhibition of hepatic glucose production by insulin in vivo in rats: contribution of glycolysis. Am J Physiol. 1986a Apr;250(4 Pt 1):E346-51.

Terrettaz J, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B. Severe hepatic and peripheral insulin resistance as evidenced by euglycemic clamps in genetically obese fa/fa rats. Endocrinology. 1986b Feb;118(2):674-8.

Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor-alpha in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. Diabetes. 2001 Nov;50(11):2563-71.

Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR.Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. J Clin Invest. 1996 May 1;97(9):2051-6.

Thannickal VJ, Fanburg BL.Reactive oxygen species in cell signaling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2000 Dec;279(6):L1005-28.

Thirone AC, Scarlett JA, Gasparetti AL, Araujo EP, Lima MH, Carvalho CR, Velloso LA, Saad MJ.Modulation of growth hormone signal transduction in kidneys of streptozotocin-induced diabetic animals: effect of a growth hormone receptor antagonist. Diabetes. 2002 Jul;51(7):2270-81.

Thomas SR, Chen K, Keaney JF Jr. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. J Biol Chem. 2002 Feb 22;277(8):6017-24.

Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. Nature. 1997 Jun 12;387(6634):673-6.

Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm.J Am Soc Nephrol. 1999 Nov;10(11):2440-5.

Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE, Polonsky KS, Naji A, Birnbaum MJ.Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. Nat Med. 2001 Oct;7(10):1133-7.

Um SH, D'Alessio D, Thomas G.Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. Cell Metab. 2006 Jun;3(6):393-402.

Vallon V.Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. News Physiol Sci. 2003 Aug;18:169-74.

van den Heuvel AP, de Vries-Smits AM, van Weeren PC, Dijkers PF, de Bruyn KM, Riedl JA, Burgering BM.Binding of protein kinase B to the plakin family member periplakin. J Cell Sci. 2002 Oct 15;115(Pt 20):3957-66.

van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthase kinase 3 inactivation. Characterization of dominant-negative mutant of PKB. J Biol Chem. 1998 May 22;273(21):13150-6.

Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. Diabetes. 2002 Jan;51(1):168-73.

Velasquez MT, Kimmel PL, Michaelis OE 4th. Animal models of spontaneous diabetic kidney disease. FASEB J. 1990 Aug;4(11):2850-9.

Wang JL, Cheng HF, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC.Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in a model of renal ablation. Am J Physiol. 1998 Oct;275(4 Pt 2):F613-22.

Wang JL, Cheng HF, Shappell S, Harris RC.A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retards progressive renal injury in rats. Kidney Int. 2000 Jun;57(6):2334-42.

Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Makela E, Sandin S, Ruotsalainen V, Cheng RH, Jalanko H, Skoglund U, Tryggvason K. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. J Clin Invest. 2004 Nov;114(10):1475-83

Welsh GI, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT, Proud CG.Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. FEBS Lett. 1998 Jan 9;421(2):125-30.

White MF.The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. Mol Cell Biochem. 1998 May;182(1-2):3-11.

Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF-beta. Kidney Int. 1992 Sep;42(3):647-56.

Wolf G.Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. Kidney Int Suppl. 2000 Sep;77:S59-66.

Wolf G.Growth factors and the development of diabetic nephropathy. Curr Diab Rep. 2003 Dec;3(6):485-90.

Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology.Eur J Clin Invest. 2004 Dec;34(12):785-96.

Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN.From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. Diabetes. 2005 Jun;54(6):1626-34.

Wolf G, Ziyadeh FN.Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy.Nephron Physiol. 2007;106(2):p26-31.

Wu D, Peng F, Zhang B, Ingram AJ, Gao B, Krepinsky JC.Collagen I induction by high glucose levels is mediated by epidermal growth factor receptor and phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling in mesangial cells. Diabetologia. 2007 Sep;50(9):2008-18. Epub 2007 Jul 11.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN.TOR signaling in growth and metabolism. Cell. 2006 Feb 10;124(3):471-84.

Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 2;98(1):247-52.

Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL.Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing.Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Apr 1;88(7):2692-6.

Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M.Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells.Kidney Int. 2003 Feb;63(2):464-73.

Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. J Biol Chem. 1995 Dec 29;270(52):31315-20.

Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice.J Clin Invest. 2001 Jul;108(2):261-8.

Yang Q, Guan KL.Expanding mTOR signaling. Cell Res. 2007 Aug;17(8):666-81.

Yang Y, Wang J, Qin L, Shou Z, Zhao J, Wang H, Chen Y, Chen J.Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats.Am J Nephrol. 2007;27(5):495-502.

Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. Nature. 1998 Dec 10;396(6711):584-7.

York DA, Steinke J, Bray GA. Hyperinsulinemia and insulin resistance in genetically obese rats. Metabolism. 1972 Apr;21(4):277-84.

Zeng G, Quon MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. J Clin Invest. 1996 Aug 15;98(4):894-8.

Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. Circulation. 2000 Apr 4;101(13):1539-45.

Zhang SL, Tang SS, Chen X, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JS.High levels of glucose stimulate angiotensinogen gene expression via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells. Endocrinology. 2000 Dec;141(12):4637-46.

Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D.Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. Nat Cell Biol. 2003 Jun;5(6):578-81.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. Nat Cell Biol. 2001 Mar;3(3):245-52.

Ziyadeh FN.Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. J Am Soc Nephrol. 2004 Jan;15 Suppl 1:S55-7.

Zucker LM. Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipemia. Ann N Y Acad Sci. 1965 Oct 8;131(1):447-58.

Ždychová J, Komers R.Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications.Physiol Res. 2005;54(1):1-16.

9. Přílohy :

Příloha: Seznam publikací souvisejících s disertační prací :

Ždychová J, Kazdová L, Pelikanová T, Lindsley JN, Anderson S, Komers R. Renal activity of Akt kinase in Obese Zucker Rats. Experimental Biology and Medicine, 2008 (in press)

Ždychová J, Veselá J, Kazdová L, Komers R.Renal activity of Akt kinase in experimental Type 1 diabetes. Physiol Res. 2007 Oct 11. [Epub ahead of print]

Komers R, Ždychová J, Cahová M, Kazdová L, Lindsley JN, Anderson S. Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats. Kidney Int. 2005 Jun;67(6):2151-8.

Renal activity of Akt kinase in Obese Zucker Rats

Jana Ždychová[1], Ludmila Kazdová[1], Terezie Pelikanová[1], Jessie N. Lindsley[2], Sharon Anderson[2,3], and Radko Komers[1,2]

[1]Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic. [2]Division of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Oregon Health and Science University, and [3]Portland VA Medical Center Portland, OR, 97239, USA

Running title: Renal Akt in Zucker rats

Address for correspondence:
Radko Komers, M.D., Ph.D.
Div. of Nephrology and Hypertension
Oregon Health & Science University, PP262
3314 SW US Veterans Hospital Road
Portland, Oregon, 97239-2940
Phone: (503) 721 7997
FAX: (503) 721-7810
e-mail: komersr@ohsu.edu

ABSTRACT

Insulin resistance (IR) and consequent hyperinsulinemia are hallmarks of Type 2 diabetes (DM2). Akt kinase (Akt) is an important molecule in insulin signaling, implicated in regulation of glucose uptake, cell growth, cell survival, protein synthesis, and endothelial nitric oxide (NO) production. Impaired Akt activation in insulin-sensitive tissues contributes to IR. However, Akt activity in other tissues, particularly those affected by complications of DM2, has been less studied. We hypothesized that hyperinsulinemia could have an impact on activity of Akt and its effectors involved in regulation of renal morphology and function in DM2. To address this issue, renal cortical Akt was determined obese Zucker rats (ZO), a model of DM2, and lean controls (ZL). We also studied expression and phosphorylation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and endothelial NO synthase (eNOS), molecules downstream of Akt in the insulin signaling cascade, and documented modulators of renal injury. Akt activity was measured by a kinase assay with GSK-3 as a substrate. Expression of phosphorylated (active) and total proteins was measured by immunoblotting and immunohistochemistry. Renal Akt activity was increased in ZO as compared to ZL rats, in parallel with progressive hyperinsulinemia. No differences in Akt were observed in the skeletal muscle. Corresponding to increases in Akt activity, ZO rats demonstrated enhanced phosphorylation of renal mTOR. Acute PI3K inhibition with wortmannin (100 μg/kg) attenuated renal Akt and mTOR activities in ZO, but not in ZL rats. In contrast to mTOR, eNOS phosphorylation was similar in ZO and ZL rats, despite higher total eNOS expression. In conclusion, ZO rats demonstrated increases in renal Akt and mTOR activity and expression. However, eNOS phosphorylation did not follow this pattern.

These data suggest that DM2 is associated with selective IR in the kidney, allowing pro-growth signaling via mTOR, whereas potentially protective effects mediated by eNOS are blunted.

Keywords: Akt kinase, phosphatidylinositol 3 – kinase, Zucker rat, mammalian target of rapamycin, mTOR, endothelial nitric oxide synthase.

INTRODUCTION

Resistance to metabolic actions of insulin (insulin resistance, IR), typically occurring in insulin-sensitive tissues such as the skeletal muscle, liver and adipose tissue, is a hallmark of Type 2 diabetes (DM2), and is often associated with obesity (1).

Insulin signaling involves activation of its receptor tyrosine kinase and subsequent phosphorylations of several substrates, including members of the insulin receptor substrate family and phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K) (2). The serine/threonine kinase Akt/protein kinase B (Akt) is one of the downstream targets of PI3K (2, 3), and an important molecule in insulin signaling. Akt activation is a process involving membrane translocation and phosphorylation by phosphoinositide-dependent protein kinases (3). Activity of the PI3K-Akt pathway can be negatively regulated by protein phosphatases, such as phosphatase with tensin homology (PTEN) (4). Phosphorylated (active) Akt, acting via its downstream effectors, has been implicated not only in regulation of mechanisms important for glucose homeostasis, such as glucose uptake and glycogen synthesis, but also in the control of other cell functions, including growth, survival, protein synthesis, and endothelial nitric oxide (NO) production (5). Thus, in addition to being a hormone with well established metabolic actions, insulin acts as a growth, survival, and vasoactive factor.

Impaired insulin signaling via the PI3K-Akt pathway in insulin-sensitive tissues has been implicated in the pathophysiology of IR (6, 7). It has been postulated that the resulting hyperinsulinemia may have impact on other cells and tissues, and play a role in the pathophysiology of micro- and macrovascular complications of diabetes (8).

The kidney is also a target of insulin actions, and nephropathy is one the most serious complications of DM2, reaching epidemic proportions in some parts of the world (9). Moreover, obesity, even without marked hyperglycemia, is associated with a variety of renal pathologies both in clinical and experimental settings (10, 11). Studies indicate that insulin and/or Akt stimulation influence renal cell protein synthesis, viability, renal hemodynamics, NO production, and sodium reabsorption, i.e. mechanisms with relevance to renal pathophysiology (12-17). If renal Akt activation remains unaffected in IR, permanent exposure to hyperinsulinemia due to IR could have impact on its downstream effectors and renal morphology and function.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is an important molecule in regulation of protein synthesis. Regulation of mTOR signaling is linked to PI3K-Akt by the tuberous sclerosis complex (18). Upon insulin and growth factor stimulation, mTOR facilitates protein translation through inhibitory phosphorylation of eIF-4E binding protein (4E-BP1), a translation repressor. These events result in activation of the translation of specific mRNA subpopulations. Enhanced protein synthesis may contribute to the development of renal hypertrophy via enhanced extracellular matrix accumulation, one of the key elements in the pathophysiology of glomerulosclerosis and renal interstitial fibrosis (18).

In contrast to mTOR, endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS) exerts protective actions in the kidney by generation of endothelium-derived NO, a molecule with well established vasodilator, antithrombotic and antigrowth effects in the cardiovascular system and the kidney (19-21). Upon agonist stimulation, Akt mediates phosphorylation of eNOS on Ser1177, resulting in enhancement of its NO-generating

capability (22, 23). Indeed, insulin acts as an endothelium-dependent vasodilator in most vascular beds (24). Impaired endothelial function has been suggested as one of the pathogenic mechanisms of renal involvement in experimental models of DM2 and obesity (21, 25). In turn, restoration of endothelial NO generation has been shown to be protective in these conditions (25).

In the present studies, we determined renal cortical Akt activity and expression in the hyperinsulinemic environment typically associated with IR. In parallel, we studied expression and phosphorylation status of mTOR and eNOS, the molecules downstream of Akt in the insulin signaling cascade, and known modulators of renal injury (21, 25-27). We hypothesized that in DM2, the kidney is affected by selective IR allowing enhanced pro-growth signaling, whereas potentially protective effects mediated by Akt-induced eNOS phosphorylation are blunted. To address this issue, these components of insulin signaling were determined in the renal cortex of obese Zucker fatty rats (fa/fa, ZO) (28), a model of DM2. Zucker lean rats (ZL) that do not display metabolic defects served as controls.

METHODS

Diabetic rat model.

Male ZO and control ZL rats were obtained from Charles River, Sulzfeld, Germany. ZO rats are metabolically well characterized: an autosomal recessive mutation of the fa-gene, encoding the leptin receptor, results in hyperphagia, obesity, and hyperlipidemia (29). ZO rats display insulin resistance, marked hyperinsulinemia, and impaired glucose tolerance, and slowly progressive increases in blood glucose (BG)

concentrations (30). Later in the course of the disease, ZO rats develop progressive albuminuria and glomerulosclerosis (31).

All experiments were carried out with the approval of, and in accordance with the regulations of, the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine. The animals were housed with a light-dark cycle of 12 hours each, and with free access to food (standard chow) and water.

Study design.

In the first series of experiments, renal cortical activity, expression, and immunohistochemical localization of Akt and protein expression of PTEN in 4-week and 12-week old ZO (n=6) and ZL (n=5) rats were determined in parallel with Akt activity in the skeletal muscle. Protein expression of phosphorylated and total mTOR and eNOS were studied in 12-week old animals. To further explore the status of the PI3K-Akt pathway and its impact on downstream molecules, Akt and mTOR were studied in separate groups of 12-week old ZO and ZL rats (n=5 in each group) administered intraperitoneal injections of the PI3K inhibitor wortmannin (100 µg/kg bwt in 15% DMSO, 90 minutes before sacrifice) and compared to vehicle (DMSO)-treated animals. In previous *in vivo* studies conducted by Gao and co-workers (32), a substantially lower dose of wortmannin (15 µg/kg bwt) injected i.v. blocked insulin-induced increases in Akt activity, and inhibited the beneficial effects of insulin on apoptosis in a rat model of myocardial infarction.

After sacrifice, the blood was collected for determinations of BG, serum triglycerides (TG), non-esterified fatty acids (NEFA), and plasma insulin levels. The

soleus muscles were removed and snap frozen in liquid nitrogen. The kidneys were quickly removed on ice, decapsulated and divided into cortical and medullary portions, frozen in liquid nitrogen, and stored in -80°C until further analysis by kinase assay and immunoblotting. Half of the right kidneys was immersed in 10% formalin and further processed for immunohistochemistry. The blood and tissues were harvested without previous food restriction.

Tissue preparation.

Renal cortical tissue and soleus muscles were homogenized in ice-cold buffer containing 2 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7.5 , 150 mM NaCl, 1mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 20 mM glycerol phosphate, 1 mM sodium orthovanadate and 2 mM sodium pyrophosphate using a motor driven homogenizer and centrifuged at 850g for 10 minutes at 4°C. The nuclei-free supernatant was further centrifuged at 100,000g for 60 minutes at 4°C to obtain crude membrane and cytosolic fractions. The analyses were performed in cytosolic fractions. Total protein concentration in each sample was determined by BCA analysis (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL).

Akt kinase assay.

The homogenates (300µg) were analyzed using an Akt kinase activity assay kit (Cell Signaling, MA) according to the manufacturer's instructions. In brief, renal cortical and muscular homogenates harvested from ZL and ZO rats (300 µg) were immunoprecipitated with immobilized phospho-Serine 473–Akt antibody and incubated

with the Akt substrate glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in the presence of ATP. Protein expression of phosphorylated GSK-3, as a measure of Akt activity, was then determined by western blotting using the anti-phospho-GSK-3 antibody.

Immunoblot analysis.

