

Szakmai zárójelentés az F-67996 témaszámú OTKA pályázathoz

témavezető: Debreceni Balázs

2011. július

Bevezetés

Kísérleteinkben oxidatív stressznek, illetve magas homocisztein koncentrációnak kitett, kultúrában tenyésztett sejteken vizsgáltuk a poli(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP-1) enzim gátlásának hatását a sejtek túlélésére és a túléléssel kapcsolatos egyes jelátviteli útvonalak aktivitására. A kísérletek célja a sejtkárosodás és sejtpusztulás kivédése, illetve a sejtpusztulás és citoprotekció hátterében zajló mechanizmusok vizsgálata volt. Korábbi ismereteink szerint a homocisztein SH csoportjának autooxidációja hidrogén-peroxid és oxigén szabadgyökök (ROS) képződését váltja ki a sejtekben, ami károsító oxidatív stresszt idéz elő és sejtpusztuláshoz vezet, illetve az érfalban az NF- κ B transzkripció faktor aktiválásán keresztül gyulladást okoz. Az is ismert, hogy az oxidatív stressz a DNS-károsító hatásán keresztül aktiválja a nukleáris lokalizációjú PARP-1 enzimet. Továbbá számos vizsgálatban kimutatták, hogy a PARP-1 befolyással bír a sejtpusztulással kapcsolatos jelátviteli utakra: a PARP-1 aktiváció gátolja a PI3-kináz/Akt jelátviteli út, és fokozza a JNK, p38 és ERK MAPK jelátviteli utak aktivitását. Arra is voltak korábbról adatok, hogy a PARP-1 gátlása kivédi az oxidatív stressz által kiváltott sejtpusztulást. Kezdeti elgondolásunk az volt, hogy ha a homocisztein a sejtpusztulást az oxidatív stressz által váltja ki, akkor a homocisztein sejtpusztító hatását a PARP-1 gátlásával ki lehet védeni.

A homocisztein sejtpusztító hatásának vizsgálata

Kutatásaink kezdeti szakaszában a homocisztein sejtpusztító hatását vizsgáltuk kultúrában tenyésztett sejteken. WRL-68 (emberi májsejt), RAW-264.7 (egér macrophag) és HUVEC (emberi köldökvéna endothel) sejteket kezeltünk homociszteinnel különböző koncentrációkban 24 órán át, és megállapítottuk, hogy a homocisztein dóziszfüggő sejtpusztulást vált ki. Az LD₅₀ WRL-68 sejtek esetében 4 mM, RAW-264.7 és HUVEC sejtek esetében 6 mM volt. Ezt követően a PJ34 farmakológiai PARP gátlószer hatását vizsgáltuk a homocisztein által kiváltott sejtpusztulásra. WRL-68, RAW-264.7 és HUVEC sejteket kezeltünk 1, 2, 4 vagy 6 mM homociszteinnel plusz 10, 20 vagy 40 μ M PJ34-gyel. A PJ34 kezelés egyik sejt típus esetében sem volt hatással a homocisztein által előidézett sejtpusztulásra. Abból a célból, hogy az oxidatív stressz szerepét kizárjuk a homocisztein által előidézett sejtpusztulásban, a kísérleteket elvégeztük az antioxidáns N-acetil-ciszteinnel is: HUVEC sejteket kezeltünk 1, 2, 4 vagy 6 mM homociszteinnel plusz 5 mM N-acetil-ciszteinnel 24 órán keresztül. Az N-acetil-ciszteinnel nem volt hatása a homocisztein által kiváltott sejtpusztulásra. Továbbá a homociszteinnel kezelt sejtekben nem tudtunk szabadgyök képződést sem kimutatni. Vizsgáltuk a homocisztein hatását a p38 MAPK, p42/44 MAPK, JNK és PKB/Akt jelátviteli útvonalak aktivitására is. A homocisztein gátolta a p38 MAPK és p42/44 MAPK foszforilációt, azonban a PJ34-nek nem volt hatása a gátlásra. Luciferáz aktivációs teszttel vizsgáltuk a homocisztein hatását az NF- κ B transzkripció faktor aktivációjára. WRL-68 sejteket 30, 60, 90, 120, 180 percig, illetve 18-20 órán át

