

**Role of MAP kinases and PI-3-kinase/Akt pathway in the
regulation of retinal degeneration**

Ph.D. thesis

Author: DR. MESTER LÁSZLÓ



Department of Biochemistry and Medical Chemistry

University of Pécs Medical School

Pécs, Hungary

2010

1. INTRODUCTION

Ischemia and oxidative stress alone or as a part of ischemia can be found in the pathogenesis of several disease affecting large populations in developed countries. Such diseases are particularly the cardiovascular, neurovascular diseases and neurodegenerative disorders. From the aspect of ophthalmology, various ocular and systemic diseases that lead to visual impairment or blindness (e.g., central retinal artery occlusion, ocular ischemic syndrome, diabetic retinopathy, hypertension, glaucoma and AMD) are accompanied by retinal ischemia (Uckermann et al. 2005, Osborne et al 2004, Feigl 2009). Furthermore, the light absorption of the retina generates increased formation of oxidative/nitrosative agents, which may cause retinal injury as it can be observed in a vision-threatening retinal disease, the age-related macular degeneration (AMD) (Liang et al 2003, Winkler et al 1999, Cai et al 2000, Jarret et al 2008).

It is noticeable that ischemia and oxidative stress both can be found in the pathogenesis of diseases leading the “toplist” of blindness in the developed world (AMD, glaucoma, DRP). Hence, it is of utmost importance to understand the events involved in retinal injury caused by ischemia and/or oxidative stress, both from the pathological and the potential therapeutic point-of-view.

Retina: Embriologically the retina belongs to the central nervous system. Anatomically it is a very delicate, and transparent membrane. The main function of the retina is transforming the light-stimuli from the outside world into a nerve impulse that reaches the brain via the optic nerve. The retina is loosely attached to the choroid via the retinal pigment epithelium (RPE), that consists of a monolayer of hexagonal cells. The main functions of the RPE are: vitamin A metabolism, maintenance of the outer blood-retinal barrier, phagocytosis of the photoreceptor outer segments, absorption of light, heat exchange, formation of the basal lamina, production of the mucopolysaccharide matrix surrounding the outer segments, and active transport of materials in and out of photoreceptors.

Ischemia: Ischemia refers to a pathological situation involving an inadequacy (not necessarily a complete lack of) blood flow to a tissue, with failure to meet cellular energy demands. The ischemic injury reflects the effect of a self-reinforcing destructive cascade called “ischemic cascade”, which is an extremely complex (not completely understood)

succession or cascade of interrelated pathological changes and biochemical responses at the cellular and molecular level initiated by energy failure.

Oxidative stress: Oxidative stress represents an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and biological system's ability to readily detoxify the reactive intermediates or to repair the resulting damage. The excessive formation of ROS leads to lipid peroxidation, protein oxidation and DNA. All of these effects in connection with the mitochondrial damage results in cell death, hence ROS has an important role in the pathogenesis of diseases, including neurodegenerative and cardiovascular diseases.

PARP (poly(ADP-ribose) polymerase): The abundant nuclear enzyme PARP-1 is activated by single- and double- strand breaks of DNA. For many decades, PARP was mainly viewed as an enzyme primarily involved in DNA repair and maintenance of genomic stability. However, over the last decade, an additional role of PARP has been identified in the sequale of oxidative and/or nitrosative stress. The PARP-1 is involved in the development of diseases associated with oxidative stress with dual mechanism: 1. excessive activation of the enzyme results in cell death caused by energy deficiency, 2. the enzyme is involved in the regulation the NFkB-dependent transcription of inflammatory mediators. Therefore, in diseases where necrosis dominates (stroke, myocardial infarction, arteria centralis retinae occlusion) the former, while in the inflammatory type of diseases not accompanied by massive cell death (colitis, diabetes, uveitis, arthritis) rather the latter mechanism dominates.

PACAP: PACAP belongs to the vasoactive intestinal peptide (VIP)/secretin/glucagon family. The biological actions of PACAP are very diverse. Among others, the neuropeptide influences reproductive functions, circadian rhythm, thermoregulation, feeding, depression, memory, urinary reflexes, inflammatory reactions, and development. PACAP has well-established neurotrophic and neuroprotective functions as well.

