



Doc. dr hab. TERESA ZALEWSKA
Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Zakład Neurochemii
Pracownia Neuropatologii Molekularnej
ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa
e-mail: terezal@cmdik.pan.pl



MODULACJA PROCESÓW PROTEOLITYCZNYCH JAKO CEL ODDZIAŁYWAŃ NEUROPROTEKCYJNYCH

TERESA ZALEWSKA

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Wprowadzenie

Enzymy proteolityczne oprócz funkcji katabolizującej, odpowiedzialnej razem z procesami syntezy za wewnątrzkomórkowe poziomy białka, posiadają zdolność potranslacyjnej modyfikacji – powszechnego mechanizmu regulacji procesów fizjologicznych w komórce. W wyniku ograniczonej proteolizy nawet jednego tylko wiązania peptydowego, może zostać usunięty istotny funkcjonalnie peptyd lub może nastąpić zmiana stanu konformacji białka, a w konsekwencji zmiana aktywności bądź funkcji biologicznej. Równocześnie białko to może zostać wprowadzone na drogę degradacji poprzez zwiększenie wrażliwości na inne proteazy komórkowe. Kontrolowana degradacja białek jest procesem zaangażowanym w regulację wielu istotnych procesów komórkowych, w tym cyklu komórkowego, różnicowania, dystrybucji białek oraz programowanej śmierci komórki.

Układy proteolityczne lizosomalne i poza-lizosomalne wybiórczo, precyzyjnie regulują degradację indywidualnych białek w ośrodkowym układzie nerwowym. Proteoliza większości białek komórkowych odbywa się przy udziale proteaz poza-lizosomalnych. Jednym z głównych układów tego rodzaju jest układ wielokatalitycznej, wielofunkcyjnej proteazy (ang. *multicatalytic proteinase complex* – MPC), znany też jako układ proteasomalny. Funkcja proteasomu *in vivo* nie jest jasno określona, natomiast złożony charakter aktywności proteolitycznej jaką prezentuje proteasom *in vitro* sugeruje, że aktywacja tego układu może prowadzić do rozpadu większości wiązań peptydowych w każdym białku [4].

W ostatnich latach notuje się wzrost zainteresowania następstwami ograniczonej proteolizy substratów białkowych, oraz enzymami odpowiedzialnymi za ten proces. Enzymy takie mogą pełnić rolę neuronalnych cząsteczek sygnałowych kontrolujących podstawowe procesy biologiczne. Zdolność cięcia wiązań peptydowych w selektywnych miejscach posiadają dwie klasy enzymów należących do rodziny proteaz cysteinowych, a mianowicie kaspazy i kalpajny [3, 29].

Kaspazy, analogi produktu genu *ced-3*, jednego z tak zwanych genów śmierci jaki został zidentyfikowany w komórkach nicienia (*Caenorhabditis elegans*), zostały odkryte dopiero w ostatniej dekadzie. Aktywowane w procesie apoptozy prowadzą do śmierci poprzez systematyczną degradację białek kluczowych dla życia komórki.

Aktywność kalpain kontrolowana jest ściśle przez homeostazę wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i wiąże się z procesami błonowej transdukcji sygnałów. Niektórzy badacze zaliczają tę proteazę do wtórnych przekaźników informacji. Mimo, że rola układu kalpainowego, zwłaszcza w wysoko wyspecjalizowanych tkankach, nie jest w pełni określona, to jego znaczenie dla funkcji komórek neuronalnych nie budzi wątpliwości.

Dane ostatnich lat wskazują, że równie ważne dla prawidłowego funkcjonowania komórki są enzymy proteolityczne funkcjonujące w przestrzeni pozakomórkowej. Kluczowa rola fizjologiczna tych proteaz polega na modulacji interakcji pomiędzy komórkami i ich otoczeniem w czasie rozwoju układu nerwowego. Do najlepiej poznanych układów, zaangażowanych w modulację macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix* – ECM), na-

Wykaz stosowanych skrótów

AD	choroba Alzheimerera
ADP	difosforan adenozyiny (5'-adenozynodifosforan)
Akt	kinaza serynowo/treoninowa
AMPA	kwas α -amino-3-hydrokso-5-metylo-4-izoz-ksazolopropionowy
APAF	apoptotic protease-activating factor
APP1	białko prekursorowe amyloidu
ATP	trifosforan adenozyiny (5'adenozynotrifosforan)
ATPaza	adenozynotrifosfataza
Bax	proapoptotyczne białko z rodziny Bcl2
Białka G	białka wiążące GDP i GTP
CDK	kinazy cyklinozależne
DISC	death inducing signaling complex
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
EAE	autoimmunologiczne zapalenie mózgu
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu
FAK	kinaza procesu ogniskowej adhezji
HD	choroba Huntingtona
IEG	geny wczesnej odpowiedzi komórkowej
IKB	inhibitor czynnika transkrypcyjnego κ B
IL	interleukina
LTP	długotrwałe wzmocnienie transmisji synaptycznej
MAP	białko aktywowane przez mitogeny
MAP2	białko związane z mikrotubulami
MAPK	kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny
MEKK	kinaza MEK
MMPs	enzymy z rodziny metaloproteaz
MPC	układ proteosomalny (wielokatalityczna, wielofunkcyjna proteaza)
NCAM	cząsteczka adhezyjna komórki neuronu
NF κ B	prozapalny czynnik transkrypcyjny (czynnik jądrowy κ B)
NMDA	kwas N-metylo-D-asparginowy
NR2A	podjednostki receptora NMDA i NR2B
p-53	onkoproteina – p53
PAI	inhibitor aktywatora plazminogenu
PARP	polimeraza poli[ADP-rybozy]
PD	choroba Parkinsona
PDGF	czynnik wzrostu pochodzenia płytkowego
PI-3K	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PKC	kinaza białkowa C
PKM	kinaza białkowa M, katalityczny fragment PKC
PSD	ziarnistości postsynaptyczne
TIMP	tkankowy inhibitor metaloproteaz
tPA	tkankowy aktywator plazminogenu
uPA	urokinazowy aktywator plazminogenu
ZO-1	białko uczestniczące w tworzeniu połączeń zamykających między komórkami (zonula occludens)

leżą aktywatory plazminogenu (urokinazowy i tkankowy) i metaloproteazy. Degradacja białek macierzy zewnątrzkomórkowej, kontrolowana precyzyjnie przez te proteazy, uczestniczy w procesach proliferacji, migracji i różnicowania komórek. Utrata kontaktu komórek z macierzą w wyniku nadmiernej proteolizy prowadzi do zjawiska typu apoptozy, określanej w tym przypadku terminem *anoikis* [21].

Aktywność układów proteolitycznych w warunkach fizjologicznych podlega ścisłej, wielopoziomowej regulacji – zarówno na etapie syntezy enzymów, aktywacji proenzymów jak i aktywności specyficznych inhibitorów. Zaburzenia tych mechanizmów i wynikająca z tego nadmierna aktywacja lub inhibicja procesu proteolizy towarzyszy licznym stanom patologicznym ośrodkowego układu nerwowego, które prowadzą do śmierci komórek nerwowych. Na tej podstawie podejmowano w ostatnich latach szereg prób stosowania inhibitorów proteaz (kalpain, kaspaz, metaloproteaz), jako związków neuroprotektoryjnych do ingerowanej regulacji aktywności proteolitycznej komórki [10].

Intencją tego opracowania jest próba usystematyzowania aktualnej wiedzy dotyczącej roli proteaz w ostrych i przewlekłych zwyrodnieniach (neurodegeneracjach) układu nerwowego oraz przedstawienie możliwości modulacji aktywności proteolitycznej jako ewentualnej strategii terapeutycznej. Omówienie roli poszczególnych układów proteolitycznych w wybranych chorobach zwyrodnieniowych poprzedzono ogólną charakterystyką enzymów z uwzględnieniem mechanizmów regulacji ich aktywności. Uwzględniając fakt, że najbardziej powszechnym, wspólnym elementem towarzyszącym neurodegeneracji jest udział cytoplazmatycznego sygnału wapniowego w aktywowaniu różnych szlaków sygnałowych i metabolicznych, szczególną uwagę zwrócono na zależne od wapnia kalpains zaangażowane zarówno w przebieg apoptozy, jak i nekrozy komórek nerwowych w patologii układu nerwowego [26].

Charakterystyka enzymów proteolitycznych

Kalpains

Kalpains, obecne we wszystkich badanych komórkach zwierzęcych, są jednymi z ważniejszych proteaz wewnątrzkomórkowych. Scharakteryzowane pierwotnie jako aktywowane wapniem obojętne proteazy cysteinowe, należą do rodziny cytosolowych proteaz tiolowych. Nasza wiedza dotycząca enzymologicznych i biologicznych własności kalpain, odnosi się do najbardziej rozpowszechnionych form konwencjonalnych, to jest μ - i m -kalpains. Izoformy te mają podobną charakterystykę biochemiczną, posiadają te same parametry kinetyczne i specyficzność substratową. Różnią się natomiast

stężeniami jonów wapniowych, wymaganymi dla ich aktywacji w układach *in vitro*: μ -kalpaina wymaga mikromolarnych stężeń wapnia, natomiast m-kalpaina stężeń milimolarnych [7].