The total protein content of each sample was equalized by dilution in SDS-PAGE sample buffer and incubated for 5 minutes at 97°C. Denatured proteins were then separated through an SDS-polyacrylamide gel and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad). Membranes were washed and then blocked overnight with TBS-T containing 5% nonfat dry milk. Following blocking, membranes were again washed, and incubated overnight with rabbit polyclonal antibodies (Cell Signaling, Beverly, MA) raised against phospho-Serine 473–Akt (P-Akt, cat. # 9271, 1:500), phospho-Serine 2448-mTOR (P-mTOR, cat. # 2971, 1:500), or phospho-Serine 1177-eNOS (P-eNOS, cat. # 9571, 1:600). Immunodetection was accomplished by incubating membranes with a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for 45 minutes (1:50,000, Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL) in TBS-T containing 5% nonfat dry milk. Visualization was performed with an enhanced chemiluminiscence (ECL) western-blotting kit (Supersignal West Dura, Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. Following the detections of phospho-proteins, the membranes were stripped in a stripping buffer (Chemicon, Temecula, CA) for 30 minutes at room temperature, blocked for 60 minutes, and reincubated with rabbit polyclonal antibodies against total Akt, total mTOR (Cell Signaling, cat. # 9272 and 2972, respectively), or eNOS (BD Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA) and

further processed as described above. To determine equality of loading, membranes were restripped and reprobed for actin (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) as previously described (33). Measurements of PTEN expression were accomplished using the same procedure as described above using a rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling, cat. # 9552, 1:500) followed directly by actin detection. Resultant films (Kodak) were scanned using a flatbed scanner and images analyzed with NIH Image software with the gel plotting macro.

Immunohistochemistry.

The fixed kidneys were dehydrated through a graded series of ethanols, embedded in paraffin, sectioned at 4 μm thickness, and placed onto glass slides. Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded ethanols to water, and pretreated by steaming in 10% CITRA buffer (BioGenex, San Ramon, CA). After blocking, the slides were incubated overnight at 4°C with primary antibody (anti-phospho-Ser473--Akt, Cell Signaling, 1:100) or with the same concentration of non-immune mouse IgG as a control. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H_2O_2 solution in methanol. The primary antibody was localized using the Vectastain ABC-Elite peroxidase detection system (Vector Laboratories, Burlingame, CA). This was followed by reaction with diaminobenzidine as chromogen and counterstaining with hematoxylin (Sigma, St. Louis, MO). Sections of each diabetic kidney were processed in parallel with appropriate control tissue.

Analytical methods.

Blood glucose levels were measured by the glucose oxidase assay (Pliva-Lachema, Czech Republic). Serum insulin concentrations were measured using a rat insulin RIA kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Serum TG concentrations were determined by standard enzymatic methods (Pliva-Lachema), and serum NEFA were measured using an acyl-CoA oxidase-based colorimetric kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Statistical analysis.

Data are expressed as mean ± SEM. All analyses were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Scheffé test. A p value of less than 0.05 was viewed as statistically significant.

RESULTS

General physical and metabolic parameters in ZL and ZO rats are summarized in Table 1. An increase in body weight was already apparent by 4 weeks in ZO, with an even more striking difference in 12-week old animals, as compared to their age-matched lean counterparts. Both 4-week old and 12-week old ZO rats demonstrated increases in renal weight. However, the kidney/body weight ratio was not different at 4 weeks, and even decreased in 12-week old ZO rats as compared to ZL rats of the same age. ZO rats demonstrated progressive increases in plasma insulin concentrations and increases in TG

and NEFA levels. Although still within the normal or near-normal range, BG values were slightly increased in both age groups of ZO as compared to ZL.

Analysis of Akt kinase activity by *in vitro* kinase assay in the skeletal muscle did not reveal any differences between ZL and ZO rats in either age group (Fig. 1). This phenomenon was observed despite increasing plasma insulin levels in ZO rats. Akt activity and expression in renal cortex is shown in Figure 2. In 4-week old ZO, Akt activity (Fig. 2, Panel A) was still similar to that in ZL. In contrast to younger animals, and unlike the findings in the skeletal muscle, 12-week old ZO rats demonstrated marked increases in renal cortical Akt activity as compared to ZL (Fig. 2, Panel A). This finding corresponded to increased expression of P-Akt in 12-week old ZO rats (Fig. 2, Panel B). The abundance of total Akt protein was also increased in 12-week old ZO rats compared with age-matched ZL (Fig. 2, Panel B). Immunohistochemical studies localized phosphorylated Akt in glomeruli, in particular in podocytes, and in mesangial cells (Fig. 3). P-Akt immunoreactivity was also apparent in the distal tubules (Fig. 3). The distribution of P-Akt in the cortex was similar in ZL and ZO rats. There were no differences in PTEN expression between ZL and ZO rats at either 4 or 12 weeks (Fig. 4).

Expression of mTOR and eNOS proteins were determined in 12-week old animals, which had demonstrated differences in Akt activity. Both P-mTOR and total mTOR protein abundances were enhanced in ZO rats as compared to ZL (Fig. 5). In contrast to mTOR, eNOS phosphorylation was similar in ZO and ZL rats, despite higher total eNOS protein expression (Fig. 6).

To further explore whether renal Akt – mTOR activation is PI3K-dependent, 12-week old ZO and ZL rats were treated acutely with wortmannin, an inhibitor of PI-3K.

The results were compared to animals treated with DMSO as vehicle. Physical parameters and BG levels in these groups of ZL and ZO rats were similar to those studied in the first series of experiments (data not shown). To exclude the possibility that DMSO *per se* could influence Akt activity, renal cortical activity was compared between DMSO-treated ZL and ZO rats. As shown in Figure 7, Panel A, DMSO-treated animals demonstrated similar differences in renal cortical Akt activity as observed in ZO and ZL rats without DMSO treatment. Wortmannin administration resulted in reductions in Akt kinase activity (Figure 7, Panel B), and mTOR phosphorylation in ZO (Figure 7, Panel C), but not in ZL rats.

DISCUSSION

In the present studies, ZO rats demonstrated progressive hyperinsulinemia and other metabolic abnormalities characteristic of IR states, including marked elevations in plasma TG and NEFA levels, and only a slight increase in BG concentrations. In this metabolic environment, renal cortical Akt kinase activity and expression of phosphorylated Akt were increased in 12-week old ZO rats as compared to lean controls. In contrast to renal cortex, no differences in Akt activity between ZO and ZL rats were observed in the skeletal muscle. ZO rats also displayed increased renal expression of total Akt protein expression. This observation suggests that exposure to chronic hyperinsulinemia leads not only to changes in posttranslational modifications of Akt, but also to changes in the transcriptional level of Akt regulation. The differences in renal Akt activity in 12-week old ZO rats were not attributable to PTEN, since the expression of this protein was similar in ZO and ZL rats.

Studies have suggested that Akt-mediated and growth factor-induced signaling are involved in cellular hypertrophy and enhanced extracellular matrix (ECM) production in renal cells, i.e. factors operating in the development of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis (12, 13, 34-37). These effects could be mediated via mTOR, a kinase involved in the control of protein translation (12, 38). Activation of mTOR has recently emerged as an important mechanism in renal and cardiovascular pathophysiology (26, 39, 40).

We observed enhanced mTOR phosphorylation in 12-week old ZO rats as compared to their lean counterparts. To further explore the link between hyperinsulinemia and the renal PIK3-Akt-mTOR pathway in DM2, ZO and ZL rats were administered the PI3K inhibitor wortmannin. This intervention was associated with reductions of Akt kinase activity in ZO rats. Furthermore, wortmannin induced a reduction in mTOR phosphorylation. These findings, together with the lack of effect of wortmannin in ZL rats, suggest that enhanced renal Akt activity in ZO is, at least in part, insulin-dependent, and that the pathway is involved in renal mTOR phosphorylation.

There is rapidly increasing evidence suggesting the roles of the Akt and Akt-mTOR pathways in the development of nephropathy in both types of diabetes. *In vitro*, Akt activation has been described in mesangial cells (36, 41), podocytes (27) and proximal tubular cells (35, 42) cultured in high glucose conditions. *In vivo*, enhanced renal Akt or Akt-mTOR activity has been reported in rodent models of Type 1 diabetes (DM1), both at early and late stages of nephropathy (26, 36, 37, 43). Treatment with rapamycin, an mTOR inhibitor, ameliorated early and advanced molecular and structural markers of diabetic nephropathy (26, 36, 43).

Although less abundant, evidence implicating Akt-mTOR signaling in the pathophysiology of Type 2 diabetic nephropathy has been also emerging. Feliers et al. (34) demonstrated increases in unstimulated Akt activity in the kidney of obese db/db mice, a murine model of DM2. These changes coincided with the onset of hypertrophy and matrix accumulation. More recent work by this group has linked these findings in db/db mice to activation of renal mTOR and mRNA translation machinery, and demonstrated beneficial effects of mTOR inhibition in the Type 2 diabetic kidney (44). Our present observations are in agreement with these reports in experimental DM2. However, since db/db mice display severe hyperglycemia, and, as shown in models of DM1, hyperglycemia *per se* stimulates Akt activity in renal cells (35), our study extends previous findings by providing the evidence for Akt-mTOR activation in a model of DM2 with predominant hyperinsulinemia, and only slight hyperglycemia.

Thus, it appears that renal Akt-mTOR could be activated both by high glucose and/or high insulin, suggesting roles for this pathway both in Type 1 and Type 2 diabetic nephropathy. Indeed, studies have indicated similar potential of high glucose and insulin to activate Akt and mTOR in renal tubular cells (35, 44). In this context, Akt-mTOR activation may explain similarities in renal pathology in patients with DM1 and at least some DM2 patients, despite the differences in the metabolic milieu.

In addition, other factors, typically associated with diabetic renal pathology, could be involved. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) is one of the best studied prosclerotic cytokines, responsible for cellular hypertrophy and enhanced ECM production in the diabetic kidney (45). ZO rats display increases in renal TGF-beta mRNA expression by 12 weeks of age (46). As recently reported, TGF-beta stimulates

Akt in mesangial cells (37), suggesting another pathway for renal Akt-mTOR activation in diabetes.

Interestingly, previous studies focusing on the extarenal vascular system in experimental DM2 (8, 47) have reported defects in Akt activation similar to insulin-sensitive tissues, such skeletal muscle, adipose tissue, or liver. In this context, our present data, in accord with previous studies in db/db mice (34, 44), suggest that the kidney may be an organ with a uniquely preserved ability of Akt to respond to increased plasma insulin concentrations associated with IR.

P-Akt immunoreactivity was detectable in glomeruli, in particular in podocytes, and to a lesser degree in mesangial cells, and in distal tubules. To our knowledge, immunohistochemical localization of P-Akt in the kidney in experimental DM2 has not been reported. However, P-Akt distribution in ZL and ZO rats corresponds to previous findings in STZ-diabetic rats. Thirone and co-workers (48) detected P-Akt in most cells of the kidney, with apparent highest staining in collecting tubules and some cells of the glomerular mesangium. In a more recent study, Nagai et al. (36) demonstrated nearly identical glomerular localization of P-Akt as in our present study. The glomerular localization of P-Akt is also in line with *in vitro* evidence in glomerular epithelial (27) and mesangial cells (36, 41). As discussed above, insulin- or high glucose-induced activation of Akt has also been studied in cultured proximal tubular cells (35, 42). We did not observe P-Akt immunoreactivity in this cell type in either ZL and ZO rats. This finding does not preclude a pathophysiological role for Akt in the proximal tubule, but in the present model P-Akt was below the detection limit of our method.

It is intriguing to speculate regarding the physiological or pathophysiological role of Akt in the distal tubule. A recent study indicating that Akt acts as an important regulator of epithelial sodium channel (ENaC) activity (49) provides a possible clue. Inhibition of the endogenous expression of Akt in thyroid cells expressing the channel inhibited its activity and disrupted the stimulatory effect on ENaC of insulin. Conversely, overexpression of Akt increased expression of ENaC at the cell membrane and overcame the inhibitory effect of ENaC ubiquitination. ENaC is typically expressed in the distal nephron, and has been shown to be involved in the regulation of blood pressure (50). Consequently, induction of Akt in the hyperinsulinemic environment could contribute to increased sodium reabsorption and development of hypertension in IR and DM2.

While activation of the PI3K-Akt-mTOR pathway has been associated with deleterious consequences in the kidney (18, 26, 35, 44), Akt also mediates protective signals, such as the eNOS Ser1177 phosphorylation in response to a variety of physiological stimuli (22, 23). This post-translational modification is a critical step for NO production by the enzyme (22, 23). To our knowledge, renal eNOS phosphorylation has not been studied in models of IR and obesity. In ZO, P-eNOS expression was similar to that in ZL despite higher plasma insulin levels and total eNOS. This phenomenon suggests a defect in insulin-induced renal activation of the enzyme in this model, in accord with previously documented endothelial dysfunction in ZO rats (25).

In summary, we report increases in renal Akt activity and mTOR phosphorylation in ZO rats, corresponding to elevated plasma insulin concentrations. In contrast, eNOS phosphorylation was similar in ZO rats as in lean controls. These data suggest that renal pro-growth insulin signaling mediated via the Akt-mTOR pathway is preserved in

experimental DM2, while the potentially protective branch of insulin signaling, mediated by eNOS, is blunted. This combination of signaling responses to hyperinsulinemia may contribute to the later development of renal glomerular and interstitial lesions observed in clinical and experimental DM2 and obesity.

Acknowledgements

These studies were supported by the institutional Grant # MZO 00023001 of the Czech Ministry of Health Care (RK), and by DK 63231 from the NIH (SA). We are grateful to J. Vesela, H. Seidlova, and I. Musilova for their excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). J Clin Invest 100:1166-1173, 1997.

2. Kido Y, Nakae J, Accili D. The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. J Clin Endocrin Metab 86:972-979, 2001.

3. Burgering BM, Coffer PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. Nature 376:599-602, 1995.

4. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc Natl Acad Sci (USA) 96:4240-4245, 1999.

5. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. Circ Res 90:1243-1250, 2002.

6. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. Diabetes 47:1281-1286., 1998.

7. Rondinone CM, Carvalho E, Wesslau C, Smith UP. Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with Type II diabetes mellitus. Diabetologia 42:819-825, 1999.

8. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. J Clin Invest 104:447-457, 1999.

9. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. N Engl J Med 341:1127-1133, 1999.

10. Adelman RD. Obesity and renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens 11:331-335, 2002.

11. Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, Brabant G, Floege J. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. Kidney Int 57:167-182, 2000.

12. Bhandari BK, Feliers D, Duraisamy S, Stewart JL, Gingras AC, Abboud HE, Choudhury GG, Sonenberg N, Kasinath BS. Insulin regulation of protein translation repressor 4E-BP1, an eIF4E-binding protein, in renal epithelial cells. Kidney Int 59:866-875, 2001.

13. Senthil D, Choudhury GG, Abboud HE, Sonenberg N, Kasinath BS. Regulation of protein synthesis by IGF-I in proximal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 283:F1226-F1236, 2002.

14. Hiromura K, Monkawa T, Petermann AT, Durvasula RV, Shankland SJ. Insulin is a potent survival factor in mesangial cells: role of the PI3- kinase/Akt pathway. Kidney Int 61:1312-1321, 2002.

15. Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. Kidney Int 67:1308-1314, 2005.

16. Hayashi K, Fujiwara K, Oka K, Nagahama T, Matsuda H, Saruta T. Effects of insulin on rat renal microvessels: studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. Kidney Int 51:1507-1513, 1997.

17. Schmetterer L, Muller M, Fasching P, Diepolder C, Gallenkamp A, Zanaschka G, Findl O, Strenn K, Mensik C, Tschernko E, Eichler H-G, Wolzt M. Renal and ocular hemodynamic effects of insulin. Diabetes 46:1868-1874, 1997.

18. Kasinath BS, Mariappan MM, Sataranatarajan K, Lee MJ, Feliers D. mRNA translation: unexplored territory in renal science. J Am Soc Nephrol 17:3281-3292, 2006.

19. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. Am J Physiol 272:F561-F578, 1997.

20. Komers R, Anderson S. The paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. Am J Physiol 284:F1121-F1137, 2003.

21. Goligorsky MS, Chen J, Brodsky S. Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy: focus on nitric oxide. Hypertension 37:744-748, 2001.

22. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature 399:597-601, 1999.

23. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt- dependent phosphorylation. Nature 399:601-605, 1999.

24. Baron AD. The coupling of glucose metabolism and perfusion in human skeletal muscle. The potential role of endothelium-derived nitric oxide. Diabetes 45 (Suppl. 1):S105-S109, 1996.