2. STUDY OBJECTIVES

Although involvement of PARP activation in various ischemia models has been thoroughly studied, only circumstantial evidences are available for the role of PARP activation in chronic hypoperfusion-induced neurodegenerative processes. Therefore, the aim of the present study was the following :

- to demonstrate the activation of PARP as a major regulator of cell death in a chronic hypoperfusion-induced retinal degeneration model in rat (bilateral common carotid occlusion induced retinal degeneration)
- to evaluate the effect of PARP inhibition (by HO3089) in this model by assessing chronic hypoperfusion-induced morphological changes
- to determine the activation state of critical kinase cascades, such as MAP kinases and PI-3K-Akt in hypoperfusion-induced retinal degeneration

In spite of the numerous studies showing the protective effects of PACAP in the retina, no data are currently available on the potential protective effect of PACAP against oxidative stress in pigment epithelial cells. Therefore, it seemed reasonable to study whether PACAP is able to increase cell survival in oxidative stress-induced apoptosis of human pigment epithelial cells. The aim of present study was the following:

- to elucidate the effect of PACAP on cultured human pigment epithelial cells (ARPE-19 cells) in oxidative stress
- to detect the effect of PACAP on apoptosis and necrosis on cultured ARPE-19 cells by Annexin V and propidium iodide staining
- to detect the effect of PACAP on mitochondrial depolarization occurring in apoptosis by using the JC-1 assay for flow cytometry

3. CONCLUSION

The activation status of PARP in BCCAO model

- We provided evidence for establishing PARP activation as a major regulator of the cell death process in chronic hypoperfusion-induced neurodegeneration. Activation of PARP in the retina was revealed by assessing poly-ADP-ribosylation of target proteins. Treatment of the eye with the PARP inhibitor -HO3089- attenuated the BCCAO-induced self-poly-ADP-ribosylation of PARP.

The effect of PARP inhibitor –HO3089- on retinal morphology in BCCAO model

- We provide histological evidence for the retinoprotective effect of PARP inhibition. Intravitreal PARP inhibition -HO3089- treatment following BCCAO led to a nearly intact appearance of the retinal layers. This is well supported by the morphometric measurements.

The involvement of different cell signaling pathways in the mechanism of PARP-inhibition-induced neuroprotection in this model.

- We determined that activation of PI-3K-Akt and ERK1/2 was cytoprotective, and inhibition of JNK and p38 MAPK cytotoxic signaling pathways were very likely involved in the mechanism of PARP-inhibition-induced neuroprotection in this model.

In summary, based on these results PARP inhibition may represent a molecular target in the clinical management of ocular ischemic syndrome, and in a broader sense, chronic hypoperfusion-induced neurodegenerative diseases.

Effect of PACAP on cell viability of human pigment epithelial cells

- We showed that PACAP treatment diminished the effect of cell death caused by H₂O₂ treatment in retinal human pigment epithelial cell line. Furthermore, the effect of PACAP1-38 could be blocked by PACAP6-38 (inhibitor of PACAP1-38) co-application

Concentration-dependency of PACAP

- We found that the protective effect of PACAP was concentration dependent. From the concentration range of 1pM to 1μM, the best result was achieved by 100 nM PACAP1-38 treatment.

Effect of PACAP in cell death

- PACAP administration led to a significant increase in the percentage of living cells and a reproducible decrease in the rate of apoptosis in cells treated with H₂O₂.

Effect of PACAP on mitochondrial depolarization

- An increase of apoptotic cell number (mitochondrial depolarization) was observed in the H₂O₂-treated group with a lower number of living cells. PACAP administration led to a significant increase in the percentage of living cells and a decrease in the percentage of apoptotic cells exposed to H₂O₂.

In summary, our present results show that PACAP has antiapoptotic effects against oxidative stress-induced cell death in retinal human pigment epithelial cells, providing an additional piece of evidence for the retinoprotective effects of PACAP. Thus PACAP may take part in future clinically effective treatments of retinal diseases caused by oxidative stress.

4. PRACTICAL MEANING

There are extremely complex molecular mechanisms in intracellular signaling that we still do not know. Thus the identification and the elucidation of the role of these pathways are particularly important since it leads to identification of new drug targets and this can be the first step in the development of new therapeutic agents. On the other hand, the “deeper” exploration of the mode of action of new and existing drugs give the clinician the chance to treat the patient more effectively.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank to my program leader Prof. Dr Balázs Sümegi for having given the possibility to work at the Department of Biochemistry and giving me support. I am grateful to Dr Dóra Reglődi and Prof. Dr Ferenc Gallyas Jr. for their tutorial work.

I would like to thank the following people who worked with me during the past 3 years and helped my work not only with giving excellent professional advice, but with maintaining friendly atmosphere:

Dr Krisztina Kovács, Alíz Szabó, Enikő Hocsák, Dr Péter Kiss, Krisztina Szabadfi, Tamás Atlasz from University of Pécs and Prof. Dr Bálint Kovács, Dr Balázs Kovács and all from the Department of Ophthalmology of the Kaposi Mór County Hospital.

This work is based on the following articles:

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

Further publications:

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, Pages 103-110

**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 neurotrófikus 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, Rác 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 neuroprotekciónak 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 neuroprotekciónak 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ –vel kezelt sejteken szignifikánsan növelte az élő sejtek arányát és reprodukálhatóan csökkentette az apoptotizáló sejtek arányát.

PACAP hatása a mitokondriális depolarizációra

- H₂O₂- 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 H₂O₂ –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. Sümei 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