Jakkolwiek własności strukturalne i enzymatyczne kalpain są dobrze scharakteryzowane, nadal nie jest wyjaśniona ich funkcja fizjologiczna. Ścisła zależność aktywności katalitycznej od obecności jonów Ca^{2+} sugeruje udział kalpain w licznych, wapniowo-zależnych procesach komórkowych. Aktywacja kalpain prowadzi do nieodwracalnego, proteolitycznego rozpadu białek substratowych. Jak wykazały badania *in vitro*, kalpaina rozszczepiają ograniczoną ilość specyficznych miejsc w białkach natywnych, prowadząc do powstania raczej dużych fragmentów polipeptydowych aniżeli drobnych peptydów czy aminokwasów. Ograniczona proteoliza białek może spowodować destabilizację ich struktury i zwiększyć podatność na działanie innych proteaz, a więc może kontrolować komórkowy poziom tych makrocząsteczek. Na uwagę zasługuje zdolność kalpain do modulacji aktywności i/lub funkcji innych białek. W przypadku niektórych enzymów proces ten prowadzi do powstania aktywnych form, które nie wymagają czynników koniecznych do aktywacji form natywnych.

Kalpaina natywne są proenzymami, które ulegają aktywacji na błonach plazmatycznych w warunkach wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , poprzez ograniczoną autolizę cząsteczki białka enzymatycznego. W wyniku autolizy μ -kalpaina powstaje aktywna forma proteazy o około dziesięciokrotnie wyższym powinowactwie do Ca^{2+} aniżeli forma natywna. Taki aktywny enzym już jest zdolny do natychmiastowej proteolizy białkowych substratów błonowych, lub po uwolnieniu do frakcji cytosolowej – także substratów rozpuszczalnych. Aktywne formy enzymu istnieją przejściowo i ulegają inaktywacji poprzez dalszą autolizę lub wiązanie ze specyficznym inhibitorem – kalpastatyną [7]. Mechanizm ten nie tłumaczy w jaki sposób aktywowana jest m-kalpaina. Opublikowane w ostatnich latach wyniki doświadczeń, prowadzone przy użyciu oczyszczonych enzymów, wskazują na rolę proteolitycznej aktywacji tej izoformy przy udziale μ -kalpaina. Taka kaskada kalpainowa mogłaby koordynować działanie omawianych proteaz w żywych organizmach. Dotychczas jednak nie ma danych potwierdzających, czy proces taki zachodzi rzeczywiście *in vivo*. Wyjaśnienie mechanizmu aktywacji kalpain *in vivo* wymaga dalszych badań.

Proteolityczna aktywność kalpain regulowana jest także przez kalpastatynę. Kalpastatyna jest jedynym znanym, endogennym inhibitorem kalpain, wysoce specyficznym dla obu izoform. Kalpastatyna, działając jak inhibitor kompetycyjny, hamuje w sposób odwracalny nie tylko aktywność proteolityczną, ale także wiązanie kalpain do błon. Wzajem-

ny stosunek ilościowy inhibitora i enzymu jest ważnym czynnikiem regulującym stopień aktywacji proteazy. Wyjaśnienie mechanizmów regulacji aktywności kalpain przez kalpastatynę *in vivo* komplikuje fakt, że sama kalpastatyna jest zarówno substratem kalpainy jak i kaspazy-3. Tak więc translokacja molekuł kalpainy i asocjacja z błonami oraz degradacja kalpastatyny mogą stanowić część kompleksowego mechanizmu, który kontroluje działanie wapniowo-zależnego układu proteolitycznego.

Nasza dotychczasowa wiedza o substratach kalpain pochodzi głównie z badań prowadzonych na kulturach tkankowych lub w ekstraktach komórkowych, w warunkach stymulacji Ca^{2+} -zależnej proteolizy, w obecności oraz przy braku inhibitorów kalpain. Należy pamiętać, że w wielu przypadkach badania wrażliwości białek na wapniowo-zależną proteolizę prowadzono w obecności czystego enzymu, zatem nie wszystkie białka muszą być substratami fizjologicznymi.

O roli kalpain w fizjologii komórki możemy wnioskować na podstawie znajomości funkcji fizjologicznej jej substratów [3, 7]. Przez ograniczoną proteolizę białek cytoszkieletowych kalpaina może wpływać na organizację cytoszkieletu, geometrię błony komórkowej, a więc na kształt komórki i rozmieszczenie organelli. Stwierdzono na przykład, że proteoliza białka szkieletowego – spektryny – towarzyszy szybkim morfologicznym i funkcjonalnym transformacjom w płytkach krwi i limfocytach T.

Jedną z intrygujących własności kalpain jest zdolność do proteolitycznego cięcia niektórych białek enzymatycznych między domeną regulatorową i katalityczną. Efektem takiego działania jest zmiana regulacji aktywności enzymów. Dobrym przykładem może być kinaza białkowa C (PKC). Ograniczona proteoliza PKC przy udziale kalpain prowadzi do powstania autonomicznej formy enzymu, tzw. kinazy białkowej M, nie podlegającej kontroli przez swoiste wtórne przekazywanie informacji.

Liczne dane doświadczalne wskazują, że w wyniku ograniczonej proteolizy dochodzi do potranslacyjnej modyfikacji receptorów. Substratami kalpainy są zarówno cytosolowe receptory steroidowe, jak i błonowe receptory czynników wzrostu – EGF i PDGF (ang. *epidermal growth factor*; *platelet growth factor*) oraz receptory glutaminianergiczne. Wapniowo-zależna proteoliza większości z tych receptorów nie ma jednak większego wpływu na wiązanie ligandów, a tym samym nie są znane funkcjonalne konsekwencje działania kalpainy na te substraty. Stwierdzono natomiast, że modulacja proteolityczna receptora alfa 1-adrenergicznego powoduje utratę zdolności interakcji z białkami G.

Przykładami białek unieczynnianych przez kalpainę zarówno w układzie *in vitro*, jak i *in vivo*, są czynniki transkrypcyjne c-Fos i c-Jun, zaliczane do produktów genów wczesnej odpowiedzi komórko-

wej. Wskazuje to na istotny udział kalpainsy w regulacji procesów transkrypcji.

Podsumowując przytoczone dane można sądzić, że wszechobecne i konstytutywnie ekspresjonowane kalpainsy są włączone w podstawowe i zasadnicze funkcje komórek. Szybko rosnąca lista białek, identyfikowanych jako naturalne substraty kalpainsy, wskazuje na szerokie możliwości regulacyjne dla procesu wapniowo-zależnej proteolizy. Istnieje pełna zgodność, że dzięki specyficznej lokalizacji subkomórkowej, aktywacja kalpainsy ma ścisły związek z napływem jonów wapniowych przez kanały związane z glutaminianergicznymi receptorami typu NMDA. Niektórzy badacze podkreślają również aktywującą rolę jonów wapniowych uwalnianych z zasobów wewnątrzkomórkowych. W zależności od stopnia aktywacji, kalpainsy mogą być włączone zarówno w liczne adaptacyjne odpowiedzi neuronu na stres, jak i w patologiczne procesy prowadzące do neurodegeneracji.

W ośrodkowym układzie nerwowym występują obie konwencjonalne formy kalpainsy, przy czym μ -kalpainsa zlokalizowana jest głównie w neuronach. Wysokie stężenie tej izoformy znaleziono w ciałach komórkowych i dendrytach. Druga z izoform, m-kalpainsa, występuje w dużej ilości w komórkach glejowych i aksonach. Obfitość zarówno kalpainsy, jak i ich strategicznych białek substratowych w przedziałach synaptycznych, może stanowić ważny czynnik wielopoziomowej regulacji procesu przekazywania w neuronach. Rosnąca ilość dowodów wskazuje na udział μ -kalpainsy w indukcji długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (tzw. LTP, ang. *long term potentiation*), molekularnego modelu procesów uczenia się i pamięci. W modelach doświadczalnych indukcji LTP obserwowano zwiększenie Ca^{2+} -zależnej aktywności proteolitycznej, natomiast zastosowanie inhibitorów kalpainsy prowadziło do zahamowania indukcji LTP lub też osłabienia już uzyskanego wzmocnienia impulsów nerwowych w pobudzonej synapsie. Jednym z kluczowych zdarzeń, związanych z indukcją LTP, jest trwałe przemodelowanie błon synaptycznych przypisywane katalizowanej przez kalpainsę proteolizie fodryny (nie-erytroidalnej spektryny) – głównego składnika tej struktury. Istnieją przekonujące dowody na to, że modyfikacja cytoszkieletu występująca w synapsach hipokampa jako część ich funkcjonalnej rekonfiguracji. Modyfikacja synaps poprzez kalpainsę niesie za sobą ekspozycję latentnych receptorów glutaminianergicznych i wzrost wrażliwości zakończeń dendrytów na dalszą stymulację.

Białkiem ulegającym proteolizie kalpainsowej w wyniku aktywności synaptycznej jest także PSD-95, główne białko zagęszczeń postsynaptycznych, włączone w architekturę synaps pobudzają-

cych. Białko PSD-95 związane jest zarówno z domeną C-końcową receptorów NMDA, jak i białkami cytoszkieletowymi oraz z cząsteczkami sygnałowymi. Proteoliza PSD-95, ułatwiona przez obecność kalpainsy w tym samym przedziale neuronu, może modulować transmisję synaptyczną.