25. Gealekman O, Brodsky SV, Zhang F, Chander PN, Friedli C, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelial dysfunction as a modifier of angiogenic response in Zucker diabetic fat rat: amelioration with Ebselen. Kidney Int 66:2337-2347, 2004.

26. Lloberas N, Cruzado JM, Franquesa M, Herrero-Fresneda I, Torras J, Alperovich G, Rama I, Vidal A, Grinyo JM. Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. J Am Soc Nephrol 17:1395-1404, 2006.

27. Lee MJ, Feliers D, Mariappan MM, Sataranatarajan K, Mahimainathan L, Musi N, Foretz M, Viollet B, Weinberg JM, Choudhury GG, Kasinath BS. A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. Am J Physiol Renal Physiol 292:F617-627, 2007.

28. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. Hypertension 19:I110-115, 1992.

29. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, Hess JF. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. Nat Genet 13:18-19, 1996.

30. Ionescu E, Sauter JF, Jeanrenaud B. Abnormal oral glucose tolerance in genetically obese (fa/fa) rats. Am J Physiol 248:E500-E506, 1985.

31. Kasiske BL, Cleary MP, O'Donnell MP, Keane WF. Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat. J Lab Clin Med 106:598-604, 1985.

32. Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. Circulation 105:1497-1502, 2002.

33. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Schutzer WE, Reed JF, Mader SL, Anderson S. Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. J Clin Invest 107:889-898, 2001.

34. Feliers D, Duraisamy S, Faulkner JL, Duch J, Lee AV, Abboud HE, Choudhury GG, Kasinath BS. Activation of renal signaling pathways in db/db mice with type 2 diabetes. Kidney Int 60:495-504., 2001.

35. Mariappan MM, Feliers D, Mummidi S, Choudhury GG, Kasinath BS. High glucose, high insulin, and their combination rapidly induce laminin-beta1 synthesis by regulation of mRNA translation in renal epithelial cells. Diabetes 56:476-485, 2007.

36. Nagai K, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Kanamori H, Iehara N, Fukatsu A, Yanagita M, Nakano T, Ishimoto Y, Kita T, Doi T, Arai H. Gas6 induces Akt/mTOR-mediated mesangial hypertrophy in diabetic nephropathy. Kidney Int 68:552-561, 2005.

37. Kato M, Yuan H, Xu ZG, Lanting L, Li SL, Wang M, Hu MC, Reddy MA, Natarajan R. Role of the Akt/FoxO3a pathway in TGF-beta1-mediated mesangial cell dysfunction: a novel mechanism related to diabetic kidney disease. J Am Soc Nephrol 17:3325-3335, 2006.

38. Scott PH, Brunn GJ, Kohn AD, Roth RA, Lawrence JC, Jr. Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 95:7772-7777, 1998.

39. Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S. Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. Mol Cell Biol 22:2799-2809, 2002.

40. Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, Izumo S. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. Circulation 107:1664-1670, 2003.

41. Wu D, Peng F, Zhang B, Ingram AJ, Gao B, Krepinsky JC. Collagen I induction by high glucose levels is mediated by epidermal growth factor receptor and phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling in mesangial cells. Diabetologia 50:2008-2018, 2007.

42. Chuang TD, Guh JY, Chiou SJ, Chen HC, Huang JS, Yang YL, Chuang LY. Phosphoinositide 3-kinase is required for high glucose-induced hypertrophy and p21WAF1 expression in LLC-PK1 cells. Kidney Int 71:867-874, 2007.

43. Yang Y, Wang J, Qin L, Shou Z, Zhao J, Wang H, Chen Y, Chen J. Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats. Am J Nephrol 27:495-502, 2007.

44. Sataranatarajan K, Mariappan MM, Lee MJ, Feliers D, Choudhury GG, Barnes JL, Kasinath BS. Regulation of elongation phase of mRNA translation in diabetic nephropathy: amelioration by rapamycin. Am J Pathol 171:1733-1742, 2007.

45. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 97:8015-8020., 2000.

46. Lavaud S, Poirier B, Mandet C, Belair MF, Irinopoulou T, Heudes D, Bazin R, Bariety J, Myara I, Chevalier J. Inflammation is probably not a prerequisite for renal interstitial fibrosis in normoglycemic obese rats. Am J Physiol 280:F683-694, 2001.

47. Kondo T, Kahn CR. Altered insulin signaling in retinal tissue in diabetic states. J Biol Chem 279:37997-38006, 2004.

48. Thirone AC, Scarlett JA, Gasparetti AL, Araujo EP, Lima MH, Carvalho CR, Velloso LA, Saad MJ. Modulation of growth hormone signal transduction in kidneys of streptozotocin-induced diabetic animals: effect of a growth hormone receptor antagonist. Diabetes 51:2270-2281, 2002.

49. Lee IH, Dinudom A, Sanchez-Perez A, Kumar S, Cook DI. Akt mediates the effect of insulin on epithelial sodium channels by inhibiting Nedd4-2. J Biol Chem 282:29866-29873, 2007.

50. Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. Nat Genet 11:76-82, 1995.

Figure legends.

Figure 1. Akt kinase activity in the skeletal muscle of Zucker lean (ZL) and Zucker obese (ZO) rats.

The homogenates of the soleus muscle from 4-week and 12-week old ZL and ZO rats were immunoprecipitated (IP) with an antibody raised against phospho-Ser473-Akt (P-Akt) and incubated with the Akt substrate glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in the presence of ATP. Protein expression of phosphorylated GSK-3 (P-GSK-3), as a measure of Akt activity, was then determined by western blotting (IB). The results of densitometric analysis (mean±SE) are presented as fold control (ZL). Representative blots are shown in insets.

Figure 2. Renal cortical activity of Akt kinase, and protein expression of phospho-Ser473-Akt and total Akt in 4-week and 12-week old Zucker lean (ZL) and Zucker obese (ZO) rats.

(A) Renal cortical homogenates from ZL and ZO rats were immunoprecipitated (IP) with an antibody raised against phospho-Ser473-Akt (P-Akt) and incubated with the Akt substrate glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in the presence of ATP. Protein expression of phosphorylated GSK-3 (P-GSK-3), as a measure of Akt activity, was then measured by western blot analysis (IB). (B) Western blot analysis was used to determine expression of P-Akt and total Akt, consisting of both phosphorylated (active) and non-phosphorylated kinase. Actin expression is provided as a verification of equal lane-to-lane loading. Representative blots are shown in insets. The results of densitometric

analysis (mean±SE) are presented as fold control (ZL). *p<0.05, †p<0.01 vs. ZL of the same age.

Figure 3. Renal cortical immunohistochemical localization of phospho-Ser473-Akt (P-Akt) in 12-week old Zucker lean (Panels A, C) and Zucker obese (Panels B, D) rats.
Formalin-fixed, paraffin-embedded kidneys were sectioned at 4 μm and incubated with a primary antibody raised against P-Akt or with the same concentration of non-immune mouse IgG as a control (not shown). The primary antibody was localized using the peroxidase detection system and counterstaining with hematoxylin. (A and B) P-Akt immunoreactivity was found in glomeruli (arrows), and in distal tubules (arrowheads). Magnifications x100. (C and D) Detailed glomerular images showing immunostaining for P-Akt in podocytes (arrows) and mesangial cells (arrowheads). Magnification x400.

Figure 4. Renal cortical expression of PTEN in 4-week and 12-week Zucker lean (ZL) and Zucker obese (ZO) rats.
Western blot analysis (IB) was used to determine expression of PTEN, as described in Methods. Actin expression was determined as a verification of equal lane-to-lane loading. Representative blots are shown in insets. The results of densitometric analysis are presented as fold control (ZL).

Figure 5. Renal cortical protein expression of phospho-Ser2448-mTOR and total mTOR in 12-week old Zucker lean (ZL) and Zucker obese (ZO) rats.
Western blot analysis (IB) was used to determine expression of phospho-Ser2448-mTOR

(P-mTOR) and total mTOR, consisting of both phosphorylated (active) and non-phosphorylated kinase, as described in Methods. Actin expression was determined as a verification of equal lane-to-lane loading. Representative blots are shown in insets. The results of densitometric analysis are presented as fold control (ZL). *p<0.05, †p<0.01 vs. ZL of the same age.

Figure 6. Renal cortical protein expression of phospho-Ser1177-eNOS and total eNOS in 12-week old Zucker lean (ZL) and Zucker obese (ZO) rats.
eNOS phosphorylation and total eNOS protein expression were measured by western blotting (IB), using primary antibodies against active eNOS, phosphorylated on Ser1177 (P-eNOS), .and total enzyme consisting of both phosphorylated and non-phosphorylated protein. Actin expression was determined as a verification of equal lane-to-lane loading. Representative blots are shown in insets. The results of densitometric analysis are presented as fold control (ZL). *p<0.05 vs. ZL.

Figure 7. Effect of wortmannin on renal cortical Akt activity and mTOR expression in Zucker lean (ZL) and Zucker obese (ZO) rats.
Twelve-week old ZL and ZO rats were acutely treated with wortmannin (WORT; 100 μg/kg, i.p.), an inhibitor of phosphatidylinositol 3 – kinase, or with DMSO as a vehicle (VEH). (A) Renal cortical Akt activity was compared between VEH-treated ZL and ZO rats, to exclude the possibility that DMSO could per se influence Akt activity. (B) Effects of WORT on Akt kinase activity in ZL (left panel) and ZO rats (right panel) as compared to control VEH-treated counterparts. Akt kinase activity was determined by in vitro

kinase assay. Tissue homogenates were immunoprecipitated (IP) with an antibody recognizing phospho-Ser473-Akt (P-Akt) and incubated with the Akt substrate glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in the presence of ATP. Expression of phosphorylated GSK-3 (P-GSK-3), as a measure of Akt activity, was then determined by western blot analysis (IB). (C) mTOR phosphorylation and expression in VEH- and WORT-treated ZL (left panels) and ZO rats (right panels). Phospho-Ser2448-mTOR (P-mTOR) and total mTOR, consisting of both phosphorylated (active) and non-phosphorylated kinase, were determined by IB. Actin expression was also measured as a verification of equal lane-to-lane loading. Representative blots are shown in insets. The results of densitometric analysis (mean±SE) are presented as fold control (VEH). †$p<0.01$ vs. VEH-treated animals of the same age.

