

Spis treści

Objaśnienie skrótów stosowanych w pracy	4 -
WPROWADZENIE	7 -
Kinaza syntazy glikogenu 3 – informacje ogólne	7 -
Budowa białka i regulacja aktywności GSK3 β	9 -
Regulacja aktywności GSK3 β poprzez fosforylację na tyrozynie 216.....	10 -
Regulacja aktywności GSK3 β poprzez fosforylację na serynie 9.....	14 -
Lokalizacja wewnątrzkomórkowa GSK3 β	17 -
GSK3 β w toksyczności parakwatu i w chorobie Parkinsona.....	17 -
GSK3 β w toksyczności peptydów A β i w chorobie Alzheimer'a.....	22 -
GSK3 β w zaburzeniach transportu aksonalnego w chorobach neurodegeneracyjnych ..	26 -
MATERIAŁY I METODY	29 -
Zwierzęta doświadczalne.....	29 -
Zastosowany związek chemiczny	29 -
Schemat podawania PQ.....	29 -
Podania jednorazowe i krótkoterminowe działanie PQ.....	29 -
Podania wielokrotne i długoterminowe działanie PQ.....	30 -
Charakterystyka modelu:.....	30 -
Wpływ długoterminowego (37 tygodni) podawania PQ na komórki dopaminergicznego układu czarno-prądkowatego.....	30 -
Wpływ długoterminowego (37 tygodni) podawania PQ na poziom DA, 5-HT, NA i ich metabolitów w prądkowiu i istocie czarnej.	30 -
Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz	30 -
Przygotowanie homogenatu	31 -
Otrzymywanie frakcji podkomórkowych.....	31 -
Komórkowe modele badawcze	31 -
Linia szczurzych komórek pheochromocytooma – PC12	31 -
Wzór chemiczny stosowanego związku	34 -
Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych.....	34 -
Metody spektrofotometryczne	34 -
Oznaczanie zawartości białka	34 -
Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT.....	34 -
Metody spektrofluorymetryczne.....	36 -

Analiza poziomu wolnych rodników w cytozolu komórek przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF	36 -
Metody immunochemiczne.....	36 -
Immunodetekcja białek metoda Western blot	36 -
Oznaczanie aktywności GSK3 β	38 -
Analiza ekspresji genów	39 -
Izolacja RNA	39 -
Oczyszczanie RNA	39 -
Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	40 -
Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR)	40 -
Statystyczne opracowanie wyników	40 -
WYNIKI.....	41 -
Badania in vivo.....	41 -
Wpływ jednorazowego podania i krótkoterminowego działania PQ na ekspresję i poziom białka GSK3 β w prążkowiu i śródmózgowiu u szczurów.	41 -
Poziom białka GSK3 β i jej ufosforylowanej formy GSK3 β pY216 w prążkowiu i śródmózgowiu po 4-krotnym podaniu w czasie 4 tygodni PQ.....	45 -
Wpływ długoterminowego podawania PQ na poziom białka GSK3 β i jego ufosforylowanej formy GSK3 β pY216 w prążkowiu i śródmózgowiu szczura.....	47 -
Poziom immunoreaktywności białka GSK3 β oraz formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 w mózgach starczych.....	52 -
Badania in vitro.....	53 -
Analiza przeżywalności komórek poddanych działaniu PQ.....	54 -
Poziom wolnych rodników w komórkach PC12 poddanych działaniu PQ.	54 -
Wpływ PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i jej form ufosforylowanych w komórkach kontrolnych PC12.	55 -
Wpływ endogennego peptydu A β na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i jej form ufosforylowanych w komórkach PC12 oraz transfekowanych genem dla białka APP.....	57 -
Wpływ endogennego peptydu A β na poziom białka Tau (pS396) w komórkach PC12 i APPsw.	59 -
Zbadanie poziomu immunoreaktywności białka GSK3 β i jej formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 we frakcjach podkomórkowych w komórkach PC12 oraz transfekowanych genem dla białka APP.	60 -
DYSKUSJA.....	62 -
Parakwat a choroba Parkinsona	62 -
Znaczenie GSK3 β w modelach zwierzęcych choroby Parkinsona.	67 -
Toksyczność parakwatu i peptydów A β w komórkach dopaminergicznych PC12.....	70 -

PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	- 75 -
STRESZCZENIE	- 77 -
LITERATURA	- 82 -

OBJAŚNIENIE SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

AICD	-	wewnątrzkomórkowe domeny amyloidu (ang. APP intracellular domain)
A β	-	beta amyloid
APC	-	gruczolakowaty polip okrężnicy (ang. adenomatous polyposis coli)
APP	-	białko prekursorowe amyloidu β (ang. β -amyloid precursor protein)
APP _{sw}	-	komórki transfekowane genem dla APP z mutacją typu szwedzkiego
ARE	-	element odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. antioxidant response element)
ATP	-	adenozynotrifosforan
BSA	-	albumina bydlęca surowicza
cAMP	-	cykliczny adenozymonofosforan
C/EBP	-	białko wiążące się sekwencjami CCAAT (ang. CCAAT enhancer binding proteins, CCAAT binding factor)
ChA	-	choroba Alzheimera
ChP	-	choroba Parkinsona
COX-2	-	cyklooksygenaza-2
CREB	-	białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (ang. c-AMP response element binding protein)
DCF	-	2',7-dichlorofluoresceina
DCFH	-	2',7-dichlorofluorescyna
DMEM	-	pożywka Dulbecco zmodyfikowana przez Eagla'a (ang. Dulbecco's modified Eagle medium)
DMSO	-	dimetylosulfotlenek
DNA	-	kwasdeoksyrybonukleinowy
DOPAC	-	kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy
DTT	-	ditiotreitol
ECL	-	chemiluminescencja
EDTA	-	sól disodowa kwasu etyleno diaminotetraoctowego
eIF2B	-	czynnik inicjacji translacji
ER	-	retikulum endoplazmatyczne
FCS	-	płodowa surowica cielęca
GAPDH	-	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GATA4	-	czynnik transkrypcyjny charakteryzujący się wiązaniem z DNA w sekwencji GATA
H2DCF-DA	-	dwuoctan 2',7-dichlorodwuhydrofluoresceiny
HnRNP	-	ludzka jądrowa rybonukleoproteina
GBP	-	białka wiążące GSK3
GSK3 β	-	kinaza syntazy glikogenu 3 β
GSK3 β pY216	-	forma aktywna kinazy syntazy glikogenu 3 β

GSK3 β pS9	-	ufosforylowana na tyrozynie 216 forma nieaktywna kinazy syntazy glikogenu 3 β ufosforylowana na serynie 9
HIF	-	czynnik transkrypcyjny (ang. hypoxiainduciblefactors)
HS	-	surowica końska
HSF	-	1 – czynnik szoku cieplnego-1
HSTF	-	1 – czynnik transkrypcyjny szoku cieplnego-1
5-HT	-	5-hydroksytryptamina, serotonina
IGF	-	insulinopodobny czynnik wzrostu
iNOS	-	indukowana izoforma syntazy tlenu azotu
LC	-	obszar miejsca sinawego
LTD	-	długoterminowe osłabienie synaptyczne (ang. long-term depression)
LTP	-	długoterminowe wzmocnienie synaptyczne (ang. long-term potentiation)
MAO B	-	monoaminooksydazotypu B
MAPK	-	kinazy aktywowane mitogenami (ang.mitogen activated protein kinases)
MPP+	-	1-metylo-4-fenylopirydyna
MPTP	-	1-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna
MTT	-	bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2Htetrazoliowy
NA	-	noradrenalina
NaCl	-	chlerek sodu
NADH	-	dinukleotyd nikotynoadeninowy, postać zredukowana
NFAT	-	jądrowyczynniktranskrypcyjny (ang. nuclear factor of activated T-cells)
NFT	-	sploty neurofibrylarne
NGF	-	czynnik wzrostu neuronów (ang. neuron al growth factor)
NLS	-	sekwencja lokalizacji jądra
NO	-	tlenek azotu
Nrf2	-	(czynnik 2 związany z NF-E2 (ang. NF-E2-related factor 2)
6-OHDA	-	6-hydroxydopamina
PARP-1	-	polimeraza-1 poli(ADP-rybozy)
PBS	-	bufor fosforanowy - buforowany roztwór soli fizjologicznej
PC12	-	komórki chromochłonne guza nadnerczy (ang.Pheochromocytoma)
PCR	-	reakcja łańcuchowa polimerazy
PDGF	-	płytkowy czynnik wzrostu
PI3-K	-	kinaza 3-fosfatydiloinozytolu
PKA	-	kinaza białkowa A
PKB	-	kinaza białkowa B
PKC	-	kinaza białkowa C
PMSF	-	fluorek fenylometylosulfonowy
PQ	-	parakwat
PRDX3	-	peroksyredoksyna 3
PS	-	preseniliny
PVDF	-	polifluorekwinylidenu

P21	-	inhibitor kinaz zależnych od cyklin
RNA	-	kwasy rybonukleinowe
ROS	-	reaktywne formy tlenu
SEM	-	średni błąd standardowy
SNC	-	część zbitaistoty czarnej
SOD	-	dysmutaza ponadtlenkowa
TBS-Tween	-	bufor o składzie 50 mMTris, 150 mMNaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6
TEMED	-	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TH-ir	-	znakowanie immunoreaktywne dla hydroksylazy tyrozynowej
TNF- α	-	czynnik martwicy nowotworu alfa
TPK-1	-	kinaza białka tau -1
Tris	-	tris(hydroksymetylo)aminometan
VDAC	-	kanały anionowe regulowane potencjałem
VTA	-	brzuszna część nakrywki śródmózgowia

WPROWADZENIE

Kinaza syntazy glikogenu 3 – informacje ogólne

Kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK3) została odkryta w latach 1970 jako jedno z kilku białek, które fosforylują syntazę glikogenu, powodując jej inhibicję i zahamowanie produkcji glikogenu [Cohen 1979, Embi i wsp., 1980]. Kinaza ta wzbudziła duże zainteresowanie po odkryciu jej roli w zależnej od insuliny transdukcji sygnału oraz w chorobie Alzheimera (ChA) [Cohen i Goedert, 2004].

GSK3 znana również, jako kinaza białka tau (TPK-1 - tau protein kinase-1) to wysoce konserwowana, wielozadaniowa kinaza serynowo-treoninowa, która w tkankach ssaków występuje w dwóch izoformach: GSK3 α i GSK3 β . Enzymy te kodowane są przez dwa odrębne geny [Woodgett 1990]. Gen kodujący GSK3 α znajduje się u myszy na chromosomie 7, a u ludzi na chromosomie 19, zaś gen kodujący GSK3 β u myszy położony jest na chromosomie 16, u ludzi na chromosomie 3. Obie formy GSK3 wykazują 97% podobieństwo w zakresie katalitycznej domeny kinazowej. Natomiast różnice stwierdza się w sekwencji N-końca bogatego w glicynę o długości 63 aminokwasów. Mniej wiadomo na temat różnic w funkcjach obu izoform [Liang i Chuang, 2006]. Zbadano, że embriony myszy z wyłączonym genem Gsk3 β umierają między 13 a 15 dniem [Hoeflich i wsp., 2000], natomiast osobniki z wyłączonym genem Gsk3 α przeżywają i wykazują lepszą tolerancję na glukozę, większą zdolność magazynowania glikogenu w wątrobie i są wrażliwe na insulinę [McAulay i wsp., 2007]. W dorosłym mózgu GSK3 α jest szczególnie bogato reprezentowana w hipokampie, korze mózgowej, prążkowie i mózdzku [Kaidanovich-Beilin i Woodgett, 2011], natomiast ekspresja GSK3 β zachodzi prawie we wszystkich częściach mózgu, chociaż istnieją znaczące różnice w zależności od struktury w poziomie mRNA u człowieka [Pandey i wsp., 2009].

W niektórych typach komórek mózgu, alternatywne składanie transkryptu (ang. splicing) pomiędzy eksonem 8 i 9 w GSK3 β prowadzi do powstania GSK3 β 2 - zawierającej dodatkowo 13 aminokwasów w domenie katalitycznej [Hanks i Hunter, 1995, Mukai i wsp., 2002, Soutar i wsp., 2010]. Obecność GSK3 β 2 u gryzoni [Yao i wsp., 2002] i u ludzi [Kwok i wsp., 2005] może mieć wpływ na funkcjonowanie neuronów. Badania z 2010 r. wskazują na dużą rolę wariantu GSK3 β 2 we wzroście aksonu [Castano i wsp., 2010]. Wyciszenie genu GSK3 β 2

zapobiega wzrostowi aksonu w szczurzych neuronach korowych oraz w komórkach neuroblastoma SH-SY5Y różnicowanymi kwasem retinoidowym. Ektopowa ekspresja GSK3 β 2 prowadzi do wzrostu aksonu nawet przy nieobecności tego kwasu. Wykazano, że GSK3 β 2 fosforyluje białko tau. Różnice w funkcji GSK3 β i GSK3 β 2 umożliwiają opracowanie inhibitorów GSK3 β , które nie zmniejszałyby korzystnego wpływu GSK3 β 2 na wzrost aksonu. Oba białka różnią się również obecnością i lokalizacją w czasie rozwoju organizmu. GSK3 β 2 występuje przede wszystkim w tkance nerwowej podczas rozwoju [Mukai i wsp., 2002]. Natomiast GSK3 β występuje we wszystkich tkankach organizmu podczas całego życia osobniczego i zaangażowana jest również w proces starzenia [Takahashi i wsp., 1994, Mukai i wsp., 2002].

W pracy skoncentrowałam swoją uwagę na GSK3 β , która jest pojedynczym polipeptydem zbudowanym z 433 aminokwasów, o masie 47 kDa. Ekspresja tego enzymu zachodzi intensywniej w neuronach aniżeli w komórkach glejowych [Takahashi i wsp., 2000]. Ponadto stwierdzono najwyższy poziom ekspresji genu tego enzymu w mózgu, w porównaniu do innych organów, co może wskazywać na jego istotną rolę w procesach fizjologicznych i patologicznych. [Takashima 2006, Perez-Costas i wsp., 2010].

GSK3 β początkowo została zidentyfikowana, jako regulator metabolizmu glikogenu. Obecnie wiadomo również, że enzym ten ma inne funkcje komórkowe takie jak np. regulacja ekspresji genów dla białek biorących udział w formowaniu cytoszkieletu komórki. Liczne dane literaturowe wskazują, że GSK3 β odgrywa istotną rolę w syntezie białek, proliferacji i różnicowaniu komórek, dynamice mikrotubul i motoryce komórki. Kinaza ta wpływa na wymienione funkcje poprzez fosforylację czynników inicjacyjnych białek, biorących udział w cyklu komórkowym, czynników transkrypcyjnych oraz białek zaangażowanych w funkcje mikrotubul i adhezję komórek. GSK3 β jest kinazą odpowiedzialną za fosforylację białka tau i funkcję białek cytoszkieletu. Enzym ten reguluje procesy przeżycia i śmierci komórek.

Kolejną ważną właściwością GSK3 β jest jej udział w licznych szlakach przekazywania informacji w tym, zależnych od czynników wzrostu. Znanych jest ponad 50 substratów GSK3 β i są wśród nich białka sygnałowe, liczne czynniki transkrypcyjne oraz białka strukturalne (Tabela 1).

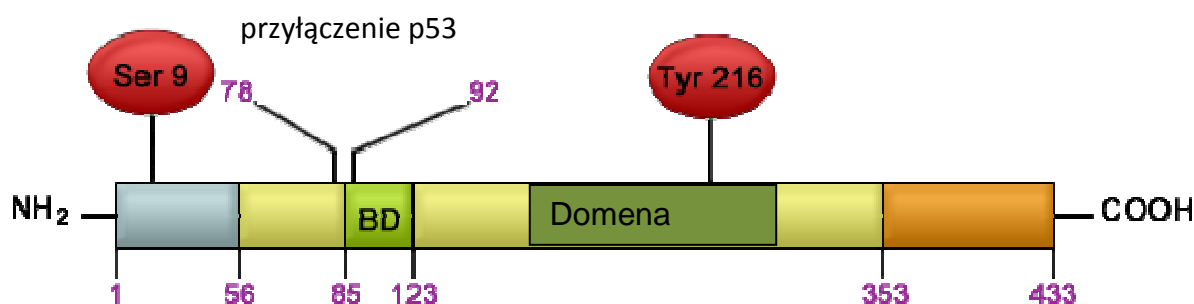
Białka sygnałowe	Białka strukturalne	Czynniki transkrypcyjne
Karboksylaza AcetyloCoA	Dynaminy	AP-1 (rodzina Jun)
APP	Kinezyzny	Beta-katenina
APC	MAP1B	C/EBP
Aksyna	MAP2	CREB
PKA	Białka adhezyjne	GATA4
Cyklina D1	Neurofilamenty	Receptor glukokortykoidu
Cyklina E	Nineina	HIF-1
eIF2B	Białko Tau	HSF-1
Syntaza glikogenu	Telokina	c-Myb
hnRNP		c-Myc
Receptor NGF		NeuroD
Nukleoporyna p62		NFAT
Białko p21		NF- κ B
Presenilina-1		Notch
Fosfataza białkowa 1		Białko p53

Tabela 1. Przykładowe substraty GSK3 β .

Budowa białka i regulacja aktywności GSK3 β

GSK3 β jest kinazą konstytutywnie aktywną w komórkach w fazie spoczynku [Hughes i wsp., 1993, Doble i Woodgett, 2003]. Regulacja aktywności GSK3 β odbywa się poprzez fosforylację, zmianę lokalizacji w komórce oraz wstępną fosforylację substratów GSK3 β przez inne kinazy [Jope i wsp., 2007].

GSK3 β posiada dwa miejsca fosforylacji, które wpływają na jej aktywność katalityczną. Jest to seryna 9 i tyrozyna 216 (Rycina 1). Fosforylacja na tyrozynie 216 zachodzi w domenie kinazy w miejscu aktywacji, co prowadzi do wzrostu aktywności GSK3 β [Wang i wsp., 1994]. Fosforylacja ta nie jest niezbędna do aktywacji kinazy. Natomiast fosforylacja seryny 9 na N-koncu prowadzi do zahamowania aktywności enzymu [Stambolic i Woodgett 1994].



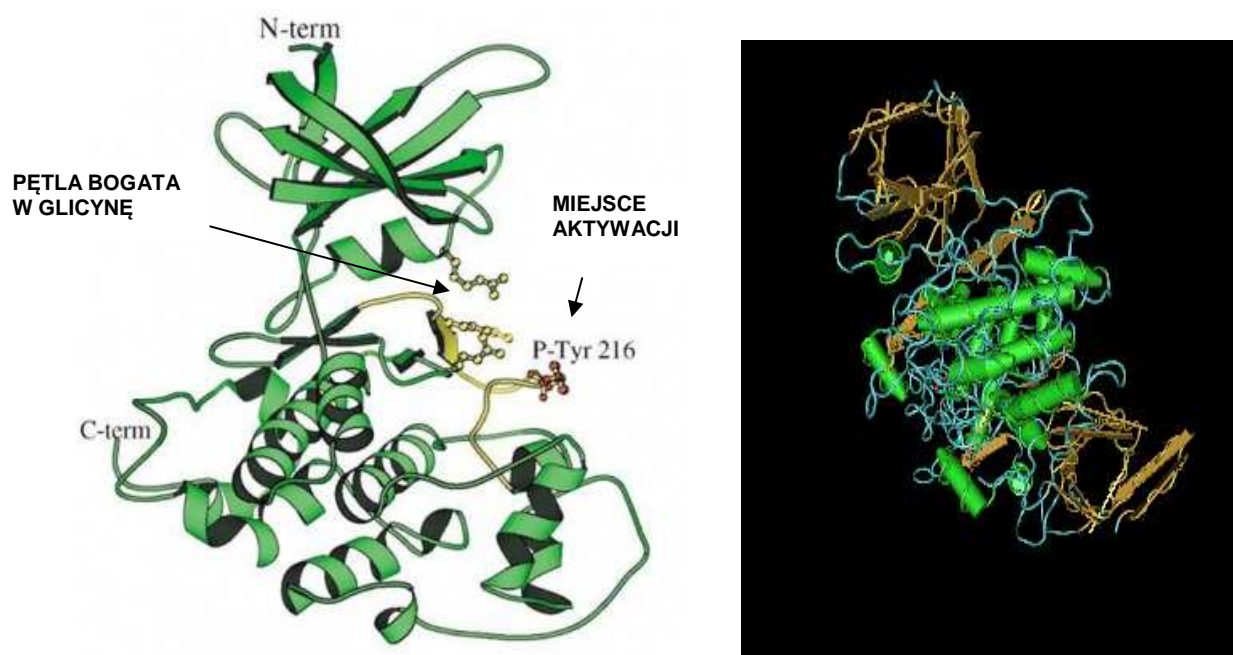
Rycina 1. Budowa GSK3 β

GSK3 β u człowieka to białko o masie 47 kDa składające się z 433 aminokwasów. (BD) domeny wiążące -to miejsca wiazań dla substratów (np.p53)

Ufosforylowany koniec aminowy GSK3 β staje się dla niej pseudosubstratem, zajmując miejsce wiązania grup fosforanowych znajdujących się na wstępnie ufosforylowanych potencjalnych substratach. Fosforylacja seryny 9 GSK3 β blokuje tym samym jej aktywność, względem substratów wymagających wstępnej fosforylacji, ale nie hamuje funkcji skierowanej na substraty, które takiej fosforylacji nie wymagają [Frame i Cohen 2001]. Fosforylowany może być także koniec karboksylowy GSK3 β , co prowadzi do obniżenia ogólnej jej aktywności, w tym aktywności względem substratów niewymagających wstępnej fosforylacji [Thornton i wsp., 2008].

Regulacja aktywności GSK3 β poprzez fosforylację na tyrozynie 216

Miejsce aktywne enzymu obejmuje domenę, z którą wiążą się jej substraty i są to aminokwasy od 200 do 226 (Rycina 2 (kolor żółty)).

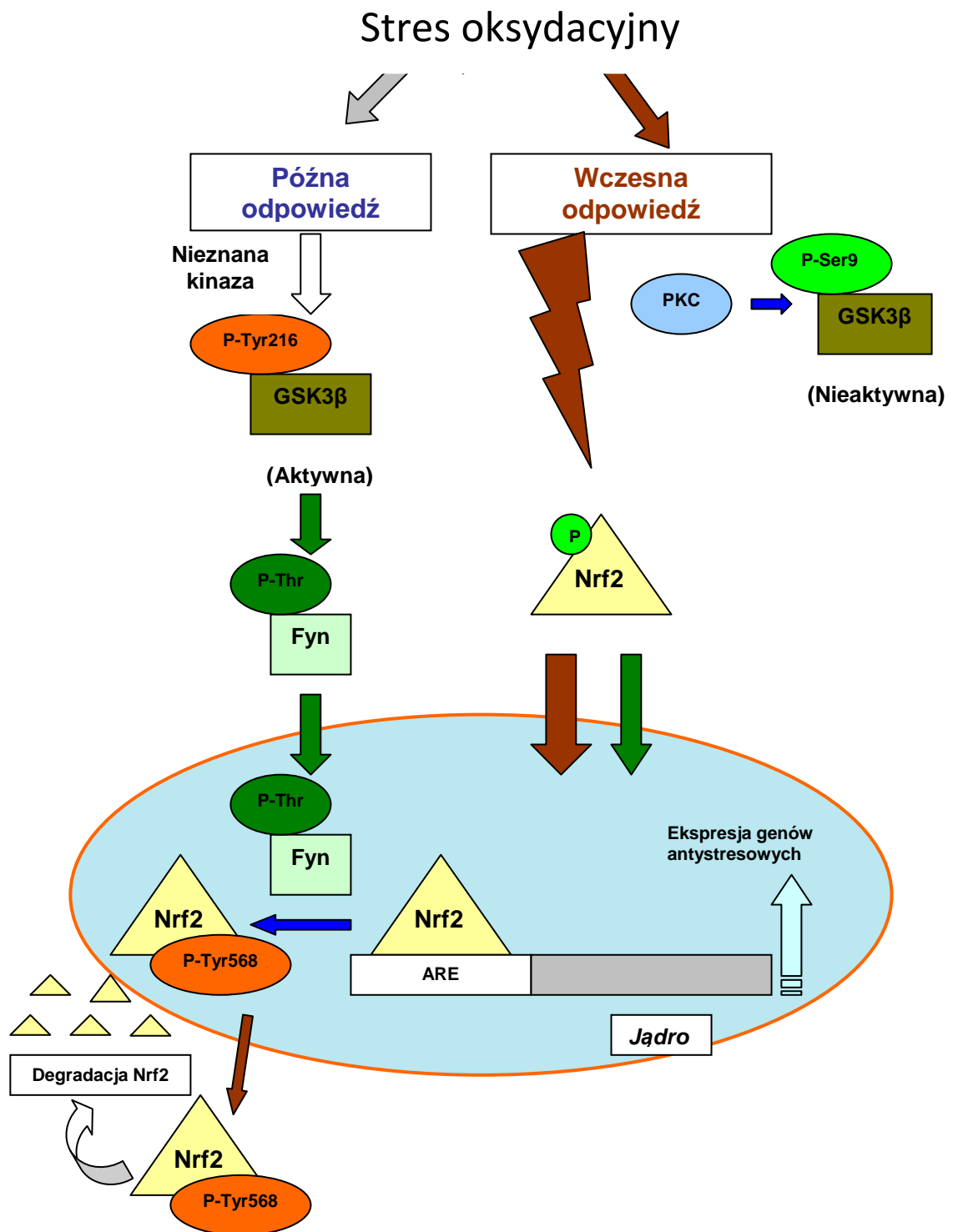


Rycina 2. Struktura krystaliczna GSK3 β wg Haar i wsp., [2001]

Na podstawie analizy struktury krystalicznej sugeruje się, że brak fosforylacji tyrozyny 216 może blokować dostęp kinaz pomocniczych (ang. priming kinases). Fosforylacja ta może powodować zmiany konformacyjne, które wpływają na wiązanie substratów. Dotychczasowe badania nie wyjaśniają tego mechanizmu, a często wyniki badań są sprzeczne. Część ośrodków badawczych wskazuje na ważną rolę autofosforylacji w regulacji aktywności GSK3 β [Cole i wsp., 2004] lub fosforylację przez inne kinazy tyrozynowe [Hughes i wsp., 1993, Kim i wsp., 1999, Lesorti i wsp., 1999, Wang i wsp., 2003]. W 1993 roku Hughes i wsp. w swojej pracy opisali, że mutacja tyrozyny 216 w GSK3 β w przeprowadzonych przez nich doświadczeniach spowodowała 10-krotny spadek jej aktywności w komórkach u *Drosophila melanogaster*. Badacze sugerują, że fosforylacja tyrozyny 216 powoduje ponad 200-krotny wzrost aktywności GSK3 β . Li i Jope [2010] w swojej pracy nie wykluczają ani autofosforylacji ani wpływu innych kinaz i procesów prowadzących do wzrostu aktywności poprzez fosforylację tyrozyny 216.

Ponadto badacze Jain i Jaiswal [2007] w swoich badaniach przedstawili, że możliwy jest udział aktywnej formy GSK3 β w fosforylacji kinazy Fyn oraz w regulacji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 (Rycina 3). Nrf2 (czynnik 2 związany z NF-E2 (ang. NF-E2-related factor 2) wiąże się z ARE (ang. antioxidant-response element) i reguluje ekspresję oraz koordynuje aktywację grupy genów chemoprotekcyjnych w odpowiedzi na powstały stres oksydacyjny. Prowadzi to do uruchomienia mechanizmów ochrony przed stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami komórki. Import i eksport jądrowy Nrf2 odgrywa znaczącą rolę w kontroli jądrowego poziomu Nrf2 oraz reguluje ekspresję genów. Cytosolowy inhibitor Nrf2 zatrzymuje ten czynnik w cytoplazmie i taki kompleks działa jak sensor stresu oksydacyjnego. Narażenie komórki na stres prowadzi do odłączenia się Nrf2 od inhibitora i aktywuje jego translokację do jądra. Długotrwałe pozostanie Nrf2 w jądrze nie jest korzystne i prowadzi do apoptotycznej śmierci komórki. Ilość Nrf2 w jądrze jest ściśle regulowana przez liczne czynniki, które kontrolują import jądrowy, wiązanie do ARE, eksport i degradację Nrf2 w warunkach normalnych oraz stresowych. Wczesna odpowiedź na stres prowadzi do importu Nrf2 do jądra i aktywacji genów protekcyjnych (Rycina 3). Opóźniona odpowiedź na stres to fosforylacja Nrf2 na tyrozynie 568 przez kinazę tyrozynową Fyn zachodząca wewnątrz jądra. Fosforylacja ta zapobiega nagromadzeniu czynnika Nrf2 w jądrze, powoduje jego eksport do cytoplazmy i degradację. Aby kinaza Fyn mogła być aktywna, potrzebna jest jej fosforylacja, w której bierze udział GSK3 β ufosforylowana na tyrozynie 216. W przypadku niewystarczającej fosforylacji białka Fyn przez aktywną GSK3 β może dochodzić do zatrzymania Nrf2 w jądrze, zaburzenia ekspresji genów, co w konsekwencji ma prowadzić do śmierci komórki. Jest to daleko idąca hipoteza, która wymaga jeszcze doświadczalnych potwierdzeń.

Do tej pory nie ma prostej odpowiedzi na pytanie, jakie czynniki wpływają na fosforylację GSK3 β na tyrozynie 216. Istniejące nieliczne dane wymagają potwierdzenia. Wzrostowi aktywności GSK3 β z reguły towarzyszy stymulacja procesów proapoptotycznych [Beurel i Jope, 2006].

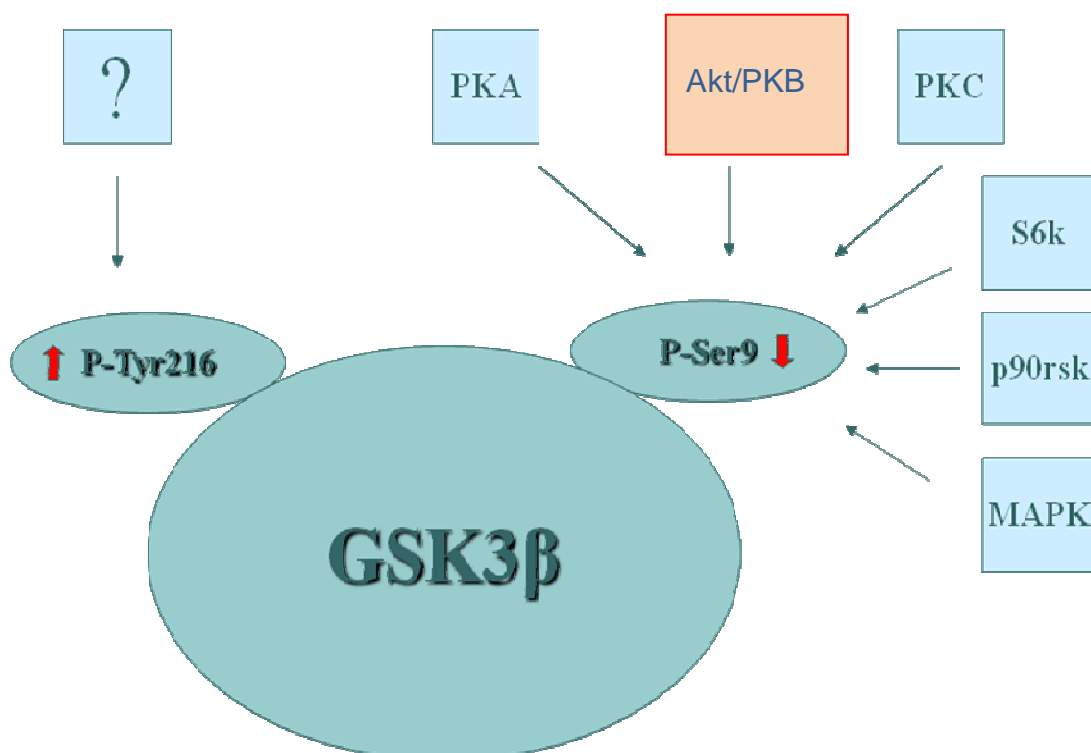


Rycina 3. Rola GSK3 β w regulacji eksportu jądrowego Nrf2 poprzez fosforylację Fyn, zmodyfikowana wg Jain i Jaiswal (2007).