Punktem uchwytu zależnej od wapnia proteolizy mogą być również same białka receptorów postsynaptycznych. Wykazana eksperymentalnie zdolność kalpainsy do modyfikacji podjednostek GluR1 i GluR2 glutaminianergicznego receptora typu AMPA, czy podjednostki NR2A receptora NMDA, może wpłynąć hamująco na odbiór sygnałów docierających do neuronu. Nie ma jednoznacznego poglądu, czy zjawisko to należy do fizjologii/plastyczności synapsy, czy też występuje jedynie w stanach patologicznych.

Kolejnym ważnym mechanizmem modyfikacji przekazywania sygnałów z receptorów błonowych jest aktywacja/dezaktywacja białek sygnałowych przy udziale kalpainsy. W przypadku kinazy białkowej C zmiana polega na odcięciu takiej części białka, która pierwotnie jest odpowiedzialna za hamowanie aktywności katalitycznej, a pod wpływem aktywatorów odsłania centrum aktywne. Podjednostka katalityczna, zwana kinazą białkową M (PKM), jest nadal formą aktywną, aczkolwiek wyłączoną spod kontroli wtórnych przekazywników. Teoretycznie, PKM może fosforylować inne, dodatkowe klasy substratów, nieosiągalnych dla form natywnych, związanych funkcjonalnie z błonami i zależnych od kofaktorów. Potwierdzeniem funkcjonalnej aktywności PKM w przedziale postsynaptycznym jest wzrost wapniowo-niezależnej aktywności kinazowej po indukcji wzmocnienia synaptycznego. Według opinii niektórych badaczy, opartych jedynie na spekulacjach, właśnie forma PKM odpowiada za długotrwałe modyfikacje uwalniania neuroprzekazywników z części presynaptycznej neuronu. W podobny sposób mogą być modulowane inne kluczowe kinazy białkowe i fosfatazy, które w wyniku proteolizy zmieniają wewnątrzkomórkowe ścieżki transdukcji sygnałów. Nie sposób pominąć także roli ograniczonej proteolizy komponentów kompleksów adhezyjnych takich jak NCAM (ang. *neuronal cell adhesion molecule*) i FAK (ang. *focal adhesion molecule*). Powstające fragmenty natywnych białek mogą modyfikować proces transdukcji sygnałów na szlakach specyficznie aktywowanych przez te kompleksy.

Kaspazy

Kaspazy, podobnie jak omówione wyżej kalpainsy, są proteazami cysteinowymi, ekspresjonowanymi konstytutywnie we wszystkich komórkach organizmów żywych. Enzymom tym przypisuje się kluczową rolę w przebiegu efektorowej, nieodwracalnej fazy apoptozy [3, 29].

Wszystkie poznane dotąd kaspazy (> 14, w tym 12 zidentyfikowanych u człowieka) syntetyzowane są w komórce jako nieaktywne prekursorzy (zymogeny), składające się z dwóch podjednostek (~20 kDa – ~10 kDa) połączonych krótkim odcinkiem (łączynikiem) oraz z tak zwanej prodomeny, polipeptydu o różnej długości. Prodomena utrzymuje kaspazy w formie zymogenów i jest odszczepiana w czasie aktywacji. Aktywne enzymatycznie formy kaspaz powstają w wyniku autoproteolizy enzymu, lub też ograniczonej proteolizy przez inne kaspazy. Kaspazy posiadające tak zwane duże prodomeny, to jest kaspaza – 1, 2, 8, 9, 10, ulegają autokatalitycznej aktywacji poprzez interakcje ze specyficznymi białkami adaptorowymi, które uczestniczą w przekazywaniu sygnału proapoptotycznego.

Na inny niż autokataliza mechanizm aktywacji prokaspaz wskazują badania dotyczące udziału w apoptozie białka CED 4 u *C. elegans* i jego homologu, białka Apaf występującego w komórkach ssaków. Postuluje się, że prokaspazy w komórkach nie zastymulowanych do apoptozy występują w połączeniu z hamującymi apoptozę białkami z rodziny Bcl-2, ułokowanymi na błonach struktur subkomórkowych. W wyniku zadziałania proapoptotycznego sygnału doszłoby do oddysocjowania białka Bcl-2 i utworzenia nowego kompleksu, tzw. apoptosomu, utworzonego z prokaspazy, białka Apaf-1 i cytochromu c uwolnionego z mitochondriów. W obecności ATP, po nie do końca poznanych zmianach konformacji białek, uwolniona zostałaby aktywna kaspaza 9. Aktywne kaspazy, zwane niekiedy inicjującymi (kaspaza 2, 8, 9, 10), aktywują w kaskadzie proteolitycznej kolejne kaspazy tzw. wzmacniające i wykonawcze (kaspaza 3, 6, 7), które przeprowadzają proteolizę wewnątrzjądrowych substratów białkowych.

Chociaż ogólny schemat budowy kaspaz jest podobny, to można je zgrupować w dwie podstawowe, filogenetycznie pokrewne podrodziny, których prototypami są kaspaza 1 – (ICE) i kaspaza 3 – (CPP32, apopain). Wydaje się, że w przeciwieństwie do CPP32, uczestnictwo kaspaz z podrodziny ICE nie jest istotne dla przebiegu apoptozy, chociaż sprawa ta jest ciągle przedmiotem dyskusji. Szczególne cechy budowy cząsteczki kaspaz, ich powszechne występowanie, a także zdolność do przeprowadzania proteolizy różnych strukturalnie i funkcjonalnie białek, są podstawowymi czynnikami decydującymi o ich istotnej roli w apoptozie.

Wszystkie kaspazy rozszczepiają polipeptydy w sposób wysoce selektywny, w specyficznym kontekście reszt aminokwasowych (za resztą asparagynową). Substratami kaspaz są liczne białka cytoplazmatyczne i jądrowe, a ich proteoliza może prowadzić zarówno do aktywacji, jak też hamowania pełnionych przez nie funkcji.

Prowadzone od lat badania specyficzności poszczególnych kaspaz są na ogół wykonywane w ukła-

dach bezkomórkowych. Badania te wskazują, że niektóre kaspazy mają zdolność degradacji wielu substratów, inne tylko bardzo określonych. Nadal nie jest jasne, jak te procesy zachodzą w warunkach fizjologicznych. Wydaje się, że podczas apoptozy w większości komórek proteolizie podlegają: lamina – białko strukturalne błony jądrowej, polimeraza poli[ADP-rybozy] (PARP), zależne od DNA kinazy białkowe, topoizomeraza I, II, kinazy białkowe PAK (ang. *p21Ras activated kinase*), kinaza FAK (ang. *focal adhesion kinase*) i białka cytoszkieletu – fodryna i aktyna. Produkt degradacji fodryny o ciężarze 120 kDa jest uznawany jako wyznacznik apoptotycznej aktywacji kaspaz. Ponadto, potencjalnymi substratami kaspaz jest szereg białek, które decydują o prawidłowym przebiegu cyklu komórkowego i o przekaznictwie sygnałów [18].

Proteasom

Jednym z głównych pozalizosomalnych szlaków degradacji białek jest proteasom, obecny w cytoplazmie i jądrze wszystkich zbadanych do chwili obecnej komórek eukariotycznych. Jest to duży ATP-zależny kompleks proteolityczny o masie rzędu 650–700 kDa. Dwie główne formy proteasomu w komórce to białka o stałej sedymentacji 20S i 26S. Występują one w stanie dynamicznej równowagi i charakteryzują się szerokim spektrum aktywności proteolitycznej. Proteasom 20S tworzy proteolityczny rdzeń kompleksu. Do jego końców przyłączone są dwa asymetryczne kompleksy regulatorowe o stałej sedymentacji 19S. Kompleksy regulatorowe zawierają ok. 15–20 różnych podjednostek posiadających aktywności ATP-az, aktywności umożliwiające wiązanie ubikwityny oraz aktywności izopeptydaz. Podjednostki o aktywności ATP-az prawdopodobnie biorą udział w dysocjacji i rozfałdowywaniu substratów białkowych przed ich translokacją do rdzenia proteolitycznego. Inne podjednostki zaangażowane są w rozpoznawanie substratów białkowych, niosących sygnały do rozpoczęcia degradacji. Kowalencyjne przyłączenie ubikwityny, małego (76 aminokwasów), powszechnie występującego białka globularnego, do właściwego białka substratowego jest zasadniczym, choć nie wyłącznym sygnałem do proteolizy. W kaskadowym procesie ubikwitynacji białek, zachodzącym przy udziale ATP, uczestniczą co najmniej trzy enzymy: aktywujący ubikwitynę, łączący się z aktywowaną ubikwityną oraz enzym przenoszący ją na białkowy substrat bądź bezpośrednio, bądź w wyniku współdziałania z ligazą ubikwitynową. Zubikwitynowane substraty białkowe dzięki formie 26S ulegają degradacji do krótkich polipeptydów, z których większość jest dalej degradowana przez komórkowe egzopeptydazy [4].

O wiele mniej poznana jest rola układów proteolitycznych, opartych na samodzielnych proteaso-

mach 20S i na niezależnych od ubikwityny systemach znakujących substraty. W warunkach *in vitro* proteasom 20S przejawia 3 główne aktywności proteolityczne: trypsyno-podobną, chymotrypsyno-podobną oraz aktywność hydrolizującą wiązania peptydyloglutamyłowe. Ponadto proteasom 20S posiada jeszcze co najmniej dwie dodatkowe aktywności proteolityczne, polegające na hydrolizie wiązań między aminokwasem rozgałęzionym np. leucyną a innym, oraz wiązań między aminokwasem małym i obojętnym elektrycznie np. glicyną a innym. Skoordynowane działanie całego spektrum aktywności prezentowanych przez ten układ prowadzi do szybkiego rozpadu większości wiązań peptydowych w każdym białku. Różnorodność aktywności proteolitycznych sugeruje wysoce selektywną i znaczącą rolę proteasomu w komórkowych procesach biochemicznych. Niestety, brak selektywnych inhibitorów blokujących funkcje proteasomu w zdrowych komórkach uniemożliwia określenie jego specyficznych funkcji fizjologicznych. Nasza dotychczasowa wiedza o substratach proteasomu głównie pochodzi z badań *in vitro*.

