

*The critical role of MAP-kinases and PI3K-Akt signaling
pathways in inflammation and oxidative stress*

PhD Thesis

Eszter Bognár

Doctoral School leader: Balázs Sümegi Ph.D., DSci

Supervisor: Ferenc Gallyas Jr. Ph.D., DSci



**University of Pécs, Medical School
Department of Biochemistry and Medical Chemistry
Hungary**

2013

Abbreviations

AP-1: activator protein-1

Akt: Protein Kinase B (PKB)

Ask1: apoptotic signal regulating kinase

BAD: Bcl-2 associated death promoter

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FKHR: forkhead homolog rhabdomyosarcoma transcription factor

GSK-3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

I κ B: inhibitors of NF- κ B

IKK: inhibitor of NF-kappa B kinase

iNOS: inducible nitric oxide synthase

IRAK1: interleukin-1 receptor-associated kinase-1

IRAK4: interleukin-1 receptor-associated kinase-4

JNK: c-jun N-terminal kinase

LBP: LPS binding protein

LPS: lipopolysaccharide

MAPK: mitogen activated protein kinase

MKP-1: MAPK phosphatase -1

MyD88: myeloid differentiation primary response gene 88

NAC: N-acetyl cysteine

NADPH-oxidase: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

NEMO: NF- κ B essential modifier

NF- κ B: nuclear factor- κ B

P: phosphorylated

PARP: poly ADP-ribose polymerase

p38-MAPK: p38 mitogen activated protein kinase

p65: transcription factor p65 (RelA)

p50: NF-KappaB1

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PTEN: phosphatase and tension homolog deleted on chromosome 10

ROS: reactive oxygen species

TAB: TAK1-binding protein

TAK1: transforming growth factor- β -activated kinase 1

TBK1: TANK binding kinase 1

TIRAP: TIR domain-containing adaptor protein

TLRs: Toll-like receptors

TLR4: Toll-like receptor 4

TNF α : tumor necrosis factor- α

TRAF6: TNF receptor-associated factor 6

TRAM: TRIF-related adaptor molecule

TRIF: TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β

Introduction

Inflammation and oxidative stress are main pathophysiological processes responsible for the cardiovascular morbidity and mortality. Both mechanisms activate and moderate same intracellular signal mechanisms. Recently, investigations focus to understand signal networks because they would become potential therapeutic target. On the other hand it may be consider to investigate the effect of new and “older” therapeutic drugs on signaling pathways.

Red wines are rich in different types of polyphenols and anthocyanins, and they have been reported to provide greater benefit in the prevention of cardiovascular diseases. Phenolic compounds have strong antioxidant, neuroprotective effect and their anticarcinogen and anti-inflammatory effects are also proven.

Malvidin and its glycosides are primary plant pigments playing an important role to protect plants from microbial infection and UV irradiation. Malvidin is responsible primarily for the color, and is included in the polyphenols of red wine together with other anthocyanidins, phenolic acids, flavonoids and trihydroxy stilbenes. Earlier studies have demonstrated that moderate red wine consumption reduce cardiovascular morbidity and mortality and have beneficial effects on chronic inflammatory diseases. These protective effects is contributed to the polyphenol contents of red wine.

The inflammatory response was extensively studied in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophage cells, which are very sensitive to LPS stimulation and respond by activation of the pro-inflammatory transcription factors; nuclear factor-kappaB (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1) resulting in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta (IL-1 β , IL-6, IL-8) and nitric oxide production. These markers are associated with gram-negative sepsis and other inflammatory diseases. Furthermore, LPS also induces production of reactive oxygen species (ROS) and activation of the nuclear enzyme poly ADP-ribose polymerase (PARP). ROS are capable of eliciting a variety of pathological changes, including peroxidation of lipids, proteins, DNA damage, and elevated level of ROS activates mitogen activated protein kinase (MAPKs) and inflammatory transcription factors. Probably as compensatory mechanisms, LPS induces activation of the cytoprotective phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway and expression of MAPK phosphates (MKP)-1. All these processes have significant role in innate immunity during the normal

immune response and in causing multiple organ failure and death during severe sepsis or septic shock.

The most investigated nutritional polyphenol, resveratrol was found to prolong lifespan, and was suggested as a potential anti-inflammatory, anti-aging, anti-cancer and protective cardiovascular agent. However, rather low bioavailability and abundance of resveratrol implies that other components may contribute substantially to the beneficial effects of red wine. A likely candidate is malvidin that exceeds resveratrol content at least 100 times in red wines. Recent data describe its beneficial effects in cardiovascular disease. On the other hand, only limited data are available about effect of malvidin on inflammatory processes and kinase signaling pathways. Therefore, in this study, we investigated the effect of malvidin on LPS induced processes in RAW 264.7 macrophages.

Another main goal of our study was to investigate oxidative stress which plays a crucial role of development and progression of cardiovascular diseases. Ischemia-reperfusion is one of the most common process is associated with enhanced formation of reactive oxygen species. Ischemia-reperfusion injury is a main pathophysiological process during acute cardiovascular events. Earlier studies widely investigated and searched potent drugs, which are able to promote cells against ischemia-reperfusion injury. Aim of these studies were to identify potential targets via can be modulated these mechanisms. Several studies have shown that ROS and proapoptotic signaling pathways play pivotal role in cell damage and death.

Reactive oxygen species (ROS) and elevated intracellular Ca^{2+} are implicated as important factors among the mechanisms leading to postischemic reperfusion injury. High levels of ROS can be generated during reperfusion from a variety of sources such as the xanthine oxidase system, the cyclo-oxygenase pathway of arachidonic acid metabolism, the respiratory burst of phagocyte cells and to a large extent, from the non-optimal operation of the mitochondrial electron transport chain. Elevated ROS levels can also induce oxidative DNA damage leading to single-stranded DNA breaks, which activate the nuclear protein-modifying and nucleotide-polymerizing enzyme poly (ADP-ribose) polymerase. PARP activation leads to NAD^+ and ATP depletion, which further destabilizes mitochondrial membrane system and eventually leads to apoptotic or necrotic cell death. Recently, inhibition of PARP was implicated in the therapy of myocardial infarction.

Among the kinase signaling pathways, PI-3K-Akt and mitogen activated protein kinase (MAPK) were implicated among the mechanisms of cardioprotection. Akt activation can be critical because Akt can phosphorylate a number of downstream targets leading to inactivation of GSK-3 β , the pro-apoptotic Bcl-2 family member BAD, caspase-9, and

forkhead homolog rhabdomyosarcoma transcription factor (FKHR), as well as to activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), p70 ribosomal S6 kinase and endothelial nitric oxide synthase. Recently, we have proved that activation of Akt pathway significantly contributed to the cytoprotective effect of PARP inhibition under pathological conditions, however no such mechanism was previously indicated among the molecular effects of calcium channel- and β -adrenergic receptor blockers.

Aim of the study

ROS plays a key role in the pathogenesis and progression of septic shock and ischemia-reperfusion injury. To investigate direct effect of ROS and activated signaling pathways support development of new therapeutic targets. Our studies focus to identify crucial signaling pathways involved in inflammation and oxidative stress used two separate model (cell culture and Langendorff perfused heart). We investigate the effect of malvidin on inflammatory response and the effect of Metoprolol, Verapamil and PARP inhibitor on ischemia-reperfusion injury.

1. We intended to determine antioxidant and anti-inflammatory effectivity of malvidin.
2. We wanted to compare antioxidant and anti-inflammatory effects of malvidin and resveratrol on the molecular basis to find out which component is most likely to account for the positive effects of moderate red wine consumption.
3. We wanted to know whether activation of PI-3K-Akt and MAPK signaling pathways are involved in the molecular action of Ca^{2+} antagonist and a β -adrenergic receptor blocker cardioprotective drugs.
4. We intended to compare the cardioprotective potential of PARP inhibition, Ca^{2+} antagonism and blocking of the β -adrenergic receptor.

Discussion

Antioxidant and anti-inflammatory effects of malvidin

In response to LPS, nuclear localization signal of cytosolic NF- κ B becomes unmasked resulting in nuclear translocation of the transcription factor. In the nucleus, NF- κ B becomes phosphorylated and acetylated, thus activated to bind to its consensus promoter DNA sequences. This binding triggers the expression of its target genes (Fig.) including pro-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion proteins, COX-2 and iNOS. These events are of pivotal importance in the development of inflammation-related chronic diseases. We demonstrated malvidin attenuates activating phosphorylation, nuclear translocation and binding to consensus DNA sequence of NF- κ B. These data are completely in line with the results of other groups. Furthermore, we found malvidin antagonised NF- κ B activation at much lower concentrations than trans-resveratrol. This indicates malvidin could account for the beneficial effects of red wine in inflammation-related chronic diseases. Furthermore, these results explain the finding of the 1999-2002 US National Health and Nutrition Examination Survey describing malvidin intake negatively correlates with serum C-reactive protein levels.

