

**MAP kinázok és a PI-3-kináz/Akt útvonal szerepe a  
retinadegeneráció szabályozásában**

**Ph.D. TÉZISEK**

**DR. MESTER LÁSZLÓ**



**Pécsi Tudományegyetem,  
Általános Orvostudományi kar,  
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**2010**

# 1. BEVEZETÉS

Az ischaemia és az oxidatív stressz –önmagában vagy az ischemia részeként- számos, nagy populációt érintő betegség patogenezisében megtalálható. Ezen betegségek főleg a szív- és érrendszeri, neurovascularis és neurodegeneratív betegségek. Szemészeti szempontból, számos látásromláshoz vezető betegséget kísér retinális ischemia, mint pl.:retina érelzáródás, okuláris ischaemiás szindróma, diabéteszes retinopathia, glaucoma és időskori makuladegeneráció. Továbbá a retina fényelnyelése következtében nagyobb mennyiségben képződnek oxidatív / nitrozatív ágensek, melyek a retina károsodását okozhatják. Az ischaemia és oxidatív stressz megtalálhatóak a fejlett országok vaksági statisztikáit vezető betegségek patogenezisében (AMD, glaucoma, DRP). Ezért rendkívül fontos, hogy megértsük az ischemia és oxidatív stressz okozta retina károsodáshoz vezető folyamatokat, mind patológiás, mind a potenciális terápiás szempontból.

**Retina:** Embriológiaiilag a retina a központi idegrendszerhez tartozik. Anatómiailag egy vékony, átlátszó membrán. Fő funkciója a külvilágból érkező fény-ingerek ingerületté alakítása és ennek a látóidegen keresztül az agy felé továbbítása. A retina lazán csatolt az érhártyához a retinális pigment epitheliumon keresztül (RPE), mely hatszögletű sejtekből felépülő sejtréteg. Az RPE fő funkciói a következők: A-vitamin anyagcsere, külső vér-retina gát fenntartása, fotoreceptorok külső szegmenseinek fagocitózisa, fényelnyelés, hőcsere, bazális lamina képzése, külső szegmenseket körülvevő mucopolysaccharid mátrix termelése valamint aktív transzport a fotoreceptorokba és onnan ki.

**Ischemia:** Ischaemia olyan kóros állapotra utal, ahol a vér szövetekhez való áramlása nem megfelelő (nem jelent feltétlenül teljes hiányt), a sejtek igényeit nem fedezi. Az ischemia okozta károsodás folyamata egy önerősítő, destruktív kaszkád, melyet ischaemiás kaszkádnak nevezünk. Ez egy rendkívül összetett, több, részben egymással összefüggő molekuláris szintű folyamatot jelent, melynek kiváltó tényezője az energiahány.

**Oxidatív stressz:** Az oxidatív stressz a reaktív oxigén származékok (ROS) termelődése valamint az őket ill. hatásukat semlegesíteni képes biológiai rendszerek működése közötti egyensúly hiányát jelenti. A szabagyökök lipidperoxidációt, protein oxidációt, DNS károsodást okoznak és a kialakuló mitokondriális károsodással együtt

vezetnek a sejtátláshoz. Az oxidatív stressz számos betegség (neurodegeneratív, kardiovaszkuláris) kialakulásában fontos szerepet játszik.

**PARP** (poli-ADP-ribóz polymeráz): A PARP-1 nukleáris enzim a DNS egyes és kettős – lánctörés hatására aktiválódik. Pár évtizeddel ezelőtt még úgy gondolták, hogy a PARP enzim elsősorban a DNS-hibajavításban és a genomikus stabilitás megőrzésében fontos, azonban később kiderült, hogy fontos szerepe van az oxidatív és nitroztatív stressz kialakulásának folyamatában. A PARP-1 kettős mechanizmussal vesz részt az oxidatív stresszrel járó betegségek kialakulásában: 1. túlzott aktivációja sejtátlást okoz, 2. szerepet játszik a gyulladáshoz vezető mediátorok (citokinek, kemokinek, iNOS, adhéziós molekulák, mátrix metalloproteinázok) NFκB-függő transzkripció szabályozásában. Azokban a betegségekben, ahol a nekrotikus típusú sejtátlás dominál (stroke, myocardialis infarktus, I/R) inkább az előbbi, míg a masszív sejtátlással nem kísért, de erős gyulladáshoz vezető komponenssel jellemzett betegségekben (colitis, arthritis, diabetes) valószínűbb, hogy a PARP patogenetikai szerepe a gyulladáshoz vezető mediátorok termelésének szabályozásán keresztül valósul meg.