Kompleks proteasomowy 26S zaangażowany jest głównie w degradację nieprawidłowo zbudowanych i zdenaturowanych białek, oraz licznych białek komórkowych o krótkim okresie półtrwania, istotnych w procesie proliferacji i regulacji cyklu komórkowego. Ponadto proteasomy 26S bezpośrednio wpływają na regulację transkrypcji genów przez przekształcenie czynnika transkrypcyjnego NFκB i degradację jego inhibitora IκB, jak również przez proteolizę innych czynników transkrypcyjnych takich jak c-Fos i c-Jun. Ostatnio wykazano ścisłe powiązanie aktywności proteasomu z kontrolą cyklu podziałowego i programem śmierci komórkowej.

Uzyskane wyniki wskazują, że proteasom 26S zajmuje kluczową pozycję, działając jako „przełącznik” decydujący o losach komórki, o tym czy komórka przystąpi do proliferacji, czy też podda się apoptozie. Zahamowanie aktywności proteasomu w komórce prowadzi do aktywacji lub inhibicji apoptozy, a wzór odpowiedzi zależy prawdopodobnie od dojrzałości i zróżnicowania komórki. I tak, w komórkach proliferujących inhibicja prowadzi do aktywacji apoptozy, natomiast w komórkach nie dzielących się takich jak limfocyty T czy neurony, do jej inhibicji [6, 16].

Liczne obserwacje wskazują, że zaburzenie funkcji proteasomu jest przyczyną akumulacji białek o nieprawidłowej strukturze i powstawania ich nierozpuszczalnych agregatów. Powstawanie takich agregatów białkowych obserwuje się w schorzeniach degeneracyjnych układu nerwowego. Zagadnienie to zostanie szerzej omówione w dalszej części.

Proteazy zewnątrzkomórkowe

Proteoliza zewnątrzkomórkowa stała się przedmiotem intensywnych badań neurobiologicznych dopiero w ostatniej dekadzie, po odkryciu roli tego procesu w plastyczności i neurogenezie mózgu. Podstawową funkcją zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych jest modulacja interakcji pomiędzy komórkami a ich otoczeniem, na drodze ograniczonej degradacji białkowych komponent macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), receptorów błonowych i cytokin. Proteazy zewnątrzkomórkowe należą w większości do dwóch głównych klas enzymów proteolitycznych, jakimi są metaloproteazy (MMPs) i proteazy serynowe [11]. Enzymy te syntetyzowane są w komórkach i w formie prekursorów uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie ulegają aktywacji poprzez proteolityczne cięcie w rejonie propeptydu. Obie klasy proteaz są precyzyjnie regulowane na poziomie transkrypcji i translacji. Dodatkowym potranslacyjnym mechanizmem kontroli aktywności proteolitycznej są poziomy specyficznych inhibitorów proteaz, które razem z samymi enzymami kształtują biochemiczną charakterystykę ECM. W przypadku aktywatorów plazminogenu są to inhibitor typu I i typu II (PAI-1 i PAI-2). Natomiast inhibitorami aktywności MMPs są inhibitory tkankowe tzw. TIMPy, należące do rodziny sekrecyjnych białek wielofunkcyjnych, a obejmujących 4 białka (TIMP-1 do TIMP-4) z 30–40% podobieństwem sekwencji. Wszystkie TIMP-y inhibują aktywne formy większości MMPs przez tworzenie z nimi kowalencyjnych kompleksów.

W ośrodkowym układzie nerwowym kluczowym reprezentantem klasy proteaz serynowych jest tkankowy i urokinazowy aktywator plazminogenu (tPA i uPA), odpowiedzialny za przekształcenie nieaktywnego prekursora proteazy – plazminogenu w aktywną plazminę, proteazę zdolną do degradacji większości białek zewnątrzkomórkowych.

Klasę metaloproteaz reprezentuje w chwili obecnej 26 zależnych od Zn^{2+} endopeptydaz, należących do 4 podstawowych grup: żelatynaz, kolagenaz, stromielizyn i metaloproteaz typu błonowego. Mechanizm aktywacji metaloproteaz nie jest wyjaśniony do końca. Wyniki badań biochemicznych i molekularnych wskazują, że aktywatorem niektórych metaloproteaz jest plazmina. Nie można wykluczyć również innych enzymów umiejscowionych na zewnętrznej powierzchni komórki, jak i udziału mechanizmu autokatalitycznego. Rola plazminy w aktywacji MMPs wskazuje na ścisłe współdziałanie obu omawianych układów proteolitycznych.

Przemodelowanie struktur macierzy zewnątrzkomórkowej na drodze proteolizy jest nieodzownym warunkiem rozwoju układu nerwowego, a więc procesów proliferacji, morfogenezy, czy migracji.

Zwiększona ekspresja aktywatora plazminogenu w stożkach wzrostu hodowanych neuronów obwodowych, czy podwyższony poziom tego aktywatora w komórkach ziarnistych dojrzewającego mózdzku sugerują, że proteoliza zewnątrzkomórkowa z udziałem plazminy może ułatwiać wzrost neurytów w czasie rozwoju ontogenetycznego [24]. Niekontrolowany wzrost aktywności MMPs i intensywne degradacja ECM, obserwowana na przykład w stanach zapalnych i reaktywnych ośrodkowego układu nerwowego, może prowadzić do śmierci komórek na drodze apoptozy (*anoikis*) przez utratę kontaktu z macierzą zewnątrzkomórkową [21].

Rola enzymów proteolitycznych w patologii ośrodkowego układu nerwowego

Podczas gdy aktywność enzymów proteolitycznych w warunkach fizjologicznych podlega ścisłej regulacji, to w stanach patologicznych zarówno ostrych, jak i przewlekłych, dochodzi do zaburzenia mechanizmów kontrolnych oraz nadmiernej stymulacji procesu. W takich warunkach enzymy demonstrują niekontrolowaną siłę proteolityczną, która może stać się przyczyną intensywnego katabolizmu białek komórkowych. Przedłużony proces proteolityczny może prowadzić do poważnego uszkodzenia cytoszkieletu komórki, błon plazmatycznych, do zaburzenia transportu aksonalnego, zaburzenia wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów, a dalej do utraty integralności i śmierci neuronów. Jednym z najcięższych i najczęściej występujących ostrych czynników uszkadzających układ nerwowy jest niedokrwienie mózgu. Może ono wynikać z wielu przyczyn zaburzających przepływ krwi i powodujących odcięcie dopływu tlenu i glukozy.

Niedokrwienie mózgu

Jeśli epizod niedokrwienny nie doprowadza bezpośrednio do śmierci organizmu, to indukuje w dotkniętych nim komórkach reakcje „kryzysowe”. W zależności od charakteru i gradacji pierwotnego uszkodzenia ischemicznego, po przywróceniu krążenia reakcje te mogą doprowadzić do regeneracji tkanki, albo z przyczyn nie do końca poznanych mogą indukować w określonych okolicach mózgu opóźnioną śmierć poischemiczną o cechach apoptozy.

W przypadku ciężkiego uszkodzenia, z nieodwracalnym wyczerpaniem rezerw energetycznych, reakcje „kryzysowe” mogą przyczynić się do eliminacji komórek w mechanizmie nekrotycznym. W niektórych klinicznych postaciach niedokrwienia, takich jak udar mózgu, neurony w centrum uszkodzenia niedokrwiennego giną na drodze nekrozy, natomiast w okolicy otaczającej to ognisko, tzw. penumbry, aktywowane są szlaki prowadzące do teoretycznie odwracalnej apoptozy. Jest sprawą oczy-

wistą, że poznanie podłoża procesów zachodzących w niedokrwionej tkance nerwowej, jest szczególnie istotne dla wypracowania efektywnych schematów terapeutycznych.

Liczne przesłanki, które są efektem wieloletnich badań doświadczalnych wskazują, że patologia niedokrwienia jest związana z napływem jonów wapnia do komórek w następstwie nadmiernego uwalniania neuroprzekazników pobudzających i aktywacji ich receptorów o cechach kanałów jonowych przepuszczalnych dla Ca^{2+} [25]. Efekty funkcjonalne, wynikające z tak zwanego pobudzenia ekscytotoksycznego, w dużej mierze zależą od aktywności wapniowo-zależnych proteaz – kalpain. Narastająca dysfunkcja tego wewnątrzkomórkowego sensora sygnału Ca^{2+} wydaje się być jednym z pierwszych ogniw przekazywania sygnału patologicznego, prowadzącego do śmierci. Badania prowadzone na przestrzeni ostatnich lat w Pracowni Neuropatologii Molekularnej IMDiK jak również dane literatury wskazują, że właśnie te wtórne drugorzędowe procesy, takie jak opisana proteoliza kalpainowa, będące pierwszym ogniwem zaburzeń, mogą odgrywać istotną rolę w związanych z ischemią procesach uszkodzenia i naprawy, co więcej, mogą decydować o sposobie śmierci komórki (nekroza czy apoptoza).