Binding of LPS to TLR4 receptor triggers activation of the MAPKs (Fig.) via various signaling pathways such as the myeloid differentiation primary response gene (MyD)88—interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)—tumor necrosis factor (TRAF)-6—transforming growth factor- β activated kinase (TAK) pathway. In turn, MAPK pathways are involved in activation of the pro-inflammatory transcription factors; NF- κ B and AP-1. In the present study, we observed malvidin attenuated LPS induced activation of all three MAPKs. However, this effect differed for the three kinases (JNK>p38>>ERK). By using specific kinase inhibitors, we aimed to establish the significance of these results. In agreement with others we found JNK and p38 inhibitors significantly reduce LPS induced nuclear translocation and DNA binding of NF- κ B. However, ERK inhibition was ineffective. These data indicate early inflammatory response in RAW 264.7 macrophages is mediated, at least partially, via the aforementioned pathway. On the other hand, it is likely that malvidin decreased LPS evoked MAPK activation undirectly since in *in vitro* kinase assays malvidin

did not exert any effect. Most likely, it regulated MAPK activation by inhibiting other key mechanisms; ROS production.

MKP-1 is the major enzyme responsible for the dephosphorylation, thereby inactivation of all three MAPKs. It is critically involved in inflammatory signaling of macrophages, and is responsible for switching off pro-inflammatory cytokine production *in vitro* and *in vivo*. In agreement with others we found increased expression of MKP-1 in the LPS stimulated macrophages both at the mRNA and protein level. However, this was accompanied by an elevated activation of the MAPKs indicating MKP-1 induction was not sufficient to suppress LPS-induced MAPK activation. Malvidin enhanced MKP-1 expression both in the unstimulated and LPS treated cells, which was accompanied by decreased activation of the MAPKs. This suggests MKP-1 expression, when augmented by malvidin, could counteract the activating mechanisms induced by TLR4 signaling (Fig.). However, we found significant differences among the MAPKs regarding malvidin's effectivity in reduction of their LPS induced activation. Furthermore, these differences were reflected in the anti-inflammatory effect of MAPK inhibitors. All these data indicate, the network of MAPK activation and inhibition signaling is complex, and balance of the regulating processes differs for each MAPK.

Previous studies established *in vitro* antioxidant characteristics for malvidin. In agreement with these results, we found malvidin attenuates ROS production by LPS-treated RAW264.7 macrophages at an IC₅₀ value comparable to that of trans-resveratrol. At the same time, this modulated a complicated network of processes produced and regulated by ROS (Fig.) including mitochondrial integrity and activation of MAPKs, Akt and PARP. It is feasible that LPS induced NF- κ B activation in our experimental system was mediated partially via the TLR4-NADPH oxidases-ROS-PARP pathway. However, the complexity of the involved networks made it hard to distinguish between cause and consequence or identify upstream and downstream events. Nevertheless, it is likely that due to its antioxidant property, malvidin decreases ROS production, thereby reduces PARP and MAPK activation as well as oxidative damage to MKP-1. Reduced PARP activation leads to decreased NF- κ B and MAPK activation, increased expression of MKP-1 and activation of the PI3K—Akt pathway that together with the decreased ROS results in maintained mitochondrial integrity (Fig.). Importance of the antioxidant mechanism in malvidin's anti-inflammatory effect is emphasized by us and others reporting NAC inhibits LPS induced NF- κ B activation.

Recently it has been shown that Akt is a downstream target of TRIF/TANK-binding kinase 1 (TBK1), and there is an association between endogenous TBK1 and Akt in LPS

treated macrophages. TBK1 enhances phosphorylation of Akt on Ser(473), and siRNA-mediated silencing or knocking out of TBK1 compromises LPS induced Akt activation. On the other hand, elevated ROS also activates the PI-3K—Akt pathway via oxidative inactivation of the phosphatase and tensin homolog (PTEN) that inactivates the pathway by dephosphorylation. Akt activation may result in mitochondrial protection by phosphorylation, thereby inactivation of Bad, and indirect NF- κ B activation. As we found, malvidin activated Akt both in the unstimulated and LPS-treated macrophages. Most likely, this effect of malvidin was also due to its antioxidant property. The augmented activation of Akt was most probably involved in malvidin's protective effect on LPS induced mitochondrial depolarization (Fig.). On the other hand, Akt was implicated in the phosphorylation thereby activation of NF- κ B p65. Accordingly and in agreement with Zhao et al., we found that inhibition of the PI-3K-Akt pathway attenuated NF- κ B activation suggesting a partial involvement of this pathway in mediating LPS's effect. All these data suggest Akt activating effect was unlikely to be involved in malvidin's anti-inflammatory effect.

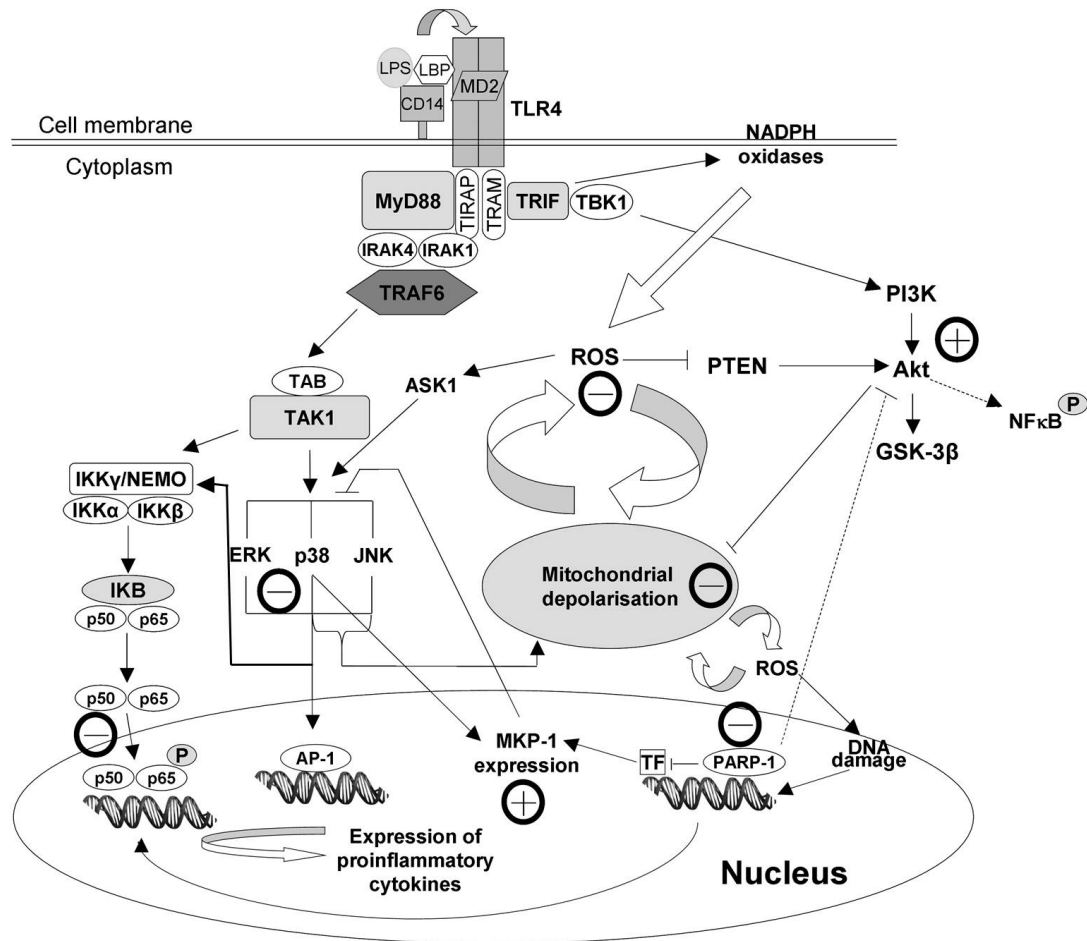


Figure. Effect of malvidin on LPS induced pathophysiological changes in RAW 264.7 macrophages. Well documented effects are indicated by solid lines, whereas effects involving yet unidentified mediator(s) or events are represented by dashed line. Lines with pointed end denote activation, whereas lines with a flat end indicate inhibition. Activating or inhibitory effect of malvidin is indicated by a circled + or – next to the line, respectively. LPS induces activating phosphorylation, nuclear translocation and DNA binding of NFκB, induction of ROS production, PARP activation, activation of MAPKs, MKP-1 expression, activation of the phosphatidylinositol-3 kinase-Akt pathway and destabilization of the mitochondrial membrane systems. Malvidin attenuates ROS production, mitochondrial destabilization, and activation of PARP and MAPKs. It also augments Akt activation and MKP-1 expression resulting in diminished activation of NFκB.