Regulacja aktywności GSK3 β poprzez fosforylację na serynie 9

Lepiej poznany jest mechanizm hamowania aktywności GSK3 β , w wyniku fosforylacji seryny 9, co zmniejsza aktywność enzymu na drodze zmian konformacyjnych. W konsekwencji dochodzi do odpowiedniego fałdowania i blokowania miejsca aktywnego koniecznego do wiązania substratu. Niezwykłą cechą GSK3 β jest to, że jako kinaza białkowa, która jest hamowana przez zewnątrzkomórkowe sygnały, może wywoływać szybki i odwracalny wzrost fosforylacji. Zewnątrzkomórkowe związki i sygnały, jak np. czynniki wzrostu (NGF, PDGF), insulina mogą powodować obniżenie aktywności o 30-70% już w ciągu 10 minut [Sutherland 2011].

Białka mające zdolność fosforylacji GSK3 β w miejscu seryny 9 (P-Ser9) to kinazy: PKA, Akt/PKB, PKC, S6k, p90^{rsk}, MAPK [Doble i Woodgett, 2003] (Rycina 4).



Rycina 4. Regulacja aktywności GSK3 β poprzez jej fosforylację.

PI3-K/Akt /PKB w regulacji GSK3 β i metabolizmu komórki

Biologiczne konsekwencje działania czynników wzrostu polegają na aktywacji procesów przeżycia neuronów i ich funkcjonalnych zdolności w tworzeniu sieci neuronalnych przy równoczesnym hamowaniu szlaków apoptozy [Pettman i Henderson 1998]. Kinaza-3 fosfatydyloinozytolu (PI3-K) pośredniczy w przekazaniu informacji od receptorów dla czynników wzrostu do Akt/PKB oraz licznych innych kinaz biorących udział w przeżyciu komórki.

Po raz pierwszy Yao i Cooper [1995] wykazali w badaniach na komórkach PC12, że obniżenie aktywności PI3-K powoduje likwidację pro-życiowych zjawisk wywołanych aktywacją receptora dla czynników wzrostu (NGF, PDGF). Liczne badania prowadzone na fibroblastach, neuronach i innych komórkach potwierdziły niezbędny udział PI3-K w działaniu czynników wzrostu. Stwierdzono ponadto, że PI3-K jest konieczna w przekazywaniu sygnałów od różnego typu mitogenów i stresorów. PI3-K jest istotna w przeżyciu komórek, a jej aktywacja blokuje apoptozę wywołaną czynnikami genotoksycznymi.

Odkrycie, że ścieżka sygnałowa PI3-K/Akt/PKB prowadzi do fosforylacji GSK3 β na serynie 9, wskazało na istotny udział tych kinaz w regulacji przemian glukozy i wielu procesów metabolicznych w komórce [Cross i wsp., 1995, Delcommenne i wsp., 1998]. Jest wiele doświadczeń, które przedstawiają GSK3 β jako ważny element szlaku przekaźnictwa PI3-K/Akt/PKB w komórce.

Akt/PKB przez fosforylację GSK3 β reguluje metabolizm lipidów. Zahamowana aktywność enzymu prowadzić może do degradacji proteolitycznej białek SREBP (ang. sterol regulatory element binding protein), które są czynnikami transkrypcyjnymi odpowiedzialnymi za aktywację genów kodujących białka zaangażowane w biosyntezę cholesterolu i kwasów tłuszczowych [Sundqvist i wsp., 2005].

Kolejnym ważnym szlakiem sygnałowym, w którym bierze udział Akt/PKB jest regulacja białek z rodziny Bcl-2, w tym białka Bax, które promuje apoptozę wpływając na przepuszczalność błony mitochondrialnej. Wykazano, że Bax jest fosforylowane przez Akt w pobliżu C-końca na serynie 184, co powoduje ograniczenie śmierci neutrofilów [Gardai i wsp., 2004, Duronio 2008]. Natomiast GSK3 β promuje translokację Bax do mitochondriów

poprzez fosforylację seryny 163 [Linseman i wsp., 2004]. Wydaje się więc, że Akt może wpływać na apoptotyczną aktywność Bax w dwojaki sposób: bezpośrednio przez fosforylację seryny 184 oraz pośrednio przez hamowanie aktywności GSK3 β .

Ponadto Akt/PKB wpływa pośrednio na progresję cyklu komórkowego przez inaktywację kinazy GSK3 β , która fosforyluje czynniki transkrypcyjne c-Jun, c-Myc i cykliny D i E odgrywające istotną rolę w przejściu z fazy G1 do S [Wei i wsp., 2005, Welcker i wsp., 2003].

Uważa się, że Akt/PKB odgrywa istotną rolę w regulacji mechanizmów powstawania inwazyjnego fenotypu komórek nowotworowych pochodzenia nabłonkowego na etapie przejścia epithelialno-mezenchymalnego [Gos i wsp., 2009]. Jednym z substratów GSK3 β jest czynnik transkrypcyjny SNAIL, który przyczynia się do zmniejszenia ekspresji kadheryny E. Fosforylacja tego czynnika zmienia jego lokalizację i wpływa na zwiększoną degradację proteolityczną. Zahamowanie aktywności GSK3 β przez Akt/PKB sprawia, że czynnik SNAIL jest bardziej stabilny, a przez to osłabiona jest adhezja międzykomórkowa na skutek obniżenia poziomu kadheryny E [Qiao i wsp., 2008]. Zmiany te powodują uwolnienie β -kateniny, wchodzącej w interakcje z wewnątrzkomórkową domeną cząsteczki kadheryny E. Translokacja β -kateniny do jądra komórkowego i połączenie jej z czynnikiem transkrypcyjnym LEF/TCF (lymphoid enhancer factor/T cell factor), prowadzi do ekspresji białek charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych, np. wimentyny i niektórych integrin [Qiao i wsp., 2008, Chin i Toker, 2009].

Jak już wspomniałam na początku tego podrozdziału, GSK3 β może być również fosforylowana na serynie 9 przez większość kinaz aktywowanych przez mitogeny (MAPK ang. mitogen activated protein kinase). MAPK może obniżać aktywność GSK3 β przez fosforylację jej końca karboksylowego na serynie 389 i treoninie 390 [Thornton i wsp., 2008]. Ostatnie badania wykazały nowy kierunek w interakcji Akt/PKB i GSK3 β , gdzie GSK3 β hamuje Akt/PKB poprzez fosforylację, nie wykluczając sprzężenia zwrotnego z Akt/PKB/MAPK [Lu i wsp. 2011].

Lokalizacja wewnątrzkomórkowa GSK3 β

GSK3 β jest przede wszystkim kinazą cytozolową, ale jej obecność stwierdzono również we frakcji jądrowej i mitochondrialnej [Franca-Koh i wsp., 2002, Fujimuro i Hayward 2003, Meares i Jope, 2007, Songin i wsp., 2011ab, Pająk i wsp., 2009]. Poziom i aktywność GSK3 β w tych organellach zmienia się w odpowiedzi na sygnały komórkowe. Aktywność GSK3 β w mitochondriach może być regulowana przez fosforylację seryny 9. Aktywne białko Akt/PKB może być importowane z cytoplazmy do mitochondriów, gdzie może fosforylować GSK3 β , hamując tym samym jej aktywność. Poziom GSK3 β w jądrze znacznie wzrasta, gdy komórka wchodzi w fazę S cyklu komórkowego, a obniża się w odpowiedzi na czynniki wzrostu. Czynniki indukujące apoptozę mogą powodować akumulację GSK3 β w jądrze, prowadząc do aktywacji kaskady kaspazowej [Jope i Roh, 2006].

Ważną rolę odgrywają białka FRAT1,2 (ang. frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1,2) i LANA (ang. latent nuclear antygen). FRAT1,2 powoduje eksport GSK3 β z jądra [Franca-Koh i wsp., 2002], natomiast LANA sekwestruje je w jądrze [Fujimuro i Hayward, 2003]. Zidentyfikowano również sekwencję lokalizacji jądrowej w domenie od 85 do 103 aminokwasu (ang. nuclear localization sequence, NLS). GSK3 β znajdując się w cytozolu tworzy kompleksy białkowe blokujące NLS i sekwestrujące GSK3 β w cytozolu. Fosforylacja tyrozyny 216 powoduje zmianę konformacji przestrzennej na preferowaną dla akumulacji jądrowej, dochodzi wtedy do odsłonięcia NLS i GSK3 β translokuje się z cytozolu do jądra [Meares i Jope, 2007].

GSK3 β w toksyczności parakwatu i w chorobie Parkinsona

Roczny wskaźnik częstości występowania choroby Parkinsona (ChP) w Stanach Zjednoczonych w wieku 65 lat i powyżej, wynosi około 160 na 100.000 osób [Wirdefeldti i wsp., 2011]. W Polsce liczbę chorych szacuje się na około 60.000, a rocznie rozpoznaje się 6000 nowych zachorowań. ChP jest jedną z głównych przyczyn długoterminowych zachorowalności wśród osób w średnim i podeszłym wieku. W 2005 r. szacowana liczba przypadków ChP na całym świecie wynosiła około 4.400.000 [Wirdefeldti i wsp., 2011]. Do

roku 2030 liczba ta podwoi się do około 9 milionów na podstawie przewidywanego wzrostu populacji w wieku powyżej 65 lat.

ChP została opisana po raz pierwszy przez Jamesa Parkinsona w 1817 roku. Za wystąpienie objawów tej choroby odpowiedzialna jest degeneracja 50-80% neuronów dopaminergicznych części zbitej istoty czarnej, co prowadzi do dramatycznego spadku poziomu dopaminy (DA) (80-90%) w jądrze ogoniastym [Ehringer i Hornykiewicz, 1960]. Procesy degeneracyjne w ChP obejmują także 40-60% neuronów części brzusznej nakrywki śródmózgowia (VTA) [Hirsh i wsp., 1988, Dymecki i wsp., 1996, Damer i wsp., 1999]. Prowadzi to do 50-70% spadku poziomu DA w korze przedczołowej i innych regionach korowych. Deficyt przekąźnictwa dopaminergicznego może powodować zaburzenia poznawcze u pacjentów cierpiących na ChP [Scatton i wsp., 1983, Hornykiewicz i Kish, 1986, Bosboom i wsp., 2004, Ossowska i wsp., 2006]. Markerem tej choroby jest obecność wewnątrzkomórkowych ciał Lewy'ego, zbudowanych głównie z α -synukleiny i innych białek towarzyszących [Maguire-Zeiss i Federoff, 2003]. Czynniki patogenne, które powodują procesy degeneracyjne w idiopatycznej ChP nie są dotychczas znane. Brane są pod uwagę predyspozycje genetyczne oraz kilka czynników endogennych (np. tetrahydroizochinoliny) i egzogennych (pestycydy). Mutacje w specyficznych genach, szczególnie dla α -synukleiny, stanowią mniej niż 10% wszystkich przypadków ChP. Reszta zaburzeń może być wywołana innymi nieznanymi czynnikami genetycznymi, procesem starzenia czy ekspozycją na szkodliwe czynniki środowiska. Do związków szczególnie toksycznych dla neuronów zaliczamy metale ciężkie, pestycydy, herbicydy i inne chemikalia przemysłowe, które wywołują silny stres oksydacyjny, przez co są uważane za potencjalne czynniki ryzyka w ChP.

GSK3 β może odgrywać istotną rolę w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, ale do chwili obecnej istnieją tylko fragmentaryczne dane dotyczące udziału tego enzymu w patomechanizmie ChP oraz w zaburzeniu funkcji mózgu w przypadku działania szkodliwych czynników środowiskowych w tym pestycydów i herbicydów. Dotychczasowe badania, w tym genetyczne, wskazują na znaczenie GSK3 β w patogenezie ChP [Kwok i wsp., 2005; Infante i wsp., 2010]. Do tej pory prowadzono doświadczenia dotyczące udziału GSK3 β na różnych modelach ChP, stosując 6-hydroxydopaminę (6-OHDA), 1-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyne /1-metylo-4-fenilopirydyne (MPTP/MPP+), α -synukleinę [Chen i wsp.,

2004, Avraham i wsp., 2005, Wang i wsp., 2007, Petit-Paitel i wsp., 2009, Wills i wsp., 2010]. Natomiast udział GSK3 β w toksyczności parakwatu (dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-bipyridynowy, PQ) został po raz pierwszy opisany w pracach naszej grupy badawczej [Songin i wsp., 2011a,b].

Chen i wsp. [2004] zastosowali 6-OHDA w zwierzęcym modelu ChP. Związek ten używano w celu zrozumienia mechanizmu śmierci komórek dopaminergicznych. W modelu tym stwierdzono, że 6-OHDA aktywuje apoptozę na szlaku zależnym od kaspazy-3. Jednym z wyników doświadczeń prowadzonych przez tych badaczy było wykazanie wzrostu fosforylacji GSK3 β na tyrozynie 216 w tym modelu. Badania Yue Yong i wsp. [2011] wskazują, że 6-OHDA nie wpływa na aktywność GSK3 β w substancji czarnej. Ponadto, inhibitor GSK3 β , chlorek litu, nie był w stanie zapobiec degeneracji neuronów dopaminergicznych wywołanej przez 6-OHDA w badanej strukturze.

Od wielu lat toksyna MPTP stosowana jest w celu wywoływania symptomów ChP w zwierzęcych modelach doświadczalnych. W wyniku utleniania MPTP w mikrogleju przez monoaminooksydazę typu B (MAO B), zostaje wytworzony toksyczny związek MPP⁺, który uszkadza neurony w istocie czarnej mózgu i powoduje ich śmierć. Stres oksydacyjny wywołany MPP⁺/MPTP prowadzi m.in. do nadmiernej fosforylacji białka tau, za co może być odpowiedzialna GSK3 β . Badacze twierdzą, że dochodzi do tego na skutek autofosforylacji GSK3 β na tyrozynie 216 [Kozikowski i wsp., 2006, Duka i wsp., 2009, Wills i wsp., 2010]. Duka i wsp. [2009] w swojej pracy wykazali, że MPP⁺ powoduje znaczny wzrost poziomu białka GSK3 β ufosforylowanego na tyrozynie 216 w cytozolu, i spadek w mitochondriach. Ponadto zaobserwowali, że hamowanie aktywności GSK3 β zapobiegłoby negatywnym zmianom mitochondrialnego potencjału błonowego, a w konsekwencji aktywacji kaspazy-3 i -9. Wyniki badań wskazują, że GSK3 β może być kluczowym mediatorem w neurotoksyczności wywołanej MPP⁺/MPTP. Hamowanie aktywności GSK3 β może zapewnić komórce ochronę przed stresem mitochondrialnym przyczyniającym się do śmierci komórki. Kolejne badania prowadzone przez Wang W i wsp., [2007] wykazały, że MPTP powoduje szybką aktywację GSK3 β , poprzez obniżenie poziomu fosforylacji GSK3 β na serynie 9, a następnie wzrost poziomu białka tau ufosforylowanego na serynie 396, znanego substratu GSK3 β . Zahamowanie aktywności GSK3 β , zapobiegało indukcji apoptozy neuronów dopaminergicznych w modelu MPTP.

Parakwat (PQ) jest strukturalnym analogiem MPP⁺/MPTP. PQ łatwo ulega redukcji do rodnikojonu, który jest prekursorem rodników nadtlenkowych. Jako herbicyd stosowany był do niedawna na masową skalę, natomiast ze względu na dużą toksyczność i brak selektywności, od 11 lipca 2007 został zakazany w Unii Europejskiej.

PQ ma zdolność przenikania bariery krew – mózg po podaniu systemowym u zwierząt. Jego poziom w mózgu jest około 100 razy niższy niż np. w nerce i wątrobie. Dane dotyczące zdolności tego pestycydu do degeneracji neuronów dopaminergicznych *in vivo* u gryzoni wskazują, że toksyczny efekt PQ wzrasta wraz z wiekiem oraz w przypadku mutacji α -synukleiny (A53T, A30P). Działanie PQ jest potęgowane podczas współdziałania z MPTP [Shepherd i wsp., 2006]. Sugerowano, że PQ, podobnie jak rotenon i MPP⁺, hamuje aktywność I kompleksu oddechowego [Fukushima i wsp. 1997, Tawara i wsp. 1996]. Jednak praca Richardsona i wsp. [2005] zarówno na hodowlach komórkowych jak i mitochondriach z mózgu myszy (PQ 10 mg/kg *ip*, 1 x tyg. przez 3 tyg.) zaprzeczyła tym doniesieniom, wskazując, że PQ nie wiąże się z I kompleksem oddechowym w miejscu działania rotenonu. Może to świadczyć, że hamowanie aktywności I kompleksu oddechowego przez PQ, wykazywane we wcześniejszych pracach, jest mechanizmem nieselektywnym, wywoływanym m.in. przez wolne rodniki tlenowe, które generuje ten pestycyd. W pracy z 2007 roku Castello i wsp. wykazali, że PQ wnika do mitochondriów i generuje O₂^{•-} i H₂O₂. W ten proces zaangażowany jest III kompleks oddechowy [Castello i wsp. 2007].

Shimizu i wsp. [2003b] wskazują także na zaangażowanie zjawiska ekscytotoksyczności w proces degeneracji neuronów po podaniu PQ u szczurów. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano wzrost uwalniania glutaminianu i tlenku azotu (NO) oraz DA z zakończeń nerwowych w prążkowiu. Glutaminian, aktywując receptory AMPA i/lub kainowe, oraz NMDA, zwiększa napływ Ca²⁺ do komórek i aktywuje syntazę NO. Uwalniany NO dyfunduje do zakończeń dopaminergicznych, reaguje z reaktywnymi formami tlenu generując toksyczny nadtlenoazotyn, który zaburza pracę mitochondriów. Uwalnianie DA miałoby być ostatnim efektem w tej kaskadzie zdarzeń, jako objaw zaburzeń funkcji neuronów dopaminergicznych [Shimizu i wsp. 2003b]. Zaangażowane są w ten proces aktywowana stresem kinaza JNK1/2 [Ramachandiran i wsp., 2007, Klintworth i wsp., 2007, Niso-Santano i wsp., 2006, Chun i wsp., 2001], a także kaspaza-3, białko efektorowe wywołujące apoptozę [Ramachandiran i wsp., 2007]

Mechanizm toksyczności PQ jest indukowany przez stres oksydacyjny oraz uszkodzenia mitochondriów [Drechsel i Patel, 2008], a te uszkodzenia odgrywają kluczową rolę również w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych [Lin i Beal, 2006; Pagani i Eckert, 2011]. Dlatego użycie PQ jako modelu doświadczalnego może być przydatne w badaniach roli zaburzeń mitochondriów w mechanizmie chorób neurodegeneracyjnych .

Chen i wsp., 2011 w swojej pracy zbadali wpływ PQ na mechanizmy odpowiedzialne za podwyższone ryzyko występowania ChA. Wykorzystane w doświadczeniach transgeniczne myszy (Tg2576), jako myszy model ChA poddano działaniu PQ, co przyczyniło się do znacznego pogorszenia pamięci i uczenia się. Ponadto, po podaniu PQ zaobserwowano wzrost poziomu peptydów amyloidu β ($A\beta$). Jednak warto zauważyć, że nie spowodowało to pojawienia się płytek amyloidowych.

Z danych literaturowych wynika, że peptydy $A\beta$ wpływają na uszkodzenia mitochondriów [Sultana i Butterfield, 2009, Pagani i Eckert, 2011], natomiast Chen i wsp., 2011 wykazują, że uszkodzenia mitochondriów są wynikiem działania PQ, a dopiero w kolejnym etapie dochodzi do wzrostu poziomu $A\beta$. Zastosowanie PQ spowodowało uszkodzenie mitochondriów, co potwierdziło wcześniejsze badania przeprowadzone przez Cochemia i Muphego z 2008 roku, przedstawiające uszkodzenie komórek i generację reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species ROS). Zaobserwowano, że PQ powoduje wzrost produkcji H_2O_2 oraz spadek potencjału błon mitochondrialnych. Przedstawiony efekt został zniesiony przez zastosowanie peroksyredoksyny 3 (PRDX3). PRDX3 należy do rodziny peroksyredoksyn zlokalizowanych w mitochondriach, które odgrywają ważną rolę w usuwaniu H_2O_2 z mitochondriów [Cox i wsp., 2010]. Chen i wsp., [2008] w swojej pracy wykorzystali myszy transgeniczne z nadekspresją PRDX3 i zaobserwowali zmniejszoną generację H_2O_2 w mitochondriach. W badanym modelu PQ wpływając na zaburzenie funkcji mitochondriów odpowiedzialny był za podwyższony poziom peptydów $A\beta$ i za zaburzenia funkcji poznawczych. Potwierdzone to zostało badaniami przeprowadzonymi na mysim modelu z nadekspresją PRDX3, gdzie zaobserwowano obniżony poziom peptydów $A\beta$, poprawę zaburzonych przez PQ funkcji poznawczych.

Ochrona funkcji mitochondriów może być bardzo dobrą strategią mającą na celu zmniejszenie ryzyka ChA w wyniku działania licznych czynników w tym pestycydów [Coskunwsp., 2004, Swerdlow i Khan, 2004, Sultana i Butterfield, 2009, Wang i wsp., 2009].

GSK3 β w toksyczności peptydów A β i w chorobie Alzheimerera

ChA jest główną przyczyną demencji w krajach wysokorozwiniętych. Choroba ta dotyczy 30 mln osób na świecie. Szacuje się, że w 2050 roku jedna osoba na 85 może chorować na ChA [Ferri CP, 2005]. Stopniowemu zwyrodnieniu i obumieraniu neuronów towarzyszy powstawanie niefizjologicznych form białek zdolnych do oligomeryzacji, agregacji, opornych na działanie enzymów proteolitycznych, oraz uszkodzenie szlaków przekazywania sygnałów.

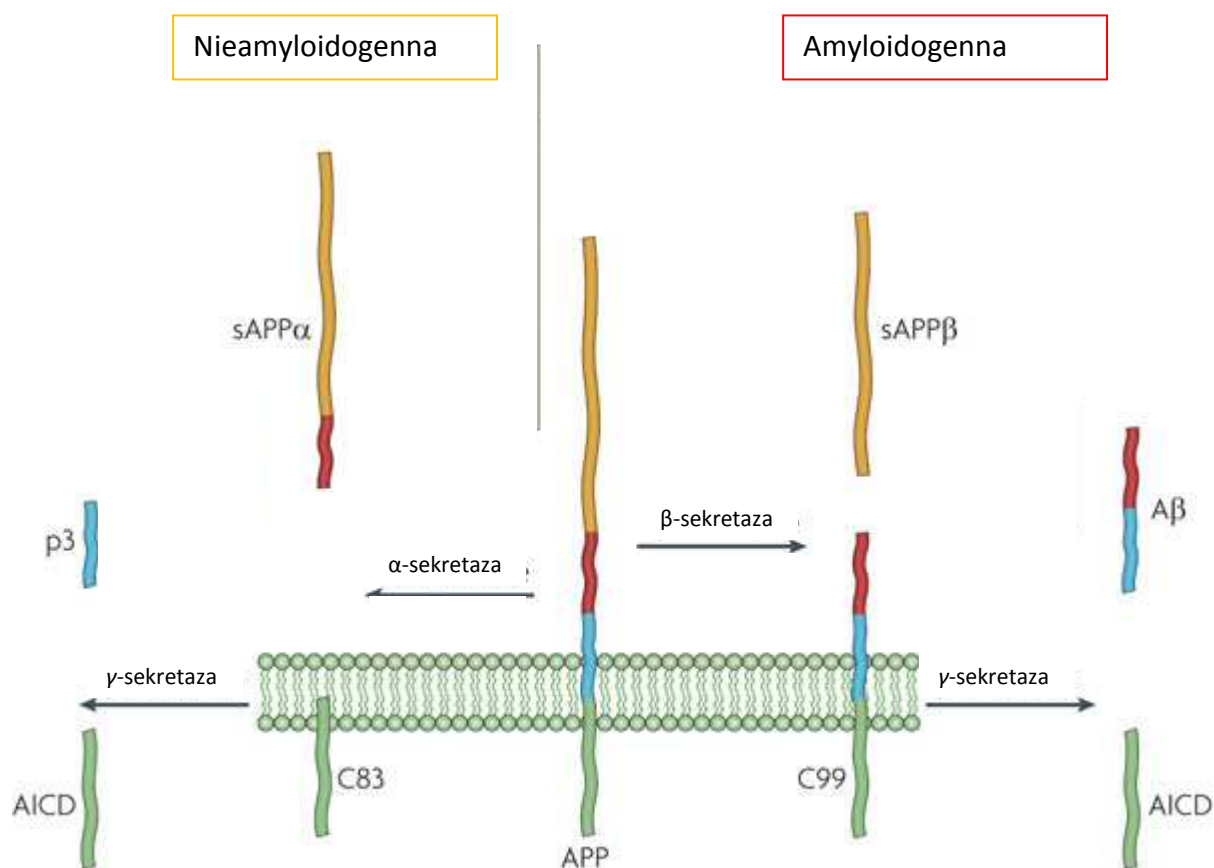
Na początku lat 90 sformułowano hipotezę kaskady amyloidowej. Obecnie uważa się, że oligomery peptydów amyloidu β (A β), które powstają w mózgu, powodują najwcześniejsze i krytyczne zmiany istotne dla rozwoju ChA. Peptydy A β są głównym elementem płytek starczych. Najliczniej peptydy A β występują w płytkach starczych w postaci A β 42, który ze względu na swoją hydrofobowość ma tendencję do agregacji [Newman i wsp., 2007]. Peptydy A β są fragmentami powstałym w wyniku proteolitycznej degradacji białka prekursorowego amyloidu (APP). Znaczenie tego białka w funkcjonowaniu mózgu nie jest w pełni poznane. Białko APP prawdopodobnie odgrywa ważną rolę w takich procesach jak adhezja komórkowa, plastyczność synaptyczna i wzrost neurytów [Gralle i Ferreira 2007].

Znane są dwie drogi metabolizmu białka APP: nieamyloidogenna i amyloidogenna (Rycina5).

W nieamyloidogennym metabolizmie białka APP zaangażowane są sekretazy α i γ (Rycina 5). γ -sekretaza jest kompleksem białkowym złożonym z preseniliny 1 (PS1) lub preseniliny 2 (PS2), nikastryny, PEN2 (ang. presenilin enhancer 2 homolog) i APH-1 (ang. anterior pharynx defectiv 1) [Wolfe i wsp., 1999]. Cięcie APP przez α – sekretazę prowadzi do uwolnienia rozpuszczalnego fragmentu sAPP α z błony komórkowej, natomiast C – końcowy fragment zbudowany z 83 aminokwasów pozostaje w obrębie błony biologicznej. Pozostały fragment może być dalej hydrolizowany przez γ -sekretazę, i powstają nietoksyczne peptydy p3 i AICD (ang. APP intracellular domain) wewnątrzkomórkowe domeny amyloidu (Rycina 5).

W procesie prowadzącym do powstawania amyloidogennych, patologicznych postaci peptydów, β -sekretaza przecina białko APP pomiędzy N- końcowymi resztami

aminokwasowymi 671-672, prowadząc do powstania rozpuszczalnego fragmentu sAPP β oraz C₉₉. Następnie, pod wpływem γ -sekreazy z C₉₉ powstają 4 kDa A β oraz wewnątrzkomórkowa domena AICD (Rycina 5). Proces amyloidogennego metabolizmu białka APP zachodzi przez całe życie i dotyczy niemal każdej komórki ludzkiego ciała [Orellana i wsp., 2007].



Nature Reviews | Neuroscience

Rycina 5. Mechanizm metabolizmu białka APP. Po lewej ścieżka nieamyloidogenna z udziałem sekretazy α i γ . Po prawej ścieżka amyloidogenna z udziałem sekretazy β i γ , prowadzi do powstania A β [wg Thathiah i Strooper 2011].

Występowanie mutacji w obrębie genów kodujących APP i białek odpowiadających za jego degradację (PS1 i PS2), prowadzi do zwiększonego poziomu toksycznych form A β [Murrell i wsp., 1991, Levy-Lahad i wsp., 1995].

Do jednej z najlepiej opisanych mutacji punktowych zaliczamy mutację szwedzką-APPsw, która powoduje nasiloną degradację APP przez β -sekretazę i prowadzi do zwiększonego uwalniania peptydów A β [Sinha i Lieberburg, 1999, Pagani i Eckert 2011].

Rozpuszczalne formy A β mogą być transportowane przez barierę krew – mózg z udziałem receptorów (np. LDL, glikoproteina 330/megalina) lub przez swobodną dyfuzję. W doświadczeniach prowadzonych zarówno *in vitro*, jak i w modelach zwierzęcych zaobserwowano, że upośledzone działanie tych receptorów prowadzi do magazynowania A β w mózgu [Zlaković i wsp., 1996, Shibata i wsp., 2000, Yan i wsp., 2000, Bruunsgaard i wsp., 2001]. Zjawisku temu może sprzyjać obniżenie degradacji peptydów A β .

Początkowo sądzono, że płytki starcze są główną przyczyną neurodegeneracji, która prowadzi do demencji. Badania histopatologiczne wykazały jednak brak korelacji pomiędzy ilością oraz rozmieszczeniem fibrylarnych agregatów A β w mózgu a progresją choroby [Braak i Braak, 1991]. Wiele doświadczeń prowadzonych *in vitro* i *in vivo* dostarczyło dowodów na to, że pula rozpuszczalnych oligomerycznych form A β ma właściwości neurotoksyczne [Lambert i wsp., 1990,1998, Hartley i wsp., 1999, Crouch i wsp., 2005], a stopień zaawansowania choroby jest do nich proporcjonalny [Lue i wsp., 1995]. Obecnie uważa się, że rozpuszczalne oligomery A β są kluczową przyczyną neurodegeneracji w ChA.

Sploty neurofibrylarne są drugą, obok złogów amyloidowych, charakterystyczną cechą histopatologiczną ChA. Struktury te zbudowane są z agregatów nadmiernie fosforylowanego białka tau. Najważniejsze znaczenie w tworzeniu splotów ma fosforylacja reszt seryny i treoniny w łańcuchu polipeptydowym tego białka. Zidentyfikowano wiele kinaz zaangażowanych w ten proces, z których największy udział ma GSK3 β . Prawdopodobnie powstawanie tych anormalnych struktur nie jest czynnikiem zapoczątkowującym tę chorobę, tylko jej skutkiem.

Jak wykazano *in vivo*, GSK3 β jest najważniejszą kinazą biorącą udział w fosforylacji białka tau w mózgu [Takashima i wsp., 1998], a pojawienie się splotów neurofibrylarnych poprzedzone jest somatodendrytycznym nagromadzeniem i aktywacją GSK3 β [Leroy i wsp., 2007].

Liczne dane wykazały istotne znaczenie GSK3 β w neuropatologii ChA. Stwierdzono, że GSK3 β może przyczyniać się do powstawania peptydów A β , a jednocześnie peptydy A β mogą

wpływać na aktywność GSK3 β oraz stymulować powstawanie splotów neurofibrylarnych, pogłębiając patologiczną agregację białka tau oraz prowadząc do zaburzeń transportu aksonalnego [Takashima i wsp. 1995; Alvarez i wsp. 1999, Terwel i wsp. 2008]. Zachodząca w ChA apoptoza neuronów również może być związana z obecnością GSK3 β . Wykazano, że bodźce proapoptotyczne aktywują GSK3 β , prowadząc do jej zwiększonej fosforylacji na tyrozynie 216 i indukując jej przesunięcie do jądra komórkowego, co może doprowadzać do apoptozy [Bhat i wsp. 2000].

GSK3 β jest zaangażowana w pogorszenie zdolności poznawczych oraz odpowiedź zapalną [Hooper i wsp., 2008]. Wiadomo, że mutacja genu preseniliny 1 (PS1) odpowiedzialna jest za wczesną, rodzinną postać ChA. Wykazano, że PS1 aktywuje GSK3 β , i że enzym ten odgrywa istotne znaczenie w patologii zależnej od mutacji w genie preseniliny [Takashima i wsp., 1998]. Mutacja genu PS1 wpływa nie tylko na odkładanie się peptydów A β , ale również na powstawanie splotów neurofibrylarnych, starzenie mózgu i agregację A β .