Dane doświadczalne potwierdzają, że aktywacja kalpain jest jednym z wcześniejszych etapów zmian indukowanych ischemią. Stymulacji Ca^{2+} -zależnych proteaz towarzyszą zmiany w ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej. We wszystkich badanych modelach ischemii obserwowano przemieszczenie enzymów do frakcji błon i wzrost postautolitycznej formy aktywnej [17, 33].

Preferowanym miejscem natychmiastowej poischemicznej translokacji niektórych białek sygnałowych są gęstości postsynaptyczne, struktury gdzie znajdują się liczne receptory dla neuroprzekazników i kanały jonowe. Kaskady biochemiczne, indukowane nadmierną aktywnością kalpain w przedziałach synaptycznych, mogą być stopniowo przenoszone do ciał komórek nerwowych powodując opóźnioną, w stosunku do bodźca, śmierć neuronów. Modulacja układu transdukcji sygnałów lub rozpad białka cytoszkieletowego w wypustkach nerwowych może być podstawą zależnych od wapnia uszkodzeń. W szczególności degradacja elementów cytoszkieletu indukowana kalpainą może prowadzić do patologicznych zmian morfologii neuronalnej, takich jak odpączkowanie błon (ang. *membrane blebbing*) i obkurczenie komórek, specyficznych dla śmierci apoptotycznej [5].

Uwaga licznej grupy badaczy skupiła się na skutkach degradacji fodryny – głównego białka strukturalnego błony postsynaptycznej, które kontroluje zarówno kształt komórki jak i organizację lipidową oraz białkową błony. Uwzględniając intramolekular-

ne asocjacje fodryny (obejmujące m.in. neurofilamenty, aktyny, lipidy błon i inne komponenty cytoszkieletu oraz transbłonowe receptory adhezyjne) można postulować, że jej hydroliza jest częścią mechanizmu patologicznej reorganizacji cytoszkieletu. Oprócz fodryny, obserwowano także poischemiczną degradację innego białka cytoszkieletowego, a mianowicie białka związanego z mikrotubulami – MAP2 (ang. *microtubule associated protein*) [35]. Nadmierna degradacja fodryny, razem z wrażliwym na proteolizę białkiem związanym z mikrotubulami i białkami neurofilamentów, może przerwać transport wewnątrzkomórkowy i osłabić stabilizację cytoszkieletu w obszarze somatodendrytycznym. Jest wielce prawdopodobne, że w wielu zaburzeniach neurodegeneracyjnych, np. w niedokrwieniu mózgu, urazach mózgu, i przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych, degeneracja synaps i neurytów wyprzedza śmierć neuronalną.

Z drugiej strony, zależna od kalpaina ograniczona proteoliza aktyny, spektryny, jak i samych receptorów glutaminianergicznych NMDA i AMPA, może hamować napływ wapnia i w pewnych warunkach spełniać rolę ważnego modulatora homeostazy wapnia w neuronach.

Na uwagę zasługuje także obserwowana w ischemii proteoliza kinazy białkowej C, prowadząca do powstania kinazy M oraz modulacji specyficznych dla PKC odpowiedzi fosforylacyjnych [32]. Interakcję pomiędzy kalpainą a PKC ułatwia prawdopodobnie translokacja obu cząsteczek białkowych do błon komórkowych. Obecne w błonie fosfolipidy wpływają pozytywnie na dalsze, wzajemne oddziaływanie obu enzymów poprzez zmianę konformacji. Kalpaina może być odpowiedzialna za poaktywacyjne wyłączenie PKC ze szlaku specyficznie regulowanych bodźców wewnątrzkomórkowych. Znaczenie proteolitycznej modyfikacji PKC w propagacji sygnału ischemicznego jest nadal przedmiotem licznych kontrowersji, spowodowanych zapewne znikomym, często niewykrywalnym poziomem PKM w warunkach fizjologicznych.

Zależna od jonów Ca^{2+} kalpaina wydaje się być łącznikiem wiążącym krótkotrwałe reakcje, zainicjowane przez transmisję pobudzającą, z wystąpieniem utrwalonych zmian transkrypcji i ekspresji tzw. genów wtórnych. Spowodowane niedokrwieniem zmiany stopnia fosforylacji wielu substratów PKC, podstawowych dla prawidłowego funkcjonowania komórki, mogą na różnych poziomach zaburzyć funkcje neuronów. Dane doświadczalne wskazują na udział kalpain w apoptozie. Na przykład, potwierdzona ostatnio translokacja kalpain do jąder komórkowych w czasie niedokrwienia poprzez interakcję z cząsteczką p53, aktywuje proapoptotyczny gen białka Bax.

Na podstawie powyższych danych można wnioskować, że inhibicja aktywności kalpaina zaangażo-

wanej w ewolucję uszkodzenia poischemicznego prowadzącego do nekrozy czy też apoptozy, wydaje się być właściwą i często sugerowaną strategią terapeutyczną. Tym bardziej, że w warunkach fizjologicznych kalpaina istnieje głównie w formie latentnej, a więc czasowa inhibicja jej aktywności nie powinna powodować niekorzystnych efektów wtórnych [30]. Hipoteza ta znalazła poparcie w wynikach testów prowadzonych w układach *in vitro*, gdzie eliminacja aktywności kalpain nie miała wpływu na przeżycie kultur tkankowych. W ostatniej dekadzie zsyntetyzowano szereg związków o wysokim powinowactwie i stopniu selektywności w stosunku do kalpain (CX216, AK275, AK295, CEP-4143), które nie wykazują niekorzystnych działań ubocznych. Brak wpływu tych związków na transmisję podstawową jest dodatkowym argumentem przemawiającym za brakiem aktywności kalpain w komórkach „spoczynkowych”. Podstawowym problemem jest niedostateczna penetracja syntetycznych inhibitorów do komórek nerwowych, co sprawia, że znaczący efekt protekcyjny był osiągnięty jedynie po domózgowym podaniu leku.

Stwierdzono doświadczalnie, że inhibicja proteolizy kalpainowej zapobiega degradacji cytoszkieletu, zmniejszając równocześnie poischemiczne uszkodzenie neuronów o 50–75%. Inhibitory kalpain okazały się być tak samo efektywne w hamowaniu apoptozy neuronalnej w niektórych formach ekscytotoksyczności jak inhibitory kaspaz.

Jak już wspomniano, poischemiczna opóźniona eliminacja neuronów może zawierać komponentę apoptotyczną. Wiadomo, że czynniki indukujące apoptozę prowadzą do aktywacji kaspaz, które odgrywają kluczową rolę w procesie programowanej śmierci komórek [18, 28]. W zależności od sygnałów inicjujących, programy śmierci realizowane są z udziałem różnych kompleksów białkowych i różnych kaspaz inicjatorowych. Dotychczas poznano dwa takie kompleksy – apoptosom i kompleks DISC (ang. *death inducing signalling complex*). W indukowanej ischemią apoptozie neuronów prawdopodobnie dochodzi do aktywacji apoptosomu w powiązaniu z destabilizacją funkcji mitochondriów. Powstanie tego kompleksu powoduje aktywację kaskady proteolitycznej prowadzącej przez kaspazę-3 i endonukleazę do typowej dla apoptozy oligonukleosomalnej fragmentacji DNA. Aktywacji kaspazy-3 towarzyszy hydroliza PARP-u – enzymu naprawy DNA.

Innym białkiem substratowym degradowanym proteolitycznie w czasie apoptozy jest białko cytoszkieletu – fodryna. Konsekwencje hydrolizy białek cytoszkieletu omówiono w akapicie opisującym kalpaina. Do końca nie jest jasne, które z pozostałych substratów kaspaz są degradowane w procesie poischemicznej apoptozy neuronów. Biorąc pod uwagę

rolę, jaką pełnią one w zdrowych komórkach, oczekuje się, że ich hydroliza może mieć istotne skutki proapoptotyczne. Kinazy białkowe PAK, regulujące między innymi aktywność kinaz z rodziny MAP, są również ważnymi regulatorami cytoszkieletu. Kinaza FAK znajduje się w kompleksach w płytkach adhezji komórkowej. Pełni ona ważną rolę w przekazywaniu sygnałów inicjowanych przez integryny i neuropeptydy. Proteoliza kinaz białkowych PAK i FAK przez kaspazy, prowadzi do zaburzonej fosforylacji białek komórkowych, które uczestniczą w ważnych szlakach sygnałowych. Wydaje się, że skutkiem zaburzenia tych sygnałów może być patologiczne fałdowanie błon komórkowych, rozpad płytek adhezyjnych, cofanie się wypustek i rozpad połączeń międzykomórkowych, które należą do pierwszych objawów apoptozy. Z kolei degradacja przez kaspazy aktyny i lamin jądrowych, występująca we wczesnym etapie apoptozy, może być odpowiedzialna za uwolnienie endonukleaz, które uczestniczą we fragmentacji jądrowego DNA. Proteoliza jednej z podjednostek endonukleazy DFF-45 prowadzi do jej aktywacji i jest prawdopodobnie przyczyną cięcia DNA na fragmenty wielkości nukleosomu.