Figure 1

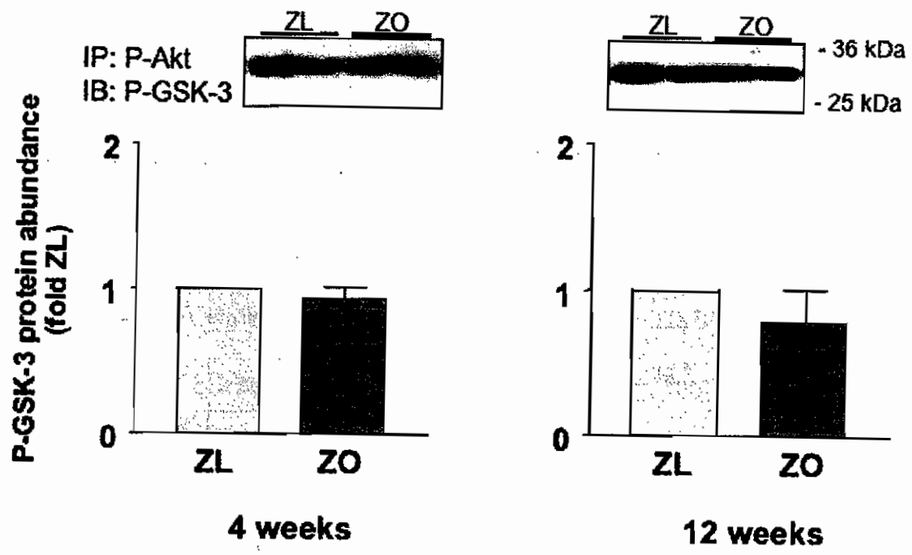


Figure 2

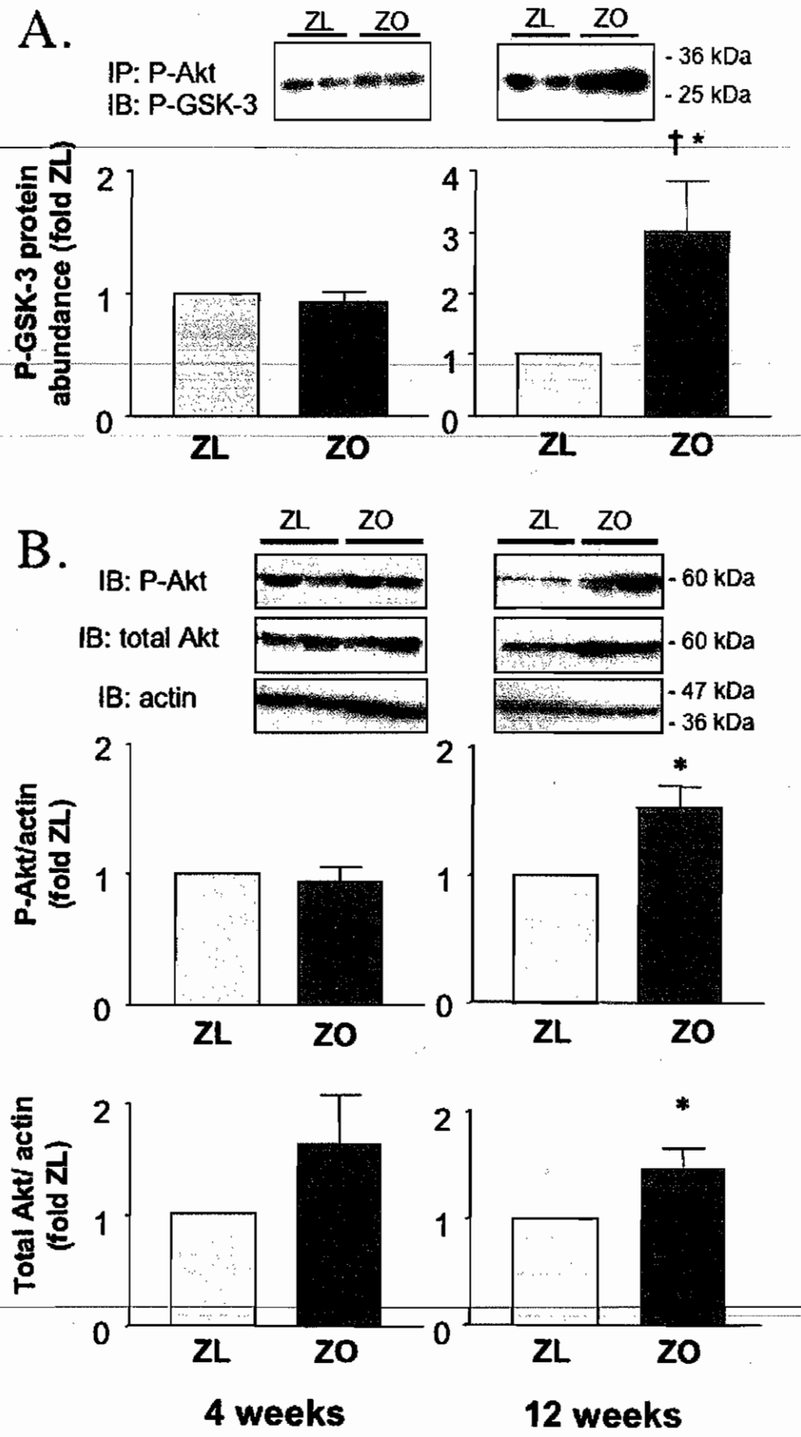


Figure 3

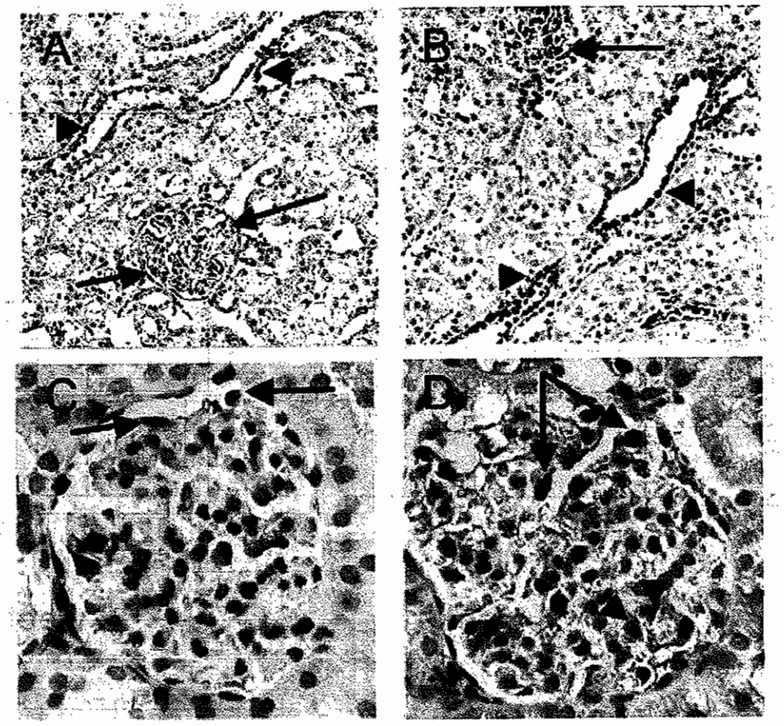


Figure 4

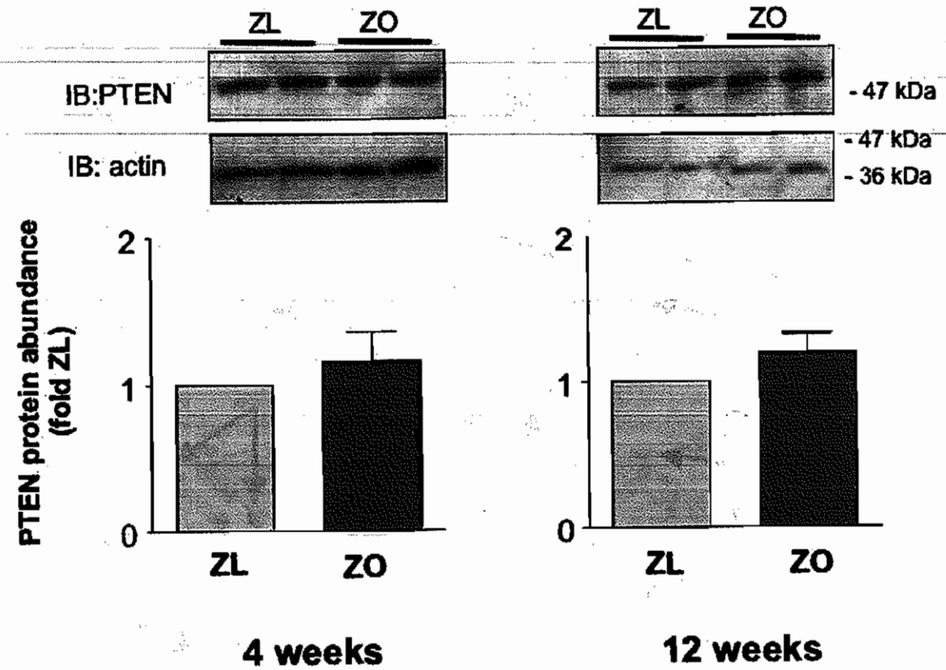


Figure 5

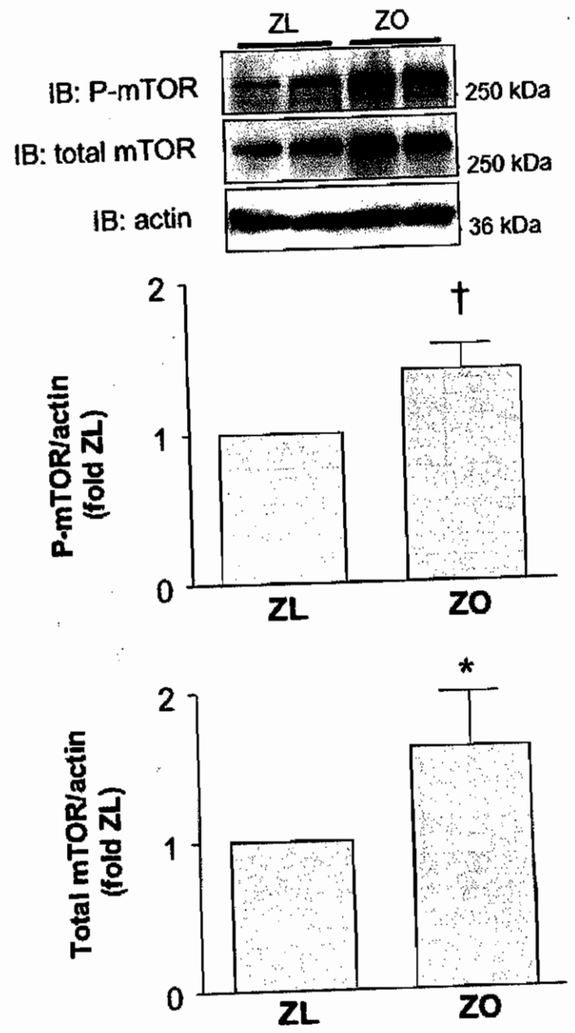


Figure 6

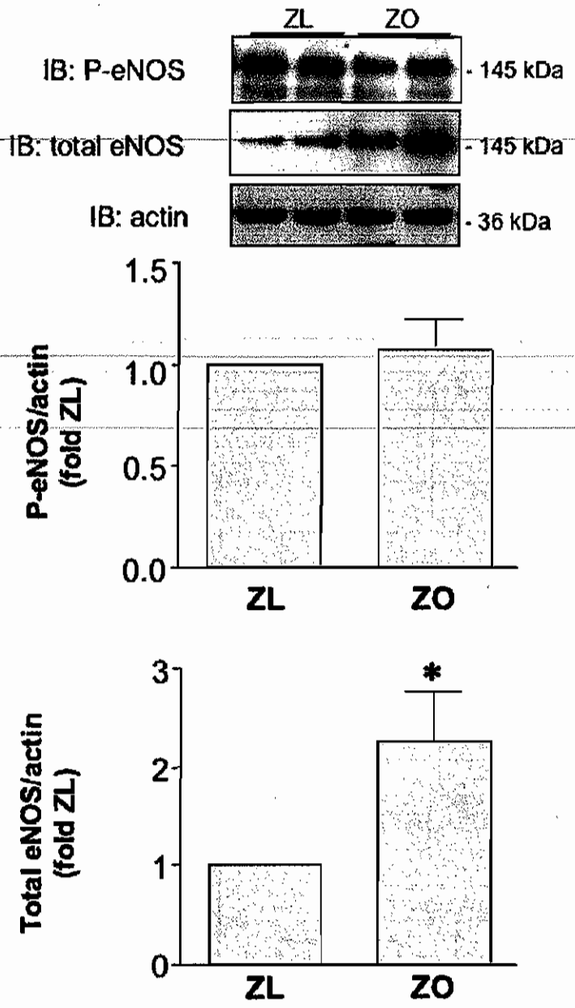


Figure 7

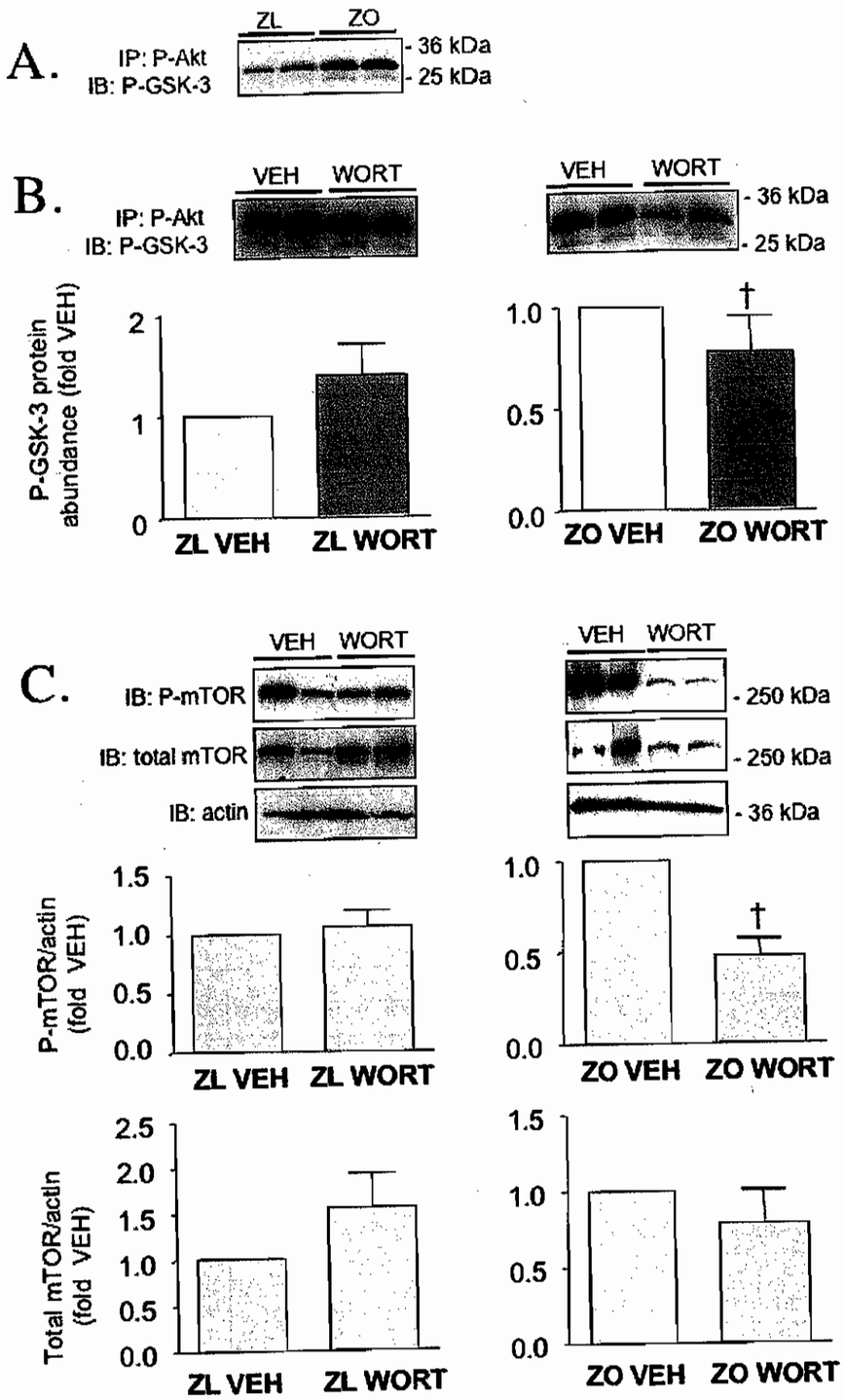


Table 1. Physical and metabolic characteristics in ZL and ZO rats.

	n	BWT [g]	RKW [mg]	RKW/ BWT [g/1000g BWT]	Plasma Insulin [nmol/l]	BG [mmol/l]	TG [mmol/l]	NEFA [mmol/l]
ZL-4 weeks	5	103±2	433±13	4.2±0.1	0.40±0.04	4.0±0.1	0.6±0.1	ND
ZO-4 weeks	6	131±6†	514±9‡	4.0±0.2	0.74±0.07†	5.5±0.6*	1.4±0.1‡	ND
ZL-12 weeks	5	358±9	1127±46	3.1±0.1	0.48±0.09	5.3±0.1	0.9±0.1	0.43±0.02
ZO-12 weeks	6	538±25‡	1295±44‡	2.4±0.1‡	1.81±0.19‡	6.7±0.3‡	4.2±0.4‡	0.54±0.02‡

BWT, body weight; RKW, right kidney weight; RKW/BWT, right kidney to body weight ratio; BG, blood glucose; TG, serum triglycerides; NEFA, non-esterified fatty acids. *$p<0.05$; † $p<0.01$; ‡ $p<0.001$ vs. ZL of the same age.

Physiological Research Pre-Press Article

Renal activity of Akt kinase in experimental Type 1 diabetes

Jana Ždychová, Jaroslava Veselá, Ludmila Kazdová, and Radko Komers

Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

Address for correspondence:

Radko Komers, MD, PhD

Diabetes Center,

Institute for Clinical and Experimental Medicine,

Videnska 1958

Prague, Czech Republic

Tel.: 4202-26136 4100

Fax: 4202-26136-3183

e-mail: radko.komers@medicon.cz

Running title: Renal Akt-mTOR in diabetes

ABSTRACT

Akt kinase regulates numerous cell functions including glucose metabolism, cell growth, survival, protein synthesis, and control of local hemodynamics. mTOR is one of down-stream effectors of Akt involved in initiation of protein translation. However, renal Akt signaling in Type 1 diabetes (DM) *in vivo*, in particular in conditions reflecting differences in metabolic control has received less attention. Renal cortical activity and expression of Akt and mTOR (kinase assay, western blotting) were determined in streptozotocin-diabetic rats (D) with different levels of glycemic control, achieved by varying insulin treatment, and in control rats with (C4) or without (C) chronic insulin administration. Renal Akt activity was reduced in D rats without insulin treatment and severe hyperglycemia (D-0), partially restored in moderately hyperglycemic rats (D-4), and normalized in D rats with intensive insulin and tight metabolic control (D-12). Expression of active mTOR paralleled Akt activity in D-0, but not in D-4 and D-12 that demonstrated increases in active mTOR as compared to C. Moreover, insulin activated renal Akt, but not mTOR in C4. In conclusion, glycemic control and intensity of insulin treatment are important modulators of renal Akt and mTOR activity in diabetes. While Akt activity is reversible by tight metabolic control, combination of hyperglycemia and insulin treatment resulted in enhancement of mTOR activity. In addition to Akt, other signaling pathways likely contribute to regulation of renal mTOR activity in diabetes.

Keywords: Akt kinase, diabetic nephropathy, insulin, mammalian target of rapamycin. mTOR.

INTRODUCTION

Akt/protein kinase B (Akt) has been implicated in regulation of a number of cell functions including glucose uptake, glycogen synthesis, cell growth, survival, apoptosis, protein synthesis, and endothelial nitric oxide production (Shiojima *et al.* 2002). Akt can be activated by a wide variety of growth stimuli, such as growth factors and cytokines, and represents an important intermediate in insulin signaling (Downward 1998). Akt activation typically occurs via tyrosine kinase receptors such as receptors for insulin or growth factors in an phospatidylinositol 3 - kinase (PI3K)-dependent manner (Downward 1998). Mammalian target of rapamycin (mTOR) is one of the down-stream targets of Akt involved in regulation of protein synthesis. Upon insulin and growth factor stimulation, mTOR is phosphorylated (activated) by Akt (Scott *et al.* 1998) and facilitates protein translation through inhibitory phosphorylation eIF-4E binding protein (4E-BP1) (Bhandari *et al.* 2001), a translation repressor. These events result in activation of the translation of specific mRNA subpopulations.

Renal hypertrophy, extracellular matrix accumulation, altered apoptosis as well as well as changes in regional hemodynamics have been implicated in the pathophysiology of nephropathy in Type 1 diabetes (DM1) (Cooper 1998). Considering multiple functions of Akt and mTOR, it is possible that alterations in activities of these molecules may play a role in pathophysiology of diabetic nephropathy. Enhanced protein synthesis may contribute to the development of renal hypertrophy via enhanced extracellular matrix accumulation, one of the key elements in the pathophysiology of diabetic nephropathy.

In DM1, the kidney is exposed to fluctuating levels of blood glucose and exogenous insulin, administered as the major treatment of the disease. Although it has

been well established that both glucose and insulin, can modulate Akt activity in various cell types and tissues (Dobrzynski *et al.* 2002; el-Remessy *et al.* 2005; Kondo *et al.* 2004; Laviola *et al.* 2001; Lee *et al.* 2007; Mariappan *et al.* 2007; Sheu *et al.* 2004), renal Akt signaling in DM1 *in vivo,* in particular in clinically relevant conditions reflecting differences in metabolic control and insulin treatment, has received less attention. To address this issue, we determined Akt and mTOR activity and expression in renal cortex of STZ-diabetic rats at early stages of nephropathy with different levels of glycemic control, achieved by varying insulin treatment. In addition, we also studied effects of chronic insulin administration on Akt and mTOR in non-diabetic rats.

METHODS

Diabetic rat model.