GSK3 β może odegrać kluczową rolę w uwalnianiu A β poprzez zwiększenie aktywności β -sekretazy. GSK3 β moduluje proteolizę również APP i powstawanie A β poprzez aktywację γ -sekretazy, ponieważ obie sekretazy są jej substratami [Cai i wsp., 2012]. GSK3 β może przyczynić się do produkcji peptydów A β poprzez zahamowanie czynności α -sekretazy. Wzrost stężenia peptydów A β może w konsekwencji wpływać na GSK3 β .

Z kolei działający neuroprotekcynie płytkowy czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor CC –PDGF--CC) moduluje aktywność GSK3 β , zwiększając hamującą fosforylację seryny 9 i zmniejszając aktywującą fosforylację na tyrozynie 216 [Tang i wsp., 2010]. Co ciekawe, neuroprotekcynie działające inhibitory GSK3 β [Jope i Bijur, 2002], mogą wywierać korzystny wpływ poprzez ułatwienie przechodzenia do mózgu IGF-1 czynnika o działaniu neuroprotekcynym. Zwiększenie wychwytu IGF-1 jest związane z poprawą funkcji megaliny, kluczowego regulatora transportu IGF-1 w splocie naczyniówkowym [Bolos i wsp., 2010]. Liczne eksperymenty mają na celu wykazanie potencjału terapeutycznego inhibitorów GSK3 β . Engel i wsp., [2006] obserwowali w mysim modelu ChA z nadekspresją GSK3 β powrót fenotypu do normy po wyłączeniu transgenu. W badaniach nad wykorzystaniem litu w modelach zwierzęcych wykazano, że przy stężeniach osiągalnych w praktyce klinicznej, lit zmniejsza powstawanie złogów A β [Su i wsp., 2004] oraz redukuje zwyrodnienia neurofibrylarne poprzez zwiększenie ubikwitynacji białek i ich degradację [Nakashima i wsp.,

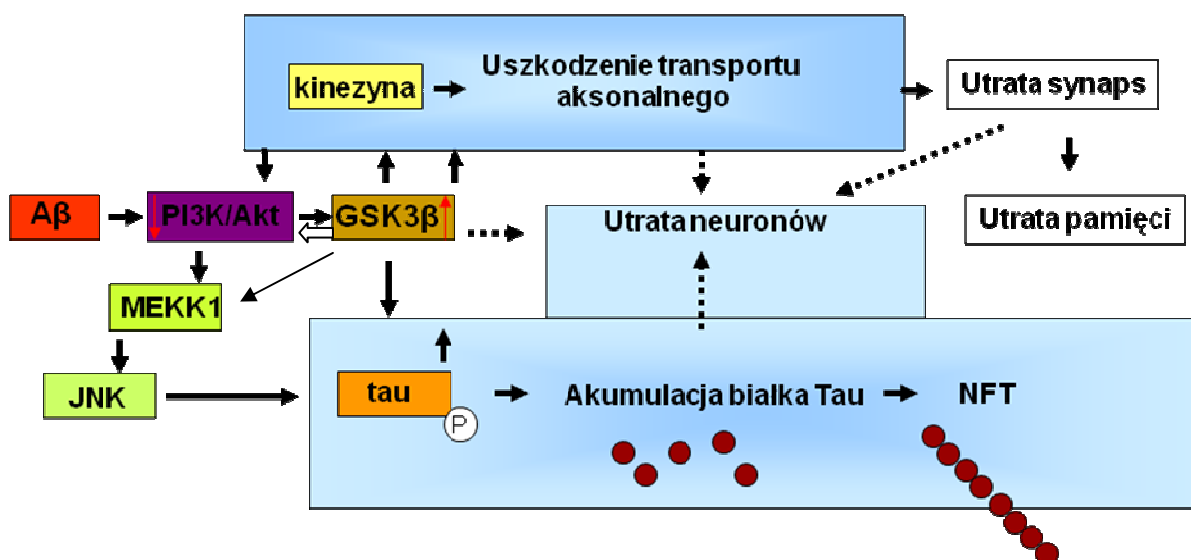
2005]. Lit obniża poziom fosforylacji białka tau, hamując postęp choroby [Engel i wsp., 2006], ale nie prowadzi do wyleczenia [Caccamo i wsp., 2007].

GSK3 β w zaburzeniach transportu aksonalnego w chorobach neurodegeneracyjnych

W centralnym układzie nerwowym istnieje sześć lizoform białka tau, które powstają w wyniku alternatywnego składania mRNA. W komórce białko to może ulegać licznym potranslacyjnym modyfikacjom jak np.: fosforylacji, glikacji, glikozylacji [Takahashi i wsp., 1994, 2000, Mukai i wsp., 2002, Caccamo i wsp., 2007, Bartoszevska 2008]. Białko tau odpowiada za stabilizację mikrotubul w komórkach.

Zaburzenie transportu aksonalnego spowodowane jest destabilizacją mikrotubul w wyniku nadmiernej fosforylacji białka tau oraz nadmiernej fosforylacji białka motorycznego kinezy. Nadmierna aktywacja GSK3 β prowadzi do hiperfosforylacji białka tau, co powoduje zaburzenia funkcji mikrotubul. W wyniku tego utracona zostaje ich zdolność transportowa.

Stwierdzono, że nadmierna fosforylacja tau przez kinazę JNK wraz z GSK3 β jest odpowiedzialna za powstawanie splotów neurofibrylarnych (NFT) (Rycina 6). Wykazano, że GSK3 β fosforyluje MEKK1 i w konsekwencji aktywuje JNK [Kim i wsp., 2003, Sato i wsp., 2003]. Uważa się, a potwierdziły to dane eksperymentalne, że peptydy A β mogą aktywować JNK pośrednio poprzez aktywację GSK3 β [Kim i wsp., 2003, Takashima i wsp., 2006].



Rycina 6. Schemat relacji molekularnych między $A\beta$, $GSK3\beta$, białkiem tau i innymi czynnikami. Mechanizm powstawania NFT, utraty synaps i neuronów [wg Takashima 2006].

Substraty $GSK3\beta$, białko tau i kinezyne, zaangażowane są w proces transportu aksonalnego. W wyniku nadmiernej fosforylacji kinezyne dochodzi do utraty funkcji białek „carga” w pęcherzykach. W konsekwencji może doprowadzać to do uszkodzenia synaps i procesów pamięci [Morfini i wsp., 2002].

Ważnym białkiem fosforylowanym przez $GSK3\beta$, jest czynnik transkrypcyjny CREB (ang. cAMP responsive element binding protein). Aktywny CREB wpływa na transkrypcję genów zaangażowanych w procesy plastyczności synaptycznej oraz w proces długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP). CREB ufosforylowany w pozycji seryny 133 przez PKA staje się substratem dla $GSK3\beta$. W tej ufosforylowanej formie CREB jest rozpoznawalny przez $GSK3\beta$, która fosforyluje go na serynie 129 i hamuje jego funkcje transkrypcyjne [Grimes i Jope, 2001]. Jest to jeden z mechanizmów, poprzez który $GSK3\beta$ może zaburzać powstawanie LTP i procesy pamięci. Zaobserwowano, że nadmierna aktywacja $GSK3\beta$, która może być spowodowana m.in. hamowaniem aktywności PI-3K/Akt, prowadzi do istotnych zaburzeń transportu aksonalnego, pamięci i orientacji przestrzennej, zjawisk bardzo podobnych do obserwowanych w chorobach neurodegeneracyjnych (Rycina 6).

Dokładne poznanie mechanizmów działania $GSK3\beta$ i procesów, w których kinaza ta odgrywa istotną rolę, może stanowić ważny etap na drodze do zapobiegania i leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego.

CEL

Celem prowadzonych badań było poznanie wpływu PQ na ekspresję i poziom białka GSK3 β i jej aktywnej formy ufosforylowanej na tyrozynie 216 (GSK3 β pY216). Ponadto zbadanie ekspresji genów prooksydacyjnych w śródmózgowiu i prążkowiu szczura oraz określenie wpływu PQ i peptydów A β na poziom białka GSK3 β w komórkach PC12.

Cel ten został zrealizowany poprzez wykonanie następujących zadań szczegółowych:

1. Zbadanie zmian ekspresji i poziomu białka GSK3 β oraz formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 w śródmózgowiu i prążkowiu szczura po jednorazowym podaniu i krótkoterminowym działaniu (3 i 24 godziny) PQ. Analiza ekspresji genów prooksydacyjnych wywołanej działaniem PQ.
2. Określenie poziomu immunoreaktywności GSK3 β i formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 w śródmózgowiu i prążkowiu, oraz we frakcjach podkomórkowych po wielokrotnym podaniu i długoterminowym działaniu PQ (4 i 37 tygodni).
3. Zbadanie wpływu PQ i peptydów A β na poziom GSK3 β i jej form ufosforylowanych (GSK3 β pY216 i GSK3 β pS9) w komórkach PC12 kontrolnych i transfekowanych genem dla białka prekursorowego A β .

MATERIAŁY I METODY

Zwierzęta doświadczalne

Do doświadczeń używano szczurów samców szczepu Wistar w wieku od 3 do 27 miesięcy. Zwierzęta w wieku 3-4 miesięcy i masie ciała 200-250g były traktowane, jako dorosłe, zwierzęta w wieku 24-27 miesięcy o masie ciała ponad 300g-350g, jako stare. Zwierzęta hodowano w warunkach stabilnej temperatury, wilgotności oraz wolnego dostępu do wody i pożywienia. Doświadczenia z udziałem zwierząt były wykonywane z zasadami prawa etycznego, zgodnego z Konwencją Europejską na podstawie zezwolenia wydanego przez IV Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, z siedzibą w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie.

Zastosowany związek chemiczny

Parakwat (PQ) (dichlorek metylo viologenu, C₁₂H₁₄Cl₂N₂, Sigma-Aldrich, USA). Do podań dootrzewnowych (*ip*) PQ rozpuszczano w sterylnej wodzie ampułkowej (Polpharma, Stargard Gdański), bezpośrednio przed podaniem zwierzętom, w dawkach 10mg/kg m.c i 40mg/kg m.c. Dawka PQ do podań została wybrana eksperymentalnie oraz na podstawie wyników opublikowanych badań [Ossowska i wsp., 2005 a,b, Ossowska i wsp., 2006, Kuter i wsp., 2007, Shimizu i wsp., 2003].

Schemat podawania PQ

Podania jednorazowe i krótkoterminowe działanie PQ

PQ w dawce 40 mg/kg m.c został podany *ip*, jednorazowo. Zwierzęta kontrolne otrzymały sól fizjologiczną. Mózg do badań pobierano po 3 i 24 godzinach od iniekcji PQ.

Podania wielokrotne i długoterminowe działanie PQ

PQ w dawce 10 mg/kg m.c. podawano *ip*, jeden raz w tygodniu przez 4 i 37 tygodni. Zwierzęta kontrolne otrzymywały sól fizjologiczną w tym samym czasie i w taki sam sposób. Mózg do badań pobierano 7 dnia od ostatniej iniekcji.

Charakterystyka modelu:

Wpływ długoterminowego (37 tygodni) podawania PQ na komórki dopaminergicznego układu czarno-prądkowego.

Stereologiczne liczenie neuronów wykazało redukcję liczby komórek TH-ir (znakowanie immunoreaktywne dla hydroksylazy tyrozynowej), statystycznie istotny ich spadek o 28% w części zbitej istoty czarnej (SNc) i nieistotne statystycznie obniżenie w polu brzusznej nakrywki (VTA) o 14% u szczurów traktowanych PQ przez 37 tygodni. Stwierdzono również obniżenie liczby komórek TH-ir w obszarze miejsca sinawego (LC) o 27%. Nie wykazano zmian objętości struktur.

Wpływ długoterminowego (37 tygodni) podawania PQ na poziom DA, 5-HT, NA i ich metabolitów w prądkowiu i istocie czarnej.

PQ podawany przez 37 tygodni nie wpłynął znacząco na poziom dopaminy, 5-HT (5-hydroksytryptaminy, serotoniny) i ich metabolitów w prądkowiu (danych nie przedstawiano), Stosunek DOPAC/DA był obniżony o 13% (kontrola= 0.1037 ± 0.0037 , $n=7$ vs. PQ = 0.09 ± 0.0034 , $n=7$, $p<0.05$). Ponadto długoterminowe podawanie PQ obniżyło poziom noradrenaliny w prądkowiu o 49% (kontrola = 127.91 ± 25.50 ng/g tkanki, $n=6$ vs. PQ = 64.88 ± 6.99 ng/g tkanki, $n=6$, $p<0.05$). Wyniki wykazują brak wpływu PQ na poziom monoamin i ich metabolitów w istocie czarnej (danych nie przedstawiano) [Songin i wsp., 2011].

Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz

Zwierzęta dekapitowano, a następnie na schłodzonej do temperatury 4°C szalce Petriego izolowano z mózgu: prądkowie, śródmózgowie, hipokamp, kora mózgowa i mózdzek.

Przygotowanie homogenatu

Wyizolowane części mózgu homogenizowano ręcznie w temperaturze 4°C w szklanym homogenizatorze Dounce'a w medium izolacyjnym zawierającym 0,32 M sacharozę, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, inhibitory proteaz (Complete™) oraz 10 mM bufor Tris-HCl, pH 7,4. Homogenat 10% używano do doświadczeń oraz do otrzymywania zgrubnych frakcji podkomórkowych.

Otrzymywanie frakcji podkomórkowych

Otrzymany homogenat wirowano przy 800 x g przez 5 minut w temperaturze 4°C. Osad zgrubnej frakcji jądrowej (P1) zawieszono w buforze do homogenizacji i używano do badań immunochemicznych metodą Western blot. Nadsącz (S1) wirowano przez 15 min przy 17000 x g w temperaturze 4°C i otrzymano osad, zgrubną frakcję mitochondrialną (P2) i nadsącz (S2) frakcji cytozolowej. Immunochemiczna analiza cytochromu c białka charakterystycznego dla mitochondriów wykazała, że jest ono obecne wyłącznie we frakcji mitochondrialnej. Natomiast specyficzna dla jąder polimeraza poli(ADP-rybzy) (PARP-1) obecna była jedynie we frakcji jądrowej.

Komórkowe modele badawcze

Linia szczurzych komórek pheochromocytooma – PC12

Komórki szczurzego guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy (pheochromocytooma, PC12) otrzymano z Zakładu Farmakologii Biocentrum Uniwersytetu we Frankfurcie nad Menem w Niemczech. Komórki te były stabilnie transfekowane ludzkim genem białka prekursorowego amyloidu β (APP) z mutacją typu szwedzkiego (APP^{sw}, K670M/N671L), a w przypadku komórek kontrolnych, samym wektorem. Transfekcję wykonano przy użyciu techniki FUGENE (Roche Diagnostics GmbH) [Eckert i wsp., 2001]. Gen kodujący APP znajdował się pod kontrolą promotora CMV. Wektor zawierał również geny oporności na gentamycynę. W przypadku komórek PC12, taka transfekcja powoduje wzrost ekspresji ludzkiego białka prekursorowego APP i zwiększone uwalnianie peptydów A β (Rycina 7).

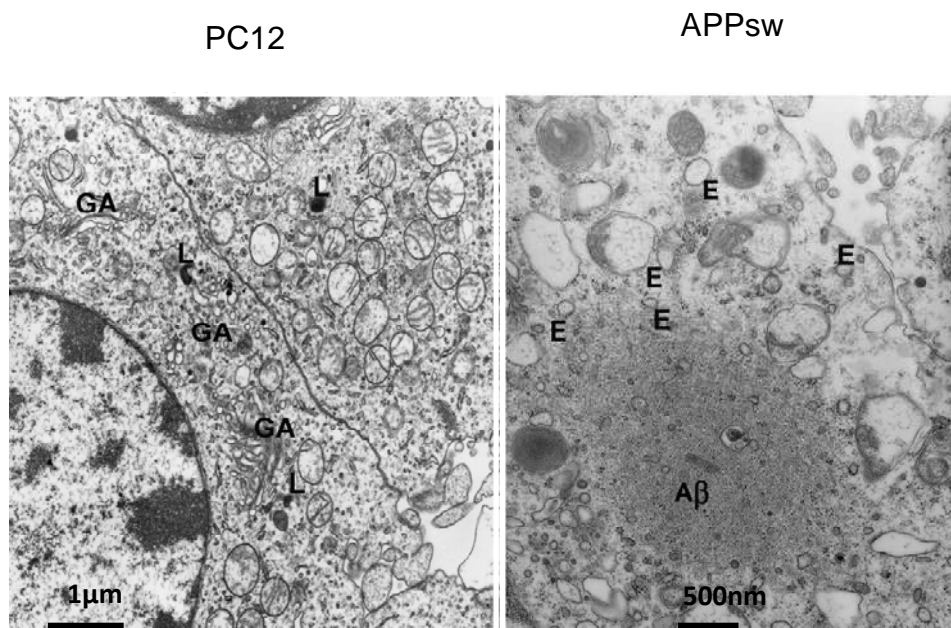
Stwierdzono, że w komórkach APPsw poziom uwalnianych peptydów A β jest 4,8-krotnie wyższy w porównaniu do komórek kontrolnych PC12 [Chalimoniuk i wsp., 2007].

Komórki APPsw i kontrolne hodowane były w standardowej pożywce DMEM (Eagle'a) (Sigma) z dodatkiem inaktywowanych w 56°C surowic: 10% płodowej cielęcej (FCS) i 5% końskiej (HS), 2 mM glutaminy i antybiotyków (50 jednostek/ml penicyliny, 50 μ g/ml streptomycyny i 400 μ g/ml G418). Hodowle prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych szalkach lub płytkach zawierających 24 dołki (Falcon), w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze powietrza nasyconej parą wodną zawierająca 5% CO₂.

Komórki w trakcie hodowli, a następnie po podaniu czynników farmakologicznych obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41.

Do wykonania zdjęć w mikroskopie elektronowym komórki kontrolne PC12 i komórki transfekowane APP z mutacją szwedzką (APPsw) były przygotowane j.w, a kolejne etapy doświadczenia wykonane były w Zakładzie Ultrastruktury Komórki IMDiK PAN.

Bank komórek przechowywano w stanie zamrożonym w temperaturze -80°C (do bieżącego użytku) oraz w ciekłym azocie (w celu dłuższego przechowywania), w pożywce o składzie: 50% FCS, 40% DMEM, 10% DMSO.



Rycina 7. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego ultrastruktury komórek kontrolnych PC12 i komórek transfekowanych APP z mutacją szwedzką (APPsw). Złogi wewnątrzkomórkowe A β widoczne w komórkach APP(sw). E-endosomy, GA-aparat Golgiego, L-lizosomy. Badania wykonano w Zakładzie Ultrastruktury Komórki IMDiK PAN [Pajk i wsp., 2009].

Do momentu rozpoczęcia eksperymentu komórki pasażowano, co 4 dni. Przy pasażowaniu komórek stosowano 0,25% roztwór trypsyny z 0,02% EDTA (Sigma). Komórki o gęstości $1-1,5 \times 10^6$ wysiewano na szalkę o średnicy 10 cm, $0,5 \times 10^6$ komórek na szalkę o średnicy 3,5 cm, 1×10^5 komórek do dołka na płytkach 24-dołkowych. W 24 godzinie po wysianiu wymieniano pożywki hodowlane na pożywki zawierające 2% FCS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki w stężeniach takich jak w mediach hodowlanych. Następnie komórki traktowano badanymi związkami i inkubowano przez 24 godziny w 37°C. W celu farmakologicznej modyfikacji reakcji komórek na badane czynniki do medium dodawano związek PQ.

Wzór chemiczny stosowanego związku

W prowadzonych badaniach zastosowano związek:

Parakwat (PQ) – Stosowany w stężeniach 0,1-1 mM.



Przygotowanie materiału do oznaczeń immunochemicznych

Komórki na szalkach płukano dwukrotnie buforem (PBS), a następnie zawieszano w buforze Tris-HCl o pH 7,4 zawierającym inhibitory proteaz Complete (Roche Diagnostics GmbH), kolejno komórki zeskrobywano z szalek i sonifikowano. Tak przygotowany materiał przechowywano w -20 °C i używano do oznaczeń immunochemicznych (Western blot).

Metody spektrofotometryczne

Oznaczanie zawartości białka

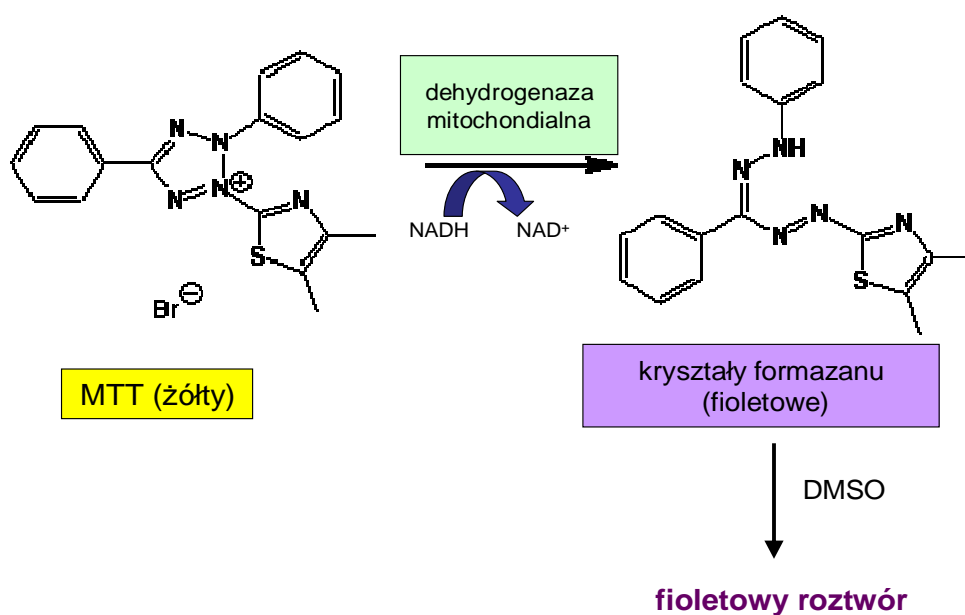
Zawartość białka w preparacie oznaczano metodą Lowry'ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina [Lowry i wsp., 1951].

Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT

Test MTT jest ilościowym kolorymetrycznym testem, w którym tylko żywe, aktywne metabolicznie komórki, mogą przekształcać w swoich mitochondriach sole tetrazoliowe (bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowego, MTT) o zabarwieniu żółtym do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu o zabarwieniu fioletowym (Rycina 8). Powstałe kryształy rozpuszczane są w DMSO. Dehydrogenaza NAD(P)H-zależna jest enzymem mitochondrialnym, aktywnym tylko w żywych komórkach, dlatego intensywność

zabarwienia jest proporcjonalna do ilości wytworzonego formazanu oraz ilości żywych i aktywnych metabolicznie komórek w badanym materiale.

Komórki PC12 wysiewano na szalki 24-dółkowe pokryte polietylenoiminą w ilości 2×10^5 komórek na dółek. Następnego dnia pożywkę wymieniano z niską zawartością surowicy (2% FCS) i dodawano PQ w odpowiednim stężeniu. Po 24 godzinach medium hodowlane wymieniano ponownie na pożywkę pozbawioną surowicy, dodawano MTT (0,25 mg/ml) i inkubowano przez 2 godziny w 37°C . Następnie pożywkę usuwano, a komórki rozpuszczano w DMSO i mierzono spektrofotometrycznie absorbancję przy długości fali 595 nm, za pomocą czytnika do mikroplitek.



Rycina 8. Zasada działania testu MTT

Metody spektrofluorymetryczne

Analiza poziomu wolnych rodników w cytozolu komórek przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF

Poziom wolnych rodników w komórkach PC12 badano w oparciu o reakcję przekształcenia dwuocianu 2',7-dichlorodwuhydrofluoresceiny ($H_2DCF-DA$), na skutek wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do 2',7-dichlorofluorescyny (DCFH), która następnie jest utleniana przez wolne rodniki do fluorescencyjnej 2',7-dichlorofluoresceiny (DCF). Test ten pozwala analizować wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników tlenowych [Royall i wsp., 1993]. Komórki PC12 wysiewano na szalki 24-dołkowe pokryte polietylenoiminą w ilości 2×10^5 komórek na dołek. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy (2% FCS). Po 24 godzinach do pożywki dodawano $10 \mu M H_2DCF-DA$ (Sigma) i inkubowano przez 50 min w $37^\circ C$. Następnie komórki płukano trzykrotnie buforem PBS. Fluorescencję mierzono przy użyciu spektrofluorymetru Perkin Elmer LS 50B przy długości fali pobudzenia 488 nm i emisji 525 nm. Wynik wyrażono, jako intensywność fluorescencji na mg białka.

Metody immunochemiczne

Immunodetekcja białek metoda Western blot

Immunochemiczną metodą Western blot oznaczano poziom białek GSK3 β , GSK3 β pY216, GSK3 β S9, fosfo serynę(p-Ser), Tau (pS396), GAPDH oraz β -aktynę. Homogenaty lub frakcje podkomórkowe (50 μg białka) mieszano z buforem denaturująco-obciążającym [Laemmli 1979], o składzie 62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM DTT, 20% glicerol i 0,2% błękit bromofenolowy, pH 6,8. Próbkę następnie ogrzewano przez 5 min w temp. $95^\circ C$. Białka rozdzielano na żelu poliakrylamidowym i przenoszono na błonę z polifluorkuwinylidenu (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech). Po wykonaniu barwienia białek za pomocą roztworu Ponceau S, membranę płukano w odpowiednim buforze, a następnie inkubowano w roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA (Sigma) w temperaturze pokojowej przez 60 min w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał (szczegółowe warunki reakcji dla poszczególnych białek podano w Tabeli 2).

Oznaczane białko	Gęstość żelu	Bufor	Blokowanie	Przeciwciała I-rzędowe		Przeciwciała II-rzędowe
GSK3 β	10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Mysie, monoklonalne, przeciw GSK3 β (N216), 610201; BD Transduction Laboratories, San Jose, CA	1:1000 w 2% mleku w TBS-Tween	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V 1:2000
GSK3 β pY216	10%	TBS-Tween	0,5% BSA	Mysie, monoklonalne, przeciw GSK3 β pY216, 612313; BD Transduction Laboratories, San Jose, CA	1:1000 w 0,2% BSA w TBS-Tween	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V 1:2000
GSK3 β pS9	10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Królicze poliklonalne, przeciw GSK3 β pS9, 9336; Cell Signaling Technology, Inc	1:1000 w 5% mleku w TBS-Tween	Antykrólicze Sigma A-0545 1:4000
Fosfo-Seryna	10%	TBS-Tween	5% BSA	Królicze poliklonalne przeciw fosfo serynie p-(S) 2324; Cell Signaling Technology, Inc	1:500 w 2,5% BSA w TBS-Tween	Antykrólicze Sigma A-0545 1:4000
Tau (pS396)	10%	TBS-Tween	5% BSA	Mysie monoklonalne przeciw Tau (pS369), 9632; Cell Signaling Technology, Inc	1:500 w 2% BSA w TBS-Tween	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V 1:2000
GAPDH	10%	TBS-Tween	5 % mleko odtłuszczone	Królicze, poliklonalne przeciw GAPDH, Sigma G9545	1:500 w 5% mleku w TBS-Tween	Antykrólicze Sigma A-0545 1:4000
β -aktyna	10%	TBS-Tween	5% mleko odtłuszczone	Mysie, monoklonalne (C4), MP Biomedicals, 69100	1:1000 w 0,1% mleku w TBS-Tween	Antymysie Amersham Pharmacia Biotech NA931V 1:2000

Tabela 2 . Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń
TBS-Tween – bufor Tris o składzie 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,6
BSA - albumina z surowicy bydlęcej, wolna od kwasów tłuszczowych

Następnie błonę inkubowano przez noc w 4 °C w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciało pierwszorzędowe. Nadmiar przeciwciała odpłukiwano 3-krotnie przez 10 minut w odpowiednim buforze, a następnie błonę inkubowano 1 godzinę w roztworze drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z peroksydazą chrzanową. Niezwiązane specyficznie przeciwciała usuwano 3-krotnie płuczając błony przez 10 min w odpowiednim buforze. Kolejno błonę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu zestawu firmowego ECL (Amersham Pharmacia Biotech) i wizualizowano naświetlając światłoczuły film (Hyperfilm-Kodak, Sigma). Klisze poddawano analizie densytometrycznej przy pomocy oprogramowania TotalLab v1.11 (Non Linear Dynamics). Błony wykorzystane uprzednio inkubowano 30 min. w roztworze 1% SDS i 50 mM glicyny-HCl o pH 2,0 w celu oderwania związanych przeciwciał i płukano 3 x 15 min w TBS-Tween, po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

Oznaczanie aktywności GSK3 β

Aktywność GSK3 β oznaczana była wg metody opisanej przez Reith (2001). Komórki PC12 kontrolne i APPsw na szalkach płukano dwukrotnie PBS-em. Następnie komórki poddawano lizie w buforze zawierającym: 50mM TrisHCl, pH 7.4, 0.1% NP-40, 250 mMNaCl, 5 mM EDTA, 50 μ g/ml PMSF, 10 μ g/ml TPCK, 10 μ g/ml STI, 1 μ g/ml Aprotynina, 1 μ g/ml Leupeptyna, 1mM Na₃VO₄, 50 mMNaF, 1 mM Na₂H₂P₂O₇, 10 mM benzamid przez 30 min w temp 0⁰C. Wirowano 12,000 \times g przez 5 min w 4°C i nadsącz używano do dalszych doświadczeń po oznaczaniu białka metodą Lowry'ego. Równolegle płukano kompleks Dynabeads (M 280 sheep z przeciwciałami anti-mysie IgG; Invitrogen, Carlsbad, CA) PBS-em, a następnie inkubowano w buforze lizującym (j.w) przez 1 godzinę w 4°C. Następnie nadsącz z komórek inkubowano wraz z kompleksem Dynabeads przez 1 godzinę w temp. 4°C w buforze lizującym (j.w). Po wirowaniu, nadsącz był inkubowany przez 1 godzinę w 4°C w celu immunoprecypitacji GSK3 β w obecności specyficznych przeciwciał anti-GSK3 β (610201; BD Transduction Laboratories, San Jose, CA). Immunoprecypitat płukano czterokrotnie buforem lizującym, a następnie raz płukano buforem zawierającym 50mMTris HCL pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Reakcja prowadzona była w objętości 40 μ l w buforze reakcyjnym zawierającym materiał po immunoprecypitacji i 100 μ g/ml substratu białka tau (P2717; Invitrogen). Po 5 minutach inkubacji w 30⁰C dodano 5 μ l buforu z ATP 10 μ M i inkubowano

przez 10 minut w 30°C, a następnie próby poddano denaturacji - 5 minut w 100°C w celu zatrzymania reakcji. Kolejnym etapem było zastosowanie metody Western blot z użyciem przeciwciał pozwalającą na detekcję fosforylacji seryny 396 białka tau przez GSK3β.

Analiza ekspresji genów

Izolacja RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzono używając odczynnika TRI-reagent firmy Sigma zgodnie z instrukcją producenta. Materiał zawieszano w 1 ml odczynnika TRI-reagent, pozostawiano na 5 minut i homogenizowano. Następnie, do 1 ml homogenatu dodawano 200 μl chloroformu, energicznie mieszano przez około 15 sek. i pozostawiano na 15 min w temperaturze pokojowej. Próby wirowano przy obrotach 12000 x g przez 10 min w 4 °C. Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 500 μl zimnego izopropanolu i delikatnie mieszano. Próby pozostawiano na 5 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 10 min przy obrotach 12000 x g w 4 °C. Otrzymany osad przemywano trzykrotnie 1 ml 75% etanolu. Po kilkuminutowym odparowaniu etanolu z próbek, osad RNA zawieszano w 20 μl wody pozbawionej RNaz (PromegaCorporation). Mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną przy długości fali 260 nm, oraz zanieczyszczenie RNA oraz DNA przy długości fali 280 nm. Prawidłowy stosunek OD_{260}/OD_{280} wynosił od 1,7 do 2,0. Ilość RNA oznaczano w aparacie spektrofotometrycznym NanoDrop.