Kaspazy były prawdopodobnie jednymi z pierwszych obiektów strategii terapeutycznej, mającej na celu modulację procesu apoptozy [20, 22]. Programy syntezy inhibitorów kaspaz były realizowane przez firmy farmaceutyczne jeszcze przed odkryciem ich roli jako egzekutorów śmierci. Pierwsze próby dotyczyły inhibicji enzymu przekształcającego interleukinę-1 β (ICE, lub kaspaza 1) odpowiedzialnego za aktywację cytokin pro-zapalnych. Po udokumentowaniu roli kaspazy 3 jako egzekutora śmierci, rozpoczęto prace nad syntezą inhibitorów tego enzymu. Dostępne w chwili obecnej inhibitory kaspazy-3, syntetyzowane jako pochodne ketonów peptydowych (Z-Vad-Fmk, YVad-fmk i Devd-Fmk), okazały się być niezbyt selektywne. Inhibicja kaspaz wykazała znaczącą skuteczność w doświadczalnym niedokrwieniu takich narządów jak serce, wątroba, jelita, nerka i mózg. We wszystkich przypadkach zaobserwowano obniżenie stopnia apoptozy i dłuższe przeżycie. W mózgu pole uszkodzenia ulegało zmniejszeniu o 50–60%.

Na podstawie tych danych wydawać się mogło, że inhibicja kaspaz w ischemii czy to na drodze farmakologicznej, czy molekularnej, może zatrzymać neurodegenerację. Zaprzeczeniem tej hipotezy była obserwacja, że w większości kultur tkankowych inhibicja kaspaz oferowała jedynie przejściową protekcję i komórki umierały w wyniku nieodwracalnych zmian na poziomie mitochondriów, na drodze niezależnej od kaspaz. Być może w tych przypadkach dochodziło do aktywacji alternatywnych dróg prowadzących do apoptozy, np. takich jak dyskusowany ostatnio czynnik indukcji apoptozy – AIF (ang. *apoptosis inducing factor*).

Należy pamiętać także, że w proces indukowanej ischemią apoptozy (jak i nekrozy) zaangażowana jest także zależna od wapnia proteaza – kalpaina [26]. Określenie roli kalpain i kaspaz w poischemicznej śmierci neuronów jest niezwykle skomplikowane przez wzajemne interakcje obu układów [2, 15]. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że proteoliza przez kalpainę pewnych kaspaz (kaspazy 7, 8 i 9) prowadzi do zahamowania aktywności tych enzymów. Zupełnie inny efekt działania kalpainsy opisano w przypadku proteolizy kaspazy-3 w modelu niedokrwienia *in vivo*. Uzyskane wyniki sugerują, że proteoliza kalpainowa ma ułatwiać dalszą hydrolizę kaspazy-3 do formy aktywnej. Z kolei kaspaza-3, proteolizując wraz z kalpainą endogenne inhibitory kalpainsy – kalpastatynę, może pośrednio przyczynić się do stymulacji aktywności proteolitycznej po epizodzie niedokrwinnym. Rozstrzygnięcie, który enzym pełni dominującą rolę w aktywacji proteolitycznej kaskady poniedokrwiennej, na obecnym etapie wiedzy nie wydaje się możliwe.

W podsumowaniu tych rozważań należy zaznaczyć, że mimo pozytywnych wyników dotychczasowych badań eksperymentalnych, inhibitory kaspaz i kalpain nie znalazły zastosowania dla zahamowania ewolucji uszkodzenia po niedokrwieniu w klinice. Ze względu na lawinową, równoległą aktywację całego szeregu reakcji wtórnych w krótkim czasie po rozpoczęciu niedokrwienia oraz ze względu na skomplikowane współzależności różnych, potencjalnie uszkodzających dróg sygnałowych, zablokowanie jednego tylko łańcucha reakcji z pewnością nie będzie wystarczające. Jednym z możliwych rozwiązań wydaje się być kombinacja leków, blokujących równocześnie kilka mechanizmów (np. blokery uwalniania glutaminianu czy substancje blokujące powstawanie wolnych rodników łącznie z inhibitorami proteolizy).

W przeciwieństwie do bogatej literatury dotyczącej proteaz cysteinowych, niezwykle skąpe dane doświadczalne wskazują na zaangażowanie proteasomu w rozwój uszkodzeń wywołanych niedokrwieniem. Generalnie – odwrotnie niż w przypadku proteaz cysteinowych, zahamowanie funkcji proteasomu prowadzi do uszkodzeń komórkowych. Sugeruje się, że w warunkach obniżonego poziomu ATP dochodzi do zahamowania funkcji proteolitycznej tego układu, a więc zahamowania proteolizy potencjalnych substratów jakimi są białka proapoptotyczne, tj. p53, cyt c, bid i bax [1]. Ustalenie roli proteasomu w scenariuszu poniedokrwiennej śmierci wymaga dalszych intensywnych badań.

Przeprowadzone w ostatnich latach badania mechanizmów śmierci neuronów po przebytych stresie niedokrwinnym, wskazują na istnienie dodatniej korelacji między aktywnością zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych, a dynamiką śmierci komórek nerwowych w różnych modelach ische-

mii [14]. W autopsyjnym badaniu mózgow ludzkich podwyższone poziomy MMPs utrzymywały się jeszcze kilka dni, a nawet kilka miesięcy po przebytym udarze. Silnym poparciem roli MMP-9 w niedokrwieniu są wyniki badań prowadzone na poziomie molekularnym – u myszy pozbawionych genu kodującego to białko znacznie zmniejszało się pole uszkodzenia ischemicznego.

Degradacja białek ECM przez metaloproteazy i aktywatory plazminogenu jest przyczyną zaburzenia prawidłowej interakcji komórek z macierzą, co jest warunkiem przeżycia wielu typów komórek, w tym komórek neuronalnych. O znaczeniu kontaktu komponentów obu przedziałów, oddzielonych błoną komórkową, mogą świadczyć wyniki badań *in vitro* wskazujące, że zaburzenie interakcji komórka-macierz indukuje apoptozę w wielu układach doświadczalnych. Badania prowadzone w Pracowni Neuropatologii Molekularnej, wykazały korelację aktywności metaloproteazy-9 i degradacji jednego z białek macierzy – lamininy, z topografią opóźnionych zmian neuronalnych wywołanych niedokrwieniem mózgu [34]. Konsekwencją aktywacji MMPs jest zmiana adhezji komórek do ECM i zaburzenie sygnału integrynowego stymulującego prożyciowy szlak PI3/Akt. Proteolityczna modyfikacja nie-receptorowej kinazy FAK, obserwowana przez nas w tych samych doświadczeniach, może wskazywać na zaburzenia informacji przekazywanej z ECM do systemów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej.

Wzrost aktywności MMPs, w modelu ischemii ogniskowej, prowadzi do degradacji błony podstawnej i przerwania ciągłości bariery krew-mózg, ułatwiając tym samym przenikanie elementów morfotycznych krwi do mózgu. Należy wspomnieć, że białko bariery ZO-1 jest substratem MMP-9. Podanie inhibitorów MMPs powoduje utrzymanie ciągłości bariery, zmniejszenie ogniska ischemicznego i redukcję obrzęku mózgu [23].

Liczne inhibitory MMPs znajdują się obecnie w stadium prób preklinicznych i klinicznych, jednak ich zastosowanie ukierunkowane jest głównie na leczenie takich schorzeń jak arterioskleroza, artretyzm, stany zapalne oraz w onkologii i stomatologii. Użycie tych związków jako czynników protekcyjnych w niedokrwieniu nie posunęło się poza fazę eksperymentów na modelach zwierzęcych. Pewną ostrożność w stosowaniu tej strategii w chorobach układu nerwowego dyktuje pozytywna rola aktywacji metaloproteaz, wyrażająca się przyspieszeniem powrotu plastyczności aksonów i dendrytów po ostrym niedokrwieniu.

Proteazą zewnątrzkomórkową stosowaną z dużymi ograniczeniami w patologii udaru niedokrwienne u ludzi jest rekombinowany aktywator plazminogenu (rtPA). Działanie tego aktywatora polega na aktywacji trombolizy poprzez przekształcenie plazminogenu w aktywną plazminę. Z pozytywnym

skutkiem można go stosować w czasie nie przekraczającym 3-ej godziny od momentu wystąpienia epizodu ischemicznego i w warunkach perfekcyjnego monitorowania stanu pacjenta. Ograniczenia te eliminują możliwości stosowania takiego postępowania w Polsce. W USA terapię taką prowadzi się jedynie u 3% pacjentów z udarem. Efektem ubocznym terapii jest aktywacja metaloproteazy MMP-9, co może doprowadzić do wylewu krwotocznego w wyniku degradacji błony podstawnej naczyń [8]. Potrzebą chwili jest uwzględnienie możliwości interakcji obu układów proteolitycznych przy opracowywaniu nowej strategii terapeutycznej. Racjonalne przesłanki wskazują, że niepożądanym skutkiem terapii mogłoby zapobiec podawanie rtPA razem ze specyficznym inhibitorem MMP-9.