Comparison of cardioprotective effects of PARP inhibition, Ca²⁺ antagonism and β-adrenergic receptor blocking

In the present study, we assessed cardioprotective as well as Akt and ERK activating effects of two substances used in the clinical management of ischemic heart diseases, namely, Verapamil and Metoprolol in Langendorff perfused hearts during ischemia-reperfusion cycle, and compared them to that of HO-3089, a PARP inhibitor used as a positive control throughout the experiments.

Among other mechanisms, L-type Ca²⁺-channel antagonists were reported to protect high-energy phosphates and cardiac functions as well as reduction of acidosis, infarct size in different ischemia models. Cardioprotecting mechanisms of β-adrenergic receptor blockers were reported to include improvement of cardiac functions, decrease of lipid peroxidation and cardiomyocyte apoptosis. Although it is very difficult to compare the results of different laboratories due to the different models and different ischemia and reperfusion protocols, our results on the different parameters of cardioprotection by Verapamil and Metoprolol were comparable with that of other laboratories.

In our experimental setup, we monitored the high-energy and inorganic phosphate levels during a 15 min equilibrating normoxic perfusion, and any significant deviation from the starting values in case of the untreated hearts resulted in the rejection of the given heart from the experiment. In the same way, we excluded those hearts treated or not, which did not regain spontaneous pulsing during the reperfusion period. We used a single concentration for Verapamil and Metoprolol since they were extensively studied in the past, and their effective concentrations in Langendorff-perfusion experiments were well established. The concentration (25μM) of HO-3089 was found to protect hearts against ischemia-induced damages in previous experiments.

According to our data, Verapamil and Metoprolol improved the recovery of creatine phosphate, ATP and pH, and the reutilization of inorganic phosphate in hearts subjected to ischemia-reperfusion significantly, although less effectively than HO-3089 did. The substances significantly attenuated oxidative myocardial damages, which were characterized by decreased lipid peroxidation and protein oxidation too. Furthermore, the favorable changes in cardiac energetics were accompanied by improved recovery of functional cardiac parameters and reduced infarct size.

We have previously demonstrated that activation of the cytoprotective PI-3 kinase/Akt pathway significantly contributed to cardioprotective and cytoprotective effects of PARP

inhibition. Activated Akt can phosphorylate several regulatory proteins, including GSK-3 β , caspase-9, BAD, or FKHR. Phosphorylation and so inactivation of pro-apoptotic BAD protein contribute to the stabilization of mitochondrial membrane systems and may prevent the release of pro-apoptotic proteins, i.e. cytochrome c or apoptosis-inducing factor. Moreover, Akt can also phosphorylate and inactivate caspase-9, which can result in the blockade of cytochrome c/Apaf-1/caspase-9/caspase-3 pathway.

Although ERK 1/2 is considered to be mainly involved in growth factor-induced mitogen signaling and cellular differentiation, this kinase was reported to exhibit protective roles under circumstances of oxidative stress through the inhibition of apoptosis by downregulating c-jun N-terminal kinase (JNK) as well as caspase-3. ERK was also brought into connection with delayed cytoprotection, because its sustained activation seemed to mediate late cardiomyocyte protection after simulated ischemia-reoxygenation.

Because of their indicated involvement in cytoprotection, we studied effect of Verapamil and Metoprolol on Akt and ERK 1/2 phosphorylation during ischemia-reperfusion. To demonstrate activation of Akt, we determined phosphorylation of its downstream target, GSK-3 β too. As we found, all the substances induced significantly elevated activation of Akt and ERK1/2 either in normoxia or after ischemia-reperfusion. We found even a strong correlation between extent of recoveries of creatine phosphate levels and Akt or ERK2 activation for the substances studied indicating a crucial role of Akt and ERK2 activation among the cardioprotective mechanisms of Verapamil and Metoprolol. An increasing number of evidence suggests that β -adrenergic receptor antagonists can induce β -arrestin-mediated trans-activation of epidermal growth factor receptor leading to activation of the down-stream target ERK, and a similar mechanism was reported for Akt activation that involved β -arrestin-1 and insulin-like growth factor 1. Although linking of L-type calcium channel blockers to Akt and ERK activation seems more elusive, calmodulin-dependent cyclic nucleotide phospho-diesterase that was indicated as a key regulator in the cross talk between cyclic nucleotide- and Ca²⁺-dependent as well as Ca²⁺-independent-signaling pathways might play role.

Regardless of the mechanism, for establishing physiological significance of the activation of these kinases in the cardioprotection by the β -adrenergic receptor blocker and the Ca²⁺ antagonist, we inactivated these kinases by inhibiting their respective upstream activator kinases during the ischemia-reperfusion cycle. The finding that inhibition of these kinases significantly decreased recoveries of high-energy phosphate levels for not just the PARP

inhibitor but for Verapamil and Metoprolol too clearly indicated that activation of Akt and ERK1/2 significantly contributed to the cardioprotective effects of these substances.

Conclusion

Ischemic heart disease and sepsis are the main causes of morbidity and mortality worldwide. Oxidative stress and inflammation play a pivotal role in both diseases. Searching for therapeutic targets we investigated the effects of naturally occurred polyphenol, malvidin and clinically used two drugs, Metoprolol and Verapamil. We investigated several signaling pathways which potentially could be therapeutic targets.

In conclusion, malvidin, the most abundant polyphenol ingredient of red wine, augments LPS-induced Akt activation and MKP-1 expression and attenuates mitochondrial destabilization, ROS production and activation of PARP as well as MAPKs resulting eventually in diminished activation of NF κ B. All these data indicate malvidin significantly contributes to the antioxidant and anti-inflammatory effects of red wine, and could, at least partially, account for the positive effects of moderate red wine consumption on inflammation-mediated chronic maladies such as obesity, diabetes, hypertension and cardiovascular disease.

We demonstrated at the first time that activation of PI-3K-Akt and ERK1/2 pathways significantly contributed to cardioprotective effect of a Ca²⁺ antagonist and a β -adrenergic receptor blocker. Furthermore, we found a strong correlation between cardioprotective and kinase activating potencies of the substances that indicate potentiality of these kinases as drug-targets in the therapy of ischemic heart disease.

Achievements

- 1.** We demonstrated that malvidin, the most abundant polyphenol ingredient of red wine, augments LPS-induced Akt activation and MKP-1 expression and attenuates mitochondrial destabilization, ROS production and activation of PARP as well as MAPKs resulting eventually in diminished activation of NFκB.
- 2.** We found that anti-inflammatory effect of malvidin exceeded that of resveratrol. Therefore, we provided experimental evidence at the first time that malvidin rather than resveratrol could account for the positive effects of moderate red wine consumption on inflammation-mediated chronic maladies such as obesity, diabetes, hypertension and cardiovascular disease.
- 3.** We demonstrated at the first time that activation of PI-3K-Akt and ERK1/2 pathways significantly contributed to cardioprotective effect of a Ca²⁺ antagonist and a β-adrenergic receptor blocker.
- 4.** We found that cardioprotective effects of PARP inhibition much exceeded that of Ca²⁺ antagonism and blocking of the β-adrenergic receptor thereby confirmed the potentiality of PARP inhibitors in the management of cardiovascular diseases.
- 5.** Furthermore, we established a strong correlation between cardioprotective and kinase activating potencies of the substances that indicate potentiality of these kinases as drug-targets in the therapy of ischemic heart disease.

Acknowledgements

These studies were carried out at the Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School of the University of Pécs.

I would like to thank Prof. Balázs Sümegi and Prof. Ferenc Gallyas Jr. for supporting my work and giving me the opportunity to work in the Institute of Biochemistry and Medical Chemistry.

I would like to thank Dr Ildiko Bock-Marquette her critical reviewing of the manuscript.

I wish to thank all participants of the experiments for their work, all the doctors, PhD students and assistants for their technical help and for the friendly atmosphere in the lab.