Oczyszczanie RNA

W celu oczyszczenia wyizolowanego wcześniej RNA z pozostałości DNA komórkowego, do probówek 1,5 ml przenoszono 5 μg RNA i uzupełniano odczynnikami do trawienia DNA firmy Promega Corporation do 10 μl. Po przygotowaniu mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 1 μl Stop solution i dalej prowadzono inkubację przez 10 min w 70°C. Po zakończeniu reakcji próbki przenoszono do lodu.

Reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowite wyizolowane RNA (5 µg) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy. W reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymywano DNA komplementarne do RNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w 42 °C przez 15 min przy użyciu zestawu odczynników firmy Promega Corporation, w końcowej objętości 20 µl. W celu inaktywacji odwrotnej transkryptazy, po zakończeniu reakcji, mieszaninę reakcyjną inkubowano przez 5 min w 90 °C, a następnie schładzano w lodzie.

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-time PCR)

Zmiany poziomu mRNA genów kodujących białka GSK3β, TNF-α, iNOS, COX-2 i aktyny analizowano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR). Na matrycy cDNA uzyskanej z 1 µg RNA przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu odpowiednich sond Taq-Man (Applied Biosystems). Zastosowano następujące warunki reakcji: (94°C-30 s, 63°C – 30 sek, 72°C – 45 sek.) x 40 cykli amplifikacji. Każdą próbkę cDNA amplifikowano w trzech powtórzeniach. Poziom mRNA wyrażano, jako względny stosunek próbki badanej do próbki referencyjnej (kalibratora), po uprzedniej normalizacji obydwu względem genu referencyjnego (aktyny).

Real-time PCR wykonywano przy pomocy aparatu ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Wyniki analizy przedstawiono jako % kontroli.

Statystyczne opracowanie wyników

Przeprowadzono od 3 do 8 doświadczeń w każdej grupie badanej. Dodatkowo oznaczenie wykonywano, w co najmniej trzech powtórzeniach. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią ± błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano wieloczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testów post-hoc Newmana-Keulsa lub Bonferroniego. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności p poniżej 0,05.

WYNIKI

Badania *in vivo*

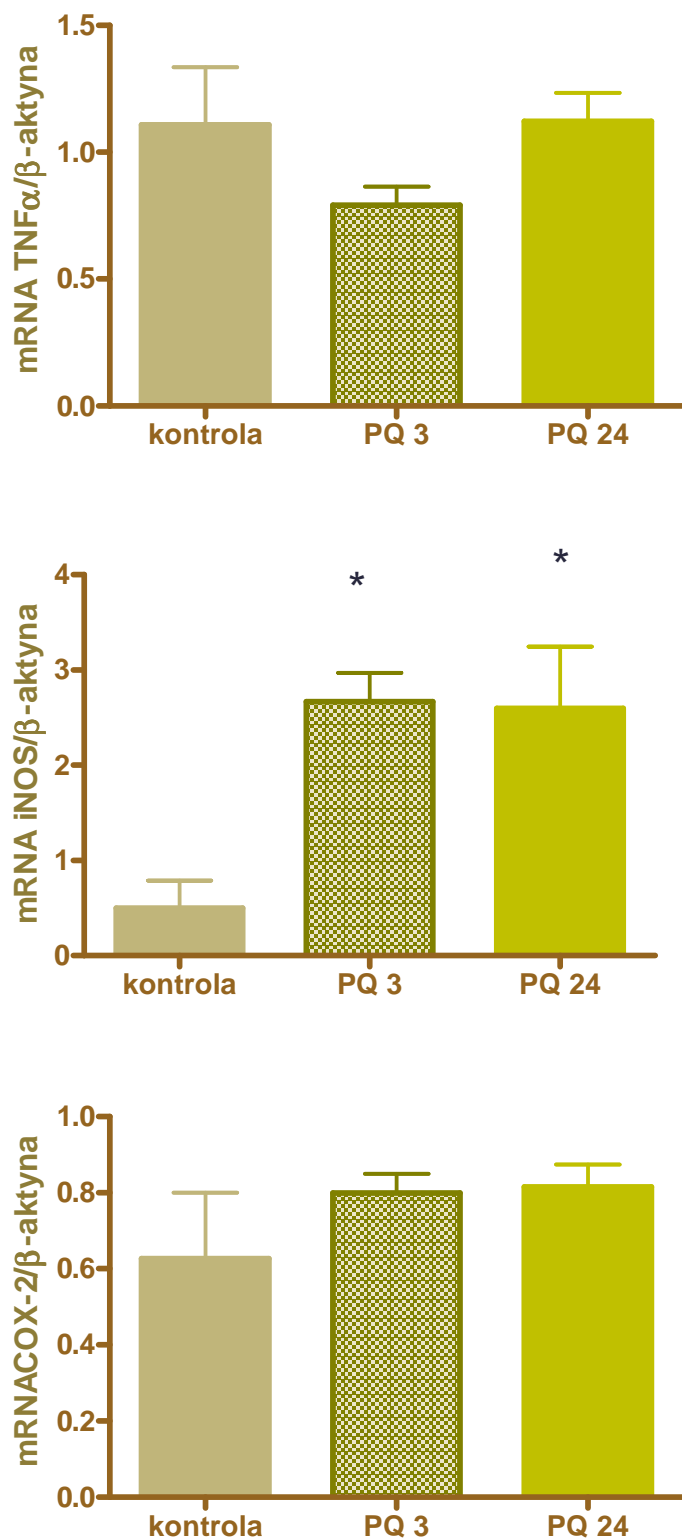
Wpływ jednorazowego podania i krótkoterminowego działania PQ na ekspresję i poziom białka GSK3 β w prążkowie i śródmózgowiu u szczurów.

Ze względu na wrażliwość struktur prążkowie i śródmózgowia na działanie PQ moja uwaga skoncentrowała się głównie na tych strukturach. Badania rozpoczęłam od jednorazowych podań PQ (40 mg/kg m.c *ip*). Dekapitacja zwierząt nastąpiła po 3 i 24 godzinach od iniekcji PQ. Chcąc dowiedzieć się, jaki wpływ na stres oksydacyjny ma PQ w prążkowie i śródmózgowiu, zbadalam ekspresję genów dla cyklooksygenazy (COX-2), czynnika martwicy nowotworów (TNF- α) i indukowanej izoformy syntazy NO⁺ (iNOS).

Wyniki wskazują, że ekspresja genu dla izoformy iNOS ulega znamienemu podwyższeniu po 3 i 24 godzinach od podania PQ w prążkowie (Rycina 9), natomiast w śródmózgowiu wzrost ekspresji iNOS stwierdza się po 3 godzinach od iniekcji PQ (Rycina 10). W śródmózgowiu również obserwujemy znamieny statystycznie wzrost COX-2 po 3 godzinach od podania PQ (Rycina 10). W tych czasach po podaniu PQ nie stwierdzono zmian ekspresji genu dla TNF- α w śródmózgowiu i prążkowie, oraz zmian w poziomie mRNA dla izoformy COX-2 w prążkowie (Rycina 9 i 10).

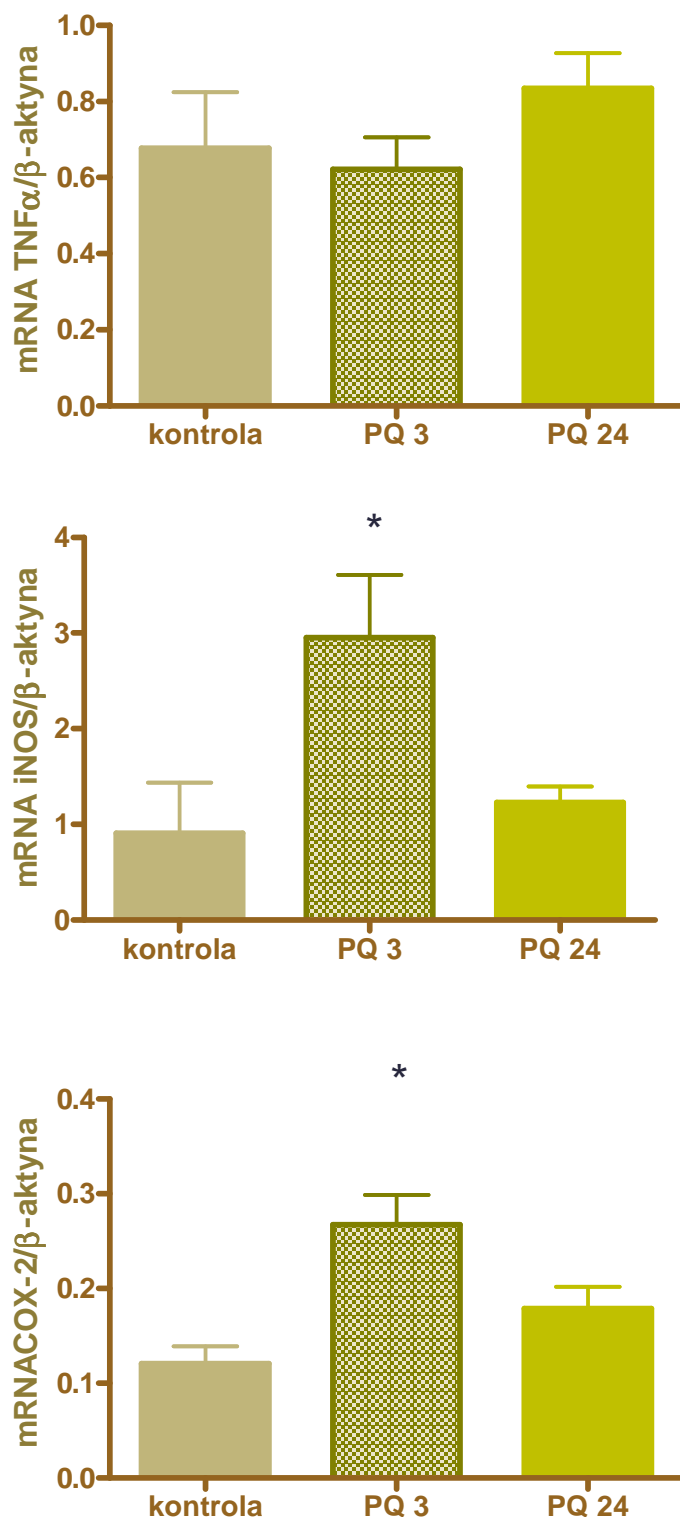
Do tej pory badania nad mechanizmem toksyczności PQ u szczurów w niewielkim stopniu dotyczyły GSK3 β , dlatego kolejnym etapem moich doświadczeń, było zbadanie wpływu PQ na ekspresję genu i poziom GSK3 β oraz na poziom formy ufosforylowanej na tyrozynie 216 GSK3 β pY216 w wymienionych powyżej częściach mózgu szczura.

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że jednorazowe podanie PQ dootrzewnowo nie miało wpływu zarówno na ekspresję (dane nieprezentowane) jak i na poziom białka GSK3 β w prążkowie i w śródmózgowiu po 3 godzinach ani po 24 godzinach (Rycina 11).



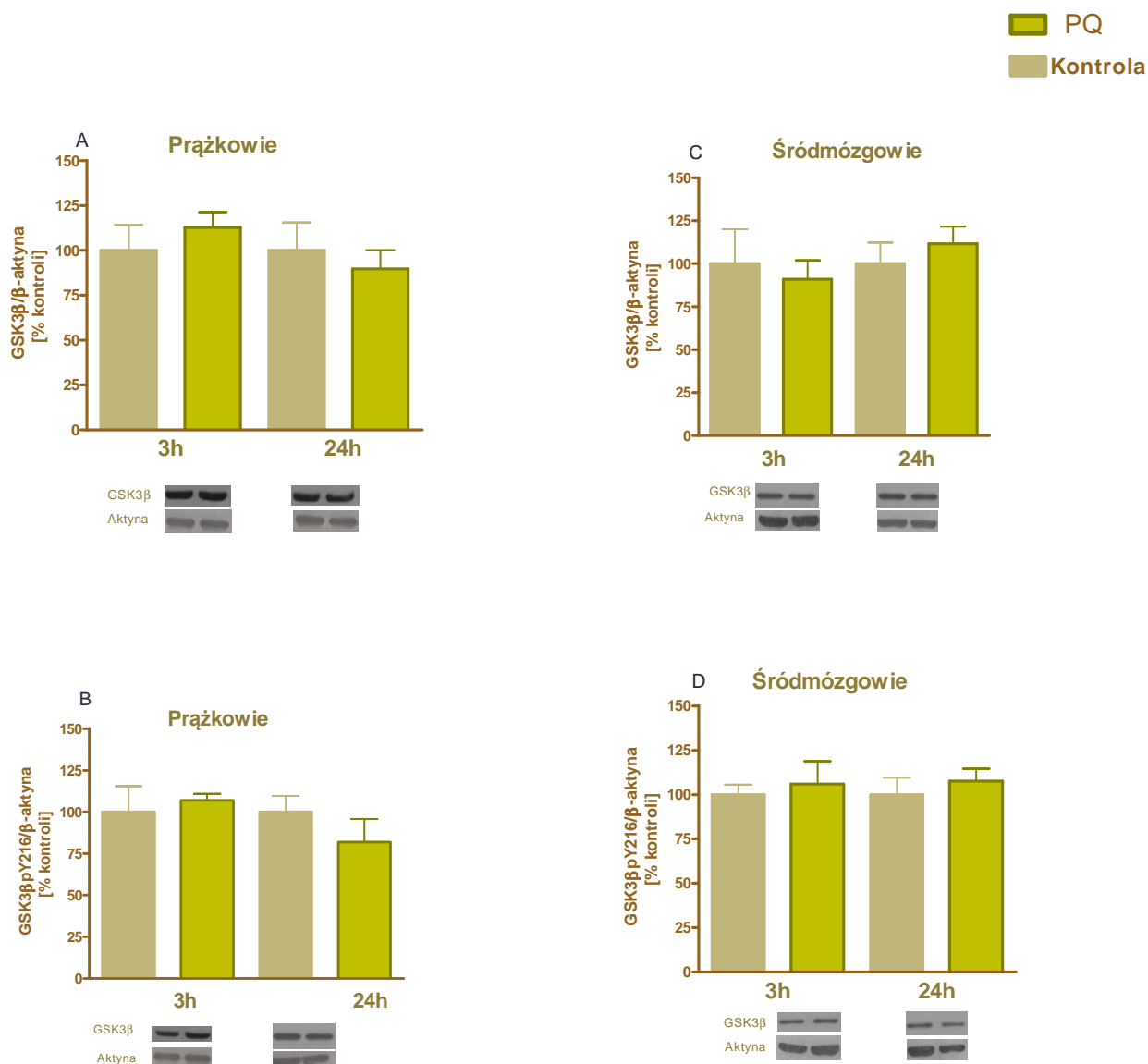
Rycina 9. Wpływ PQ na poziom ekspresji genów dla TNF α , iNOS, COX-2 w prążkowiu.

Ekspresję genów badano metodą Real-time PCR. Wykres przedstawia wyniki analizy normalizowane względem β -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. *, - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej: $p < 0,05$.



Rycina 10. Wpływ PQ na poziom ekspresji genów dla TNF α , iNOS, COX-2w śródmózgiu.

Ekspresję genów badano metodą Real-time PCR. Wykres przedstawia wyniki analizy normalizowane względem β -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Bonferroni. *, - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej: $p < 0,05$.

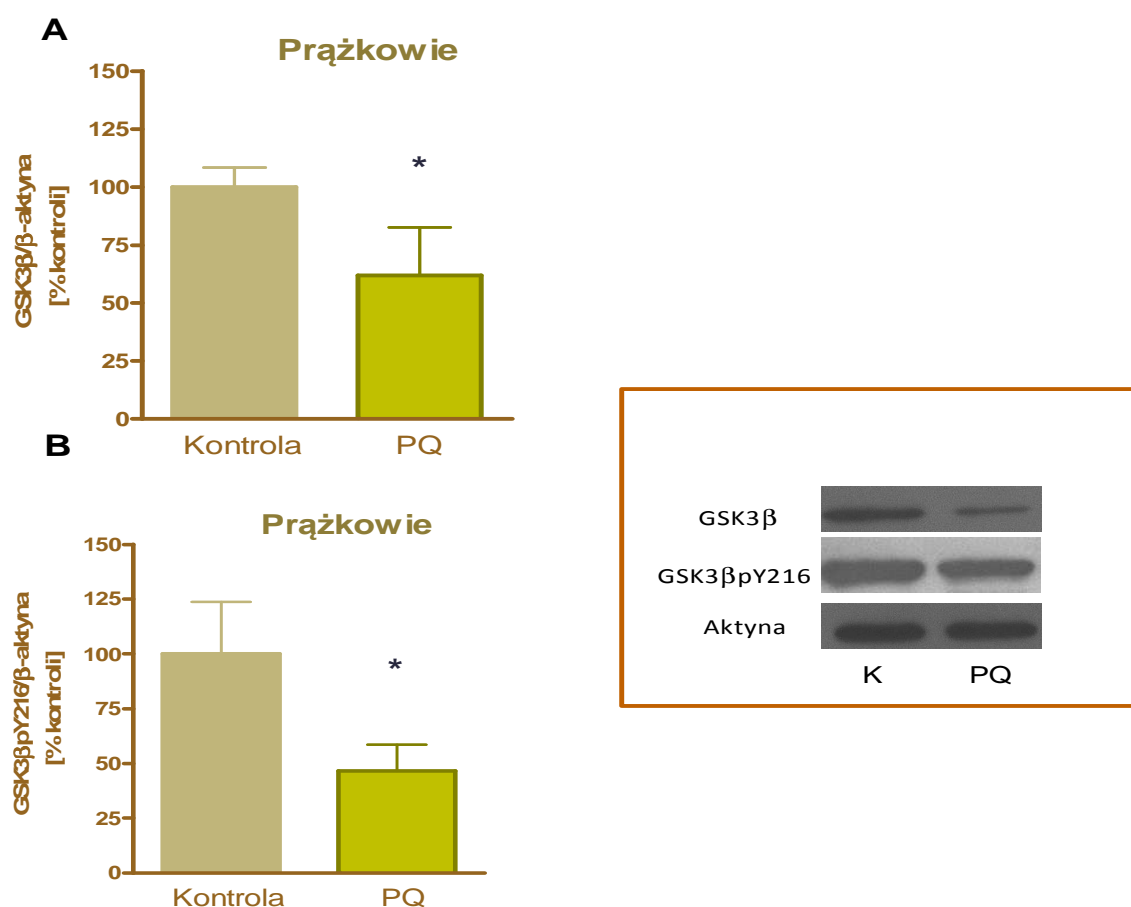


Rycina 11. Poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej formy ufosforylowanej GSK3βpY216 w prążkowie i śródmózgowiu szczura po jednorazowym podawaniu PQ.

Wyniki przedstawiają wpływ krótkoterminowego podania PQ, 3 h i 24 h w dawce 40 mg/kg m.c. Wykresy przedstawiają poziomy białka GSK3β i jej formy ufosforylowanej GSK3βpY216 w prążkowie (A i B) i śródmózgowiu (C i D). Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z 6 niezależnych doświadczeń ± SEM. W dolnych panelach zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keulsa.

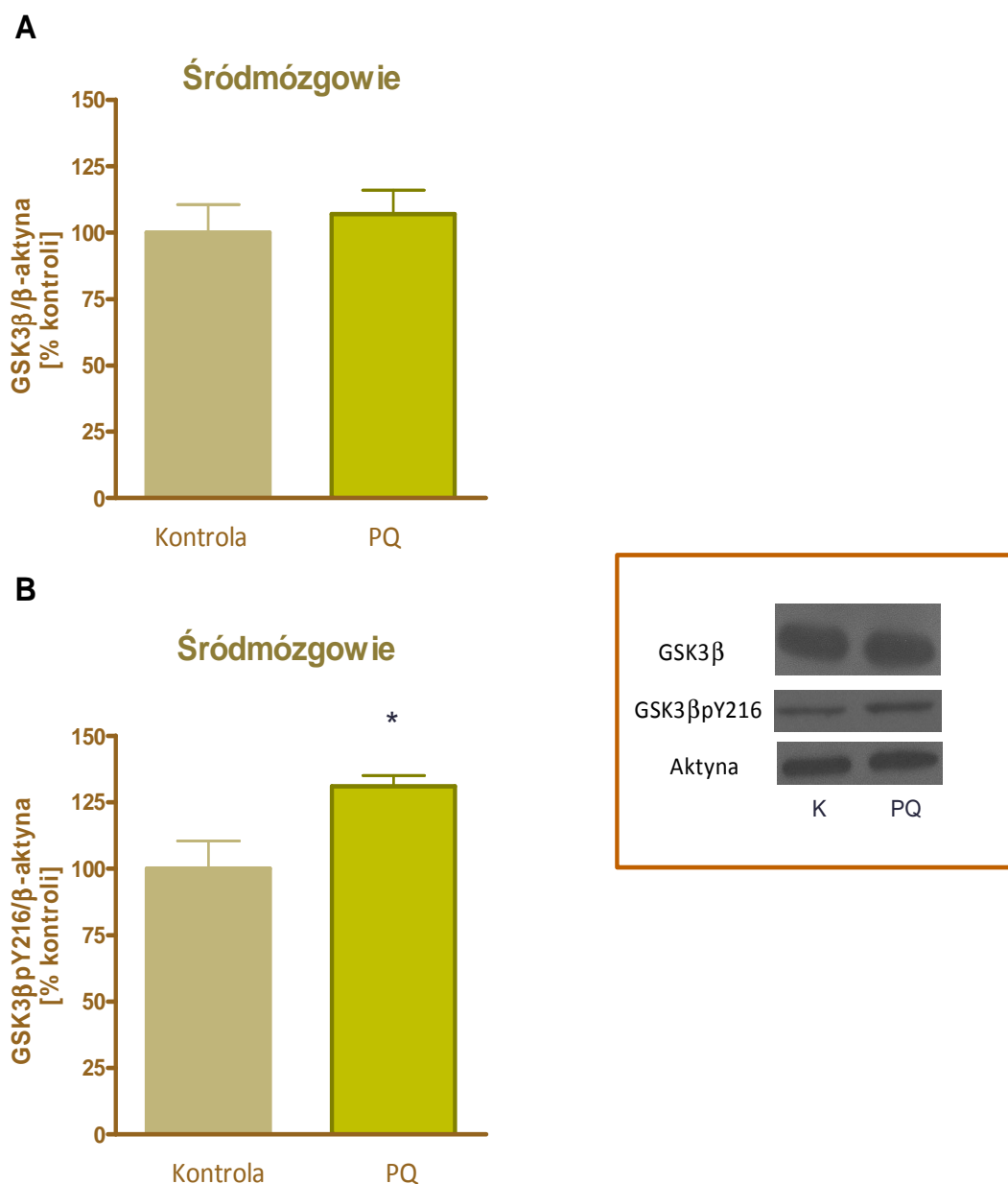
Poziom białka GSK3 β i jej ufosforylowanej formy GSK3 β pY216 w prążkowie i śródmózgowiu po 4-krotnym podaniu w czasie 4 tygodni PQ.

Kolejnym etapem moich doświadczeń, było zbadanie wpływu 4-krotnego podania PQ w czasie 4 tygodni na poziom białka obu postaci GSK3 β i GSK3 β pY216 w wymienionych częściach mózgu szczura. Zbadano wpływ PQ, podawanego 1 x w tygodniu (10 mg/kg m.c *ip*), przez 4 tygodnie. Badania wykonano 7 dni po ostatniej iniekcji.



Rycina 12. Wpływ 4-tygodniowego podawania PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i jej formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 w prążkowie szczura.

Wyniki przedstawiają wpływ PQ, który był podawany raz w tygodniu w dawce 10 mg/kg m.c przez 4 tygodnie. Wykres (A) przedstawia poziom białka GSK3 β , natomiast wykres (B) poziom białka GSK3 β pY216 w prążkowie. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z 5 niezależnych doświadczeń \pm SEM. W panelu obok zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. *, - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej; $p < 0,05$.



Rycina 13. Wpływ 4-tygodniowego podawania PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej formy ufosforylowanej GSK3βpY216 w śródmózgowiu szczura.

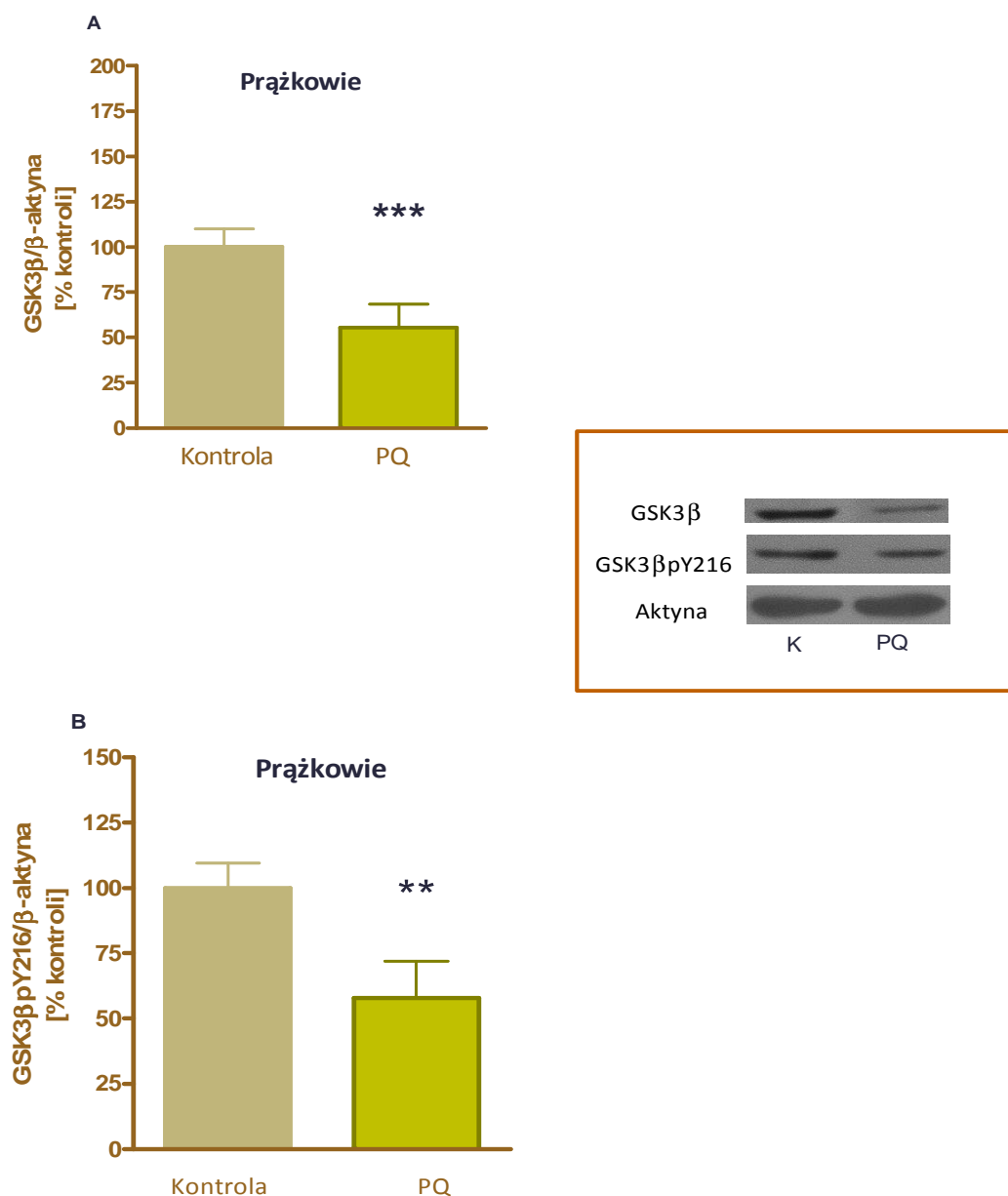
Wyniki przedstawiają wpływ PQ, który był podawany raz w tygodniu w dawce 10 mg/kg m.c przez 4 tygodnie. Wykres (A) przedstawia poziom białka GSK3β, natomiast wykres (B) poziom białka GSK3βpY216 w śródmózgowiu. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z 5 niezależnych doświadczeń ± SEM. W panelu obok zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. *, - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej: $p < 0,05$.

Przeprowadzone metodą Western blot badania wykazały, obniżenie poziomu immunoreaktywności obu postaci GSK3 β i GSK3 β pY216 w prążkowie po zastosowaniu PQ (Rycina 12A i B). Natomiast w śródmózgowiu obserwowano znamienne podwyższenie poziomu białka dla formy ufosforylowanej na tyrozynie 216 (GSK3 β pY216) po potraktowaniu PQ w stosunku do kontroli (Rycina 13 B).

Wpływ długoterminowego podawania PQ na poziom białka GSK3 β i jego ufosforylowanej formy GSK3 β pY216 w prążkowie i śródmózgowiu szczura.

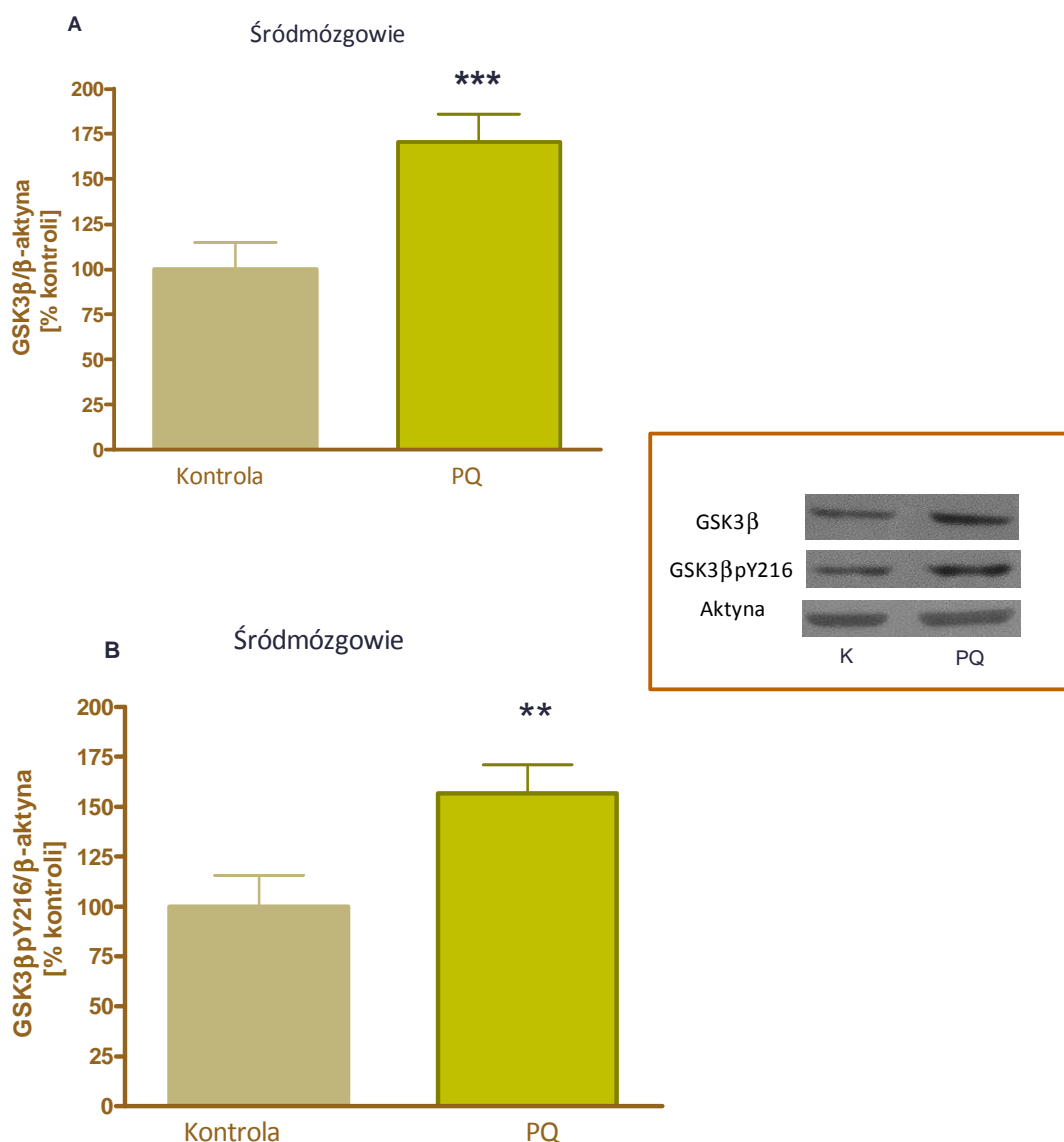
Nawiązując do poprzednio przedstawionych badań, w których stwierdzono zmiany GSK3 β w badanych częściach mózgu po 4-tygodniowym podaniu PQ postanowiono zbadać, wpływ znacznie dłuższego jego podawania na poziom immunoreaktywności GSK3 β i postaci ufosforylowanej GSK3 β pY216. W kolejnych doświadczeniach długoterminowych podawano PQ przez 37 tygodni, 1 x na tydzień w dawce 10mg/kg m.c *ip*. Badania przeprowadzono na homogenatach, jak i również na zgrubnych frakcjach podkomórkowych: prążkowie i śródmózgowia.