Enzymy proteolityczne w neurodegeneracjach przewlekłych

Badania molekularne nad patologią mózgu wskazują na zaangażowanie układów proteolitycznych także w rozwój procesów neurodegeneracyjnych o charakterze przewlekłym. Do grupy chorób zwyrodnieniowych mózgu tradycyjnie włącza się wszystkie postępujące niejasne etiologicznie zespoły, w których istotą procesu są zmiany dystroficzne i zanikowe elementów układu nerwowego. W przebiegu choroby zniszczeniu ulegają komórki nerwowe z wypustkami. Proces patologiczny dotyczy określonych okolic lub całego układu nerwowego. Przykładami chorób zwyrodnieniowych są: 1) choroba Alzheimera (AD), 2) stwardnienie rozsiane (MS), 3) choroba Parkinsona (PD) czy 4) Huntingtona (HD). Bez względu na różną etiologię, wszystkie te stany charakteryzują się jedną wspólną cechą jaką jest kumulacja nieprawidłowych białek. Odmienność tych białek polega na zmienionej strukturze łańcucha polipeptydowego, który jest albo częściowo zwinięty, albo zwinięty w sposób nieprawidłowy (ang. *toxic folds*), stając się czynnikiem patogennym [27, 31]. Takie nieprawidłowe białka mają skłonność do tworzenia widzialnych mikroskopowo agregatów, często o specyficznym, właściwym dla danego schorzenia charakterze. I tak w chorobie Alzheimera są to płytki amyloidowe utworzone przez amyloid β , w przypadku choroby Parkinsona agregaty α -synukleiny, w chorobie Huntingtona – białko huntingtina. Białka te charakteryzują się wysokim stopniem toksyczności w stosunku do neuronów. Patologiczną konsekwencją powstania takich agregatów może być zmiana transportu aksonalnego, uszkodzenie cytoszkieletu i utrata połączeń z komórkami docelowymi. Badania prowadzone w układach *in vitro* wykazały, że formowanie agregatów pewnych białek zmutowanych podlega regulacji przez kortykosteroidy i szlaki sygnałowe (np. kinazy stresu MEKK1), a więc wbrew wcześniejszym hipotezom, sugeruje to proces aktywny.

Niezależnie od stałego postępu badań poświęconych molekularnym symulacjom struktur białkowych, wiedza o mechanizmach regulujących proces zwijania łańcuchów polipeptydowych nadal nie jest kompletna.

Warto przypomnieć, że aktywne funkcjonalnie komórki, między innymi komórki neuronalne, wykształciły ewolucyjnie silne mechanizmy zabezpieczające przed neurotoksycznym efektem źle zwiniętych łańcuchów polipeptydowych. Zaburzenie tego mechanizmu z przyczyn biochemicznych czy genetycznych, prowadzi do nagromadzenia takich „niechcianych” i potencjalnie szkodliwych białek. Według ogólnie akceptowanej hipotezy, za degradację tych białek ma odpowiadać proteolityczny układ wewnątrzkomórkowy proteasom-ubikwityna, a więc dysfunkcja tego układu może być istotnym czynnikiem patogenetycznym chorób zwyrodnieniowych [6].

Schorzenia o podłożu neurodegeneracyjnym, takie jak choroba Alzheimera, Parkinsona, a także udary mózgu, należą do najbardziej upośledzających życie. Przykładem jest omówiona nieco dokładniej choroba Alzheimera.

1) Choroba Alzheimera (AD) – jest nieuleczalnym schorzeniem neuro-psychiatrycznym, z postępującym uszkodzeniem funkcji poznawczych, utratą synaps i neuronów. Odpowiada za 50–75% przypadków demencji, wyrażającej się postępującym spadkiem sprawności intelektualnej. Jakkolwiek jest to choroba związana z podeszłym wiekiem, opisano przypadki pojawiania się jej objawów także w wieku średnim. W obrazie morfologicznym mózgow z AD obserwuje się pozakomórkowe złogi amyloidu oraz zmiany włóknkowe neuronów (podwójne helikalne filamenty utworzone z nadmiernie ufosforylowanych form związanych z mikrotubulami białek tau). Obecność tych struktur początkowo zaburza funkcję neuronu, a w końcu powoduje jego rozpad. Ubytek liczby neuronów makroskopowo przejawia się zanikiem mózgu. Dzięki badaniom prowadzonym na myszach transgenicznym, rozwijających patologię płytek starczych, obserwuje się znaczny postęp wiedzy dotyczący wyjaśnienia patomechanizmu AD. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że eksperymentalny model choroby nie daje pełnego obrazu patologii ludzkiej – np. u myszy nie stwierdzono obserwowanego u ludzi charakterystycznego zwyrodnienia włóknkowego neuronów.

Aktualne dane wskazują, że choroba Alzheimera jest uwarunkowana genetycznie i w zależności od fenotypu schorzenia jest następstwem mutacji kilku genów, tj. genów kodujących białko prekursorowe amyloidu, presenilinę (1 i 2) oraz alipoproteinę E. Około 10% przypadków związanych jest z mutacją genu APP. Rozważania na temat etiopatogenezy choroby Alzheimera oparte są na przesłaniu, że pier-

wotną przyczyną zwyrodnienia neuronów jest odkładanie się złogów amyloidu beta (peptyd o 39–42 resztach aminokwasowych) i wtórne do tego procesu neurodegeneracyjne. Amyloid beta pochodzi z proteolitycznego rozpadu transbłonowego białka błon neuronalnych, tzw. prekursora amyloidu (APP, ang. *amyloid precursor protein*).

Istnieją przesłanki wskazujące na udział defektu degradacji proteosomalnej w patogenezie choroby. Poparciem takiej hipotezy są wyniki precyzyjnych badań biochemicznych, które wykazały, że amyloid beta jest selektywnym niekompetycyjnym inhibitorem chymotrypsyno-podobnej aktywności proteasomu, co z kolei prowadzi do wzrostu poziomu toksycznej formy amyloidu. Innym czynnikiem, wskazującym na zaburzenie degradacji proteosomalnej jest ekspresja zmutowanej formy ubikwityny w neuronach mózgu z AD, która współzawodniczy z ubikwityną w procesie inicjowania degradacji białek. Tak wyznakowane białka nie podlegają hydrolizie przez proteasom. Zaburzenie funkcji proteasomu może, przynajmniej częściowo, odpowiadać za akumulację agregatów.

Na uwagę zasługuje także, sugerowane coraz częściej zaangażowanie kalpain w rozwój choroby Alzheimera [19]. Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia w neuronach i aktywacja kalpain obserwowane były w eksperymentalnych modelach AD. Wczesne pojawienie się aktywnej kalpains, jeszcze przed symptomami neurodegeneracji neuronów, sugeruje możliwość jej udziału we wczesnej fazie patobiologii AD. Wzrost poziomu Ca^{2+} i aktywacja kalpain w kulturach tkankowych poddanych działaniu egzogenego amyloidu beta jest jeszcze jednym dowodem zaangażowania kalpain w rozwoju AD. Zgodnie z ostatnimi doniesieniami, jednym z substratów kalpain jest białko p35, specyficzny dla neuronów aktywator cyklino-zależnej kinazy (cdk5), włączanej w fosforylację białka tau. Proteoliza tego aktywatora prowadzi do powstania nieczynnego fragmentu p25 [9]. Właśnie akumulację tego fragmentu stwierdzono w płytkach starczych, w mózgach pacjentów z chorobą Alzheimera. Ze względu na ciągły brak precyzyjnego określenia znaczenia aktywacji kalpains w ośpieniu typu Alzheimera, nie podejmowano prób modulowania jej aktywności w klinice.

Białko prekursorowe amyloidu podlega hydrolizie przez 3 formy proteaz asparaginowych, tzw. sekretaz alfa, beta i gamma. Toksyczny amyloid beta powstaje w wyniku proteolizy prekursora jedynie przy udziale beta-sekretazy, zwanej inaczej BACE1. Za udziałem sekretazy beta przemawiają obiecujące wyniki badań prowadzone u myszy knock-out pozabawionych genu kodującego BACE1. Na podstawie tych obserwacji można wnioskować, że inhibicja beta sekretazy byłaby właściwą strategią terapeu-

tyczną w chorobie Alzheimera. Pomimo wieloletniego zaangażowania firm farmaceutycznych, do tej pory nie udało się uzyskać leku przechodzącego przez barierę krew-mózg i wykazującego specyficzność w stosunku do sekretazy beta. W chwili obecnej można stosować jedynie leczenie objawowe, łagodząc skutki choroby.

2) Stwardnienie rozsiane (MS) – jest następstwem zaburzenia układu immunologicznego, charakteryzującego się demielinizacją powiązaną z dużą komponentą zapalną oraz wtórną patologią aksonów. Enzymami, które wydają się być zaangażowane w rozwój patologii są zewnątrzkomórkowe metaloproteazy, głównie MMP-9 [11]. Aktywną MMP-9 znaleziono w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów oraz w ogniskach uszkodzeń. MMP-9 może być zaangażowana w degradację mieliny i białek błony podstawnej naczyń. Konsekwencją tego drugiego procesu jest uprzepuszczalność ściany naczyń i infiltracja komórek zapalnych krwi do mózgu. Potwierdzeniem roli metaloproteaz są badania prowadzone u zwierząt z autoimmunologicznym zapaleniem mózgu (EAE), eksperymentalnym modelem MS. Na podstawie pozytywnej korelacji pomiędzy podwyższonymi poziomami MMPs a nasileniem objawów klinicznych choroby zakłada się istnienie prawdopodobnego związku przyczynowego. Mocnym poparciem tej hipotezy jest wyraźne osłabienie zmian chorobowych po podaniu inhibitorów MMPs. Podobny efekt miało wykluczenie genu kodującego tę metaloproteazę u zwierząt transgenicznych. Z inhibicją MMP-9 przez interferon beta można łączyć sukces terapeutyczny leczenia pacjentów tym lekiem.