I express my heartfelt thanks to my family.

These works were supported by Hungarian grants SROP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002, SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029, OTKA K73738 and 34039/KA-OTKA/11-06; Hungarian Scientific Research Fund (OTKA) K-73738 and Ministry of Health and Welfare ETT 531/2006.

Publications/Publikációk

This work based on the following articles/Dolgozathoz kapcsolódó publikációk:

Eszter Bognár, Zsolt Sarszegi, Alíz Szabó, Balazs Debreceni, Nikoletta Kalman, Zsuzsanna Tucsek, Balazs Sumegi, Ferenc Gallyas Jr. Antioxidant and anti-inflammatory effects in RAW264.7 macrophages of Malvidin, a major red wine polyphenol. PLoS ONE 2013;8: e65355.

IF: 4,092 (2011)

Cit.: 0

Kovacs K, Hanto K, Bognar Z, Tapodi A, **Bognar E**, Kiss GN, Szabo A, Rappai G, Kiss T, Sumegi B, Gallyas F Jr. Prevalent role of Akt and ERK activation in cardioprotective effect of Ca(2+) channel- and beta-adrenergic receptor blockers. Mol Cell Biochem 2009;321:155-164.

IF: 1,896

Cit.: 10

Further publications/További publikációk:

Sarszegi Z, Bognar E, Gaszner B, Kónyi A, Gallyas F Jr, Sumegi B, Berente Z. BGP-15, a PARP-inhibitor, prevents imatinib-induced cardiotoxicity by activating Akt and suppressing JNK and p38 MAP kinases. Mol Cell Biochem. 2012;365:129-137.

IF: 2,057

Cit.: 2

Szabo A, Danyadi B, Bognar E, Szabadfi K, Fabian E, Kiss P, Mester L, Manavalan S, Atlasz T, Gabriel R, Toth G, Tamas A, Reglodi D, Kovacs K. Effect of PACAP on MAP kinases, Akt and cytokine expressions in rat retinal hypoperfusion. Neurosci Lett 2012;523:93-98.

IF: 2,105

Cit.: 1

Total IF: 10,15

Total citations: 13

Abstracts/Absztraktok

1. Arpad Szanto, Aliz Szabo, Zita Bogнар, Balazs Radnai, Zsuzsa Tucsek, Izabella Solti, **Eszter Bogнар**, Antal Tapodi, Balazs Debreceni, Ferenc Gallyas Jr., Balazs Sumegi: PARP-1 inhibition-induced activation of PI-3-kinase-Akt pathway by treatment of Taxol. **15th Euroconference on Apoptosis & 4th Training course on 'Concepts and Methods in Programmed Cell Death', Portoroz, Slovenia**, October 26-31, 2007.
2. Balazs Sumegi, Anita Palfi, Krisztina Kovacs, Katalin Hanto, Peter Deres, Edina Pandur, **Eszter Bogнар**, Ambrus Toth, Kalman Toth: Akt/GSK-3 β , and MAP kinase cascades contribute to the protective effect of PARP inhibition. The 14th **International meeting on ADP ribosylation reactions, PARP 2005**: Bench to Bed be held in Newcastle upon Tyne-Gateshead on 5th to 7th October 2005.
3. Bartha Éva, Pálfi Anita, Márk László, **Bognár Eszter**, Halmosi Róbert, Szabados Eszter, Kálmán Endre, Pajor László, Tóth Kálmán, Sümegi Balázs: Alkohol-mentes vörösbőr kivonat hatása isoproterenol okozta cardialis remodelling esetén. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 2.
4. Bartha Éva, Halmosi Róbert, Kiss N. Gyöngyi, Solti Izabella, **Bognár Eszter**, Kálmán Endre, Kálai Tamás, Hideg Kálmán, Sümegi Balázs, Tóth Kálmán: PARP és ACE gátló hatása krónikus szívelégtelenség esetén patkányban. 37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007. május 22-25.
5. **Bognár Eszter**, Solti Izabella, Németh Viktória, Bartha Éva, Tucsek Zsuzsanna, Vető Sára, Hocsák Enikő, Nagyné Kiss Gyöngyi, Sümegi Balázs, Berente Zoltán: A glükózfelvétel és a kapcsolódó intracelluláris jelátviteli utak vizsgálata izolált szívmodellen. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 2.
6. E. Bartha, R. Halmosi, I. Solti, **E. Bogнар**, K. Kovacs, T. Habon, T. Kálai, B. Sumegi, K. Hideg, K. Toth: Effect of PARP inhibition on young spontaneously hypertensive rat (SHR) hearts. **Word Congress of Cardiology 2008, Buenos Aires**, May 18-21.
7. **E. Bogнар**, Gy. N. Kiss, I. Solti, K. Hanto, K. Kovacs, B. Sumegi, F. Gallyas: Comparison of 4-hydroxy-quinazoline, verapamil and metoprolol in heart protection during ischemia-reperfusion. **The International Symposium on Myocardial Cytoprotection**, Pecs, Hungary, 28-30 September, 2006.
8. **E. Bogнар**, Gy. N. Kiss, ZS. Sarszegi, E. Bartha, I. Solti, B. Sumegi, Z. Berente: Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor HO3089 Enhanced Post Ischemic Myocardial Glucose Uptake Mostly By Activation Of AMP-activated Protein Kinase (AMPK). **Word Congress of Cardiology 2008, Buenos Aires**, May 18-21.
9. **Eszter Bogнар**, Zsolt Sarszegi, Gyongyi Nagyne Kiss, Krisztina Kovacs, Balazs Ruzsics, Ferenc Gallyas Jr, Balazs Sumegi, Zoltan Berente: Protective effect of a novel insulin sensitizer BGP-15 in imatinib mesylate (Gleevec) induced cardiotoxicity. 40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2010. május 18-21.

10. Gy. Kiss, P. Deres, K. Hanto, **E. Bognar**, E. Bartha, B. Sumegi, Z. Berente: Do poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors affect myocardial metabolism?. **Word Congress of Cardiology 2006, Barcelona-Spain**, September 2-6 2006.
11. Gy. N. Kiss, **E. Bognar**, I. Solti, K. Hanto, K. Kovacs, F. Gallyas, B. Sumegi: Molecular mechanisms of cardioprotection afforded by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, Ca²⁺ channel- and β -blockers in ischemia-reperfusion: a comparative exvivo study. **Semmelweis Symposium-Nitric Oxide and Nitrosative Stress in the Cardiovascular System**, Thermal Hotel helia, Budapest, Hungary, October 29-31 2006.
12. Izabella Solti, **Eszter Bognar**, Zsuzsanna Tucsek, Sara Veto, Gabor Varbiro, Arpad Szanto, and Balazs Sumegi: Taxol induced mitochondrial permeability transition and free radical formation. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
13. Németh Viktória, Montskó Gergely, Vető Sára, **Bognár Eszter**, Márk László: Maldí TOF/TOF tömegspektrometria alkalmazása a jelátviteli folyamatokban jelentős kis molekulatömegű fehérjék azonosítására. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
14. Solti Izabella, Bognár Zita, Németh Viktória, **Bognár Eszter**, Vető Sára, Hocsák Enikő, Nagyné Kiss Gyöngyi, Szántó Árpád, Várbíró Gábor és Sümegi Balázs: Taxol hatása a mitokondriumra és a szabadgyök képződésre. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30- szeptember2.
15. Szigeti András, Bellyei Szabolcs, Boronkai Árpád, Bognár Zita, Gasz Balázs, Szabó Zoltán, **Bognár Eszter**, Hocsák Enikő, Komlosi Katalin, Varbiro Gábor, Melegh Béla, Janaky Tamás, Sumegi Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: Egy BH3 domént tartalmazó mitokondriális-permeability transition-t indukáló fehérje azonosítása.: A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember2.
16. Tucsek Zsuzsanna, Radnai Balázs, Szabó Zoltán, Dolowschiák Tamás, Hocsák Enikő, Szabó Alíz, Solti Izabella, **Bognár Eszter**, Vető Sára, ifj. Gallyas Ferenc, Lóránd Tamás és Sümegi Balázs: A PJ34 protektív hatása az IK11 indukálta oxidatív stresszben HepG2 sejtvonalon. 36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.
17. Vető Sára, Ács Péter, Berente Zoltán, Solti Izabella, Tucsek Zsuzsanna, Németh Viktória, **Bognár Eszter**, ifj. Gallyas Ferenc, Komoly Sámuel: 4- hydroxyquinazoline hatása a cuprizone indukálta központi idegrendszeri elváltozásokra. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember2.
18. Zita Bognar, Ferenc Gallyas Jr., Balazs Radnai, Antal Tapodi, Katalin Hanto, Alíz Szabo, Peter Jakus, Sara Veto, **Eszter Bognar**, Gabor Varbiro, Balazs Sumegi: Poly-(ADP-ribose) polymerase inhibitors influence the taxol induced cell death in cultured cells. A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság III. Konferenciája, Termál Hotel, Debrecen, Hungary, October 13-15 2005.