Poziom immunoreaktywności GSK3 β i GSK3 β pY216 w homogenatach wykazuje znaczne obniżenie w prążkowie (Rycina 14), ponadto znamienność statystyczną uzyskano w śródmózgowiu, gdzie wykazano wzrost poziomu immunoreaktywności GSK3 β (Rycina 15).



Rycina 14. Wpływ długoterminowego podawania PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej formy ufosforylowanej GSK3βpY216 w prążkowie.

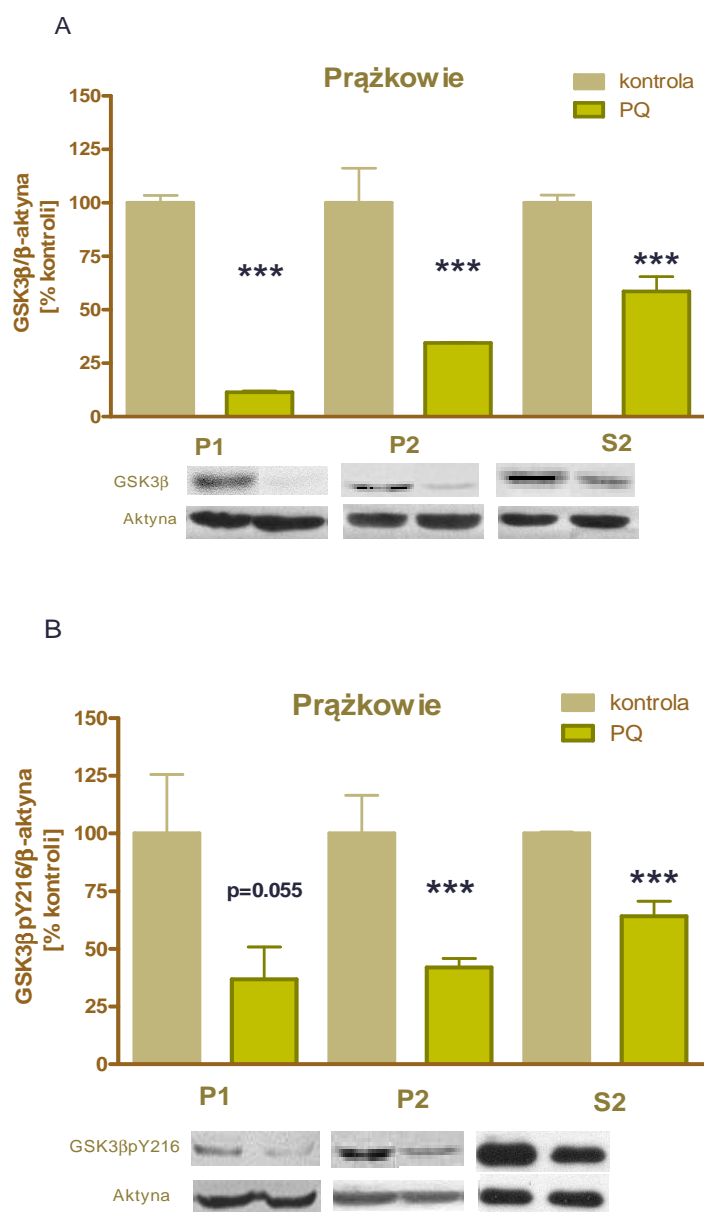
Wyniki przedstawiają wpływ PQ, który był podawany przez 37 tygodni raz w tygodniu w dawce 10 mg/kg m.c. Wykres (A) przedstawia poziom białka GSK3β, natomiast wykres (B) poziom białka GSK3βpY216 w prążkowie. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z 6 niezależnych doświadczeń ± SEM. W panelu obok zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa. **,*** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej: $p < 0,01$, $p < 0,001$.



Rycina 15. Wpływ długoterminowego podawania PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej formy ufosforylowanej GSK3βpY216 w śródmózgowiu.

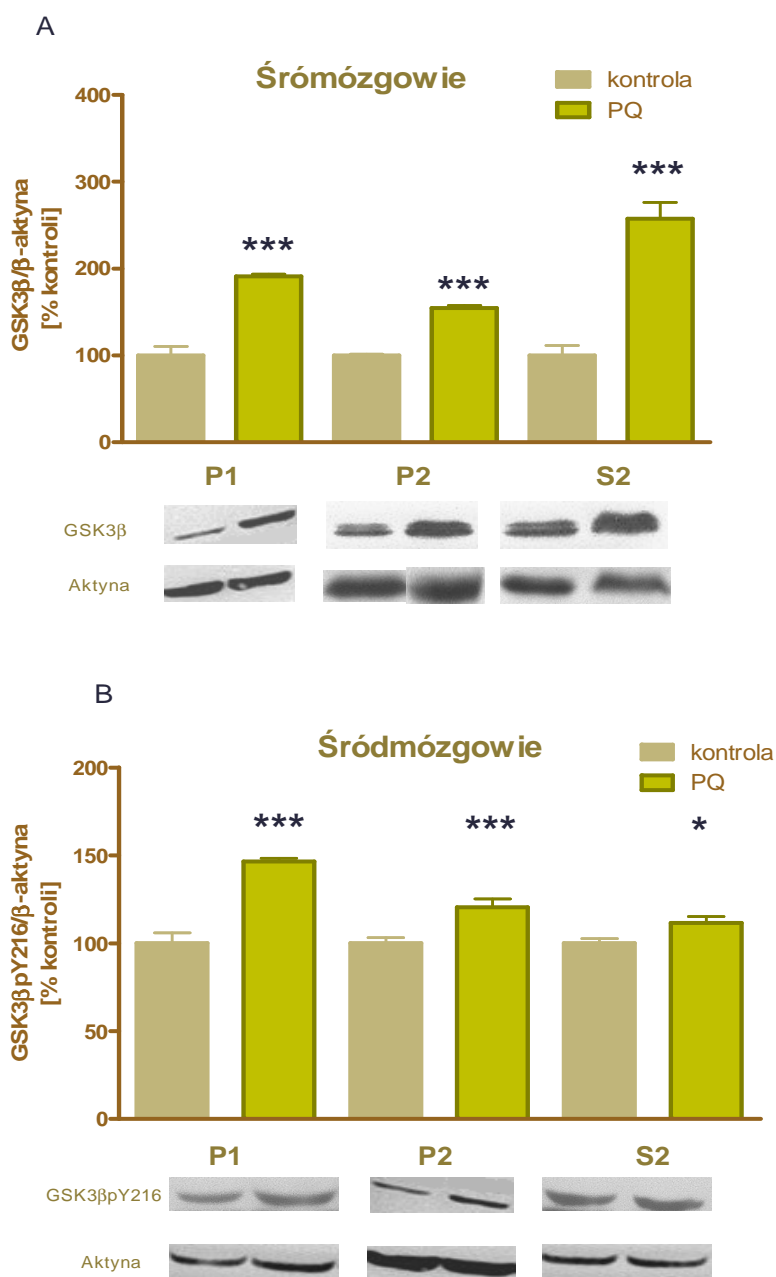
Wyniki przedstawiają wpływ PQ, który był podawany przez 37 tygodni raz w tygodniu w dawce 10 mg/kg m.c. Wykres (A) przedstawia poziom immunoreaktywności białka GSK3β, natomiast wykres (B) poziom białka GSK3βpY216 w śródmózgowiu. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z 6 niezależnych doświadczeń ± SEM. W panelu obok zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa. **, *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej, $p < 0,01$, $p < 0,001$.

W kolejnej serii doświadczeń zbadano wpływ PQ na GSK3 β oraz jej formę ufosforylowaną GSK3 β pY216 we frakcjach podkomórkowych prądkowia i śródmózgowia.



Rycina 16. Wpływ długoterminowego podawania PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i jej formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 we frakcjach podkomórkowych w prądkowiu.

Wyniki przedstawiają wpływ PQ, podawanego przez 37 tygodni raz w tygodniu w dawce 10 mg/kg m.c. Wykres (A) przedstawia poziom białka GSK3 β , natomiast wykres (B) poziom białka GSK3 β pY216 we frakcjach podkomórkowych: jądrowej (P1), mitochondrialnej (P2), cytozolowej (S2) w prądkowiu. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z 4-6 niezależnych doświadczeń \pm SEM. W dolnych panelach zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa. *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej: $p < 0,001$ (Songin i wsp., 2011).



Rycina 17. Wpływ długoterminowego podawania PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej formy ufosforylowanej GSK3βpY216 we frakcjach podkomórkowych w śródmózgowiu.

Wyniki przedstawiają wpływ PQ, podawanego przez 37 tygodni raz w tygodniu w dawce 10 mg/kg m.c. Wykres (A) przedstawia poziom białka GSK3β, natomiast wykres (B) poziom białka GSK3βpY216 we frakcjach podkomórkowych: jądrowej (P1), mitochondrialnej (P2), cytozolowej (S2) w śródmózgowiu. Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z 4-6 niezależnych doświadczeń ± SEM. W dolnych panelach zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa. *, *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej; $p < 0,05$, $p < 0,001$ [Songin i wsp., 2011].

Wpływ długoterminowego podawania PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i jej formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 we frakcjach podkomórkowych w prążkowie.

PQ prowadzi do statystycznie znaczącego obniżenia GSK3 β we wszystkich frakcjach podkomórkowych: jądrowej (P1), mitochondrialnej (P2) i cytozolowej (S2) w prążkowie. Ufosforylowana postać GSK3 β pY216 ulega również znaczącemu obniżeniu we frakcji mitochondrialnej i cytozolowej, a we frakcji jądrowej wykazuje tendencję spadkową ($p=0.055$) (Rycina 16A i B).

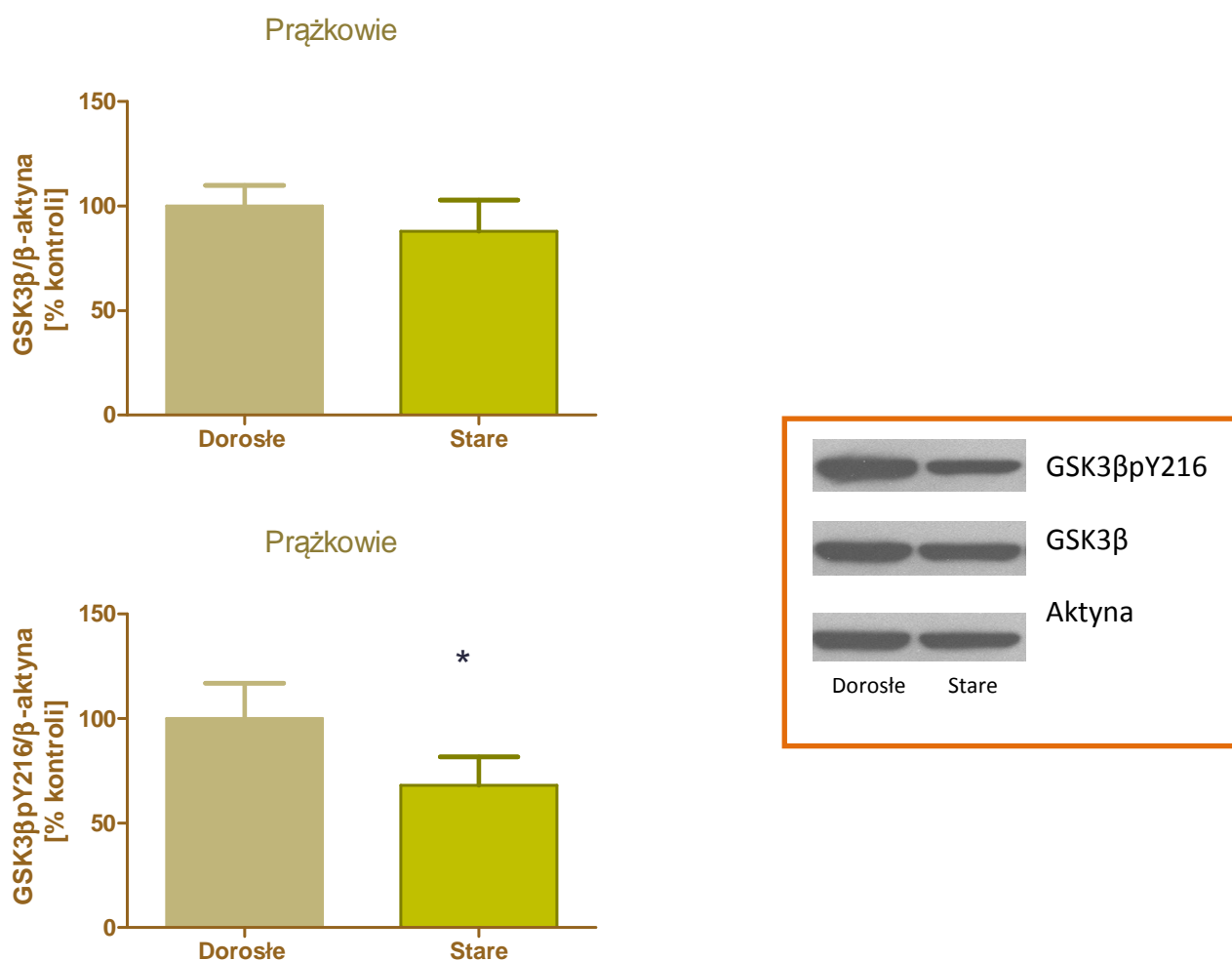
Wpływ długoterminowego podawania PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i jej formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 we frakcjach podkomórkowych w śródmózgowiu

PQ znacząco podwyższa poziom białka GSK3 β oraz jej formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 we wszystkich badanych frakcjach podkomórkowych (Rycina 17A i B).

Poziom immunoreaktywności białka GSK3 β oraz formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 w mózгах starczych.

Kolejne prowadzone badania miały na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy proces starzenia prowadzi do zmian obu form GSK3 β .

Stwierdzono, że poziom GSK3 β pY216 jest znacząco niższy wyłącznie w prążkowie u zwierząt starych w porównaniu do dorosłych (Rycina 18). Wykazano również, że nie dochodzi do istotnych zmian ekspresji GSK3 β w badanych starczych strukturach mózgu w stosunku do dorosłych zwierząt (dane nieprezentowane). Oprócz tego poziom dialdehydu malonowego i innych produktów wolnorodnikowego uszkodzenia lipidów reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBRS) oraz grup karbonylowych u badanych zwierząt nie uległ statystycznie istotnej zmianie podczas fizjologicznego starzenia (dane nieprezentowane).



Rycina 18. Poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej formy ufosforylowanej GSK3βpY216 w prązkowie zwierząt dorosłych i starych.

Wykresy przedstawiają poziom białka GSK3β i poziom białka GSK3βpY216 w prązkowie u szczurów dorosłych (4 m-ce) i starych (24 m-ce). Wykresy przedstawiają wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z 8 niezależnych doświadczeń ± SEM. W panelu obok zamieszczono przykładowe wyniki Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newmana-Keulsa. * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do grupy kontrolnej: $p < 0,05$.

Badania *in vitro*

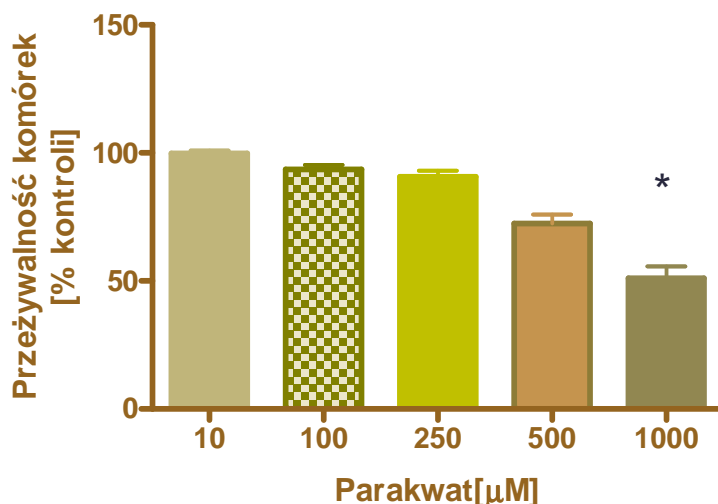
Prowadzone badania miały na celu potwierdzenie, że działanie PQ na komórki pochodzenia dopaminergicznego prowadzi do ich śmierci oraz zbadanie jak PQ wpływa na

poziom wolnych rodników oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Badania prowadzono na komórkach PC12.

Analiza przeżywalności komórek poddanych działaniu PQ

Wpływ PQ na przeżywalność komórek PC12 oceniano testem MTT.

Żywotność komórek PC12 zbadano po podaniu PQ w zakresie stężeń 0-1000 μM . Wykazano, że PQ w sposób zależny od stężenia wywołuje obumieranie komórek PC12. Stwierdzono, że po 24 godzinach inkubacji w obecności PQ (1000 μM) przeżywało około 50% komórek. PQ podawany w niższych stężeniach (10-500 μM) pozostawał bez znamiennej zmiany wpływu na przeżywalność badanej linii komórkowej (Rycina 19).



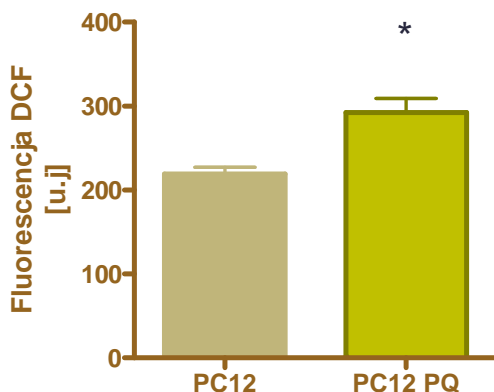
Rycina 19. Przeżywalność komórek PC12 poddanych działaniu w zależności od stężenia 10-1000 μM PQ

Przeżywalność komórek badano za pomocą testu MTT po 24-godzinnej inkubacji z PQ. Wyniki przedstawiono w procentach kontroli. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z pięciu niezależnych doświadczeń w czterech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa. *- Różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych: $p < 0,05$.

Poziom wolnych rodników w komórkach PC12 poddanych działaniu PQ.

W celu zbadania zdolności PQ do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach PC12 badano wpływ tego związku na poziom wolnych rodników, poprzez pomiar utleniania sondy

dichlorodihydrofluoresceiny (H2DCF-DA). Stwierdzono, że po 4-godzinnej inkubacji z PQ ma miejsce statystycznie znamiennej wzrost poziomu wolnych rodników w komórkach PC12 (Rycina 20).

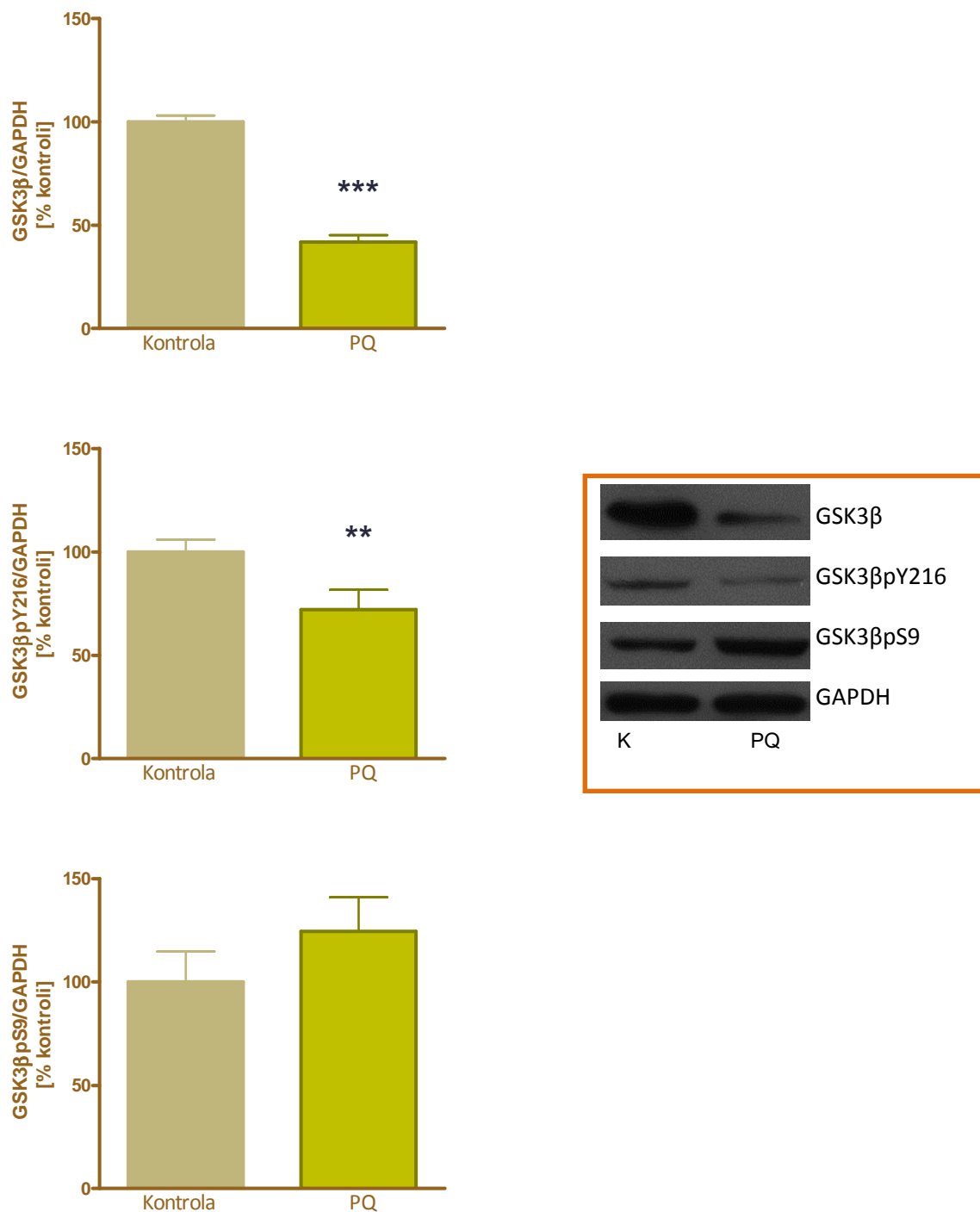


Rycina 20. Poziom wolnych rodników w komórkach PC12 poddanych działaniu PQ 1mM.

Poziom wolnych rodników oznaczano metodą fluorymetryczną z zastosowaniem DCF. Wyniki wyrażono, jako intensywność fluorescencji. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli $p < 0,05$.

Wpływ PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i jej form ufosforylowanych w komórkach kontrolnych PC12.

Celem kolejnych badań było określenie wpływu PQ na poziom białka GSK3 β i jej ufosforylowanych izoform, takich jak: GSK3 β pY216 i GSK3 β pS9, które są odpowiedzialne za poziom aktywności GSK3 β . Analiza Western blot wykazała, że PQ (1mM) znacząco obniża całkowitą GSK3 β oraz jej formę ufosforylowaną na tyrozynie 216, która ma być odpowiedzialna za wzrost jej aktywności. Poziom GSK3 β pS9 nie ulega zmianie pod wpływem PQ (Rycina 21).

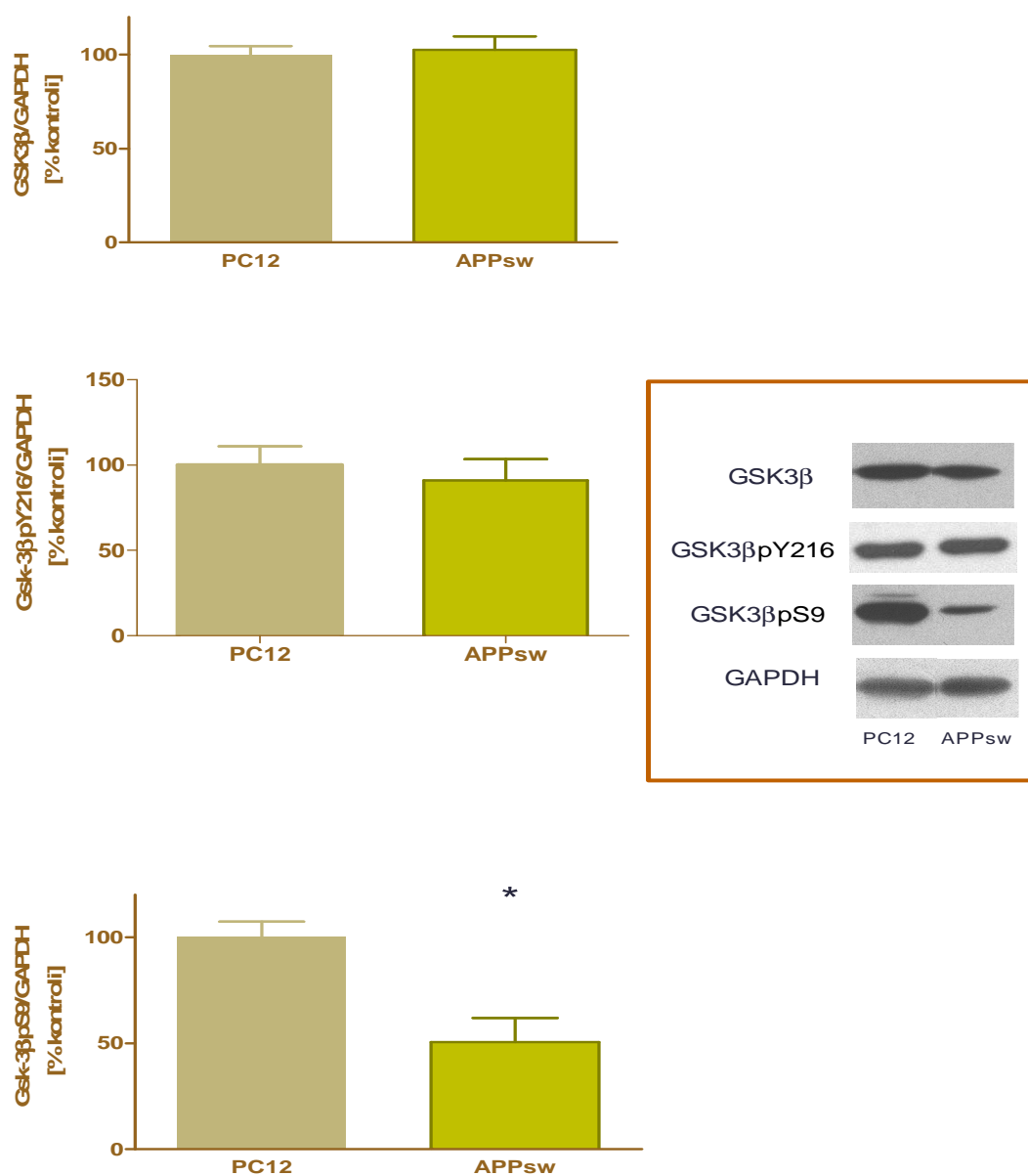


Rycina 21. Wpływ PQ na poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej form ufosforylowanych GSK3βpY216 i GSK3βpS9 w komórkach PC12.

Poziom białka GSK3β badano metodą Western blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem GAPDH i stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń \pm SEM. W panelu obok zamieszczono przykładowy wynik Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test t. ** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli, $p < 0,01$; *** - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli, $p < 0,001$

Wpływ endogennego peptydu A β na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i jej form ufosforylowanych w komórkach PC12 oraz transfekowanych genem dla białka APP.

Celem badań było określenie wpływu endogennie uwalnianych peptydów A β na poziom immunoreaktywności GSK3 β i jej formy ufosforylowanej na tyrozynie 216 i serynie 9. Doświadczenia prowadzono na komórkach transfekowanych genem białka prekursorowego A β z mutacją szwedzką (APP_{sw}), produkujących 4,8 razy więcej A β niż komórki kontrolne PC12 [Chalimoniuk i wsp., 2007]. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że w komórkach APP_{sw} wraz ze wzrostem uwalnianych endogennie A β dochodzi do spadku GSK3 β ufosforylowanej na serynie 9, która jest odpowiedzialna za zahamowanie aktywności tej kinazy (Rycina 22).

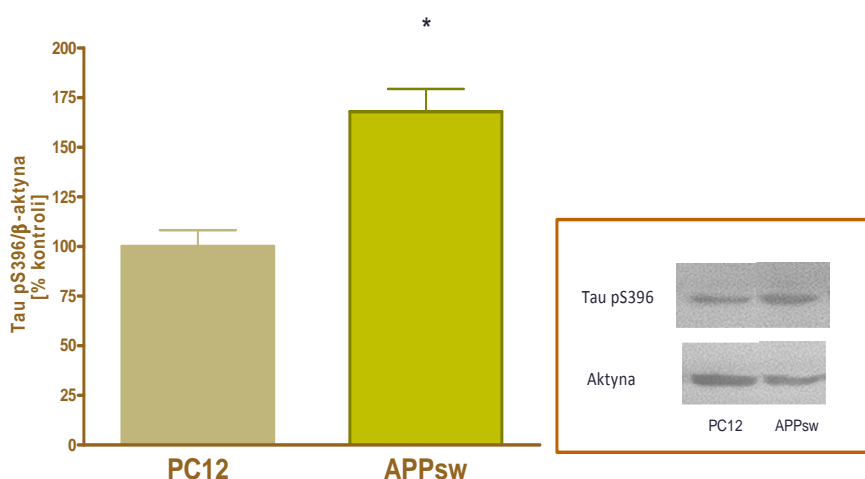


Rycina 22. Poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej form ufosforylowanych GSK3βpY216 i GSK3βpS9 w komórkach PC12 i APPsw.

Poziom białka GSK3β i jej form ufosforylowanych GSK3βpY216 oraz GSK3βpS9 badano w komórkach PC12 i APPsw metodą Western blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem GAPDH i stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Obok wykresów zamieszczono przykładowy wynik Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli, $p < 0,05$.

Wpływ endogennego peptydu A β na poziom białka Tau (pS396) w komórkach PC12 i APPsw.

Poprzednie wyniki wskazują, że wzrost A β powoduje podwyższenie aktywności GSK3 β poprzez obniżenie poziomu formy ufosforylowanej GSK3 β pS9. Dlatego kolejnym etapem moich badań było sprawdzenie, czy ten wzrost ma wpływ na poziom immunoreaktywności białka Tau ufosforylowanego na serynie 396. Stwierdzono znamiennej wzrost poziomu białka Tau w linii komórkowej APPsw 9 (Rycina 23).



Rycina 23. Poziom immunoreaktywności ufosforylowanej formy białka Tau(pS396) w komórkach PC12 i APPsw.

Poziom białka Tau(pS396) badano w komórkach PC12 i APPsw metodą Western blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej normalizowane względem β -aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Przy wykresie zamieszczono przykładowy wynik Western blot. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli, $p < 0,05$.