kezeltünk homociszteinnel 0,25–2 mM koncentrációban. A mért NF- κ B aktivitás nem mutatott eltérést a különböző csoportok között. A homocisztein hatását az apoptózis kialakulására áramlási citometriával vizsgáltuk. 20 órán át tartó homocisztein kezelés dóziszfüggően apoptózist indukált WRL-68 és HUVEC sejtekben. WRL-68 sejtek esetében 6 mM-os homocisztein kezelést követően szignifikánsan (négyeszeresére) nőtt az apoptózis késői fázisába jutott sejtek száma. HUVEC sejtekben 6 mM-os homocisztein kezelés négy-ötszörösére emelte mind a korai, mind a késői apoptotikus fázisban lévő sejtek számát.

A fenti eredmények arra utalnak, hogy az általunk vizsgált rendszerekben a homocisztein nem szabadgyök generáláson keresztül okoz sejtpusztulást. A sejtpusztító hatás pontos mechanizmusának kiderítése további kutatásokat tesz szükségessé.

A hidrogén-peroxid által kiváltott oxidatív stressz gátlásának vizsgálata

A PJ34-gyel történő PARP gátlás a homocisztein által kiváltott sejtpusztulástól eltérően kivédte a hidrogén-peroxid által előidézett sejtpusztulást WRL-68 sejt kultúrában, ezért kísérleteinket ebben az irányban folytattuk tovább.

Az irodalomból ismert, hogy a JNK és p38 MAPK korai aktivációja hozzájárul az oxidatív stressz által kiváltott sejtpusztuláshoz. A MAPK-ok defoszforilációval történő inaktiválásában játszanak szerepet a MAPK foszfatázok (MKP), melyek közül az MKP-1 a JNK-t és a p38 MAPK-t is defoszforilálja/inaktiválja. Az oxidatív stressz egyrészt fokozza az MKP-1 expresszióját, másrészt gátolja is az MKP-1 katalitikus aktivitását, vagyis az MKP-1 aktivitás egy összetett szabályozási mechanizmus függvénye. Oxidatív stresszben a JNK és p38 MAPK korai aktivációját követően az MKP-1 aktivitása is emelkedik, ami a JNK és p38 MAPK defoszforilációjához, inaktiválásához vezet; ez a folyamat a citoprotekcióban játszik szerepet.

Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a PARP-1 gátlása a p38 MAPK és JNK jelátviteli utakat, valamint az MKP-1 aktivitását és expresszióját oxidatív stressz esetén. Ezen kívül vizsgáltuk a PARP-1 gátlás hatását a sejtek túlélésére és a fent említett kinázok aktivitására MKP-1 hiányos sejtekben. Először a PARP-1 gátlás hatását vizsgáltuk hidrogén-peroxiddal kiváltott oxidatív stresszben a sejtek túlélésére. Meghatároztuk a kezelés idő- és dóziszfüggését, mely szerint a 3 órán át tartó 300 μ M-os H_2O_2 kezelés a sejtek kb. felének pusztulását váltotta ki (40-50% túlélés), amit 10 μ M PJ34 farmakológiai PARP gátló jelentősen kivédett (80-90% túlélés). Ezt követően került sor a jelátviteli útvonalak analizésére immunoblot módszerrel. A H_2O_2 kezelés fokozta a JNK és p38 MAPK foszforilációt, míg ezt a hatást a PJ34 kivédte. Mivel az MKP-1 aktivitása befolyásolhatja a MAPK foszforilációt, ezért a következő lépésben az MKP-1 aktivitását vizsgáltuk Western-blot technikával. A H_2O_2 és a PJ34 kezelés (mindkettő önmagában) is az MKP-1 expresszió emelkedéséhez vezetett. Oxidatív stressz esetében a PJ34 (H_2O_2 +PJ34) további MKP-1 szint emelkedést váltott ki. Fenti eredményeink megerősítésére az említett kísérleteket elvégeztük olyan WRL-68 sejteken is, amelyekben a PARP-1 gátlását nem farmakológiai módon értük el. A sejteket a PARP-1 DNS kötő doménjét expresszáló plazmiddal transzfektáltuk (transziens transzfekció). Az overexpresszált DNS kötő domén a sejtben található vad típusú PARP-1 aktiválódását kompetitív módon gátolja. A kísérletek egy másik részében a PARP-1 gátlását RNS lecsendesítéssel értük el a sejtekbe történő specifikus siRNS transzfektálásával. Mindkét módszerrel előidézett PARP-1 gátlás esetében a fentiekkel egyező eredményeket kaptunk. Ezen eredmények arra utaltak, hogy a PARP-1 gátlása az MKP-1 aktiválásán keresztül gátolhatja a JNK és a p38