Presentations/Előadások

Eszter Bognar, Zsolt Sarszegi, Gyöngyi Nagyné Kiss, Zoltan Berente, Balazs Sumegi: Impact of a novel antioxidant compound on the cardiotoxicity of imatinibe mesylate (Gleevec). Biológus Doktoranduszok Konferenciája, A Pécsi Akadémiai Bizottság Biológiai Tudományok Szakbizottságának rendezvénye, Pécs, 2009. november 12-13.

Szabó Alíz, Kovács Krisztina, **Bognár Eszter**, N. Kiss Gyöngyi, Sümegi Balázs, ifj. Gallyas Ferenc: AKT és ERK aktiváció univerzális szerepe a Poli (ADP-ribóz) polimeráz inhibitorok, Ca²⁺ csatorna- és β-blokkolók kardioprotektív hatásában. A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi Vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.

Krisztina Kovacs, Aliz Szabo, Eszter Bognar, N. Gyongyi Kiss, Tamas Kiss, Zsolt Sarszegi, Balazs Sumegi, Ferenc Gallyas: Identification of novel drug targets preventing ischemic heart diseases. **Bridges in Life Sciences Annual Scientific Review**, Pécs, October 2007.

Radnai Balázs, Tucsek Zsuzsanna, Hocsák Enikő, Vető Sára, Németh Viktória, **Bognár Eszter**, Grász Dénes, Berente Zoltán, ifj. Gallyas Ferenc, Sümegi Balázs: A ferulaldehid hatása az LPS indukálta endotoxikus sokkra egerekben.:A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30- szeptember 2.

Balazs Sumegi, Sara Veto, Zsuzsanna Tucsek, Izabella Solti, Eniko Hocsak, **Eszter Bognar**, Aliz Szabo, Ferenc Gallyas Jr.: PARP and inflammatory and kinase pathways: relevance for endotoxic shock. **Semmelweis Symposium-Nitric Oxide and Nitrosative Stress in the Cardiovascular System**, Thermal Hotel Helia, Budapest, Hungary, October 29-31 2006.

MAP kinázok és a PI3K-Akt útvonal szerepe inflammációban és oxidatív stresszben

PhD tézis

Bognár Eszter

Programvezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs DSci

Témavezető: Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc DSci



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

2013

Rövidítések

AP-1: aktivátor protein-1

Akt: protein kináz B (PKB)

Ask1: apoptózis szignál-regulált kináz 1

BAD: Bcl-2 asszociált halál promóter

ERK: extracelluláris szignál-regulált kináz

FKHR: forkhead homológ rhabdomiosarkóma transzkripciós faktor

GSK-3 β : glikogén szintáz kináz-3 β

I κ B: inhibitor κ B

IKK: I κ B kináz

iNOS: indukálható NO-szintáz

IRAK1: interleukin-1 receptorhoz kapcsolt kináz 1

IRAK4: interleukin-1 receptorhoz kapcsolt kináz 4

JNK: c-jun N-terminális kináz

LBP: LPS-kötő protein

LPS: lipopoliszaharid

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

MKP-1: MAPK foszfatáz -1

MyD88: myeloid differenciációs faktor 88

NAC: N-acetil cisztein

NADPH-oxidase: NADPH-oxidáz

NEMO: NF- κ B esszenciális modulátor

NF- κ B: nukleáris faktor- κ B

P: foszforilált

PARP: poli(ADP)-ribóz polimeráz

p38-MAPK: p38 mitogén aktivált protein kináz

p65: transzkripciós faktor p65 (RelA)

p50: NF-KappaB1

PI3K: foszfatidilinozitol 3 kináz

PTEN: foszfatáz és tenzin homológ

ROS: reaktív oxigén származék

TAB: TAK1 kötő protein

TAK1: transzformáló növekedési faktor β aktivált kináz 1

TBK1: TANK kötő kináz 1

TIRAP: TIR domén tartalmú adaptor fehérje

TLR: Toll-like receptor

TLR4: Toll-like receptor 4

TNF α : tumor nekrosis faktor α

TRAF6: TNF receptorhoz kapcsolt 6. faktor

TRAM: TRIF-kapcsolt adaptor molekula

TRIF: TIR domént tartalmazó IFN- β -t indukáló adaptor fehérje

Bevezetés

Az inflammáció és az oxidatív stressz a két legfontosabb patofiziológiai folyamat, melyek felelősek a kardiovaszkuláris morbiditásért és mortalitásért. Mindkettőben hasonló intracelluláris jelátviteli útvonalak aktiválódnak. Mostanában a vizsgálatok a jelátviteli hálózatok megértésére összpontosítanak, mert ezek potenciális terápiás célpontok lehetnek. A kutatás egy másik fontos iránya, hogy megismerjük a már meglévő hatóanyagok, és új, gyógyszerben használható vegyületek hatását a jelátviteli útvonalakra.

A vörösborok különféle polifenolokban és antocianinokban gazdagok, melyekről korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy jótékony hatásuk van a kardiovaszkuláris betegségek prevenciójára. Ezek a fenolos komponensek erős antioxidáns, neuroprotektív, rákellenes, gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek.

A malvidin és glikozidjai növényi színanyagok, melyek fontos szerepet játszanak a mikrobák és az UV sugárzás elleni védelemben. A malvidin, a polifenolok közé tartozó vegyület, amely más fenolsavakkal, antocianinokkal, flavonoidokkal, trihidroxi sztilbénekkel a vörösbor alapszínét adja. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a mérsékelt vörösbor fogyasztás csökkenti a kardiovaszkuláris morbiditást, mortalitást és jótékony hatással van a krónikus gyulladással járó betegségekre. Ezen kedvező hatásokat a vörösbor polifenol komponenseivel hozták összefüggésbe.

A gyulladással járó válaszreakciók tanulmányozására széles körben alkalmazzák a lipopoliszacharid által stimulált RAW 264.7 makrofág sejteket. LPS indukció hatására ezekben a sejtekben proinflammatorikus transzkripciós faktorok aktiválódnak (NF- κ B, AP-1), melyek hatására gyulladással járó markerek, interleukinek (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8) és nitrogén-monoxid termelődik. Ezen folyamatok igazolódtak Gram-negatív szepszisben és más gyulladással járó betegségeken is. A bakteriális lipopoliszacharid indukálta gyulladással járó folyamatokban intenzív reaktív oxigén gyök képződést valamint poli (ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációt mutattak ki. A nagy mennyiségű reaktív oxigén gyökök számos patológiai folyamatot kiváltásáért felelősek, mint például lipidperoxidáció, fehérje oxidáció, DNS károsodás, valamint aktiválják a mitogén aktiválta protein kinázokat (MAPK) és gyulladással járó transzkripciós faktorokat. Az LPS valószínűleg egyfajta kompenzációs mechanizmusként aktiválja a citoprotektív foszfatidilinozitol 3 kináz (PI3K)-Akt valamint a MAPK foszfatáz (MKP)-1 útvonalakat. Ezek a folyamatok jelentős szerepet játszanak mind a normál

immunválaszban mind a súlyos szepszis és szeptikus sokk során kialakuló többszörös szervkárosodásban.

A leggyakrabban vizsgált polifenol a rezveratrol, melyről feltételezik, hogy potenciális gyulladáscsökkentő, öregedésgátló, rákellenes, valamint kedvező kardiovaszkuláris hatással bíró vegyület. Bár a vörösborban nagy mennyiségben van jelen, biohasznosulása azonban meglehetősen alacsony, ezért feltételezhető, hogy más polifenol komponenseknek is jelentős szerepe lehet a vörösbor kedvező hatásában. Az egyik lehetséges vegyület a malvidin, melynek vörösborbeli koncentrációja százszorosa a rezveratrolénak. A legújabb kutatási eredmények igazolták a malvidin jótékony hatását kardiovaszkuláris betegségekben, azonban kevés adat áll rendelkezésre a malvidin gyulladáscsökkentő hatásáról, valamint az általa befolyásolt jelátviteli útvonalakról. Így munkánk egyik fő célja a malvidin hatásának vizsgálata LPS indukálta RAW 264.7 makrofág sejteken.