Studies were conducted in adult male Wistar rats (Anlab, Prague, Czech Republic) with initial weights ~ 270 g. The rats were made diabetic by intraperitoneal injection of streptozotocin (Sigma, St. Louis, MO), 65 mg/kg body weight. Three days later, induction of diabetes was confirmed by measurements of tail blood glucose (BG) level using a reflectance meter (One Touch II; Lifescan, Milpetas, CA). All experiments were carried out with the approval of, and in accordance with the regulations of, the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine. The animals were housed with a light-dark cycle of 12 hours each, and with free access to food (standard chow) and water.

Study design.

Diabetic rats were then randomized to receive no insulin treatment (severely diabetic rats, DM-0, n=6), 4IU of insulin/day (Insulatard, Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark) to achieve moderate hyperglycemia (DM-4, n=6), or 12IU of insulin/day (diabetic rats on intensive insulin treatment, DM-12, n=6), to achieve tight metabolic control. Age-matched non-diabetic rats served as controls (C, n=8). In addition, non-diabetic rats treated with 4 IU of insulin/day (C4, n=5) were also studied. After 4 weeks of diabetes, the rats were sacrificed, and the blood was collected for determinations of blood glucose (BG) and plasma insulin levels. The kidneys were quickly removed on ice, divided into cortical and medullary portions, homogenized in lysis buffer as previously described (Komers *et al.* 2007). Aliquotes were frozen in liquid nitrogen and stored in -70°C. Total protein concentration in each sample was determined by BCA analysis (Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL).

Akt kinase assay.

The homogenates (300μg) were analyzed using Akt kinase activity assay kit (Cell Signaling, MA) according to the manufacturer's instructions. In brief, renal cortical homogenates described above (300 μg) were immunoprecipitated with immobilized anti-phospho-Akt antibody and incubated with the Akt substrate GSK-3 in the presence of ATP. Protein expression of phosphorylated GSK-3, as a measure of Akt activity, was then determined by western blotting using the anti-phospho-GSK-3 antibody.

Immunoblot analysis.

Equal amounts of protein of each sample were analyzed by western blotting and visualized as previously described (Komers *et al.* 2007) using primary antibodies raised

against phospho-Serine-473–Akt (P-Ser473-Akt, 1:500; Cell Signaling, Beverly, MA) or phospho-Serine-2448-mTOR (P-Ser2448-mTOR, 1:500, Cell Signaling). Following the detections of phospho-proteins, total Akt and total mTOR proteins were detected on stripped membranes. To determine equality of loading, membranes were restripped and reprobed for actin (Santa Cruz, Santa Cruz, CA).

Analytical methods.

Serum insulin concentrations were measured using a rat insulin RIA kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Statistical analysis.

Data are expressed as mean ± SEM. All analyses were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Scheffé test. A p value of less than 0.05 was viewed as statistically significant.

RESULTS

Physical and metabolic parameters in control and diabetic rats reflected approximately differences in metabolic control (Table 1). DM-0 and demonstrated reduced weight gain, as compared to control animals and diabetic rats with insulin treatment. Body weights in DM-4 rats were greater than in DM-0 rats, but lower than in DM-12. All groups of diabetic rats demonstrated renal hypertrophy assessed both by kidney weight and kidney to body weight ratios. Renal hypertrophy was most prominent in DM-0 that demonstrated higher kidney/body weight ratios as compared to diabetic rats with insulin treatments. All groups of diabetic rats had higher BG as compared to control

animals, and there were also significant differences in BG between the groups of diabetic rats, consistent with intensity of insulin treatment. DM-0 rats had markedly lower plasma insulin levels than other groups of rats. In DM-4, plasma insulin was not different from controls, whereas the DM-12 rats demonstrated significant hyperinsulinemia. Control rats receiving 4IU of insulin displayed no statistically significant differences in physical and metabolic parameters when compared to control animals. Plasma insulin levels in C4 were higher than in untreated control animals, although this difference did not reach statistical significance.

There were marked decreases in P-Ser473-Akt expression in DM-0 rats, lacking insulin treatment (Fig.1, Panel A). Treatment with suboptimal insulin in DM-4 resulted in partial restoration of Akt phosphorylation, whereas DM-12 rats demonstrated similar expression of P-Ser473-Akt as controls (Fig. 1, Panel A). Both treatments with suboptimal (DM-4) and intensive insulin (DM-12) regimen were associated with increases in Akt phosphorylation compared to DM-0. However, there was no statistical difference in P-Ser473-Akt expression between the DM-4 and DM-12 rats despite substantial differences in insulin dose. Expression of total Akt protein, consisting of both active and inactive kinase, did not differ between groups (Fig. 1, Panel A). Similar to analysis of P-Ser473-Akt expression, *in vitro* kinase assay revealed significant reduction in Akt kinase activity in DM-0 as compared to both control (Fig. 1, Panel B) and D-12 rats, partial restoration of Akt activity in DM-4 and similar Akt activity in DM-12 as in controls.

In DM-0, mTOR phosphorylation was reduced as compared to control animals (Fig. 2). In contrast to DM-0, P-Ser2448-mTOR expression in DM-4 and DM-12 rats was

higher than in control animals ($p<0.05$). Total mTOR expression was not, in diabetic rats, different from controls (Fig. 2).

Administration of insulin to normal rats was associated with increased expression of P-Ser473-Akt (Fig. 3 Panel A). Expression of total Akt protein did not change. In contrast to Akt, expressions of P-Ser2448-mTOR, as well as total mTOR protein, were similar in control and C4 rats (Fig.3, Panel B).

DISCUSSION

In the present studies renal Akt and mTOR activity and expression were measured in diabetic rats with different levels of metabolic control achieved by complete lack or different doses of exogenous insulin. Diabetic rats with severe hyperglycemia, no insulin treatment, and markedly reduced plasma insulin levels, demonstrated marked reductions in renal cortical Akt kinase activity. Akt activity was partially restored in moderately hyperglycemic diabetic rats treated with suboptimal dose of insulin, and completely normalized in diabetic rats with intensive insulin treatment and the best glycemic control. In addition, non-diabetic rats treated with insulin that achieved similar plasma insulin levels as moderately hyperglycemic diabetic rats, displayed marked increases in Akt phosphorylation as compared to control animals without insulin treatment.

The two major components of diabetic metabolic milieu that have been modulated in this study, i.e. glucose and insulin, have been previously shown to strongly influence Akt activities in various cell types and tissues (Dobrzynski *et al.* 2002; el-Remessy *et al.* 2005; Kondo *et al.* 2004; Laviola *et al.* 2001; Lee *et al.* 2007; Mariappan *et al.* 2007; Sheu *et al.* 2004). In accord, present observations indicate that metabolic control is an important factor in the control of renal cortical Akt activity in diabetes. Akt activity in

diabetic rats reflected variations in BG levels and intensity of insulin treatment. Corresponding to our observations in DM-0 rats, diabetes/hyperglycemia-induced reductions in Akt activity have been reported in murine retinal endothelial cells (Kondo *et al.* 2004), and in rat myocardium (Dobrzynski *et al.* 2002; Laviola *et al.* 2001). Considering established pathways of Akt activation, one of plausible explanations for reduced Akt activity in DM-0 is absolute lack of insulin. Indeed, Akt activity determined both as expression of P-Ser473-Akt and by kinase assay paralleled plasma insulin levels in diabetic rats.

Furthermore, hyperglycemia could also contribute. High glucose has been shown to be associated with reduced ability of Akt to be activated by known agonists in the skeletal muscle and endothelial cells (el-Remessy *et al.* 2005; Kondo *et al.* 2004; Krook *et al.* 1997). Indeed, similar phenomenon was observed in the present study. The same dose of insulin that only partially restored Akt activity in DM-4 rats, resulted in a significant increase in Akt phosphorylation in non-diabetic, normoglycemic animals. The ability of insulin to markedly enhance Akt phosphorylation in normal rats, as opposed to mere restoration of P-Akt expression in diabetic rats with insulin treatment that demonstrated similar, or in case of DM-12, even higher plasma insulin levels, suggests some degree of resistance to insulin actions in the diabetic kidney.

Interestingly, studies focusing on alterations of renal Akt signaling in the diabetic kidney and in renal cells in vitro exposed to high glucose have so far provided conflicting evidence. Our observations are in accord with a report by Lin et al. (Lin *et al.* 2006) showing markedly lower phospho-Akt expression in mesangial cells exposed to high glucose in conjunction with enhanced apoptosis. In contrast, growth hormone-induced Akt activation in STZ-diabetic rats was enhanced as compared to control animals

(Thirone *et al.* 2002). Other studies have reported rapid glucose-induced Akt phosphorylation in murine and rat mesangial cells (Sheu *et al.* 2004), proximal tubular cells (Mariappan *et al.* 2007), glomerular epithelial cells, and enhanced renal Akt activity in STZ-diabetes in vivo (Lee *et al.* 2007).

We can only speculate about the explanation for disparate findings in the present studies and the above discussed evidence. Time factor may be important. For example, high glucose-induced Akt phosphorylation in proximal tubular cells (Mariappan *et al.* 2007) was detectable up to 15 minutes, but returned to baseline after 30 minutes of exposure to high glucose. In vivo, renal cortical Akt activation was detected in diabetic rats early (3-4 days) after induction of diabetes (Lee *et al.* 2007). In the present studies, the kidneys were analyzed 4 weeks after induction of diabetes. These differences in study designs indicate that present findings are not necessarily in disagreement with the above discussed renal evidence. High-glucose activation of Akt may be a phenomenon characteristic for acute phase of hyperglycemia/diabetes.

Out of large number of down-stream targets of Akt, mTOR was chosen for its role in initiation of protein translation (Kasinath *et al.* 2006; Scott *et al.* 1998) and possible involvement in enhanced renal production of ECM proteins (Senthil *et al.* 2003). In DM-0 rats, phosphorylation status of mTOR paralleled observed changes in indices characterizing Akt activity. However, diabetic rats with suboptimal and intensive insulin treatment demonstrated increases in mTOR phosphorylation as compared to control animals, and an opposite trend compared with DM-0. Moreover, in contrast to insulin-treated diabetic animals, there were no increases in mTOR phosphorylation in non-diabetic rats receiving insulin, at a dose sufficient to markedly activated Akt. These findings combined suggest that both hyperglycemia and insulin are required for renal

mTOR activation in diabetes. In vitro, both high glucose and insulin have been recently shown to have ability to activate mTOR in murine proximal tubular cells, although the additive effect of glucose and insulin has not been reported (Mariappan *et al.* 2007).

Kidney/body weight ratios were markedly elevated in all groups of diabetic rats, although renal hypertrophy was attenuated by insulin treatment. This phenomenon indicates that signaling pathways leading to renal hypertrophy in severely diabetic rats lacking insulin treatment and in diabetic rats with moderate or mild hyperglycemia and insulin treatment may differ. Furthermore, mTOR phosphorylation did not parallel observed pattern of Akt activity in diabetic rats suggesting that in addition to Akt, some other signaling pathways contribute to activation of this molecule in diabetes. Indeed, Akt-independent pathways leading to mTOR phosphorylation have been recently suggested. S6 kinase 1 (S6K1) has been identified as direct mTOR kinase (Holz *et al.* 2005) acting down-stream from protein kinase C. Moreover, high-glucose-induced suppression of AMP-activated protein kinase, a natural inhibitor of mTOR activation, appears to be also operative in glomerular epithelial cells (Lee *et al.* 2007).

At this stage, it is impossible to determine the significance of alterations in renal Akt signaling for the development of kidney disease in Type 1 diabetes. Theoretically, Akt may be involved in both protective signaling in the kidney (Shiojima *et al.* 2002), as well as mediate deleterious effects, such as renal hypertrophy. In contrast, mTOR activation seems to play, in accordance with its assumed role in enhanced production of ECM in the diabetic kidney, a role in the pathophysiology of diabetic nephropathy. Indeed, recent experimental study have demonstrated nephroprotective actions of long-term mTOR inhibition with rapamycin (Lloberas *et al.* 2006).

In summary, diabetic rats with severe hyperglycemia, lack of insulin treatment and low plasma insulin levels, demonstrated reduced renal cortical Akt activity. This phenomenon was reversible by tight metabolic control. Expression of active mTOR, one of down-stream effectors of Akt, was also reduced in severely diabetic animals. However, combination of hyperglycemia and insulin treatment resulted in increased mTOR phosphorylation. Chronic administration of insulin in normal rats lead to Akt, but not mTOR activation. These observations show that glycemic control and intensity of insulin treatment are important modulators of renal Akt and mTOR activity in diabetes and suggest that, in addition to Akt, other signaling pathways contribute to renal mTOR activity in diabetes.

Acknowledgements

These studies were supported by the institutional Grant # MZO 00023001 of the Czech Ministry of Health Care. We are grateful to J. Vesela, H. Seidlova, and I. Musilova for their excellent technical assistance.

REFERENCES

BHANDARI BK, FELIERS D, DURAISAMY S, STEWART JL, GINGRAS AC, ABBOUD HE, CHOUDHURY GG, SONENBERG N,KASINATH BS: Insulin regulation of protein translation repressor 4E-BP1, an eIF4E-binding protein, in renal epithelial cells. *Kidney Int* **59:** 866-875, 2001.

COOPER ME: Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* **352:** 213-219, 1998.

DOBRZYNSKI E, MONTANARI D, AGATA J, ZHU J, CHAO J,CHAO L: Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283:** E1291-8, 2002.

DOWNWARD J: Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* **10:** 262-267, 1998.

EL-REMESSY AB, BARTOLI M, PLATT DH, FULTON D,CALDWELL RB: Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration. *J Cell Sci* **118:** 243-52, 2005.

HOLZ MK,BLENIS J: Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem* **280:** 26089-93, 2005.

KASINATH BS, MARIAPPAN MM, SATARANATARAJAN K, LEE MJ,FELIERS D: mRNA translation: unexplored territory in renal science. *J Am Soc Nephrol* **17:** 3281-92, 2006.

KOMERS R, LINDSLEY JN, OYAMA TT, COHEN DM,ANDERSON S: Renal p38 MAP kinase activity in experimental diabetes. *Lab Invest*: Apr 2 (ahead of print), 2007.

KONDO T,KAHN CR: Altered insulin signaling in retinal tissue in diabetic states. *J Biol Chem* **279:** 37997-38006, 2004.

KROOK A, KAWANO Y, SONG XM, EFENDIC S, ROTH RA, WALLBERG-HENRIKSSON H,ZIERATH JR: Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto- Kakizaki rats. *Diabetes* **46:** 2110-2114, 1997.

LAVIOLA L, BELSANTI G, DAVALLI AM, NAPOLI R, PERRINI S, WEIR GC, GIORGINO R,GIORGINO F: Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by

islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. *Diabetes* **50:** 2709-2720, 2001.

LEE MJ, FELIERS D, MARIAPPAN MM, SATARANATARAJAN K, MAHIMAINATHAN L, MUSI N, FORETZ M, VIOLLET B, WEINBERG JM, CHOUDHURY GG,KASINATH BS: A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. *Am J Physiol Renal Physiol* **292:** F617-27, 2007.

LIN CL, WANG JY, HUANG YT, KUO YH, SURENDRAN K,WANG FS: Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **17:** 2812-20, 2006.

LLOBERAS N, CRUZADO JM, FRANQUESA M, HERRERO-FRESNEDA I, TORRAS J, ALPEROVICH G, RAMA I, VIDAL A,GRINYO JM: Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. *J Am Soc Nephrol* **17:** 1395-404, 2006.

MARIAPPAN MM, FELIERS D, MUMMIDI S, CHOUDHURY GG,KASINATH BS: High glucose, high insulin, and their combination rapidly induce laminin-beta1 synthesis by regulation of mRNA translation in renal epithelial cells. *Diabetes* **56:** 476-85, 2007.

SCOTT PH, BRUNN GJ, KOHN AD, ROTH RA,LAWRENCE JC, JR.: Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 7772-7777, 1998.

SENTHIL D, CHOUDHURY GG, MCLAURIN C,KASINATH BS: Vascular endothelial growth factor induces protein synthesis in renal epithelial cells: a potential role in diabetic nephropathy. *Kidney Int* **64:** 468-79, 2003.

SHEU ML, HO FM, CHAO KF, KUO ML,LIU SH: Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to high glucose leads to regulation of reactive oxygen species-related nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Mol Pharmacol* **66:** 187-96, 2004.

SHIOJIMA I,WALSH K: Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* **90:** 1243-1250, 2002.