MAPK útvonalakat. A következő lépés ennek a feltételezésnek a bizonyítása volt. A sejtekben az MKP-1 expressziót siRNS génelcsendesítéssel gátoltuk, majd a sejtek túlélését vizsgáltuk H₂O₂, PJ34 és H₂O₂+PJ34 kezelést követően MTT sejt túlélési esszével és áramlási citometriával. Az MKP-1 mennyiségének csökkenése a sejtpusztulás emelkedéséhez vezetett: a kontroll és a csak PJ34-gyel kezelt sejtekben kisebb mértékű apoptózis/nekrózis volt megfigyelhető, míg a H₂O₂ kezelt sejtekben az MKP-1 hiányában felerősödött a H₂O₂ sejtpusztító hatása. Továbbá a PJ34 kezelés az MKP-1 hiányában nem védte ki a H₂O₂ citotoxikus hatását. Úgy tűnik tehát, hogy a PARP-1 gátlásával kiváltott citoprotekció feltétele az MKP-1 expressziója. A következőkben az MKP-1 lecsendesítés hatását vizsgáltuk a p38 MAPK és JNK aktivitására oxidatív stresszben. Az MKP-1 hiányos sejtekben a H₂O₂ kezelés mindkét kináz foszforilációját szignifikánsan megemelte, amit a PJ34-gyel történő együttes kezelés csak kismértékben csökkentett. Ezt követően az oxidatív stressz és PARP gátlás hatását vizsgáltuk az MKP-1 expressziójára kvantitatív real-time PCR módszerrel: a PJ34 kezelés nem szignifikánsan, míg H₂O₂ és H₂O₂+PJ34 kezelés szignifikánsan (2, illetve 3-szorosára) emelte az MKP-1 mRNS szintet. A nukleáris és a citoplazmatikus MKP-1 fehérjék mennyiségét Western-blottal összehasonlítva azt is kimutattuk, hogy PARP-1 gátlás esetén a citoplazmában az MKP-1 mennyisége emelkedik.

A fenti eredményeket értékelve az alábbi modellt állítottuk fel a PARP gátlás szerepére vonatkozóan oxidatív stresszben: A JNK és p38 MAPK-ok korai aktiválódása jelentősen hozzájárul a sejtek pusztulásához. Az MKP-1, melynek expressziója a PARP-1 gátlás hatására fokozódik, visszaszorítja a JNK és p38 MAPK foszforilációt, ezáltal fokozza a protektív hatást a sejtpusztulással szemben. Korábban úgy gondolták, hogy a PARP-1 önmaga vagy az ADP-ribozilált fehérjéken keresztül szabályozza a citoplazmatikus jelátviteli utakat. Eredményeink arra utalnak, hogy ehelyett vagy ezen kívül a PARP-1 olyan fehérjék expresszióját szabályozhatja, melyek a citoplazmában más jelátviteli utakat szabályoznak.