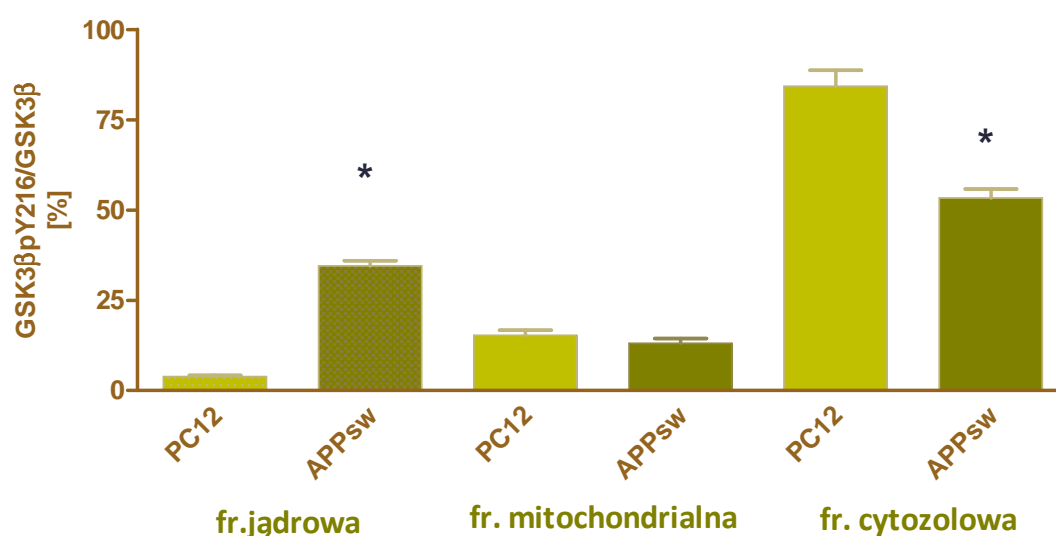
Przeprowadzone doświadczenia wykazują, że wzrost A β powoduje obniżenie poziomu fosforylacji GSK3 β na serynie 9, co wpływa na podwyższenie jej aktywności i wzrost fosforylacji jej substratu białka tau w komórkach APPsw. Dla potwierdzenia tego wyniku na dalszym etapie badań analizowano aktywność GSK3 β po immunoprecypitacji enzymu w komórkach kontrolnych PC12 i APPsw poprzez ocenę fosforylacji substratu, czyli egzogenego białka tau na serynie 396. Aktywność GSK3 β badano w wymienionych liniach komórkowych metodą immunochemiczną. Badanie aktywności potwierdziło obniżenie poziomu immunoreaktywności GSK3 β pS9 w linii komórkowej APPsw w stosunku do komórek

kontrolnych PC12, przy jednoczesnym wzroście tau ufosforylowanego na serynie 396 (dane nieprezentowane).

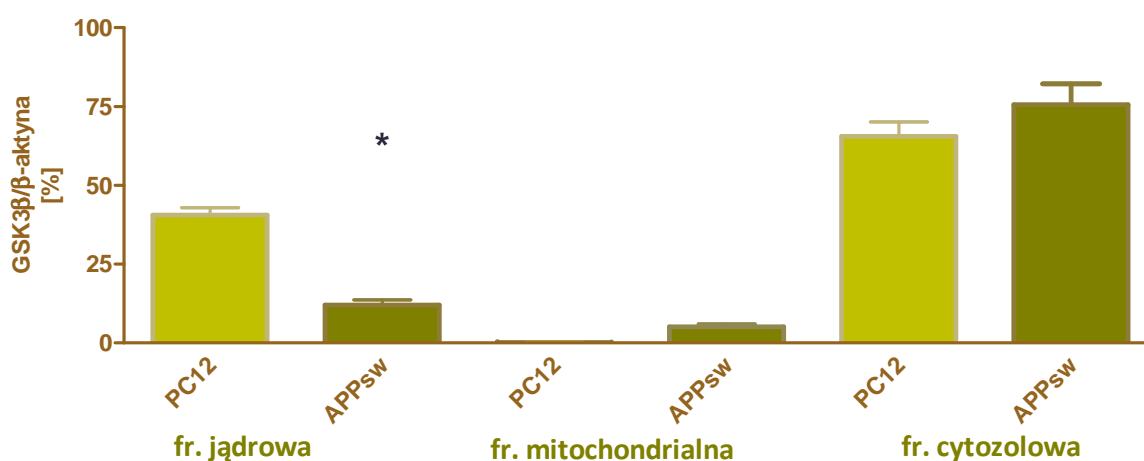
Zbadanie poziomu immunoreaktywności białka GSK3 β i jej formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 we frakcjach podkomórkowych w komórkach PC12 oraz transfekowanych genem dla białka APP.

Kolejnym etapem doświadczeń było zbadanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji GSK3 β w komórkach PC12 i APPsw. Z przeprowadzonych badań metodą Western blot wynika, że bez względu na poziom A β obie formy zarówno GSK3 β (Rycina 24B) jak i ufosforylowana GSK3 β pY216 (Rycina 24A) są zlokalizowane w głównej mierze we frakcji cytozolowej. W komórkach APPsw dochodzi do znamienego podwyższenia poziomu immunoreaktywności białka GSK3 β pY216 we frakcji jądrowej, podczas gdy we frakcji cytozolowej obserwujemy jej obniżenie (Rycina 24A). Porównanie GSK3 β pY216 do całkowitej GSK3 β w badanych liniach komórkowych wykazuje, że wzrost A β powoduje podwyższenie poziomu GSK3 β ufosforylowanej na tyrozynie 216 we frakcji jądrowej, co może wpływać na poziom jej aktywności i w konsekwencji zmianę ekspresji genów.

A



B



Rycina 24. Poziom immunoreaktywności białka GSK3β i jej formy ufosforylowanej GSK3βpY216 we frakcjach podkomórkowych w komórkach PC12 i APPsw.

Poziom białka GSK3β i jej formy fosforylowanej GSK3βpY216 w komórkach PC12 i APPsw oznaczony metodą Western blot. Wykres przedstawia wyniki analizy densytometrycznej i normalizowane względem β-aktyny i stanowią średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń ± SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji Anova oraz test post-hoc Newman-Keulsa * - Różnica istotna statystycznie w stosunku do kontroli, $p < 0,05$. Wyniki przedstawiają % immunoreaktywności GSK3βpY216 w poszczególnych frakcjach podkomórkowych w całkowitej immunoreaktywności wszystkich frakcji podkomórkowych przyjętej jako 100% (Pająk i wsp., 2009).

DYSKUSJA

Obecnie szacuje się, że około 400 milionów ludzi na świecie cierpi z powodu chorób neurodegeneracyjnych centralnego systemu nerwowego. Problem dotyczy głównie ChA oraz ChP. Podłoże i przyczyny tych chorób nie są dotychczas dobrze poznane.

W 1960 odkryto, że w ChP obserwuje się zanik neuronów dopaminergicznym w istocie czarnej i dramatyczny spadek poziomu DA w prążkowie. Pomimo wielu lat badań i zastosowania licznych, nowoczesnych metod, nadal nie znany jest czynnik, który wywołuje degenerację tych komórek [Forno, 1996, Spillantini i wsp., 1997, Braak i wsp., 2004].

Do tej pory nie zostało stwierdzone, czy za rozwój ChP odpowiedzialne są czynniki działające w okresie pre lub postnatalnym podczas rozwoju mózgu. Na wiele pytań nie znamy odpowiedzi. Do chwili obecnej nie wiemy, czy wiek jest istotnym elementem ryzyka decydującym w tej chorobie, czy wywołuje ją czynnik działający jednorazowo u osobników dorosłych lub czy jest to efekt zmian kumulujących się przez całe życie [Landrigan i wsp., 2005, Logroscino 2005, Uversky 2004]. Dane literaturowe wskazują, że na pojawienie się ChP mają wpływ: podłoże genetyczne, czynniki środowiskowe (toksyny, metale ciężkie), przebyte infekcje, a także proces starzenia.

Parakwat a choroba Parkinsona

Uważa się obecnie, że czynniki środowiskowe odgrywają istotną rolę w sporadycznych postaciach ChP. Toksyny pochodzące ze środowiska mogą zwiększać wrażliwość neuronów lub powodować ich degenerację oraz uszkodzenia naczyń krwionośnych, które towarzyszą tym chorobom [Miller i wsp., 2002]. Do związków szczególnie toksycznych dla neuronów zaliczamy pestycydy, herbicydy i chemikalia przemysłowe, które wywołują silny stres oksydacyjny i uważane są za potencjalne czynniki ryzyka w ChP. Jedną z często wskazywanych substancji, pozytywnie korelującą z częstością pojawiania się ChP, jest herbicyd – parakwat (PQ) [Hertzman i wsp., 1990, Liou i wsp., 1997]. Jego struktura chemiczna jest podobna do MPP⁺/MPTP. Związek ten przenika do mózgu w niewielkim stopniu przy pomocy transportera dla obojętnych aminokwasów [Shimizu i wsp., 2001]. Neurotoksyczność PQ jest dużo mniejsza niż MPTP/ MPP⁺ czy 6-OHDA [Corasaniti i Nistico, 1993, Shimizu i wsp., 2001, Barlow i wsp., 2003, Ossowska i wsp., 2005a, Prasad i wsp.,

2007]. Badania wskazują, że PQ gromadzi się w mózgu i to w sposób nierównomierny w różnych jego strukturach [Prasad i wsp., 2009]. Zmieniło to wobec tego spojrzenie na toksyczne działanie PQ wskazując, że różne struktury mózgu mogą być zmienione pod wpływem jego działania, a nie tylko wybiórczo istota czarna.

Badania, w tym również nasze, sugerują, że podawany gryzoniom PQ jest dobrym modelem do poznawania patologicznych procesów, które mogą pomóc w lepszym zrozumieniu ChP [Brooks i wsp., 1999; McCormack i wsp., 2002; Shimizu i wsp., 2003; Thiruchelvam i wsp., 2003; Ossowska i wsp., 2005b, 2006; Kuter i wsp., 2007, Kuter i wsp., 2010, Cannon i Greenamyre 2010, Mandel i wsp., 2011, Songin i wsp., 2011a,b].

Wykazano, że zmiany wywoływane przez PQ są zależne od wieku. Myszy 18 miesięczne w przeciwieństwie do 5 miesięcznych i 6 tygodniowych wykazywały nieodwracalne zaburzenia aktywności lokomotorycznej oraz utratę neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej [Thiruchelvami wsp., 2003]. Efekty te widoczne były nawet 3 miesiące po zaprzestaniu podawania pestycydu. Nie zaobserwowano u nich spadku poziomu DA, a jedynie kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego (DOPAC), pomimo spadku ilości i aktywności enzymatycznej TH (hydroksylazy tyrozynowej) [Thiruchelvam i wsp., 2003]. Ponadto, podanie PQ w wieku rozwojowym uwrażliwiało dorosłe myszy na ponowne podanie pestycydu, wywołując dużo większe zmiany degeneracyjne niż u zwierząt, które nie otrzymały wcześniejszej dawki PQ lub otrzymały ją już w wieku dorosłym [Cory-Slechta i wsp., 2005, Thiruchelvam i wsp., 2002]. Badania te wykazują efekt tzw. „primingu” i zwracają uwagę, jak ważna może być ekspozycja na toksyny środowiskowe [Weiss i wsp., 2004]. Wykazano, że pestycydy w wieku prenatalnym oraz neonatalnym uwrażliwiają organizm na późniejszy kontakt z pestycydami, prowadząc do ujawniania się deficytów z wiekiem [Fredriksson i wsp., 1993, Wesseling i wsp., 2001, Landrigan i wsp., 2005, Miranda-Contreras i wsp., 2005, Cory-Slechta i wsp., 2005, Purisai i wsp., 2007]. Przy interpretacji uzyskanych wyników warto zauważyć, że stężenia PQ w środowisku są wielokrotnie niższe niż podawane w doświadczeniach, ale mogą wywierać swoje działanie przez znacznie dłuższy czas, niekiedy wiele lat, a nawet przez całe życie.

Nasze badania oraz opublikowane dotychczas dane wykazują, że PQ powoduje degenerację neuronów dopaminergicznych [Brooks i wsp., 1999; McCormack i wsp., 2002; Thiruchelvam i wsp., 2003; Ossowska i wsp., 2006, Songin i wsp., 2011a,b].

Wyniki naszych doświadczeń [Songin i wsp., 2011] pokazują również, że podługoterminowym podawaniu PQ (37 tygodni) w miejscu sinawym liczba neuronów noradrenergicznych jest znacznie zmniejszona. Zaobserwowano ponadto obniżony poziom noradrenaliny w prążkowie. Doświadczenia innych badaczy sugerują, że degeneracja noradrenergicznych neuronów wydaje się poprzedzać utratę neuronów dopaminergicznych w początkowych stadiach ChP [Braak i wsp., 2004].

Ossowska i wsp. [2005b, 2006] stwierdzili, że po 6 miesięcznym podawaniu PQ u szczurów dochodzi do znacznego obniżenia liczby neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej (37%) i w polu brzusznej nakrywki (42%). Natomiast w przeprowadzonych przez nas doświadczeniach po długoterminowym podaniu PQ (37 tygodni) zaobserwowano obniżenie liczby neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej (28%) i w polu brzusznej nakrywki (14%). Podobne wyniki do naszych danych prezentowanych w niniejszej pracy, otrzymano w mysim modelu po podaniu PQ, w którym zaobserwowano zmniejszenie liczby dopaminergicznych neuronów o 15-30%, ale nie stwierdzono zmian poziomu DA [McCormack i wsp., 2002, Kuter i wsp., 2007, Thiruchelvam i wsp., 2003]. Zmiany niewielkiego stopnia mogą być kompensowane, natomiast zaburzenia doprowadzające do istotnego obumierania neuronów dopaminergicznych mogą powodować obniżenie poziomu DA [McCormack i wsp., 2002, Kuter i wsp., 2007, Thiruchelvam i wsp., 2003, Kang i wsp., 2009].

Badania epidemiologiczne wskazują na istotne znaczenie PQ w chorobach neurodegeneracyjnych [Hertzman i wsp., 1990, Lioui i wsp., 1997, Costello i wsp., 2009]. Natomiast dostępne dane literaturowe przedstawiają różne efekty działania PQ na poziomie molekularnym, komórkowym i całego organizmu. Doświadczenia prowadzone były na zwierzętach w różnych warunkach doświadczalnych. De Gori i wsp. (1988) podawali PQ obwodowo szczurom (5 mg/kg sc 1 x dziennie przez 15 dni) po 6 – 15 dniach zwierzęta wykazywały obniżenie funkcji lokomotorycznych, drżenie tułowia i mięśni pyska oraz ataksję. Tawara i wsp. (1996) u szczurów szczepu Sprague-Dawley po podaniu PQ (w dawce 20 mg/kg, iv, 1x dziennie przez 5 dni) zaobserwowali na podstawie przeprowadzonych doświadczeń spadek zawartości DA o 30% w prążkowie, peroksydację lipidów i obniżoną aktywność I kompleksu oddechowego. Shimizu i wsp. (2003b) podawali PQ szczurom Wistar, przez 5 kolejnych dni (10 mg/kg sc). Zaobserwowali 30% spadek poziomu DA oraz 20% spadek kwasu homowanilinowego (HVA) w prążkowie. W śródmózgowiu natomiast, wykazali

spadek poziomu DA o 50%, ale nie istotny statystycznie, DOPAC o 40% i HVA o 60%. Wcześniejsze prace wskazywały natomiast na wzrost poziomu DA w prążkowie po obwodowych podaniach PQ u szczurów [Widdowson i wsp., 1996a, Widdowson i wsp., 1996b]. W innych pracach, po jednorazowym podaniu PQ *ip*, zaobserwowano w prążkowie podniesiony poziom 3-metoksytyraminy (3-MT) [Shimizu i wsp., 2003b], która jest zewnątrzkomórkowym metabolitem DA uznawanym za marker jej uwalniania [Elverfors i Nissbrandt, 1992]. W związku z tym, wyniki te mogą świadczyć o zwiększonym poziomie uwalnianej DA w prążkowie.

Wcześniejsze prace wykazują, że PQ wywołuje stres oksydacyjny, w wyniku, którego dochodzi do peroksydacji lipidów i białek [Hara i wsp., 1990, Hara i wsp., 1991 a-d]. Toksyczności PQ zapobiegają i wykazują działanie neuroprotekcjne enzymy usuwające wolne rodniki oraz związki antyoksydacyjne, jak np. salicylan sodu, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa i wykazują one działanie neuroprotekcjne [Dinis-Oliveira i wsp., 2007, Thiruchelvam i wsp., 2005].

Shimizu i wsp. [2003b], przedstawił w swojej pracy zjawiska wywoływane przez PQ, w które zaangażowany jest wzrost poziomu zewnątrzkomórkowego glutaminianu. Konsekwencją działania glutaminianu jest napływ Ca^{2+} do komórek i aktywacja neuronalnej syntazy NO, wzrost stężenia NO i powstawanie nadtlenoazotynu ($ONOO^-$), który z kolei zaburza pracę mitochondriów. Tlenek azotu jest wolnym rodnikiem charakteryzującym się niską reaktywnością. Jednakże równoczesna produkcja NO i O^{2-} w warunkach stresu oksydacyjnego prowadzi do wytworzenia nadtlenoazotynu ($ONOO^-$) [Koppenol i wsp., 1992]. W specyficznych warunkach (niski poziom substratu, argininy lub kofaktora, tetrahydrobiopteryny) może również doprowadzać do wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego (O^{2-}) lub nadtlenku wodoru (H_2O_2) [Bhat i Feinstein, 2006]. Nadtlenoazotyn jest bardzo silnym utleniaczem, który może modyfikować białka, lipidy oraz kwasy nukleinowe, powodować uszkodzenia mitochondriów i śmierć neuronów [Kilbourn i wsp., 2000]. Badania *post mortem* mózgow osób z chorobami neurodegeneracyjnymi wykazują obecność nitrowanych białek, których powstawanie jest wynikiem działania $ONOO^-$ [Good i wsp., 1998]. Nasze badania pokazują, że podanie PQ zwiększa poziom wolnych rodników i ekspresję genów dla iNOS. Udokumentowano, że zarówno NO jak i $ONOO^-$ mogą hamować aktywność poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego w mitochondriach

i prowadzić do zaburzenia równowagi energetycznej komórki [Ebadi i Sharma, 2003, Nakamura i Lipton, 2010]. Nadtlenoazotyn oraz inne reaktywne formy azotu modyfikują działanie wielu białek poprzez ich nitrację lub S-nitrozylację [Cho i wsp., 2009, Gu i wsp., 2002, Nakamura i Lipton, 2009]. Taka modyfikacja reszt aminokwasowych może zaburzać prawidłową strukturę białek, prowadzić do ich oligomeryzacji i zaburzenia funkcji, co bezpośrednio łączy stres nitrozacyjny ze zmianami molekularnymi wykrytymi w chorobach neurodegeneracyjnych [Good i wsp., 1998]. Badania pokazały, że działanie wolnych rodników, w tym NO, może prowadzić do akumulacji α -synukleiny wewnątrz jąder komórkowych [Gentile i wsp., 2008; Specht i wsp., 2005]. Może to stanowić istotną przyczynę neurodegeneracji zarówno neuronów jak i oligodendrocytów, co pokazują badania *post mortem* mózgów chorych na atrofię wielosystemową [Lin i wsp., 2004]. Wykazano, że w wyniku działania stresu oksydacyjnego dochodzi do translokacji C-końcowego, 10 kDa fragmentu α -synukleiny do jądra komórek dopaminergicznych [Xu i wsp., 2006]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że stres oksydacyjny może również prowadzić do translokacji α -synukleiny do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz do jądra w wyniku przerwania ciągłości błony jądrowej [Sangchot i wsp., 2002, Adamczyk i wsp., 2007]. Ponadto po dootrzewnowym podaniu myszom PQ zaobserwowano istotne zwiększenie immunoreaktywności α -synukleiny zarówno w cytozolu jak i jądrach neuronów istoty czarnej [Goers i wsp., 2003]. Pokazano, że w jądrze komórkowym α -synukleina może tworzyć specyficzne kompleksy z histonami, co zwiększa jej oligomeryzację do nierozpuszczalnych fibryli [Goers i wsp., 2003]. Jądrowa lokalizacja α -synukleiny jest zwiększona w przypadku mutacji A30P oraz A53T i skutkuje neurotoksycznością, poprzez zahamowanie acetylacji histonów [Kontopoulos i wsp., 2006].

Wydaje się, że aktywacja iNOS i COX-2 przez PQ może zapoczątkowywać proces cytotoxyczności i neurodegeneracji. W przedstawionych w tej pracy wynikach, po 3 i 24 godzinach od podania PQ w prążkowiu i śródmózgowiu dochodzi do wzrostu poziomu mRNA iNOS, wzrostu poziomu wolnych rodników i stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji może powodować obumieranie komórek. Ponadto prezentowane w tej pracy wyniki wskazują na wzrost poziomu mRNA cyklooksygenazy-2 (COX-2) w śródmózgowiu po 3 godzinach od podania PQ. COX-2 jest izoformą indukowaną, której podstawowa ekspresja w ludzkich tkankach jest niska, natomiast ulega indukcji w przebiegu odpowiedzi immunologicznej, w

reakcji na bodźce zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe [O'Neill i Ford-Hutchinson, 1993]. Gen kodujący COX-2 charakteryzuje się miejscami wiążącymi dla czynników transkrypcyjnych (m.in.: NF- κ B, NF-IL6 (czynnik jądrowy interleukiny 6) i CREB (ang. *c-AMP response element binding protein*)) [Yang i Bleich, 2004]. To, jakie czynniki transkrypcyjne są zaangażowane w aktywację COX-2 zależy zarówno od typu komórki jak i działającego na nią bodźca [Schmedtje i wsp., 1997, Reddy i wsp., 2000, Wadleigh i wsp., 2000]. Wzrost ekspresji genu COX-2 powodują m.in. cytokiny prozapalne, mitogeny i czynniki wzrostu. Z kolei glikokortykosteroidy i niektóre cytokiny hamują ekspresję genu COX-2 [Hinz i Brune, 2002, Kołaczowska 2002, Consilvio i wsp., 2004]. W niektórych sytuacjach wzrost poziomu COX-2 związany jest z aktywacją jego transkrypcji, w innych natomiast zależy głównie od stabilizacji mRNA [Ristimaki i wsp., 1994, Huang i wsp., 2000, Dixon i wsp., 2000, Tamura i wsp., 2002]. Dane wskazują, że COX-2 w mózgach chorych na choroby neurodegeneracyjne jest aktywowany we wczesnych etapach choroby, przed wystąpieniem objawów demencji i poprzedza aktywację mikrogleju, a jego poziom spada w zaawansowanych stadiach choroby [Yermakova i O'Banion, 2001]. Obserwowano także, że COX-2 może pośredniczyć w aktywacji mikrogleju i indukcji uszkodzeń neuronów [Sanchez-Pernaute i wsp., 2004, Vijitruth i wsp., 2004]. W przeprowadzonych badaniach PQ wpływając na wzrost poziomu NO \cdot , O $_2\cdot^-$ wolnych rodników, stresu oksydacyjnego, prowadzi również do aktywacji ekspresji genu dla COX-2. W ten sposób z kolei uwalniany w reakcji cyklooksygenazy rodnik nadadtlenowy nasila stres oksydacyjny. Do tej pory kontynuowane są badania dotyczące długoterminowego stosowania nioselektywnych inhibitorów COX-2 na obniżenie ryzyka wystąpienia ChP [Townsend i Pratico 2005]. Z przeprowadzonych badań wynika, że inhibitor COX-2, ibuprofen, indukuje fosforylację GSK3 β na serynie 9, powoduje obniżenie jej aktywności [Greenspan i wsp. 2011] i w ten sposób może wywierać korzystne działanie w chorobach neurodegeneracyjnych.

Znaczenie GSK3 β w modelach zwierzęcych choroby Parkinsona.

Ostatnio opublikowane badania na temat GSK3 β wykazały duże zainteresowanie postacią określoną, jako forma aktywna GSK3 β pY216. Do tej pory prowadzono prace doświadczalne z udziałem GSK3 β w różnych modelach parkinsonowskich jak: 6-hydroxydopamina (6-OHDA), rotenoniMPTP/MPP+, α -synukleina [Chen i wsp., 2004, Avraham i wsp., 2005, Wang i wsp., 2007, Petit-Paitel i wsp., 2009, Wills i wsp., 2010].

Poza badaniami Songin i wsp., [2011a,b] do chwili obecnej nie istnieją dane doświadczalne dotyczące znaczenia GSK3 β w modelu ChP wywołanej PQ.

Chen i wsp., [2004] zastosowali 6-OHDA, jako czynnik śmierci komórek dopaminergicznych i model zwierzęcy ChP, w którym stwierdzili aktywację apoptozy, na szlaku zależnym od kaspazy-3 i wzrostu fosforylacji GSK3 β na tyrozynie 216.

Wyniki uzyskane przez Yue i wsp. 2011 wskazują natomiast, że 6-OHDA nie wpływa na aktywność GSK3 β w istocie czarnej. Inhibitor GSK3 β -chlorek litu nie był w stanie złagodzić efektu wywołanego 6-OHDA, jak degeneracja neuronów dopaminergicznych. W kolejnych badaniach na modelu ChP wywołanym podaniem MPTP/MPP+, α -synukleina stwierdzono nadmierną fosforylację białka tau, za co odpowiedzialna jest GSK3 β . Badacze twierdzą, że dochodzi do aktywacji enzymu w wyniku autofosforylacji GSK3 β na tyrozynie 216 [Kozikowski i wsp., 2006, Duka i wsp., 2009, Wills i wsp., 2010].

Biorąc pod uwagę toksyczność PQ, ważnym zagadnieniem, którym zajęłam się w mojej pracy było zbadanie wpływu PQ na poziom białka GSK3 β i jej form ufosforylowanych *in vivo* jak i *in vitro*. Dotychczasowe badania dotyczące wpływu PQ na procesy, zjawiska molekularne i metaboliczne nie uwzględniały wielofunkcyjnego enzymu GSK3 β i jego formy ufosforylowanej na tyrozynie 216.

Uzyskane przez nas dane pokazują, że jednorazowe podania PQ w dawce 40 mg/kg m.c nie miało wpływu na poziom białka ani na ekspresję GSK3 β w prądkowiu i w śródmózgowiu po 3 godzinach ani po 24 godzinach. Może to być związane ze zbyt krótkim działaniem PQ oraz z wiekiem szczurów doświadczalnych. Badania te są potwierdzeniem wyników innych badaczy, którzy przedstawiają w swoich pracach, że jednorazowe podanie PQ nie wykazywało znaczących zmian w mózgu szczura [Widdowson i wsp., 1996b]. Potwierdzili to Bartlett i wsp., [2009], którzy za pomocą ilościowej techniki obrazowania PET, znaleźli minimalne ilości PQ w mózgu małpy 'rhesus macaque' po jego pojedynczym wstrzyknięciu, co może sugerować słabą penetrację tego herbicydu do mózgu.

Długoterminowe podania PQ oraz czynniki zarówno zewnętrzne jak i wewnętrzne mogą wpływać na zwiększoną przepuszczalność bariery krew-mózg, co powoduje akumulację toksycznych stężeń PQ w mózgu, który niszczy neurony dopaminergiczne i doprowadza do parkinsonizmu [Widdowsoni wsp.,1996a,b, Thiruchelvam i wsp.,2003]. Kuter i wsp., 2010 w

swojej pracy przedstawili wpływ 4-krotnego podawania PQ, na produkcję reaktywnych formy tlenu (ROS), które mogą być główną przyczyną toksyczności PQ. Mało jest dowodów na generowanie ROS *in vivo* w mózgu po dootrzewnowym podawaniu PQ. W wymienionych badaniach 4-krotne podawanie PQ powodowało wzrost ROS w prążkowie. Ossowska i wsp., [2006] opublikowali, że w tym samym modelu podawania PQ nie dochodzi do zmiany poziomu DA w korze przedczołowej, ale za to dochodzi do wzrostu poziomu jej metabolitu HVA i stosunku HVA/DA. W przeprowadzonych przez nas badaniach w tych samych warunkach obserwujemy w prążkowie obniżenie poziomu białka GSK3 β i jej aktywnej formy GSK3 β pY216, co może wynikać w głównej mierze z działania wolnych rodników. Odmienna sytuacja występuje w śródmózgowiu, gdzie obserwujemy wzrost poziomu immunoreaktywności GSK3 β i GSK3 β pY216, przy braku zmian ROS w tej strukturze [Kuter i wsp., 2010].

W związku z powyższym, ciekawym i nowatorskim doświadczeniem było zbadanie poziomu immunoreaktywności GSK3 β i jej formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 w prążkowie i śródmózgowiu w szczurzym modelu parkinsonizmu wywołanego znacznie dłuższym podaniem PQ - 37 tygodni.

Wpływ długoterminowego podania PQ na poziom białka GSK3 β i jej aktywnej formy GSK3 β pY216 różnił się w badanych strukturach mózgu. Po pierwsze, herbicyd powodował znamienny spadek GSK3 β w homogenatach w prążkowie przy jednoczesnym wzroście w śródmózgowiu. Interesującym wydawało się zagadnienie, jakim jest występowanie obu postaci GSK3 β w różnych kompartmentach komórki. Przeprowadzone doświadczenia na zgrubnych frakcjach podkomórkowych jak: frakcja jądrowa, mitochondrialna i cytozolowa potwierdziły znaczący spadek poziomu białka GSK3 β we wszystkich wymienionych frakcjach podkomórkowych w prążkowie. Dodatkowo badania wykazały obniżenie poziomu immunoreaktywności białka GSK3 β pY216. Natomiast obserwowano wzrost poziomu białka zarówno całkowitej i aktywnej formy GSK3 β w śródmózgowiu również we wszystkich badanych frakcjach podkomórkowych. Z danych literaturowych wiadomo, że PQ jest zdolny do niszczenia cytoszkieletu różnych komórek, w tym neuronów, co może również doprowadzać do agregacji mikrotubul, redystrybucji mikrofilamentów, jak również do aksonopatii, mierzonej spadkiem liczby neurofilamentów [Lii i wsp., 1987, Schmucki i Schlüter, 1996, Milzani i wsp., 1997; Schmucki i wsp., 2000, Schmucki i Kahl, 2009]. Dlatego jest wielce

prawdopodobne, że obniżony poziom GSK3 β w prądkowiu związany jest z zaburzeniami transportu aksonalnego ze śródmózgowia do prądkowia. Taki proces może być również odpowiedzialny za zwiększoną akumulację GSK3 β w śródmózgowiu, którą obserwowano w naszych doświadczeniach. Z drugiej strony, zwiększenie poziomu białka GSK3 β w śródmózgowiu przez długoterminowe podawanie PQ, może być przyczyną uszkodzenia cytoszkieletu poprzez nadmierną fosforylację białek związanych z mikrotubulami, znanymi jako substraty GSK3 β , prowadząc do destabilizacji mikrotubul [Jope i Johnson, 2004]. Jednak, nie można wykluczyć bezpośredniego wpływu PQ na neurony prądkowia. Wcześniejsze doniesienia wykazały, że neurony dopaminergiczne były również wrażliwe na ten herbicyd podawany w takiej samej dawce, jak w naszych doświadczeniach [McCormack i wsp., 2002]. Jednak, selektywność PQ nie została zbadana po tak długim podawaniu (37-tygodni), co może w dużym stopniu utrudniać interpretację i porównanie z wynikami uzyskanymi w innych ośrodkach badawczych. PQ gromadzi się w mózgu, a proces ten zależy od czasu działania i jego dawek [Prasad i wsp., 2007]. Moje badania wskazują, że długoterminowe podania PQ szczurom, zmienia poziom białka GSK3 β i jej aktywnej formy GSK3 β pY216 w prądkowiu i śródmózgowiu. W hipokampie, korze mózgowej i mózdzku poziom GSK3 β nie ulega zmianom, natomiast obserwuje się zaburzenia jej śródkomórkowej lokalizacji pod wpływem PQ [Songin i wsp., 2011b]. Funkcjonalne znaczenie tych zmian i ich rola w patomechanizmie ChP na tym etapie pozostaje nie wyjaśniona. Dotychczasowe badania nad GSK3 β w ChP stwarzały trudności w należytych przedyskutowaniu wyników własnych w kontekście do doświadczeń opublikowanych przez innych autorów. W literaturze dostępne są nieliczne badania dotyczące GSK3 β w zwierzęcych modelach ChP jak: MPTP, 6-OHDA, rotenon czy α -synukleina. Jednak te dane są fragmentaryczne, wykonane w wielu dawkach, w różnym okresie życia zwierząt.