Munkánk másik fontos célkitűzése az oxidatív stressz vizsgálata, mely alapvető szerepet játszik a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában és progressziójában. Az ischemia-reperfúziós károsodás az egyik legáltalánosabb folyamat, mely jelentős mennyiségű reaktív oxigén gyök felszabadulásával jár együtt. Az ischemia-reperfúziós károsodás legfontosabb patofiziológias folyamat az akut kardiovaszkuláris események során. Korábbi vizsgálatok széles körben tanulmányoztak számos vegyületet, melyek potenciálisan alkalmasak az ischemia-reperfúziós károsodás kivédésére. Számos bizonyíték van arra, hogy a ROS és a proapoptotikus jelátviteli útvonalak kulcsszerepet játszanak a sejtkárosodásban és sejthalálban.

A posztischemiás-reperfúziós károsodásban a reaktív oxigén gyököknek és az emelkedett intracelluláris Ca^{2+} szintnek egyaránt fontos szerepe van. Reperfúzió során a reaktív oxigén intermediereknek számos forrása van: xantin-oxidáz, ciklooxygenáz, fagocita aktiváció, mitokondriális légzési lánc. A nagy mennyiségű ROS oxidatív DNS károsodást, DNS lánc törést okoz, mely a nukleáris PARP enzim aktivációját, végső soron NAD^+ és ATP deplációját eredményezi. Mindezen változások a mitokondriális membrán további károsodásához, valamint apoptotikus és nekrotikus sejthalálhoz vezetnek. Ezek alapján feltételezhető, hogy maga a PARP gátlás eredményes lehet a miokardiális infarktus kezelésében.

A különböző jelátviteli útvonalak közül a PI-3K-Akt és a mitogén aktiválta protein kinázokról igazolódott, hogy szerepük lehet a kardioprotekcióban. Az Akt útvonal aktiválódása kulcsszereppel bír, mivel számos downstream szubsztrátot képes foszforilálni, ezáltal inaktiválni a GSK-3 β -t, proapoptotikus Bcl-2 családdhoz tartozó BAD fehérjét, kaszpáz 9-et,

forkhead homolog rhabdomioszarkóma transzkripciósi faktort (FKHR). Másrészt aktiválja az NF- κ B-t, riboszómális p70 S6 kinázt és az endotheliális nitrogén-monoxid szintázt. Jelen vizsgálatunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk egy PARP gátló, egy klinikumban használt β -adrenerg receptor blokkoló és egy Ca^{2+} -csatorna blokkoló hatását a jelátviteli útvonalakra ischemia-reperfúziós modellben.

Célkitűzések

A reaktív oxigén gyökök kulcsszerepet játszanak a szeptikus sokk és az ischemia-reperfúziós károsodások patogenezisében és progressziójában. A ROS és a hozzá kapcsolódó jelátviteli útvonalak tanulmányozása elősegítheti új, potenciális terápiás célpontok meghatározását. Munkánk során két különböző vizsgálati modellben (sejtkultúra, Langendorff szívperfúziós modell) tanulmányoztuk az inflammációban és az oxidatív stresszben központi szerepet játszó jelátviteli útvonalakat. Vizsgáltuk a malvidin hatását gyulladásos válaszra, valamint a Metoprolol, Verapamil és egy PARP gátló hatását ischemia-reperfúzió körülményei között.

- 1. Malvidin antioxidáns/antiinflammatorikus hatásának tanulmányozása**
- 2. Malvidin és a rezveratrol antioxidáns és antiinflammatorikus hatásának összehasonlítása valamint annak meghatározása, hogy a mérsékelt vörösbor fogyasztás jótékony hatása melyik polifenolnak tulajdonítható.**
- 3. A klinikumban használt kardioprotektív Ca^{2+} -csatorna blokkoló és β -adrenerg receptor blokkoló gyógyszerek hatással vannak-e a PI-3K-Akt és a MAPK jelátviteli útvonalakra.**
- 4. PARP gátló, Ca^{2+} -csatorna blokkoló és β -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatásának összehasonlítása.**

Diszkusszió

A malvidin antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatása

Az LPS hatására a citoszolban elhelyezkedő NF- κ B nukleáris lokalizációs szignálja szabaddá válik, ennek hatására lehetővé válik a transzkripciós faktor magba történő transzlokációja. Az NF- κ B a sejtmagban foszforilálódik, acetilálódik, ezáltal aktiválódik és képessé válik arra, hogy a promoter DNS szekvenciához kapcsolódjon. Ezáltal különböző gének expresszálódnak (ábra), mint például proinflammatorikus citokinek, kemokinek, adhéziós fehérjék, COX-2, iNOS génjei. Ezek a folyamatok kiemelkedő jelentőséggel bírnak a gyulladással összefüggő krónikus betegségekben. Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a malvidin gátolja az NF- κ B foszforilációját, magba történő transzlokációját, és a konszenzus DNS szekvenciához való kötődését. Ezek a kísérleti eredmények összhangban vannak más csoportok eredményeivel. Továbbá kimutattuk, hogy a malvidin sokkal alacsonyabb koncentrációban gátolja az NF- κ B aktivációt, mint a trans-rezveratrol. Mindezek bizonyítják, hogy a malvidinnek szerepe lehet a vörösbor jótékony hatásában krónikus gyulladással járó betegségekben. Továbbá ezek az eredmények korrelálnak a 1999-2002 US National Health and Nutrition Examination Survey eredményeivel, miszerint a malvidin fogyasztás mértéke negatív összefüggést mutat a szérumban lévő C-reaktív protein szintjével.

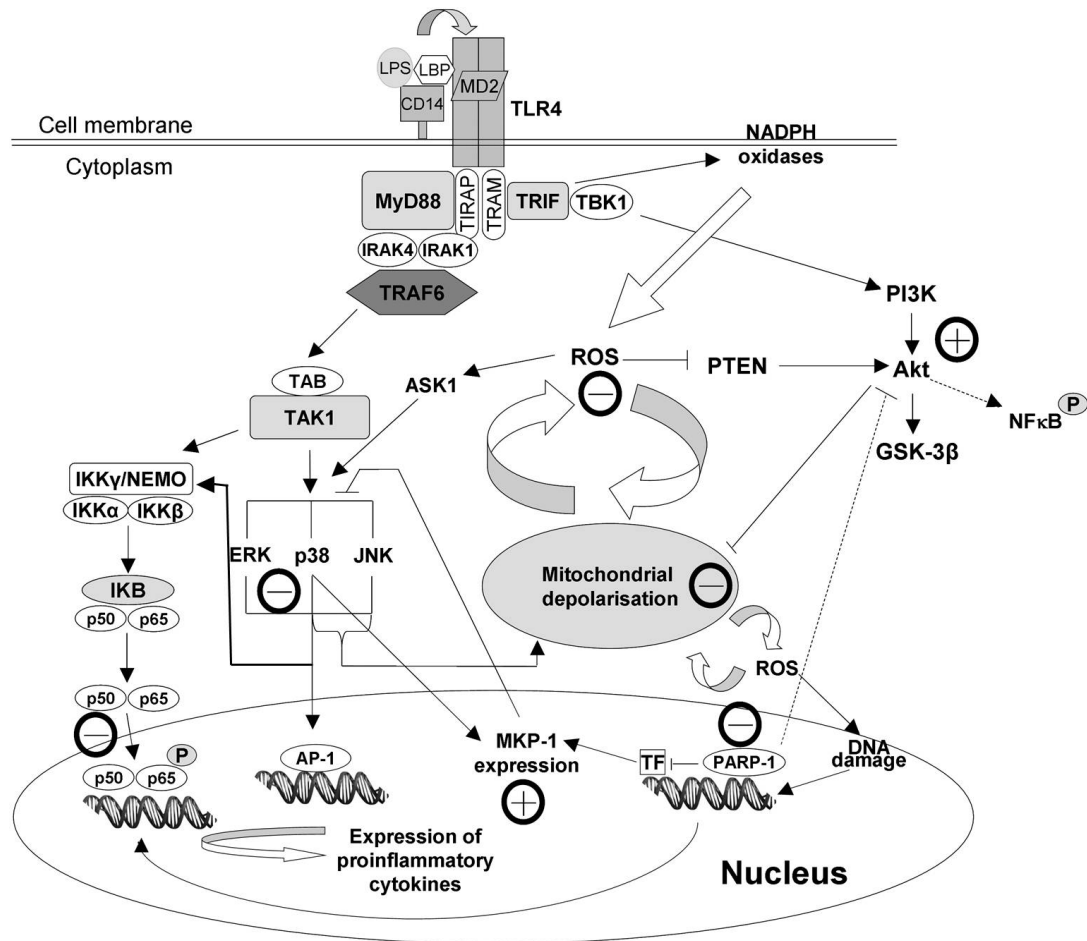
Az LPS kötődése a TLR4 receptorhoz különböző jelátviteli útvonalakon keresztül aktiválja a MAP-kinázokat (ábra), mint például myeloid differenciálódási 88 faktor (MyD)88—interleukin-1 receptor-asszociált kináz (IRAK)—TNF-receptorhoz kapcsolt 6 faktor (TRAF)-6—TGF- β -aktivált kináz (TAK) útvonal. Végül a MAP-kinázok a proinflammatorikus transzkripciós faktorok aktivációjában játszanak szerepet; NF- κ B és AP-1. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a malvidin mindhárom MAPK aktivációját csökkentette, bár a hatás erőssége különböző volt (JNK>p38>>ERK). Specifikus kináz inhibitorok alkalmazásával vizsgáltuk, hogy melyik MAPK hatása szignifikáns. Más vizsgálatok eredményeivel összhangban azt találtuk, hogy a JNK and p38 szelektív gátlása szignifikánsan csökkentette az LPS indukálta NF- κ B nukleáris transzlokációját és DNS-hez való kötődését. Emellett az ERK gátlását ebben a tekintetben hatástalannak találtuk. Ezen