Eredményeinket a *Free Radical Biology & Medicine* c. folyóiratban közzétettük.

A MAPK jelátviteli utak és az MKP-1 szerepe az LPS indukálta gyulladás modellben

A fent említett jelátviteli utak szerepét tanulmányoztuk egy másik, nevezetesen az LPS (lipopoliszacharid) indukálta gyulladás modellben is. Az LPS a célsejtekben a MAPK és a PI3K/Akt jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül citokinek és más mediátorok felszabadulását idézi elő, melyek gyulladásos választ váltanak ki a környezetben. Néhány növényi eredetű polifenol vegyület (pl. resveratrol, ferulsav) anti-inflammatórikus és antioxidáns tulajdonsága már korábbról ismert. Kísérleteinkben egy polifenol degradációs végtermék, a ferulaldehid hatását vizsgáltuk LPS-indukálta RAW-264.7 macrophagokban. Kimutattuk, hogy a ferulaldehid koncentráció-függően csökkenti az LPS-indukálta ROS képződését, valamint gátolja a p38 MAPK, JNK és ERK1/2 MAPK-ok aktiválódását (foszforilációját). A ferulaldehid továbbá mind rövid (10 perc), mind hosszú távon (24 óra) mérsékelte az NF- κ B transzkripció faktor aktivációját, valamint növelte a sejtekben az MKP-1 expresszióját. Az eredmények arra utalnak, hogy a ferulaldehid az anti-inflammatórikus hatását az MKP-1 mennyiségének megemelésén keresztül a MAPK-ok defoszforilálásával, inaktiválásával fejt ki.

Ezek az eredmények a *Journal of Leukocyte Biology* nevű folyóiratban kerültek közzétételre.

A homocisztein csökkentő B-vitamin szupplementáció szerepe a cardiovascularis prevencióban

A fent említett vizsgálatokkal párhuzamosan érdeklődési körünkbe került a homocisztein által kiváltott érlemeszesedés lehetséges prevenciójának kérdése. A homocisztein-csökkentő B-vitamin szupplementáció jelentős szerepet játszhatna az atherosclerosis prevenciójában, ha a preventív hatás igazolható lenne. Számos klinikai, epidemiológiai és statisztikai tanulmány bizonyítja, hogy a vér emelkedett homocisztein szintje a vascularis betegségek önálló, független rizikófaktora. Számos vizsgálat bizonyítja azt is, hogy a homocisztein oxidatív stressz által biokémiai és immunológiai folyamatokat indukál, melyek atherogenesishez, állatkísérletekben pedig atherosclerosis kifejlődéséhez vezetnek. A plazma folsav koncentráció inverz összefüggésben áll a plazma homocisztein koncentrációjával, és a folsav szupplementáció csökkenti a plazma homocisztein szintjét.

A homocisztein-csökkentő B-vitamin terápiáknak a cardiovascularis betegségek prevenciójában való hatékonyságát betegek tízezreiben, placebo-kontrollált trial-ekben vizsgálták. Mivel a vitamin szubsztitúciós terápia minden tekintetben javítja az atherogenesis progressziójára jellegzetes paramétereket, meglepő volt, hogy az elmúlt néhány évben publikált nagy prospektív, placebo-kontrollált klinikai trial-ekben (VISP, HOPE-2, NORVIT, HOST, WAFACS, WENBIT) a homocisztein-csökkentő B-vitamin komplex szupplementáció nem volt hatásos a cardiovascularis és cerebrovascularis betegségek szekunder prevenciójában, figyelemmel újabb szívinfarktus és stroke megjelenésére és a cardiovascularis/cerebrovascularis halálózásra, mint klinikai végpontokra. Fölvetődik a kérdés, hogy a B-vitamin szupplementáció valóban hatástalan-e a vascularis betegségek prevenciójában, vagy bizonyos tényezők miatt a kedvező hatás nem volt kimutatható az említett trial-ekben. Ezért a trial-eket megvizsgáltuk kritikai szempontból, és úgy találtuk, hogy azok eredményei torzítottak, aminek okát a trial-ek inadekvát konstrukciójában látjuk („inappropriate trial settings”). A trial-ekben figyelmen kívül hagytak néhány tényezőt („confounding factors”), mint például a lipid csökkentő szerek (statinok) és thrombocytá gátlókat (pl. aspirin) folyamatos alkalmazását. Ezeknek a használata a kontrollált periódus alatt vagy előtt az eredmények torzításához és téves értékeléséhez vezethetett.