THIRONE AC, SCARLETT JA, GASPARETTI AL, ARAUJO EP, LIMA MH, CARVALHO CR, VELLOSO LA,SAAD MJ: Modulation of growth hormone signal transduction in kidneys of streptozotocin-induced diabetic animals: effect of a growth hormone receptor antagonist. *Diabetes* **51:** 2270-2281, 2002.

Figure legends.

Figure 1. Renal cortical protein expression and activity of Akt kinase in control and diabetic rats.

A. P-Ser473-Akt (active) and total Akt in renal cortical homogenates harvested from control animals, diabetic rats without insulin treatment (DM-0), and diabetic rats treated with 4 IU (DM-4) and 12 IU (DM-12) of insulin as described in Methods. The data are presented as Akt/actin ratios. Representative blots are shown in the upper inset. B. Renal cortical Akt activity in control and diabetic rats determined by *in vitro* kinase assay using GSK-3 as a substrate. A representative blot of phospho-GSK-3 is shown in the upper panel. *p<0.05 vs. control; †p<0.01 vs. control; ‡p<0.05 vs. DM-0; ¶<0.01 vs. DM-0; π<0.05 vs. DM-4.

Figure 2. Renal cortical protein expression of mTOR in control and diabetic rats.

P-Ser2448-mTOR (active) and total mTOR in renal cortical homogenates harvested from control animals, diabetic rats without insulin treatment (DM-0), and diabetic rats treated with 4 IU (DM-4) and 12 IU (DM-12) of insulin as described in Methods. The data are presented as mTOR/actin ratios. Representative blots are shown in the upper inset. *p<0.05 vs. control; †p<0.01 vs. control; ¶<0.01 vs. DM-0;

Figure 3. Effects of insulin on Akt and mTOR in normal rats.

Expression of P-Ser473-Akt (active) and total Akt (Panel A), and P-Ser2448-mTOR (active) and total mTOR (Panel B) in renal cortical homogenates harvested from control animals, and non-diabetic animals treated with 4 IU of insulin was determined by western

blotting. The data are presented as Akt/actin and mTOR/actin ratios. Representative blots are shown in the upper inset. †p<0.001 vs. control

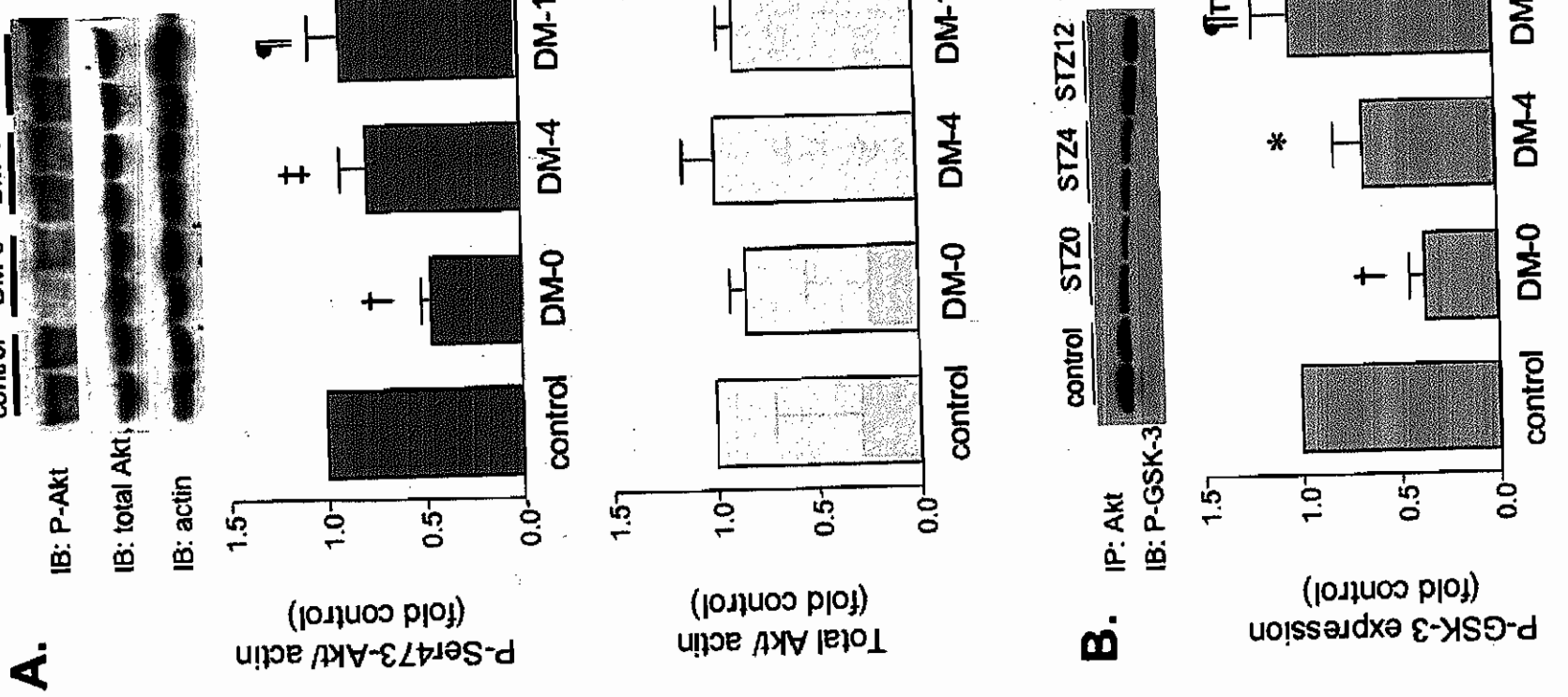


Table 1. Metabolic and hormonal characteristics in and control and diabetic rats.

	n	BWT [g]	RKW [mg]	RKW/ 100g BWT	plasma insulin [nmol/l]	BG [mmol/l]
Control	6	335±10	1082±22	0.33±0.01	1.03±0.14	5.4±0.1
DM-0	6	270±11[b]	1338±50[b]	0.50±0.01[b]	0.15±0.03[b]	22.0±1.0[b]
DM-4	6	309±6[ad]	1158±20[c]	0.38±0.01[bd]	1.42±0.12[d]	13.4±1.5[bd]
DM-12	6	343±5 [de]	1268±36[be]	0.37±0.01[bd]	1.82±0.21[ad]	8.1±0.4[bde]
C4	5	345±3	1056±32	0.33± 0.01	1.41±0.14	5.0±0.8

BWT, body weight; RKW, right kidney weight; BG, blood glucose.
[a]p<0.05, [b]p<0.01 vs. Control; [c]p<0.05, [d]p<0.01 vs. DM-0; [e]p<0.05 vs. DM-4.

Figure 2.

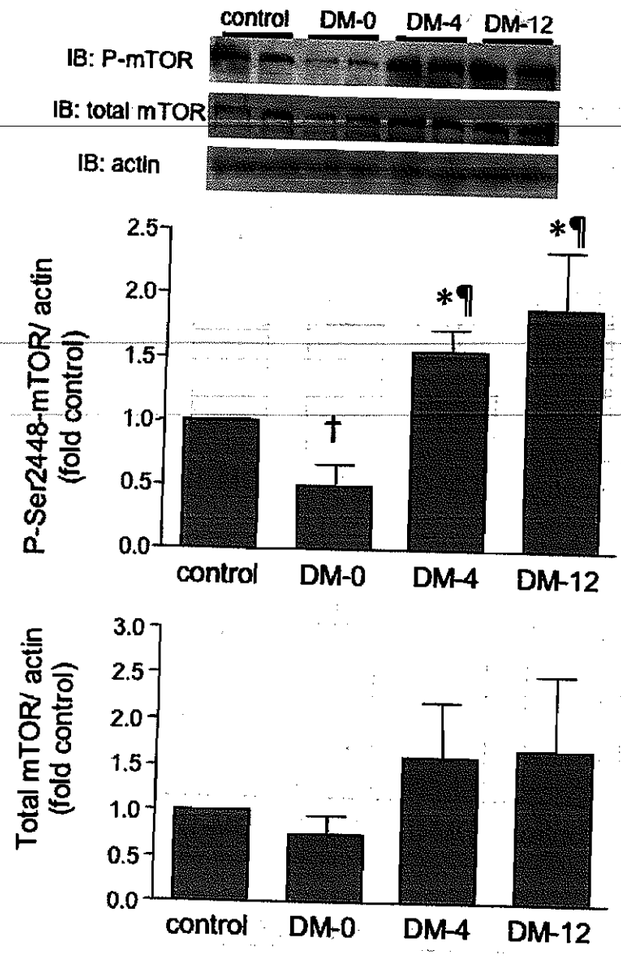
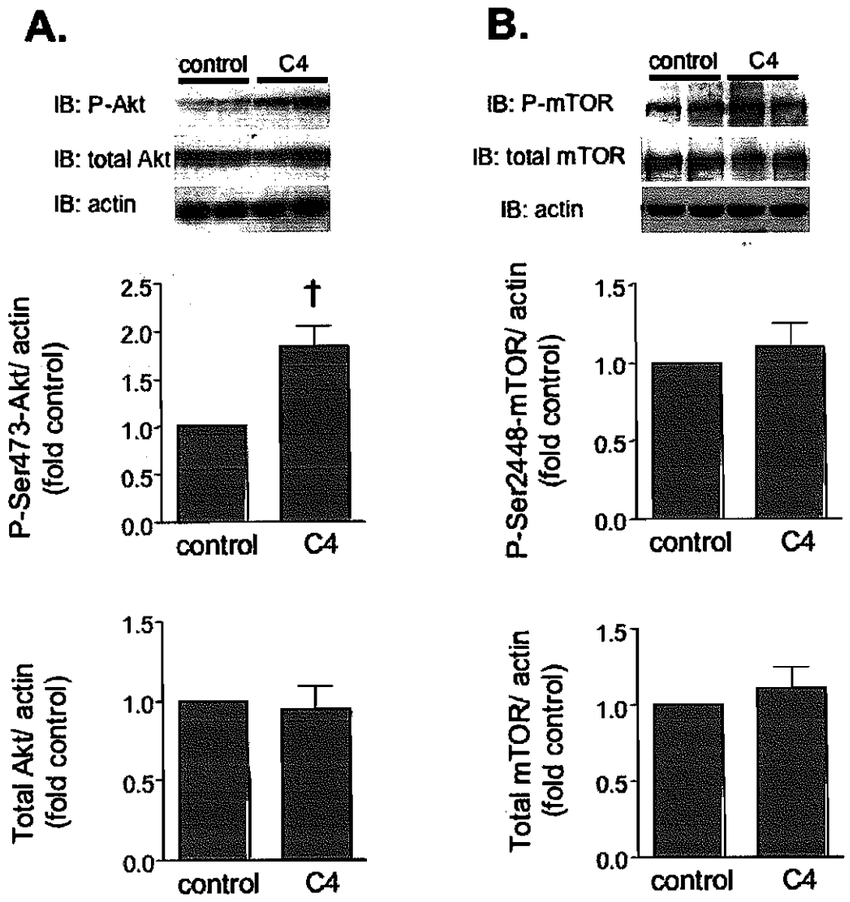


Figure 3.



Kidney International, Vol. 67 (2005), pp. 2151–2158

Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats

RADKO KOMERS, JANA ŽDYCHOVÁ, MONIKA CAHOVÁ, LUDMILA KAZDOVÁ, JESSIE N. LINDSLEY, and SHARON ANDERSON

Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic; Center for Experimental Medicine, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic; Division of Nephrology and Hypertension, Department of Medicine, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon; and Portland VA Medical Center Portland, Oregon

Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats.

Background. Cyclooxygenase (COX) isoforms, COX-1 and COX-2, are involved in production of prostanoids in the kidney. Increases in renal COX-2 expression have been implicated in the pathophysiology of progressive renal injury, including type 1 diabetes. Thromboxane A_2 (TxA_2) has been suggested as the key mediator of these effects resulting in up-regulation of prosclerotic cytokines and extracellular matrix proteins. Unlike type 1 diabetes, renal COX has not been studied in models of type 2 diabetes.

Methods. Renal cortical COX protein expression, and urinary excretion of stable metabolites of prostaglandin E_2 (PGE_2) and TxA_2, in association with metabolic parameters, were determined in 4-and 12-week-old Zucker fatty rats (fa/fa rat) (ZDF4 and ZDF12), a model of type 2 diabetes, and in age-matched littermates with no metabolic defect (Zucker lean) (ZL4 and ZL12).

Results. Western blotting revealed increased COX-2 expression in ZDF4 as compared to ZL4 ($245 \pm 130\%$) ($P < 0.05$). This increase in COX-2 was even more apparent in 12-week-old ZDF rats ($650 \pm 120\%$) ($P < 0.01$). All groups of rats demonstrated COX-2–positive cells in typical cortical localizations [macula densa, thick ascending loop of Henle (TALH)]. In contrast to COX-2, COX-1 expression was 30% lower in ZDF12. These changes in COX expression were associated with enhanced urinary excretion of prostanoids, in parallel with the development of metabolic abnormalities. Moreover, increases in prostanoid excretion in ZDF12 were in part reduced by wortmannin (100 μg/kg), used as inhibitor of insulin signaling.

Conclusion. Renal cortical COX-2 protein expression and function were increased in ZDF rats, as compared to controls, whereas COX-1 exhibited opposite regulation. The changes in COX-2 paralleled metabolic abnormalities, and were at least in part a four consequence of hyperinsulinemia. These abnormalities may play a role in renal pathophysiology in this model of type 2 diabetes.

The role of cyclooxygenase (COX) metabolites of arachidonic acid in the development of renal alterations, and in the pathogenesis of diabetic nephropathy in type 1 diabetes, has been suggested in a number of clinical studies [1–3], as well as in experimental models of diabetes [4–9].

Two isoforms of COX have been identified, COX-1 and COX-2. COX-1 is constitutively expressed in most tissues and performs housekeeping functions in the vascular system. In the normal adult kidney, COX-1 has been localized to arteries and arterioles, glomeruli, and collecting ducts [10, 11]. In contrast, COX-2 operates as an inducible enzyme with low or undetectable levels in most tissues, and its expression can be markedly increased by a number of inflammatory, mitogenic, and physical stimuli [12, 13]. Although considered to be an inducible enzyme, COX-2 is constitutively expressed in occasional renal cells of the thick ascending loop of Henle (TALH) and in the region of the macula densa of the rat kidney, and in podocytes in the human kidney [11, 14, 15].

Increased COX-2 expression and activity has been described in several models of progressive renal disease, including models of type 1 diabetes [8, 9]. Long-term studies have demonstrated beneficial effects of selective COX-2 inhibitors in these experimental conditions on the development of proteinuria and renal structural damage [8, 16, 17] [abstract; Komers R, *J Am Soc Nephrol* 13:166A, 2002]. These renoprotective effects could be attributable to inhibition of thromboxane A_2 (TxA_2) production and consequent beneficial effects on mRNA expression of transforming growth factor-β (TGF-β), and molecular markers of glomerular injury, such as type III type IV collagen [8, 17]. Consequently, COX-2–derived metabolites are likely to play a role in the development of diabetic nephropathy.

Nephropathy is also a major problem in type 2 diabetes [18]. Various animal models have been reported that could help to elucidate the pathophysiology of nephropathy in type 2 diabetes [19]. One such model is the Zucker diabetic fatty rat (fa/fa) (ZDF) [20]. These rats are metabolically well characterized: an autosomal-recessive mutation of the fa gene, encoding the leptin receptor, results in hyperphagia, obesity, and hyperlipidemia [21].

Key words: Zucker rat, diabetic nephropathy, cyclooxygenase-2, hyperinsulinemia, thromboxane A2.

Received for publication March 24, 2004
and in revised form November 11, 2004, and December 20, 2004
Accepted for publication January 20, 2005

© 2005 by the International Society of Nephrology

Similar to patients with type 2 diabetes, ZDF rats display insulin resistance, hyperinsulinemia, and impaired glucose tolerance, and slowly progressive increases in blood glucose levels [22].

ZDF rats develop progressive albuminuria and glomerulosclerosis later in the course of nephropathy [23]. However, unlike the streptozotocin (STZ) diabetic rats, renal COX-2 expression and function have not been studied in models of type 2 diabetes.

To address this issue, we determined renal protein expression, localization, and regulation of COX-2, together with expression of COX-1, in 4- and 12-week-old ZDF fa/fa rats and in age-matched control Zucker lean rats (ZL) that do not develop the diabetic phenotype.