adatok megerősítik, hogy a korai gyulladási válasz RAW 264.7 makrofágokban, legalábbis részben, a fent említett útvonalakon keresztül mediálódik. Másrészt azt is bizonyítottuk, hogy a malvidin MAPK aktivációt csökkentő hatása valószínűleg indirekt módon valósul meg, mivel *in vitro* kináz assay vizsgálat során a malvidinnek nem volt hatása. Legvalószínűbb, hogy a malvidin a MAPK aktivációt csökkentő hatását más gátló mechanizmusok útján (ROS gátlás) fejtik ki. MKP-1 (MAP kináz foszfatáz-1) az egyik legfontosabb enzim, mely a MAP-kinázok defoszforilálás útján történő inaktiválásáért felelős. Ez a gátlás fontos lépése a jelátviteli útvonalak szabályozásának a gyulladási válaszban, mely által a proinflammatorikus citokinek excesszív termelődése *in vitro* and *in vivo* gátlódik. Korábbi eredményekkel összhangban vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az LPS indukálta makrofágokban fokozott MKP-1 génexpresszió és fehérjeszintézis figyelhető meg. Mindezek mellett a fokozott MKP-1 aktiváció nem volt képes teljes mértékben kivédeni a MAPK útvonalak aktivációját. A malvidin mind a stimulált, mind a stimulálatlan makrofág sejtekben fokozta az MKP-1 expresszióját, mely végső soron MAPK aktiváció csökkenéséhez vezetett. Feltételezhető, hogy a malvidin hatására kialakuló MKP-1 expresszió ellenregulálja a TLR4 mediált aktivációs mechanizmusokat (ábra). Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a malvidin különböző mértékben csökkentette a különböző MAP-kinázok aktivációját LPS hatására, ezen különbségek mutatkoztak a MAPK inhibitorok alkalmazása során. Mindezen adatok azt mutatják, hogy a MAP-kinázok aktivációja/gátlása egy bonyolult hálózat, melyben megfelelő egyensúly elérése kinázonként különböző.

Korábbi vizsgálatok *in vitro* igazolták a malvidin antioxidáns hatását. Ezekkel a vizsgálatokkal összhangban kimutattuk, hogy a malvidin csökkentette az LPS indukálta ROS termelést RAW264.7 makrofágokban és a hatáserőssége az IC₅₀ érték alapján hasonló a transzveratrolhoz. A ROS mennyiségének csökkentése az általa befolyásolt folyamatok bonyolult hálózatát fogja módosítani, beleértve a mitokondriális integritást, MAPK, Akt, PARP aktivációt (ábra). Nagyon valószínű, hogy az LPS indukálta NF-κB aktiváció a mi kísérleti modellünkben a TLR4-NADPH oxidáz-ROS-PARP útvonalon keresztül mediálódott. A folyamat komplexitása miatt nehéz különbséget tenni ok és okozat között és pontosan azonosítani az upstream és downstream regulátorokat. Mindazonáltal valószínű, hogy a malvidin az antioxidáns tulajdonságánál fogva csökkenti a ROS termelést, ezáltal a PARP és MAPK aktivációt, csakúgy, mint az MKP-1 károsodását. A csökkent PARP aktiváció csökkent NF-κB és MAPK aktivációt eredményez, emellett emelkedett MKP-1 expresszió, valamint PI3K–Akt aktiváció figyelhető meg, melyek együttesen a mitokondriális membrán

integritás megtartásához vezetnek (ábra). A kísérleteink során tehát azt találtuk, hogy malvidin gyulladáscsökkentő hatása az antioxidáns tulajdonságán keresztül valósul meg.

Újabban kimutatták, hogy az Akt downstream célpontja a TRIF/TANK-kötő kináz 1-nek (TBK1) LPS indukálta makrofágokban, mivel a TBK1 fokozza az Akt Ser(473)-on történő foszforilációját. Másrészt az emelkedett ROS aktiválhatja a PI-3K–Akt útvonalat azáltal is, hogy oxidálja és ezáltal inaktiválja a tensin homolog (PTEN)-t. Az Akt aktivációja mitokondriális védelmet eredményezhet azáltal, hogy foszforilálja és inaktiválja a Bad-ot, valamint indirect módon NF-kappaB aktivációt okoz. Az találtuk, hogy a malvidin Akt aktivációt vált ki mind stimulált mind nem stimulált makrofágokban. Legvalószínűbb, hogy ezen hatása az antioxidáns tulajdonságával van összefüggésben. Az LPS indukálta mitokondriális depolarizáció kivédésében a malvidin által kiváltott fokozott Akt aktivációnak lehet leginkább szerepe. Másrészt az Akt foszforilálja és aktiválja az NF- κ B p65-t. Vizsgálatunkban azt találtuk, hogy a PI-3K-Akt útvonal gátlása csökkenti az NF- κ B aktivációját, mely azt sugallja, hogy ennek az útvonalnak részben szerepe lehet az LPS hatásának közvetítésében. Ezek az adatok azt mutatják, a malvidin gyulladáscsökkentő hatásában valószínűleg nem az Akt aktivációnak van szerepe.



Ábra. Malvidin hatása az LPS indukálta patofiziológiai változásokra RAW 264.7 makrofágokban. A bizonyított hatásokat egyenes vonallal, míg a feltételezett hatásokat/mediátorokat szaggatott vonallal jelöltük. Nyíllal jelöltük az aktivációs folyamatokat, a tompa véggel jelölt vonalak a gátlást reprezentálják. A malvidin pozitív hatását a körben levő + jellel, negative hatását – jellel jelöltük. Az LPS foszforiláció útján aktiválja az NFκB-t, nukleáris transzlokációt és DNS-hez való kötődést eredményez. Indukálja a ROS képződést, PARP és MAPK és Akt aktivációt okoz, fokozza az MKP-1 expresszióját, valamint mitokondriális membrán depolarizációt vált ki. A malvidin csökkenti a ROS képződést, mitokondriális destabilizációt, a PARP valamint a MAPK aktivációt, emellett erősíti az Akt aktivációt, valamint MKP-1 expressziót.

PARP gátló, Ca²⁺ antagonistá, β-adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatásának összehasonlítása

Jelen vizsgálatunkban két, az ischemiás szívbetegség kezelésében használt vegyület (Verapamil és Metoprolol) kardioprotektív és jelátviteli útvonalakra (Akt, ERK) kifejtett hatását hasonlítottuk össze. Langendorff szívperfúziós modellben, ischemia-reperfúzió körülményei között hasonlítottuk össze a Verapamil és Metoprolol, valamint egy PARP gátló, a HO-3089, mint pozitív kontroll kardioprotektív hatását.