Toksyczność parakwatu i peptydów A β w komórkach dopaminergicznych PC12.

Dotychczasowe dane przedstawiają, że najbardziej wrażliwe na toksyczne działanie pestycydów są komórki dopaminergiczne [Sidhu i wsp., 2004; Wersinger i wsp., 2004]. W związku z tym badania dotyczące mechanizmu śmierci komórek prowadzono na linii komórek pheochromocytoza PC12, charakteryzującej się syntezą amin katecholowych, w tym DA. Do chwili obecnej jest to jedna z najlepiej scharakteryzowanych linii komórkowych, oraz model badawczy szeroko stosowany w doświadczeniach *in vitro* dotyczących

toksyczności A β [Qian i wsp., 2008; Girigoswami i wsp., 2008; Hu i wsp., 2008], jak również wykorzystywany w badaniu cytotoksycznego efektu wielu innych substancji [Piga i wsp., 2007]. Prezentowane w obecnej pracy badania potwierdziły toksyczne działanie PQ na komórki dopaminergiczne PC12. Stwierdzono, że po 24 godzinach inkubacji w obecności 1mM PQ przeżywało około 50% komórek. W innych badaniach wykazano, że już 8 godzinna inkubacja indukuje śmierć komórek [Gelinas i wsp., 2004]. Badania przeprowadzone na tym samym modelu pokazują, że zewnątrzkomórkowe podanie MPP⁺/MPTP lub α -synukleiny powoduje zaburzenie funkcji mitochondriów oraz aktywuje programowaną śmierć komórek [Chalimoniuk i wsp., 2007, Kaźmierczak i wsp., 2008, Duka i wsp., 2009, Wills i wsp., 2010].

PQ powoduje wzrost poziomu wolnych rodników oraz ekspresję genów dla iNOS i COX-2. Wyniki innych badań *in vitro* dowodzą, że peroksydacja lipidów może być konsekwencją komórkowej neurotoksyczności PQ, co prowadzi do śmierci komórki i może być brana pod uwagę w ocenie ryzyka chorób neurodegeneracyjnych [Yang i Sun, 1998]. Ponadto wykazano, że PQ w mitochondriach hamuje heksokinazę, prawdopodobnie ze względu na wewnątrzkomórkowe wytwarzanie wolnych rodników tlenowych [Kang i wsp., 1997]. PQ zwiększa utlenianie NADH i zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie ATP znacznie bardziej niż MPP⁺. W komórkach PC12 potraktowanych PQ zaobserwowano znaczny wzrost uwalniania dehydrogenazy mleczanowej (LDH) co jest wyrazem ich uszkodzenia [Lam i Ko, 2011]. Z naszych badań wynika, że PQ powoduje wzrost ekspresji genów prooksydacyjnych, ale równocześnie komórka broni się przed działaniem toksycznego PQ poprzez zwiększenie ekspresji genów dla enzymów antyoksydacyjnych. W przeprowadzonych doświadczeniach na komórkach PC12 pod wpływem PQ stwierdzono wzrost ekspresji genów dla SOD i katalazy (dane nieprezentowane). W naszych badaniach stwierdziliśmy znaczne obniżenie poziomu immunoreaktywności całkowitej GSK3 β , jak i formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 w komórkach dopaminergicznych PC12 poddanych działaniu PQ. Spadek poziomu białka aktywnej formy enzymu może być odpowiedzią obronną na zmiany zachodzące w komórce po toksycznym działaniu PQ. Równocześnie związek ten nie wpływał na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β pS9.

Kolejne badania w komórkach PC12 dotyczyły udziału GSK3 β w toksyczności peptydów A β .

Ścieżki sygnałowe, w których GSK3 β odgrywa znaczącą rolę mogą przyczyniać się w dużym stopniu do powstawania lub pogłębiania stresu oksydacyjnego w procesie starzenia

się mózgu i rozwoju chorób neurodegeneracyjnych [Pei i wsp., 1997, Beurel i Jope, 2006, Liang i Chuang 2006, 2007, Jope i wsp., 2007, Lee i wsp., 2007, Songin i wsp., 2007]. Badania na poziomie molekularnym wskazują, że GSK3 β bierze istotny udział w neuropatologii ChA przez fosforylację (hiperfosforylację) białka tau związanego z mikrotubulami, białko to stanowi główny składnik splotów neurofibrilarnych w ChA [Jope i wsp., 2007, Hooper i wsp., 2008]. GSK3 β może być zaangażowana we wzrost produkcji A β oraz odpowiedź zapalną i zaburzenia poznawcze [Hooper i wsp., 2008]. Hamowanie aktywności GSK3 β zostało zaproponowane, jako mechanizm wspierający przeżycie neuronów w ChA.

Dalsze eksperymenty miały na celu zbadanie poziomu immunoreaktywności GSK3 β w uwalnianiu i toksyczności peptydów A β . Badania prowadzono na komórkach PC12 transfekowanych ludzkim genem dla APP z podwójną mutacją szwedzką. Komórki te charakteryzuje zwiększone wytwarzanie i uwalnianie peptydów A β w porównaniu do komórek kontrolnych [Chalimoniuk i wsp., 2007]. Wyniki uzyskane w tej pracy wykazują, że poziom A β uwalnianego przez komórki APPsw jest 4,8-krotnie większy w porównaniu z komórkami PC12 kontrolnymi.

Badania wielu ośrodków, w tym nasze, wykazały, że A β może powodować wytwarzanie wolnych rodników tlenowych, chociaż mechanizm tego procesu nie jest do końca poznany. Neurotoksyczne działanie A β może obejmować ponadto inne liczne mechanizmy, takie jak, zaburzenie homeostazy wapnia i procesów fosforylacji i defosforylacji szlaków przekaźnictwa sygnałów w układzie glutaminianergicznym i cholinergicznym. Ponadto peptydy A β przez aktywację mikrogleju powodują rozwój odpowiedzi zapalnej. Wydaje się, że A β może wchodzić w interakcję z błonami komórkowymi powodując np. utlenianie lipidów i białek [Murray i wsp., 2007]. Peptydy A β wchodzi również w interakcję z jonami żelaza znajdującymi się w hemie różnych enzymów, m.in. kompleksu III łańcucha oddechowego doprowadzając do zaburzenia jego funkcji i zwiększenia produkcji wolnych rodników [Atamna i Boyle, 2006]. Wolnorodnikowe uszkodzenie lipidów błon komórkowych może powodować utratę integralności błon, zaburzenia homeostazy i uszkodzenie komórek. Obserwowane zaburzenia homeostazy jonów, szczególnie jonów wapnia w neuronach poddanych działaniu A β mogą być także związane z oddziaływaniem hydrofobowych agregatów A β z błonami, co może zmieniać nie tylko właściwości fizykochemiczne błon, lecz także zaburzać funkcjonowanie receptorów i kanałów jonowych zlokalizowanych w tych

błonach [Mattson i wsp., 1992]. Zaburzenia homeostazy wapnia mogą być z kolei przyczyną aktywacji licznych kinaz, które powodują zaburzenia funkcji licznych białek w tym hiperfosforylację białka tau, a także innych enzymów wrażliwych na poziom Ca^{2+} , takich jak proteazy i fosfatazy, fosfolipazy. A β poprzez hamowanie PI3-K wpływa na wzrost aktywności GSK3 β . Nasze dane wskazują, że wzrost uwalnianych endogennie peptydów A β powoduje zwiększoną aktywność GSK3 β pS9 w komórkach APPsw, natomiast nie wpływa na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i GSK3 β pY216. Morfinii wsp.[2004] stwierdzili, że elementem łączącym współdziałanie CDK5 i GSK3 β jest stan fosforylacji seryny 9 w cząsteczce GSK3 β . Badania własne także wykazały udział CDK5 w regulacji GSK3 β [Czapski i wsp., 2011]. Zbyt duża aktywacja GSK3 β może doprowadzić do hiperfosforylacji białek docelowych, w tym MAP tau. W celu wykazania zależności pomiędzy wzrostem poziomu A β a wzrostem aktywności GSK3 β zbadano poziom immunoreaktywności białka tau na Ser396, które fosforylowane jest przez GSK3 β . Nasze oczekiwania się potwierdziły, ponieważ wraz ze wzrostem aktywności GSK3 β otrzymaliśmy wzrost poziomu ufosforylowanego białka tau na Ser396 w komórkach APPsw.

Zwiększone wytwarzanie A β przez komórki wiąże się nie tylko ze wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu wolnych rodników i wrażliwością na stres oksydacyjny, ale również, co wykazały nasze doświadczenia, że znacznym wzrostem poziomu immunoreaktywności GSK3 β pY216 we frakcji jądrowej, przy jednoczesnym jej obniżeniu w cytozolu w komórkach APPsw. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że w komórkach PC12, jeżeli porówna się całkowitą GSK3 β do formy ufosforylowanej to wyższy poziom A β związany jest z większym procentowym udziałem GSK3 β pY216 we frakcji jądrowej. Nasze badania są zgodne z obserwacjami badaczy Kim i wsp., (2003), którzy badali poziom białka GSK3 β w komórkach APPsw.

Egzogenny PQ oraz endogennie uwalniane peptydy A β , są czynnikami wywołującymi stres oksydacyjny i modyfikującymi w sposób zróżnicowany GSK3 β i jej ufosforylowane formy. PQ podwyższa poziom GSK3 β i jej aktywnej postaci GSK3 β pY216 wyłącznie w śródmózgowiu, a hamuje w prądkowiu. Peptydy A β zwiększają wyłącznie aktywność GSK3 β pS9 i wpływają w ten sposób na wzrost fosforylacji białka tau.

Mimo danych epidemiologicznych wskazujących, że działanie pestycydów zwiększa ryzyko ChA [Baldi i wsp, 2003;. Haydeni wsp.,2010] do tej pory nie zbadano doświadczalnie,

jaki jest bezpośredni związek między ekspozycją na pestycydy a patogenezą ChA. Chen i wsp., [2011] zbadali wpływ PQ na poziom A β u myszy transgenicznych APP. Wyniki pokazują, że PQ doprowadził do wzrostu poziomu A β w korze mózgowej oraz doprowadził do stresu oksydacyjnego w mitochondriach i do ich dysfunkcji. Istnieją dane wskazujące, że PQ jest mitochondrialną toksyną, która indukuje utratę neuronów poprzez wzrost poziomu białka p53 i aktywację mitochondrialnego szlaku apoptozy [YangiTiffany-Castiglioni, 2008]. Uszkodzenia mitochondriów były skorelowane z zaburzeniami uczenia się i pamięci.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

- ❖ Wykazano, że PQ po jednorazowym podaniu i krótkoterminowym działaniu (3 i 24 godziny) wpływa na ekspresję genów prooksydacyjnych w prążkowie i śródmózgowiu (iNOS i COX-2) natomiast nie ma wpływu na ekspresję i poziom białka GSK3 β w badanych strukturach mózgu. Wyniki wskazują na brak udziału GSK3 β we wczesnej odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny wywołany PQ.
- ❖ Stwierdzono, że poziom białka GSK3 β i jego formy ufosforylowanej (GSK3 β pY216) zmniejszył się w prążkowie po wielokrotnym podaniu i długoterminowym działaniu PQ (4 i 37 tygodniowym). Obniżony poziom GSK3 β w prążkowie może zależeć od zaburzeń transportu aksonalnego tego białka ze śródmózgowia, gdzie obserwuje się jego wyższy poziom wskazujący na jego zwiększoną akumulację.
- ❖ Długoterminowe (37 tygodni) działanie PQ prowadzi do znaczącego obniżenia poziomu immunoreaktywności GSK3 β i formy ufosforylowanej GSK3 β pY216 we wszystkich badanych frakcjach podkomórkowych prążkowie, przy jednoczesnym wzroście w śródmózgowiu. Wyniki wskazują, że lokalizacja wewnątrzkomórkowa tych enzymów nie ulega zaburzeniu w badanych częściach mózgu w wyniku działania PQ.
- ❖ Badania na komórkach dopaminergicznych PC12 wykazały, że PQ powoduje znaczny wzrost poziomu wolnych rodników i obumieranie komórek oraz obniżenie poziomu immunoreaktywności GSK3 β i GSK3 β pY216. Wyniki mogą wskazywać, że obniżona przeżywalność komórek w wyniku działania PQ może być spowodowana wzrostem procesów wolnorodnikowych i zmianami GSK3 β i formy ufosforylowanej na tyrozynie 216.

- ❖ Endogennie uwalniane peptydy A β przez komórki PC12 transfekowane ludzkim genem APP z podwójną mutacją szwedzką (APPsw), prowadzą do obniżonego poziomu białka GSK3 β pS9 przy braku zmian GSK3 β i GSK3 β pY216. Wyniki wskazują, że wzrostowi aktywności GSK3 β pS9 towarzyszy podwyższenie poziomu immunoreaktywności ufosforylowanego białka tau na serynie 396 w komórkach APPsw. Zjawiska te mogą powodować zaburzenie funkcji cytoszkieletu komórek APPsw w porównaniu do komórek kontrolnych PC12.

STRESZCZENIE

Kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK3) znana obecnie również, jako kinaza białka tau (TPK1 - tau protein kinase-1) to wysoce konserwowana, wielozadaniowa kinaza serynowo-treoninowa, która w tkankach ssaków występuje w dwóch izoformach: GSK3 α i GSK3 β .

W pracy skoncentrowałam swoją uwagę na GSK3 β , która jest pojedynczym polipeptydem zbudowanym z 433 aminokwasów, o masie 47 kDa. Wykazuje najwyższy poziom ekspresji w mózgu, w porównaniu do innych organów [Takashima 2006, Perez-Costas i wsp., 2010]. Ekspresja tego enzymu zachodzi intensywniej w neuronach niż w komórkach glejowych [Takahashi i wsp., 2000]. GSK3 β jest przede wszystkim kinazą cytozolową, ale jej obecność stwierdzono również we frakcji jądrowej i mitochondrialnej [Franca-Koh i wsp., 2002, Fujimuro i Hayward, 2003, Meares i Jope, 2007, Songin i wsp., 2011ab, Pająk i wsp., 2009].

GSK3 β początkowo została zidentyfikowana, jako regulator metabolizmu glikogenu, a obecnie wiadomo, że enzym ten ma liczne funkcje komórkowe takie jak regulacja licznych czynników transkrypcyjnych, ekspresji genów dla białek sygnałowych, strukturalnych biorących udział w „architekturze” komórki i w apoptozie. GSK3 β odgrywa istotną rolę w syntezie białek, proliferacji i różnicowaniu komórek, dynamice mikrotubul, motoryce komórki. Kinaza ta wpływa na wymienione funkcje poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych, czynników inicjacyjnych białek biorących udział w cyklu komórkowym oraz białek zaangażowanych w funkcje mikrotubul i adhezję komórek. Jest kinazą odpowiedzialną za fosforylację białka tau. Podsumowując, GSK3 β reguluje funkcję białek cytoszkieletu, przeżycie i śmierć komórek.

GSK3 β posiada dwa miejsca fosforylacji, które wpływają na jej aktywność katalityczną. Jest to seryna 9 i tyrozyna 216. Fosforylacja na tyrozynie 216 znajduje się w domenie kinazy w miejscu aktywacji, co prowadzi do wzrostu aktywności GSK3 β . Mechanizm tej regulacji nie jest dobrze poznany [Wang i wsp., 1994]. Część ośrodków badawczych wskazuje na ważną rolę autofosforylacji w regulacji aktywności GSK3 β [Cole i wsp., 2004] lub na fosforylację przez inne kinazy tyrozynowe [Hughes i wsp., 1993, Kim i wsp., 1999, Lesort i wsp., 1999, Wang i wsp., 2003,]. Lepiej poznany jest mechanizm hamowania aktywności GSK3 β , w

wyniku fosforylacji seryny 9, co zmniejsza aktywność enzymu na drodze zmian konformacyjnych, dzięki którym dochodzi do odpowiedniego fałdowania i blokowania miejsca aktywnego koniecznego do wiązania substratu.

Istniejące dane literaturowe wskazują na istotne znaczenie GSK3 β w patogenezie i patomechanizmie choroby Parkinsona (ChP) i choroby Alzheimerera (ChA).

Obecnie szacuje się, że około 400 milionów ludzi cierpi z powodu chorób degeneracyjnego centralnego systemu nerwowego. Problem dotyczy głównie ChA oraz choroby Parkinsona (ChP). Podłoże i przyczyny tych chorób nie są dotychczas dobrze poznane. Do związków szczególnie toksycznych dla neuronów zaliczamy pestycydy, herbicydy i chemikalia przemysłowe, które wywołują silny stres oksydacyjny, przez co są uważane za potencjalne czynniki ryzyka w chorobach neurodegeneracyjnych. Toksyny pochodzące ze środowiska mogą zwiększać wrażliwość neuronów lub powodować ich degenerację oraz uszkodzenia naczyń krwionośnych, które towarzyszą tym chorobom [Miller i wsp., 2002]. Jedną z często wskazywanych substancji, pozytywnie korelującą z częstością pojawiania się ChP, jest powszechnie stosowany herbicyd – parakwat (PQ) [Hertzman i wsp., 1990, Liou i wsp., 1997]. Jego struktura chemiczna jest podobna do związku MPP⁺/MPTP (1-methyl-4-phenylpyridinium). PQ w sytuacji nie zaburzającej bariery krew-mózg przenika do mózgu w niewielkim stopniu przy pomocy transportera dla obojętnych aminokwasów [Shimizu i wsp., 2001]. Neurotoksyczność centralna PQ jest z tego powodu dużo mniejsza niż MPTP czy 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) [Corasaniti i Nistico 1993, Shimizu i wsp., 2001, Barlow i wsp., 2003, Ossowska i wsp., 2005, Prasad i wsp., 2007]. Mechanizm toksyczności PQ jest indukowany przez stres oksydacyjny oraz uszkodzenie mitochondriów [Drechsel i Patel, 2008], które mają kluczowe znaczenie w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych [Lin i Beal, 2006; Pagani i Eckert, 2011]. Użycie PQ jako modelu doświadczalnego może być przydatne w badaniach nad rolą mitochondriów w mechanizmie zarówno ChP, jak i ChA. Z danych literaturowych wynika, że peptydy A β wpływają na uszkodzenia mitochondriów [Sultana i Butterfield, 2009], natomiast Chen i wsp., 2011 wykazują, że uszkodzenia mitochondriów mogą być wynikiem działania PQ, a dopiero w kolejnym etapie dochodzi do wzrostu poziomu A β .

Podjęte w niniejszej pracy zagadnienia miały na celu zbadanie wpływu PQ na ekspresję i poziom białka GSK3 β *in vivo* jak i *in vitro*. W badaniach uwzględniono formę aktywną GSK3 β

ufosforylowaną na tyrozynie 216 (GSK3 β pY216) w śródmózgowiu i prążkowie szczura. Zbadano wpływ PQ i peptydów A β na poziom GSK3 β i jej form ufosforylowanych (GSK3 β pY216 i GSK3 β pS9) w komórkach PC12 kontrolnych i transfekowanych genem dla białka prekursorowego amyloidu beta.

Do doświadczeń używano szczurów samców szczepu Wistar. Badano jednorazowe i krótkoterminowe działanie PQ w dawce 40 mg/kg m.c. Mózg do dalszych doświadczeń pobierano po 3 i 24 godzinach od iniekcji PQ. Ten model badawczy posłużył do poznania wpływu PQ na ekspresję i poziom białka GSK3 β i jej aktywnej formy ufosforylowanej na tyrozynie 216 (GSK3 β pY216) oraz na ekspresję genów prooksydacyjnych w śródmózgowiu i prążkowie szczura. Zbadano również wielokrotne i długoterminowe działanie PQ w dawce 10 mg/kg m.c, w tych doświadczeniach PQ podawany był raz w tygodniu przez 4 i 37 tygodni. Dawka PQ do podań została wybrana eksperymentalnie oraz na podstawie wyników opublikowanych badań [Ossowska i wsp., 2005a,b, Ossowska i wsp., 2006, Kuter i wsp., 2007, Shimizu i wsp., 2003]. W modelu doświadczalnym z długoterminowym podaniem PQ zbadano poziom białka GSK3 β i GSK3 β pY216 w śródmózgowiu i prążkowie oraz we frakcjach podkomórkowych. Kolejne badania prowadzono na szczurzych komórkach guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy (pheochromocytoma, PC12). Komórki te były stabilnie transfekowane ludzkim genem białka prekursorowego amyloidu β (APP) z mutacją typu szwedzkiego (APP^{sw}, K670M/N671L), a w przypadku komórek kontrolnych, samym wektorem. Stwierdzono, że w komórkach APP^{sw} poziom uwalnianych peptydów A β jest 4,8-krotnie wyższy w porównaniu do komórek kontrolnych PC12 [Chalimoniuk i wsp., 2007]. Zbadano działanie PQ (1mM) i peptydów A β uwalnianych endogennie na poziom białka GSK3 β i jej form ufosforylowanych (GSK3 β pY216 i GSK3 β pS9) w komórkach PC12. W badaniach oceniano także wewnątrzkomórkowy poziom wolnych rodników za pomocą fluorymetrycznego testu DCF oraz wrażliwość komórek na stres oksydacyjny i ich przeżycie za pomocą testu MTT.

Stwierdzono wzrost ekspresji genów dla iNOS i COX-2 przez PQ, a zjawiska te mogą zapoczątkowywać proces cytotoksyczności i neurodegeneracji. W przedstawionych w tej pracy wynikach, po 3 i 24 godzinach od podania PQ w prążkowie i śródmózgowiu dochodzi do wzrostu poziomu mRNA iNOS, wzrostu poziomu wolnych rodników i stresu oksydacyjnego, co w konsekwencji może powodować obumieranie komórek. Ponadto

prezentowane w tej pracy wyniki wskazują na wzrost poziomu mRNA COX-2w śródmózgowiu po 3 godzinach od podania PQ. Uzyskane przez nas dane pokazują, że jednorazowe podania PQ w dawce 40 mg/kg m.c nie miało wpływu na poziom białka ani na ekspresję GSK3 β w prądkowiu i w śródmózgowiu po 3 godzinach ani po 24 godzinach. Może to być związane ze zbyt krótkim działaniem PQ oraz wiekiem szczurów doświadczalnych.

Wpływ długoterminowego podania PQ na poziom białka GSK3 β i jej aktywnej formy GSK3 β pY216 różnił się w badanych strukturach mózgu. Po pierwsze, herbicyd powodował znamienny spadek GSK3 β w homogenatach w prądkowiu przy jednoczesnym wzroście w śródmózgowiu. Interesującym wydawało się zagadnienie dotyczące występowania obu postaci GSK3 β w różnych kompartmentach komórki. Przeprowadzone doświadczenia na zgrubnych frakcjach podkomórkowych jak: frakcja jądrowa, mitochondrialna i cytozolowa potwierdziły znaczący spadek poziomu białka GSK3 β we wszystkich wymienionych frakcjach podkomórkowych w prądkowiu. Dodatkowo badania wykazały obniżenie poziomu immunoreaktywności białka GSK3 β pY216. Natomiast obserwowano wzrost poziomu białka zarówno całkowitej i aktywnej formy GSK3 β w śródmózgowiu również we wszystkich badanych frakcjach podkomórkowych. Jest wielce prawdopodobne, że obniżony poziom GSK3 β w prądkowiu związany jest z zaburzeniami transportu aksonalnego ze śródmózgowia do prądkowia. Taki proces może być również odpowiedzialny za zwiększoną akumulację GSK3 β w śródmózgowiu i obserwowany w naszych doświadczeniach wzrost immunoreaktywności tego białka. Z drugiej strony, zwiększenie poziomu białka GSK3 β w śródmózgowiu przez długotrwałe podawanie PQ, może być przyczyną uszkodzenia cytoszkieletu poprzez nadmierną fosforylację białek związanych z mikrotubulami, znanymi jako substraty GSK3 β prowadząc do destabilizacji mikrotubul [Jope i Johnson, 2004]. Jednak, bezpośredniego wpływu PQ na neurony prądkowia nie można wykluczyć. Dodatkowo w grę mogą wchodzić zmiany wywołane procesem starzenia. W badaniach mózgu starczego w porównaniu do mózgu dojrzałego wykazaliśmy wybiórcze obniżenie poziomu GSK3 β i jej formy aktywnej w prądkowiu w porównaniu do mózgu dojrzałego.

Prezentowane w obecnej pracy badania potwierdziły toksyczne działanie PQ na komórkach dopaminergicznym PC12. Stwierdzono, że po 24 godzinach inkubacji w obecności 1mM PQ przeżywało około 50% komórek. W naszych badaniach stwierdziliśmy znaczne obniżenie poziomu immunoreaktywności całkowitej, GSK3 β jak i formy

ufosforylowanej GSK3 β pY216 w komórkach PC12. Spadek aktywnej formy enzymu może być odpowiedzią obronną na zmiany zachodzące w komórce po toksycznym działaniu PQ. Równocześnie związek ten nie wpływał na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β pS9. Wyniki mogą wskazywać, że obniżona przeżywalność komórek w wyniku działania PQ może być spowodowana wzrostem procesów wolnorodnikowych.

Kolejne dane doświadczalne wskazują, że wzrost uwalnianych endogennie peptydów A β powoduje zwiększoną aktywność GSK3 β pS9 w komórkach APPsw, natomiast peptydy A β nie wpływają na poziom immunoreaktywności białka GSK3 β i GSK3 β pY216. Aby podkreślić zależność pomiędzy wzrostem poziomu A β a wzrostem aktywności GSK3 β zbadano poziom immunoreaktywności białka tau na Ser396, które obecnie wiadomo, że jest fosforylowane przez GSK3 β . Stwierdzono, że wraz ze wzrostem aktywności GSK3 β dochodzi do wzrostu poziomu ufosforylowanego białka tau w komórkach APPsw. Zjawiska te mogą powodować zaburzenie funkcji cytoszkieletu komórek APPsw w porównaniu do komórek kontrolnych PC12.

LITERATURA

- Adamczyk A, Kaźmierczak A, Strosznajder JB. Alpha-synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. Relationship to nitric oxide. (2006) *Neurochem Int.* 49(4):407-12.
- Alimohamad H, Rajakumar N, Seah YH, Rushlow W. Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum. (2005) *Biol Psychiatry* 57: 533-542.
- Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. (1999) *FEBS Lett* 453:260-264.
- Atamna H i Boyle K. Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. (2006) *PNAS* 103: 3381-3386.
- Avraham E, Szargel R, Eyal A, Rott R, Engelender S. Glycogen synthase kinase-3b modulates synphilin1 ubiquitylation and cellular inclusion formation by SIAH; implications for proteasomal function and Lewy body formation. (2005) *J Biol Chem* 280:42877-42886.
- Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues JF, Brochard P. Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly. (2003) *Am J Epidemiol* 157: 409-414.
- Barbeau A, Dallaire L, Buu NT, Poirier J, Rucinska E. Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP and paraquat in *Rana pipiens*. (1985) *Life Sciences* 37(16): 1529-1538.
- Barlow BK, Thiruchelvam MJ, Bennice L, Cory-Slechta DA, Ballatori N, Richfield EK. Increased synaptosomal dopamine content and brain concentration of paraquat produced by selective dithiocarbamates. (2003) *J Neurochem* 85:1075-1086.
- Bartlett RM, Holden JE, Nickles RJ, Murali D, Barbee DL, Barnhart TE, Christian BT, DeJesus OT. Paraquat is excluded by the blood brain barrier in rhesus macaque: an in vivo pet study. (2009) *Brain Res* 1259:74-79.
- Bartoszewska M. Molekularne mechanizmy choroby Alzheimera. (2008) *Postępy Biol. Kom.* Tom 35, 3:333-350.
- Beaulieu JM, Del'Guidice T, Sotnikova TD, Lemasson M, Gainetdinov RR. Beyond cAMP: The regulation of Akt and GSK3 by Dopamine Receptors. (2011) *Front Mol Neurosci* 4:38.
- Beurel E i Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. (2006) *Progress in Neurobiology* 79: 173-189.

Bhat Narayan R i Feinstein Douglas L. NO and Glial. (2006) Cell Biology Antioxidants & Redox Signaling 8(5-6): 869-872.

Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 26;97(20):11074-9.

Blennow K i Zetterberg H. Alzheimer's disease. (2006) Lancet 368: 387-403.

Bolós M, Fernandez S, Torres-Aleman I. Oral administration of a GSK3 inhibitor increases brain insulin-like growth factor I levels. (2010) J Biol Chem 285: 17693-17700.

Bosboom JLW, Stoffers D, Wolters ECH. Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. (2004) J Neural Transm 111:1303– 1315.

Braak H i Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. (1991) Acta Neuropathol 82:239-259.

Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. (2004) Cell Tissue Res 318(1):121-34.

Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. (1999) Brain Res 823(1-2):1-10.

Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. (2001) Curr Opin Hematol 8(3):131-6.

Cai Z, Zhao Y, Zhao B. Roles of Glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's. (2012) Curr Alzheimer Res 2012 Jan 23. Praca w druku.

Cannon JR, Greenamyre JT. Neurotoxic in vivo models of Parkinson's disease recent advances. (2010) Prog Brain Res 184:17-33.

Carter RJ, Morton AJ, Dunnett SB. Motor co-ordination and balance in rodents. (2001) Current Protocols in Neuroscience. Ed. Wiley, Chichester. 8.12.1–8.12.14.

Castano Z, Gordon-Weeks PR, Kypta RM. The neuron-specific isoform of glycogen synthase kinase-3beta is required for axon growth.(2010) J Neurochem 113: 117-130.

Centers for Disease Control and Prevention, National Vital Statistics Report, Deaths: Preliminary data for 2009. 59(4), March 16, 2011, <http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr59/nvsr59_04.pdf>.

Chalimoniuk M, Stolecka A, Cakała M, Hauptmann S, Schulz K, Lipka U, Leuner K, Eckert A, Muller WE, Strosznajder JB. Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A2 level and

arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells. (2007) *Acta Biochim Pol* 54(3):611-23.

Chen G, Huang LD, Jiang YM, Manji HK. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. (1999) *J Neurochem* 72: 1327-1330.

Chen G, Bower KA, Ma C, Fang S, Thiele C, Luo J. Glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) mediates 6-hydroxydopamine-induced neuronal death. (2004) *FASEB Journal* 1-26.

Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, et al. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. (2011) *Nature* 469: 491-497.

Chin YR i Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. (2009) *Cell Signal* 21: 470–476.

Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton S.A. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. (2009) *Science* 324(5923):102-5.

Caccamo A, Oddo S, Tran LX, LaFerla FM. Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. (2007) *Am J Pathol* 170: 1669-1675.

Cohen P. The fifteenth Colworth Medal Lecture. The hormonal control of glycogen metabolism in mammalian muscle by multivalent phosphorylation. (1979) *Biochem Soc Trans* 7: 459-480.

Cohen P i Goedert M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. (2004) *Nat Rev Drug Discov* 3(6):479-87.

Cole A, Frame S, Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3(GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. (2004) *Biochem J* 377(Pt 1): 249–255.

Consilvio C, Vincent AM, Feldman EL. Neuroinflammation, COX-2, and ALS – a dual role? (2004) *Exp Neurol* 187: 1-10.

Corasaniti MT, Nistico` G. Determination of paraquat in rat brain by high-performance liquid chromatography.(1993) *J Chromatogr* 643:419–425.

Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Barlow BK, Richfield EK. Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. *Environ Health Perspect* (2005) 113(9):1263-70.

Costello S, Cockburn M, Brownstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. (2009) *Am J Epidemiol* 169:919-926.