METHODS

ZL and ZDF rat were obtained from Charles River (Sulzfeld, Germany). Renal cortical expression of COX isoforms, immunohistochemical localization of COX-2, and urinary excretion of stable metabolites of prostaglandin E_2 (PGE_2) and TxA_2, together with metabolic and renal parameters were studied in six male ZDF rats at the ages of 4 and 12 weeks, and in six age-matched ZL rats as controls.

To further explore possible role of hyperinsulinemia in regulation of renal cortical COX-2 in ZDF rats, additional groups of 12-week-old ZDF and ZL were administered with intraperitoneal injection of the phosphatidyl inositol-3-kinase (PI3K) inhibitor wortmannin [24][100 μg/kg body weight in 15% dimethyl sulfoxide (DMSO)] (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA) or with vehicle (15% DMSO). Immediately after wortmannin or vehicle administration, the rats ($N = 5$ in each group) were placed into metabolic cages to obtain timed urine samples for analysis of urinary excretion of PGE_2 and TxB_2. General physical and metabolic parameters were measured in separate groups of wortmannin-or vehicle-treated ZL and ZDF ($N = 5$ in each group), sacrificed 90 minutes after injection. In previous in vivo studies conducted by Gao et al [25], substantially lower dose of wortmannin (15 μg/kg body weight) injected intravenously blocked insulin-induced increases in Akt activity, and inhibited beneficial effects of insulin on apoptosis in a rat model of myocardial infarction.

All experiments were carried out with the approval of, and in accordance with the regulations of, the Institutional Animal Care and Use Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine. The animals were housed with a light-dark cycle of 12 hours each, and with free access to food (standard chow) and water. The blood and tissues were harvested without previous food restriction.

Immunoblotting and immunohistochemistry

The rats were sacrificed with cervical dislocation and the blood was collected into chilled tubes for determinations of glucose levels and plasma insulin concentrations. After collection of blood samples, the kidneys were exposed via midabdominal incision, removed, decapsulated, divided into cortical and medullary portions, and snap frozen in liquid nitrogen for Western blot analysis. The half of the left kidney was immersed in 10% formalin for immunohistochemistry.

To obtain whole cell homogenates, kidney cortices were homogenized in RIPA buffer containing 50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 1.0% Triton X-100, and protease inhibitors (leupeptin 20 μg/mL and benzamidine 20 μg/mL), and centrifuged at 12000 × *g* for 30 minutes at 4°C. The resulting supernatant was aliquoted and saved at −70°C until analysis. Total protein content in fractions was determined by BCA analysis (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA).

Immunoblotting was performed as previously described [9]. In brief, denatured proteins were separated through an SDS-polyacrylamide gel and transferred to polyvinylidine difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were washed and then blocked overnight with Tris-buffered saline, plus 0.05% Tween-20 (TBS-T) containing 5% nonfat dry milk. Following blocking, membranes were again washed, and incubated overnight with rabbit polyclonal antimurine COX-2 or COX-1 antisera (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) diluted 1:800 in TBS-T. Immunodetection was accomplished by incubating membranes with a goat antirabbit-IgG secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for 45 minutes (1:100,000) (Pierce Chemical Co.) in TBS-T containing 5% nonfat dry milk. Visualization was performed with enhanced chemiluminiscence (ECL) Western-blotting kit (Supersignal West Dura) (Pierce Chemical Co.) according to the manufacturer's instructions. Resultant films (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, USA) (Scientific Imaging Systems, New Haven, CT, USA) were scanned using a flatbed scanner and images analyzed with NIH Image software. The membranes were then stripped, reblocked, and reincubated for 1 hour at room temperature with goat antiactin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), followed by 45-minute incubation with antigoat-IgG secondary antibody conjugated with HRP (1:4000) (Santa Cruz Biotechnology), and reaction with ECL as described above.

For immunohistochemical analysis, the fixed kidneys were processed as previously described [9]. The fixed kidney halves were dehydrated through a graded series of ethanols, embedded in paraffin, sectioned at 4 μm thickness, and placed onto glass slides. The same antibody as described above was used for immunohistochemical detection of COX-2 in ZDF and ZL rats. Sections were deparaffinized, and pretreated by steaming in 10% Citra buffer (BioGenex, San Ramon, CA, USA). After blocking, the slides were incubated overnight at 4°C with primary antibody (diluted 1:100) or with the same concentration of nonimmune mouse IgG as a control. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H_2O_2 solution in methanol. The primary antibody was localized using the Vectastain ABC-Elite peroxidase detection system (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). This was followed by reaction with diaminobenzidine (DAB) as chromogen and counterstaining with hematoxylin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Sections of each diabetic kidney were processed in parallel with appropriate control tissue.

Table 1. Physical and renal characteristics in 4-week-old and 12-week-old lean Zucker (ZL) and fatty diabetic Zucker (ZDF) rats

	Number	Body weight *g*	Right kidney weight *g*	Right kidney weight/100 g body weight	Creatinine clearance *mL/min*	Urinary protein excretion *μg/min*
ZL 4 weeks	5	103 ± 2	0.43 ± 0.01	0.42 ± 0.01	ND	ND
ZDF 4 weeks	6	131 ± 6[a]	0.51 ± 0.01[b]	0.40 ± 0.02	ND	ND
ZL 12 weeks	5	358 ± 9	1.13 ± 0.05	0.31 ± 0.01	0.93 ± 0.13	5.6 ± 0.9
ZDF 12 weeks	6	538 ± 25[b]	1.30 ± 0.04[b]	0.24 ± 0.01[‡]	0.92 ± 0.10	13.6 ± 3.0[c]

[a] $P < 0.01$; [b] $P < 0.001$ vs. ZL of the same age; [c] $P < 0.05$.

Urinary excretion of COX metabolites

Within 5 days prior to sacrifice, the 12-week-old ZL and ZDF rats, and 12-week-old wortmannin- or vehicle-treated ZL and ZDF rats underwent timed urine collections in metabolic cages with free access to food and water. The urine was collected in volumetric tubes immersed in a mixture of ice and dry ice. After completion of collections, the urine was immediately stored at −70°C and kept frozen until further analysis. Urinary PGE_2 and its metabolites, and urinary concentrations of TxB_2, a stable metabolite of TxA_2, were analyzed using enzyme immunoassay (EIA) (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

Analytical methods

Blood glucose levels were measured by the glucose oxidase assay (Pliva-Lachema, Czech Republic). Serum insulin concentrations were measured using a rat insulin RIA kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Serum triglyceride concentrations were determined by standard enzymatic methods (Pliva-Lachema), and serum nonesterified fatty acids (NEFA) were measured using an acyl-coenzymeA oxidase–based colorimetric kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Plasma and urinary creatinine were measured using commercially available kit (Pliva-Lachema). Urinary protein concentrations were measured spectrophotometrically after reaction with perchloric acid (Pliva-Lachema).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. All analyses were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Scheffé test. Differences in responses to treatments between control and diabetic rats were tested by two-way repeated measures ANOVA, using Statview SE and Graphics software (Brainpower, Calabasas, CA, USA). A P value of less than 0.05 was viewed as statistically significant.

RESULTS

General physical, renal, and metabolic parameters in ZL and ZDF rats

General physical and renal parameters in ZL and ZDF rats are summarized in Table 1. ZDF rats demonstrated increased body and renal weight gain, although the kidney/body weight ratio was not different in 4-week-old ZL and ZDF, and even decreased in 12-week-old ZDF as compared to ZL of the same age. There were no differences in creatinine clearance between the 12-week-old ZL and ZDF groups.

However, urinary protein excretion was slightly, but significantly increased in 12-week-old ZDF rats compared with ZL.

Metabolic parameters in 4- and 12-week-old rats are shown in Table 2. ZDF rats demonstrated progressive increases in plasma insulin concentrations in parallel with increased serum triglyercide and NEFA concentrations. Blood glucose levels were slightly but significantly increased in both age groups of ZDF as compared to ZL.

Protein expression of COX isoforms and prostanoid excretion

As shown in Figure 1A, ZDF rats demonstrated increases in renal cortical COX-2 protein expression as compared to ZL rats. The difference in COX-2 expression between the ZL and ZDF groups was more prominent with increasing age. In all groups of rats, immunoreactive COX-2 was localized in typical localizations in macula densa cells, and in the TALH. In ZL, COX-2

Table 2. Metabolic characteristics in lean Zucker (ZL) and fatty diabetic Zucker (ZDF) rats

	Plasma insulin nmol/L	Blood glucose mmol/L	Triglyceride mmol/L	Nonesterified fatty acids mmol/L
	[nmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]
ZL 4 weeks	0.40 ± 0.04	4.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	ND
ZDF 4 weeks	0.74 ± 0.07[a]	5.5 ± 0.6b	1.4 ± 0.1[a]	ND
ZL 12 weeks	0.48 ± 0.09	5.3 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.43 ± 0.02
ZDF 12 weeks	1.81 ± 0.19[c]	6.7 ± 0.3‡	4.2 ± 0.4[c]	0.54 ± 0.02[c]

[a] $P < 0.01$; [b] $P < 0.05$; [c] $P < 0.001$ vs. ZL of the same age.

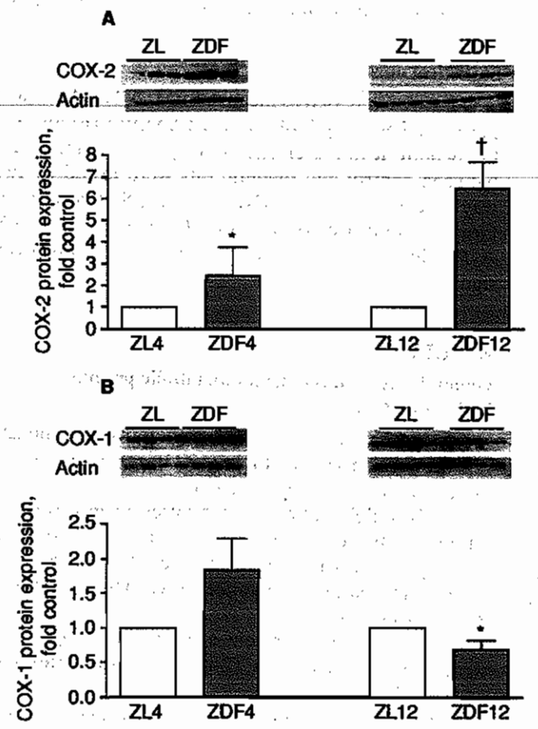


Fig. 1. Renal cortical cyclooxygenase (COX)-2 and COX-1 expression in Zucker lean (ZL) and fatty diabetic rats (ZDF). (*A*) Increased COX-2 expression was apparent already in 4-week-old ZDF rats (ZDF4) and further increased in 12-week-old ZDF rats (ZDF12) as compared to age-matched lean counterparts (ZL4 and ZL12). The upper panels show representative blots. (*B*) There were no significant differences in COX-1 expression between the 4-week-old ZDF and ZL rats. In contrast, COX-1 expression was lower in 12-week-old ZDF rats as compared to age-matched lean counterparts. The insets show representative blots. *$P < 0.05$ vs. ZL; †$P < 0.01$ vs. ZL.

immunoreactivity in both locations was found in occasional cells, whereas ZDF rats demonstrated clusters of COX-2–positive cells (Fig. 2). In contrast to COX-2, there were no significant differences in COX-1 expression between ZL and ZDF rats at age 4 weeks (Fig. 1B). Moreover, in 12-week-old ZDF rats, COX-1 expression was lower than in their age-matched ZL counterparts ($P < 0.05$).

To assess the impact of observed changes in protein expression of renal COX isoforms on production of COX-derived metabolites, further studies determined urinary excretion of PGE_2 and TxB_2, a stable metabolite of TxA_2, in 12-week-old rats. Urinary excretion of both metabolites was increased in ZDF as compared to ZL rats (Fig. 3).

Acute effects of wortmannin on PGE_2 and TxB_2 excretion

Further experiments focused on the possible role of hyperinsulinemia in modulation of COX activity in ZDF rats. Additional groups of 12-week-old ZL and ZDF rats were administered with wortmannin or with vehicle. Wortmannin acts as an inhibitor of PI3K, an important intermediate in insulin signaling [26]. The differences in physical and metabolic parameters between the vehicle-treated ZL and ZDF rats (Table 3) as well as the differences in PGE_2 and TxB_2 excretion (Fig. 4) between the vehicle-treated ZL and ZDF rats were similar as in the previous protocol. Wortmannin had no effect on these parameters in ZL. In contrast, wortmannin-treated ZDF rats demonstrated significantly lower TxB_2 excretion and a similar trend in PGE_2 excretion (Fig. 4), as compared to their vehicle-treated counterparts. These changes were associated with an increase in plasma triglyceride and a decrease in NEFA concentrations (Table 3).

DISCUSSION

In the present studies, ZDF rats, studied as a model of type 2 diabetes, demonstrated a progressive increase in COX-2 expression in the renal cortex as compared to lean controls. In contrast to COX-2, COX-1 expression was lower in 12-week-old ZDF. These changes in expression of COX isoforms in ZDF rats were associated with increased urinary excretion of both PGE and TxB_2, determined as a stable metabolite of TxA_2. The changes in expression and activity of COX isoforms in ZDF rats were associated with metabolic abnormalities characteristic of the insulin-resistant state, increased kidney weight, and mild proteinuria; however, the kidney/body weight ratio

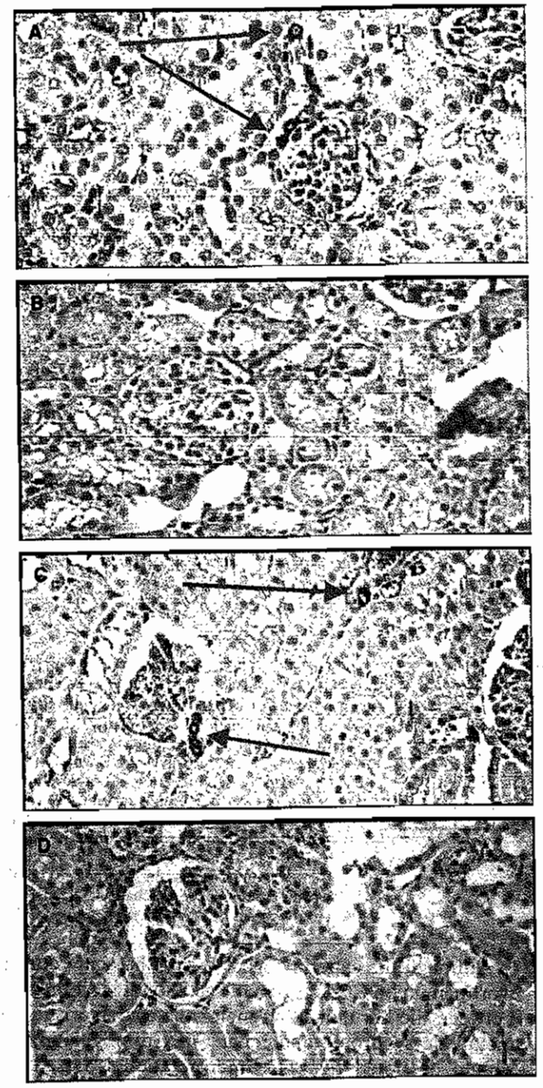


Fig. 2. Renal cortical immunohistochemical localization of cyclooxygenase (COX)-2 in Zucker lean (ZL) (*A*) and fatty diabetic rats (ZDF) (*C*). Representative images in 12-week-old rats are shown. Both in ZL and ZDF rats, COX-2 was localized in the cells of macula densa and in thin ascending limb of Henle (TALH) (arrows, 200×). (*B* and *D*) Control adjacent sections incubated with nonimmune IgG.

in 12-week-old animals was lower than in lean controls due to marked obesity.

Our present findings demonstrate another model of progressive renal injury that is associated with increased cortical COX-2 expression and activity. Considering the documented role of COX-2–derived metabolites in the pathophysiology of progressive renal disease, these observations suggest that COX-2 might be involved in the pathophysiology of renal disease in the ZDF rat. Evolution of nephropathy in ZDF has been well described. Extensive studies by Kasiske et al [23] and Coimbra et al [27] have shown that the first detectable changes in glomerular morphology suggestive of glomerulosclerosis and significant proteinuria occur at about 4 to 5 months of age, whereas more subtle changes characterized by glomerular mesangial matrix expansion and albuminuria occur by 14 weeks of age. Thus, similar to findings in some other models of progressive glomerulosclerosis, such as the rat remnant kidney model [28], fawn-hooded hypertensive rats [29], or type 1 diabetic nephropathy [8, 9], increased renal expression of COX-2 and enhanced generation of prostanoids in ZDF rats precedes the development of glomerulosclerosis. Furthermore, in the present studies it coincided with early development of proteinuria.