**PACAP** (hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid): A PACAP a vazóaktív intesztinális peptid (VIP)/szekretin/glukagon családba tartozik. A neuropeptid PACAP biológiai hatásai igen változatosak: többek között befolyásolja a reprodukciókat, a cirkadián ritmust, a hőszabályozást, a táplálkozást, a memóriát, a vizelési reflexeket, a gyulladáshoz vezető reakciókat és a fejlődési folyamatokat. Továbbá jól ismert a PACAP neurotrófik és neuroprotektív hatása is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Bár a PARP aktiváció részvételét a különböző iszkémia modellekben alaposan tanulmányozták, csak közvetett bizonyítékok állnak rendelkezésre a PARP aktiváció szerepéről a krónikus hipoperfúzió indukálta neurodegeneratív folyamatokban.

Ezért jelen tanulmány célja, a következő:

- bizonyítani, hogy a PARP aktiváció a sejthalál egyik fő szabályozója a krónikus hipoperfúzió indukálta retinadegeneráció patkány modellben [bilaterális carotis communis lektés indukálta retina degeneráció (BCCAO)].
- értékelni a PARP gátlás (HO3089) hatását ebben a modellben, a krónikus hipoperfúzió okozta morfológiai változások vizsgálatán keresztül
- meghatározni a kritikus kináz kaszkádok, mint a MAP kinázok és a PI-3K-Akt aktiváltsági állapotát, a hipoperfúzió indukálta retinális degenerációban

Annak ellenére, hogy számos tanulmány mutatja be a PACAP védő hatását a retinában (Shoge et al 1999, Babai et al 2005, RácZ et al 2006), jelenleg nem állnak rendelkezésre adatok a PACAP oxidatív stressz elleni lehetséges védő hatásáról retina pigment epithel sejteken. Ezért ésszerűnek tűnt megvizsgálni, vajon a PACAP képes-e növelni a retina pigment epithel sejtek túlélését az oxidatív stressz által kiváltott apoptózis esetén.

- PACAP hatásának vizsgálata oxidatív stressznek kitett tenyésztett human pigment epithel sejteken (ARPE-19)
- PACAP apoptózisra, nekrozisra gyakorolt hatásának detektálása tenyésztett humán retina pigment epithel sejteken Annexin V és propidium-jodid festés segítségével
- PACAP apoptózis során bekövetkező mitokondriális depolarizációra gyakorolt hatásának detektálása tenyésztett humán retina pigment epithel sejteken JC-1 festés alkalmazásával

### **3. . KONKLÚZIÓ**

#### **PARP aktiváció állapota BCCAO modellben**

- Bizonyítottuk, hogy a kialakuló PARP aktiváció a sejthalál folyamatának egyik fő szabályozója krónikus hipoperfúzió indukálta neurodegenerációban. A PARP aktiváció a retinában a célfehérjék poly-ADP-ribozilációjának mérése által került meghatározásra. A szem kezelése a PARP inhibitorral (HO3089) csökkentette a BCCAO indukálta PARP auto-poli-ADP-ribozilációját.

#### **A PARP inhibitor-HO3089 hatása a retina morfológiára BCCAO modellben**

- Szövetteni vizsgálatokkal igazoltuk a PARP gátlás retinaprotektív hatását. A BCCAO-t követő intravitreális PARP inhibitor (HO3089) kezelés következtében a retinarétegek megjelenése közel ép volt. Ezt a morfometriai mérések is jól alátámasztották.

#### **Különböző jelátviteli útvonalak részvétele a PARP-gátlás indukálta neuroprotekción mechanizmusában BCCAO modellben**

- Megállapítottuk, hogy a PI-3K-Akt és a ERK1/2 aktiválása citoprotektív és a JNK ill. p38 MAPK citotoxikus jelátviteli útvonalak gátlásával együtt nagy valószínűséggel részt vesz a PARP-gátlás indukálta neuroprotekción mechanizmusában BCCAO modellben.

Összefoglalva, ezen eredmények alapján a PARP gátlása molekuláris célpontot jelenthet az okuláris ischaemiás szindróma és tágabb értelemben véve a krónikus hipoperfúzió okozta neurodegeneratív betegségek klinikai kezelésében.

## **PACAP hatása a humán retina pigment epithel sejtek viabilitására oxidatív stressz során**

- Kimutattuk, hogy a PACAP kezelés csökkentette a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés okozta sejthalált a retina humán pigment epithel sejtvonalon. Továbbá, a PACAP1-38 ezen hatása PACAP6-38 (PACAP1-38 inhibitor) alkalmazásával blokkolható.