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

Czapski GA, Gąssowska M, Songin M, Radecka UD, Strosznajder JB. Alterations of cyclin dependent kinase 5 expression and phosphorylation in amyloid precursor protein (APP)-transfected PC12 cells.(2011) *FEBS Lett* 585(8):1243-8.

Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Pattern of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. (1999) *Brain* 122:1437–1448.

De Gori N, Froio F, Strongoli MC, De Francesco A, Calo M, Nistico G. Behavioural and electrocortical changes induced by paraquat after injection in specific areas of the brain of the rat. (1988) *Neuropharmacology* 27(2):201-7.

De Sarno P, Li X, Jope RS. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. (2002) *Neuropharmacology* 43: 1158-1164.

Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19):11211-6.

Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. Erk associates with and primes GSK- 3 beta for its inactivation resulting in up regulation of beta-catenin. (2005) *Mol Cell* 19: 159–170.

Dinis-Oliveira RJ, Sousa C, Remiao F, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, Carvalho F. Full survival of paraquat-exposed rats after treatment with sodium salicylate. (2007) *Free Radic Biol Med* 42(7):1017-28.

Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. (2000) *J Biol Chem* 275: 11750–11757.

Doble BW i Woodgett JR. GSK3: tricks of the trade for a multitasking kinase. (2003) *J Cell Scien* 116: 1175–1186.

Duka T, Duka V, Joyce JN, Sidhu A. alpha-Synuclein contributes to GSK-3beta catalyzed Tau phosphorylation in Parkinson's disease models. (2009) *FASEB J* 23: 2820–2830.

Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. (2008) *Biochem J* 415: 333–344.

Dymecki J, Lechowicz W, Bertrand E, Szpak GM. Changes in dopaminergic neurons of the mesocorticolimbic system in Parkinson's disease. (1996) *Folia Neuropathol* 43:102–106.

Ebadi M i Sharma SK. Peroxynitrite and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson's disease. (2003) *Antioxid Redox Signal*. 5: 319-335.

Eckert A, Steiner B, Marques C, Leutz S, Romig H, Haass C, Muller WE. Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. (2001) *J Neurosci Res* 64: 183-192.

Ehringer H, Hornykiewicz O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. (1960) *Klin Wochenschrift* 38:1236–1239

Elverfors A i Nissbrandt H. Effects of d-amphetamine on dopaminergic neurotransmission; a comparison between the substantia nigra and the striatum. (1992) *Neuropharmacology* 31(7):661-70.

Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. (2004) *Nat Genet* 36: 131-137.

Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. (1980) *Eur J Biochem* 107: 519-527.

Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. (2006) *J Neurochem* 99: 1445-1455.

Ennaceur A i Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. (1988) *Behavioral data. Behav Brain Res* 31: 47-59

Frame S i Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. (2001) *Biochem J* 359: 1-16.

Franca-Koh J, Yeo M, Fraser E, Young N, Dale TC. The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. (2002) *Journal of Biological Chemistry* 277: 43844–43848.

Ferris CP, Prince M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. (2005) *Lancet* 366:2112-2117

Forno LS Neuropathology of Parkinson's disease. (1996) *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 55 (3): 259–272.

Fredriksson A, Fredriksson M, Eriksson P. Neonatal exposure to paraquat or MPTP induces permanent changes in striatum dopamine and behavior in adult mice. (1993) *Toxicol Appl Pharmacol* 122(2):258-64.

Fujimuro M i Hayward SD. The latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus manipulates the activity of glycogen synthase kinase-3 β . (2003) *J Virology* 7: 8019–8030.

Gardai SJ, Hildeman DA, Frankel SK, Whitlock BB, Frasch SC, Borregaard N, Marrack P, Bratton DL, Henson PM. Phosphorylation of Bax Ser184 by Akt regulates its activity and apoptosis of neutrophils. (2004) *J Biol Chem* 279: 21085–21095.

Gao X, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. (2011) *Neurology* 76: 863-869.

Gélinas S, Bureau G, Valastro B, Massicotte G, Cicchetti F, Chiasson K, Gagne B, Blanchet J, Martinoli MG. Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress. (2004) *Neurotox Res.*6(2):141-8.

Girigoswami K, Ku SH, Ryu J, Park CB. A synthetic amyloid lawn system for high-throughput analysis of amyloid toxicity and drug screening. (2008) *Biomaterials* 29: 2813–2819.

Gómez-Sintes R, Hernández F, Bortolozzi A, Artigas F, Avila J, Zaratin P, Gotteland JP, Lucas JJ. Neuronal apoptosis and reversible motor deficit in dominantnegative GSK-3 conditional transgenic mice. (2007) *EMBO J* 26: 2743-2754.

Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW. Protein nitration in Parkinson's disease. (1998) *J Neuropathol Exp Neurol* 57(4):338-42.

Gos M, Miłoszewska J, Przybyszewska M. Rola przejścia epitelialno-mezenchymalnego w progresji nowotworów. (2009) *Postepy Biochem* 55: 121–128.

Gralle M i Ferreira ST. Structure and functions of the human amyloid precursor protein:the whole is more than the sum of its parts. (2007) *Prog Neurobiol* 82:11-32

Greenspan EJ, Madigan JP, Boardman LA, Rosenberg DW. Ibuprofen inhibits activation of nuclear {beta}-catenin in human colon adenomas and induces the phosphorylation of GSK-3{beta}. (2011) *Cancer Prev Res (Phila)* 4: 161-171.

Grimes CA i Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. (2001) *J Neurochem.* 78(6):1219-32

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. (2002) *Science* 297(5584):1186-90.

Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao H, Swenson L, Jain J. Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism. (2001) *Nature Structural Biology* 8: 7593-596.

Hanks SK i Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. (1995) *FASEB J.* 9 576-596.

Hara S, Endo T, Kuriwa F, Kano S. NADPH-dependent reaction of paraquat in mouse brain microsomes. (1990) *Toxicol Lett* 54(2-3):271-7.

Hara S, Endo T, Kuriwa F, Kano S. Mechanism of paraquat-stimulated lipid peroxidation in mouse brain and pulmonary microsomes. (1991a) *J Pharm Pharmacol* 43(10):731-3.

Hara S, Endo T, Kuriwa F, Kano S. Interaction between dual NADPH-dependent reactions of paraquat in mouse brain microsomes. (1991b) *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 73(1):119-22.

Hara S, Endo T, Kuriwa F, Kano S. Effects of MPTP, MPP+, and paraquat on NADPH-dependent lipid peroxidation in mouse brain and lung microsomes. (1991c) *Biochem Med Metab Biol* 45(3):292-7.

Hara S, Endo T, Kuriwa F, Kano S. Different effects of paraquat on microsomal lipid peroxidation in mouse brain, lung and liver. (1991d) *Pharmacol Toxicol* 68(4):260-5.

Hayden KM, Norton MC, Darcey D, Ostbye T, Zandi PP, Breitner JC, Welsh-Bohmer KA. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. (2010) *Neurology* 74: 1524–1530.

Hertzman C, Wiens M, Bowering D, Snow B, Calne D. Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. (1990) *Am J Ind Med* 17(3):349-55.

Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2 - 10 years later. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* 300: 367-375.

Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. (1988) *Nature* 334:345–348.

Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF- κ B activation. (2000) *Nature* 406: 86-90.

Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. (2008) *J Neurochem* 104: 1433-1439.

Hornykiewicz O, Kish SJ. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. (1986) *Adv Neurol* 45:19–34.

Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β in brain. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 2; 93(7): 2719-23.

Hu M, Waring JF, Gopalakrishnan M, Li J. Role of GSK-3 β activation and α 7 nAChRs in A β (1-42)-induced tau phosphorylation in PC12 cells. (2008) *J Neurochem* 106(3):1371-7.

Hu S, Begum AN, Jones MR, Oh MS, Beech WK, Beech BH, Yang F, Chen P, Ubeda OJ, Kim PC, Davies P, Ma Q, Cole GM, Frautschy SA. GSK3 inhibitors show benefits in an Alzheimer's disease (AD) model of neurodegeneration but adverse effects in control animals. (2009) *Neurobiol Dis* 33: 193-206.

Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in human *in vitro* differentiated macrophages. (2000) *Biochem Pharmacol* 59: 187–194.

Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR. Modulation of the glycogen synthase kinase-3family by tyrosine phosphorylation. (1993)*EMBO J* 12: 803–808.

Infante J, García-Gorostiaga I, Sánchez-Juan P, Sierra M, Martín-Gurpegui JL, Terrazas J, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Berciano J, Combarros O. Synergistic effect of two oxidative stress-related genes (heme oxygenase-1 and GSK3 β) on the risk of Parkinson's disease. (2010)*Eur J Neurol* 17: 760-762.

Jain AK I Jaiswal A. GSK-3beta Acts Upstream of Kinase in Regulation of Nuclear Export and Degradation of NF-E2 Related Factor 2. (2007) *J Biol Chem* 282(22):16502-16510.

Jope RS i Bijur GN. Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3beta and cell survival. (2002) *Mol Psychiatry* 7 Suppl 1: S35-45.

Jope RS I Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. (2004) *Trends Biochem Sci* 29:95-102.

Jope RS i Roh M. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions. (2006) *Curr Drug Targets* 7(11): 1421–1434.

Jope RS, Yuskaitis ChJ, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. (2007) *Neurochem Res* 32(4-5): 577-595.

Kaidanovich-Beilin O i Woodgett JR. GSK: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. (2011) *Front Mol Neurosci* 4:40.

Kang D, Miyako K, Kuribayashi F, Hasegawa E, Mitsumoto A, Nagano T, Takeshige K. Changes of energy metabolism induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-related compounds in rat pheochromocytoma PC12 cells. (1997) *Arch Biochem Biophys* 337(1):75-80.

Kang MJ, Gil SJ, Koh HC. Paraquat induces alteration of the dopamine catabolic pathways and glutathione levels in the substantia nigra of mice. (2009) *Toxicol Lett* 188:148-152.

Kazmierczak A, Strosznajder JB, Adamczyk A. alpha-Synuclein enhances secretion and toxicity of amyloid beta peptides in PC12 cells. (2008) *Neurochem Int* 53(6-8):263-9.

Kilbourn MR, Kuszpit K, Sherman P. Rapid and differential losses of in vivo dopamine transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT2) radioligand binding in MPTP-treated mice. (2000) *Synapse* 35(4):250-5.

Kim L, Liu J, Kimmel AR. The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. (1999) *Cell* 99: 399–408.

Kim JW, Lee JE, Kim MJ, Cho EG, Cho SG, Choi EJ. Glycogen synthase kinase 3 beta is a natural activator of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1 (MEKK1). (2003) *J Biol Chem* 278(16):13995-4001.

Koh SH, Baek W, Kim SH. Brief review of the role of glycogen synthase kinase-3 β in amyotrophic lateral sclerosis. (2011) *Neurol Res Int* 2011: 205761.

Kończakowska E. Cyklooksygenazy. I. Rola w odczynie zapalnym. (2002) *Postępy Biologii Komórki* 29: 533-554.

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. (1992) *Chem Res Toxicol* 5(6):834-42.

Kozikowski A, Gaisina I, Petukhov P, Sridhar J, King L, Blond S, Duka T, Rusnak M, Sidhu A. Highly potent and specific GSK-3 inhibitors that block Tau phosphorylation and decrease alpha-synuclein protein expression in a cellular model of Parkinson's disease.(2006) *Chem Med Chem* 1: 256–266.

Kozlovsky N, Nadri C, Agam G. Low GSK-3beta in schizophrenia as a consequence of neurodevelopmental insult. (2005) *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 1-11.

Kuter K, Smiałowska M, Wierońska J, Zieba B, Wardas J, Pietraszek M, Nowak P, Biedka I, Roczniak W, Konieczny J, Wolfarth S, Ossowska K. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons In rats. (2007) *Brain Res* 1155:196-207.

Kuter K, Nowak P, Gołembiowska K, Ossowska K. Increased Reactive Oxygen Species Production in the Brain After Repeated Low-Dose Pesticide Paraquat Exposure in Rats. A Comparison with Peripheral Tissues. (2010). *Neurochem Res* 35:1121-1130.

Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM, Schofield PR. GSK3 beta polymorphism alter transcription and splicing Parkinson's disease. (2005) *Ann Neurol* 58:826-839.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970)*Nature* 227:680-685.

Lam PY, Ko KM. (-)Schisandrin B ameliorates paraquat-induced oxidative stress by suppressing glutathione depletion and enhancing glutathione recovery in differentiated PC12 cells. (2011) *Biofactors*. 37(1):51-7

Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. (2005) *Environ Health Perspect* 113(9):1230-3.

Lee KY, Koh SA, Noh MY, Park KW, Lee YJ, Kim SH. Glycogen synthase kinase 3beta activity plays very important roles in determining the fate of oxidative stress-inflicted neuronal cells. (2007) *Brain Res* 1129:89-99.

Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP. Increased level of active GSK- 3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. (2007) *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 43-55.

Lesort M, Jope RS, Johnson GV. Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3 beta and Fyn tyrosine kinase. (1999) *J. Neurochem.* 72: 576–584.

Li WD, Zhao YZ, Chou IN. Paraquat-induced cytoskeletal injury in cultured. (1987) *Toxicol Appl Pharmacol* 91:96-106.

Li X, Liu M, Cai Z, Wang G, Li X. Regulation of glycogen synthase kinase-3 during bipolar mania treatment. (2010) *Bipolar Disord* 12: 741-752.

Liang MH i Chuang DM. Differential roles of glycogen synthase kinase-3 isoforms in the regulation of transcriptional activation. (2006) *Journal of Biological Chemistry* 281: 30479–30484.

Liang MH i Chuang DM. Regulation and Function of Glycogen Synthase Kinase-3 Isoforms in Neuronal Survival. (2007) *J. Biol. Chem.* 282: 3904-3917.

Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. Glycogen synthase kinase-3b phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. (2004) *J Neurosci* 24: 9993–10002.

Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. (1997) *Neurology* 48(6):1583-8.

Logroscino G. The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence? (2005) *Environ Health Perspect* 113(9):1234-8.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with Folin fenol reagent. (1951) *J Biol Chem* 193:265-269.

Lu Y, Muller M, Smith D, Dutta B, Komurov K, Iadevaia S, Ruths D, Tseng JT, Yu S, Yu Q, Nakhleh L, Balazsi G, Donnelly J, Schurdak M, Morgan-Lappe S, Fesik S, Ram PT, Mills GB. Kinome siRNA-phosphoproteomic screen identifies networks regulating AKT signaling. (2011) *Oncogene* 30: 4567–4577.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachowa L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. (1999) *Am J Pathol* 155:853-862.

Maguire-Zeiss KA, Federoff HJ. Convergent pathobiologic model of Parkinson's disease. (2003) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 991: 152-166. Mandel JS, Adami HO, Cole P. Paraquat and Parkinson's disease: An overview of the epidemiology and a review of two recent studies.(2011) *Regul Toxicol Pharmacol* Praca w druku.

Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. (1992) *J Neurosci* 12: 379-389.

Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. (2006) *Mol Cell* 21: 749–760.

McAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, Nagy A, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase 3alpha – specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. (2007) *Cell Metab* 6: 329-337.

McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. (2002) *Neurobiol Dis* 10(2):119-27.

Meares GP, Jope RS. Resolution of the Nuclear Localization Mechanism of Glycogen Synthase Kinase-3:Functional effects in apoptosis. (2007) *J Biol Chem* 282(23): 16989-17001.

Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, SM Paul, Ungerer A. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12683-12688.

Miller AC, Stewart M, Brooks K, Shi L, Page N. Depleted uranium-catalyzed oxidative DNA damage: absence of significant alpha particle decay. (2002) *J. Inorg. Biochem.* 91 246–252.

Milzani A, Dalledonne I, Vailati G, Colombo R. Paraquat induces actin assembly in depolymerizing conditions. (1997) *FASEB J* 11:261-270.

Miranda-Contreras L, Davila-Ovalles R, Benitez-Diaz P, Pena-Contreras Z, Palacios-Pru E. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. (2005) *Brain Res Dev Brain Res.* 160(1):19-27.

Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N, Brady ST. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. (2002) *EMBO J.*21(3):281-93.

Morfini G, Szebenyi G, Brown H. A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. (2004) *EMBO J*. 23: 2235-2245.

Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. (2002) *J Neurochem* 81: 1073-1083.

Murray IVJ, Liu L, Komatsu H, Uryo K, Xiao G, Lawson JA, Axelsen PH. Membrane mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid beta proteins. (2007) *Biol Chem* 282: 9335-9345.

Nakamura T, Lipton SA. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. (2009) *Apoptosis*. 14(4):455-68.

Nakamura T, Lipton SA. Redox regulation of mitochondrial fission, protein misfolding, synaptic damage and neuronal cell death:potential implications for Alzheimer's and Parkinson's diseases. (2010) *Apoptosis* 15(11):1354-63.

Nakashima H, Ishihara T, Suguimoto P, Yokota O, Oshima E, Kugo A, Terada S, Hamamura T, Trojanowski JQ, Lee VM, Kuroda S. Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. (2005) *Acta Neuropathol* 110: 547-556.

Newman M, Musgrave IF, Lardelli M. Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. (2007) *Biochim Biophys Acta* 1772:285-297.

O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. (1993) *FEBS Lett* 330: 156–160.

Orellana DI, Quintanilla RA, Maccioni RB. Neuroprotective effect of TNF alpha against the beta-amyloid neurotoxicity mediated by CDK5 kinase. (2007) *Biochim Biophys Acta* 1773(2):254-63

Ossowska K, Wardas J, Kuter K, Nowak P, Dąbrowska J, Bortel A, Labus L, Kwieciński A, Krygowska-Wajs A, Wolfarth S. Influence of paraquat on dopaminergic transporter in the rat brain. (2005a) *Pharmacol Rep* 57: 330-335.

Ossowska K, Wardas J, Śmiałowska M, Kuter K, Lenda T, Wierońska JM, Zięba B, Nowak P, Dąbrowska J, Bortel A, Kwieciński A, Wolfarth S. A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages. (2005b) *Eur J Neurosci* 22:1294-1304.

Ossowska K, Śmiałowska M, Kuter K, Wierońska J, Zięba B, Wardas J, Nowak P, Dąbrowska J, Bortel A, Biedka I, Schulze G, Rommelspacher H. Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: implications for Parkinson's disease. (2006) *Neuroscience* 141:2155-2165.

Pagani L i Eckert A. Amyloid beta interaction with mitochondria. (2011) *Int J Alzheimers Dis* 15:2011:925050.

Pajak B, Songin M, Strosznajder JB, Gajkowska B. Alzheimer's disease genetic mutation evokes ultrastructural alterations: correlation to an intracellular Abeta deposition and the level of GSK3beta-P(Y216) phosphorylated form.(2009) *NeuroToxicology* 30(4):581-8.

Pandey GN, Dwivedi Y, Rizavi HS, Teppen T, Gaszner GL, Roberts RC, Conley RR. GSK3beta gene expression in human postmortem brain: regional distribution, effects of age and suicide. (2009) *Neurochem. Res* 34:274-285.

Pei JJ, Tanaka T, Tung YC, Braak E, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. (1997) *J Neuropathol Exp Neurol* 56:70-78.

Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, et al. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. (2007) *Neuron* 53: 703-717.

Petit-Paitel A, Brau F, Cazareth J, Chabry J. Involvement of cytosolic and mitochondrial GSK 3b in mitochondrial dysfunction and neuronal cell death of MPTP/MPP⁺-treated neurons. (2009) *PLoS ONE* 4:e5491, 1–12.

Perez-Costas E., Gandy JC., Melendez-Ferro M., Roberts RC and Bijur GN. Light and electron microscopy study of glycogen synthase kinase-3 beta in the mouse brain. (2010) *PLoS One*. 5(1):e8911.

Pettman B I Henderson CE. Neuronal Cell death. (1998) *Neuron* 20: 633-647.

Piga R, Saito Y, Yoshida Y, Niki E. Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. (2007)*Neurotoxicology* 28: 167-75.

Prasad K, Winnik B, Thiruchelvam MJ, Buckley B, Mirochnitchenko O, Richfield EK. Prolonged toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat in mouse brain. (2007) *Environ Health Perspect* 115:1448–1453.

Prasad K, Tarasewicz E, Mathew J, Ohman Strickland PA, Buckley B, Richardson JR, Richfield EK. Toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat accumulation in mouse brain. (2009) *Exp Neurol* 215:358–367.

Purisai MG, McCormack AL, Cumine S, Li J, Isla MZ, Di Monte DA. Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. (2007) *Neurobiol Dis*. 25(2):392-400.

Qian J, Chenga Y, Yang Y, Mao C, Qin Z, Li K, Liu C. Differential effects of overexpression of wild-type and mutant human α -synuclein on MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. (2008) *Neurosci. Lett.* 435: 142–146.

Qiao M., Sheng S., Pardee A.B.: Metastasis and AKT activation. (2008) *Cell Cycle* 7: 2991–2996.

Ragano-Caracciolo M, Berlin WK, Miller MW, Hanover J.A. Nuclear glycogen and glycogen synthase kinase 3. (1998) *Biochem Biophys Res Commun.* 249(2): 422-427.

Reith AD. Protein Kinase Protocols - Methods in Molecular Biology 124. (2001) Humana Press Inc, Totowa, New Jersey.

Ristimaki A, Garfinkel S, Wessendorf J, Maciag T, Hla T. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 α . Evidence for post-transcriptional regulation. (1994) *J Biol Chem* 269: 11769–11775.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. (2000) *J Biol Chem* 275: 3107–3113.

Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. (1993) *Arch Biochem Biophys* 302: 348-355.

Sanchez-Pernaute R, Ferree A, Cooper O, Yu M, Brownell A-L, Isacson O. Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. (2004) *J Neuroinflammation* 1: 6-15.

Sato S, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui DH, Murayama M, Miyasaka T, Planel E, Tanemura K, Sun X, Mashikawa T, Yoshioka K, Ishiguro K, Takashima A. Abberant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. (2002) *J Biol Chem* 277:42060-42065.

Schmedtje JF Jr, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappa B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. (1997) *J Biol Chem* 272: 601–608.

Schmuck G i Schluter G. An in vitro model for toxicological investigations of environmental neurotoxins in primary neuronal cell cultures. (1996) *Toxicol Ind Health* 12:683-696.

Schmuck G, Ahr HJ, Schluter G. Rat cortical neurons cultures: an in vitro model for differentiating mechanisms of chemically induced neurotoxicity. (2000) *In Vitro Mol Toxicol* 13:37-50.

Schmuck G i Kahl R. The use of Fluro-Jade in primary neuronal cell cultures. (2009) *Arch Toxicol* 83:397-403.

Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. (1983) *Brain Res* 275:321–328.

Shepherd KR, Lee E, Schumed L, Jiao Y, Ali SF, Oriaku ET, Lamango NS, Soliman KFA, Charlton CG. The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice. (2006) *Pharmacol Biochem Behav* 83: 349-359.

Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zloković BV. Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. (2000) *J Clin Invest* 106(12):1489-99.

Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, Suno M, Ogawa K, Hayase N, Kimura K, Shiono H. Carrier-mediated processes in blood-brain penetration and neuronal uptake of paraquat. (2001) *Brain Res* 906: 135-142.

Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. (2003) *Brain Res* 976(2):243-52.

Sinha S, Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96(20):11049-53.

Singer TP, Castagnoli JN, Ramsay RR, Trevor AJ. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. (1987) *Neurochem* 4:91-8

Songin M, Strosznajder JB, Fitał M, Kuter K., Kolasiewicz W, Nowak P, Ossowska K. Glycogen synthase kinase 3 β and its phosphorylated form (Y216) in the paraquat-induced model of parkinsonism. (2011a) *Neurotox Res* 19(1):162-71.

Songin M, Ossowska K, Kuter K, Strosznajder JB. Alteration of GSK-3 β in the hippocampus and other brain structures after chronic paraquat administration in rats. (2011b) *Folia Neuropathol* 49(4):319-27.

Soutar MP, Kim WY, Williamson R. Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. (2010) *J Neurochem* 115: 974-983.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. (1997) *Nature* 388(6645): 839–840.

Stambolic V i Woodgett JR. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. (1994) *Biochem J* 303:701-704.

Strosznajder JB, Strosznajder RP. Kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, kinaza Akt oraz kinaza 3-syntazy glikogenu w procesach przeżycia I w chorobie Alzheimerera. (2008) *Mózg a stress*. 25-36.

Su Y, Ryder J, Li B, Wu X, Fox N, Solenberg P, Brune K, Paul S, Zhou Y, Liu F, Ni B. Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. (2004) *Biochemistry* 43: 6899-6908.

Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, Lukiyanchuk V, Jin J, Harper JW, Ericsson J. Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCFFbw7. (2005) *Cell Metab* 1: 379–391.

Sutherland C. What are the bona fide GSK3 substrates. (2011) *Int J Alzheimers Dis* 505607.

Śmiałowska M, Wierońska JM, Zięba B, Kuter K, Lenda T, Ossowska K. P3 the effect of paraquat on alpha-synuclein expression in the substantia nigra of the rat brain. (2006) *Behav Pharm* 17:542.

Takahashi M, Tomizawa K, Kato R, Sato K, Uchida T, Fujita SC, Imahori K. Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. (1994) *J Neurochem* 63: 245-255.

Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K. Distribution of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta, phosphatases 2A and 2B, and phosphorylated tau in the developing rat brain. (2000) *Brain Res*. 857(1-2): 193-206.

Takashima A, Yamaguchi H, Noguchi K, et al. Amyloid beta peptide induces cytoplasmic accumulation of amyloid protein precursor via tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat hippocampal neurons. (1995) *Neurosci Lett* 198: 83-86.

Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(16):9637-41.

Takashima A. GSK3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. (2006) *Journal of Alzheimer's Disease* 9: 309-317.

Tamura M, Sebastian S, Yang S, Gurates B, Fang Z, Bulun SE. Interleukin-1 β elevates cyclooxygenase-2 protein level and enzyme activity via increasing its mRNA stability in human endometrial stromal cells: an effect mediated by extracellularly regulated kinases 1 and 2. (2002) *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3263–3273.

Tang Z, Arjunan P, Lee C, Li Y, Kumar A, Hou X, Wang B, Wardega P, Zhang F, Dong L, Zhang Y, Zhang SZ, Ding H, Fariss RN, Becker KG, Lennartsson J, Nagai N, Cao Y, Li X. Survival effect of PDGF-CC rescues neurons from apoptosis in both brain and retina by regulating GSK3 phosphorylation. (2010) *J Exp Med* 207: 867-880.

Tawara T, Fukushima T, Hojo N, Isobe A, Shiwaku K, Setogawa T, Yamane Y. Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. (1996) *Arch Toxicol* 70(9):585-9.

Terwel D, Muyliaert D, Dewachter I, et al. Amyloid activates GSK-3beta to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. (2008) *Am J Pathol* 172: 786-798.

Thathiah A i De Strooper B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. (2011) *Nature Reviews Neuroscience* 12:73-87.

Thiruchelvam M, Richfield EK, Goodman BM, Baggs RB, Cory-Slechta DA. Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. (2002) *Neurotoxicology* (4-5):621-33.

Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield ER, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, Cory-Slechta DA. Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype. (2003) *Eur J Neurosci* 18:589-600.

Thiruchelvam M, Prokopenko O, Cory-Slechta DA, Richfield EK, Buckley B, Mirochnitchenko O. Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase protects against the paraquat + maneb-induced Parkinson disease phenotype. (2005) *J Biol Chem.* 280(23):22530-9.

Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, and Rincon M. Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 beta inactivation. (2008) *Science* 320: 667-670.

Townsend KP, Pratico` D. Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. (2005) *FASEB J* 19: 1592-1601.

Tyagarajan SK, Ghosh H, Yévenes GE, et al. Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3 beta dependent phosphorylation of gephyrin. (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 379-384.

Uversky VN. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. (2004) *Cell Tissue Res* 318(1):225-41.

Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. (1997) *Cell* 91(5):627-37.

Vijitruth R, Liu M, Choi DY, Nguyen XV, Hunter RL, Bing G Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. (2006) *J Neuroinflammation* 3: 6-17.

Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. (2000) *J Biol Chem* 275: 6259–6266.

Wang QM, Fiol Cj, DePaoli-Roach AA, Roach PJ. Glycogen synthase kinase-3b is dual specificity kinase differentially regulated by tyrosine and serine/threonine phosphorylation. (1994) *J Biol Chem* 269:14566-14574.

Wang W, Yang Y, Ying C, Li W, Ruan H, Zhu X, You Y, Han Y, Chen R, Wang Y, Li M. Inhibition of glycogen synthase kinase-3b protects dopaminergic neurons from MPTP toxicity.(2007) *Neuropharmacology* 52:1678–1684.

Wang X, Liu XT, Dunn R, Ohl DA, Smith GD. Glycogen synthase kinase-3regulates mouse oocyte homologue segregation. (2003) *Mol. Reprod. Dev*64: 96–105.

Wei W, Jin J, Schlisio S, Harper JW, Kaelin WG Jr. The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. (2005) *Cancer Cell* 8: 25–33.

Weiss B, Amler S, Amler RW. Pesticides. (2004) *Pediatrics*. 113(4 Suppl):1030-6.

Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, Clurman BE, Roberts JM. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. (2003) *Mol Cell* 12: 381–392.

Wesseling C, van Wendel de Joode B, Ruepert C, Leon C, Monge P, Hermosillo H, Partanen TJ. Paraquat in developing countries. (2001) *Int J Occup Environ Health* 7(4):275-86.

Widdowson PS, Farnworth MJ, Upton R, Simpson MG. No changes in behaviour, nigro-striatal system neurochemistry or neuronal cell death following toxic multiple oral paraquat administration to rats. (1996a) *Hum Exp Toxicol*. 15(7):583-91.

Widdowson PS, Farnworth MJ, Simpson MG, Lock EA. Influence of age on the passage of paraquat through the blood-brain barrier in rats: a distribution and pathological examination. (1996b) *Hum Exp Toxicol*.15(3):231-6.

Wills J, Jones J, Haggerty T, Duka V, Joyce JN, Sidhu A. Elevated tauopathy and alpha-synuclein pathology in postmortem Parkinson's disease brains with and without dementia. (2010) *Experimental Neurology* 225: 210–218.

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Tricholopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. (2011) *Eur. J. Epidemiol*. 26 (Supp 1), S1–S58.

Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. (1990) *EMBOJ*. 9(8): 2431-2438.

- Woodgett JR. Regulation and function of the glycogen synthase kinase 3 subfamily. (1994) *Semin Cancer Biol.* 5:269-275.
- Yan SD, Zhu H, ZhunA, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M. Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. (2000) *Nat. Med* 6:643-651.
- Yang ES, Nowsheen S, Wang T, et al. Glycogen synthase kinase 3{beta} inhibition enhances repair of DNA doublestrand breaks in irradiated hippocampal neurons. (2011) *Neuro Oncol* 13: 459-470.
- Yang F, Bleich D. Transcriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Gene in Pancreatic β -Cells.(2004) *JBiolChem* 279: 35403-35411.
- Yang W, Leystra-Lantz C, Strong MJ. Upregulation of GSK3beta expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci). (2008) *Brain Res* 1196: 131-139.
- Yang W i Tiffany-Castiglioni E. Paraquat- induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells:involvement of p53 and mitochondria.(2008) *J Toxicol Environ Health* 71:289-299.
- Yang WL, Sun AY. Paraquat-induced cell death in PC12 cells. (1998) *Neurochem Res.*23(11):1387-94.
- Yao HB, Shaw PC, Wong CC, Wan DC. Expression of glycogen synthase kinase 3-isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. (2002) *J Chem Neuroanat* 23: 291-297.
- Yao R i Cooper. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. (1995) *Science* 267(5206):2003-6
- Yermakova AV, O'Banion MK. Downregulation of neuronal cyclooxygenase-2 expression in end stage Alzheimer's disease. (2001) *Neurobiol Aging* 22: 823-836
- Yue Yong, Hanqing Ding, Zhiqin Fan, Jia Luo, Zun-Ji Ke. Lithium Fails to Protect Dopaminergic Neurons in the 6-OHDA Model of Parkinson's. (2011) *Neurochem Res* 36:367-374.
- Zloković BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, Frangione B, Ghiso J. Glycoprotein 330/megalin:probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood brain and blood-cerebrospinal fluid barriers.(1996) *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(9):4229-4234.