A statin és thrombocytá-gátló kezelésre nézve a trial-ekben csak részlegesen van információ. A NORVIT trial-ben a résztvevők „standard postinfarctus utáni terápiában” részesültek: a betegek ~87%-a acetilszalicilsav, ~80%-a statin kezelést kapott mind a placebo, mind a vitamin csoportban. A WENBIT trial-ben a placebo és vitamin csoport tagjainak ugyanakkora hányada részesült acetilszalicilsav (~90%), clopidogrel (~24%) és statin (~88%) kezelésben. A WAFACS trial-ben a résztvevők ~50%-a aspirint, ~34%-a lipid-csökkentő gyógyszert kapott. Továbbá ebben a trial-ben a résztvevők körülbelül fele mind a placebo, mind a vitamin csoportban napi 432 µg vagy annál több folsavat kapott. A HOPE-2 trial-ben a placebo és vitamin csoport ugyanakkora hányada részesült aspirin vagy más thrombocytá-gátló (~80%), lipid-csökkentő (~60%), illetve multivitamin (~12%) kezelésben.

A statinok és az aspirin cardiovascularis preventív hatása csökkentheti vagy eltörölheti a vitamin- és placebo csoportok közötti különbséget a vizsgált végpontokra nézve. Ha mind a vitamin, mind a placebo csoport résztvevői olyan gyógyszereket szedtek (statint, aspirint), melyek hatékonyak a cardiovascularis és cerebrovascularis betegségek prevenciójában, akkor ezek elmosásuk, illetve maszkírozzák a vitamin kezelés hatásait, és az eredmények nem tükrözik a vitamin kezelés *per se* hatékonyságát. Különbségek az aktív (vitamin) és a

placebo csoportok között csak akkor mutatkoznának, ha a vitamin plusz statin vagy/és aspirin hatásai összegeződnének (additív hatás), azonban ezidáig ilyenről nincs tudomásunk. A statinok – függetlenül a koleszterin-csökkentő hatástól – számos pleiotrop, vasoprotektív hatással rendelkeznek, melyek hasonlóak a folsavéhoz: mindkettő javítja az endothelfunkciót, növeli a felhasználható NO mennyiségét, antioxidáns és immunmodulátor hatást fejtenek ki, gátolják a gyulladásos reakciókat, és stabilizálják a scleroticus plakkot. Ezért, ha a statinok kiaknázzák az érfal gyógyító és regeneratív kapacitását, elfedik a folsav pleiotrop hatásait. Ennélfogva az ezekből a trial-ekből származó eredmények félrevezetőek. Mindazokat a személyeket akik statin és/vagy aspirin kezelésben részesültek, ki kellett volna zárni ezekből a vitamin trialek-ből, egyébként az eredmények korrekt interpretációjára nincs mód.

Az elmondottakból levonható az a következtetés, hogy a nagy vitamin trial-ek nem rendelkeznek azzal a súllyal, melynek alapján eldönthető lenne a vitamin szubsztitúciónak a cardiovascularis és cerebrovascularis betegségek prevenciójában valószínűsíthető hatékonysága.

Analízisünk eredményeit a Cardiovascular Therapeutics c. folyóiratban közzétettük.