An increase in renal cortical COX-2 expression in ZDF rats corresponds to previous reports by our group as well as by other investigators, suggesting marked increases in renal COX-2 expression and function in models of type 1 diabetes [8, 9]. However, there are striking differences between the metabolic environments associated with COX-2 up-regulation in the present and in previous studies. Unlike the studies in type 1 diabetes, changes in COX-2 expression in ZDF were not closely associated with hyperglycemia, since at 12 weeks of age, ZDF rats demonstrated only mild hyperglycemia, and their younger counterparts had blood glucose levels still within the normoglycemic range. Therefore, some other factors must contribute to COX dysregulation in the ZDF. The increase in COX-2 expression, as observed in ZDF rats, paralleled the development of insulin resistance and metabolic abnormalities characterized by progressive obesity, hyperinsulinemia, serum triglyceride, and NEFA concentrations. Therefore, a progressive increase in COX-2 expression is likely linked to the development of the metabolic syndrome.

Hyperinsulinemia is one of the most striking metabolic/hormonal abnormalities in the ZDF. Therefore, we embarked on further studies to explore the role of this factor in the enhanced prostanoid excretion in this model of type 2 diabetes. To inhibit the major insulin signaling pathway, the rats were administered the inhibitor of PI3K, wortmannin. This intervention significantly reduced TxB_2 excretion in ZDF rats, albeit the change in PGE did not reach statistical significance. These findings, together with the lack of effect of wortmannin in ZL rats, suggest that enhanced COX-2 activity in ZDF is in part insulin-dependent. Although PI3K is not activated only by insulin, but by a number of other factors, hyperinsulinemia is such a prominent feature in ZDF rats that effects of wortmannin could be attributable to inhibition of insulin signaling.

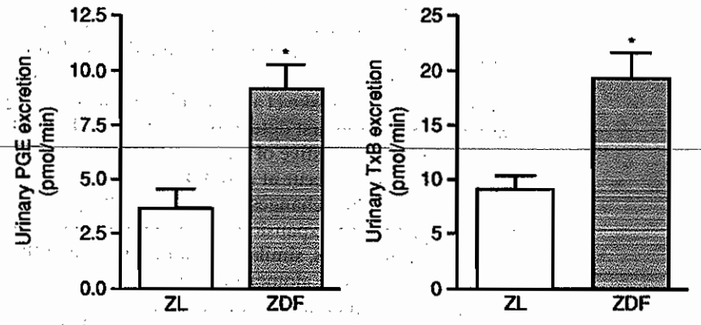


Fig. 3. Urinary excretion of stable metabolites of prostaglandin E (PGE) and thromboxane A_2 (TxA_2) in 12-week-old fatty diabetic Zucker (ZDF) and lean Zucker (ZL) rats as controls. ZDF demonstrated increased excretion of both COX metabolites as compared to ZL. $^*P < 0.05$.

Table 3. Physical and metabolic characteristics in vehicle- and wortmannin-treated lean Zucker (ZL) and fatty diabetic Zucker (ZDF) rats

	Number	Body weight *g*	Right kidney weight *g*	Right kidney weight/100 g body weight	Blood glucose *mmol/L*	Triglyceride *mmol/L*	Nonesterified fatty acids *mmol/L*
ZL vehicle	5	345 ± 11	1.06 ± 0.06	0.31 ± 0.01	4.4 ± 0.1	0.67 ± 0.10	0.30 ± 0.04
ZDF vehicle	5	508 ± 22[a]	1.23 ± 0.04[b]	0.24 ± 0.01[a]	5.8 ± 0.2[a]	2.82 ± 0.12[c]	0.50 ± 0.04[c]
ZL wortmannin	5	355 ± 10	1.05 ± 0.03	0.30 ± 0.01	4.6 ± 0.1	0.59 ± 0.07	0.24 ± 0.04
ZDF wortmannin	5	516 ± 17[a]	1.17 ± 0.05[b]	0.23 ± 0.01[a]	6.1 ± 0.2[a]	4.52 ± 0.47[c]	0.29 ± 0.03[d]

[a] $P < 0.001$ vs. ZL; [b] $P < 0.05$; [c] $P < 0.01$; [d] $P < 0.01$ vs. ZDF-vehicle.

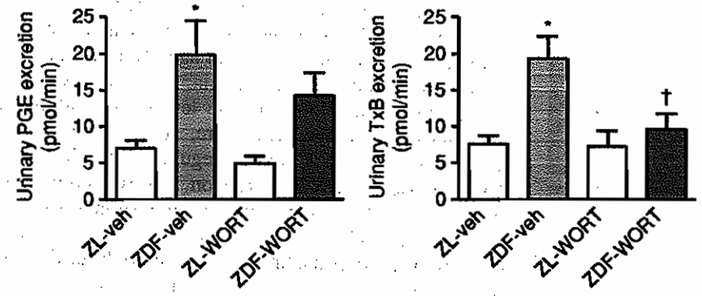


Fig. 4. Urinary excretion of stable metabolites of prostaglandin E (PGE) and thromboxane A_2 (TxA_2) in 12-week-old fatty diabetic Zucker (ZDF) and lean Zucker (ZL) treated with wortmannin or with a vehicle. Vehicle-treated ZDF (ZDF-veh) demonstrated increased excretion of both cyclooxygenase (COX) metabolites as compared to ZL (ZL-veh). Wortmannintreated ZDF (ZDF-WORT) rats demonstrated significantly lower TxB_2 excretion as compared to vehicle-treated counterparts. In contrast to ZDF, wortmannin induced no changes in TxB_2 excretion in ZL (ZL-WORT). $^*P < 0.05$ vs. ZL.

Analysis of metabolic parameters in wortmannin-treated ZDF also showed marked reduction in plasma NEFA concentrations, together with higher triglyceride concentrations. Detailed discussion of this phenomenon is beyond the scope of this paper, but these changes could be related to decreased activity of hormone-sensitive lipoprotein lipase in adipose tissue [30]. Furthermore, these observations could be considered as additional proof of effective PI3K inhibition by wortmannin administered at a given dose. Since NEFA act as precursors for synthesis of arachidonic acid [31], and therefore, as precursors of a spectrum of COX metabolites, the reduction in NEFA levels observed in response to wortmannin administration in ZDF rats could also contribute to attenuation in TxB_2 excretion. Thus, in addition to insulin, enhanced COX-2 activity in ZDF rats could be also attributable to increased NEFA.

Although the experiments assessing the acute effects wortmannin on COX enzymatic activity suggest the link between the hormonal and metabolic characteristics of metabolic syndrome and renal COX dysregulation, it should be noted that this interpretation is based on just a few measurements of urinary prostaglandins and metabolic parameters. Therefore, these data should be viewed as exploratory and supportive. To provide conclusive evidence, future studies should focus on measurements of COX-2 activity and expression, together with indicators of renal injury in models of type 2 diabetes, after long-term modulation of these metabolic/hormonal risk factors.

COX-1 was not the major focus of the present studies. However, our finding of decreased expression of this isoform in 12-week-old ZDF rats may have pathophysiologic significance. Considering the documented

localization of this isoform in collecting ducts [11], it has been hypothesized that COX-1–derived metabolites are involved in natriuresis. For example, pressure natriuretic responses were inhibited by indomethacin, but not by a selective COX-2 inhibitor [32]. Reduction in COX-1 expression in ZDF rats could contribute to later development of hypertension in this model by decreased natriuretic responses.

Lessons derived from studies focusing on renal COX-2 regulation may provide additional clues for determination of factors characteristic both for the metabolic syndrome and for modulation of COX-2 expression in the renal cortex. COX-2 expression and function in macula densa cells is stimulated by decreased sodium chloride concentration in tubular fluid. In particular, chloride ion tubular concentrations seem to be important for COX-2 regulation. Insulin is a potent stimulator of chloride reabsorption up-stream from macula densa [33, 34]. Therefore, progressive hyperinsulinemia in ZDF rats may be associated with changes in ionic content of tubular fluid sensed by macula densa cells leading to up-regulation of COX-2. In this context, Schnyder et al [35] have recently provided persuasive evidence that insulin signaling pathways involved in insulin-induced sodium reabsorption in proximal tubular cells are not affected by insulin resistance.

Previous studies by Vora et al [36] have suggested that a significant proportion of ZDF rats develop hydronephrosis later in the course of nephropathy. This phenomenon may interfere with identification of renal pathophysiologic mechanisms specific for metabolic syndrome. Theoretically, development of hydronephrosis could trigger processes that would lead to COX-2 up-regulation. Our present studies were deliberately performed at early stages of the disease, when both age groups of ZDF do not display hydronephrosis.

CONCLUSION

We report complex changes in renal cortical expression of COX isoforms in ZDF rats as compared to lean controls. These changes were characterized by a progressive increase in COX-2; COX-1 expression was lower in 12-week-old ZDF rats. These changes in expression of COX isoforms in the ZDF rats were associated with increased urinary excretion of both PGE and TxB_2, determined as a stable metabolite of TxA_2. The changes in COX-2 expression and activity paralleled the development of metabolic abnormalities characteristic of insulin resistant states. Further experiments with wortmannin suggested the link between hormonal/metabolic factors characteristic for type 2 diabetes (hyperinsulinemia and increased plasma NEFA concentrations) and COX-2 up-regulation and enhanced prostanoid excretion. With respect to the documented roles of COX in the regulation of kidney function and in renal pathophysiology, the observed alterations in COX expression and function could contribute to the later development of nephropathy in this model of type 2 diabetes. Furthermore, the data provide a rationale for studies of additional metabolic/hormonal mechanisms operating in the pathophysiology of diabetic nephropathy.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by Research Grant No. NR/8221–3/2004 of the Internal Grant Agency, Ministry of Healthcare, Czech Republic, and by the NIH (DK 63231). We are grateful to I. Vesela, H. Seidlova, and I. Musilova for their excellent technical assistance.

Reprint requests to Radko Komers, M.D., Ph.D., Diabetes Center, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Videnska 1958 140 21 Prague, Czech Republic.
E-mail: radko.komers@medicon.cz

REFERENCES

1. Hommel E, Mathiesen E, Arnold-Larsen S, *et al*: Effects of indomethacin on kidney function in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia* 30:78–81, 1987
2. Viberti GC, Benigni A, Bognetti E, *et al*: Glomerular hyperfiltration and urinary prostaglandins in type 1 diabetes mellitus. *Diab Med* 6:219–223, 1989
3. Kontessis PS, Jones SL, Barrow SE, *et al*: Effect of thromboxane synthase inhibitor on renal function in diabetic nephropathy. *J Lab Clin Med* 121:415–423, 1993
4. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF: Glucose-induced increases in renal hemodynamic function. Possible modulation by renal prostaglandins. *Diabetes* 34:360–364, 1985
5. Craven PA, Caines MA, DeRubertis FR: Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: Relationship to the hyperfiltration of early diabetes. *Metabolism* 36:95–103, 1987
6. Perico N, Benigni A, Gabanelli M, *et al*: Atrial natriuretic peptide and prostacyclin synergistically mediate hyperfiltration and hyperperfusion of diabetic rats. *Diabetes* 41:533–538, 1992
7. Uriu K, Kaizu K, Hashimoto O, *et al*: Acute and chronic effects of thromboxane A_2 inhibition on the renal hemodynamics in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 45:794–802, 1994
8. Cheng HF, Wang CJ, Moeckel GW, *et al*: Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int* 62:929–939, 2002
9. Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, *et al*: Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J Clin Invest* 107:889–898, 2001
10. Smith WL, Bell TG: Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol* 235:F451–F457, 1978
11. Campean V, Theilig F, Paliege A, *et al*: Key enzymes for renal prostaglandin synthesis: Site-specific expression in rodent kidney (rat, mouse). *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F19–F32, 2003
12. Tetsuka T, Daphna-Iken D, Miller BW, *et al*: Nitric oxide amplifies interleukin 1–induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 97:2051–2056, 1996
13. Fletcher BS, Kujubu DA, Perrin DM, Herschman HR: Structure of the mitogen-inducible TIS 10 gene and demonstration that the TIS 10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J Biol Chem* 267:4338–4344, 1992
14. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, *et al*: Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94:2504–2510, 1994
15. Kömhoff M, Gröne H, Klein T, *et al*: Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: Implication for renal function. *Am J Physiol* 272:F460–F468, 1997

16. Sanchez PL, Salgado LM, Perreri NR, Escalante B: Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal function after renal ablation. *Hypertension* 34:848–853, 1999
17. Wang J-L, Cheng H-F, Shappell S, Harris RC: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retards progressive renal injury in rats. *Kidney Int* 57:2334–2342, 2000
18. Ritz E, Orth SR: Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 341:1127–1133, 1999
19. Velasquez MT, Kimmel PL, Michaelis OET: Animal models of spontaneous diabetic kidney disease. *FASEB J* 4:2850–2859, 1990
20. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF: The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 19:I110–115, 1992
21. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, *et al*: Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 13:18–19, 1996
22. Ionescu E, Sauter JF, Jeanrenaud B: Abnormal oral glucose tolerance in genetically obese (fa/fa) rats. *Am J Physiol* 248:E500–E506, 1985
23. Kasiske BL, Cleary MP, O'Donnell MP, Keane WF: Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat. *J Lab Clin Med* 106:598–604, 1985
24. Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, *et al*: Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 269:3568–3573, 1994
25. Gao F, Gao E, Yue TL, *et al*: Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: The roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 105:1497–1502, 2002
26. Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, *et al*: Akt activation by growth factors is a multiple-step process: The role of the PH domain. *Oncogene* 17:313–325, 1998
27. Coimbra TM, Janssen U, Grone HJ, *et al*: Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 57:167–182, 2000
28. Wang J-L, Cheng H-F, Zhang M-Z, *et al*: Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in a model of renal ablation. *Am J Physiol* 275:F613–F622, 1998
29. Weichert W, Paliege A, Provoost AP, Bachmann S: Upregulation of juxtaglomerular NOS1 and COX-2 precedes glomerulosclerosis in fawn-hooded hypertensive rats. *Am J Physiol* 280:F706–F714, 2001
30. Kraemer FB, Takeda D, Natu V, Sztalryd C: Insulin regulates lipoprotein lipase activity in rat adipose cells via wortmannin- and rapamycin-sensitive pathways. *Metabolism* 47:555–559, 1998
31. Needleman P, Turk J, Jakschik BA: Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 55:69–102, 1986
32. Cheng HF, Harris RC: Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension* 43:1–6, 2004
33. Baum M: Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule. *J Clin Invest* 79:1104–1109, 1987
34. Kirchner KA: Insulin increases loop segment chloride reabsorption in the euglycemic rat. *Am J Physiol* 255:F1206–F1213, 1988
35. Schnyder B, Pittet M, Durand J, Schnyder-Candrian S: Rapid effects of glucose on the insulin signaling of endothelial NO generation and epithelial Na transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E87–E94, 2002
36. Vora JP, Zimsen SM, Houghton DC, Anderson S: Evolution of metabolic and renal changes in the ZDF/Drt-fa rat model of type II diabetes. *J Am Soc Nephrol* 7:113–117, 1996

Seznam publikací v průběhu doktorského studia :

1. Publikace, které jsou podkladem disertace :

Ždychová J, Kazdová L, Pelikanová T, Lindsley JN, Anderson S, Komers R. Renal activity of Akt kinase in Obese Zucker Rats. Experimental Biology and Medicine, 2008 (in press)

Ždychová J, Veselá J, Kazdová L, Komers R.Renal activity of Akt kinase in experimental Type 1 diabetes. Physiol Res. 2007 Oct 11. [Epub ahead of print]

Komers R, Ždychová J, Cahová M, Kazdová L, Lindsley JN, Anderson S. Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats. Kidney Int. 2005 Jun;67(6):2151-8. (IF 4,79)

Ždychová J, Komers R.Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. Physiol Res. 2005;54(1):1-16. (IF 1,14)

2. Publikace bez vztahu k tématu disertace :

Lecian D, Demova H, Lodererova A, Ždychová J, Kluckova H, Teplan V, Voska L, Komers R. Renal effects of HMG-CoA reductase inhibition in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis. Kidney Blood Press Res. 2006;29(3):135-43. (IF 2,408)