## **PACAP koncentrációfüggése**

- Kimutattuk, hogy a PACAP védőhatása koncentráció függő. Az 1pM-től 1μM-ig terjedő skálán, a legjobb eredményt 100 nM PACAP1-38 –al való kezelés esetében értük el.

## **PACAP a sejthalálban**

- PACAP alkalmazása H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –vel kezelt sejteken szignifikánsan növelte az élő sejtek arányát és reprodukálhatóan csökkentette az apoptotizáló sejtek arányát.

## **PACAP hatása a mitokondriális depolarizációra**

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- kezelt csoportban az apoptotizáló sejtek számának növekedése mellett az élő sejtek számának csökkenése volt megfigyelhető. A PACAP alkalmazása szignifikánsan növelte az élő sejtek arányát és csökkentette az apoptotizáló sejtek arányát a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> –vel kezelt sejteknél.

Összefoglalva, a jelenlegi eredményeink alapján elmondható, hogy a PACAP az oxidatív stressznek kitett retina humán pigment epithel sejtekben antiapoptotikus hatású, ez további bizonyítékként szolgál a PACAP retinaprotekcióban betöltött szerepéről. Későbbiekben a PACAP az oxidatív stressz okozta retinabetegségek hatásos klinikai kezelésének részese lehet.

## **4. KLINIKAI JELENTŐSÉG**

A rendkívül bonyolult sejten belüli jelátviteli mechanizmusokról rendelkezésre álló ismeretek még nem elégségesek, ezért ezen útvonalak azonosítása, szerepének tisztázása különösen fontos, mivel a későbbiekben ezek lehetséges gyógyszer-célpontként szolgálhatnak. Másrészt a már meglévő, hatásos gyógyszerek hatásmechanizmusának “mélyebb” megismerése szintén lehetőséget kínál arra, hogy a jövőben a kezelés még hatékonyabbá váljon.

## **5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönöm segítségüket, támogatásukat, tanácsaikat:

Prof. Sümegei Balázs, Dr Reglődi Dóra, Ifj. Dr Ferenc Gallyas, Dr Kovács Krisztina, Szabó Alíz, Hocsák Enikő, Dr Kiss Péter, Szabadfi Krisztina, Prof. Dr Kovács Bálint, Dr Kovács Balázs

## **A jelen munka az alábbi közleményeken alapul:**

**L Mester**, A Szabo, T Atlasz, K Szabadfi, D Reglodi, P Kiss, B Racz, A Tamas, F Gallyas Jr, B Sumegi, E Hocsak, R Gabriel, K Kovacs

*Protection Against Chronic Hypoperfusion-Induced Retinal Neurodegeneration by PARP Inhibition via Activation of PI-3 kinase Akt Pathway and Suppression of JNK and p38 MAP kinases*

Neurotox Res (2009) 16:68-76

**IF: 2,439**

**L Mester**, K Kovacs, B Racz, I Solti, T Atlasz, K Szabadfi, A Tamas, D Reglodi

*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide is Protective Against Oxidative Stress in Human Retinal Pigment Epithelial Cells*

J Mol Neurosci (2010) (In Press, PMID: 20645022)

**IF 2,720**

K Szabadfi , **L Mester** , D Reglodi , P Kiss , N Babai , B Racz , K Kovacs , A Szabo , A Tamas, R Gabriel, T Atlasz

*Novel Neuroprotective Strategies in Ischemic Retinal Lesions*

Int. J. Mol. Sci. (2010), Feb 3;11(2):544-61

**IF: 1,387**

## **További közlemények:**

V Mester, F Kuhn, **L Mester**

*Epiretinal membranes: current management concepts*

Expert Review of Ophthalmology (2007), Feb Vol. 2, No.1, Pages 131-141

E Hocsak, B Racz, A Szabo, **L Mester**, E Rapolti, Sz Javor, Sz Bellyei, F Gallyas Jr., B Sumegi, A Szigeti

*TIP47 protects mitochondrial membrane integrity and inhibits oxidative-stress-induced cell death*

FEBS Letters (2010) Jul 2;584(13):2953-60.

**IF 3,541**

V Mester, F Kuhn, **L Mester**

*Éles tárgyak által okozott szemsérülések prognózisa*

Kovács Bálint professzor a Pécsi Szemklinika Igazgatója 1988-2008, Emlékkönyv

2008, oldal: 103-110