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy az L-típusú Ca²⁺-csatornák blokkolása különböző ischemiás modellekben védelmet nyújtott a nagy energiájú foszfátvegyületek depléciója ellen, javította a kardiális funkciót, csökkentette az acidózis mértékét, és az infarktus nagyságát. A β-adrenerg receptor blokkolók kardioprotektív hatásának hátterében több mechanizmus állhat, úgy mint, kardiális funkció javítása, lipid peroxidáció csökkentése és a szívizomsejtek apoptózisának gátlása.

Vizsgálatunkban a nagy energiájú foszfátok és az anorganikus foszfát szintjét mértük. Azokat a sziveket, amelyek 15 perces normoxia alatt energetikailag nem voltak stabilak, vagy az ischemia-reperfúziót követően irreverzibilisen károsodtak kizártuk a vizsgálatból. A perfúzió során egyszeri bolus Verapamil és Metoprolol dózist alkalmaztunk. A HO-3089-el történő perfúzió során egy korábbi vizsgálatunkkal már biztosan kardioprotektívnek bizonyult koncentrációt (25μM) választottunk.

Eredményeink alapján igazolódott, hogy a Verapamil és Metoprolol szignifikánsan javította a keratin foszfát és az ATP vissza épülését, javította a pH-t, valamint fokozta az anorganikus foszfát visszaépülését, bár a HO-3089 jobbnak bizonyult. A felsorolt vegyületek szignifikánsan csökkentették a miokardium oxidatív károsodását (csökkent lipid peroxidáció, fehérje oxidáció). A kardiális energetika javulásával párhuzamosan a funkcionális paraméterek javulását észleltük és az infarktus nagysága is szignifikánsan csökkent. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a PARP gátlás kardioprotektív és citoprotektív hatása a PI-3 kináz/Akt útvonalon keresztül valósul meg. Az aktivált Akt foszforilálni képes számos szabályozó fehérjét, mint például a GSK-3β, kaspáz-9, BAD, és FKHR. A BAD foszforilációja és inaktivációja szerepet játszik a mitokondriális membrán stabilizációjában és gátolja a különböző proapoptotikus fehérjék, mint például a citokróm c és apoptózis indukáló faktor felszabadulását. Emellett az Akt foszforilálni és inaktiválni képes a kaspáz-9-et, blokkolja a citokróm c/Apaf-1/kaspáz-9/kaspáz-3 útvonalat.

Bár az ERK 1/2 főként a növekedési faktor indukálta mitogén szignál és celluláris differenciáció fő jelátviteli útvonala, oxidatív stressz körülményei közötti protektív szerepe is igazolódott. Ezen hatása az apoptózis gátlásán keresztül valósul meg a c-jun N-terminális kináz (JNK) és kaszpáz-3 gátlása útján. Feltehetően az ERK felelős az elnyújtott citoprotekcióért, mivel az ischemia-reperfúziós károsodások után elnyújtott aktivációját figyelték meg.

Annak igazolására, hogy a Verapamil és Metoprolol citoprotektív hatással bír, vizsgáltuk ezen vegyületek hatását az Akt és ERK 1/2 foszforilációjára ischemia-reperfúzió során. Emellett vizsgáltuk az Akt downstream targetjének a GSK-3 β -nak a foszforilációját is. Normoxia és ischemia-reperfúzió során is fokozott Akt és ERK1/2 aktivációt találtunk. Szoros korrelációt találtunk a kreatin-foszfát vissztérése és az Akt, ERK2 aktivitása között. Vizsgálatunkkal bizonyítottuk, hogy az Akt és az ERK2 aktivációja központi szerepet játszik a Verapamil és Metoprolol által közvetített hatásban. Számos korábbi vizsgálat bizonyította, hogy a β -adrenerg receptor blokkolók indukálni képesek a β -arrestin-mediálta epidermális növekedési faktor receptor aktivációt, mely ERK aktivációhoz vezet. Hasonló mechanizmus igazolódott a β -arrestin-1, insulin-like growth factor 1 és az Akt aktiváció között. Az L-típusú Ca²⁺-csatorna blokkolók és az Akt, ERK aktiváció közötti kapcsolat kevésbé egyértelmű, kalmodulin függő ciklikus nukleotid foszfodiészteráz játszhat szerepet a ciklikus nukleotid - Ca²⁺ függő/ Ca²⁺ független jelátviteli útvonalban.

Annak bizonyítására, hogy a β -adrenerg receptor blokkoló és Ca²⁺-csatorna blokkoló kardioprotektív hatása az Akt és ERK útvonalon keresztül mediálódik, ezen kinázok specifikus upstream targetjeinek inhibitorait használtunk. Az Akt és ERK specifikus gátlása szignifikánsan csökkentette a nagy energiájú foszfátvegyületek visszatérését mind a PARP gátló, mind a Verapamil and Metoprolol esetében is.

Konklúzió

Az iszkémiás szívbetegség és a szepszis világszerte vezető morbiditási és mortalitási tényezők. Az oxidatív stressz és a gyulladás mindkettő esetén fontos szerepet játszik. Terápiás célpontokat keresve vizsgáltuk a természetben előforduló polifenol, a malvidin, valamint két, a klinikumban használt vegyület a Metoprolol és Verapamil hatását ezen folyamatokban. Főként a jelátviteli útvonalakban betöltött szerepükre voltunk kíváncsiak.

A vörösborban található malvidin hatásait összegezve elmondható, hogy fokozza az LPS indukálta Akt és MKP-1 aktivációt, csökkenti a mitokondriális destabilizációt, a ROS termelést, PARP és MAPK aktivációt, végül pedig az NF κ B aktivációt. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy a malvidin szignifikáns antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással bír és legalábbis részben szerepe van a mérsékelt vörösbor fogyasztás jótékony hatásában gyulladás mediálta krónikus betegségekben, obesitásban, diabéteszben, hipertóniában és kardiovaszkuláris betegségekben.

Először írtuk le, hogy a PI-3K-Akt és ERK1/2 útvonalak szignifikáns szerepet játszanak a Ca²⁺-csatorna blokkoló és a β -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatásának közvetítésében. Továbbá szoros korrelációt találtunk ezen vegyületek kardioprotektív és kináz aktiváló képessége között, mely adatok arra utalnak, hogy az Akt és ERK1/2 az iszkémiás szívbetegség kezelésének potenciális célpontja lehet.

Eredményeink

1. Bebizonyítottuk, hogy a vörösborban nagy mennyiségben előforduló malvidin fokozza az LPS indukálta Akt és MKP-1 aktivációt, csökkenti a mitokondriális destabilizációt, a ROS termelést, PARP és MAPK aktivációt, végül pedig az NFκB aktivációt.
2. Azt találtuk, hogy a malvidin gyulladáscsökkentő hatása meghaladja a rezveratrolét. Elsőként írtuk le, hogy a malvidin a rezveratrolnál jelentősebb szerepet játszik a mérsékelt vörösbor fogyasztás jótékony hatásában gyulladás mediálta krónikus betegségekben, obesitasban, diabéteszben, hipertóniában és kardiovaszkuláris betegségekben.
3. Először írtuk le, hogy a PI-3K-Akt és ERK1/2 útvonalak szignifikáns szerepet játszanak a Ca^{2+} -csatorna blokkoló és a β -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatásának közvetítésében.
4. Azt találtuk, hogy a PARP gátlás kardioprotektív hatása meghaladja a Ca^{2+} -csatorna blokkoló és a β -adrenerg receptor blokkoló kardioprotektív hatását, ami alapján a PARP gátlásnak szerepe lehet a kardiovaszkuláris betegségek kezelésében.
5. Továbbá szoros korrelációt találtunk ezen vegyületek kardioprotektív és kináz aktiváló képessége között, mely adatok arra utalnak, hogy az Akt és ERK1/2 az iszkémiás szívbetegség kezelésének potenciális célpontja lehet.

Köszönetnyilvánítás

Ez a tanulmány a PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében készült.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Sümegei Balázs és Dr. Gallyas Ferenc Professzor uraknak, hogy támogattak a munkámban és lehetőséget adtak arra, hogy a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetben dolgozhassak.

Szeretném megköszönni Dr. Bock-Marquette Ildikónak a kézirat elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönet a cikkben résztvevő munkatársaknak, mindazoknak, akik segítséget nyújtottak a kísérletes munka elvégzésében, PhD hallgatóknak, asszisztenseknek. Köszönöm támogatásukat, hasznos tanácsaikat és a laborban uralkodó baráti légkört.

Végül, de nem utolsó sorban szívből köszönöm családomnak a kitartó támogatást.

Munánkat a SROP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002, SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029, OTKA K73738 és a 34039/KA-OTKA/11-06, valamint az ETT 531/2006 támogatta.