Dane z literatury zwracają także uwagę na rolę tkankowego aktywatora plazminogenu w rozwoju zmian chorobowych w EAE [11]. W ostrej fazie zapalenia mózgu tPA ma podobnie jak MMP-9 działanie prozapalne, indukując aktywne formy cytokin prozapalnych z ich prekursorów (np. TNF alfa). W fazie remisji choroby może spełniać rolę protekcyjną w mechanizmie usuwania depozytów fibryny, które nasilają uszkodzenie aksonalne. Pomimo ciągłego postępu wiedzy dotyczącej patologii SM, jest ona w dalszym ciągu jedynie fragmentaryczna. Oprócz wspomnianego wyżej interferonu beta, terapia przy pomocy inhibitorów enzymów zewnątrzkomórkowych jest nadal w stadium badań wstępnych.

3) Choroba Parkinsona (PD). Etiologia choroby Parkinsona związana jest z mutacją genów kodujących alfa-synukleinę (PARK-1) i białko parkin (PARK 2). W rozwoju tej choroby obserwuje się odkładanie agregatów synukleiny w postaci tzw. ciałek Lewiego, specyficznie w neuronach dopaminergicznych. Tworzenie agregatów synukleiny, podobnie jak i innych agregatów białkowych w chorobach zwyrodnieniowych mózgu, wiązane jest z zaburzeniem funkcji proteasomu. Inhibicja proteasomu w komórkach neuronalnych ekspresjo-

nujących synukleinę powoduje agregację tego białka i prowadzi do apoptozy [13].

4) Choroba Huntingtona (HD). Rozległe uszkodzenie neuronalne w korze mózgu i w prążkowie spowodowane jest nadmierną ekspresją poliglutaminy, kodowanej powtarzającymi sekwencjami trinu-kleotydu CAG (adeniny, guaniny i cytozyny). Łańcuchy białkowe zawierające poliglutaminę stają się białkami toksycznymi. Istniejące dane są fragmentaryczne i wskazują na zaburzenie funkcji proteasomu [16]. Dane doświadczalne sugerują również udział kaspazy-1. Zaobserwowano, że u mutantów pozbawionych kaspazy-1 notuje się opóźnione pojawianie się agregatów. Podobny efekt miało podanie inhibitora tej kaspazy.

Wydaje się, że racjonalnym podejściem terapeutycznym, w omówionych zwyrodnieniach przewlekłych, byłoby zablokowanie ekspresji lub też przyspieszenie degradacji białek potencjalnie toksycznych. To drugie postępowanie dałoby pozytywne efekty tylko wtedy, jeśli fragmenty degradowanych białek nie okazałyby się być bardziej patogenne niż nietknięty łańcuch białkowy. Ze względu na sugerowaną rolę dysfunkcji proteasomu we wszystkich omawianych chorobach zwyrodnieniowych wydaje się, że aktywacja tego układu mogłaby przynieść pozytywne wyniki w leczeniu wielu schorzeń neurodegeneracyjnych.

Większość badaczy uważa, że śmierć komórek w przewlekłych chorobach zwyrodnieniowych ma charakter apoptotyczny. W badaniach *post mortem* aktywne kaspazy znaleziono w przypadkach AD (kaspaza 3, 6, 9), PD (kaspaza 3, 8, 9) i w chorobie Huntingtona (kaspaza 1 i 8). Z faktu, że apoptoza, w przeciwieństwie do nekrozy, jest procesem przedłużonym, wymagającym aktywacji nowych genów i syntezy nowych białek, wynikają nowe możliwości terapeutyczne [12]. Niestety, podejmowane próby protekcji komórek nerwowych przez stosowanie inhibitorów kaspaz nie dały do tej pory jednoznacznych wyników, między innymi ze względu na brak selektywności. W układach modelowych inhibitory kaspaz jedynie opóźniają utratę neuronów, zwalniając przebieg neurodegeneracji. Należy mieć pełną świadomość, że modele zwierzęce odzwierciedlają jedynie pewne aspekty choroby, ale żaden z nich nie daje odbicia całokształtu patologii ludzkiej. Dalsza, wnikliwa analiza mechanizmów leżących u podłoża chorób zwyrodnieniowych z pewnością przyczyni się do znaczącego postępu w opracowaniu skutecznych metod terapii.

Piśmiennictwo

1. Asai A., Tanahashi N., Qiu J., Saito N., Chi S., Kawahara N., Tanaka K., Kirino T.: Selective proteasomal dysfunction in the hippocampal CA1 region after tran-

- sient forebrain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2002, 22, 705–709.
2. Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J.-O., Leverk A.-N., Bahr B.A., Mallard C., Hagberg H.: Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia. A mechanism of „pathological apoptosis”? *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 10191–10198.
 3. Chan S.L., Mattson M.P.: Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J. Neurosci. Res.*, 1999, 58, 167–190.
 4. Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L.: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, 65, 801–847.
 5. Domańska-Janik K., Zabłocka B., Zalewska T., Ostrowski J.: Ischemia-induced modifications of protein components of rat brain postsynaptic densities. *Neurochem. Intern.*, 1999, 34, 329–336.
 6. Drexler H.C.: Activation of cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 855–860.
 7. Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Zalewska T.: Is calpain activity regulated by autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays*, 1992, 14, 549–556.
 8. Lapchak P.A., Chapman D.F., Zivin J.A.: Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*, 2000, 31, 3034–3040.
 9. Lee M.-S., Kwon Y.T., Li M., Peng J., Friedlander R.M., Tsai L.-H.: Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature*, 2002, 405, 360–364.
 10. Leung D., Abbenante G., Fairlie D.P.: Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 305–340.
 11. Lo E.H., Wang X., Cuzner M.L.: Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J. Neurosci. Res.*, 2002, 69, 1–9.
 12. Mattson M.P., Furukawa K.: Programmed cell life: anti-apoptotic signaling and therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 1996, 9, 191–205.
 13. McNaught K.S., Jenner P.: Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson’s disease. *Neurosci. Lett.*, 2001, 297, 191–194.
 14. Mun-Bryce S., Rosenberg G.A.: Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1998, 18, 1163–1172.
 15. Nath R., Raser K.J., Stafford D., Hajimohammadreza I., Posner A., Allen H., Talanian R.V., Yuen P., Gilbertsen R.B., Wang K.K.: Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells; contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.*, 1996, 319, 683–690.
 16. Naujokat C., Hoffmann S.: Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab. Invest.*, 2002, 82, 965–980.
 17. Neumar R.W., Hagle S.M., DeGracia D.J., Krause G.S., White B.C.: Brain μ -calpain autolysis during global cerebral ischemia. *J. Neurochem.*, 1996, 66, 421–424.
 18. Nicotera P., Leist M., Fava E., Berliocchi L., Volbracht C.: Energy Requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol.*, 2000, 10, 276–282.
 19. Nixon R.A., Saito K.-I., Grynspan F., Griffin W.R., Katayama S., Honda T., Mohan P.S., Shea T.B., Beerman M.: Calcium-activated neutral protease (calpain) system in aging and Alzheimer’s disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1994, 747, 77–91.
 20. Ozawa H., Keane R.W., Marcillo A.E., Diaz P.H., Dietrich W.D.: Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol.*, 2002, 177, 306–313.
 21. Raff M.C.: Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992, 356, 397–400.
 22. Rideout H.J., Stefanis L.: Caspase inhibition: a potential therapeutic strategy in neurological diseases. *Histol. Histopathol.*, 2001, 16, 895–908.
 23. Rosenberg G.A.: Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*, 1997, 48, 921–926.
 24. Shea T.B., Beermann M.L.: regulation of neuronal migration and neuritogenesis by distinct surface proteases. Relative contribution of plasmin and thrombin-like protease. *FEBS Lett.*, 1992, 307, 190–194.
 25. Siesjo B.K., Bengtsson F.: Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia and spreading depression. An unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1989, 9, 127–140.
 26. Squier M.K.T., Miller A.C.K., Malkinson A.M., Cohen J.J.: Calpain activation in apoptosis. *J. Cell Physiol.*, 1994, 159, 229–237.
 27. Taylor J.P., Hardy J., Fischbeck K.H.: Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 2002, 296, 1991–1995.
 28. Troy C.M., Salvesen G.S.: Caspases on the brain. *J. Neurosci. Res.*, 2002, 69, 145–150.
 29. Wang K.K.W.: Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.*, 2000, 23, 20–26.
 30. Wang K.K.W., Yuen P.-W.: Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *TIPS*, 1994, 15, 412–419.
 31. Wilkinson K.D.: Unchaining the condemned. *Nature*, 2002, 419, 351–353.
 32. Zalewska T., Zabłocka B., Saido T.C., Domańska-Janik K.: On the mechanism of calpain activation under ischemia. W: *Neurochemistry. Red. Teelken A.W., Korf J., Plenum Press, New York*, 1997, 407–414.
 33. Zalewska T., Zabłocka B., Saido T.C., Zając H., Domańska-Janik K.: Dual response of calpain to rat brain postdecapitative ischemia. *Mol. Chem. Neuropathol.*, 1998, 33, 185–197.
 34. Zalewska T., Ziemka-Nałęcz M., Sarnowska A., Domańska-Janik K.: Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia. *Acta Neurobiol. Exp.*, 2002, 62, 53–61.
 35. Ziemka-Nałęcz M., Zalewska T., Zając H., Domańska-Janik K.: Decrease of PKC precedes other cellular signs of calpain activation in area CA1 of the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Neurochem. Intern.*, 2003, 42, 205–214.